

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



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

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

Département: Biologie

Thème : : Étude du potentiel mutagène des boues résiduaires

Présenté par :

- Dafri Ghaniyya
- Kerdouci Khadra

Devant le jury composé de :

Président (e) : Mme. Boumaaza Awatif M.A.A

Examinatrice : Mme. Benhalima lamia M.A.A

Encadreur : Mme. Khallef Messaouda M.C.B

Université de Guelma

Université de Guelma

Université de Guelma

Juin 2016

Remerciements

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

Je remercie chaleureusement mon encadreur, Madame Khallelf Massaouda, pour ses judicieux conseils, ses directives précieuses, et de son soutien scientifique et moral au cours de la réalisation pratique et théorique de ce travail.

Je remercie aussi Madame Boumaaza Awatif. De nous avoir honorés de sa présence et d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de ce mémoire.

Je voudrais également remercier vivement Pr. Benouareth Djamel Eddine, pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

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

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

MERCI

Dédicaces

Je dédie ce travail :

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

d'amour et d'affection.

A mes frères :

karim, bilel, pour leur extrême serviabilité et compréhension.

A mes sœurs:

asma, nabila, mahdia.

À khadra mon binome.

A mes amies :

amel, mona, hana, jihen, nadira, Hoda, nasrine, hala, zahra.

A toute ma famille et surtout mes cousines :

*najiba, soad, zahra, wided, amina, salma, chaïma, imene et
nora.*

Et surtout mon fiancé lotfi.

A toute ma promotion.

Ghaniyya

Dédicaces

Je dédie ce travail :

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

A mes frères :

Mourad , said

A mes soeurs:

Izdihar ,Hayatte , Ahleme , Nesrine ,Zahra ,Halla,Basma,Asma

À Ghaniyya mon binome

Aux enfants

younes,oussama,chamsou, norhane,mouhamed elamine,mariame

A mes amies :

Asma ,sara ,Adnan

A toute ma famille et surtout mes cousines :

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

A toute ma promotion.

KHADRA

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction :1

Partie bibliographique :

Chapitre I : Les opérations de traitement des boues :3

1-Définition d'une boue d'épuration :.....	3
2-Les différents types des boues :.....	3
2-1-Les boues primaires :.....	3
2-2-Les boues secondaires :.....	4
2-3-Les boues mixtes :.....	4
2-4-Les boues physico-chimiques :.....	4
3-Traitements des boues :.....	4
3-1-Définition :.....	4
3-2-Objectifs :.....	5
4-Système de traitement des boues :.....	5
4-1-Lit de séchage :.....	5
4-2-L'épaississement :.....	6
4-3-La déshydratation :.....	6
4-4-Stabilisation des boues :	6
5-Destination finale des boues :.....	7
5-1-La mise en décharge :.....	7
5-2-Incinération :.....	7
5-3-L'oxydation par voie humide (OVH) :.....	8
5-4-Rejet en mer :.....	8
5-5-Valorisation agricole :.....	8

6-Les risques liés à la valorisation agricole des boues :.....	9
6-1-Les risques environnementaux :.....	9
6-2-Risque pour la santé humaine :.....	9
7-traitement aux nanoparticules d'argent :.....	9
7-1-Définition :.....	9
7-2-les effets sur la santé :.....	10
7-3-Les nanoparticules d'argent dans les boues d'épuration seraient nocives pour les micro-organismes du sol :.....	10
chapitre II : les testes de mutagénicité et génotoxicité :.....	12
1- Généralités :.....	12
2-Les types de tests :.....	12
2-1-Le test d'Ames :.....	13
2-1-1-Définition :.....	13
2-1-2-Principe :.....	14
2-1-3-Les souches bactériennes utilisées :.....	14
2-1-4-Avantages et inconvénients :.....	16
2-2-Test des comètes :.....	17
2-2-1-Définition :.....	17
2-2-2-Principe :.....	17
2-2-3-Avantages et Inconvénients :.....	18
2-3-Le test des micronoyaux :.....	19
2-3-1-Définition :.....	19
2-3-2-Principe :.....	19
2-3-3-Avantages et Inconvénients :.....	20
2-4-Echange de chromatides soeurs (SCE) :.....	20
2-4-1-Définition :.....	20
2-4-2-Principe :.....	21

2-4-3-Avantages et Inconvénients :.....	21
2-5-Le test d'aberration chromosomique :.....	21
2-5-1-Définition :.....	22
2-5-2- Principe :.....	22
2-5-3-Avantages et Inconvénients :.....	23
2-6-Le SOS chromotest :.....	24
2-6-1-Définition :.....	24
2-6-2-Principe :.....	24
2-6-3-Avantages et Inconvénients :.....	25
2-7-Autres tests :.....	26
2-7-1-Mutatox assay :.....	26

partie pratique:

chapitre I : matériel et méthodes:.....	27
1-Présentation et fonctionnement du site de prélèvement :.....	27
1-1-Présentation et localisation de la STEP :.....	27
1-2-Principe et fonctionnement du système de traitement :.....	27
2-Prélèvement des boues liquides :.....	28
3-Traitement des boues liquides aux nanoparticules d'argent:.....	28
4-Test de mutagenicité (test d'Ames) :.....	28
4-1-Principe du test :.....	28
4-2-Matériel biologique :.....	28
4-3-Confirmation des génotypes :.....	29
4-4-Activation des souches tests :.....	30
4-4-1-La préculture de nuit :.....	30
4-4-2-La culture de deux heures :.....	30
4-4-3-Le réisolement des souches tests :.....	30
4-4-4-Le stockage des souches :.....	30

4-5-la vérification des caractères :.....	30
4-5-la vérification des caractères :.....	30
4-6-Le test de mutagenèse par la méthode standard avec préincubation:.....	30
4-6-1-Principe :.....	31
4-6-2-Technique sans activation métabolique (-S9) :.....	32
4-6-3-Analyse statistique :.....	32
chapitre II : Résultats du test Ames:.....	33
1-Vérification des caractères génétiques :.....	33
2-Test de mutagenèse :.....	34
Conclusion :.....	37

Liste des figures :

Figures	Titres	Pages
Figure 1	les boues d'épuration.	3
Figure 2	Les différents types des boues d'épuration.	4
Figure 3	un lit de séchage.	6
Figure 4	Des nanoparticules observées par microscopie électronique.	10
Figure 5	Les différents types des tests de génotoxicité.	13
Figure 6	Le principe de test Ames.	14
Figure 7	Le principe du test des comètes.	18
Figure 8	Les principaux mécanismes d'apparition des aberrations de structures chromosomiques.	22
Figure 9	Le principe du SOS chromotest.	25
Figure 10	Configuration de la STEP de Guelma.	27
Figure 11	La réclamation de l'histidine.	33
Figure 12	L'effet de l'Ampicilline et du CV sur les souches d'Ames.	33
Figure 13	Les résultats de test Ames sur les souches <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 et TA100 sans activation métabolique et avec nanoparticule.	36

Liste des tableaux :

tableaux	titres	pages
Tableau 1	Les souches bactériennes du test d'Ames	16
Tableau 2	Génotype spécifique des souches TA98 et TA100	29
Tableau 3	Analyse Mutagénicité des boues liquides avec ou sans nanoparticules d'argent . typhimurium avec les souches TA98 et TA100 (-S9).	34

:

Liste des abréviations :

ACs	Aberrations chromosomiques.
ADN	Acide désoxy ribonucléique.
Al	Aluminium.
Ampi	Ampicilline.
ANs	Anomalies nucléaires.
APL	activité de la phosphatase alcaline.
Bio	Biotine.
β-gal	Galactosidase.
Br-dU	Bromodésoxyridine
C	Carbone.
Ca	Calcium.
CEN	Comité Européen de Normalisation.
CET	Centres d'enfouissement technique.
CTO	Composés traces organiques.
CV	Cristal violet.
DO	Densité optique.
ECVAM	European Center for the Validation of Alternative Methods
ECS	Echanges de chromatides sœurs.
ETM	Eléments traces métalliques.
Fe	Fer.
FI	facteur d'induction.
GN	Gélose nutritive.
HCl	Chlorure d'hydrogène.
His	Histidine.

HMN	Human MicroNucleus
IM	Indice mitotique.
LPS	Lipopolysaccharides.
MES	Matière en suspension.
Mg	Magnésium.
MMS	Méthyle méthane sulfonate.
MNx	Micronoyaux.
MO	Matière organique.
Ms	Matière sèche.
N	Azote.
NaCl	Chlorure de sodium.
NADP	Nicotine adenine dinucleotide phosphate.
NAg	Nanoparticules d'argent.
NaOH	Hydroxyde de sodium.
ONA	Office National d'Assainissement.
P	Phosphore.
pH	Potentiel d'hydrogène.
S	Soufre.
SFTG	Société Française de Toxicologie Génétique
STEP	Station d'épuration des eaux polluées
UV	Ultra-violet.

Résumé

Chapitre I :

Les opérations de traitement
des boues

Annexes

Chapitre I :

Matériel et Méthodes

Chapitre II :

Résultats et discussion

Conclusion

Introduction

Références bibliographiques

Chapitre II :

Les tests de génotoxicité et
mutagénicité

INTRODUCTION

Introduction :

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

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

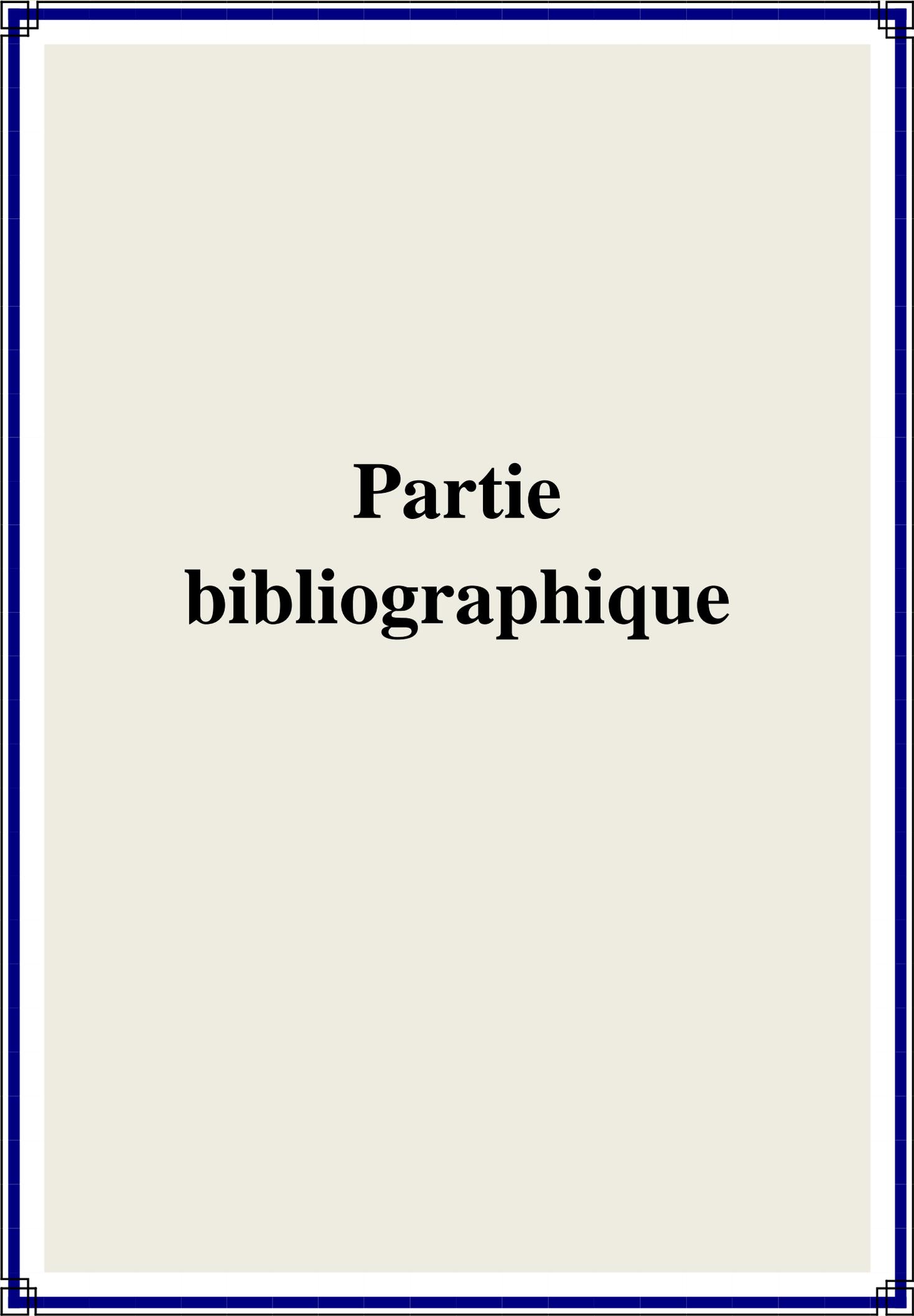
Cependant, les boues d'épuration sont riches en substances chimiques et en microorganismes dont les effets sont indésirables soit pour la conservation des sols, soit pour la qualité alimentaire des cultures, soit pour la santé de l'homme et des animaux. Elles peuvent également être chargées en divers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

C'est dans cette optique, un essai a été développés pour mettre en évidence la mutagénicité des boues liquides avant et après leur traitement (au nanoparticule d'argent). le test de mutagénèse chez les procaryotes (test d'Ames) par les souches TA 98 (détecent des mutations par décalage du cadre de lecture) et TA 100 (détecent des mutations de type substitutions de paires de bases), sans activation métabolique.

Notre mémoire est structuré en deux parties interdépendantes :

La première partie présente une synthèse bibliographique qui englobe deux chapitre

Chapitre I : consacré à la présentation Les opérations de traitement des boues avec la caractérisation de ces dernières. Le chapitre II : présente les tests l'un consiste à évaluer l'activité mutagène par le test d'Ames on utilisant deux souches de *Salmonella typhimurium* (TA98 et TA100) et l'autre pour évaluer la génotoxicité . La deuxième partie expérimentale porte sur les protocoles expérimentaux globaux de toutes les techniques employées qui sont détaillé dans le chapitre III, suivi des résultats obtenus ainsi que de leur discussion dans le chapitre IV, le mémoire est clôturée par une conclusion.



Partie bibliographique

Partie pratique

Les opérations de traitement des boues :

1-Définition d'une boue d'épuration :

Les boues sont définies par le Comité Européen de Normalisation (CEN) comme «un mélange d'eau et de matières solides, séparé par des procédés naturels ou artificiels des divers types d'eau qui le contiennent» (Fig. 1). Les boues sont issues du traitement des eaux usées domestiques ou industrielles. L'épuration de ces eaux usées s'effectue en différentes étapes selon des techniques basées sur des lois de la physique, de la chimie et de la biologie. Il en résulte une eau épurée que l'on rejette dans le milieu naturel et un résidu principal: les boues. Ce résidu est constitué de matières minérales inertes, d'azote, de phosphore et de matières organiques. En fonction du type d'effluents traité (eaux usées domestiques, agro-alimentaires ou industrielles), et des traitements effectués pour les eaux usées et les boues, la composition de ces dernières peut être différente (Adda Boucheikh A et Menouer A, 2014).



Figure 1 : les boues d'épuration (Fartas K *et al*, 2015).

2-Les différents types des boues :

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

2-1-Les boues primaires :

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

2-2-Les boues secondaires :

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

2-3-Les boues mixtes :

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

2-4-Les boues physico-chimiques :

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

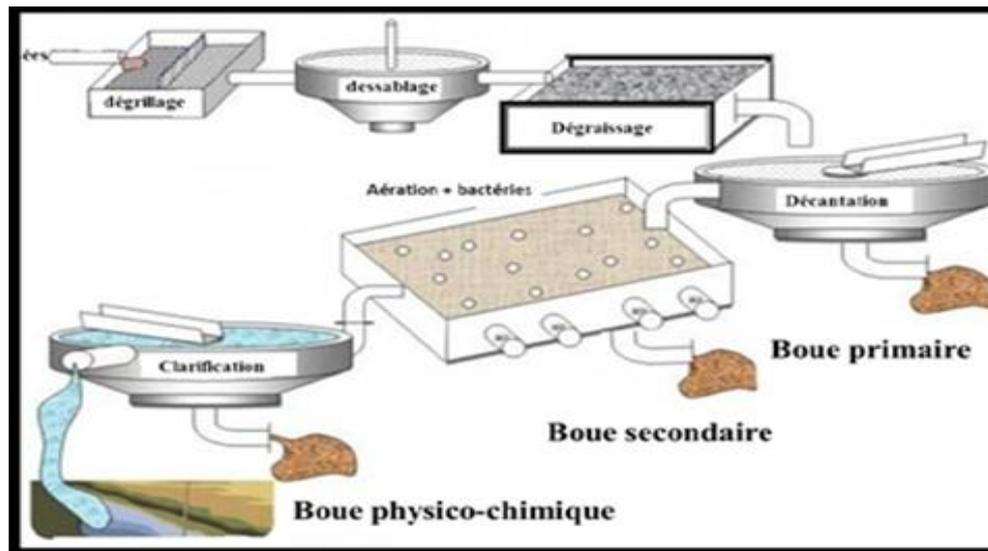


Figure 2 : Les différents types des boues d'épuration (1).

3-Traitements des boues :

3-1-Définition :

Le traitement des boues est défini comme l'ensemble des opérations visant à modifier les caractéristiques des boues en excès afin de rendre leur destination finale fiable et sans nuisance.

Les boues subissent des traitements de déshydratation et de stabilisation avant d'être rejetées dans le milieu naturel ou réutilisées à des fins agricoles ou énergétiques (Blondeau F, 1985).

3-2-Objectifs :

Quelle que soit la destination des boues, impose la mise en place d'une filière de traitement a pour but de :

- Réduire les volumes et éviter la fermentation (odeurs) ;
- Limiter au maximum les risques pathogènes ;
- Utiliser des procédés permettant de conserver une valeur aux boues ;
- réutiliser le produit (valoriser) ;
- Réduire, dans certains cas, la masse de façon ultime ;
- Modifier les caractéristiques de la boue afin de faciliter la séparation des phases solides et liquides ;
- Augmenter la siccité afin de rendre le produit solide ou pâteux (Koller E, 2004).

4-Système de traitement des boues :

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

4-1-Lit de séchage :

Pour des raisons d'hygiène et afin de ne pas créer des odeurs désagréables, on utilise des lits de séchage ; on élimine en grande partie ou, en totalité l'eau par évaporation : Soit par voie naturelle (lits de séchage) (Fig. 3) ; Soit par voie thermique. La technique des lits de séchage se pratique à l'air libre sur des boues liquides et combine l'évaporation naturelle et le drainage de l'eau libre à travers une couche filtrante de sable ou de graviers ; l'emprise au sol est de 1m² pour 4 à 5 habitants raccordés. Ce système extensif donne des boues solides à 35 – 40 % de siccité mais reste fort dépendant des conditions météorologiques.

Le séchage thermique permet une élimination quasi-totale de l'eau (siccité – 95 %) les boues obtenues sont pulvérulentes ou en granulés, mais en raison du coût énergétique, ce procédé reste peut utilisé (Ati S, 2009).



Figure 3 : un lit de séchage (Fartas K *et al*, 2015).

4-2-L'épaississement :

Il vise l'augmentation de la siccité (teneur en matière sèche) des boues sans pour autant modifier le caractère liquide de la boue, ce procédé peut se faire par voie gravitaire dans un concentrateur ou par des moyens mécaniques (égouttage – flottation – centrifugation) ; La siccité des boues ne dépasse pas 7% (Ati S, 2009).

4-3-La déshydratation :

Elle correspond en fait à une forte augmentation de la siccité, et modifier l'état physique des boues, celles ci passent de l'état liquide à l'état pâteux ou solide. Les filtres à bandes et les centrifugeuses donnent des boues plutôt pâteuses en raison de la performance de déshydratation qui plafonnent de 18 à 20 % de siccité pour la première famille de matériels, et de 20 à 25 % pour la seconde. Les filtres presses produisent par contre des boues de structures solides 30- 35 % de siccité, en conjuguant un conditionnement au lait de chaux et des pressions élevées (Ati S, 2009).

4-4-Stabilisation des boues :

Dans la stabilisation biologique, les boues primaires et les boues activées en excès sont souvent mélangées, elles présentent une tendance à la fermentation, on aère ce mélange avec l'air ou de l'oxygène, on assiste alors à une minéralisation de la matière organique en CO_2 , ce procédé permet l'élimination de certains parasites ; cette technique résume la digestion aérobie, tandis que pour la digestion anaérobie, et qui a bénéficié d'une grande publicité, permet une production des gaz combustibles , elle consiste à favoriser le développement des bactéries méthanifères qui agissent en anaérobie sur la matière organique en la décomposant en produisant le méthane, selon Maes, ce procédé peut être important pour certaines cultures lorsqu'on prévoit l'utilisation agricole.

La stabilisation non biologique ou chimique comporte la pasteurisation, et le traitement à la chaux. La pasteurisation consiste à l'injection de vapeur à une température de 80 ° durant 30 mn ; Les boues sont désinfectées mais non stérilisées.

Le compostage constitue un procédé particulier de stabilisation biologique aérobie il se réalise de préférence sur les boues déjà déshydratées, les boues compostées ont une structure solide (Ati S, 2009).

5-Destination finale des boues :

Les boues d'épuration peuvent être incinérées ou mises en décharge, mais on les utilise traitées principalement pour l'agriculture au même titre que les engrais et elles sont destinées vers d'autres filières. Ce sont les seuls sous-produits de traitement des eaux usées qui peuvent être réutilisés pour l'agriculture, mais il faut encore qu'elles répondent à certaines règles de qualité ce qui peut être dur à gérer car la qualité des boues d'épuration est liée à la qualité des eaux usées produites (Koller E, 2004).

5-1-La mise en décharge :

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

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

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

5-2-Incinération :

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

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

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

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

5-3-L'oxydation par voie humide (OVH) :

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

5-4-Rejet en mer :

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

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

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

5-5-Valorisation agricole :

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

La valorisation agricole des boues résiduelles peut être considérée comme le mode de recyclage le plus adapté pour rééquilibrer les cycles biogéochimique (C, N, P...), pour la

protection de l'environnement et d'un très grand intérêt économique. Elle vise à ménager les ressources naturelles et à éviter tout gaspillage de matière organique dû à l'incinération ou à l'enfouissement dans les décharges (Lambkin D *et al.*, 2004).

6-Les risques liés à la valorisation agricole des boues :

6-1-Les risques environnementaux :

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

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

- Transfert sol \ animal

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

- Transfert sol \ atmosphère

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

6-2-Risque pour la santé humaine :

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

7-traitement aux nanoparticules d'argent :

7-1-Définition :

Les nanoparticules concernent des matériaux et composants de très petite taille, dont au moins l'une des dimensions est comprise entre 1 et 100 nanomètres (un nanomètre correspond à un millionième de millimètre). En raison de leur taille, ces matériaux peuvent interagir plus particulièrement avec les cellules et les tissus humains. L'évaluation de l'impact éventuel des nanoparticules sur la santé humaine est un processus en cours (2).

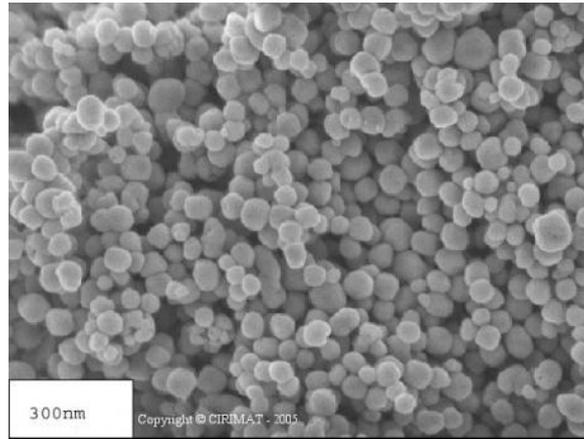


Figure 4 : Des nanoparticules observées par microscopie électronique (3).

7-2-les effets sur la santé :

La toxicité de l'argent, notamment des nanoparticules d'argent, pour l'homme est généralement faible. L'une des principales sources d'exposition des humains aux nanoparticules d'argent consiste en un contact de la peau avec des textiles. En général, les produits de consommation ne libèrent que de petites quantités d'argent, ce qui ne donne pas lieu à des effets significatifs sur la santé (4).

7-3-Les nanoparticules d'argent dans les boues d'épuration seraient nocives pour les micro-organismes du sol :

Les propriétés antibactériennes des nanoparticules d'argent (NAg) sont de plus en plus utilisées dans une gamme de matériaux et de produits de consommation (ex. plastiques textiles, revêtements de surface, cosmétiques). Comme leur utilisation est en augmentation elles sont donc plus susceptibles d'être rejetées dans l'environnement. Si c'est le cas, elles pourraient avoir des effets néfastes sur les bactéries et autres organismes vivants des différents milieux.

Des chercheurs allemands ont étudié les préoccupations par rapport à la présence potentielle de NAg dans les rejets ou les eaux usées, car les centres de traitement ne sont généralement pas conçus pour éliminer les NP. Les boues d'épuration pourraient donc contenir des NAg et dans de nombreux pays, ces boues d'épuration sont séchées et épandues comme engrais sur les terres agricoles.

Les chercheurs ont étudié plus précisément les effets des NAg intégrées dans les boues d'épuration sur les microorganismes du sol. Ils ont exploré d'abord les effets des NAg quand elles sont appliquées sous forme pure (sans mélange avec des boues d'épuration). Ils ont

déterminé que les bactéries essentielles au cycle naturel de l'azote ont été de plus en plus inhibées en 28 jours d'essais. La taille globale des populations microbiennes, en termes de biomasse, a diminué au cours de cette période.

Ils ont ensuite évalué les effets à long terme des NAg lorsqu'elles sont incorporées dans les boues d'épuration. Les échantillons de boue ont été traités en laboratoire selon les protocoles standards utilisés dans les centres de traitements. Les chercheurs ont comparé également les effets des NAg avec ceux du nitrate d'argent sous sa forme standard étant donné que l'argent avait déjà été identifié comme étant toxique pour les micro-organismes .

Plus de 90 % des NAg et la quasi-totalité des ions d'argent ont été absorbés par les boues de décantation. Ceci implique que le processus de traitement des eaux usées n'a pas éliminé la majorité des NP ou des ions. Quand la boue contaminée a été testée sur des échantillons de sol pour plus de 140 jours, les chercheurs ont constaté des effets similaires à ceux qui avaient eu lieu dans les premiers tests de 28 jours avec les NAg pures.

À des concentrations qui seraient pertinentes pour les applications réelles de boues d'épuration en agriculture en Allemagne, les chercheurs ont constaté que la concentration prévisible sans effet de NAg dans le sol (*la plus forte concentration en dessous de laquelle on s'attend à ce qu'aucun effet nocif ne se produise*) était de 0,05 mg/kg de sol sec. Cela équivaut à une quantité maximale de 30 mg/kg de boue sèche à chaque application au champ.

Les NAg n'étant pas très mobiles dans le sol, et avec des applications répétées de boues contenant des NAg, elles sont susceptibles de s'accumuler dans le sol et de devenir une source d'argent biodisponible.

Les chercheurs concluent donc que l'absorption des NAg dans les boues d'épuration et leur durée de vie dans le sol peuvent provoquer des effets toxiques sur les micro organismes du sol de l'écosystème terrestre (5).

les testes de mutagénicité et génotoxicité :

1- Généralités :

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

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

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

2-Les types de tests :

Pour évaluer le potentiel génotoxique d'une molécule ou d'une famille de molécules des tests *in vitro* ont été développés. Ces tests ont permis de démontrer le caractère génotoxique d'un grand nombre de polluants chimiques principalement de nature organique les nitrosamines, quelques pesticides, quelques solvants organiques Les tests utilisés dans le domaine des mutations géniques permettent de déceler trois types d'effet: la substitution l'addition ou la délétion de nucléotides à l'intérieur d'un gène.

Ceux utilisés pour détecter des mutations chromosomiques mettent en évidence les cassures ou les réarrangements chromosomiques impliquant un ou plusieurs chromosomes.

Les tests portant sur les mutations génomiques décèlent les modifications du nombre de chromosomes ou aneuploïdie. Depuis, plus de 200 tests ont été mis au point pour déceler les mutations sur l'ADN (Fig. 5) avec leurs avantages et inconvénients. Divers test ont été utilisés sur les boues avec des modèles procaryotes comme :

- Le test de mutation réverse sur des bactéries *Salmonella thyphimurium* (Test d'Ames) (Amari S et Berkane S, 2015)

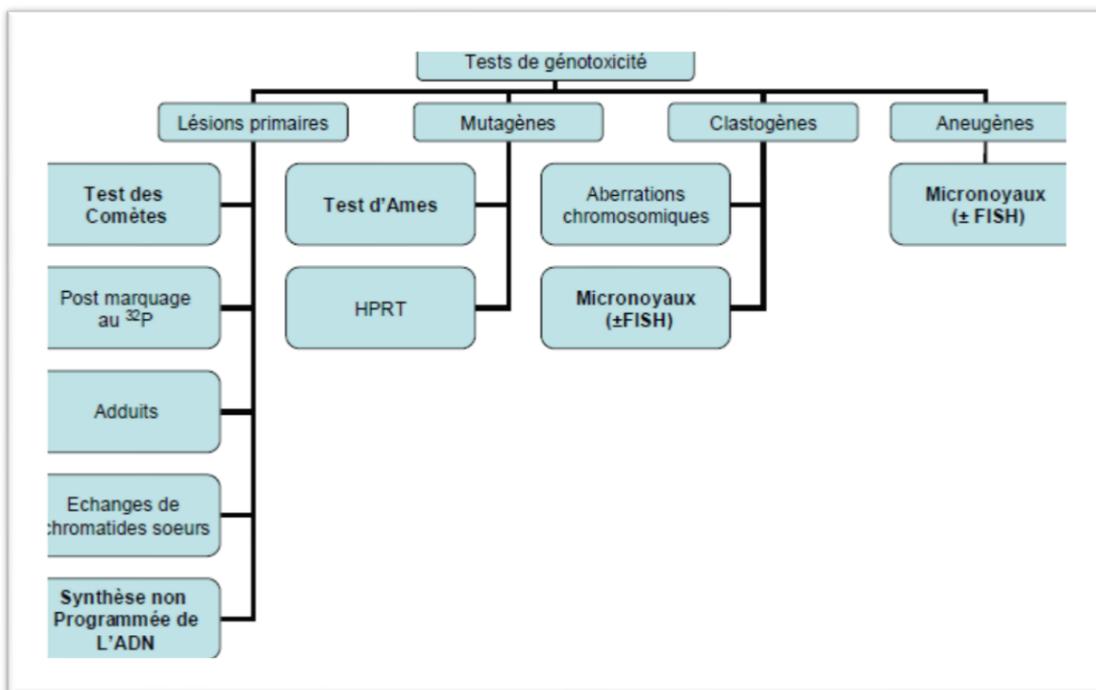


Figure 5 : Les différents types de tests de génotoxicité (6).

2-1- Le test d'Ames :

2-1-1-Définition :

Décrit dans une série de publications au début des années 70 par Bruce Ames et son équipe de l'Université de Californie à Berkeley ,le test d'Ames consiste à examiner si une Substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella thyphimurium* (Fardel O *et al.*, 2009).

2-1-2-Principe :

Le principe de ce test repose sur différentes souches bactériennes de *Salmonella typhimurium* ces souches utilisées dans le test sont des souches porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation His⁻ rend les souches incapables de se développer sur un milieu sans histidine. Avec une fréquence très faible, ces mutations His⁻ reversent spontanément vers His⁺: les cellules retrouvent leur capacité à croître sur un milieu dépourvu d'histidine. Cette fréquence de réversion peut augmenter en exposant les bactéries His⁻ à des agents mutagènes. Ainsi, le test d'Ames permet de quantifier l'induction de ces mutations réverses His⁺ (Mortelmans k et Zeiger E, 2000) (Fig. 6).

Le test évalue alors la capacité de la substance toxique à induire une nouvelle mutation dans cette même région de l'ADN qui se traduira par la réversion de l'autotrophie de la souche bactérienne vis-vis de l'histidine. Le nombre de clones bactériens His⁺, dits révertants ayant poussé au bout de 48 h sur le milieu de culture dépourvu d'histidine, est proportionnel au pouvoir mutagène de la substance testée (Amari S et Berkane S, 2015).

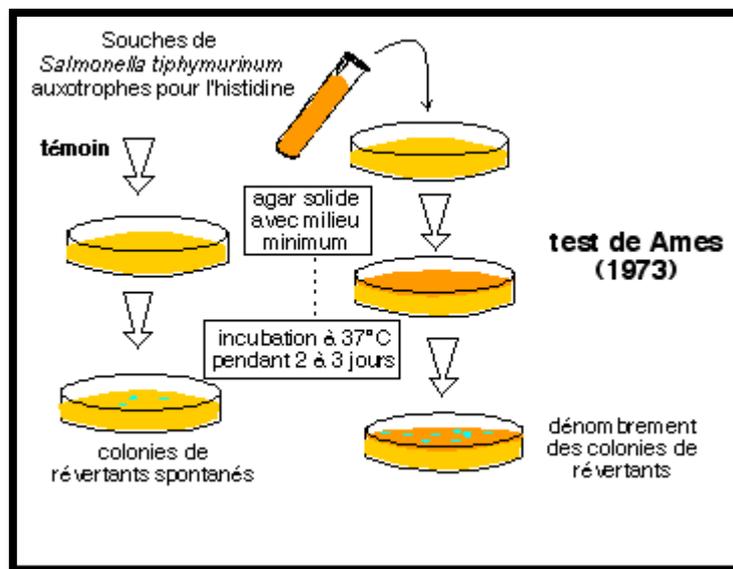


Figure 6 : Le principe de test Ames (7).

2-1-3-Les souches bactériennes utilisées :

En fonction des souches utilisées pour la réalisation du test, différents types de mutations peuvent être détectées, les souches bactériennes de nature génétique différente utilisées sont porteuses de mutations His⁻ différentes qui permettent de tester des agents mutagènes variés.

En plus de ces mutations spécifiques sur l'opéron His, ces souches possèdent des caractères génétiques qui permettent d'augmenter leur sensibilité à l'agression génotoxique (Tableau 1).

- **Mutation hisD 3052** : mutation dans TA1538 et TA98, ces bactéries sont déficientes à l'enzyme histidinol déshydrogénase. La TA1538 et sa dérivée r-factor TA98, détectent des mutagènes de type «frameshift». Cette mutation à la séquence (-CGCGCGCG-), est révertée par les frameshift (-GCGCGCGC-) mutagènes tel que 2- nitrosofluorène et le daunomycine ce qui conduit à la restauration du cadre de lecture correct pour la synthèse de l'histidine.
- **Mutation hisG 46** : mutation présente dans TA100 et TA1535, ces bactéries sont déficientes à la première enzyme qui entre dans la synthèse de l'histidine. Elle est déterminée par la séquence (-GGG- -CCC-) La TA1535 et sa dérivée R-factor TA100, détectent les mutagènes qui causent des substituants de paires de bases.
- **Mutation hisC 3076** : C'est une mutation frameshift dans TA1537, elle n'est pas séquencée mais il est connu qu'elle contient une cytosine de plus dans une série d'au moins 4 cytosines.
- **Mutation rfa**: cette mutation cause la perte partielle des polysaccharides à la surface de la barrière cellulaire de la bactérie ce qui augmente sa perméabilité aux grandes molécules qui sont incapables de pénétrer dans la cellule normale.
- **Mutation uvrB** : c'est une délétion du gène codant pour le système de réparation «excision resynthèse», conférant une augmentation de la sensibilité à la détection des mutagènes. Pour des raisons techniques la délétion du gène uvrB s'étend jusqu'au gène bio et par conséquent, la bactérie est aussi auxotrophe à la biotine pour croître.
- **Plasmide pKM 101** : Ce plasmide porte le gène de résistance à l'ampicilline (R-Factor), il est présent dans les souches TA98 et TA100. Ces souches portant le facteur de résistance se révertent par des mutagènes qui sont faiblement détectés par les autres souches. pKM 101 qui contient deux gènes amplifiant le processus SOS de réparation responsable de la mutagenèse induite (Maron D et Ames B., 1983).

Souches	Gènes affectés	Mutations additionnelles			Type de mutation
		réparation	LPS	plasmide	
TA 1535	His G46	uvrB-	rfa	-	substitution
TA 1537	His C3076	uvrB-	rfa	-	frameshift
TA 1538	His D3052	uvrB-	rfa	-	frameshift
TA 97	His O1242 His D6610	uvrB-	rfa	pKM 101	frameshift
TA 98	His D3052	uvrB-	rfa	pKM 101	frameshift
TA 100	His G46	uvrB-	rfa	pKM 101	substitution
TA 102	His G428	+	rfa	pKM 101 (PAQ1)	substitution

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

2-1-4-Avantages et inconvénients :

Ce test présente les avantages suivants :

- Il s'agit du test le plus ancien, le plus étudié, avec des résultats d'essais disponibles pour un grand nombre de substances employées dans l'industrie, qui permettent de choisir ce test à bon escient.
- Simplicité, rapidité de réalisation et faible coût.
- Reproductibilité.
- Faisabilité, car seul un échantillon urinaire est nécessaire : il est de ce fait non invasif.
- Réalisation d'un screening de toutes les substances auxquelles est soumis l'individu dans les 72 heures qui ont précédé. Cet essai possède une bonne sensibilité, aux dépens d'une spécificité médiocre (Pillière F et Falcy M, 1991).

Ce test présente les inconvénients suivants :

- On peut collecter des résultats variables, et parfois même contradictoire, pour des travailleurs de mêmes secteur professionnel ceci peut s'expliquer par l'action notable de facteurs de confusion, tels les médicaments (chimiothérapie, antiseptiques urinaires). L'alimentation ou surtout la consommation de tabac, par l'utilisation de

méthodologies d'essai différentes, et aussi par la variabilité des expositions dans un même secteur professionnel.

- La moitié seulement des substances mutagènes connues qui ont été testées se sont révélées mutagènes avec le test d'Ames. Un résultat négatif ne doit donc pas être considéré comme pleinement rassurant.
- A quel moment doit-on considérer le test comme positif : à partir du doublement du taux de mutagenicité par rapport aux témoins. Ou à partir de la signification statistique (seul différentiel suffisamment élevé) de ce taux. Cette méthode rend le niveau d'exposition difficile à définir (Pillière F et Falcy M, 1991).

2-2-Test des comètes :

2-2-1-Définition :

Cette technique d'électrophorèse des noyaux de cellules isolées en gel d'agarose, sur Lames de microscope, en conditions alcalines, rencontre un intérêt certain à l'heure actuelle car elle permet la mesure du degré de dommages à l'ADN au sein d'une population cellulaire et non au niveau tissulaire comme la plupart des autres techniques d'étude des dommages à l'ADN (Sébastien L, 2004).

2-2-2-Principe :

Le dosage fonctionne sur le principe que la rupture des brins de l'ADN double brin surenroulé conduit à la réduction de la taille de la molécule de grande taille et de ces brins peut être étiré par électrophorèse. En outre, dans des conditions fortement alcalines il y a dénaturation, le déroulement de l'ADN duplex et d'exposition des sites labiles alcalins comme cassures simple brin. Le Comètes (Fig. 7) montre les extrémités cassées de la molécule d'ADN chargé négativement deviennent libres de migrer dans le champ électrique vers l'anode

Deux principes de la formation de la comète sont les suivants:

1. La migration de l'ADN est une fonction de la taille et le nombre d'extrémités brisées de l'ADN
2. La longueur de la queue augmente avec des dommages au départ, puis atteint un maximum qui dépend des conditions électrophorétiques, et non la taille des fragments (8).

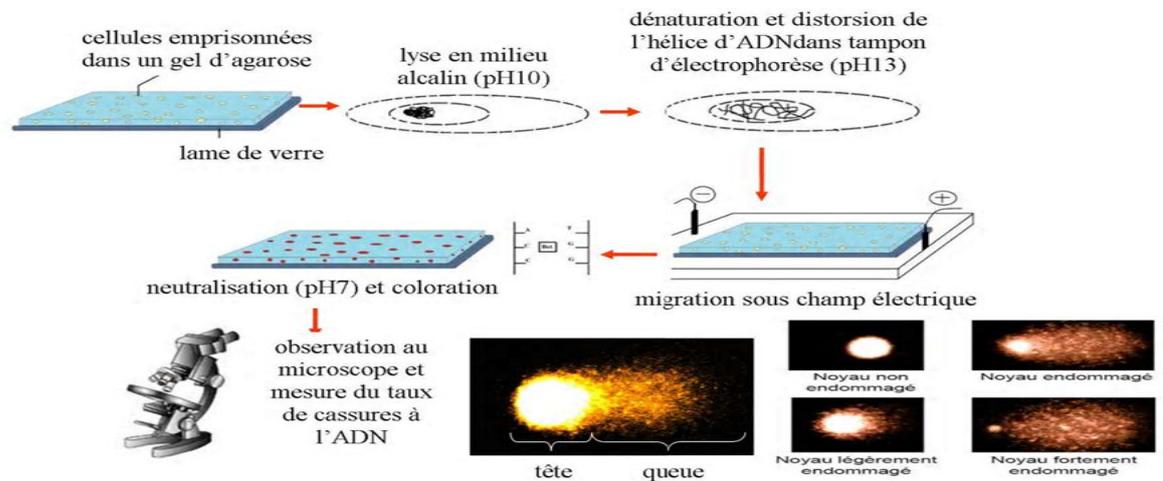


Figure 7 : Le principe du test des comètes (Michel C, 2011).

2-2-3-Avantages et Inconvénients :

Ce test présente un certain nombre d'avantages :

- Test rapide, simple, sensible
- Nécessite peu de cellules (10⁴ à 10⁶ cellules)
- Applicable à un grand nombre de types cellulaires (animales, végétales, sanguines, épithéliales...) de tissus et d'organismes Organo spécificité.
- Domaines d'applications très nombreux.
- Ne nécessite pas de division cellulaire.
- Ne nécessite pas l'utilisation de radioéléments.
- Accepté par les autorités d'enregistrement comme test complémentaire (Sébastien L, 2000).

Ce test présente les inconvénients suivants :

- Informations sur des cellules isolées.
- Niveau de bruit de fond généralement élevé chez les organismes exposés in situ.
- Outil qui ne recherche pas les aspects fondamentaux des dommages à l'ADN ni la réponse de la cellule à ces dommages.
- Nécessité de travailler sur une suspension cellulaires la digestion enzymatique (trypsine) des tissus ou la récupération des cellules en culture par grattage (scraping) peuvent provoquer des dommages supplémentaires (Sébastien L, 2004).

2-3-Le test des micronoyaux :

2-3-1-Définition :

Le test de numération des micronoyaux sur cellules binucléées (ou en anglais «*Cytokinesis Block Micronucleus assay* ») représente un moyen d'évaluer les mutations chromosomiques de structure et de nombre. Le test des micronoyaux (MNx) a été proposé par Countryman et Heddle (1976) pour détecter les dommages génétiques chimio- ou radio-induits. Il s'agit d'un test adapté à la mise en évidence de remaniements génomiques consécutifs à des cassures chromosomiques ou à des altérations des protéines se traduisant par des anomalies chromosomiques quantitatives. Son protocole aisé, son interprétation non ambiguë et son coût modéré expliquent l'utilisation sans cesse croissante de ce test qui, de surcroît, est particulièrement indiqué dans la détermination des événements aneugènes et clastogènes (Carine D, 2010).

2-3-2-Principe :

Le principe du test des micronoyaux consiste à mettre en évidence des anomalies chromosomiques de nombre et/ou de structure par la détermination et le dénombrement, au sein d'une population cellulaire en interphase, de cellules présentant une ou plusieurs entités nucléaires indépendantes du noyau principal. Le test des MNx a fait l'objet d'une étude multicentrique pilotée par la Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) validant son aptitude à rendre compte des propriétés aneugènes et/ou clastogènes de divers agents génotoxiques connus. Ces résultats, associés à bien d'autres travaux conduisent à recommander l'application du test des MNx dans la détermination *in vitro* des capacités de composés à induire des dommages chromosomiques. Le test des MNx a d'ailleurs été validé par l'ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) et son protocole en version finale par les directives de l'OCDE.

Le test des MNx a par ailleurs fait l'objet de puis quelques années d'une large étude internationale, intitulée *The Human MicroNucleus (HUMN) Project*.

Il a été validé quant à sa capacité à détecter les effets de faibles doses de rayonnements ionisants tant *in vitro* qu'*in vivo*. Ce test appliqué dans des études *in vitro* a pour but de détecter la génotoxicité d'un agent physique ou chimique ; dans ce cadre, l'agent à tester est incorporé au cours de la division cellulaire générant un micronoyau. Appliqué dans des études *in vivo*, Il est employé dans de nombreuses études de biosurveillance, notamment

auprès de populations exposées aux rayonnements ionisants au niveau environnemental ou professionnelle (Carine D, 2010).

2-3-3-Avantages et Inconvénients :

Ce test présente un certain nombre d'avantages :

- La numération des MNx, qui se fait en interphase, représente un moyen fiable d'évaluer les anomalies chromosomiques de nombre et de structure (\pm FISH).
- Ce test est rapide (avec toutefois le temps de culture cellulaire) et simple avec un comptage relativement facile.
- Son coût est peu élevé.
- Il permet de comptabiliser les cellules en apoptose, en nécrose ainsi que les ponts nucléoplasmiques et les bourgeons nucléaires.
- Il est applicable à plusieurs types cellulaires.
- Sa puissance statistique est bonne en raison du grand nombre de cellules comptées. (Carine D, 2010).

Ce test présente les inconvénients suivants :

- Le test des MNx ne permet pas cependant de détecter toutes les anomalies chromosomiques de structure ; seuls les fragments acentromériques sont mis en évidence, tandis que les aberrations plus subtiles (translocations) ne peuvent être détectées que par l'analyse des chromosomes en métaphase.
- Les MNx ne peuvent s'exprimer qu'après une division cellulaire, ce qui rend le test applicable seulement à des cellules qui se divisent (Carine D, 2010).

2-4-Echange de chromatides soeurs (SCE) :

2-4-1-Définition :

Ce test analyse des anomalies chromatidiennes survenant en réponse à l'exposition à un génotoxique . Les échanges de chromatides soeurs entre chromosomes découlent de cassures dans l'ADN et de la réversion des fragments brisés à une position presque équivalente après échange entre les deux chromatides soeurs d'un même chromosome et par conséquent leur formation dépend de la phase S du cycle cellulaire ou des processus de duplication de l'ADN. Les génotoxiques ou agents clastogènes augmentent la fréquence de SCE par cellules, ce qui serait lié à une action sur la réparation au cours de la phase S (Fardel O *et al.*, 2009).

2-4-2-Principe :

Les cellules, le plus souvent des lymphocytes, sont mises en culture dans un milieu contenant de la bromodésoxyridine (Br-dU) qui s'incorpore dans l'ADN chromosomique pendant deux cycles cellulaires. Les chromatides-sœurs, en cas des échanges, sont marquées différemment. Après traitement par un inhibiteur du fuseau comme la colchicine afin d'accumuler les cellules en métaphase, celles-ci sont récoltées et les chromosomes sont préparés par des méthodes cytogénétiques standard.

Au moins 25 métaphases sont analysées en microscopie optique. Pour toutes les cultures, le nombre d'ECS par métaphase et le nombre d'ECS par chromosome sont données séparément.

Le processus d'échange implique probablement une cassure et une réunion de l'ADN, bien que l'on sache peu de choses de sa base moléculaire. Les ECS sont formés pendant la phase de réplication et persistent après culture des cellules. Les milieux biologiques les plus utilisés sont les lymphocytes sanguins (Pillière F et Falcy M, 1991).

2-4-3-Avantages et Inconvénients :

Ce test présente un certain nombre d'avantages :

- Un test plus sensible que la détection des aberration chromosomiques.
- Les ECS persistent pendant quelques semaines et sont le témoin d'une exposition récente, ce qui permet de suivre des sujets même s'ils ont été antérieurement exposés à d'autres génotoxiques ou d'évaluer les effets de mesures de prévention (réduction ou disparition de l'exposition à des cancérogènes) (Pillière F et Falcy M, 1991).

Ce test présente les inconvénients suivants :

- Une technique lourde, difficile à mettre en place en routine, mal standardisée, qui pour l'instant reste du domaine de la recherche.
- L'absence de spécificité du test en raison de facteurs de confusion comme le tabac, l'alcool, l'alimentation et les infections qui augmentent le taux d'ECS.
- L'absence de seuil à partir duquel le test est considéré comme positif ; le résultat doit être comparé à celui d'un groupe témoin car le taux normal d'ECS dans la population générale n'est pas clairement défini.

- Une variabilité importante des résultats, en partie liée à l’instabilité des ECS, mais aussi au fait que les chromosomes porteurs d’ECS peuvent être réparés (Pillière F et Falcy M, 1991).

2-5-Le test d’aberration chromosomique :

2-5-1-Définition :

On parle d'aberration chromosomique lorsque la structure ou le nombre des chromosomes est anormal. Une partie d'un chromosome peut être déplacée, oubliée ou inversée. Cela peut toucher les chromosomes sexuels (ou gonosomes) aussi bien que les chromosomes non sexuels (ou autosomes). Ces anomalies peuvent être détectées sur un caryotype (représentation photographique des chromosomes d'une cellule). Une aberration chromosomique peut être responsable de malformations ou de retard mental ; parfois, elle n'a aucune conséquence négative. On ne peut pas guérir à ce jour d'une anomalie chromosomique(9).

2-5-2- Principe :

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

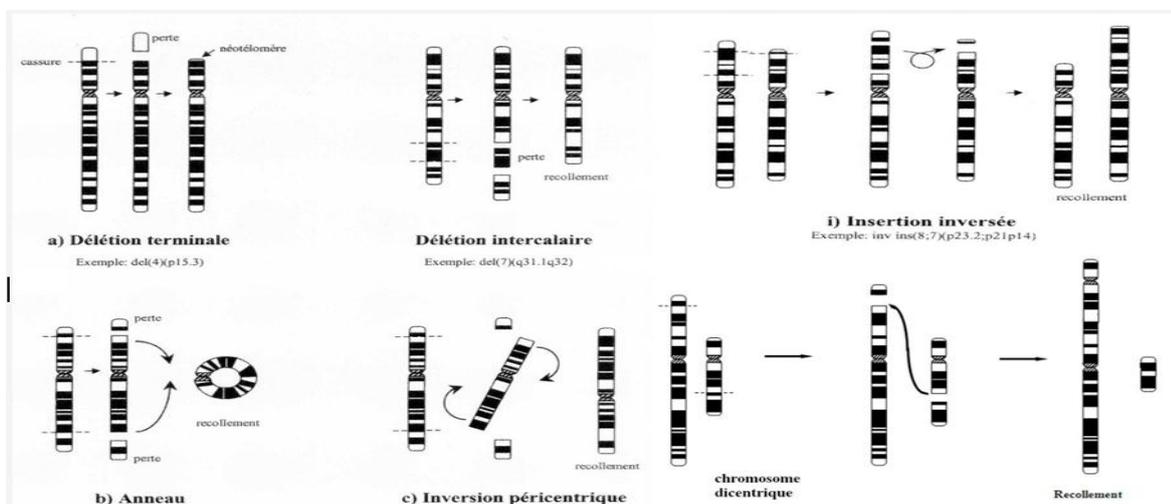


Figure 8 : Les principaux mécanismes d’apparition des aberrations de structures chromosomiques (10).

2-5-3-Avantages et Inconvénients :

Ce test présente un certain nombre d'avantages :

- C'est une technique relativement plus simple que celle des ECS.
- Elle permet d'apprécier des expositions cumulatives et reflète l'exposition sur une période relativement longue (Pillière F et Falcy M, 1991).

Ce test présente les inconvénients suivants :

- Les résultats sont souvent contradictoires pour le même agent, en raison de variations individuelles dans la fréquence de base des modifications de la structure chromosomique (dues au tabac, à l'âge, aux pathologies anciennes ou actuelles).
- La prise en compte des facteurs de confusion est donc primordiale.
- Il faut aussi tenir compte de la fréquence d'aberrations chromosomiques dites spontanées, non précisément définie dans la population non professionnellement exposée.
- Une sensibilité médiocre en raison du faible taux d'aberration impose l'analyse de nombreuses métaphases chez un grand nombre d'individus.
- L'absence de relation dose-effet et une persistance des aberrations pendant des dizaines d'années empêchent toute évaluation de nouvelles mesures de prévention.
- L'absence de signification précise de ces lésions, en termes de risque de cancer. Rend l'interprétation de ce test délicate (Pillière F et Falcy M, 1991).

2-6-Le SOS chromotest :

2-6-1-Définition :

Mis au point par Quillardet et Hoffnung (1982) est basé sur l'utilisation de la bactérie intestinale *Escherichia coli* PQ37 qui sous l'action d'agents génotoxiques, c'est-à-dire d'agents capables d'endommager l'ADN cellulaire va mettre en place un système de fonctions réparatrices appelés « fonctions SOS » qui vont éviter le blocage irréversible de la synthèse d'ADN. Ce système code pour une enzyme β -galactosidase, avec l'aide d'un substrat qui peut être converti en composé coloré par la β -gal, le taux du dommage provoqué à l'ADN peut être mesuré par l'intensité de l'activité enzymatique. Ce test peut être utilisé pour la détection de nombreux échantillons aqueux. C'est pourquoi, ce test est particulièrement adapté pour tester les échantillons pris de l'environnement (Khallef M, 2004).

2-6-2-Principe :

Le SOS Chromotest est un test in vitro qui permet d'évaluer l'activité génotoxique d'une substance pure ou d'un échantillon biologique ou environnemental. Ce test est effectué sur une souche bactérienne, *Escherichia coli* PQ37. Il consiste à déterminer in vitro la capacité d'une substance chimique à induire des dommages à l'ADN qui seront quantifiés indirectement par la mesure de l'expression d'un des composants du système de réparation SOS, le gène *sfiA*. Dans cette souche bactérienne, le gène *lacZ* responsable de la synthèse de la β -galactosidase a été placé sous le contrôle du promoteur *sfiA*. Ainsi, lorsque l'ADN bactérien est endommagé par un génotoxique, le système de réparation SOS est activé, ce qui conduit à l'induction du gène *lacZ* et à la synthèse de l'enzyme β -gal dont l'activité est quantifiée par dosage colorimétrique (apparition d'une couleur jaune) à 405 nm. L'activité de la β -gal est comparée à l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) mesurée en parallèle, qui constitue à ce titre un standard interne puisque non inductible par des agents génotoxiques.

Comme dans le cas du test d'Ames une fraction S9 est ajoutée au milieu réactionnel afin de permettre l'activation métabolique des pro-génotoxiques. L'activité génotoxique, pour une concentration c d'échantillon, est exprimée par le ratio $R_c = \beta\text{-gal}/\text{PAL}$. Le facteur d'induction, IF, est défini par le rapport R_c/R_o ou R_o est le ratio mesuré pour un témoin négatif (solvant seul). Un échantillon est généralement considéré comme génotoxique si IF est supérieur ou égal à 2, modérément génotoxique si $1,5 < \text{IF} < 2$ et non génotoxique si $\text{IF} < 1,5$ (Céline D et Jérôme C, 2009).

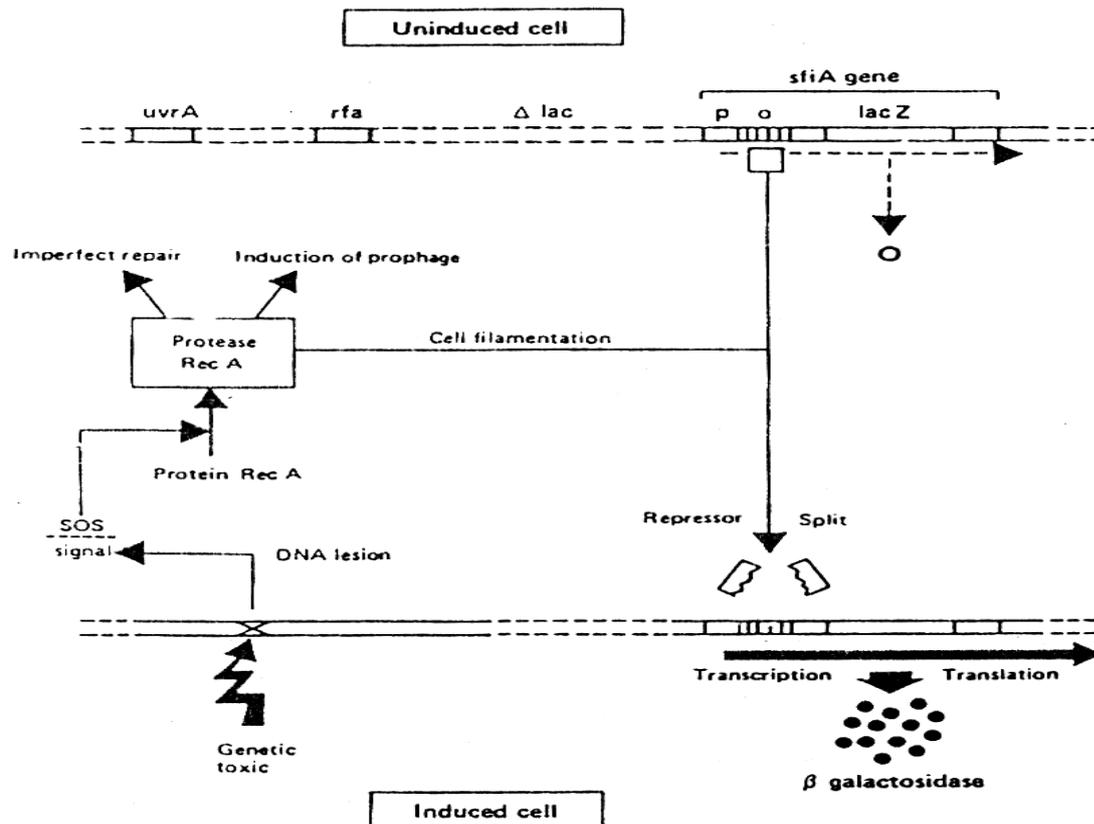


Figure 9 :Le principe du SOS chromotest (Khallef M, 2004).

2-6-3-Avantages et Inconvénients :

Ce test présente un certain nombre d'avantages :

- C'est l'une des méthodes les plus anciennes d'évaluation des lésions génétiques liées à des expositions à des génotoxiques.
- C'est une technique simple.
- Cette méthode est plus informative sur la nature des lésions que le test des micronoyaux (Pillière F et Falcy M, 1991).

Comme il présente certains inconvénients :

- Les résultats sont souvent contradictoires pour le même agent, en raison de variations individuelles dans la fréquence de base des modifications de la structure chromosomique (dus au tabac, à l'âge, aux pathologies anciennes ou actuelles). La prise en compte des facteurs de confusion est donc primordiale.
- Il faut aussi tenir compte de la fréquence d'aberrations chromosomiques dites spontanées, non précisément définie dans la population non professionnellement exposée.

- Une sensibilité médiocre en raison du faible taux d'aberrations impose l'analyse de nombreuses métaphases chez un grand nombre d'individus.
- L'absence de relation dose-effet et une persistance des aberrations pendant des dizaines d'années empêchent toute évaluation de nouvelles mesures de prévention
- L'absence de signification précise de ces lésions, en termes de risque de cancer, rend l'interprétation de ce test délicate (Pillière F et Falcy M, 1991).

2-7-Autres tests :**2-7-1-Mutatox assay :**

Ce test est également basé sur l'activation du système SOS en réponse aux dommages à l'ADN, se traduisant par la restauration de la luminescence dans une souche mutante de la bactérie marine *Vibrio fuchseri* (l'activation de SOS entraîne la synthèse d'une protéase qui clive un répresseur de la voie de la luminescence chez cette bactérie). Ce test est applicable en environnement (sédiments, eau...) (Fardel O *et al.*, 2009).

Matériel et méthodes :

1-Présentation et fonctionnement du site de prélèvement :

1-1-Présentation et localisation de la STEP :

La station d'épuration de Guelma a été créée en 2008 et occupe un terrain agricole de 8 ha. Elle se situe à 1 km environ au Nord de la ville sur le flanc droit de la vallée développée par l'Oued Seybouse et sur la route nationale N° 21 menant à Annaba à la sortie de l'agglomération. Les responsables de la station se fixent comme objectif l'épuration de 43 388 m³/j d'eaux usées de la ville de Guelma qui sont collectées par deux stations de relevage, l'une se trouvant au niveau de la cité Ghehdour : point de rejet de Oued Lemaïz avec un débit de 1575 m³ /h, et la seconde au niveau du point de rejet de Oued Skhoun (son débit est de 1125 m³/h) (Berouh Y, 2014).

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

L'épuration des eaux usées consiste à un prétraitement physique, une décantation primaire, un traitement biologique et une décantation secondaire. Les boues issues du bassin biologique sont récupérées au fond de clarificateur. De là une partie est extraite pour être traitée, puis évacuée, tandis qu'une partie est recirculée (Fig. 10) (Amari S et Berkane S, 2015).



Figure 10 : Configuration de la STEP de Guelma (Bedouh Y, 2014).

2-Prélèvement des boues liquides :

Le prélèvement s'est effectué dans des flacons en verre stérilisés au four pasteur pendant 1h30 à 180 C°. Le transport est assuré dans des emballages isothermes à la température de 4C° ce qui permet d'assurer une conservation satisfaisante (Rodier J, 2009).

3- Traitement des boues liquides aux nanoparticules d'argent :

Les Nanoparticules d'Argent (solution liquide à 0,02N) fournies par Sonatrach de Skikda ont été utilisées pour le traitement des boues liquides à une concentration de 0,25 mM comme mentionné dans les travaux de. (Bouchelegem et Bouregaa, 2015)

4-Test de mutagénicité (test d'Ames) :

4-1-Principe du test :

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

4-2-Matériel biologique :

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

- ✓ Elles permettent de détecter une plus large gamme de mutagènes.
- ✓ Chaque souche bactérienne est spécifique pour la détection d'un type de mutation (frameshift pour TA98 et substitution des bases pour TA100) (Tableau 2) (Bach C, 2011).

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

Tableau 2 : Génotype spécifique des souches TA98 et TA100 (Bach C, 2011).

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

La mutation *uvrB*⁻ : consiste en l'élimination des systèmes de réparation de l'ADN pour des dommages provoqués par certaines substances mutagènes et la lumière UV.

La mutation *rfa*⁻ : entraîne une modification de la membrane externe de la bactérie qui est composée essentiellement de lipopolysaccharides (LPS), ce qui implique une augmentation de la perméabilité cellulaire à certains types de substances chimiques. Cette mutation est sensible au cristal violet.

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

4-3-Confirmation des génotypes :

Les génotypes des souches tests doivent être confirmés :

1. Immédiatement après les avoir reçus.
2. Quand un lot gelé ou lyophilisé est destiné à l'utilisation.
3. Quand le nombre de révertants spontanés par boîte sort de l'intervalle indiqué.

4. Quand il y a une perte de la sensibilité vis-à-vis les mutagènes standards.
5. La confirmation des génotypes des souches tests est incluse dans chaque test de mutagenèse (Maron D et Ames B, 1983).

4-4-Activation des souches tests :

4-4-1-La préculture de nuit :

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

4-4-2-La culture de deux heures :

Le but de cette culture est d'arriver à la phase exponentielle de croissance c'est à dire 2.10^9 bactérie/ml et qui correspond à une DO= 0,4 à une longueur d'onde égale à 650nm.

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

Les bactéries sont couvertes de papier Aluminium pour les protéger de la lumière (Maron D. et Ames B., 1983 ; Mortelmans K. et Zeiger E., 2000).

4-4-3-Le réisolement des souches tests :

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

4-4-4-Le stockage des souches :

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

4-5-la vérification des caractères :

➤ Réclamation de l'Histidine :

La mutation His⁻ rend les bactéries auxotrophes à cet acide aminé dans un milieu sélectif

contient obligatoirement la biotine.

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

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

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

➤ **La sensibilité aux UV**

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

Le moitié de la boîte est couverte par une plaque en verre ensuite irradiée par une lampe à UV (15W) à une distance de 30cm pendant 8 secondes : TA98^R et TA100^R. L'incubation dure 24h à 37° (Maron D. et Ames B., 1983 ; Mortelmans K. et Zeiger E., 2000).

Dans notre travail ce caractère génétique a été vérifié suivant le protocole des auteurs du test d'Ames au niveau de notre laboratoire de Microbiologie plusieurs fois par le matériel disponible qui consistait en :

- des lampes à UV à 15W pendant 8 secondes
- un trans illuminateur à UV contenant 6 lampes à UV chacune à 15W pendant 8 secondes dans un premier essai puis pendant 5 heures dans un deuxième essai en vue d'obtenir un effet germicide.

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

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

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

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

Mortelmans K. et Zeiger E., 2000).

4-6-Le test de mutagenèse par la méthode standard avec préincubation :

4-6-1-Principe :

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

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

4-6-2-Technique sans activation métabolique (-S9) :

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

4-6-3-Analyse statistique :

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

Résultats du test Ames:

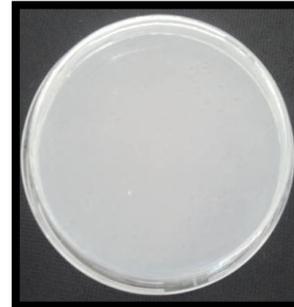
1-Vérification des caractères génétiques :

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

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



Milieu avec histidine



Milieu sans histidine

1 : TA100

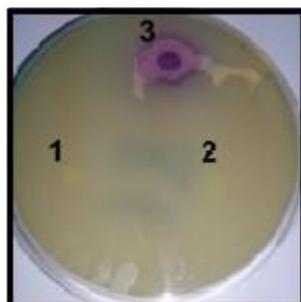
2 : TA98

Figure11 : La réclamation de l'histidine.

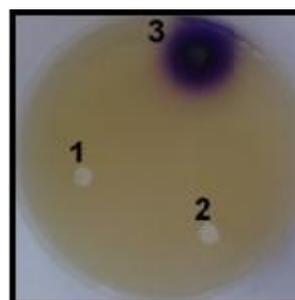
➤ La sensibilité aux UV

Toutes nos tentatives de vérification ont donné un résultat négatif quant à ce caractère. Les bactéries irradiées aux UV sur le coté exposé, par le matériel utilisé et à temps d'exposition différent (même après 5h d'exposition), ont poussés tout au long du trait de l'ensemencement sur la boite de pétri. Ce résultat ne peut pas être interpréter comme une perte de la sensibilité aux UV des souches bactériennes utilisées sauf s'il est confirmé en utilisant une lampe à UV 60W germicide qui n'est pas disponible dans nos laboratoires.

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



TA98



TA100

Figure12 : L'effet de l'Ampicilline et du CV sur les souches d'Ames.

On remarque, après l'incubation :

- La présence d'une zone claire uniquement autour du disque du CV dans le cas des souches **TA98** et **TA100**. Ces souches sont donc portantes de la mutation rfa^- et du plasmide pKM101 qui porte le gène de résistance à l'Ampicilline.

2-Test de mutagenèse :

Les résultats de essais sur les boues liquides sont présentés dans la figure 14 et les données numériques dans le tableau 3.

Tableau 3 : Analyse de la mutagénicité des boues liquides avant et après traitement aux nanoparticules d'argent avec les souches TA98 et TA100 sans activité métabolique (-S9).

Produit à tester	Nombre de révertant His ⁺ /Boite± DS	
	TA98	TA100
	S9(-)	S9(-)
Boue liquide	190±9.95ma	91.33±5.57a
Les boues liquides avec de l'argent nanoparticulaire	106.66±5.5mb	293.33±10.8mb
Control	38.16±4.26c	99±6.63a
2AF – 200 µg/plate	1400.66±72.2md	
SA – 10 µg/plate		1637.16±102.78b

Les mêmes lettres indiquent qu'il n'y a pas de différence statistiquement significante à $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test), m : Mutagène, DS: deviation Standard, 2AF: 2 aminofluorene, SA: Sodium azide.

L'analyse statistique des résultats de mutagénicité des boues liquides résiduaires avant et après traitement aux nanoparticules d'Argent (NAg) (tableau 3) utilisant les deux souches d'Ames (la TA98 et la TA100) montre que:

- Avec la souche TA 98 qui détecte des mutations de type décalage du cadre de lecture (frameshift), le nombre des colonies révertantes est de 190 en présence de boues liquide avant traitement ce nombre de colonies révertantes diminue après traitement de ces boues aux NAg à 106. Ces résultats indiquent que les boues sont des mutagènes

potentiels puisque le nombre de révertants est plus de 2 fois supérieur à celui du contrôle négatif qui est de 38 colonies. La réduction du nombre de révertants après traitement aux NAg à 0,25 mM signifie que ce traitement est capable d'agir sur certains composants mutagènes des boues liquides bien que le résultat obtenu montre que le potentiel mutagène reste significatif.

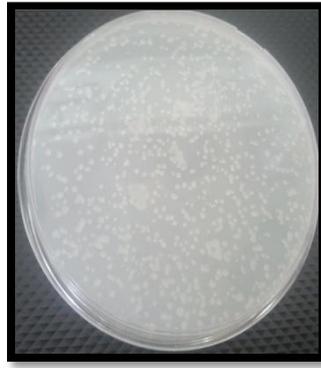
- Avec la souche TA 100 qui détecte des mutations de type substitution de paires de bases, le nombre de colonies révertantes obtenu en présence de boues liquides est de 91 ce chiffre a la même signification statistique "a" que le contrôle négatif donc on peut dire que la boue liquide avant traitement aux NAg ne contient pas d'agents mutagènes capables de produire des substitutions de paires de bases. Le traitement des boues aux NAg donne un résultat statistiquement significatif comme un mutagène potentiel avec 293 colonies révertantes.

Ces résultats montrent que les boues liquides contiennent des mutagènes de type frameshift (effet mutagène avec la TA98) plutôt que des mutagènes par décalage de cadre de lecture (pas d'effet avec la TA100).

Le traitement aux nanoparticules d'Argent (NAg) réduit l'activité de certains mutagènes de type frameshift mais induit un effet mutagène potentiel avec les deux souches de *Salmonella typhimurium* et précisément la TA100 donc les nanoparticules d'Argent sont très mutagènes et leur mutagénicité se manifeste par substitution de paires de bases et par décalage du cadre de lecture à un degré moindre.

Pour TA98:

TA 98 (témoin)



TA 98 (BL- ST)



TA 98 (BL+ AT)

Pour TA100:

TA 100 (témoin)



TA 100 (BL- ST)



TA 100 (BL+ AT)

BL : boue liquide

ST : sans traitement aux NAg

AT : avec traitement aux NAg

Figure13 : Les résultats du test d'Ames avec les souches *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100 sans et avec traitement aux nanoparticules d'Argent.

Conclusion :

La pollution des eaux est une notion qui est en constante évolution. L'Algérie ; est l'un des pays qui souffre de cette pollution, et plus précisément les eaux usées d'origine urbaine et les produits qui se génèrent suite aux procédures de traitement principalement les boues résiduaires. Ce qui présente un grand risque sur la santé publique.

Dans ce contexte ; notre étude a été portée sur l'évaluation du potentiel mutagène des boues issues suite aux traitement avant et après leur traitement aux nanoparticules d'Argent par le test d'Ames qui est le plus fréquemment utilisé dans le domaine de la mutagénicité. En vue d'évaluer l'activité mutagène des ces sous produits, on a utilisés les deux souches *Salmonella typhimurium* TA 98 et TA100, sans activation métabolique (-S9mix).

Le test d'Ames a montré que les agents mutagènes présents dans les boues résiduaires ont la capacité d'induire principalement des mutations de type décalage du cadre de lecture suite à l'effet mutagène important induit avec *Salmonella typhimurium* TA98 et l'absence d'effet mutagène avec la *Salmonella typhimurium* TA100 qui détecte les mutations par substitutions de paires de bases.

Le traitement des boues par les nanoparticules d'Argent pratiqué afin de vérifier leur effet sur les boues liquides montre que ce traitement n'aboutit pas à la réduction de l' effet mutagène des boues mais tout à fait au contraire, le traitement des boues résiduaires aux nanoparticules d'Argent conduit à une augmentation significative de l'effet mutagène sur la souche TA100 rendant ainsi les boues traités mutagènes par substitution de paires de bases et une diminution de l'effet mutagène par décalage du cadre de lecture mais qui reste statistiquement significatif.

On peut conclure donc le traitement des boues par les et nanoparticules d'Argent pour réduire leur charge en agents mutagènes n'est pas une méthode efficace.

L'étude des effets mutagènes concerne de nombreux produits est–et devenue d'une grande importance. Cependant, un seul test ne peut pas mettre en évidence tous les agents mutagènes. Il convient alors de réaliser plusieurs d'autres tests.

Annexes

Test Ames

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

Utilisée dans le Test de mutagenèse

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

Annexe n°2. Top agar.

Utilisé dans le Test de mutagenèse

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

Annexe n°3. Solution 0,02 N NaOH

Utilisée dans la solution ampicilline.

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

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

Utilisée dans le Test de résistance à l'ampicilline

Ingrédients :	Par 100 ml
Ampicilline trihydraté	0,8g
0,02 N NaOH	100 ml

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

Utilisé dans le Test de sensibilité au cristal violet

Ingrédients :	Par 100 ml
Cristal violet.....	0,1g
Eau distillée.....	100ml

Annexe n°6 .Milieu minimal agar (GM).

Utilisé dans le Test de mutagenèse

Ingrédients :	Par 1000ml
Agar	15g
Eau distillée.....	900ml
50X VB sels.....	20ml
20% Glucose.....	50ml

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

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

Utiliser dans le milieu minimal agar

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

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

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

Utilisé dans le Test de Réclamation de l'Histidine

Ingrédients :	Par 1000ml
Agar	15g
Eau distillée.....	900ml

50X VB sels.....	20ml
20% Glucose.....	50ml
Histidine-HCl-H ₂ O.....	8 ml
0,01 Mm Biotine.....	8ml
Ampicilline (0,8/0,02% NaOH).....	3ml

Annexe n°9 : Solution glucose (20 %)

Utiliser dans le milieu minimal agar

Ingrédients :	Par 1000ml
20% Glucose	200g
Eau distillée.....	700ml

Références bibliographiques :

- 1- Adda B et Menouer A., (2014). Étude et Caractérisation des boues huileuses au niveau RA1/Z. Pour l'obtention du diplôme de MASTER. Université des Sciences et de la technologie d'Oran, 62p.
- 2- Amari S et Berkane S., (2015). Étude génotoxique des boues des eaux usées de la ville de Guelma. Université 8 mai 1945 Guelma, 53p.
- 3- Amir S., (2005). Contribution à la valorisation de boues de stations d'épuration par compostage : devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du compost. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique, Toulouse, 312p.
- 4- Ati S., (2010). Etude de l'effet des boues résiduaires sur sol cultivé : Dynamique du phosphore et son utilisation en zone semi – aride. mémoire de magistère en sciences agronomique. Université El Hadj Lakhdar Batna, 37p.
- 5- Azzabi A., (2012). Influence des boues résiduaires sur le comportement d'une culture sous-jacente à Touggourt. Diplôme d'ingénieur d'état. Université Kasdi Merbah, Ouargla, 58p.
- 6- Bach C., (2011). Evaluation de la migration des constituants de l'emballage en poly (éthylène téréphtalate) vers l'eau, des facteurs d'influence et du potentiel toxique des migrants. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France, 254p.
- 7- Boucheleghem A., Bouregaa M., (2015). Evaluation de la qualité des eaux usées (Wilaya de Guelma) après traitement par différents procédés (Station d'épuration, Nanoparticules et les lentilles d'eaux). Mémoire de Master. Université 8 Mai de Guelma, 69p.
- 8- Bedouh Y., (2014). Évaluation de la toxicité des eaux usées traitées par la station d'épuration de Guelma et son impact sur l'oignon « Allium cepa ». These en vue de L'obtention d'un diplôme de doctorat L.M.D. Université Badji Mokhtar – Annaba, 113p.
- 9- Blondeau F., (1985). Le traitement centralisé des boues. Edition TSM l'eau, n°6, pp 231-242.
- 10- Carine D., (2010). Discrimination des effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'uranium : définition de marqueurs biologiques pour l'évaluation des risques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- professionnels dans l'industrie du nucléaire. Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale, 455p.
- 11- Céline D et Jérôme C., (2009). LaGénotoxicité Quel risque pour les espèces aquatiques ? Fascicules Seine-Aval, 35p.
- 12- Derouiche F., (2012). Contribution à l'étude des boues résiduares comme amendement organiques pour les cultures maraichères. Mémoire de magister. Université d'Oran, Oran, 102p.
- 13- Fabrice G., (1993). Performances des Tests d'Ames et micronoyaux triton, appliques a l'étude de La génotoxicite d'effluents complexes et des interactions entre polluants. Université de Metz, 60p.
- 14- Fardel O., Vernhet L., Nouvel V., Jung A., Legrand A., (2009). Utilisation des tests de génotoxicité pour la surveillance de l'exposition des travailleurs dans l'industrie du traitement et recyclage des déchets. Rapport final. Etude N° 07-0667/1A 73p.
- 15- Fartas K., *et al* (2015). Etude Microbiologique Des Boues Des Eaux Usées De La Ville De Guelma. Mémoire De Master En Biologie. Universite 8 Mai 1945 De Guelma, 71p
- 16- Guerfi Z., (2012). Impact de l'utilisation des boues résiduares sur les propriétés physico-chimique des sols de haute vallée de la Medjerda wilaya de souk ahras. Mémoire de magistère. Université Badji-Mokhtar, Annaba, 73p.
- 17- Khallef., (2004). Evaluation de l'activité mutagène et génotoxique des eaux potables traitées par le chlore (station chaiba : ville d'Annaba). Microbiologie de l'environnement. Université Badji Mokhtar- Annaba, 86p.
- 18- Koller E., (2004). Traitement des pollutions industrielles eau, air, sols, boues, 2èmeédition. Dunod, 566p.
- 19- Ladjel F et Abbou S., (2016). Perspectives de valorisation agricole et énergétique des boues issues des. STEP en Algérie.
- 20- Lambkin D., Nortcliff S., white T, (2004). The importance of precision in sampling sludges, biowastes and treated soils in a regulatory framework Trends in Analytical Chemistry, 23:10-11.
- 21- Madigan M et Martinko J, (2007). Biologie des micro-organismes, Note de synthèse. Unité d'enseignement et de recherche de biologie, Paris, 45p.
- 22- Maron D et Ames B, (1983). Revised methods for the salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. 113: 173-215.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 23- Michel C., (2011). Biomarqueurs de génotoxicité chez *Dreissena polymorpha* indicateurs de la pression chimique urbaine et variabilité naturelle des lésions de l'ADN. Grade de docteur en Géosciences et Ressources Naturelles. Université Pierre et Marie Curie, 192p.
- 24- Mortelmans K et Zeiger E., (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res*455: 29-60.
- 25- Nessler F., (2013). Etude de génotoxicité. Mémoire de Master. Institut Pasteur de Lille, Paris, 40p.
- 26- Pernin C., (2003). Epannage de boues d'épuration en milieu sylvo-pastoral .Etude des effets in situ et en mésocosmes sur la mésofaune du sol et la décomposition d'une litière de chêne liège. Mémoire de magistère, Paris, 220p.
- 27- Pillière F et Falcy M., (1991). Exposition aux produits chimiques génotoxique. Fiche medico- technique. Institut National de recherche et de sécurité, Paris, 330- 336.
- 28- Rodier J., (1996). L'analyse de l'eau; eaux naturelles, eaux résiduelles, eaux de mer. 8^{ème} édition. Dunod, 1383p.
- 29- Sébastien L., (2000). Intérêt du test des Comètes pour l'évaluation de la génotoxicité environnementale. these de doctorat de l'Université de Metz, 130p.

Sites internet :

(1)-<http://www.ademe.fr/partenaires/boues/pages/f14.htm>. (20/05/2016).

(2)- <http://www.futura-sciences.com/magazines/nature/infos/actu/d/botanique-nanoparticules-argent-menace-ecosystemes-44990/>(15/04/2016).

(3)-<http://www.journaldelascience.fr/sante/articles/forte-dose-les-nanoparticules-de-dioxyde-de-titane-pourraient-endommager-le-cerveau-2365>

(4)-<http://copublications.greenfacts.org/fr/nanoparticules-argent/index.htm>.(12/05/2016)

(5)-<https://www.agrireseau.net/nanotechnologies-bioalimentaire/documents/87625>
(09/05/2016).

(6)-Laurent B., (2013). Modèles d'exposition temporelle, voies d'exposition, indicateurs d'exposition : produits uniques ou mélanges.
www.biomedicale.univ-paris5.fr/.../toxico/.../TC1%20-%20BODIN.ppt. (05/05/2016).

(7)-Le test d' Ames pour évaluer le pouvoir cancérogène d'une substance.
<http://www.technobio.fr/article-le-test-d-ames-43438456.html>. (30/04/2016).

(8)-<http://www.cometassayindia.org/introduction.htm>.(12/05/2016).

(9)-<http://sante-medecine.journaldesfemmes.com/faq/8619-aberration-chromosomique-definition>.(22/04/2016).

(10)-<http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/22427/ch01.html>.(11/05/2016).

Résumé

Les boues résiduelles sont fortement chargées en polluants et en contaminants divers, ce qui pose le problème de pollution de l'environnement. Dans notre travail, le test d'Ames de mutagénèse chez les procaryotes sans activation métabolique a été utilisé pour mettre en évidence le potentiel mutagène des boues liquides avant et après leur traitement aux nanoparticules d'Argent. En utilisant les souches de *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100 qui détectent des mutations de type Frameshift et de substitution de paires de bases respectivement, les boues liquides sans aucun traitement préalable se sont montrés contenir des mutagènes par décalage du cadre de lecture du code génétique. Le traitement des boues par les nanoparticules réduit le potentiel mutagène des boues par décalage du cadre de lecture mais fait augmenter excessivement leur effet mutagène par substitution de paires de bases, cet effet est probablement dû aux nanoparticules.

Mots clé : Boue, effet mutagène, Test d'Ames.

Abstract

The sludge is heavily loaded with pollutants and various contaminants, which raises the environmental pollution problem. In our work, the test of Ames mutagenesis in prokaryotes without metabolic activation was used to highlight the mutagenic potential of the slurry before and after treatment with nanoparticles of silver. Using *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100 which detect Frameshift type of mutation and base pair substitution respectively, slurries without any treatment have been shown to contain mutagenic by shifting the reading frame of the genetic code. Treating sludge with nanoparticles reduced the mutagenic potential of sludge offset by the reading frame but excessively increased their mutagenic effect by substitution of base pairs, this effect is probably due to nanoparticles.

Keywords: Sludge, mutagenic effect, Ames test

ملخص

يتم تحميل الحمأة بشكل كبير مع الملوثات والملوثات المختلفة، الأمر الذي يثير مشكلة التلوث البيئي. في عملنا، تم استخدام اختبار الطفرات Ames في بدائيات النوى دون تفعيل الأيض لتسليط الضوء على طفرات محتملة من الطين قبل وبعد العلاج مع النانوية من الفضة. استخدام سلالات *Salmonella typhimurium* TA98 و TA100 الذي كشف عن نوع انزياح الإطار من طفرة واستبدال زوج قاعدة على التوالي، وقد ثبت عجائز من دون أي علاج لاحتواء طفرات عن طريق تحويل إطار القراءة من الشفرة الوراثية. علاج الحمأة مع النانوية خفضت طفرات محتملة من الحمأة يقابله إطار القراءة ولكن زادت بشكل مفرط تأثيرها مطفرة من استبدال قاعدة أزواج، وهذا التأثير ربما يرجع إلى النانوية.

الكلمات المفتاحية: الحمأة ، تأثير مطفرة، اختبار Ames