

Evaluation de la génotoxicité d'un sol salin irrigué par des eaux usées traitées : Cas du sol de Kalaât Landelous (Tunisie)

D. Souguir⁽¹⁾, G. Hörmann⁽²⁾ et M. Hachicha⁽¹⁾

- 1) Institut National de Recherches en Génie Rural, Eaux et Forêts (INRGREF), Université de Carthage, Tunisie
- 2) Department of Hydrology and Water Resources Research, Kiel University, Germany

*: Auteur correspondant: souguir.dalila@yahoo.com

RÉSUMÉ

L'évaluation des risques liés, d'une part, à un sol salin et, d'autre part, à l'irrigation par des eaux usées traitées (EUT), nécessite de disposer, en plus des suivis et des analyses physico-chimiques, d'outils biologiques permettant d'évaluer mieux l'impact sur les êtres vivants. Cette étude biologique repose sur des marqueurs de génotoxicité tels que le test de micronoyaux. Dans ce contexte, le potentiel génotoxique du sol de Kalaât Landelous, un sol fortement salin et irrigué depuis 2008 par des EUT, a été évalué. Le lixiviat est de pH basique, d'une salinité élevée (CE (1:1) = 10 dS/m), une composition ionique dominée par des ions Na⁺ et Cl⁻ et des teneurs en éléments traces métalliques (ETM) faibles. Le test de micronoyaux a été appliqué sur les extrémités méristématiques de fève (*Vicia faba*) pendant 24 heures. Les observations microscopiques ont montré une diminution du nombre de cellules en division et une formation de micronoyaux chez les racines soumises au lixiviat. Outre les micronoyaux, le lixiviat semble avoir (i) un effet clastogénique suite à une induction des chromosomes collants, des anneaux et des ponts anaphasiques, (ii) un effet aneugénique suite à une atteinte de fuseau mitotique et l'apparition de c-mitoses et la perte des chromosomes entiers et/ou des chromatides et (iii) un effet sur le noyau principal avec des cellules pycnotiques et d'autres renfermant deux noyaux atypiques. La génotoxicité induite chez *V. faba* semble être le résultat d'une toxicité individuelle des contaminants contenus dans le lixiviat et biodisponibles pour la plante et/ou des interactions possibles entre eux.

Mots clés

EUT, génotoxicité, lixiviat, test de micronoyaux, salinité, *V. faba*.

Comment citer cet article:

Souguir D., Hörmann G. et Hachicha M. - 2017 - Evaluation de la génotoxicité d'un sol salin irrigué par des eaux usées traitées : cas du sol Kalaât Landelous (Tunisie) *Etude et Gestion des Sols*, 24, 127-135

Comment télécharger cet article:

www.afes.egs/EGS-2017-24-8-Souguir-127-135

Comment consulter/télécharger

tous les articles de la revue EGS: www.afes/egs/

SUMMARY**GENOTOXICITY ASSESSMENT OF A SALT-AFFECTED SOIL IRRIGATED WITH TREATED WASTEWATER:****Case of of Kalaât Landelous soil (Tunisia)**

The assessment of risks linked to saline soils and irrigation with treated wastewater (TWW) requires, in addition to monitoring and physicochemical analyses, biological tools to evaluate the impact on living organisms. This biological study is based on genotoxicity's markers such as the micronucleus test. In this context, the genotoxicity of a salt-affected soil irrigated, since 2008, with the TWW was evaluated. The leachate is basic with a high salinity (EC (1: 1) = 10 dS/m), an ionic composition dominated by Na⁺ and Cl⁻ ions and low metal trace elements (MTE) contents. The micronuclei test was applied on the meristematic zones of the bean (*Vicia faba*) during 24 h. Microscopic observations showed a decrease of the number of dividing cells and a formation of micronuclei in roots subjected to the leachate. In addition, the leachate seems to have (i) a clastogenic effect due to the induction of sticky chromosomes, rings and anaphasic bridges, (ii) an aneugenic effect after the spindle alteration and the appearance of c-mitosis and the loss of the entire chromosomes and/or the chromatids, and (iii) an effect on the main nucleus with pycnotic cells and others containing two atypical nuclei. The genotoxicity induced in *V. faba* may be the result of the individual toxicity of contaminants in the leachate and bioavailable to the plant and/or of possible interactions between them.

Key-words

TWW, genotoxicity, leachate, micronuclei test, salinity, *V. faba*.

RESUMEN**EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE UN SUELO SALINO IRRIGADO POR AGUAS USADAS TRATADAS:****Caso del suelo Kalaât Landelous (Túnez)****sous titre**

La evaluación de los riesgos ligados, de un lado a un suelo salino, y de otro lado a la irrigación por aguas usadas tratadas (EUT), necesita disponer, además de seguimientos y análisis fisicoquímicas, de herramientas biológicas que permiten evaluar mejor el impacto sobre los seres vivos. Este estudio biológico se basa sobre marcadores de genotoxicidad como el test de micronúcleos. En este contexto, se evaluó el potencial genotóxico del suelo de Kalaât Landelous, un suelo fuertemente salino e irrigado desde 2008 por EUT. El lixiviado es de pH básico, con salinidad elevada (CE (1:1) = 10 dS/m), una composición iónica dominada por iones Na⁺ y Cl⁻ y tasas bajas en elementos traza metálicos (ETM). Se aplicó el test de micronúcleos sobre las extremidades meristemáticas de haba (*Vicia faba*) durante 24 h. Las observaciones microscópicas mostraron una disminución del número de células en división y una formación de micronúcleos en las raíces sometidas al lixiviado. Además de los micronúcleos, el lixiviado parece tener (i) un efecto clastogénico debido a una inducción de los cromosomas pegajosos, anillos y puentes anafásicos, (ii) un efecto aneugénico debido a un daño de huso mitótico y aparición de c-mitosis y la pérdida de cromosomas enteros y/o de cromátidas y (iii) un efecto sobre el núcleo principal con células picnóticas y otras que contienen dos núcleos atípicos. La genotoxicidad inducida parece ser el resultado de una toxicidad individual de los contaminantes contenidos en el lixiviado y biodisponibles para las plantas y/o interacciones posibles entre sí.

Palabras clave

EUT, genotoxicidad, lixiviado, test de micronúcleos, salinidad, *V. faba*.

Les activités anthropiques sont de plus en plus responsables de l'introduction d'un grand nombre de substances chimiques dans l'environnement. L'utilisation des eaux de mauvaise qualité parfois riches en éléments traces métalliques (ETM) et/ou en sels, peut entraîner une contamination et une salinisation des sols à court ou à long terme. En Tunisie, l'utilisation des eaux usées traitées (EUT) et/ou des eaux salées, en agriculture, est indispensable. Seulement 49 % des ressources en eau ont une salinité inférieure à 1,5 g/l et sont localisées principalement au Nord; l'utilisation de ces eaux «de bonne qualité» concerne en priorité l'approvisionnement domestique et d'autres usages prioritaires.

L'irrigation avec des eaux riches en sels peut entraîner une salinisation. Les problèmes de salinisation rencontrés dans les périmètres irrigués sont aussi associés à un manque de maîtrise et de contrôle d'une nappe peu profonde et salée. La salinité a été reliée à l'augmentation de la mobilité et la biodisponibilité des ETM dans la solution du sol (Du Laing *et al.*, 2007; Acosta *et al.*, 2011). Bien que la concentration de ces ETM dans les EUT soit faible, l'irrigation peut, à terme, entraîner l'accumulation de ces éléments dans le sol et/ou leur passage vers la nappe surtout si elle est proche de la surface, ainsi que leur absorption par la plante. Pour cette raison, beaucoup de pays, dont la Tunisie, ont fixé une liste des cultures pouvant être irriguées par les EUT et les charges maximum en ETM dans ces eaux destinées à l'irrigation (INNORPI, 1989). Dans le cadre d'une recherche sur des plantes alternatives pouvant occuper d'une part, des sols salins et de valoriser, d'autre part, des EUT, une parcelle de sol fortement salin (Salorthid aquic (SCS-USDA), salinité dépassant 16 dS/m) a été occupée, depuis 2008, par des plantes de *Jatropha curcas*, puis d'*Aloe vera* et actuellement, par des plantes forestières (*Atriplex nummularia*, *Acacia cyanophylla*, *Casuarine glauca*, *Cupressus sempervirens*, *Eucalyptus gomphocephala* et *Pinus halepensis*). Au début de l'expérimentation, la parcelle a été aménagée en blocs (sous-parcelles). Chaque bloc désigne une élévation du sol d'un mètre par rapport à la surface en raison d'une nappe très salée et très proche de la surface. Toutes les plantes étudiées ont été cultivées sur ces blocs et irriguées pendant la saison estivale par des EUT provenant de la station d'épuration de la région de Kalaât Landelous. L'évaluation des risques liés à la contamination ou non du sol et/ou de la nappe, a nécessité de disposer d'outils biologiques permettant d'apprécier l'impact des polluants sur les êtres vivants. En effet, si la contamination est globalement bien définie par les analyses physico-chimiques, l'évaluation des effets de l'ensemble des contaminants contenus dans le sol et/ou la nappe à l'aide d'une approche biologique permet de mieux comprendre la biodisponibilité des polluants, leurs interactions possibles, et les effets potentiels de la contamination. Cette étude des effets induits par ces contaminants repose sur l'utilisation de marqueurs biologiques (Amiard, 2011). Il s'agit de changements structuraux ou fonctionnels observables et/ou mesurables à divers niveaux d'organisation biologique

(moléculaire, biochimique...), qui révèlent l'exposition d'un individu à au moins une substance chimique. L'utilisation d'un biomarqueur de génotoxicité permet l'évaluation de l'impact des contaminants sur l'intégrité structurale de l'ADN. Le test de micronoyaux, un de ces biomarqueurs, permet d'évaluer la génotoxicité des substances chimiques des eaux et des effluents (Smaka-Kincl *et al.*, 1996; Hajjouji *et al.*, 2007). Il est aussi utilisé dans l'évaluation de la génotoxicité des sols et des matrices solides (composts, boues, déchets, etc.) à travers une exposition directe ou à un lixiviat de sol ou de matrice. Dans ce contexte, nous nous sommes servi de ce test pour l'évaluation de l'état génotoxique d'un sol de Kalaât Landelous suite à une exposition des racines de *Vicia faba* à un lixiviat de ce sol.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Parcelle d'étude et préparation du lixiviat

L'échantillonnage a concerné le sol d'une parcelle expérimentale située dans la région Kalaât Landelous à 35 km au Nord de Tunis (Tunisie). Il s'agit une plaine alluviale caractérisée par un bioclimat méditerranéen semi-aride supérieur. La pluviométrie moyenne annuelle est de 470 mm avec de fortes irrégularités intra et interannuelles. Les sols sont affectés par les sels causés par la présence d'une nappe phréatique proche de la surface et saline. En effet, la profondeur de la nappe et la salinité moyenne sont de 83 cm et 73 dS/m, respectivement. Le sol de la parcelle (Salorthid aquic, SCS-USDA) est argilo-limoneux (50 % de limons, 44 % d'argiles et 5 % de sables), fortement calcaire (entre 25 % et 50 %) et pauvre en matière organique (MO < 1 %).

La parcelle d'étude est située à proximité de la station d'épuration des EUT de Kalaât Landelous. Cette station traite, depuis 1994, des eaux usées d'origine domestique et industrielle par lagunage aéré. Depuis 2008, les EUT produites ont servi à l'irrigation des plantes de *Jatropha curcas* et d'*Aloe vera* et des espèces forestières pendant la période estivale uniquement. Certaines de ces plantes ont montré une incapacité de survivre, alors que d'autres ont pu résister aux conditions de la parcelle (Souguir *et al.*, 2013).

Les échantillons du sol (4 kg) ont été prélevés de différents blocs (0 - 20 cm) en raison de 3 échantillons par bloc (partie élevée du sol par rapport à la surface). Ils ont été séchés à l'air libre, broyés et tamisés à 2 mm. Des échantillons composites ont été formés. Pour chacun d'eux, le lixiviat a été extrait par un ajout de 1 l de l'eau distillée à 1 kg de sol (1:1), une agitation de 24 heures et une filtration. Ces lixiviats ont servi pour l'étude génotoxique. Ils ont un pH moyen basique (pH = 8,5) et une conductivité électrique moyenne (CE 1:1) de 10 dS/m. Ils ont fait l'objet d'une analyse minérale. Les ions Na⁺ et K⁺ ont été dosés par spectrophotométrie de flamme (Jenway, PFP7). La

quantification des ions Cl^- et HCO_3^- a été réalisée par titrage en utilisant une solution de nitrate d'argent (AgNO_3) et l'acide chlorhydrique (HCl), respectivement. Les ions SO_4^{2-} ont été dosés selon la méthode néphélométrique et ceux Ca^{2+} et Mg^{2+} par titrage complexométrique. Les concentrations des éléments traces métalliques ont été déterminées par spectrométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer).

Selon ces analyses, la composition ionique est dominée par les cations Na^+ et les anions Cl^- . Les ETM les plus présents sont le Fe (0,130 mg/l), le Pb (0,124 mg/l) et le Ni (0,091 mg/l) (tableau 1).

Matériel végétal et germination

Les graines de fèves (*Vicia faba*, variété locale Chahbi) ont été fournies par le Laboratoire des Légumineuses de l'Institut National de Recherches Agronomiques de Tunis (INRAT). Elles ont été désinfectées à l'eau de Javel (10 %) et lavées abondamment à l'eau distillée. Pour faciliter et homogénéiser leur germination, les graines ont été placées dans l'eau distillée pendant une nuit. Une partie du tégument a été enlevée délicatement et les graines ont été mises à germer entre deux papiers filtres imbibés à l'eau distillée. La germination a eu lieu dans une étuve à une température de 25 ± 1 °C et à l'obscurité pendant 48 heures. Lorsque la racine a atteint une longueur de 2 à 3 cm, les graines ont été transférées dans des bacs contenant les lixiviats. D'autres bacs contenant de l'eau distillée ont servi comme témoins.

Application du test de micronoyaux

Après 24 heures d'exposition, les racines ont été rincées et transférées dans une solution de Carnoy formée d'acide acétique et d'éthanol. Après l'hydrolyse au HCl (1 N) et la coloration à l'orcéine, l'indice mitotique et le nombre de cellules ont été déterminés sous microscope optique (Leica DM2500, Wetzlar,

Allemagne). L'indice mitotique correspond au nombre de cellules en division parmi 100 cellules comptées. Le nombre de cellules correspond au nombre de cellules renfermant un ou plusieurs micronoyaux parmi 1000 cellules comptées. Pour chaque traitement (contrôle/lixiviat), 9 lames ont été préparées avec un double comptage de cellules en division et de cellules micronuclées sur chacune des lames.

Les aberrations nucléaires et chromosomiques ont été photographiées à l'aide d'une caméra (Canon EOS 1100, Tokyo, Japan).

Analyse statistique

Afin de déterminer la significativité entre le contrôle et le lixiviat du sol sur les deux paramètres étudiés (indice mitotique et nombre de cellules), nous avons procédé à une analyse de la variance et à une comparaison des moyennes, à l'aide du test de Tukey à $\alpha = 5$ %. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS (IBM SPSS statistics, v20).

RÉSULTATS

Les cellules en division ont été observées chez les racines témoins et celles soumises au lixiviat du sol de Kalaât Landelous. Cependant, le nombre de ces cellules a diminué significativement et il est 4 fois moins important chez les graines irriguées avec le lixiviat comparé à celles témoins (tableau 2).

Les micronoyaux ont été détectés dans les racines traitées par l'extrait aqueux. Le nombre de cellules a atteint $5,33 \pm 3,44$ cellules parmi les 1000 cellules comptées. Ces petites entités nucléaires, séparées du noyau principal et ayant la même coloration que ce dernier, ont été aussi rencontrées chez les cellules témoins mais en faible nombre ($0,18 \pm 0,38/1000$ cellules) (tableau 2).

Tableau 1 - Compositions ionique et métallique moyennes des lixiviats du sol de Kalaât Landelous (Mars 2015).

Table 1 - Ionic and metallic compositions' averages of the leachate from the Kalaât Landelous soil (March 2015).

Eléments majeurs (méq/l)							Eléments traces métalliques (mg/l)								
Na	Ca	Mg	K	Cl	SO ₄	HCO ₃	Cd	Co	Cu	Fe	Cr	Mn	Ni	Pb	Zn
97,2	12,5	6,50	0,85	81,60	20,06	4,00	0,002	0,056	0,028	0,130	0,048	0,059	0,091	0,124	0,040

Tableau 2 - Indice mitotique et nombre de cellules micronuclées suite à une exposition à un lixiviat du sol de Kalaât Landelous.

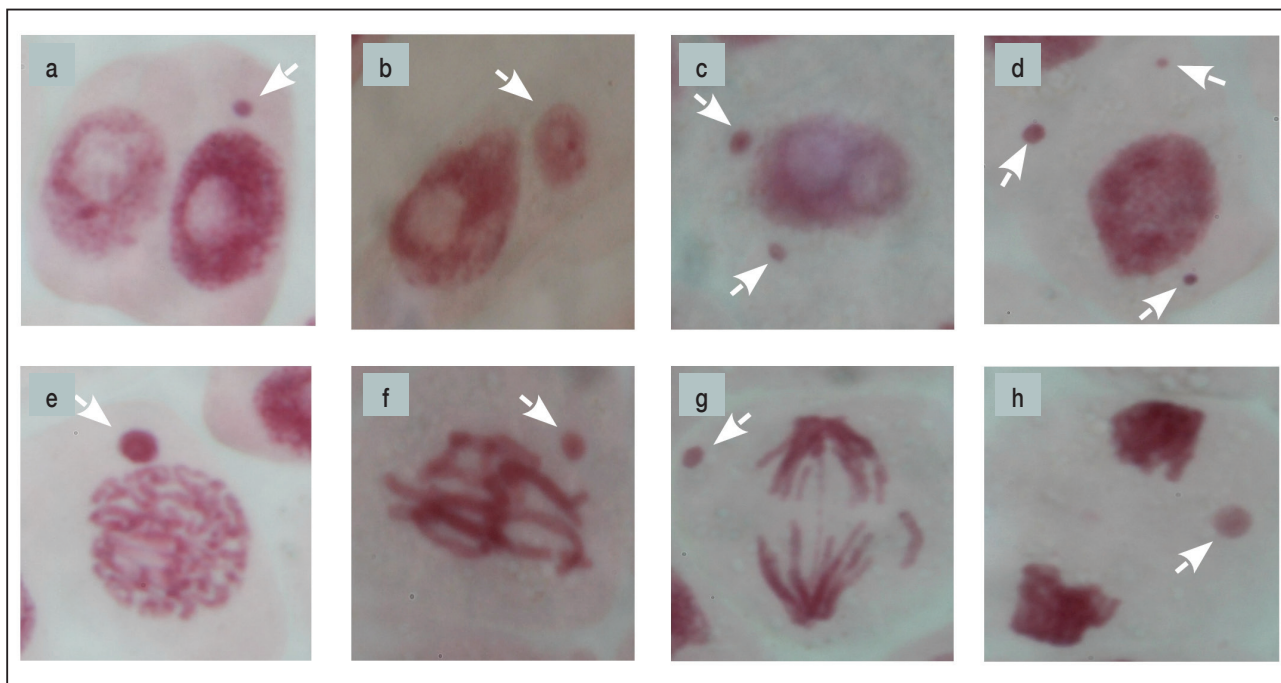
Table 2 - Mitotic index and number of micronucleated cells following exposure to soil leachate from Kalaât Landelous.

	Contrôle	Lixiviat du sol
Indice mitotique (%)	20,5 \pm 9,79	5,33 \pm 3,44*
Nombre de cellules/1000 cellules	0,18 \pm 0,38	4,75 \pm 3,38*

Les valeurs sont les moyennes \pm SE. * $P < 0,05$ selon le test de Tukey à $\alpha = 5$ %

Figure 1 - Induction des micronoyaux suite à une exposition des racines de *V. faba* à un lixiviat du sol de Kalaât Landelous. **a-** micronoyau de petite taille; **b-** micronoyau de grande taille; **c-** cellule avec 2 micronoyaux; **d-** cellule avec 3 micronoyaux; **e-** micronoyau en prophase; **f-** micronoyau en métaphase; **g-** micronoyau en anaphase; **h-** micronoyau en télophase.

Figure 1 - Micronucleus induction following the exposure of *V. faba* roots to a soil leachate from Kalaât Landelous. **a-** small micronucleus; **b-** large micronucleus; **c-** cell with 2 micronuclei; **d-** cell with 3 micronuclei; **e-** micronucleus in prophase; **f-** micronucleus in metaphase; **g-** micronucleus in anaphase; **h-** micronucleus in telophase.



La taille et le nombre des micronoyaux dans une cellule ont varié. En effet, une cellule peut renfermer un micronoyau de petite taille et/ou de grande taille comparé au noyau principal et leur nombre peut atteindre trois micronoyaux par cellule (figure 1). Leur abondance en interphase n'a pas exclu leur présence dans des cellules en division. Ces micronoyaux ont été observés dans des cellules en prophase, métaphase, anaphase et télophase sans aucune synchronisation avec la division en cours (figure 1).

En plus de micronoyaux, plusieurs anomalies chromosomiques touchant la structure et le nombre de chromosomes ont été détectées au niveau de différentes phases mitotiques. Au stade prophasique (figure 2), des cellules avec des chromosomes collants qui sont accompagnés, parfois, d'une perte du matériel génétique ont été observées.

D'autres anomalies chromosomiques ont marqué la métaphase (figure 3). Il s'agit de la formation d'anneau et de c-mitoses, et de la perte d'un ou plusieurs chromosomes entiers suite à leur exclusion de la plaque équatoriale.

La perte des chromosomes entiers et/ou des chromatides suite à une mauvaise migration et la présence des ponts anaphasiques ont été visualisées chez des cellules en anaphase et télophase (figures 4 et 5).

Le lixiviat du sol a agi aussi sur le noyau cellulaire (figure 6). Dans ce cas, des cellules atypiques et une condensation du noyau (pycnose) ont été signalées chez les cellules en interphase.

DISCUSSION

La génotoxicité d'une solution extraite (lixiviat) du sol de Kalaât Landelous a été évaluée en utilisant le test de micronoyaux appliqué sur les extrémités racinaires de fève, une plante modèle couramment utilisée dans les tests de génotoxicité. Le sol d'origine est caractérisé par une salinité excessive dû à la présence d'une nappe phréatique très saline et très proche de la surface ainsi que par un passé d'irrigation par des EUT. L'exposition au lixiviat de sol a permis de détecter les mutagènes qui ne sont pas adsorbés dans le sol et qui peuvent être à la plante. Plusieurs travaux ont utilisé le test de micronoyaux pour l'évaluation d'une contamination environnementale en se servant de *V. faba* comme outil biologique ou d'autres plantes notamment *Allium cepa* (Souguir *et al.*, 2009; Goujon *et al.*, 2014; Ananthkrishnan *et al.*, 2013; Corrêa *et al.*, 2016).

En présence du lixiviat du sol de Kalaât Landelous, nous avons enregistré une diminution significative de la division cellu-

Figure 2 - Différentes anomalies observées en prophase suite à une exposition des racines de *V. faba* à un lixiviat du sol de Kalaât Landelous. **a, b, c**- chromosomes collants; **d**- chromosomes collants avec une perte du matériel génétique.

Figure 2 - Different abnormalities observed in prophase following the exposure of *V. faba* roots to a soil leachate from Kalaât Landelous. **a, b, c**- sticky chromosomes; **d**- sticky chromosomes with genetic material's loss.

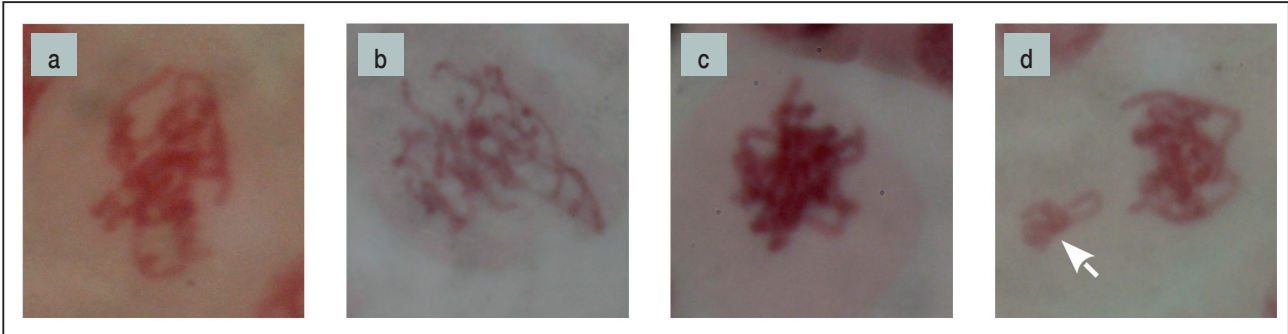


Figure 3 - Différentes anomalies observées en métaphase suite à une exposition des racines de *V. faba* à un lixiviat du sol de Kalaât Landelous. **a**- chromosomes collants avec un micronoyau; **b**- chromosome en anneau; **c**- c-mitose; **d**- chromosomes ne rejoignant pas la plaque équatoriale; **e**- micronoyau (1) et chromosome ne rejoignant pas la plaque équatoriale (2).

Figure 3 - Different abnormalities observed in metaphase following the exposure of *V. faba* roots to a soil leachate from Kalaât Landelous. **a**- sticky chromosomes with a micronucleus; **b**- ring chromosome; **c**- c-mitosis; **d**- chromosomes not joining the equatorial plate; **e**- micronucleus (1) and chromosome not joining the equatorial plate (2).

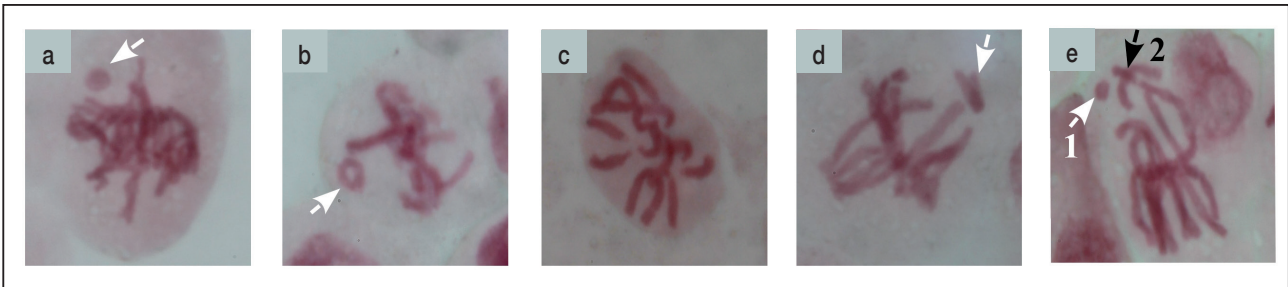


Figure 4 - Différentes anomalies observées en anaphase suite à une exposition des racines de *V. faba* à un lixiviat du sol de Kalaât Landelous. **a**- désorientation et perte des chromosomes; **b**- perte de chromosomes entiers (1) et de chromatides (2); **c**- retard de migration d'une chromatide; **d**- rupture du pont anaphasique et perte d'un chromosome (2); **e**- pont anaphasique.

Figure 4 - Different abnormalities observed in anaphase following the exposure of *V. faba* roots to a soil leachate from Kalaât Landelous. **a**- disorientation and loss of chromosomes; **b**- loss of entire chromosomes (1) and chromatids (2); **c**- chromatid migration delay; **d**- anaphasic bridge break (1) and loss of a chromosome (2); **e**- anaphasic bridge.

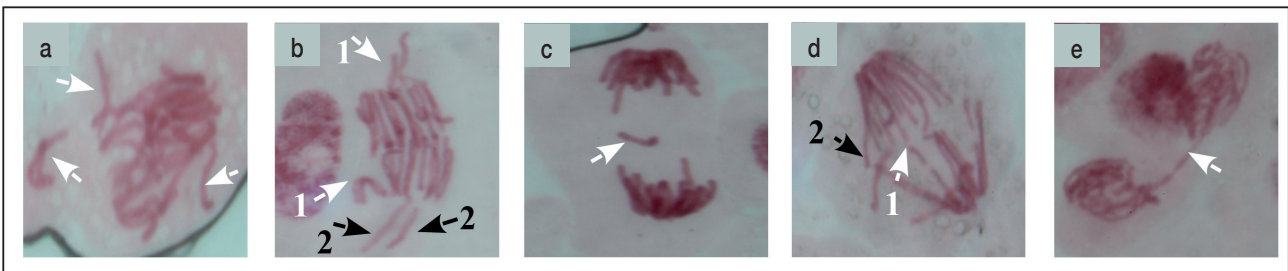


Figure 5 - Différentes anomalies observées en télophase suite à une exposition des racines de *V. faba* à un lixiviat du sol de Kalaât Landelous. **a**- chromosome non-disjoint; **b**- deux ponts (1), rupture du pont (2), chromatides non migrées (3) et chromosome non-disjoint (4); **c**- rupture de pont; **d**- micronoyau.

Figure 5 - Different abnormalities observed in telophase following the exposure of *V. faba* roots to a soil leachate from Kalaât Landelous. **a**- non-disjoint chromosome; **b**- two bridges (1), bridge breakage (2), non-migrated chromatids (3) and non-disjoint chromosome (4); **c**- bridge breakage; **d**- micronucleus.

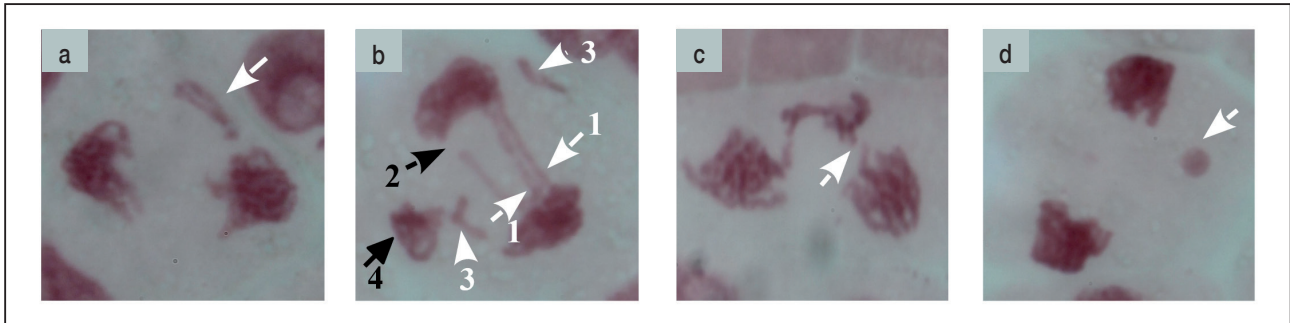
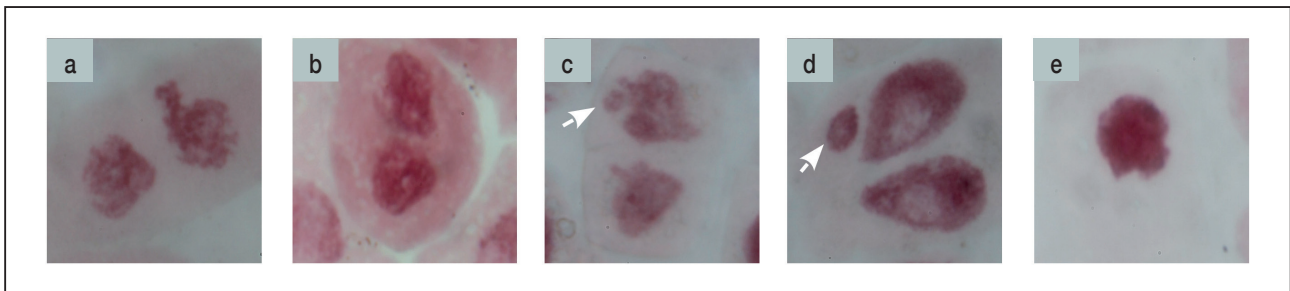


Figure 6 - Anomalies de noyau suite à une exposition des racines de *V. faba* à un lixiviat du sol de Kalaât Landelous. **a-b**- cellule à deux noyaux atypiques; **c-d**- micronoyau dans une cellule à deux noyaux atypiques; **e**- pycnose.

Figure 6 - Nucleus abnormalities following the exposure of *V. faba* roots to a soil leachate from Kalaât Landelous; **a-b**- cell with two atypical nuclei; **c-d**- micronucleus in a cell with two atypical nuclei; **e**- pycnose.



laire à travers une réduction de l'indice mitotique par rapport aux cellules témoins. Une formation importante de micronoyaux a été observée. Ces micronoyaux générés par le lixiviat pourraient avoir comme origine une cassure double brin d'ADN induisant un fragment acentrique ou une perte d'un chromosome entier ou d'une chromatide suite à une mauvaise migration lors de l'anaphase (Iarmarcovai *et al.*, 2007). En plus de leur abondance en interphase, les micronoyaux ont été aussi observés en prophase, métaphase, anaphase et télophase sans aucune synchronisation avec la phase en cours.

Les cellules soumises au lixiviat du sol ont également montré d'autres anomalies touchant la structure et le nombre de chromosomes. Les aberrations clastogéniques survenues suite à une atteinte de la structure des chromosomes de *Vicia* sont résumées en une présence des chromosomes collants, des anneaux et des ponts anaphasiques. L'occurrence des chromosomes collants en métaphase, après l'exposition au lixiviat du sol, semble attribuer un caractère de toxicité sévère et irréversible à ce lixiviat. En effet, l'aspect collant des

chromosomes est considéré comme une anomalie irréversible des chromosomes et un indicateur d'une toxicité sévère qui conduit à une mort cellulaire (El-Ghamery *et al.*, 2000). Ce type d'anomalie pourrait avoir comme origine une altération des protéines non-histones telles que les topoisomérases II et les protéines périphériques (Gaulden, 1987), un enchevêtrement des fibres de la chromatine inter-chromosomiques, une dégradation et une condensation de l'ADN (Darlington et Mcleish, 1951; Österberg *et al.*, 1984).

Les ponts observés lors de l'anaphase et la télophase pourraient provenir de chromosomes dicentriques suite à une réparation échelonnée des cassures double-brins d'ADN ou de la fusion des extrémités télomériques (Fenech *et al.*, 2011; El-Ghamery *et al.*, 2003).

Les chromosomes en anneau, une anomalie de structure particulière de forme circulaire, sont probablement produits après deux cassures de chaque côté du centromère suivies du recollement des deux extrémités opposées avec une perte des fragments distaux (Renjana *et al.*, 2013). Ils pourraient aussi être

le résultat d'un dysfonctionnement des télomères entraînant une fusion des extrémités chromosomiques. Ce type de lésion est létal pour la cellule (Hall et Garcia, 2006). Le lixiviat du sol semble contenir des éléments aneugènes agissant sur le fonctionnement du fuseau mitotique avec une apparition des anomalies de types c-mitoses et une perte des chromosomes entiers et/ou des chromatides. Ces aberrations ont marqué la métaphase, l'anaphase et la télophase. Les c-mitoses représentent les cellules avec des chromatides non séparées suite à un blocage de la mise en place du fuseau mitotique. Leur nom est lié à la colchicine, une substance connue par son inhibition des fibres fusoriales, empêchant ainsi l'écartement anaphasique des chromosomes (Levan, 1938).

Les pertes d'un ou plusieurs chromosomes entiers ou séparés (chromatides) semblent être liés à des anomalies du fonctionnement du centrosome, organite cellulaire protéique ayant un rôle primordial dans la constitution du fuseau mitotique (Iarmarcovai *et al.*, 2007). Il semble que le lixiviat du sol contient des agents capables de se lier sur la tubuline et de provoquer soit une inhibition de la polymérisation des microtubules, soit une dépolymérisation des microtubules déjà assemblés. L'induction de ces anomalies par le lixiviat du sol pourrait conduire à la formation des cellules filles avec un nombre inégal de chromosomes. Le chromosome perdu pourrait former donc un micronoyau indépendant des noyaux de cellules filles ou s'intégrer dans le noyau principal, d'où des cellules filles avec des noyaux inégaux (El-Ghamery *et al.*, 2003).

A côté des anomalies touchant la structure des chromosomes et la stabilité du fuseau mitotique, le lixiviat semble agir sur le noyau cellulaire. En effet, des cellules avec deux noyaux atypiques et d'autres décrivant une pycnose ont été signalées. Les cellules pourraient résulter d'une inhibition de la cytokinèse, un processus permettant la séparation de cytoplasme à la fin de la mitose. Ce type d'aberration a été observé chez les cellules d'*Allium cepa* après exposition à différentes concentrations d'hypochlorite de calcium, couramment utilisé comme désinfectant (Neelamkavil et Thoppil, 2010). La pycnose est marquée par une rétraction du noyau suite à une condensation de la chromatine. La présence de cette anomalie dans les racines de fève témoigne d'une mort cellulaire.

Le lixiviat du sol de Kalaât Landelous est de salinité élevée dominée par des ions Na^+ et Cl^- . En complément à ce travail, l'effet mitodépressif du NaCl, l'induction des micronoyaux et des aberrations clastogéniques et aneugéniques ont été aussi démontrés dans les racines de *V. faba* (résultats non présentés). D'autres auteurs ont étudié le pouvoir génotoxique de la salinité en se basant sur le test de micronoyaux appliqué au niveau des extrémités racinaires de l'orge (*Hodeum vulgare*). Des fortes concentrations de NaCl ont engendré un blocage de la division cellulaire, des anomalies de type ponts anaphasiques, chromosomes collants, retard des chromosomes (Tajbakhsh *et al.*, 2006; Tabur et Demir, 2009; Marakli *et al.*, 2014). Pour *Allium cepa*, Tee-

rarak *et al.* (2009) ont montré, en plus des anomalies mitotiques, une atteinte du noyau cellulaire à travers une formation des bourgeons nucléaires et des noyaux inégaux.

Malgré leurs teneurs faibles, les effets génotoxiques observés dans les racines de *Vicia* exposées au lixiviat du sol pourraient être aussi attribués aux effets individuels des éléments métalliques contenus dans l'extrait ou aux interactions (synergique ou antagoniste) entre eux. La génotoxicité métallique a été largement étudiée et plusieurs travaux ont montré une diminution de la division cellulaire et une induction de micronoyaux et des anomalies chromosomiques sous stress cuprique, cadmique, borique, d'aluminium, d'arsenic et du zinc (Konuk *et al.*, 2007; Souguir *et al.*, 2008; Marcato-Romain *et al.*, 2009; Souguir *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010; Souguir *et al.*, 2011). Les dangers nucléaires liés à des expositions au nickel, chrome et plomb ont été aussi évoqués (Fargašova, 2012; Kaur *et al.*, 2014).

Les ions métalliques peuvent interagir avec d'autres ions présents dans le sol, ce qui pourrait augmenter leur biodisponibilité et leur absorption par la plante. Dans ce contexte, plusieurs travaux ont confirmé le rôle de la salinité dans l'augmentation de la biodisponibilité des ions métalliques suite à leur libération dans la solution du sol (Hatje *et al.*, 2003; Bäckström *et al.*, 2004). Etudiant le comportement de Cu, Cd, Pb et Zn en présence de CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl et de Na_2SO_4 , Acosta *et al.* (2011) ont montré une désorption importante du Cd en présence de tous les sels testés. Ajouté à ce métal, une mobilité notable de Pb en présence de CaCl_2 et NaCl et de Cu en présence de MgCl_2 et Na_2SO_4 ont été mentionnées.

A ces sels et ETM, pourraient s'ajouter d'autres contaminants non-caractérisés dans ce travail et contribuer à générer une telle atteinte du matériel génétique de *V. faba*.

CONCLUSION

L'étude génotoxique du sol de Kalaât Landelous a révélé une atteinte des cellules méristématiques de *V. faba* à travers une perturbation de la division cellulaire, une induction des micronoyaux et des anomalies chromosomiques et nucléaires. Cette génotoxicité pourrait résulter de différents constituants chimiques contenus dans le lixiviat et biodisponibles pour la plante notamment les sels et les ETM et/ou des interactions entre eux. L'évaluation des effets de l'ensemble de ces contaminants biodisponibles à l'aide de cette approche biologique a permis de mieux caractériser les effets sur le matériel biologique et contribue à expliquer la faible croissance au sein des plantes cultivées dans la parcelle expérimentale.

REMERCIEMENTS

Ce travail mené dans le «Laboratoire de Valorisation des Eaux Non-Conventionnelles» s'est effectué dans le cadre du projet bilatéral INRGREF/ACSAD «Unconventional Water Uses» et du projet TUNGER «Integrated Management of Conventional and Unconventional Water Resources in Arid Environment». Ce dernier projet est supporté par le MESRS (Tunisie) et le BMBF (Allemagne).

BIBLIOGRAPHIE

- Acosta J.A., Jansen B., Kalbitz K., Faz A. et Martínez-Martínez S., 2011 - Salinity increases mobility of heavy metals in soils. *Chemosphere*, 85, pp. 1318-1324.
- Amiard J.-C. 2011 - Les risques chimiques environnementaux: méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. Tec et Doc, pp. 782.
- Ananthkrishnan M., Kumarasamy K. et Antony A.S., 2013 - Genotoxic effects of furadan and endosulphan on (*Allium cepa*) root tips. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 6, 1, pp. 126-131.
- Bäckström M., Karlsson S., Bäckman L., Folkesson L. et Lind B., 2004 - Mobilisation of heavy metals by deicing salts in a roadside environment. *Water Res.*, 38, pp. 720-732.
- Corréa A.X.R., Cotellet S., Millet M., Somensi C.A., Wagner T.M. et Radetski C.M., 2016 - Genotoxicity assessment of particulate matter emitted from heavy-duty diesel-powered vehicles using the *in vivo* *Vicia faba* L. micronucleus test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 27, pp. 199-204.
- Darlington C.D. et McLeish J., 1951 - Action of maleic hydrazide on the cell. *Nature*, 167, pp. 407-408.
- Du Laing G., De Vos R., Vandecasteele B., Lesage E., Tack F.M.G. et Verloo M.G., 2007 - Effect of salinity on heavy metal mobility and availability in intertidal sediments of the Scheldt estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 77, pp. 589-602.
- El Hajjouji H., Pinelli E., Guiress M., Merlina G., Revel J.-C. et Hafidi M., 2007 - Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mut. Res.* 634, pp. 25-31.
- El-Ghamery A.A., El-Kholy M.A. et El-Youssef M.A., 2003 - Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.*, 537, pp. 29-41.
- El-Ghamery A.A., El-Nahas A.I. et Mansour M.M., 2000 - The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cytologia*, 65, pp. 277-287.
- Fargašová A., 2012 - Plants as models for chromium and nickel risk assessment. *Ecotoxicology*, 21, 5, pp. 1476-1483.
- Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T., Surrallés J., Crott J.W., Parry J., Norppa H., Eastmond D.A., Tucker J.D. et Thomas P., 2011 - Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26, pp. 125-132.
- Gaulden M.E., 1987 - Hypothesis: some mutagens directly alter specific chromosomal proteins (DNA topoisomerase II and peripheral proteins) to produce chromosome stickiness, which causes chromosome aberrations. *Mutagenesis*, 2, pp. 357-365.
- Goujon E., Sta C., Trivella A., Goupil P., Richard C. et Ledoigt G., 2014 - Genotoxicity of sulcotriane pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 113, pp. 47-54.
- Hall E.J. et Garcia A.J., 2006 - Radiobiology for the Radiologist. 6th edition, Lippincott Williams et Wilkins, pp. 656.
- Hatje V., Payne T.E., Hill D.M., McOrist G., Birch G.F. et Szymczak R., 2003 - Kinetics of trace element uptake and release by particles in estuarine waters: effects of pH, salinity, and particle loading. *Environ. Int.*, 29, pp. 619-629.
- Larmarcovai G., Botta A. et Orsière T., 2007 - Anomalies chromosomiques de nombre, instabilité génétique et expositions professionnelles. *Bull. Cancer*, 94, 4, pp. 381-388.
- Institut National de la Normalisation et de la Propriété Industrielle, 1989 - Protection de l'environnement - Utilisation des eaux usées traitées à des fins agricoles - Spécifications physico-chimiques et biologiques, INNORPI, NT 106.03, pp. 2.
- Kaur G., Singh H.P., Batish D.R., Kohli R.K., 2014 - Pb-inhibited mitotic activity in onion roots involves DNA damage and disruption of oxidative metabolism. *Ecotoxicology*, 23, pp. 1292-1304.
- Konuk M., Liman R. et Çiğerci I.H., 2007 - Determination of genotoxic effect of boron on *Allium cepa* root meristematic cells. *Pak. J. Bot.*, 39, 1, pp. 73-79.
- Levan A., 1938 - The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas*, 24, pp. 471-486.
- Marakli S., Temel A.S. et Gozukirmizi N., 2014 - Salt stress and homobrassinosteroid interactions during germination in barley roots. *Not. Bot. Horti. Agrobo.*, 42, 2, pp. 446-452.
- Marcato-Romain C.E., Pinelli E., Pourrut B., Silvestre J., Guiress M., 2009 - Assessment of the genotoxicity of Cu and Zn in raw and anaerobically digested slurry with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mut. Res.*, 672, pp. 113-118.
- Neelamkavil S.V. et Thoppil J.E. 2015 - Genotoxic assessment of calcium hypochlorite and *Strychnos potatorum* Linn. Seeds-two commonly used water purifying agents. *Rev. Environ. Health*, 30, 1, pp. 19-23.
- Österberg R., Persson D. et Bjursell G., 1984 - The condensation of DNA by chromium (III) ions. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2, pp. 285-290.
- Renjana P.K., Anjana S. et Thoppil J.E., 2013 - Evaluation of genotoxic effects of baking powder and monosodium glutamate using *Allium cepa* assay. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 5, pp. 311-315.
- Smaka-Kincl V., Stegnar P., Lovka M., et Toman M.J., 1996 - The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mut. Res.* 368, pp. 171-179.
- Souguir D., Ferjani E., Goupil P. et Ledoigt G., 2008 - Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper- induced genotoxicity. *Protoplasma*, 233, pp. 203-207.
- Souguir D., Ferjani E., Goupil P. et Ledoigt G., 2009 - Effets génotoxiques du cuivre chez *Vicia faba* et *Pisum sativum*. *Etudes et Gestion des Sols*, 16, 3/4, pp. 339-347.
- Souguir D., Ferjani E., Goupil P. et Ledoigt G., 2011 - Sequential effects of cadmium on genotoxicity and lipoperoxidation in *Vicia faba* roots. *Ecotoxicology*, 20, pp. 329-336.
- Souguir D., Jouzdan O., Khouja M.L., Hachicha M., 2013 - Suivi de la croissance d'*Aloe vera* en milieu salin: Parcelle de Kalaât Landelous (Tunisie). *Etude et Gestion des Sols*, 20, 3, pp. 19-26.
- Tabur S. et Demir K., 2009 - Cytogenetic response of 24-epibrassinolide on the root meristem cells of barley seeds under salinity. *Plant Growth Regul.*, 58, pp. 119-123.
- Tajbakhsh M., Zhou M.X., Chen Z.H. et Mendham N.J., 2006 - Physiological and cytological response of salt-tolerant and non-tolerant barley to salinity during germination and early growth. *Aust. J. Exp. Agric.*, 46, 4, pp. 555-562.
- Teerarak M., Bhinija K., Thitavasanta S. et Laosinwattana C., 2009 - The impact of sodium chloride on root growth, cell division, and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in root tip cells of *Allium cepa* L. *Sci. Horti.*, 121, pp. 228-232.
- Wu L., Yi H. et Yi M., 2010 - Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays. *J. Hazard. Mat.*, 176, pp. 952-956.
- Yi M., Yi H., Li H. et Wu L., 2010 - Aluminum induces chromosome aberrations, micronuclei, and cell cycle dysfunction in root cells of *Vicia faba*. *Environ. Toxicol.*, 25, 2, pp. 124-129.

