

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث 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 SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire /Biologie Moléculaire des  
Procaryotes

---

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

---

Présenté par :

- Amari Souhila
- Berkane Samira

Devant le jury composé de :

Président : M<sup>me</sup>. Boumaaza Awatif

M.A.A. Université de Guelma.

Examineur : M<sup>r</sup>. Benouareth djamel Eddine

Prof. Université de Guelma.

Encadreur : M<sup>me</sup>. Khallef Messaouda

M.C.B. Université de Guelma.

Juin 2015

# Remerciements

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude, avant tout à Dieu le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné le courage et la force pour mener à bout ce modeste travail.*

*Nous remercions chaleureusement notre encadreur, Madame Khallef Massaouda, pour ses judicieux conseils, ses directives précieuses, et de son soutien scientifique et moral au cours de la réalisation pratique et théorique de ce travail.*

*Nous remercions aussi Madame Boumaaza Awatif. De nous avoir honorés de sa présence et d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance de ce mémoire.*

*Nous voudrions également remercier vivement Pr. Benouareth Djamel Eddine, pour avoir accepté de faire partie de ce jury.*

*Nos plus vifs remerciements s'adressent aussi à toutes les techniciennes des laboratoires pour leur gentillesse et leur disponibilité tout au long de la période du travail.*

*Nos remerciements vont enfin à toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

**MERCI**

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail :*

*Aux deux êtres les plus chers, mes parents pour tout ce qu'ils m'ont offert  
d'amour et d'affection*

*A mes frères :*

*Hamid, Hassen, Salim, Nacer, et ma sœur Houria pour leur extrême  
serviabilité et compréhension*

*Aux enfants*

*Islem, Manel, Sara, chourouk, Marwa, younes, hajer et youcef*

*A Samira mon binome*

*A mes amies :*

*Kaltoum, Salma, Hana, Ebtesam, Emen, Hoda et Nabila*

*A toute ma famille et surtout mes cousines :*

*Meriem, Nasima, Basma, Djanet, Layla, Hasna, Latifa et Salma*

*A toute ma promotion*

*Souhila*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail :*

*A mes frères :*

*Ibrahim, Nabil, Tayeb, Lakhdar, pour leur extrême serviabilité et compréhension.*

*A mes sœurs:*

*Zahia, Habiba, Radia, Halima, Zayneb et Meriem.*

*À Souhila mon binome*

*Aux enfants*

*Sami, Ayoub, Aymen, Yousef, Abd arraouf*

*Amora et Amina.*

*A mes amies :*

*Kaltoum, Salma, Hana, Ebtesam, Emen, Hoda, Nabila et Fatima*

*A toute ma famille et surtout mes cousines :*

*Soussen, Mouna, Meriem, Amina, Ikram et Romays.*

*A toute ma promotion*

*Samira*

# Table des matières

Liste des figures.

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Introduction.....1

## **Partie bibliographique :**

### **Chapitre I : Caractérisation des boues de station d'épuration**

1- Définition et origine des eaux usées .....3

1-1- Définition des eaux usées.....3

1-2- Origine des eaux usées.....3

1-2-1- Les eaux usées domestiques .....3

1-2-2- Les eaux usées industrielles .....3

1-2-3- Les eaux agricoles.....4

1-2-4- Les eaux pluviales.....4

2- Traitements des eaux usées.....4

2-1- Les prétraitements.....5

2-2- Les traitements primaires.....5

2-3- Les traitements secondaires.....6

2-3-1- Les traitements secondaires aérobies .....6

2-3-2- Les traitements secondaires anaérobies.....8

2-4- Les traitements physico-chimiques.....	8
3- Les différents types des boues.....	8
3-1- Les boues primaires.....	8
3-2- Les boues secondaires .....	9
3-3- Les boues mixtes.....	9
3-4- Les boues physico-chimiques.....	9
4- Compositions et caractéristiques des boues.....	10
4-1- Compositions des boues.....	10
4-1-1- Les éléments utiles.....	10
4-1-1-1- Les éléments fertilisants.....	10
4-1-1-2- La matière organique.....	12
4-1-1-3- Les microorganismes utiles.....	12
4-1-2- Les éléments indésirables.....	12
4-1-2-1- Les éléments traces métalliques.....	12
4-1-2-2- Les composés traces organiques.....	13
4-1-2-3- Les microorganismes pathogènes.....	13
4-2- Caractéristiques des boues.....	14
4-2-1- Matière sèche et siccité.....	14
4-2-2- Matière en suspension.....	14
5- Traitements des boues.....	14
5-1- Définition.....	14
5-2- Objectifs.....	14
5-3- Système de traitement des boues.....	15

5-3-1- Les traitements d'épaississement et déshydratation.....	15
5-3-2- Les traitements de stabilisation.....	15
5-3-3- Les traitements d'hygiénisation.....	17
6- Destination finale des boues.....	17
6-1- La mise en décharge.....	18
6-2- Incinération.....	18
6-3- L'oxydation par voie humide (OVH).....	19
6-4- Rejet en mer.....	19
6-5- Valorisation agricole.....	19
7- Intérêt d'une utilisation agricole des boues.....	20
7-1- Application des boues sur les sols.....	20
7-1-1- Définition de l'épandage.....	20
7-1-2- Le sol adapté à l'épandage.....	20
7-1-3- Relation boue sol.....	21
7-2- Conditions d'utilisations agricoles des boues.....	22
7-3- Les risques liés à la valorisation agricole des boues.....	23
7-3-1- Les risques environnementaux.....	23
7-3-2- Risque pour la santé humaine.....	23

## **Chapitre II : Les tests de génotoxicité**

1- Généralités.....	24
2- Les types des tests.....	24
2-1- Test de mutation génique sur procaryotes (Test d'Ames).....	26
2-1-1- Définition et principe.....	26

2-1-2- Les souches bactériennes utilisées.....	27
2-1-3- Le système d'activation métabolique (S9 Mix).....	28
2-1-4- Avantages et inconvénients du test Ames. ....	29
2-2- Test de génotoxicité sur eucaryotes (plantes supérieures).....	30
2-2-1- L'importance des plantes supérieures en génotoxicité.....	30
2-2-2- Les différents tests de génotoxicité associés aux plantes supérieures.....	31
2-2-2-1- Test d'aberration chromosomique.....	31
2-2-2-2- Induction de micronoyaux.....	32
2-2-2-3- Induction des échanges de chromatides sœurs.....	32
2-2-2-4- Test des comètes.....	32
2-2-3- <i>Allium cepa</i> .....	33
2-2-3-1- Présentation générale d' <i>Allium cepa</i> .....	33
2-2-3-2- Les critères de génotoxicité déterminés sur <i>Allium cepa</i> .....	33
2-2-3-3- Les différents paramètres Analysés par le test <i>Allium cepa</i> .....	34

## **Partie pratique**

### **Chapitre I : Matériel et Méthodes**

1- Présentation et fonctionnement du site de prélèvement.....	36
1-1- Présentation et localisation de la STEP.....	36
1-2- Principe et fonctionnement du système de traitement.....	36
2- Prélèvement des boues.....	37
3- Test de mutagénicité (test d'Ames).....	37
3-1- Principe du test.....	37
3-2- Matériel biologique.....	37



3-3- Confirmation des génotypes.....	38
3-3-1-Activation des souches tests.....	39
3-3-2- Vérification des caractères.....	40
3-4- Le test de mutagenèse par la méthode standard avec préincubation.....	41
3-4-1- Le principe.....	41
3-4-2- La technique.....	41
3-4-3- L'analyse statistique.....	41
4- Test de génotoxicité (test <i>d'Allium cepa</i> ).....	42
4-1- Matériel biologique.....	42
4-2- Le principe.....	42
4-3- La technique.....	42
.4-4- L'analyse statistique.....	44

## **Chapitre II. Résultats et discussion**

1-Résultats du test Ames.....	45
2-Résultats du test <i>d'Allium cepa</i> .....	49
Conclusion.....	53

Références bibliographiques

Annexes

# Liste des figures

<b>Figures</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>Figure 1</b>	Principe de fonctionnement des boues activées.	<b>7</b>
<b>Figure 2</b>	Les différents types des boues d'épuration.	<b>9</b>
<b>Figure 3</b>	Les différents types des tests de génotoxicité.	<b>25</b>
<b>Figure 4</b>	Le principe de test Ames.	<b>26</b>
<b>Figure 5</b>	Préparation standard du S9 Mix.	<b>29</b>
<b>Figure 6</b>	Schéma de station d'épuration de la ville de Guelma.	<b>36</b>
<b>Figure 7</b>	Les étapes du test des AC dans les racines d' <i>Allium cepa</i> .	<b>44</b>
<b>Figure 8</b>	La réclamation de l'histidine.	<b>45</b>
<b>Figure 9</b>	L'effet des UV sur les souches d'Ames et la souche sauvage.	<b>45</b>
<b>Figure 10</b>	L'effet de l'Ampicilline et du CV sur les souches d'Ames.	<b>46</b>
<b>Figure 11</b>	Les résultats de test Ames sur les souches <i>S. typhimurium</i> TA98 et TA100 avec et sans activation métabolique.	<b>48</b>
<b>Figure 12</b>	Les aberrations chromosomiques qui induisent par les boues sur <i>Allium cepa</i> .	<b>52</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableaux</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>Tableau 1</b>	Les souches bactériennes du test d'Ames.	<b>28</b>
<b>Tableau 2</b>	Exemples des plantes étudiées et tests associés.	<b>33</b>
<b>Tableau 3</b>	Génotype spécifique des souches TA98 et TA100.	<b>38</b>
<b>Tableau 4</b>	L'analyse de mutagénicité des boues par <i>S. typhimurium</i> TA98 et TA100 avec et sans activation métabolique.	<b>47</b>
<b>Tableau 5</b>	Effets des boues sur l'indice mitotique et les phases de mitose dans les racines d' <i>Allium cepa</i> .	<b>50</b>
<b>Tableau 6</b>	Pourcentage des anomalies chromosomiques des boues dans les racines d' <i>Allium cepa</i> .	<b>51</b>

# Liste des abréviations

<b>ACs</b>	Aberrations chromosomiques.
<b>ADN</b>	Acide désoxy ribonucléique.
<b>Al</b>	Aluminium.
<b>Ampi</b>	Ampicilline.
<b>ANs</b>	Anomalies nucléaires.
<b>Bio</b>	Biotine.
<b>C</b>	Carbone.
<b>Ca</b>	Calcium.
<b>CET</b>	Centres d'enfouissement technique.
<b>CTO</b>	Composés traces organiques.
<b>CV</b>	Cristal violet.
<b>DO</b>	Densité optique.
<b>ECS</b>	Echanges de chromatides sœurs.
<b>ETM</b>	Eléments traces métalliques.
<b>Fe</b>	Fer.
<b>GN</b>	Gélose nutritive.
<b>HCl</b>	Chlorure d'hydrogène.
<b>His</b>	Histidine.
<b>IM</b>	Indice mitotique.
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides.
<b>MES</b>	Matière en suspension.
<b>Mg</b>	Magnésium.
<b>MMS</b>	Méthyle méthane sulfonate.
<b>MCN</b>	Micronoyau.
<b>MO</b>	Matière organique.
<b>Ms</b>	Matière sèche.
<b>N</b>	Azote.
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium.
<b>NADP</b>	Nicotine adenine dinucleotide phosphate.
<b>NaOH</b>	Hydroxyde de sodium.
<b>ONA</b>	Office National d'Assainissement.
<b>P</b>	Phosphore.
<b>pH</b>	Potentiel d'hydrogène.
<b>S</b>	Soufre.
<b>STEP</b>	Station d'épuration.
<b>UV</b>	Ultra-violet.
<b>Zn</b>	Zinc.

# **Introduction**

## Introduction

En Algérie, le volume d'eaux usées évacuées à travers le réseau d'assainissement est estimé à peu près de 60 millions de m<sup>3</sup>/an. La plus part de ces eaux usées sont rejetées dans le milieu récepteur et provoquent une menace considérable pour les écosystèmes, des risques graves pour la santé publique et réduit aussi les ressources en eau utilisable.

Pour la protection de ces ressources dans ce pays, ces eaux sont traitées par des stations d'épuration qui représentent environ 130000m<sup>3</sup>/ans (Chibani, 2010).

Le traitement des eaux conduit toujours à la formation de boues que l'on sépare de l'eau traitée. Ces boues se présentent à la sortie de la station d'épuration comme un liquide à forte teneur en eau ou sèche, les boues sont considérées comme de bons fertilisants agricoles, riches en matière organique et en macronutriments azotés et phosphatés, elles devraient être utilisées lorsque cela présente un intérêt agronomique pour les cultures ou lorsqu'il peut en résulter une amélioration de la qualité du sol (Abessa et Tabet, 2014).

Du faite de leurs caractéristiques, plusieurs voies d'élimination ou de valorisation de ces boues sont possibles : le largage en mer, la mise en décharge, l'incinération et l'épandage agricole.

Cependant, les boues d'épuration sont riches en substances chimiques et en micro-organismes dont les effets sont indésirables soit pour la conservation des sols, soit pour la qualité alimentaire des cultures, soit pour la santé de l'homme et des animaux. Elles peuvent également être chargées en divers polluants : éléments traces métalliques, substances organiques.

C'est dans cette optique, deux essais ont été développés pour mettre en évidence la génotoxicité et la mutagénicité des boues liquides et sèches. Un test de mutagénèse chez les procaryotes (test d'Ames) sur les souches TA 98 (détectent des mutations par décalage du cadre de lecture), TA 100 (détectent des mutations de type substitutions de paires de bases), avec et sans activation métabolique et un test de génotoxicité des aberrations chromosomiques sur plantes supérieures (test *Allium cepa*) au niveau des méristèmes racinaires des d'oignon, du fait que les cellules méristématiques sont des cellules à fort pouvoir de division.

Notre mémoire est structuré en deux parties interdépendantes :

La première partie présente une synthèse bibliographique qui englobe deux chapitres, chapitre I : consacré à la présentation de différents types du traitement des eaux usées et des boues avec la caractérisation de ces dernières. Le chapitre II : présente deux tests l'un consiste à évaluer l'activité mutagène par le test d'Ames on utilisant deux souches de *Salmonella typhimurium* (TA98 et TA100) et l'autre pour évaluer la génotoxicité qui utilisent des plantes supérieures tel qu'*Allium cepa*.

La deuxième partie expérimentale, porte sur les protocoles expérimentaux globaux de toutes les techniques employées qui sont détaillé dans le chapitre III, suivi des résultats obtenus ainsi que de leur discussion dans le chapitre IV, le mémoire est clôturée par une conclusion.

**Partie**  
**bibliographique**



# **Chapitre I :**

Caractérisation des boues de  
station d'épuration

## **1-Définition et origine des eaux usées**

### **1-1-Définition des eaux usées**

La pollution de l'eau est une modification défavorable ou nocive des propriétés physico-chimiques et biologiques, produite directement ou indirectement par les activités humaines, les rendant impropres à l'utilisation normale établit.

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 (Digniolle, 1980).

### **1-2-Origine des eaux usées**

Suivant l'origine et la qualité des substances polluantes, on distingue quatre catégories d'eaux usées :

#### **1-2-1-Les eaux usées domestiques**

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 et de toilette chargées de matières organiques azotées, phosphatées et de germes fécaux (Digniolle, 1980).

#### **1-2-2-Les eaux usées industrielles**

Elles sont très différentes des eaux usées domestiques, leurs caractéristiques varient d'une industrie à l'autre, en plus des matières organiques, azotées ou phosphorées, elles sont chargées en différentes substances chimiques organiques et métalliques. Selon leur origine industrielle elles peuvent également contenir :

- Des graisses (industries agroalimentaires, équarrissage);
- Des hydrocarbures (raffineries) ;
- Des métaux (traitement de surface, métallurgie);
- Des acides, des bases et divers produits chimiques (industries chimiques divers, tanneries);
- De l'eau chaude (circuit de refroidissement des centrales thermiques);

- Des matières radioactives (centrales nucléaires, traitement des déchets radioactifs).

Avant d'être rejetées dans les réseaux de collecte, les eaux usées industrielles doivent faire l'objet d'un traitement. Elles ne sont mélangées aux eaux domestiques que lorsqu'elles ne présentent aucun danger pour les réseaux de collecte et ne perturbent pas le fonctionnement des stations d'épurations (Metahri, 2012).

### **1-2-3-Les eaux agricoles**

L'agriculture est une source de pollution des eaux non négligeable car elle apporte les engrais et les pesticides. Les eaux agricoles issues de terre cultivée chargés d'engrais nitrates et phosphatés, qu'ils ne seraient pas finalement retenus par le sol et assimilés par les plantes, conduisent par ruissellement à un enrichissement en matière azotées ou phosphatées des nappes les plus superficielles et des eaux des cours d'eau ou des retenues (Metahri, 2012).

### **1-2-4-Les eaux pluviales**

Les eaux de pluie ruissellent dans les rues où sont accumulés polluants atmosphériques, poussières, débris, suies de combustion et hydrocarbures rejetés par les véhicules. Les eaux de pluies, collectées normalement à la fois avec les eaux usées puis déversées dans la canalisation d'assainissement et acheminées vers une station d'épuration, sont souvent drainées directement dans les rivières entraînant ainsi une pollution intense du milieu aquatique (Digniolle, 1980).

## **2-Traitements des eaux usées**

L'objectif principal du traitement est de produire des effluents traités à un niveau approprié et acceptable du point de vue du risque pour la santé humaine et l'environnement. À cet égard, le traitement des eaux résiduaires le plus approprié est celui qui fournit, avec certitude, des effluents de qualité chimique et microbiologique exigée pour un certain usage spécifique, à bas prix et des besoins d'opération et d'entretien minimaux.

Les stations d'épuration des eaux résiduaires, indépendamment du type de traitement, réduisent la charge organique et les solides en suspension et enlèvent les constituants chimiques des eaux usées qui peuvent être toxiques aux récoltes, ainsi que les constituants biologiques (microbes pathogènes) qui concernent la santé publique en général (Djeddi, 2007).

Le processus d'épuration des eaux usées comprend trois grandes étapes présentées ci-dessous, les prétraitements, les traitements primaires et secondaires parfois suivis par un quatrième niveau de traitement, appelé traitement tertiaire.

### **2-1-Les prétraitements**

Après collecte et acheminement vers les stations d'épuration, le processus d'épuration des eaux usées peut débuter. A ce stade, elles contiennent de nombreuses matières très hétérogènes, grossières, et potentiellement dangereuses pour les machines. La première étape de traitement consiste en un prétraitement visant à éliminer les déchets volumineux susceptibles d'endommager les équipements, par simples procédés de séparation physique. Ainsi on y retrouve une étape de dégrillage au cours de laquelle les eaux usées passent au travers d'une grille dont les barreaux sont plus ou moins espacés, retenant ainsi les matières les plus volumineuses. L'étape de dessablage vient ensuite débarrasser les eaux usées des sables et graviers par sédimentation.

Les matériaux récupérés sont alors lavés puis, selon la qualité du lavage, seront soit réutilisés soit envoyés en décharge. Une étape de dégraissage (ou encore appelée déshuilage) vient parachever ces prétraitements. Elle consiste à racler les particules graisseuses se trouvant en surfaces des eaux naturellement ou par flottation via une injection d'air au fond de l'ouvrage (Anaëlle, 2009).

### **2-2-Les traitements primaires**

Une fois ces étapes de dégrossissage réalisées, les eaux usées vont subir des procédés physiques ou physico-chimiques visant à éliminer, par décantation la charge de matière organique et minérale en suspension. C'est ce que l'on appelle le traitement primaire.

Ces traitements ne permettent d'obtenir qu'une épuration partielle des eaux usées. L'eau va alors passer au travers de bassins décanteurs, à faible vitesse permettant ainsi la sédimentation des particules au fond des bassins, et leur enlèvement via des pompes.

Une étape de coagulation-flocculation préalable à la décantation permet d'améliorer l'épuration. C'est le traitement physico-chimique Cette technique comporte une première phase d'adjonction d'un réactif (sels de fer ou d'aluminium) qui provoque l'agglomération des particules en suspension, provoquant ainsi leur chute au fond de l'ouvrage. 90% des matières en suspension peuvent alors être éliminées (Anaëlle, 2009).

Les matières solides se déposent au fond d'un ouvrage appelé "décanteur" pour former les "boues primaires". Ces dernières sont récupérées au moyen d'un système de raclage. Ce traitement élimine 50 à 55 % des matières en suspension (Daloz, 2007).

### **2-3-Les traitements secondaires :**

Le traitement secondaire a pour objectif principal l'élimination des composés solubles d'origine organique. Parallèlement, la floculation de la biomasse permet de piéger les matières en suspension restant à l'issue du traitement primaire.

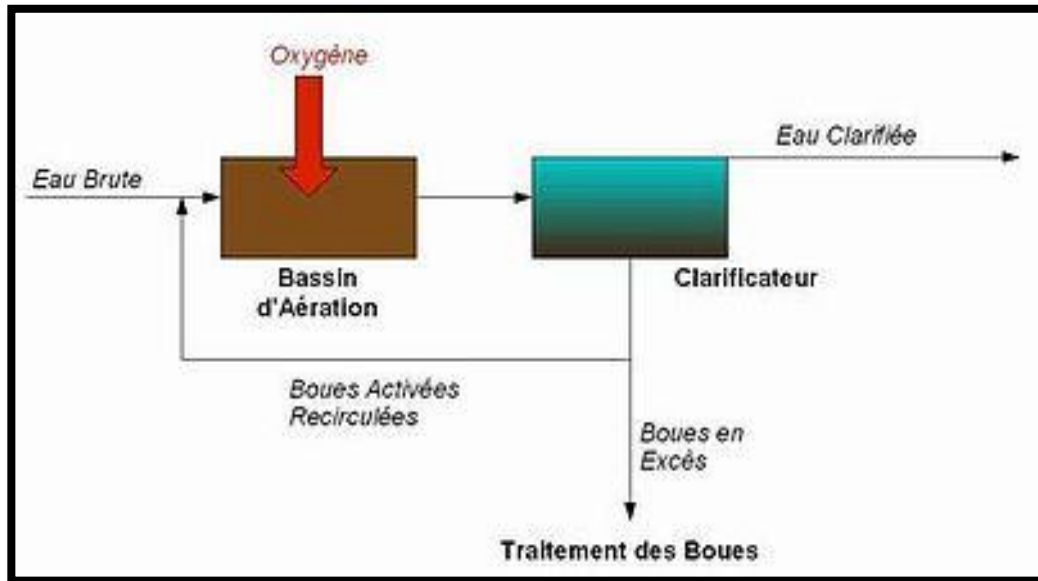
Ces traitements consistent en une consommation de la matière organique contenue dans les eaux usées et d'une partie des matières nutritives (azote et phosphore) par des microorganismes déjà présents dans ces eaux, et ce généralement en présence d'air ou d'oxygène, la croissance de la faune et de la flore donne lieu à des floes plus ou moins abondants qu'on éliminera par décantation ou filtration (Derouiche, 2012).

#### **2-3-1-Les traitements secondaires aérobies**

##### **2-3-1-1-Le traitement par boues activées**

Dans ces procédés, les bactéries se développent dans des bassins alimentés d'une part en eaux usées à traiter et d'autre part en oxygène par des apports d'air. Les bactéries en suspension dans l'eau des bassins, sont donc en contact permanent avec les matières polluantes dont elles se nourrissent et avec l'oxygène nécessaire à leur assimilation (Edeline, 1997).

Après ce traitement les eaux sont à nouveau décantées une partie des boues est renvoyée dans les bassins d'activation pour maintenir la population des microorganismes intervenant dans l'épuration, le reste des boues, appelé boues en excès, est soutiré pour subir un traitement (Fig.1), on peut prolonger le temps d'aération de façon à obtenir une minéralisation plus forte des boues. C'est le procédé le plus utilisé (Derouiche, 2012).



**Figure 1** : Principe de fonctionnement des boues activées (8).

### 2-3-1-2- Le traitement par lit bactérien

Le principe du traitement par lit bactérien consiste à faire ruisseler l'eau à traiter, préalablement décantée (traitement primaire), sur un support poreux contenant les micro-organismes épurateurs. L'eau à traiter est répartie uniformément à la surface du filtre (dispersion en pluie par une grille de répartition), puis suit une phase d'aération pour apporter dans toute la biomasse du lit l'oxygène nécessaire au maintien des bonnes conditions pour la microflore, l'objectif final n'étant pas de développer une biomasse, mais de restituer une eau purifiée. Une étape de séparation liquide-biomasse est assurée par un dispositif de clarification. Comme pour les boues activées, une partie de ces boues sert à réensemencer les bassins biologiques tandis que le reste est transféré vers la filière boue (Jarde, 2002).

### 2-3-1-3- Le traitement par lagunage

Ce processus d'épuration biologique permet l'élimination des matières organiques biodégradables avec production de sels minéraux, entraînant un phénomène d'eutrophisation (souligné par la production d'algues). Celui-ci est profitable au lagunage, car la photosynthèse des algues qui se forment fournit l'oxygène nécessaire au développement des bactéries qui vont dégrader cette matière organique selon les processus de fermentation aérobie. Le lagunage permet également l'élimination de la pollution microbienne, ce qui est un avantage par rapport aux autres techniques d'épuration. Les boues vont se concentrer sur le fond des

lagunes (bassins de terre), intervenir dans la biologie du système et ne devront pas être évacuées avant 5 ou 10 ans (Jarde, 2002).

### **2-3-2-Les traitements secondaires anaérobies**

Dans ce genre de traitement on utilise essentiellement la fosse de double étage, qui consiste en une consommation des matières organiques par les microorganismes présents dans l'eau en absence d'air. Il se produit une fermentation méthanique dans une première fosse et on recueille ainsi les eaux épurées dans une seconde fosse placée sous la première pour qu'elles puissent décanter, ce traitement est de moins en moins utilisé car il est difficile à conduire et son mauvais fonctionnement peut avoir de graves inconvénients (odeurs nauséabondes, risques d'explosion, etc.). En outre les quantités des gaz produites sont trop faibles pour qu'on puisse penser à les récupérer (Jaroz, 1985).

### **2-4-Les traitements physico-chimiques**

Les eaux prétraitées sont additionnées de réactifs chimiques, flocculants ou coagulants (polyelectrolytes, chaux....) qui agglomèrent les particules solides sous formes de flocons décantables, une décantation sépare ensuite l'eau et les boues (Sbih., 1990). Les traitements physico-chimiques permettent d'agglomérer ces particules par adjonction d'agents coagulants et flocculants (sels de fer ou d'alumine, chaux...). Les amas de particules ainsi formés, ou "flocs", peuvent être séparés de l'eau par décantation ou par flottation (Mathian, 1986).

## **3-Les différents types des boues**

Les boues des stations d'épuration sont les principaux déchets produits par une station d'épuration à partir des effluents liquides (Fig.2). Les principaux types de boues proposés au recyclage en agriculture sont les suivants :

### **3-1-Les boues primaires**

Elles sont issues du traitement primaire et sont produites par simple décantation, en tête de station d'épuration. Ces boues sont fraîches, c'est-à-dire non stabilisées (forte teneur en matière organique) et fortement fermentescibles. De par la nature des nouvelles installations, elles tendent à disparaître (permin, 2003).

### 3-2-Les boues secondaires

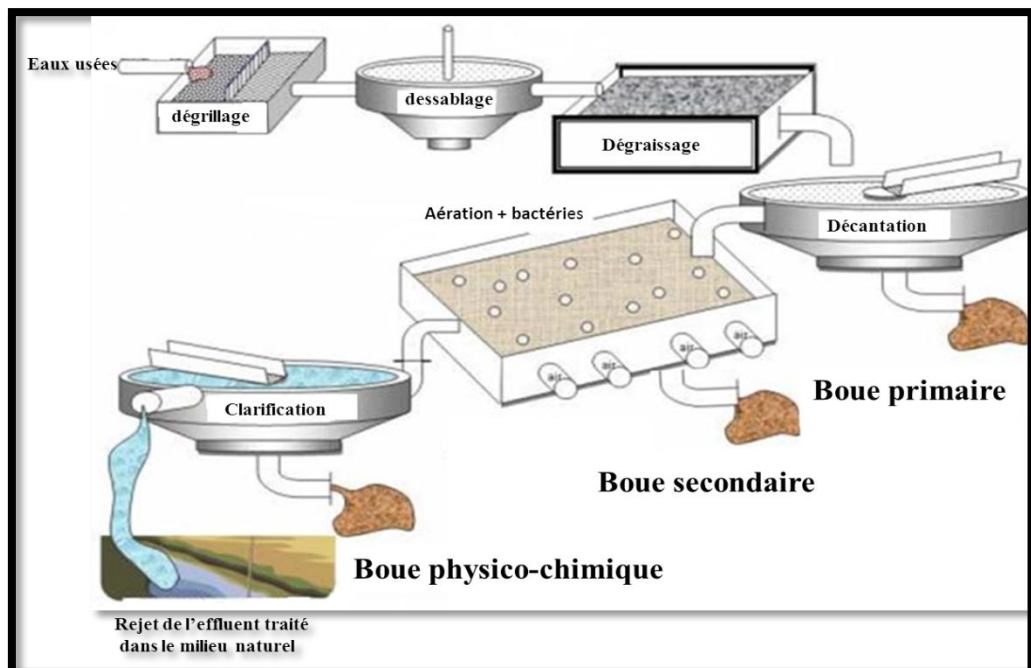
Qui résultent de l'activité vitale des micro-organismes, les boues ont une structure floculée et sont séparées dans des décanteurs secondaires ; dans les filtres biologiques (lits bactériens). Il s'agit de boues des lits bactériens prélevées dans les décanteurs secondaires dans les bassins de boues activées. La plus grande partie est recirculée dans les bassins comme boues de retour et seules les boues en excès sont évacuées (Koller, 2004).

### 3-3-Les boues mixtes

Le mélange de boues primaires et secondaires conduit à l'obtention des boues mixtes, leur composition est dépendante de quantité de boues primaires et secondaires produite très fermentescibles (pernin, 2003).

### 3-4-Les boues physico-chimiques

Variante du type précédent, les matières organiques particulaires ou colloïdales contenues dans les eaux usées sont agglomérées par addition d'un réactif coagulant (sels de fer ou d'aluminium) ; 90 % des MES peuvent ainsi être captées. Séparées par décantation, les boues obtenues renferment une partie importante de sels minéraux issus des eaux brutes et de l'agent coagulant (Azzabi, 2012).



**Figure 2:** Les différents types des boues d'épuration (9).



## 4-Compositions et caractéristiques des boues

### 4-1-Compositions des boues

La composition des boues varie en fonction de l'origine des eaux usées, de la période de l'année et de type de traitement et de conditionnement pratiqué dans la station d'épuration (Werther et Ogada, 1999). Les boues des stations d'épuration sont constituées généralement de :

- Particules minérales (argiles, carbonates, silicates, phosphate...);
- Débris organique grossiers (fibres textiles, résidus végétales, matières plastiques);
- Biomasse morte (résidus de cellules bactérienne, d'algues...);
- Polymère organique issu de l'activité de biomasse (polysaccharides, protéines...);
- Constituants minéraux et organiques solubles;
- Elles contiennent des nutriments qui servent d'amendement organique et calcique pour améliorer les propriétés physico-chimique du sol (Dudkowski, 2001).

En générale, deux sortes d'éléments sont présents (ou susceptibles de l'être) dans les boues :

- Des éléments utiles.
- Des éléments indésirables.

#### 4-1-1-Les éléments utiles

La valorisation des boues en agriculture est intéressante, tant par la quantité de matière organique qu'elles contiennent que par la présence en quantité appréciable d'éléments fertilisants (Karonne, 2008).

##### 4-1-1-1-Les éléments fertilisants

Selon la dose appliquée, les boues peuvent couvrir, en partie ou en totalité, les besoins des cultures en azote, en phosphore, en magnésium, calcium et en soufre ou peuvent aussi corriger des carences à l'exception de celle en potassium. Les éléments en traces tels que le

cuivre, le zinc, le chrome et le nickel présents dans les boues sont aussi indispensables au développement des végétaux et des animaux (Amir, 2005).

Il est envisageable de fabriquer des matières fertilisantes commerciales à partir de la matière sèche des boues d'épuration (Karonne, 2008).

#### ✓ **L'azote des boues**

L'azote est un des éléments nutritifs les plus importants pour la croissance des plantes. La plupart des sols profitent de l'ajout d'azote, qui assure une croissance optimale des cultures agricoles. L'amendement des sols par l'épandage des boues peut procurer une source complémentaire d'azote et ainsi contribuer à réduire l'utilisation d'engrais azotés classiques (CCME, 2012).

L'azote contenu dans la phase liquide est essentiellement sous forme minérale et directement assimilable (nitrate et ammonium), celui de la matière solide est sous forme organique et n'est assimilable qu'après décomposition partielle (Michel, 1984).

#### ✓ **Le phosphore des boues**

L'élément phosphore existe en quantité à peu près équivalente à celle de l'azote dans les boues. La valeur moyenne de concentration en phosphore : 4.7% relativement à la matière sèche. 5 à 6% du phosphore total des boues se trouvent sous forme de phosphate organique et que le phosphore minéral étant surtout constitué par des associations avec les composés du Fe, d'Al du Ca et du Mg qui abondent dans la plus part des boues (Karonne, 2008).

#### ✓ **Les éléments minéraux**

Les apports de potassium par les boues résiduaires sont négligeables. La teneur moyenne est de l'ordre de 1% de la MS.

Le potassium est très peu retenu pendant le traitement des eaux usées et se trouve en faible quantité dans les boues surtout celle ayant été déshydraté. La teneur des boues en potassium varie de 0.1 à 0.3 de la matière sèche.

Les boues contiennent du calcium en quantité appréciable : 0.2 à 1.5% dans les boues liquides et de 2 à plus de 20% dans les boues solides (Karonne, 2008).

Pour le magnésium, les boues contiennent de très faible teneur (0.5 à 1.5% de MS), les sels de magnésium sont très solubles et donc éliminés des boues (Impens et Avril, 1992).

#### 4-1-1-2-La matière organique

La matière organique représente en moyenne 50% de la matière sèche, elle est constituée de matières particulaires éliminées par gravité dans les boues primaires, des lipides (6 à 19 % de la matière organique), des polysaccharides, des protéines et des acides aminés (jusqu'à 33 % de la matière organique), de la lignine, ainsi que des produits de métabolisation et des corps microbiens résultant des traitements biologiques (Jedidi *et al.*, 2000).

La teneur moyenne en carbone des boues de station d'épuration est voisine de celle d'un fumier de ferme ; on peut donc les considérer avant tout comme un amendement organique.

Cette matière organique a deux origines essentielles :

- soit qu'elle provient de la récupération de la culture microbienne développée en consommant le majeur parti de la matière organique des eaux.
- soit qu'elle provient de la récupération directe d'une matière organique hétérogène retenue par décantation primaire puis stabilisée (Lefevre, 1977).

#### 4-1-1-3-Les microorganismes utiles

Les microorganismes jouent un rôle important dans les sols par la production de matière minérale nécessaire à la croissance des plantes. C'est le cas des phospho-bactéries qui augmentent la nutrition phosphatée des plantes, les *Thiobacillus* qui interviennent dans le cycle du soufre et les bactéries nitrifiantes qui sont liées au cycle de l'azote et jouent un rôle clé dans le fonctionnement des sols (Prescott *et al.*, 2003).

#### 4-1-2- Les éléments indésirables

Parmi ceux-ci on distingue les éléments traces métalliques (ETM), les composés traces organiques (CTO).

##### 4-1-2-1- Les éléments traces métalliques (ETM)

Les éléments traces métalliques (cuivre, le zinc, le chrome et le nickel) indispensables au développement des végétaux et des animaux peuvent se révéler toxiques à trop fortes doses, cette toxicité se manifeste d'autant plus que le sol est acide, car en pH neutre ou alcaline, les

métaux lourds sont adsorbés sur l'argile, complexée par la matière organique et les composées hydroxydes du sol. Cette action propre du sol rend très difficile la fixation des seuils limites des métaux lourds (Amir, 2005).

D'autres, tels que le cadmium et plomb sont des toxiques potentiels. Donc La présence des métaux lourds dans les boues de station d'épuration constitue à ce jour le frein principal à l'utilisation de ce type de sous -produit en agriculture (Karonne, 2008).

#### **4-1-2-2-Les composés traces organiques (CTO)**

Les composés traces organiques sont des produits chimiques d'origine domestique (détergents, solvant, peinture...), industrielle, urbaine (eaux de ruissellement drainant la pollution liée à la circulation automobile) et agricole (pesticides).

De plus, les CTO se dégradent dans le sol à des vitesses variables et n'ont donc pas un flux cumulatif. Cependant, au même titre que les ETM, les CTO peuvent devenir toxiques pour les micro-organismes des sols à haute dose; or ces derniers sont indispensables à la fertilité des sols (IAURIF., 2003).

#### **4-1-2-3-Les microorganismes pathogènes**

Les boues contiennent des milliards de microorganismes vivants qui jouent un rôle essentiel dans les processus d'épuration. Seul une infime partie est pathogène (virus, bactéries, protozoaires, champignons, helminthes, etc.) et provient en majorité des excréments humains ou animaux.

La concentration d'une eau usée en germes pathogènes dépend du secteur d'activité d'origine: les eaux provenant d'abattoirs ou de toute industrie traitant de produits d'animaux sont très largement contaminées. Ainsi, par mesure de précaution, et afin d'éviter de propager la maladie de la vache folle, il est interdit d'utiliser les boues d'épuration provenant des eaux usées des abattoirs ou des équarrissages pour fabriquer de la fumure ou du compost. D'une façon générale, les boues doivent subir un prétraitement avant leur utilisation en agriculture (Amir, 2005).

## 4-2-Caractéristiques des boues

### 4-2-1-Matière sèche (MS) et siccité (S)

C'est le paramètre principal de la définition de filière et surtout un des plus faciles à mesurer. La MS est exprimée en g/L, rapporté à la masse totale de boue, on l'exprimera en fraction massique S qui correspond à la siccité. Il permet de connaître la quantité de boue à traiter, quel que soit son niveau de concentration dans la filière de traitement (Guerfi, 2012).

### 4-2-2-Matière en suspension (MES)

Si les MS sont faciles à déterminer sur les phases concentrées, il n'en va pas de même sur les phases clarifiées où la procédure de mesure des MES par filtration sur membrane est plus appropriée.

Afin d'écrire un bilan matière rigoureux soit en MS, soit en MES sur une opération de séparation de phase (qui ne sépare que les MES), on reliera les deux paramètres par la relation expérimentale :  $MES = MS - [\text{substances organiques et minérales dissoutes}]$  (Guerfi, 2012).

## 5-Traitements des boues

### 5-1- Définition

Le traitement des boues est défini comme l'ensemble des opérations visant à modifier les caractéristiques des boues en excès afin de rendre leur destination finale fiable et sans nuisance. Les boues subissent des traitements de déshydratation et de stabilisation avant d'être rejetées dans le milieu naturel ou réutilisées à des fins agricoles ou énergétiques (Blondeau, 1985).

### 5-2- Objectifs

Quelle que soit la destination des boues et imposent la mise en place d'une filière de traitement. On s'attachera lors du traitement à :

- Réduire les volumes et éviter la fermentation (odeurs) ;
- Limiter au maximum les risques pathogènes ;
- Utiliser des procédés permettant de conserver une valeur aux boues ;
- Eventuellement réutiliser ce produit (valoriser) ;
- Réduire, dans certains cas, la masse de façon ultime ;

- Modifier les caractéristiques de la boue afin de faciliter la séparation des phases solides et liquides ;
- Augmenter la siccité afin de rendre le produit solide ou pâteux (Koller, 2004).

### **5-3- Système de traitement des boues**

Les boues issues de l'épuration des eaux (boues brutes) se présentent au départ sous forme de liquide et avec une forte charge en matière organique hautement fermentescible, Ces deux caractéristiques sont gênantes et posent beaucoup de problèmes techniques pour leur évacuation « quelle que soit la destination » et impose la mise en place d'une filière de traitement. Ces traitements permettent donc de limiter les nuisances olfactives, les risques sanitaires, mais aussi faciliter leur stockage (Amir, 2005).

#### **5-3-1- Les traitements d'épaississement et déshydratation**

Cette première étape permet de réduire trois à six fois le volume des boues, réduisant ainsi les coûts de stockage, d'élimination et de transport. La teneur en eau est ainsi visée. Cet épaississement peut se faire soit par simple égouttage, par flottation, par centrifugation ou par voie gravitaire au moyen d'un concentrateur. Cette étape a pour effet d'augmenter la proportion en matières sèches dans les boues.

La déshydratation est une étape de réduction de volume d'eau également, mais encore plus poussée que l'épaississement. Au moyen de centrifugeuses, filtres-presses ou des filtres à bandes, la siccité, c'est-à-dire la teneur en matières sèches des boues est augmentée. Selon les techniques utilisées, elle varie de 15 à 20%, au terme de cette étape (Anaëlle, 2009).

#### **5-3-2- Les traitements de stabilisation**

Les boues contiennent une importante proportion de matière organique et par conséquent sont très putrescible le but de la stabilisation biologique est de les rendre inertes et inodores (Thomazeau, 1981).

Les traitements de stabilisation utilisés sont de type biologique, chimique ou thermique. Ils s'appliquent aux boues mixtes fraîches, aux boues secondaires ou à l'ensemble des boues afin de réduire leur fermentescibilité, et limiter voire annuler, les nuisances olfactives (Koller, 2004).

### 5-3-2-1- Stabilisation biologique

Elle réduit la teneur des boues en matières fermentescibles. La stabilisation biologique se fait soit par : Voie aérobie (en présence d'oxygène) dans les bassins d'aération, jusqu'à l'obtention des boues à teneur non négligeable en oxygène et biologiquement stable. La consommation d'énergie de ce procédé ne permet pas d'envisager son utilisation de manière systématique pour les boues d'origine urbaines; soit par voie anaérobie (absence d'oxygène) dans des digesteurs avec production d'un biogaz riche en méthane et on obtient des boues « digérées », encore appelées « Anaérobies » ou « stabilisées anaérobies » (CNB, 2001).

### 5-3-2-2-Compostage

Le compostage constitue un procédé particulier de stabilisation biologique aérobie. Il se réalise de préférence sur des boues déjà déshydratées de façon à économiser l'approvisionnement en support de compostage, les boues n'étant pas auto-compostables.

Les boues compostées ont un aspect de « terreau » et présentent une structure solide ; elles sont stables. Le compostage se pratique dans des stations de moyenne taille et ne représente que 2% des tonnages des boues (OPECST, 2001).

Le compostage permet de poursuivre plusieurs objectifs en même temps :

stabilisation du déchet pour réduire les pollutions ou nuisances associées à son évolution biologique, diminution du volume des boues due à la dégradation des composés organiques et au séchage induit par la nature exothermique du procédé et production en fin d'un compost riche en substances humiques valorisable comme amendement organique des sols (Karonne, 2008).

### 5-3-2-3-Stabilisation chimique

Stabilisation chimique bloque simplement l'activité biologique, et donc l'évolution de la boue, par adjonction d'une quantité importante de chaux (10 à 50 % de la matière sèche, en général 30 %) élevant le pH au-delà de 12 (Koller, 2004). ayant pour effet de bloquer les fermentations en évitant ainsi le dégagement de mauvaise odeur. Ce traitement apporte un appoint en calcium qui peut être bénéfique, si la boue sera valoriser (Gamrasni, 1981).

#### 5-3-2-4- Séchage thermique

Le séchage thermique des boues revêt un effet temporaire de stabilisation (par absence d'eau), persistant aussi longtemps que les boues ne sont pas réhumecté.

Le séchage fait intervenir deux techniques :

- Soit par action du soleil sur des boues placées sous serre, préalablement déshydratées mécaniquement. Ce procédé concerne surtout les usines d'épuration de petite et moyenne capacité.
- Soit par action de la chaleur de manière directe, indirecte ou mixte, selon le type de sécheur. Ce traitement est plutôt réservé aux usines d'épuration de plus grande capacité.

L'intérêt du séchage (réduction des volumes, réduction des odeurs, meilleure manutention) est d'élargir l'éventail des solutions pour les boues et d'en faciliter leur utilisation et l'accès aux filières agronomiques (SPDE, 2006).

#### 5-3-3-Les traitements d'hygiénisation

Les boues d'épuration contiennent des micro-organismes vivants en provenance des eaux usées et des processus de traitement. Cette étape de traitement des boues permet d'obtenir un résidu dépourvu d'agents pathogènes et encourage un épandage contrôlé et sans risques. Elle est indispensable dans certains contextes d'épandages agricoles, mais reste une étape marginalisée en France. Le chaulage représente un mode d'hygiénisation puisque les organismes potentiellement pathogènes sont rendus inertes par l'augmentation de pH (Anaëlle, 2009).

#### 6-Destination finale des boues

Les boues d'épuration peuvent être incinérées ou mises en décharge, mais on les utilise traitées principalement pour l'agriculture au même titre que les engrais et elles sont destinées vers d'autres filières.

Ce sont les seuls sous-produits de traitement des eaux usées qui peuvent être réutilisés pour l'agriculture, mais il faut encore qu'elles répondent à certaines règles de qualité ce qui peut être dur à gérer car la qualité des boues d'épuration est liée à la qualité des eaux usées produites (Koller, 2004).



### 6-1-La mise en décharge

La mise en décharge est une mauvaise solution pour l'élimination des boues de STEP. Dans la mesure du possible, on lui préfère la valorisation, ou à défaut, l'incinération. Ces derniers ne sont pas toutefois pas toujours possibles, soit que les quantités ou qualités des boues ne se prêtent pas à leur valorisation en l'agriculture, soit que les installations d'incinération présentent des insuffisances de capacité ou des interruptions d'exploitation.

La mise en décharge des boues avec les déchets ménagers est également une pratique courante et sans risque pour l'environnement.

Dans les centres d'enfouissement technique (CET) moderne, les déchets sont confinés dans des alvéoles étanches et recouverts de terre végétale. La fermentation qui se déclenche dans ces alvéoles, produit au bout de quelque mois, et pendant une dizaine d'années, un gaz riche en méthane. Celui-ci est aujourd'hui capté par les réseaux de canalisation et peut être utilisé comme combustible sur des moteurs thermiques (Koller, 2004).

### 6-2-Incinération

L'incinération conduit non seulement à l'élimination totale de l'eau industrielle, mais également à la combustion des matières organiques des boues, c'est le procédé permettant d'obtenir des résidus dont la masse est la plus faible (Koller, 2004).

L'incinération n'est pratiquée généralement que sur des boues ayant déjà subi un premier stade de déshydratation le plus poussé possible (par filtration ou centrifugation).

L'incinération des boues d'épuration peut se faire de plusieurs manières :

- Dans un four spécifique auto thermique, car elle nécessite le plus souvent un apport d'énergie complémentaire.
- Conjointement avec les ordures ménagères (Co-incinération). L'incinération des boues déshydratées mécaniquement est possible mais l'on préfère des boues séchées thermiquement (65 à 92% de MS).
- En four cimentier; après séchage à 92% MS, les boues sont généralement introduites avec le combustible par injection dans la tuyère (Derouiche, 2012).

### 6-3-L'oxydation par voie humide (OVH)

L'oxydation par voie humide (incinération sans flamme) est un traitement qui s'apparente à l'incinération dans le sens qu'elle a pour but la minéralisation de la boue. Cependant, au lieu d'effectuer cette combustion sous forme d'une flamme ouverte, l'OVH réalise la réaction entre les matières organiques et l'oxygène en phase liquide à des températures très élevées. Lors de cette incinération sans flamme dans l'eau, les matières organiques (MO) sont décomposées de la manière suivante:  $MO + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O + \Delta H$  (chaleur) (Derouiche, 2012).

### 6-4-Rejet en mer

Cette solution expéditive consiste le plus souvent en un déversement discontinu au large au moyen de barges et chalands.

Dans quelques cas cette évacuation est réalisée par un émissaire sous-marin suffisamment long et immergé en profondeur.

Le choix d'un rejet en mer nécessite au préalable un examen minutieux et prolongé des courants ainsi que des études bactériologiques, biologiques, la destruction des germes pathogènes et la dégradation des matières organiques en milieu marin est lente, les boues déversées en mer doivent être débarrassées des matières flottantes (Koller, 2004).

### 6-5-Valorisation agricole

La valorisation agricole des boues est aujourd'hui la filière la plus utilisée, filière historique qui devrait perdurer, non tant du fait de son coût qui est moindre, mais davantage parce qu'elle s'inscrit dans la perspective de recyclage de matières utiles, à la condition cependant qu'une qualité indiscutable des boues soit obtenue et que son acceptation par tous les acteurs soit mieux admise.

La valorisation agricole des boues résiduelles peut être considérée comme le mode de recyclage le plus adapté pour rééquilibrer les cycles biogéochimique (C, N, P...), pour la protection de l'environnement et d'un très grand intérêt économique. Elle vise à ménager les ressources naturelles et à éviter tout gaspillage de matière organique dû à l'incinération ou à l'enfouissement dans les décharges (Lambkin *et al.*, 2004).

## 7-Intérêt d'une utilisation agricole des boues

Les raisons principales justifient l'utilisation des boues en agriculture :

- accélération de l'établissement et de la croissance des végétaux ;
- Apport de fertilisants qui permettent de couvrir, en partie ou totalement en fonction des doses d'apport les besoins des cultures en N et P et éventuellement en Mg, Ca et S, ou bien de corriger rapidement des carences en Zn, Mg ;
- Apport de composés organiques qui contribuent au maintien du stock humique des sols et à l'activation de la vie biologique des sols ;
- amélioration de la qualité, de la richesse et de la structure du sol ;
- Un mode d'élimination relativement économique et qui est généralement bien accepté par les populations, car cette filière relève d'une logique de recyclage (CCME, 2012).

### 7-1-Application des boues sur les sols

#### 7-1-1- Définition de l'épandage

L'épandage implique la dispersion et la diffusion d'un élément sur une surface relativement étendue dans un but de fertilisation du sol. Ces produits peuvent être des produits chimiques comme des herbicides, ou des pesticides, ou bien des engrais chimiques, des produits naturels, comme des excréments animaux ou des boues d'épuration urbaines ou bien des effluents liquides ou des boues d'origine industrielle (Juste,1994).

#### 7-1-2- Le sol adapté à l'épandage

Il convient de déterminer les caractéristiques physiques et chimiques du sol avant de procéder à l'épandage des boues. Les caractéristiques à prendre en compte sont les suivantes : éléments traces, éléments nutritifs majeurs et mineurs, humidité, matière organique, pH conductivité électrique, capacité d'échange cationique, taux d'absorption du sodium, texture, densité apparente, porosité.

- ✓ La connaissance des propriétés physiques et chimiques du sol aide à déterminer comment les épandages des boues peuvent le mieux contribuer à l'apport en éléments nutritifs, à l'amélioration du sol ou à la modification du pH. L'épandage peut parfois être restreint par des bruits de fond élevés d'éléments traces ou par la présence de

concentrations suffisantes d'éléments nutritifs ou encore à cause du pH des boues ou du sol.

- ✓ La texture du sol est un facteur important à prendre en compte au moment d'estimer les risques de migration des composants des boues après l'épandage. La connaissance de la texture du sol (vitesse d'infiltration élevée ou lente) et des conditions climatiques peut aider à prendre des décisions éclairées sur la façon de procéder pour restreindre la migration éventuelle des boues à travers le profil pédologique.
- ✓ L'humidité du sol est un facteur à considérer tant sur le plan de l'environnement que sur celui des opérations. L'utilisation de l'équipement d'épandage peut causer le tassement des sols humides et conduire à une réduction de la vitesse d'infiltration, à l'accumulation de flaques d'eau à la surface du sol et à la création de conditions anaérobies. Un sol très humide peut également limiter l'accès au site d'épandage (CCME, 2012).

### 7-1-3- Relation boue sol

Le sol est l'élément essentiel de la nutrition des végétaux et donc le support trophique de la production agricole.

Les apports de boues d'épuration vont permettre d'accroître les sources en matière organiques dans le sol et donc enrichir ce dernier en carbone organique. Les composés organiques présents dans les boues vont permettre d'améliorer certaines propriétés du sol tel que la porosité ou la structure et le taux d'humidité du sol (Sommers, 1977).

L'épandage des boues améliore la structure du sol grâce à son apport en matière organique. L'ajout de matière organique à la structure du sol présente un certain nombre d'avantages :

- Agrégation des particules du sol ;
- Réduction de la densité apparente du sol ;
- Amélioration de l'aération et de la pénétration des racines ;
- Atténuation des effets de l'érosion.

L'utilisation des boues d'épuration est interdite lorsque la concentration d'un ou de plusieurs métaux lourds dans les sols dépasse les valeurs limites fixées (Wallace *et al.*, 2009).

## 7-2-Conditions d'utilisations agricoles des boues

A l'heure actuelle, l'épandage agricole des boues reste en Europe la principale filière d'élimination. En 2002, environ 62% des boues d'épuration domestiques étaient valorisées en agriculture en France par ce biais.

L'épandage des boues ne peut être pratiqué que si celles-ci respectent le principe "d'intérêt agronomique" et soient exemptes de grandes teneurs en polluants inorganiques ou organiques. L'application des boues doit suivre des lois et des règles :

### ✓ Des distances minimales

-d'épandage vis à vis des berges, des sources, des puits, des habitations en évitant une percolation rapide vers les eaux superficielles, sou terrains ou de ruissellement.

-d'isolement d'au moins 3 mètres vis-à-vis des routes et fossés.

### ✓ Interdiction d'épandage

-sur des sols gelés, de forte pente.

-pendant les périodes de forte pluie et doit être en dehors des terres régulièrement travaillées (maraîchages).

### ✓ Autres mesures réglementaires

Deux grandes périodes d'épandage: le printemps (mars à avril) et à la fin de l'été (Août à Octobre).

L'épandage est interdit à certaines périodes (gel, enneigement.) et dans les terrains à forte pente. Des modalités de stockage : le stockage des boues (6 à 9 mois) devient indispensable en dehors des périodes d'épandage.

Les boues liquides sont stockées dans des silos. Les boues pâteuses sont conservées dans des fosses ou autres dispositifs étanches. Les boues solides sont stockées à même le sol sur des dalles imperméables couvertes. Le stockage temporaire à même le sol est déconseillé et ne peut pas excéder 48 heures si les boues ne sont pas stabilisées (Karonne, 2008).

### 7-3-Les risques liés à la valorisation agricole des boues

#### 7-3-1- Les risques environnementaux

La plupart des études sur la dynamique des éléments traces métallique apportées par épandage des boues dans les sols, avait pour objectif les transferts sol \ plante et pour finalité les risque de contamination de la chaîne alimentaire. C'est pourquoi en dispose de peu des données publiées.

Pour estimer les conséquences sanitaires chez l'homme de l'accumulation des polluants dans les sols à moyen et long terme. Il est importants de entraîne les différente voies de dispersion de ces contaminants et de pouvoir quantifier leur transfert d'un compartiment à l'autre (Derouiche, 2012).

- **Transfert sol \ animal**

L'accumulation à la surface du sol d'éléments résultants de l'application de boue peut présenter un risque de contamination directe de la chaîne alimentaire lors du pâturage; les animaux absorbent souvent un mélange de terre et déchets.

- **Transfert sol \ atmosphère**

Certains micro-organismes anaérobies présents dans le sol et les boues sont capable de réduire certains éléments traces métallique (sélénium, mercure), en des formes volatiles qui peuvent être directement fixés par la partie aérienne des végétaux couvrant le sol.

#### 7-3-2-Risque pour la santé humaine

La non maîtrise du plomb, mercure, cadmium entraîne parfois des risques pour la santé, évaluation de ces risques s'interprète par la prise en compte de plusieurs éléments tels que le niveau de contamination alimentaire par estimation des quantités ingérées (dose hebdomadaire tolérable à long terme) (Derouiche, 2012).

# **Chapitre II :**

Les tests de génotoxicité

## 1- Généralités

Le terme de génotoxicité se réfère à l'effet d'agents, dits génotoxiques, qui interagissent avec l'ADN et/ou la machinerie cellulaire qui maintient l'intégrité du génome. Il s'agit notamment des radiations ionisantes, capables de provoquer directement des dommages et cassures à l'ADN, des substances chimiques souvent électrophiles, qui directement ou après bioactivation par des systèmes enzymatiques adéquats, vont se lier à l'ADN pour former des adduits. Ces adduits vont pouvoir être responsables de cassures et de pontage de l'ADN, d'erreurs de réplication et de substitution de bases. Ces lésions de l'ADN peuvent conduire à la mort cellulaire si les dommages sont très importants mais elles peuvent aussi être réparées par la machinerie cellulaire et il n'y aura alors pas de conséquence pour la cellule. Si la réparation est imparfaite, incomplète ou absente, les lésions vont alors conduire à des mutations, qui sont permanentes et irréversibles, et qui peuvent impliquer des gènes individuels (mutation génique), des blocs de gènes (mutation génomique) ou des chromosomes (mutation chromosomique). Les mutations conduisant à des cassures des chromosomes sont appelées clastogènes tandis que celles se traduisant par des anomalies de la ségrégation chromosomique sont appelées aneugènes (Fardel *et al.*, 2009).

Un certain nombre de méthodes sont actuellement utilisées ou en cours d'évaluation. Il est utile de rappeler que pour qu'un test soit valable, il doit satisfaire aux conditions suivantes :

- Etre commode à réaliser et ne comporter aucun risque pour le sujet ;
- Fournir des résultats précis et reproductibles avec un minimum d'erreurs analytiques possibles ;
- L'information obtenue doit être quantitativement significative en termes de risque pour la santé d'un individu ou d'un groupe d'individus (Pillière et Falcy, 1991).

## 2-Les types des tests

Pour évaluer le potentiel génotoxique d'une molécule ou d'une famille de molécules, des tests *in vitro* ont été développés. Ces tests ont permis de démontrer le caractère génotoxique d'un grand nombre de polluants chimiques principalement de nature organique, les nitrosamines, quelques pesticides, quelques solvants organiques (3).



Les tests utilisés dans le domaine des mutations géniques permettent de détecter trois types d'effet: la substitution, l'addition ou la délétion de nucléotides à l'intérieur d'un gène. Ceux utilisés pour détecter des mutations chromosomiques mettent en évidence les cassures ou les réarrangements chromosomiques impliquant un ou plusieurs chromosomes. Les tests portant sur les mutations génomiques décèlent les modifications du nombre de chromosomes ou aneuploïdie. Depuis, plus de 200 tests ont été mis au point pour détecter les mutations sur l'ADN (Fig. 3) avec leurs avantages et inconvénients. Divers test ont été utilisés sur les boues avec des modèles procaryotes et eucaryotes comme :

- Le test de mutation réverse sur des bactéries *Salmonella thyphimurium* (Test d'Ames).
- Le test des aberrations chromosomiques sur *Allium cepa* (2).

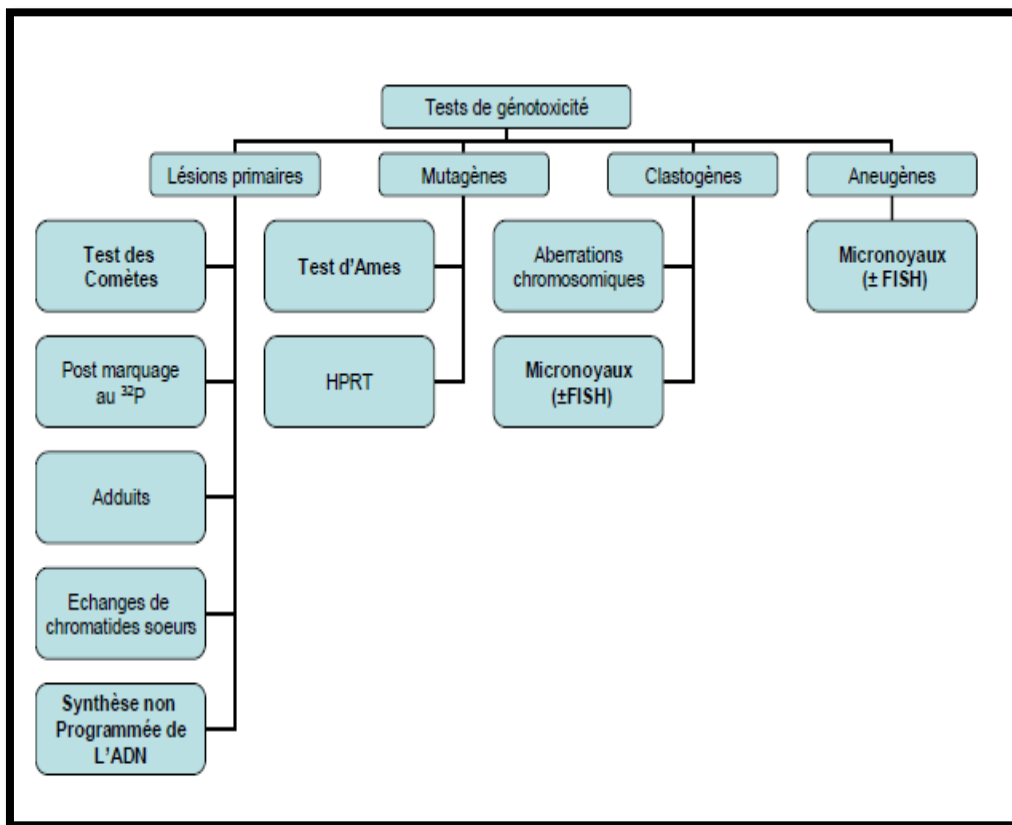


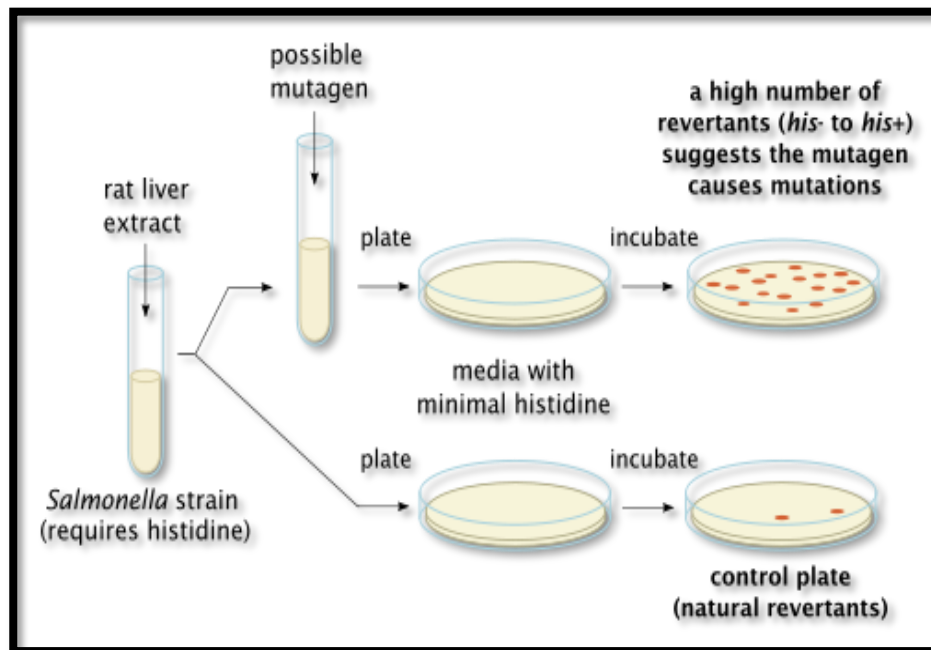
Figure 3 : Les différents types des tests de génotoxicité (5).

## 2-1-Test de mutation génique sur procaryotes (Test d'Ames)

### 2-1-1-Définition et principe

Le test d'Ames, parfois appelé test à *Salmonella* ou mutatest, consiste à examiner si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella typhimurium*. Les souches utilisées dans le test sont des souches porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation  $\text{His}^-$  rend les souches incapables de se développer sur un milieu sans histidine. Avec une fréquence très faible, ces mutations  $\text{His}^-$  reversent spontanément vers  $\text{His}^+$ : les cellules retrouvent leur capacité à croître sur un milieu dépourvu d'histidine. Cette fréquence de réversion peut augmenter en exposant les bactéries  $\text{His}^-$  à des agents mutagènes. Ainsi, le test d'Ames permet de quantifier l'induction de ces mutations réverses  $\text{His}^+$  (Mortelmans et Zeiger, 2000) (Fig. 4).

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'autotrophie de la souche bactérienne vis-vis de l'histidine. Le nombre de clones bactériens  $\text{His}^+$ , dits révertants, ayant poussé au bout de 48 h sur le milieu de culture dépourvu d'histidine, est proportionnel au pouvoir mutagène de la substance testée (4).



**Figure 4** : Le principe de test Ames (7).

### 2-1-2-Les souches bactériennes utilisées

En fonction des souches utilisées pour la réalisation du test, différents types de mutations peuvent être détectées, les souches bactériennes de nature génétique différente utilisées sont porteuses de mutations *His*<sup>-</sup> différentes qui permettent de tester des agents mutagènes variés. En plus de ces mutations spécifiques sur l'opéron *His*, ces souches possèdent des caractères génétiques qui permettent d'augmenter leur sensibilité à l'agression génotoxique (Tableau 1).

- ❖ **Mutation *hisD* 3052** : mutation dans **TA1538** et **TA98**, ces bactéries sont déficientes à l'enzyme histidinol déshydrogénase. La **TA1538** et sa dérivée r-factor **TA98**, détectent des mutagènes de type « frameshift ». Cette mutation à la séquence (-CGCGCGCG-), est révertée par les frameshift (-GCGCGCGC-) mutagènes tel que 2-nitrosofluorène et le daunomycine ce qui conduit à la restauration du cadre de lecture correct pour la synthèse de l'histidine.
- ❖ **Mutation *hisG* 46** : mutation présente dans **TA100** et **TA1535**, ces bactéries sont déficientes à la première enzyme qui entre dans la synthèse de l'histidine. Elle est déterminée par la séquence (-GGG- -CCC-) La **TA1535** et sa dérivée R-factor **TA100**, détectent les mutagènes qui causent des substituants de paires de bases.
- ❖ **Mutation *hisC* 3076** : C'est une mutation frameshift dans **TA1537**, elle n'est pas séquencée mais il est connu qu'elle contient une cytosine de plus dans une série d'au moins 4 cytosines.
- ❖ **Mutation *rfa***: cette mutation cause la perte partielle des polysaccharides à la surface de la barrière cellulaire de la bactérie ce qui augmente sa perméabilité aux grandes molécules qui sont incapables de pénétrer dans la cellule normale.
- ❖ **Mutation *uvrB*** : c'est une délétion du gène codant pour le système de réparation « excision resynthèse », conférant une augmentation de la sensibilité à la détection des mutagènes. Pour des raisons techniques la délétion du gène *uvrB* s'étend jusqu'au gène *bio* et par conséquent, la bactérie est aussi auxotrophe à la biotine pour croître.
- ❖ **Plasmide pKM 101** : Ce plasmide porte le gène de résistance à l'ampicilline (**R-Factor**), il est présent dans les souches **TA98** et **TA100**. Ces souches portant le facteur de résistance se révertent par des mutagènes qui sont faiblement détectés par

les autres souches. pKM 101 qui contient deux gènes amplifiant le processus SOS de réparation responsable de la mutagenèse induite (Maron et Ames, 1983).

**Tableau 1** : Les souches bactériennes du test d'Ames (Nesslany, 2013).

Souches	Gènes affectés	Mutations additionnelles			Type de mutation
		réparation	LPS	plasmide	
TA 1535	His G46	uvrB-	rfa	-	substitution
TA 1537	His C3076	uvrB-	rfa	-	frameshift
TA 1538	His D3052	uvrB-	rfa	-	frameshift
TA 97	His O1242 His D6610	uvrB-	rfa	pKM 101	frameshift
TA 98	His D3052	uvrB-	rfa	pKM 101	frameshift
TA 100	His G46	uvrB-	rfa	pKM 101	substitution
TA 102	His G428	+	rfa	pKM 101 (PAQ 1)	substitution

### 2-1-3-Le système d'activation métabolique (S9 Mix)

L'utilisation des systèmes procaryotes implique l'addition d'un système de métabolisation exogène de type S9 (extrait de foie de rongeurs) due à l'absence d'activité enzymatique de ce modèle procaryote (Fig. 5).

La grande majorité des produits pénétrant dans un organisme humain sont détoxifiés afin d'être rapidement éliminés. Les systèmes enzymatiques qui interviennent dans ces réactions se situent principalement au niveau du foie et exigent des cofacteurs (oxygène et NADPH). Ils sont aussi inductibles. Dans le test d'Ames, ce métabolisme est mimé en mélangeant un homogénat de foie de rat (S9) avec les bactéries et les cofacteurs nécessaires (Mix). Un traitement préalable par un inducteur (généralement l'Aroclor 1254) assure la présence de tous les systèmes enzymatiques (Bach, 2011).

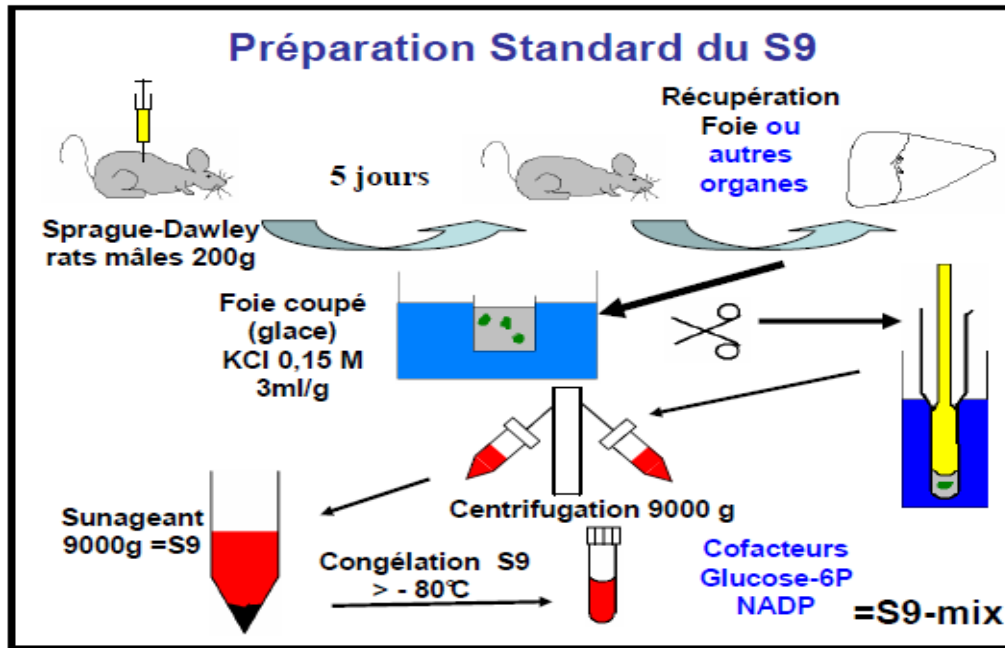


Figure 5 : Préparation standard du S9 Mix (Nesslany, 2013).

#### 2-1-4-Avantages et inconvénients du test Ames :

- Le succès du test d'Ames vient de sa simplicité d'exécution et de son coût modique. De plus, ce test est rapide (48h) et sensible. Il donne une réponse quantitative permettant des études comparatives. Sa souplesse dans les différents protocoles lui permet de s'adapter à des échantillons variés.
- Parmi tous les tests disponibles, sa banque de données est certainement la plus importante. Enfin, il a été validé dans de nombreux pays.
- Cependant, le test d'Ames est un test bactérien. Il représente une simulation approximative de ce qui peut se passer chez l'homme (métabolisme, système de réparation de l'ADN, systèmes de toxification, conditions d'exposition et de diffusion des produits dans l'organisme cible).
- La présence d'histidine dans des échantillons biologiques peut induire de fausses réponses positives et certains produits bactéricides (antibiotiques) peuvent induire des fausses réponses négatives (6).
- On peut collecter des résultats variables.
- Seuil de positivité difficile à déterminer.
- Le S9 Mix ne peut pas remplacer toutes les réactions enzymatiques effectuées in vivo (4).

## 2-2-Test de génotoxicité sur eucaryotes (plantes supérieures)

### 2-2-1-L'importance des plantes supérieures en génotoxicité

Les espèces végétales utilisées dans les tests de génotoxicité sont en nombre beaucoup plus restreint, 18 seulement. Ces tests permettent l'identification des agents causant des dommages à l'Homme. Les espèces les plus souvent mentionnées dans les questionnaires sont : *Allium cepa*, *Tradescantia* et *Vicia faba* (Tableau 2).

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

#### ❖ Représentativité

- Les réponses des végétaux aux agents mutagènes/cancérogènes sont similaires à celles des animaux, ce qui peut être expliqué en partie par la similitude de la morphologie et du fonctionnement des chromosomes entre les systèmes végétaux et animaux, tous deux eucaryotes.
- Les deux systèmes de division des cellules sont présents chez les plantes : la mitose dans les cellules somatiques (racines, étamines, etc...) et la méiose dans les cellules germinales (cellules de pollen).
- L'un des grands avantages des plantes, qui se rapporte plus particulièrement à *Vicia* et à *Allium*, est leur disponibilité. En effet, les graines de fève et les bulbes d'oignon sont disponibles toute l'année et dans la majeure partie des pays (Cotelle, 1999).
- .

#### ❖ Faisabilité

- De nombreuses parties végétales peuvent être utilisées pour examiner les effets genotoxiques les feuilles, les racines les bourgeons, les fleurs etc.
- Un grand nombre de plantes possèdent des chromosomes de grande taille, par exemple: *Allium cepa* ( $2n = 16$ ), *Pisum sativum* ( $2n = 14$ ), les clones de *Tradescantia* ( $2n = 12$ ), *Vicia faba* ( $2n = 12$ ) et *Crepis capillaris* ( $2n = 6$ ), offrent d'excellents systèmes de cytogénicité et permettent la détection des aberrations chromosomiques lors de la méiose et de la mitose ainsi que l'endommagement de l'ADN.

- Aucune préparation des matrices à tester n'est nécessaire, pas de filtration, ni d'ajustements de pH qui permet de tester les effluents, les lixiviats et même les sols directement dans leur état brut sans aucune modification (Cotelle, 1999).

#### ❖ Sensibilité

- Les plantes permettent de détecter des critères de génotoxicité nombreux et variés : mutations, cassures de chromosomes, aberrations chromosomiques, échanges de chromatides sœurs, etc...
- Les tissus végétaux constituent, pour la plupart, le siège de transformations métaboliques complexes capables d'activer les promutagènes, de la même façon que chez les animaux (Cotelle, 1999).

### 2-2-2-Les différents tests de génotoxicité associés aux plantes supérieures

L'utilisation de plantes supérieures a permis de détecter les effets génotoxiques des polluants dont :

- Les cassures des chromosomes ou clastogénicité ou aberrations structurales des chromosomes ;
- Le dysfonctionnement du fuseau mitotique affectant par la suite le nombre de chromosomes ou aneuploïdie ;
- La formation des micronoyaux (Test MCN) ;
- L'échange des chromatides sœurs (Test de SCEs) ;
- Les cassures des brins d'ADN qui peuvent être évaluées par le test de comète (Soughir, 2009).

#### 2-2-2-1-Test d'aberration chromosomique

L'induction des cassures de chromosomes est considérée comme l'un des tests de base de la génotoxicité. Le test d'aberration chromosomique *in vitro* est pratiqué chez les plantes au niveau de la zone méristématique et chez les animaux au niveau des cellules des mammifères en culture. Il permet de détecter les agents polluants qui provoquent des anomalies touchant la structure des chromosomes (Marcano *et al.*, 2004).

Plusieurs auteurs considèrent que l'augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques dans les extrémités racinaires est dépendante de la concentration et du temps

d'exposition à l'agent polluant jusqu'à un certain seuil où la fréquence de ces aberrations commence à diminuer suite au blocage de la division cellulaire. Ce blocage est évalué par l'indice mitotique (IM) qui permet d'estimer la fréquence des divisions cellulaires (Rank et Nielsen, 1997).

#### **2-2-2-2- Induction de micronoyaux**

L'induction de micronoyaux in vitro est un des tests de mutagénicité utilisé pour la détection de la capacité de tout agent physique ou chimique à induire la formation de petits noyaux (micronoyaux) dans le cytoplasme de cellules en interphase. Lors d'une lésion majeure de l'ADN, une fraction de chromosome ou un chromosome entier, après la division cellulaire, peut se détacher et former un micronoyau visible en microscopie photonique après coloration.

Le test des micronoyaux (ou Test MCN) constitue un outil valable pour déterminer la génotoxicité des métaux lourds, des pesticides, des radiations, des boues, qui appliqué sur les cellules méristématiques des extrémités racinaires de plusieurs espèces ont été utilisés pour tester l'effet génotoxique de divers agents polluants (Soughir, 2009).

#### **2-2-2-3-Induction des échanges de chromatides sœurs**

Le test SCEs permet d'identifier des génotoxines même à de très faibles concentrations. Il permet de visualiser les échanges réciproques des bras chromatidiques appartenant à un même chromosome et il a été employé sur différentes plantes : *Allium cepa*, *Vicia faba* et *Nicotiana plumbaginifolia* (Panda *et al.*, 1996).

#### **2-2-2-4-Test des comètes**

Le test des comètes permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique, indirectement lors des processus de réparation des dommages et enfin lors des processus secondaires de fragmentation de l'ADN. C'est une technique récente qui est considérée comme très efficace pour la détection de la génotoxicité à court terme de certains polluants.

Ce test peut détecter les cassures simples et double brin, les sites labiles alcalins et les sites incomplets de réparations. Suite à une migration électrophorétique, les noyaux dont l'ADN a subi des cassures prennent une forme de comète alors que les noyaux dont l'ADN n'est pas endommagé restent ronds (Singh *et al.*, 1988).



**Tableau 2:** Exemples des plantes étudiées et tests associés (Cotelle, 1999).

	<b>Tradescantia</b>	<b>Vicia faba</b>	<b>Allium cepa</b>
Nombre de chromosome	2n=12	2n=12	2n=16
Les Tests de génotoxicité	- Micronoyau. -Aberrations chromosomiques. -Echange de chromatide sœurs.	-Division mitotique. -Aberrations chromosomiques. -Micronoyau.	-Division mitotique. -Aberrations chromosomiques. -Micronoyau. -Echange de chromatide sœurs. -Test des Comètes.

### 2-2-3-*Allium cepa*

#### 2-2-3-1-Présentation générale d'*Allium cepa*

*Allium cepa* l'oignon, fait partie de la famille des alliacées. Différentes variétés d'oignon peuvent être utilisées. Cette plante est cultivée dans de très nombreux pays pour son usage alimentaire. Le caryotype ( $2n = 16$ ) présente cinq paires de chromosome (de 8 à 16  $\mu\text{m}$ ) avec des centromères situés de façon médiane à submédiane, deux paires dans lesquelles les centromères sont submédians et une paire de chromosomes satellites (Grant, 1982).

*Allium cepa* permet l'évaluation de divers critères de toxicité et de génotoxicité. Pour ce qui est de la toxicité, contrairement à *Vicia faba*, l'élongation racinaire d'*Allium cepa* est très souvent déterminée en parallèle avec les études de génotoxicité. Ce critère présente une bien meilleure répétabilité et une plus grande facilité de mesure pour *Allium* que pour *Vicia* car les racines d'*Allium* poussent de façon très homogène et forment ensemble de racines de longueur égale (Cotelle, 1999).

#### 2-2-3-2-Les critères de génotoxicité déterminés sur *Allium cepa*

*Allium cepa* est utilisé depuis longtemps dans les études sur les chromosomes et en particulier sur les effets des rayons X, en 1938 le premier scientifique à évaluer les effets du traitement d'*Allium cepa* à un produit chimique, à savoir la colchicine. La modification du

comportement mitotique due à la colchicine fut baptisé c-mitose qui se traduit en fait par une modification du nombre de chromosomes (Marshak, 1937).

Les racines *d'Allium cepa* ont surtout été utilisées pour évaluer le nombre d'aberrations chromosomiques. Ce critère s'est avéré très sensible pour détecter le potentiel génotoxique de produits chimiques, métaux, produits phytosanitaires ou autres substances organiques. La revue de Grant 1982 a montré que, sur 148 produits chimiques étudiés avec ce test, 76 % ont donné une réponse positive.

Ce test s'est également montré efficace dans l'étude de la génotoxicité de :

- Sols prélevés dans la région de Tchernobyl et présentant une forte radioactivité ;
- Lixiviats de déchets d'industries métallurgiques et chimiques ;
- Eau de rivière ;
- Eau de pluie dans des régions industrialisées ;
- Effluents industriels ;
- Effluents de papeteries et d'industries métallurgiques et chimiques ;
- Effluents de raffinerie de pétrole ;
- Effluents de tannerie ;
- Effluents d'industries, pétrochimiques.

D'autres critères ont aussi été étudiés dans les racines *d'Allium cepa* : les échanges de chromatide sœur et très récemment, le test des comètes. Enfin, de la même façon que dans le cas de *Vicia faba*, le critère « micronoyaux » évalué dans les racines *d'Allium* est de plus en plus utilisé dans les études de génotoxicité (test allium-MCN). Au niveau de la sensibilité des deux tests, quelques études sur *Allium cepa* ont démontré qu'il y avait peu de différences entre le test des micronoyaux et le test des aberrations chromosomiques (Cotelle, 1999).

### 2-2-3-3-Les différents paramètres Analysés par le test *Allium cepa*

#### ❖ Indice mitotique

L'indice mitotique (IM), caractérisé par le nombre total des divisions des cellules dans le cycle cellulaire, a été utilisé en tant que paramètre à évaluer la cytotoxicité de plusieurs substances. Le niveau de cytotoxicité d'une substance peut être déterminé par l'augmentation ou la diminution de l'IM. La diminution significative de l'IM en comparant au contrôle négatif indique une altération, découlant de l'action d'une substance chimique sur la

croissance et le développement des organismes exposés. D'autre part, Lorsque l'IM est plus élevé que le témoin négatif, ceci est le résultat d'une augmentation de la division cellulaire, conduit à une prolifération anarchique des cellules et même à la formation de tissus tumoraux (Leme *et al.*, 2009).

#### ❖ Les Aberrations Chromosomiques (AC)

Les ACs sont caractérisés par le changement soit dans le nombre total de chromosomes ou de la structure chromosomique qui se produisent en raison de l'exposition du au traitement chimique. Pour évaluer les différentes anomalies chromosomiques, plusieurs types d'ACs sont considérés à différents stades du cycle cellulaire (Prophase, métaphase, anaphase et télophase). Les ACs ont été regroupés en deux types, les aberrations clastogéniques et physiologiques. Aberrations clastogéniques comprennent les ponts chromosomiques, la rupture chromosomique alors que les aberrations physiologiques comprennent c-mitose, chromosome retardataire et la condensation des chromosomes (Khanna et Sharma, 2013).

#### ❖ Les anomalies nucléaires

Certains auteurs ont récemment inclus un autre caractère dans l'analyse des aberrations chromosomiques dans les cellules méristématiques d'*Allium cepa*. Ce caractère se réfère à des anomalies nucléaires (AN). Les ANs sont caractérisés par des modifications morphologiques dans les noyaux interphasiques, à la suite de l'action de l'agent testé. En général, ces altérations sont observées dans le test d'*A. cepa* comme noyaux lobulés, noyaux portant des bourgeons nucléaires, polynucléaires (Leme *et al.*, 2009).

#### ❖ Micronoyau

Les micronoyaux (MN) ont été considérés par de nombreux auteurs comme le critère le plus efficace et le plus simple pour analyser l'effet mutagène des produits chimiques. Cela est dû au fait que les MN résultent des dommages d'ADN, pas ou mal réparés, dans les cellules parentales, étant facilement observés dans les cellules filles comme une structure similaire au noyau principal, mais dans une taille réduite. Ainsi, MN découlent de la mise au point de certains aberrations chromosomiques, par exemple, les pertes chromosomiques (Leme *et al.*, 2009).

# **Partie pratique**

# **Chapitre I :**

## Matériel et Méthodes

## 1-Présentation et fonctionnement du site de prélèvement

### 1-1-Présentation et localisation de la STEP

La station d'épuration de Guelma a été créée en 2008 et occupe un terrain agricole de 8 ha. Elle se situe à 1 km environ au Nord de la ville sur le flanc droit de la vallée développée par l'Oued Seybouse et sur la route nationale N° 21 menant à Annaba à la sortie de l'agglomération (ONA, 2011). Les responsables de la station se fixent comme objectif l'épuration de 43 388 m<sup>3</sup>/j d'eaux usées de la ville de Guelma qui sont collectées par deux stations de relevage, l'une se trouvant au niveau de la cité Ghehdour : point de rejet de Oued Lemaïz avec un débit de 1575 m<sup>3</sup> /h, et la seconde au niveau du point de rejet de Oued Skhoun (son débit est de 1125 m<sup>3</sup>/h) (Berouh, 2014).

### 1-2-Principe et fonctionnement du système de traitement

L'épuration des eaux usées consiste à un prétraitement physique, une décantation primaire, un traitement biologique et une décantation secondaire. Les boues issues du bassin biologique sont récupérées au fond de clarificateur. De là une partie est extraite pour être traitée, puis évacuée, tandis qu'une partie est recerclée (Fig. 6) (Karaali *et al.*, 2008).



[1 : Prétraitement, 2 : Décanteur primaire, 3 : Bassin d'oxygénation, 4 : Clarificateur,

5 : Épaississeur, 6: Bassin de désinfection, 7 : Lit de séchage, 8 : Boue secondaire].

**Figure 6:** Schéma de station d'épuration de la ville de Guelma (Karaali *et al.*, 2008).

## 2-Prélèvement des boues

Le prélèvement doit s'effectuer dans des conditions d'asepsie rigoureuses. Les techniques de prélèvements sont variables en fonction du but recherché et de la nature de boues à analyser (Rodier *et al.*, 1996).

### ●Pour le prélèvement de boues sèches

Le prélèvement se fait directement, en utilisant une petite pelle, car ce type de boues est sous forme de pâte dans des récipients cylindriques en verre bien fermés (Rodier *et al.*, 1996).

### ●Pour le prélèvement de boues liquides

Le prélèvement se fait directement sur la tuyauterie de transfert dans des flacons en verre munis d'un large col et d'un bouchon à vis métallique (Rodier *et al.*, 1996).

## 3-Test de mutagénicité (test d'Ames)

### 3-1-Principe du test

Le test d'Ames consiste à préparer une série de mélanges d'une quantité constante d'une de chacune des souches choisies pour le test et des quantités croissantes du produit à tester, à les étaler sur des boîtes de Pétri contenant un milieu minimal. Ce milieu autorise la croissance des révertants His<sup>+</sup> uniquement. Afin d'augmenter la sensibilité du test, une trace d'histidine est ajoutée qui permet la croissance de 2 à 3 générations de His<sup>-</sup> et amplifie l'apparition des révertants. Après incubation pendant 48 h, le dénombrement des révertants His<sup>+</sup> est effectué. Ceux-ci apparaissent sous forme de colonies sur un tapis cellulaire translucide (bruit de fond) (Maron et Ames, 1983 ; De Meo *et al.*, 1996).

### 3-2-Matériel biologique

Le test d'Ames a été pratiqué sur deux souches de *Salmonella typhimurium* auxotrophes au regard de l'histidine: TA98 et TA100. Ces deux souches ont été sélectionnées pour les raisons suivantes:

- Elles permettent de détecter une plus large gamme de mutagènes.
- Chaque souche bactérienne est spécifique pour la détection d'un type de mutation (frameshift pour TA98 et substitution des bases pour TA100) (Tableau 3) (Bach, 2011).

**Tableau 3** : Génotype spécifique des souches TA98 et TA100 (Bach, 2011).

Les souches	Gènes affectés	Mutations additionnelles		Plasmide	Type de mutation détectée
		Réparation	LPS		
<b>TA98</b>	hisD3052	uvrB-	rfa-	pKM101+	Frameshift
<b>TA100</b>	hisG46	uvrB-	rfa-	pKM101+	Substitution d'une paire de base

La souche TA98 met en évidence une mutation de type Frameshift. Ce type de mutation consiste en l'insertion ou délétion des paires de bases dans les codons triplets qui constituent le code génétique contenu dans la séquence de l'ADN. Cette modification entraîne un décalage du cadre de lecture pour tous les codons situés en avènement ce qui implique des changements majeurs dans la synthèse de protéines. La souche TA100 est capable de détecter une mutation générée par la substitution d'une paire de base purique ou pyrimidique. Cette mutation se produit dans la séquence codante d'un gène. Ce changement va se répercuter dans toute la séquence primaire du produit encodé par ce gène (Madigan et Martinko, 2007).

Les mutations additionnelles dans les souches TA98 et TA100 sont les suivantes:

- **La mutation *uvrB*<sup>-</sup>** : consiste en l'élimination des systèmes de réparation de l'ADN pour des dommages provoqués par certaines substances mutagènes et la lumière UV.
- **La mutation *rfa*<sup>-</sup>** : entraîne une modification de la membrane externe de la bactérie qui est composée essentiellement de lipopolysaccharides (LPS), ce qui implique une augmentation de la perméabilité cellulaire à certains types de substances chimiques. Cette mutation est sensible au cristal violet.

De plus, la présence du plasmide pKM101 (molécule d'ADN extrachromosomique) dans les deux souches apporte une augmentation des processus induisant des erreurs lors de la réparation de l'ADN (Bach, 2011).

### 3-3-Confirmation des génotypes

Les génotypes des souches tests doivent être confirmés :

1. Immédiatement après les avoir reçu.



2. Quand un lot gelé ou lyophilisé est destiné à l'utilisation.
3. Quand le nombre de révertants spontanés par boîte sort de l'intervalle indiqué.
4. Quand il y a une perte de la sensibilité vis-à-vis les mutagènes standards.
5. La confirmation des géotypes des souches tests est incluse dans chaque test de mutagenèse (Maron et Ames, 1983).

### 3-3-1-Activation des souches tests

#### ▪ La préculture de nuit

A partir des souches conservées dans une gélose de conservation, on cultive 20 µl dans 5ml de bouillon nutritif. L'incubation se fait à 37° avec agitation dans un bain mari pendant 18-24 heures (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).

#### ▪ La culture de deux heures

Le but de cette culture est d'arriver à la phase exponentielle de croissance c'est à dire  $2 \cdot 10^9$  bactérie/ml et qui correspond à une  $DO = 0,4$  à une longueur d'onde égale à 650nm.

A partir de la culture de nuit on prélève 20 µl quand dilue dans 5ml de bouillon nutritif. On les incube à nouveau à 37° pendant 2 heures avec agitation.

Les bactéries sont couvert de papier Aluminium pour les protéger de la lumière (Maron et Ames., 1983 ; Mortelmans et Zeiger., 2000).

#### ▪ Le réisolement des souches tests

A partir de la culture de 2 heures des souches et avec une anse de platine faire des stries dans des boîtes contenant du glucose minimal agar enrichie d'histidine et de biotine, pour les souches résistantes à l'ampicilline l'agar doit contenir de l'ampicilline à une concentration de 25 µg/ml, incubé à 37° pendant 48h. Les boîtes sont ensuite placées dans un réfrigérateur et servons comme source de bactéries pour des tests ultérieurs. Cette conservation dura jusqu'à 2 mois (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).

- **Le stockage des souches**

Le stockage se fait dans des eppendorf de 1,2 ml, pour 1ml de la culture est mélangé 90µl de glycerol, la conservation se fait à -20°. Le mélange est à renouveler chaque 6 mois (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).

### 3-3-2-la vérification des caractères

- **Réclamation de l'Histidine**

La mutation His<sup>-</sup> rend les bactéries auxotrophes à cet acide aminé dans un milieu sélectif contient obligatoirement la biotine.

Avec un écouvillon ou une anse de platine faire un seul strie de chaque souche sur :

1. des boites de contrôle contenant uniquement 100 µl d'une solution (0,5mM) stérile de biotine par boite appliquée à la surface de la gélose minimal agar, avec un râteau.
2. des boites his / bio.

L'incubation se fait à 37°pendant 24h (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).

- **La sensibilité aux UV**

Le but de ce test est de vérifier l'existence de la mutation *uvrB*. Les souches testées et la bactérie sauvage sont déposées en stries sur des boites de gélose nutritive.

Le moitié de la boite est couvrit par une plaque en verre ensuite irradié par une lampe à UV (15W) à une distance de 30cm pendant 8 secondes : TA98<sup>R</sup> et TA100<sup>R</sup>. L'incubation dura 24 h à37° (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).

- **La résistance à l'ampicilline et la sensibilité au cristal violet**

Il faut s'assurer de la résistance à l'ampicilline pour vérifier la présence du plasmide pKM101 chez la TA98 et TA100 qui est instable. La sensibilité au cristal violet est le résultat de la mutation *rfa*.

Ces deux caractéristiques sont testées simultanément. On prépare 3 disques de papier Wattman, chaque disque est déposé sur boite de gélose nutritive imbibé de 10 µl d'une des solutions suivantes :

- Solution à 1mg/ml de cristal violet.
- Solution à 10 mg/ml d'ampicilline.
- L'eau distillée stérile est utilisée comme témoin (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).

### **3-4-Le test de mutagenèse par la méthode standard avec préincubation**

#### **3-4-1- Principe**

Certains mutagènes ne sont pas détectés par la méthode standard (incorporation en boîte) qui doivent être testés en utilisant une modification du test standard. L'essai par préincubation a été utilisé pour détecter la mutagénicité de 10 carcinogènes, d'autres travaux ont aussi démontré la mutagénicité de produits biologiques et des séries de composés volatils en utilisant cette technique.

L'essai en préincubation nécessite l'incubation du composé à tester avec la souche test pendant 20 minutes à 37°, l'agar molle est ajoutée au mélange puis verser sur le milieu solide (glucose minimal agar) les boîtes sont incubées à 37° pendant 48 h, les révertants His<sup>+</sup> sont dénombrés (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).

#### **3-4-2-Technique**

Dans des tubes en verre de 20ml, 100 µl de la culture de nuit mis en contact avec 100 µl de l'échantillon à tester placés en incubation à 37° pendant 20 minutes avec agitation dans le bain mari. Ensuite 2,5 ml de Top agar (gélose molle) sont ajoutés au mélange puis verser sur le milieu minimum, laisser se solidifier quelques minutes et enfin mettre en incubation 48 h à 37° (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000) .

#### **3-4-3- Analyse statistique**

Le test U Mann-Whitney à  $p < 0.05$  avec la version 15 du logiciel SPSS.

## 4-Test de génotoxicité (test d'*Allium cepa*)

### 4-1-Matériel biologique

Le matériel biologique du test est l'oignon commun (*Allium cepa*  $2n=16$ ). D'autres variétés d'oignons peuvent également être utilisées (de 25-30 mm et un poids de 2-4 g). Si les oignons sont conservés dans le frais (10-15°C) et à sec, ils peuvent être utilisés jusqu'à un an après la récolte. Les bulbes d'oignons sans aucun traitement. Les racines d'oignons permettent de réaliser le test des aberrations chromosomiques et de déterminer des critères de cytotoxicité tel que l'indice mitotique (Cotelle, 1999).

### 4-2-Le principe

Le test *Allium cepa* est un test efficace pour le dépistage chimique et le suivi « in situ » de la génotoxicité de contaminants de l'environnement. Le test a été largement utilisé pour étudier la génotoxicité des boues, dévoilant que ces composés peuvent induire des aberrations chromosomiques dans la racine de méristème *Allium cepa*. Les résidus de boues peuvent être présents dans les fruits et légumes et représentent un risque pour la santé humaine.

Le test de génotoxicité oignon prévoit le dépistage facile des produits chimiques ou des échantillons avec des effets génotoxiques, en particulier pour les plantes. L'échantillon est testé pour les aberrations chromosomiques et/ou micronoyaux (Leme *et al.*, 2009).

### 4-3-La technique

L'analyse génotoxique est réalisée par le test d'aberrations chromosomiques sur *Allium cepa*. Cet essai est basé sur la détection des aberrations chromosomiques dans les racines d'*Allium cepa*, le protocole de ce test est inspiré de celui de Recep *et al.*, (2010). Les principales étapes sont résumées dans la figure 7.

#### 4-3-1-La culture des bulbes

Avant de lancer le test *Allium*, les écailles externes des bulbes et la plaque de fond sec ont été enlevés sans détruire les primordiaux des racines. Une série de trente oignons ont été placés dans de l'eau distillée pendant 48 h.

Il s'agit de placer les bulbes germés sur un tube à essai contenant l'échantillon à tester de façon à ce que seules les racines soient immergées. Le Méthyl méthane sulfonate (MMS) est utilisé comme contrôle positif et l'eau distillée comme contrôle négatif. La durée de

l'exposition aux échantillons testés est de 24 h. Afin de limiter la variabilité intra individuelle, cinq réplicats par échantillon présentant la moyenne croissance racinaire sont conservées pour les critères étudiés.

#### **4-3-2-Fixation des extrémités racinaires**

Les racines sont nettoyés à l'eau distillée et les deux derniers centimètres sont prélevés et fixés à 4°C pendant une durée minimale d'une nuit dans un mélange éthanol/acide acétique glacial (3V : 1V) préparé extemporainement. 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 durcie les tissus. L'acide acétique est un bon fixateur des chromosomes, il précipite les protéines du noyau.

Les extrémités racinaires sont ensuite conservées pour un long terme dans 2,5 ml d'éthanol à 70% après 3 lavages successives à l'aide de cette solution.

#### **4-3-3-Coloration des extrémités racinaires**

Les extrémités racinaires sont alors placées dans l'eau distillée pendant 10 min, hydrolysées dans HCL 1N pendant 8 min et à nouveau transférées dans de l'eau distillée pendant 5 min, changer l'eau distillée 3 fois (5min/fois). Les racines sont ensuite colorées à l'obscurité avec le réactif Feulgen pendant 20 min à 25min, après la coloration, les racines sont ensuite transférées dans de l'eau distillée pendant 2 min.

Il s'agit ensuite de poser les racines sur les lames et couper la partie claire de la partie foncée et celle-ci est coupée en très petits morceaux. Mettre sur chaque racine une goutte de 45% d'acide acétique glacial, couvrir par une lamelle et appuyer par un papier filtre. Enfin fixer les bords de la lamelle par un vernis à ongle numéro 00 (transparent) pour éviter l'évaporation de la solution et permettre une bonne observation microscopique dans la journée même de la préparation de la lame à étudier.

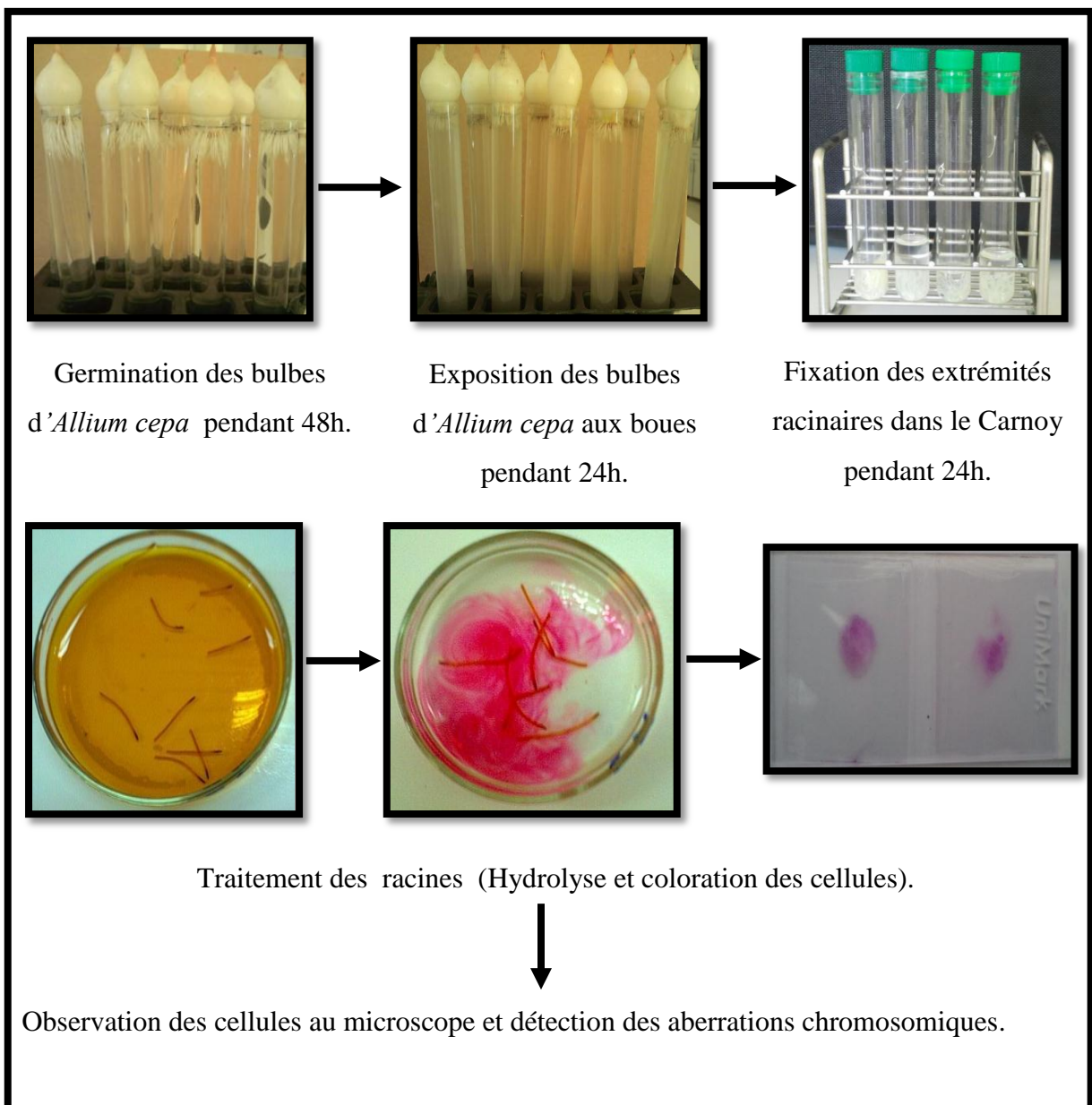
#### **4-3-4-Examen des cellules des extrémités racinaires**

Les cellules sont examinées au microscope optique en utilisant l'objectif  $\times 640$  pour l'indice mitotique et l'objectif  $\times 960$  pour les aberrations chromosomiques. Pour le MI, les différentes étapes de mitose ont été comptées dans un total de 5000 cellules (1000 cellules /

lame) et exprimées en pourcentage. Pour les aberrations chromosomiques, 100 cellules par lame étaient examinées.

#### 4-4-L'analyse statistique

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



**Figure 7 :** Les étapes du test des AC dans les racines d'*Allium cepa*.

# **Chapitre II :**

Résultats et discussion

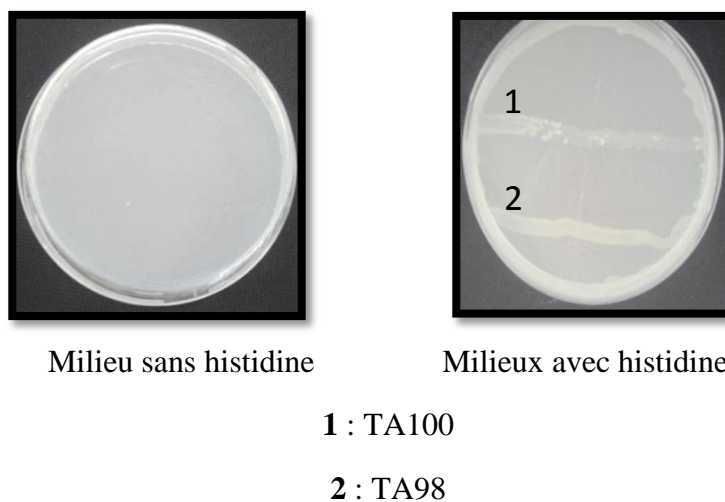
## 1- Résultats du test Ames

### 1-1-Vérification des caractères génétiques

Les résultats de la vérification des caractères génétiques des bactéries pris après culture au bouillon nutritif réalisés antérieurement aux tests de mutagenécité sont comme suit :

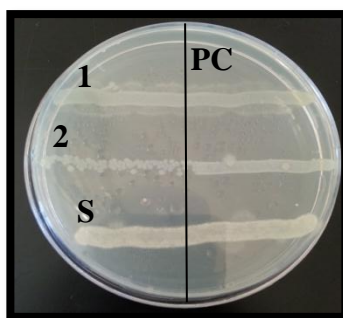
#### ➤ Réclamation de l'histidine :

Après incubation on voit que les bactéries poussent sur les boites his/ bio et non sur les boites contenant de la biotine uniquement. Ce résultat confirme la présence de mutation His.



**Figure 8 :** La réclamation de l'histidine.

#### ➤ La sensibilité aux UV :



**PC :** partie cachée

**S:** souche sauvage

1 :TA100

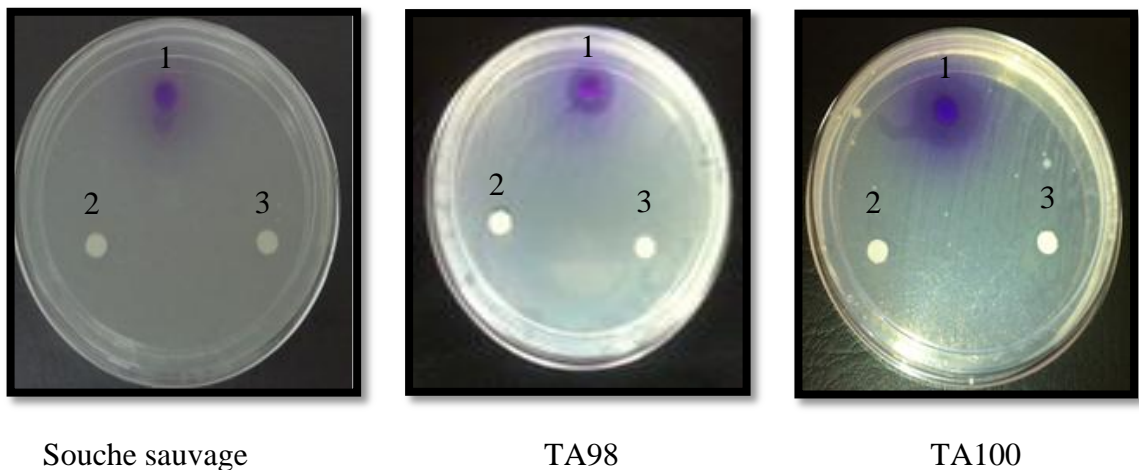
2 : TA98

**Figure 9:** L'effet des UV sur les souches d'Ames et la souche sauvage.



Après incubation les deux souches TA 100 et TA 98 poussent tout au long de la boîte même dans la partie exposée au UV ce qui est expliqué par la perte de la sensibilité au UV, 100% pour TA100 et 80% pour TA98, même la souche sauvage pousse tout au long de la boîte grâce à la possession du système de réparation par excision (*uvrA*, *uvrB* et *uvrC*).

➤ **La résistance à l'ampicilline et la sensibilité au Cristal violet :**



- 1: Cristal violet  
2 : Ampicilline  
3 : eau distillée

**Figure 10 :** L'effet de l'Ampicilline et du CV sur les souches d'Ames.

On remarque, après l'incubation :

- La présence d'une zone claire uniquement autour du disque du CV dans le cas des souches **TA98** et **TA100**. Ces souches sont donc portantes de la mutation *rfa*<sup>-</sup> et du plasmide PKM101 qui porte le gène de résistance à l'Ampicilline.
- La souche sauvage possède le gène *rfa*<sup>+</sup> ce qui explique sa poussée autour du disque du CV qui ne peut pas traverser la membrane bactérienne, cette souche est aussi résistante à l'Ampicilline.

### 1-2-Test de mutagenèse

Afin d'augmenter la sensibilité du test d'Ames, nous avons choisi d'utiliser la méthode faisant appel à une étape de préincubation avec et sans activation métabolique.

Les résultats de essais sur les boues liquides et sèches sont présentés dans la figure 11 et les données numériques dans le tableau 4.

**Tableau 4:** L'analyse de mutagénicité des boues par *S. typhimurium* TA98 et TA100 avec et sans S9 Mix.

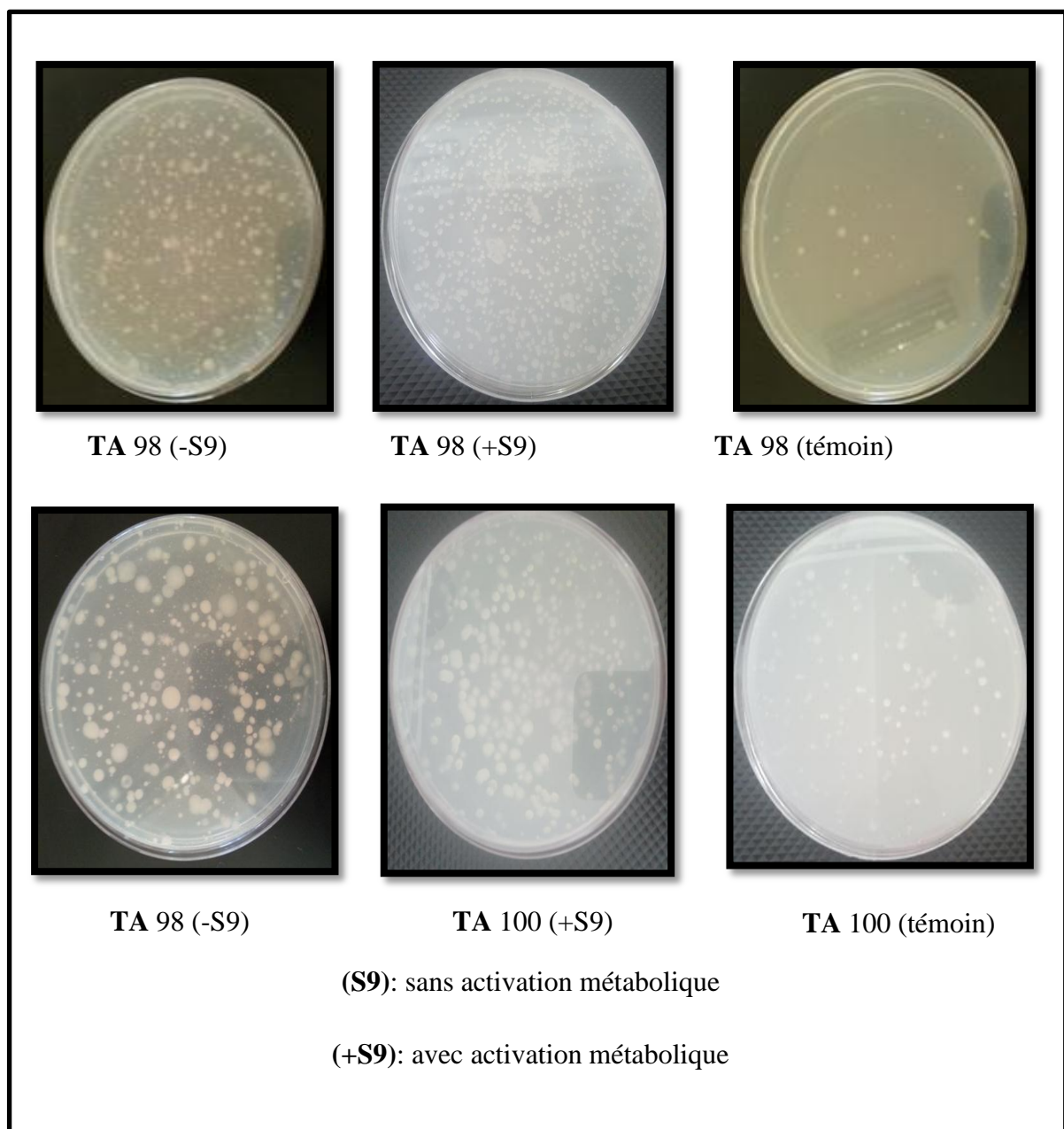
Produit à tester	Nombre de révertant His <sup>+</sup> /Boite± DS			
	TA98		TA100	
	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)
Boue liquide	538±21.01mc	772.66±24.96mc	293.33±13.67mc	511.33±25.64mc
Boue Séche 6 mois	173.33±12.95md	297.83±16.46md	132.66±14.9ad	230±9.14md
Boue Séche 1 ans	214±16.14me	403±13.66me	177±9.85de	283.66±11.96md
Boue Séche 2 ans	325±20.37mf	550.66±27.96mf	217.83±14.51me	363.83±15.91me
Control	40.66±3.5a	36.83±4.83a	98.66±11.57a	92.66±9.07a
2AF – 200 µg/plate	1392.5±106.71b			
NPD – 200 µg/plate		911.83±58.6b		
SA – 10 µg/plate			1637.16±102.78b	
2AA – 5 µg/plate				2267.33±108.35b

Les mêmes lettres indiquent qu'il n'y a pas de différence statistiquement signifiant à  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U test), m : Mutagene, DS: deviation Standard, 2AF: 2-aminofluorene, NPD: 4-nitro-o-phenylenediamine, SA: Sodium azide, 2AA: 2-aminoanthracene.

le nombre de révertants pour les deux souches testées induits par les boues liquides et sèches est au moins deux fois supérieur au taux de révertants spontanés, avec ou sans activation métabolique, mais il reste inférieur à celle du contrôle positif, cette différence est statistiquement significative donc on peut dire que les boues de la station de traitement des eaux usées présente un effet mutagène différent sur les deux souches ce qui indique qu'ils provoquent des mutations de type frameshift et des substitutions de base sauf les boues sèches

de 6 mois et 1 ans n'est pas mutagène avec la souche TA100 sans activation métabolique donc elles sont mutagène indirecte.

On peut dire que les résultats de notre essais ont révélé que les boues est mutagène quel que soit liquides ou solides, avec ou sans activité métabolique sur les deux souches bactériennes, La souche *Salmonella typhimurium* TA98, qui détecte des mutations de type frameshift et la *Salmonella typhimurium* TA100, qui détecte des mutations de type substitution de bases (Maron et Ames, 1983).



**Figure 11:** Les résultats de test Ames sur les souches *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100 avec et sans activation métabolique.

## 2-Résultats du test *Allium cepa*

Les résultats du test d'*Allium cepa* sont présentés dans les tableaux (5 et 6). La caractérisation de la cytotoxicité et de la génotoxicité des boues liquides et sèches prélevées a été surveillée par l'analyse de l'indice mitotique et par la fréquence des aberrations chromosomiques respectivement.

Une diminution significative dans l'indice mitotique (IM) a été enregistrée pour les boues liquides ( $39.61 \pm 3.26$ ) et pas de changement pour les boues sèches (de divers duré de stockage) ( $45,13 \pm 2,71$ ) et ceci par rapport au IM du contrôle négatif ( $46.43 \pm 2.88$ ). Le niveau de la cytotoxicité peut être déterminé par la diminution ou l'augmentation de l'IM. Dans notre travail, la diminution du IM indique que la croissance et le développement des organismes exposés ont été affectés par les composés des boues liquides (Recep *et al.*, 2010).

Les valeurs du pourcentage des phases mitotiques du contrôle négatif étaient ( $76.13 \pm 1$ ) pour la prophase, ( $9.97 \pm 0.34$ ) pour la métaphase, ( $6.28 \pm 0.84$ ) pour l'anaphase et ( $7.61 \pm 0.7$ ) pour la télophase. Pour les boues sèches et les boues liquides une diminution significative dans le pourcentage de la prophase a été observée. Une augmentation dans le pourcentage de la métaphase a été enregistrée ainsi que pour l'anaphase et télophase.

La diminution significative de l'activité mitotique indique un effet mito-dépressif de micropolluants des boues, pourrait interférer avec le développement normal de la mitose, ce qui empêche un certain nombre de cellules de pénétrer dans la prophase et en bloquant le cycle de la mitose durant l'interphase (Yildiz *et al.*, 2009) et ceci a été détecté dans notre étude par la diminution du pourcentage de la prophase.

Les échantillons des boues testées causent un changement dans la fréquence des aberrations chromosomiques par rapport à celles du contrôle négatif (Fig.12). Une augmentation dans la fréquence des aberrations chromosomiques a été observé dans les racines traitées par les boues liquide ( $7.63 \pm 0.94$ ) et les boues sèches ( $8,48 \pm 0,68$ ) ceci en comparant avec le contrôle négatif ( $4.91 \pm 0.44$ ), cette différence est statistiquement significative donc on peut dire que les boues de la station de traitement des eaux usées présentent un effet génotoxique, D'autres travaux sur végétaux supérieurs, Mielli *et al.*, (2008), ont montré un effet génotoxique sur les cellules de *Tradescantia pallida* (test Trad-MN) mais sans relation dose réponse, ce qui met en question le potentiel génotoxique.

Dans notre travail, Les boues liquides testées possèdent un effet cytotoxique par la diminution de l'IM et un effet génotoxique significatif pour les boues liquides et sèches par l'augmentation des aberrations chromosomiques par le test d'*Allium cepa* sur les extrémités racinaires.

**Tableau 5 :** Effets des boues sur l'indice mitotique et les phases de mitose dans les racines d'*Allium cepa*.

Traitement	NCC	IM±DS	Phases mitotiques (%) ± DS			
			Prophase	Métaphase	Anaphase	Télophase
Control	5339	46.43±2.88 a	76.13±1 a	9.97±0.34 a	6.28±0.84 a	7.61±0.7 a
Boue liquide	5894	39.61±3.26 b	73.02±1.96 b	11.52±1.05 b	5.97±0.73 a	9.47±1.02 bc
Boue Séche 6 mois	5180	45.08±2.17 a	68.96±1.33 c	13.02±0.59 c	6.8±0.77 ab	11.21±0.7 7d
Boue Séche 1 ans	5187	45.94±2.55 a	71.65±1.48 b	11±1.1a b	7.38±0.56 b	9.96±0.75 c
Boue Séche 2 ans	5409	44.35±3.41 a	73.56±1.51 b	10.77±0.79 ab	6.83±0.67 ab	8.82±0.7 b

a, b, c : les mêmes lettres indiquent qu'il n'y a pas de différence significative.

**NCC** : nombre de cellules comptées.

**IM** : indice mitotique.

**DS** : Deviation standard.

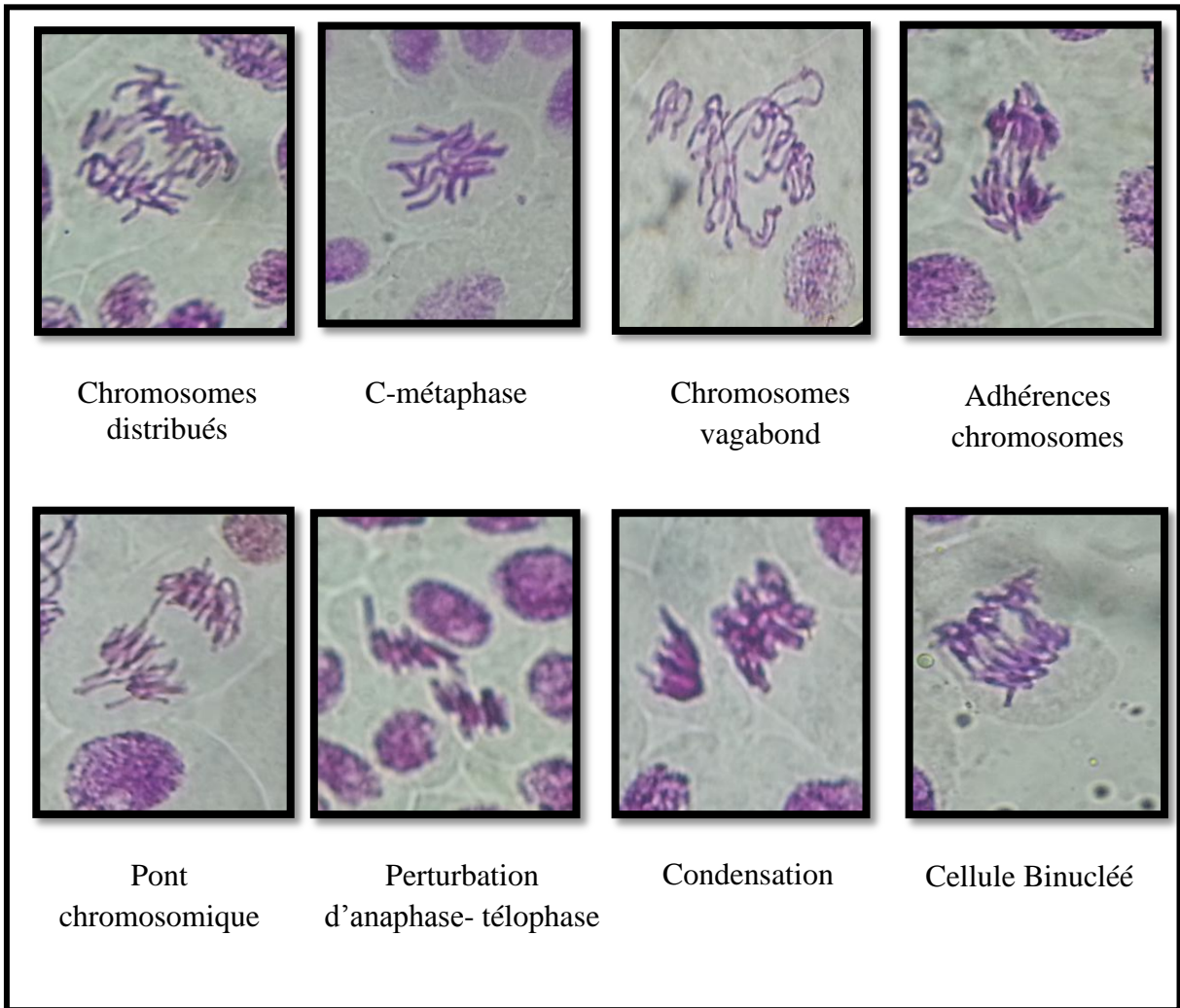
**Tableau 6.** Pourcentage des anomalies chromosomiques des boues dans les racines d'*Allium cepa*.

Traitement	NCC	FM	CM	PCM	CBM	CAM	PA	PCA	C	PAT	AT± DS*
Controle	5339	0.11	0.84	0.21	0,73	0.64	0.22	0.15	0.96	1.04	<b>4.91±0.44</b> a
Boue liquide	5894	0.12	1.94	0.12	0,16	0.94	0.91	0.15	0.43	2.87	<b>7.63±0.94</b> b
Boue Séche 6 mois	5180	0.19	1.55	0.5	1,02	0.99	1.16	0.58	0.72	3.16	<b>9.87±0.81</b> c
Boue Séche 1 ans	5187	0.11	1.74	0.44	0,22	1.03	0.63	0.04	1.31	2.75	<b>8.27±0.64</b> b
Boue Séche 2 ans	5409	0.09	1	0.11	0,95	0.56	0.29	0.15	1.51	2.66	<b>7.32±0.61</b> b

**a, b, c** : les mêmes lettres indiquent qu'il n'y a pas de différence significative.

**NCC** : nombre de cellules comptées,

**FM**: fragment dans la métaphase, **CM**: C-métaphase, **PCM**: Perte de chromosome dans la métaphase, **CBM**: Cellules Binuclée dans la métaphase, **CAM**: Chromosome Adherences dans la métaphase, **PA**: Pont dans l'anaphase, **PCA** : Perte de chromosome dans l'anaphase, **C**: Condensation des chromosomes, **PAT**: Perturbation d'anaphase-télophase, **AT**: Anomalies totales, **DS**: Deviation standard.



**Figure 12:** Les aberrations chromosomiques qui induit par les boues sur *Allium cepa*.

# Conclusion



## Conclusion

En général les boues issues des systèmes d'épuration des eaux usées sont reconnues par leur pouvoir fertilisant, en termes de matière organique, d'azote, de phosphore et des oligoéléments. Néanmoins, les boues de STEP peuvent aussi contenir des éléments traces métalliques (Cr, Zn, Cd, Pb...); des polluants organiques susceptibles de provoquer des effets nocifs sur les milieux récepteurs. Ces différentes sources de polluants sont à l'origine du pouvoir génotoxique et cytotoxique.

Dans ce travail nous avons mis en œuvre : le test d'Ames (détecte des mutations réverses chez les bactéries *Salmonella typhimurium*) qui a été le plus fréquemment utilisé dans le domaine de la mutagénicité de l'eau usée, pour évaluer l'activité mutagène des sous-produits, boues, en utilisant les deux souches de *Salmonella typhimurium* TA 98 et TA100, sans et avec activation métabolique (S9mix), et le test de génotoxicité des aberrations chromosomiques sur plantes supérieures (test *Allium cepa*) au niveau des méristèmes racinaires des d'oignon.

Pour le mutatest (test d'Ames) a montré l'effet mutagène provoqué par les boues liquides et sèches qui induisent une réversion de la souche auxotrophe et l'apparition de souches prototrophes sous forme de colonies sont appelées révertants.

Concernant, les résultats du test de génotoxité (*Allium cepa*), les boues liquides ont montré un effet cytotoxique par la diminution de l'IM et un effet génotoxique significatif pour les boues liquides et sèches par l'augmentation des aberrations chromosomiques par le test d'*Allium cepa* sur les extrémités racinaires par rapport au contrôle négatif.

L'étude des effets génotoxiques et/ou mutagènes concerne de nombreux produits et est devenue d'une grande importance. Les tests sont effectués sur des bactéries et sur des cellules eucaryotique. Cependant, un seul test ne peut pas mettre en évidence tous les agents génotoxiques et/ou mutagènes. Il convient alors de réaliser plusieurs tests selon une procédure bien définie.

# **Références bibliographiques**

**Références bibliographiques**

1. Abessa R., Tabet S., (2014). Étude microbiologique et génotoxique des boues des eaux usées de la ville de Guelma. Mémoire de master. Université 8 Mai, Guelma, 101p.
2. Amir S., (2005). Contribution à la valorisation de boues de stations d'épuration par compostage : devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du compost. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique, Toulouse, 312p.
3. Anaëlle P., (2009). Estimation de performances épuratoires : caractérisation de boues de station d'épuration. Mémoire de master. Université Pierre et Marie Curie, Paris, 48p.
4. Azzabi A., (2012). Influence des boues résiduelles sur le comportement d'une culture sous-jacente à Touggourt. Diplôme d'ingénieur d'état. Université Kasdi Merbah, Ouargla, 58p.
5. Bach C., (2011). Evaluation de la migration des constituants de l'emballage en poly (éthylène téréphtalate) vers l'eau, des facteurs d'influence et du potentiel toxique des migrants. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France, 254p.
6. Berouh Y., (2014). Evaluation de la toxicité des eaux usées traitées par la station d'épuration de Guelma et son impact sur l'oignon « *Allium cepa* ». Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba, 128p.
7. Bougrier S., (2005). Optimisation du procédé de méthanisation par mise en place d'un co-traitement physico-chimique : application au gisement de biogaz représenté par les boues d'épuration des eaux usées. Mémoire de magistère. Université Mentouri, Constantine, 179p.
8. Blondeau F., (1985). Le traitement centralisé des boues. Edition TSM l'eau, n°6, pp 231-242.
9. CCME (Conseil Canadien des Ministres de l'Environnement), (2012). Guide pour la valorisation des biosolides municipaux des boues municipales et des boues de fosses septiques traitées, 117p.
10. Chibani S., (2010). Analyse physico- chimique et rhéologique des boues d'épuration des eaux usées de la ville de Guelma. Mémoire de magister. Université 08 mai 1945, Guelma, 121p.
11. CNB (Comité National des Boues), (2001). Les boues d'épuration municipales et leur utilisation en agriculture. Collection valorisation agricole des boues d'épuration. Edition ADEME, France, 217p.

12. Cotelle S., (1999). Etude de la génotoxiques de matrice complexe à l'aide de plantes supérieures. Thèse de doctorat. Université Ecotoxicologie, Biodiversité et Santé environnementale, Paris, 247p.
13. Daloz A., (2007). L'épuration des eaux usées par les filtres plantés de macrophytes. Mémoire de fin d'étude. Ecole Nationale Supérieure d'Architecture, Lyon, 26p.
14. De Meo M., Laget M., Giorgio C., Guiraud H., Botta A., Castegnaro M., Dumenil G., (1996). Optimization of the salmonella / mammalian microsome assay for urine mutagenesis by experimental designs. *Mutation Research*, pp 51-65.
15. Derouiche F., (2012). Contribution à l'étude des boues résiduaires comme amendement organiques pour les cultures maraichères. Mémoire de magister. Université d'Oran, Oran, 102p.
16. Digniolle H., (1980). L'assainissement des eaux résiduaires domestique. CSTC. Revue n° 3, pp 44-52.
17. Djeddi H., (2007). Utilisation des eaux d'une station d'épuration pour l'irrigation des essences forestières urbaines. Mémoire de magistère. Université Mentouri, Constantine, 144p.
18. Dudkowski A., (2001). Les boues d'épuration agricoles. *Courrier de l'Environnement*, 41: 134-135.
19. Edeline F., (1997). L'épuration biologique des eaux. Théorie et technologie. Edition CEBEDOC, 298p.
20. Fardel O., Vernhet L., Nouvel V., Jung A., Legrand A., (2009). Utilisation des tests de génotoxicité pour la surveillance de l'exposition des travailleurs dans l'industrie du traitement et recyclage des déchets. Rapport final. Etude N° 07-0667/1A 73p.
21. Gamarasni M A., (1981). Utilisation agricole des boues d'origines urbaines. (F.R). AFEE, Paris 128p.
22. Grant WF., (1982). Chromosome aberration assays in Allium. Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox program, *Mutation Research* 99: 273-291.
23. Guerfi Z., (2012). Impact de l'utilisation des boues résiduaires sur les propriétés physico-chimique des sols de haute vallée de la Medjerda wilaya de souk ahras. Mémoire de magistère. Université Badji-Mokhtar, Annaba, 73p.
24. IAURIF (Institut d'Aménagement et d'Urbanisme de la Région d'Ile de France), (2003). Les boues d'épuration urbaines d'Ile de France : enjeux sanitaires et environnementaux. Edition ILE, France, p6.

25. Impens R., Avril C., (1992). Code de bonnes pratiques pour l'utilisation en agriculture de fertilisants et amendements riches en cadmium. Note de synthèse. Unité d'enseignement et de recherche de biologie végétale, Belgique, 76p.
26. Jardé E., (2002). Composition organique de boues résiduares de station d'épuration lonaines : caractérisation moléculaire et effets de la biodégradation. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy I, 271p.
27. Jaroz J., (1985). Le traitement des boues des stations d'épuration, centre de formation et de documentation sur l'environnement industriel, Paris.
28. Jedidi N., Hassen A., Van Cleemput O., M'Hiri A., (2000). Caractérisation du compost et des résidus urbains utilisés comme amendements organiques dans le sol. Revue de l'INRA, 15: 33-49.
29. Juste G., (1994). Les micropolluants métalliques dans les boues résiduares des stations d'épuration urbaines. Convention ADEM- INRA, Edition ADEM, 209p.
30. Karaali R., Khettal M., Reggam R., (2008). Etude comparative de la qualité physicochimique et bactériologique des eaux usées avant et après épuration : cas de la station d'épuration de la ville de Guelma (Nord-est Algérie). Mémoire d'ingénieur. Université 8 Mai de Guelma, 110p.
31. Karonne S., (2008). Effets des boues résiduares sur le développement des semis du chêne liège (*Quercus suber* L.). Mémoire de magistère. Université mentouri, Constantine, 217p.
32. Khanna N., Sharma S., (2013). *Allium cepa* root chromosomal aberration, Indian. Pharm. Biol. Res, Vol.1 (3), 105-119. ISSN : 320-9267.
33. Koller E., (2004). Traitement des pollutions industrielles eau, air, sols, boues, 2<sup>ème</sup> édition. Dunod, 566p.
34. Lambkin D., Nortcliff S., white T., (2004). The importance of precision in sampling sludges, biowastes and treated soils in a regulatory framework Trends in Analytical Chemistry, 23:10-11.
35. Lefevre G., (1977). Aspects qualitatifs de l'utilisation agronomique des boues résiduares des stations d'épurations. Bull. d'AFES n°3: 125-140.
36. Leme D., Aparecida M., Marin Morales M., (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application, Mutation Research, 682: 71-81.
37. Madigan M., Martinko J., (2007). Biologie des micro-organismes, Note de synthèse. Unité d'enseignement et de recherche de biologie, Paris, 45p.

38. Marcano L., Carruyo M. H., Del campo A., Montiel A., (2004). Cytotoxicity and mode of action of Maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa*. Environ. Res. 94: 221-226.
39. Maron D., Ames B. N. (1983). Revised methods for the salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. 113: 173-215.
40. Marshak A., (1937). The effects of X-rays on chromosomes in mitosis. Proc. Natl. Acad. Sci. 23: 362-369.
41. Mathian R., (1986). Les procédés physico-chimiques d'épuration des eaux usées urbaines. I.R.C.H.A, documents techniques.
42. Michel L., (1984). Les métaux lourds dans les boues de stations d'épuration : Valorisation agricole et extraction des métaux toxiques. Assistant Section de pollution des eaux. Laboratoire central des Ponts et Chaussées, 36p.
43. Mortelmans K., Zeiger E., (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutat. Res455: 29-60.
44. Nesslany F., (2013). Etude de génotoxicité. Mémoire de Master. Institut Pasteur de Lille, Paris, 40p.
45. OPECST (Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Technologiques), (2001). Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Rapport n°261:100-261.
46. Panda K. K., Patra J., Panda B. B., (1996). Induction of sister chromatid exchanges by heavy metal salts in root meristem cells of *Allium cepa*. Biol. Plantarum 38 :555-561.
47. Pernin C., (2003). Epannage de boues d'épuration en milieu sylvo-pastoral .Etude des effets in situ et en mésocosmes sur la mésofaune du sol et la décomposition d'une litière de chêne liège. Mémoire de magistère, Paris, 220p.
48. Pillière F., Falcy M., (1991). Exposition aux produits chimiques génotoxique. Fiche medico- technique. Institut National de recherche et de sécurité, Paris, 330- 336.
49. Prescott L M., Harley J P., Klein D A., (2003). Microbiologie. Bruxelles. De Boeck supérieur. ISBN 2-8041-4256-6, 1164p.
50. Rank J., Nielson M. H., (1993) a modified *Allium* test as a tool in screening of the genotoxicity of complex mixtures. Hereditas 118: 49-53.
51. Recep L., Dilek A., Yasin E., Muhsin K., (2010). Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/Salmonella and *Allium* test. Chemosphere 80 : 1056–1061.
52. Rodier J., (1996). L'analyse de l'eau; eaux naturelles, eaux résiduelles, eaux de mer. 8<sup>ème</sup> édition. Dunod, 1383p.

53. Singh N., McCoy M., Tice R, Schneider L., (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184-191.
54. Sommers L.E., (1977). Chemical composition of sewage sludges and analysis of their potential use as fertilizers. *Environ. Qual*, 6: 225-229.
55. Soughir D., (2009). Modification métaboliques, moléculaires et génotoxicité par le cadmium chez *vicia f.* Thèse de doctorat. Université de Carthage, Tunisie, 238p.
56. SPDE (Syndicat Professionnel Des Entreprises), (2006). Services d'eau et d'assainissement.
57. Thomazeau R., (1981). Station d'épuration, eau potable, eaux usées. Précis théorique et technologique, 435p.
58. Wallace B.M., Krzic M., ForgeT.A., Broersma K., Newman R.F., (2009). Biosolids increase soil aggregation and protection of soil carbon five years after application on a crested wheatgrass pasture, *Journal of Environmental Quality* 38: 291-298.
59. Werther J., Ogada T., (1999). Sewage sludge combustion. *Progress in energy and combustion science*, 25: 55-116.
60. Yıldız M., Cigerci I., Konuk M., Fidan A., Terzi H., (2009). Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*, 75: 934–938.

## Sites internet

(1)-ADEME (Agence de l'environnement et la Maîtrise de l'Energie, France), (2001) Les boues d'épuration municipales et utilisation en agriculture.

<http://www.ademe.fr/collectivites/Dechets-new/mots-chiffres/dec.pdf> (15/03/2015).

(2)-David M., Demarini K., Huff J. L'évaluation de la toxicité génétique.

[http://www.ilo.org/safework\\_bookshelf/french?content&nd=857170397](http://www.ilo.org/safework_bookshelf/french?content&nd=857170397). (10/04/2015).

(3)-Dégremont C., Cachot J., (2009). La génotoxicité quel risques pour les espèces aquatiques.

[www.seineaval.crihan.fr/web/attached\\_file/componentd/kmelia106](http://www.seineaval.crihan.fr/web/attached_file/componentd/kmelia106). (10/04/2015).

(4)-Euzeuby J.P., Mutations bactériennes.

<http://www.bacteriologie.net/generale/mutations.html>. (29/04/2015).

(5)-Laurent B., (2013). Modèles d'exposition temporelle, voies d'exposition, indicateurs d'exposition : produits uniques ou mélanges.

[www.biomedicale.univ-paris5.fr/.../toxico/.../TC1%20-%20BODIN.ppt](http://www.biomedicale.univ-paris5.fr/.../toxico/.../TC1%20-%20BODIN.ppt). (29/04/2015).

(6)-Le test d'Ames pour évaluer le pouvoir cancérigène d'une substance.

<http://www.technobio.fr/article-le-test-d-ames-43438456.html>. (29/04/2015).

(7)-[http://fr.wikipedia.org/wiki/Test\\_d'Ames](http://fr.wikipedia.org/wiki/Test_d'Ames). (17/01/2015).

(8)-[http://fr.wikipedia.org/wiki/Boue\\_activée](http://fr.wikipedia.org/wiki/Boue_activée). (17/01/2015).

(9)-<http://www.ademe.fr/partenaires/boues/pages/f14.htm>. (20/02/2015).



# **Annexes**

## Test Ames

### Annexe n°1. Solution Histidine / Biotine (0,5mM).

Utilisée dans le Test de mutagenèse

Ingrédients	Par 1000ml
D-Biotine.....	0,124g
L-histidine-HCl.....	0,096g
Eau Distillée.....	1000ml

### Annexe n°2. Top agar.

Utilisé dans le Test de mutagenèse

Ingrédients	Par 1000ml
Agar.....	6g
Chloride de sodium (NaCl).....	6g
Histidine/Biotine(0,5mM).....	100ml
Eau Distillée.....	900 ml

### Annexe n°3. Solution 0,02 N NaOH

Utilisée dans la solution ampicilline.

Ingrédients	Par 250 ml
NaOH.....	0,2g
Eau Distillée.....	250ml

### Annexe n°4. Solution ampicilline (0,8/0,02% NaOH)

Utilisée dans le Test de résistance à l'ampicilline

Ingrédients	Par 100 ml
Ampicilline trihydraté.....	0,8g

0,02 N NaOH ..... 100 ml

**Annexe n°5. Solution de cristal violet (0,1%).**

Utilisé dans le Test de sensibilité au cristal violet

<b>Ingrédients</b>	<b>Par 100 ml</b>
Cristal violet.....	0,1g
Eau distillée.....	100ml

**Annexe n°6 .Milieu minimal agar (GM).**

Utilisé dans le Test de mutagenèse

<b>Ingrédients</b>	<b>Par 1000ml</b>
Agar .....	15g
Eau distillée.....	900ml
50X VB sels.....	20ml
20% Glucose.....	50ml

L'agar dans l'eau distillée est autoclavée à 120° pendant 20 minutes, une fois refroidie, nous ajoutons les sels 50X VB et le glucose autoclavés séparément.

**Annexe n°7. Milieu Vogel-Bonner E (50x).**

Utiliser dans le milieu minimal agar

<b>Ingrédients</b>	<b>Par 1000ml</b>
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O).....	10g
Acide citrique.....	100g
Phosphate de potassium dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	500g
Sodium ammonium phosphate (NaH <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> ,4H <sub>2</sub> O).....	175g
Eau distillée.....	670ml

Dans l'eau distillée est ajoutée à des ingrédients ci-dessus dans l'ordre écrit. Autoclavée à 120° pendant 20 minutes, est stocké dans l'obscurité à la température ambiante.

**Annexe n°8. Milieu Histidine/ biotine/Ampicilline (BHA).**

Utilisé dans le Test de Réclamation de l'Histidine

<b>Ingrédients</b>	<b>Par 1000ml</b>
Agar .....	15g
Eau distillée.....	900ml
50X VB sels.....	20ml
20% Glucose.....	50ml
Histidine-HCl-H <sub>2</sub> O.....	8 ml
(0,5g / 100 ml H <sub>2</sub> O)	
0,01 Mm Biotine.....	8ml
Ampicilline (0,8/0,02% NaOH).....	3ml

**Annexe n°9 : Solution glucose (20 %)**

Utiliser dans le milieu minimal agar

<b>Ingrédients</b>	<b>Par 1000ml</b>
Glucose .....	200g
Eau distillée.....	700ml

**Annexe n°10 : Salt solution (1.65 M KCl + 0.4 M MgCl<sub>2</sub>)**

Utilisé dans le \$9 mix de Test de mutagenèse

<b>Ingrédients</b>	<b>Par 500 ml</b>
chloride de Potassium (KCl).....	61.5 g
chloride de Magnesium (MgCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O) .....	40.7 g

Eau distillée .....500 ml

Dans l'eau distillée est ajoutée à des ingrédients. autoclavée à 120° pendant 20 minutes.

#### **Annexe n°11 : Tampon 0.2 M phosphate de sodium, pH 7.4**

Utilisé dans le S9 mix de Test de mutagenèse

**Ingredients** **Par 500 ml**

0.2 M phosphate de sodium dihydrogène (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) .....60 ml

(13.8 g/500 ml)

0.2 M phosphate de disodium hydrogène (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) .....440 ml

(14.2 g/500 ml)

#### **Annexe n°12 : Solution 1 M NADP**

Utilisé dans le S9 mix de Test de mutagenèse

**Ingrédients** **Par 5 ml**

NADP (F.W. 765.4).....0,383 mg

Eau distillée stérile ..... 5 ml

#### **Annexe n°13 : glucose-6-phosphate 1 M**

Utilisé dans le S9 mix de Test de mutagenèse

**Ingrédients** **Par 10 ml**

Glucose-6-phosphate (G-6-P)..... 2.82 g

Eau distillée stérile ..... 10 ml

#### **Annexe n°14 : S9 mix (extrait de foie de rat +cofacteurs)**

Utilisé dans le Test de mutagenèse

**Ingrédients** **Par 50 ml**

Extrait de foie de rat S9 ..... 2.0 ml (4%)

MgCl <sub>2</sub> -KCl salts .....	1.0 ml
1 M glucose-6-phosphate .....	0.25 ml
0.1 M NADP .....	2.0 ml
0.2 M phosphate buffer, pH 7.4 .....	25.0 ml
Eau distillée stérile .....	19.75 ml

### ***Test Allium Cepa***

#### **Annexe n°15 : La solution HCl (1N) à 8%**

Utilisé dans le colorant Feulgen

<b>Ingrédients</b>	<b>Par 10 ml</b>
HCl.....	8ml
Eau distillé.....	92 ml

#### **Annexe n°16 : La solution d'Acide Acétique Glacial à 45%**

<b>Ingrédients</b>	<b>Par 100 ml</b>
Acide acétique glacial.....	45 ml
Eau distillée .....	55 ml

#### **Annexe n°17 : Solution de Carnoy**

Utilisé dans la fixation des racines

<b>Ingrédients</b>	<b>Par 10ml</b>
Acide acétique glacial.....	1ml
Éthanol 100%.....	3ml

### **Annexe n°18 : colorant Feulgen**

Utilisé pour la coloration des racines

<b>Ingrédients</b>	<b>Par 50 ml</b>
Fushine basique .....	0,25g
Eau distillée.....	50 ml
1N d'HCl .....	5ml
Métasulfite de Potassium $K_2S_2O_5$ .....	0,5 g

Ajouter à 0,25 g de Fushine basique 50 ml d'eau distillée bouillante (100°), attendre 10 minutes jusqu'à ce que le mélange atteint une température de 50° puis ajouter 5 ml d'une solution 1N d'HCl et mixer puis ajouter 0,5 g de métasulfite de Potassium  $K_2S_2O_5$ , couvrir la solution par papier aluminium et la conservée à 4°C. Après 24h la solution est filtrée et peut être utilisé.

### **Annexe n°19 : Préparation de solution de boue sèche**

<b>Ingrédients</b>	<b>Par 1000 ml</b>
Boue sèche.....	100g
Eau distillée.....	1000ml

100g de boue sèche sont mis en agitation avec 1litre d'eau distillée pendant 24 heures, à une température de 20° C et a l'obscurité. Les solutions ainsi obtenues sont ensuite centrifugées à 2000 tpm pendant 15 minutes et le surnageant sont prélevés pour être testés.