

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE

PRESENTE A

L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

INRS-eau

par

Manon Harwood

PROCEDURE D'ENSEMBLE DE DEPISTAGE DU POTENTIEL GENOTOXIQUE

DES EAUX RESIDUAIRES

EN TENANT COMPTE DES INTERACTIONS PHYTOPLANCTONIQUES

OCTOBRE 1987

REMERCIEMENTS

Je désire, tout d'abord, remercier mon directeur de thèse, le docteur Pierre Couture, pour ses précieux conseils et sa disponibilité, particulièrement lors de la rédaction de cette thèse.

Je remercie, tout spécialement, le docteur Christian Blaise, Biologiste principal, Direction de la protection de l'environnement, Environnement Canada, pour ses conseils judicieux, son appui ainsi que sa disponibilité et son intérêt soutenu tout au long de l'élaboration de ce travail.

Ma reconnaissance s'adresse également à Richard Hogue, mon compagnon de tous les jours, pour ses encouragements multiples, son aide et sa patience sans borne, notamment lors de la rédaction finale de ce travail.

Enfin, il me fait plaisir de souligner l'excellente collaboration dont j'ai pu bénéficier de la part du personnel du laboratoire Capitaine Bernier, Direction de la protection de l'environnement, Environnement Canada.

RÉSUMÉ

Diverses activités anthropogéniques contribuent à un "stress génotoxique" pour l'environnement, ainsi que le démontrent plusieurs études récentes. L'interprétation de ce genre particulier d'agression est souvent difficile au niveau de son impact potentiel. Dans ce contexte, nos préoccupations à l'égard des effluents industriels nous ont amenés à développer une procédure expérimentale qui vise, tout d'abord, à dépister leur génotoxicité et, ensuite, à évaluer la façon dont le phytoplancton peut interagir avec celle-ci. L'évaluation des caractéristiques génotoxiques initiales des effluents est déterminée par l'analyse de trois sous-échantillons, soit: 1) la phase liquide de l'échantillon, 2) celle-ci après extraction et concentration et 3) l'extrait concentré de la phase solide de l'échantillon. L'étude de la capacité du phytoplancton à interagir sur les caractéristiques génotoxiques des échantillons s'effectue 1) sur l'extrait concentré de la biomasse algale (Selenastrum capricornutum) après exposition à l'effluent initial, 2) sur l'effluent mis en contact avec la population phytoplanctonique (le surnageant) et 3) sur l'extrait concentré du surnageant. Le SOS chromotest (test colorimétrique quantitatif pour les génotoxines) a été utilisé pour évaluer chacun des six sous-échantillons des effluents étudiés.

La mise au point de la procédure expérimentale a été réalisée à partir d'expériences avec des substances pures soit le 4-Nitro Quinoline N-Oxide, le 2 Amino Anthracène et le N-Méthyle-N'-Nitro-n-Nitroguanidine. Les procédures élaborées se sont révélées efficaces pour mettre en évidence les caractéristiques génotoxiques des effluents industriels et la capacité du phytoplancton à interagir sur ces caractéristiques. L'étude a permis de faire ressortir différentes interactions phytoplanctoniques face à ce type d'agression. On retrouve, entre autres, la détoxification, la bioaccumulation de génotoxines, l'activation potentielle de pro-mutagènes, la production endogène de génotoxines ainsi que la modification des composants de certains échantillons sans pour autant modifier le potentiel génotoxique de l'échantillon.

TABLE DES MATIÈRES

	<u>Page</u>
REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	vii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE	8
1.1. Evaluation du potentiel génotoxique des effluents industriels.....	11
1.1.1. Filtration	11
1.1.2. Phase liquide	11
1.1.3. Phase solide	13
1.2. Capacité du phytoplancton à interagir sur les caractéristiques génotoxiques d'un échan- tillon	14
1.2.1. Bioaccumulation	14
1.2.2. Tests de génotoxicité	16
CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	18
2.1. Choix des échantillons	18
2.2. Echantillonnage	21
2.3. Traitement des échantillons	22
2.4. Tests de toxicité	24
2.4.1. Test de toxicité avec bactéries	24
2.4.2. Test de toxicité avec algues	25
2.5. Test de dépistage génotoxique	25
2.5.1. Principe du test	26
2.5.2. Préparation des échantillons et des microplaques	29

2.5.3. Mise en évidence de l'activité géno- toxique	30
2.5.4. Détermination de l'activité géno- toxique	33
2.6. Extraction et concentration	36
2.7. Test de bioaccumulation	38
2.7.1. Culture des algues	38
2.7.2. Préparation de l'inoculum algal	40
2.7.3. Test de pré-bioaccumulation	40
2.7.4. Test de bioaccumulation	43
2.8. Analyse statistique des résultats	44
2.8.1. Test de l'hypothèse nulle	44
2.8.2. Intervalle d'estimation des SOSIP	45
2.8.3. Test d'égalité des coefficients de régression	45
CHAPITRE III. RÉSULTATS ET DISCUSSION	47
3.1. Evaluation du potentiel génotoxique initial des échantillons	48
3.1.1. Phase liquide	48
3.1.2. Phase solide	58
3.2. Capacité du phytoplancton à interagir sur les caractéristiques génotoxiques d'un échan- tillon	58
3.2.1. Analyse des résultats pour les subs- tances pures	64
3.2.2. Analyse des résultats pour les ef- fluents industriels	78
CONCLUSION	88
BIBLIOGRAPHIE	96
ANNEXES	102
I. Détermination du facteur de correction relié à l'activité de l'alcaline phosphatase	103
II. Extraction et concentration: procédure expéri- mentale	105

LISTE DES TABLEAUX

	<u>Page</u>
Tableau 1. Liste des substances pures dont l'activité génotoxique a été évaluée.....	19
Tableau 2. Effluents industriels évalués pour leur activité génotoxique.....	20
Tableau 3. Mode de préparation des échantillons pour le test de pré-bioaccumulation en fonction des résultats de la CI50-96 h.....	42
Tableau 4. Evaluation de l'activité génotoxique initiale de la phase liquide des échantillons à l'aide de tests directs avec le SOS Chromotest et détermination des seuils minimums de génotoxicité.....	49
Tableau 5. Résultats de l'activité génotoxique de la phase liquide des échantillons après extraction et concentration, et détermination des seuils minimums de génotoxicité.....	56
Tableau 6. Evaluation de l'activité génotoxique des surnageants à l'aide de tests directs avec le SOS Chromotest et détermination des seuils minimums de génotoxicité.....	60
Tableau 7. Résultats de l'activité génotoxique des surnageants et des culots algaux après extraction et concentration, et détermination des seuils minimums de génotoxicité.	61
Tableau 8. Evaluation comparative de l'activité génotoxique initiale des échantillons et des surnageants.....	65

LISTE DES FIGURES

	<u>Page</u>
Figure 1. Présentation schématique de la démarche expérimentale utilisée pour mettre en évidence le potentiel génotoxique initial des effluents.....	9
Figure 2. Présentation schématique de la démarche expérimentale utilisée pour mettre en évidence la capacité des algues à interagir sur les caractéristiques génotoxiques d'un échantillon.....	10
Figure 3. Diagramme schématique de la procédure de filtration.....	23
Figure 4. Courbe dose-réponse typique d'un composé génotoxique testé avec le SOS Chromotest..	28
Figure 5. (A) Schématisation de la préparation des microplaques et (B) disposition du contenu de la microplaque sans activation métabolique.....	31
Figure 6. Activité génotoxique initiale de l'échantillon 1 dans le test direct avec activation métabolique (SOS Chromotest).....	50
Figure 7. Activité génotoxique initiale de l'échantillon 5 dans le test direct sans activation métabolique (SOS Chromotest).....	52
Figure 8. Activité génotoxique de la solution initiale (*) et du surnageant (o) pour l'échantillon de 4NQO dans le test direct sans activation métabolique (SOS Chromotest).....	66

- Figure 9. Effet de la lumière et de la centrifugation sur l'activité génotoxique de la solution de 4NQO dans le test direct sans activation métabolique..... 69
- Figure 10. Activité génotoxique A) de la solution initiale (*) et du surnageant (o) pour l'échantillon de 2AA et B) de l'extrait concentré du culot algal dans le test avec activation métabolique (SOS Chromotest).. 71
- Figure 11. Effet de la lumière et de la centrifugation sur l'activité génotoxique de la solution de 2AA dans le test direct avec activation métabolique..... 73
- Figure 12. Activité génotoxique de la solution initiale (*) et du surnageant (o) pour l'échantillon de MNNG dans le test direct sans activation métabolique (SOS Chromotest)..... 75
- Figure 13. Histogramme des valeurs de SOSIP obtenues pour les contrôles positifs lors de la caractérisation initiale et suite à la bioaccumulation..... 77
- Figure 14. Histogramme des valeurs de SOSIP obtenues pour les effluents d'origine industrielle lors de leur caractérisation initiale et suite à leur bioaccumulation..... 79
- Figure 15. Histogramme des valeurs de SMG obtenues pour les effluents d'origine industrielle lors de leur caractérisation initiale et suite à leur bioaccumulation..... 80
- Figure 16. Activité génotoxique de l'extrait concentré de l'effluent initial (*) et du surnageant (o) pour l'échantillon 1 dans le test sans activation métabolique (SOS Chromotest)..... 81

- Figure 17. Activité génotoxique de l'effluent initial (*) et du surnageant (o) pour l'échantillon 4 dans le test direct sans activation métabolique (SOS Chromotest).. 85
- Figure 18. Cheminement de la procédure d'extraction et de concentration des sous-échantillons. 109

INTRODUCTION

De récentes études ont clairement établi que des molécules chimiques génotoxiques sont largement répandues dans l'environnement (De Raat et al., 1985). La génotoxicité englobe toutes les agressions létales et héréditaires : le caryotype et l'extracaryotype du matériel génétique des cellules germinales et somatiques (Wright, 1980). On constate que parmi tous les agents génotoxiques connus, c'est-à-dire ceux en mesure d'altérer de façon directe ou indirecte la structure ou l'expression des gènes cellulaires (virus, radiations ionisantes, ultraviolets, et composés chimiques), les composés chimiques ont une importance majeure (Miller et Miller, 1981). Une large portion des cancers humains pourrait découler d'une exposition à des composés chimiques toxiques présents dans l'environnement (McCann et al., 1979). De plus, certains effets génotoxiques ont été observés chez des organismes vivant dans des environnements contaminés, notamment dans

le milieu aquatique où sont déversés un nombre considérable d'effluents industriels toxiques (De Raat et al., 1985).

L'exposition à des agents génotoxiques entraîne de nombreux effets délétères pour la santé humaine tels des tares héréditaires, le développement de cancers, de tumeurs ainsi que de certaines maladies métaboliques (Meier et Bishop, 1985). On considère également que l'exposition à des agents mutagéniques pourrait jouer un rôle important au niveau de l'étiologie de certaines maladies humaines comme par exemple l'artériosclérose, le sénile du cristallin (Hartman, 1983), l'activation de maladie coronarienne ainsi que l'accélération de certains processus de vieillissement (SBSC et Environnement Canada, 1986).

La présence de pollution mutagénique/cancérogénique doit donc être surveillée en respect des effets potentiels sur la santé humaine mais également en raison des impacts directs possibles sur l'écologie du milieu .

Malheureusement, les substances génotoxiques sont difficilement détectables. Certaines substances toxiques caractérisées par des effets rapides et aigus sur les organismes permettent une détection rapide des sources. Au contraire, les effets découlant d'une exposition à des agents génotoxiques ne se manifestent pas immédiatement

surtout lorsqu'il s'agit de tumeurs, de cancers ou encore de tares génétiques. Les effets seront alors détectés plusieurs années, voire même plusieurs générations plus tard, rendant la relation de cause à effet difficile et même impossible dans certains cas. De plus, comme le précise Zimmermann (1985), les différentes sources potentielles d'agents génotoxiques requièrent différentes approches expérimentales pour être identifiées. Jusqu'à ce jour, très peu de procédures normalisées sont disponibles, particulièrement lorsqu'il est question de rejets complexes. Pourtant, plusieurs recherches dans ce domaine se préoccupent d'évaluer le potentiel génotoxique d'échantillons complexes. Les eaux résiduaires d'origine industrielle n'échappent pas à cet intérêt général, et ce, depuis la mise en évidence de la présence de génotoxines dans certains effluents (Somani et al., 1980).

Afin de caractériser le potentiel génotoxique des eaux résiduaires d'origine industrielle, deux approches sont disponibles .

La première, plus traditionnelle, est basée sur l'utilisation de méthodes décrites en chimie analytique et porte principalement sur l'isolation et l'identification des différents composés de l'échantillon. On entreprend ensuite des tests de dépistage génotoxique sur chacun des

composants. Cette approche pose certains problèmes. D'une part, elle peut constituer un travail colossal. En effet, certains échantillons contiennent un grand nombre de composés chimiques détectables lesquels, doivent être évalués individuellement pour déterminer leur activité génotoxique (Parry, 1985). D'autre part, de tels échantillons sont formés de plusieurs autres composants non-identifiés et même inconnus (Zimmermann et Taylor-Mayer, 1985). Enfin, suite à une individualisation des différents composants, les analyses effectuées ne peuvent tenir compte des réactions synergiques, antagonistes ou additives qui peuvent intervenir.

Afin de pallier à certains de ces problèmes, une seconde approche est considérée; le présent travail s'en inspire, d'ailleurs. Celle-ci consiste à étudier l'échantillon directement à l'aide de bioessais qui permettent la mise en évidence du potentiel génotoxique d'effluents complexes. Il nous semble plus utile d'orienter les efforts expérimentaux sur l'étude du mélange. En effet, l'effluent étant libéré dans l'environnement dans sa totalité, les organismes sont dès lors exposés à l'ensemble des composants et non à chacun d'eux individuellement. L'interprétation de la génotoxicité de l'effluent nous apparaît donc plus révélatrice selon cette approche.

Dans cette optique, on reconnaît également que tout organisme vivant possède un certain nombre de processus métaboliques qui peuvent transformer les caractéristiques des produits toxiques. Cet aspect doit être pris en compte pour structurer une approche fiable de dépistage du potentiel génotoxique.

Par ses capacités métaboliques, le phytoplancton pourrait être en mesure de produire, premièrement, une détoxification (biodégradation ou transformation) des génotoxines présentes dans un échantillon. Deuxièmement, il a déjà été constaté que certaines espèces phytoplantoniques concentrent les polluants de plusieurs ordres de grandeur au-dessus du niveau ambiant (Levine, 1984). La bioaccumulation de substances génotoxiques par les algues ainsi que par certains organismes de la chaîne alimentaire a déjà été mise en évidence (Barbes, 1980; Levine, 1984; Pittinger et al., 1987). Par contre, la caractérisation chimique des substances entreposées dans les cellules représente une zone grise. Il n'en demeure pas moins que si les algues sont en mesure de bioconcentrer les génotoxines d'un effluent, cette bioconcentration peut se propager tout au long de la chaîne alimentaire. De plus, comme le souligne Levine (1984), l'analyse d'extraits dérivés d'espèces bioaccumulatrices par des tests de mutagénicité microbienne pourrait devenir une technique puissante de dépistage du potentiel génotoxique.

Le phytoplancton est, troisièmement, en mesure d'activer certains précurseurs génotoxiques (pro-mutagènes et pro-cancérogènes). Ces composés ne sont pas génotoxiques dans leur forme originale. Ils peuvent cependant devenir biologiquement actifs suite à une conversion métabolique. Le produit actif, soit le mutagène ou le cancérogène définitif, est formé au cours du métabolisme dans des tissus spécifiques de certains organismes. Ces processus d'activation métabolique ont principalement lieu, chez les mammifères, dans des cellules spécialisées comme celle du foie (Wright, 1980). L'activation métabolique de pro-mutagènes et de pro-cancérogènes peut avoir lieu partout dans la biosphère et chacun des maillons de la chaîne alimentaire doit être considérée comme un site potentiel d'activation métabolique (Zimmermann et Taylor-Mayer, 1985). Le phytoplancton, de par sa position stratégique dans la chaîne trophique, jouerait un rôle important à ce niveau. Certains travaux, notamment ceux de Gentile et Plewa (1982), de Plewa et al. (1984) et de Plewa (1985), ont d'ailleurs démontré la transformation de certains pesticides et insecticides non mutagéniques en mutagènes par une action biologique des plantes. A leur instar, Schoeny et al. (1985) mentionnent que l'algue verte Selenastrum capricornutum est en mesure de produire des métabolites à partir de BaP (Benzo(a)Pyrène) ou de faciliter la transformation des BaP en dérivatifs mutagéniques identifiés par le test d'Ames.

Suite à cette brève revue des biotransformations, il est bon de rappeler, comme le précisent Schoeny et al. (1985), que les études portant sur les interactions possibles des végétaux vis-à-vis des caractéristiques génotoxiques sont rares. Ce domaine est loin d'avoir été examiné en détail.

Dans cette optique, nous présentons ici une démarche expérimentale permettant l'étude de deux aspects distincts du problème. Dans un premier temps, nous cherchons à caractériser le potentiel génotoxique initial d'effluents industriels à l'aide d'une procédure de dépistage primaire. Dans un deuxième temps, nous mettons en évidence la capacité du phytoplancton à interagir sur les caractéristiques génotoxiques des échantillons. Cette approche séquentielle nous semble indispensable: elle permet une caractérisation plus fiable du potentiel génotoxique. En effet, les algues, par des transformations métaboliques sur les génotoxines, pourraient constituer un vecteur important de modifications des caractéristiques génotoxiques des effluents. Ces microorganismes pourraient contribuer à l'élimination, à l'activation et/ou à la bioconcentration des génotoxines. Nous examinons ces potentialités dans la présente étude.

CHAPITRE I

DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

La démarche expérimentale se divise en deux étapes. La première, illustrée à la figure 1, sert à déterminer le potentiel génotoxique initial des effluents. La deuxième, représentée à la figure 2, évalue la capacité du phytoplancton à interagir sur les caractéristiques génotoxiques d'un échantillon. La description de chaque étape de la démarche expérimentale ainsi que leur justification sont discutées dans ce chapitre.

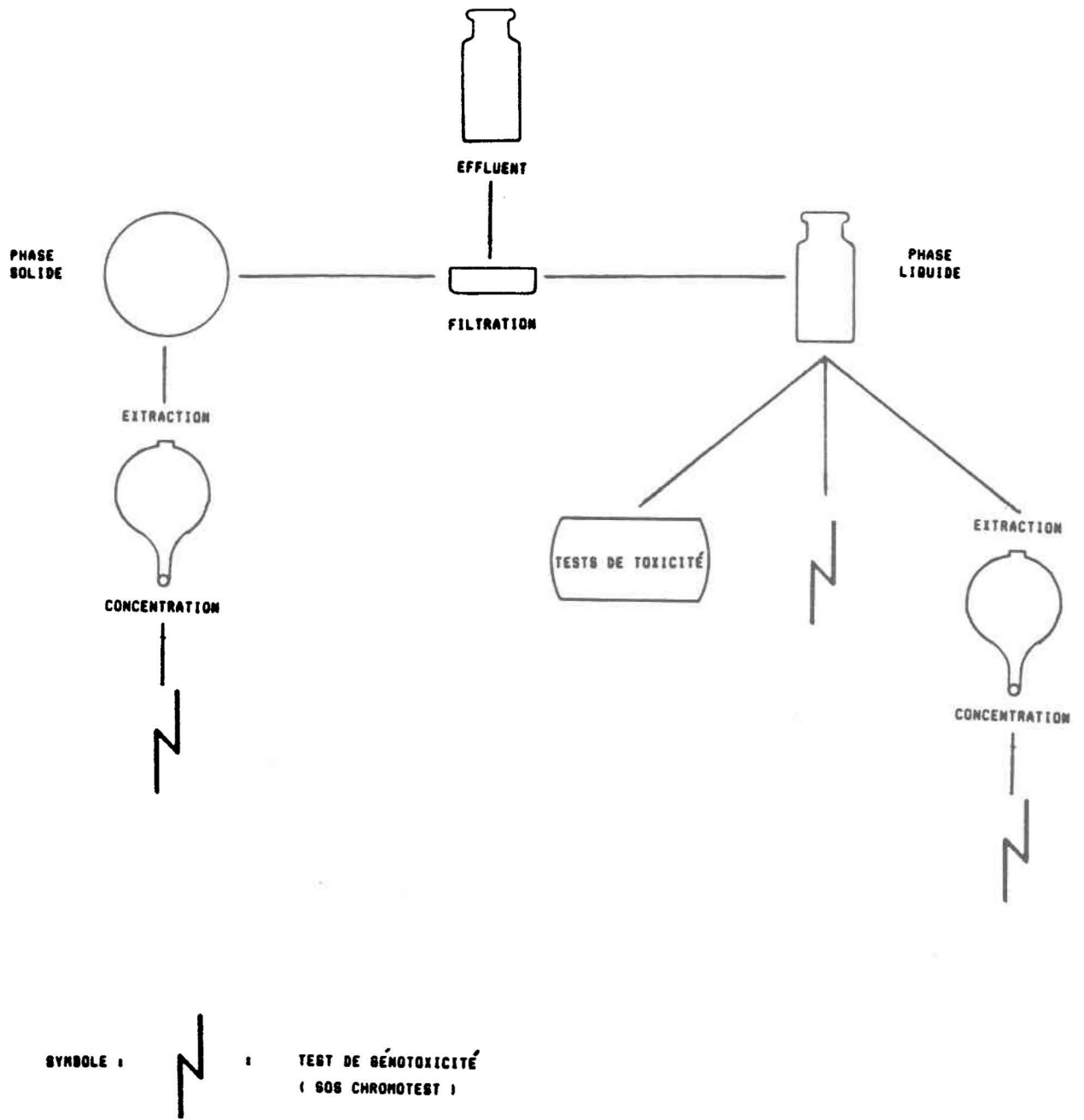


Figure 1. Présentation schématique de la démarche expérimentale utilisée pour mettre en évidence le potentiel génotoxique initial des effluents.

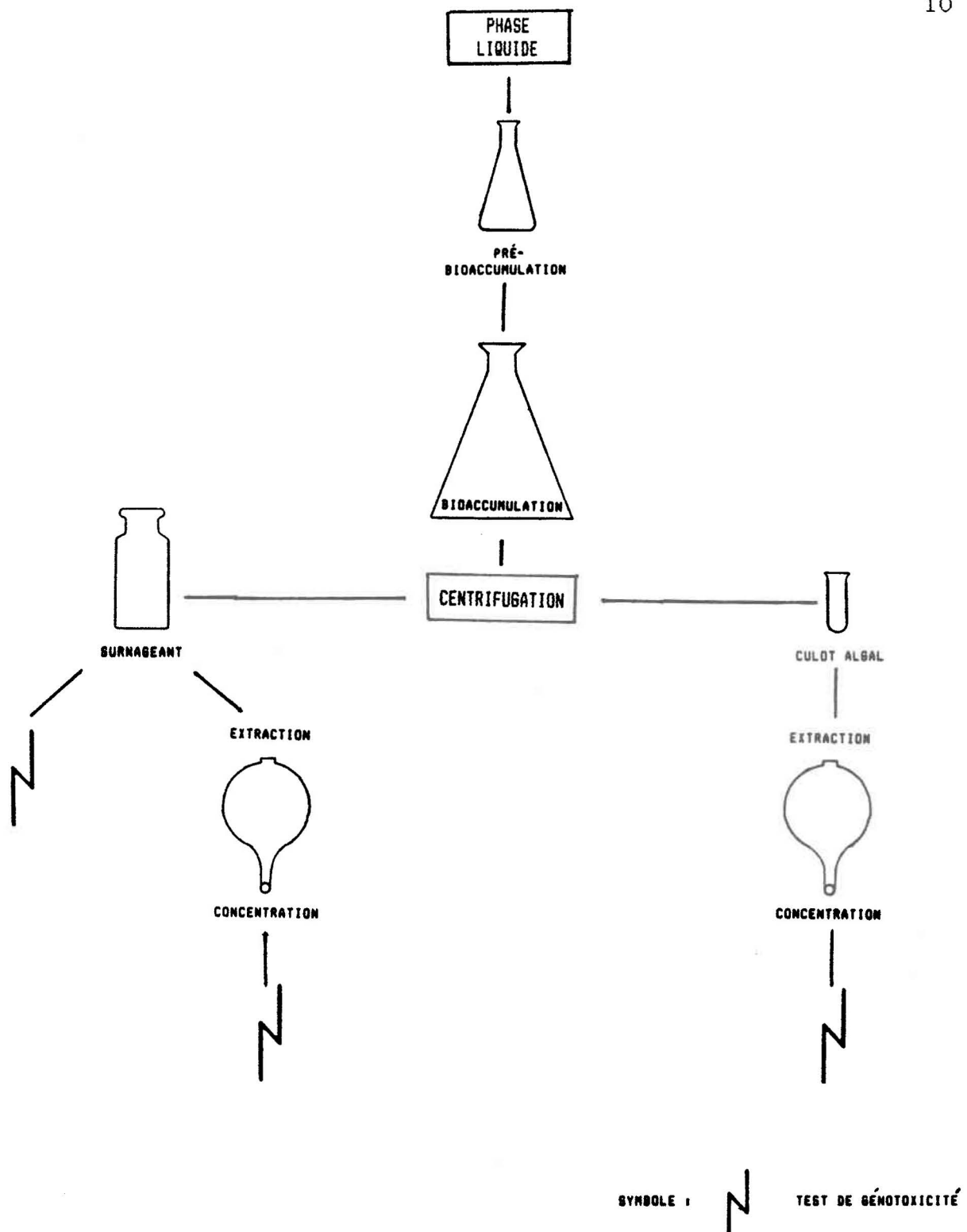


Figure 2. Présentation schématique de la démarche expérimentale utilisée pour mettre en évidence la capacité des algues à interagir sur les caractéristiques génotoxiques d'un échantillon.

1.1- Evaluation du potentiel génotoxique des effluents industriels.

1.1.1- Filtration

La filtration a pour but, d'une part, de séparer la phase liquide et solide de l'effluent. Ainsi, le potentiel génotoxique peut être évalué sur chacune des phases, ce qui nous permet d'identifier la ou les phases problématiques. D'autre part, la filtration permet d'éliminer l'activité biologique durant la période d'entreposage.

1.1.2- Phase liquide

1.1.2.1- Tests de toxicité et de génotoxicité

Les effluents industriels étant souvent constitués d'un mélange chimique complexe (Zimmermann, 1985), les composés toxiques, en y assumant leur présence, peuvent camoufler un potentiel génotoxique. Afin d'appréhender ce phénomène, des tests de toxicité sont d'abord effectués sur la phase liquide de l'effluent. Les résultats de ces tests de dépistage toxique permettent ensuite de préciser une gamme de concentrations relativement exemptes d'effets toxiques lors des tests subséquents de génotoxicité.

1.1.2.2 Extraction et concentration

Le phénomène de dilution peut compliquer la mise en évidence de la présence de génotoxines (Levine, 1984). En effet, les substances génotoxiques se trouvent souvent en microquantité dans les eaux résiduaires et dans l'environnement en général (Saxena et Schwartz, 1979). De plus, on doit tenir compte des seuils de détection des tests utilisés (U.S. EPA, 1985). Pour remédier à ces problèmes, si aucune génotoxicité n'apparaît avec le test direct sur l'effluent (étape 1.1.2.1), on effectue une extraction; il en résulte donc une concentration de la matière organique extractible de l'échantillon.

La concentration d'échantillons a fait l'objet d'un débat important ces dernières années. Tout d'abord, la problématique soulevée visait principalement à vérifier l'adéquation des procédures de concentration développées. Ensuite, il s'agissait de savoir si la proportion des composés chimiques et la composition du concentré obtenu reflétaient bien l'échantillon original. Enfin, pouvait-on assurer que la toxicité inhérente à toute concentration d'un échantillon ne limiterait pas la détection des génotoxines présentes? Bien que toutes ces questions n'aient pas été clarifiées complètement, la nécessité de concentrer les effluents en vue d'évaluer leur génotoxicité

est maintenant généralement acceptée (Epler, 1980; McGeorge et al., 1985) et est appuyée par deux arguments probants. D'une part, les organismes de la chaîne alimentaire aquatique ont la capacité de bioconcentrer les produits chimiques de telle façon que les agents génotoxiques, même en microquantité, pourraient présenter un niveau de risque important (U.S. EPA, 1985). D'autre part, une exposition à long terme des humains, même à de très petites doses d'eaux contaminées, présente un risque important. Malgré les incertitudes scientifiques entourant toujours l'évaluation d'une telle exposition, il est recommandé de minimiser toute exposition à ces produits (SBSC et Environnement Canada, 1986).

Après les étapes d'extraction et de concentration de la matière organique de l'effluent, on procède au test de dépistage génotoxique sur le concentré.

1.1.3- Phase solide

La matière en suspension retenue par le filtre constitue la phase solide de l'effluent. Il est important de caractériser le potentiel génotoxique de cette phase sachant que de nombreux produits chimiques organiques de faible solubilité peuvent s'y trouver. En effet, les particules en suspension sont capables d'adsorber une

grande partie des substances chimiques anthropogéniques provenant de sources isolées (Allan, 1985).

L'analyse du potentiel génotoxique de la phase solide s'effectue en deux temps. D'abord, afin de rendre les substances organiques biodisponibles, on procède à l'extraction et à la concentration des substances retenues sur les filtres. Ensuite, on effectue un test de génotoxicité sur le concentré obtenu.

Cette première partie du protocole permet d'établir le potentiel génotoxique initial de la phase liquide et solide des eaux résiduaires. En résumé, comme l'indique la figure 1, trois sous-échantillons sont analysés afin de déterminer la capacité génotoxique des effluents soit: la phase liquide de l'effluent avant et après concentration ainsi que l'extrait concentré du filtre.

1.2- Capacité du phytoplancton à interagir sur les caractéristiques génotoxiques d'un échantillon.

1.2.1- Bioaccumulation

La capacité des algues à modifier l'état génotoxique initial des effluents est étudiée par l'entremise de la bioaccumulation. Le microorganisme utilisé dans le cadre de

cette étude est la Chlorophycée unicellulaire S. capricornutum, dont les propriétés accumulatrices ont déjà été mises en évidence (Blaise et al., 1981). Les exigences nutritives des différentes espèces d'algues d'eaux douces étant relativement voisines, le choix de l'espèce pour les biotests est justifiable en fonction des critères suivants: facilité des souches à être manipulée en laboratoire et représentativité de la physiologie générale de l'organisme pour le milieu testé (Couture, 1981).

Afin d'être en mesure de procéder aux expériences de bioaccumulation, il est important que les concentrations testées d'effluents n'induisent tout au plus que des effets mineurs sur le métabolisme de base des algues exposées. En effet, il serait impossible de réaliser cette étape si les concentrations utilisées entraînaient leur mortalité. Pour cette raison, on procède alors à une étape de pré-bioaccumulation permettant de cerner la concentration maximale d'effluent à utiliser lors de l'exposition. Cette concentration ne doit induire aucune inhibition de la division cellulaire après une période d'exposition de quatre heures. En effet, la culture algale étant en phase exponentielle et asynchrone, une période d'exposition de quatre heures est suffisante pour mettre en évidence une inhibition de la division cellulaire. L'étape de bioaccumulation est ensuite réalisée.

Suite à cette étape, les algues, recueillies par centrifugation, sont séparées du surnageant de l'effluent avec lequel elles ont été mises en contact.

1.2.2- Tests de génotoxicité

1.2.2.1- Culot algal

Afin de solubiliser les substances qui pourraient être absorbées ou adsorbées par les algues, on procède à l'extraction et à la concentration du culot algal. Par la suite, on soumet le concentré au test de dépistage génotoxique. Le test de génotoxicité utilisé dans le cadre de cette étude est un test colorimétrique conçu pour les échantillons aqueux. L'extraction du culot algal est donc essentielle car les algues en tant que microorganismes particuliers constitueraient une interférence importante au niveau du test.

1.2.2.2- Surnageant (effluent mis en contact avec les algues)

Un premier test de dépistage génotoxique est effectué directement sur le surnageant afin de caractériser l'activité génotoxique de l'effluent après contact avec la population algale. Si la génotoxicité s'avère indétectable, on effectue, comme pour l'étape 1.1.2.2 et pour les mêmes

raisons, une extraction et une concentration du surnageant. Par la suite, on répète le test de génotoxicité sur l'extrait concentré.

Ainsi que l'illustre la figure 2, la mise en évidence des interactions phytoplanctoniques pouvant modifier les caractéristiques génotoxiques d'un échantillon, s'effectue à l'aide de tests de dépistage sur trois sous-composantes: (1) sur l'extrait concentré de la biomasse algale après exposition des cellules à l'effluent, (2) sur l'effluent mis en contact avec la population phytoplanctonique, c'est-à-dire le surnageant et (3) sur l'extrait concentré du surnageant. La comparaison des résultats de l'activité génotoxique initiale des effluents avec ceux obtenus suite à la bioaccumulation permettra d'élucider les interactions phytoplanctoniques face à une agression génotoxique. Ceci fera l'objet de discussions à l'intérieur du chapitre 3. Nous précisons auparavant les protocoles expérimentaux au chapitre 2.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Au chapitre précédent, nous avons exposé la démarche utilisée. Dans celui-ci, nous détaillons les différents protocoles expérimentaux qui s'y rattachent. L'ordre de présentation des protocoles est le même qu'au chapitre précédent.

2.1- Choix des échantillons

Afin de se familiariser avec les diverses procédures, une série de tests fut réalisée sur des produits purs dont la liste apparaît au tableau 1. Les procédures analytiques furent par la suite appliquées sur une série d'échantillons d'effluents industriels (tableau 2).

TABLEAU 1. Liste des substances pures dont l'activité géno-toxique a été évaluée.

Nom	Nom chimique	Caractéristique	Concentration testée mg/L
4NQO	4-Nitro Quinoline N-Oxide	mutagène	1.0
2AA	2 Amino Anthracène	pro-mutagène	1.0
MNNG	N-Methyle-N'-Nitro-n-Nitroguanidine	cancérogène	0.1
Témoin	-	eau déionisée	-

TABLEAU 2. Effluents industriels évalués pour leur activité
génétoxique

No. d'échantillon	Sources des effluents
1	Industrie de pâtes et papiers
2	Industrie de pétrochimie organique
3	Industrie de pétrochimie organique
4	Industrie de pétrochimie organique
5	Industrie de pétrochimie organique
6	Eau d'entrée pour l'industrie pétro- chimique organique
7	Eau d'entrée pour l'industrie pétro- chimique organique

La solution de 4NQO est obtenue en dissolvant tout d'abord 3 mg de 4NQO dans 3 mL de DMSO 100% (v/v). Cette solution est ensuite ajoutée à 3 L d'eau déionisée. La même procédure est utilisée pour le 2AA. Le MNNG, très hydrosoluble, est introduit directement dans 3 L d'eau déionisée.

Ces trois solutions servent de contrôle positif pour la caractérisation génotoxique initiale des effluents et pour mettre en évidence les interactions possibles du phytoplancton face à une agression génotoxique. Suit ensuite le témoin, composé uniquement d'eau déionisée, dont l'analyse vise, entre autres, à vérifier l'absence de contamination par des agents génotoxiques lors des différentes étapes du protocole. L'emploi d'eau déionisée permet également de vérifier s'il y a formation de génotoxines à la suite des différentes techniques de laboratoire (figure 1 et 2).

2.2- Echantillonnage

Les échantillons d'effluents sont prélevés dans des contenants de verre ambré de 1 L, à raison de 7 L par effluent. Chaque échantillon est réfrigéré ($<4^{\circ}\text{C}$), gardé à l'obscurité durant le transport et acheminé au laboratoire à l'intérieur d'une période de 24 h.

2.3- Traitement des échantillons

Dès son arrivée au laboratoire l'échantillon est recomposé de façon homogène dans un contenant de verre.

Les traitements subséquents des sous-échantillons sont présentés à la figure 3. On prélève tout d'abord 500 mL pour l'analyse du pH et la détermination des solides en suspension. Si des valeurs extrêmes de pH étaient enregistrées pour certains échantillons, il faudrait alors tenir compte de l'effet de ce facteur sur les bio-indicateurs des tests subséquents. D'autre part, la détermination des solides en suspension nous sert de référence pour l'analyse de la phase solide. Par la suite, deux volumes de 3 L et un de 0,5 L sont respectivement filtrés à travers une membrane de polycarbonate de 0,22 μm . Les trois filtrats sont versés dans des contenants en verre et conservés à 4°C. Les deux séries de membranes ayant servi à recueillir la phase solide provenant de 3 L d'échantillon à la fois sont placées dans des boîtes de Pétri, scellées et congelées à -20°C. L'utilisation ultérieure des filtrats et des filtres est décrite à la figure 3.

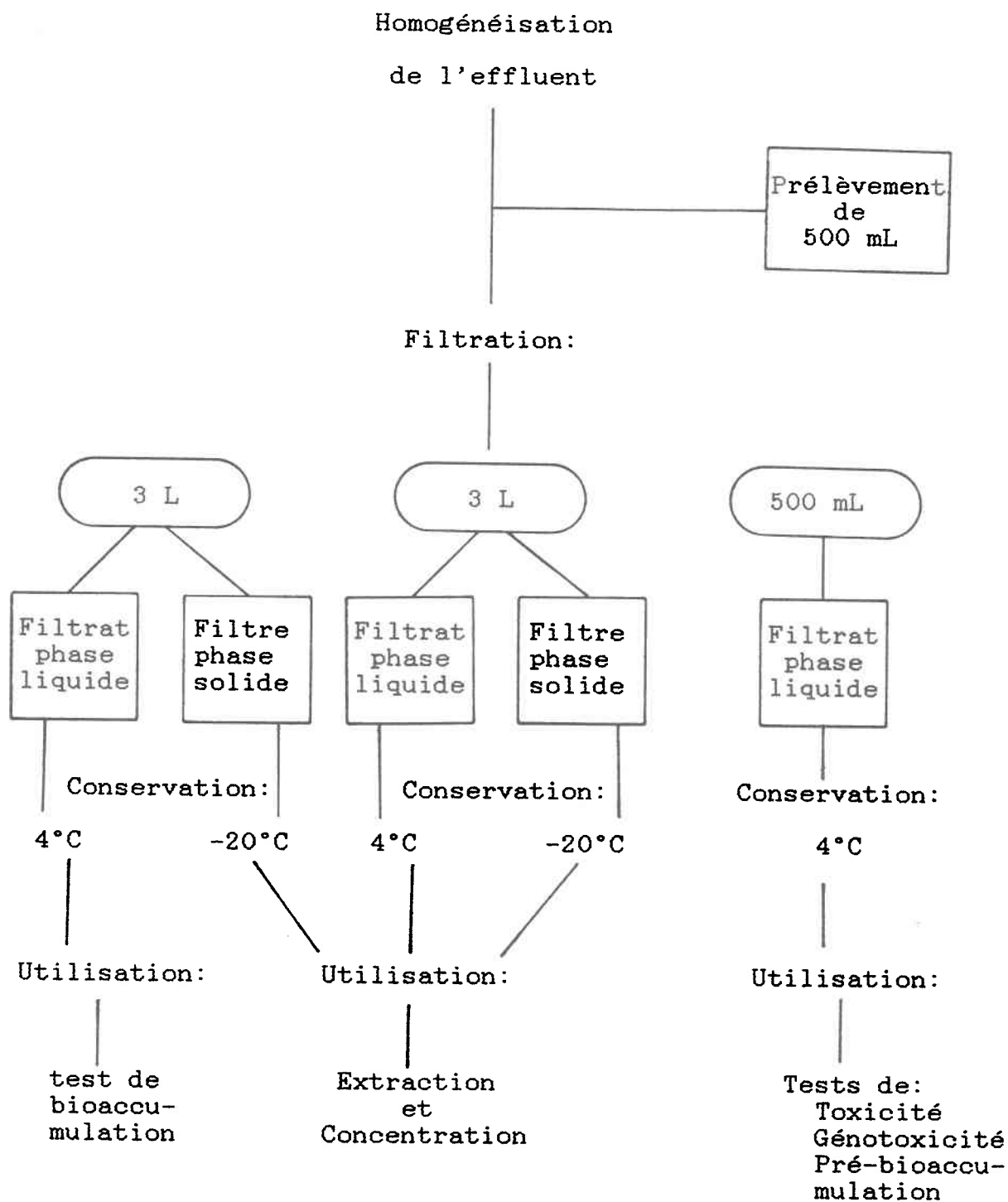


Figure 3: Schéma de la procédure de filtration.

2.4- Tests de toxicité

Dans le cadre de cette étude, la toxicité de chacun des effluents industriels est évaluée à l'aide de deux bioessais, un premier avec bactéries et un second utilisant des algues.

2.4.1- Test de toxicité avec bactéries

On utilise le système de détection de toxicité basé sur l'inhibition de l'activité bioluminescente d'un réactif biologique, la bactérie marine Photobacterium phosphoreum (Beckman Instruments Inc., 1982). L'instrument photométrique est l'appareil Microtox (Modèle 2055, Toxicity Analyzer System, Microbics Corporation). Ce dernier est conçu spécifiquement pour déterminer la réponse bioluminescente du réactif bactérien. On établit une courbe dose-réponse, à partir de laquelle on détermine la concentration (% v/v) de l'échantillon produisant une réduction de 50% de l'intensité lumineuse (CI50) après une exposition de 5 minutes à 15°C. Le test biologique est réalisé en duplicata à différentes concentrations. La toxicité pour chacun des échantillons est exprimée en unités toxiques (UT) définies de la façon suivante:

$$UT = \frac{100\%}{CI50}$$

CI50

2.4.2- Test de toxicité avec algues

La toxicité des effluents vis-à-vis des algues est déterminée à l'aide du microtest algal avec S. capricornutum (Blaise et al., 1986). L'inhibition de la croissance algale est estimée en comparant le dénombrement cellulaire des concentrations testées avec celles des contrôles après 4 jours d'exposition. Le dénombrement cellulaire s'effectue à l'aide d'un compteur électronique de particules (Coulter Counter, Modèle TA-II). Le test est réalisé en triplicata avec huit concentrations d'effluent. Une courbe dose-réponse est établie et la concentration d'échantillon responsable de l'inhibition de 50% de la croissance cellulaire (CI50) est calculée. Cette concentration est exprimée aussi en unités toxiques (UT).

2.5- Test de dépistage génotoxique

L'outil utilisé dans le cadre de cette étude est le SOS Chromotest, lequel est considéré comme un test colorimétrique de dépistage rapide du potentiel génotoxique de substances pures et d'échantillons complexes (Organics Ltd, 1986).

2.5.1- Principe du test

Le bio-indicateur pour ce test est la bactérie Escherichia coli (souche PQ37), dont le génome a été modifié par manipulation génétique. Chez E. coli, certaines réponses induites par des agents génotoxiques peuvent être exprimées par une série de fonctions appelées "réponse SOS". Le seul système de réparation de l'ADN fonctionnel de la bactérie utilisée dans le chromotest est la réponse SOS. Cette réponse est contrôlée par un certain nombre de gènes appelés *sfiA*. A ce système de gènes est fusionné le gène structurel (*lacZ*), responsable de la synthèse de l'enzyme β -galactosidase. La souche bactérienne utilisée est donc constituée d'une fusion des gènes *sfiA::lacZ*. Elle est également caractérisée par une suppression de la région *lacZ* normal, ce qui a pour conséquence que l'activité de la β -galactosidase est strictement dépendante de l'expression des gènes *sfiA* (Quillardet et Hofnung, 1985).

L'essai consiste à incuber la souche bactérienne avec des concentrations croissantes du composé à tester. Lorsqu'un agent génotoxique cause une lésion à l'ADN un promoteur SOS (protéine RecA) induit la transcription des gènes SOS, ainsi que la production de l'enzyme β -galactosidase. Après une période de temps permettant la synthèse protéinique, la quantité de β -galactosidase

produite est déterminée. La concentration de l'enzyme est déterminée à l'aide d'une réaction colorimétrique qui se développe après l'ajout d'un réactif chromogénique. La quantité de β -galactosidase, c'est-à-dire le degré de couleur produit lors du test, est une mesure directe des dommages qu'a subi l'ADN des bactéries lors du test. Cette réponse est obtenue en quelques heures. Par contre, certains produits toxiques testés à de trop fortes concentrations peuvent inhiber la synthèse protéinique et occasionner une sous-estimation de l'induction de la β -galactosidase. Afin de contourner ce problème, la viabilité des bactéries est estimée à partir d'une mesure de la quantité d'alcaline phosphatase synthétisée.

Les résultats du test quantitatif de génotoxicité se présentent sous la forme d'une courbe dose-réponse. Une courbe typique est présentée à la figure 4. La pente de la région linéaire de la courbe représente la valeur de l'indice du potentiel d'induction génotoxique de l'échantillon, soit le SOSIP ("SOS Induction Potential": Orgenics Ltd, 1986). Il est admis que plus une valeur de SOSIP est élevée, plus le potentiel génotoxique, ou encore l'activité génotoxique de l'échantillon est intense.

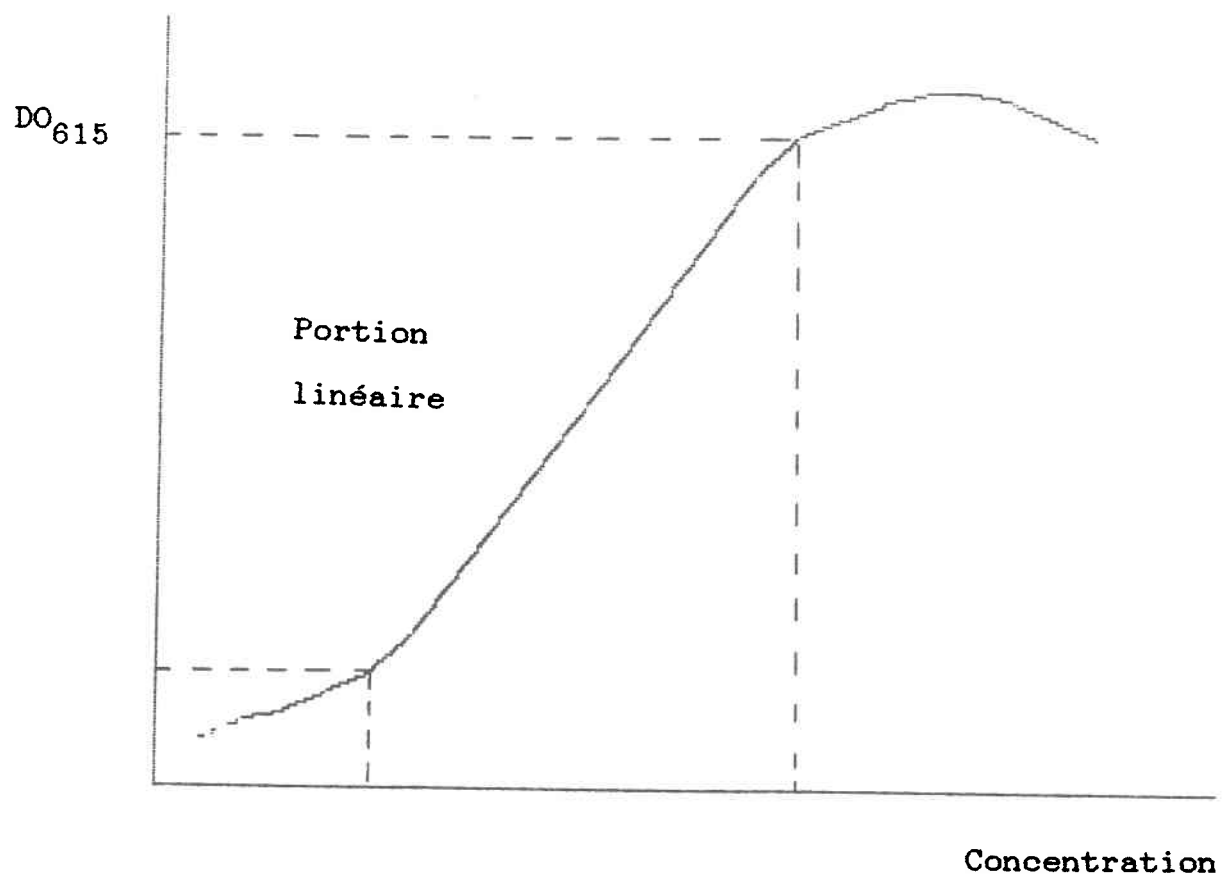


Figure 4. Courbe dose-réponse typique d'un composé génotoxique testé avec le SOS Chromotest.

2.5.2- Préparation des échantillons et des microplaques

La première étape de ce test consiste à réhydrater les cultures bactériennes lyophilisées. Celles-ci sont ensuite incubées à 37°C dans un bain-marie pendant une période de 4 h.

Le SOS Chromotest s'effectue avec deux microplaques. La première permet de détecter, sans activation métabolique, les génotoxines actives. La deuxième permet d'identifier la présence de pro-mutagènes et/ou de pro-cancérogènes en simulant le processus d'activation métabolique que l'on retrouve chez les mammifères. Ceci est réalisé par l'ajout, aux bactéries du test, d'un extrait de foie de rat traité avec l'Aroclor 1254 (S9 mix).

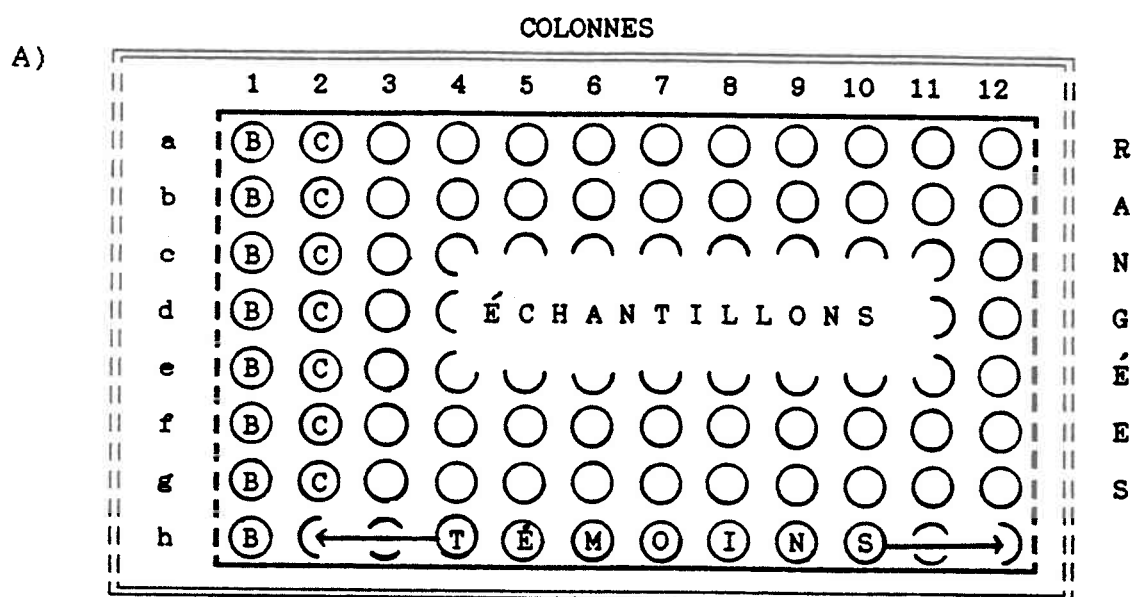
Afin d'assurer le bon fonctionnement du test, deux contrôles positifs sont incorporés à la procédure. Pour la partie du test sans activation métabolique, on utilise le mutagène 4-Nitro Quinoline N-Oxide (4NQO), tandis que le 2-Amino Anthracène (2AA), pro-mutagène, est testé dans les expériences pour démontrer l'activation métabolique. Sept concentrations sont préparées pour chacun des contrôles positifs à partir de solutions normalisées dont les concentrations respectives sont de 10 µg/mL pour le 4NQO, et de 100 µg/mL pour le 2AA. Le solvant utilisé pour la

préparation des dilutions est le diméthyle sulfoxide (DMSO) 10% (v/v) dans une solution saline (0.85%, v/v) stérile.

La préparation des microplaques, schématisée à la figure 5, s'effectue de la façon suivante: la colonne 1 des deux microplaques est utilisée pour calibrer l'appareil photométrique. Dans chacun des puits de cette colonne, on introduit 10 μ L de DMSO ainsi que 100 μ L de milieu de culture. La colonne 2 sert pour les contrôles positifs du test. Dans la première microplaque (colonne 2) on introduit 10 μ L des sept concentrations de 4NQO alors que dans la deuxième microplaque, on dispense 10 μ L des sept concentrations de 2AA. Les derniers puits de chacune des colonnes sont réservés aux témoins et ne reçoivent que 10 μ L de solvant. Ces puits sont utilisés pour quantifier le bruit de fond du test et pour déterminer la viabilité des bactéries. Les autres colonnes (3 à 12) servent à tester les différents échantillons avec et sans activation métabolique. Pour chacun d'eux, on teste un minimum de sept concentrations à raison de 10 μ L par puits.

2.5.3- Mise en évidence de l'activité génotoxique

Lorsque la période de pré-incubation du réactif bactérien est terminée (4 h), on inocule 100 μ L de la solution bactérienne dans chaque puits des colonnes 2 à 12



B)

Blanc Calibration(B)	Courbe Standard(C) 4NQO	Échantillons testés
col. 1	col. 2	col. 3 à 12
	10.00 µg/mL	non dilué
solvant	5.00 µg/mL	1:2
et	2.50 µg/mL	1:4
milieu	1.25 µg/mL	1:8
de	0.63 µg/mL	1:16
culture	0.32 µg/mL	1:32
	0.16 µg/mL	1:64
	témoin	témoins

Figure 5. Schématisation de la préparation des microplaques
 A) Le symbole "B" correspond au blanc servant à la calibration du spectrophotomètre. Le "C" représente les contrôles positifs. La dernière rangée (témoins) sert à déterminer le bruit de fond ainsi que la viabilité des bactéries.
 B) Disposition du contenu de la microplaque sans activation métabolique.

pour la microplaque où sont réalisées les expériences sans activation métabolique. Aux bactéries servant d'inoculum dans l'autre microplaque, où sont réalisées les expériences d'activation métabolique, on ajoute le S9 mix. On introduit ensuite 100 μ L du mélange dans chacun des puits des colonnes 2 à 12. On incube les deux microplaques à 37°C durant une période de 2 h.

Durant l'incubation, les contrôles génotoxiques interagissent avec l'ADN des bactéries et induisent la synthèse de β -galactosidase. Il en est de même pour les échantillons qui s'avèrent génotoxiques. La dernière partie du test consiste à mesurer l'activité enzymatique résultant de ces interactions. Cette détermination se fait en dosant simultanément la quantité de β -galactosidase et d'alcaline phosphatase à l'aide de deux chromogènes: le ONPG (O-nitrophényle-B-D-galactopyranoside), substrat bleu pour la β -galactosidase et le PNPP (p-nitrophényle phosphate disodium), substrat jaune pour l'alcaline phosphatase. Après l'exposition, 100 μ L de la solution de chromogènes combinés sont ajoutés à tous les puits des deux microplaques. On incube de nouveau à 37°C, pour une période de 60 à 90 min. Lorsqu'un gradient de couleur apparaît, on mesure la densité optique à 615 nm (DO_{615}), afin de mesurer l'activité génotoxique, et à 405 nm (DO_{405}), pour déterminer la viabilité des bactéries. L'appareil

photométrique (Multiskan M C) est calibré à l'aide de la première colonne de chacune des microplaques.

2.5.4- Détermination de l'activité génotoxique

Pour chacun des échantillons, on prépare un graphique des DO_{615} en fonction des concentrations testées. On identifie la portion linéaire de l'ensemble des points. En établissant l'équation de la droite de régression ($y = a + bx$), on obtient alors la valeur du SOSIP. Celui-ci correspond au coefficient de régression de la droite, c'est-à-dire le terme b ou pente de la droite. La pente correspond au rapport des différences de DO_{615} et de concentrations de produits testés. Lorsqu'on expérimente sur des produits purs, les poids moléculaires sont connus et les concentrations peuvent être exprimées en nM par exemple. Cette pratique ne peut s'appliquer aux effluents qui contiennent un nombre inconnu de substances chimiques. Les concentrations de l'effluent s'expriment en mL d'effluent exposé aux bactéries. Le SOSIP est alors rapporté par unité de mL pour les effluents testés avant et après bioaccumulation et en unités de mg lorsqu'il s'agit d'extraits concentrés.

La toxicité de certains échantillons peut interférer avec la réponse SOS, et perturber la linéarité des

résultats. Les lectures de DO_{615} sont corrigées pour la toxicité. Le facteur de correction, pour une concentration donnée du matériel testé, est calculé à partir des valeurs de DO_{405} . Celles-ci sont représentatives de l'activité de l'alcaline phosphatase. Le facteur de correction (FC) est défini de la façon suivante:

$$FC = DO_{\infty} / DO_{*}$$

où

DO_{∞} = DO_{405} moyenne associée à la réaction de l'alcaline phosphatase en absence de matériel testé.

DO_{*} = DO_{405} associée à la réaction de l'alcaline phosphatase en présence d'une concentration donnée de matériel testé.

Afin d'obtenir la valeur de DO_{615} corrigée pour la β -galactosidase, on multiplie la valeur observée par le FC. Par la suite, on prépare un nouveau graphique avec les valeurs de DO_{615} corrigées et on calcule le SOSIP, comme décrit précédemment. Par ailleurs, le filtre utilisé est constitué de façon à sélectionner autour de 405 nm les bandes de fréquence de la lumière. Malheureusement, son pouvoir de résolution est faible et la bande sélectionnée est large de sorte que le bleu de la réaction avec la β -galactosidase interfère sur la coloration de la réaction

à l'alcaline phosphatase. Il s'en suit une surestimation des DO_{405} qu'il faut corriger. Il est donc nécessaire de calculer un facteur de correction afin d'établir une valeur précise de DO_{405} . Ce facteur de correction a été utilisé dans notre analyse des résultats. La procédure utilisée est décrite à l'annexe I.

Enfin, il existe un facteur de normalisation des valeurs de SOSIP. En effet, le SOSIP calculé pour un échantillon donné varie d'un test à l'autre à cause des changements dans les conditions d'incubation, de l'âge des bactéries, etc... La normalisation des valeurs SOSIP obtenues est effectuée à l'aide du contrôle positif 4NQO. Pour établir le facteur de standardisation, on calcule le SOSIP du 4NQO avec les valeurs expérimentales et on divise celui-ci par 71 qui est la valeur de SOSIP du 4NQO publiée par Quillardet et al. (1982). Afin de normaliser les valeurs SOSIP pour un test donné, on divise celles-ci par le facteur de standardisation obtenu.

Pour chacun des échantillons démontrant un potentiel génotoxique on établit également le seuil minimum génotoxique (SMG). Le SMG correspond, d'un point de vue statistique, à la plus faible concentration d'échantillon indiquant une activité génotoxique. On calcule d'abord la moyenne des DO_{615} des témoins. On établit ensuite l'écart

type associé à cette moyenne. Puis, à l'aide de la droite de régression, on interpole sur le graphique la concentration d'échantillon correspondant à la $DO_{0.15}$ moyenne des témoins plus deux fois son écart type. Cette concentration représente le SMG de l'échantillon.

2.6- Extraction et concentration

Cette étape permet d'extraire et de concentrer les substances organiques des échantillons en vue des tests de dépistage génotoxique ultérieurs. Elle s'applique à la fois aux phases liquide et solide des effluents ainsi qu'à la biomasse algale récupérée après la bioaccumulation.

La procédure utilisée est l'extraction acide-base, liquide-liquide. Cette méthode est la technique recommandée par U.S. EPA pour le fractionnement chimique des composés organiques (U.S. EPA, 1982, 1985). Le fractionnement acide-base des composés organiques est fonction de leur constante d'acidité (pKA). Les composés présentant un pKA faible sont acides tandis que ceux dont la valeur est élevée sont basiques. Si un mélange complexe est équilibré avec un acide inorganique à un pH bas (<2), les bases organiques seront alors protonnées devenant ainsi solubles dans l'eau. Les composés organiques acides insolubles seront alors extractibles à l'aide d'un solvant. Réciproquement, si on

utilise une base inorganique à pH élevé (≥ 11), les acides organiques seront déprotonnés devenant des anions solubles dans l'eau. Les composés organiques basiques insolubles sont alors extractibles par l'intermédiaire d'un solvant. Un échantillon peut ainsi être séparé en composés acides, basiques et neutres par ajustement du pH. Le solvant utilisé pour l'extraction est le chlorure de méthylène (U.S. EPA, 1982). Etant plus dense que l'eau, ce solvant est facilement récupéré.

La procédure d'extraction utilisée est celle de l'U.S. EPA (1985). La phase aqueuse homogène de l'échantillon (3 L) est versée en deux volumes égaux dans deux ampoules de décantation de 2 L. Le pH de chaque sous-échantillon est ajusté à 2, avec une solution d'acide sulfurique 1 N. On extrait ensuite les composés organiques acides insolubles avec du chlorure de méthylène de qualité pesticide.

On réajuste ensuite le pH des phases aqueuses à 11 à l'aide d'hydroxyde de sodium 10 N, et on récupère les composés organiques neutres et basiques insolubles comme précédemment. Le solvant (1 400 mL) de la phase organique est ensuite évaporé (60°C) à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait organique concentré ainsi obtenu est, en dernier lieu, séché à sec sous jet d'azote et resuspendu dans le DMSO en préparation du test de génotoxicité à

venir. Le détail des différentes étapes de la procédure expérimentale ainsi que le cheminement sont présentés à l'annexe II.

2.7- Test de bioaccumulation

Ce test consiste à exposer une population d'algues en phase de croissance exponentielle, période de prise en charge maximale telle que suggérée par Blaise et al. (1981), à la phase liquide d'un échantillon durant une courte période. Pour des raisons d'ordre pratique, le temps d'exposition des algues a été fixé à 4 h. De plus, cette courte période d'exposition s'avère réaliste puisqu'elle reflète le bref contact entre les algues et des concentrations élevées de l'effluent suite au rejet dans le milieu récepteur. Les algues sont par la suite recueillies par centrifugation. Le culot et le surnageant sont ensuite évalués pour leur génotoxicité.

2.7.1- Culture des algues

Les algues (*S. capricornutum*) sont cultivées dans des erlenmeyers de 4 L contenant 1 L de solution 2 X AAP (les concentrations en nutriments sont ajustées à 2 fois la concentration dans le milieu de culture "Algal Assay Procedure": U.S. EPA 1978), mais modifiées par l'absence de

l'EDTA (Ethylènediamine tétraacétate). Ce milieu de culture est obtenu en diluant dans 900 mL d'eau déionisée un ajout de 2 mL de chacune des six solutions suivantes:

1- Nitrate de Sodium, NaNO_3	25.50 g/L
2- Chlorure de Magnésium, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12.10 g/L
3- Chlorure de Calcium, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.41 g/L
4- Sulfate de Magnésium, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14.70 g/L
5- Phosphate de Potassium, K_2HPO_4	1.04 g/L
6- Solution d'oligoéléments	voir ci-dessous

La solution d'oligoéléments contient les produits suivants:

1- H_3BO_3	185.520 mg/L
2- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415.610 mg/L
3- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	160.000 mg/L
4- $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.428 mg/L
5- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.012 mg/L
6- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.260 mg/L
7- ZnCl_2	0.327 mg/L

Dans chaque erlenmeyer, on ajoute 100 mL d'une culture de S. capricornutum agée de une à deux semaines de façon à obtenir un inoculum de 20,000 cellules/mL. Le volume de solution est ainsi complété à 1 L. Les cultures sont par la suite placées dans une enceinte à température et luminosité contrôlées; l'éclairement, en continu, est de $95\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (lampe fluorescente "cool white"), tandis que la température est maintenue à $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Les erlenmeyers sont agités manuellement deux fois par jour pendant 5 jours. Ces cultures en phase exponentielle servent d'inoculum pour les tests de bioaccumulation subséquents.

2.7.2- Préparation de l'inoculum algal

On estime d'abord la biomasse des cultures d'entretien de 5 jours par dénombrement cellulaire à l'aide d'un compteur électronique de particules (Coulter Counter, Modèle TA-II). Ayant établi le volume de culture requis pour l'inoculum, on centrifuge alors à 3000 RPM pendant 10 minutes. Par la suite, on élimine le surnageant et l'on resuspend chaque culot de culture dans 1 mL d'eau déionisée tamponnée avec 15 mg/L de NaHCO_3 . Les suspensions sont ensuite regroupées dans un tube conique de 50 mL. Le volume de suspension algale requis pour l'inoculum du test de bioaccumulation est établi en tenant compte de la densité cellulaire du concentré algal et du volume d'effluent à tester (voir section 2.7.4).

2.7.3- Test de pré-bioaccumulation

Le test de pré-bioaccumulation a pour but de définir la concentration maximale d'effluent qui n'occasionne aucune inhibition de la croissance algale après 4 h d'exposition. Cette étape nous assure que le test de bioaccumulation subséquent sera réalisé à une concentration d'effluent non nocive pour *S. capricornutum*. Les conditions expérimentales pour ce test sont les suivantes:

- Conditions d'incubation:
 - . durée d'exposition : 4 h \pm 45 min.
 - . température : 24°C \pm 2°C
 - . agitation : 110 RPM
 - . éclaircissement : 95 μ E/m²/s
- Contenants : erlenmeyers de 125 mL
- Volume total : 20,5 mL
- Quantité d'algues : 1 X 10⁷ cellules/L, ce qui correspond à une biomasse de 10 mg/L pour S. capricornutum
- Milieu de culture : 1 X AAP
- Dilution de l'effluent : 3 dilutions décroissantes sélectionnées en tenant compte de la CI50-96 h avec le test de toxicité sur microplaque (voir section 2.4.2)

Les différentes concentrations d'effluent sont préparées à partir de 70 mL d'effluent auquel on ajoute 1 mL de milieu AAP concentré 70 fois. Le tableau 3 résume le mode de préparation des dilutions en fonction des résultats de la CI50-96 h.

Afin de choisir la concentration d'effluent pour le test de bioaccumulation, le dénombrement de la population d'algues au temps 0 et 4 h est estimé. En comparant avec la

TABLEAU 3. Mode de préparation des échantillons pour le test de pré-biaccumulation en fonction des résultats de la CI50-96 h.

CI50 %(v/v)	Concentration effluent	Volume d'effluent	Volume du milieu de culture 1 X AAP	Volume ¹ d'algues
>10	100 %	20 mL	-	0,5 mL
	50 %	10 mL	10 mL	0,5 mL
	20 %	4 mL	16 mL	0,5 mL
	contrôle	-	20 mL	0,5 mL
<10	50 %	10 mL	10 mL	0,5 mL
	25 %	5 mL	15 mL	0,5 mL
	10 %	2 mL	18 mL	0,5 mL
	contrôle	-	20 mL	0,5 mL

1 Le volume de 0,5 mL d'algues contient un inoculum de 20×10^6 cellules, soit l'équivalent d'une biomasse algale de 10 mg/L pour ce test, puisque 10^8 cellules équivalent à 1 mg de poids sec.

population témoin, on détermine la concentration d'effluent qui n'a causé aucune diminution cellulaire.

2.7.4- Test de bioaccumulation

Le test de bioaccumulation s'effectue dans des erlenmeyers de 6 L contenant 3 L d'échantillon, dont la concentration (% v/v) est préalablement déterminée par le test de pré-bioaccumulation. A l'échantillon on ajoute 3 mL des six solutions du milieu de culture AAP déjà décrites à la section 2.7.1, ainsi qu'un concentré algal de 3×10^7 cellules (biomasse de 30 mg) resuspendu dans 30 mL de NaHCO_3 . On procède de façon identique pour le témoin, lequel reçoit 3 L d'eau déionisée à la place de l'effluent. Les conditions d'incubation sont les mêmes que celles précédemment décrites à l'étape de pré-bioaccumulation.

A la fin de la période d'incubation, les algues sont recueillies et lavées (15mg/L de NaHCO_3) en effectuant trois centrifugations successives (3000 RPM, 10 min.). En dernier lieu, les cellules sont concentrées dans un volume de 30 mL d'eau déionisée tamponnée avec la solution de NaHCO_3 . Le concentré est entreposé à -20°C . Lors de ces opérations, on recueille aussi le surnageant dans un contenant de verre d'une capacité de 4 L. Celui-ci est réfrigéré à une température de 4°C .

2.8- Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique des résultats a trait aux résultats obtenus avec le SOS chromotest. Elle porte sur les points formant la portion linéaire de la courbe dose-réponse, à partir desquels on établit la droite de régression (section 2.5.4). Le coefficient de régression b de l'échantillon représentant le SOSIP, est un estimateur ponctuel de β (coefficient de régression de la population). Sur chacun des coefficients de régression, on calcule l'écart type S_b du coefficient et les analyses statistiques sont effectuées en considérant que:

$(b - \beta)/S_b$ suit une distribution t de Student avec $(n-2)$ degrés de liberté (dl) (Snedecor et Cochran, 1984).

2.8.1- Test de l'hypothèse nulle

Ce test est utilisé pour déterminer si un échantillon est significativement génotoxique. Il permet de vérifier si la pente calculée est significativement différente de zéro.

Les hypothèses testées sont: $H_0 : \beta = 0.0$

$H_1 : \beta \neq 0.0$

$$\text{où: } t = \frac{b - 0.0}{S_b}$$

Si le t obtenu est inférieur au $t_{0.05}$ de la table de t de Student, l'hypothèse H_0 est acceptée. Cette situation signifie que le coefficient de régression n'est pas significativement différent de zéro. Le SOSIP établi est donc nul, indiquant ainsi une réponse négative face à l'activité génotoxique.

2.8.2- Intervalle d'estimation des SOSIP

Pour chacun des coefficients de régression (b), on établit les intervalles de confiance à 95% de la façon suivante:

$$b - t_{0.05} S_b < \beta < b + t_{0.05} S_b$$

2.8.3- Test d'égalité des coefficients de régression

Afin de démontrer que deux SOSIP sont significativement différents, on effectue un test de comparaison des pentes. Le test vérifie les hypothèses; $H_0 : b_1 = b_2$; $H_1 : b_1 \neq b_2$, selon un test t de Student en posant:

$$t = \frac{b_1 - b_2}{S_b}$$

où:

b_1 et b_2 sont les pentes respectives des deux échantillons;

S_b est la somme des écarts type des deux coefficients de régression.

Si le t calculé est inférieur au $t_{0.05}$ de la table de t de Student, l'hypothèse H_0 est acceptée, ce qui signifie que les pentes, mais également que les SOSIP, des deux échantillons ne sont pas significativement différents l'un de l'autre.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous présentons et discutons des résultats expérimentaux obtenus avec les différents types d'échantillons, à savoir des produits purs et des effluents industriels. La première section est consacrée à la caractérisation génotoxique initiale des échantillons. Dans la deuxième section, nous abordons l'analyse des interactions phytoplanctoniques face à l'agression génotoxique.

3.1- Evaluation du potentiel génotoxique initial des échantillons

3.1.1- Phase liquide

On trouve au tableau 4, les résultats de l'activité génotoxique initiale de la phase liquide des échantillons. Les contrôles positifs (4NQO, 2AA et MNNG), tel que prévu, sont génotoxiques et les valeurs de SOSIP reflètent leur degré d'activité. En classant par ordre décroissant ces substances selon leurs potentiels génotoxiques, le SOSIP du 4NQO s'avère le plus élevé; selon Dollery et al., 1983 et Zimmermann et Taylor-Mayer, 1985, le 4NQO serait l'un des mutagènes les plus puissants. Le 2AA et finalement le MNNG sont des mutagènes moins puissants. A noter que le 2AA nécessite une activation métabolique avant de mettre en évidence un potentiel génotoxique.

En ce qui concerne les échantillons d'origine industrielle, on note, d'abord, une réponse positive pour l'effluent de pâtes et papiers (échantillon 1), dont l'activité génotoxique est illustrée à la figure 6. La valeur du SOSIP calculée, en absence d'activation métabolique, est de 32,3. L'activité génotoxique de certains effluents de pâtes et papiers a déjà été rapportée avec d'autres tests par plusieurs auteurs

TABLEAU 4. Evaluation de l'activité génotoxique initiale de la phase liquide des échantillons à l'aide de tests directs avec le SOS Chromotest et détermination des seuils minimums de génotoxicité (SMG).

Echantillon	SOSIP ¹		TEST ² H ₀ :β=0	SMG ³ (μL)
	(- S9)	(+ S9)		
4NQO	47,6 ± 1,9	8,8 ± 3,9	R	2,6 (- S9)
2AA	ng	14,9 ± 1,8	R	9,7 (+ S9)
MNNG	7,8 ± 2,7	6,3 ± 5,7	R	3,5 (- S9)
1	32,3 ± 2,5	22,8 ± 7,5	R	2,8 (+ S9)
2	25,0 ± 6,7	ng	R	9,0 (- S9)
3	18,0 ± 6,5	ng	R	14,2 (- S9)
4	5,5 ± 3,3	5,0 ± 4,3	R	<0,6 (- S9)
5	ng	ng	-	-
6	20,6 ± 6,1	-	R	22,9 (- S9)
7	12,2 ± 4,2	6,7 ± 3,2	R	3,1 (- S9)

- Le SOSIP est déterminé par mL d'échantillon testé
Symboles : - S9, sans activation métabolique; + S9 avec activation métabolique.
: ±, intervalle de confiance à 95 % du SOSIP.
: -, résultat non disponible.
: ng, non génotoxique.
- Symboles : R, Hypothèse H₀ rejetée, donc l'activité génotoxique de l'échantillon est significative (α = 0,05).
- Seuil minimum génotoxique (μL) calculé à l'aide des résultats du test sans activation métabolique (- S9), ou avec activation métabolique (+ S9).

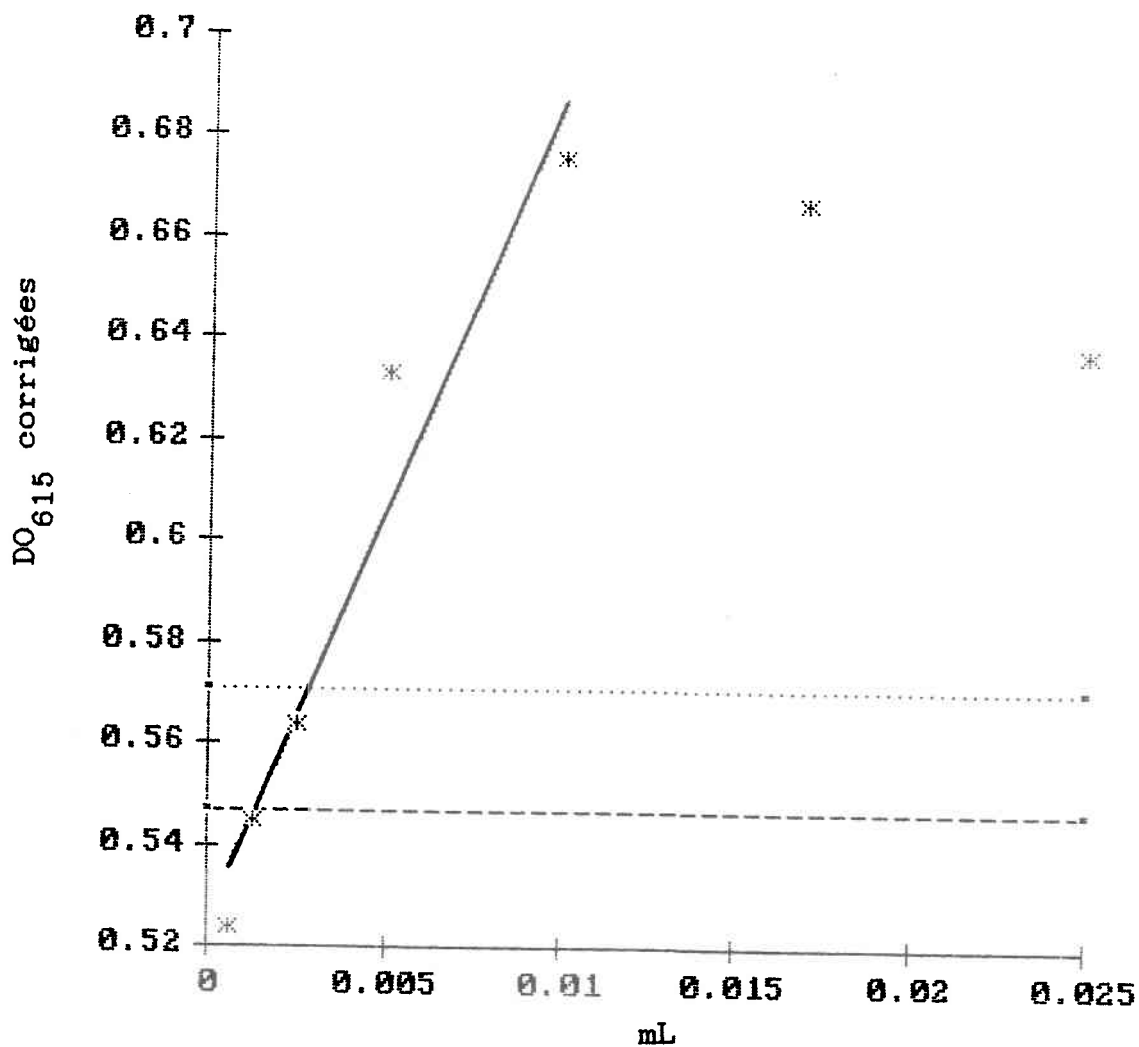


Figure 6. Activité génotoxique initiale de l'échantillon 1 dans le test direct avec activation métabolique (SOS Chromotest). Symboles: points expérimentaux (*), droite de régression (—), moyenne des DO₆₁₅ corrigées pour les témoins (---), moyenne des témoins plus deux fois son écart type (...).

(Douglas et al., 1980, 1983; Kamra et al., 1983, et Nestmann et al., 1979, 1985). Notre étude vient confirmer cette activité génotoxique, mais cette fois-ci avec un test de dépistage beaucoup plus rapide, à savoir le SOS Chromotest.

On constate, à la figure 6, une baisse de la réponse génotoxique pour les deux dernières concentrations testées. Cette diminution est due à la toxicité importante de l'échantillon où le facteur de correction pour la toxicité (section 2.5.4) ne peut compenser suffisamment.

D'autre part, trois des quatre effluents de l'industrie pétrochimique organique (échantillons 2, 3 et 4) se sont révélés génotoxiques. L'échantillon 5 s'est révélé sans activité (tableau 4). Pour celui-ci, la figure 7 confirme l'absence d'une relation linéaire. Aucune des valeurs de DO_{615} n'est supérieure à la moyenne des témoins plus deux écarts type, confirmant ainsi l'absence d'activité génotoxique.

Enfin, le tableau 4 présente les résultats quantitatifs de l'activité génotoxique pour les deux échantillons d'eaux d'entrée (échantillons 6 et 7). A priori surprenants, ces résultats positifs le sont moins lorsque l'on considère que ces échantillons proviennent

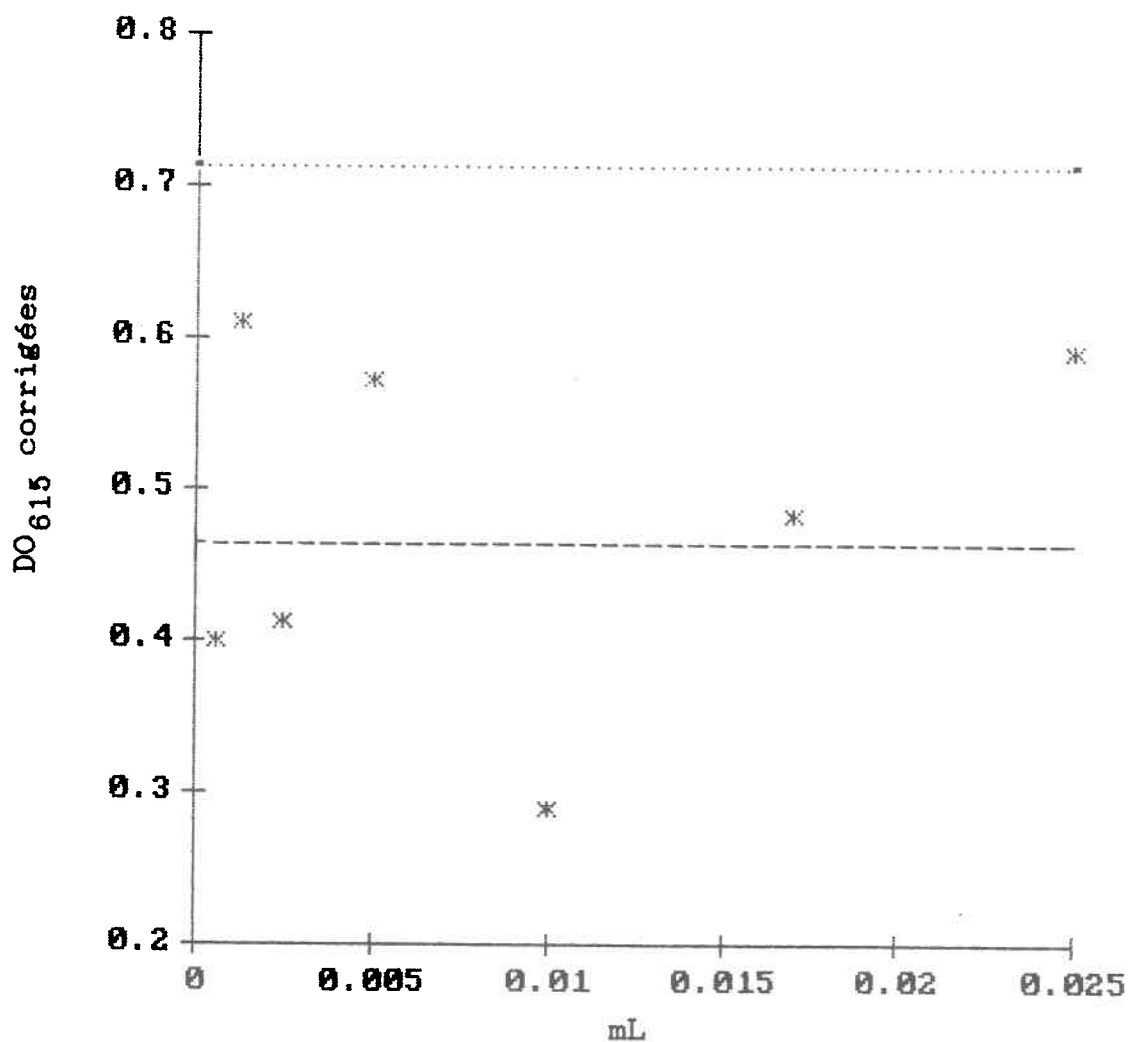


Figure 7. Activité génotoxique initiale de l'échantillon 5 dans le test direct sans activation métabolique (SOS Chromotest). Symboles: points expérimentaux (*), moyenne des DO₆₁₅ corrigées pour les témoins (---), moyenne des témoins plus deux fois son écart type (...).

d'une zone qui reçoit de nombreux rejets industriels. D'ailleurs, l'activité génotoxique de certaines eaux de surface en régions industrielles a déjà été constatée (McGeorge et al., 1985).

A partir des résultats du tableau 4, on constate également que seul le 2AA, un pro-mutagène reconnu, a nécessité une activation métabolique pour mettre en évidence son potentiel génotoxique. Pour les autres échantillons, l'activité génotoxique décroît lorsqu'il y a ajout du S9 mix.

La baisse d'activité génotoxique en présence de S9 mix peut être attribuée à certaines réactions catalysées par différentes enzymes présentes dans le mélange. Ces réactions peuvent favoriser une désactivation des génotoxines. Entre autres, deux des principaux systèmes enzymatiques impliqués dans les processus de désactivation soit, celui de l'époxide hydratase et de la S-glutathione transférase, sont présents dans les S9 mix dérivés de foie de mammifères (Wright, 1980). Par contre, dans le cadre d'une étude sur l'activité génotoxique des effluents de pâtes et papiers, Kamra et al. (1983) attribuent la baisse d'activité en présence de S9 mix, non pas à une interaction de nature enzymatique, mais plutôt à des liaisons aléatoires entre des espèces moléculaires actives de l'échantillon et des

protéines présentes dans le mélange. Cependant, comme le précise Wright (1980), les phénomènes de désactivation de substances génotoxiques sont très peu connus et peuvent, en fonction de la nature chimique des composés, être attribuables à différents mécanismes.

En raison des phénomènes de désactivation que peuvent subir les substances génotoxiques en présence de S9 mix, les résultats utilisés dans cette étude proviennent des tests sans activation métabolique sauf lorsqu'il est question de pro-mutagène ou encore de données non disponibles.

En conclusion cette étape de caractérisation initiale a permis de confirmer la génotoxicité de tous les échantillons, à l'exception de l'échantillon 5.

Selon l'approche expérimentale décrite au chapitre 2, la prochaine étape de caractérisation génotoxique ne devrait s'appliquer qu'aux échantillons qui n'ont démontré aucune activité génotoxique lors du test direct. Nous avons cependant procédé à l'extraction et à la concentration de tous les échantillons afin d'examiner les différentes réponses génotoxiques possibles.

Les données quantitatives de l'activité génotoxique des échantillons après extraction et concentration (tableau 5) révèlent: (1) qu'en général les concentrés des contrôles positifs et des effluents ont une activité génotoxique plus élevée que leur forme diluée, (2) que certains des échantillons ont une activité génotoxique diminuée (échantillon 1), et même inexistante (échantillons 4 et 7) suite à l'extraction et la concentration, (3) que l'échantillon 5, même concentré ne démontre aucune activité génotoxique.

L'augmentation de l'activité génotoxique après concentration traduit normalement la réponse attendue. En effet, ce traitement des échantillons doit faciliter la mise en évidence de génotoxines. Les valeurs élevées de SOSIP reflètent un facteur de concentration des composés organiques, qui est théoriquement de 3 000 fois pour les solutions pures et de 1 500 fois pour les échantillons industriels.

Les modifications de l'activité génotoxique suite à l'extraction peuvent être attribuées au protocole expérimental utilisé pour la préparation des échantillons. Tout d'abord, on sait que seules les substances organiques non volatiles et extractibles au solvant peuvent être extraites. Donc l'activité génotoxique notée dans les tests

TABLEAU 5. Résultats de l'activité génotoxique de la phase liquide des échantillons après extraction et concentration, et détermination des seuils minimums de génotoxicité (SMG).

Echantillon	SOSIP ¹		TEST ² H ₀ :β=0	SMG ³ (μg)
	(- S9)	(+ S9)		
4NQO	20498,9 (+)	1784,6 (+)	R	<0,04 (+ S9)
2AA	ng	4241,8 (+)	R	0,02 (+ S9)
MNNG	121,1 (+)	54,6 (+)	R	0,06 (- S9)
1	18,2 (-)	-	R	7,62 (- S9)
2	50,7 (+)	ng	R	8,58 (- S9)
3	536,0 (+)	ng	R	1,09 (- S9)
4	ng (-)	ng (-)	-	-
5	ng	ng	-	-
6	474,0 (+)	ng	A	-
7	ng (-)	ng (-)	-	-
témoins	ng	ng	-	-

- Le SOSIP est déterminé par mg de résidu sec extrait.
Symboles : - S9, sans activation métabolique; + S9, avec activation métabolique.
: -, résultat non disponible.
: ng, non génotoxique.
: (+), identifie une activité plus élevée que celle déterminée dans les échantillons avant le processus d'extraction et de concentration (tableau 4);
: (-), identifie une activité moins élevée.
- Symboles : A, Hypothèse H₀ acceptée; R, Hypothèse H₀ rejetée (α = 0,05).
- Seuil minimum génotoxique (μg) déterminé à l'aide des résultats du test sans activation métabolique (- S9), ou celui avec activation métabolique (+ S9).

directs peut être imputée à la présence de substances organiques volatiles ou encore non extractibles qui ne peuvent être entraînées par le solvant dans le processus d'extraction et de concentration. Par ailleurs, comme le précise U.S. EPA (1985), la structure de certains composés est affectée lors de la fractionnation acide-base en raison des réactions d'hydrolyse ou d'autres réactions qui conduisent à l'altération des composés. On trouve parmi ces composés sensibles les esters, les hydrocarbures halogénés, les phthalates, les nitriles et les amides. A la lumière de ces informations, on constate que les composés responsables de l'activité génotoxique des échantillons 4 et 7, seraient des substances volatiles et/ou non extractibles. En effet, pour ces deux échantillons, on note une disparition des propriétés génotoxiques suite à l'extraction et la concentration.

Ces résultats établissent la validité du processus décisionnel de la démarche expérimentale. Celle-ci limite l'emploi de la procédure d'extraction et de concentration aux échantillons exempts d'activité génotoxique lors des tests directs. En effet, les échantillons peuvent subir des transformations lors de la préparation. Les résultats de ces tests ont, à notre avis, un caractère très qualitatif qui convient bien à un exercice de dépistage.

3.1.2- Phase solide

L'évaluation du potentiel génotoxique initial des effluents porte, en deuxième lieu, sur la phase solide des échantillons.

Malheureusement, aucun résultat n'est exploitable. Nous avons sous-estimé la propriété d'extractibilité des membranes de polycarbonate par la méthode d'extraction liquide-liquide, acide-base. En conséquence, les résidus provenant de l'extraction et de la concentration des filtres, étaient contaminés par les composantes des filtres, rendant ainsi l'évaluation génotoxique impossible. Pour des analyses futures, il faudrait utiliser des filtres de verre, ou de polyester. Ceux-ci ne sont pas extractibles avec la procédure employée (McGeorge et al., 1985).

3.2- Capacité du phytoplancton à interagir sur les caractéristiques génotoxiques d'un échantillon.

Après l'évaluation de la génotoxicité des produits chimiques et des effluents, nous testons dans cette section l'hypothèse que le phytoplancton est en mesure d'interagir sur ces caractéristiques. Dans un premier temps, nous présentons les résultats pour les surnageants (phase liquide des échantillons mis en contact avec les algues) et

pour les culots algaux. En second lieu, nous comparons les caractéristiques génotoxiques des échantillons avant et après l'étape de bioaccumulation.

Le tableau 6 rassemble les résultats de l'activité génotoxique des surnageants. On constate tout d'abord que, comme lors de la caractérisation initiale, tous les échantillons, à l'exception de l'effluent 5 et des témoins, démontrent une activité génotoxique. En second lieu, seul le 2AA a nécessité une activation métabolique. En général, les autres échantillons démontrent, comparativement aux effluents originaux, une diminution de l'activité dans cette partie du test.

Les résultats de l'activité génotoxique des surnageants et des culots algaux après extraction et concentration sont présentés au tableau 7. On constate que pour certains surnageants soit, le 4NQO, le 2AA et les échantillons 4, 6 et 7, les SOSIP sont plus élevés que lors des tests directs. Pour les autres échantillons, on note une baisse ou encore une absence d'activité génotoxique.

Les tests sur les extraits concentrés de la biomasse algale se sont révélés positifs pour deux échantillons. Tout d'abord, le culot algal exposé à la solution de 2AA se distingue avec un SOSIP de 133,7 pour le test avec

TABLEAU 6. Evaluation de l'activité génotoxique des surnageants à l'aide de tests directs avec le SOS Chromotest et détermination des seuils minimums de génotoxicité (SMG).

Echantillon	SOSIP ¹		TEST ² H ₀ :β=0	SMG ³ (μL)
	(- S9)	(+ S9)		
4NQO	21,8 ± 1,5	6,7 ± 2,4	R	4,0 (- S9)
2AA	ng	8,1 ± 3,0	R	19,5 (+ S9)
MNNG	9,6 ± 3,2	7,8 ± 2,7	R	6,1 (- S9)
1	-	15,7 ± 5,4	R	4,1 (+ S9)
2	10,4 ± 1,9	ng	R	18,7 (- S9)
3	25,8 ± 3,6	ng	R	4,0 (- S9)
4	5,8 ± 3,7	5,6 ± 2,03	R	<0,6 (- S9)
5	ng	ng	-	-
6	17,7 ± 5,6	ng	R	10,9 (- S9)
7	7,8 ± 4,8	5,4 ± 1,9	R	4,4 (- S9)
témoins	ng	ng	-	-

- Le SOSIP est déterminé par mL d'échantillon testé
Symboles : - S9, sans activation métabolique; + S9 avec activation métabolique.
: ±, intervalle de confiance à 95 % du SOSIP.
: -, résultat non disponible.
: ng, non génotoxique.
- Symboles : R, Hypothèse H₀ rejetée, donc l'activité génotoxique de l'échantillon est significative (α = 0,05).
- Seuil minimum génotoxique (μL) calculé à l'aide des résultats du test sans activation métabolique (- S9), ou avec activation métabolique (+ S9).

TABLEAU 7. Résultats de l'activité génotoxique des surnageants et des culots algaux après extraction et concentration, et détermination des seuils minimums de génotoxicité (SMG).

Echantillon ¹		SOSIP ²		TEST ³	SMG ⁴
		(- S9)	(+ S9)	H ₀ :β=0	(μg)
4NQO	S	12126,9 (+)	501,6 (+)	R	0,02 (+ S9)
	C	ng	ng	-	-
2AA	S	ng	753,0 (+)	R	0,17 (+ S9)
	C	ng	133,7	R	0,23 (+ S9)
MNNG	S	-	-	-	-
	C	ng	ng	-	-
1	S	13,3	13,1 (-)	R	10,52 (- S9)
	C	ng	ng	-	-
2	S	ng (-)	ng	-	-
	C	ng	ng	-	-
3	S	ng (-)	ng	-	-
	C	ng	ng	-	-
4	S	108,5 (+)	ng (-)	R	0,74 (- S9)
	C	425,4	ng	R	0,23 (- S9)
5	S	ng	ng	-	-
	C	ng	ng	-	-
6	S	166,4 (+)	ng	A	-
	C	ng	ng	-	-

Suite du tableau à la page suivante.

TABLEAU 7. (Suite)

Echantillon ¹	SOSIP ²		TEST ³ H ₀ :β=0	SMG ⁴ (μg)	
	(- S9)	(+ S9)			
7	S	142,5 (+)	ng (-)	A	-
	C	ng	ng	-	-
témoins	S	ng	ng	-	-
	C	ng	ng	-	-

1 Symboles : S, Surnageant; C, Culot algal.

2 Le SOSIP est déterminé par mg de résidu sec extrait.
 Symboles : - S9, sans activation métabolique; + S9, avec activation métabolique.
 : -, résultat non disponible.
 : ng, non génotoxique.
 : (+), identifie une activité plus élevée que celle déterminée dans les échantillons avant le processus d'extraction et de concentration (tableau 4);
 : (-), identifie une activité moins élevée.

3 Symboles : A, Hypothèse H₀ acceptée; R, Hypothèse H₀ rejetée (α = 0,05).

4 Seuil minimum génotoxique (μg) déterminé à l'aide des résultats du test sans activation métabolique (- S9), ou celui avec activation métabolique (+ S9).

activation métabolique. Ensuite, le culot algal soumis à l'effluent 4 exhibe une activité génotoxique (SOSIP d'une valeur de 425,4) pour le test sans activation métabolique.

Il est important de signaler qu'aucune activité génotoxique n'a été observée pour les différents sous-composés des échantillons témoins. Etant donné le nombre d'échantillons témoins testés (N=9), il est raisonnable de penser que la procédure utilisée n'entraîne aucune formation artificielle de génotoxines, que ce soit au niveau de la préparation des échantillons ou encore durant la période de bioaccumulation.

La comparaison des résultats de l'activité génotoxique des échantillons avant et après l'étape de bioaccumulation permet de mettre en évidence les différentes interactions du phytoplancton face à ce type d'agression. On peut s'en rendre compte en analysant le rapport des SOSIP avant et après l'étape de bioaccumulation. Ce rapport (échantillon initial/ surnageant) indique la baisse ou l'augmentation de l'activité génotoxique après contact avec les algues. Ainsi, un rapport supérieur à 1 signifie une diminution de l'activité génotoxique: plus ce rapport est élevé, plus la diminution est importante. Au contraire, un rapport inférieur à 1 reflète une augmentation de l'activité. Signalons que le rapport en lui-même est interprété comme

un indice de la tendance. En effet, pour s'assurer que la différence entre deux valeurs de SOSIP est significative, un test d'égalité des valeurs doit être effectué (section 2.8.3). Les résultats de ce test pour chaque échantillon ainsi que le rapport des SOSIP sont présentés au tableau 8.

3.2.1- Analyse des résultats pour les substances pures

A partir des résultats du tableau 8, on constate tout d'abord, une baisse significative de l'activité génotoxique du surnageant pour la solution de 4NQO. Celle-ci correspond à une diminution de 54% de l'activité. La figure 8, illustre la différence importante de l'intensité génotoxique de la solution initiale et du surnageant. Visiblement, les pentes (SOSIP) sont différentes pour ces deux droites. En fait, la valeur de SOSIP calculée lors de la caractérisation initiale de l'échantillon est de $47,6 \pm 1,9$ (tableau 4) tandis que celle du surnageant est de $21,8 \pm 1,5$ (tableau 6). On observe également que le rapport des SOSIP des tests de génotoxicité sur les extraits concentrés de la solution initiale et du surnageant ont la même tendance. En effet, ce rapport de 1,7 indique aussi une baisse de l'activité génotoxique suite à l'étape de bioaccumulation. La baisse de l'activité génotoxique se manifeste également au niveau des SMG (figure 8). Le SMG initial de la solution est de $2,6 \mu\text{L}$

TABLEAU 8. Evaluation comparative de l'activité génotoxique initiale des échantillons et des surnageants.

Echantillon ¹		Rapport des SOSIP ² E/S		Test H ₀ SOSIP ₁ = SOSIP ₂
4NQO	d	2,18	(- S9)	Rejetée
	e	1,69	(- S9)	Rejetée
2AA	d	1,85	(+ S9)	Rejetée
	e	5,63	(+ S9)	Rejetée
MNNG	d	0,81	(- S9)	Acceptée
	e	-	-	-
1	d	1,46	(+ S9)	Rejetée
	e	1,36	(- S9)	Rejetée
2	d	2,40	(- S9)	Rejetée
	e	-	-	-
3	d	0,69	(- S9)	Rejetée
	e	-	-	-
4	d	0,94	(- S9)	Acceptée
	e	-	-	-
5	d	ng	-	-
	e	ng	-	-
6	d	1,16	(- S9)	Acceptée
	e	-	-	-
7	d	1,56	(- S9)	Rejetée
	e	-	-	-

1 Symboles : d, test génotoxique direct; e, test sur l'extrait concentré.

2 Symboles : E/S, rapport des SOSIP échantillon initial / surnageant.
: - S9, rapport des SOSIP déterminé à l'aide du test sans activation métabolique; + S9, rapport établi à partir du test avec activation.

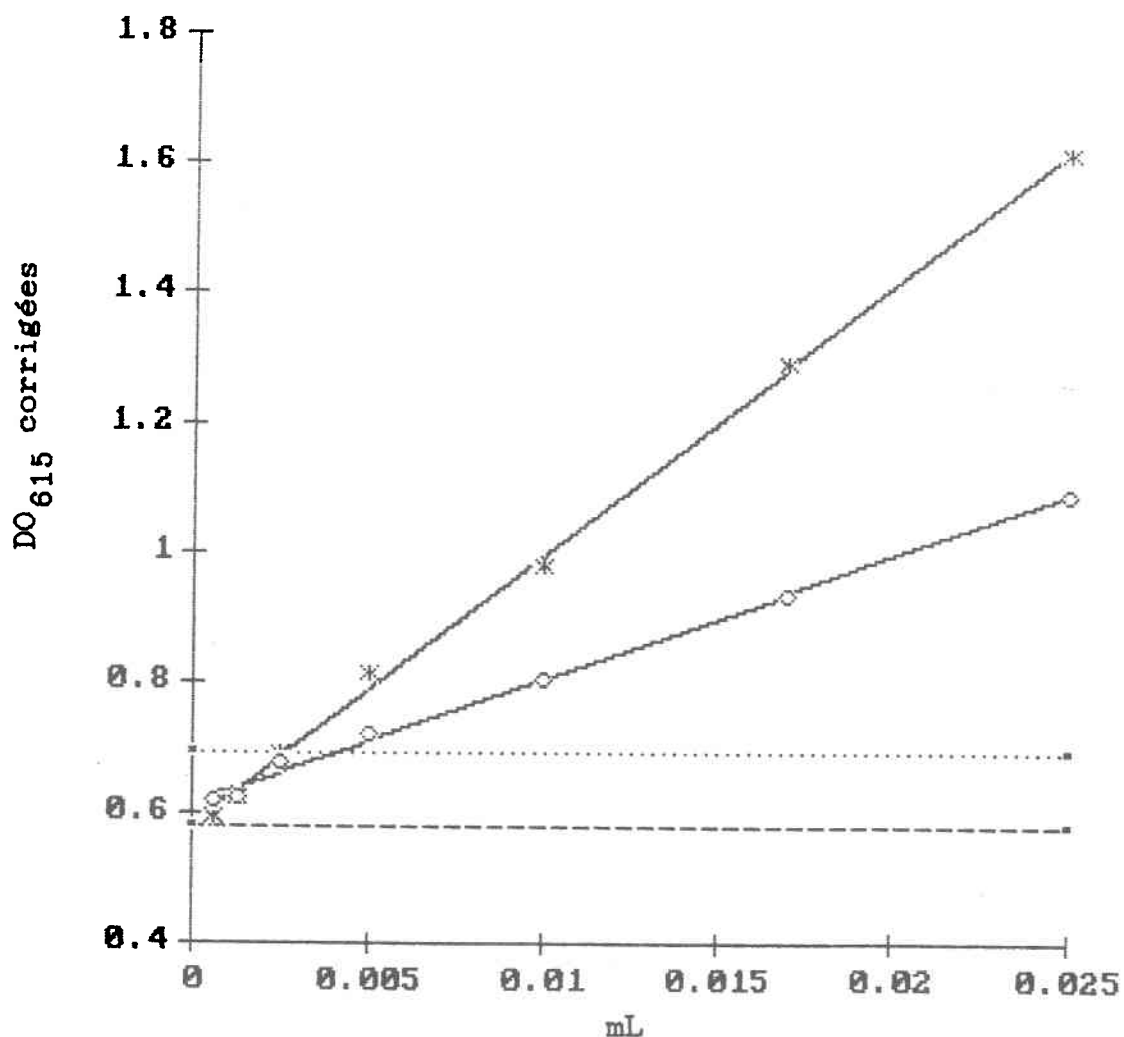


Figure 8. Activité génotoxique de la solution initiale (*) et du surnageant (o) pour l'échantillon de 4NQO dans le test direct sans activation métabolique (SOS Chromotest). Symboles: droite de régression (—), moyenne des DO₆₁₅ corrigées pour les témoins (---), moyenne des témoins plus deux fois son écart type (...).

(tableau 4), tandis qu'après la bioaccumulation, le SMG du surnageant est 4,0 μ L (tableau 6). Dans ce cas, la diminution d'activité génotoxique se traduit par une augmentation du SMG pour le surnageant.

Cette baisse d'activité génotoxique peut être attribuée à quatre processus différents. Premièrement, les algues, par bioconcentration, contribueraient à provoquer une réduction de la concentration du 4NQO dans la solution initiale. Cette hypothèse est rejetée étant donné qu'aucune trace d'activité génotoxique n'a été mise en évidence lors du test sur l'extrait concentré du culot algal (tableau 7). Deuxièmement, les algues peuvent biotransformer des groupes fonctionnels du 4NQO de façon à en réduire le potentiel génotoxique. La photodégradation peut également être envisagée comme troisième processus. En effet, durant les quatre heures d'exposition du test de bioaccumulation, une dégradation du 4NQO par la lumière est possible. Enfin, la baisse d'activité génotoxique après bioaccumulation peut être attribuée à une perte du composé. Il est possible que celui-ci s'adsorbe aux parois des contenants employés lors des trois centrifugations successives entreprises pour la récupération du culot algal et du surnageant.

Il nous est apparu important de préciser les effets de la lumière et de la centrifugation sur l'activité génotoxique

de la solution de 4NQO. Cette investigation fut initiée en préparant une solution de 3 L de 4NQO (1 mg/L) à partir de laquelle on prélèva 2 mL pour caractériser le potentiel génotoxique initial. Par la suite, la solution fut incubée durant 4 h dans les mêmes conditions expérimentales qu'auparavant. On prélèva de nouveau 2 mL afin de déterminer l'activité génotoxique après exposition à la lumière. Finalement, la solution fut soumise à l'étape de la centrifugation pour y déterminer l'activité génotoxique résultante.

Les trois courbes dose-réponse issues de cette expériences sont présentées à la figure 9. Aucune baisse significative de l'activité génotoxique du 4NQO n'est attribuable à des effets de lumière ou de centrifugation. En effet, le SOSIP de la solution initiale est de $40,0 \pm 6,0$, tandis que ceux après l'exposition à la lumière et à la centrifugation sont respectivement de $46,1 \pm 8,9$ et de $45,5 \pm 6,0$. Ces résultats confirment que l'activité génotoxique altérée de la solution de 4NQO après bioaccumulation est liée à des interactions du phytoplancton sur ce composé et que celles-ci sont responsables d'une détoxification de ce composé.

Dans le cas du 2AA les valeurs de SOSIP caractérisant son activité génotoxique dans les tests directs avec

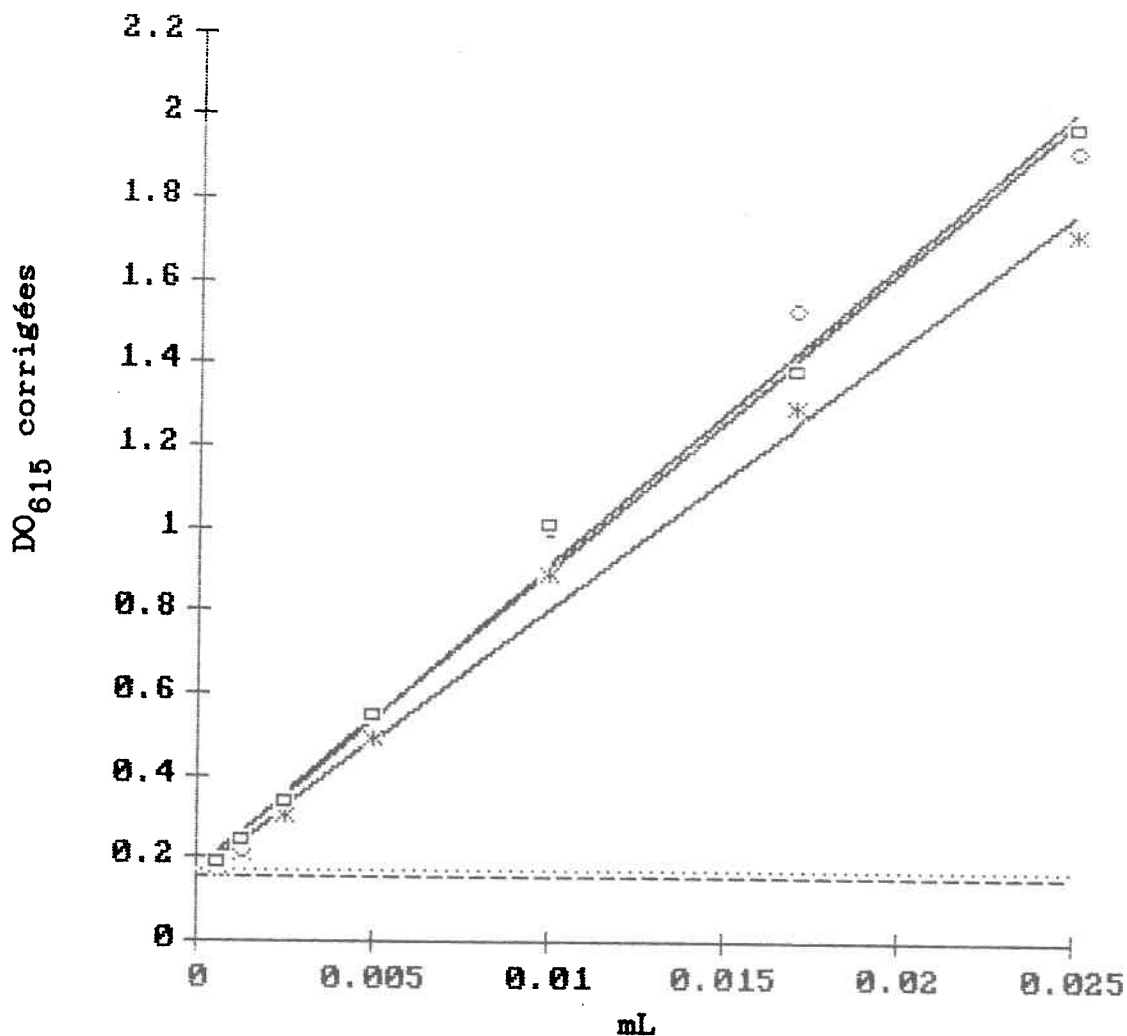


Figure 9. Effet de la lumière et de la centrifugation sur l'activité génotoxique de la solution de 4NQO dans le test direct sans activation métabolique. Symboles: solution initiale (*), solution après exposition à la lumière (o), solution après exposition à la lumière et centrifugation (□), moyenne des DO₆₁₅ corrigées pour les témoins (---), moyenne des témoins plus deux fois son écart type (...).

activation métabolique sont respectivement de $14,9 \pm 1,8$ pour la solution initiale (tableau 4) et de $8,1 \pm 3,0$ pour le surnageant (tableau 6). Le rapport E/S établi à partir de ces valeurs est de 1,9 (tableau 8), indiquant une baisse significative de l'activité génotoxique de l'ordre de 45,8% suite à la bioaccumulation. La figure 10a présente les courbes expérimentales pour le test de caractérisation initiale et le test sur le surnageant. Le SMG du surnageant (tableau 6: $19,5 \mu\text{L}$) est beaucoup plus élevé que celui de la solution initiale (tableau 4: $9,7 \mu\text{L}$). Ces résultats traduisent une baisse d'activité génotoxique du 2AA potentiellement imputable aux algues.

Cette baisse pourrait s'expliquer par une prise en charge du 2AA par les algues. D'ailleurs, la courbe dose-réponse de l'extrait concentré du culot algal (figure 10b), témoigne d'un SOSIP de 133,7 et d'un SMG de $0,23 \mu\text{g}$ (tableau 7). Cependant, l'éventualité d'une biotransformation, d'une photodégradation et/ou d'une perte par adsorption lors de la centrifugation ne peut être exclue. D'ailleurs, comme le précise Schoeny et al. (1985), les hydrocarbures poly-aromatiques (HPA), dont le 2AA, sont sujets à la photooxydation dans les milieux aqueux.

Nous avons donc effectué une expérience pour isoler les effets de la lumière et de la centrifugation sur

En conséquence, on note que le 2AA n'a subi aucune activation métabolique par les algues. En effet, la mise en évidence de l'activité génotoxique de tous les sous-composés de cette solution a nécessité la présence de S9 mix.

En considérant maintenant le MMNG on constate qu'aucune modification de ses caractéristiques génotoxiques n'est survenue après bioaccumulation. Bien que le rapport E/S des SOSIP (0,81) semble refléter une augmentation de l'activité génotoxique, celle-ci n'est pas significative (SOSIP: $7,8 \pm 2,7$ vs $9,6 \pm 3,2$). Le chevauchement des valeurs de SOSIP est un premier indice de l'égalité des SOSIP. D'ailleurs, tel qu'illustré à la figure 12, on peut constater visuellement que les droites de régression obtenues pour la solution initiale et pour le surnageant dans le test sans activation métabolique sont voisines.

Cependant bien que ces SOSIP ne soient pas significativement différents, on constate une variation importante des SMG. Alors que l'on obtient un SMG de $3,5 \mu\text{L}$ pour la solution initiale de MNNG (tableau 4) on obtient une concentration de $6,1 \mu\text{L}$ pour le surnageant (tableau 6). On constate que le SMG du surnageant est presque deux fois plus élevé que celui de la solution initiale. On peut comprendre que les SMG peuvent varier, bien que les valeurs

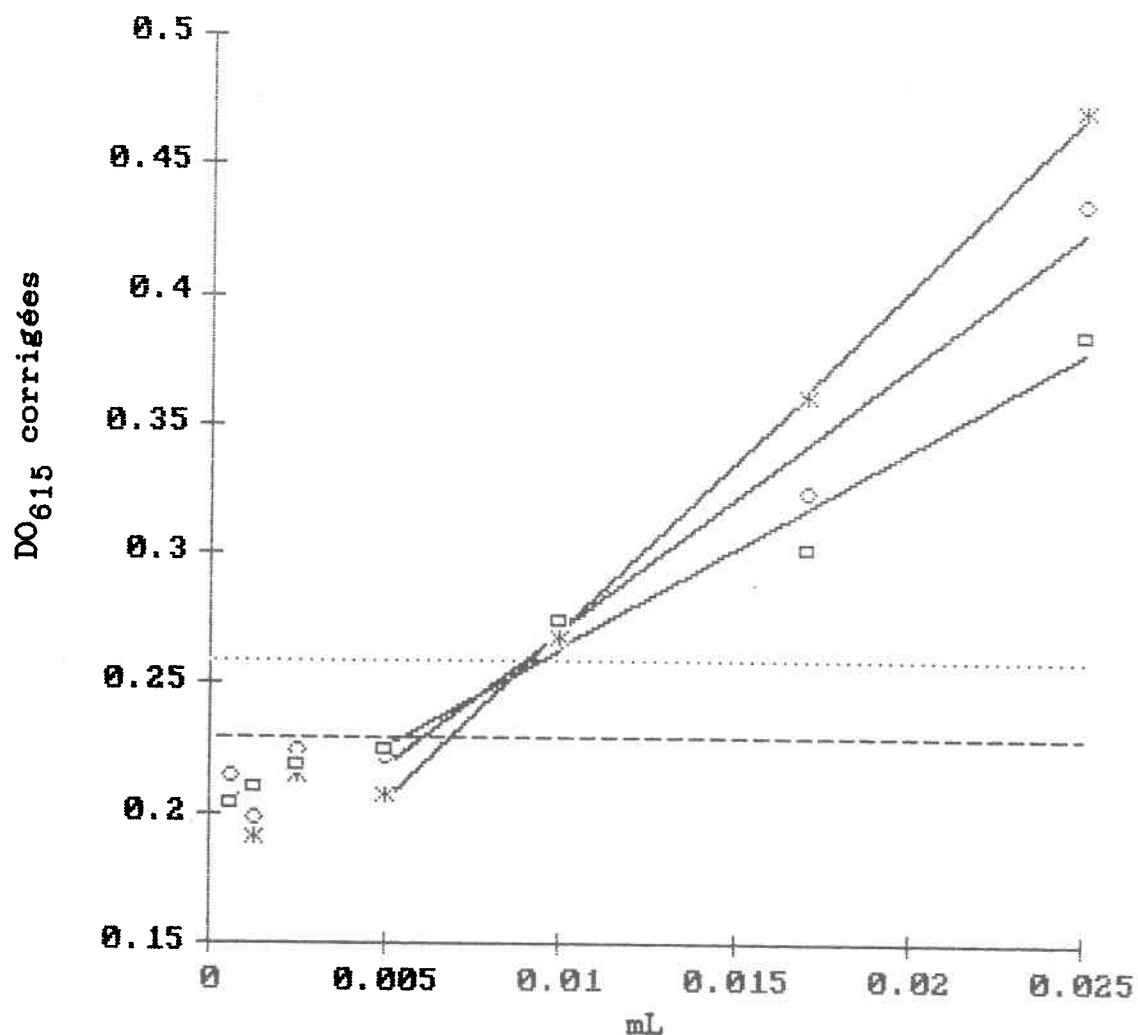


Figure 11. Effet de la lumière et de la centrifugation sur l'activité génotoxique de la solution de 2AA dans le test direct avec activation métabolique. Symboles: solution initiale (*), solution après exposition à la lumière (o), solution après exposition à la lumière et centrifugation (□), moyenne des DO₆₁₅ corrigées pour les témoins (---), moyenne des témoins plus deux fois son écart type (...).

l'activité génotoxique. Les courbes dose-réponse sont présentées à la figure 11 et confirment une baisse de l'activité génotoxique de la solution non seulement par photodégradation mais également par perte lors des centrifugations. Les SOSIP sont de $13,2 \pm 0,2$ pour la solution initiale, de $10,3 \pm 1,0$ suite à l'exposition à la lumière et de $7,6 \pm 0,9$ après exposition à la lumière et centrifugation. Les effets combinés de la lumière et de la centrifugation se traduisent par une baisse significative de l'ordre de 42% de l'activité génotoxique du 2AA.

Ainsi, bien que les algues aient concentré une partie du 2AA, la baisse de l'activité génotoxique est principalement associée à une photodégradation et une perte par adsorption lors des centrifugations successives. Mentionnons qu'il est possible de limiter la photooxydation des HPA, ainsi que l'on démontré Schoeny et al. (1985), en utilisant une source lumineuse de type "gold light". Cette source de lumière permet d'éviter la photooxydation des HPA étant donné sa faible émission de longueurs d'ondes inférieures à 410 nm, soit la limite supérieure occasionnant la photooxydation des HPA. Cette source assure également une croissance normale des algues car elle est caractérisée par la présence importante de lumière à une longueur d'onde de 670 nm, qui constitue le pic d'absorbance primaire pour la chlorophylle a.

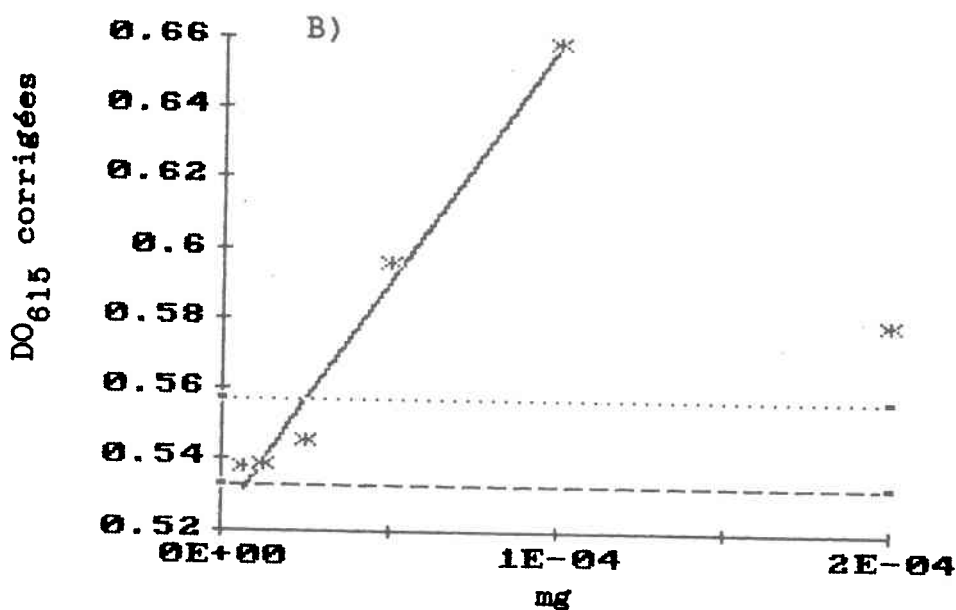
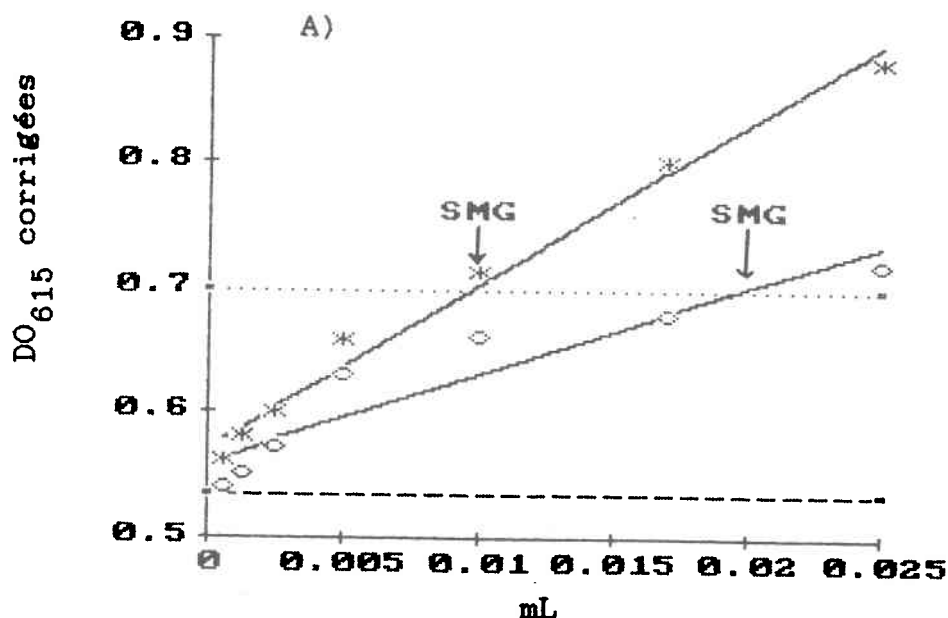


Figure 10. Activité génotoxique A) de la solution initiale (*) et du surnageant (o) pour l'échantillon de 2AA et B) de l'extrait concentré du culot algal dans le test avec activation métabolique (SOS Chromotest). Symboles: droite de régression (—), moyenne des DO₆₁₅ corrigées pour les témoins (---), moyenne des témoins plus deux fois son écart type (...), SMG seuil minimum génotoxique.

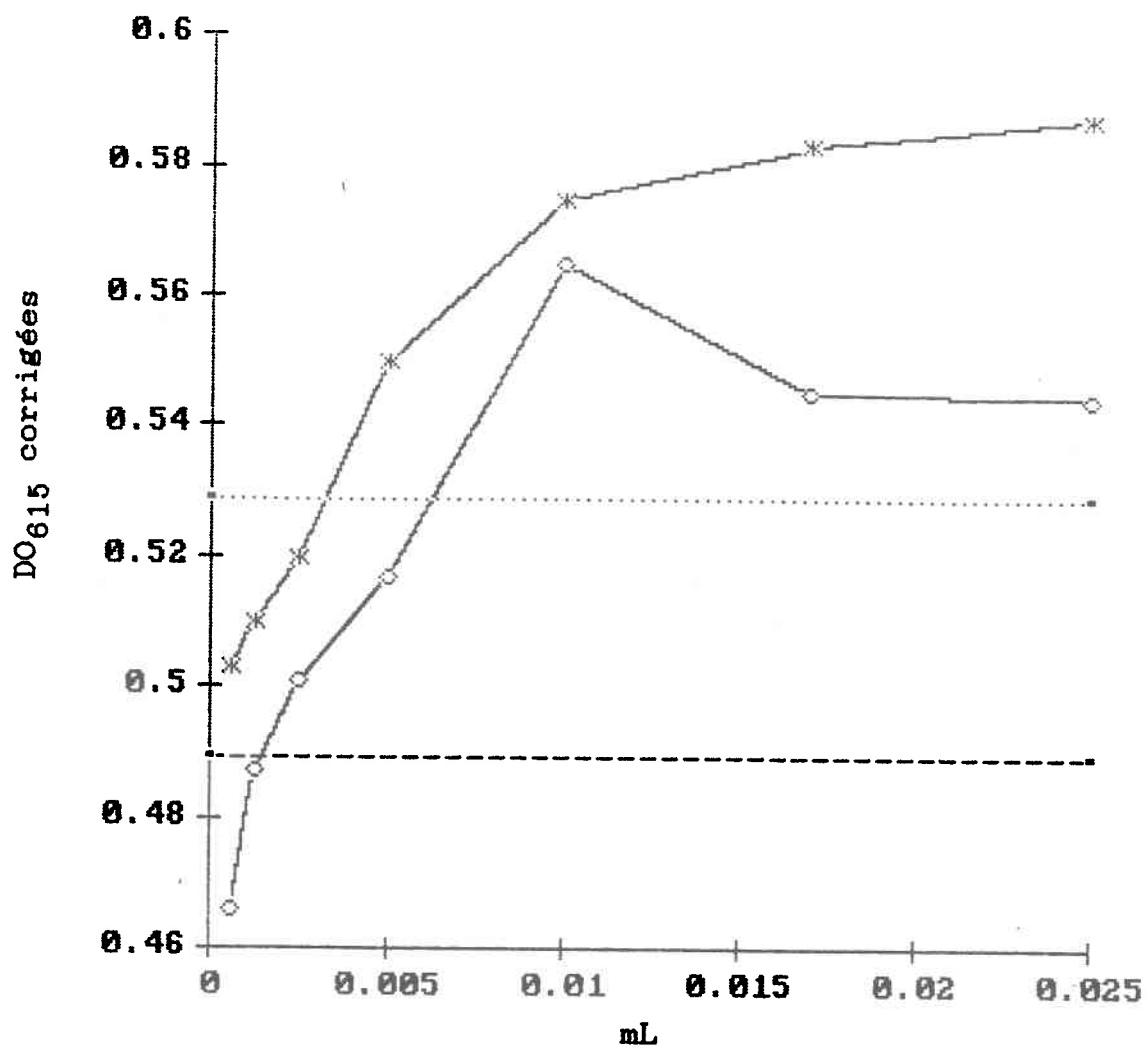


Figure 12. Activité génotoxique de la solution initiale (*) et du surnageant (o) pour l'échantillon de MNNG dans le test direct sans activation métabolique (SOS Chromotest). Symboles: moyenne des DO₆₁₅ corrigées pour les témoins (---), moyenne des témoins plus deux fois son écart type (...).

de SOSIP demeurent équivalentes pour la solution initiale et le surnageant, en se référant à la figure 12. On remarque alors que la portion linéaire de l'ensemble de points pour le surnageant s'est déplacée vers la droite (vers des concentrations plus élevées), sans pour autant que la pente en soit modifiée. Ceci traduit un facteur d'induction génotoxique plus faible pour le surnageant que pour la solution initiale. Ainsi, pour obtenir le même effet génotoxique la concentration du surnageant devra être plus importante que celle de la solution initiale. Cette augmentation du SMG suggère que le MNNG a subi certaines modifications durant la période de bioaccumulation sans pour autant que cela modifie son potentiel génotoxique.

En résumé, on note que le 4NQO et le 2AA ont subi une baisse d'activité génotoxique suite à la bioaccumulation (figure 13). La baisse d'activité pour le 4NQO est vraisemblablement associée à une biotransformation par les algues. La diminution d'activité observée pour le 2AA est principalement attribuable à un effet de photodégradation et à l'étape de centrifugation, quoique le processus de prise en charge ne peut être négligé. Malgré que les résultats des SOSIP du MNNG n'indiquent aucune modification de l'activité génotoxique après bioaccumulation, l'augmentation significative du SMG pour le surnageant

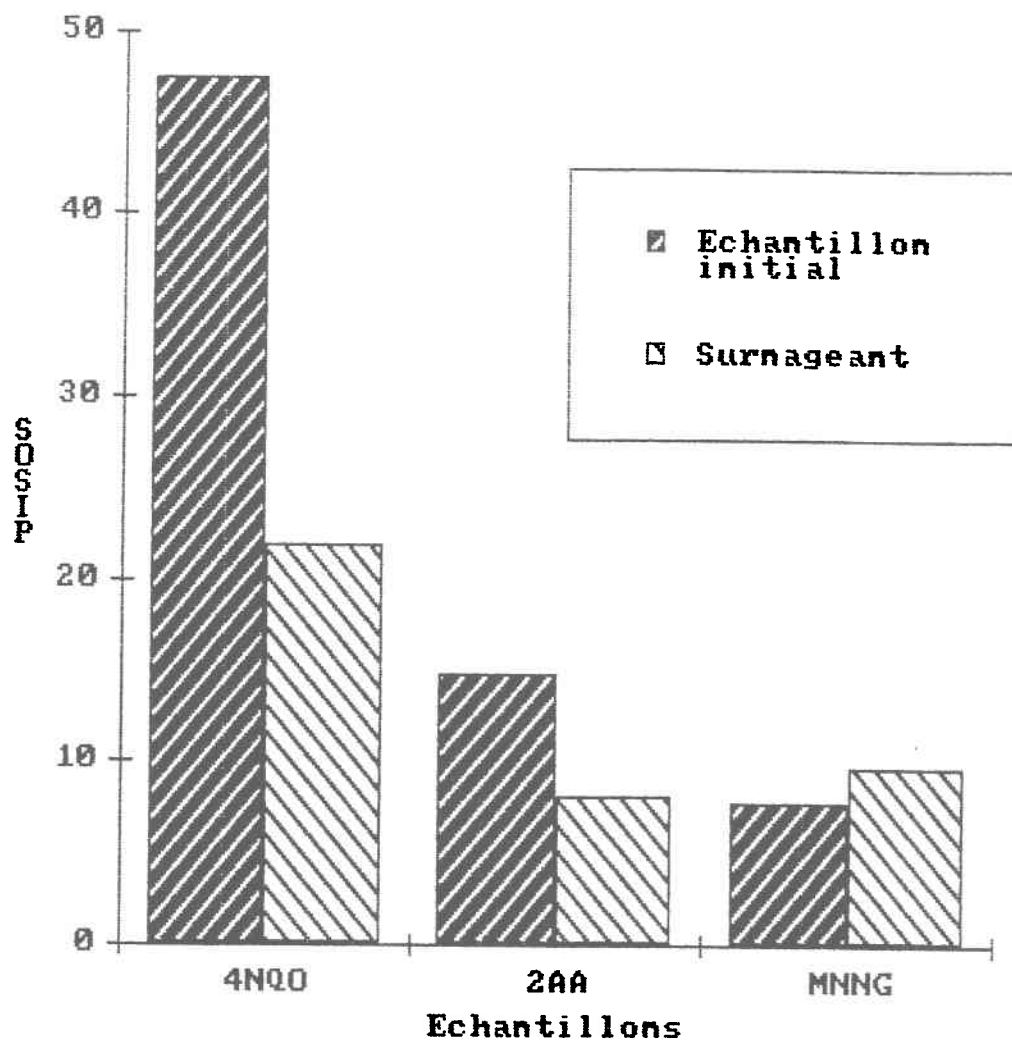


Figure 13. Histogramme des valeurs de SOSIP obtenues pour les contrôles positifs lors de la caractérisation initiale et suite à la bioaccumulation.

suggère que les algues ont joué un certain rôle de détoxification.

3.2.2- Analyse des résultats pour les effluents industriels

les figures 14 et 15 nous permettent de visualiser les modifications des SOSIP et des SMG pour les effluents industriels après l'étape de bioaccumulation. On note, tout d'abord, une diminution de l'activité génotoxique suite à la bioaccumulation pour les effluents 1, 2 et 7.

Rappelons que le rapport des SOSIP E/S de l'effluent 1 pour le test direct avec activation métabolique est de 1,5 (tableau 8), indiquant une baisse de l'activité génotoxique de l'ordre de 31,4%. De même, le test sur les extraits concentrés, avec un rapport des SOSIP E/S d'une valeur 1,4 (test -S9), reflète une diminution significative de 26,7% (tableau 8). Les courbes dose-réponse obtenues pour les tests sans activation métabolique sur les extraits concentrés de l'effluent initial et du surnageant sont présentées à la figure 16. On y note que la diminution de l'activité génotoxique de l'échantillon entraîne également une augmentation des SMG pour le test direct (figure 15) et pour l'extrait concentré (figure 16).

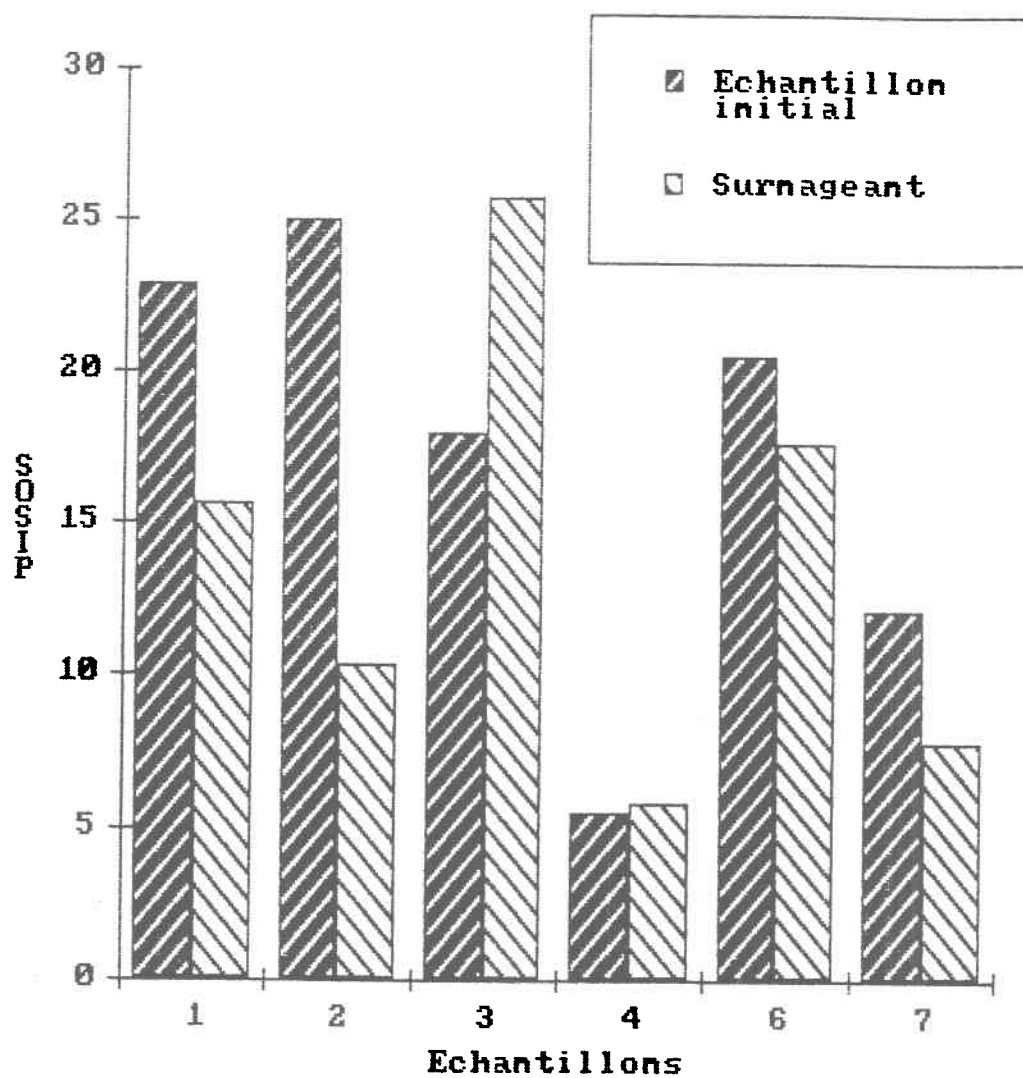


Figure 14. Histogramme des valeurs de SOSIP obtenues pour les effluents d'origine industrielle lors de leur caractérisation initiale et suite à leur bioaccumulation.

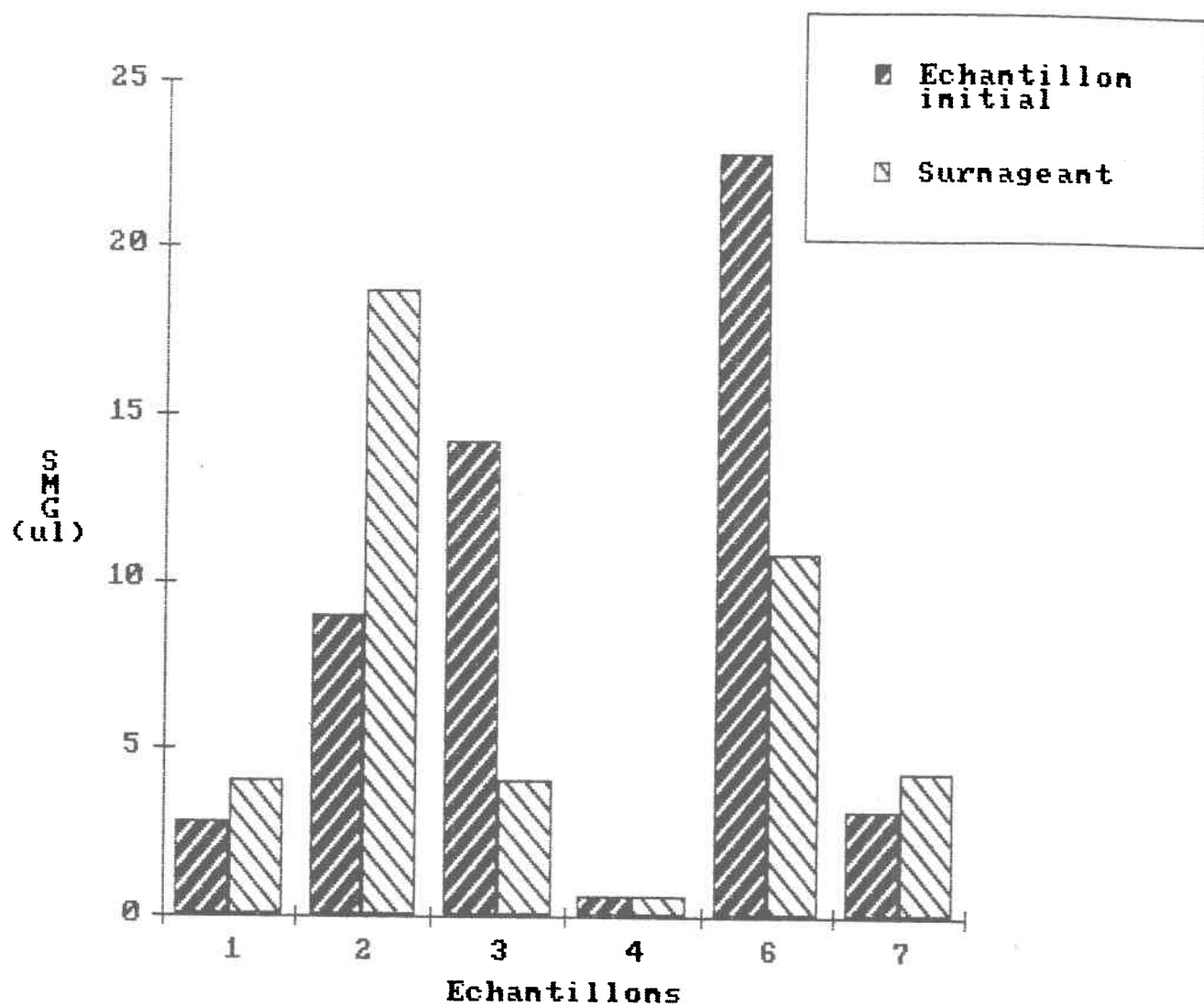


Figure 15. Histogramme des valeurs de SMG obtenues pour les effluents d'origine industrielle lors de leur caractérisation initiale et suite à leur bioaccumulation.

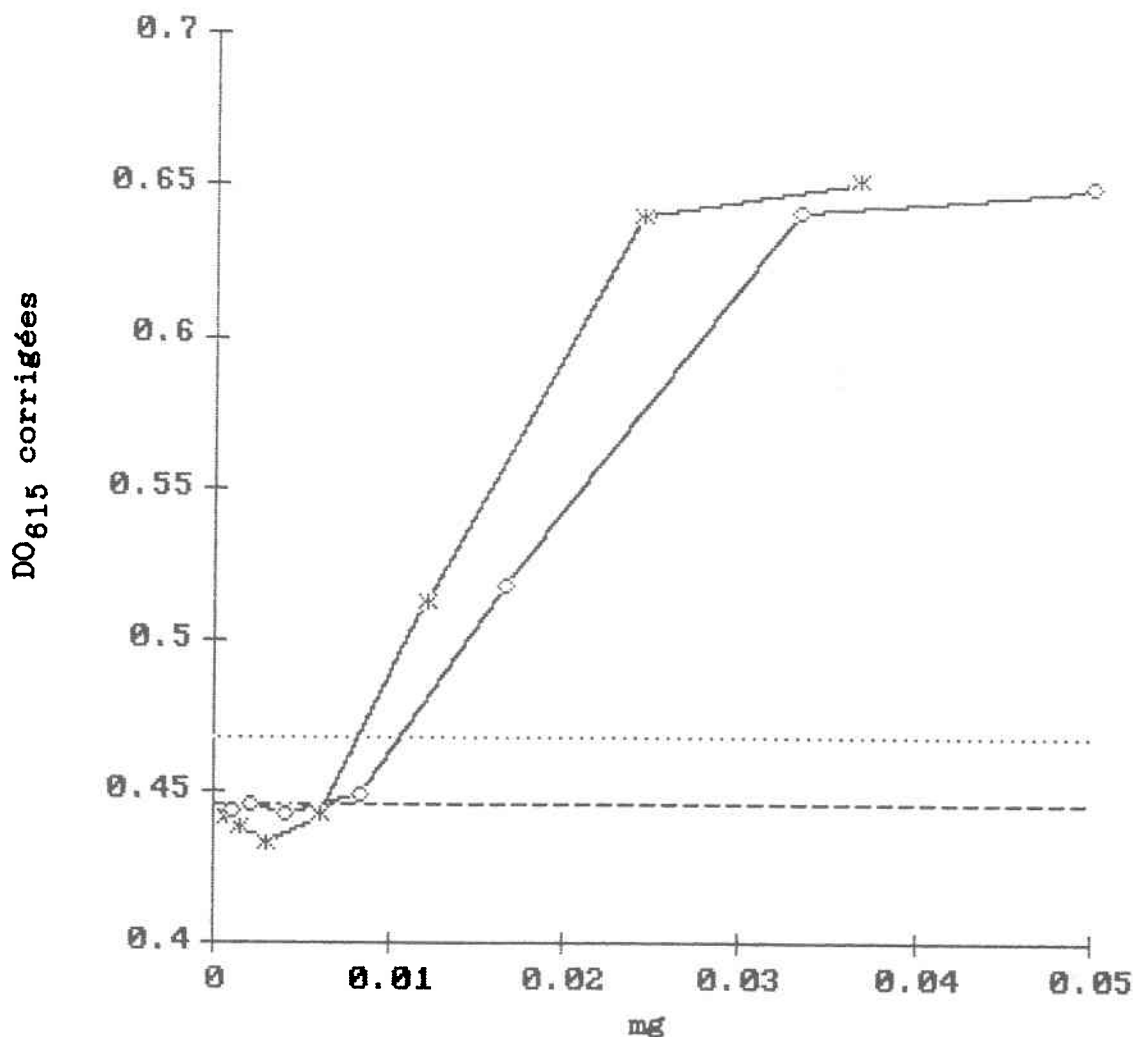


Figure 16. Activité génotoxique de l'extrait concentré de l'effluent initial (*) et du surnageant (o) pour l'échantillon 1 dans le test sans activation métabolique (SOS Chromotest). Symboles: moyenne des DO₆₁₅ corrigées pour les témoins (---), moyenne des témoins plus deux fois son écart type (...).

La diminution de l'activité génotoxique après l'étape de bioaccumulation est très importante pour l'échantillon 2. Avec un rapport des SOSIP E/S de 2,4 pour le test direct sans activation métabolique, la baisse d'activité génotoxique du surnageant par rapport à l'effluent initial est de 58,4%. On constate en parallèle une augmentation importante du SMG pour le surnageant (figure 15).

L'échantillon 7 indique, lui aussi, une baisse significative d'activité génotoxique après bioaccumulation de 36,1% qui se reflète par une légère augmentation du SMG (figure 16, tableau 8).

La baisse d'activité génotoxique des effluents 1, 2 et 7 peut être expliquée par une biotransformation des génotoxines par les algues, par une photodégradation de celles-ci lors de la période d'incubation, et/ou par une perte lors des centrifugations successives. Le volume restreint d'échantillon n'a pas permis d'étudier ces facteurs séparément. A l'avenir, il faudrait donc prévoir des volumes d'échantillons suffisants pour tenir compte de ces facteurs. On exclut ici la possibilité d'une bioconcentration des génotoxines par les algues étant donné qu'aucune activité génotoxique n'a été mise en évidence sur les extraits des culots algaux.

Contrairement aux trois échantillons mentionnés plus haut, on constate une augmentation significative de l'activité génotoxique (43,3%) pour l'effluent 3 (figure 14). En effet les SOSIP pour l'effluent original (tableau 4: 18,0) et pour le surnageant (tableau 6: 25,8) lors des tests directs sans activation métabolique, donnent lieu à un rapport des SOSIP E/S de 0,69 (tableau 8). Les valeurs de SMG obtenues confirment aussi cette augmentation de l'activité génotoxique (figure 15).

Cette augmentation peut être attribuable au fait que les algues ont activé certains précurseurs d'agents génotoxiques présents dans l'effluent. En revanche, en réaction au stress provoqué par l'agression, la population phytoplanctonique peut être responsable d'une production endogène de génotoxines libérées dans le milieu. Notre expérimentation ne permet pas de préciser lequel de ces deux facteurs a pu entrer en jeu dans le cas présent. Notons cependant que la présence de ces deux mécanismes a été signalée par Levine (1984) et Schoeny et al. (1985) dans des études récentes sur la bioaccumulation de génotoxines par les algues. Nous ne pouvons négliger l'impact que peut avoir la lumière, ainsi que nous en avons discuté précédemment. Cependant, l'influence de la lumière est facilement vérifiable expérimentalement. Sans pour autant négliger le mécanisme agissant sur l'activité

génomotoxique, il faut également souligner le danger, voire même le risque, que pourrait représenter le déversement d'un effluent "activable" dans l'environnement, comparativement à un effluent pour lequel on a observé une dégradation des génotoxines.

Aucune modification significative des caractéristiques génotoxiques après l'étape de bioaccumulation n'a été observée pour l'effluent 4 (figure 17). D'ailleurs en consultant les figures 14 et 15, on constate la similitude des valeurs de SOSIP et des SMG pour l'échantillon initial et le surnageant. Bien qu'aucune modification des caractéristiques génotoxiques ne soit survenue pour la phase liquide de cet échantillon, il est surprenant de constater une réponse génotoxique positive sur le culot algal. La valeur de SOSIP obtenue pour celui-ci est de 425,4 (tableau 7). Ceci est néanmoins explicable. Premièrement, les algues peuvent accumuler certains promoteurs présents dans l'effluent (dérivés exogènes) et les activer en agent génotoxique (Levine, 1984; Schoeny et al., 1985). Deuxièmement, les algues peuvent produire elles-mêmes des génotoxines, en réaction au stress provoqué par l'exposition (Levine, 1984; Schoeny et al., 1985). L'absence d'une libération des génotoxines activées ou produites par les algues dans l'échantillon expliquerait ainsi la stabilité de celui-ci après l'étape de bioaccumulation.

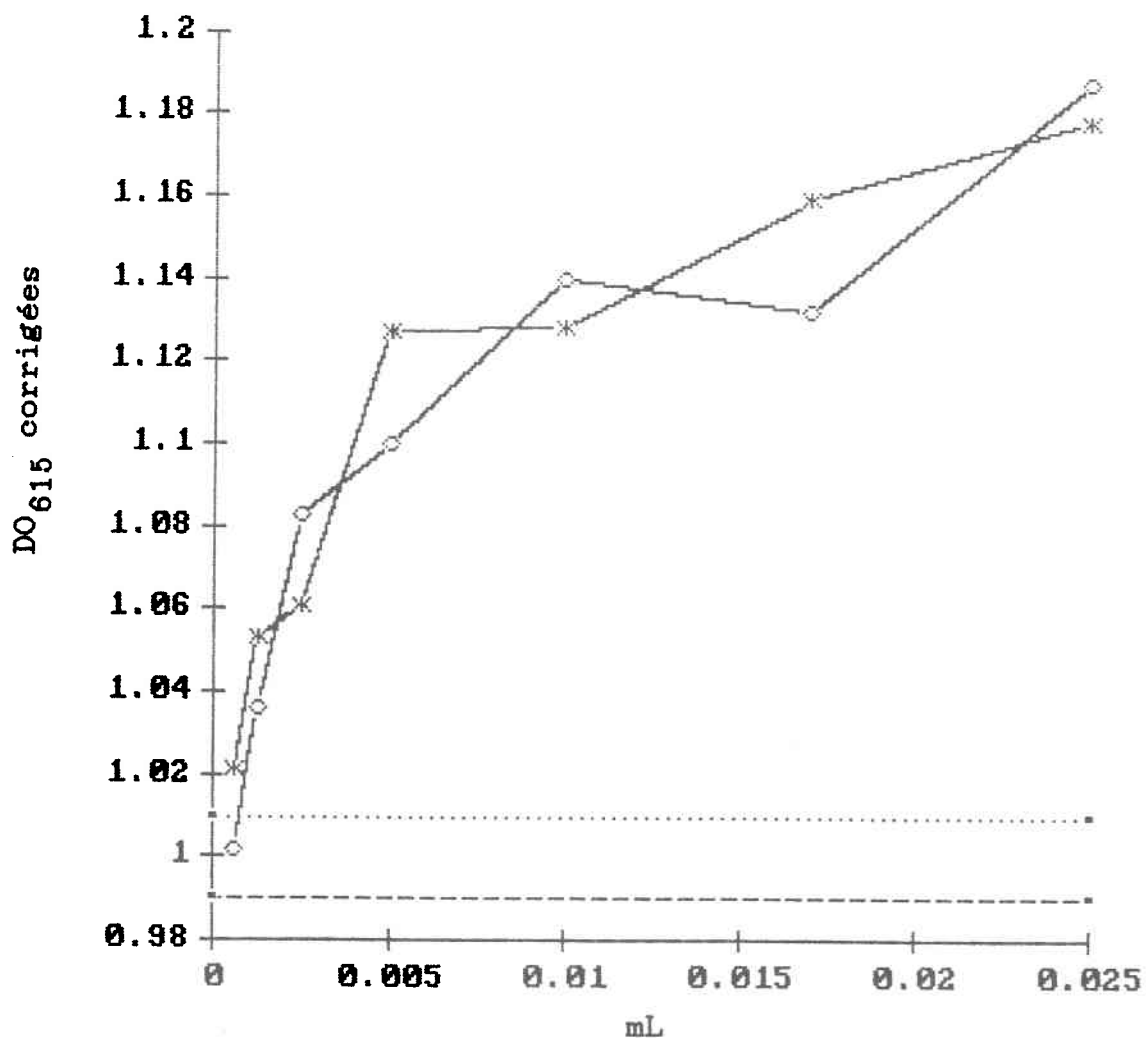


Figure 17. Activité génotoxique de l'effluent initial (*) et du surnageant (o) pour l'échantillon 4 dans le test direct sans activation métabolique (SOS Chromotest). Symboles: moyenne des DO₆₁₅ corrigées pour les témoins (---), moyenne des témoins plus deux fois son écart type (...).

Enfin, l'échantillon 6, a démontré une diminution non significative de son activité génotoxique après bioaccumulation (figure 14). En effet, les valeurs de SOSIP pour l'effluent initial (tableau 4: $20,6 \pm 6,1$) et pour le surnageant (tableau 6: $17,7 \pm 5,6$) ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre. En revanche, on remarque une très nette diminution du SMG pour cet effluent après son exposition aux algues (figure 15). Cette réduction signifie que l'induction génotoxique est plus élevée pour le surnageant que pour l'effluent original. Contrairement au MNNG, où l'on notait un déplacement vers la droite de la portion linéaire de la courbe dose-réponse, on enregistre ici un déplacement vers la gauche. Il y a donc eu transformation des caractéristiques génotoxiques de l'effluent que l'on peut une fois de plus, attribuer à des interactions des algues et/ou de la lumière.

En résumé, on note une baisse significative de l'activité génotoxique pour les effluents 1, 2 et 7 après bioaccumulation. Cette diminution peut être associée à une photodégradation, à une biotransformation par les algues et/ou à une perte lors de l'étape de centrifugation. Pour l'échantillon 3, on constate au contraire une augmentation de l'activité génotoxique. Celle-ci peut être attribuable à une production algale (endogène et/ou exogène) et/ou à

l'influence de la lumière. En dernier lieu, bien que les résultats des SOSIP des échantillons 4 et 6 n'indiquent aucune modification du potentiel génotoxique après bioaccumulation, la réponse positive sur le culot algal exposé à l'effluent 4 et la diminution significative du SMG pour le surnageant de l'effluent 6, suggèrent des interactions algales et/ou de la lumière.

CONCLUSION

La mise au point d'un test de dépistage d'activité génotoxique d'effluents a été réalisée à partir d'expériences qui ont mis en évidence le potentiel génotoxique de substances pures (4NQO, 2AA et MNNG). Aussi, les procédures élaborées se sont révélées efficaces pour mettre en évidence les caractéristiques génotoxiques des effluents industriels et la capacité du phytoplancton à interagir sur ces caractéristiques.

La caractérisation génotoxique initiale des échantillons est basée sur l'analyse de la phase liquide de l'effluent, de l'extrait concentré de cette phase et de la phase solide.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence d'une part, la génotoxicité de la phase liquide de la majorité des échantillons testés. D'autre part, à l'exception des pro-

mutagènes, l'activité génotoxique des échantillons décroît en présence de S9 mix. Ce phénomène est relié aux processus de désactivation que subissent les substances génotoxiques en présence de S9 mix.

Par ailleurs, l'analyse des résultats sur les extraits concentrés de la phase liquide, nous a permis de constater les limites de ce traitement des échantillons ainsi que le caractère qualitatif des résultats. En effet, seuls les composés extractibles et non volatils peuvent être concentrés par la procédure expérimentale utilisée. Ainsi, suite à l'extraction et à la concentration certaines modifications des caractéristiques génotoxiques peuvent survenir pour les échantillons constitués de composés non extractibles et/ou volatils. La démarche expérimentale nous semble donc appropriée puisque celle-ci limite l'étape d'extraction et de concentration aux effluents qui n'ont démontré aucune activité génotoxique lors du test direct sur la phase liquide.

Finalement, en dépit du fait qu'aucun résultat concernant la phase solide des échantillons ne soit exploitable, nous considérons que la caractérisation de cette phase est essentielle considérant le phénomène d'adsorption des composés chimiques de faible solubilité sur la matière en suspension. Pour les études ultérieures

l'utilisation de filtre de verre ou de polyester est recommandée et permettra de mettre en évidence l'importance de cette phase au niveau du potentiel génotoxique des effluents.

L'étude de la capacité du phytoplancton à interagir sur les caractéristiques génotoxiques des échantillons a porté sur l'analyse: 1) de l'extrait concentré de la biomasse algale (S. capricornutum) après exposition des cellules à l'effluent, 2) de l'effluent mis en contact avec la population phytoplanctonique, c'est-à-dire le surnageant et 3) de l'extrait concentré du surnageant. Les constatations suivantes ont pu être dégagées des résultats obtenus:

Premièrement, une baisse significative de l'activité génotoxique des échantillons peut survenir suite à la bioaccumulation. Cette détoxification des échantillons est attribuable à différents facteurs. D'une part, la baisse d'activité, comme observée avec le 4NQO, peut être directement reliée à des interactions phytoplanctoniques sur les groupes fonctionnels des composés génotoxiques. D'autre part, à la lumière des résultats obtenus avec le 2AA, la photodégradation ainsi que l'étape de centrifugation peuvent également être responsable d'une diminution de l'activité génotoxique. Le volume restreint

d'échantillons pour les effluents industriels ne nous a pas permis de vérifier l'importance de chacun des ces facteurs face aux diminutions observées. Par contre, comme on a pu le constater, les effets de la lumière ainsi que de la centrifugation sont facilement vérifiables expérimentalement.

Deuxièmement, on a pu mettre en évidence la capacité du phytoplancton à bioconcentrer des génotoxines. En effet, tel que noté avec le 2AA, les algues sont en mesure de prendre en charge des composés génotoxiques présents dans l'échantillon et d'induire ainsi une diminution de l'activité génotoxique de la phase liquide. D'autre part, les résultats de l'effluent 4, ont permis d'établir que les algues peuvent bioconcentrer des composés génotoxiques sans pour autant modifier les caractéristiques génotoxiques de l'échantillon. Les génotoxines prises en charge par les algues sont alors d'origine exogène (mutagènes ou pro-mutagènes présents dans l'échantillon et activés en agent génotoxique par les algues) et/ou d'origine endogène (produites par les algues en réponse au stress associé à l'exposition d'un effluent génotoxique).

Troisièmement, une augmentation significative de l'activité génotoxique peut se manifester suite à la bioaccumulation. Celle-ci peut découler d'une activation de

pro-mutagènes présents dans l'échantillon et/ou d'une production endogène du phytoplancton en réponse au stress de l'exposition. A noter que l'activation des pro-mutagènes peut résulter des interactions du phytoplancton et/ou de l'influence de la lumière.

En dernier lieu, comme nous avons pu le constater avec le MNNG et l'effluent 6, les échantillons peuvent subir certaines modifications durant la période de bioaccumulation sans pour autant qu'il y ait modification du potentiel génotoxique de l'échantillon (SOSIP). Ces modifications, que l'on peut encore une fois attribuer à des interactions phytoplanctoniques et/ou à l'influence de la lumière, provoquent une augmentation ou une diminution du facteur d'induction génotoxique de l'échantillon.

Dans un contexte plus général, il est bon de souligner que la réponse génotoxique à l'aide de tests bactériens, comme le SOS Chromotest, n'est pas en elle-même une évidence définitive des risques carcinogéniques que peuvent représenter un échantillon. En effet, les organismes vivants, particulièrement les mammifères, possèdent une variété de mécanismes qui peuvent entraîner une modification des réponses face à des agents génotoxiques (absorption, distribution, métabolisme, extraction). De plus, les agents génotoxiques peuvent causer différents

types d'altérations de l'ADN (aberrations chromosomiques, substitution de bases, délétion ou insertion de nucléotides) et, en général, les bioessais ne peuvent détecter qu'un seul type d'altération. En dernier lieu, la susceptibilité des tests est également un facteur à considérer puisque certaines bactéries vont réagir différemment à l'exposition du même composé.

Dans cette optique, l'approche expérimentale pour mettre en évidence le potentiel génotoxique des effluents devrait être considérée dans une perspective de dépistage primaire, permettant une première sélection des effluents susceptibles d'être problématique pour l'environnement. Les résultats positifs pour un effluent spécifique devraient mener à la conduite de tests supplémentaires permettant une caractérisation plus poussée de l'échantillon. Cette caractérisation additionnelle pourrait inclure l'évaluation du potentiel génotoxique à l'aide d'un deuxième test de dépistage, l'analyse génotoxique de fractions spécifiques de l'effluent ainsi que l'identification des composés responsables de l'activité génotoxique. Cette caractérisation des effluents industriels pourrait s'avérer importante afin de concevoir une méthode de traitement efficace pour l'élimination des génotoxines.

Il n'en demeure pas moins que l'approche expérimentale séquentielle développée nous semble appropriée. En effet, la caractérisation du potentiel génotoxique initial des effluents permet une première sélection des effluents susceptibles d'être problématiques pour l'environnement. En plus, la mise en évidence des différentes interactions du phytoplancton sur les caractéristiques génotoxiques des échantillons démontre l'importance de ce vecteur face à une agression de ce genre. Les tests sur les différents sous-échantillons peuvent nous aider à comprendre la distribution, le destin ainsi que l'activité des effluents potentiellement génotoxiques déversés dans l'environnement. En effet, les algues vertes, comme S. capricornutum, sont une composante essentielle de la chaîne alimentaire de l'écosystème aquatique et l'analyse des résultats pour les différents échantillons nous a permis de mettre en évidence différentes interactions de cette dernière sur les caractéristiques génotoxiques des effluents. Par contre, certaines modifications sont nécessaires. Entre autres, l'utilisation de filtres non extractibles est primordiale. De plus, afin de corroborer les résultats génotoxiques obtenus, un deuxième test de dépistage est souhaitable. Une étape permettant de mettre en évidence l'effet de la lumière et de la centrifugation sur les caractéristiques génotoxiques des effluents est également essentielle. En dernier lieu, l'importance des procédures d'extraction et

de concentration rend nécessaire le développement de nouvelles procédures expérimentales permettant d'obtenir des concentrés plus représentatifs de l'échantillon original, tel qu'explicité au chapitre 1 et démontré dans l'analyse des résultats (chapitre 3).

BIBLIOGRAPHIE

- ALLAN, R.J. (1985). Influence des substances particulières sur le sort des contaminants dans les écosystèmes aquatiques. Etude N°142, Série Scientifique. Direction générale des eaux intérieures, Institut national de recherches en hydrologie, Centre Canadien des eaux intérieures, Burlington, Ontario, 139 p.
- BARNES, W.S. (1980). Assays for Dispersed Mutagens in Marine Environments Using Extracts of Bioconcentrators. Considerations, Problems and Applications. Ph.D. dissertation, Botany Dept., Univ. of Mass., Amherst, M.A.
- BECKMAN Instruments Inc. (1982). Microtox™ System Operating Manual, Beckman Instructions 015-555879. Beckman Instruments Inc., Microbics Operations, Carlsbad, CA92008, USA, 12 sections, 70 p.
- BLAISE, C., SKA, B., SABATINI, G., BERMINGHAM, N. et LEGAULT, R. (1981). Potentiel de bioaccumulation des substances toxiques d'eaux résiduaires industrielles à l'aide d'un essai utilisant des algues et des bactéries. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, 106: 155-165.
- BLAISE, C., LEGAULT, R., BERMINGHAM, N., VAN COILLIE, R. et VASSEUR P. (1986). A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. Toxicity Assessment, 1: 261-281.
- COUTURE, P. (1981). Contribution de bio-essais avec algues pour l'étude des impacts environnementaux en eaux douces. Thèse de doctorat de 3e cycle, Université Paul Sabatier, Toulouse, 128 p.
- DeRAAT, W.K., HANSTVEIT, A.O. et DeKREUK, J.F. (1985). The role of mutagenicity in the ecotoxicological evaluation of industrial discharges into the aquatic environment. Food Chem. Toxicol., 23: 33-41

- DOLLERY, A.A., MELVIN, W.T., KEIR, H.M. et HARRIS, W.J. (1983). Repair of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced DNA damage in normal human cells and cells from classical and variant xeroderma pigmentasum. *Mutat. Res.*, 112: 33-46
- DOUGLAS, G.R., NESTMANN, E.R., BETTS, J.L., MUELLER, J.C., LEE, E.G.-H., STICH, H.F., SAN, R.H.C., BROUZES, R.P., CHMELANSKAS, A.L., PAAVILLA, H.D. et WALDEN, C.C. (1980). Mutagenic activity in pulp mill effluents. In: Jolley, R.L., W.A. Brungs et R.B. Cumming (Eds.), *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Vol. 3. Ann Arbor Sci., New-York, pp. 865-880.
- DOUGLAS, G.R., NESTMANN, E.R., McKAGUE, A.B., KAMRA, O.P., LEE, E.G.-H., ELLENTON, J.A., BELL, R., KOWBEL, D., LIU, V. et POOLEY, J. (1983). Mutagenicity of pulp and paper mill effluent: a comprehensive study of complex mixtures. In: Waters, M., S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, N. Chernoff et S. Nestnow (Eds.), *Application of Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures*, Vol. 3. Plenum, New York, pp. 431-459.
- EPLER, J. (1980). The use of short-term tests in the isolation and identification of chemical mutagens in complex mixtures. In: deSerres F. and A. Hollaender (Eds.), *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 6. Plenum Press, New York, pp. 239-270.
- GENTILE, J.M. et PLEWA, M.J. (1982). Plant dependent mutation assays. In: Fleck, R.A. et A. Hollaender (Eds.), *Genetic Toxicology*. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 327-352.
- HARTMAN, P.E. (1983). Impacts beyond carcinogenesis. *Environ. Mutagen.*, 5: 139-152.
- KAMRA, O.P., NESTMANN, E.R., DOUGLAS, G.R., KOWBEL D.J. et HARRINGTON, T.R. (1983). Genotoxic activity of pulp mill effluent in Salmonella and Saccharomyces cerevisiae assays. *Mutat. Res.*, 118: 269-276.

- LEVINE, H.G. (1984). The use of seaweeds for monitoring coastal waters. In: Shubert, L.E. (ed.), *Algae as ecological Indicators*. Academic Press Inc., London, England, pp. 189-210.
- MCCANN, J., CHOI, E., YAMASAKI, E. et AMES B.N. (1979). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72: 5135-5139.
- McGEORGE, L.J., LOUIS, J.B., ATHERHOLT, T.B. et McGARRITY, G.J. (1985). Mutagenicity analyses of industrial effluents: results and considerations for integration into water pollution control programs. In: Waters M.B., S.S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, G. Strauss et S. Nesnow (Eds.), *Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures IV*. Plenum, New York, pp. 247-268.
- MEIER, R.J. et BISHOP, D.F. (1985). Evaluation of conventional treatment processes for removal of mutagenic activity from municipal waste waters. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 57: 999-1005.
- MILLER, E.C. et MILLER, J.A. (1981). Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer*, 47: 1055-1064.
- NESTMANN, E.R. (1985). Detection of genetic activity in effluents from pulp and paper mills: mutagenicity in Saccharomyces cerevisiae. In: Zimmermann, F.K. et R.E. Taylor-Mayer (Eds.), *Mutagenicity Testing in Environmental Pollution Control*. Ellis Horwood limited, England, pp. 105-117.
- NESTMANN, E.R., LEBEL, G.L., WILLIAMS, D.T. et KOWBEL, D.J. (1979). Mutagenicity of resin acids identified in pulp and paper mill effluents using the Salmonella/mammalian-microsome assay. *Environ. Mutagen.* 1: 361-369.
- ORGENICS LTD. (1986). The SOS Chromotest blue kit, Instruction for use. Orgenics Ltd., Document Location: SOS-II/sosbins.mss, Yavne 70650, Israel, 23 p.

- PARRY, J.M. (1985). The detection of mutagens in the tissue of marine organisms exposed to environmental pollutants. In: Zimmermann, F.K. et R.E. Taylor-Mayer (Eds.), Mutagenicity Testing in Environmental Pollution Control. Ellis Horwood limited, England, pp. 105-117.
- PITTINGER, C.A., BUIKEMA Jr., A.L. et FALKINHAM III, J.O. (1987). In situ variations in oyster mutagenicity and tissue concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Environ. Toxicol. Chem., 6: 51-60.
- PLEWA, M.J. (1985). Genetic assays of maize for environment pollution control. In: Zimmermann, F.K. et R.E. Taylor-Mayer (Eds.), Mutagenicity Testing in Environmental Pollution Control. Ellis Horwood limited, England, pp. 147-165.
- PLEWA, M.J., WAGNER, E.D., GENTILE, G.J. et GENTILE, J.M. (1984). An evaluation of genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. Mutat. Res., 136: 233-245.
- QUILLARDET, P., HUISMAN, O., D'ARI, R., et HOFNUNG, M., (1982). SOS Chromotest, a direct assay for induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity. Proc. Nat. Acad. Sci., 79: 5971-5975.
- QUILLARDET, P., HOFNUNG, M. (1985). The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. Mutat. Res., 147: 65-78.
- SBSC (Santé et Bien-être social Canada) et Environnement Canada. (1986). Lignes directrices sur l'utilisation des tests de mutagenicité pour l'évaluation toxicologique des produits chimiques. Rapport consultatif, Ottawa, Canada, 91 p.
- SAXENA, J. et SCHWARTZ, D.J. (1979). Mutagens in wastewaters renovated by advanced wastewater treatment. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 22: 319-326.

- SCHOENY, R., CODY, T., RADIKE, M. et WARSHAWSKY, D. (1985). Mutagenicity of algal metabolites of benzo(a)pyrene for Salmonella typhimurium. Environ. Mutagen., 7: 839-855.
- SNEDECOR, G.W. ET COCHRAN, W.G. (1984). Méthodes statistiques. Association de coordination et technique agricole, sixième édition, Paris, 649 p.
- SOMANI, S.M. TEECE, R.G. et SCHAEFFER, D.J. (1980). Identification of cocarcinogens and promoters in industrial discharges into and in the Illinois river. J. Toxicol. Environ. Health, 6: 315-331.
- U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency), (1978). The Selenastrum capricornutum Printz algal assay bottle test. Experimental Design, Application, and Data Interpretation. Protocol, EPA/600/9-78-018. Corvallis Environmental Research Lab. Office of Research and Development, Corvallis, Oregon, 126 p.
- U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency), (1982). Test methods for evaluating solid waste: Physical/Chemical methods. 2nd. ed., U.S. Environmental Protection Agency, SW-846-July.
- U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency), (1985). Guidelines for preparing environmental and waste samples for mutagenicity (Ames) testing: Interim procedures and Panel Meeting Proceedings. EPA/600/4-85/058, Las Vegas, Nevada, 89114, 255 p.
- WRIGHT, A.S. (1980). The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. Mutat. Res., 75: 215-241.
- ZIMMERMANN, F.K. (1985). Introduction. In: Zimmermann, F.K. et R.E. Taylor-Mayer (Eds.), Mutagenicity Testing in Environmental Pollution Control. Ellis Horwood limited, England, pp. 11-13.

ZIMMERMANN, F.K. et TAYLOR-MAYER, R.E. (1985). Mutagenicity testing - some background information. In: Zimmermann, F.K. et R.E. Taylor-Mayer (Eds.), Mutagenicity Testing in Environmental Pollution Control. Ellis Horwood limited, England, pp. 23-46.

ANNEXES

Annexe I

Détermination du facteur de correction relié à
l'activité de l'alcaline phosphatase

Une colonne spéciale de 8 puits de format microplaque est incorporée à chaque trousse SOS Chromotest. Celle-ci contient des concentrations décroissantes d'enzymes préservées de β -galactosidase. L'ajout de chromogène bleu, avec lequel l'enzyme réagit, permet d'établir un gradient de couleur à partir duquel on peut évaluer le pourcentage de débordement de la couleur bleue du substrat de la β -galactosidase (615 nm) sur la lecture de DO de l'alcaline phosphatase (405 nm).

A l'aide de cette courbe standard, on obtient une valeur précise de la densité optique à 405 nm pour une concentration donnée de matériel testé, en procédant de la façon suivante;

- 1- On note les DO 615 et 405 de l'échantillon pour une concentration donnée.
- 2- On se réfère, ensuite, aux DO 615 et 405 de la courbe standard et on identifie le puits où la valeur de DO 615 est la plus rapprochée de celle de l'échantillon et on note la DO 405 correspondante.

- 3- On détermine, par la suite, le pourcentage de débordement en divisant cette DO 405 par la DO 615 correspondante sur l'échelle de couleur.
- 4- Pour obtenir la valeur précise correspondant à l'activité de l'alcaline phosphatase, on soustrait à la valeur de DO 405 de l'échantillon notée au début, la valeur de la DO 615 correspondante que l'on a préalablement multipliée par le pourcentage de débordement.

L'équation suivante résume les différentes étapes pour déterminer la DO 405 nette pour une concentration donnée de matériel testé;

$$DO405 \text{ nette} = DO405_e - (DO615_e \times (DO405_c / DO615_c))$$

où:

DO 405 nette = valeur précise de DO de l'alcaline phosphatase

DO 405_e = DO 405 de l'échantillon pour une concentration donnée,

DO 615_e = DO 615 de l'échantillon pour une concentration donnée,

DO 615_c = DO 615 de la courbe standard, dont la valeur est la plus rapprochée de la DO 615_e,

DO 405_c = DO 405 de la courbe standard correspondant à la DO 615_c.

Annexe II

Extraction et concentration: procédure expérimentale

La procédure utilisée, qui est celle de U.S. EPA (EPA/600/4-85; 048), est présentée ci-après:

II-1 Préparation de la verrerie:

- Laver et brosser au savon.
- Rincer trois fois à l'eau du robinet.
- Rincer trois fois à l'eau déionisée.
- Rincer à l'acétone de qualité pesticide.
- Rincer au chlorure de méthylène de qualité pesticide.
- Placer la verrerie dans une étuve à 300°C pour une période de 12 heures.

II-2 Extraction (phase liquide)

- 1- Homogénéiser le contenu de la bouteille d'échantillon (3 L).
- 2- Mesurer deux parties aliquotes de 1,5 L à l'aide d'un cylindre gradué et transférer dans 2 ampoules de séparation de 2 L.
- 3- Ajuster le pH des 2 sous-échantillons à 2 avec une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4 1 N).

- 4- Ajouter 150 mL de chlorure de méthylène (CH_2CL_2) de qualité pesticide à chacune des ampoules et extraire en brassant pendant deux minutes. Effectuer périodiquement une aération des ampoules afin de libérer l'excès de pression.
- 5- Recueillir la phase organique (chlorure de méthylène) de chacun des sous-échantillons dans des béchers de 2 L.
- 6- Ajouter 100 mL de chlorure de méthylène à chacune des ampoules et répéter la procédure d'extraction une deuxième fois. Combiner tous les extraits dans les béchers de 2 L. Exécuter une dernière extraction avec 100 mL de chlorure de méthylène, selon la même procédure.
- 7- Ajuster le pH des deux sous-échantillons à une valeur égale ou supérieure à 11 avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH 10 N).
- 8- Extraire l'échantillon successivement avec 150, 100 et 100 mL de chlorure de méthylène par ampoule de séparation. Récupérer toutes les phases organiques dans les béchers de 2 L.
- 9- Placer une colonne contenant environ 10 cm de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) purifié durant 4 h à 400°C (préalablement refroidi) au dessus d'un ballon de 1 L. Filtrer la phase organique à travers la colonne.
- 10- Concentrer les extraits par évaporation du chlorure de méthylène sur un évaporateur rotatif (60°C), en

réduisant jusqu'à environ 10 mL.

- 11- Transférer l'extrait dans une éprouvette graduée de 15 mL, pré-pesée. Rincer le ballon avec 5 mL de chlorure de méthylène et transférer dans l'éprouvette.
- 12- Evaporer à sec le contenu de l'éprouvette sous jet d'azote ultra-pur comprimé.
- 13- Peser l'éprouvette et son contenu et déterminer le poids de résidu en mg.
- 14- Resolubiliser le résidu extrait dans 1 mL de diméthyle sulfoxide (DMSO) 100% de qualité pesticide et réfrigérer à 4°C.

II-3 Extraction (biomasse algale)

- 1- Compléter le 30 mL contenant 30 mg d'algues à 50 mL avec de l'eau déionisée. Transférer dans une ampoule de séparation de 250 mL.
- 2- Ajuster le pH à deux avec de l'acide sulfurique. Faire une extraction en série avec respectivement 50, 25 et 25 mL de chlorure de méthylène, comme à l'étape 3, 4 et 5 de l'extraction de la phase liquide. Récupérer la phase organique dans un bécher de 1 L.
- 3- Ajuster le pH de la phase aqueuse à 11, à l'aide du NaOH. Répéter l'extraction successivement avec 50, 25 et 25 mL de solvant. Recueillir les phases organiques dans le bécher.

4- Pour la concentration de la phase organique, on procède de la même façon que pour la phase liquide (étapes 9 à 14).

II-4 Extraction (phase solide de l'effluent)

L'extraction de la phase solide de l'effluent se fait suivant la même procédure que pour le matériel biologique. Les seules différences se situent au niveau de la préparation des filtres et des volumes de solvant à utiliser. Les filtres doivent être préalablement coupés en petits morceaux, puis transférés dans une ampoule d'extraction de 500 mL, à laquelle on ajoute 60 mL d'eau déionisée. Les volumes de solvant à utiliser pour les trois extractions en série sont respectivement de 60, 30 et 30 mL de chlorure de méthylène.

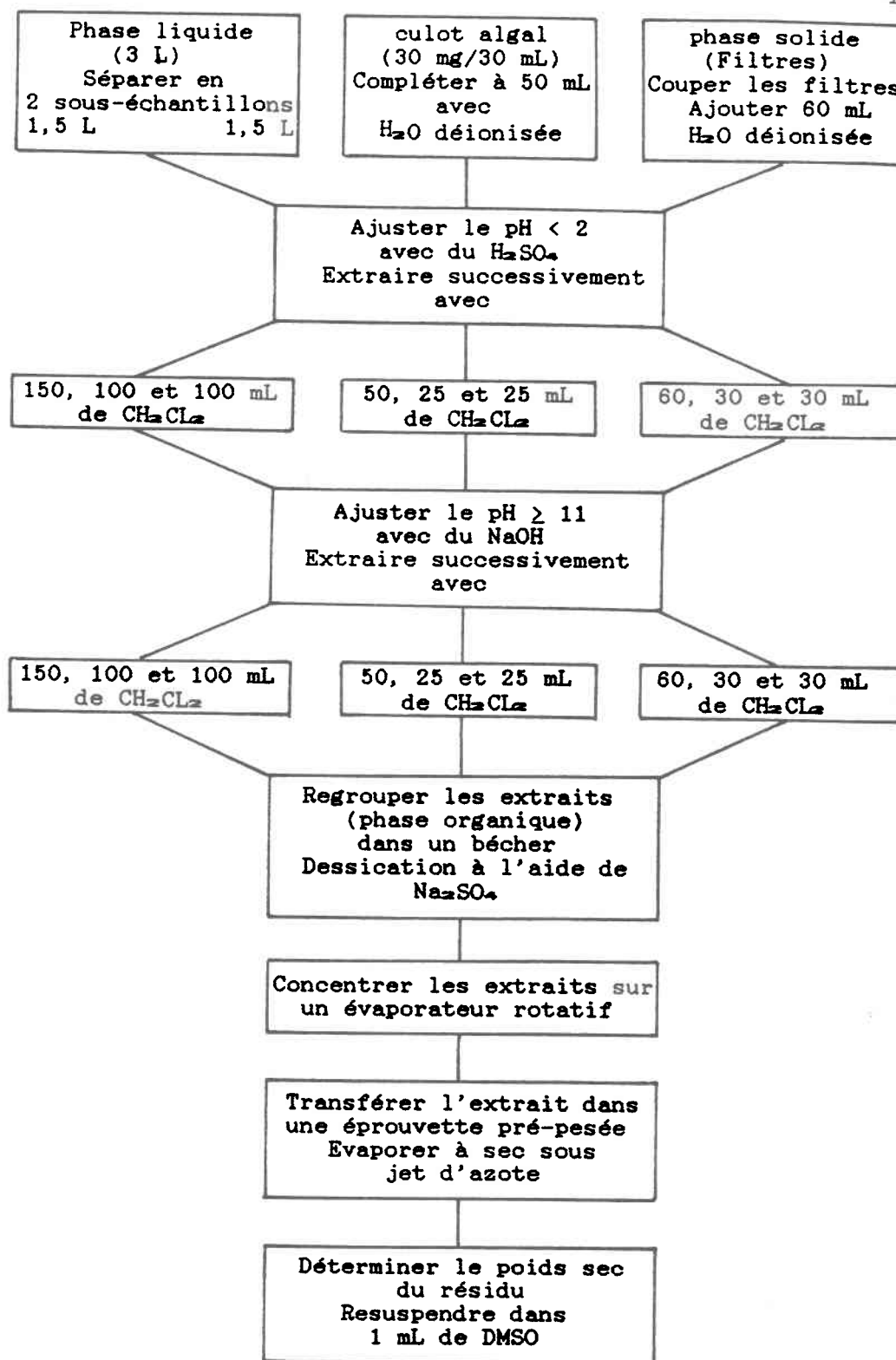


Figure 18. Cheminement de la procédure d'extraction et de concentration des sous-échantillons.

