



Etude de tests de génotoxicité sur sédiment et zooplancton d'un oued fortement anthropisé (Oued Hamdoun, Tunisie)

Sabria BARKA ¹, Zouhour OUANES ¹, Mounira KRIFA ², Soumaya KILANI ²,
Leila CHEKIR-GHEDIRA ², Amel HAMZA-CHAFFAI ¹

1. Unité de Recherche de Toxicologie Environnementale et Marine, UR 09-03, IPEIS, Université de Sfax, Sfax, Tunisia.
sabriabarka@yahoo.fr
2. Unité de Recherche de Pharmacognosie/Biologie Moléculaire 99/UR/07-03, Faculté de Pharmacie, Rue Avicenne, 5000 Monastir, Tunisia

Résumé :

Cette étude consiste à évaluer la qualité de l'eau et l'état de santé d'écosystèmes dulcicoles par la mise en évidence de propriétés génotoxiques du sédiment et par la recherche d'altérations génétiques chez des représentants du zooplancton (Daphnidés) dans un étang sauvage (Zramdine, site témoin) et dans un milieu fortement anthropisé (Oued Hamdoun) qui reçoit notamment les effluents d'une usine textile. Les tests d'Ames et du SOS-Chromo test ont été appliqués aux sédiments alors que la technique des « micronoyaux » (MN) a été réalisée sur des Branchiopodes récoltées *in-situ*. Le taux de MN chez l'espèce de l'oued Hamdoun était très largement supérieur à celui de celle de l'étang de Zramdine, suggérant la présence de substances génotoxiques dans les eaux de l'oued. Ces résultats concordent avec ceux obtenus sur les sédiments.

Mots-clés : Oued Hamdoun, Zooplancton, Sédiment, Génotoxicité, Test d'Ames, SOS-Chromo test, Test micronoyau.

1. Introduction

En Tunisie, les stations d'épuration se révèlent inefficaces pour traiter les effluents urbains et industriels, notamment lorsqu'il s'agit d'éliminer les micropolluants et les polluants émergents (BELHADJ *et al.*, 2015). Or ces substances chimiques rejetées dans l'environnement possèdent des propriétés mutagène et cancérogène. Cette situation est d'autant plus préoccupante que les eaux usées traitées sont réutilisées pour l'irrigation et la recharge de nappes d'eaux souterraines (NEUBERT & BENADALLAH, 2003). Il apparaît donc primordial de pouvoir développer des outils de surveillance de la qualité des milieux aquatiques afin d'évaluer le risque génotoxique.

Différents tests bactériologiques (SOS-Chromo test, test d'Ames) et cytogénétiques (Test Micronoyau, test COMET) ont été mis au point pour révéler la présence intrinsèque de composés génotoxiques dans le biota, l'eau et les sédiments ou pour

<https://dx.doi.org/10.5150/cmcm.2017.016>

*Mediterranean rocky coasts:
Features, processes, evolution and problems*

mettre en évidence leurs effets sur les organismes vivants (AN, 2004). De nombreuses études réalisées sur des organismes aquatiques récoltés en milieu naturel montrent la pertinence de ces tests pour mettre en évidence la présence d'agents génotoxiques dans l'environnement (CHEN & WHITE, 2004 ; JOLIBOIS & GUERBET, 2005 ; CACHOT *et al.*, 2006 ; KOCAK *et al.*, 2010). Bien que ces tests constituent un outil puissant pour évaluer la présence de composés génotoxiques et leurs effets toxiques dans différents environnements, très peu de méthodes ont été validées pour mettre en évidence le risque écotoxicologique chez des animaux qui occupent une position écologique pertinente et notamment chez les invertébrés, à la base de la chaîne alimentaire (WATANABE *et al.*, 2008). En effet, le suivi écotoxicologique des communautés planctoniques permet de révéler la présence de polluants dans le milieu de façon précoce puisque leur position dans la chaîne alimentaire fait d'elles les premières cibles des agents toxiques (TERNJEJ *et al.*, 2009).

Ce travail consiste à rechercher la présence éventuelle de composés génotoxiques dans le sédiment et par la recherche d'altérations génétiques chez des représentants du zooplancton récoltés dans deux sites différents : l'un sauvage et l'autre pollué par les eaux d'émissaires domestiques et industriels.

2. Matériels et méthodes

Deux sites dulcicoles différents, situés dans le centre du pays, ont été choisis : l'un sauvage (étang de Zarmidine, considéré comme site témoin) et l'autre fortement anthropisé (Oued Hamdoun) par les effluents de station d'épuration et d'industries textiles, de cuir et agroalimentaires. Les zooplanctons (Branchiopodes) ont été prélevés avec un filet de 105 µm. Les Branchiopodes de Hamdoun, identifiés comme étant de la famille des Daphniidae (*Semiocephalus expinosus*), ont été récoltés au niveau de l'émissaire d'une usine textile dans la partie aval de l'oued (à environ 1 km de la mer). Pour l'étang de Zarmidine, il s'agissait également de Daphniidae (*Daphnia magna*) (Daphniidae). Les sédiments ont été prélevés au cœur d'une carotte obtenue grâce à une benne en acier inoxydable descendue sur le fond durant le mois de février. Les échantillons ont été gardés à -20°C et ont été traités dans un délai de 3 mois.

Pour le test MN, réalisé en triplicats, dans les 24h qui ont suivi la récolte, 10 individus femelles adultes (d'une même espèce de Branchiopode) ont été traités selon le protocole décrit dans BARKA *et al.*, (2016). Les taux de MN sont donnés en pourcentage de cellules micronuclées sur 1000 cellules observées sous microscope optique (x100). Une souche de *Salmonella typhimurium* a été utilisée pour le test d'Ames et le SOS-Chromo test a été réalisé à partir d'une souche d'*Escherichia coli* PQ37 selon les méthodes décrites dans (MARON & AMES, 1983) et (QUILLARDET & HOFNUNG, 1985) respectivement. Ces deux tests réalisés, en duplicats et sans système d'activation métabolique (S9), à partir de sédiments secs extraits dans du dichlorométhane/méthanol, séchés sous azote puis repris dans du DMSO à différentes concentrations (0, 5, 12, 25 et

50 mg.L⁻¹). Les données ont été comparées par ANOVA à un facteur et le test Tuckey de comparaisons multiples. Le seuil de significativité a été fixé à $P \leq 0.05$.

3. Résultats

A toutes les dates de prélèvements, les valeurs significativement plus élevées des taux de micronoyaux dans les Branchiopodes de oued Hamdoun, comparés à celles du site témoin, reflètent la présence de composés génotoxiques dans le milieu (Figure 1A). Pour le test d'Ames (Figure 1B), les résultats n'expriment pas de mutagénicité pour aucun des deux sites, raison pour laquelle une plus faible dose de sédiments provenant de l'oued Hamdoun a été testée (5 mg.L⁻¹). Il apparaît donc que ce test révèle une forte cytotoxicité dans le site Hamdoun, puisque le nombre de révertants est comparable à celui des RS ; masquant ainsi toute expression de mutagénicité. Ce résultat rejoint ceux obtenus avec le test des MN où les taux étaient très élevés pour les Branchiopodes de Hamdoun. Les résultats du SOS Chromo test (Figure 1C) ne permettent pas de mettre en évidence une génotoxicité (FI<1,5). Sur le site Hamdoun, on remarque qu'à la plus forte dose le FI<0,7 ; ce qui prouve que, là aussi, une cytotoxicité s'exerce. Toutefois, la plus faible dose de sédiment testée, révèle une tendance vers la génotoxicité. Ces résultats reflètent bien la situation d'extrême pollution puisqu'une étude sur les procédés de teinture/coloration de l'usine textile qui déverse ses effluents dans l'oued Hamdoun, a listé plus d'une quinzaine de composés dont le formaldéhyde, des dérivés d'hydrocarbures (HAP) et des triazines (herbicides) (BARKALLAH, 2008). Or de nombreuses études ont démontré la génotoxicité et la cytotoxicité de ces molécules chez l'Homme et chez des organismes aquatiques (ZELJEZIC *et al.*, 2006 ; ABDOLLAHI & HOSSEINI, 2014 ; CLEMENTS *et al.*, 1997 ; NUDI *et al.*, 2010).

*Mediterranean rocky coasts:
Features, processes, evolution and problems*

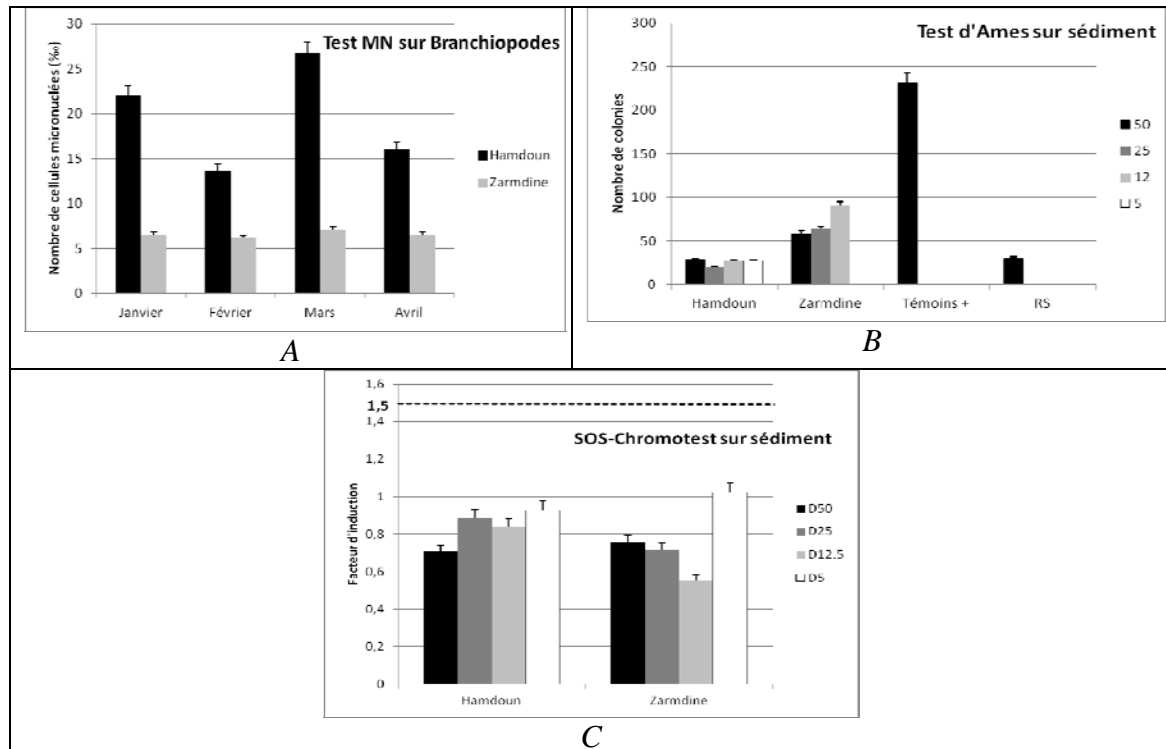


Figure 1. Tests de génotoxicité sur Branchiopodes (test MN) -A- et sur sédiment -B et C- provenant d'un site sauvage (Zamdine) et d'un site fortement anthropisé (oued Hamdoun). Test Ames -B- : on estime qu'il y a une génotoxicité lorsque le nombre de révertants est au moins égal à deux fois le nombre de RS (révertants spontanés) et SOS-Chromo test -C- : la génotoxicité est mise en évidence lorsque le facteur d'induction $FI > 1,5$, considéré comme le seuil de génotoxicité.

4. Conclusions

Les tests employés sur sédiments ont pu mettre en évidence la présence d'agents génotoxiques dans les eaux de l'oued Hamdoun comparé au site témoin. L'utilisation du test MN sur des invertébrés marins s'est révélée probante tant dans la faisabilité que dans les résultats, puisque ces derniers confirment les données sur sédiments. Il est donc recommandé d'inclure les tests de génotoxicité sur des matrices environnementales dans la mesure où ils constituent un outil puissant de surveillance environnementale.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Karima ELTAIEF et Hazem HAMMAMI pour leur contribution à ce travail.

5. Références bibliographiques

- ABDOLLAHI M., HOSSEINI A. (2014). *Formaldehyde. Reference Module in Biomedical Sciences, from Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, (Third Edition), pp. 653-656.
- BARKA S., OUANES Z., GHARBI A., GDARA I., MOUELI S., HAMZA-CHAFFAI A. (2016). *Monitoring genotoxicity in freshwater microcrustaceans: A new application of the micronucleus assay*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 803–804, pp. 27–33. doi: 10.1016/j.mrgentox.2016.05.002
- BARKALLAH O. (2008). *Contribution à l'optimisation de l'application de recettes de teinture établies au laboratoire et à l'échelle industrielle*. Mémoire de fin d'études, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Monastir, Tunisie.
- BELHAJ D., BACCAR R., JAABIRI I., BOUZID J., KALLEL M., AYADI H., ZHOU J. L. (2015). *Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa)*. Science of the Total Environment, Vol. 505, pp. 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.018>
- CACHOT J., GEFFARD O., AUGAGNEUR S., LACROIX S., LE MENACH K., PELUHET L., COUTEAU J., DENIER X., DEVIER M.H., POTTIER D., BUDZINSKI H. (2006). *Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France)*, Aquatic Toxicology, Vol. 79, pp. 257-267. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.014>
- CHEN G., WHITE P.A. (2004). *The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review*, Mutation Research/Reviews in Mutation Research, Vol. 567 (2-3), pp. 151-225. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2004.08.005>
- CLEMENTS C., RALPH S., PETRAS M. (1997). *Genotoxicity of select herbicides in Rana catesbeiana tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay*. Environmental Molecular Mutagenesis, Vol. 29 (3), pp. 277–288. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2280(1997)29:3<277::AID-EM8>3.0.CO;2-9
- AN J. (2004). *Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 552 (1-2), pp. 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.034>
- JOLIBOIS B., GUERBET M. (2005). *Evaluation of industrial, hospital and domestic wastewater genotoxicity with the Salmonella fluctuation test and the SOS Chromotest*, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol.565 (2-3), pp. 151-162. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.10.006>
- KOÇAK E., YETILMEZSOY K., GONULLU M. T., PETEK M. (2010). *A statistical evaluation of the potential genotoxic activity in the surface waters of the Golden Horn Estuary*, Marine Pollution Bulletin, Vol. 60 (10), pp. 1708-1717. doi : 10.1016/j.marpolbul.2010.06.029

*Mediterranean rocky coasts:
Features, processes, evolution and problems*

- MARON, D.M., AMES, B.N. (1983). *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test*. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 113 (3-4), pp. 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
- NEUBERT S., BENABDALLAH S. (2003). *La réutilisation des eaux usées traitées en Tunisie*. Etudes et rapports d'expertise 11/2003. Institut Allemand de Développement, 48 p.
- NUDI A.H., WAGENER A., FRANCONI E., SETTE C., SARTORI A.V., SCOFIELD A. (2010). *Biomarkers of PAHs exposure in crabs *Ucides cordatus*: Laboratory assay and field study*. Environmental Research, Vol. 110 (2), pp. 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.10.014>
- QUILLARDET P., HOFNUNG M. (1985). *The SOS chromotest colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures*. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 147 (3), pp. 65-78. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(85\)90020-2](https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90020-2)
- TERNJEJ I., STANKOVIC I., MIHALJEVIC Z., FURAC L., ZELJEZI D., KOPJAR N. (2009). *Alkaline comet assay as a potential tool in the assessment of DNA integrity in freshwater zooplankton affected by pollutants from water treatment facility*. Water Air Soil Pollution, Vol. 204 (1-4), pp. 299–314. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0046-4>
- WATANABE H., KOBAYASHI K., KATO Y., ODA S., ABE R., TARAZAKO N., IGUCHI T. (2008). *Genomic response in *Daphnia* to chemical pollutants*, Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry, Vol. 1, Biological Responses to Chemical Pollutants, in Y. Murakami, K. Nakayama, S.I. Kitamura, H. Iwata, S. Tanabe (Eds.), TERRAPUB, Tokyo, pp. 133–142.
- ZELJEZIC D., GARAJ-VRHOVAC V., PERKOVIC P. (2006). *Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay*. Toxicology in Vitro, Vol. 20 (6), pp. 923–935. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.01.017>