

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

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



12/605

590.287

## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Biologie

Spécialité/Option : Microbiologie d l'environnement (Santé, eau, environnement)

---

**Thème : Evaluation des risques écotoxicologiques des effluents hospitaliers «Hôpital de Bouchegouf» Sur *Saccharomyces cerevisiae***

---

**Présenté par :** ATAILIA Marwa

BOUSENA Radhia

**Devant le jury composé de :**

Président : Mme. SOUIKI Linda (M.C.A)  
Examineur : M. MERZOUG Abd Elghani (M.A.A)  
Examinatrice : Melle. HAMDY KANE Malika (M.A.A)  
Encadreur : M. DJEKOUN Mohamed (M.C.B)

Juin 2012

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

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



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Biologie

Spécialité/Option : Microbiologie d l'environnement (Santé,eau, environnement)

---

**Thème : Evaluation des risques écotoxicologiques des effluents hospitaliers «Hôpital de Bouchegouf» Sur *Saccharomyces cerevisiae***

---

Présenté par : ATAILIA Marwa

BOUSENA Radhia

Devant le jury composé de :

Président : Mme. SOUIKI Linda (M.C.A)  
Examineur : M. MERZOUG Abd Elghani (M.A.A)  
Examinatrice : Melle. HAMDJ KANE Malika (M.A.A)  
Encadreur : M. DJEKOUN Mohamed (M.C.B)

Juin 2012

## REMERCIEMENTS

*Nous remercions Dieu le tout puissant ; pour nous avoir aidé à achever ce travail et nous permettre ici d'exprimer notre gratitude la plus sincère à tous ce qui ont ménagé leur efforts pour nous apporter une aide fructueuse pour réaliser ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier vivement monsieur Djekoun Mohamed pour son soutien continu et sa patience en cours de la réalisation pratique et théorique de ce travail.*

*Nos remerciements vont également à la commission d'examen :*

*Madame Souiki Linda*

*De nous avoir honoré de sa présence et d'avoir accepté de présider le jury.*

*Monsieur Merzoug Abed Elghani et Madame Hamdi Khane Malika*

*De nous avoir fait l'honneur de participer à l'évaluation de ce mémoire.*

*Nous remercions tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin dans la réalisation de travail et exceptionnellement nos familles et nos enseignants.*

*Ainsi que tout le personnel du département de biologie de l'université de*

*08 Mai 1945 (Guelma)*

**MERCI**

# SOMMAIRE

<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Introduction</b>	
<b>Chapitre I : <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	
1. La levure modèle de cellule eucaryote	1
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
2.1. Définition	1
2.2. Classification scientifique	2
2.3. Caractéristiques	2
2.4. Cycle biologique	5
2.4.1. Reproduction asexuée	5
2.4.2. Reproduction sexuée	7
2.5. Condition de croissance	7
2.6. Métabolisme	8
2.6.1. Métabolisme oxydatif	8
2.6.2. Métabolisme fermentaire	9
2.6.3. Effet glucose	9
2.6.4. Effet pasteur	10
2.6.5. Effet Crabtree	10
3. Intérêt biologique	11

4. Biomarqueur .....	11
5. Bioindicateur .....	12
5.1. Propriétés d'un bioindicateur.....	12

## **Chapitre II : Les effluents hospitaliers**

1. Contexte .....	13
2. Typologie des effluents liquides hospitaliers .....	13
3. Caractérisation des effluents hospitaliers .....	15
3.1. Caractéristiques microbiologiques .....	15
3.2. Caractéristiques des rejets médicamenteux .....	16
3.3. Caractéristiques physico-chimiques .....	17
4. Substances suspectées d'être à l'origine de l'écotoxicité des effluents hospitaliers .....	18
4.1. Les détergents .....	18
4.2. Les désinfectants .....	18
4.2.1. les désinfectants couramment utilisés.....	19
4.2.2 les désinfectants utilisés de façon restreinte on peut citer.....	19
5. Impacts écotoxicologiques des résidus médicamenteux .....	20
6. Effets des médicaments sur les organismes aquatiques .....	21
7. Le risque infectieux présenté par les effluents hospitaliers .....	21

## **Chapitre III : Matériel et méthode**

1 Description du site .....	22
2. Matériel .....	22
2.1. Les prélèvements .....	22

2.2. Matériel biologique (bio indicateur) .....	24
3. Les tests .....	24
4. Paramètres Physiologiques mesurés .....	25
4.1. La culture des Levures .....	25
4.1.1. Lavage des Levures.....	25
4.1.2. La mise en culture cellulaire.....	26
4.2. Tests de cytotoxicité .....	26
4.2.1. Cinétique de la croissance.....	26
4.2.2. Test de viabilité.....	27
5. Paramètres biochimiques .....	27
5.1. Dosage des Protéines totales .....	27
5.2. Dosage des glucides totaux .....	28
5.3. Dosage de l'activité Catalase.....	29
6. Analyse statistique.....	30

## Chapitre IV : Résultats et discussion.

1. Etude de la viabilité cellulaire .....	31
2. Étude de la Croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	31
2.1. Effet des effluents hospitaliers sur la croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	32
3. Taux des Protéines totales .....	33
3.1. Effet des différents prélèvements sur le taux des protéines totales .....	33
4. Taux des glucides totaux .....	34

4.1. Effet des différents prélèvements sur le taux des glucides totaux .....	34
5. L'activité catalase .....	35
4.1. Effet des différents prélèvements sur l'activité catalase (CAT) .....	35
Discussion .....	35
<b>Conclusion et perspective</b>	
<b>Références bibliographique</b>	
<b>Annexe</b>	
<b>Résumé</b>	

Produced with ScanTOPDF

## Liste des abréviations

<i>Abréviation</i>	<i>Mots correspondants</i>
<b>AFNOR</b>	Association Française de Normalisation
<b>AOX</b>	Composés organohalogénés adsorbables sur charbon actif
<b>CE 50</b>	Concentration Efficace 50 %. Concentration en polluant qui cause un effet toxique donné chez 50 % des individus exposés après un temps d'exposition normalisé
<b>COT</b>	Carbone Organique Total
<b>DCO</b>	Demande Chimique en Oxygène
<b>DBO5</b>	Demande Biochimique en Oxygène après incubation durant 5 jours à 20°C
<b>ETS</b>	Etablissement de santé
<b>EPA</b>	Environmental Protection Agency
<b>MEST</b>	Matière en suspension
<b>OMS</b>	L'Organisation mondiale de la santé
<b>PFE</b>	Projet fin d'étude
<b>SIDA</b>	Syndrome Immunitaire de Déficience Acquise
<b>STEP</b>	Station d'épuration
<b>VII</b>	Virus d'Immunodéficience Humaine



## Liste des figures

Figure	Titre	page
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	02
2	Caractéristiques principales du <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	04
3	Le cycle biologique de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	05
4	Le bourgeonnement	06
5	Les différentes étapes du cycle cellulaire mettant en avant les changements de forme de la levure au cours de bourgeonnement	06
6	Le circuit d'élimination des médicaments.	
7	Carte montrant la distribution des 3 sites des prélèvements	
8. a	<b>Site 1</b> « l'eau de l'oued Seybouse »	
8. b	<b>Site 2</b> « l'égout principal de l'hôpital »	
8. c	<b>Site 3</b> « le point de contact oued-égout »	
9	Lavage de levure par agitation.	
10	Principe de dosage des glucides totaux	
11	Exemple de coloration au bleu de méthylène.	
12	L'effet des EH sur la cinétique de croissance de <i>Saccharomyces</i>	
13	L'effet des EH sur le taux des protéines totales de <i>saccharomyces cerevisiae</i> .	
14	L'effet des EH sur le taux des glucides totales des de <i>saccharomyces cerevisiae</i> .	
15	L'effet des EH sur l'activité catalase de <i>saccharomyces cerevisiae</i> .	

## Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Types de rejets et produits utilisés à nature domestique ou industrielle pour un hôpital.	
2	Types de rejets et produits utilisés de nature spécifique à un hôpital.	
3	Toxicité des médicaments sur les organismes aquatiques.	

Produced with ScanTOPDF

# INTRODUCTION

Produced by Scantopdf

## Introduction

L'environnement est "la clé d'une meilleure santé", déclare l'OMS (L'Organisation mondiale de la santé), à la Conférence ministérielle "santé et environnement" à Londres en juin 1999. Elle inclut dans le terme Environnement des paramètres physiques liés aux milieux (pollution de l'eau, impact des déchets...) et à l'ensemble des activités humaines (air ambiant, accidents domestiques, violences urbaines...).

Les activités de services médicaux, vaccinations, recherches médicales incluant les essais diagnostiques, traitements médicaux et examens de laboratoire par exemple, protègent, rétablissent la santé et sauvent des vies (OMS, 2000). En dépit de leur caractère humanitaire, elles n'échappent pas, elles non plus, au double processus «d'appropriation-désappropriation» qui caractérise toute activité technique (Blanc, 1999). La production de biens et de services de santé nécessite la mobilisation de ressources naturelles. Comme c'est le cas pour toutes les activités qui mettent en œuvre de la matière, celles relevant du domaine de la santé sont également génératrices de pollution et de transfert vers les milieux naturels. D'une façon générale, les hôpitaux agissent à deux niveaux sur les écosystèmes aquatiques. Ils ont une demande en eau potable importante. Parallèlement, ils produisent des effluents liquides, pollués par des microorganismes pathogènes, par des radioéléments et par des substances chimiques dont certaines peuvent avoir un caractère peu biodégradable.

La consommation minimale d'eau domestique est de 100 litres par habitant et par jour (Gadelle, 1995), alors que la valeur généralement admise pour les hôpitaux varie de 400 à 1200 litres par lit et par jour.

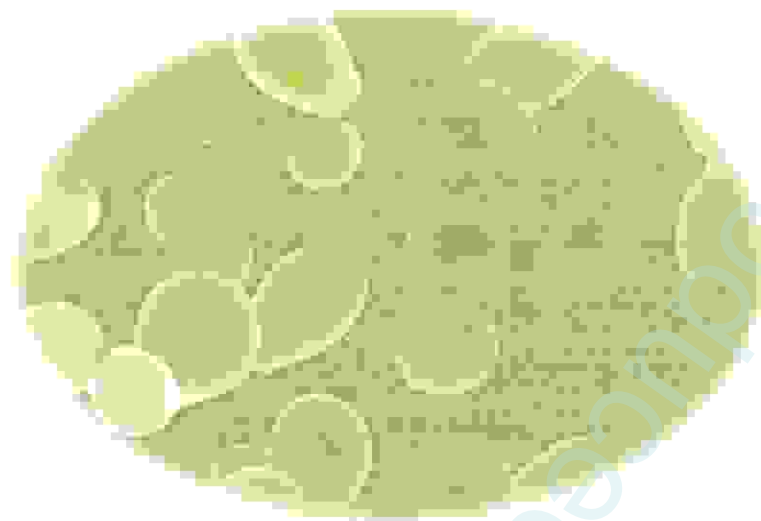
A côté de cette demande élevée d'eau potable, se rajoutent des besoins en eaux spécifiques telles que l'eau physiologique ou stérilisée et les sérums. Cette importante consommation en eau des hôpitaux donne naissance à de grands volumes de rejets liquides chargés de microorganismes pathogènes, dont certains sont multirésistants aux antibiotiques, de substances chimiques toxiques et des radioisotopes (Leprat, 1998). Bien que la consommation élevée en eau des centres hospitaliers puisse assurer une dilution importante des charges organiques et inorganiques des effluents des différents services, leur rejet dans le réseau d'assainissement communal ou dans le milieu naturel n'est pas exempt de risques pour les espèces vivantes qui seront exposées aux substances dangereuses contenues dans ces effluents.

Les objectifs du présent PFE sont de trois ordres : scientifiques, méthodologiques et d'amélioration de gestion.

- **Les objectifs scientifiques** visent à améliorer les connaissances sur les effets des effluents hospitaliers vis-à-vis des écosystèmes aquatiques :
- **Les objectifs méthodologiques** visent à contribuer à l'amélioration des méthodologies d'évaluation des risques écotoxicologiques et plus particulièrement de la phase "caractérisation des effets" ; ceci d'un point de vue général et pour le scénario spécifique de « rejet des effluents hospitaliers dans le réseau des eaux usées en direction du cours d'eau récepteur ».
- **Les objectifs d'amélioration de gestion** visent à exploiter les résultats de ce PFE en fournissant des recommandations aux acteurs en charge de la gestion des effluents hospitaliers (responsables des hôpitaux, collectivités locales et services de l'État en charge du contrôle des effluents).

Dans cette optique nous avons structuré notre travail de la manière suivante :

- ⊕ Le chapitre I est consacré à l'étude de la biologie de *Saccharomyces cerevisiae*.
- ⊕ Le chapitre II présente une étude bibliographique sur les effluents hospitaliers. *L'objectif de cette partie est de synthétiser les informations sur la typologie, les caractéristiques biologiques, physicochimiques, toxicologiques et écotoxicologiques et des molécules susceptibles d'être à l'origine du potentiel écotoxique des rejets provenant des établissements de la santé.*
- ⊕ Le chapitre III aborde le matériel et les méthodes utilisés tout au long de ce travail.
- ⊕ Le chapitre IV traite les résultats, discussions et perspectives.



# CHAPITRE I

## *Saccharomyces cerevisiae*

## 1. La levure modèle de cellule eucaryote :

Les levures sont des champignons unicellulaires et présentent donc une structure cellulaire eucaryote. Leur seule caractéristique commune est l'état unicellulaire bien que de nombreuses levures soient aussi capables de faire dans certaines conditions un pseudomycélium comme le genre *Brettanomyces*, voire un véritable mycélium comme *Candida albicans* (Didier, 1996).

La levure est un organisme modèle chez lequel de nombreux processus cellulaires et moléculaires communs à toutes les cellules ont été élucidés.

Egalement l'état unicellulaire, la capacité à se multiplier rapidement et la rusticité des exigences nutritionnelles confèrent à ces eucaryotes des qualités qui permettent de les cultiver, de les étudier et de les utiliser aussi facilement que des microorganismes procaryotes cependant, les plus communément utilisés *Saccharomyces cerevisiae* (Didier, 1996).

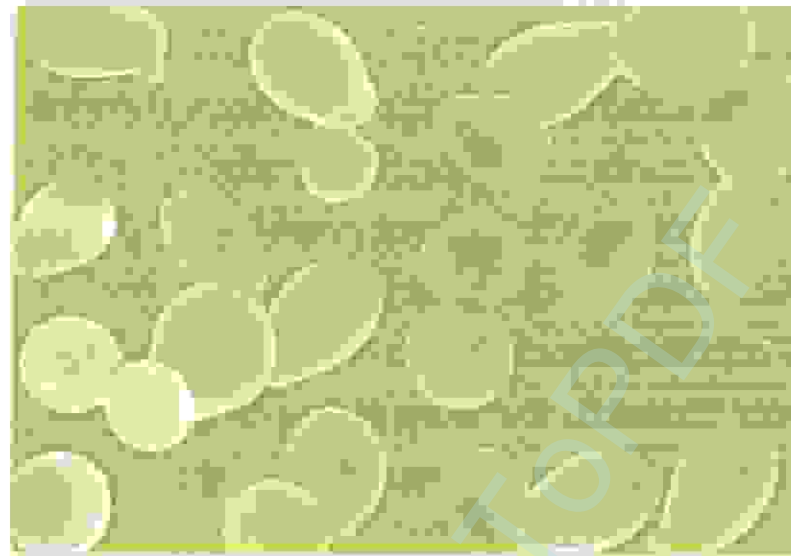
## 2. *Saccharomyces cerevisiae* :

### 2.1. Définition :

Elle appartient à la classe des Ascomycètes, à la famille des *Saccharomycetoideae*, genre *Saccharomyces* (Rothlis et Leveau, 1997) (Fig:01).

C'est un microorganisme utilisé pour sa fermentation alcoolique ainsi appelé levure de bière (*cerevisiae*), mais aussi et surtout dans le domaine des boulangeries la où elle est appelé « levure de boulanger ». Due à son mode de reproduction, elle est découverte, isolée et identifiée au milieu du XIXème siècle soit reconnue comme étant le petit champignon

(-myces) se nourrissant de sucre (saccharose) responsable de la fermentation. Elle fut logiquement appelée *Saccharomyces cerevisiae* (Thuriaux, 2004).



**Figure 1 :** *Saccharomyces cerevisiae* [1].

## 2.2. Classification scientifique [1]:

<b>Règne :</b>	<i>Fungi</i>
<b>Division :</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Sous-embranchement :</b>	<i>Saccharomycotina</i>
<b>Classe :</b>	<i>Hemiascomycete</i>
<b>Ordre :</b>	<i>Saccharomycetales</i>
<b>Famille :</b>	<i>Saccharomycetaceae</i>
<b>Genre :</b>	<i>Saccharomyces</i>

## 2.3. Caractéristiques :

Les cellules de levures du genre *Saccharomyces*, en particulier *Saccharomyces cerevisiae*, sont arrondies, plus ou moins ovalaires, elles ont la formes d'un ellipsoïde de révolution dont le grand axe atteint une longueur d'environ 5  $\mu\text{m}$  chez les cellules diploïdes (Fig : 2).

Aspect de levures à la coloration de Gram, on peut visualiser les parois (translucides) qui entourent les cellules.



→ **La paroi** fait environ 20% du poids de la levure, entourant la membrane plasmique et protégeant la levure des agressions physico-chimiques du milieu extérieur [2].

Ce poreux d'environ 200 nm de large (trois fois plus large que la membrane cytoplasmique) laisse passer les petites molécules et détermine la forme et la rigidité des cellules (Thuriaux, 2004). Elle est constituée d'une couche externe de mannoprotéines, associés à des glucanes et une couche interne de glucanes associés à une petite quantité de chitine [2].

→ **Une membrane cytoplasmique** composée principalement de phospholipides double couche (partie hydrophile à l'extérieur et partie lipophile à l'intérieur). Elle contient aussi de nombreux complexes protéiques intrinsèques et extrinsèques dont les rôles sont variés, par exemple des enzymes appelées protéases mènent les transports de substances du milieu extérieur vers le milieu intracellulaire et/ou inversement avec ou non transformation du substrat durant le passage.

→ **Le noyau**, généralement en position centrale à un diamètre d'environ 2 µm chez les cellules haploïdes, contenant l'information génétique du génome chromosomique de la levure

→ **Le cytoplasme** contient des vacuoles en nombre variable, organites à l'aspect homogène, qui servent d'espaces de stockage pour diverses substances. ces vacuoles fusionnent le plus souvent chez les cellules âgées.

On trouve également dans le cytoplasme des inclusions de glycogène et des microvésicules, les peroxysomes contenant notamment le catalase. Lorsque les levures sont en aérobiose, on trouve des mitochondries qui jouent un rôle important dans la respiration et la production d'ATP [2]. Les mitochondries disparaissent en anaérobiose. La plupart des constituants cellulaires peuvent être distingués au microscope sur la base de leur affinité sélective pour tel ou tel colorant (Didier Pol, 1996).

Malgré leur petite taille, le microscope optique permet d'obtenir diverses informations sur les levures en particulier si l'on utilise des techniques de coloration. L'observation d'organites caractéristiques permet de situer les levures dans la classification (Didier Pol, 1996).

### ☞ Caractéristiques génétiques :

- ☒ **Chromosomes** : les levures sont des organismes eucaryotes et possèdent un noyau avec des chromosomes linéaires. Chez les Saccharomyces, les chromosomes sont au nombre de 16 simples ou 16 paires selon la forme haploïde ou diploïde de la cellule.
- ☒ **Plasmides** : à côté des chromosomes, il existe dans le noyau des petites molécules d'ADN circulaire d'environ 6 000 paires de bases, les plasmides, présents entre 50 et 100 exemplaires par cellule.

Ces plasmides sont autorépliquables et autotransférables sans affecter la viabilité de la cellule. Ils portent l'information génétique de quelques caractères non essentiels à la viabilité de la levure.

- ☒ **ADN mitochondrial** : chaque mitochondrie renferme plusieurs molécules circulaires d'ADN qui portent l'information de certaines enzymes de la chaîne respiratoire.

L'observation vitale peut aussi être utile pour comparer des cellules d'espèce différentes, souvent très semblables, et montrer ainsi les limites de cette approche pour apprécier les différences spécifiques [2].

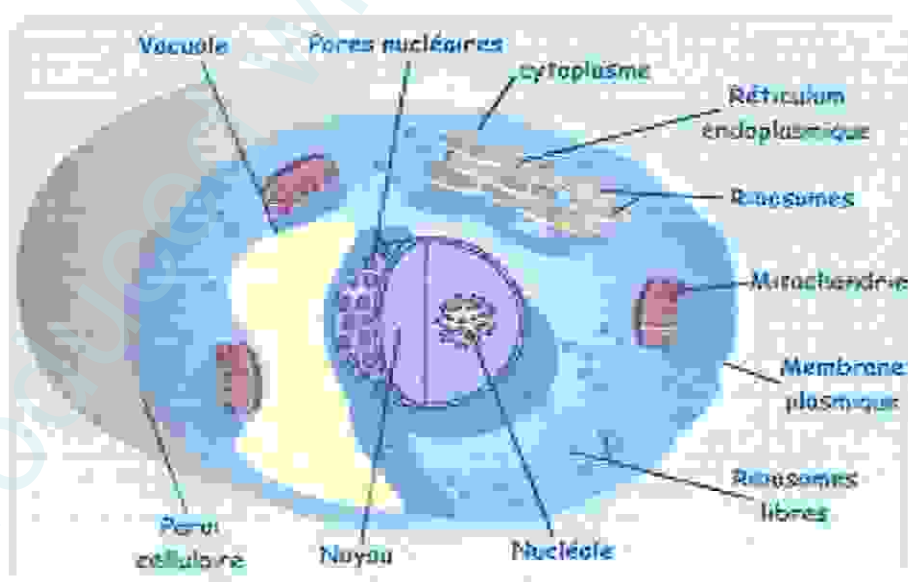


Figure 2 : Caractéristiques principales du *Saccharomyces cerevisiae* [3].

## 2.4. Cycle biologique :

Une levure présente un cycle haplodiplophasique. La plupart d'entre elles peuvent se multiplier par reproduction asexuée aussi bien sous la forme haploïde.

A l'état diploïde, elles peuvent aussi subir la méiose et donner alors des spores haploïdes capable de se multiplier par voie asexuée en un clone haploïde. Deux cellules haploïdes de signe sexuel opposé peuvent fusionner (Fig. : 3).

Le zygote qui en résulte est à l'origine de la phase diploïde du cycle (Didier Pol, 1996).

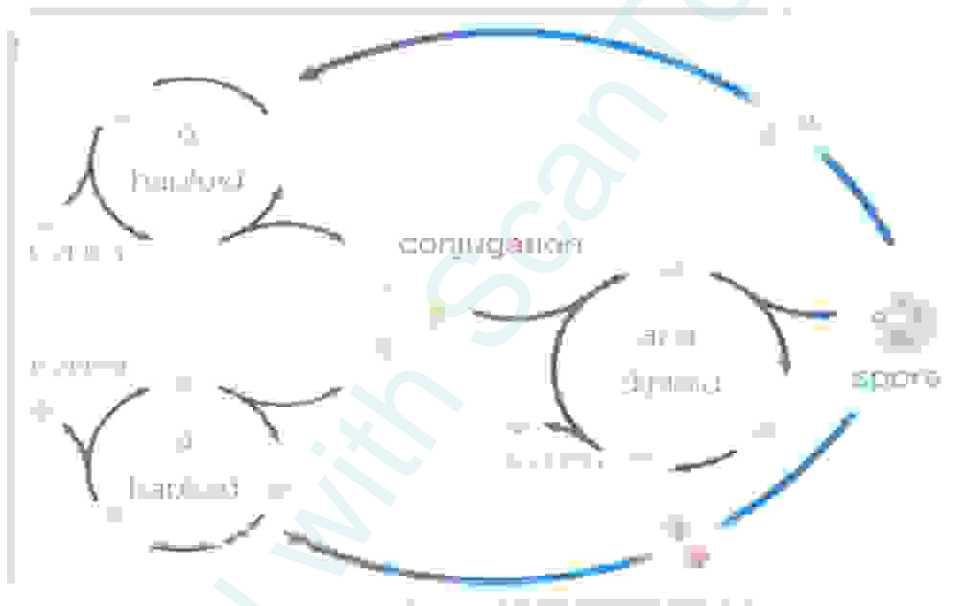


Figure 3 : Le cycle biologique de *Saccharomyces cerevisiae* [3].

### 2.4.1. Reproduction asexuée :

La multiplication asexuée s'effectue chez *Saccharomyces cerevisiae* par une forme de division cellulaire atypique : « le bourgeonnement » (Didier Pol, 1996).

- **Bourgeonnement :**

Les cellules de *S. cerevisiae* ont un mode de division cellulaire assez exceptionnel chez les eucaryotes, le bourgeonnement (Fig : 4), qui crée une différence dans la durée individuelle des cycles. En effet, le bourgeon est plus petit que la cellule mère à l'issue de la division, d'où une période de croissance plus longue avant qu'il ne produise lui-même

un nouveau bourgeon, faute de quoi les cellules deviendraient plus petites à chaque division.

Pour éviter une telle « catastrophe mitotique », la cellule issue du bourgeon a donc une phase pré-répllicative (G1) plus longue (70 min) que celle de la cellule mère (30 min), et ne déclenche la réplication de son ADN (qui coïncide à peu près avec la formation du nouveau bourgeon) que lorsqu'elle a atteint une taille critique appropriée. La phase S (20 min) et les phases G2 et M (50 min) complètent le cycle, de sorte que le bourgeon et sa mère ont, respectivement, un cycle de division long (140 min) et court (100 min), avec une valeur moyenne de 120 min pour l'ensemble de la population cellulaire (Fig 5) (Thuriaux, 2004).



Figure 4 : Le bourgeonnement [3].

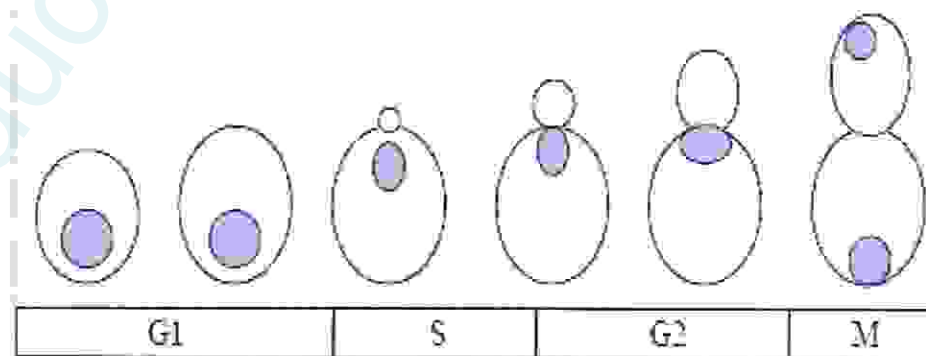


Figure 5 : Les différentes étapes du cycle cellulaire mettant en avant les changements de forme de la levure au cours de bourgeonnement [3].

### 2.4.2. Reproduction sexuée :

Chez *S.cerevisiae*, les spores issues de la méiose germent pour donner des cellules haploïdes qui, en milieu riche, produisent en permanence la phéromone sexuelle correspondant aux haplotypes *MATa* et *MATa*. Ces cellules s'engagent donc spontanément dans un processus de fécondation qui produit un zygote où les deux noyaux fusionnent immédiatement, formant un diploïde *MATa/MATa* qui est certes compétent pour la méiose, mais où celle-ci ne se produit que dans des conditions de carence sévère, et pour autant que les cellules soient compétentes pour la respiration. La présence d'acétate favorise la méiose, pour des raisons inconnues (Thuriaux, 2004).

### 2.5. Condition de croissance :

Les conditions de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* se rapportent à ceux de la levure en générale, ainsi pour leur développement les levures ont besoins :

- ☞ De composés carbonés : source de carbone et d'énergie.
- ☞ De composés azotés réduits sous forme d'ammonium ; quelques levures peuvent cependant utiliser des composés oxydés (comme les nitrates) ou organiques pour la synthèse de protéines et d'acides nucléiques.
- ☞ D'éléments minéraux variés, vitamines et facteurs de croissance qui varient selon les levures [2].

Les levures surviennent à un large spectre de type environnemental :

- ➔ Gamme de tolérance de température : de 0° à 55°C.
- ➔ Température de prolifération : de 12 à 40°C.
- ➔ Tolérance presque complète vis-à-vis de la dessiccation (levures sèches)
- ➔ Tolérance vis-à-vis de la pression osmotique : les levures peuvent pousser et fermenter jusqu'à des concentrations en sucre de l'ordre de 3 M.
- ➔ Tolérance alcoolique : jusqu'à 20% d'alcool [2].

## 2.6. Métabolisme :

- *S.cerevisiae* une levure aérobie facultative :

La fermentation produit deux molécules d'ATP par molécules de glucose oxydée, un bilan énergétique évidemment très modeste par rapport à la respiration. On comprend donc que la quasi-totalité des eucaryotes non photosynthétique privilégient la respiration en présence d'O<sub>2</sub>.

On appelle effet pasteur cette adaptation à l'oxygène. *S.cerevisiae* échappe à cet effet, et l'on parle d'effet Crabtree pour qualifier sa forte adaptation à la fermentation même en présence de l'oxygène. *S.cerevisiae* aérobie facultative. En outre *S.cerevisiae* discrimine entre les sucre qu'elle est capable de fermenter et privilégier fortement le glucose ou le fructose. on parle alors d'effet glucose (ou répression catabolique carbonée) (Thuriaux, 2004).

### 2.6.1. Métabolisme oxydatif :

Le métabolisme oxydatif du glucose est une oxydation complète de la molécule de sucre en eau et en gaz carbonique à travers les voies métaboliques de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative. Deux conditions sont nécessaires à ce métabolisme. Outre la présence d'oxygène, la concentration en glucose doit rester faible, pour un changement métabolique. chez *S.cerevisiae* comme chez d'autre organismes eucaryotes, les différentes enzymes qui catalysent les réactions du cycle de Krebs sont situées dans la mitochondrie (Flammarion et al .. 2000).

Le bilan énergétique théorique maximal de cette voie métabolique est le suivant :



En plus de la production de coenzymes réduits sous forme de NADH et FADH<sub>2</sub>, le cycle de Krebs sert à former de nombreux précurseurs pour la synthèse de macromolécules de la composition cellulaire. La phosphorylation oxydative régénère les coenzymes réduits NADH et FADH<sub>2</sub> en NAD<sup>+</sup> et FAD. Les électrons ainsi libérés sont transférés à l'oxygène moléculaire pour former une molécule d'eau. Les protons exportés permettent le maintien du potentiel transmembranaire entre l'espace inter membranaire et la matrice de la mitochondrie. Ainsi, l'entrer des protons à l'intérieur de la mitochondrie permet la synthèse d'ATP et Pi grâce à l'ATPase membranaire (Mouret, 2006).

### 2.6.2. Métabolisme fermentaire :

Le métabolisme fermentaire peut être défini comme l'ensemble des réactions qui se réalisent en l'absence d'oxygène comme accepteur final d'électron. Cette fonction est alors assurée par des molécules organiques. Ainsi ce métabolisme produit de l'éthanol, du dioxyde de carbone et des produits secondaires. La glycolyse est la voie principale de dégradation du sucre en pyruvate. La distinction entre voie oxydative et fermentaire est le devenir du pyruvate. Dans le cas d'un métabolisme fermentaire, il est transformé en éthanol et dioxyde de carbone.

Le bilan énergétique de la dégradation du glucose en éthanol est alors suivant :



Le rendement théorique en éthanol est de 0,51 g d'éthanol par gramme de glucose consommé.

Cependant les réactions de maintenance, de synthèse des infrastructures cellulaires et la formation des composés secondaires (glycérol, acide acétique, substances de réserve) limitent ce rendement à 80 -90 % de sa valeur théorique. Le rendement en biomasse est de l'ordre de 0,10g .g<sup>-1</sup> de glucose. En plus de l'éthanol, se forment d'autres sous-produits dont le plus important est le glycérol.

Le but de la production de glycérol est de rééquilibrer la balance redox en réponse à la production de biomasse associée à la réaction fermentaire (Marlene, 2006).

### 2.6.3. Effet glucose :

Le glucose peut devenir un répresseur des enzymes de la voie de la gluconéogenèse, de la respiration et des enzymes qui assurent le catabolisme des sucres autres que le glucose.

On parle alors « d'effet glucose ». Le niveau des enzymes est plus faible et lié soit à une diminution de la concentration en ARNm correspondants, soit à une diminution de leur traduction voire à une augmentation de la vitesse de dégradation de ces enzymes. Cet effet peut être déclenché par d'autres hexoses tels le fructose ou le mannose (Cancedo, 1998).

#### 2.6.4. Effet pasteur :

L'effet pasteur est une inhibition de la fermentation par la respiration. On assiste ainsi à une diminution de la vitesse de consommation de sucre en présence d'oxygène. L'effet pasteur est très peu marqué chez la levure *S. cerevisiae* car elle est plus sensible au glucose (effet Crabtree et répression catabolique) (Leveau et Bouix, 1993).

#### 2.6.5. Effet Crabtree :

Crabtree, en 1929, étudier le métabolisme des sucres chez les cellules animales. Il observe que la respiration n'exerce pas d'effet inhibiteur sur la fermentation, mais qu'à l'inverse, La respiration est inhibée par l'activité fermentaire des cellules. Suite à cette découverte, des travaux ont permis de définir l'effet Crabtree comme l'inhibition d'une voie énergétique. La respiration par une autre voie énergétique, la fermentation. Il s'agit d'un phénomène contradictoire à l'effet Pasteur. Il est parfois nommé « contre -effet » Pasteur.

Un effet similaire sur les levures a été réalisé par De Deken en 1966. L'auteur montre que plusieurs types de levures présentent le même comportement que les cellules animales étudiées par Crabtree. Il a observé que lorsqu'une souche de *S. cerevisiae* utilise du glucose ou du fructose comme source de carbone en présence d'air, le métabolisme est principalement fermentaire. Ce serait le résultat d'une répression de la synthèse d'enzymes du métabolisme respiratoire dû à une vitesse de fermentation élevée (Guay, 1999).

#### ❖ Définition :

L'effet Crabtree correspond à la transition respiro-fermentaire en conditions aérobies, c'est -à- dire à une production d'éthanol en présence d'oxygène. En aérobiose, lorsque la vitesse d'apport du substrat dépasse un certain seuil, la levure passe d'un métabolisme purement oxydatif à un métabolisme oxydo-réductif.

Le niveau de sensibilité est variable selon le type de levure considéré. Certaines levures, telles que *Saccharomyces cerevisiae*, sont fortement Crabtree positives et produisent déjà de l'éthanol au-delà de  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucose (Mouret, 2006).



### 3. Intérêt biologique :

L'engagement de ces microorganismes dans divers phénomènes naturels a toujours soulevé un intérêt scientifique considérable à leur égard. Actuellement, les levures sont probablement les organismes eucaryotiques dont la biologie cellulaire est le mieux étudiée.

Les bonnes connaissances de la biologie moléculaire des levures et les techniques du génie-génétique ont permis d'utiliser des levures pour la production de protéines animales et humaines, comme la présure, l'hormone de croissance humaine ou le vaccin contre l'hépatite B (Leveau et Bouix, 1993).

Sans oublier aussi leur intérêt dans l'industrie agro-alimentaire. L'état unicellulaire, la capacité à se multiplier rapidement et la rusticité des exigences nutritionnelles confèrent à ces eucaryotes des qualités qui permettent de les cultiver, de les étudier et de les utiliser aussi facilement que des microorganismes procaryotes (Didier Pal, 1996).

### 4. Biomarqueur :

Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Flammarion et al., 2000).

Les différents types de biomarqueur sont :

- ✦ **Biomarqueur d'exposition** : Ils permettent la mise en évidence d'une exposition actuelle ou passée à un polluant d'un organisme. Par exemple les adduits d'ADN sont utilisés comme biomarqueur d'exposition à des cellules cancérogènes ou génotoxiques.
- ✦ **Biomarqueur d'effet** : Ils sont utilisés pour évaluer les effets des xénobiotiques sur les individus, les populations ou les écosystèmes.
- ✦ **Biomarqueur de sensibilité** : Ce sont des composés qui traduisent les variations de la sensibilité.

## 5. Bioindicateur :

Un bioindicateur est un indicateur constitué par une espèce végétale, fongique ou animale ou par un groupe d'espèces (groupe éco-sociologique) ou groupement végétal dont la présence (ou l'état) renseigne sur certaines caractéristiques écologiques (c'est-à-dire physico-chimiques, microclimatique, biologiques et fonctionnelle) de l'environnement, ou sur l'incidence de certaines pratiques. On les utilise notamment pour la bioévaluation environnementale (suivi de l'état de l'environnement, ou de l'efficacité de mesures compensatoires ou restauratoires).

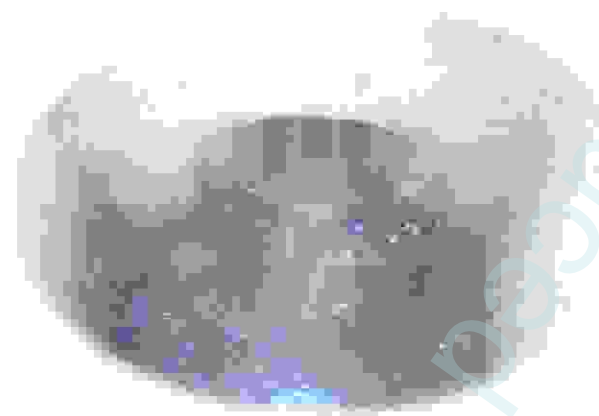
Son principe est d'observer des effets biologiques ou écosystémiques, au niveau de l'individu et/ou de population ou écosystèmes (à l'échelle de la biosphère ou de grands biomes éventuellement).

Ces effets doivent être mesurables via l'observation de divers degrés d'altérations morphologiques, comportementales, fissulaires ou physiologiques (croissance et reproduction), conduisant dans les cas extrêmes à la mort de ces individus ou à la disparition d'une population. (Flammarion et al. 2000).

### 5.1. Propriétés d'un bioindicateur :

- ✦ Il doit suffisamment (normalement ou anormalement) répandu sur le territoire concerné et y être relativement abondant, et si possible facilement détectable.
- ✦ Sauf dans le cas où l'on veut mesurer la mobilité d'espèce, il doit être le plus sédentaire possible pour refléter les conditions locales.
- ✦ Il doit avoir une taille rendant possible l'étude de ces différents tissus et de leurs composantes (muscles, os, organes dans le cas d'un animal.....).
- ✦ Il doit tolérer les contaminants avec des effets sub-létaux.
- ✦ Il doit aussi survivre hors du milieu naturel le tolérer différentes conditions de laboratoires (ph, température ...).
- ✦ Une relation entre la concentration en contaminants dans le milieu externe et la concentration dans l'organisme doit exister.

Certains bioindicateurs sont aussi des biointégrateurs ; ils peuvent être doublement utiles dans les cadres de programmes de biosurveillance (Flammarion et al., 2000).



## CHAPITRE II

# Les effluents hospitaliers

## 1. Contexte :

Consommation de l'eau : L'hôpital est un grand consommateur d'eau, en effet par comparaison avec la consommation en milieu domestique dont la moyenne retenue par habitant et par jour est de 150 à 200 litres, pour les hôpitaux la valeur moyenne passe de 400 à 1200 litres par jour et par lit [4].

Par conséquent, si les volumes d'eau entrant dans l'hôpital sont importants, les volumes rejetés dans le réseau d'assainissement public le sont également ; ces rejets pouvant générer une pollution de l'environnement.

Les usages de l'eau à l'hôpital : Ils sont très variés : usage alimentaire, sanitaire, technique et thérapeutique..., et génèrent donc différents types d'effluents [4].

## 2. Typologie des effluents liquides hospitaliers :

**Tableau 1 :** Types de rejets et produits utilisés à nature domestique ou industrielle pour un hôpital (Olivier, 2007).

Type de rejets	Produits rejetés		Impacts
Rejets de cuisines	Matière organique	Huiles et graisses	Issus de la préparation de mets, ils sont chargés de matières grasses et huileuses occasionnant des frais élevés d'entretien de collecteurs pour les collectivités.
Rejets de garages et d'ateliers	Huiles usagées	Hydrocarbures	Rejets de nature industrielle dont les produits font souvent appel à une réglementation particulière. Les huiles usagées par exemple sont peu biodégradables et réduisent l'oxygénation du milieu.
	Solvants	Lubrifiants	
	Particules métalliques	...	
Rejets de blanchisserie	Lessives	Bactériostatiques	L'eau de Javel est l'élément le plus utilisé et le plus nocif puisqu'elle forme des composés toxiques en se décomposant.
	Eau de Javel	Décontaminant	
	Bisulfite de sodium	Assouplissant	
	Eau oxygénée	Acide acétique	

**Tableau 2 :** Types de rejets et produits utilisés de nature spécifique à un hôpital  
(Olivier, 2007).

Type de rejets	Produits rejetés		Impacts
<b>Rejets d'antiseptiques et de désinfectants</b>	Halogènes : chlorés et iodés	Aldéhydes : Formol et Glutaraldéhyde	Un ETS est un gros consommateur d'agents de désinfection notamment pour palier aux problèmes d'infections nosocomiales. Les ammoniums quaternaires sont souvent très toxiques pour les organismes aquatiques. La réglementation impose une biodégradabilité de 90% pour tous les désinfectants ce qui atténue largement leurs impacts.
	Biguanides	Dérivés phénols	
	Alcools	Carbanilides	
	Ammoniums quaternaires	Diamidines	
	Oxydants	Colorants	
<b>Rejets de germes pathogènes</b>	Bactéries multirésistantes	Virus	Si de nombreux agents pathogènes ne peuvent survivre une fois rejetés, il en existe qui le peuvent d'où un problème sanitaire éventuel.
<b>Rejets de médicaments</b>	Hormones sexuelles	Analgésiques	Avec les types de médicaments différents, les quantités utilisées et du fait de la concentration, les ETS sont des sources de pollution éventuelles. Il ne faut toutefois pas oublier que la ville et l'élevage sont aussi des importantes sources de rejets médicamenteux. Des impacts commencent à être décelés comme la féminisation de certains poissons ou la malformation, lors du développement, de certains animaux.
	Analgésique, antipyrétiques, anti-inflammatoire	Bêtabloquants	
	Hypolipémiants	Broncholytiques secretolytiques	
	Antiépileptiques	Cytostatiques	
	Vasodilatateurs	Produits de contraste rayons X	
<b>Rejets de métaux lourds</b>	Tensiomètre à mercure	Produit de développement photo	Les métaux lourds nous sont très utiles, mais malheureusement se sont également des toxiques très puissants.

Rejets des laboratoires	Effluents	Colorants	Les laboratoires au sens large sont les services travaillant avec de nombreux produits toxiques différents.
	d'automates		
	Acides	CMR	
	ases	Formol	
	Solvants	...	
Autres rejets	Radioactivité	...	Les ETS ont souvent de multiples services possédant chacun des rejets spécifiques et donc leurs contraintes propres comme la radioactivité de certains éléments pouvant avoir une durée de demi-vie importante à l'échelle des effluents.

### 3. Caractérisation des effluents hospitaliers :

#### 3.1. Caractéristiques microbiologiques :

Sur le plan microbiologique, les effluents des établissements de santé seraient globalement moins chargés que les eaux usées urbaines (T. eprat, 1999; Mansotte, 2000). Emmanuel (2004) a trouvé des concentrations de  $2.10^2$  et  $2.10^6$  coliformes fécaux par 100 ml dans les effluents d'un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France alors que la concentration moyenne est de 108 / 100 ml dans les effluents urbains (Metcalf et Eddy, 1991). Le danger résiderait plus dans la présence de certaines bactéries multirésistantes aux antibiotiques (*Proteus vulgaris*, Mycobactéries) et de certaines souches typiquement hospitalières (*Enterobacter sakazakii*) (Schwartz et al, 2003).

En utilisant des entérocoques, des staphylocoques, des *Enterobactériaceae* et des bactéries hétérotrophiques en tant qu'indicateurs de présence des bactéries multirésistantes dans les biofilms formés dans le réseau d'assainissement hospitalier, (Schwartz et al 2003) ont relevé une importante présence de germes multirésistants aux antibiotiques.

#### ➔ Virologie des effluents hospitaliers :

Des marqueurs de pollution virale des eaux de surface tels que les entérovirus et les adénovirus ont été identifiés dans les effluents hospitaliers (Mansotte et Justin, 2000).

Les entérovirus se présentent en quantité importante dans les eaux usées. Leur présence, en tant que marqueur de pollution virale, dans les effluents hospitaliers est à corrélérer avec celle d'autres virus, le VIH par exemple.

En effet, les personnes infectées par les entérovirus et les entérobactéries libèrent en moyenne  $10^6$  à  $10^7$  PI « particules infectieuses » (ou colonies) pour chaque litre de selle excréte. Certaines études mentionnent la présence de particules infectieuses du VIH dans les eaux naturelles et usées (Casson et al. 1997).

### 3.2. Caractéristiques des rejets médicamenteux :

Les médicaments utilisés dans les établissements de santé sont variés et représentent des quantités importantes. On peut citer à titre d'exemple, les analgésiques, les antipyrétiques, les antibiotiques, les antiviraux, les antifongiques, les immunodépresseurs et les anticancéreux.

On distingue deux voies d'élimination des médicaments, la première et la plus conséquente concerne les excréta et les liquides biologiques, la seconde le circuit d'élimination des médicaments non utilisés et du matériel souillé [5].

Le circuit d'élimination des médicaments par les patients peut-être représenté par le schéma suivant (Fig : 6) [6] :

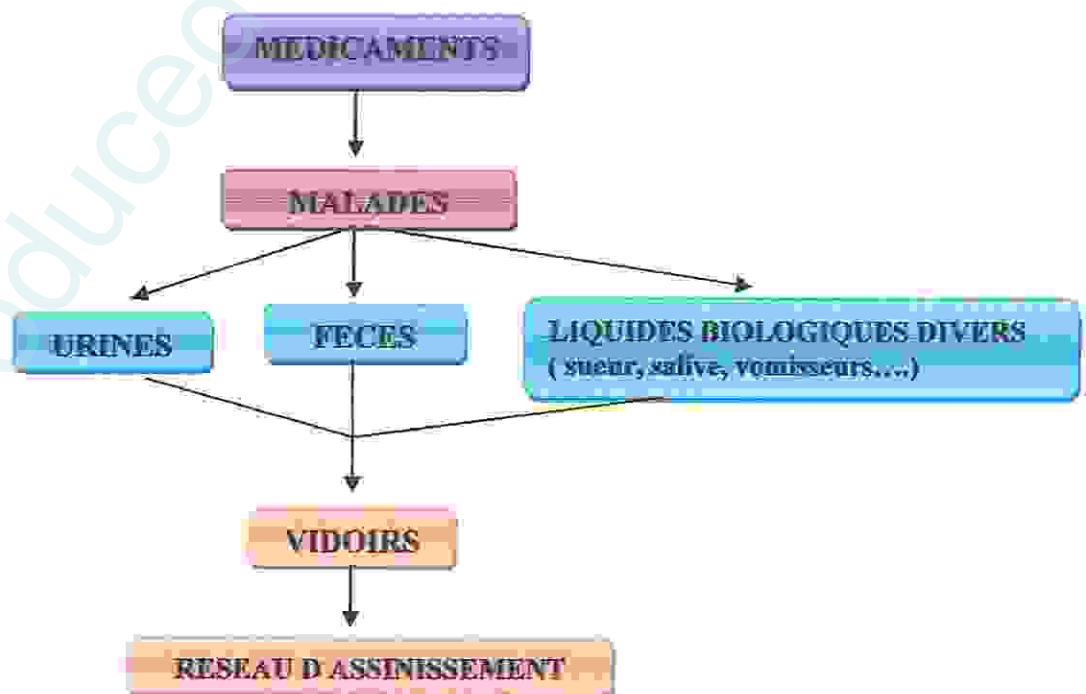


Figure 6 : Le circuit d'élimination des médicaments.

Suivant la voie d'administration, le médicament est plus ou moins métabolisé par l'organisme et on retrouve donc en partie les médicaments et les métabolites dans le réseau des eaux usés. Pour certains médicaments cela peut poser de graves problèmes de santé publique et d'environnement, si aucune précaution n'est prise quant à leur rejet notamment pour les anticancéreux.

L'élimination des médicaments non utilisés ou périmés est faite, dans certain cas, via les éviers et les vidoirs des services. Cela est évidemment un cas extrême de négligence mais malheureusement il peut se rencontrer dans certain établissement [5].

### 3.3. Caractéristiques physico-chimiques :

EPA (1989) souligne «les eaux usées provenant des hôpitaux sont essentiellement domestiques et peuvent être caractérisées par la concentration des paramètres globaux dans les limites suivantes :

DBO<sub>5</sub> : 50 à 400 mg/L

DCO : 150 à 800 mg/L

MEST : 60 à 200 mg/L

COT : 50 à 300 mg/L

Des polluants tels que métaux, radioisotopes et autres substances chimiques sont introduits dans le réseau d'assainissement des hôpitaux. Etant donné que les hôpitaux utilisent et rejettent un volume important d'eau, les polluants identifiés se diluent et se retrouvent à des concentrations souvent voisines de celles des effluents domestiques ». D'autres auteurs notent que les effluents hospitaliers présentent pour les paramètres globaux (MEST, DCO, DBO<sub>5</sub>, Phosphore total) des caractéristiques tout à fait semblables à la moyenne de celles d'eaux résiduelles urbaines à l'exception des détergents qui présentent une concentration significativement plus élevée (Mansotte et Justin, 2000).



## 4. Substances suspectées d'être à l'origine de l'écotoxicité des effluents hospitaliers :

### 4.1. Les détergents :

Un détergent est un produit servant à « décoller la saleté » par une action physique et chimique.

Les principaux détergents sont :

- ☛ **Les détergents anioniques** : Sont des détergents d'origine naturelle : les savons, les sels d'acides gras. Leur dégradation est complète entre 2 et 20 jours.
- ☛ **Les détergents cationiques** : (ammonium quaternaire), sont des sels d'amines. En plus de leur pouvoir détergent, ils ont également un pouvoir bactéricide (désinfectant). Ils ont une mauvaise biodégradabilité. En contact avec des détergents anioniques, ils forment des composés insolubles (existence d'une certaine neutralisation).
- ☛ **Les détergents non ioniques** Correspondent à la classe la plus importante. À cause de la très bonne tolérance cutanée qu'ils présentent, ces détergents sont les plus utilisés. Si la chaîne carbonée est linéaire, les enzymes naturelles assurent beaucoup plus facilement la biodégradabilité du composé que si cette chaîne est ramifiée.

Un des principes actifs des détergents est l'agent de surface (ou tensioactif), qui forme un film discontinu et fragile à la surface de l'eau. Ce film empêche le plus souvent à la lumière solaire et à l'oxygène de l'air de pénétrer dans l'eau, ce qui peut entraîner un déséquilibre biologique en entraînant à moyen ou à long terme, dans le cas d'un réacteur de traitement biologique aérobie, l'apparition de zones anaérobies. Dans le cas d'un milieu naturel aquatique, il peut faciliter le début d'une eutrophisation (Emmanuel, 2004).

### 4.2. Les désinfectants :

L'AFNOR définit la désinfection comme une « opération au résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés en fonction des objectifs visés ».

Les désinfectants utilisés dans les hôpitaux peuvent se classer en :

- désinfectant couramment utilisés

• désinfectant à utilisation restreinte.

#### 4.2.1. Les désinfectants couramment utilisés:

- **Les produits chlorés :** L'eau de Javel et les autres hypochlorites sont les désinfectants les plus utilisés dans les hôpitaux (Deloffre-Bommamour, 1995).

Ils contribuent à la formation des composés organohalogénés adsorbables sur du charbon actif (AOX). Les composés organohalogénés sont le plus souvent lipophiles, durables dans l'environnement, et potentiellement toxiques pour les organismes aquatiques (Carey et al., 1998).

- **Les produits contenant des aldéhydes et dérivés :** Le formaldéhyde ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) est le plus toxique de tous les aldéhydes. Il est incompatible avec les produits iodés, les hypochlorites et l'eau oxygénée (Emmanuel, 2004).
- **Le glutaraldéhyde :** C'est un dialdéhyde très utilisé dans la désinfection des appareils d'endoscopies. A cause de sa nature volatile et irritante, le glutaraldéhyde peut être responsable de dysfonctionnement pulmonaire comme l'asthme ou d'anomalies cutanées, comme les eczéma allergiques chez le personnel médical exposé périodiquement à cette substance (Cullinan et al., 1992).

Cependant, les problèmes sanitaires liés au glutaraldéhyde peuvent être réduits par l'utilisation d'appareils de nettoyage automatique (Foussereau, 1985).

- **Les sels ammoniums quaternaires :** Ils ont à la fois un pouvoir détergent et un pouvoir désinfectant.

#### 4.2.2. Les désinfectants utilisés de façon restreinte on peut citer :

- **Les produits à base d'iode :** Le problème avec ces produits, c'est qu'ils sont incompatibles avec beaucoup d'autres produits tels : les métaux lourds, les matières organiques, les dérivés mercuriels,...., ce qui limite leur utilisation.
- **Les dérivés phénoliques :** Ils ont un très bon pouvoir désinfectant, mais ils ne sont pas biodégradables et à terme peuvent se retrouver dans les eaux de surface destinées à la préparation d'eau potable.

- Et dans le cas d'une désinfection de l'eau par le chlore ou ses dérivés, les substances phénoliques peuvent générer des composés toxiques tels que les chlorophénols (Emmanuel, 2004).
- Les produits à base d'alcool : R-OH
- L'acide péraacétique : CH<sub>3</sub>-COOOH
- La chlorhexidine

### 5. Impacts écotoxicologiques des résidus médicamenteux :

Par opposition à beaucoup de molécules mises sur le marché, les substances médicamenteuses (et leurs métabolites) sont spécifiquement conçues pour avoir des effets biologiques. Elles sont souvent persistantes et lipophiles, ce qui leur permet de se bioaccumuler et d'entraîner des effets sur les écosystèmes aquatiques et terrestres. (Halling-Sørensen *et al.*, 1998).

Une fois ingérées, la plupart des substances médicamenteuses subissent des modifications biochimiques qui donnent naissance à des métabolites. Ceux-ci peuvent être plus ou moins actifs et/ou toxiques que le médicament initial. Un certain nombre de médicaments ne subit toutefois pas de biotransformation au sein de l'organisme et est excrété sous forme inchangée (Rabiet, 2006).

Le jeu de données d'écotoxicité apparaît globalement très limité, surtout en ce qui concerne l'écotoxicité de type chronique. Il est même inexistant pour des substances telles que les anticancéreux qui semblent être prioritaires pour les hôpitaux. La majorité des valeurs d'écotoxicité aiguës recensés est comprise entre 1 et 100 mg/l pour les invertébrés et les poissons. D'une manière générale, les algues et plus particulièrement les cyanophytes représentent le groupe taxonomique le plus sensible, notamment envers les antibiotiques. Les antidépresseurs, le propranol (bêtabloquant), l'amlodipine, le carvedilol et les fibrates apparaissent enfin comme les substances les plus écotoxiques (Clotilde, 2008).

## 6. Effets des médicaments sur les organismes aquatiques :

Le tableau 3 donne les résultats des effets toxiques des médicaments mesurés sur les organismes aquatiques par la mise en œuvre des essais d'écotoxicité normalisés (Clotilde, 2008).

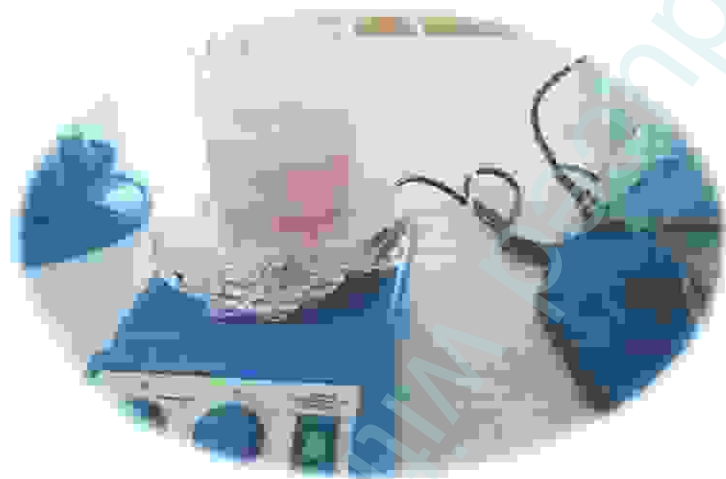
**Tableau 3 : Toxicité des médicaments sur les organismes aquatiques.**

Médicaments ou métabolites / Effluents hospitaliers	Organismes	Effets mesurés	Toxicité	Références
Clofibrate	Aigue <i>Daphnia magna</i>	CE <sub>10</sub> = 5,4 mg/L CE <sub>50</sub> = 12 mg/L CE <sub>10</sub> = 17,7 mg/L CE <sub>50</sub> = 28,2 mg/L NOEC = 0,01 mg/L	Inhibition de la croissance Aigue Chronique	HALLING-SORENSEN et al. (1998)
Diazepam	<i>Daphnia magna</i>	CE <sub>50</sub> = 13,9 mg/L CE <sub>50</sub> = 4,3 mg/L	Aigue	LILLIS et al. (1995) CALERA et al. (1993)
Diéthylstilbestrol acetate	<i>Daphnia magna</i>	CE <sub>50</sub> = 10 mg/L	Aigue	COATS et al. (1976)
17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	Aigue <i>Daphnia magna</i>	CE <sub>10</sub> = 17,7 mg/L CE <sub>50</sub> = 28,2 mg/L NOEC = 0,01 mg/L	Inhibition de la croissance chronique	HALLING-SORENSEN et al. (1998)
Effluents hospitaliers contenant de la Mitomycine C et/ou cisplatine	Essai Umu C (bactéries)	Activités génotoxiques	Echantillons d'effluents hospitaliers	GUJARA et al. (1996)
Ibuprofène	Bactérie (Microtox S) <i>Skeletonema costatum</i> <i>Daphnia magna</i>	CE <sub>50</sub> (5 mins) = 12,3 mg/L CE <sub>50</sub> (96 hres) = 12,3 mg/L CE <sub>50</sub> (48 hres) = 9,06 à 11,5 mg/L	Aigue Inhibition de la croissance Aigue	HALLING-SORENSEN et al. (1998)
Nicotine	<i>Daphnia magna</i>	CE <sub>50</sub> = 3,7 mg/L CE <sub>50</sub> = 5,7 mg/L	Aigue	LILLIS et al. (1995) CALERA et al. (1993)
Propranolol HCl	<i>Daphnia magna</i>	CE <sub>50</sub> = 17,7 mg/L CE <sub>50</sub> = 3,1 mg/L	Aigue	LILLIS et al. (1995) CALERA et al. (1993)

## 7. Le risque infectieux présenté par les effluents hospitaliers :

Il est théoriquement possible de retrouver dans les eaux usées hospitalières des germes pathogènes dont l'origine a été précisée plus haut. Les germes pathogènes peuvent être :

- Des bactéries présentes dans les selles ou urines (*Salmonelles*, *Shigella*, *Coliformes*, *Vibrions*, *Streptocoques*, *Entérobactéries*...) ou encore des bactéries responsables d'infections nosocomiales (*Staphylocoques*, *Streptocoques*, *Pseudomonas*...). La particularité et le danger de ces bactéries est qu'elles sont souvent polyrésistantes aux antibiotiques.
- Des virus (Hépatites, Entero-virus, Rotavirus...).
- Des parasites (amibes, taenia, ascaris, champignons...) [5].



## CHAPITRE III

# Matériel et Méthodes

Ce chapitre donnera la description des différentes expériences réalisées au laboratoire. Nous exposerons dans ce qui suit, le matériel biologique, les protocoles opératoires et les techniques d'analyses utilisées pour accomplir ce travail. Un ensemble de tests abordés au laboratoire (Expositions *in vitro*) ont été menés pour mieux caractériser les réponses biologiques de *Saccharomyces cerevisiae* exposé aux effluents hospitaliers.

Notre étude expérimentale est effectuée au laboratoire de microbiologie du Département de Biologie de l'Université de Guelma.

### 1. Description du site :

**Boucheouf** est une ville de l'est de l'Algérie située dans la wilaya de Guelma, à 35 km de du centre de la wilaya, à 52 km de la wilaya d'Annaba et 42 km de la wilaya de Souk-Ahras. Elle est aussi située à 600 km de la capital Alger et 300 km de Tunis. Le nombre d'habitant dans la ville est d'environ 35 000. Durant la colonisation française, la ville portait le nom de *Duvivier*.

### 2. Matériel :

#### 2.1. Les prélèvements :

Le matériel utilisé est une eau usée rejeté de l'hôpital de Boucheouf.

Le prélèvement s'effectué durant le mois d'Avril à partir de 3 sites différents (Fig:7) :

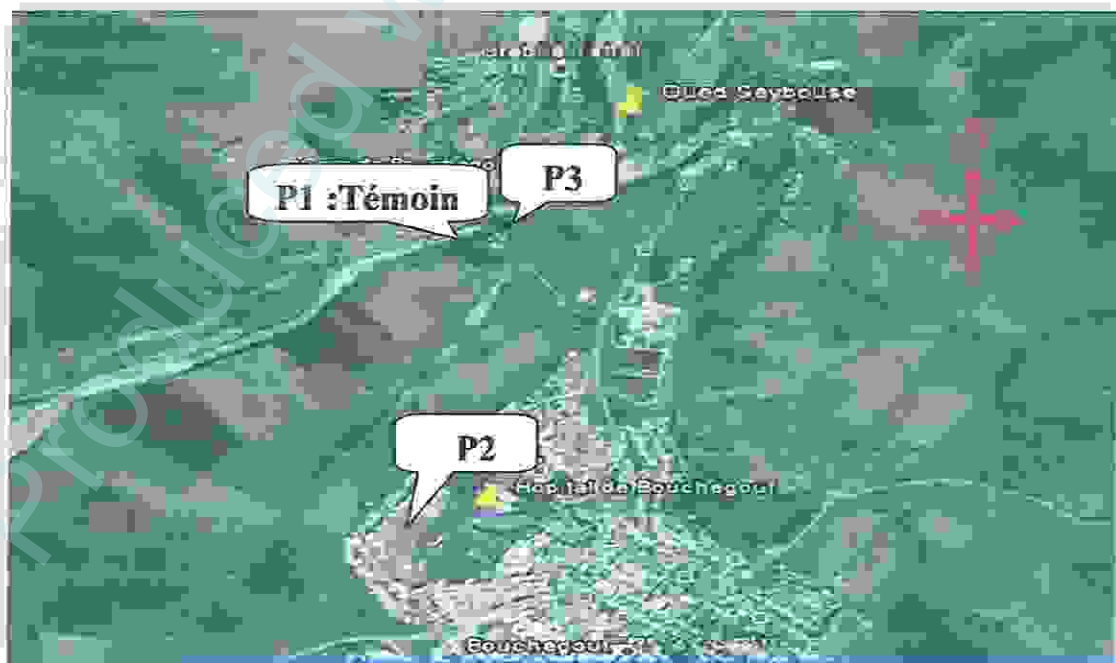


Figure 7 : Image satellite montrant la distribution des 3 sites des prélèvements.

- **Le point 1 (P1 ou Témoin) :** L'eau de l'oued Seybouse (Pont de Bouchegouf) distant de 2,5Km de l'égout principal et de 50m avant le contact oued-égout (Fig: 8.a).



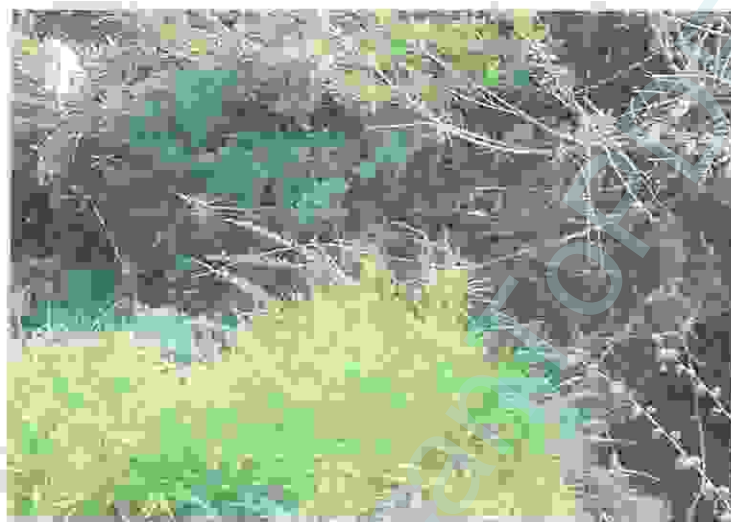
**Figure 8.a :** Site 1 « l'eau de l'oued Seybouse »  
Prise par : Marwa A le : 4 /4/ 2012

- **Le point 2 (P2) :** Egout principal distant 500 m de l'hôpital (Fig: 8.b).



**Figure 8.b :** Site 2 « l'égout principal de l'hôpital »  
Prise par : Marwa A le : 4 /4/ 2012

- **Le point 3 (P3) :** Le point de contact direct de l'effluent hospitalier avec l'eau de l'oued Seybouse, distant de 3Km de l'hôpital de Bouchegouf (Fig: 8.c).



**Figure 8.c :** Site 3 « le point de contact oued-égout »  
Prise par : Marwa A le : 4 /4/ 2012

## 2.2. Matériel biologique (bio indicateur) :

Les levures sont parmi les micro-organismes les plus faciles à obtenir et à cultiver. Notre étude porte particulièrement sur ces espèces, la levure d'origine industrielle qui est : "La levure de boulangerie" ou « *Saccharomyces cerevisiae* » et qui se présente sous la forme d'une petite cellule sphérique, d'environ 4 microns de diamètre.

## 3. Les tests :

Les différents tests utilisés afin de déterminer l'impact des effluents hospitaliers sur divers biomarqueurs et pour la compréhension des mécanismes de toxicité et de réponse vis-à-vis des effluents hospitaliers au niveau d'un bioindicateur (*Saccharomyces cerevisiae*).

Parmi les tests que nous avons réalisé :

- ☞ Un essai sur la croissance par dénombrement des cellules de levure dans un milieu liquide préalablement incubées avec différentes prélèvement.
- ☞ Observation de l'effet sur les différents métabolismes (glucidiques, protéiques).



☞ L'influence des effluents hospitaliers sur l'activité catalase.

#### 4. Paramètres Physiologiques mesurés :

##### 4.1. La culture des Levures :

###### 4.1.1. Lavage des Levures :

La levure d'origine industrielle comme la levure de boulanger est conditionnée en pâte ou lyophilisée à partir de culture menée dans un milieu riche en substrats. En conséquence, ces substrats sont souvent présentes dans ces préparations et les levures mises en suspensions dans l'eau respirent et/ou fermentent spontanément.

Dans ces conditions, il est difficile voir impossible de mener des mesures fiables sur le métabolisme énergétique. Aussi, avant toute expérience comportant des mesures sur le métabolisme énergétique, il est nécessaire de laver soigneusement les levures pour éliminer toute trace de substrat dans le milieu (Pol, 1994).

###### ❖ Protocole de lavage :

###### ➤ Lavage par agitation :

- Préparer une suspension de levure en mettant 1g de levure avec 100 ml de l'eau physiologique (Solution Na Cl à 9g/l) dans un bécher.
- Mettre en agitation douce et faire buller de l'air pendant 3 heures.
- Après la sédimentation de la suspension, on élimine le surnageant avec une pipette graduée.
- Mettre le culot en suspension dans le milieu désiré.



Figure 9: Lavage de levure par agitation.

#### 4.1.2. La mise en culture :

- Préparer une suspension de Levure (1g dans 100ml de Tampon Phosphate) après avoir procédé au lavage de Levures (Fig : 9).
- Mettre en agitation douce et faire buller de l'air pendant 2 heures.
- Préparer une dilution de 1/20 avec le milieu de culture dans une cuve standard chaque 30 minutes.
- Mesurer l'absorbance de le l'échantillon dilué avec un spectrophotomètre (JENWAY 6100) à une longueur d'onde à  $\lambda = 660\text{nm}$  sans oublier d'agiter la cuve avant chaque mesure.
- Élaboration de la courbe de l'absorbance en fonction du temps,  $DO = f(T)$ .

#### 4.2. Tests de cytotoxicité :

##### 4.2.1. Cinétique de la croissance cellulaire :

Le paramètre physiologique étudié est la cinétique de croissance des levures qui s'effectue par la mesure de la densité optique DO à la longueur d'onde  $\lambda = 660\text{nm}$  en fonction du temps (Pol, 1994).

La cinétique de croissance pour les différents traitements est suivie en fonction du temps aussi bien pour les témoins que pour les traitées selon le protocole suivant :

**T<sub>30min</sub>** : Observation microscopique + lecture de la densité optique à  $\lambda = 660 \text{ nm}$ .

**T<sub>60min</sub>** : Observation microscopique + lecture de la densité optique à  $\lambda = 660 \text{ nm}$ .

**T<sub>90min</sub>** : Observation microscopique + lecture de la densité optique à  $\lambda = 660 \text{ nm}$ .

**T<sub>120min</sub>** : Observation microscopique + lecture de la densité optique à  $\lambda = 660 \text{ nm}$ .

**T<sub>150min</sub>** : Observation microscopique + lecture de la densité optique à  $\lambda = 660 \text{ nm}$ .

**T<sub>180min</sub>** : Observation microscopique + lecture de la densité optique à  $\lambda = 660 \text{ nm}$ .

Les cellules sont observées sous microscope photonique (Leica DL1000) au grossissement x 40 et x 100.

La figure (9) illustre le protocole suivi pour les tests de cytotoxicité.

#### 4.2.2. La viabilité cellulaire :

La viabilité cellulaire est déterminée par comptage sur cellule de MALASSEZ après coloration au bleu de méthylène. La solution colorante est préparée comme suit :

- Diluer 10 mg de bleu de méthylène dans 10 ml d'eau distillée.
- Ajouter 2 g de tricitrate de sodium dihydraté.
- Après filtration sur membrane Minisart 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius®), compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

La technique consiste à mélanger 200 ml de solution de bleu de méthylène avec 200 ml de suspension cellulaire diluée. Après homogénéisation et 10 min d'incubation à température ambiante, les cellules sont alors comptées au microscope sur la cellule de MALASSEZ. Les cellules viables apparaissent incolores tandis que les cellules non viables se colorent en bleu.

### 5. Paramètres biochimiques :

#### 5.1. Dosage des Protéines totales :

Les protéines sont dosées par colorimétrie selon la méthode de Bradford, (1976). Le principe de la méthode est basé sur la fixation d'un colorant acide (bleu de coomassie) sur les protéines au niveau de résidus basiques et aromatiques, cette fixation provoque un transfert de sa couleur qui passe du rouge au bleu.

Ce changement de coloration est mesuré à une longueur d'onde de 595nm par spectrophotomètre (Jenway 3600) en utilisant l'Albumine Sérum bovine (BSA) comme standard.

### 5.2. Dosage des glucides totaux :

Le dosage des glucides pour les différents traitements ainsi que pour les cellules témoins est réalisé selon le protocole expérimental suivant (Shibko et al., 1966).

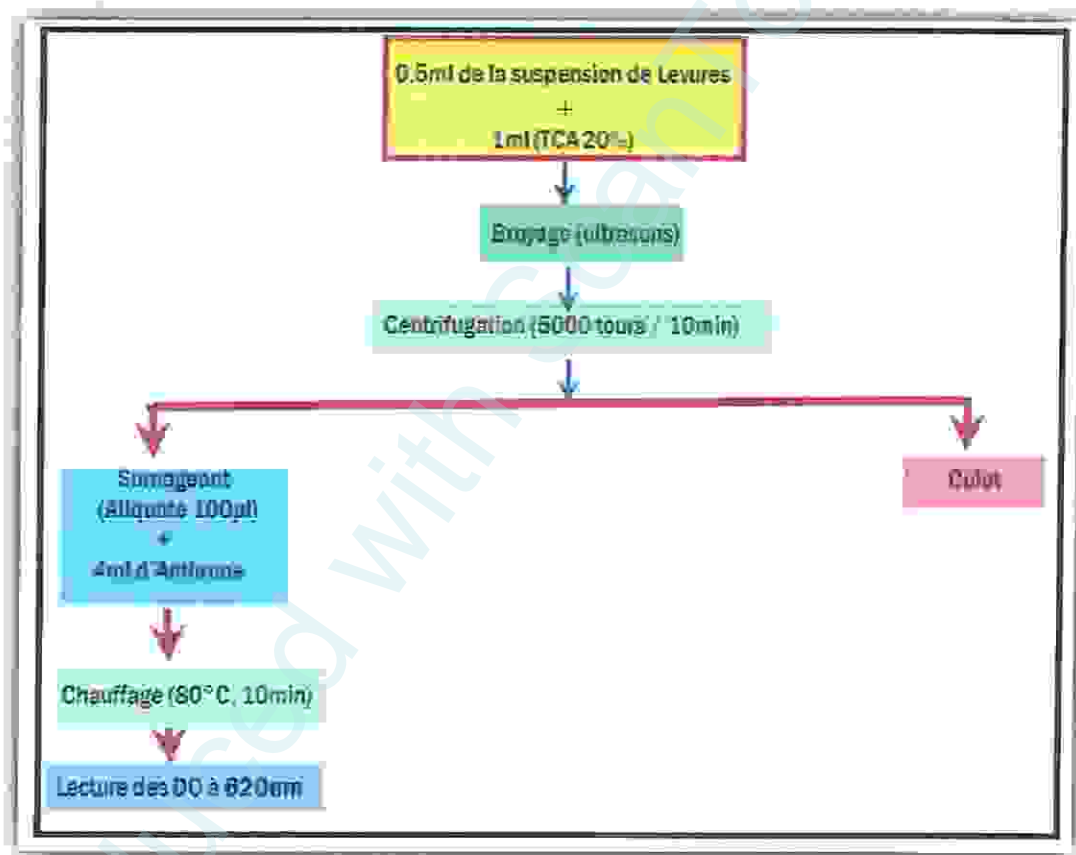


Figure 10 : Principe de dosage des glucides totaux (Shibko et al, 1966).

Le dosage des glucides est réalisé selon la méthode de Duchateau & Florin (1959). Cette méthode est basée sur l'addition de 4 ml du réactif anthrone à 100 µl du surnageant ou de la gamme étalon utilisant une solution mère de glucose comme standard (Fig : 10).

Après chauffage au bain marie (80° C, 10 min), il se développe une coloration verte, dont l'intensité mesurée à une longueur d'onde de 620 nm est proportionnelle à la concentration des glucides totaux.

### 5.3. Dosage de l'activité Catalase :

#### → Principe :

Les catalases sont des enzymes qui interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydatif en éliminant les espèces oxygénées réactives et en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) toxique pour la cellule en eau et en oxygène moléculaire.

La technique utilisée est celle décrite par Claiborne (1985), elle consiste à suivre la disparition du peroxyde d'hydrogène par action de la catalase selon la réaction suivante :



#### → Préparation des fractions à doser :

Dans une cuve en quartz, introduire dans l'ordre :

- 780  $\mu$ l de tampon phosphate de sodium ( $Na_2HPO_4$  100 mM, pH 7.5 ; 1mM EDTA; 1mM PMSF),
- 200  $\mu$ l de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$  0,5 M),
- 20  $\mu$ l de l'extrait brut (fraction S9)

Pour les essais à blanc, on introduit les mêmes composés sauf l'extrait dont le volume sera remplacé par 20  $\mu$ l de tampon phosphate.

#### → Mesure de l'activité enzymatique :

Comme l'activité décroît rapidement, il est donc important de mettre toujours le même temps entre le pipetage et le moment où on place la cuve au spectrophotomètre (Selecta UV-visible) (15 s de délai ; 30 s de lecture à 5 s d'intervalle). La mesure se fait à 240 nm. Les résultats de l'activité sont exprimés en  $\mu$ mol de  $H_2O_2$  consommé/min/mg de protéines et l'activité est donnée par la formule suivante :

$$\text{Activité } (\mu\text{mol/min/ mg de protéines}) = \frac{\Delta DO \times 10}{\epsilon \times l \times X \times Fd}$$

$\Delta DO$  : variation de la densité optique par minute

$l$  : longueur du trajet optique : 0,779 m

$Fd$  : facteur de dilution

$\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire de la catalase égale à  $0,04 \text{ mol.cm}^{-1}$

$X$  : concentration de S9 en protéines (mg/ml)

### 6-Analyse statistique :

Dans notre étude, pour mieux visualiser les résultats obtenus ; la représentation graphique choisie est celle des histogrammes en utilisant Microsoft Excel 2007.

L'analyse statistique des données est effectuée par le test  $t$  de Student qui sert à comparer entre deux échantillons (Témoins et Traités) et la corrélation par le calcul du coefficient de Pearson  $r$ .

Ce test est réalisé à l'aide du logiciel d'analyse de traitement statistique des données : Minitab (version 15).

#### 6-1-Test $t$ de Student :

En admettant que tous les paramètres mesurés suivent une loi *Normale* il s'ensuit que les moyennes de leurs groupes d'observations suivent la loi de *Student* (Fiield et Haines, 1995). Donc, pour affiner l'étude de l'influence des traitements (Effluents hospitaliers ) sur les levures et afin d'apprécier les différences entre les moyennes, il est préférable d'utiliser la méthode différentielle, qui consiste à tester chaque moyenne contre l'autre, en faisant appel au test  $t$  de *Student* sur des échantillons indépendants avec un seuil de signification supérieur à 95% ( $p < 0,05$ ).

En fait, les normes européennes utilisent le test  $t$  de *Student* pour évaluer les différences entre le groupe témoin et les groupes traités dans le cas des essais écotoxicologiques (Afnor, 1995).



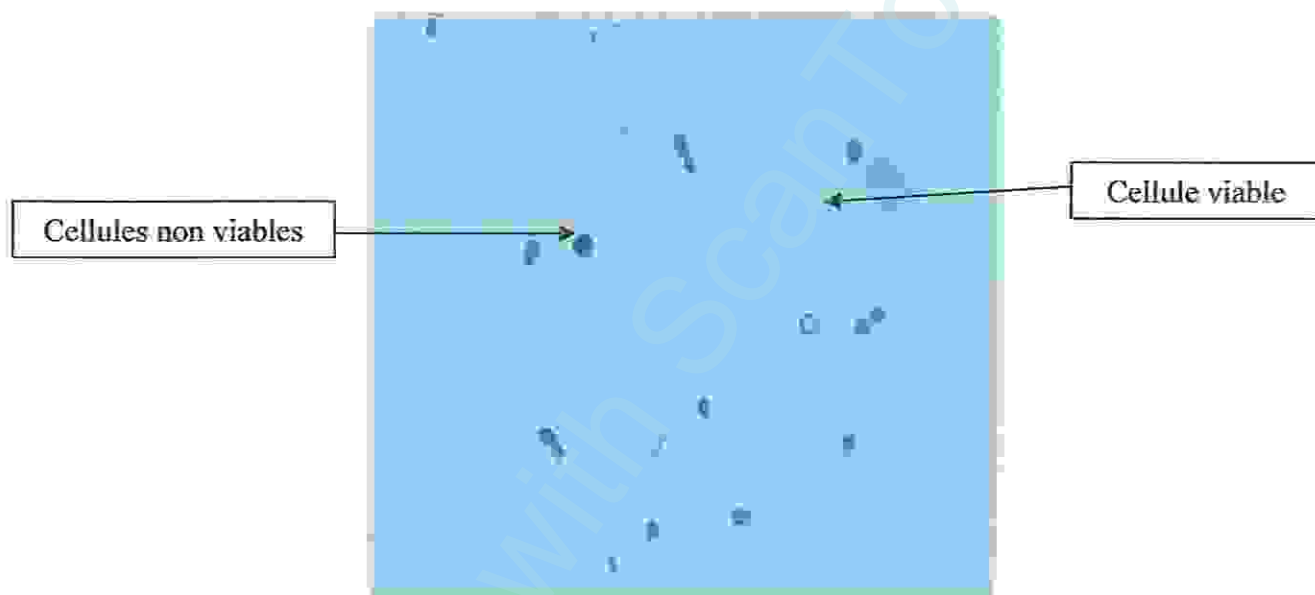
# CHAPITRE IV

## Résultats et discussion

Dans cette partie, nous allons présentés les résultats obtenus dans notre travail relatifs aux paramètres mesurés.

### 1. Étude de la viabilité cellulaire :

La figure 11 montre les cellules de levure après coloration avec le bleu de méthylène.



**Figure 11:** Exemple de coloration au bleu de méthylène (Gross X 100).

Par analyse d'image, nous pouvons identifier les cellules incolores, correspondant aux cellules actives et les cellules considérées comme inactives qui sont en bleu (Fig:11).

La mesure de la viabilité par bleu de méthylène repose donc uniquement sur l'activité métabolique de la cellule (Millard *et al.* 1997).

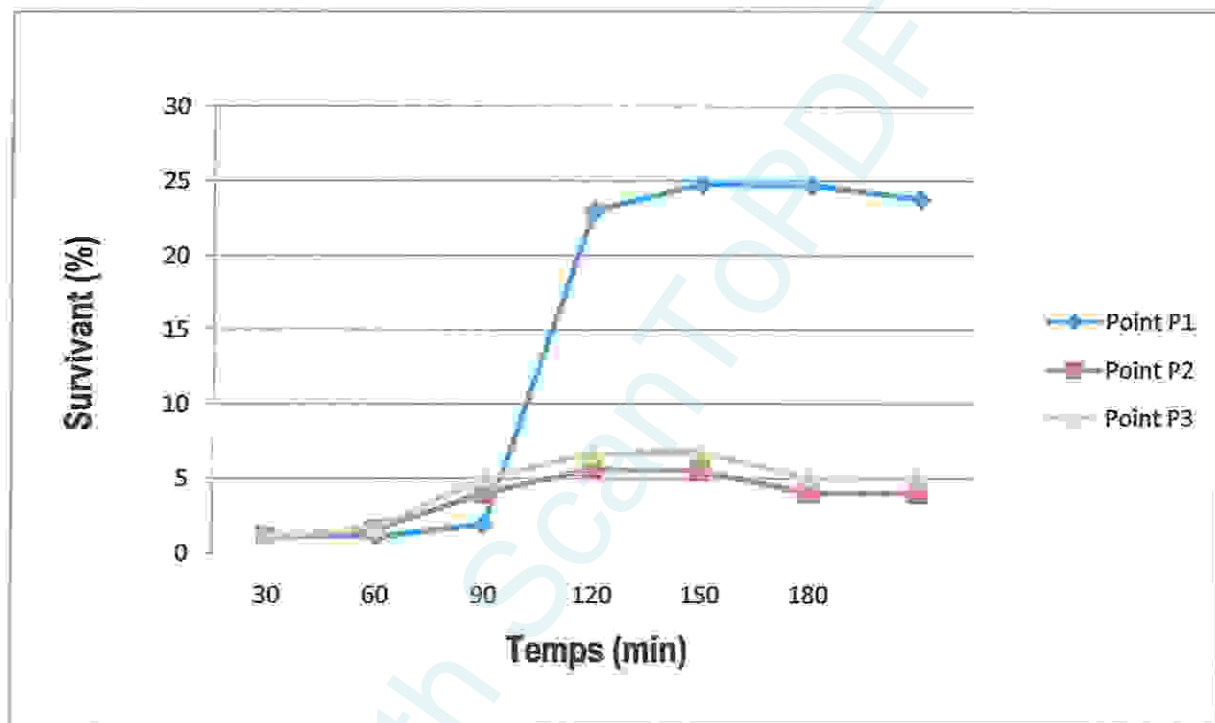
### 2. Étude de la Croissance de *Saccharomyces cerevisiae* :

Les courbes de croissance offrent des données quantitatives permettant une analyse fiable de l'effet toxique d'une substance donnée.



### 2.1. Effet des effluents hospitaliers sur la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* :

La figure 12 représente les résultats de la croissance des levures en fonction du temps après traitement avec les différents prélèvements.



**Figure 12 :** l'effet des effluents hospitaliers sur la cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae*

On constate que la croissance des levures traitées par le point P2 est stable après 30 minutes de traitement est ce aussi bien chez les levures (point P1 ou témoin) que celles traitées par les différents prélèvements (point P2 et point P3). Elle atteint son maximum à la 90<sup>ème</sup> minute et donne un plateau stable jusqu'à la fin du traitement.

Cependant une inhibition de la croissance est observée en fonction du temps chez les cellules avec le prélèvement (point P3). Le profil de cette inhibition reste proche de celui obtenu avec les levures traitées par le (point P1).

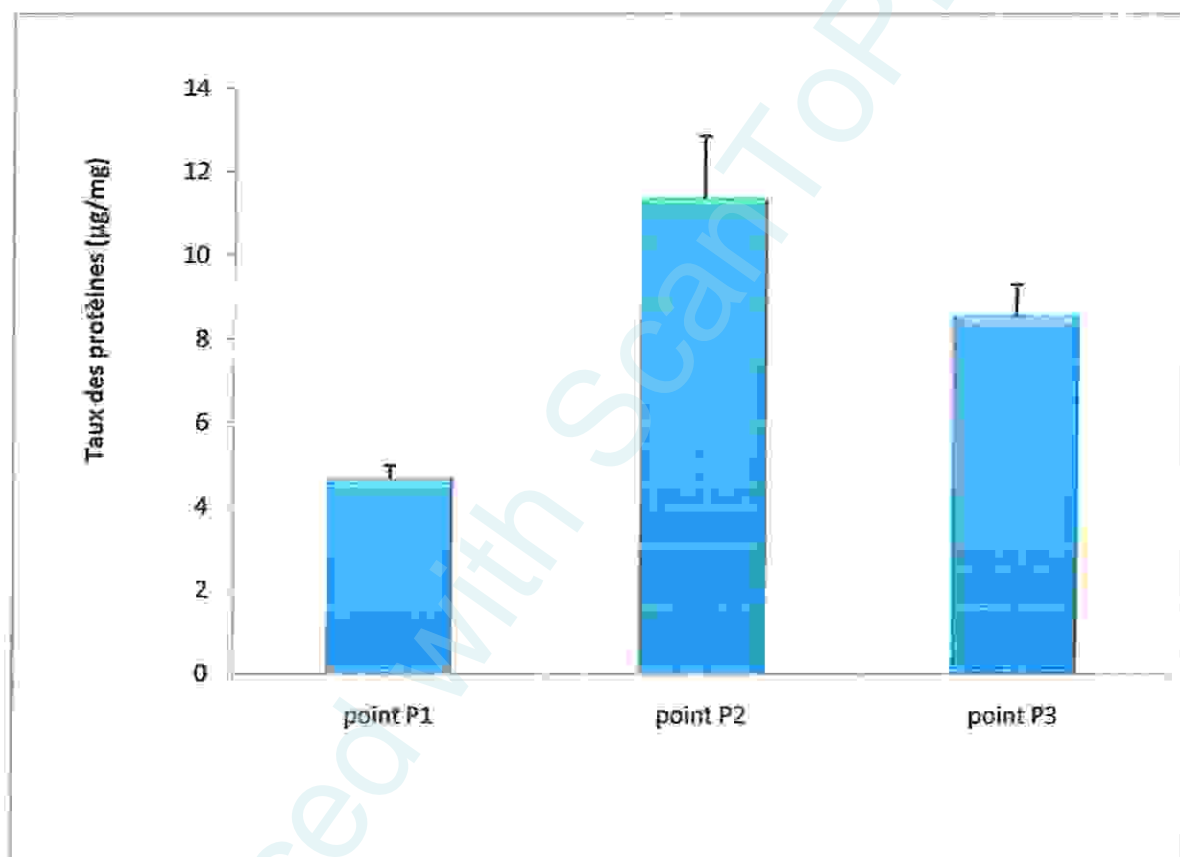
On note cependant un taux de croissance très faible observé avec les cellules traitées par le (point P2).

L'étude statistique montre que l'inhibition de la croissance observé avec les différents points de prélèvements est hautement significative ( $P < 0,001$ ).

### 3. Taux des Protéines totales :

#### 3.1. Effet des différents prélèvements sur le taux des protéines totales :

La figure 13 montre les variations des teneurs moyennes des protéines totales obtenus relativement au traitement des levures avec les différents prélèvements.



**Figure 13:** L'effet des effluents hospitaliers sur le taux des protéines totales de *saccharomyces cerevisiae*.

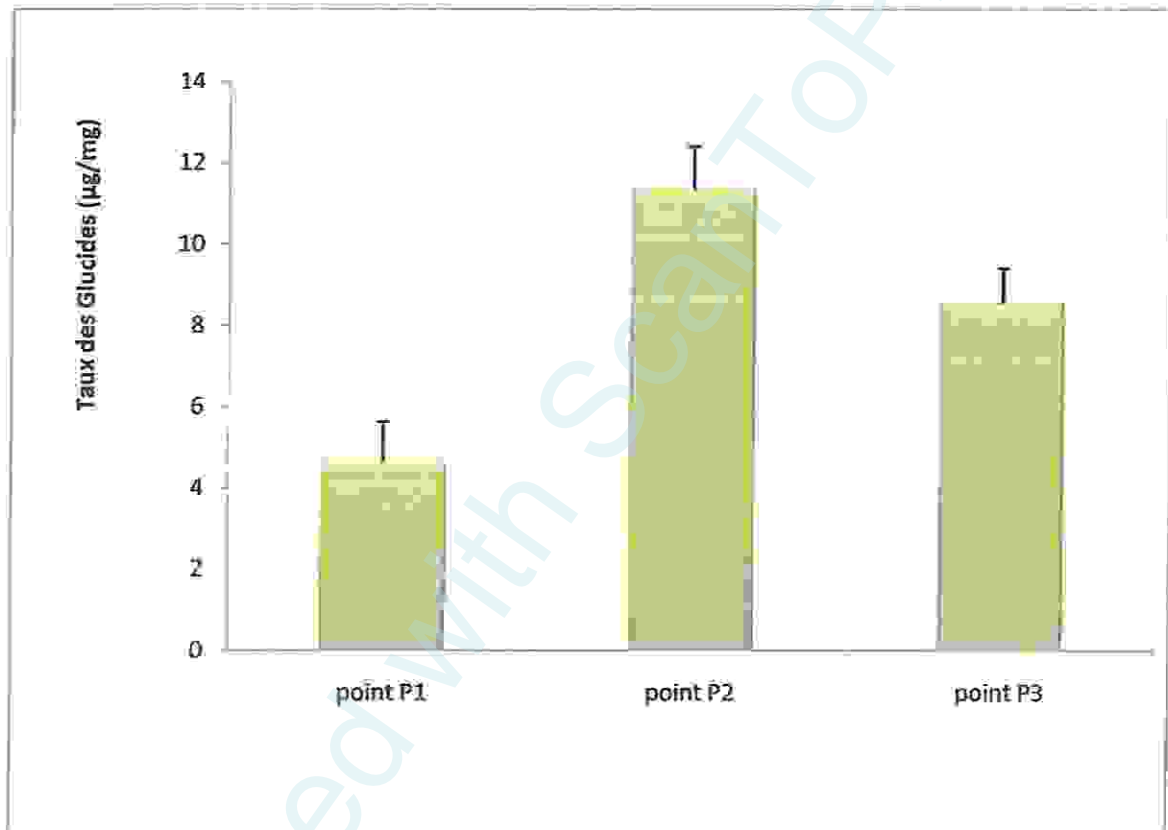
On note une augmentation du taux des protéines chez les cellules traitées avec les différents prélèvements, elle est d'environ (50%) pour le P2; Cependant elle est d'environ (23%) pour celles traitées avec P3.

L'analyse statistique montre que les différences entre les levures témoins et traitées sont significatives ( $P < 0,05$ ) ainsi que la corrélation enregistrée entre taux des glucides totaux et les différents prélèvements est très hautement significative ( $r = 0,999$ ;  $p < 0,001$ ).

#### 4. Taux des glucides totaux :

##### 4.1. Effet des différents prélèvements sur le taux des glucides totaux :

La figure 10 montre les variations des teneurs moyennes des glucides totaux obtenus relativement au traitement des levures avec les différents prélèvements.



**Figure 14:** L'effet des effluents hospitaliers sur le taux des glucides totales des de *saccharomyces cerevisiae*.

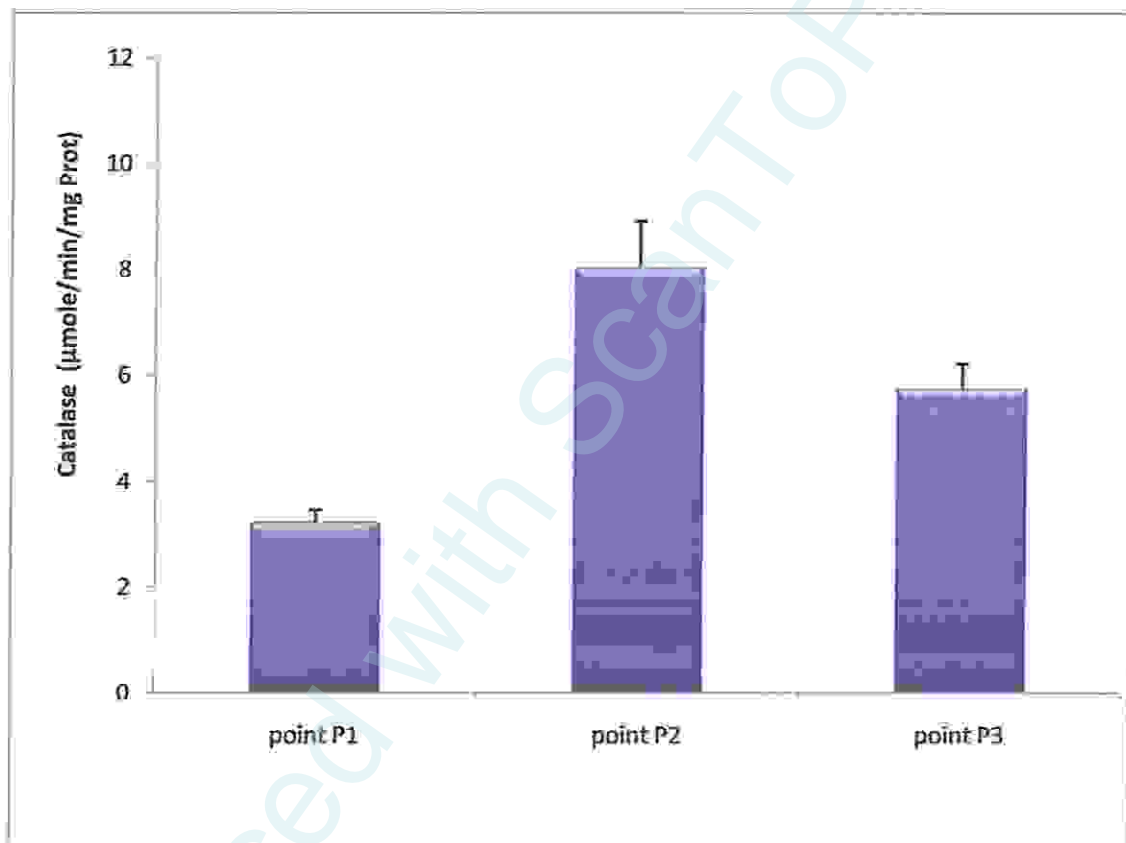
On note une augmentation du taux des glucides chez les cellules traitées avec les différents prélèvements, elle est d'environ (63%) pour le P2 ; Cependant elle est d'environ (35%) pour celles traitées avec P3.

L'analyse statistique montre que les différences entre les levures témoins et traitées sont significatives ( $p < 0,05$ ) ainsi que la corrélation enregistrée entre taux des glucides totaux et les différents prélèvements est très hautement significative ( $r = 0,999$  ;  $p < 0,001$ ).

## 5. L'activité catalase :

### 4.1. Effet des différents prélèvements sur l'activité catalase (CAT) :

Les résultats obtenus de l'activité CAT en fonction différents prélèvements sont représentés sur la figure 15.



**Figure 15:** L'effet des effluents hospitaliers sur l'activité catalase de *saccharomyces cerevisiae*.

On constate une forte augmentation de l'activité Catalase chez les levures traitées par le P2 puis tend à diminuer pour arriver à 4,56 µmoles/min/mg chez les cellules traitées par le P3.

Pour l'analyse statistique, nous observons que les différences enregistrées entre les témoins et traitées sont significatives ( $p < 0,05$ ).

## Discussion :

L'objectif de cette partie est d'analyser l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de PFE au regard des objectifs fixés au départ.

L'intérêt de notre travail est de démontrer l'intérêt de l'utilisation d'une approche multimarqueurs afin de mieux cerner les réponses biologiques, biochimiques et écotoxicologiques de souche à la contamination de l'écosystème aquatique par les effluents hospitalier.

Pour cela nous avons évalué l'expression de plusieurs biomarqueurs pouvant rendre compte du niveau de contamination.

L'ensemble des résultats, obtenus au cours de travail met en évidence l'utilité de cette approche multimarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'écosystème aquatique.

Le statut oxydatif des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) exposées aux différents prélèvements (P2 et P3) à été évalué en suivant la cinétique de croissance, l'activité catalase ainsi que les molécules biologiques pouvant être déstabilisés (protéine, glucides).

La combinaison de ces marqueurs nous révèle un état oxydatif très sérieux des *Saccharomyces cerevisiae* avec une altération très prononcée de la qualité du milieu aquatique.

### I. Pourquoi notre Choix de *Saccharomyces cerevisiae* comme bioindicateur de pollution par les effluents hospitaliers ?

Les levures sont de plus en plus utilisées en écotoxicologie de par leur faible coût et leur facilité de culture. Ce sont aussi des organismes unicellulaires eucaryotes dont le caractère diploïde (cas des levures *Saccharomyces cerevisiae*) les rapproche plus des espèces supérieures que les bactéries. Le génome complet de *Saccharomyces cerevisiae* est disponible depuis 1996. Génétiquement et physiologiquement, *Saccharomyces cerevisiae* est l'espèce la plus caractéristique, elle montre une complexité génétique intermédiaire entre les organismes eucaryotes supérieurs et les procaryotes. Plusieurs types de réponse après exposition des levures à des polluants peuvent être détectés (Fujita *et al.*, 1998; Haubenstricker *et al.*, 1990; Iwahashi *et al.*, 2000; Tomaská, 2000 ).

Cependant, la faible perméabilité des membranes cellulaires de *Saccharomyces cerevisiae* (De Nobe] *et al.*, 1991) entraîne une sensibilité aux agents cancérigènes et/ou mutagènes inférieures à celle des tests bactériens.

Terziyska *et al.*, (2000), ont donc essayé, par manipulations génétiques, d'augmenter la sensibilité des tests à base de *Saccharomyces cerevisiae* vis-à-vis des agents cancérigènes/mutagènes en augmentant la perméabilité cellulaire.

## 2. Quels sont les effets des effluents hospitaliers constatés sur les paramètres physiologiques de *S. cerevisiae* ?

### ➤ Action des effluents hospitaliers sur la croissance :

Nos résultats concernant l'effet des effluents hospitaliers sur des levures en culture, montrent l'effet inhibiteur et/ou perturbateur de la croissance de ces dernières avec un décalage dans l'évolution des courbes particulièrement au niveau du prélèvement P2.

### ➤ Action des effluents hospitaliers sur la viabilité :

A l'intérieur des cellules, le colorant est alors oxydé par les activités oxydo-réductases si les cellules sont encore actives. La coloration des cellules dépend donc de l'équilibre entre le flux de pénétration du bleu au travers des membranes et la vitesse d'action des enzymes cellulaires (Jones 1987).

## 3. Quels sont les effets des effluents hospitaliers sur le métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae* ?

### ➤ Action des effluents hospitaliers sur les protéines :

La teneur en protéines solubles totales est un test souvent utilisé pour mettre en évidence un stress chez un bioindicateur. En effet, lorsque les contraintes environnementales (stress hydrique, thermique, oxydant, exposition à une pollution, infection par des agents pathogènes...) sont fortes, la plupart des protéines subissent une dénaturation (Mohammadkhani et Heidari, 2008).

La structure des protéines ainsi que leur fonction peut être altérée par les ROS produites soit par le métabolisme cellulaire ou par des oxydants exogènes.

Dans notre travail, Le changement de profil de l'expression des protéines cytosoliques pourrait être considéré comme un biomarqueur précoce de l'exposition aux polluants chimiques. Cependant, l'identification de ces protéines s'avère nécessaire pour comprendre les mécanismes moléculaires de toxicité des polluants et mettre en place des nouveaux marqueurs spécifiques de toxicité.

#### ➔ Action des effluents hospitaliers sur les glucides :

Outre une augmentation des protéines, les taux moyens en glucides ont connus eux aussi une perturbation au cours du traitement, on constate une forte augmentation du taux moyen des glucides totaux en présence des différents prélèvements (P2 et P3).

Le mécanisme intervenant dans ce cas de figure reste encore mal connu, mais l'augmentation de ces molécules proviendrait d'une activation de leur dégradation par la glycolyse en vue d'une libération d'ATP nécessaire au métabolisme de détoxification cellulaire, que les mitochondries ne peuvent plus approvisionner suite à l'atteinte de la chaîne respiratoire.

#### 4. Quels sont les mécanismes mis en jeu pour la détoxification cellulaire chez *S. cerevisiae* ?

##### ➔ Action des effluents hospitaliers sur l'activité catalase :

Nos résultats montrent chez *S. cerevisiae* après une exposition aux effluents hospitaliers, une réponse dose-effet de l'activité CAT. Ceci ne permet pas d'établir clairement quels ont été les mécanismes moléculaires à l'origine des perturbations observées. Néanmoins, quelques hypothèses pourraient ouvrir des pistes mécanistiques de ces atteintes enzymatiques notées à des concentrations relativement importantes. Parmi ces mécanismes susceptibles d'expliquer les perturbations enzymatiques observées, nous aborderons successivement :

- L'altération des enzymes du fait de dommages oxydatifs.
- L'interaction directe du EH, avec ces macromolécules.

- La conséquence possible des interrelations avec d'autres acteurs du système antioxydant.

Comme il a été déjà mentionné, le suivi de l'activité CAT révèle une augmentation de cette dernière chez les cellules traitées, il est noté et déjà connu que *S. cerevisiae* possède deux catalases, Cta1, qui se localise dans le peroxysome, et Ctt1, qui est cytosolique. Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène en utilisant les propriétés redox d'un groupe hème complexé au polypeptide. Cta1 est supposé impliqué dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène généré par l'acyl-CoA oxydase au cours de bêta-oxydation d'acides gras au niveau du peroxysome (Hiltunen *et al.*, 2003).



# Conclusion et perspectives

Produced with Scantopdf

## Conclusion

Selon Hartemann *et al.*, (2005) : « Les hôpitaux sont certainement l'un des plus gros producteurs d'effluents chargés chimiquement et non soumis à des règles strictes d'épuration ». En 1998, Leprat rapportait déjà que : « Les effluents générés par l'activité hospitalière peuvent présenter en l'état un danger potentiel pour l'homme et son environnement compte tenu de la nature et de l'importance des substances spécifiques (résidus médicamenteux, réactifs chimiques, antiseptiques, détergents, révélateurs et fixateurs de radiographies...) qu'ils contiennent et en raison de leur évacuation, au même titre que les rejets urbains classiques, vers le réseau d'assainissement communal sans traitement préalable ».

Pourtant, aucune étude n'est aujourd'hui parvenue à une caractérisation détaillée (physicochimie, microbiologique et écotoxicologique) de ces effluents, ni à l'évaluation des risques écotoxicologiques liés à leur évacuation (au même titre que les rejets urbains classiques) dans le milieu naturel.

Ce mémoire de thèse s'inscrit dans la problématique de *l'évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets des effluents d'un hôpital de la ville de Bouchegouf* dans le réseau d'assainissement, puis du cours d'eau récepteur.

Dans le cadre de ce travail, nous sommes tout particulièrement interrogés sur la « caractérisation des effets » écotoxicologiques de ce type d'effluent. Les résultats obtenus nous permettent ainsi d'aboutir à une conclusion d'amélioration de gestion.

### ● *Conclusions d'amélioration de gestion :*

Le potentiel toxique des effluents hospitaliers révélé par ce travail de PFE, nous amène à formuler des propositions en vue de diminuer le danger lié au scénario étudié : la gestion de la pollution à la source et l'amélioration du dispositif d'assainissement.

### ● *Gestion de la pollution à la source :*

Les résultats obtenus nous incitent tout d'abord à recommander une amélioration de la gestion des substances utilisées et rejetées par les hôpitaux, en termes de :

- **Qualité** : Utilisation de produits peu toxiques quand cela est possible.
- **Quantité** : Utilisation et rejets de quantités minimales.
- **Traçabilité** : La connaissance des formulations, des substances et des quantités utilisées par chaque service permettrait une meilleure gestion de ces substances.
- **Information et de sensibilisation** du personnel hospitalier.

● ***Amélioration de l'assainissement :***

Nous proposons de **décanner les effluents et de gérer les flux**. La mise en place d'un bassin tampon réceptionnant l'effluent permettrait la décantation et la régulation des débits et limiterait ainsi de manière importante la pollution engendrée par l'effluent.

L'**installation de véritables STEP** peut également être envisagée. La mise en place de technologies spécifiques permettrait de traiter les micropolluants contenus dans les effluents tels que les résidus médicamenteux.

Les résultats obtenus nous ont ainsi conduits à un certain nombre d'interrogations qui donnent lieu aux perspectives de cette étude. Celles-ci sont développées dans les paragraphes suivants et devront être réalisées ultérieurement.

### *Perspectives*

En fin cette étude nécessite d'être approfondie afin de faire une bonne biosurveillance de la santé de tous les écosystèmes, et le maintien de la biodiversité dont l'importance n'est aujourd'hui méconnue de personne dans l'équilibre écologique.

Ce travail constitue une première étape dans le bilan de la contamination des eaux superficielles par des substances hautement toxique rejetées par les activités hospitalières.

L'étude des effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers.  
Caractérisation des effets des effluents hospitaliers vis-à-vis de différents organismes des écosystèmes aquatiques

Produced with ScanTopDF

Référence

Bibliographique

Produced by ScantOPDF

- Blanc A., 1999.** Analyse de cycle de vie des filières de traitement des sites industriels pollués. Thèse. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, , 209 p.
- Calleja M.C., Persoone G., Geladi P., 1993.** The predictive potential of a battery of ecotoxicological tests for human acute toxicity as evaluated with the first 50 MEIC chemicals. *ATLA – Alternatives to Laboratory Animals*, 21, pp. 330-349.
- Carey j., Cook p., Giesy j., Hodson p., Muir d., Owens w., Solomon k., (ed), 1998.** Ecotoxicological risk assessment of the chlorinated organic chemical. SETAC Pellston Workshop on Environmental Risk Assessment for Organochlorine Compounds; 1994 Jul 24-29; Aliston , Ontario, Canada. Published by the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola-Florida , 397 p.
- Casson l.w., Ritter m.od., Cossentino l.m., Gupta p., 1997.** Survival and recovery of seeded HIV in water and wastewater. *Water Environment Research*, Vol. 69, pp. 130-142.
- Coats J.R., Metcalf R.L., Lu P.Y., Brown D.D., Williams J.F., Hansen L.G., 1976.** Model ecosystem evaluation of the environmental impacts of the veterinary drugs Phenothiazine, Sulfametazine, Clopidol and Diethylstilbestrol. *Envir. Health Perspect.* , 18, pp. 167-179.
- Clotilde boillot , 2008.** Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques .Contribution à l'amélioration de la phase « caractérisation des effets », Lyon, 57-63p.
- Cullinan p., Hayes j., Cannon j., Madan i., Heap i., Newman-taylor a., 1992.** Occupational athma in radiographers. *Lancet*, 340, p.

- De Deken, R. H., 1966.** The crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of General Microbiology*, vol. 44, 149 - 156.
- Deloffre-Bonnamour., 1995.** N. Les rejets des établissements de santé : des effluents liquides aux déchets solides. Mémoire de Maîtrise, Université Claude Bernard-Lyon1, Institut Universitaire Professionnalis , Génie de l'Environnement-Ecod veloppement, Lyon, 75 p.
- Didier, P., 1996 .**Travaux pratique de biologie des levures, édition : Ellipses, Paris.
- Evens Emmanuel ., 2004.**  valuation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers. Thèse INSA de Lyon - Spécialité Sciences et Techniques du Déchet. Lyon: 37p.
- Flammarion P., Devaux A., Garric J., 2000 .** Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes continentaux. Exemples d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire. *Bull. Fr. Pêche Piscic*, 357/358, pp. 209.
- Foussereau J., 1985 .** L'eczéma allergique au glutaraldéhyde. *Doc Médecin Travail*, 23, pp. 13-14.
- Fujita, K., Iwahashi, H., Kawai R. and al ., 2000.** Hsp104 expression and morphological changes associated with disinfectants in environmental bioassay using stress response. *Water Science and Technology*, 1998, vol. 38, n 7, pp. 237-243. *In*: IWAHASHI H., FUJITA K. and TAKAHASHI Y. Bioassay for chemical toxicity using yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Water Science and Technology*, vol. 42, n 7, 269 - 276.

- Gadelle F., 1995. Le monde manquera-t-il bientôt d'eau? Sécheresse, vol. 6, pp. 11-15.
- Guay, P., 1999. Valorisation de résidus organiques par production de protéines d'origine unicellulaire. Thèse de maîtrise. L'Université Laval ,66p .
- Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC et Jørgensen SE., 1998 . Occurrence , fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. Chemosphere, Vol. 36, n° 2, pp. 357-393.
- Hartemann P, Hautemaniere A et Joyeux M., 2005 .La problématique des effluents hospitaliers. Hygiène, Vol. 13, n° 5, pp. 369-374.
- Haubenstricker, M. E., Meier, P. G., Mancy K. H., et al., 1990. Rapid toxicity testing based on yeast respiratory activity. Bull. Environm. Contam. Toxicol., vol. 44, pp. 669 - 674.
- Hiltunen, J.K., Mursula, A.M., Rottensteiner, H., Wierenga, R.K., Kastaniotis, A.J., Gurvitz, A.,2003. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Microbiol. Rev. 27 : 35-64.
- Iwahashi, H., Fujita, K. and Takahashi, Y., 2000. Bioassay for chemical toxicity using yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Water Science and Technology, vol. 42, n°7, pp. 269 - 276.
- J-Y .Leveau-M.Bouix ., 1993. Microbiologie industrielle, édition : Lavoisier, Paris.



- Kümmerer K, Steger-Hartmann T et Meyer M., 1997.** Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Res.*, Vol. 31, n° 11, pp. 2705-2710.
- Leprat P., 1999.** Caractéristiques et impacts des rejets liquides hospitaliers. *Techniques hospitalières*, Vol. 634, pp. 56-57.
- Lilius H., Hästbacka T., Isomaa B., 1995.** A comparison of the toxicity of 30 reference chemicals to *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. *Envir Toxicol. Chem.*, 14, pp. 2085-2088.
- Marlène, C., 2006.** Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la production intensive d'éthanol. Thèse de doctorat. L'institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 265 p .
- Mansotte F., 2000** Les rejets des établissements de santé. DDAS Seine-Maritime - Synthèse réalisé et complété sur la base du travail de F. Lebrun - Chargé d'études Environnement - Centre hospitalier du havre - CLIN - Club Environnement: 68p.
- Mansotte F et Jestin E., 2000.** Les rejets liquides des établissements de santé : Caractérisation à la source et impact sur l'environnement marin côtier. AESN, DDASS SEINE MARITIME. 24425 RM, Le Havre: 31p.
- Metcalf et Eddy. 1991.** *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse.* New York: McGraw- Hill Book Company. 3rd ed. 303p.

- Mihoub A., Chaoui A. and El ferjania A., 2005.** Biochemical changes associated with Cadmium and Copper stress in germinating pea seeds (*Pisum sativum* L.). *Comptes Rendus Biologies*, 238 (1), 33-41.
- Mohamm adkhani N., Heidari R., 2008.** Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. *Turkish Journal of Biology* 32 : 23-30.
- Mouret, J., 2006.** Modulation de la transition respiro-fermentaire chez *Saccharomyces cerevisiae* par l'oléate : analyse cinétique et métabolique en culture continue sur substrats mixtes. Thèse de doctorat. L'institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 175 p.
- Olivier, N., 2007.** Les effluents liquides hospitaliers : environnement et traitement Etude de cas de la blanchisserie et des unités de soins du Centre Hospitalier Universitaire de Dijon. 3-4 p.
- OMS (ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE), 1994.** Directives de qualité de l'eau de boisson, 2<sup>e</sup> ed., Vol. 1: Recommandations, OMS, Genève, p. 8-30.
- Rabiet M., 2006.** Contamination de la ressource en eau par les eaux usées dans un bassin versant méditerranéen - Apport des éléments majeurs, traces et terres rares. Thèse Université de Montpellier II. Spécialité Terre solide (géodynamique des enveloppes supérieures, paléobiosphère), Sciences de l'Eau dans l'Environnement Continental 368p.
- Schwartz T, Kohnen W, Jansen B et Obst U., 2003.** Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 43, n° 3, pp. 325-335.

**Terziyska, A., Waltschewa, L., and Venkov, P. A., 2000.** New sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. *Environmental Pollution*, vol. 109, 43-52.

**Thuriaux, P., 2004.** *Les organismes modèles la levure*, édition : Belin, Paris.

**Tomaska , L.,2000.** Mitochondrial protein phosphorylation : lessons from yeasts. *Gene*, vol. 255, 59-64.

Produced with ScanTopDF

**Sites d'internet :**

[1] : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces\\_cerevisiae](http://fr.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae) . Consulté le 25.03.2012

[2] : <http://www.maxisciences.com/levure/tout-savoir.html>. Consulté le 11.04.2012

[3] : <http://membres.multimania.fr/neb5000/BacteriologieII/IV%20-20Les%20Levures/Caracteristiques.htm> . Consulté le 11.04.2012

[4] : [http://www.utc.fr/~farges/dess\\_tbh/96-97/Projets/EL/EL.htm](http://www.utc.fr/~farges/dess_tbh/96-97/Projets/EL/EL.htm). Consulté le 28.03.2012

[5] : La pollution de l'eau par les médicaments / Laurent Thebault. 1991/92. Mémoire E.N.S.P. Consulté le 15.04.2012

[6] : Revue Française des Laboratoires, n 23, février 1992, p.101 à 106.  
- Les déchets de laboratoires hospitaliers - quels sont-ils? / F.Tissot-Gueraz et al.  
- Stockage et acheminement des déchets de laboratoires hospitaliers / F.Tissot-Gueraz et al.  
Consulté le 07.04.2012

Produced with Scantopdf

# Annexe

Produced with ScantOPDF

## Annexes

### Milieux de culture

Milieux non-sélectifs	Milieux sélectifs
Milieu ordinaire ( GN)	Gélose Sabouraud
Milieu BCP	(sélectif par pH acide, auquel on peut ajouter
Milieu à l'extrait de malt	du <i>chloramphénicol</i> ou <i>gentamicine</i>

#### 1- Gélose nutritive

- ▣ **Usage** : Milieu d'isolement courant surtout utilisé pour la recherche de FMAR (Flore Mésophile Aérobie Revivable)

- ▣ **Composition**

- extrait de viande 1,0g
- extrait de levure 2.5g
- peptone 5,0g
- chlorure de sodium 5,0g
- Agar 15,0g
- pH = 7,0

#### 2- Milieu BCP

- ▣ **Usage** : Dénombrement des coliformes des eaux.

- ▣ **Composition**

Dans un volume final d'un litre:

- Peptone : 5,0 g
- Extrait de viande de bœuf : 3,0 g
- Lactose : 10,0 g
- Pourpre de bromocrésol : 25 mg
- Agar : 15 g

(pH = 6,8)

### 3- Gélose à l'extrait de malt

- **Usage :** La gélose à l'extrait de malt est utilisée pour le dénombrement des levures et des moisissures dans les produits alimentaires et les produits pharmaceutiques. Elle convient également pour l'isolement et l'entretien des souches.
- **Composition**
  - extrait de malt 30,0 grammes
  - Agar 12,0 à 15,0 grammes (en fonction du fabricant)
  - pH = 5,5
- **Préparation :** 42 g de poudre par litre d'eau distillée. Porter à ébullition en chauffant doucement et en agitant jusqu'à ce que le milieu devienne d'un brun-rouge transparent. Autoclavage classique à 120°C pendant 15 à 20 minutes en fonction du fabricant. Laisser refroidir à 45-50°C au bain-marie avant utilisation

### 4- Gélose de Sabouraud

- **Composition**
  - Peptone 10 g
  - Glucose massé ..... 20 g
  - Agar-agar ..... 15 g
  - Eau distillée (qsp) ..... 1 000 ml
  - vitamines et facteurs de croissance
  - pH = 6,0
- **Caractéristiques**

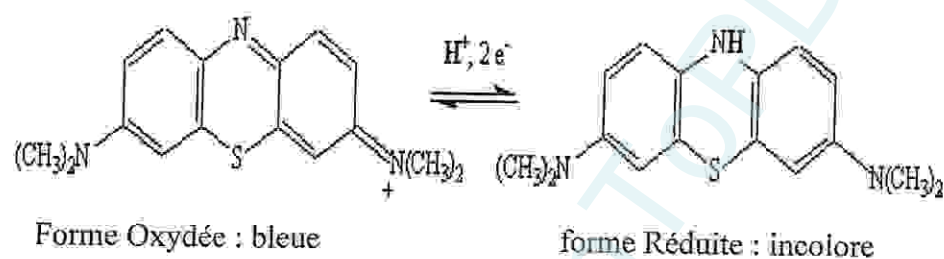
Naturellement acide, elle inhibe la croissance de nombreuses bactéries.

- **Ensemencement**

- Transférer l'échantillon à analyser sur le milieu.
- Étaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur en verre stérile.
- Incuber à 20 - 25 °C de 5 à 7 jours.

- **Bleu de méthylène**

Le bleu de méthylène est une molécule organique, qui peut exister sous les deux formes (cf. figure 10) : forme Oxydée : bleue forme Réduite : incolore



**Figure** : Molécule de bleu de méthylène sous forme oxydée et sous forme réduite. Cette molécule va réagir avec les activités oxydoréductases des cellules encore actives.



# Résumé

Produced with Scantopdf

**Résumé :**

Les substances chimiques utilisées dans les hôpitaux pour les activités de soins et pour la recherche médicale sont le plus souvent retrouvées dans les effluents liquides. Même si le volume élevé d'eaux usées généré par ces établissements, assure une dilution importante des polluants présents, le rejet de ces effluents dans le réseau d'assainissement communal ou dans le milieu naturel génère un risque pour la santé humaine, et représente une contribution significative à la contamination générale de l'environnement, et plus particulièrement des milieux aquatiques. Les contaminants les plus fréquemment rencontrés sont des micro-organismes pathogènes, des métaux, des radios isotopes, des détergents, des composés organohalogénés et des résidus de médicaments. L'objectif de ce travail était d'élaborer une méthodologie d'évaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés au rejet dans les milieux aquatiques des effluents hospitaliers. Une procédure a été élaborée : pour la gestion et l'évaluation des risques générés par le rejet des effluents hospitaliers, via un bio-essai (*Saccharomyces cerevisiae*) par le biais d'une étude toxicologique. Ainsi que les perturbations enregistrées au cours de l'évolution du cycle de reproduction à travers certains paramètres (croissance, l'activité enzymatique, les différents métabolismes,...). Les tests menés sur *S.cerevisiae* au laboratoire ont montré des variations au niveau des paramètres cités ci-dessus. Ces résultats nécessitent d'être vérifiés par des études complémentaires. Le scénario présenté conduit à une évaluation semi quantitative des risques. Il devra être amélioré sur certains aspects, particulièrement ceux concernant : l'activité enzymatique (GSH, ATP-ase ,...) et l'activité respiratoire.

**Mots-clés :** Effluents hospitaliers, *S.cerevisiae*, risques écotoxicologiques, biomarqueurs.

**Abstract :**

The chemical substances used in hospitals for care activities and medical research are generally found in the wastewater. Even if the high volume of generated wastewater by these establishments ensures an important dilution of the pollutants, the discharge of these effluents in the urban sewer network or in the natural environment generates risks for human health, and represents a significant contribution to the general contamination of the environment, and more particularly of the aquatic environments. The most important pollutants present in hospital wastewater pathogenic microorganism organohalogen compounds, such as the AOX (halogenated organic compounds absorbable on activated carbon), radioisotopes, detergents and pharmaceuticals. The aims of this study were to develop a methodology for human health and ecotoxicological risks' assessment of hospital wastewater. A process was elaborated for a good driving and evolution of risks generated by hospital effluents by a bioassay (*Saccharomyces cerevisiae*) used a toxicological study. As well as the disruptions recorded during the evolution of the reproduction cycle through some parameters (growth , enzymatic activity, metabolic.).The tests led on *Saccharomyces cerevisiae* to the laboratory showed some variations to the level of the above stated parameters. These results require to be verified by complementary studies. The script presented duct to an assessment semi quantitative of the risks. It should be improved on some aspects, particularly those concerning: the enzymatic activity (GSH, ATP-asc,...) and the respiratory activity.

**Key words:** Hospital wastewater, *Saccharomyces cerevisiae*, ecotoxicological, biomarkers.

## الملخص :

تهدف هذه الدراسة إلى إيجاد آلية فعالة قصد تقييم المخاطر الصحية و السمية البيئية المرتبطة أساسا بصب مجاري المستشفيات بالأنظمة المائية.

هناك طريقة تم استحداثها قصد التسيير و التقييم الخاص للمخاطر الناجمة عن صب المجاري من خلال الدراسة السمية على النموذج الحيوي (*Saccharomyces cerevisiae*) بواسطة التجارب الحيوية.

هناك أيضا الاضطرابات السمية المسجلة في الدورة التكاثرية وهذا من خلال معايير معينة (النمو، النشاط الإنزيمي، والتمثيل الغذائي،...). التجارب التي أجريت على *Saccharomyces cerevisiae* في المختبر أظهرت تغيرات على مستوى المعايير المذكورة أعلاه.

هذه النتائج لا بد من التحقق منها بإجراء المزيد من الدراسات. السيناريو المقدم أدى إلى التقييم شبه الكمي للمخاطر. وينبغي أن تعمق البحث في بعض الجوانب ، لاسيما تلك المتعلقة ب: النشاط الإنزيمي (GSH ، ATP-ase...) والنشاط التنفسي.

الكلمات المفتاحية : المجاري الاستشفائية ، السمية البيئية ، المؤشرات الحيوية .

*Saccharomyces cerevisiae*

Produced with Scantopdf