

INDUCTION DES MICRONOYAUX ET INDICE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE CHEZ LA POPULATION DES MZAMZA EXPOSEE AUX EAUX USEES

K. Glouib^{1,2}, B. Charaf¹, S. El Kettani³ et A. Hilali^{1,2}

¹Laboratoire de Cytogénétique et Toxicogénétique, Université Hassan I^{er}, Faculté des Sciences et Techniques de Settat, B.P. 577, FST Settat, Maroc

² UFR Sciences Anthropogénétiques, UCD, Faculté des Sciences, El Jadida, Maroc

³ Unité de Médecine Interne, Hôpital Hassan II, Settat, Maroc
hilalia@hotmail.com

(Received 7 November 2005 - Accepted 27 March 2006)

RESUME

Les effluents d'eaux usées constituent l'un des problèmes majeurs de pollution dans plusieurs régions du Maroc. En effet, au nord de la ville de Settat, les eaux usées domestiques et industrielles sont évacuées sans traitement préalable dans l'oued Bou Moussa, devenu ainsi un exutoire sous forme d'un égout à ciel ouvert. Il traverse la communauté rurale des Mzamza et les riverains l'utilisent comme une source principale d'eaux d'irrigation. Cette utilisation peut éventuellement avoir un effet néfaste sur cette population.

Afin de permettre une évaluation précise des risques sanitaires encourus par l'exposition aux eaux usées, nous avons procédé chez cette population à une étude cytogénétique qui permet de détecter de façon précoce les dommages génotoxiques chez les organismes exposés aux agents mutagènes.

Ainsi, dans ce travail, nous avons évalué le taux des dommages produits au matériel génétique (ADN), par la mesure de l'indice de prolifération cellulaire (IP) et la numération des taux des micronoyaux (MN), chez la population exposée en comparaison avec une population témoin.

Les résultats montrent que, chez la population exposée l'indice de prolifération cellulaire est significativement plus faible, alors que le taux des micronoyaux est significativement plus élevé par rapport aux résultats observés chez la population non exposée.

Mots clés: eaux usées, génotoxicité, lymphocytes, indice de prolifération cellulaire, micronoyaux

ABSTRACT

Proper sewage treatment constitutes one of the major problems in pollution control in several regions of Morocco. Indeed, to the north of the city of Settat, both domestic and

industrial wastewaters are directed without previous treatment into the Oued Bou Moussa, thus becoming an open outlet as a sewage river. It crosses the farming community of Mzamza and the residents use the sewage as their main source of irrigation water. This use can possibly have deleterious effect on the health of this population.

In order to assess the potential health risk induced by the exposure of the population to the wastewaters, the cytogenetic damage produced in the genetic material (DNA) was evaluated by measuring the cellular proliferation index (IP) and the frequency in the rate of the micronuclei (MN.), in peripheral blood lymphocytes of the exposed population in comparison with a control population.

Results reveal that the proliferation index (PI), as measured in cultured lymphocytes is significantly decreased in the exposed population, as compared with the control group. The frequency of micronucleated lymphocytes is significantly increased in the population exposed to sewage water in comparison with the control group, revealing potential exposure to genotoxic agents in the community environment.

Keywords: wastewaters, genotoxicity, lymphocytes cellular proliferation index, micronucleus

INTRODUCTION

Au Maroc, selon le Conseil Supérieur de l'Eau et du Climat (Jemali & Kefati, 2002), environ 70 millions de m³ des eaux usées sont utilisées, chaque année en agriculture, sans précautions sanitaires ; Et ce pour irriguer une superficie de plus de 7000ha de cultures diverses (cultures fourragères, cultures maraîchères, grandes cultures, arboricultures,...). L'irrigation des cultures maraîchères par les eaux usées est interdite au Maroc, mais cette interdiction n'est pas toujours respectée (ADH, 1991).

A partir des années 1980, la région de Settat a connu une grande expansion démographique, une urbanisation de plus en plus importante, une surexploitation agricole et une industrialisation récente et rapide (Laamari *et al.*, 2004).

Des unités industrielles installées au sud de la ville de Settat opèrent dans plusieurs secteurs. Ainsi, des polluants de nature chimique et en quantités importantes sont rejetés dans la nature. Il s'agit essentiellement du plomb, du cadmium, de l'arsenic, du mercure, du chrome et des nitrates. Les études conduites depuis l'an 2000 ont permis de confirmer la présence de tous ces éléments dont les concentrations sont élevées et diffèrent d'une zone à une autre selon un gradient bien établi (Kholtei *et al.*, 2003).

Au nord de la ville, les eaux usées domestiques et industrielles sont évacuées sans aucun traitement préalable, leur volume est estimé à plus de 9632 m³/jour, elles sont charriées par l'oued Bou Moussa qui est devenu un exutoire sous forme d'un égout à ciel ouvert. Il traverse la communauté des Mzamza sur une distance de huit kilomètres. Le long de son passage les riverains l'utilisent pour l'irrigation des cultures céréalières et fourragères (Laamari *et al.*, 2004).

La présente étude a pour objectif d'évaluer l'impact de l'utilisation des eaux usées en agriculture sur le patrimoine génétique de la population de la communauté de Mzamza (PE) en comparaison avec une population non exposée (PNE) qui vit dans les mêmes conditions à l'exception de l'exposition aux eaux usées.

MATERIELS ET METHODES

Echantillonnage

La collecte s'est faite à travers une enquête comparant une PE appartenant au douar Dladla et douar Boukallou, à une PNE appartenant au douar Oulad Afif. La PE utilise l'eau d'oued Bou Moussa pour l'irrigation et consomme l'eau de la nappe phréatique sous-jacente. La PNE est aussi une communauté rurale et qui n'a aucun contact avec les eaux usées.

La PE est formée de 30 individus, 13 de sexe masculin et 17 de sexe féminin, âgés de 5 à 61 ans. La PNE est formée de 30 sujets, 14 de sexe masculin et 16 de sexe féminin, âgés de 6 à 63 ans. Les deux populations sont renseignées sur le but de l'étude et ont donné leur consentement.

Chaque individu, a d'abord subi un examen médical complet avec prélèvement des échantillons sanguins et a répondu à un questionnaire. Ce questionnaire tient compte de plusieurs facteurs tels que la profession, la nature d'exposition aux eaux usées, la prédisposition génétique, l'histoire tabagique et les habitudes alimentaires.

Culture cellulaire

La technique utilisée dérive de celle proposée par Fenech et Morley (1985). A partir du sang veineux, et selon les conditions techniques employées dans notre laboratoire, 0,5 ml du sang total ont été incubés dans des tubes en verre contenant 5 ml de milieu RPMI 1640, additionné de 15% de sérum de veau fœtal, 1% de phytohémagglutinine et 1% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Ces tubes ont été placés horizontalement dans une étuve à 37°C pendant 72 h. Après 44 h de culture, une solution de cytochalasin-B a été ajoutée à raison de 0,1 ml par tube. La solution de cytochalasin-B est préparée en dissolvant 5 mg de ce produit dans 1,5 ml de diméthylsulfoxyde avant d'y ajouter 13,5 ml du milieu RPMI 1640. Au terme de la culture, la suspension cellulaire est centrifugée à 1000 tours/minutes pendant 10 minutes, et est soumise à un choc hypotonique avec du KCl (0.075 M) puis trois fixations à l'aide du mélange acide acétique-méthanol (1v :3v). Les cellules sont étalées sur des lames en verre préalablement dégraissées. Les lames sont ensuite séchées à l'air ambiant et la coloration se fait dans du Giemsa 5% dans un tampon phosphate à pH 6,8. La lecture est effectuée par deux personnes au microscope optique en double aveugle.

Test des micronoyaux

Pour l'analyse des micronoyaux (MN), seuls les lymphocytes binucléés sont observés. Les critères de reconnaissance des micronoyaux sont strictement définis : entité nucléaire indépendante des noyaux principaux et de même coloration qu'eux. La taille doit être comprise entre le seizième et le tiers du plus petit des deux noyaux principaux (Fenech, 1993). Pour chaque individu, le taux des MN est calculé sur 1000 lymphocytes binucléés analysés. Ce test permet de quantifier les effets aneugènes et les effets clastogènes des agents génotoxiques, en effet, les fragments acentriques et les chromosomes qui n'ont pas achevé leur migration forment en télophase des petites entités nucléaires qu'on appelle pour cette raison micronoyaux.

Indice de prolifération cellulaire

L'indice de prolifération cellulaire (IP), est une mesure indirecte de la durée du cycle cellulaire. Il dépend du taux de cellules mononucléées, binucléées, trinucléées et tetranucléées. Il est défini par la formule suivante (Titenko-Holland *et al.*, 1997) :

$$IP = \frac{(1 \times N_1) + (2 \times N_2) + (3 \times N_3) + (4 \times N_4)}{1000 \text{ cellules analysées}}$$

N_1 : nombre de cellules mononucléées; N_2 : nombre de cellules binucléées ; N_3 : nombre de cellules trinucléées ; N_4 : nombre de cellules tétranucléées.

Analyse statistique

On a procédé à une analyse de variance, cet outil effectue une analyse simple de variance sur les données de deux ou plusieurs échantillons. L'analyse teste l'hypothèse selon laquelle chaque échantillon provient de la même distribution de probabilité sous-jacente par rapport à l'hypothèse contraire selon laquelle les distributions de probabilité ne sont pas les mêmes pour les échantillons.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les méthodes cytogénétiques sont largement utilisées depuis plus de trente ans pour évaluer les doses reçues par des personnes susceptibles d'avoir été professionnellement ou accidentellement exposées aux rayonnements ionisants (Aitio *et al.*, 1988). Dans cette étude, nous avons utilisé le test des MN et l'IP en tant que bioindicateurs des dommages produits à l'ADN suite à l'exposition aux agents génotoxiques.

La Figure 1 représente les résultats de nos observations concernant le comptage des MN dans les cellules binucléées chez les individus de la PE ainsi que la valeur moyenne observée chez les individus de la PNE.

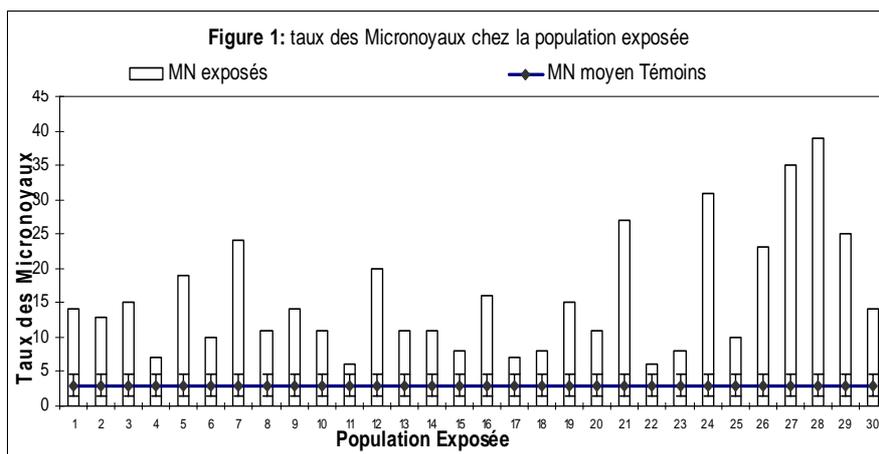


Figure 1. Taux des micronoyaux chez la population exposée.

Les résultats montrent un taux moyen des MN de 16 ± 8 qui dépasse largement le taux moyen observé chez la PNE de l'ordre de 3 ± 2 . Cette différence est très hautement significative ($p < 0.001$). Ces résultats ont montré également une variabilité importante dans la réponse des individus de la PE.

La Figure 2 représente les résultats de l'IP de chaque individu de la PE en comparaison avec la valeur moyenne observée chez la PNE. Nous pouvons constater que la majorité des individus exposés présente un IP plus faible ($1,29 \pm 0,20$) que la valeur moyenne observée chez la PNE ($1,60 \pm 0,16$). L'analyse statistique confirme que cette diminution est hautement significative ($p < 0.001$).

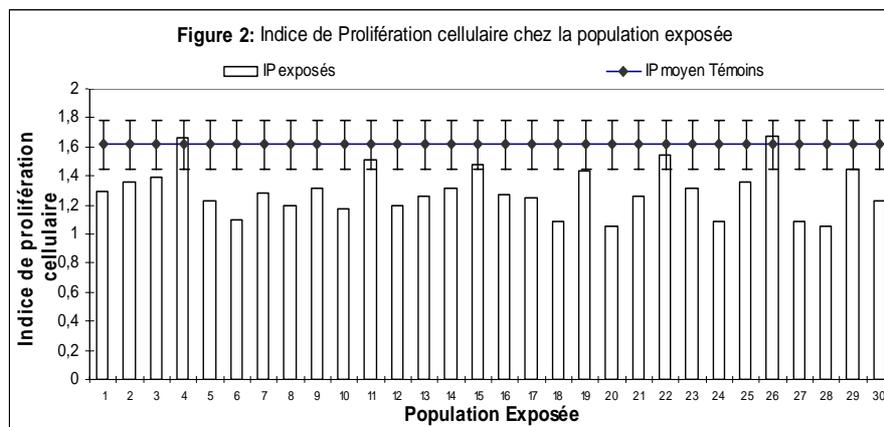


Figure 2. Indice de prolifération cellulaire chez la population exposée.

D'autre part, nous avons pu démontrer l'existence d'une corrélation inverse entre l'IP et le taux des MN. En effet lorsque le taux MN augmente, la vitesse de la division cellulaire est retardée, ceci est probablement dû à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire les checkpoint G1/S et G2/M en réponse aux lésions induites au niveau de l'ADN (Clarke *et al.*, 1999).

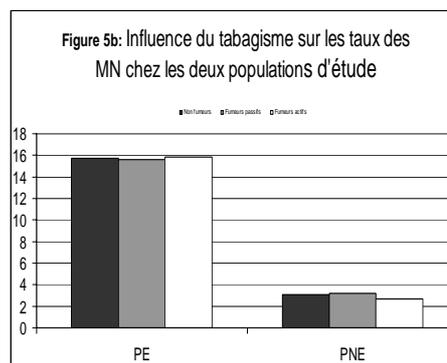
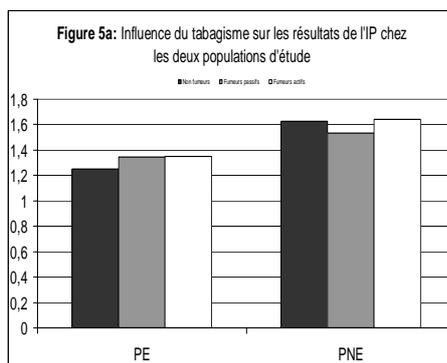
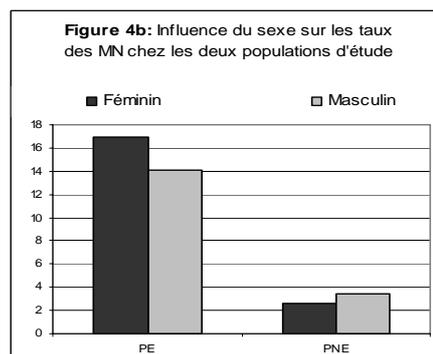
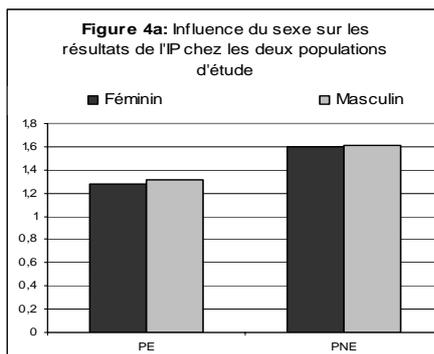
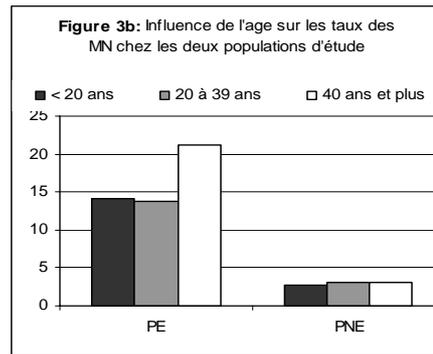
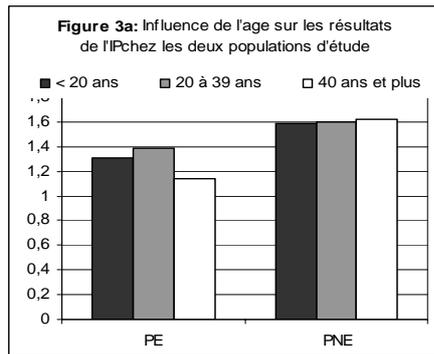
Pour mieux expliquer les différences observées dans la PE ou dans la PNE, ou au sein de la même population, nous avons étudié l'évolution des deux bioindicateurs en fonction de l'âge, du sexe, du tabagisme et d'autres facteurs.

Ainsi dans la PE nous avons constaté que l'IP est plus faible chez les personnes ayant plus de 40 ans, alors que chez ces mêmes personnes le taux des MN est le plus élevé (Figures 3a et 3b). Les différences observées sont hautement significatives ($p < 0,01$). Par contre, dans la PNE, l'âge n'affecte pas le taux des MN ou la cinétique de la division cellulaire (Figures 3a et 3b).

Comme le montre la Figure 4a et 4b, le facteur sexe ne semble pas affecter l'IP chez la PE et la PNE, alors que la production des MN dans la PE est plus importante chez les individus de sexe féminin. Toutefois, la différence observée n'est pas significative.

Par ailleurs, le tabagisme (Figures 5a et 5b), la consommation du thé, du café ou d'alcool n'influencent pas l'IP ou le taux des MN chez les deux populations.

Des études ont montré que l'exposition aux radiations ionisantes entraîne une diminution de l'indice mitotique et celui de prolifération cellulaire. Elle augmente le taux des micronoyaux, des échanges entre les chromatides sœurs ainsi que les aberrations chromosomiques (Leonard *et al.*, 1998 ; Hung *et al.*, 1995).



Une étude cytogénétique concernant les expositions aux polluants chimiques tel que le benzène, le toluène, l'éthylbenzène, le m, p et o-xylène, le n-propylbenzène, le 1,3,5-triméthylbenzène, le 2-éthyltoluène, 1,2,4-triméthylbenzène, le trichlorethylène et le tetrachlorethylène a montré un effet positif sur la production des dommages à l'ADN par les tests des micronoyaux, des échanges entre chromatides sœurs et l'indice de prolifération cellulaire. Toutefois cette même étude a montré qu'il n'y a pas un effet de tabagisme sur ces différents bioindicateurs (Klemans *et al.*, 1995).

Concernant les composés métalliques, une étude sur les expositions professionnelles, réalisée par A. Leonard et A. Bernard en 1993 a montré que l'Arsenic, le Cadmium, le Chrome et le Béryllium sont des agents potentiellement génotoxiques. Ces auteurs ont conclu que pour ces métaux, il y a une relation claire entre leurs effets génotoxiques et leurs effets cancérigènes. Une autre étude faite par Hantson *et al.* en 1996 prouve la clastogénicité de l'Arsenic.

Il convient de rappeler que la variation interindividuelle évaluée par des tests cytogénétiques sur des lymphocytes humains a été rapportée par plusieurs auteurs (Diana, 1999 ; Bolognesi *et al.*, 1997). Ces études ont montré que cette variation est fonction de diverses interactions des agents génotoxiques avec l'ADN (Obe & Beek, 1984), comme elle peut être due à l'âge, le sexe, le métabolisme et les compétences de réparation intrinsèque (Diana, 1999 ; Obe & Beek, 1982).

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons montré que le test des MN et celui de l'IP ont permis de mettre en évidence l'effet génotoxique des eaux usées.

Les résultats obtenus ont montré que, dans la population exposée aux eaux usées, le taux des MN dans les lymphocytes du sang périphérique, est significativement élevé, plus particulièrement chez les personnes âgées de plus de 40 ans. L'indice de prolifération cellulaire a montré une diminution significative chez les individus de la PE. Toutefois, ces deux bioindicateurs présentent des variations interindividuelles importantes pouvant être expliquées par la nature de l'exposition, la durée de l'exposition et la réponse intrinsèque propre à chaque individu.

Pour mieux apprécier l'impact et la nature des agents génotoxiques présents dans les eaux usées, on va étudier *in vitro* sur des modèles cellulaires les différentes possibilités de synergie et/ou d'antagonisme entre les polluants présents dans ces eaux.

On peut déduire par le fait que l'utilisation des eaux usées à des fins agricoles est très probablement responsable d'un effet génotoxique patent, ses conséquences pathologiques sont actuellement difficiles à prévoir. Une surveillance attentive de la population exposée s'impose avec nécessité d'un traitement des eaux usées dans une station d'épuration.

On peut conclure que, les études cytogénétiques, chez des populations exposées, peuvent être utilisées avec confiance pour déterminer le risque potentiel de développement de problèmes de santé (Wagida, 1994 ; Sorsa & Yager, 1987).

REMERCIEMENTS

Ce travail a eu le support financier du Centre de Recherche pour le Développement International (Canada) et la Fondation Ford (USA) dans le cadre du programme Ecosanté.

REFERENCES

- ADH, Administration De l'Hydraulique 1991. *Pollution des eaux souterraines par les nitrates cas de Tadla*. Rapport, Rabat, Maroc, 26p.
- Aitio, A., Becking, G., Berlin, A., Bernard, A., Foa, V., Kello, D., Krug, E., Leonard, A. et Nordberg, G. 1988. Indicators for assessing exposure and biological effects of genotoxic chemical. *European Commission, EUR 11642 EN*, 191p.
- Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Baral, R., Casalone, R., Dalpra, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lalberti, L., Lando, C., Miglioore, L., Padovani, P., Pasquini, R., Puntoni, R., Sbrana, I., Stella, M., Bonassi, S. 1997. Age related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 6(11): 981-982.
- Clarke, A. S., Lowell, J. E., Jacobson, S. J., and Pillus, L. 1999. Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 2515-2526.
- Diana, A. 1999. Factors contributing to biomarkers responses in exposed workers. *Mutat. Res.*, 428: 197-202.
- Fenech, M. 1993. The cytokinesis – block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in a human population. *Mutat. Res.*, 285: 35-44.
- Fenech, M. et Morley, A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, 147: 29-36.
- Hantson, P., Verellen-Dumoulin, C., Libouton, J.M., Leonard, A., Leonard, E.D., Mahieu, P. 1996. Sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes after ingestion of high doses of arsenicals. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 68: 342-344.
- Hung, H.T., Gerber, G.B., Leonard, E.D., Crutzen-Fayt, M.C., Richard, F. et Leonard, A. 1995. Utilisation du test micronoyaux comme dosimètre biologique en cas d'exposition homogène ou non homogène aux radiations ionisantes. *C. R. Soc. Biol.*, 189(6): 1137-1142.
- Jemali, A. et Kefati, A. 2002. Réutilisation des eaux usées au Maroc. *Forum de la gestion de la demande des eaux. Rabat, Maroc, Ministère de l'Agriculture*.
- Kholtei, S., Bouzidi, A., Bonini, M., Fekhaoui, M., Sbai, K., Anan, R. et Creppy, E.E. 2003. Contamination des eaux souterraines de la plaine de Berrechid dans la région de Chaouia au Maroc par des métaux présents dans les eaux usées : effet de la pluviométrie. *Vecteur environnement*, 36(5) : 68-80.
- Klemans, W., Vleminckx, C., Schriewer, L., Joris, I., Maes, A., Ottogali, M., Pays, A., Planard, C., Rigaux, G., Ros, Y., Vande Rivière, M., Vandenvelde, J., Verschaeve, L., Deplaen, P., Lakhanisky, Th. 1995. Cytogenetic biomonitoring of a population of children allegedly exposed to environmental pollutants, phase 2: results of a three-year longitudinal study. *Mutat. Res.*, 342: 147-156.
- Laamari, A., El Ketteni, S., Bouzidi, A. et Tanji, A. 2004. *Evaluation de l'impact de l'utilisation des eaux usées en agriculture sur l'écosystème et la santé de la*

- communauté des Mzamza, Settat, Maroc. Rapport 2004 projet CRDI/INRA n°100771-0004.*
- Leonard, A. et Bernard, A. 1993. Biomonitoring exposure to metal compounds with carcinogenic properties. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 101 (Suppl. 3): 127-133.
- Leonard, A., Leonard, E.D., Decat, G. et Hilali, A. 1998. Surveillance biologique, par analyse des anomalies chromosomiques, des personnes ayant pu être exposées aux radiations ionisantes. Revue des cas étudiés en Belgique de 1971 à 1996. *Annales de l'Association Belge de Radioprotection*, 23(1) : 113-126.
- Obe, G. et Beek, G. 1982. The human leukocyte system. In: F.J. de Serres and A. Hollaender (Eds.), *Chemical mutagens and methods for their detection*, vol.7, Plenum, New York, pp. 337-400.
- Obe, G. et Beek, G. 1984. Human peripheral lymphocytes in mutation research. In: G. Obe (Ed.), *Mutation in man*, Springer, Berlin, pp. 177-197.
- Sorsa, M., Yager, J.W. 1987. Cytogenetic surveillance of occupational exposure. In: *cytogenetics* (Obe G., Basler A., eds). Berlin and Heidelberg/ Springer-Verlag, pp. 345-360.
- Titenko-Holland, N., Windhan, G., Kolachana, P., Reinish, F., Paravatham, S., Osorio, A.M. and Smith, M.T. 1997. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo* : a study of malathion-exposed workers. *Mut. Res.*, 388 : 85-95.
- Wagida, A.A. 1994. Monitoring of human populations at risk by different cytogenetic end points. *Environ. Health Perspect.*, 102 (Suppl. 4): 131-134.