

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

UNIVERSITE 08 Mai 1945 de GUELMA

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DÉPARTEMENT SNV



MEMOIRE DE MASTER

DOMAINE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
SPECIALITE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE  
OPTION BIOLOGIE MOLECULAIRE DES PROCARYOTES

THÈME

**Evaluation de l'activité mutagène par  
le test d'Ames des sous produits de chloration  
chloroforme et bromoforme**

Présenté par :

**BELABED Imene**

Membres de jury :

**PRESIDENT: M<sup>r</sup> BENOUARETH Djamel Eddine**

**Prof. Université de Guelma.**

**ENCADREUR : M<sup>me</sup> KHALLEF Messaouda**

**M.A.A. Université de Guelma.**

**EXAMINATRICE : M<sup>me</sup> TORCHE Asma**

**M.A.A. Université de Guelma.**

**Juin 2013**

# REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements et ma profonde gratitude, avant tout à **Dieu** le tout puissant et miséricordieux qui m'a donné le courage et la force pour mener à bout ce modeste travail.

Je remercie chaleureusement mon encadreur, Madame **Khallelf 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.

Je remercie aussi Pr. **Benouareth Djamel Eddine** de nous avoir honoré de sa présence et d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de ce mémoire.

Je voudrais également remercier vivement Madame **Torche Asma** pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je tiens aussi à remercier vivement les doctorantes, **Thabet Mona** et **Abda Ahlem** pour leur aide continuel au cours de la réalisation pratique de ce travail.

Mes 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 stage.

Un merci du fond du cœur à ma famille qui est toujours à mes côtés, mes parents qui suivent mon travail de près avec affection et respect.

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

**MERCI**

## Liste des figures

<b>Figures</b>	<b>Intitulés</b>	<b>Pages</b>
<b>1</b>	Dispositif du traitement à l'ozone	5
<b>2</b>	Dispositif de chloration au bioxyde de chlore	6
<b>3</b>	Dispositif de chloration par le chlore gazeux	7
<b>4</b>	Le spectre électromagnétique	7
<b>5</b>	Dispositif du traitement par UV	8
<b>6</b>	Les membranes de filtration	9
<b>7</b>	Désinfection par chloration	12
<b>8</b>	La cohabitation du HOCl et ClO <sup>-</sup> en fonction du pH	14
<b>9</b>	Action du chlore sur la cellule microbienne	16
<b>10</b>	La cohabitation du HOCl et ClO <sup>-</sup> en fonction du pH et de la température	18
<b>11</b>	Modèle de réaction du chlore avec les noyaux aromatiques	27
<b>12</b>	Les différents tests de génotoxicité de l'eau	37
<b>13</b>	Principe du test d'Ames	39
<b>14</b>	Principe du SOS chromotest	42
<b>15</b>	Principe du test des comètes	44
<b>16</b>	Principe de la méthode de post-marquage au 32P de l'ADN	46
<b>17</b>	Formation de micronoyaux	50
<b>18</b>	Photos (Hybridation in situ fluorescente). Exemples de MN centromériques (spots de fluorescence à l'intérieur des MN).	50

<b>19</b>	Principaux mécanismes d'apparition des aberrations de structures chromosomiques.[1]	53
<b>20</b>	La réclamation de l'histidine.	61
<b>21</b>	L'effet des UV sur les souches d'Ames et la souche sauvage.	61
<b>22</b>	L'effet de l'Ampi et du CV sur les souches d'Ames.	62

**Liste des tableaux**

<b>Tableaux</b>	<b>Intitulés</b>	<b>pages</b>
<b>1</b>	Les principaux genres d'eau brute	2
<b>2</b>	Tableau comparatif des différents procédés de désinfection	10
<b>3</b>	Propriétés physico-chimiques des THM	26
<b>4</b>	Limites imposées et recommandées pour les SPC	35
<b>5</b>	Différentes mutations des souches utilisées	57
<b>6</b>	Mutagenicité du Chloroforme par <i>S. typhimurium</i> TA98 et TA100 sans activation métabolique	63
<b>7</b>	Mutagenicité du Bromoforme avec <i>S. typhimurium</i> TA98 et TA100 sans activation métabolique	63

## Liste des abréviations

**<sup>32</sup>P**: Phosphore 32.

**3D**: Damaged DNA Detection.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**AHA** : acides haloacétiques.

**Ampi** : Ampicilline.

**ARN** : Acide ribonucléique.

**ATP** : Adénosine tri-phosphate.

**C** : Couleur.

**ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>** : chlorite.

**Ca (OH)<sub>2</sub>** : Hydroxyde de calcium.

**Ca Cl<sub>2</sub>**: Chlorure de calcium.

**Ca(ClO)<sub>2</sub>** : Hypochlorite de calcium .

**CaO**: Oxyde de Calcium.

**Cl<sup>-</sup>** : Ion chlorure.

**Cl<sub>2</sub>** : Le dichlore.

**ClO<sub>2</sub>** : Le dioxyde de chlore.

**CODB** : Carbone organique dissous biodégradable.

**CV**: Cristal violet.

**DBO<sub>5</sub>** : demande biologique en oxygène en 5 jours

**DCO** :demande chimique en oxygène

**DO** : Densité optique.

**DP**: Désinfection primaire.

**DS**: Désinfection secondaire.

**ECS** : Echanges de chromatides-sœurs.

**EMS**: Ethyl methanesulfonate.

**FB** : Filtration biologique.

**Fe** : Fer.

**Fe<sup>+2</sup>** : Ion ferreux.

**Fe<sup>3+</sup>** : Ion ferrique.

**GO**: Goûts et odeurs.

**H<sup>+</sup>** : Ion hydrogène ou proton.

**H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>** : Ion d'hydronium.

**HAN**: haloacétonitriles.

**HC** : hydrates de chlorale.

**HCl** : Le chlorure d'hydrogène.

**HClO**: Acide hypochloreux.

**HGPRT**: Hypoxanthine Guanine Phospho-Ribosyl Transférase.

**His**: Histidine.

**HOBr** : acide hypobromeux.

**IF**: Facteur d'induction.

**KH** : constante Henry.

**KOE** : coefficient de partage octanol-eau.

**Mn** : Manganèse.

**MN** : Micronoyau.

**Mn<sup>2+</sup>** : Ion manganèse.

**MnO<sub>2</sub>** : Dioxyde de manganèse.

**MON** : matière organique naturelle.

**NaCl**: Chlorure de sodium.

**NaClO**: Hypochlorite de sodium.

**NaClO<sub>2</sub>** : Le chlorite de sodium.

**NaOH**: Hydroxyde de sodium.

**NH<sub>2</sub>Cl** : Chloramine.

**NH<sub>3</sub>** : Ammoniac.

**O<sub>3</sub>** : L'ozone.

**OCl<sup>-</sup>** : Hypochlorite.

**OH<sup>-</sup>** : Ion hydroxide.

**OMS** : Organisation mondiale de la santé.

**Ox**: Oxydation du fer et du manganèse.

**PAH** : Polycyclique aromatique hydrocarbure.

**PAL**: Phosphatase alcaline.

**pH** : Potentiel d'hydrogène.

**Pho<sup>c</sup>** : Phosphatase alcaline constitutive.

**ppm** : partie par million.

**SCGE**: Single Cell Gel Electrophoresis.

**SPC** : Sous produits de chloration.

**SPD** : Sous produits de désinfection.

**T** : température.

**THM** : Trihalométhanes.

**THM** : trihalométhanes.

**TOX** : les composés organohalogénés.

**UV** : Ultra-violet.

**β-gal** : β-galactosidase.

---

## Glossaire

- **Aneugène** : Substance ou processus qui, *via* des interactions avec les composants de la cellule mitotique ou méiotique lors de la division cellulaire, provoque la formation de cellules ou d'organismes aneuploïdes.
- **Aneuploïdie** : caractérise une cellule d'un organisme qui - suite à une mutation - ne possède pas le nombre normal de chromosomes.
- **Apoptose** : Mort cellulaire programmée caractérisée par une succession d'étapes menant à la désintégration des cellules en particules membranaires qui sont ensuite éliminées par phagocytose ou par excrétion.
- **caryotype (ou caryogramme)** : est l'arrangement standard de l'ensemble des chromosomes d'une cellule, à partir d'une prise de vue microscopique. Les chromosomes sont photographiés et disposés selon un format standard : par paire et classés par taille, et par position du centromère On réalise des caryotypes dans le but de détecter des aberrations chromosomiques (telles que la trisomie 21) ou d'identifier certains aspects du génome de l'individu, comme le sexe (XX ou XY). Notons qu'un caryotype se présente sous forme de photographie.
- **Cellules en interphase** : Cellules qui ne sont pas en phase de mitose.
- **Centromère** : Région de l'ADN d'un chromosome où les deux chromatides sont reliées entre elles et sur laquelle les deux kinétochores sont fixés côte à côte.
- **Chromatide** : est une molécule d'ADN (le nucléofilament) associée à des protéines histones et des protéines non-histones .Chaque chromosome d'une cellule peut être constitué d'une ou de deux chromatides selon son état dans la division cellulaire.
- **Chromatides-sœurs** : Les deux Chromatides relié par un centromère d'un même Chromosome.
- **Chromosomes homologue** : sont des chromosomes semblables portent les mêmes allèles et contrôle les mêmes caractères ils ont le même taille ce a dire le même longueur de bras et le même emplacement de centromère. chaque gène sur un chromosome homologue garde la même localisation sur l'autre. *chromosome non homologue* non de ce qui précède.
- **Clastogène** : Substance ou processus induisant des aberrations chromosomiques structurelles dans des populations cellulaires ou des organismes.

- **Génotoxique** : Tout produit qui provoque tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, adduits, remaniements, mutations, aberrations chromosomiques et aneuploïdies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.
- **Kinétochore** : Assemblage de protéines situé au niveau du centromère d'un chromosome, auquel sont associées les fibres fusoriales lors de la division cellulaire, permettant le mouvement ordonné des chromosomes-fils vers les pôles des cellules-filles.
- **Mutagène** : Toute substance qui provoque une augmentation de la fréquence d'apparition de mutations.
- **Mutagenèse** : Le processus par lequel les mutations sont générées.
- **S9 Mix** : est un mélange des enzymes hépatiques de rat (S9) et de leurs cofacteurs tels que le NADPH et le glucose-6-phosphate (Mix). S9 Mix conduit à la métabolisation de certaines substances produisant des métabolites plus toxiques que la molécule d'origine puisque de nombreuses substances ne deviennent génotoxiques qu'après bioactivation métabolique.

---

# Sommaire

Liste des figures.

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Glossaire

Introduction..... 1

## Partie bibliographique :

### Chapitre I : Les procédés de désinfection de l'eau potable

1. Généralités..... 2

2. Les procédés de désinfection..... 4

2.1. Les procédés physico-chimiques..... 4

2.1.1. L'ozone..... 4

2.1.2. Bioxyde de chlore..... 5

2.1.3. Chlore gazeux..... 6

2.1.4. Les chloramines..... 7

2.2. Les procédés physiques..... 7

2.2.1. Les rayons ultra-violets..... 7

2.2.2. L'osmose inverse..... 8

3. Chloration de l'eau potable..... 11

3.1. L'histoire de la chloration..... 11

3.2. Principe de la chloration..... 11

3.3. Les types du chlore..... 12

---

3.3.1. Chlore gazeux.....	12
3.3.2. Hypochlorite de calcium.....	13
3.3.3. Hypochlorite de sodium.....	13
3.4. Chimie du chlore dans l'eau.....	13
3.5. Mode d'action du chlore.....	14
3.5.1. Action du chlore sur les micro-organismes.....	15
3.5.2. Action du chlore sur les composés organiques.....	16
3.5.3. Action du chlore sur les composés inorganiques.....	16
4. Influence de facteurs sur l'efficacité de la chloration de l'eau potable.....	17
5. Les paramètres du choix du procédé de désinfection.....	19
<b>Chapitre II : Les sous produits de chloration</b>	
1. Définition de SPC.....	20
2. Formation de SPC.....	20
3. Influence de facteurs sur la formation de SPC.....	21
4. Les types de SPC.....	22
4.1. SPC non volatils.....	23
4.1.1. Les acides haloacétiques(AHA).....	23
4.1.2. Les haloacétonitriles(HAN).....	23
4.1.3. Les hydrates de chlorale(HC).....	23
4.1.4. Chlorite.....	24
4.2. SPC volatils.....	24
4.2.1. Les trihalométhanes(THM).....	24
4.2.2. Les chloroanisoles.....	24

---

4.2.3. Les chlorophénols.....	25
4.2.4. Les chloropicrines.....	25
5. Les trihalométhanes.....	25
5.1. Définition.....	25
5.2. Les propriétés physico-chimiques.....	26
5.3. Mécanisme de réaction.....	27
5.3.1. Chimie de formation.....	27
5.3.2. Conditions de stabilité.....	28
5.3.3. Influence de facteurs sur la formation de THM.....	28
5.3.3.1. Matière organique naturelle.....	28
5.3.3.2. Bromures.....	28
5.3.3.3. La matière organique naturelle d'origine biotique.....	29
5.3.3.4. Influence des conditions de chloration.....	29
5.4. Normes des THM.....	30
5.5. La pharmacocinétique des THM.....	30
6. Le chloroforme.....	31
6.1. Les propriétés physico-chimiques.....	31
6.2. Les risques pour la santé humaine.....	32
6.2.1. Études épidémiologiques.....	32
6.2.2. Études toxicologiques.....	32
7. Le bromoforme.....	33
7.1. Les propriétés physico-chimiques.....	33
7.2. Les risques pour la santé humaine.....	34

---

7.2.1. Études épidémiologiques.....	34
7.2.2. Études toxicologiques.....	34
8. Normes des SPC.....	35
9. Moyens d'action pour limiter la formation des SPC dans l'eau.....	35

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

1. Généralités.....	37
2. Les types de tests.....	38
2.1. Tests des mutations géniques.....	38
2.1.1. Test d'Ames ou mutatest.....	38
2.1.1.1. Définition.....	38
2.1.1.2. Principe.....	38
2.1.1.3. Particularité des souches bactériennes et du milieu de culture.....	40
2.1.1.4. Avantages et Inconvénients.....	40
2.1.2. Le SOS chromotest.....	41
2.1.2.1. Définition.....	41
2.1.2.2. Principe.....	41
2.1.2.3. Particularité des souches bactériennes.....	42
2.1.2.4. Avantages et Inconvénients.....	43
2.2. Tests des lésions primaires de l'ADN.....	43
2.2.1. Test des comètes.....	43
2.2.1.1. Définition.....	43
2.2.1.2. Principe.....	43
2.2.1.3. Types de lésions génotoxiques mises en évidence par le test des comètes.....	44
2.2.1.4. Avantages et Inconvénients.....	45
2.2.2. Test de Post-marquage au phosphore 32.....	46
2.2.2.1. Définition.....	46
2.2.2.2. Principe.....	46
2.2.2.3. Avantages et Inconvénients.....	47

---

2.2.3. Méthode d'elution alcaline sur filtre.....	47
2.2.3.1. Principe.....	47
2.2.3.2. Avantages et Inconvénients.....	48
2.3. Tests des mutations chromosomiques.....	48
2.3.1. Test des micronoyaux.....	48
2.3.1.1. Définition.....	48
2.3.1.2. Principe.....	49
2.3.1.3. Avantages et Inconvénients.....	51
2.3.2. Test d'aberration chromosomique.....	51
2.3.2.1. Définition.....	51
2.3.2.2. Principe.....	52
2.3.2.3. Types d'aberrations de structure chromosomique.....	52
2.3.2.3.1. Les aberrations de structure portant sur un chromosome.....	52
2.3.2.3.2. Les aberrations de structure portant sur deux chromosomes.....	53
2.3.2.4. Avantages et Inconvénients.....	54
2.4. Autres tests.....	54

## **Partie pratique :**

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

1. Principe du test.....	56
1.1. Matériel biologique.....	56
1.2. Confirmation des génotypes.....	58
1.2.1. La préculture de nuit.....	58
1.2.2. La culture de deux heures.....	58
1.2.3. Le ré isolement des souches tests.....	58
1.2.4. Le stockage des souches.....	59
1.2.5. La vérification des caractères.....	59

1.3. Test de mutagenèse par la Méthode standard avec pré incubation.....	60
1.3.1. Principe.....	60
1.3.2. Technique.....	60
2. Analyse statistique.....	60
<b>Chapitre II : Résultats et discussion.....</b>	<b>61</b>
Conclusion .....	65
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	



## Introduction

L'utilisation du chlore comme un désinfectant hydrique est l'étape finale indispensable dans toute filière de traitement de potabilisation de l'eau et dans la distribution [1]. La chloration est sans contredit un excellent désinfectant et demeure le moyen le plus économique de réduire le risque microbiologique. Une chloration appropriée permet de détruire les virus, bactéries et quelques-uns des parasites que l'on retrouve occasionnellement dans l'eau (Vaillancourt, 2006). En contrepartie, il est admis depuis que les composés organo-halogénés formés par la réaction d'un désinfectant halogène (chlore, brome, chloramine, dioxyde de chlore, ...) avec la matière organique (acides humiques, acides fulviques, phénols...) présente dans l'eau sont considérés comme carcinogènes pour l'homme. Rook, (1974) a été le premier à observer la présence de trihalométhanes (THM) dans l'eau chlorée. Parmi les composés organo-halogénés les plus connus sont les trihalométhanes (chloroforme, bromodichlorométhane, bromoforme,...), les acides chloroacétiques (dichloro et trichloro) et les chlorophénols. Ils sont considérés comme cancérigènes et mutagènes (Vaillancourt, 2006 ; Duvivier & Goffin, 2001).

La réaction suivante est couramment utilisée pour décrire le phénomène (Love 1975).

### **Précurseurs + Chlore → THMs + autres sous-produits**

Les substances humiques constituent les précurseurs principaux de la mutagénicité des eaux chlorées. L'activité mutagène produite est proportionnelle, d'une part, au taux de chloration appliqué, et d'autre part, à la quantité de composés organo-halogénés formée. En 1976, de nouveaux travaux démontrent que le chloroforme, l'un des principaux trihalométhanes retrouvé dans les eaux d'alimentation, est cancérigène chez le rat et la souris. Les nombreux travaux qui ont suivi ont abouti à la démonstration de l'existence d'une activité mutagène induite par les extraits d'eau d'alimentation chlorée dans le test d'Ames sur *Salmonella typhimurium* (Marzin et al., 1998).

Le taux des trihalométhanes et l'apparition de l'activité génotoxique ont été mis en évidence par notre présent travail qui consiste à évaluer l'activité mutagène par le test d'Ames de deux sous produits de chloration (SPC) chloroforme et bromoforme par deux souches de *Salmonella typhimurium* (TA98 et TA100).

## I-1-Généralités

Pour qualifier une eau brute et qu'on la considère de bonne pour être consommée par les êtres humains, on distingue trois niveaux de qualité différents, avec des limites associées à chaque paramètre (Tableau1). Les niveaux A1, A2 et A3 sont les niveaux de qualité dans l'ordre décroissant et à chacun de ces niveaux correspond un traitement adéquat (Paul, 2006). Les eaux de classe A1 nécessitent un traitement préalable, consiste en un traitement physique simple (par exemple le filtrage), suivi d'un procès de désinfection. Dans le cas du genre A2, il est nécessaire de faire un traitement physique normal, traitement chimique et désinfection. Pour le genre A3 il faut des traitements physiques et chimiques intensifs, affinage et désinfection [2].

De tous les traitements mentionnés, nous considérerons la désinfection. Dans ce procès, on cherche à détruire ou à désactiver les organismes pathogènes présents dans l'eau surtout les bactéries, les virus et les protozoaires. Dans les cas des eaux du Genre A2 ou Genre A3, ces organismes sont éliminés en grande partie pendant les opérations de traitement physico-chimique, mais ceci n'est pas suffisant à garantir la totale innocuité de l'eau [2].

**Tableau 1. Les principaux genres d'eau brute [2].**

Paramètre	Unité	Genre A1	Genre A2	Genre A3
pH	-	(6.5-8.5)	(5.5-9.0)	(5.5-9.0)
Couleur	Echelle Pt	20	100	200
Solides en suspension	Mg/l	(25)	-	-
Température	°C	25	25	25
Conductivité (20°C)	uS/cm	(1000)	(1000)	(1000)
Nitrates (*)	Mg/l NO <sub>3</sub>	50	50	50
Fluorures	Mg/l F	1.5	(1.7)	(1.7)
Fer dissous	Mg/l Fe	0.3	2	(1)
Manganèse	Mg/l Mn	(0.05)	(0.1)	(1)
Cuivre	Mg/l Cu	0.05	(0.05)	(1)
Zinc	Mg/l Zn	3	5	5

Bore	Mg/l B	(1)	(1)	(1)
Arsenic	Mg/l As	0.05	0.05	0.1
Cadmium	Mg/l Cd	0.005	0.005	0.005
Chrome total	Mg/l Cr	0.05	0.05	0.05
Plomb	Mg/l Pb	0.05	0.05	0.05
Sélénium	Mg/l Se	0.01	0.01	0.01
Mercure	Mg/l Hg	0.001	0.001	0.001
Baryum	Mg/l Ba	0.1	1	1
Cyanures	Mg/l CN <sup>-</sup>	0.05	0.05	0.05
Sulfates (**)	Mg/l SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	250	250	250
Chlorures (**)	Mg/l Cl	(200)	(200)	(200)
Détersifs	Mg/l laurilsulfate	(0.2)	(0.2)	(0.5)
Phosphates (*)	Mg/l P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	(0.4)	(0.7)	(0.7)
Phénols	Mg/l Phénol	0.001	0.005	0.1
Hydrocarbures dissous ou émulsionnés (après leur extraction dans éther de pétrole)	Mg/l	0.05 0.0002	0.2 0.0002	1 0.001
PAH	Mg/l	0.001	0.0025	0.005
Plaguicides totaux	Mg/l O <sub>2</sub>	-	-	(30)
DCO	%	(70)	(50)	(30)
Oxygène dissous	Saturation	(3)	(5)	(7)
DBO <sub>5</sub>	Mg/l O <sub>2</sub>	(1)	(2)	(3)
Nitrogène	Mg/l N	(0.05)	1.5	4
Ammoniac	Mg/l NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	(0.1)	(0.2)	(0.5)
Matières extractibles avec chloroforme	Mg/l sec	(50)	(5000)	(50000)
Coliformes totaux (37°C)	Mg/l	(20)	(2000)	(20000)
Coliformes fécaux	Mg/l	(20)	(1000)	(10000)
Streptocoques fécaux	Mg/l	Absentes	Absentes	-
Salmonellas	-	En 5l	En 1l	-

(\*) Dans des lacs peu profonds à rénovation lente.

(\*\*) Sauf dans le cas où il n'y ait des eaux plus aptes à être consommées.

Les numéros en parenthèse indiquent des valeurs indicatives souhaitables à caractère Provisionnel.

## **I-2-Les procédés de désinfection**

La désinfection est une étape commune à tous les traitements même si les eaux souterraines présentent naturellement moins de germes pathogènes que les eaux de surface.

Les procédés de désinfection peuvent être physiques (radiation gamma, rayons de Roentgen, radiation ultraviolette, stérilisation par la chaleur,...) ou chimiques (métaux lourds, acides ou alcalins, halogènes, ozone, permanganate,...), les traitements chimiques étant les plus habituels. Entre tous les réactifs chimiques, le chlore et ses composés sont les agents désinfectants les plus utilisés à l'échelon mondial, et pour ceci nous les étudierons avec plus de détail [1].

### **I-2-1-Les procédés physico-chimiques**

Pour la désinfection physico-chimique, il convient de respecter un temps de contact et une dose d'application adaptée afin d'assurer l'efficacité de l'action du composé chimique et minimiser les sous produits

#### **I-2-1-1-L'ozone**

C'est un oxydant très puissant. Il se présente comme un gaz instable, qui doit donc être produit sur place dans des ozoneurs industriels [1].

L'ozone a un potentiel normal d'oxydo-réduction supérieur au chlore. Il possède un spectre d'action germicide supérieur au chlore en ce qui concerne les bactéries et surtout les virus. Il est aussi très efficace contre les protozoaires [1].

Des études ont montré que l'application à une eau potable d'une dose d'au moins 0,4 mg/l d'ozone pendant 4 minutes garantissait l'élimination des virus. Dans une gamme de pH compris entre 6 et 10, à une température de 3 à 10°C, une dose de 0.3 à 2 mg/l d'ozone permet l'élimination du virus de l'hépatite A pour un temps de contact de 5 secondes. De même, les entérovirus sont éliminés par l'application d'une dose de 0.5 – 0.6 mg/l d'ozone en

5 minutes. L'ozonation peut entraîner la formation de sous produits de réaction notamment en présence de bromures [1].

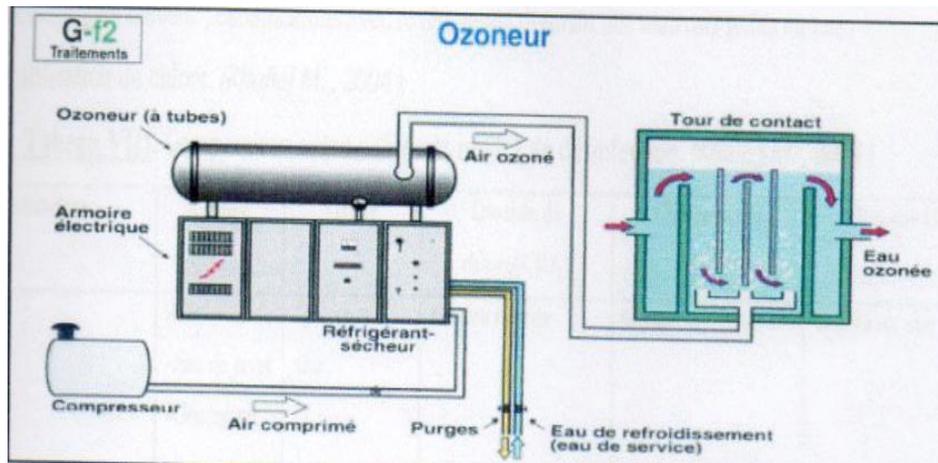


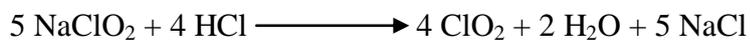
Figure 1: Dispositif du traitement à l'ozone (Bielo & Ndiemi, 2011).

### I-2-1-2-Bioxyde de chlore

Le dioxyde de chlore ( $\text{ClO}_2$ ) est également appelé bioxyde de chlore. C'est un gaz orangé explosif à plus de 10% (concentration dans l'air) [1].

Compte tenu de son instabilité, le dioxyde chlore est préparé sur le lieu d'utilisation à partir de :

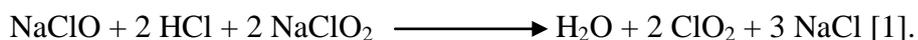
- Soit de chlorite en présence d'acide chlorhydrique pour maintenir un milieu acide, La réaction mise en œuvre dans ce cas est la suivante :



Le rendement de cette réaction est bon, taux de transformation du chlorite proche de 100%, en présence d'un excès d'acide (pH inférieur à 4).

- Soit de chlorite et de chlore.
- Soit de chlorite, d'acide chlorhydrique et d'eau de javel :

La réaction chimique intervenant alors est la suivante :



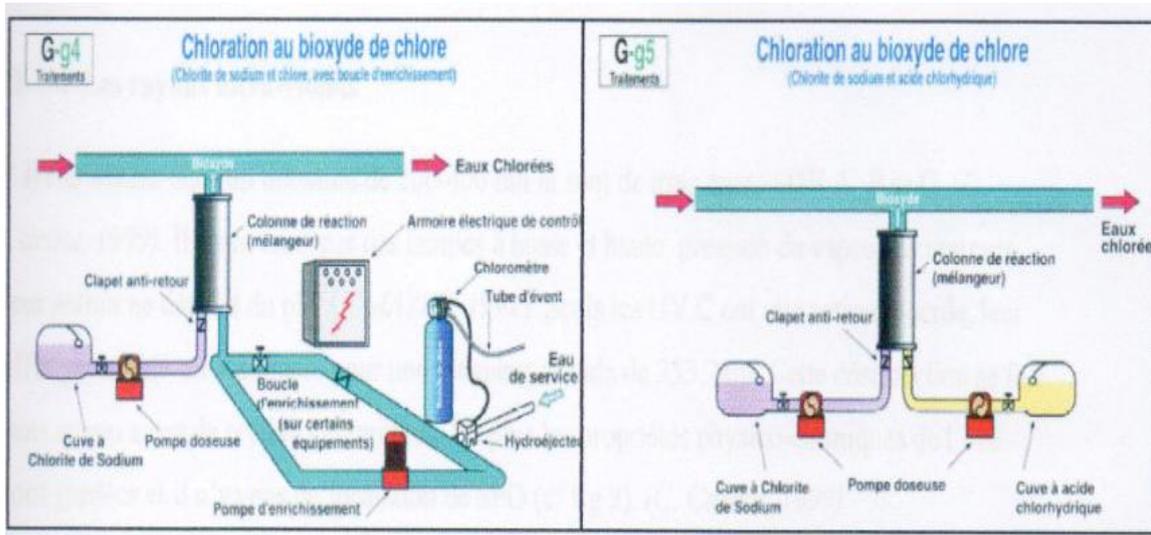


Figure 2: Dispositif de chloration au bioxyde de chlore (Bielo & Ndiemi, 2011).

### I-2-1-3-Chlore gazeux

Le chlore gazeux est un désinfectant puissant par l'intermédiaire de l'ion hypochloreux  $\text{HClO}^-$  qui peut pénétrer la membrane cellulaire pour inhiber les fonctions enzymatiques de la bactérie [1].

En fonction de la dose appliquée le traitement entraîne soit des lésions réversibles, soit des lésions irréversibles causant de fait la mort cellulaire. Par contre, le chlore n'a que peu d'effet sur les bactéries contenues au sein du biofilm dans un réseau public d'eau potable [1].

Le chlore gazeux peut produire des composés chlorés indésirables (THM:trihalométhanes, chlorophénols, organochlorés) et entraîne un goût prononcé de l'eau potable. Son efficacité dépend du pH du milieu et son utilisation nécessite un local de stockage spécifique. Son action est avérée contre les bactéries mais non contre les virus. De plus, il existe de plus en plus d'organismes résistant au chlore [1].

Il a été démontré qu'une dose de chlore de 0.3 mg/l dans une eau (en terme de résiduel de chlore) à 15 °C et à pH 7,5, maintenue pendant 10 à 20 minutes assure la destruction des bactéries. Cependant, l'efficacité du chlore décroît avec l'augmentation de la température et du pH. La plage de pH optimale se situe entre 4 et 6, ce qui se situe hors de la gamme des pH acceptables en eau potable [1].

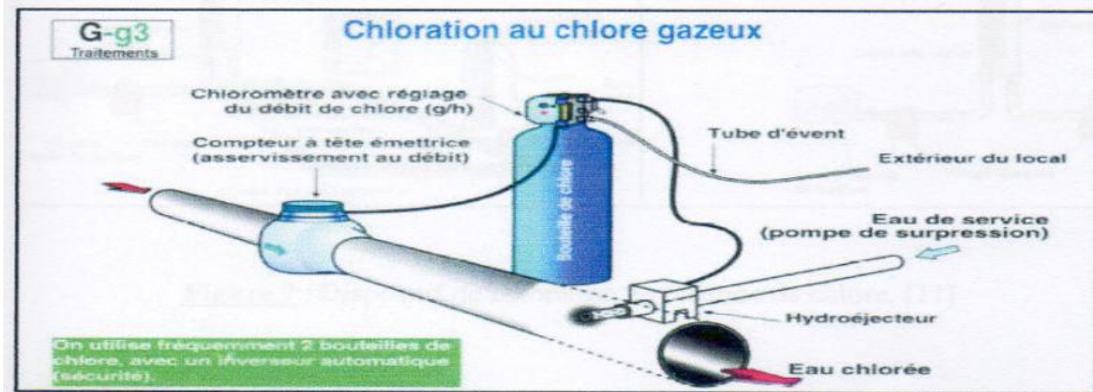


Figure 3 : Dispositif de chloration par le chlore gazeux (Bielo & Ndiemi, 2011).

#### I-2-1-4-Les chloramines

Généralement préparées à partir du chlore et de l'ammoniac ou des sels ammoniacaux, leur action bactéricide est plus lente que celle du chlore, mais l'effet rémanent est plus important du fait de leur stabilité. Elles n'induisent pas la formation de composés haloformes. Elles peuvent présenter un intérêt dans certains cas tels que : longs réseaux avec temps de séjour et températures élevées ; canalisations avec revêtements donnant des mauvais goûts en cas d'utilisation du chlore (Bielo & Ndiemi, 2011).

#### I-2-2-Les procédés physiques

##### I-2-2-1- Les rayons ultra-violet

Le rayonnement ultraviolet est une forme de rayonnement électromagnétique comme l'infrarouge, les rayons X et la lumière. Il se situe entre la lumière visible et les rayons X dans le spectre électromagnétique. Il se divise en 3 bandes de longueur d'onde, selon l'effet qu'il produit sur les tissus vivants, soit UVA, UVB et UVC [1].

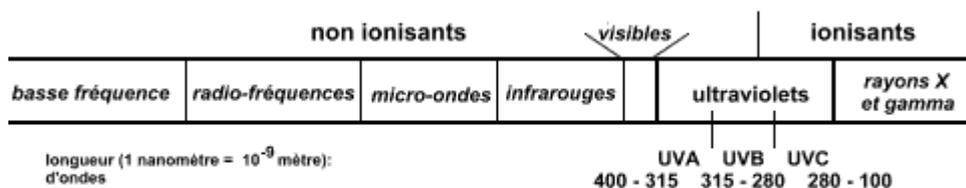


Figure 4 : Le spectre électromagnétique [1].

Les lampes ultraviolettes utilisées en traitement des eaux émettent la majorité de leur énergie d'irradiation à une longueur d'onde de 254 nm ou 2537 Angström qui a un pouvoir fortement bactéricide, virucide et algicide. Les UV de type C éradiquent les germes en détruisant le métabolisme des cellules [1].

L'eau à désinfecter transite dans une chambre d'irradiation où sont placées des lampes, isolées de l'eau par des gaines en silice ou quartz, émettant un rayonnement ultraviolet qui a la propriété d'agir directement sur les chaînes moléculaires (ADN-ARN) des cellules des microorganismes, ce qui interrompt le processus de vie et de reproduction de ces pathogènes. Le rayonnement UV nécessaire se mesure en micro watts.seconde/cm<sup>2</sup> [1].

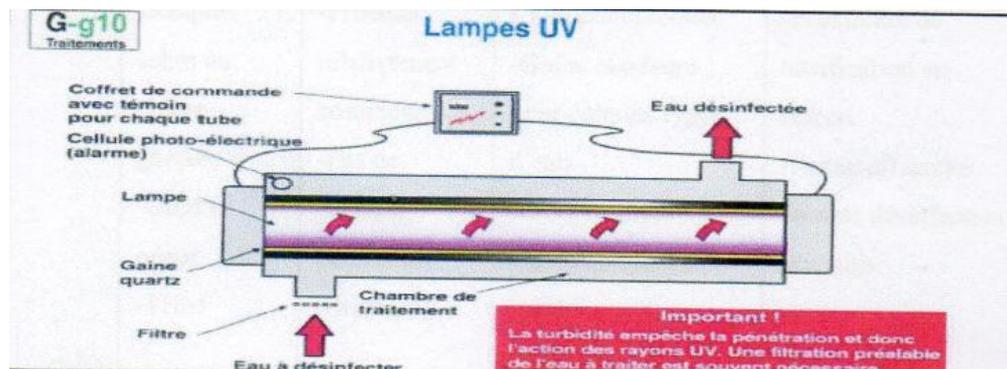


Figure 5: Dispositif du traitement par UV (Bielo & Ndiemi, 2011).

### I-2-2-2- L'osmose inverse

L'osmose inverse est un procédé qui consiste à filtrer l'eau à travers une membrane semi-perméable d'une extrême finesse. Cette membrane sépare deux solutions de concentration différentes. Ainsi la solution la plus concentrée passe dans le milieu dilué, grâce à une pression très forte du côté le plus concentré. Cette pression doit être supérieure à la pression osmotique. Cette membrane filtre tous les éléments indésirables que peut contenir l'eau [3].

#### Avantages

- le système peut se débarrasser de la rouille et les débris microscopiques.
- il peut également filtrer les conduits, le fer, le manganèse et le sel, ainsi que d'autres minéraux nocifs.
- également des produits chimiques comme le fluorure et le chlore peuvent être enlevés.

- les bactéries ne peuvent pas passer à travers les filtres.
- Le système d'osmose inverse ne gaspille pas autant d'eau, par rapport à d'autres systèmes de filtration.
- L'eau résultant de la filtration est traitée et devient plus efficace contre les taches.
- L'eau devient potable et vous pouvez économiser de l'argent sur l'eau embouteillée [4].

### Inconvénients

- certains minéraux alcalins bénéfiques sont également supprimés ainsi que d'autres minéraux nocifs, ce qui rend l'eau plus acide.
- aussi l'eau peut devenir très acide et de corroder les tuyaux et autres appareils du réseau d'eau.
- pour chaque gallon d'eau produite à partir de l'osmose inverse, 3 à 5 gallons sont gaspillés.
- le processus est assez lent, un système de production de 15 gallons par jour.
- membranes de filtration doit être remplacée de temps en temps, en ajoutant aux coûts.
- le processus d'installation est assez compliqué et a besoin d'aide professionnelle [4].

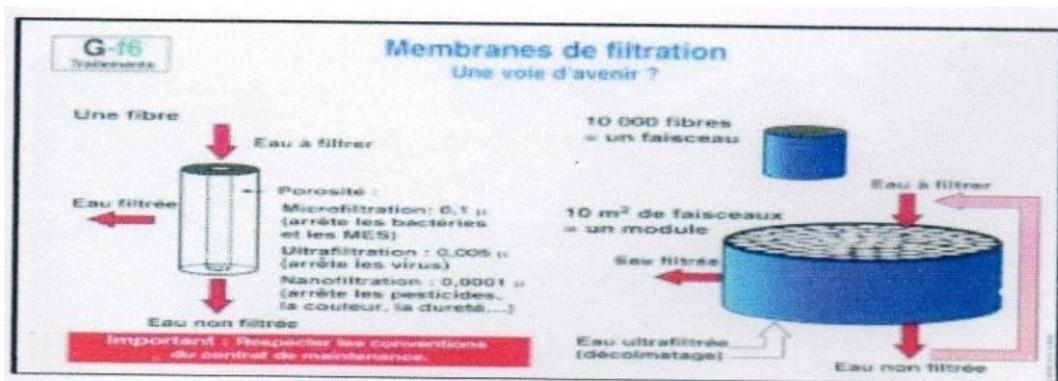


Figure 6: Les membranes de filtration (Bielo & Ndiemi, 2011).

**Tableau 2.** tableau comparatif des différents procédés de désinfection (Khallef, 2004) [5][6].

Paramètre	Chlore gazeux Cl <sub>2</sub>	Chloramine NH <sub>2</sub> Cl	Ozone O <sub>3</sub>	Dioxyde de chlore (ClO <sub>2</sub> )	Rayons UV
<b>Source</b>	-Cl <sub>2</sub> -Eau de javel -Généré sur site	- Généré sur site	-Généré sur site	-Généré sur site	-Généré sur site
<b>Utilité</b>	DP, DS, GO, C, Ox	DS	DP,DS,GO,C,Ox,FB	DP, DS, GO, C, Ox	DP
<b>Sous produits de désinfection</b>	-THM  -AHA	-HAN  -Aldéhydes	-Bromates -CODB (carbone Organique dissous biodégradable)	-chlorites -chlorates	Aucun
<b>Avantages</b>	-Investissement plus faible - Système très simple	-Formation minime de THM et AHA -Meilleure persistance que le Cl <sub>2</sub> en réseau -Plus efficace que le Cl <sub>2</sub> pour contrôler la recroissance	-contrôle des goûts/odeurs et couleurs -L'ozone se décompose en oxygène, sans laisser de produits dérivés dans l'eau	-Ne réagit pas avec l'ammoniaque -Excellent pour oxyder Fe/Mn -Ne force pas de THM/AHA	- Le système est bon économique à l'investissement et à l'utilisation -aucun sous produits de désinfection
<b>Désavantages</b>	-Gout et odeur - dérivés chlorés dangereux - L'efficacité du chlore dépend du pH de l'eau	-Possibilité de nitrification en réseau -faible efficacité comme désinfectant primaire	-Le système est assez complexe - pas de résiduel Persistant - La production d'ozone consomme de l'énergie - investissement de départ important	-chlorites -chlorates Gouts et odeurs pour certains types d'eau -ClO <sub>2</sub> résiduel recommandé=0,8ppm -Sécurité relié à l'utilisation du NaClO <sub>2</sub>	-pas de résiduel Persistant - Les particules dans l'eau stoppent les rayons U.V. et diminuent l'efficacité du traitement
<b>Activité bactéricide</b>	++++	+	++++	+++	+++
<b>Activité virulicide</b>	++++	+	++++	++	+++
<b>Elimination Cryptosporidium Giardia</b>	Négligeable  +	Négligeable  +	Négligeable  +++	Négligeable  ++	++++  +++

DP: désinfection primaire ; DS: désinfection secondaire ; Ox: oxydation du fer et du manganèse ;  
GO: goûts et odeurs ; C : couleur ; FB : filtration biologique.

### **I-3-La chloration de l'eau potable**

La chloration de l'eau vise deux buts. Elle sert d'abord à rendre inactifs les organismes pathogènes présents dans l'eau. Elle a aussi pour but de faire en sorte que le chlore résiduel libre subsiste pendant son transport depuis l'usine de traitement jusqu'à l'utilisateur de sorte que l'ensemble de la chaîne soit désinfecté [7].

#### **1-3-1- L'histoire de la chloration**

On a d'abord découvert le chlore en Suède en 1744. À ce moment-là, les gens croyaient que l'odeur de l'eau était responsable de la transmission des maladies. En 1835, le chlore a été utilisé pour enlever les odeurs de l'eau, mais ce n'est quand 1890 que le chlore a été trouvé en tant qu'outil efficace pour la désinfection et une façon de réduire la quantité de maladies transmises dans l'eau. Avec cette découverte, la chloration a commencé en Grande-Bretagne et c'est ensuite répandu aux États-Unis en 1908 et au Canada en 1917. Aujourd'hui la chloration est la méthode de désinfection la plus populaire et elle est utilisée pour désinfecter l'eau à travers le monde [7].

#### **1-3-2- Principe de la chloration**

La chloration est une des méthodes que l'on peut utiliser pour désinfecter l'eau. Cette méthode a été utilisée il y a plusieurs siècles et elle est encore utilisée aujourd'hui. C'est une méthode de désinfection chimique qui utilise divers type de chlore ou des substances contenant du chlore pour *éliminer de façon simple et à faible coût la plupart des microbes, bactéries, virus et germes* responsables de maladies comme la dysenterie, la typhoïde et le choléra. Il ne peut toutefois détruire certains microorganismes parasites pathogènes. La chloration *désinfecte donc l'eau mais ne la purifie pas entièrement* [7,8].

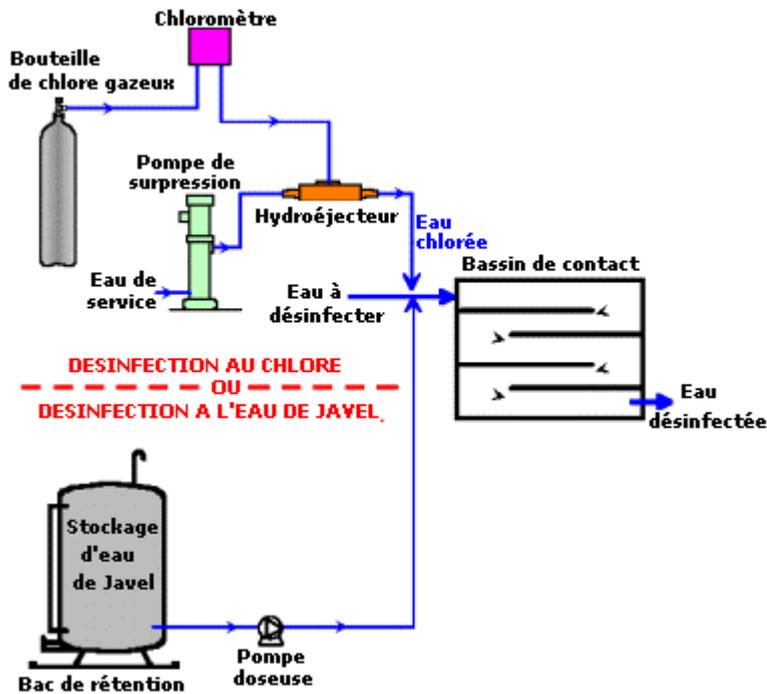


Figure7: Désinfection par chloration. [1]

### I-3-3-Les types du chlore

Le chlore destiné à la désinfection se trouve normalement sous l'une des trois formes suivantes :

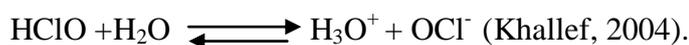
#### I-3-3-1-Chlore gazeux

Il est stocké et livré sous forme liquide en bouteilles de 15 à 100 kg sous pression. Le chlore sous pression provenant des récipients et amené par une canalisation à l'appareil de stérilisation proprement dit. Le gaz est alors le plus généralement dissous par un courant d'eau à faible débit dans un dissolvant et c'est la solution chlorée ainsi formée qui est introduite et mélangée dans l'eau à traiter pour y produire la stérilisation.

Introduit dans l'eau le chlore gazeux est rapidement hydralisé pour donner de l'acide hypochloreux (HOCl) selon la réaction suivante :

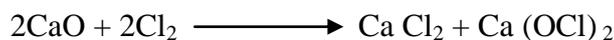


L'addition de chlore gazeux dans l'eau réduit le pH car cela entraîne la formation d'un ion  $\text{H}^+$ . L'acide hypochloreux est un acide faible (un pKa d'environ 7,5) ce qui signifie qu'il se dissocie légèrement en ions d'hydronium et hypochlorite, tel que montre la réaction suivante :



**I-3-3-2- Hypochlorite de calcium**

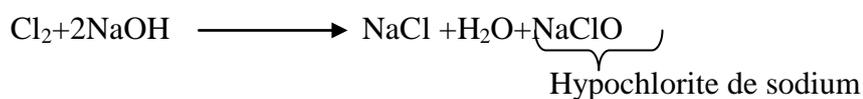
On fabrique l'hypochlorite de calcium à partir du précité issu de la dissolution de chlore gazeux dans une solution d'oxyde de calcium (chaux vive) et l'hydroxyde de sodium.



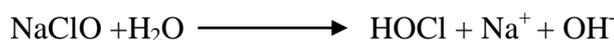
L'hypochlorite de calcium a une teneur très élevée en chlore actif et est surtout employé dans des pays ne pouvant s'approvisionner ni en chlore gazeux, ni en solution d'hypochlorite de sodium (cout de transport).généralement utilisé sous forme solide en poudre

**I-3-3-3- Hypochlorite de sodium**

Appelé l'eau de javel qui est un excellent désinfectant. Pour la fabrication industrielle de la javel, on fait agir le chlore sur la soude, on obtient du sel, de l'eau et de l'hypochlorite : le mélange de ces trois produits constitue l'eau de javel



L'équation suivante illustre la réaction qui se produit entre hypochlorite de sodium et l'eau



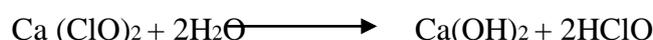
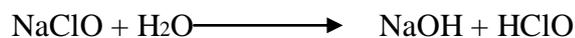
Cette équation montre que l'ajout d' hypochlorite de sodium dans l'eau entraine la formation d'acide hypochloreux un peu comme dans le cas de l'hydrolyse du chlore gazeux, l'ajout d'hypochlorite de sodium dans l'eau produit un ion hydroxyle qui fait grimper le pH(Khallef, 2004).

**1-3-4-Chimie du chlore dans l'eau**

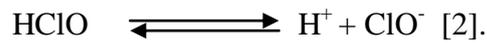
Quand le  $\text{Cl}_2$  se dissout dans l'eau il est rapidement hydrolysé et il produit l'acide hypochloreux et l'acide chlorhydrique.



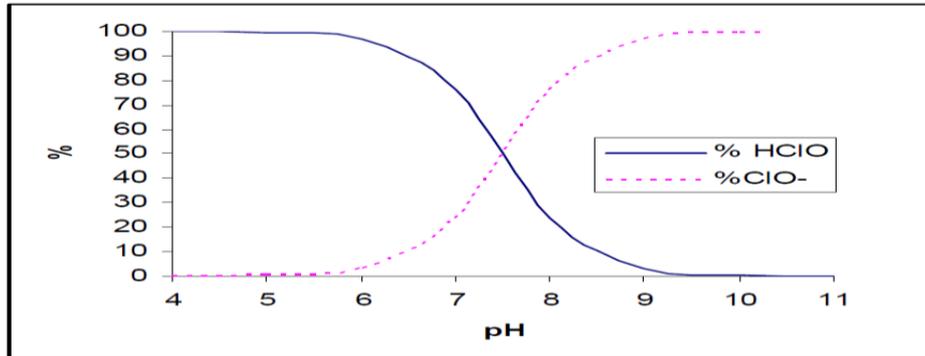
Dans le cas des hypochlorites, il se produit une dissociation des deux sels avec les équations suivantes:



Ainsi, dans n'importe quel cas: chlore, hypochlorite de sodium et hypochlorite de calcium, finalement il se forme l'acide hypochloreux, qui est vraiment le désinfectant. Cependant, celui-ci se dissocie avec l'équilibre suivant:



Dans le graphique qui suit on peut observer la distribution de chaque espèce en fonction du pH:



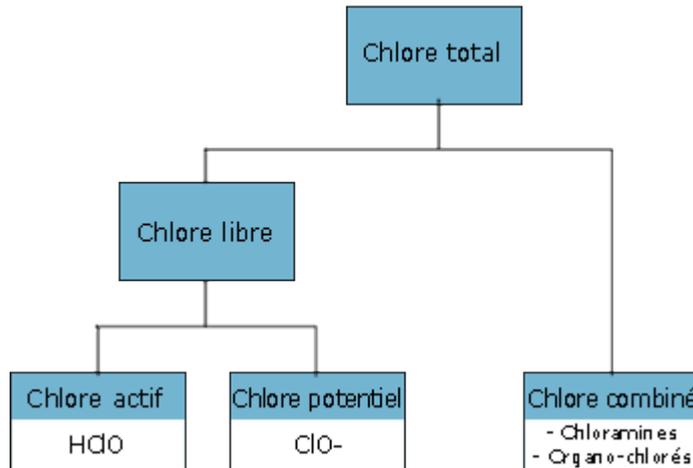
**Figure 8 : La cohabitation du HOCl et ClO<sup>-</sup> en fonction du pH [2].**

On voit clairement dans le graphique qu'entre pH 6 et pH 9 les deux espèces coexistent, tandis qu'à pH inférieurs à 6 et supérieurs à 9 on considère l'existence d'une seule espèce. Dans la valeur de pH égal au pKa de l'acide hypochloreux (pKa =7.5), on observe que les concentrations de HClO et ClO<sup>-</sup> sont égales, ce qui est facilement déductible de l'expression antérieure [2].

L'acide hypochloreux est un désinfectant beaucoup plus effectif que l'ion hypochlorite, et ce fait pourrait être en rapport avec l'absence de charge dans la molécule d'acide hypochloreux. Etant donné qu'il s'agit d'une molécule neutre, il lui serait plus facile de pénétrer la paroi bactérienne avec le résultat d'une activité bactéricide. Compte tenu de ce fait, et de ce qu'on a vu jusqu'à présent, il est facile de comprendre les différentes activités de l'hypochlorite comme agent bactéricide en différentes conditions de pH. Ainsi, avec un pH inférieur à 7,5, la quantité d'hypochlorite pour désinfecter l'eau est très inférieure à celle nécessaire pour la même eau avec un pH en dessus de 7,5 [2].

### 1-3-5-Mode d'action du chlore

Après action du chlore sur les matières organiques, azotées et autres composés oxydables, il subsiste un résiduel de chlore se présentant sous différentes formes [9].



- **Le chlore libre**

Il se trouve sous plusieurs formes, en particulier

- *L'acide hypochloreux ou chlore actif* : est le composé le plus actif dans les mécanismes de la désinfection, il est aussi appelé "chlore actif" [9].

- *L'ion hypochlorite ou chlore potentiel* : par sa charge négative ne pénètre pas à l'intérieur de la cellule. Il est peu oxydant et peu bactéricide [9].

- **Le chlore combiné**

Il est chimiquement très réactif et va oxyder un certain nombre de matières minérales ou organiques. Les matières azotées (l'urée) subissent une hydrolyse avec formation d'ammoniaque produisant des composés appelés « chloramines » [9].

- **Le chlore total**

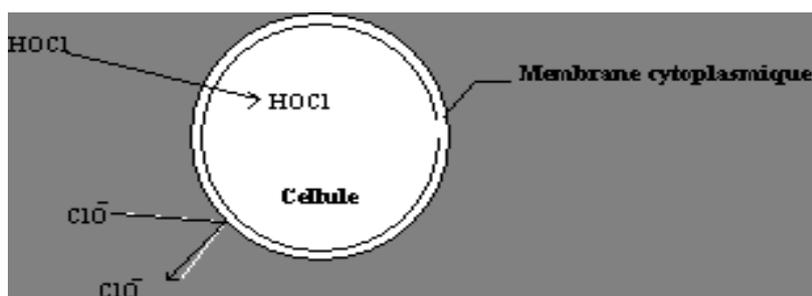
Le chlore total est l'addition du chlore libre et du chlore combiné [9].

### 1-3-5-1-Action du chlore sur les micro-organismes

Le chlore tue les organismes pathogènes tels que les bactéries et les virus en cassant les liaisons chimiques de leurs molécules. Les désinfectants qui sont utilisés à cette fin sont des composés de chlore qui peuvent échanger des atomes avec d'autres composés, tels que des enzymes dans les bactéries et autres cellules. Lorsque l'enzyme vient en contact avec le chlore, un ou plusieurs atomes d'hydrogène de la molécule sont remplacés par le chlore. Ceci va modifier la structure entière de la molécule et dans la plupart des cas provoquer sa

dissociation ou sa désactivation. Lorsque les enzymes ne fonctionnent pas correctement, la cellule ou la bactérie mourra [10].

Les membranes des cellules des micro-organismes pathogènes sont négativement chargées par nature. En tant que telles, elles peuvent être pénétrées par l'acide hypochlorite neutre, plutôt que par l'ion négativement chargé hypochlorite. L'acide hypochlorite peut pénétrer les couches de boue, les membranes des cellules et les couches protectrices de micro-organismes et tue de ce fait efficacement les microbes pathogènes. Les micro-organismes seront détruits ou ne pourront plus se dupliquer [10].



**Figure 9: Action du chlore sur la cellule microbienne [10].**

#### **1-3-5-2- Action du chlore sur les composés organiques**

HClO est une molécule sélective et n'agira que sur des sites privilégiés des micropolluants organiques. Ainsi chaque molécule organique a sa propre réactivité avec le chlore. Les réactions générées par l'acide hypochloreux donnent des modifications structurales des molécules organiques, en particulier :

- Formation de composés plus oxydés.
- Génération de molécules organochlorées volatils et non volatils (Haddad et al., 2010).

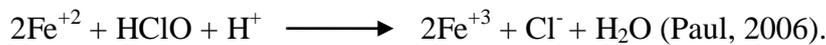
#### **1-3-5-3- Action du chlore sur les composés inorganiques**

On a vu que la dissociation du chlore est fonction du pH et que l'acide hypochloreux est un oxydant et un désinfectant plus puissant que l'hypochlorite (Paul, 2006). En pratique, la vitesse d'oxydation n'est pas un facteur limitatif si bien que le pH a peu d'importance. Ce n'est pas le cas pour le fer et le manganèse car ils sont solubles à de faibles pH. Il faut donc travailler à un pH élevé (>7), notamment pour le manganèse, afin de les oxyder et les

précipiter. Il faut donc bien connaître la qualité de l'eau à traiter pour ajuster le dosage de chlore et le pH pour lequel il sera le plus efficace (Paul, 2006).

- **Oxydation du fer**

Le chlore réagit avec le fer ferreux pour le transformer en fer ferrique. L'hydroxyde ferrique est éliminé par sédimentation ou filtration.



- **Oxydation du manganèse :**

Le chlore transforme le  $\text{Mn}^{2+}$  en  $\text{Mn}^{4+}$  → L'oxyde de manganèse forme une couche précipitée lors de la filtration ou dans le réseau.



- **Oxydation d'ammonium**

L'oxydation d'ammonium donne des désinfectants (chloramines) moins efficace que le chlore.



#### **I-4-Influence de facteurs sur l'efficacité de la chloration de l'eau potable**

Quatre paramètres interviennent, le pH, la dose de chlore et le temps de contact, la qualité de l'eau et la température.

##### **a- Le pH**

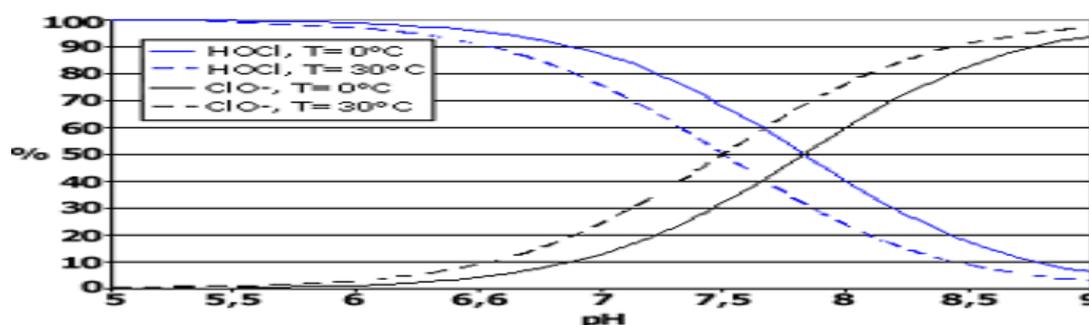
C'est un paramètre clé de la désinfection, qui traduit l'équilibre acide-base : HOCl est en équilibre avec  $\text{H}^+$  et  $\text{ClO}^-$ .

Suivant le pH nous aurons donc plus ou moins de chlore actif :

- si le pH est acide, nous aurons 100 % de chlore actif (HOCl) ;

- si le pH est basique, nous aurons peu d'HOCl (par exemple à pH = 9, 10% d'HOCl, 90 % de  $\text{ClO}^-$ ) (Grondin, 1996).

La proportion des deux composés dépend essentiellement de la valeur du pH de l'eau, comme l'indiquent les courbes de la figure 10



**Figure 10: La cohabitation du HOCl et ClO<sup>-</sup> en fonction du pH et de la température [11].**

Pour un effet rapide du chlore et une économie en produits, il convient de traiter l'eau à des valeurs de pH proches de la neutralité [11].

#### **b - la dose du chlore et le temps de contact (CT)**

La variation du temps de contact nécessaire permet de jouer sur cette dose requise : pour un pH donné, si on augmente la dose de chlore, on pourra diminuer le temps de contact, par contre si on diminue la dose, il faudra augmenter le temps de contact.

De même le temps de contact est en fonction du pH (Grondin, 1996).

pH	Concentration en chlore	temps de contact
7,5	0,3-0,5	20 à 40 minutes
8-8,5	0,3-0,5	20 à 60 minutes

#### **c - la qualité de l'eau**

La présence de matières en suspension inhibe l'action du chlore en diminuant la quantité de chlore libre disponible et en favorisant la protection des bactéries (Grondin, 1996).

**d - la température**

- **La diminution de la température de l'eau entraîne une diminution de l'efficacité du désinfectant**, bien qu'elle augmente légèrement la proportion d' $\text{HOCl}$  par rapport à  $\text{ClO}^-$ , ce qui nécessite d'ajuster les dosages en fonction des variations de la température [11].
- **La rapidité de l'effet bactéricide du chlore est proportionnelle à la température de l'eau** ; par conséquent cette stérilisation est plus efficace dans des eaux de température élevée. En revanche, le chlore est plus stable dans l'eau froide, donc subsiste plus longtemps, ce qui compense dans une certaine mesure la lenteur de la réaction [11].

**I-5-Les paramètres du choix du procédé de désinfection**

Le choix de la technique, parmi celles qui ont été présentées, est fonction de plusieurs paramètres :

**1. la qualité de l'eau à traiter**

- a) risques bactériologiques (eaux souterraine ou superficielle).
- b) présence de : ammoniacque, fer, manganèse, algues, pesticides, turbidité, matières organiques.
- c) variations de la qualité (T, pH, turbidité).
- d) pollutions accidentelles [5].

**2. le type de filière de traitement**

- a) classique ou par membrane.
- b) système idéal : multibarrières.
- c) surveiller la présence simultanée de différents oxydants [5].

**3. l'état du réseau de distribution**

- a) longueur, temps de résidence ;
- b) postes de rechloration ;
- c) état et historique des canalisations [5].

Les désinfectants comme le chlore, l'ozone et le dioxyde de chlore jouent un rôle prépondérant dans la protection de l'eau potable contre les microbes et dans la prévention des maladies transmissibles par l'eau. Cependant, ces désinfectants peuvent également réagir avec des substances présentes naturellement dans l'eau et former certains sous produits indésirables, ce qui peut poser un problème du point de vue sanitaire.

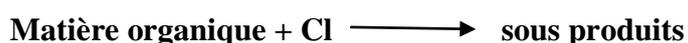
### II-1- Définition de SPC

La majorité des SPC ont été découverts par des analyses de chromatographie gazeuse. Les sous produits de chloration désignent tout produit issu d'un procédé de désinfection par le chlore ou par un autre produit chloré c'est-à-dire ils sont des substances chimiques produites lorsque le chlore utilisé pour éliminer les microorganismes pathogènes réagit avec les matières organiques d'origine naturelle (p.ex.: les produits de décomposition des végétaux) présentes dans l'eau (Hrudey, 2008).ils peuvent être volatils et hydrophobes ou non-volatils et hydrophiles, contenant des substances aromatiques et aliphatiques.[12]

Les principales classes de SPC incluent les organohalogénures, comme les trihalométhanes, les acides haloacétiques, les haloacétonitriles, les chlorophénols, l'hydrate de chloral et la chloropicrine. On rapporte également la présence d'autres SPC non halogénés sous forme d'aldéhydes, de cétoacides, de cétones, d'acides carboxyliques, d'acides maléiques, de nitrosamines, d'acides alkanoïques et de benzène. Cependant les trihalométhanes et les acides haloacétiques sont les composés les plus fréquemment observés dans l'eau potable chlorée et ils constituent les groupes de SPC les plus vastes (Hrudey, 2008).

### II-2- Formation de SPC

Le chlore est actif sous sa forme acide hypochloreux HOCl. Cette forme possède des propriétés d'oxydation de la matière organique, ce qui entraîne la formation de sous produits. Cette réaction peut être représentée de la façon suivante :



Il existe de nombreux sous produits de chloration. Les principaux et les plus connus sont les composés organohalogénés encore appelés TOX, parmi lesquels on compte les trihalométhanes(THM), les acide haloacétiques(AHA), les haloacétonitriles(HAN), les chlorophénols. La spéciation des sous produits dépend de la nature de l'eau brute. Les réactions peuvent être de différentes natures :

- Des substitutions halogènes sur les cycles et les chaînes aliphatiques des molécules.

- Des oxydations qui peuvent être couplées aux substitutions.
- Des décarboxylations.
- Des hydroxylations (Nicolas, 2003).

### II-3- Influence de facteurs sur la formation de SPC

La réaction de formation des sous produits est affectée par différents paramètres, dont la température, le pH de l'eau, la teneur en matière organique présente dans l'eau, la dose de désinfectant et le temps de contact entre le désinfectant et la matière organique (Gruau, 2004).

#### ➤ Teneur en matière organique

La matière organique en solution étant le précurseur des SPC, il n'est pas surprenant que la quantité de SPC formée augmente avec l'accroissement de la teneur en matière organique. En fait, à même qualité de matière organique, il existe généralement une assez bonne corrélation linéaire positive entre la quantité de SPC formée et la teneur matière organique (Gruau, 2004).

#### ➤ Dose de chlore ajoutée

C'est sans doute de tous les paramètres celui qui prête le moins à discussion, sachant que le chlore est l'ingrédient de base de formation des SPC. Toutes les études montrent que la quantité de SPC formée augmente avec la dose de chlore ajoutée (Gruau, 2004).

#### ➤ Temps de contact

Toutes les études cinétiques effectuées au laboratoire sur les THM montrent que la formation de ces composés se fait en deux stades: un premier stade entre 0 et 24 heures où les cinétiques sont très rapides et pendant lequel 50%, ou plus, du total des SPC est formé; un deuxième stade compris entre 1 et quelques jours pendant lequel les cinétiques sont plus lentes et pendant lequel se forme le reste des SPC (Gruau, 2004).

#### ➤ Température

Comme cela est classique en chimie, une augmentation de la température augmente stimule la formation de SPC. Cependant, l'augmentation de la température s'accompagne généralement de l'accroissement des paramètres opérationnels des usines, notamment au regard des doses de chlore ajoutées. Il est donc possible, si ce n'est probable, que l'augmentation constatée des teneurs en période estivale ne résulte pas que de la seule augmentation des températures mais provient de l'action cumulée de plusieurs facteurs (Gruau, 2004).

➤ **pH**

La formation de THM augmente avec l'augmentation du pH. De plus, les pH acides favoriseraient la formation de l'acide trichloracétique, alors que le pH n'aurait que peu d'influence sur l'acide dichloracétique (Gruau, 2004).

➤ **Les propriétés physico-chimiques de SPC**

Les principales propriétés physicochimiques d'un composé déterminent largement son devenir dans les usines de traitement de l'eau, les réseaux de distribution et au point d'approvisionnement des usagers. Il importe de comprendre ces propriétés pour évaluer l'importance relative des trois voies possibles d'exposition des populations, à savoir, l'inhalation et l'absorption cutanée (Hrudey, 2008).

La propriété physicochimique des SPC la plus déterminante est bien la constante de la loi d'Henry (KH) et le coefficient de partage octanol-eau (KOE) constituent deux propriétés importantes des SPC. La valeur de la constante de la loi d'Henry est une mesure de volatilité, le coefficient de partage octanol-eau rend compte de la préférence du composé pour la phase aqueuse (composés hydrophiles) ou la phase organique (composés lipophiles). Tous les SPC peuvent être absorbés par ingestion, mais seuls les composés volatils se prêtent à une réelle exposition par inhalation et seuls les SPC lipophiles peuvent être absorbés par la peau. Les données sur les valeurs KH et KOE des sous produits de la désinfection sont limitées. Les valeurs mesurées pour les trihalométhanes indiquent cependant qu'il s'agit de composés volatils et peu lipophiles (Hrudey, 2008).

L'exposition humaine à ces composés est par conséquent fortement liée à l'inhalation de la substance dans sa phase vapeur et aux voies d'exposition cutanée durant des activités comme le bain et la douche. Les haloacides sont réputés être très hydrophiles et pratiquement pas volatils. L'exposition aux haloacides se fait donc essentiellement par ingestion d'eau potable (Hrudey, 2008).

#### **II-4- Les types de SPC**

La chloration produit une large gamme de sous produits de désinfection, volatils et non volatils. Les trihalométhanes sont les sous produits de désinfection volatils les plus rencontrés dans l'eau potable et les acides haloacétiques sont les sous produits de désinfection non volatils les plus identifiés [13].

## II-4-1- SPC non volatils

### II-4-1-1- Les acides haloacétiques(AHA)

Les AHA appartiennent à la famille des acides carboxyliques aliphatiques halogénés. Ils sont composés de trois atomes d'hydrogène qui sont fixés à un groupe COOH. Les atomes H de l'acide acétique sont partiellement remplacés par des atomes d'halogènes. Les AHA sont des composés non volatils et hydrophiles. Ils peuvent se trouver dans l'eau avec des concentrations plus élevés que les THM, en fonction de la valeur du pH de l'eau : quand le pH est faible, plus de AHA sont formés, et dans le cas d'un pH élevé, plus de THM sont formés. Il y a neuf AHA courants : MCA, DCA, TCA, MBA, DBA, (qui constituent le groupe des AHA5, les plus fréquents dans l'eau potable), acide bromochloroacétique, acide bromodichloroacétique, acide chlorodibromoacétique et acide tribromoacétique (Bielo & Ndiemi, 2011).

### II-4-1-2- Les haloacétonitriles (HAN)

Généralement présents en plus faible quantité que les THM et HAA, ces composés sont souvent formés immédiatement lors de la désinfection de l'eau, mais se décomposent très vite lors des réactions d'hydrolyse ou de réactions avec des désinfectants résiduels. Ils peuvent aussi être des produits de réactions d'autres SPD, tels que les THM et les HAA et lorsque les valeurs de pH sont élevées, ils ne peuvent pas formés (Bielo & Ndiemi, 2011).

Les haloacétonitriles sont formés lors de la réaction du chlore et d'acétronitrile. Quand le temps de réaction du désinfectant dans l'eau est faible, ces sous produits de désinfection sont décomposés (Bielo & Ndiemi, 2011).

Les composés d'acétaldéhyde trichlorés et les aldéhydes bromes sont les seconds plus grands groupes de SPD. L'acétaldéhyde mono et dichlorée peuvent être formés lors de la désinfection, mais seront immédiatement oxydés pour former des acétaldéhydes trichlorés. L'acétaldéhyde est un sous-produit de désinfection par ozone. Quand l'ozone est combiné au chlore, il y a formation de trihaloacétaldéhydes (Bielo & Ndiemi, 2011).

### II-4-1-3- Les hydrates de chlorale (HC)

Il s'agit du 2,2,2-trichloro-1,1-éthanediol de poids moléculaire 165,4 g/mol ; il a une apparence cristalline, une odeur aromatique légèrement acre et un goût légèrement amer. Il est synthétisé par chloration de l'éthanol (Bielo & Ndiemi, 2011). C'est un sous produit de

chloration qui se trouve dans l'eau de boisson à une concentration qui s'élève à 19 ug/l et peut atteindre 100 ug/l. Il constitue avec les chloracétones 3% des SPC. On le détecte aussi dans les solutions chlorées d'acides humiques et d'acides aminés (Khallef, 2004).

L'hydrate de chloral est en concentration élevée dans les eaux souterraines et faible en eaux superficielles. Les plus faibles niveaux d'hydrate de chloral sont enregistrés durant les mois où l'eau était froide que durant les mois où l'eau était chaude (Khallef, 2004).

#### **II-4-1-4- Chlorite**

Le chlorite ( $\text{ClO}_2^-$ ) est un sous-produit de désinfection par le dioxyde de chlore. Quand le dioxyde de chlore est décomposé, le chlorite est formé:  $\text{ClO}_2 \longrightarrow \text{ClO}_2^-$

De nombreuses réactions complexes masquent la formation de chlorite lors de la dissolution du dioxyde de chlore. Le chlorite est suspecté de causer l'anémie chez les jeunes enfants et peut affecter le système nerveux (Bielo & Ndiemi, 2011).

#### **II-4-2- SPC volatils**

##### **II-4-2-1- Les trihalométhanes (THM)**

Les THM sont des sous produits de la chloration de l'eau formés principalement par réaction du chlore avec des substances organiques naturelles (substances humiques et fulviques) présentes dans l'eau. Le chloroforme est généralement le principal THM mesuré dans l'eau potable (jusqu'à 90 % en poids de tous les THM), mais sa proportion par rapport à l'ensemble des THM peut varier de façon significative selon la teneur de l'eau brute en bromure (qui peut entraîner alors une formation de sous produits bromés) et selon le pH de l'eau (Fiche Trihalométhanes, 2002). beaucoup de THM sont utilisés dans l'industrie comme solvants ou comme réfrigérants. ils sont aussi des polluants, et beaucoup sont considérés comme cancérogènes (Khallef, 2004).

##### **II-4-2-2- Les chloroanisoles**

Les chloroanisoles seraient formés à partir de chlorophénols méthyles par des micro-organismes. Le passage aux chloroanisoles serait un moyen de détoxification et d'élimination du chlore ou de certains composés chlorés nocifs pour certains micro-organismes. Le chloroanisole est utilisé comme intermédiaire pour l'acide de fruits [14].

### II-4-2-3- Les chlorophénols

La présence des chlorophénols dans l'eau de boisson peut résulter de la chloration des phénols si la concentration en chlore libre est importante, ce qui est le cas de la chloration au dessus du point critique. Un faible taux de chlorophénols, spécialement le mono et le dichlorophénol se produisent dans l'eau désinfectée au chlore. Les chlorophénols présents dans l'eau, le sol ou les sédiments sont détruits et enlevés de l'environnement dans quelques jours à quelques semaines par les microorganismes (Khallef, 2004).

### II-4-2-4- Les chloropicrines

La chloropicrine ou trichloronitrométhane est trouvée dans les eaux chlorées comme sous produits de désinfection à des concentrations supérieures à 1 ug/l par action du chlore sur les acides humiques, les acides aminés et les nitrophenols. La présence des nitrates favorise sa formation. Les niveaux de chloropicrine ont été quelque peu élevés durant les mois où l'eau était chaude mais ont été relativement constantes durant la distribution pendant la saison froide. Les niveaux de chloropicrine se réduisent au cours de la distribution durant la saison chaude, cette réduction suggère que la chloropicrine est dégradée dans le réseau de distribution plutôt que la chloropicrine est produite à partir du chlore résiduel (Khallef, 2004).

## II-5- Les trihalométhanes

Parmi les sous produits de chloration les plus connus sont les trihalométhanes (THM).

### II-5-1-Définition

Les trihalométhanes (THM) sont des composés constitués d'un seul atome de carbone lié à des halogènes, de formule générale  $CHX_3$ , où X soit du chlore, du brome, du fluor ou de l'iode, soit une combinaison de ces éléments. Les THM mesurés dans l'eau chlorée sont : le chloroforme ( $CHCl_3$ ), le bromodichlorométhane ( $CHBrCl_2$ ), le chlorodibromométhane ( $CHClBr_2$ ) et le bromoforme ( $CHBr_3$ ). Ces substances existent à l'état liquide à la température ambiante. Elles sont de relativement à extrêmement volatiles et se dégradent dans l'air par réaction photooxydative avec une demi-vie de 26 à 260 jours dans le cas du chloroforme et d'environ deux mois pour les autres trihalométhanes bromés (Fiche Trihalométhanes, 2002).

### II-5-2- Les propriétés physico-chimiques

Les significations des propriétés physico-chimiques sont rappelées car elles conditionnent le potentiel de transfert entre les milieux et donc le potentiel d'exposition de la population :

-La solubilité quantifie l'affinité de la substance pour l'eau ; une substance est hautement hydrosoluble lorsque sa solubilité dans l'eau est supérieure à 1g/L et hydrophobe lorsque sa solubilité dans l'eau est inférieure à 10-5g/L.

- La tension de vapeur indique la volatilité et donc l'affinité de la substance pour l'air.

- Le coefficient de répartition octanol/eau quantifie la lipophilie des substances donc, leur affinité à passer les membranes biologiques et à s'accumuler. Une substance est dite bioaccumulatrice si  $\log k_{ow} > 3,5$  et non bioaccumulatrice si  $\log k_{ow} < 3,5$  (Nicolas, 2003).

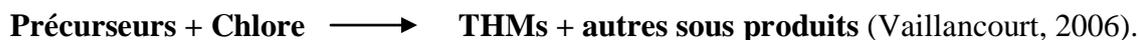
**Tableau 3. Propriétés physico-chimiques des THM (Nicolas, 2003).**

Substance	Formule	Poids moléculaire (g/mole)	Solubilité dans l'eau (mg/L)	Pression de vapeur (mmHg)	Log $k_{ow}$
<b>Chloroforme</b>	CHCl <sub>3</sub>	119,39	7,710 à 25°C (Se +/-)	197 à 25°C (V+++)	1,97
<b>Bromodichlorométhane</b>	CHBrCl <sub>2</sub>	163,83	4700 à 22°C (Se +++)	50 à 20°C (V+)	2
<b>Dibromochlorométhane</b>	CHBr <sub>2</sub> Cl	208,28	4400 à 22°C (Se +++)		2,16
<b>Bromoforme</b>	CHBr <sub>3</sub>	252,73	3100 à 25°C	7,5 à 35°C	2,4

Il apparait donc que les THM sont des composés volatils qui passent facilement de l'eau à l'air, ce qui pourra avoir une incidence sur les voies et les vecteurs d'exposition à prendre en compte (Nicolas, 2003).

### II-5-3- Mécanisme de réaction

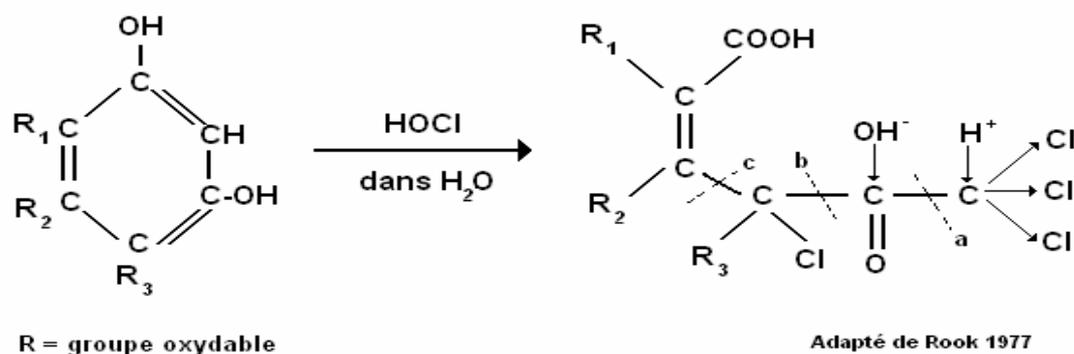
Les THM sont produits par la réaction du chlore avec des précurseurs que l'on retrouve dans l'eau. Love (1975) a résumé la réaction de la façon suivante :



#### II-5-3-1- Chimie de formation

La réaction gouvernant la formation des THM se nomme réaction haloforme. Il existe plus d'une centaine de composés organiques halogénés (TOX) mais seulement 38% de ces derniers sont actuellement identifiés. Les THM forment environ 25% de l'ensemble des TOX (Vaillancourt, 2006).

L'acide hypochloreux (HOCl) et l'acide hypobromeux (HOBr) sont les sources des espèces électrophiles halogènes. Ils réagissent principalement avec les noyaux aromatiques des substances humiques et avec la partie résorcinol des acides fulviques. Lorsque les noyaux aromatiques ont été halogénés, les molécules se dissocient pour donner les différents SPC (Vaillancourt, 2006).



**Figure 11 : Modèle de réaction du chlore avec les noyaux aromatiques (Vaillancourt, 2006).**

Une séparation au point (a) donnera du chloroforme. La séparation au point (b) entraînera la formation d'acide trichloracétique ( $\text{Cl}_3\text{CCOOH}$ ) ou d'hydrate de chlore ( $\text{Cl}_3\text{CCH}(\text{OH})_2$ ) qui sont des acides haloacétiques. Finalement la séparation au point (c) donnera l'un des halo cétones (Vaillancourt, 2006).

### II-5-3-2- Conditions de stabilité

Levi et al. (1994) et Koch et al. (1988) ont étudié la stabilité des THM. Ils ont démontré qu'en l'absence de chlore et avec un pH se maintenant entre 7.5 et 7.7, les THM sont stables durant au moins 7 jours s'ils sont maintenus à une température de 4 °C. Selon ces études, la variabilité était inférieure à 20% de la valeur initiale (Vaillancourt, 2006).

### II-5-3-3- Influence de facteurs sur la formation de THM

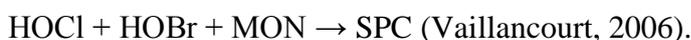
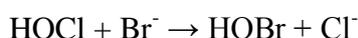
La matière organique naturelle (MON) abiotique évaluée par sa concentration et sa nature représente le principal précurseur des trihalométhanes. On considère les ions bromures comme un second groupe de précurseurs. Le troisième et dernier groupe est celui de la matière organique biotique composée essentiellement des algues planctoniques (Vaillancourt, 2006).

#### II-5-3-3-1- Matière organique naturelle

Rook, (1974) a été le premier à démontrer la forte corrélation entre la concentration de MON et celle de chloroforme mesurée dans l'eau chlorée (Vaillancourt, 2006).

#### II-5-3-3-2- Bromures

La rapide oxydation du bromure par l'acide hypochloreux (HOCl) forme de l'acide hypobromeux (HOBr). Les acides hypochloreux et hypobromeux réagissent ensuite avec la MON pour former des SPC.



Il a été suggéré par Singer, (1999) que l'acide hypobromeux attaque plus de sites dans les précurseurs que HOCl et que celui-ci réagit avec ces sites plus rapidement que l'acide hypochloreux. Ces résultats ont été confirmés par Amy et al. (1991) qui affirment que le ratio bromure / COT dans l'eau influence la vitesse de formation des THM lorsque des doses élevées de chlore sont utilisées. Par exemple, la chloration d'une eau contenant peu d'ions bromures donne lieu à une proportion de chloroforme plus importante que les autres espèces de THM (Vaillancourt, 2006).

### **II-5-3-3-3- La matière organique naturelle d'origine biotique**

Hoehn et al. (1980) ont observé que les algues ainsi que leurs produits extracellulaires conduisent à la formation de chloroforme après leur réaction avec le chlore. En plus du COT que leurs biomasses contiennent, les algues libèrent des précurseurs durant leur cycle de vie (Vaillancourt, 2006).

### **II-5-3-3-4- Influence des conditions de chloration**

#### **➤ Température**

Il est bien connu que la température est un facteur clé dans la formation des THM. L'explication de ce phénomène découle du fait que la réaction halogène de l'acide hypochloreux est grandement dépendante de la température. Ces auteurs ont observé des augmentations de 2 à 4 fois la concentration de chloroforme en faisant varier la température de 10 à 30 °C. La température peut aussi influencer le ratio des espèces de THM. Par contre, pour des longs temps de contact (>24h), Summers et al. (1996) ont remarqué que l'augmentation de la température n'a pas beaucoup d'effet sur la concentration des espèces bromées des THM. Ces auteurs justifient cette observation par la rapidité de formation des espèces bromées des THM, même à basse température. Donc, pour un temps d'incubation de 24h, la plupart des espèces bromées de THM sont déjà formées, L'augmentation des THM totaux observée dans les deux études mentionnées plus haut peut être due à l'augmentation de l'espèce non bromée de THM (chloroforme) (Vaillancourt, 2006).

#### **➤ Temps de contact avec le chlore**

La réaction de formation des THM est très rapide durant les premières heures de contact avec le chlore puis sa magnitude ralentit progressivement. La présence de deux vitesses de formation des THM s'explique par le fait que la MON contient une variété de substances inconnues qui ont chacune leurs propres cinétiques de réaction. Aussi, il a été suggéré par Summers et al. (1996) que les espèces bromées des THM sont formées rapidement comparativement au chloroforme car la réaction de l'acide hypobromeux est très rapide (Vaillancourt, 2006).

➤ **Concentration résiduelle de chlore**

Il y aura production de THM tant qu'il y aura un résiduel de chlore dans l'eau et des précurseurs pour réagir avec ce chlore. De plus, la magnitude de la concentration résiduelle de chlore augmente le rythme de formation des THM (Vaillancourt, 2006).

➤ **Acidité de l'eau (pH)**

Le pH est une variable importante dans la formation des THM. La réaction de formation des THM est favorisée lorsque le pH est augmenté. Le phénomène provient de l'hydrolyse de certains sites de la MON par du  $\text{OCl}^-$ . Ces sites ne seraient pas touchés par le HOCl (Vaillancourt, 2006).

#### **II-5-4- Normes des THM**

L'OMS a établi les valeurs guides suivantes comme limites maximales des concentrations en THM admissible des eaux de boisson :

Chloroforme	$\text{CHCl}_3$	200	$\mu\text{g/L}$
Bromodichlorométhane	$\text{CHBrCl}_2$	60	$\mu\text{g/L}$
Dibromochlorométhane	$\text{CHBr}_2\text{Cl}$	100	$\mu\text{g/L}$
Bromoforme	$\text{CHBr}_3$	100	$\mu\text{g/L}$ (Gruau, 2004).

#### **II-5-5- La pharmacocinétique des THM**

➤ **L'absorption**

Les THM absorbés par ingestion sont en bonne partie métabolisés lors du premier passage au foie alors que ceux inhalés ou absorbés par voie cutanée se retrouvent directement dans la circulation sanguine ((Fiche Trihalométhanes, 2002).

➤ **Métabolisme**

Les THM ingérés sont absorbés au niveau gastro-intestinal. À cause de sa grande volatilité, le chloroforme peut également être absorbé par les poumons. Une fois absorbés, les concentrations de THM les plus importantes se retrouvent dans les tissus adipeux, le foie et les reins. Une partie des THM absorbée est exhalée sous forme inchangée. Le reste est oxydé en composés dihalocarboxyliques très réactifs (ex. phosgènes, chlorobromocarboxyles) puis hydrolysé en dioxyde ou monoxyde de carbone avant d'être expiré. Les données suggèrent

que ces composés dihalocarboxyliques seraient responsables des effets toxiques des THM (Fiche Trihalométhanes, 2002).

## II-6- Le chloroforme

Le chloroforme ou trichlorométhane est un composé chimique organochloré de formule brute  $\text{CHCl}_3$ . Le chloroforme est généralement le principal THM mesuré dans l'eau potable (jusqu'à 90% en poids de tous les THM), mais sa proportion par rapport à l'ensemble des THM peut varier de façon significative selon la teneur de l'eau brute en bromure (qui peut entraîner alors une formation de sous produits bromés) et selon le pH de l'eau (Bielo & Ndiemi, 2011).

### II-6-1- Les propriétés physico-chimiques

**Formule moléculaire:**  $\text{CHCl}_3$ .

**Forme physique:** Liquide.

**Apparence:** Transparent.

**Couleur:** Incolore.

**Odeur:** Odeur légèrement écoeurante.

**Seuil de l'odeur:** 200 ppm **Poids moléculaire:** 119.37.

**Point d'ébullition:** 142 ° F (61 ,1 ° C) (°C).

**Point de congélation :** -83 ° F (-63,9 ° C) (°C).

**Pression de vapeur:** 160 mmHg @ 20° C.

**Gravité (eau=1):** 1,4 @ 25 ° C.

**Densité de la vapeur (air=1):** 4,1.

**Solubilité dans l'eau:** 0,8% @ 25 °C %.

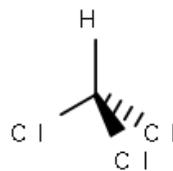
**Volatilité:** 100%.

**Taux d'évaporation (ether=1):** 0,56.

**Coefficient de partage eau/huile :**  $\log K_{ow} = 1,97$ .

**Point d'éclair:** Aucun.

**Auto-inflammation :** > 1832 F (> 1000 C) (°F) (chloroforme, qualité technique et qualité du fluorocarbone ; stabilité par l'alcool, 2011).



## II-6-2- Les risques pour la santé humaine

### II-6-2-1- Études épidémiologiques

Une étude épidémiologique a été effectuée auprès de travailleurs exposés à 375 à 1 330 mg/m<sup>3</sup> (77 à 272 ppm) de chloroforme pendant 3 à 10 ans. Les symptômes observés étaient la lassitude, la soif, des dérangements gastro-intestinaux, des mictions fréquentes et douloureuses, un manque de concentration, la dépression et l'irritabilité [15].

Une étude effectuée auprès de travailleurs chinois fait mention d'une incidence plus élevée d'étourdissements, de fatigue, de somnolence, d'insomnie, de pertes de mémoire, d'anorexie et de palpitations. Ces personnes ont été exposées à 0,9 à 28,9 ppm pour une durée moyenne de 7,8 ans. Les effets ne peuvent être attribués à la seule exposition au chloroforme puisque les travailleurs étaient exposés à de nombreux produits chimiques simultanément [15].

Plusieurs études épidémiologiques ont été publiées concernant le risque de cancer en relation avec l'exposition aux produits chlorés dans l'eau potable. Bien que ces études semblent indiquer un risque accru pour certains types de cancer (particulièrement la vessie, le colon et le rectum), Deux études épidémiologiques en milieu de travail ont été menées mais il semble que leur puissance statistique soit faible. Plusieurs études ont été effectuées chez l'animal dont trois études par voie orale et une par inhalation chez la souris ont montré une augmentation de l'incidence de tumeurs des tubules rénaux et, dans un cas, des tumeurs hépatocellulaires [15].

### II-6-2-2- Études toxicologiques

Les effets toxiques du chloroforme sont attribuables à la fois au composé lui-même et à un de ses métabolites, le phosgène. À forte concentration, la dépression du système nerveux central est causée par le chloroforme. À plus faible concentration, les effets toxiques sur le foie et le rein résulteraient de l'action du chloroforme et du phosgène [15].

Des effets hépatotoxiques ont été rapportés chez des personnes exposées en milieu de travail. Une étude citée par Environmental Health Criteria (1994) rapporte une incidence accrue d'hépatite toxique et d'hépatomégalie chez des travailleurs exposés à des concentrations de 10 à 1 000 mg/m<sup>3</sup> (2 à 200 ppm) pendant 1 à 4 ans. D'autres produits chimiques étaient présents en faible concentration. Une autre étude mentionne une incidence élevée de jaunisse toxique ainsi que des nausées et des vomissements chez des travailleurs exposés à des concentrations de plus de 1 950 mg/m<sup>3</sup> (400 ppm) pendant moins de 6 mois.

D'autres cas d'hépatotoxicité ont été observés chez des travailleurs exposés à 80 à 160 mg/m<sup>3</sup> (16 à 32 ppm) pendant moins de 4 mois [15].

Un grand nombre d'études visant à mettre en évidence une activité génotoxique du chloroforme a été effectué chez l'animal *in vitro* et a donné des résultats négatifs dans une variété de tests (locus spécifique, aberrations chromosomiques, échange de chromatides soeurs, synthèse non programmée d'ADN, bris de brins d'ADN, liaison à l'ADN) [15].

Selon le CIRC (1999), l'évidence du potentiel mutagène du chloroforme est faible selon les études animales effectuées *in vivo* ainsi que les études *in vitro* avec des cellules de mammifères, de champignons et de levures [15].

## II-7- Le bromoforme

Le bromoforme ou tribromométhane est un composé chimique de formule brute CHBr<sub>3</sub> (bromoforme, 2003).

### II-7-1- Les propriétés physico-chimiques

#### ➤ Propriétés physiques

Le bromoforme est un liquide dense, incolore (tendance au jaunissement à la lumière), d'odeur sucrée, détectable à environ 1,3ppm et rappelant celle du trichlorométhane. Il est très peu soluble dans l'eau (0,1% en poids à 20°C), par contre miscible avec la plupart des solvants organiques. En outre, il dissout un grand nombre de substances telles que graisses, huiles, résines. Ses principales caractéristiques physiques sont les suivantes :

**Masse molaire :** 252,8

**Point de fusion :** 8 °C

**Point d'ébullition :** 149°C à pression atmosphérique

**Densité (D<sub>20</sub>) :** 2,894

**Densité de vapeur (air = 1) :** 8,7

**Tensions de vapeur :** 0,67 kPa à 20 °C

13,3 kPa à 86 °C

53,3 kPa à 128 °C (bromoforme, 2003).

### ➤ Propriétés chimiques

Le bromoforme est un produit peu stable qui tend à se décomposer et à jaunir sous l'action de la chaleur, de l'air et de la lumière. Il est généralement stabilisé par addition de 1% d'éthanol. A température élevée ou au contact de flammes, la décomposition donne lieu à un dégagement de gaz toxiques et corrosifs, notamment le bromure d'hydrogène, le brome (bromoforme, 2003).

## II-7-2- Les risques pour la santé humaine

### II-7-2-1- Études épidémiologiques

L'ingestion provoque une sensation de brûlure de la bouche, puis une ataxie et une logorrhée suivie d'un coma aréflexique; une dépression respiratoire et un collapsus cardiovasculaire caractérisent les cas graves. Les vomissements pouvant survenir lors de ces comas peuvent provoquer des fausses routes pulmonaires. Il s'agit de signes neurologiques (hyperréactivité ou somnolence), psychiatriques (hallucination, excitation, troubles de mémoire), cutanés (éruption acnéiforme, lésions pustuleuses) et digestives (anorexie, constipation). Une altération des fonctions hépatiques est également rapportée. Le contact prolongé avec le liquide peut occasionner des dermatoses. Il peut également causer des altérations génétiques héréditaires (Cancérogène) (bromoforme, 2003).

### II-7-2-2- Études toxicologiques

Sa toxicité est plus marquée que celle du trichlorométhane, mais sa faible volatilité à température ordinaire limite le degré d'exposition en milieu professionnel. Il peut pénétrer dans l'organisme par voies respiratoire, cutanée ou accidentellement par ingestion (bromoforme, 2003).

Les symptômes observés sont essentiellement neurologiques (sédation, atonie musculaire, ataxie, prostration et, pour les fortes doses, coma); il peut s'y associer une hypothermie et une piloérection. L'autopsie révèle une atteinte du foie et des reins, plus rarement des surrénales et du cerveau (bromoforme, 2003).

Une étude met en évidence une activité mutagène du bromoforme par le test d'Ames a été effectué sur salmonelle (TA 100) et a donné des résultats positifs (bromoforme, 2003).

## II-8- Normes des SPC

Le tableau ci-dessous présente les différentes normes en fonction de diverses sources et des années.

**Tableau 4. Limites imposées et recommandées pour les SPC (Hrudey, 2008).**

Source	Sous-produits de désinfection par chloration	Valeur de référence (µg/L)	Année d'établissement ou de révision
Australie	THM4 (valeur maximale)	250	1996, 2004
	Acide monochloroacétique	150	2004
	Acide dichloroacétique	100	2004
	Acide trichloroacétique	100	2004
	Chlorure de cyanogène	80	2004
	Hydrate de chloral (trichloroacétaldéhyde)	20	2004
Canada – CMA	THM4 (valeur maximale)	350	1978
	THM4 (moyenne annuelle mobile)	100	1996, 2006
	Bromodichlorométhane (BDCM) <sup>a</sup>	16	2006
	AHA5 (valeur maximale)	80	2008
É.-U. – CMC	THM4 (moyenne annuelle mobile)	100	1979
	THM4 (moyenne annuelle mobile)	80	1998
	AHA5 (moyenne annuelle)	60	1998
OMS	Chloroforme	30	1984
	Chloroforme	200	1993, 2004
	Bromodichlorométhane (BDCM)	60	2004
	Chlorodibromométhane	100	2004
	Bromoforme	100	2004
	Hydrate de chloral	10	2004
	Chlorure de cyanogène	70	2004
	Dibromoacétonitrile	70	2004
	Acide dichloroacétique	50	2004
	Dichloroacétonitrile	20	2004
	Acide monochloroacétique	20	2004
	Acide trichloroacétique	200	2004

## II-9- Moyens d'action pour limiter la formation des SPC dans l'eau

Les moyens d'action permettant de réduire la formation des SPC ou d'éliminer les SPC formés sont les suivants:

- Réduire la formation des SPC:
  - par diminution de la teneur en matière organique des eaux brutes en mettant en place des politiques de reconquête de la qualité des eaux vis-à-vis de ce paramètre.

- par l'amélioration du traitement physico-chimique avant la désinfection (afin de réduire au maximum la teneur en matière organique de l'eau).
- par la diminution de la dose de chlore administrée.
- par le changement de désinfectant (ozonation, chloramine,...).
- par le changement de source d'eau brute, lorsque cela est possible.
  - Eliminer les SPC formés
- par utilisation de filtres au charbon actif (Gruau, 2004).

L'utilisation de méthodes alternatives de désinfection ou l'utilisation de filtres au charbon actif crée des surcoûts importants, tant et si bien que la chloration reste le processus dominant, notamment lorsque les installations sont anciennes. D'autre part, même si le problème des SPC est résolu au niveau de la station de traitement, il reste le problème de leur formation dans les réseaux (Gruau, 2004).

### III-1-Généralités

La mutagenicité des eaux potables provient principalement de la chloration des substances humiques contenues dans l'eau brute. Les substances humiques sont issues de la dégradation biologique de déchets naturels végétaux et animaux. Elles représentent la majeure partie du carbone organique contenu dans les eaux brutes. L'activité mutagène produite est proportionnelle, d'une part, au taux de chloration appliqué, et d'autre part, à la quantité de composés organo-halogénés formée (Marzin et al., 1998).

Plusieurs tests de génotoxicité impliquant divers systèmes biologiques ont été mis en oeuvre. La mise au point du test de mutation reverse sur *Salmonella typhimurium*, ou test d'Ames (AMES et al., 1975) a coïncidé avec la publication des premières études démontrant l'existence de composés organochlorés dans les eaux potables. Ce test s'est depuis imposé comme l'essai le plus utilisé dans le domaine de la génotoxicité des eaux. Le SOS chromotest, un autre test sur procaryote, a été utilisé pour démontrer que des extraits d'eau potable induisaient des altérations primaires de l'ADN chez *E. coli* (Marzin et al., 1998).

Des échantillons d'eau potable testés sans préconcentration provoquent l'augmentation de la fréquence de micronoyaux dans les cellules de pollen de *Trandescantia*, et induisent des aberrations chromosomiques dans les cellules de plante *Crépis capifiaris*. Néanmoins, Demarini et al. (1982) n'ont pas réussi à démontrer la capacité d'extraits d'eau potable à induire des mutations dans les champignons *Neurospora crassa*, dans des levures *Saccharomyces cerevisiae*, ou dans le maïs *Zea mays*. Les extraits d'eau potable testés par Galassi et al. (1989) produisent des mutations sur *Saccharomyces cerevisiae* (Marzin et al., 1998).

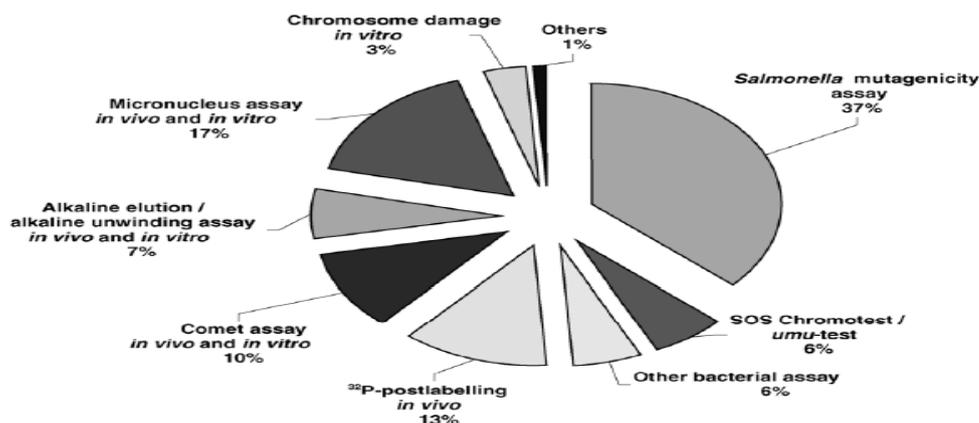


Figure 12 : Les différents tests de génotoxicité de l'eau (Takeshi et al., 2004).

### III-2-Les types de 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 incluant notamment les SPC, les nitrosamines, quelques pesticides, quelques solvants organiques [16].

Les tests utilisés dans le domaine des mutations géniques permettent de déceler 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 déceler les mutations sur l'ADN, mais on en utilise aujourd'hui moins d'une dizaine de façon courante [17].

#### III-2-1-Tests de mutations géniques

Les mutations géniques affectent la structure du matériel génique au sein d'un seul gène. Dues à des erreurs lors de la réplication de l'ADN, elles sont à l'origine de l'apparition d'allèles nouveaux [18].

##### III-2-1-1-Test d'Ames ou mutatest

###### III-2-1-1-1- Définition

Le test d'Ames est un test biologique permettant de déterminer le potentiel mutagène d'un composé chimique. Les cancers étant souvent liés à des dommages causés dans l'ADN, ce test rapide et peu onéreux est donc utilisé afin d'estimer le potentiel cancérigène d'une substance. Le protocole fut décrit dans une série de publications au début des années 70 par Bruce Ames et son équipe de l'Université de Californie, Berkeley [19].

###### III-2-1-1-2- Principe

Le principe de ce test repose sur différentes souches bactériennes de *Salmonella typhimurium*, chacune de ces souches contient une mutation légèrement différente qui désactive un gène codant pour une enzyme nécessaire à la synthèse de l'acide aminé histidine. La mutation rend les bactéries auxotrophes, c'est-à-dire Ces souches ne peuvent pas se développer dans un milieu de culture normal et avoir une exigence absolue pour la supplémentation de l'acide

aminé histidine contrairement aux bactéries sauvages (prototrophes) qui poussent dans un milieu qui en est dépourvu. Cette mutation peut réverser vers le phénotype sauvage (His<sup>+</sup>) de manière spontanée ou sous l'action d'un agent mutagène.



Le test permet donc d'évaluer la capacité que possède une substance à induire une réversion de la souche auxotrophe. Dans le cas d'une substance mutagène, on observe ainsi l'apparition de souches prototrophes sous forme de colonies sont appelées révertants, ne nécessitant plus d'histidine pour croître mais d'un milieu minimum seulement.

Un extrait de foie de rat (appelé S9 Mix) est ajouté aux bactéries, juste avant l'addition de la solution de la substance à tester afin de simuler l'effet du métabolisme. En effet, certains composés comme le benzopyrène une fois métabolisés induisent la formation de produits cancérigènes, le S9 Mix de Hamster peut être utilisé pour entrainer la métabolisation de certains produits.

Différentes souches de *Salmonella typhimurium* peuvent être utilisées pour ce test. Différents types de dommages à l'ADN peuvent ainsi être observés en fonction des souches. La souche TA98 qui est l'une des plus utilisée est plus sensible aux mutations qui affectent le cadre de lecture. La souche TA100 est une souche plus sensible aux mutations de substitutions [19, 20, 21, 22].

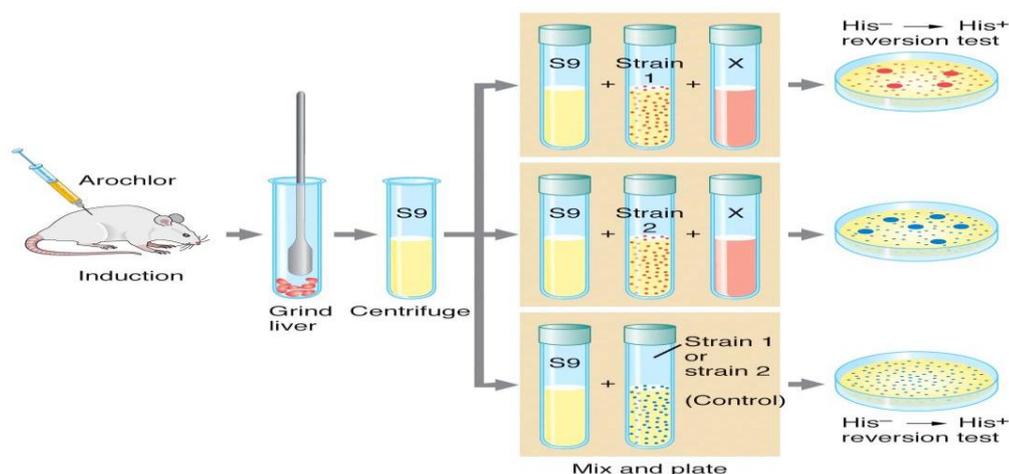


Figure 13 : Principe du test d'Ames [23].

### III-2-1-1-3- Particularité des souches bactériennes et du milieu de culture

#### ➤ Particularité des souches bactériennes

-Les souches portent une mutation rfa améliorant la pénétration de certains produits à travers l'enveloppe bactérienne et mutation uvrB rendant les bactéries déficientes dans leur système de réparation de l'ADN par excision-resynthèse

-Les souches de Salmonella hébergent en outre un plasmide pKMI01. Ce plasmide porte un gène (muc C) spécifiquement implique dans la mutagenèse SOS (Hofnung & Quillardet, 1983).

#### ➤ Particularité du milieu de culture

Certaines substances nécessitent un inducteur pour être mutagène. Un extrait de foie de rat appelé S9 Mix (fraction microsomale) obtenu par ultra-centrifugation est souvent ajouté à l'agar mou avant étalement. Cet extrait enzymatique convertirait les substances cancérigènes en dérivés électrophiles, plus susceptibles de réagir directement avec l'ADN, système absent chez les bactéries mais présent chez les mammifères. Ainsi de nombreux agents cancérigènes comme les alfa-toxines ne deviennent actifs dans ce test qu'en présence de cet extrait de foie [20].

### III-2-1-1-4- Avantages et Inconvénients

Ce test présente les avantages suivants :

Méthode simple, sensible et précise. Ce test peut également s'appliquer à l'analyse d'effluents industriels, d'eau à usage alimentaire, de fumées ou de gaz d'échappement, de liquides biologiques humains (urines) provenant d'individus mis en contact par leur travail avec des produits cancérigènes. Les médicaments et leur principe actif peuvent aussi faire l'objet d'un examen systématique par ce test [20].

Ce test possède certains inconvénients :

- Ce test utilise des bactéries, Celles-ci ne présentent pas un modèle parfait pour l'homme [20].
- On peut collecter des résultats variables, et parfois même contradictoires, pour des travailleurs de même secteur professionnel. Ceci peut s'expliquer par l'action notable de facteurs de confusion, tels les médicaments (chimiothérapie, antiseptiques

urinaires), l'alimentation ou surtout la consommation de tabac (Pillière & Falcy, 1991).

- Le S9 Mix ne peut pas remplacer toutes les réactions enzymatiques effectuées *in vivo* [24].

### III-2-1-2-Le SOS chromotest

#### III-2-1-2-1-Définition

Le **SOS Chromotest** est un dosage biologique pour évaluer la génotoxicité potentielle de composés chimiques. Ce test est un test colorimétrique qui mesure l'expression de gènes induite par des agents génotoxiques dans *Escherichia coli* PQ 37 (Quillardet et al., 1982). L'ADN cellulaire endommagé va mettre en place un système de fonctions réparatrices appelées « fonctions SOS » qui vont éviter le blocage irréversible de la synthèse d'ADN. Ce système code pour une enzyme  $\beta$ -galactosidase, l'activité de celle-ci est dosée en utilisant un dosage colorimétrique simple. En incluant un analogue de lactose qui donne un composé coloré lors de la dégradation par la  $\beta$ -gal. Ce test peut être utilisé pour la détection de nombreux échantillons aqueux (Khallef, 2004).

#### III-2-1-2-2-Principe

Lorsqu'une cellule ou un organisme sont exposés à des substances génotoxiques, un système de réparation de l'ADN est activé en réponse à cette agression : c'est le système SOS. Le SOS Chromotest permet de déterminer *in vitro* la capacité d'une substance chimique à induire des dommages à l'ADN qui seront quantifiés indirectement par la mesure de l'expression d'un des composants du système SOS, le gène *sfia* (Cazaunau, 2009).

Deux gènes jouent un rôle clé dans l'expression des fonctions SOS: *lexA* et *recA*, la protéine RecA est activée par le signal SOS en une RecA protéase capable de cliver spécifiquement la protéine LexA qui n'est autre que le répresseur de la plupart des gènes impliqués dans l'expression des fonctions SOS : *umuC*, *sfia*, gènes *din*. La RecA protéase peut aussi cliver la protéine CI répresseur du prophage (Hofnung & Quillardet, 1983), donc l'activation du système de réparation SOS conduit à l'induction du prophage et à l'induction du gène *lacZ* (responsable de la synthèse de la galactosidase a été placé sous le contrôle du promoteur *sfia*) et à la synthèse de l'enzyme  $\beta$ -gal dont l'activité est dosée en utilisant un dosage colorimétrique simple. En incluant un analogue de lactose qui donne un composé de couleur jaune. L'activité de la  $\beta$ -gal est comparée à l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)

mesurée en parallèle, qui constitue à ce titre un standard interne puisque non inducible par des agents génotoxiques [16].

Comme dans le cas du test d'Ames une fraction S9 est ajoutée au milieu réactionnel afin de permettre l'activation métabolique des pro-génotoxiques. L'activité génotoxique. Pour une concentration  $c$  d'échantillon, est exprimée par le ratio  $Rc = \beta gal/IPAL$ . Le facteur d'induction. IF, est défini par le rapport  $Rc/Ro$  ou  $Ro$  est le ratio mesuré pour un témoin négatif (solvant seul). Un échantillon est généralement considéré comme génotoxique si IF est supérieur ou égal à 2, modérément génotoxique si  $1.5 < IF < 2$  et non génotoxique si  $IF < 1,5$  [16].

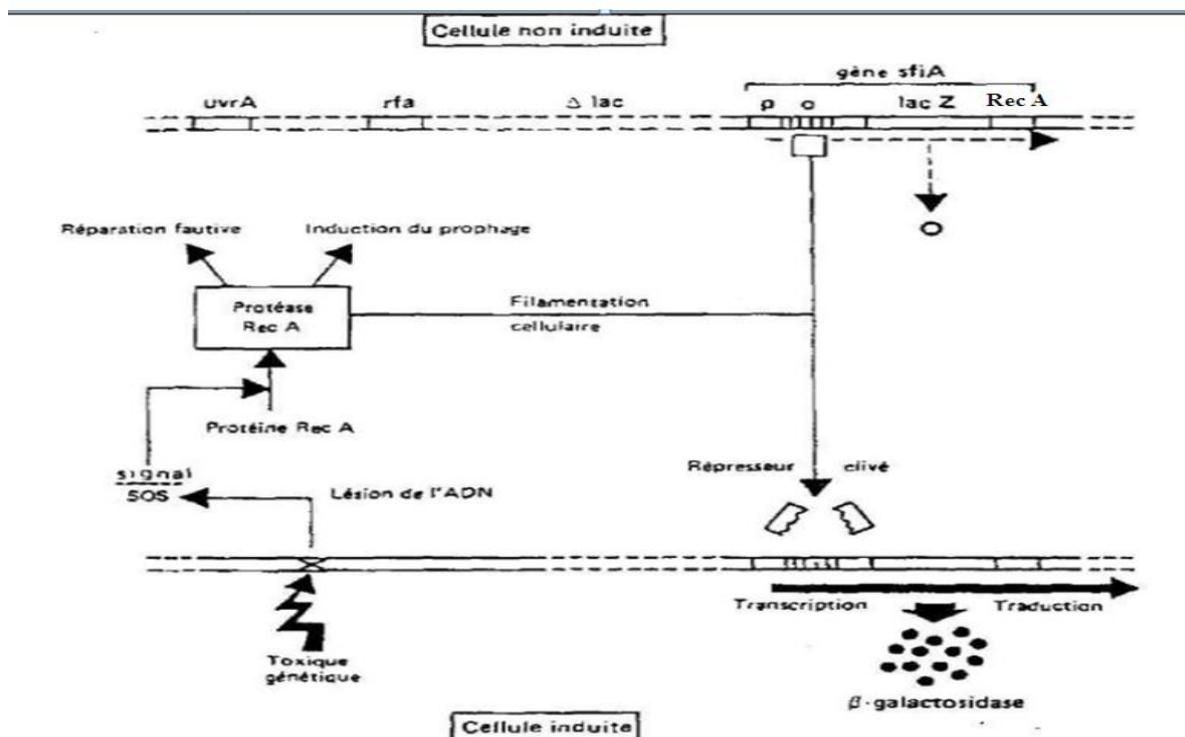


Figure 14: Principe du SOS chromotest (Hofnung & Quillardet, 1983).

### III-2-1-2-3- Particularité des souches bactériennes

La bactérie *Escherichia coli* PQ37 est le résultat de manipulations génétiques ayant pour but de modifier son système de réparation SOS, de diminuer sa capacité de réparation par excision-resynthèse (*uvrA*) et d'augmenter la perméabilité de sa membrane cellulaire (*rfa*). Les modifications sur son système SOS consistent en la fusion du gène structural *lacZ*, codant pour la synthèse de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase, aux gènes *sfiA* contrôlant la réponse SOS. Egalement, la suppression de la région ( $\Delta lac$ ) du gène *lacZ* normale a pour conséquence de

rendre l'activité de la  $\beta$ -galactosidase strictement dépendante de l'expression des gènes *sfIA* (Rodrigue, 1991). Elle a été rendue constitutive pour la phosphatase alcaline ( $\text{Pho}^c$ ) pour permettre une mesure facile de la synthèse générale de protéines. Toutes ces modifications génétiques rendent cette bactérie plus sensible vis à vis des agents génotoxiques (Hofnung & Quillardet, 1983).

#### III-2-1-2-4- Avantages et Inconvénients

Il présente les avantages suivants :

- Tests de produits pharmaceutiques pour l'activité génotoxique.
- Dépistage des eaux souterraines et de surface pour les résidus génotoxiques.
- Dépistage de l'eau potable des produits chimiques ayant un potentiel génotoxique.
- Dépistage des polluants atmosphériques solubles dans l'eau pour les agents génotoxiques.
- facile à utiliser, fiable, rapide, peu coûteux [25].

cependant, ce test est moins sensible que le test d'Ames et test des micronoyaux [26].

#### III-2-2-Tests des lésions primaires de l'ADN

##### III-2-2-1-Test des comètes

###### III-2-2-1-1-Définition

Le test des comètes ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose. Cette technique fut mise au point par **O.Osting et K.Johanson, 1984** dans le but de détecter les cassures doubles brins de l'ADN. Elle fut ensuite optimisée par **Singh et al, 1988** afin de détecter les cassures simples brins et les sites alcali-labiles. Il permet de mesurer les cassures induites directement par *un agent génotoxique* et indirectement lors des processus enzymatiques de *réparation des dommages* ou lors de processus secondaires *de fragmentation de l'ADN* tel que *l'apoptose* [27].

###### III-2-2-1-2-Principe

Le test des comètes est un outil incontournable pour l'étude de la génotoxicité à l'échelle cellulaire d'une ou plusieurs substances sur n'importe quel tissu vivant constitué de cellules

eucaryotes. Ce test est basé sur le principe de la charge négative portée par l'ADN qui, sous influence du courant de migration, se déplace vers l'anode (Foltete, 2010).

Dans la cellule, l'ADN est sous forme d'une double hélice surenroulée. Dans des conditions alcalines, la structure surenroulée se relâche, l'ADN se dénature en structure simple brin et les fragments d'ADN sont libérés [28]. Durant l'électrophorèse, la présence de cassures permet à l'ADN de migrer et le noyau prend donc la forme d'une comète. On distingue une partie contenant de l'ADN non endommagé, appelée tête de la comète et une partie plus allongée, contenant l'ADN fragmenté ayant migré, constituant la queue de la comète et l'ADN d'une cellule intacte apparaît sous la forme d'une sphère (Michel, 2011).

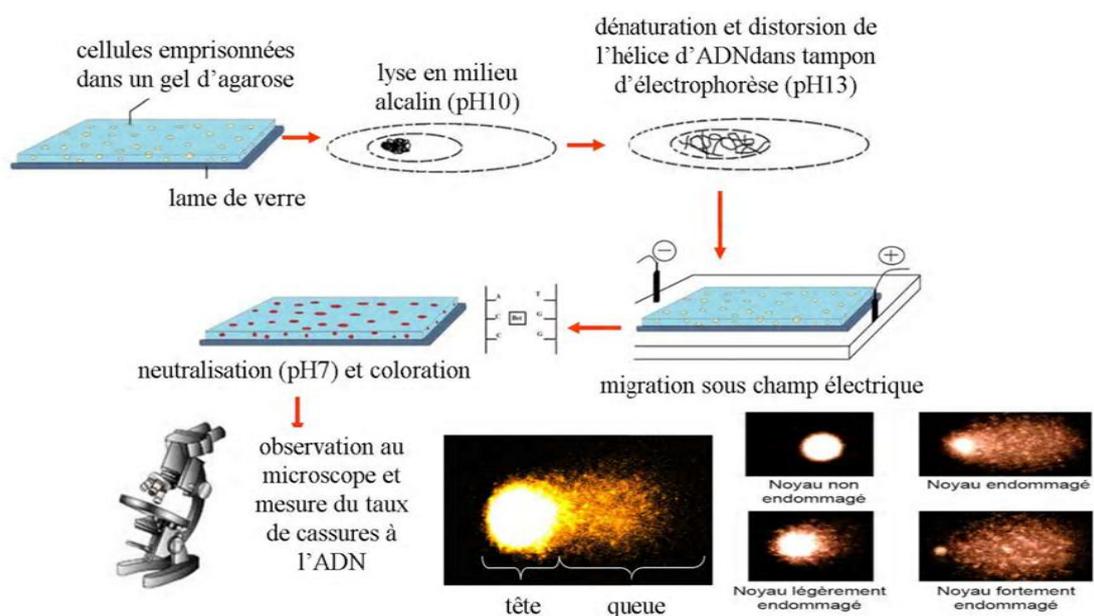


Figure 15 : Principe du test des comètes (Michel, 2011).

### III-2-2-1-3- Types de lésions génotoxiques mises en évidence par le test des comètes

#### ➤ En conditions neutres

Le test des comètes en conditions neutres permet de détecter sélectivement les cassures doubles brins, car la molécule d'ADN n'est pas dénaturée (Foltete, 2010).

#### ➤ En conditions alcalines

Le test des comètes en conditions alcalines est beaucoup plus sensible et permet de détecter un large panel de lésions génotoxiques :

- les cassures simple et double brins, car la molécule d'ADN est dénaturée.
- les sites de réparation par excision-resynthèse. En effet, si cette dernière est mal exécutée, elle peut causer des ruptures simple brin.
- les sites alcali-labiles, qui se forment lorsqu'une base se détache du désoxyribose, donnant naissance à des sites apuriques ou apyrimidiques en milieu alcalin (pH>13), ces « points faibles » se rompent et créent des cassures simple brin.
- l'alkylation de l'ADN par des agents alkylants tels que l'éthyl methanesulfonate (EMS) ou la N-méthyl-N-nitrosourée (MNU). L'alkylation des bases de l'ADN peut donner lieu à réparation par excision-resynthèse, mais les bases alkylées peuvent aussi devenir par glycosilation des sites apuriques ou apyrimidiques alcali-labiles.
- les ponts chromosomiques ou les liaisons entre deux chaînes d'ADN ou entre une chaîne et des protéines, qui peuvent être détectés par l'inhibition de la migration de l'ADN.
- l'apoptose cellulaire, dont la structure caractéristique après migration se compose d'un vestige de noyau matérialisé par un fin anneau et suivi par une queue très fournie.
- les cellules nécrosées, qui ne laissent qu'un halo plus ou moins diffus sur la lame (Foltete, 2010).

#### III-2-2-1-4- Avantages et Inconvénients

Ce test présente un certain nombre d'avantages :

- Simple, peu coûteux, fiable, rapide, reproductible
- Cette technique permet de **quantifier** d'une part **les dommages causés à l'ADN** par divers agents toxiques et d'autre part **la réparation des dommages** dans les cellules eucaryotes ainsi que dans quelques cellules procaryotes in vivo et in vitro.
- Technique **non invasive**.
- Technique sensible (détection d'environ 0,2 à 2 coupures par  $10^9$  daltons).
- Les résultats sont obtenus en quelques heures par rapport aux techniques conventionnelles.
- 50 à 100 cellules sont comptées par échantillon par comptage manuel ou en utilisant un logiciel [27].

Comme ce test présente les inconvénients suivants :

- Le débit de cette technique est bas, car une électrophorèse correspond à un type cellulaire / un agent toxique / une concentration.

- Les résultats ne peuvent être comparés que s'ils proviennent d'électrophorèses réalisées ensembles [27].

### III-2-2-2-Test de Post-marquage au phosphore 32

#### III-2-2-2-1-Définition

Le marquage de l'ADN, par la méthode du post marquage au  $^{32}\text{P}$ , est très utilisé comme biomarqueur d'effet biologique, en particulier pour la détection d'adduits générés par des produits d'origine environnementale. Il permet de mettre en évidence le caractère génotoxique d'une substance et d'atteindre une sensibilité de 1 adduit par  $10^{10}$  nucléotides (Jawich, 2006 ; Michel, 2011).

#### III-2-2-2-2-Principe

La procédure expérimentale consiste en quatre étapes :

- 1- Une digestion enzymatique de l'ADN.
- 2- Une présélection des adduits afin d'augmenter la sensibilité de la méthode
- 3- Une phosphorylation des adduits par transfert du phosphate radioactif du  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  grâce à la polynucléotide kinase pour former les  $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{-}3'$ -diphosphonucléotides
- 4- Une séparation des adduits marqués par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince. La quantification est réalisée actuellement par la technologie du phosphore-imaging (Jawich, 2006).

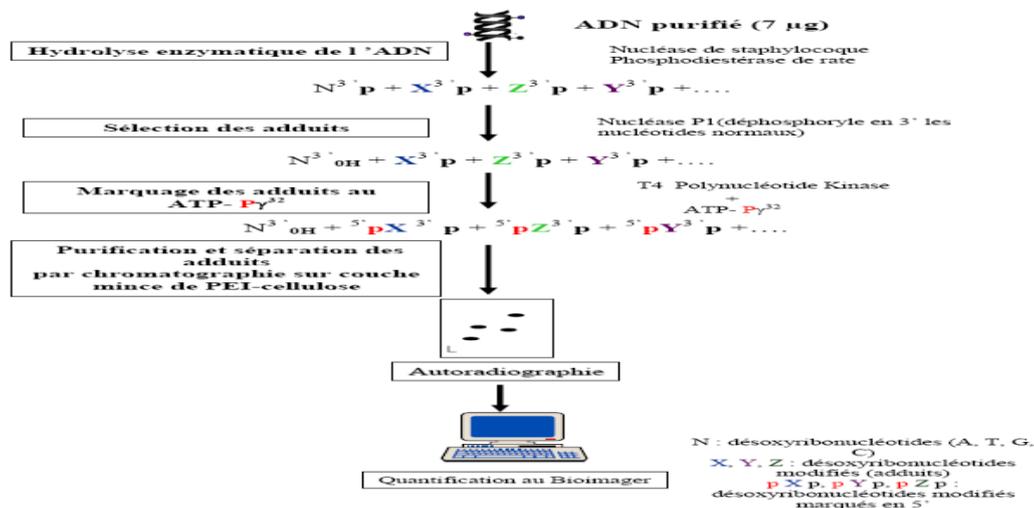


Figure 16: Principe de la méthode de post-marquage au  $^{32}\text{P}$  de l'ADN (Michel, 2011).

### III-2-2-3- Avantages et Inconvénients

Cette méthode possède les avantages suivants :

- Elle ne nécessite pas de connaître au préalable, la structure chimique des adduits et est généralement applicable à la mesure des adduits à l'ADN non identifiés.
- Elle possède une sensibilité élevée et permet de détecter des faibles taux d'adduits (jusqu'à un adduit/ $10^{10}$  nucléotides).
- Elle ne requiert que quelques microgrammes d'ADN.
- C'est une méthode non invasive puisqu'elle évite l'utilisation de substances radioactives *in vivo*.
- Elle permet des études épidémiologiques.
- Elle donne des résultats quantitativement reliés avec l'exposition.
- Elle permet de quantifier chaque type d'adduit sans même en connaître la structure chimique (Jawich, 2006).

Cette méthode présente certains inconvénients :

- C'est une méthode non automatisable, nécessitant du temps.
- Elle nécessite l'utilisation et la manipulation de substances radioactives.
- C'est une technique relativement coûteuse.
- Elle ne permet pas de donner la nature (structure chimique) des adduits, bien que les conditions de migration permettent de caractériser la famille chimique à laquelle le composé appartient (Jawich, 2006).

### III-2-2-3-Méthode d'elution alcaline sur filtre

#### III-2-2-3-1-Principe

Ce test est basé sur le principe que les lésions simple brin de l'ADN sont alcali-sensibles. Ces sites sont des indicateurs des dommages génétiques causés par les agents alkylants, molécules interagissant avec l'ADN en des sites multiples. Après hydrolyse en milieu basique, on obtient des fragments d'ADN d'autant plus petits qu'on aura de lésions. Le taux d'ADN double brin restant est inversement proportionnel au nombre de ruptures présentes (Vincent, 1993). Des cassures dans le simple brin d'ADN ou des points de faiblesse dans les alcalis sont identifiés en mesurant le taux auquel l'ADN simple brin passe à travers une membrane filtrante de porosité connue dans des conditions alcalines de dénaturation [29].

### III-2-2-3-2- Avantages et Inconvénients

Cette méthode présente un certain nombre d'avantages :

Cette méthode est assez sensible. De plus, la détermination microfluorimétrique de l'ADN augmente la sensibilité et la reproductibilité de la méthode d'éluion alcaline [29]. Elle permet d'établir une corrélation entre les cassures et l'activité cancérogène et mutagène (Vincent, 1993).

Cette technique présente certains inconvénients :

Elle permet de détecter des taux faibles de dommages de l'ADN. De plus, elle est à noter par sa variabilité et l'incohérence extrême (Vincent, 1993).

### III-2-3-Tests des mutations chromosomiques

Les mutations chromosomiques se sont des changements profonds dans la structure d'un ou de plusieurs chromosomes de telle sorte que la mutation est observable lorsqu'on fait un caryotype [18].

#### III-2-3-1-Test des micronoyaux

##### III-2-3-1-1-Définition

Test de micronoyaux est une méthode d'essai in vitro utilisant généralement des cultures de cellules humaines ou de rongeur. Grâce à sa capacité de mise en évidence d'agents aneugènes et clastogènes, il constitue un outil de base complet pour l'étude in vitro du potentiel de lésions chromosomiques. Il consiste à mettre en évidence d'éventuels micronoyaux (MN) dans le cytoplasme de cellules en interphase (OECD & OCDE, 2010).

Un *micronoyau*, également appelé corps de Howell-Jolly par les hématologistes est le noyau erratique (troisième) qui est formée au cours de la transition métaphase / anaphase de la mitose ou la méiose (division cellulaire) consécutivement à deux types d'évènements distincts : une cassure double brin d'ADN, générant un fragment de chromosome acentrique (c'est à dire dépourvu de centromère) non rattachable au fuseau mitotique (événement clastogène), une perte de chromosome entier incapables de migrer vers les pôles de la cellule au cours de l'anaphase (événement aneugène) [ 30,31,32].

Les micronoyaux sont des lésions transmises aux cellules-filles, contrairement aux aberrations chromosomiques observées dans les cellules en métaphase, qui ne sont pas forcément transmises (OECD & OCDE, 2010).

### III-2-3-1-2-Principe

Les cultures cellulaires d'origine humaine ou mammifère sont exposées à la substance d'essai, en présence et en absence d'une source exogène d'activation métabolique, à moins que les cellules utilisées ne soient dotées de capacités métaboliques idoines. Durant ou après l'exposition à la substance d'essai, les cellules sont mises en culture pendant une période suffisante pour que la lésion chromosomique ou fusoriale conduise à la formation de micronoyaux dans les cellules en interphase. La substance d'essai est normalement présente au cours de la mitose pour qu'il y ait induction d'une aneuploïdie. Les cellules récoltées en interphase sont teintées et soumises à analyse pour déceler la présence de micronoyaux. En principe, Afin d'observer ces micronoyaux, il est nécessaire qu'il se soit écoulé au moins 30h entre le début de la contamination et l'observation microscopique, car les micronoyaux n'apparaissant qu'à la suite d'une mitose, il faut garantir au moins le temps requis pour permettre le déroulement entier du cycle cellulaire. Dans le cas où le temps de contamination serait inférieur, il faudra prévoir une période de récupération permettant aux cellules d'achever un cycle avant l'observation. Dans les cultures ayant été exposées à un agent de blocage de la cytokinèse, la numération n'est effectuée que sur les cellules binucléées. En l'absence d'agent de blocage de la cytokinèse, il importe de démontrer que les cellules analysées ont selon toute vraisemblance subi une mitose pendant ou après l'exposition à la substance d'essai. Pour tous les protocoles, il convient de démontrer qu'une prolifération cellulaire a eu lieu tant dans les cultures témoins que dans les cultures traitées (Foltete, 2010 ; OECD & OCDE, 2010).

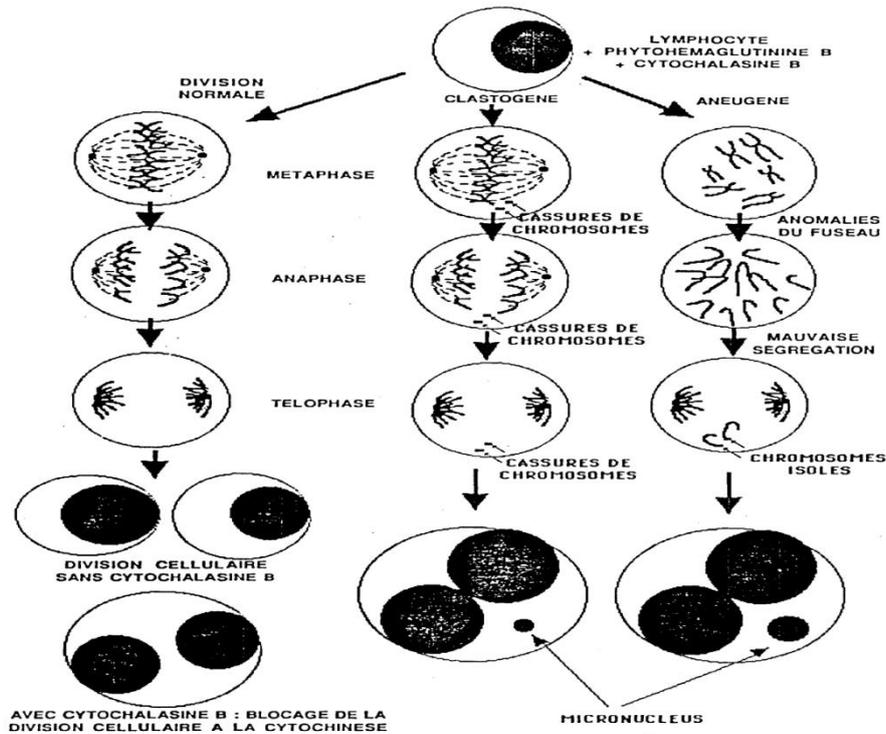


Figure 17: Formation de micronoyaux (Vincent, 1993).

- L'association de *l'hybridation in situ fluorescente* permet de différencier les MN contenant des fragments chromosomiques acentromériques (cassures chromosomiques) et ceux contenant des chromosomes entiers centromériques (pertes chromosomiques). Elle permet d'identifier la région centromérique de chaque chromosome humain, sur des préparations chromosomiques en métaphase. Pour chaque cellule micronucléée, le nombre de MN est enregistré de même que la présence ou non de centromères dans les MN et le nombre de spots de fluorescence (correspondant chacun à un centromère donc à un chromosome) au sein de chaque MN (Gwenaëlle, 2008).

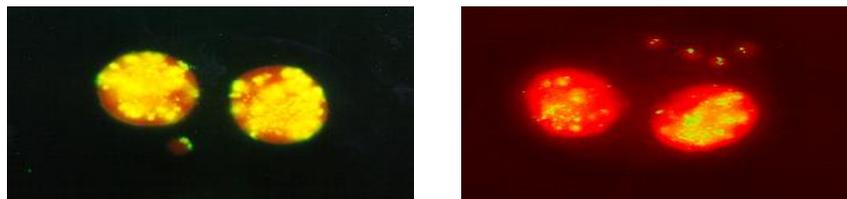


Figure 18: Photos (Hybridation in situ fluorescente). Exemples de MN centromériques (spots de fluorescence à l'intérieur des MN) (Gwenaëlle, 2008).

### III-2-3-1-3-Avantages et Inconvénients

Ce test présente un certain nombre d'avantages :

- mise en évidence des mutations chromosomiques et/ou génomiques
- Détection à la fois des substances clastogènes et aneugènes et ne met en évidence que les mutations non létales pour la cellule.
- associable à une étude de la qualité du matériel génétique contenu dans le micronoyau (présence ou non de centromères, type de chromosome altéré, nature exacte de l'altération) par hybridation " in situ " fluorescente ce qui apporte des éléments mécanistiques fondamentaux à l'interprétation des résultats [33,34].

Comme il présente certains inconvénients :

Des résultats variables en raison de facteurs de confusion, tels le tabac qui augmente le nombre de micronoyaux, ou les médicaments comme les rétinoïdes qui les diminuent, mais aussi des différences de qualité dans les protocoles de préparations (Pillière & Falcy, 1991).

### III-2-3-2-Test d'aberration chromosomique

#### III-2-3-2-1-Définition

L'essai d'aberration chromosomique in vitro est destiné à détecter les agents clastogènes qui provoquent des aberrations chromosomiques structurales dans des cellules somatiques mammaliennes cultivées. Aberrations chromosomiques induites peuvent être divisés en deux catégories principales (OECD & OCDE, 1997) : Aberrations de type chromosomique, se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides (d'un chromosome) sur le même site et les aberrations chromatidiennes se traduisant par une cassure d'une seule des deux chromatides ou par une cassure et une réunion entre chromatides [35]. *Les rayonnements ionisants* induisent des aberrations de type chromosomique (aberrations symétriques), comme dicentriques, des inversions, des chromosomes en anneau, sont produits dans la phase G0 ou G1 du cycle cellulaire (avant la réplication), tandis que les aberrations de type chromatides (aberrations asymétriques), comme des pauses et des lacunes, sont produits au cours de la phase S ou G2 (pendant ou après réplication).[36]

L'essai d'aberration chromosomique *in vitro* peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires établies, des souches cellulaires ou des cultures de cellules primaires. Les cellules employées sont choisies en fonction de leur potentiel de croissance en culture, de la stabilité de leur caryotype, du nombre et de la diversité des chromosomes et de la fréquence spontanée des aberrations chromosomiques (OECD & OCDE, 1997).

#### **III-2-3-2-2- Principe**

Après mise en culture des lymphocytes pendant 48 heures, les cellules sont bloquées en métaphase par la colchicine. Les cellules, éclatées avec une solution hypotonique, sont ensuite fixées puis colorées. Des anomalies du nombre ou de la structure des chromosomes (inversions, anneaux, délétions, lacunes...) sont alors observées au microscope optique. Ces aberrations sont le résultat de cassures suivies de réarrangements anormaux du chromosome entier. Les milieux biologiques les plus utilisés sont les lymphocytes sanguins périphériques (Pillière & Falcy, 1991).

#### **III-2-3-2-3- Types d'aberrations de structure chromosomique**

Aberration de structure est une modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope au stade de la métaphase et se présentant sous la forme de délétions, de cassures, de modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques [35].

##### **III-2-3-2-3-1- Les aberrations de structure portant sur un chromosome**

###### **➤ Délétions**

Elles résultent d'une cassure chromosomique avec perte du segment distal (délétion terminale), ou de deux cassures sur un même bras chromosomique avec perte du segment intercalaire (délétion intercalaire) (Figure 19). Les délétions terminales supposent un mécanisme de restitution d'un télomère pour assurer la stabilisation du chromosome [37].

###### **➤ Chromosomes en anneau**

Ils résultent d'une cassure à chaque extrémité d'un chromosome suivie par un recollement avec perte des segments distaux (Figure 19). Les structures en anneau sont assimilables à une double délétion, mais les échanges mitotiques entre chromatides-sœurs engendrent des dérivés complexes avec duplication/déficiences, ce qui complique l'interprétation du phénotype [37].

➤ *Inversions*

Elles sont dues à deux cassures sur le même chromosome, suivies de recollement après inversion du segment intermédiaire (Figure 19). Elles sont dites péricentriques si le centromère est compris dans le segment intermédiaire. Elles sont dites paracentriques si les deux cassures se sont produites sur le même bras chromosomique [37].

### III-2-3-2-3-2- Les aberrations de structure portant sur deux chromosomes

➤ *Les insertions*

Elles se traduisent par le transfert d'un segment intercalaire à l'intérieur d'un autre bras chromosomique (Figure 19). Elles résultent d'un mécanisme à trois cassures, deux sur le chromosome donneur et une sur le chromosome receveur. Les chromosomes donneurs et receveurs peuvent être un seul et même chromosome (insertion intrachromosomique). Le segment inséré peut conserver son orientation par rapport au centromère ou prendre une orientation inverse. Lors de la méiose on peut observer la formation de cellules monosomiques ou trisomiques pour le segment inséré [37].

➤ *Chromosomes dicentriques ou pseudodicentriques*

Un chromosome dicentrique est un chromosome possédant deux centromères. Ces chromosomes résultent de la fusion, souvent dans les régions télomériques, de deux chromosomes homologues ou non homologues. Lorsque les deux centromères sont suffisamment éloignés, l'un d'entre eux perd sa fonction, formant un pseudodicentrique [37].

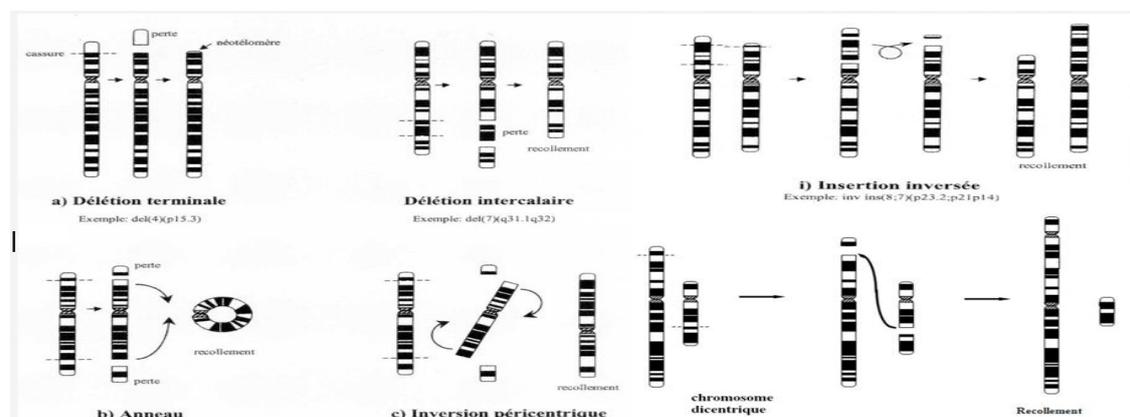


Figure 19: Principaux mécanismes d'apparition des aberrations de structures chromosomiques [38].

### III-2-3-2-4- Avantages et Inconvénients

Ce test présente un certain nombre d'avantages :

- C'est l'une des méthodes les plus anciennes d'évaluation des lésions génétiques liées à des expositions à des génotoxiques.
- C'est une technique simple.

Cette méthode est plus informative sur la nature des lésions que le test des micronoyaux (Pillière & Falcy, 1991).

Comme il présente certains inconvénients :

- Les résultats sont souvent contradictoires pour le même agent, en raison de variations individuelles dans la fréquence de base des modifications de la structure chromosomique (dus au tabac, à l'âge, aux pathologies anciennes ou actuelles). La prise en compte des facteurs de confusion est donc primordiale.
- Il faut aussi tenir compte de la fréquence d'aberrations chromosomiques dites spontanées, non précisément définie dans la population non professionnellement exposée.
- Une sensibilité médiocre en raison du faible taux d'aberrations impose l'analyse de nombreuses métaphases chez un grand nombre d'individus.
- L'absence de relation dose-effet et une persistance des aberrations pendant des dizaines d'années empêchent toute évaluation de nouvelles mesures de prévention.

L'absence de signification précise de ces lésions, en termes de risque de cancer, rend l'interprétation de ce test délicate (Pillière & Falcy, 1991).

### III-2-4- Autres tests

#### ➤ Test de HGPRT

Test de mise en évidence des mutations géniques consistant à dénombrer, par exemple dans les lymphocytes, les mutants sur le locus Hypoxanthine Guanine Phospho-Ribosyl Transférase (HGPRT). Ces cellules mutantes ont acquis la propriété de résistance vis-à-vis de la toxicité de la 6-thioguanine, ce qui permet leur mise en évidence et leur numération [33].

➤ **Damaged DNA Detection( 3D)**

Test de mise en évidence des lésions de l'ADN basé sur la réparabilité de ces lésions. Il consiste à quantifier l'intensité de la mise en œuvre des systèmes de réparation de l'ADN par excision- resynthèse. Il est donc complémentaire des tests de mise en évidence des adduits ou des cassures de l'ADN. Il peut être appliqué à de l'ADN plasmidique (système acellulaire) pour le screening d'agents génotoxiques ou à de l'ADN génomique (système cellulaire) [33].

➤ **Test d'Echanges de chromatides-sœurs (ECS)**

Ce test, plus récent, permet de détecter au niveau d'une cellule en métaphase des échanges réciproques d'ADN entre les deux chromatides-sœurs d'un même chromosome (Pillière & Falcy, 1991).

Les essais biologiques avec des procaryotes permettent la détection d'agents qui induisent de mutation génétique et dommages de l'ADN primaires.

### Test de mutagénicité « Le test d'Ames »

Les bactéries utilisées sont procurées du département de Biologie, université d'Afyon karahisar, turquie. Nous tenons à remercier vivement Dr Prof Muhsin Konuk d'avoir répondu à notre demande.

#### I-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 48h, 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 & Ames, 1983 ; De Meo et al., 1996).

##### I-1-1- Matériel biologique (Tab. 5)

Il s'agit des souches *salmonella typhimurium* TA98, TA100. Chacune des souches contient un type différent de mutation dans l'opéron Histidine.

En plus de la mutation **His** les souches standard du test contiennent d'autres mutations qui augmentent énormément leur habilité à détecter des mutagènes (Maron & Ames, 1983 ; De Meo et al., 1996).

- **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- GCGCGGC-, est révertée par les frameshift\_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 substituant de pairs 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 & Ames, 1983).

**Tableau 5. Différentes mutations des souches utilisées (Levin et al ., 1982 ; Maron & Ames, 1983).**

mutation Histidine			LPS	Réparation	R-factor
<i>hisC 3076</i>	<i>hisD 3052</i>	<i>hisG 46</i>			
TA1537	TA1538	TA1535	<i>rfa</i>	(Δ) <i>uvrB</i>	-R
	[TA98]	[TA100]	<i>rfa</i>	(Δ) <i>uvrB</i>	+R

\*Toutes les souches dérivent de la souche *Salmonella typhimurium LT<sub>2</sub>*.

\*[ ] les bactéries entre parenthèses sont celles les plus utilisées dans les tests de mutagenèse.

\*La délétion (Δ) *uvrB* inclue aussi les gènes de la nitrate réductase et de la biotine.

\*LPS : lipopolysaccharides.

### **I-1-2-Confirmation des génotypes**

Les génotypes des souches tests doivent être confirmés :

1. Immédiatement après les avoir reçus.
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 génotypes des souches tests est incluse dans chaque test de mutagenèse (Maron & Ames, 1983).

#### **I-1-2-1- La préculture de nuit**

A partir des souches conservées dans une gélose de conservation, on cultive 20µl dans 5ml de bouillon nutritif. L'incubation se fait à 37° avec agitation dans un bain mari (Salvis AG, CH-6015, type SBK 25D) pendant 16 heures.

#### **I-1-2-2- La culture de deux heures**

Le but de cette culture est d'arriver à la phase exponentielle de croissance c'est à dire  $2.10^9$  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 20µl quand dilue dans 5ml de bouillon nutritif. On les incube à nouveau à 37° pendant 2 heures avec agitation.

Les bactéries sont couvertes de papier Aluminium pour les protéger de la lumière (Maron & Ames, 1983).

#### **I-1-2-3- Le ré isolement 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 25µg/ml, incubé à 37° pendant 48h. les boîtes sont ensuite placées dans un réfrigérateur et servent comme source de bactéries pour des tests ultérieurs. Cette conservation dure jusqu'à 2 mois.

#### I-1-2-4- Le stockage des souches

Le stockage se fait dans des Eppendorf de 1,2ml, pour 1ml de la culture est mélangé 90µl de glycerol, la conservation se fait à -20°. Le mélange est à renouveler chaque 6mois.

#### I-1-2-5- la vérification des caractères

##### ▪ Réclamation de l’Histidine

La mutation *his-* 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 100µl 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.

##### ▪ 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 couvrir par une plaque en verre ensuite irradier par une lampe à UV à une distance de 30cm. L’incubation dura 24h à 37°. Pendant 8secondes: TA98<sup>R</sup> et TA100<sup>R</sup>.

##### ▪ 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 3disques de papier Wattman, chaque disque est déposé sur boite de gélose nutritive imbibé de 10µl 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.

### **I-1-3- Test de mutagenèse par la Méthode standard avec pré incubation**

#### **I-1-3-1- 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 48h, les révertants His<sup>+</sup> sont dénombrés (Maron & Ames, 1983 ; De Meo et al., 1996).

#### **I-1-3-2-Technique**

Dans des tubes en verre de 20ml, 100µl de la culture de nuit mis en contact avec 100µl de l'échantillon à tester placés en incubation à (37°, 20minutes) avec agitation dans le bain mari. Ensuite 2,5ml 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 48h à 37° (Maron & Ames, 1983 ; De Meo et al., 1996).

### **I-2- Analyse statistique**

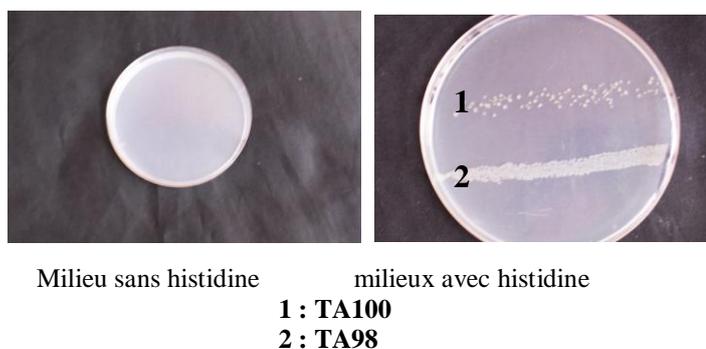
Le test U Mann-Whitney à  $p < 0.05$  avec la version 15 du logiciel SPSS.



### ❖ Vérification des caractères génétiques

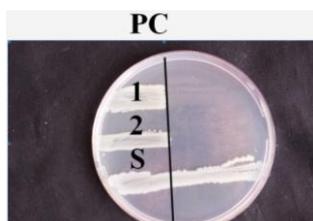
Les résultats de la vérification des caractères génétiques des bactéries pris après culture au bouillon nutritif réalisés antérieurement aux tests de mutagenicité sont comme suit :

➤ **Réclamation de l'histidine** : Après incubation on voit que les bactéries poussent sur les boîtes his/ bio et non sur les boîtes contenant de la biotine uniquement. Ce résultat confirme la présence de mutation His.



**Figure 20: La réclamation de l'histidine.**

### ➤ La sensibilité aux UV

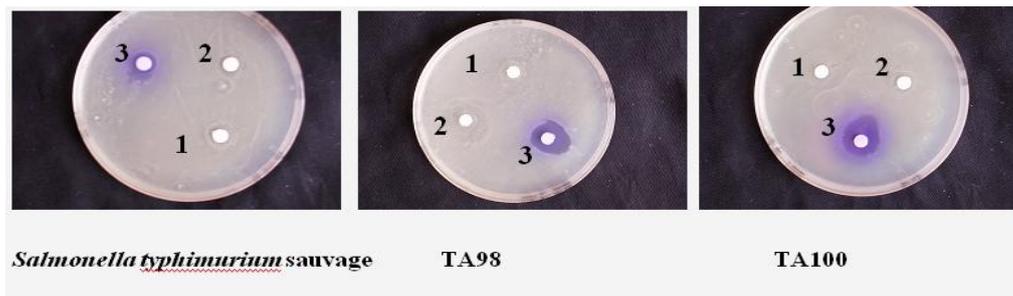


**PC : partie cachée**  
**S: souche sauvage**  
**1 : TA98**  
**2 :TA100**

**Figure 21 : L'effet des UV sur les souches d'Ames et la souche sauvage.**

Après incubation les bactéries mutées poussent uniquement dans la partie cachée tandis que la souche sauvage pousse tout au long de la boîte même dans la partie exposée au UV grâce à la possession du système de réparation par excision (uvrA, uvrB et uvrC) ce qui n'est pas le cas des autres souches du test d'Ames.

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



1 : H2O  
2 : Ampic  
3 : CV

**Figure 22: L'effet de l'Ampi 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  $rfa^-$  et du plasmide PKM101 qui porte le gène de résistance à l'Ampicilline.
- La souche sauvage possède le gène  $rfa^+$  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'Ampi.

❖ **Test de mutagenèse**

Les résultats du test d'Ames par préincubation sont représentés dans les tableaux 6 & 7.

L'analyse statistique par le test Mann-Whitney U test à  $p < 0.05$  montre que les résultats sont statistiquement très significatifs et dose dépendant ce qui confirme leur effet mutagène et génotoxique.

**Tableau 6. Mutagenicité du Chloroforme par *S. typhimurium* TA98 et TA100 sans activation métabolique.**

Agent	Amount (ppm/plat)	No of His <sup>+</sup> Revertants/plate Mean $\pm$ SD*	
		TA98	TA100
Chloroform	25	423 $\pm$ 17.69* <sup>m</sup>	240.33 $\pm$ 13.79* <sup>m</sup>
	50	1500 $\pm$ 28* <sup>m</sup>	1663.33 $\pm$ 104* <sup>m</sup>
	100	2249.33 $\pm$ 112.73* <sup>m</sup>	1951 $\pm$ 82.96* <sup>m</sup>
	200	2526 $\pm$ 127.38* <sup>m</sup>	2403.33 $\pm$ 74.84* <sup>m</sup>
Control		27 $\pm$ 3	109 $\pm$ 7.93
SA	10		1625.66 $\pm$ 119*
NPD	200	1396.66 $\pm$ 124.74*	

\* statistiquement significatif à  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U test), <sup>m</sup> : Mutagène, SD: deviation Standard, SA: Sodium azide, NPD: 4-nitro-o-phenyldiamine.

Le chloroforme est mutagène à toutes les concentrations testées avec les deux souches bactériennes, La souche *Salmonella typhimurium* TA98, qui détecte des mutations de type frameshift (Maron & Ames, 1983) et la *Salmonella typhimurium* TA100, qui détecte des mutations de type substitution de bases (Maron & Ames, 1983) ce qui explique sa classification par IARC en groupe (Group 2B, IARC, 1999b) comme carcinogène probable à l'homme pour son évidence de carcinogénicité sur les animaux.

**Tableau 7. Mutagenicité du Bromoforme avec *S. typhimurium* TA98 et TA100 sans activation métabolique.**

Agent	Amount (ppm/plat)	No of His <sup>+</sup> Revertants/plate Mean $\pm$ SD*	
		TA98	TA100
Bromoform	25	65.33 $\pm$ 11.15* <sup>m</sup>	110.66 $\pm$ 24.78
	50	67 $\pm$ 3.6* <sup>m</sup>	164.66 $\pm$ 6.5*
	75	96.66 $\pm$ 10.69* <sup>m</sup>	158 $\pm$ 9.53*
	100	593.33 $\pm$ 30.28* <sup>m</sup>	457.33 $\pm$ 35.07* <sup>m</sup>
Control		27 $\pm$ 3	109 $\pm$ 7.93
SA	10		1625.66 $\pm$ 119*
NPD	200	1396.66 $\pm$ 124.74*	

\* statistiquement significatif à  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U test), <sup>m</sup> : Mutagène, SD: deviation Standard, SA: Sodium azide, NPD: 4-nitro-o-phenyldiamine.

Quant au bromoforme qui est un sous produit de chloration bromé il n'est mutagène qu'à 100ppm ( $\mu\text{g/ml}$ ) avec la souche *Salmonella typhimurium* TA100 et mutagène à toutes concentrations testées avec la souche *Salmonella typhimurium* TA98 ce qui indique qu'il provoque beaucoup plus des mutations de type frameshift que des substitutions de base ce qui explique sa classification en groupe (Group 3, IARC,1999a) parce que son évidence chez les animaux est considéré limité et le bromoforme est considéré non classifiable pour sa carcinogénicité à l'homme (Komulainen, 2004).

Des études sur les sous produits de chloration et précisément les THMs ont montré que la TA100 sans activation métabolique est la plus sensible aux sous produits de désinfection (Kargalioglu et al., 2002).

Beaucoup de résultats d'études publiés sur la mutagénicité/ génotoxicité des eaux de surface utilisant *Salmonella typhimurium* TA 98 et /ou TA100 avec et sans activation métabolique ont montré que le pourcentage des échantillons positifs avec TA98 est 15% en absence et en présence d'activation métabolique et celui obtenu par TA100 est 7% en absence et en présence d'activation métabolique (Takeshi et al., 2004), donc l'activation métabolique n'a pas d'effet important vis-à-vis l'effet mutagène des sous produits de chloration dont le chloroforme et le bromoforme et que leur effet mutagène et génotoxique et en relation avec leur structure, le métabolisme des THMs n'est pas très bien élucidé (Kargalioglu et al., 2002).



La désinfection des eaux de consommation par chloration est la technique la plus utilisée vue les propriétés du chlore et la facilité d'emploi qui joue un rôle primordial dans la lutte contre les maladies à transmission hydrique quoique cette technique soit à l'origine de la formation de sous produits organochlorés. Certains de ces sous produits présentent une activité mutagène. Les plus abondants produits organochlorés et les plus fréquemment présents dans les eaux sont les trihalométhanes.

Les trihalométhanes sont les sous produits de chloration les plus étudiés, le chloroforme constitue le THM le plus abondant parmi ces sous produits. Le chloroforme et le bromoforme sont régulés par l'organisation mondiale de santé à 200µg/ml et 100µg/ml respectivement.

En Algérie la concentration des THM totaux dépassent les normes internationales (El attafia & Soraya, 2009) ce qui peut engendrer des effets néfastes de santé publique.

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 potable, pour évaluer l'activité mutagène des deux sous produits de chloration, le chloroforme et bromoforme, en utilisant les deux souches de *Salmonella typhimurium* TA 98 et TA100, sans activation métabolique (S9mix).

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

L'étude de la génotoxicité d'une eau de boisson constitue une approche nouvelle du problème de la contamination des eaux potables. L'introduction de la génotoxicité des eaux comme nouveau critère de qualité pour les eaux de boisson, en complément des critères physico-chimiques et microbiologiques déjà en vigueur, pourrait s'avérer profitable. Ainsi l'identification, la quantification et l'étude de la génotoxicité des agents potentiellement dangereux permettraient en outre de fixer les normes afin d'améliorer la sécurité du consommateur. Par ailleurs, il est important de rappeler que le risque microbiologique prime sur le risque génotoxique. En d'autres termes, l'ensemble des efforts visant à limiter la formation des agents génotoxiques, notamment en utilisant moins de chlore, ne doit jamais mettre en péril la parfaite désinfection de l'eau délivrée au consommateur.

1. Bielo, M., NDIEMI, V., 2011. Les sous produits de chloration de l'eau potable. Diplôme de master en biologie moléculaire des procaryotes. Université 08 Mai 1945(Guelma) ,61p.
2. Cazaunau, M., 2009.Oxydation atmosphérique hétérogène de HAP et de PBDE : cinétique, produits et génotoxicité. Grade de docteur en chimie analytique et environnement. Université Bordeaux 1, 222p.
3. De Meo, M., Laget, M., Giorgio, C. DI., Guiraud, H., Botta, A., Castegnaro, M., Dumenil, G., 1996. Optimization of the salmonella / mammalian microsome assay for urine mutagenesis by experimental designs. *Mutat*, 51-65.
4. Duvivier, L., Goffin, C., 2001. Impact de la monochloramine sur la formation des composés organo-halogénés, *tribune de l'eau*, 11-16.
5. El-Attafi, B., Soraya, M., 2010. Hyperchlorination of drinking tap water and bladder cancer in the region of Mostaganem (west Algeria), *J. Afr. Cancer* 2: 20-24 DOI 10.1007/s12558-010-0057-5.
6. Foltete, A. S., 2010. Effets génotoxiques et systèmes de détoxification chez *Vicia faba* (Fabaceae) dans le cadre de l'évaluation des sols pollués .Grade de docteur en Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes. Université Paul Verlaine – Metz, 189p.
7. Groupe scientifique sur l'eau Institut national de santé publique du Québec, Décembre 2002.Fiche Trihalométhanes.
8. Gruau, G., 2004. Les Sous Produits Chlorés dans les Eaux Destinées à l'Alimentation Humaine, Rapport d'étude remis à la DRASS Bretagne et la région Bretagne, 42p.
9. Gwenaelle, L., 2008. Mutagenèse et cancérogenèse, *Revue électronique internationale Web Journal*, 1-9.
10. Haddad, S., Reghis, F., Samsar, Z., 2010.Chloration des eaux potables et émergence des bactéries résistantes au chlore. Diplôme de master en biologie moléculaire des procaryotes. Université 08 Mai 1945(Guelma) ,73p.
11. Hofnung, M., Quillardet, P., 1983.Aspects des tests bactériens en toxicologie génétique, *INSERM*, 87-100.
12. Hrudey, S. E ., 2008.Les sous produits de la désinfection (SPD) par chloration dans l'eau potable et la santé publique au Canada, *Revue documentaire axé sur l'application des connaissances*, 1-195.

13. IARC, 1991. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to Humans, chlorination drinking water; chlorination by-products; some other halogenated compounds; cobalt and cobalt compounds*, Lyon, 213-242.
14. Jawich, D., 2006. Etude de la toxicité de pesticides vis-à-vis de deux genres de levures approche cinétique et moléculaire. Grade de docteur en Génie des procédés et de l'environnement. Université Saint Joseph(BEYROUTH), 134p.
15. Kargalioglu, Y., McMillan, B. J., Minear, R. A., Plewa, M. J., 2002. Analysis of the cytotoxicity and mutagenicity of drinking water disinfection by products in *Samonella typhimurium*. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 113-128.
16. Khallef, M., 2004. Evaluation de l'activité mutagène et génotoxique des eaux potables traitées par le chlore. Diplôme de magistraire en microbiologie appliquée. Université Badji Mokhtar(Annaba), 87p.
17. Komulainen, H., 2004. Experimental cancer studies of chlorinated by-products, *Toxicology* 198, 239-248.
18. Le Curieux, F., Erb, F., Marzin, D., 1998. Identification de composés génotoxiques dans les eaux de boisson, *Rev. Sci. Eau*, 103-118.
19. Les services techniques et médicaux de l'INRS, 2003, bromoforme.
20. LEVIN, E., YAMASAKI, E., AMES, B. N., 1982. A new salmonella tester strain, TA97, for detection of frame shift mutagens. *Mutat.* 315-330.
21. Maron, D., AMES, N., 1983. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutat.* 173-215.
22. Michel, C., 2011. Biomarqueurs de génotoxicité chez *Dreissena polymorpha* indicateurs de la pression chimique urbaine et variabilité naturelle des lésions de l'ADN. Grade de docteur en Géosciences et Ressources Naturelles. Université Pierre et Marie Curie, 192p.
23. Nicolas, V., 2003. Méthodes d'évaluation de l'exposition de la population française aux sous produits de la chloration de l'eau potable. Diplome d'ingénieur en génie sanitaire. Ecole nationale de la santé publique, 71p.
24. OECD, OCDE, 2010. Essai in vitro de micronoyaux sur cellules de mammifères, ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, 20p.

25. Paul, S., 2006. Etude de la chloration sur le réseau d'eau potable du syndicat d'Annonay – Serrières (07). Diplôme de licence professionnelle en Protection de l'environnement. Université Louis Pasteur (Strasbourg), 48p.
26. Pillière, F., Falcy, M., 1991. Exposition aux produits chimiques génotoxiques. Marqueurs biologiques pour la surveillance des salariés, INRS, 330-336.
27. Rondin, P. M., 1996. Chloration en milieu rural dans les pays en voie de développement, le pS-Eau, 95p.
28. Takeshi, O., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutation Research, Mutagens in surface waters, 109–149.
29. Vaillancourt, F., 2006. Guide de vérification du respect des normes sur les sous produits de désinfection à l'intention des installations ne désirant pas filtrer leurs eaux. Diplôme de maîtrise des sciences appliquées en génie civil. Université de Montréal, 149p.
30. Vincent, F., 1993. étude en génotoxicité de l'environnement marin, DEL - Laboratoire Ecotoxicologie, 58p.

## Sites internet

- [1]. Catherine JUERY. Définition des caractéristiques techniques de fonctionnement et domaine d'emploi des appareils de désinfection .Disponible sur : [www.fndae.fr/documentation-fndae02\\_v2](http://www.fndae.fr/documentation-fndae02_v2). (02/03/2013).
- [2]. Chloration de l'eau potable. Disponible sur : [www.itc.es/Technical\\_documents/Agua-marca-Fra](http://www.itc.es/Technical_documents/Agua-marca-Fra). (28/02/2013).
- [3]. L'osmose inverse .Disponible sur : <http://membres.multimania.fr/dessallement/osmose.htm>. (30/04/2013).
- [4]. Avantages et inconvénients des systèmes à osmose inverse purification de l'eau. Disponible sur : <http://fr.mustknowhow.com/qualite-de-leau/avantages-et-inconvenients-des-systemes-a-osmose-inverse-purification-de-leau>. (30/04/2013).
- [5]. Chlore désinfection et eau. Disponible sur : <http://www.conso.org/chloreeteau>. (03/03/2013).
- [6]. Les différentes méthodes de désinfection de l'eau. Disponible sur : <http://hmf.enseeiht.fr/travaux/CD0304/optsee/bei/5/binome5/avapro/avapro4.htm>. (09/04/2013).
- [7]. Qu'est-ce que la chloration? . Disponible sur : [www.safewater.org/knowthefacts/Chloration](http://www.safewater.org/knowthefacts/Chloration). (09/04/2013).
- [8]. Le traitement de l'eau par chloration. Disponible sur : <http://www.wikiwater.fr/e18-le-traitement-de-l-eau-par.html>. (10/04/2013).
- [9].Le chlore. Disponible sur : [http://dialyse-infos.fr/crbst\\_307.html](http://dialyse-infos.fr/crbst_307.html). (12/04/2013).
- [10]. Désinfectants: le chlore. Disponible sur : <http://www.lenntech.fr/désinfectant/le-chlore.htm>. (03/04/2013).
- [11]. Paramètres physico-chimiques influençant l'efficacité de la désinfection par chloration. Disponible sur : <http://hmf.enseeiht.fr/travaux/CD0304/optsee/bei/5/binome5/genechlo.htm>. (03/04/2013).
- [12]. Les différents types de sous-produits de la désinfection. Disponible sur : <http://www.lenntech.fr/procedes/desinfection/sous-produits/desinfection/desinfectants-sous-produits-types.htm>. (07/04/2013).

[13]. la qualité de l'eau potable. Disponible sur : [www.cwwa.ca/freepub\\_9thabstracts\\_f](http://www.cwwa.ca/freepub_9thabstracts_f). (20/03/2013).

[14]. Définition: TCA. Disponible sur : <http://www.cavesa.ch/definition/tca,4620.html>. (20/04/2013).

[15]. Chloroforme. Disponible sur : [www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no\\_produit=2659](http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=2659). (06/03/2013).

[16]. Céline DEGREMONT & Jérôme CACHOT. La génotoxicité. Disponible sur : [www.seine-aval.crihan.fr/web/attached\\_file/componentId/kmelia106](http://www.seine-aval.crihan.fr/web/attached_file/componentId/kmelia106). (10/04/2013).

[17]. David M. DEMARINI & James HUFF. L'évaluation de la toxicité génétique. Disponible sur : [http://www.ilo.org/safework\\_bookshelf/french?content&nd=857170397](http://www.ilo.org/safework_bookshelf/french?content&nd=857170397). (10/04/2013).

[18]. Mutations. Disponible sur : [www.dfglfa.net/dfg/info/lib/exe/fetch.php?media=biologie:mutations](http://www.dfglfa.net/dfg/info/lib/exe/fetch.php?media=biologie:mutations). (15/03/2012).

[19]. Test d'Ames. Disponible sur : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Test\\_d%27Ames](http://fr.wikipedia.org/wiki/Test_d%27Ames). (04/03/2013).

[20]. Le test d'Ames pour évaluer le pouvoir cancérogène d'une substance. Disponible sur : <http://www.technobio.fr/article-le-test-d-ames-43438456.html>. (04/03/2013).

[21]. test d'Ames. Disponible sur : <http://www.sigentec.com/html/fr/tests/ames.html>. (04/03/2013).

[22]. Introduction à la Toxicologie génétique Bactérienne Mutation Test - Test d'Ames. Disponiblesur : [http://translate.googleusercontent.com/translate\\_c?depth=1&hl=fr&prev=/search%3Fq%3Dtest%27](http://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=fr&prev=/search%3Fq%3Dtest%27). (05/03/2013).

[23]. Ames test for mutagenicity. Disponible sur : [http://www.mun.ca/biology/scarr/Bio4241\\_Ames\\_Test\\_2.html](http://www.mun.ca/biology/scarr/Bio4241_Ames_Test_2.html). (05/03/2013).

[24]. J.P. EUZEEBY. Mutations bactériennes. Disponible sur : <http://www.bacteriologie.net/generale/mutations.html>. (10/03/2013).

[25]. SOS Chromotest. Disponible sur : <http://www.ebpi-kits.com/SOS-ChromoTest.html>. (10/04/2013).

[26]. Utilisation de trois tests de génotoxicité pour l'étude de l'activité génotoxique de composés organohalogénés, d'acides fulviques chlorés et d'échantillons d'eau (non concentrés) en cours de traitement de potabilisation. Disponible sur : <http://www.erudit.org/revue/rseau/1996/v9/n1/705243ar.html?vue=resume>. (11/04/2013).

[27]. Le test des comètes. Disponible sur : <http://www.technobio.fr/article-le-test-des-cometes-44649012.html>. (11/04/2013).

[28]. Test de comètes sur différents types cellulaires. Disponible sur : <http://www.sigentec.com/html/fr/tests/cometes.html>. (11/04/2013).

[29]. Les biomarqueurs recommandés pour le programme de biosurveillance du MED POL. Disponible sur : [195.97.36.231/dbases/MTSReports\(Word\)/121/Appendice.III.fre.doc](195.97.36.231/dbases/MTSReports(Word)/121/Appendice.III.fre.doc). (02/04/2013).

[30]. Test du micronoyau. Disponible sur : [http://en.wikipedia.org/wiki/Micronucleus\\_test](http://en.wikipedia.org/wiki/Micronucleus_test). (15/04/2013).

[31]. tests micronoyaux. Disponible sur : [http://forumeducation.mnhn.fr/index.php?p=topic&t\\_id=116&sid=d83a11dbcf347b61d961bbc95b6377a4](http://forumeducation.mnhn.fr/index.php?p=topic&t_id=116&sid=d83a11dbcf347b61d961bbc95b6377a4). (15/04/2013).

[32]. Génotoxicité: test du micronoyau. Disponible sur : [http://cdfc00.ugent.be/HealthRisk/genotoxicitytests/micronucleus\\_test.htm](http://cdfc00.ugent.be/HealthRisk/genotoxicitytests/micronucleus_test.htm). (15/04/2013).

[33]. Santé et sécurité au travail en PACA. Disponible sur : [http://prevention.pharmacie.univ-mrs.fr/sante\\_travail/risque\\_nuisance/toxico\\_generale/reflexion/annexes\\_reflexions.html](http://prevention.pharmacie.univ-mrs.fr/sante_travail/risque_nuisance/toxico_generale/reflexion/annexes_reflexions.html). (21/04/2013).

[34]. Génotoxicité de la doxorubicine et du cisplatine : recherche d'un témoin positif pour le test des micronoyaux. Disponible sur : <http://www.jle.com/e-docs/00/00/C6/0F/article.phtml>. (15/04/2012).

[35]. Méthodes de détermination de la toxicité et des autres effets sur la santé. Disponible sur : [ec.europa.eu/environment/archives/dansub/annex5b\\_fr](ec.europa.eu/environment/archives/dansub/annex5b_fr). (18/04/2013).

[36]. Génotoxicité: aberrations chromosomiques essai. Disponible sur : [http://www.crios.be/genotoxicitytests/chromosome\\_aberrations.htm](http://www.crios.be/genotoxicitytests/chromosome_aberrations.htm). (23/04/2013).

[37]. Catherine TURLEAU & Marguerite PRIEUR. Types, fréquences et mécanismes de formation des anomalies chromosomiques. Disponible sur : <http://college-genetique.igh.cnrs.fr/Enseignement/genchrom/alieschrom.html>. (25/04/2013).









## Liste des annexes

<b>Annexes</b>	<b>Intitulés</b>	<b>Pages</b>
<b>1</b>	Différents micro-organismes responsables de maladies hydriques	I
<b>2</b>	Les classes des SPC	II
<b>3</b>	Classification de la cancérogénicité des SPC	III
<b>4</b>	Principales caractéristiques génétiques des quatre souches pour le Mutatest	III
<b>5</b>	Solution Histidine / Biotine	IV
<b>6</b>	Top agar	IV
<b>7</b>	Solution d'ampicilline à 10mg/ ml	IV
<b>8</b>	Solution de cristal violet (0,1%)	V
<b>9</b>	Milieu minimal agar	V
<b>10</b>	Milieu Vogel-Bonner E (50x)	VI
<b>11</b>	Milieu Histidine/ biotine	VI

## Annexe n°1 .Différents micro-organismes responsables de maladies hydriques.

Organisme	Maladies	Origine
<p><b><u>Bactéries</u></b> (pouvant se reproduire dans l'eau ou la nourriture)</p>	<p>Fièvre typhoïde Choléra Gastroentérite Pathogènes opportunistes</p>	<p>Salmonella typhi Salmonella paratyphi Vibrion Choléra E. Coli pathogène (0157) Shigella Campilobacter Yersinia Entérocolitica Aéromonas hydrophyla Pseudomonas aéruginosas Légionelles</p>
<p><b><u>Virus</u></b> (ne peuvent pas se reproduire dans l'eau)</p>	<p>Hépatite Gastroentérites</p>	<p>Hépatite A – E Rotavirus Echovirus Coxakivirus Agent de Norwalk</p>
<p><b><u>Parasite</u></b> (Le passage chez l'homme nécessite un cycle d'évolution)</p>	<p>Gastroentérite Pathogène opportuniste</p>	<p>Cryptosporidium parvum Giardia Loubliia Microsporidium</p>

## Annexe n°2. Les classes des SPC.

Classes de SPD	Les différents SPD	Formules chimiques
<b>Trihalométhanes</b> <i>THM</i> (groupe des THM : THM4)	Chloroforme	CHCl <sub>3</sub>
	Bromodichlorométhane	CHCl <sub>2</sub> Br
	Dibromochlorométhane	CHClBr <sub>2</sub>
	Bromoforme	CHBr <sub>3</sub>
<b>Acides haloacétiques</b> <i>AHA</i> (groupe des AHA : AHA9)	Acide chloroacétique	CH <sub>2</sub> ClCOOH
	Acide dichloroacétique	CHCl <sub>2</sub> COOH
	Acide trichloroacétique	CCl <sub>3</sub> COOH
	Acide bromochloroacétique	CHBrClCOOH
	Acide bromodichloroacétique	CBrCl <sub>2</sub> COOH
	Acide dibromochloroacétique	CBr <sub>2</sub> ClCOOH
	Acide bromoacétique	CH <sub>2</sub> BrCOOH
	Acide dibromoacétique	CHBr <sub>2</sub> COOH
	Acide tribromoacétique	CBr <sub>3</sub> COOH
<b>Haloacétonitriles</b> <i>HAN</i>	Trichloroacétonitrile	CCl <sub>3</sub> CN
	Dichloroacétonitrile	CHCl <sub>2</sub> CN
	Bromochloroacétonitrile	CHBrClCN
	Dibromoacétonitrile	CHBr <sub>2</sub> CN
<b>Halocétones</b> <i>HCé</i>	1,1-Dichloroacétone	CHCl <sub>2</sub> COCH <sub>3</sub>
	1,1,1-Trichloroacétone	CCl <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>
<b>Divers</b> Composés organochlorés	Hydrate de chloral	CCl <sub>3</sub> CH(OH) <sub>2</sub>
	Chloropicrine	CCl <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>
<b>Cyanogènes halogénés</b>	Chlorure de cyanogène	ClCN
	Bromure de cyanogène	BrCN
<b>Oxyhalides</b>	Chlorite	ClO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
	Chlorate	ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	Bromate	BrO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<b>Aldéhydes</b> (aldéhydes odorants)	Formaldéhyde <sup>1</sup>	HCHO
	Acétaldéhyde <sup>2</sup>	CH <sub>3</sub> CHO
	Ethanedial (glyoxal)	OHCCHO
	Méthylglyoxal	CH <sub>3</sub> COCHO
	Isobutyraldéhyde <sup>3</sup>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCHO
	Isovaléraldéhyde <sup>4</sup>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> CHO
	2-méthylbutyraldéhyde <sup>5</sup>	(CH <sub>3</sub> )(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )CHCHO
Phénylacétaldéhyde <sup>6</sup>	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )CH <sub>2</sub> CHO	
<b>Aldocétoacides</b>	Acide glyoxalique	OHCCHO
	Acide pyruvique	CH <sub>3</sub> COCOOH
	Acide cétomalonique	HOCCOCOOH
<b>Acides carboxyliques</b>	Formate	HCOO <sup>-</sup>
	Acétate	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>
	Oxalate	OCCOO <sup>-2</sup>
<b>Acides maléiques</b>	Acide 2- <i>tert</i> -butylmaléique	HOCC(C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ):CHCOOH
<b>Chlorophénols</b> <i>CPh</i> (odorants)	Chlorophénol	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Cl
	Dichlorophénols	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>
	Trichlorophénols	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub>
<b>Chloroanisoles</b> (odorants)	Trichloroanisoles <sup>7</sup>	CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub>

<sup>1</sup>Issu de la glycine<sup>2</sup>Issu de l'alanine<sup>3</sup>Issu de la valine, selon Hrudey et al. (1988)<sup>4</sup>Issu de la leucine, selon Hrudey et al. (1988)<sup>5</sup>Issu de l'isoleucine, selon Hrudey et al. (1988)<sup>6</sup>Issu de la phénylalanine, selon Hrudey et al. (1988)<sup>7</sup>Issus de la biotransformation des trichlorophénols

## Annexe n°3. Classification de la cancérogénicité des SPC.

Substances	IARC	US EPA
<b>Trihalométhanes</b>		
Chloroforme	2B	B2
Bromodichlorométhane	2B	B2
Dibromochlorométhane	3	C
Bromoforme	3	B2
<b>Acides haloacétiques</b>		
Acide dichloroacétique	3	B2
Acide trichloroacétique	3	C
<b>Haloacétonitriles</b>		
Dichloroacétonitrile	3	
Bromochloroacétonitrile	3	
<b>Halohydroxyfuranones</b>		
3-chloro-4-dichlorométhyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX)	2B	

## Annexe n°4. Principales caractéristiques génétiques des quatre souches pour le Mutatest.

strain	his	uvrB	mutation	context	reversion
TA97	D6610	-	+4	GTC ACC CCT GAA CAG TGG GGA CTT ↓ CACC GTGG n.s. GTC ACA CCC CCC TGA CAG TGT GGG GGG ACT	1 (±3n)
TA98	D3052	-	-1	near GCGCGCGC CGCGCGCG	1 (±3n)
TA100	G46	-	A T ↓ G C	GAG leu CTC ↓ GGG pro CCC	G C ↓
TA102	G426	+	G C ↓ A T	CAA GTT ↓ TAA n.s. ATT	A T ↓

**Annexe n°5. Solution Histidine / Biotine.**

Utilisée dans le Test de mutagenèse

D-Biotine.....	30,9 mg
L-histidine-HCl.....	24,0mg
H2O distillée.....	250 ml

**Annexe n°6. Top agar.**

Utilisé dans le Test de mutagenèse

Agar.....	6g
Chloride de sodium (NaCl).....	5g
H2O distillée.....	1000 ml

**Annexe n°7. Solution d'ampicilline à 10mg/ ml.**

Utilisée dans le Test de résistance à l'ampicilline

Ampicilline trihydraté.....	1g
H2O distillée.....	100ml

**Annexe n°8. Solution de cristal violet (0,1%).**

Utilisé dans le Test de sensibilité au cristal violet

Cristal violet.....	0,1g
H2O distillée.....	100ml

**Annexe n°9 .Milieu minimal agar.**

Utilisé dans le Test de mutagenèse

Agar .....	15g
H2O distillée.....	930ml
50X VB sels.....	20ml
20% Glucose.....	50ml

**Note:** 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°10. Milieu Vogel-Bonner E (50x).**

Utiliser dans le milieu minimal agar

Sulfate de magnésium ( $MgSO_4, 7H_2O$ ).....	10g
Acide citrique.....	100g
Phosphate de potassium dibasique( $K_2HPO_4$ ).....	500g
Sodium ammonium phosphate( $NaH_2NH_4PO_4, 4H_2O$ ).....	175g
H <sub>2</sub> O distillée.....	670ml

**Annexe n°11. Milieu Histidine/ biotine.**

Utilisé dans le Test de Réclamation de l'Histidine

Agar .....	15g
H <sub>2</sub> O distillée.....	914ml
50X VB sels.....	20ml
20% Glucose.....	50ml
Stérile histidine-HCl-H <sub>2</sub> O.....	100mg
(2g / 400 ml H <sub>2</sub> O)	
Stérile 0,5 mMBiotine.....	6mg



## Résumé

L'effet mutagène du chlorofome et du bromoforme, deux sous produits abondant des eaux potables chlorées de la classe des trihalométhane qui constituent la fraction volatile de l'ensemble des sous produits de chloration a été évalué par le test d'Ames. Les souches de *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100 utilisées par le test d'Ames qui détectent des mutations de type Frameshift et des reversion

GC →AT respectivement mélangés à différentes concentrations croissantes de chloroforme et de bromoforme, à l'eau distillée comme témoin négatif et au sodium azide (SA) et au 4-nitro-o-phenyldiamine (NPD) comme témoin positif pour TA 98 et TA100 respectivement. Tous les résultats obtenus ont été soumis à l'analyse statistique par le test U Mann-Whitney à  $p < 0.05$  en utilisant le logiciel SPSS 15.0 de Windows Software. Le nombre de révertants a augmenté pour toutes les concentrations testées pour les deux produits (dose dépendant). Le chloroforme s'est montré mutagène à toutes les concentrations avec les deux souches ce qui montre qu'il est un mutagène potentiel qui induit des mutations frameshift et des réversions. Le bromoforme s'est montré moins potentiel que le chloroforme il est mutagène à toutes les concentrations avec la TA98 provoque des mutations de type frameshift mais il n'est pas mutagène avec la TA 100 qu'à 100 µg/ml.

Mots clés: effet mutagène, Test d'Ames, chloration, chloroforme, bromoforme.

## abstract

The mutagenic effect of chlorofome and bromoform, two abundant disinfection by products of chlorination class of trihalomethanes that constitute the volatile fraction of all chlorination by products was evaluated by Ames test. The *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100 used by the Ames test that detects Frameshift mutations and reversion GC → AT respectively mixed with different increasing concentrations of chloroform and bromoform, with distilled water as a negative control and sodium azide (SA) and 4-nitro-o-phenyldiamine (NPD) as a positive control for TA98 and TA100, respectively. All results were subjected to statistical analysis by the Mann-Whitney U test at  $p < 0.05$  using SPSS 15.0 for Windows Software. The number of revertants increased for all concentrations tested for both products (depending on dose). Chloroform was mutagenic at all concentrations with the two strains showing that it is a potential mutagen that induces frameshift mutations and reversion. Bromoform was less potential than chloroform at all concentrations, with TA98 causes frameshift mutations type but it is not mutagenic with TA 100 only at 100 µg /ml.

Keywords: mutagenic effect, Ames test, chlorination, chloroform, bromoform.

## المخلص

أثار الطفرات الجينية التي يسببها الكلوروفورم و البروموفورم المتواجدان بكثرة في مياه الشرب المعقمة بالكلور و ينتميان الى فئة مركبات ثلاثي هالو الميثان التي تشكل الجزء المتبخر من مجموع المنتجات الفرعية للكلورة قيمت باستخدام اختبار Ames . سلالات *Salmonella typhimurium* التي يستخدمها اختبار Ames الذي يكشف الطفرات من نوع انزياح إطار القراءة والارتداد AT → GC على التوالي مختلطة مع زيادة تركيزات مختلفة من الكلوروفورم و البروموفورم و مع الماء المقطر كشاهد سلبي و (SA) و (NPD) كشاهد إيجابي ل TA98 و TA100، على التوالي. تعرضت جميع النتائج للتحليل الإحصائي من قبل اختبار Mann-Whitney U في مجال  $P < 0.05$  باستخدام SPSS 15.0 للبرمجيات. ارتفع عدد السلالات المرتهدة لجميع التركيزات المراد اختبارها لكلا العنصرين (تعتمد على الجرعة). و سبب الكلوروفورم طفرات في جميع التركيزات مع السلالتين مما يبين أنه مطفر قوي ل طفرات انزياح إطار القراءة والارتدادات . ثلاثي برومو الميثان أقل قوة من الكلوروفورم و هو مسبب ل طفرات جينية في جميع التركيزات مع TA98 من نوع انزياح إطار القراءة ولكنه ليس مطفر مع TA 100 الا مع التركيز 100 ميكروغرام / مل.

الكلمات المفتاحية: آثار الطفرات الجينية، اختبار Ames، الكلورة، الكلوروفورم، ثلاثي برومو الميثان.

