

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

INRS-EAU

par

LUCIE MÉNARD

DÉVELOPPEMENT D'UN TEST DE LÉTALITÉ
ALGAL PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

MARS 1993

REMERCIEMENTS

Par la présente, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont collaboré et soutenu la réalisation de cette étude.

Je remercie particulièrement mon directeur, le Dr Christian Blaise, qui par son soutien scientifique, a su orienté et dirigé de façon judicieuse cette recherche. Ses précieuses suggestions et sa rigueur scientifique m'ont permis d'atteindre les objectifs de ce projet de recherche.

Je tiens également à remercier sincèrement le Dr Pierre Couture de l'Institut National de recherche scientifique (INRS-Eau) pour son soutien moral et scientifique. Je tiens à le remercier particulièrement pour la confiance qu'il a porté à mon égard en acceptant d'être co-directeur de cette recherche.

Plusieurs personnes m'ont également apporté une aide précieuse dans la réalisation des diverses étapes de ces travaux. J'adresse ma gratitude aux collègues de la section écotoxicologique du Centre Saint-Laurent et particulièrement à Donald St-Laurent qui m'a apporté de judicieux conseils tout au long de cette étude.

Mes remerciements s'adressent également à M. Raymond Vezeau, de la section des Services Analytiques du Centre Saint-Laurent, qui m'a accordé la possibilité de travailler dans ses laboratoires et a toujours su m'apporter son soutien analytique.

Finalement, je tiens à souligner ma gratitude à tous mes amies et amis qui m'ont accordé leur confiance et leur encouragement tout au long de cette recherche.

RÉSUMÉ

La présente étude a porté sur le développement d'un test de létalité algal en microplaque à l'aide de la cytométrie en flux. Nos efforts ont permis de combler une lacune parmi les bioessais existants. Ce test de létalité permettra de préciser d'avantage le potentiel toxique d'échantillons liquides afin de mieux appréhender les répercussions environnementales de substances pouvant entraîner des effets délétères sur la communauté phytoplanctonique. La micro-algue *Selenastrum capricornutum* a été retenue comme indicateur biologique au cours de ces essais.

La première phase de cette recherche est orientée vers le choix de marqueurs de viabilité. Des tests cytométriques sur le carboxy-diacétate de fluorescéine (C-FDA), le diacétate de fluorescéine (FDA) et l'autofluorescence chlorophyllienne ont permis de sélectionner deux marqueurs fiables pour révéler la viabilité cellulaire. À la lumière des résultats obtenus, suite à des déterminations de cinétiques enzymatiques effectuées avec les deux fluorochromes à différentes concentrations, notre choix s'est porté sur le FDA à une concentration de 5 μM . Les tests ont également permis de conclure que l'emploi combiné du FDA (5 μM) et de l'autofluorescence chlorophyllienne s'avère plus fiable pour détecter la viabilité cellulaire que le seul emploi du FDA.

Afin de confirmer la valeur des résultats de mortalité algale obtenus par les lectures cytométriques, plusieurs tests furent réalisés. Premièrement, le patron cytophographique séparant les cellules mortes des cellules vivantes rapporté par le cytomètre a été validé à l'aide de tests de croissance en milieu solide et en milieu liquide. Deuxièmement, l'observation visuelle par microscopie à fluorescence a constitué une autre preuve des réponses cytométriques.

Des tests de toxicité pour étudier l'efficacité de notre approche ont été réalisés avec deux toxiques de référence: le sulfate de cuivre et le chlorure de mercure. Les déterminations paramétriques retenues pour l'évaluation toxicologique de ces contaminants ont été la CI_{50} et la CL_{50} . La comparaison de celles-ci aura permis d'évaluer les concentrations spécifiques de chaque produit à engendrer des effets algostatiques ou algicides. Les résultats obtenus indiquent que le mercure (CI_{50} : 0.008 mg/L et CL_{50} : 0.021 mg/L) présente une plus grande toxicité pour l'algue *Selenastrum capricornutum* que la cuivre (CI_{50} : 0.025 mg/L et CL_{50} : 0.042 mg/L).

De plus, cinq herbicides (atrazine, cyanazine, 2,4-D, métolachlore et diquat dibromide), parmi la liste des herbicides jugés prioritaires au Québec, ont également fait l'objet d'une évaluation algicidale et algistatique. Les résultats démontrent que les triazines et le diquat dibromide présentent un potentiel toxique plus élevé par rapport aux autres herbicides testés pour l'algue *Selenastrum capricornutum*. Les CI_{50} obtenues pour la cyanazine, l'atrazine et le diquat dibromide sont respectivement de 0.059 mg/L, 0.026 mg/L et 0.009 mg/L. Les paramètres de létalité pour ces mêmes herbicides sont : 0.146 mg/L pour la cyanazine, 0.026 mg/L pour l'atrazine et 0.072 mg/L pour le diquat dibromide. Le métolachlore (CI_{50} : 0.069 mg/L et CL_{50} : 0.232 mg/L) et le 2,4-D (CI_{50} : 24.16 mg/L et CL_{50} : 33.37 mg/L) représentent les herbicides les moins toxiques de la présente étude.

La procédure cytométrique s'est avérée précise à démarquer la viabilité et la mortalité cellulaire. De plus, elle s'est montrée sensible pour détecter l'atteinte précoce sur le système chlorophyllien.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
REMERCIEMENT.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	xvi
1.0-INTRODUCTION et PROBLÉMATIQUE	
1.1-Importance du phytoplancton dans l'écosystème aquatique.....	1
1.2-Les polluants et le phytoplancton.....	2
1.2.1-Effet des contaminants sur le phytoplancton.....	2
1.2.2-Généralité quant aux effets des contaminants sur les micro-algues.....	4
1.3-Les biotests algaux.....	5
1.3.1-Historique et principes généraux des biotests avec micro-algues.....	5
1.3.2-Limite des biotests algaux.....	8
1.4-La cytométrie en flux.....	11
1.4.1-La cytométrie en flux, technique de pointe en écotoxicologie.....	11
1.4.2-Certaines application dans le domaine des sciences aquatiques.....	13
1.5-Objectifs de la recherche.....	16
1.5.1-Le diacétate de fluorescéine, le carboxy-diacétate de fluorescéine et l'autofluorescence chlorophyllienne, marqueurs de viabilité.....	17
1.5.2-L'estimation de l'inhibition de croissance et de la léthalité chez les algues.....	19
2.0- MATÉRIEL ET MÉTHODES	
2.1-Matériel biologique et entretien des cultures.....	20
2.1.1-Matériel biologique.....	20

2.1.2-Entretien des cultures.....	20
2.2-Considérations techniques du cytomètre.....	22
2.2.1-Système optique.....	23
2.2.2-Ecoulement des fluides.....	25
2.3-Cinétique enzymatique du FDA et du C-FDA.....	27
2.4-Sélection d'une concentration optimale de FDA.....	29
2.5-Procédure de létalité algale par cytométrie en flux.....	30
2.5.1-Validation du fenêtrage des populations.....	32
2.5.1.1- Tests en milieu liquide.....	32
2.5.1.2- Tests en milieu solide.....	34
2.6-Biotest algaux d'inhibition de croissance (CI ₅₀) et de létalité (CL ₅₀).....	34
2.6.1-Principe du test d'inhibition.....	37
2.6.2-Principe du test de létalité.....	37
2.7-Produits retenus pour les tests.....	40
2.8-Analyses statistiques des résultats.....	41
2.8.1-Évaluation de l'activité estérasiqque des fluorochromes	41
2.8.2-Estimation de l'activité estérasiqque.....	44
2.8.3-Évaluation de l'autofluorescence.....	45
2.8.4-Estimation des CI ₅₀ et CL ₅₀	46
3.0-RÉSULTATS ET DISCUSSION	
3.1-Quelques rappels sur la cinétique enzymatique du FDA et du C-FDA.....	48
3.2-Validation du test de létalité algale.....	66
3.2.1-Mise en évidence de la mortalité cellulaire par des tests en milieu liquide.....	66
3.2.1.1-Tests préliminaires sur la mortalité après traitement des algues aux micro-ondes.....	66
3.2.1.2-Tests en milieu liquide et solide suite à une incubation de 96 h.....	75
3.3-Évaluation de la CL ₅₀ du sulfate de cuivre et du chlorure de mercure par cytométrie en flux.....	83
3.4-Phytotoxicité des herbicides.....	98

3.3-Évaluation de la CL ₅₀ du sulfate de cuivre et du chlorure de mercure par cytométrie en flux.....	83
3.4-Phytotoxicité des herbicides.....	98
3.4.1-2,4-D.....	98
3.4.2-Diquat dibromide.....	107
3.4.3-Métolachlore.....	112
3.4.4-Atrazine.....	118
3.4.5-Cyanazine.....	126
3.4.6-Conclusion et recommandations sur les herbicides	132
3.5-Évaluation de la toxicité en considérant les effets létaux et sublétaux.....	132
CONCLUSION.....	137
RÉFÉRENCES.....	141
ANNEXE.....	152

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I.	Liste du matériel et des produits utilisés pour l'expérimentation..... 42
Tableau II.	Liste des toxiques utilisés pour les tests algaux de létalité et d'inhibition de croissance.....43
Tableau III.	Tests de comparaisons multiples effectués sur les pentes des droites de régression des cinétiques estérasiques obtenues pour le FDA et le C-FDA lors de la première expérimentation (fig. 8)..... 52
Tableau IV.	Tests de comparaisons multiples effectués sur les pentes des droites de régression des cinétiques estérasiques obtenues pour le FDA et le C-FDA lors de la deuxième expérimentation (fig. 9)..... 53
Tableau V.	Tests de Tukey ($p < 0.05$) effectué sur l'autofluorescence verte (530 nm) chez le témoin à 1 % d'acétone..... 55
Tableau VI.	Test de Student ($p < 0.05$) effectué sur les pentes des droites des régressions des cinétiques estérasiques évaluées pour le FDA et le C-FDA à 17,73 μM 56
Tableau VII.	Tests de Tukey ($p < 0.05$) effectué sur l'autofluorescence verte (530 nm) chez le témoin à 0.05 % et 0.01 % d'acétone..... 60
Tableau VIII.	Pourcentages de mortalité obtenus pour chaque concentration de cuivre testée. L'activité estérasique a été évaluée avec 1 μM de FDA..... 63
Tableau IX.	Analyse de Tukey ($p < 0.05$) effectuée sur la fluorescence à 530 nm du FDA 1 μM en fonction du temps d'incubation pour les témoins des expériences avec le sulfate de cuivre et le chlorure de mercure..... 64

Tableau X.	Évaluation de la fluorescence à 530 nm après incubation au FDA pour la population témoin et les groupes traités aux micro-ondes.....	68
Tableau XI.	Tests de Mann-Withney ($p < 0.05$) pour l'évaluation de la fluorescence à 530 nm chez les groupes témoins et traités aux micro-ondes avant et après incubation au FDA.....	69
Tableau XII.	Évaluation de l'autofluorescence à 530 nm (spectre vert) et à 650 nm (spectre rouge, chlorophylle).....	71
Tableau XIII.	Évaluation de la fluorescence à 530 nm après incubation au FDA pour le groupe traité aux micro-ondes 60 s au jour 0 et au jour 4.....	77
Tableau XIV.	Estimation de la fluorescence à 530 nm avant et après incubation au FDA pour les groupes témoin et traités aux micro-ondes 60 s au jour 0 et au jour 4.....	78
Tableau XV.	Évaluation de l'intensité relative de fluorescence liée à la chlorophylle (650 nm) par des tests de Mann-Withney ($p < 0.05$) pour le témoin et le groupe traité aux micro-ondes 60 s au jour 0 et au jour 4 ($n=3$).....	81
Tableau XVI.	Pourcentages d'inhibition de croissance obtenus après l'exposition de 96 h des algues en présence de cuivre.....	86
Tableau XVII.	Pourcentages d'inhibition de croissance obtenus après l'exposition de 96 h des algues en présence de mercure.....	87
Tableau XVIII.	Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1 pour l'expérimentation avec le cuivre.....	91
Tableau XIX.	Évaluation de l'augmentation de l'autofluorescence à 530 nm par un test de Tukey ($p < 0.05$) chez les populations cellulaires localisées dans la fenêtre 1 et 2 lors des expérimentations avec le sulfate de cuivre.....	92

Tableau XX.	Pourcentages de mortalité obtenus chez <i>Selenastrum capricornutum</i> après une exposition de 96 h au cuivre.....	93
Tableau XXI.	Évaluation de l'activité estérasiqque (fluorescence à 530 nm) pour la population située dans la fenêtre 2 par des tests de Student ($p < 0.05$).....	95
Tableau XXII.	Comparaison de l'autofluorescence de la chlorophylle (650 nm) de la population située dans la fenêtre 1 (1) à celle située dans la fenêtre 2 (2) par des tests de Student ($p < 0.05$) pour les différentes concentrations de mercure.....	96
Tableau XXIII.	Pourcentages de mortalité obtenus chez <i>Selenastrum capricornutum</i> après une exposition de 96 h au mercure.....	97
Tableau XXIV.	Pourcentages de viabilité obtenus une exposition de 96 h des cellules algales à 0.9 % d'acétone.....	100
Tableau XXV.	Pourcentages de mortalité de l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> après une exposition de 96 h à l'herbicide 2,4-D.....	101
Tableau XXVI.	Pourcentages d'inhibition de croissance chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> après une exposition de 96 h à l'herbicide 2,4-D	102
Tableau XXVII.	Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1 par des tests de Student ou Student modifié (lors d'une inégalité des variances). Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.005$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le 2,4-D.....	104

Tableau XXVIII.	Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 2 par des tests de Student ou Student modifié (lors d'une inégalité des variances). Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.005$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le 2,4-D.....	105
Tableau XXIX.	Évaluation de l'intensité de l'autofluorescence chlorophyllienne (spectre rouge à 650 nm) des populations situées dans la fenêtre 1 et 2 par des tests de Student. Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.005$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le 2,4-D.....	106
Tableau XXX.	Pourcentages d'inhibition de croissance de l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> après une exposition de 96 h à l'herbicide diquat dibromide.....	108
Tableau XXXI.	Pourcentages de mortalité de l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> après une exposition de 96 h à l'herbicide diquat dibromide	109
Tableau XXXII.	Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1 par des tests de Student ou Student modifié (lors d'une inégalité des variances). Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.005$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le diquat.....	110
Tableau XXXIII.	Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 2 par des tests de Student. Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.005$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le diquat.....	111
Tableau XXXIV.	Pourcentages d'inhibition de croissance chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> après une exposition de 96 h à l'herbicide métolachlore.....	114
Tableau XXXV.	Pourcentages de mortalité chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> après une exposition de 96 h à l'herbicide métolachlore.....	115

Tableau XXXVI.	Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1 par des tests de Student. Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.005$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le métolachlore.....	116
Tableau XXVII.	Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 2 par des tests de Student. Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.005$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le métolachlore.....	117
Tableau XXXVIII.	Pourcentages d'inhibition de croissance chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> après une exposition de 96 h à l'atrazine.....	120
Tableau XXXIX.	Pourcentages de mortalité chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> après une exposition de 96 h à l'atrazine.....	121
Tableau LX.	Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1 par des tests de Student. Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.005$) effectués sur les données de l'expérimentation avec l'atrazine.....	124
Tableau LXI.	Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 2 par des tests de Student. Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.005$) effectués sur les données de l'expérimentation avec l'atrazine.....	125
Tableau LXII.	Pourcentages d'inhibition de croissance chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> après une exposition de 96 h à la cyanazine.....	128
Tableau LXIII.	Pourcentages de mortalité chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> après une exposition de 96 h à la cyanazine.....	129

Tableau LXIV.	Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre par des tests de Student et Student modifié (lors d'une inégalité des variances). Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.005$) effectués sur les données de l'expérimentation avec la cyanazine.....	130
Tableau LXV.	Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 2 par des tests de Student. Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.005$) effectués sur les données de l'expérimentation avec la cyanazine.....	131
Tableau LXVI.	Comparaison des résultats des CL50 avec celles obtenues par St-Laurent (1992).....	133
Tableau LXVII.	Réponse de l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> aux différents produits chimiques étudiés considérant la létalité (L), la sublétalité (S) et le rapport L/S.....	136

TABLEAUX À L'ANNEXE

Tableau AI.	Analyse de comparaisons multiples (Tukey, $p \leq 0,05$, $n=3$) sur la fluorescence à 530 nm (spectre vert) suite à l'incubation des cellules avec 1 μM de FDA.....	153
Tableau AII.	Analyse de comparaisons multiples (Tukey, $p \leq 0,05$, $n=3$) sur la fluorescence à 530 nm (spectre vert) suite à l'incubation des cellules avec 5 μM de FDA.....	154
Tableau AIII.	Analyse de comparaisons multiples (Tukey, $p \leq 0,05$, $n=3$) sur la fluorescence à 530 nm (spectre vert) suite à l'incubation des cellules avec 10 μM de FDA.....	155

Tableau AIV.	Analyse de comparaisons multiples (Tukey, $p \leq 0,05$, $n=3$) sur la fluorescence à 530 nm (spectre vert) suite à l'incubation des cellules avec 24 μM de FDA.....	156
Tableau AV.	Analyse de comparaisons multiples (Tukey, $p \leq 0,05$, $n=3$) sur la fluorescence à 530 nm (spectre vert) suite à l'incubation des cellules avec 17,73 μM de C-FDA.....	157
Tableau AVI.	Analyse de comparaisons multiples (Tukey, $p \leq 0,05$, $n=3$) sur l'autofluorescence à 530 nm (spectre vert) du témoin à 1 % d'acétone.....	158
Tableau AVII.	Tableau d'analyse de covariance: comparaison des droites de régressions des cinétiques estérasiques du FDA et du C-FDA pour la première expérience.....	159
Tableau AVIII.	Tableau d'analyse de covariance: comparaison des droites de régressions des cinétiques estérasiques du FDA et du C-FDA pour la deuxième expérience.....	160
Tableau AIX.	Tableau des valeurs de fluorescence à 530 nm (spectre vert) obtenues avant et après incubation au FDA pour les groupes de cellules exposés aux micro-ondes (M.O.) à différents temps.....	161
Tableau AX.	Fluorescence à 530 nm (spectre vert) observée pour le groupe exposé aux micro-ondes (M.O.) pendant 60 secondes et le groupe témoin. Le tableau donne les résultats des fluorescences obtenues suite à l'incubation au FDA et avant et après centrifugation au jour 0 et au jour 4.....	162

Tableau AXI.	Résultats de la fluorescence à 530 nm (spectre vert) observés pour le groupe exposé aux micro-ondes (M.O.) pendant 60 s et le groupe témoin. Le tableau donne les résultats des fluorescences obtenues avant et après incubation au FDA pour le jour 0 et le jour 4.....	163
Tableau AXII.	Tableau représentant les pourcentages de viabilité obtenus lors du test de létalité algale sur le Cu^{2+}	164
Tableau AXIII.	Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le sulfate de cuivre.....	165
Tableau AXIV.	Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le chlorure de mercure.....	168
Tableau AXV.	Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le 2,4-D.....	171
Tableau AXVI.	Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le diquat dibromide.....	173
Tableau AXVII.	Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le métolachlore.....	175
Tableau AXVIII.	Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec l'atrazine.....	177
Tableau AXIX.	Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec la cyanazine.....	180

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1. Système optique du cytomètre, modèle FACScan.....	24
Figure 2. Cytogrammes des patrons cellulaires de l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> en fonction de paramètres expérimentaux spécifiques.....	26
Figure 3. Protocole d'évaluation des cinétiques estérasiqes du FDA et du C-FDA chez l'algue <i>S. capricornutum</i>	28
Figure 4. Exemple de cytogrammes de la fluorescence verte liée à l'hydrolyse du FDA en fonction de la fluorescence rouge chlorophyllienne.....	31
Figure 5. Protocole pour évaluer la viabilité: test en milieu liquide.....	33
Figure 6. Protocole pour évaluer la viabilité: test en milieu solide.....	35
Figure 7. Configuration de la microplaque.....	36
Figure 8. Protocole de létalité algale utilisant la cytométrie en flux.....	38
Figure 9. Courbes de cinétiques enzymatiques de la fluorescence en fonction du temps (1ière exp.).....	50
Figure 10. Courbes de cinétiques enzymatiques de la fluorescence en fonction du temps (2ième exp.).....	51
Figure 11. Histogramme des courbes de fluorescence à 530 nm obtenues lors des incubations au FDA et au C-FDA.....	58
Figure 12. Histogramme de la fluorescence à 530 nm émise après une incubation de 30 min avec 1 μ M de FDA chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i>	61

Figure 13. Histogrammes de la fluorescence à 530 nm émise après une incubation de 30 min avec 5 μ M de FDA chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i>	65
Figure 14. Cytogrammes illustrant les populations des cellules viables et mortes au jour 0.....	73
Figure 15. Histogramme de la fluorescence à 530 nm de la population témoin et traité aux micro-ondes après incubation au FDA.....	74
Figure 16. Cytogramme de la population traitée aux micro-ondes après 96 h d'incubation dans le milieu nutritif AAP 1X.....	80
Figure 17. Histogrammes de la fluorescence chlorophyllienne de la population témoin et traitée aux micro-ondes après 96 h d'incubation dans un milieu nutritif AAP 1X.....	82
Figure 18. Courbe dose-réponse du test d'inhibition de croissance après une incubation de 96 h des algues en présence du cuivre.....	84
Figure 19. Courbe dose-réponse du test d'inhibition de croissance après une incubation de 96 h des algues au mercure.....	85
Figure 20. Pourcentage de viabilité de cellules algales après une exposition de 96 h au cuivre.....	89
Figure 21. Mode d'action de l'atrazine dans la chaîne d'électrons du photosystème.....	119
Figure 22. Comparaison des CL ₅₀ obtenues pour les herbicides lors des tests de létalité avec l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i>	134

CHAPITRE I

1.0- INTRODUCTION et PROBLÉMATIQUE

1.1- Importance du phytoplancton dans l'écosystème aquatique

Le phytoplancton, dans l'écosystème aquatique, constitue la principale composante autotrophe du plancton. Il se compose de plusieurs espèces algales formant des associations particulières selon les propriétés physico-chimiques du milieu. Les algues ne possédant pas ou très peu de pouvoir de locomotion se retrouvent en suspension dans l'eau et sont sujettes à la dispersion par turbulence ou autres mouvements de l'eau (Wetzel, 1983).

Le fonctionnement de l'écosystème aquatique est basé sur la fixation de l'énergie solaire par la photosynthèse permettant la production de composés organiques (Smith, 1980). Par leur capacité photosynthétique, les algues constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire. Elles jouent un rôle important dans les cycles des substances organiques et inorganiques. Leurs fonctions dans les écosystèmes dépendent de la dynamique des populations: cette dernière résulte de la variabilité saisonnière des températures, de l'intensité des radiations solaires, des concentrations d'éléments nutritifs dans l'eau et du broutage par les animaux (Walsh et Merrill, 1984). Les algues sont donc considérées comme les piliers de l'organisation du biote aquatique supportant le développement de la biomasse des niveaux trophiques supérieurs.

1.2- Les polluants et le phytoplancton

1.2.1- Effets des contaminants sur le phytoplancton

Les altérations naturelles et anthropogéniques peuvent bouleverser les différentes fonctions du phytoplancton. Celles-ci sont susceptibles de provoquer des changements dans la composition des espèces de la communauté, augmenter ou diminuer le niveau de productivité primaire, et perturber les niveaux d'organisation de l'écosystème.

Les problèmes anthropogéniques engendrant l'eutrophisation des lacs et des cours d'eau ont été parmi les premières grandes préoccupations des scientifiques qui étudieront les dommages causés au système aquatique. Le phosphore, les nitrates et le carbone retrouvés à de fortes concentrations sont les éléments principaux favorisant l'eutrophisation (Wetzel, 1983). L'eutrophisation soutenant la croissance algale provoquera des changements au niveau de la structure de la communauté phytoplanctonique (Reynolds, 1987). Conséquemment, ces changements altéreront la composition des nutriments imposant une réorganisation dans la composition des espèces situées à des niveaux trophiques supérieurs (Boyle, 1984). Keighan (1977), Chiaudani et Vighi (1974), Vollenweider (1966), sont parmi ceux ayant étudié les phénomènes d'eutrophisation et leurs conséquences sur l'écosystème aquatique.

Déjà, en 1971, le US EPA (United State Environmental Protection Agency) proposait deux protocoles permettant de caractériser le niveau d'enrichissement des eaux en substances nutritives. L'un de ces protocoles évalue le potentiel de fertilité (mesure de biomasse algale après incubation de 21 jours en présence d'échantillons d'eau). L'autre permet d'évaluer lequel de l'azote ou du phosphore constitue le facteur contrôlant la croissance algale. Au Québec, une première étude sur la caractérisation de la qualité des eaux du fleuve Saint-Laurent a été réalisée par Keighan

et al. (1977); on y évaluait la toxicité et le potentiel de fertilité d'échantillons d'eau à l'aide du test biologique algal développé par le US EPA en 1971.

En plus des problèmes liés à l'eutrophisation, la contamination de l'écosystème aquatique par les métaux lourds est aussi l'objet de nombreuses études. Déjà en 1935, en Grande Bretagne, Reese publiait un article sur les problèmes rencontrés dans deux rivières (Rheidol et Melindwr) drainant des territoires où étaient exploités des mines de plomb (Reese, 1937). Il observa une différence significative au niveau de la flore algale en comparant les espèces algales situées en amont et en aval de ces mines. Un peu plus tard, Hynes (1960), nota l'impact de la pollution du cuivre au niveau des associations entre les espèces algales et leurs proportions respectives en amont et en aval de rejets d'une raffinerie de cuivre dans la rivière Churnet, un tributaire de la rivière Dove (Grande Bretagne). Cette étude est considérée comme un exemple classique des effets directs d'un toxique affectant la communauté phytoplanctonique. Depuis, les recherches sur les effets des métaux lourds sur la communauté phytoplanctonique abondent dans la littérature. Dans une excellente revue sur ce problème, Rai *et al.* (1981), par exemple, ont présenté les effets de plusieurs métaux lourds sur le métabolisme algal, les mécanismes de tolérance, la prise en charge et la bioaccumulation ainsi que les facteurs environnementaux affectant la toxicité des métaux.

Les effets des contaminants organiques et des mélanges complexes de contaminants (effluents industriels) sur le phytoplancton ont également fait l'objet de nombreuses recherches. En 1973, Aronson évaluait les effets aigus de plusieurs insecticides sur la prise en charge du ^{14}C chez plusieurs espèces phytoplanctoniques. En 1975, Greene *et al.*, utilisaient des tests algaux pour évaluer l'impact des rejets municipaux, industriels et agricoles sur la production phytoplanctonique. Au Québec, en 1981, Joubert effectua une étude comparative des réactions à la toxicité d'effluents provenant de différentes sources chez plusieurs organismes

aquatiques dont les algues *Selenastrum capricornutum* et *Chlamydomonas variabilis*.

Par le rôle spécifique et l'importance capitale que joue le phytoplancton dans l'écosystème aquatique, les micro-algues, en particulier, ont été rapidement considérées comme de bons indicateurs pour évaluer les perturbations engendrées par des substances polluantes dans l'environnement aquatique.

1.2.2- Généralités quant aux effets des contaminants sur les micro-algues

Les contaminants pénètrent les cellules phytoplanctoniques en traversant la paroi et la membrane cellulaire. L'entrée des polluants se fait par transport passif (ne requérant pas d'énergie) ou par transport actif (requérant de l'énergie). Certains contaminants agissent au niveau du cycle cellulaire et ont pour effet de diminuer ou d'augmenter la croissance algale (Jeanne, 1979; Howell *et al*, 1975). Signalons que l'osmorégulation est affectée par des contaminants tels les détergents perturbant la membrane cellulaire et diminuant ainsi le volume cellulaire. Des effets au niveau du métabolisme (photosynthèse, respiration, synthèse protéique, etc), du potentiel génétique et de la reproduction sont également observés (Boudou et Ribeyre, 1989).

À l'intérieur de la cellule, le devenir des contaminants varie selon les caractéristiques physico-chimiques du milieu intracellulaire et du contaminant: ils peuvent être biotransformés permettant ainsi leur élimination par excrétion, leur bioaccumulation ou leur bioactivation (Boudou et Ribeyre, 1989).

La bioaccumulation algale diminue la possibilité du contaminant et présente un avantage vis-à-vis des autres organismes du milieu comme les poissons et les invertébrés. Ainsi, l'impact toxique des polluants est

diminué, du moins temporairement. Cependant, leur persistance à l'intérieur des algues peut jouer un rôle important dans le transfert des contaminants à travers la chaîne alimentaire (Boyle, 1984).

La réponse algale vis à vis des agressions toxiques varie d'une espèce à l'autre (Blank *et al.*, 1984). Cette variation de la sensibilité est utilisée comme indicateur de stress chez le phytoplancton (Reynolds, 1987). En 1987, Hosmani étudia l'effet de la pollution organique sur la diversité algale en milieu naturel. Il calcula un indice de diversité et démontra que celui-ci diminuait aux endroits les plus pollués et augmentait avec l'éloignement de la source de pollution. La présence de toxiques provoquant des effets létaux ou sublétaux favorise le développement d'une espèce au détriment d'une autre. Il est donc apparu important de trouver des outils permettant de mesurer ces effets adverses dans le but de mieux en comprendre les répercussions encourues par le phytoplancton dans l'écosystème aquatique.

1.3- Les biotests algaux

1.3.1- Historique et principes généraux des biotests avec micro-algues

La détérioration de la qualité de l'eau induite par des produits toxiques ou des substances stimulant la croissance algale provenant des activités anthropogéniques est une problématique de premier ordre. Les premières études entreprises pour évaluer le degré de contamination de l'écosystème aquatique utilisaient surtout des paramètres chimiques (conductivité, oxygène dissous...) et physiques (pH, température, turbidité...). Dans le cadre d'une politique de caractérisation de la ressource, ces paramètres, bien qu'importants, s'avèrent nettement insuffisants. Il est donc apparu impératif de se préoccuper également des effets sur les organismes du milieu.

Les bioessais effectués en laboratoire, où les différents paramètres chimiques et physiques du milieu sont contrôlés, offrent des techniques avantageuses pour vérifier la toxicité spécifiques des produits chimiques (Keighan, 1977). De plus, ils permettent une souplesse dans l'expérimentation et l'observation séparée ou simultanée de plusieurs niveaux trophiques. L'évaluation des substances chimiques spécifiques ou d'effluents industriels à l'aide de bioessais peut orienter les politiques environnementales de prévention afin de contribuer à amoindrir les risques environnementaux liés à la pollution (Blaise et al., 1984).

Parmi les bioessais, les microbiotests ont reçu une attention particulière. Ces derniers, s'effectuent à l'aide d'organismes unicellulaires ou de petits organismes pluricellulaires exposés à différentes concentrations d'échantillons liquides toxiques. La toxicité est évaluée à partir de la mesure de variables physiologiques ou métaboliques sur les microorganismes exposés. Ces tests sont réalisés à l'aide de bactéries, de protozoaires, de champignons, de moisissures, de micro-algues, et de petits invertébrés tels les rotifères (Blaise, 1991).

Les microbiotests offrent plusieurs avantages (peu coûteux, simples, organismes faciles à maintenir en culture, faible volume d'échantillon requis, reproductibilité, etc). Parmi les microbiotests existants, différents types d'effets sublétaux et létaux peuvent être mesurés.

De nombreux travaux présentés à l'intérieur du symposium international intitulé "Experimental Use of Algal Cultures in Limnology" (Société Internationale de Limnologie, 1978), ont mis en évidence le rôle essentiel des algues dans l'écosystème aquatique et leur potentiel à évaluer les répercussions environnementales dues aux toxiques ou substances nutritives. Au niveau international, on constate de plus en plus l'ampleur que prennent les tests algaux dans des programmes de contrôle de qualité des eaux. Depuis, le phytoplancton est devenu un indicateur

biologique sensible pour détecter la présence de substances toxiques ou nutritives (Couture *et al.*, 1981). De plus, il présente des caractéristiques intéressantes pour des tests en laboratoire: cycle biologique de courte durée, bioaccumule, culture et manipulation simples. Les algues unicellulaires utilisées pour les essais biologiques sont représentées essentiellement par les Chlorophycées, les Diatomées et quelques Cyanophycées (Jouany, 1981).

En 1978, Miller *et al.*, développèrent un modèle simple permettant de calculer le potentiel de fertilité d'un échantillon d'eau à partir de ses teneurs en phosphore ou en azote. L'algue utilisée pour effectuer ces tests était *S. capricornutum*. C'est une algue verte (chlorophycée) unicellulaire isolée, en 1959, de la rivière Nitelva, dans la région d'Akershus en Norvège par l'Institut Norvégien pour la recherche en eau. C'est une algue ubiquitaire qui s'adapte facilement à diverses conditions environnementales. Elle ne possède pas d'appareil de locomotion (cils, flagelles) et adopte une morphologie en croissant de lune (Miller *et al.*, 1978). Ses dimensions particulières (7,52 μm de longueur par 2,1 μm de largeur) lui confèrent un volume cellulaire moyen de 71,8 μm^3 (Gonçalves *et al.*, 1988).

Au Québec, Joubert utilisa cette espèce pour déterminer l'effet inhibiteur d'effluents industriels (Joubert, 1980). Par ailleurs, de nombreuses études ont été menées à l'aide de micro-algues pour évaluer l'impact des métaux lourds (Christensen *et al.*, 1988; Rai *et al.*, 1981; Chiaudani et Vighi 1978), des rejets industriels (van Coillie *et al.*, 1982; Couture *et al.*, 1981; Joubert *et al.*, 1980), des pesticides (St-Laurent *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1990; Caux et Forrest, 1989). Signalons, que Couture *et al.* (1985) ont revu et discuté de la signification des divers applications de la procédure des bioessais avec micro-algues lorsqu'appliquée à l'intérieur du réseau de surveillance de la qualité de l'eau. Présentement, le test d'inhibition de croissance algale est

recommandé sur le plan international par l'Organisation pour la Coopération Économique et le Développement (OCDE) pour l'évaluation écotoxicologique (Nyholm, 1989).

Dans le but d'alléger la technique, un protocole miniaturisé réalisé en microplaque et pouvant se substituer au test en erlenmeyers fut développé (Blaise *et al.*, 1986). L'utilisation des microplaques comprend plusieurs avantages: rapidité d'exécution, meilleure rentabilité, économie d'espace par rapport à la technique en erlenmeyers et potentiel d'automatisation. Depuis la validation de cette technique (Thellen *et al.*, 1989), l'utilisation des microplaques pour effectuer des tests d'inhibition de croissance se popularise. Les travaux présentés dans ce mémoire s'inspirent de la technique en microplaque utilisant la micro-algue *S. capricornutum*.

1.3.2- Limite des biotests algaux

Depuis le milieu des années 1970, on assiste à une augmentation du nombre d'études évaluant les effets de stress environnementaux sur le phytoplancton. Celles-ci traitent des atteintes toxiques sublétales. Ces tests mesurent des paramètres comme l'inhibition de croissance, la charge énergétique en adénylates, et la fluorescence chlorophyllienne.

Malgré de nombreux efforts, il demeure difficile d'utiliser en routine un test algal qui renseigne sur les atteintes toxiques létales. L'emploi de colorants a été préconisé pour distinguer entre la viabilité et la mortalité cellulaire. Le bleu d'Evans et le rouge neutre ont été parmi les premiers colorants testés sur le phytoplancton (Dressel *et al.*, 1972; Gaff et Okong'O-Ogola, 1971). Le bleu d'Evans, défini comme un colorant non fluorescent d'exclusion, est utilisé surtout dans les analyses conventionnelles par microscopie ou par spectrophotométrie. Les cellules viables, non endommagées, ont la capacité d'exclure le bleu d'Evans, tandis que les

cellules mortes ou endommagées y sont perméables (Combrier *et al.*, 1988).

Le rouge neutre est défini comme un colorant non fluorescent supravital (ne se fixe que dans les cellules viables). L'absorption du colorant est fonction de la perméabilité normale ou modifiée de la cellule. Les cellules viables, dont la membrane cellulaire est intacte, seront colorées par le rouge neutre. L'incorporation du rouge neutre se fait passivement ou activement à travers la membrane sous forme non ionisée. Dans la cellule, il est protonné et piégé à l'intérieur des lysosomes. Le rouge neutre colore certains organites tels les mitochondries (Combrier *et al.*, 1988). Ces colorants sont encore utilisés pour discriminer entre la viabilité et la mortalité cellulaire (Alexander et Wilkinson, 1987; Walsh, 1983; Taylor et West, 1980).

Il existe cependant plusieurs désavantages à les utiliser. Premièrement, les dénombrements pour estimer les cellules viables et mortes sont effectués par microscopie. Les observations microscopiques sont laborieuses et ne permettent pas d'observer un grand nombre de cellules, limitant ainsi le traitement statistique. Deuxièmement, les concentrations optimales de colorant employées et le temps d'incubation nécessaire pour la coloration changent d'un type cellulaire à l'autre. De plus, le rouge neutre devient parfois toxique et tue des cellules chez certaines espèces algales avant la fin de la période de coloration (Crippen et Perrier, 1974). La coloration au bleu d'Evans est aussi problématique que la coloration au rouge neutre. En effet, le bleu d'Evans a un patron de coloration plus spécifique pour certaines espèces. Il présente donc une grande variabilité dans la coloration de certaines espèces (Alexander et Wilkinson, 1987). Il est également cytotoxique. L'établissement d'une procédure universelle estimant la viabilité et/ou la mortalité pour toutes les espèces phytoplanctoniques en utilisant le rouge neutre et le bleu d'Evans comme colorants cellulaires apparaît donc problématique.

Trevors *et al.* (1983) utilisèrent un autre indicateur de viabilité. L'INT-formazan (2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyltetrazolium chloride), fut utilisé pour déterminer la respiration algale. La respiration étant directement associée à l'activité cellulaire, la mesure de l'activité enzymatique de la déhydrogénase en révèle donc le niveau. Cette activité enzymatique fut estimée à l'aide de l'INT-formazan qui permet de mesurer l'activité du système de transport des électrons (ETS) directement relié au potentiel respiratoire. Cette procédure révélant l'activité ETS fut utilisée pour évaluer le pourcentage de cellules viables d'une population. La viabilité cellulaire s'estime microscopiquement à l'aide d'un hématimètre. Les cellules viables présentent un dépôt intracellulaire d'INT-formazan directement observable par microscopie. Le temps d'incubation des cellules et de l'INT-formazan (deux heures) ainsi que l'observation microscopique subséquente limitent le nombre d'échantillons évaluer par jour.

Les techniques employées jusqu'à présent pour révéler la viabilité et/ou la mortalité cellulaire se font par l'observation microscopique. Celle-ci est souvent fastidieuse et subjective. Il était donc important de mettre au point une technique fiable, quantitative et rapide pour évaluer la létalité algale. Les techniques cytométriques permettent entre autre d'éliminer les éléments de subjectivité dans les cas de coloration faible.

Les techniques cytométriques ont été employées dans quelques études afin d'évaluer la viabilité cellulaire algale. Gala et Giesy (1990; Dorsey *et al.*, (1989) et Berglund et Eversman (1988), employèrent le diacétate de fluorescéine (FDA) afin d'évaluer l'état physiologique des algues et la viabilité cellulaire. Ils conclurent que la cytométrie en flux, associée à l'emploi d'un fluorochrome tel que le diacétate de fluorescéine, permettait de mettre en évidence la viabilité cellulaire chez des cellules algales (voir section 1.5).

1.4- La cytométrie en flux

1.4.1- La cytométrie en flux, technique de pointe en écotoxicologie

La microscopie a permis nombre d'études cellulaires pour approfondir les connaissances morphologiques, structurales et parfois physiologiques. Cependant, l'analyse microscopique s'avère insuffisante. La sensibilité et la capacité de quantification de la cytométrie présentent plusieurs avantages sur le mode conventionnel d'analyse cellulaire par microscopie. L'échelle d'intensité de la microscopie conventionnelle, par exemple, classe les échantillons en colorations négatives, faibles, moyennes ou fortes laissant l'expérimentateur à une évaluation subjective. Par contre, la cytométrie en flux permet une échelle de classification d'intensité nettement plus continue et est capable de détecter des signaux beaucoup plus faibles (Muirhead *et al.*, 1985).

L'analyse individuelle des cellules est essentielle pour comprendre les effets responsables d'altérations des fonctions et des mécanismes des cellules. La cytométrie en flux, comme la microscopie conventionnelle, permet l'étude précise de cellules isolées. Elle informe également de la présence d'une ou de plusieurs sous-populations. Ainsi, l'analyse cytométrique discrimine entre une faible augmentation de l'expression d'un paramètre optique pour l'ensemble des cellules et une augmentation de l'expression de ce même paramètre optique pour une sous-population (Muirhead *et al.*, 1985).

L'emploi de marqueurs cellulaires spécifiques d'un élément, d'un constituant, ou d'une activité enzymatique, se révèle une puissante technique pour le repérage, le dénombrement des différents types cellulaires ou la compréhension des mécanismes d'action, tant en recherche qu'en analyse biomédicale. La cytométrie en flux se situe au carrefour de toutes ces techniques en permettant la quantification de

plusieurs signaux optiques diffusés par chacune des cellules. Elle offre donc la possibilité d'observer les variations et la distribution des propriétés cellulaires au sein d'une population (Métézeau et Delamare, 1988).

La cytométrie en flux se distingue par trois caractéristiques uniques. Premièrement, elle permet l'analyse de plusieurs paramètres à la fois, lesquels peuvent être mesurés et éventuellement corrélés. Deuxièmement, les cellules font l'objet d'un examen individuelle comme en microscopie. Ceci est avantageux pour l'étude de la réponse algale vis-à-vis des toxiques. Présentement, les tests algaux mesurent les effets toxiques sur l'ensemble de la population selon différentes variables (biomasse, niveau de croissance, fluorescence chlorophyllienne totale, etc). Ces mesures représentent la réponse intégrée de toutes les cellules dans un volume d'eau spécifique et ne tient pas compte des réponses individuelles. La cytométrie en flux offre donc une nouvelle approche expérimentale puisque les analyses s'effectuent sur des cellules individuelles. Troisièmement, elle assure la quantification des signaux optiques émis par les cellules. De plus, la rapidité (observation de 10^4 à 10^6 cellules par seconde) avec laquelle elle enregistre les informations permet d'observer un nombre important de cellules, favorisant ainsi la fiabilité des données et des analyses statistiques (Métézeau et Frelat, 1991).

Cependant, il existe quelques désavantages associés à l'emploi de techniques cytométriques pour l'analyse cellulaire comme, par exemple, la préparation de suspensions cellulaires à partir de tissus. Dans ce cas, la dissociation enzymatique ou mécanique conduit parfois à la perte de certains types cellulaires, à la destruction ou modification de marqueurs intéressants et peut même désorganiser le micro-environnement nécessaire au maintien des fonctions cellulaires.

Tel que mentionné, la cytométrie en flux mesure la totalité des émissions de lumière pour chacun des paramètres optiques retenus. En

conséquence, l'information sur la distribution intracellulaire du fluorochrome ou sur les structures capables de diffuser la lumière, et visualisables par microscopie conventionnelle, est perdue. De plus, la cytométrie en flux capte la diffusion lumineuse d'amas cellulaires ou de débris et enregistre faussement ceux-ci comme étant des paramètres optiques diffusés par une cellule, ce que l'observation visuelle par microscopie aurait naturellement éliminée (Muirhead *et al.*, 1985).

Le développement continu de marqueurs de plus en plus spécifiques, tels que les anticorps monoclonaux, les fluorochromes capables de traduire de nombreux mécanismes et propriétés cellulaires, ainsi qu'une plus grande utilisation des propriétés cellulaires intrinsèques (diffusion, autofluorescence) ont amené une extension des activités utilisant la cytométrie en flux (Métézeau et Frelat, 1991). La cytométrie en flux se présente donc comme une technologie de pointe dans tous les domaines de recherche de la biologie cellulaire, de la recherche biomédicale et devient une approche de plus en plus convoitée pour la recherche en sciences aquatiques.

1.4.2- Certaines applications dans le domaine des sciences aquatiques

Ce n'est que vers la fin des années 1970 que la cytométrie en flux a fait ses débuts comme outil de recherche en milieu aquatique. Depuis, plusieurs publications favorisant l'utilisation de techniques cytométriques à l'intérieur de ce cadre de recherche ont vu le jour (Yentsch et Campbell, 1991; Phinney et Cucci, 1989; Premazzi *et al.*, 1989; Cunningham et Leftley, 1986; Forrest, 1984; Yentsch, 1983; Yentsch, 1981). Le cytomètre analysant uniquement des particules en suspension et de petites tailles, soit entre 1 μm et 150 μm , le phytoplancton, composé essentiellement d'organismes unicellulaires, se prête bien aux analyses cytométriques (Yentsch *et al.*, 1986). De plus, le phytoplancton possède des pigments photosynthétiques fluorescents (chlorophylle, caraténoïdes), permettant

l'analyse cytométrique de la fluorescence. Il est simple également d'effectuer une analyse biparamétrique en utilisant l'autofluorescence chlorophyllienne accompagnée de la lecture simultanée d'un autre paramètre optique.

La cytométrie en flux se prête bien aux études de laboratoire. Par exemple, certains travaux ont été réalisés pour évaluer le broutage algal par le zooplancton (Cucci *et al.*, 1989). Premazzi *et al.* (1989) ont utilisé la cytométrie en flux pour connaître l'impact toxique de l'acide nitrilotriacétique (NTA), du cuivre et du cadmium sur plusieurs espèces algales. Ils ont également fait des expériences d'identification d'espèces algales en utilisant les propriétés optiques intrinsèques à chacune, telles que l'autofluorescence ou la diffusion de la lumière à petits angles (FSC: "forward side scatter") qui reflète la taille cellulaire. Déjà en 1978, Price *et al.*, identifiaient et déterminèrent les patrons cellulaires associés à la diffusion de la lumière à petits angles sur trois espèces algales.

En 1988, Berglund et Eversman utilisèrent la cytométrie en flux afin d'évaluer le stress causé par la pollution atmosphérique sur des lichens. Elles mesurèrent l'activité estérasiqne de la composante algale des lichens après séparation des champignons, ainsi que l'intégrité membranaire et le pH intracellulaire à l'aide du diacétate de fluorescéine (FDA). Les résultats démontrèrent que le FDA s'avèrait un bon indicateur pour évaluer les effets que causaient la pollution sur la cellule. La même année, Berglund *et al.* employèrent la cytométrie pour l'évaluation quantitative de l'activité biologique de phytotoxines sur des champignons pathogènes pour les végétaux. L'étude cytométrique permet aussi de mieux connaître les mécanismes d'action des phytotoxines.

Le cycle cellulaire est également étudié chez le phytoplancton à l'aide de la cytométrie en flux. De tels travaux sur le cycle cellulaire de l'algue verte unicellulaire *Euglena gracilis* intoxiquée au cadmium auront

permis de résoudre le mécanisme de résistance de cette algue pour ce métal (Bonaly-Cantarel, 1988).

Par ailleurs, plusieurs recherches sur l'autofluorescence chlorophyllienne ont été menées à l'aide de techniques cytométriques (Xu *et al.*, 1990; Demers *et al.*, 1989; Galbraith *et al.*, 1988). Par exemple, l'autofluorescence sert de traceur pour estimer la prise en charge des algues par les invertébrés (Cucci *et al.*, 1989). Demers *et al.* (1989) utilisèrent l'autofluorescence comme indicateur de l'état physiologique du phytoplancton. Ils trouvèrent une corrélation positive entre le biovolume cellulaire et la fluorescence chlorophyllienne et furent capables d'estimer la croissance relative du phytoplancton dans le milieu naturel. Ils conclurent que la cytométrie en flux s'avérait fiable pour étudier la réponse physiologique du phytoplancton. Dorsey *et al.* (1989) l'utilisèrent pour étudier l'activité métabolique de micro-algues marines. Ils firent des expériences avec le FDA pour mesurer la viabilité, les caractéristiques métaboliques de la membrane cellulaire et l'effet de la chaleur sur l'accumulation de fluorescéine.

L'étude de l'autofluorescence des pigments photosynthétiques des algues est aussi une approche intéressante pour identifier les espèces dans un échantillon provenant du milieu naturel ou dans une culture mixte en laboratoire. Olson *et al.* (1989) identifèrent, à l'aide des propriétés optiques spécifiques aux différents pigments, plusieurs espèces de phytoplancton marin. Li (1989) analysa et classifia l'ultraphytoplancton marin par ses caractéristiques d'autofluorescence et de taille cellulaire.

Legendre et Yentsch (1989) présentèrent un profil des techniques cytométriques pour les études biologiques en limnologie et océanographie. Ils décrivent l'importance d'évaluer certaines variables dans ce cadre de recherche et nous informèrent des avantages et des désavantages à travailler avec le phytoplancton du milieu naturel. Phinney et Cucci

(1989), Peeters *et al.* (1989) ont également évalué les difficultés associées à l'analyse du phytoplancton dans le milieu naturel. Celles-ci peuvent être associées aux appareils cytométriques actuellement sur le marché qui présentent certaines restrictions. Il existe des limites quant à la grosseur des particules pouvant être analysées. Les algues filamenteuses, par exemple, peuvent se briser en petites fractions lors de leur passage dans le cytomètre ou bien des concentrations cellulaires peu élevées peuvent amener certaines contraintes analytiques..

1.5- Objectifs de la recherche

L'intégrité du phytoplancton est un facteur essentiel à la productivité de l'écosystème aquatique. Les substances chimiques qui peuvent lui porter atteinte doivent être évaluées. Afin de mieux caractériser leurs répercussions sur le phytoplancton, il est apparu important de développer une méthode simple et fiable pour estimer la létalité algale. L'objectif de cette recherche vise donc le développement d'un test de létalité algal à l'aide des techniques cytométriques. Le but ultérieur de cette étude vise à la validation et à l'intégration de ce bioessai parmi ceux déjà existants afin d'obtenir un portrait plus complet des effets délétères sur le phytoplancton des substances chimiques et/ou des effluents industriels.

Afin d'évaluer la létalité algale, le diacétate de fluorescéine (FDA) et le carboxydiacétate de fluorescéine (C-FDA), deux marqueurs reconnus pour la mise en évidence de la viabilité cellulaire (Gala et Giesy, 1990; Berglund *et al.*, 1988; McGinnes *et al.*, 1985; Bruning *et al.*, 1980; Rotman et Papermaster; 1966), offraient un potentiel intéressant. La première étape de cette étude consistera à l'évaluation de leur efficacité à mesurer de façon fiable la viabilité cellulaire sur la micro-algue *S. capricornutum*.

Par la suite, l'application de la méthode sera évaluée sur des toxiques de référence: cuivre et mercure. À cette étape, l'amélioration de la méthode et la validation des résultats de mortalité seront effectuées.

La démonstration de la fiabilité du protocole réalisée, des tests de létalité seront effectués sur différents pesticides (l'atrazine, le 2,4-D, le métolachlore, le diquat, la cyanazine) reconnus prioritaires au Québec selon le rapport SAGE (1988).

1.5.1- Le diacétate de fluorescéine, le carboxydiacétate de fluorescéine et l'autofluorescence chlorophyllienne, marqueurs de viabilité

La viabilité cellulaire est mise en évidence par des colorants spécifiques qui informent de l'état de la cellule. Dans le cadre de cette étude, nous avons sélectionné parmi deux colorants fluorescents supravitaux: FDA et C-FDA. Ceux-ci pénètrent les cellules vivantes et non vivantes mais se fixent uniquement dans les cellules vivantes. Ils s'avèrent peu ou non toxiques et sont liposolubles, ils traversent donc facilement la membrane cellulaire (Combrier *et al.*, 1988).

Le FDA est une molécule non polaire (ester d'acide gras) et non fluorescente. A l'intérieur des cellules vivantes, des estérases non spécifiques cliveront le lien ester des acétates pour libérer la fluorescéine. L'hydrolyse du FDA se produit à 95 % dans le cytoplasme (Sontag, 1977). La fluorescéine étant hydrophile demeure captive du cytoplasme des cellules vivantes dont la membrane cellulaire est en bon état physiologique (Dorsey *et al.*, 1989; Combrier *et al.*, 1988). La fluorescence est transmise en unités relatives de fluorescence (URF). Chez les cellules non viables, le FDA ne pourra être clivé étant donné l'absence d'activité estérasique.

L'intensité de la fluorescence verte dépend de l'activité des estérases, du pH intracellulaire (Visser *et al.*, 1979) et de l'intégrité membranaire (Aeschbacher *et al.*, 1986; Prosperi *et al.*, 1986; Persidsky et

Baillie, 1977). La perte d'intégrité membranaire favorisera un relargage plus rapide de la fluorescéine et la diminution du pH intracellulaire et de l'activité estérasique réduit l'intensité de la fluorescence verte.

- Le C-FDA est également une molécule non polaire (ester d'acide gras) qui pénètre facilement à l'intérieur de la cellule. Son mode d'action est identique à celui du FDA. Par ailleurs, des études menées par McGinnes *et al.* (1985), avec des cellules immunologiques de mammifères ("Natural Killer"), ont démontré que le C-FDA est relargué beaucoup plus lentement que le FDA. Les réponses présentent également une moins grande variabilité entre triplicatas selon les conditions expérimentales (la température, les constituants du milieu, etc).

Comme il est impératif de bien connaître les propriétés des colorants utilisés pour marquer les cellules viables et non viables, leurs répercussions sur le métabolisme cellulaire en fonction de leurs propriétés physico-chimiques devront être connues. De plus, il est essentiel de bien connaître leurs qualités spectrales dans le cas d'une utilisation avec d'autres marqueurs.

Le FDA et le C-FDA émettent à 530 nm lorsqu'excités à 488 nm par le laser du cytomètre. Le choix des fluorochromes étant lié aux contraintes cytométriques imposées par la source d'excitation unique, ces deux fluorochromes présentent donc de bonnes caractéristiques optiques pour la présente étude.

Cependant, l'unique mesure de l'activité des estérases liée à l'intensité de la fluorescence verte ne constituait pas une preuve irréfutable de viabilité. Étant donné que certains toxiques inhibent l'activité estérasique (métaux: Karataglis *et al.*, 1988; organophosphorés: Casarett et Doull, 1986) et que d'autres l'induisent ou l'activent (pesticides de la famille des chloroacétamides: Kaufman et Kearney, 1976), il s'est avéré essentiel

d'incorporer un deuxième indicateur de viabilité à notre procédure: la fluorescence chlorophyllienne.

Le principe de l'autofluorescence chlorophyllienne est le suivant: lorsque l'énergie d'excitation n'est pas toute utilisée dans la photosynthèse, les pigments chlorophylliens dissipent cette énergie sous forme de chaleur ou de fluorescence (Salisbury et Ross, 1985). Lorsqu'excitée à 488 nm, la chlorophylle des cellules saines émet autour de 650 nm (spectre rouge), laquelle est captée par le détecteur à fluorescence rouge du cytomètre. En utilisant l'autofluorescence, nous évitons un chevauchement de fluorescence avec celle émise par le FDA (fluorescence verte). Des analyses biparamétriques des signaux optiques émis par les cellules peuvent donc être menées sans difficultés d'interprétation. Nous évitons également l'emploi d'un deuxième fluorochrome, allégeant davantage le protocole. L'accumulation intracellulaire de fluorescéine n'interfère pas avec l'autofluorescence (Dorsey *et al.*, 1989). Il est à noter, cependant, que l'autofluorescence ne peut pas apporter à elle seule une garantie absolue de viabilité. En effet plusieurs toxiques peuvent altérer l'autofluorescence sans nécessairement entraîner une conséquence algicidale (Grazyna *et al.*, 1987; Roy et Legendre, 1979; Samuelsson et Oquist, 1977).

1.5.2- L'estimation de l'inhibition de croissance et de la létalité chez les algues

Des tests d'inhibition de croissance effectués selon le protocole miniaturisé développé par Blaise *et al.* (1986) seront réalisés pour plusieurs des produits utilisés lors des tests de létalité. Les tests d'inhibition serviront de référence afin de comparer les résultats obtenus avec ceux de la littérature. De cette façon, un contrôle de qualité de la technique est effectuée pour valider davantage les résultats. La comparaison des paramètres de mesure (CI₅₀ et CL₅₀) permettra également de mieux caractériser le potentiel toxique des produits.

CHAPITRE 2

2.0- MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1- Matériel biologique et entretien des cultures

2.1.1- Matériel biologique

Le microorganisme retenu pour les tests est la microalgue *S. capricornutum*, souche ATCC 22662. Au Québec, plusieurs études ont permis de vérifier l'efficacité des tests biologiques avec *S. capricornutum*. La polyvalence d'utilisation de ce réactif biologique afin de préciser les répercussions environnementales des composés toxiques a été démontrée par plusieurs auteurs (St-Laurent *et al.*, 1992; Thellen *et al.*, 1989; Blaise *et al.*, 1986; Couture *et al.*, 1985; van Coillie *et al.*, 1982; Couture *et al.*, 1981; Joubert, 1980).

2.1.2- Entretien des cultures

Les microalgues sont mises en culture dans le milieu nutritif AAP ("Algal Assay Procedure") 1X (Miller *et al.*, 1978). Ce milieu est préparé à partir de cinq solutions concentrées de macro et microéléments. Un volume de 1 mL est prélevé de chacune des cinq solutions et ajouté à 900 mL d'eau déionisée (Millipore Super-Q). Le volume de la solution est complété à 1 L. Les concentrations nominales de macroéléments et de microéléments dans le milieu de culture sont les suivantes:

Macroéléments

.Nitrate de Sodium NaNO_3	25,50 mg/L
.Chlorure de Magnésium, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10,00 mg/L
.Chlorure de Calcium, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,42 mg/L
.Sulfate de Magnésium, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14,70 mg/L
.Phosphate de Potassium, K_2HPO_4	1,04 mg/L
.Bicarbonate de Sodium, NaHCO_3	15,00 mg/L

Micro-éléments

.Acide Borique, H_3BO_3	185,52 $\mu\text{g/L}$
.Chlorure de Manganèse, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415,61 $\mu\text{g/L}$
.Chlorure de Fer, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	160,00 $\mu\text{g/L}$
.Chlorure de Zinc, ZnCl_2	3,28 $\mu\text{g/L}$
.Chlorure de Cobalt, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,43 $\mu\text{g/L}$
.Chlorure de Cuivre, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,012 $\mu\text{g/L}$
.Molybdate de Sodium, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,26 $\mu\text{g/L}$
.Disodium d'acide Tétracétique, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	300,00 $\mu\text{g/L}$

Le pH du milieu est ajusté à $7,5 \pm 0,1$ en utilisant 0,1N d'hydroxyde de sodium ou d'acide hydrochlorique. Le milieu nutritif est ensuite filtré à 0.45 μm sous des conditions stériles. Un volume de 500 mL de milieu est réparti dans des erlenmeyers de 2 L. Les milieux sont ensuite entreposés à 4°C à la noirceur. Un inoculum de 100 μL d'algues provenant d'une culture en phase logarithmique de croissance (généralement de 7 jours) est ajouté dans un des erlenmeyers contenant 500 mL de milieu nutritif AAP 1X. La culture est incubée pendant une période de 7 jours avec agitation (100 rpm), à 24°C, sous luminosité continue (approximativement $95 \mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Un repiquage de la culture d'algues est effectué hebdomadairement dans

un milieu AAP frais afin de maintenir les cultures en phase de croissance logarithmique.

2.2- Considérations techniques du cytomètre

Le cytomètre en flux mesure diverses paramètres optiques qui sont des signaux lumineux émis par les cellules. L'intensité de ces signaux optiques est corrélée avec les propriétés cellulaires. Les variations et la distribution de ces propriétés peuvent être observées au sein d'une population.

L'appareil utilisé pour nos recherches est le modèle FACScan (Becton Dickinson). Cet appareil détecte des particules aussi petites que 1 μm (Nauwelaers *et al.*, 1988). La mesure de cinq paramètres optiques est captée simultanément sur chacune des cellules. Les cinq paramètres optiques analysés par le FACScan sont: la lumière diffusée à petits angles (FSC: "forward scatter"), la lumière diffusée à angle droit (SSC: "side scatter"), et l'émission de fluorescence à trois longueurs d'ondes différentes. Un mode d'amplification linéaire ou logarithmique peut être employé pour chacun des détecteurs optiques (Becton Dickinson, 1988).

L'intensité de la lumière diffusée à petits angles (1° à 10°) est corrélée avec la taille cellulaire. Cependant, la relation n'est pas nécessairement linéaire. Certains paramètres tels que l'asymétrie cellulaire, l'index de réfraction et la réflexion de la lumière à la surface de la cellule, influencent la lumière diffusée à petits angles (Kruth, 1982). La lumière diffusée à angle droit (90°) permet l'étude de la réfringence et la complexité du cytoplasme, la morphologie et le rapport nucléocytoplasmique (Métézeau et Delamare, 1988).

La mesure de l'intensité des signaux optiques provenant de molécules fluorescentes sera déterminante dans le cadre expérimental de

nos travaux. Le modèle FACScan permet l'emploi de molécules fluorescentes dont les longueurs d'onde d'émission se situent à 530 ± 15 nm (FL1: spectre vert), 585 ± 22 nm (FL2: spectre orange) et > 650 nm (FL3: spectre rouge). Ces spécifications s'avèrent compatibles avec le diacétate de fluorescéine (colorant fluorescent utilisé pour nos travaux) dont la longueur d'émission est à 530 nm lorsqu'excité à 488 nm et la fluorescence provenant des pigments chlorophylliens de la microalgue *S. capricornutum* dont la longueur d'onde d'émission se situe autour de 650 nm.

2.2.1- Système optique

La source d'excitation du FACScan provient d'un laser à ions d'argon. Sa puissance d'émission est à 488 nm. Cette longueur d'onde d'excitation permet l'analyse de plusieurs molécules telles que: la fluorescéine, le bromure d'éthidium, l'acridine orange, le propidium iodine et la chlorophylle (Métézeau et Delamare, 1988).

Le système optique du cytomètre en flux, composé de miroirs dichroïques et de filtres, quantifie séparément les différents signaux optiques émis par une cellule. Après avoir traversé cette succession de miroirs et de filtres, les signaux optiques sont acheminés vers des systèmes de détection appelés les photomultiplicateurs (PMT). Le FACScan est composé de trois PMT captant l'émission de fluorescence. À chacun de ceux-ci est associé un filtre passe-bande spécifique à une longueur d'onde. La lumière diffusée à angle droit (SSC) est également acheminée vers un PMT tandis que la lumière diffusée à petits angles (FSC) est acheminée vers une photodiode (figure 1).

Les signaux électriques livrés par les PMT et la photodiode sont transformés par un convertisseur analogique digital (CAD) en signaux

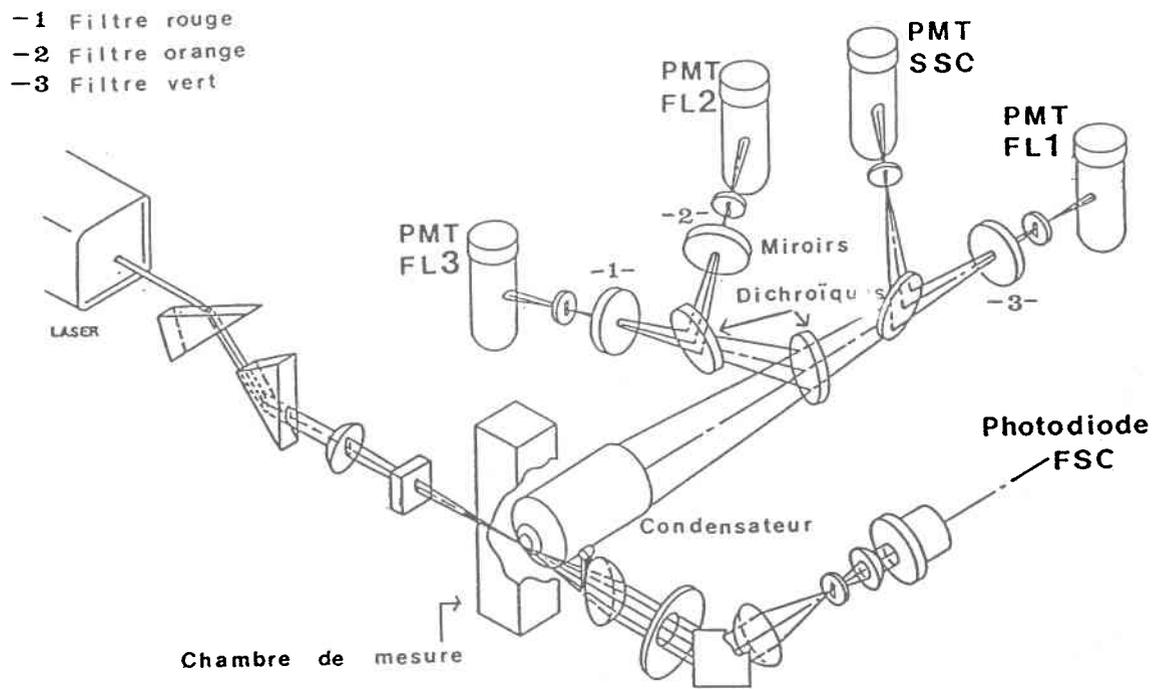


FIGURE 1. Système optique du cytomètre, modèle FACScan

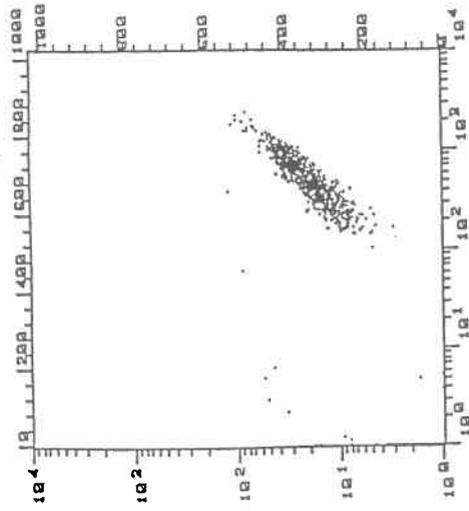
digitalisés. Le modèle FACScan possède un CAD de 10 bits. Le signal maximum (en Volt) sera donc digitalisé en 2^{10} , offrant 1024 valeurs discontinues. Tout signal optique issu du cytomètre sera transformé par le CAD en une valeur digitalisée répartie entre les 1024 valeurs. Ainsi, selon l'intensité du signal, une valeur située entre les 1024 valeurs, représentatives de l'intensité du signal, lui sera assignée (Pierrez *et al.*, 1988). Suite à l'acquisition des données, les résultats des fluorescences peuvent être analysés à l'aide de deux logiciels (FACscan ou le LYSYS). Le logiciel FACscan analyse les valeurs obtenues sur 1024 canaux, tandis que le logiciel LYSYS analyse les valeurs obtenues sur 256 canaux.

La localisation de la population cellulaire de *S. capricornutum* a tout d'abord été effectuée à l'aide des signaux optiques FSC et SSC. La combinaison de ces deux paramètres optiques s'avère fiable pour discriminer les populations cellulaires (Muirhead *et al.*, 1985). Ensuite, la population cellulaire a été localisée en fonction de la fluorescence émise à 530 nm (diacétate de fluorescéine) et à 650 nm (chlorophylle). Les valeurs des amplifications et des détections (statuts expérimentaux) pour discriminer cette population cellulaire sont présentées à la figure 2. Les résultats des analyses peuvent être présentés sous forme de cytogramme biparamétrique. Les paramètres mesurés sont corrélés deux par deux. Sur le cytogramme chaque cellule est représentée par un point (figure 2). Des histogrammes monoparamétriques peuvent également être générés.

2.2.2- Écoulement des fluides

La séparation et l'entraînement des cellules dans la chambre de mesure sont réalisés par un système à deux flux laminaires. Les cellules, sujettes à des forces hydrostatiques, sont entraînées au centre du flux liquide permettant un positionnement adéquat dans la chambre de mesure. Une surpression est exercée sur l'échantillon afin de faire progresser les cellules au centre d'une veine liquide d'entraînement. Cette dernière est

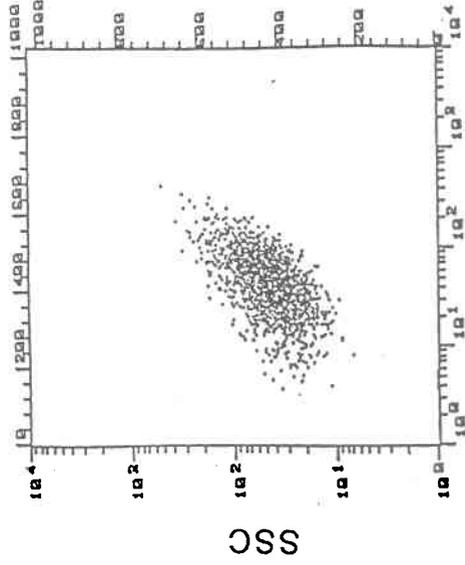
Unités relatives de fluorescence (URL)
Fluorescence verte (530 nm)



Fluorescence rouge (>650 nm)

Unités relatives de fluorescence (URL)

Unités relatives de lumière diffusée



FSC

Unités relatives de lumière diffusée

Détecteurs	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3
E-1		250	600	450	400
Amplificateurs	LOG	LOG	LOG	LOG	LOG
Mode	LOG	LOG	LOG	LOG	LOG

FIGURE 2. Cytogrammes des patrons cellulaires de l'algue *Selenastrum capricornutum* en fonction de paramètres expérimentaux spécifiques.

constituée d'un liquide isotonique (HEMATALLR) filtré à l'aide d'une membrane de porosité de $0,22 \mu\text{m}$ afin d'éviter que des agrégats puissent obstruer l'appareil, perturber l'écoulement des fluides ou produire des artéfacts lumineux (Métézeau et Delamare, 1988). Au centre de la chambre de mesure, le faisceau lumineux du laser intercepte les cellules. La chambre de mesure du modèle FACScan est formée d'une cuvette rectangulaire en quartz de $430 \mu\text{m} \times 180 \mu\text{m}$ (Becton Dickinson, 1988).

2.3- Cinétique enzymatique du FDA et du C-FDA

Afin de faire un choix entre ces deux fluorochromes, nous les avons comparé en effectuant des expériences de cinétique enzymatique (figure 3). À partir d'une culture d'algues en phase logarithmique de croissance, des cellules furent centrifugées à 1100 G pendant 10 min afin d'éliminer les débris cellulaires contenus dans le milieu. Le culot fut ensuite resuspendu dans un milieu AAP 1X. La concentration cellulaire fut ajustée (Coulter Counter, modèle ZM) à environ 1×10^6 cellules/mL: les dénombrements cellulaires sont effectués à l'aide d'un compteur de particules. Un volume de 900 μL de la suspension cellulaire fut distribué dans des éprouvettes. On ajoute à ce volume 100 μl des différentes concentrations de fluorochromes, soit 24 mM pour le FDA et 17,73 mM pour le C-FDA. Tous les tests furent réalisés en triplicata. Le FDA et le C-FDA étant des molécules hydrophobes, l'acétone fut employée comme véhicule pour les solubiliser. Les témoins étaient soumis au même pourcentage d'acétone. Des lectures cytométriques furent prises à différents temps, permettant ainsi l'obtention d'une mesure temporelle d'intensité de la fluorescence verte (exprimée en unités relatives de fluorescence: URF) émise par les cellules.

Les courbes des cinétiques estérasiques obtenues sont conformes au modèle de cinétique enzymatique de Michaelis-Menten. La réaction enzymatique débute par une phase de latence représentant le temps requis pour le transport des fluorochromes (FDA et C-FDA) dans la cellule et leur

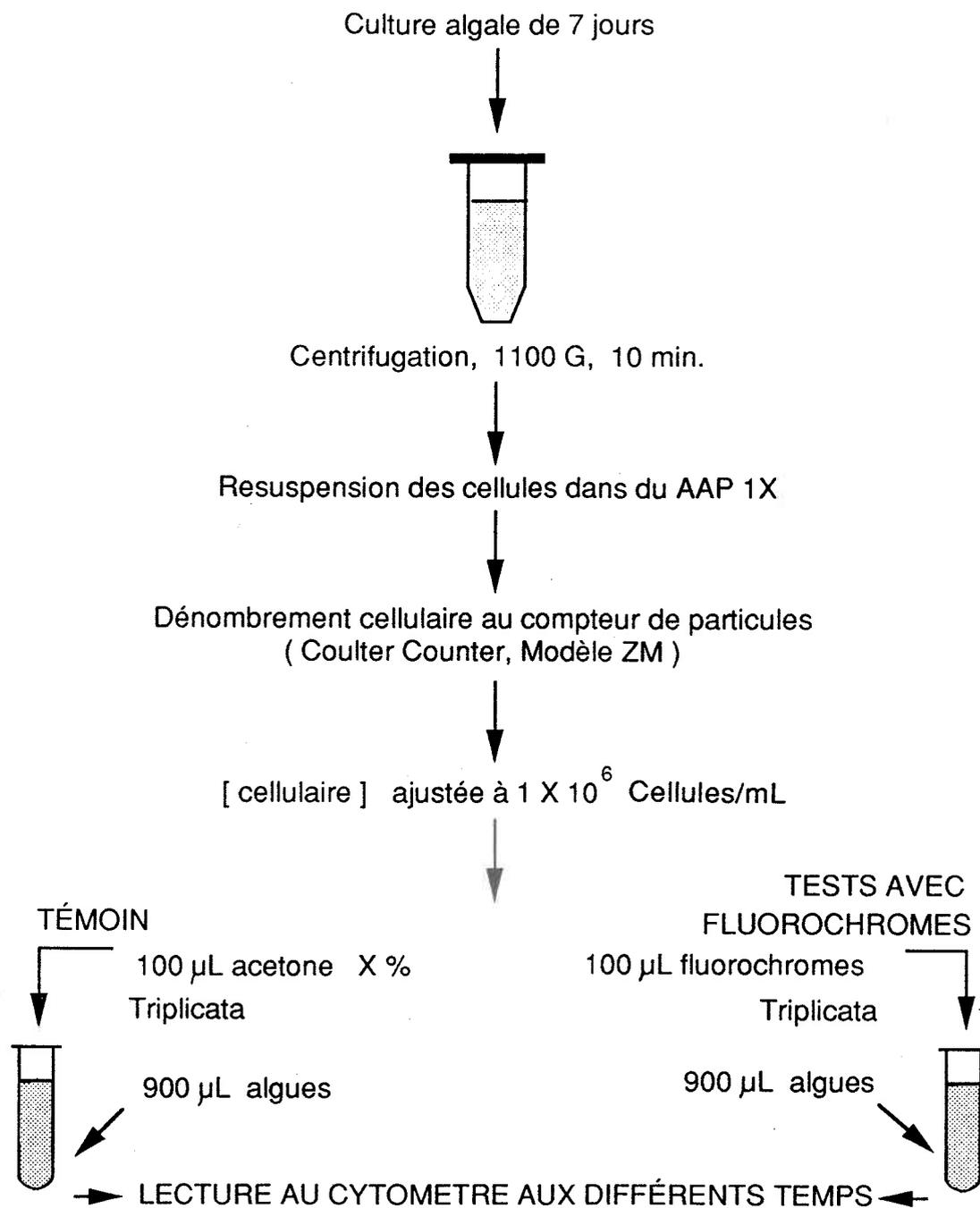


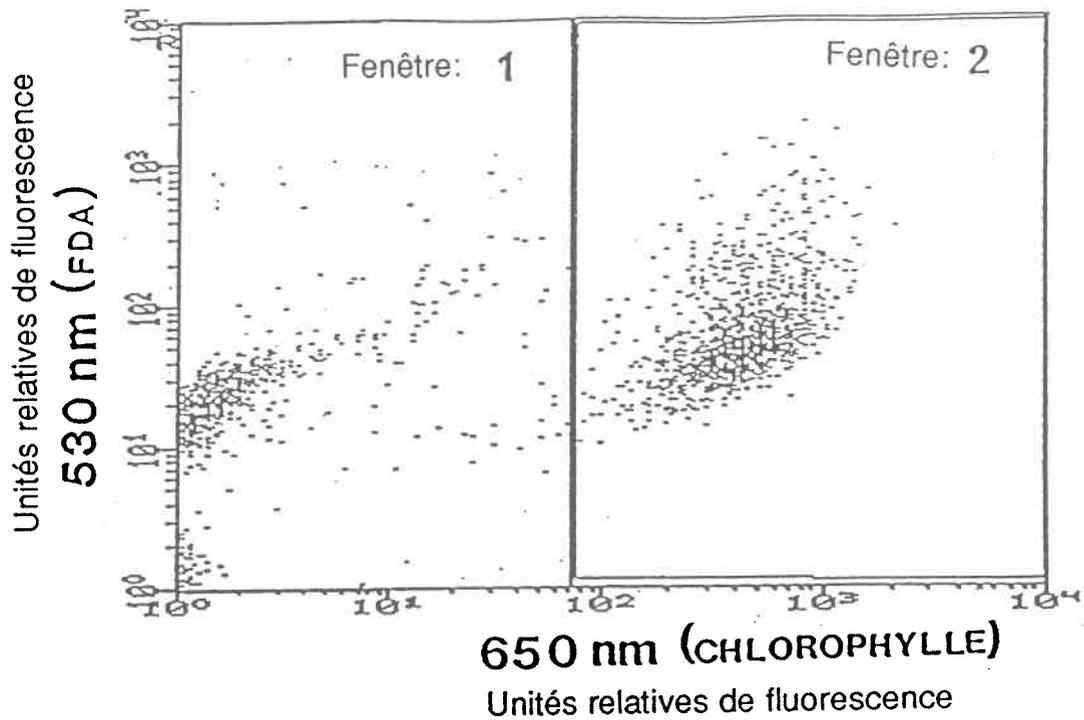
FIGURE 3. Protocole d'évaluation des cinétiques estérasiqes du FDA et du C-FDA chez l'algue *S. capricornutum*.

accessibilité aux estérases. Il s'ensuit une augmentation de la réaction enzymatique suite à l'accroissement de la concentration du substrat (le fluorochrome) intracellulaire (phase linéaire). Aux fortes concentrations de substrat, la vitesse de la réaction devient constante et indépendante de sa concentration. L'enzyme est alors saturé (phase stationnaire). Cette phase est également caractérisée par un équilibre entre le niveau de formation de fluorescéine et son relargage dans le milieu. Le relargage de la fluorescéine se fait par diffusion passive (Baisch, 1978) ou par transport actif (Prosperi *et al.*, 1986) chez les cellules dont la membrane est intacte. Il peut aussi résulter d'une augmentation de la perméabilité membranaire chez les cellules endommagées. La phase stationnaire est enfin suivie par la phase décroissante caractérisée par une diminution du substrat, et/ou par une augmentation de la réaction inverse, et/ou par un accroissement du relargage de la fluorescéine dans le milieu (Dive *et al.*, 1987; Lehninger, 1982).

Suite à ces expériences préliminaires de cinétique, le FDA a été retenu comme marqueur de viabilité chez l'algue *S. capricornutum* pour les essais subséquents puisqu'il présentait une meilleure réponse (voir chapitre 3).

2.4- Sélection d'une concentration optimale de FDA

La concentration de FDA utilisée pour mettre en évidence la viabilité cellulaire chez les algues varie selon les auteurs. Les concentrations rapportées s'échelonnent entre 1 μM et 40 μM (Gala et Giesy, 1990; Dorsey *et al.*, 1989; Berglund *et al.*, 1988;). Afin d'estimer la concentration de FDA optimale pour nos travaux, nous avons effectué des cinétiques enzymatiques aux concentrations suivantes: 1 μM , 5 μM , 10 μM et 24 μM .



Fenêtre 1: population cellulaire non viable

Fenêtre 2: population cellulaire viable

FIGURE 4. Exemple de cytoigrammes de la fluorescence verte liée à l'hydrolyse du FDA en fonction de la fluorescence rouge chlorophyllienne.

2.5.1- Validation du fenêtrage des populations

Afin de valider le fenêtrage des populations viables et non viables, des tests en milieu liquide et en milieu solide ont été effectués.

Lors d'expériences préliminaires, des cellules ont été exposées aux micro-ondes durant 15, 30 et 60 s: la létalité a été évaluée en incubant les algues traitées dans un milieu nutritif liquide et gélosé. L'absence de croissances des algues dans les différents milieux confirmait la mortalité des algues. Ces expériences ont permis de déterminer que les cellules algales étaient tuées après un traitement de 60 s au four à micro-ondes.

2.5.1.1- Tests en milieu liquide

Le protocole utilisé pour différencier les cellules vivantes des mortes est schématisé à la figure 5. Un volume de 100 mL a été prélevé d'une suspension algale en phase logarithmique de croissance. Les cellules ont été centrifugées à 1100 G pendant 10 min. Le culot a été resuspendu dans un milieu AAP 1X. La suspension algale a été répartie (2 X 50 mL) dans deux erlenmeyers de 125 ml. Afin de tuer les cellules, un des erlenmeyers a subi un traitement aux micro-ondes (60 s). L'autre constituait le témoin (cellules viables). Les deux cultures en erlenmeyers ont ensuite été incubées durant 4 jours.

Pour l'analyse cytométrique, 900 μ L ont alors été prélevés de chacune des suspensions algales et déposés dans un tube de 12 X 75 mm dans lequel fut ajouté 100 μ L de FDA 50 μ M pour obtenir une concentration finale de 5 μ M de FDA. Les tubes furent incubés à la température de la pièce (environ 25°C) pendant 30 min. Pour chaque groupe (témoin et groupe test), des témoins constitués de la suspension algale et de 0.05 % d'acétone furent inclus. Ces derniers s'avèrent nécessaires afin de vérifier

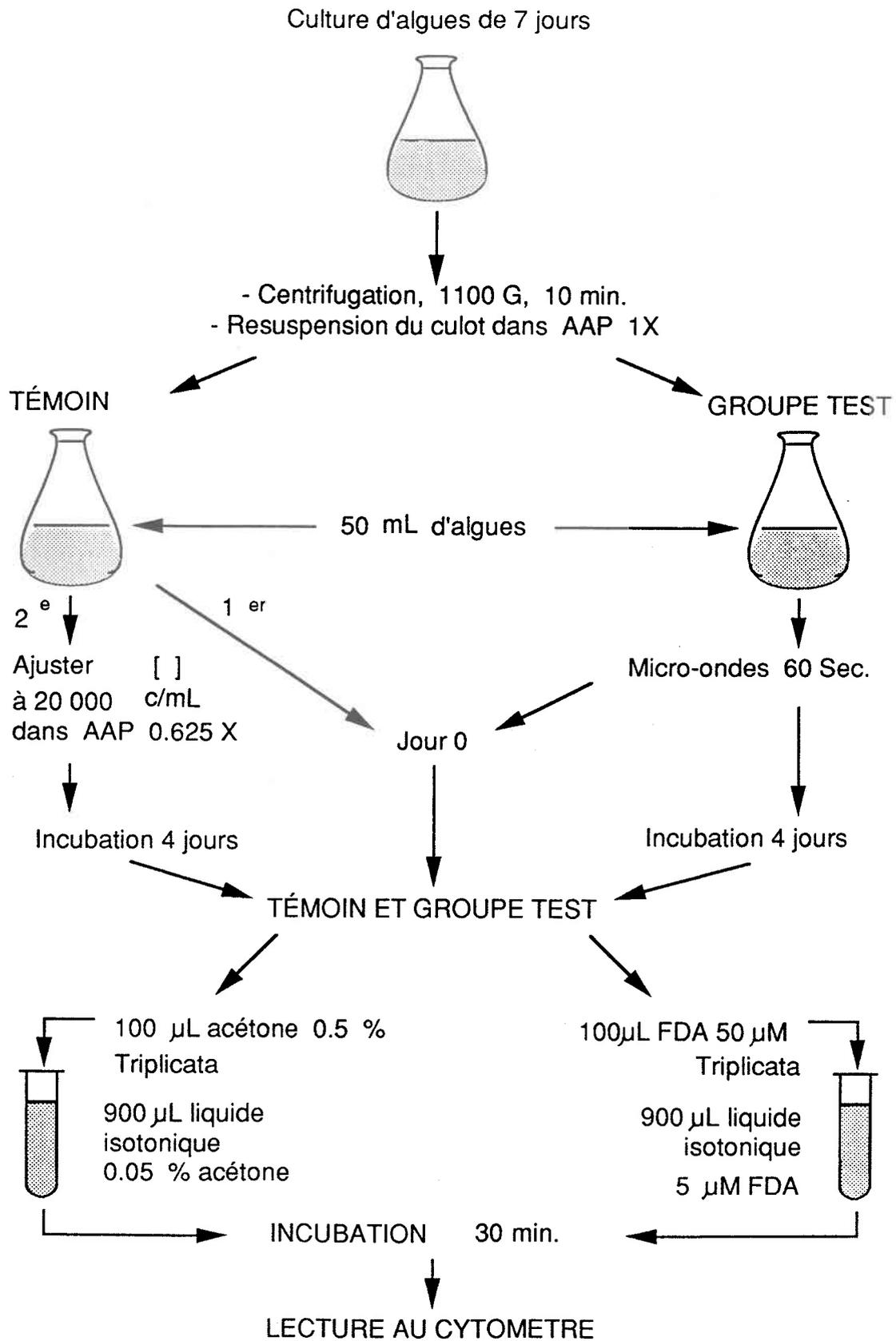


FIGURE 5. Protocole pour évaluer la viabilité: test en milieu liquide.

l'activité estérasique (voir section 2.5). Au jour 0, des mesures cytométriques de fluorescence furent effectuées à 530 nm (FDA) et à 650 nm (chlorophylle) pour chaque traitement réalisé en triplicata. Après avoir ajusté la concentration cellulaire du témoin à 20 000 cellules/mL dans un milieu AAP 0.625 X (concentration d'AAP lors des tests de 4 jours en microplaque) les erlenmeyers ont été incubés à 24°C pendant 4 jours. Un réajustement de la concentration cellulaire du témoin était nécessaire afin de s'assurer que la culture soit en phase logarithmique de croissance après 4 jours d'incubation. Cette étape est importante puisque la concentration agale avant le réajustement était supérieure à 1×10^6 cellules/mL. Si la concentration n'avait pas été réajustée, la culture aurait été en phase stationnaire ou de décroissance. Ceci aurait diminué le pourcentage de viabilité du témoin par rapport aux lectures cytométriques du jour 0. Afin d'obtenir une réponse optimale de fluorescence du témoin, les cellules devaient être en bon état physiologique. Ce réajustement s'avèrait naturellement superflu dans le cas des algues traitées aux micro-ondes.

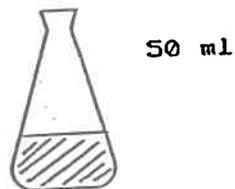
2.5.1.2- Tests en milieu solide

Le protocole des tests en milieu solide est présenté à la figure 6. Pour chaque traitement, 100 µl des suspensions algales ont été prélevés au jour 0 et au jour 4 puis étalés sur des boîtes de Pétri (en triplicata pour chacun des groupes contenant du milieu gélosé AAP 1X. Les boîtes de Pétri furent incubées à 24°C, en éclairage continu, pendant 12 jours. La présence de colonies algales sur les géloses fut alors évaluée.

2.6- Biotests algaux d'inhibition de croissance (CI₅₀) et de létalité (CL₅₀)

Les tests algaux d'inhibition de croissance et de létalité ont été entrepris selon un protocole semblable à celui du bioessai algal en microplaque développé par Blaise (1986). La figure 7 expose la disposition

GROUPE TÉMOIN



*J0, *J4



100 µL



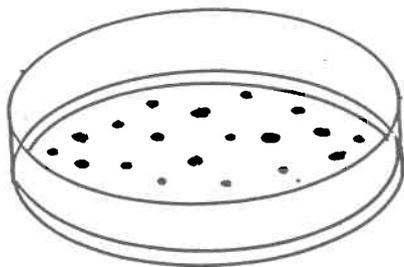
Gélose AAP 1X



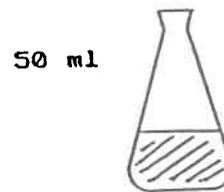
INCUBATION 12 JOURS



PRÉSENCE DE COLONIES ALGALES



GROUPE TEST



*J0, *J4



100 µL



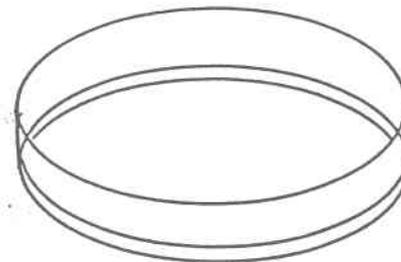
Gélose AAP 1X



INCUBATION 12 JOURS



ABSENCE DE COLONIES ALGALES



* J0, *J4: jour 0 et jour 4

FIGURE 6. Protocole pour évaluer la viabilité: test en milieu solide.

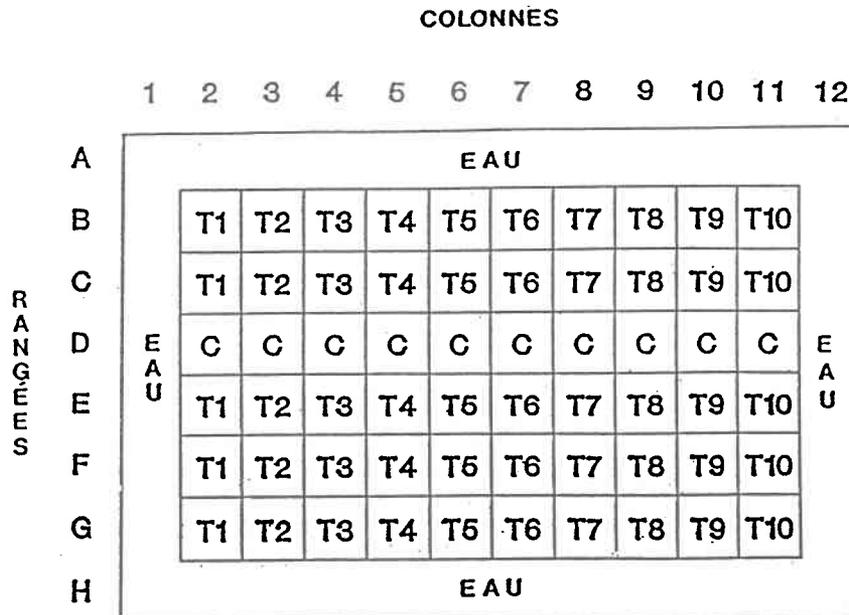


FIGURE 7. Configuration de la microplaque

Les puits périphériques de la microplaque contiennent 200 μ L d'eau déionisée. Les colonnes 2 à 11 sont réservées pour chacune des concentrations du toxique (T). Les dilutions de ce dernier sont effectuées de la colonne 2 à la colonne 11, de la plus forte concentration à la plus faible. À chacune des concentrations correspond 5 réplicats. La rangée D est exclusivement réservée au groupe témoin (C: contrôle).

expérimentale retenue pour l'évaluation de la toxicité d'un produit dans une microplaque.

Afin de déterminer les CI_{50} et CL_{50} , des mesures de dénombrement cellulaire (compteur de particules) et cytométriques sont respectivement prises en triplicata (i.e. dans 3 des 5 puits T1, etc) pour chacune des concentrations du produit chimique évalué. Cinq réplicats sont mesurés pour le groupe témoin (i.e. dans 5 des 10 puits "C"). Pour chaque mesure paramétrique (CI_{50} et CL_{50}), une courbe dose-réponse est obtenue. Les CL_{50} et CI_{50} sont ensuite intrapolées par régression linéaire.

2.6.1- Principe du test d'inhibition

L'inhibition de croissance est mesurée par dénombrement cellulaire à l'aide du compteur de particules. La variable retenue pour l'évaluation de la CI_{50} est le niveau de croissance obtenu suite à une exposition de 4 jours en comparant la biomasse algale des groupes exposés avec celle du groupe témoin.

2.6.2- Principe du test de létalité

La létalité est quantifiée à l'aide du cytomètre en flux. La figure 8 illustre les étapes du protocole. Pour chaque produit testé, les tests en microplaque sont faits en duplicata. Suite à l'incubation de 4 jours, les algues d'une des microplaques ne seront pas traitées au FDA. Les algues de l'autre microplaque seront traitées au FDA avant les lectures cytométriques. L'intensité de la fluorescence à 530 nm émise par les algues avant et après l'ajout de FDA permettra de vérifier la présence d'activité estérasiqque (voir section 2.5).

Avant d'effectuer les lectures, le produit testé devra être retiré des microplaques. Le contenu de chacun des puits est alors transféré à l'aide

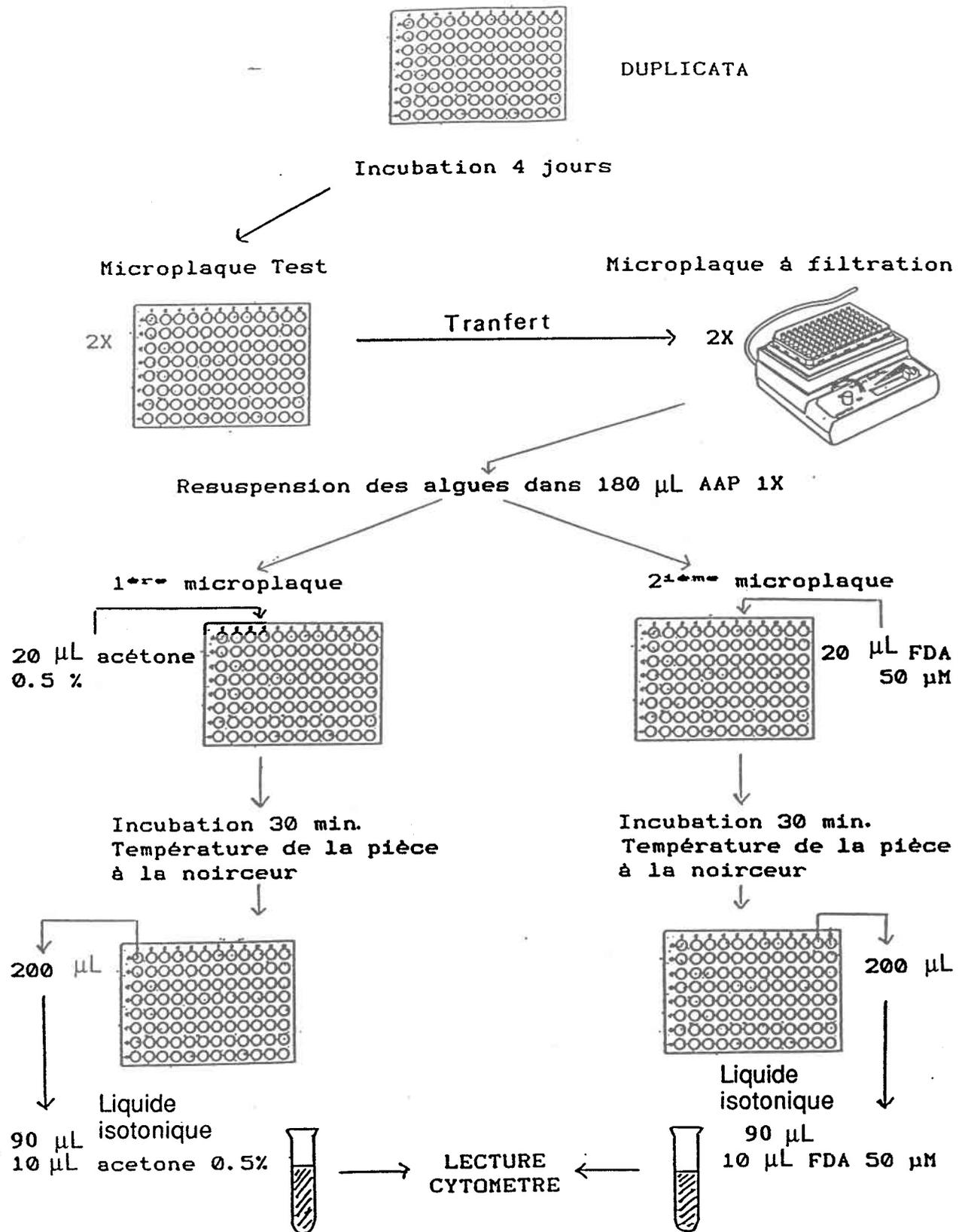


FIGURE 8. Protocole de létalité algale utilisant la cytométrie en flux.

d'une pipette multipointe dans une microplaque à filtration: le fond de chacun des puits de la microplaque est constitué d'un filtre de 0,45 μm . A l'aide d'une pompe à vide, le milieu dans lequel baigne les algues est retiré par aspiration. Les algues retenues par les filtres sont ensuite resuspendues dans 180 μL de milieu AAP 1X.

L'étape de filtration permet d'éliminer la compétition possible entre le produit et le FDA pour les sites actifs estérasiques (cas des produits hydrolysés par les estérases). La possibilité d'une chélation du FDA par le produit testé pouvant causer une diminution de la disponibilité du FDA est aussi évitée. La compétition dans le transport membranaire entre le FDA et d'autres substances organiques est également éliminée et le cytomètre n'est pas contaminé par les produits (Dive *et al.*, 1987).

Afin de vérifier la viabilité, le traitement des algues contenues dans les puits de chacune des microplaques se poursuit tel qu'indiqué à la figure 8. L'obtention d'une concentration finale de 5 μM de FDA se fait par l'ajout d'un volume de 20 μL d'une solution de travail de FDA à 50 μM (0,5 % acétone), dans les puits d'une des microplaques contenant la suspension algale baignant dans 180 μL AAP 1X. La concentration finale d'acétone étant de 0.05 %, un volume de 20 μL d'une solution de 0.5 % d'acétone sera ajouté dans l'autre microplaque. Ceci permet de s'assurer qu'aucun effet toxique n'est attribuable à l'acétone.

À de fortes concentrations toxiques, la densité algale étant faible, le temps des lectures cytométriques se situe en moyenne à 90 s par puits. Le temps de lecture d'une microplaque peut donc prendre plus de 45 min. Étant donné que le temps optimum d'incubation des algues avec le FDA a été établie à 30 min, cette situation signifie que la lecture des derniers puits se fait au delà de 30 min. Il en résulte une augmentation de l'intensité de fluorescence verte pour ceux-ci (voir la cinétique estérasique du FDA 5 μM dans le chapitre 3: Résultats et Discussion). Puisqu'on effectue les lectures

cytométriques en triplicata pour chaque concentration de produit, le temps moyen de lecture pour les fortes concentrations demande environ 4 min. Dans le but de respecter le temps d'incubation de 30 min pour tous les puits, les réactifs (FDA, acétone) sont ajoutés dans les puits par intervalle de 5 min pour chaque concentration de produit testé. Ceci permet d'effectuer les lectures au cytomètre en respectant le temps prévu d'incubation.

Le volume minimal requis pour les lectures au cytomètre est de 100 μL (Métézeau et Delamare, 1988). Puisqu'aux fortes concentrations toxiques la densité cellulaire est faible, un volume minimal de 200 μL est nécessaire afin d'effectuer les lectures sur 2 000 cellules. Afin d'obtenir cette densité, le contenu des puits (200 μL) est transféré dans un tube contenant 100 μL de milieu isotonique et 10 μL de FDA 50 μM . De cette façon, la lecture cytométrique de chaque tube s'effectue sur 2000 cellules.

La létalité est estimée par la mesure de la fluorescence verte (530 nm) liée à l'activité estérasique et de l'autofluorescence rouge (650 nm) émise par la chlorophylle. Pour chacune des concentrations du produit le pourcentage de mortalité est établi par fenêtrage des populations viables et non viables. Le pourcentage de mortalité obtenu pour les différentes concentrations est ajusté en tenant compte du pourcentage de mortalité obtenu chez le témoin, celui-ci étant égal à 100 % de viabilité.

2.7- Produits retenus pour les tests

La validation du test de létalité a été effectuée avec deux toxiques de référence soit le sulfate de cuivre et le chlorure de mercure. Des courbes dose-réponse du pourcentage de mortalité en fonction de la concentration cellulaire ont été obtenues (voir chapitre 3). Nous avons estimé les CL_{50} et CI_{50} par prédiction inverse (voir section analyse statistique des résultats).

Les tests de létalité ont ensuite été entrepris sur quelques classes de pesticides (voir tableau I). Comme mentionné, nous avons sélectionné les pesticides parmi les plus utilisés en agriculture au Québec (SAGE, 1988). Ces herbicides sont appelés à faire également parti d'une réévaluation écotoxicologique.

La liste des autres produits utilisés pour les expériences est présentée au tableau II.

2.8- Analyse statistique des résultats

Les analyses statistiques ont été réalisées pour les mesures paramétriques suivantes: l'activité estérasique et l'autofluorescence. L'estimation des CI_{50} et CL_{50} est obtenue par régressions linéaires inverses. Des tests statistiques sont effectués afin d'évaluer la significativité des pourcentages de mortalité entre les différentes concentrations du produit (test de Tukey, $p < 0.05$). Des tests sont également réalisés afin d'estimer les concentrations qui donneront un pourcentage de mortalité significativement différent du témoin (test de Dunnett, $p < 0.05$). Les tests statistiques sont effectués à l'aide du logiciel Statgraphics à l'exception du test de Dunnett où un logiciel de l'Environmental Protection Agency (EPA, 1988) a été utilisé.

2.8.1- Évaluation de l'activité estérasique des fluorochromes

Puisque les cinétiques enzymatiques démontraient des courbes de forme parabolique, les valeurs de fluorescence obtenues ont été transformées par l'équation quadratique de la régression :

$$Y_i = a + b_1x_i + b_2x_i^2$$

(Zar, 1984)

TABLEAU I

Liste des toxiques utilisés pour les tests de létalité et d'inhibition de croissance.

Produits	Sources	Nº. Catalogue
Sulfate de Cuivre	Fisher	C-495
Chlorure de Mercure	Matheson Coleman et Bell	CB509
Atrazine (99 %)	Riedel-de Haën	35702
Cyanazine (98 %)	Riedel-de Haën	35679
2,4-D (98%)	Dow Chemical Canada	2RS86
Diquat dibromide (25%)	Imperial Chemical Industries	JF1855
Métolachlore (95 %)	Ciba-Geigy	CF3544

TABLEAU II

Liste du matériel et des produits utilisés pour l'expérimentation

Produits ou Matériel	Description ou utilisation	Compagnies
FDA	Diacétate de fluorescéine	Molecular Probe F-1303
C-FDA	Carboxy-Diacétate de fluorescéine	Molecular Probe C-369
Acétone	Solvant	Fisher Pesticide Quality A40B-4
HEMATALL	Liquide isotonique	Fisher CS606-20
Microplaque à filtration	Modèle Multiscreen	Millipore MADV6550
Filtre 0.45 µM	Filtration milieu AAP	MSI E04TF04700
Tube 12 X 75 mm	Tubes utilisés pour les lectures cytométriques	Falcon A-2052-2

Une analyse de covariance a été effectuée sur les pentes des droites de régression des cinétiques estérasiques afin de vérifier l'existence d'une différence significative pour au moins une d'entre elle. Le test est calculé de la façon suivante:

$$F = \frac{SS_c - SS_p}{k - 1} \cdot \frac{SS_p}{DF_p}$$

Où:

SS_c : erreur résiduelle de la régression commune

SS_p : erreur résiduelle de la régression combinée ("pooled")

k: le nombre de régressions

DF_p : les degrés de liberté de la régression combinée ("pooled")

Suite à l'analyse de covariance, une analyse de comparaison multiple a été faite afin de connaître quelles droites de régression étaient différentes entre elles. L'équation employée pour le test statistique est:

$$q = \frac{b_b - b_a}{SE}$$

$$\text{ou } SE = \frac{(s^2_{y,x})_p}{\sum x^2}$$

2.8.2- Estimation de l'activité estérasique

Des tests de Student (test unilatéral ou $p(\mu_{j1} > \mu_{j2}) < 0.05$) ou de Student modifié lors d'une inégalité des variances (test unilatéral, $p(\mu_{j1} > \mu_{j2}) < 0.0005$) sont réalisés sur la fluorescence verte pour chacune des concentrations de produits testés. Ces tests sont faits avant (μ_{j1}) et après incubation au FDA (μ_{j2}). L'obtention d'une augmentation significative de

fluorescence verte après incubation au FDA certifie la présence de l'activité estérasique. L'évaluation de l'activité estérasique se fait en comparant les résultats de la fluorescence verte obtenue pour les cellules situées dans la fenêtre 1 (cellules non viables) et ceux obtenus dans la fenêtre 2 (cellules viables).

2.8.3- Évaluation de l'autofluorescence

Des tests de Dunnett (comparaison multiple entre le groupe témoin et les différentes concentrations de produits, $p < 0.05$) sur l'autofluorescence rouge liée à la chlorophylle ont permis d'évaluer l'atteinte du système photosynthétique des groupes tests par rapport au groupe témoin. Une diminution significative de fluorescence rouge chez les groupes tests indiquera une atteinte au niveau du système photosynthétique. Des tests de Tukey ($p < 0.05$) ont été également réalisés pour estimer les différences de l'autofluorescence chlorophyllienne entre les différents groupes.

Une atteinte au niveau du système photosynthétique pourra faire augmenter l'autofluorescence verte (Berglund *et al.*, 1987). L'observation d'une diminution significative de fluorescence rouge (chlorophylle) est suivie, en général, d'une augmentation de l'autofluorescence dans le vert. Des tests de comparaison multiple (Tukey, Dunnett) ont permis d'évaluer l'autofluorescence verte entre chacun des groupes incluant le témoin.

Ces tests nous signalent la présence ou l'absence d'une atteinte au niveau du photosystème pour chacune des concentrations des produits testés.

2.8.4- Estimation des CI₅₀ et CL₅₀

L'estimation des CI₅₀ et CL₅₀ est obtenue par régression linéaire simple effectuée sur les points se retrouvant dans la partie linéaire de la courbe. La régression est de type $Y = a + bX$, où:

- Y = pourcentage de mortalité obtenu pour chacune des concentrations du produit testé
- a = ordonnée à l'origine
- b = la pente de la droite de régression
- X = concentration du produit

La pente de la droite de régression exprime la puissance de l'atteinte toxique.

L'évaluation des CI₅₀ et CL₅₀ se fait par prédiction inverse selon l'équation suivante:

$$X_i = \frac{Y_i - a}{b}$$

$Y_i = 50$ (%) de mortalité ou d'inhibition

(Zar, 1984)

Les intervalles de confiance pour la prédiction inverse sont calculées selon l'équation suivante:

$$X \pm \frac{b(Y_i - \bar{Y})}{K} \pm \frac{t}{K} \sqrt{s_b^2 \left[\frac{(Y_i - \bar{Y})^2}{\sum x^2} + K \left(1 + \frac{1}{n} \right) \right]}$$

$$\text{où: } K = b^2 - t^2 s^2$$
$$\Sigma x^2 = \Sigma (x_i - \bar{x})^2$$

(Zar, 1984)

Un test de signification de pente est réalisé afin de vérifier si les variations de la variable Y (% de mortalité) sont expliquées par le modèle de régression impliquant la variable X (concentration du produit) (Sherrer, 1984).

Un test de signification de R^2 (analyse de variance) est également effectué afin de vérifier la part de variation due à d'autres facteurs non étudiés dans le modèle de régression comme la variance résiduelle ou la variance due aux erreurs. C'est un test unilatéral où H_0 (le modèle de la régression n'explique pas la variation de Y, les variables X et Y étant indépendantes) est rejetée si F_C (F calculé) est supérieure ou égale à $F_{0.05}$ (F_{α} de la table), sinon elle est acceptée (Sherrer, 1984).

CHAPITRE 3

3.0- RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1- Quelques rappels sur la cinétique enzymatique du FDA et du C-FDA.

L'augmentation dans le temps de la fluorescence intracellulaire, due à la conversion enzymatique du substrat non fluorescent (molécules de FDA ou de C-FDA) en un produit fluorescent (la fluorescéine), amène des fluctuations dans l'intensité de fluorescence (Martin et Swartzendruber, 1980). Une augmentation du coefficient de variation est alors observée dans la distribution de l'amplitude des signaux de fluorescence émis par les cellules. Cette situation entraîne une certaine confusion dans l'interprétation des résultats. Afin d'obtenir une réponse minimisant ces fluctuations, il est d'abord apparu important d'effectuer des cinétiques enzymatiques sur les fluorochromes. Les cinétiques enzymatiques ont permis de connaître le temps optimal d'incubation du fluorochrome et d'en choisir une concentration appropriée. Le temps d'incubation optimal a été défini comme étant celui requis pour que les lectures cytométriques de fluorescence soient réalisées lors de la phase linéaire de la réaction enzymatique. Les cinétiques enzymatiques ont donc été estimées à différentes concentrations de FDA (1 μM , 5 μM , 10 μM , 24 μM) et à une concentration de C-FDA de 17,73 μM . Les lectures cytométriques ont par la suite été faites de façon séquentielle dans le temps.

Afin de s'assurer de la répétabilité des résultats, deux cinétiques estérasiques ont été effectuées à des jours différents. Les concentrations cellulaires utilisées pour les deux expériences de cinétique étaient de 1.3×10^6 cellules/ml et de 1.5×10^6 cellules/ml, respectivement. Les algues provenaient de cultures en phase de croissance logarithmique. La procédure suivie pour l'évaluation des cinétiques a été décrite à la section 2.3.2.

Afin d'estimer le temps requis pour que se réalise chacune des phases de la cinétique enzymatique (linéaire, plateau, décroissante), des analyses de comparaison multiple (tests de Tukey, $p < 0.05$) aux différents temps d'incubation ont été effectuées sur la fluorescence à 530 nm émise par les cellules aux différentes concentrations. Ces analyses ont permis d'estimer s'il y a lieu, les groupes apparentés. Les résultats des tests sont présentés aux tableaux AI, AII, AIII, AIV, AV et AVI de l'annexe. Les figures 9 et 10 illustrent les courbes de cinétique.

Signalons tout d'abord que les lectures cytométriques ont été prises de façon séquentielle après 5 min d'incubation. Dans le texte, nous désignons donc à 5 min le temps spécifiant le début de la phase linéaire.

Les résultats des tests statistiques ont signalé des différences significatives dans les temps d'obtention de chacune des phases entre les deux expériences de cinétique enzymatique pour toutes les concentrations de fluorochromes testés à l'exception de $1 \mu\text{M}$ de FDA.

Puisque les résultats des analyses statistiques ont révélé des différences significatives, une analyse de comparaison multiple (Tukey, $p < 0.05$) fut effectuée sur les pentes des régressions (tableau III et IV) afin de vérifier s'il existe réellement des différences significatives entre elles. Celle-ci a été réalisée suite aux transformations des données par l'équation quadratique de la régression. La démarche suivie est expliquée à la section

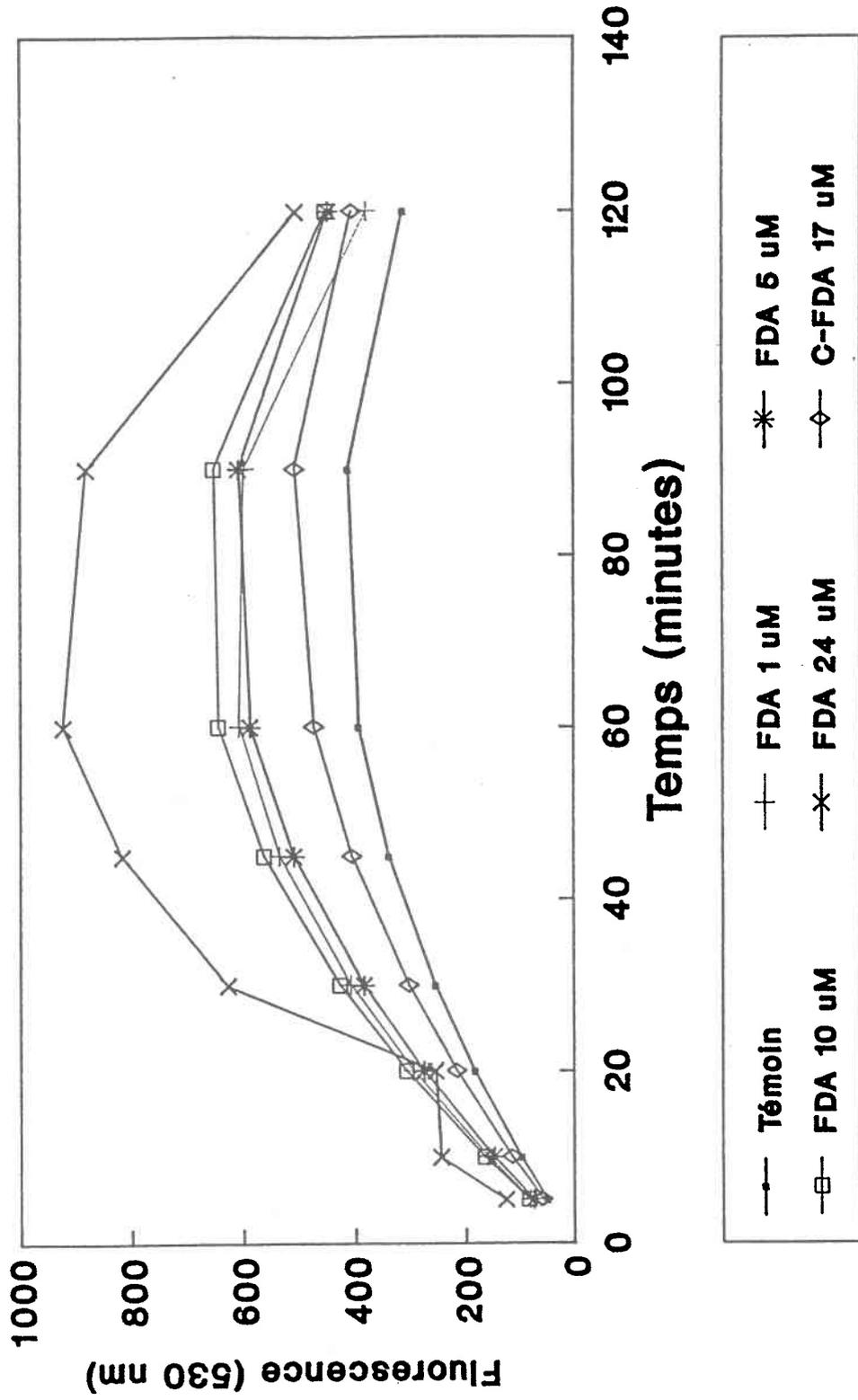


FIGURE 9. Courbes de cinétique estérasique de la fluorescence en fonction du temps lors de la première expérimentation.

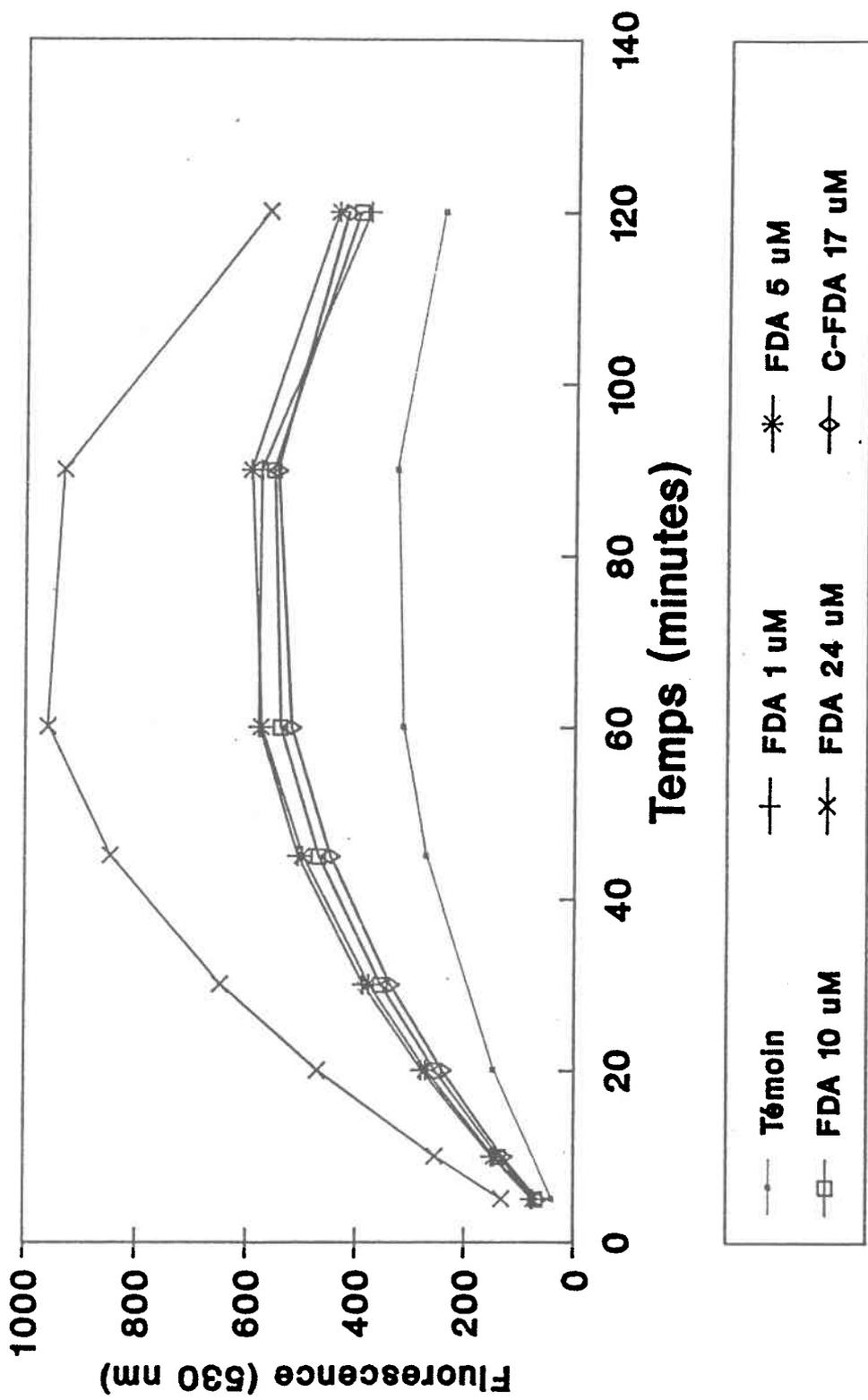


FIGURE 10. Courbes de cinétique estérasique de la fluorescence en fonction du temps lors de la deuxième expérimentation.

TABLEAU III

Tests de comparaisons multiples effectués sur les pentes des droites de régression des cinétiques estérasiques obtenues avec le FDA et le C-FDA lors de la première expérimentation (fig. 8).

HYPOTHESES	SE	q _c	H ₀ = β _a = β _b
β ₀ = β ₅	1.077	1.772	acceptée
β ₁ = β ₂	1.462	-0.847	acceptée
β ₀ = β ₁	1.245	5.284	refusée
β ₂ = β ₃	1.518	1.258	acceptée
β ₃ = β ₄	1.920	4.583	refusée
β ₁ = β ₅	1.329	3.516	refusée
β ₂ = β ₀	1.237	4.318	refusée
β ₂ = β ₅	1.321	2.598	acceptée*

*: erreur de type 2, un test de Student a donc été effectué sur les pentes .

$$S_{b_1-b_2} = 1.7498 \quad t_c = 1.962 \quad t_t = 1.68 \quad v = 44 \quad \alpha = 0.05$$

H₀ acceptée si t_c > t_t, donc puisque t_c < t_t, H₀ est refusée, β₂ et β₅ ne sont pas égaux.

β₀: témoin β₁: FDA 1 μM β₂: FDA 5 μM

β₃: FDA 10 μM β₄: FDA 24 μM β₅: C-FDA 17,73 μM

$$q_t = 2.772 \quad v = 132 \quad k = 2$$

TABLEAU IV

Tests de comparaisons multiples effectués sur les pentes des droites de régression des cinétiques estérasiqes obtenues avec le FDA et le C-FDA lors de la deuxième expérimentation (fig. 9).

HYPOTHESES	SE	q _c	H ₀ = β _a = β _b
β ₀ = β ₅	1.362	3.941	refusée
β ₁ = β ₂	1.441	0.423	acceptée
β ₀ = β ₁	1.238	5.996	refusée
β ₂ = β ₃	1.405	0.606	acceptée
β ₃ = β ₄	1.912	6.604	refusée
β ₁ = β ₅	1.379	1.687	acceptée

β₀: témoin

β₁: FDA 1 μM

β₂: FDA 5 μM

β₃: FDA 10 μM

β₄: FDA 24 μM

β₅: C-FDA 17,73 μM

q_t = 2.772 v = 132 k = 2

2.8.1. Les résultats de l'analyse de covariance permettant d'effectuer les comparaisons multiples sont présentés aux tableaux AVII et AVIII de l'annexe 1.

Les résultats des analyses statistiques effectuées sur la fluorescence verte indiquent aucune différence significative entre 1 μM , 5 μM , et 10 μM de FDA (tous différents du témoin) pour les deux expérimentations. Par contre, il n'y a pas de différence significative entre le témoin et 17,73 μM de C-FDA lors de la première expérience, signifiant qu'il n'y aurait pas eu de transformation du C-FDA par les estérases. Cependant, les analyses effectuées pour la deuxième expérience indiquent une différence significative entre la fluorescence verte naturelle du témoin (autofluorescence) et celle du groupe soumis au C-FDA.

Lors de la première expérience (figure 9), le témoin à 1% d'acétone (pourcentage final d'acétone à cette concentration de C-FDA) présente une augmentation significative (test de Tukey, $p < 0.05$) de l'autofluorescence à 530 nm (spectre vert) dans le temps (tableau V). Cette élévation de l'autofluorescence verte pourrait être due à une toxicité provoquée par l'acétone au niveau du système chlorophyllien. Puisque la fluorescence verte émise par le C-FDA est faible, l'augmentation de l'autofluorescence verte du témoin contribue à ce qu'aucune différence significative de fluorescence ne soit décelée entre le témoin et le C-FDA lors de la première expérience.

Un test de Student ($p < 0.05$) a également été fait sur les pentes des deux cinétiques du C-FDA dans le but de vérifier leur similarité. Les résultats présentés au tableau VI indiquent une différence significative entre les deux distributions. L'intensité de fluorescence à 530 nm (spectre vert) est significativement plus élevée lors de la deuxième expérience.

TABLEAU V

Test de Tukey ($p < 0.05$) effectué sur l'*autofluorescence* verte (530 nm) chez le témoin à 1 % d'acétone. Les groupes possédant la même lettre ne sont pas significativement différents entre eux.

TEMPS	n	\bar{x} URF* 530 nm	Tukey
5	3	243.00	a
10	3	255.00	a
30	3	291.33	b
45	3	300.00	b
60	3	323.67	c
90	3	351.67	d
120	3	364.33	d

*: les résultats ont été analysés avec le logiciel FACScan

TABLEAU VI

Test de Student ($p < 0.05$) effectué sur les pentes des régressions des cinétiques estérasiqes évaluées pour le C-FDA à 17,73 μM

$$t_c = \frac{\beta_1 - \beta_2}{S_{b1 - b2}} = \frac{13.8445 - 12.4276}{1.7693} = 0.8008$$

$$S_{b1 - b2} = \frac{(S^2_{y \cdot x})_1}{(\sum x^2)_1} + \frac{(S^2_{y \cdot x})_2}{(\sum x^2)_2} =$$

$$S_{b1 - b2} = \frac{138\,754.07}{88\,650} + \frac{138\,754.07}{88\,650} = 1.7693$$

$$v = 44 \quad t_t = 1.680 \quad t_c > t_t$$

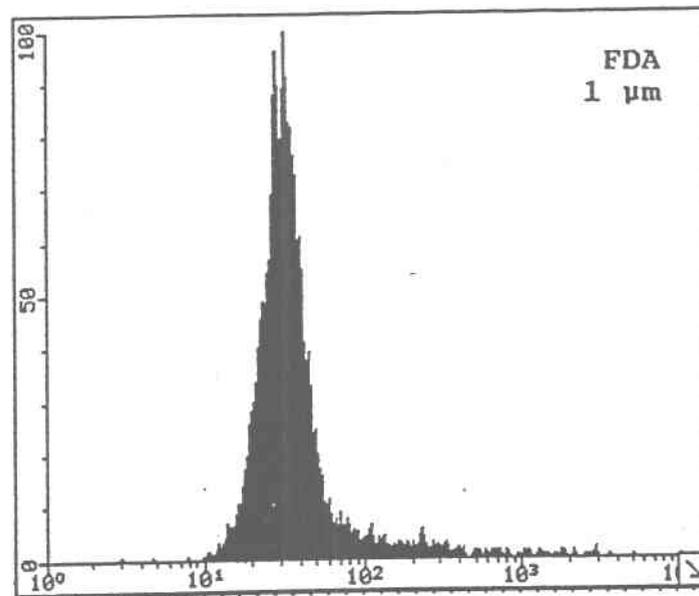
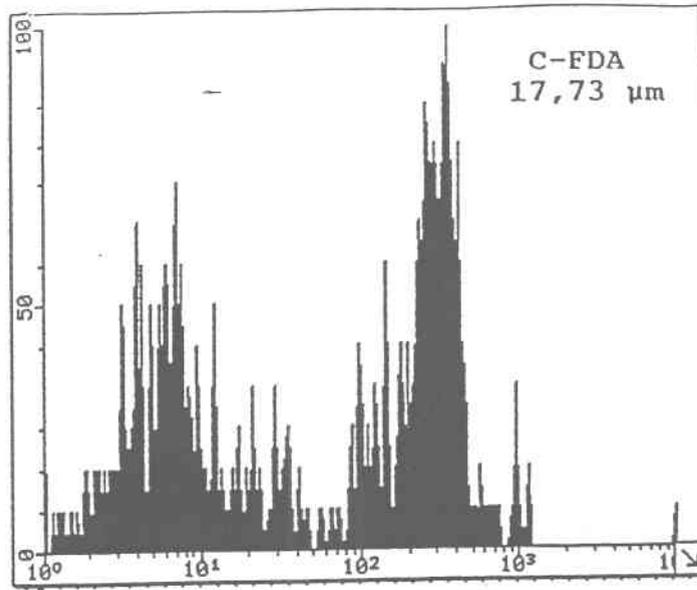
Les deux pentes ne sont pas égales

N.B.: les données permettant d'effectuer le test de Student sont présentées au tableau AV à l'annexe 1.

Selon des travaux effectués par McGinnes *et al.* (1985) sur des cellules immunologiques ("Natural Killer") de mammifères, l'hydrolyse du C-FDA se produit plus lentement que celle du FDA. De plus, le poids moléculaire plus élevé du C-FDA (529 g) par rapport au FDA (416,4 g) pourrait retarder sa pénétration à travers la paroi et la membrane cellulaire de l'algue. Certaines expérimentations effectuées avec le C-FDA semblent démontrer également que l'hydrolyse du C-FDA, chez *S. capricornutum*, est plus lente. Les histogrammes à la figure 11, illustrant la fluorescence verte (530 nm) obtenue après une incubation de 30 min des algues en présence de 1 μM de FDA et 17,73 μM de C-FDA, démontrent une courbe bimodale pour la fluorescence liée au C-FDA et une courbe unimodale pour celle du FDA. Ces résultats suggèrent, après 30 min d'incubation au C-FDA, qu'une partie seulement de la population a incorporé et hydrolysé le C-FDA. La possibilité d'augmenter sa concentration est exclue puisque le pourcentage d'acétone en serait également augmenté. Suite aux résultats obtenus avec le C-FDA, il a été décidé de ne pas utiliser ce fluorochrome comme marqueur de viabilité chez l'algue *S. capricornutum*.

Les résultats des cinétiques à 24 μM de FDA signalent une phase linéaire située entre 0 et 10 min lors des deux expériences. La phase stationnaire est obtenue entre 10 et 90 min lors de la première expérience (figure 9) et entre 10 et 60 min lors de la deuxième expérience (figure 10). L'acquisition des données cytométriques pour une microplaque (35 lectures) peut prendre jusqu'à 60 min. L'utilisation de cette concentration pour nos expérimentations n'a donc pu être considérée puisqu'au-delà de 10 min, la cinétique estérasiq ue étant en phase stationnaire. De plus, la concentration finale d'acétone retrouvée dans les puits suite à l'ajout du FDA 24 μM est de 1% d'acétone. À cette concentration, une toxicité a été détectée lors de la première expérimentation. Il était donc préférable de ne pas utiliser cette concentration de FDA étant donné le potentiel toxique de la concentration de solvant utilisé. Par contre, des tests de Tukey ($p < 0,05$) effectués avec des concentrations finales d'acétone à 0.05% (FDA 5 μM) et

NOMBRE de CELLULES



FLUORESCENCE à 530 nm

FIGURE 11. Histogramme des courbes de fluorescence à 530 nm obtenues lors des incubations au FDA et C-FDA.

à 0.01% (FDA 1 μM) n'ont présenté aucune élévation significative dans le temps pour l'autofluorescence à 530 nm chez le témoin (tableau VII).

Les solutions de travail de FDA utilisées, afin d'obtenir des concentrations finales de 10 μM et de 5 μM , sont de 100 μM et de 50 μM , respectivement. À ces concentrations, le pourcentage d'acétone contenu dans la solution de 100 μM est de 1% et de 0.5% pour 50 μM de FDA. À ces pourcentages d'acétone, le FDA se dissout plus difficilement, surtout pour la solution de 100 μM . Étant donné la difficulté de dissoudre le FDA à ces concentrations, elles n'ont pas été retenues pour la poursuite de nos travaux. À la lumière de nos résultats, la solution de 1 μM de FDA (concentration finale) a donc été sélectionnée comme marqueur potentiel de viabilité.

Des études ont ensuite été menées afin d'évaluer le temps nécessaire à l'obtention de lectures cytométriques optimales. Comme mentionné précédemment, les lectures devraient être prises dans la partie linéaire de la cinétique enzymatique. À une concentration finale de 1 μM de FDA, la phase linéaire se situe entre 5 et 45 min et le temps d'incubation devrait donc se situer à l'intérieur de cet intervalle de temps. Ce dernier devrait également être fonction du temps où une bonne démarcation de la fluorescence verte entre les algues témoin sans FDA et celles incubées avec le FDA est obtenue. Selon nos résultats, une démarcation optimale après 30 min d'incubation est observée, ainsi que l'illustre la figure 12. De plus, à ce temps, la cinétique enzymatique se retrouve dans la partie linéaire de la courbe et loin de la phase de plateau observée à 45 min. Pour conclure, nous avons donc choisi d'utiliser, à ce moment-ci de nos travaux le FDA à une concentration de 1 μM et les lectures cytométriques furent effectuées après 30 min d'incubation.

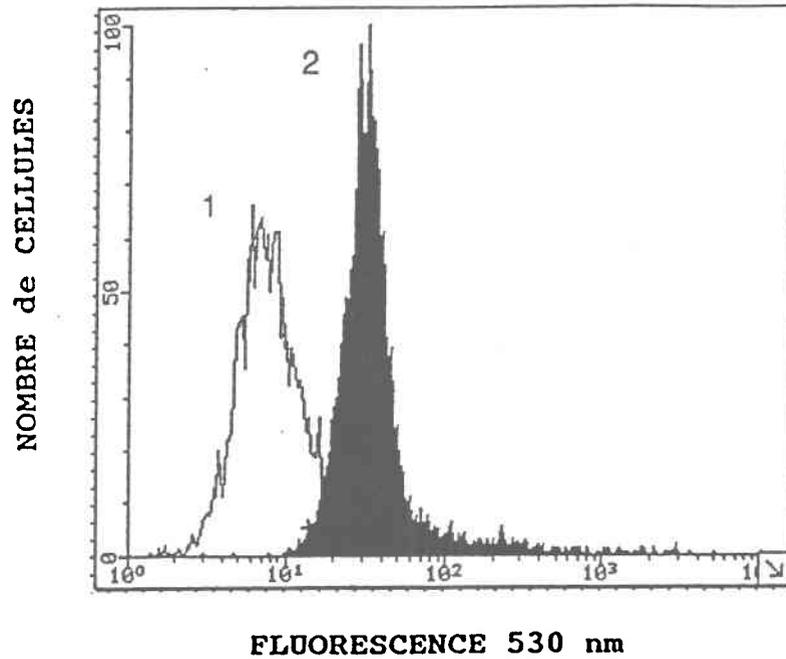
En guise de tests préliminaires de létalité des essais de toxicité de 96 h en microplaque ont été entrepris à l'aide des deux toxiques de

TABLEAU VII

Tests de Tukey ($p < 0.05$) effectués sur l'*autofluorescence* verte (530 nm) chez des témoins exposés à 0,05 % et 0,01 % d'acétone. Les groupes possédant la même lettre ne sont pas significativement différents entre eux.

GROUPES	TEMPS	n	\bar{x} URF*	Tukey
0.01 % *	0 min.	4	102.75	a
	5 min.	4	101.00	a
	30 min.	4	102.00	a
	70 min.	4	103.00	a
	90 min.	4	104.00	a
0.05 %	0 min.	3	412.67	a
	15 min.	3	424.67	a
	60 min.	3	427.33	a
	120 min.	3	426.33	a

*: les données ont été analysées à partir du logiciel LYSYS



- 1: population cellulaire non exposée au FDA
- 2: population cellulaire exposée au FDA

FIGURE 12. Histogramme de la fluorescence à 530 nm émise après une incubation de 30 min avec $1 \mu\text{M}$ de FDA chez l'algue *Selenastrum capricornutum*.

référence: le sulfate de cuivre et le chlorure de mercure. Le tableau VIII présente le pourcentage de mortalité pour chacune des concentrations de Cu^{2+} . La CL_{50} estimée par régression inverse (voir Matériel et Méthodes, section 2.8.4) est de 0.038 mg/L (I.C. 95%, 0.032 mg/L - 0.040 mg/L).

Afin de vérifier la répétabilité, un deuxième essai a été entrepris. Celui-ci n'a pas donné les résultats attendus. Les résultats présentaient une faible augmentation de fluorescence verte après l'incubation au FDA 1 μM . Le tableau IX résume les résultats obtenus lors de la première et de la deuxième expérimentation. Ce même essai a été repris avec le chlorure de mercure. L'hydrolyse du FDA présentait une seconde fois une réaction plus lente (tableau IX). Il se peut qu'à cette concentration, le K_m de la réaction enzymatique ne soit pas atteint. Ceci expliquerait une faible hydrolyse du FDA.

Suite à ces difficultés, les expériences préliminaires sur les toxiques de référence ont été reprises à une concentration finale de 5 μM de FDA. Afin de remédier au problème de dissolution du FDA mentionné auparavant, cette solution fut placée dans un bain à ultra son (Branson, Branson 8200) pendant 10 min. La nouvelle CL_{50} estimée pour le sulfate de cuivre fut identique à celle obtenue lors des expérimentations à 1 μM de FDA: 0.042 mg/L (I.C. 95%, 0.030 mg/L - 0.046 mg/L). Les résultats, tableaux et discussion des tests préliminaires avec les toxiqués de référence sont présentés à la section 3.3 (Résultats et Discussion). Les essais entrepris à 5 μM de FDA ont été concluants. Ils ont démontré que le temps d'incubation optimal (situé dans la phase linéaire de la courbe de cinétique) offrant une bonne démarcation de la fluorescence verte par rapport au témoin sans FDA est également situé à 30 min (voir figure 13). La viabilité cellulaire fut donc estimée par la suite à l'aide de 5 μM de FDA.

TABLEAU VIII

Pourcentages de mortalité obtenus pour chaque concentration de cuivre testée. L'activité estérasiqne a été évaluée avec 1 μ M de FDA.

[Cu ²⁺] mg/mL	% mortalité (\bar{x} de 2)
0.025	0.945
0.030	7.76
0.035	31.48
0.040	66.42
0.045	88.37
0.050	94.87

Régression linéaire

Ordonnée à l'origine = -127.246

Pente = 4.6262

Coefficient de corrélation = 97.80 %

CL₅₀ = 0.038 mg/mL

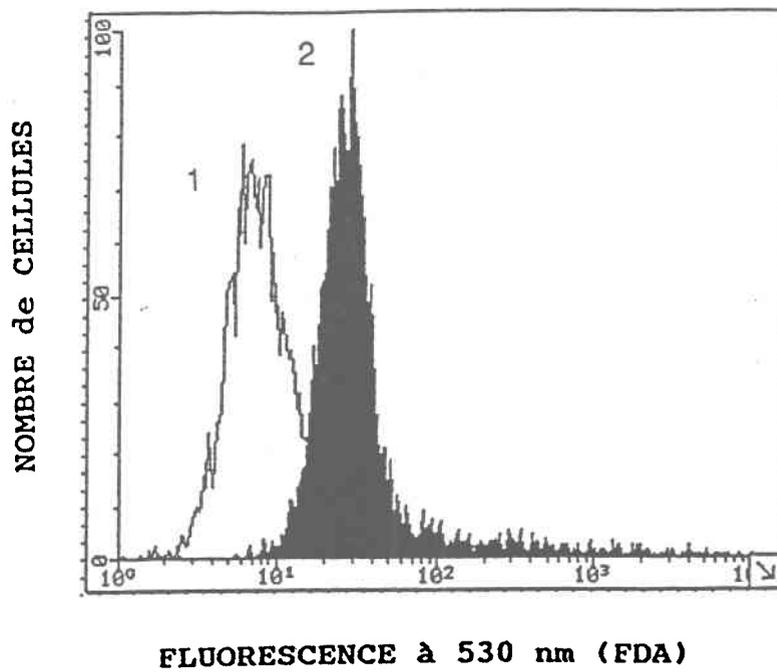
Intervalle de confiance (95 %) = 0.032 mg/mL - 0.040 mg/mL

TABLEAU IX

Analyse de Tukey ($p < 0.05$) effectuée sur la fluorescence à 530 nm du FDA 1 μM en fonction du temps d'incubation pour les témoins des expériences avec le sulfate de cuivre et le chlorure de mercure. Pour chacune des expériences, les groupes avec la même lettre ne sont pas significativement différents entre eux.

EXPERIENCES	TEMPS	n	\bar{x} URF* 530 nm	Tukey
Cu²⁺ 1^{ère} exp.				
sans FDA	0	2	54.21	a
avec FDA	20	2	111.46	b
	45	2	108.59	b
Cu²⁺ 2^{ème} exp.				
sans FDA	0	3	56.52	a
avec FDA	20	3	60.71	b
	30	3	61.17	b
	45	3	62.92	b
Hg²⁺ 1^{ère} exp.				
sans FDA	0	2	51.53	a
avec FDA	20	3	64.77	b
	40	3	69.83	c

*: les résultats ont été analysés avec le logiciel LYSYS



- 1: population cellulaire non exposée au FDA
- 2: population cellulaire exposée au FDA

FIGURE 13. Histogramme de la fluorescence à 530 nm émise après une incubation de 30 min avec 5 μ M de FDA chez l'algue *Selenastrum capricornutum*.

3.2- Validation du test de létalité algal

Le pourcentage de cellules viables et mortes est évalué par fenêtrage des deux populations visualisées à l'aide d'un cytogramme. La figure 4 (Matériel et Méthodes) illustre bien la démarcation des cytogrammes des deux populations. Afin de confirmer la fiabilité du fenêtrage à délimiter les cellules viables et non viables, des tests de vérification de la mortalité algale ont été effectués. Nous rappelons que la viabilité cellulaire est définie selon deux paramètres, soit par l'activité enzymatique des estérases mise en évidence par le FDA et par l'autofluorescence de la chlorophylle. Une cellule viable et saine émettra une fluorescence élevée à 530 nm (FDA) et à 650 nm (chlorophylle). La section 2.5 (Matériels et méthodes) décrit la méthodologie et les informations nécessaires à la bonne compréhension des sections qui suivent.

3.2.1- Mise en évidence de la mortalité cellulaire par des tests en milieu liquide.

La vérification de l'adéquation du fenêtrage des populations viables et non viables a été effectuée en examinant le cytogramme obtenu à partir d'une population de cellules tuées aux micro-ondes. Le repiquage de ces populations dans un milieu AAP 1X liquide ou gélosé a permis de vérifier la viabilité après une période d'incubation de 4 jours et de 12 jours, respectivement.

3.2.1.1- Tests préliminaires sur la mortalité après traitement des algues aux micro-ondes.

Afin de déterminer le temps nécessaire pour tuer les cellules par micro-ondes, les populations algales ont été exposées aux micro-ondes à des temps différents de 15, 30 et 60 s.

Dans le but de comparer l'intensité de fluorescence verte, suite à l'incubation au FDA, des cellules traitées et des cellules témoin, un test de

Tukey a été effectué (tableau X). Les résultats indiquent que les cellules exposées aux micro-ondes pendant 15 s fluorescent aussi intensément dans le spectre vert que les cellules témoin. Cependant, l'intensité de fluorescence verte chez les cellules traitées aux micro-ondes durant 30 et 60 s est significativement plus faible que les cellules témoin et ces deux groupes (30 s et 60 s) ne présentent pas de différence significative entre eux.

Pour vérifier la présence d'activité estérasique chez tous les groupes, des lectures cytométriques ont été prises avant et après incubation au FDA. L'augmentation significative de fluorescence, telle que déterminée par des tests de Mann-Whitney après incubation des cellules avec le FDA, viendra confirmer la présence de l'activité enzymatique. Un test non paramétrique fut sélectionné à cause d'une inégalité des variances entre les groupes.

Les résultats des tests présentés au tableau XI indiquent une augmentation significative de fluorescence verte suite à l'incubation au FDA pour le groupe témoin et les groupes traités aux micro-ondes durant 15 et 30 s. Ces résultats témoignent de la présence d'activité estérasique pour ces groupes. Par contre, les cellules traitées pendant 60 s ne possèdent plus d'activité enzymatique, car aucune différence significative de fluorescence verte après incubation au FDA n'est observée. Par contre, ce dernier groupe présente une autofluorescence verte plus élevée que les autres groupes. Les résultats des fluorescences obtenus pour chacun des groupes sont présentés au tableau AIX de l'annexe.

Berglund *et al.* (1987), mentionnent qu'une atteinte sévère au niveau du système chlorophyllien engendre une augmentation de l'autofluorescence verte à 530 nm dans le temps. Cette situation peut entraîner une mauvaise interprétation des résultats puisqu'il y a interférence entre la fluorescence verte liée au FDA et celle émise par le système chlorophyllien endommagé.

TABLEAU X

Évaluation de la fluorescence à 530 nm après incubation au FDA pour la population témoin et les groupes traités aux micro-ondes. Les groupes possédant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents entre eux (Tukey, $p < 0,05$)

GROUPES	n	\bar{x} URF* 530 nm
TEMOIN	3	109.45 (a)
MICRO-ONDES 15 S	3	110.23 (a)
MICRO-ONDES 30 S	3	103.33 (b)
MICRO-ONDES 60 S	3	103.56 (b)

*: les résultats ont été analysés avec le logiciel LYSYS

TABLEAU XI

Tests de Mann-Withney ($p < 0.05$) pour l'évaluation de la fluorescence à 530 nm chez les groupes témoin et traités aux micro-ondes avant et après incubation au FDA.

GROUPES	n	Mann-Withney H_0 : URF sans FDA = URF avec FDA
TEMOIN	3	rejetée
MICRO-ONDES 15 S	3	rejetée
MICRO-ONDES 30 S	3	rejetée
MICRO-ONDES 60 S	3	acceptée

H_1 : URF sans FDA < URF avec FDA

Dans le but de vérifier s'il y a atteinte du système chlorophyllien lors d'un traitement de 60 s aux micro-ondes, un test de comparaisons multiples (Tukey) a été effectué sur l'autofluorescence rouge (650 nm) émise par les populations des témoins et les groupes traités. Le même test a été effectué sur l'autofluorescence verte. Une baisse significative de l'autofluorescence rouge (650 nm) émise par la chlorophylle observée en même temps qu'une augmentation de l'autofluorescence verte (530 nm) émise par la chlorophylle endommagée signifiera qu'il y a un bris au niveau du système chlorophyllien. Les tests statistiques sont présentés au tableau XII.

Les résultats des tests démontrent qu'une baisse significative d'autofluorescence rouge est suivie dans ce cas d'une augmentation de l'autofluorescence verte pour le groupe traité pendant 60 s. Il semble qu'il y a présence d'un bris dans le photosystème chlorophyllien. Ceci pourrait expliquer, malgré l'absence de différence significative de la fluorescence verte entre les groupes traités 30 et 60 s aux micro-ondes (voir tableau X), la présence d'activité estérasiqque pour le groupe exposé 30 s. Dans ce cas, l'élévation de fluorescence verte est certainement causée par l'endommagement du système chlorophyllien.

Cette expérimentation appuie l'importance d'effectuer les lectures cytométriques avant et après l'incubation au FDA. Cette procédure permettra d'éviter de conclure faussement qu'une population cellulaire est viable alors qu'elle ne possède en réalité plus d'activité estérasiqque. Un bris dans le système chlorophyllien peut faire augmenter l'autofluorescence verte et, par ce fait, compliquer l'interprétation des résultats de la fluorescence verte émise par la fluorescéine.

Suite aux différents traitements, un volume de 100 μ L a été prélevé en duplicata pour chacun des groupes et ensemencé sur des géloses AAP 1X. Celles-ci ont été incubées pendant 12 jours à 24°C, sous luminosité continue. Après ce temps, un tapis d'algues était observé chez les géloses

TABLEAU XII

Évaluation de l'autofluorescence à 530 nm (spectre vert) et à 650 nm (spectre rouge, chlorophylle). Les groupes avec la même lettre ne sont pas significativement différents entre eux. Test de Tukey, $p < 0.05$, $n = 3$

GROUPES	\bar{x} URF* 530 nm	Tukey	\bar{x} URF* 650 nm	Tukey
TEMOIN	95.81	a	184.03	a
MICRO-ONDES 15 S	96.39	a	184.61	a
MICRO-ONDES 30 S	97.00	a	184.14	a
MICRO-ONDES 60 S	102.63	b	155.60	b

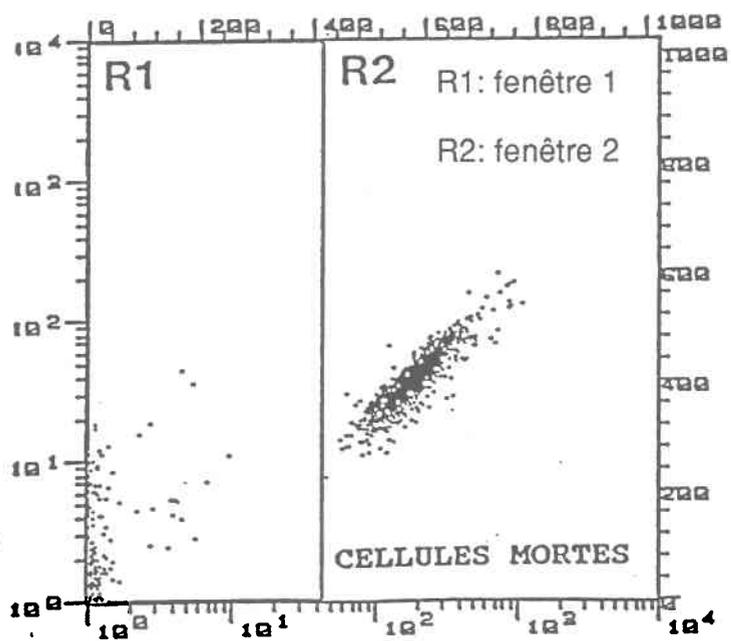
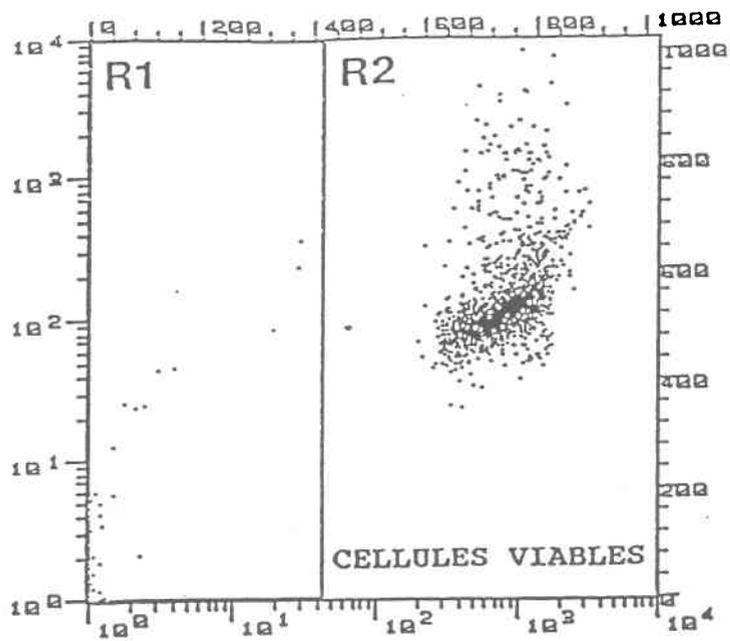
*: les résultats ont été analysés avec le logiciel FACScan

témoin, ainsi que chez les groupes traités 15 ou 30 s aux micro-ondes. Par contre, l'absence de croissance observée chez le groupe traité pendant 60 s confirmait la mortalité de la population.

En observant les cytogrammes à la figure 14, on remarque que la population des cellules mortes du groupe traité aux micro-ondes 60 s se retrouve dans la même fenêtre que celle des cellules viables du témoin. Ce patron cellulaire provient des populations qui n'ont pas été exposées au FDA. Même si une diminution significative de fluorescence rouge (chlorophylle) pour ce groupe est observée, la population ne se démarque pas de façon évidente de la population des cellules viables lorsque celle-ci n'est pas incubée en présence de FDA. Il est possible que la dégradation de la chlorophylle ne soit pas immédiate, ce qui expliquerait la présence de la population de cellules mortes dans la même fenêtre que la population des cellules viables. Par contre, suite à l'incubation au FDA, une élévation significative de la fluorescence verte du témoin est obtenue, signalant la présence de l'activité estérasique, mais aucune augmentation significative de fluorescence verte n'est observée chez le groupe exposé 60 s aux micro-ondes. Ces résultats sont illustrés à la figure 15. Puisque les tests de létalité sont effectués après une période d'exposition de 96 h, nous avons répété l'expérience en prenant des lectures au jour 0 et après 96 h. Le protocole expérimental est décrit à la section 2.5 (Matériel et Méthodes).

Suite aux traitements (micro-ondes), des observations microscopiques ont été faites sur les populations au jour 0. L'observation microscopique des cellules témoin et des groupes traités démontrait une morphologie semblable. Les algues du groupe exposé 60 s aux micro-ondes semblaient cependant présenter une courbure en croissant de lune moins prononcée que les algues des autres groupes. Il semble également que les traitements n'aient pas lysé les cellules puisque les dénombrements par hémacimètre des populations témoin et traitées étaient

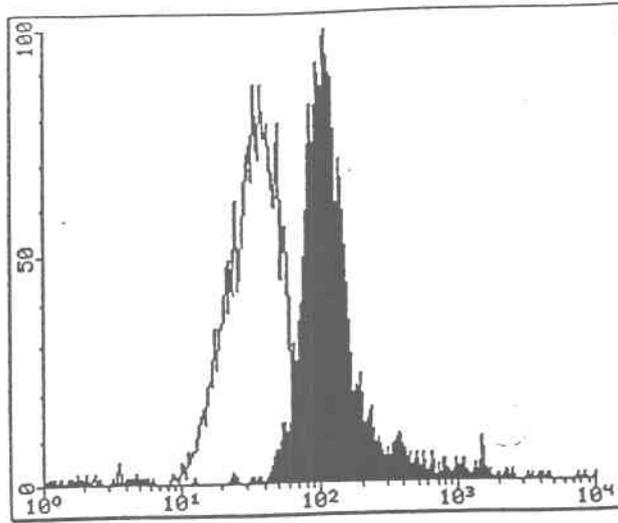
UNITÉ RELATIVE DE FLUORESCENCE à 530 nm (FDA)



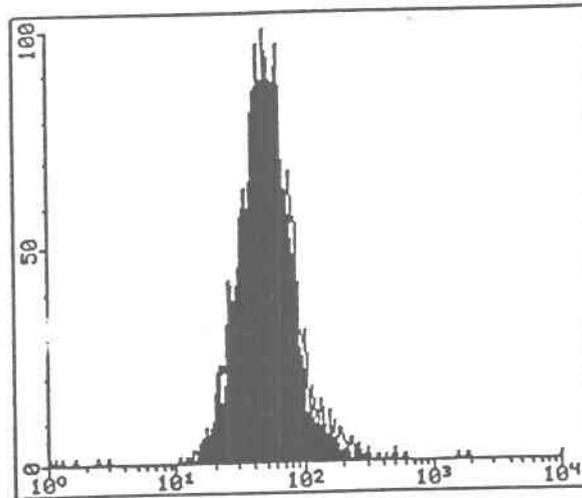
FLUORESCENCE à 650 nm (chlorophylle)

FIGURE 14. Cytogrammes illustrant les populations des cellules viables et mortes au jour 0.

NOMBRE de CELLULES



GROUPE TÉMOIN



GROUPE TRAITÉ

FLUORESCENCE à 530 nm (FDA)

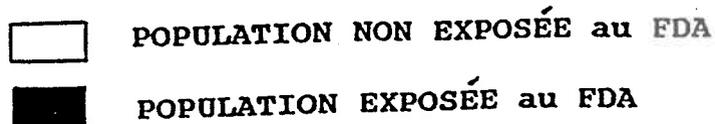


FIGURE 15. Histogrammes de la fluorescence à 530 nm de la population témoin et traitée aux micro-ondes après une incubation au FDA.

approximativement les mêmes soit entre 2×10^6 cellules. ml⁻¹ et $2,3 \times 10^6$ cellules/ml).

Afin de corroborer davantage les réponses cytométriques, les différents groupes ont également été examinés à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leitz, Laborlux S, objectif 40X) avant et après incubation au FDA. L'intensité de fluorescence verte suite à l'incubation était très nette chez les populations des témoins et les groupes traités 15 et 30 s aux micro-ondes. La fluorescence liée à la chlorophylle y était très évidente également. Par contre, pour tous les groupes une certaine quantité de débris fluoresçant très nettement dans le vert a été observée. Le groupe traité 60 s présentait plus de débris fluorescents que les autres groupes. Ceci s'explique probablement par des molécules de fluorescéine libérées des cellules mortes qui se sont adsorbées sur les débris cellulaires présents dans le milieu. Les cellules provenant du groupe traité 60 s démontraient une faible fluorescence chlorophyllienne et semblaient plus orangées. Par contre, une légère autofluorescence dans le vert a été observé. Aucune fluorescence liée au FDA n'a été confirmée par observation microscopique. La fiabilité des données cytométriques a donc été certifiée par ces observations microscopiques.

3.2.1.2- Tests en milieu liquide et solide suite à une exposition de 96 h.

Après l'observation microscopique de molécules de fluorescéine adsorbées sur des débris, des lectures cytométriques ont été prises avant et après centrifugation. Celle-ci permettait d'éliminer la présence des débris cellulaires pouvant causer des artéfacts. Elle fut effectuée à l'aide d'une centrifugeuse (Eppendorf) à 7 000 G, pendant 60 s. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 1 mL d'AAP 1X et mis sous glace afin d'arrêter la réaction enzymatique avant les lectures cytométriques. Pour cette expérimentation, nous avons uniquement travaillé avec le groupe traité 60 s aux micro-ondes caractérisé par des cellules mortes.

Des tests de Mann-Whitney ont permis d'évaluer la présence d'activité enzymatique chez le témoin au jour 0 et au jour 4 avant et après la centrifugation. Les tests statistiques sont présentés au tableau XIII et les résultats des fluorescences sont présentés au tableau AX de l'annexe. Le tableau AXI de l'annexe présente les résultats des lectures cytométriques des fluorescences obtenues avant et après incubation au FDA. Les tests statistiques confirment qu'il y a une augmentation significative de fluorescence verte après incubation au FDA. Par contre, les tests effectués sur le témoin après centrifugation indiquent une augmentation de fluorescence verte liée au FDA. Ces résultats sont probablement dus à l'augmentation de fluorescéine à l'intérieur de la cellule, l'hydrolyse du FDA ayant pu se poursuivre lors du laps de temps entre la centrifugation et les lectures cytométriques.

Ainsi que démontré lors des tests préliminaires, la fluorescence verte après incubation au FDA pour le groupe traité aux micro-ondes pendant 60 s est beaucoup plus faible que le témoin au jour 0 et au jour 4 (tableau XIII). Cependant, lorsque les algues ne sont pas centrifugées, une augmentation significative de fluorescence à 530 nm (spectre vert) est observée pour le groupe exposé aux micro-ondes après incubation au FDA ce qui suppose la présence d'activité estérasique (tableau XIV). Cette différence n'est plus visible après la centrifugation. Prosperi *et al.* (1986), spécifient que l'accumulation de fluorescéine à l'intérieur de la cellule est directement liée à l'intégrité membranaire. Le traitement aux micro-ondes a probablement causé une perte d'intégrité membranaire permettant un relargage rapide de fluorescéine dans le milieu. Ceci pourrait expliquer la perte de fluorescence verte après la centrifugation. Il est à supposer que l'augmentation de fluorescence verte observée avant la centrifugation suite à l'incubation au FDA provient de l'adsorption de la fluorescéine sur les débris du milieu. La viabilité cellulaire étant fonction de l'intégrité membranaire (Berglund *et al.*, 1988; Dorsey *et al.*, 1989), les cellules subissant une telle perte d'intégrité ne sont plus considérées comme

TABLEAU XIII

Évaluation de la fluorescence à 530 nm après incubation au FDA pour le groupe témoin et le groupe traité aux micro-ondes 60 s au jour 0 et au jour 4 (test de Mann-Withney, $p < 0.05$).

GROUPES	\bar{x} URF* 530 nm	Mann-withney H_0 : égalité des distributions
Témoin jour 0	137.927	
Micro-ondes jour 0	99.7	rejetée
Témoin jour 4	137.413	
Micro-ondes jour 4	98.22	rejetée

*: les résultats ont été analysés avec le logiciel FACScan

TABEAU XIV

Estimation de la fluorescence à 530 nm avant et après incubation au FDA pour les groupes témoin et traités aux micro-ondes 60 s. Le tableau présente les valeurs obtenues avant et après centrifugation au jour 0 et au jour 4 (tests de Mann-Withney, $p < 0.05$, $n = 3$).

GROUPES	\bar{x} URF 530 nm avant centrifugation	Mann- Withney $H_0: U_{11}=U_{12}$	\bar{x} URF 530 nm après centrifugation	Mann- Withney $H_0: U_{11}=U_{12}$
JOUR 0				
Témoin sans FDA	89.71		89.71	
Témoin avec FDA	137.93	rejetée	142.96	rejetée
Traité sans FDA	99.70		99.70	
Traité avec FDA	101.76	rejetée	99.73	acceptée
JOUR 4				
Témoin sans FDA	97.38		97.38	
Témoin avec FDA	137.41	rejetée	136.36	refusée
Traité sans FDA	95.45		95.45	
Traité avec FDA	98.22	rejetée	97.09	acceptée

viables. L'ensemencement de cette population et de la population témoin sur gélose AAP 1X (incubation de 12 jours) et en milieu liquide (incubation de 4 jours) a bien confirmé l'absence de viabilité cellulaire pour le groupe traité. Pour le groupe témoin, un tapis algal était présent sur gélose et une densité cellulaire de 1×10^6 cellule/mL a été dénombrée en milieu liquide.

Nous avons poursuivi l'incubation de la population traitée aux micro-ondes pendant 60 s afin de vérifier dans quelle fenêtre cette population se situerait.

Comme nous l'avions supposé lors du test préliminaire, un déplacement de la population du groupe traité (population non-viable) de la fenêtre 2 vers la fenêtre 1 est observé. Le cytogramme est illustré à la figure 16. Ce déplacement confirme que la population de cellules non viables se situera à l'intérieur de la fenêtre 1 après 96 h d'exposition. Ceci permet donc d'identifier rapidement les deux populations sans ambiguïté.

L'intensité relative de fluorescence liée à la chlorophylle (650 nm) pour le groupe traité aux micro-ondes diffère significativement de celle du témoin (test de Mann-Withney) au jour 0 et au jour 4 (tableau XV). Au jour 0, l'écart entre les moyennes des fluorescences pour la population témoin et la population traitée est beaucoup moins importante que l'écart entre le témoin au jour 0 et le groupe de cellules traitées au jour 4. Pour ce dernier, une baisse très significative d'autofluorescence à 650 nm est obtenue, alors que l'on passe d'une moyenne de 106.89 unités relatives de fluorescence (URF) au jour 0 à une moyenne de 14.54 URF au jour 4. Les histogrammes de la figure 17 illustrent bien cette diminution de fluorescence à 650 nm de la chlorophylle.

Les résultats du tableau XV confirment la présence d'une augmentation de la fluorescence à 650 nm de la chlorophylle pour le

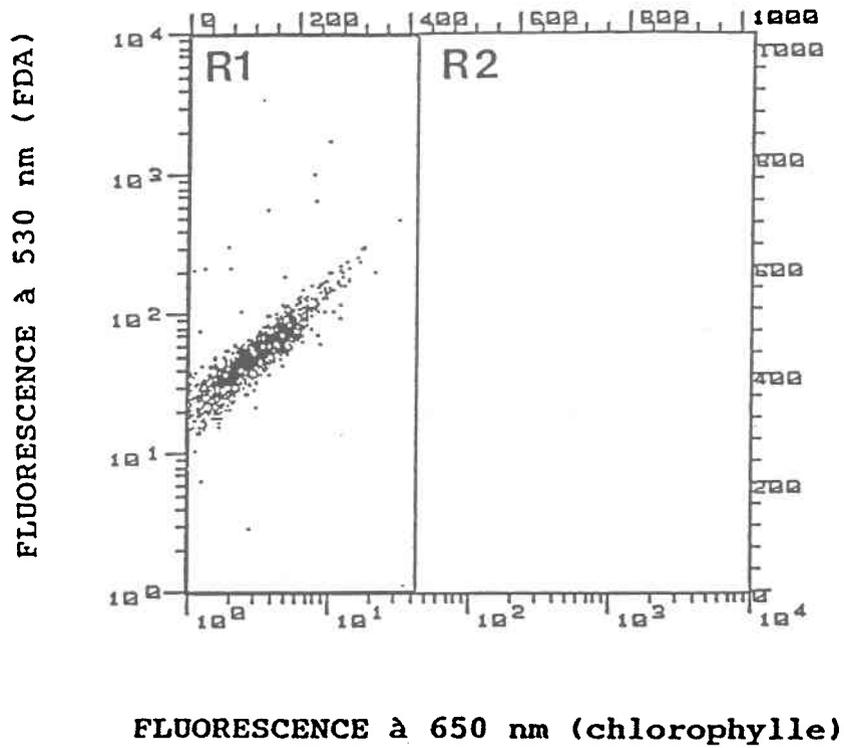


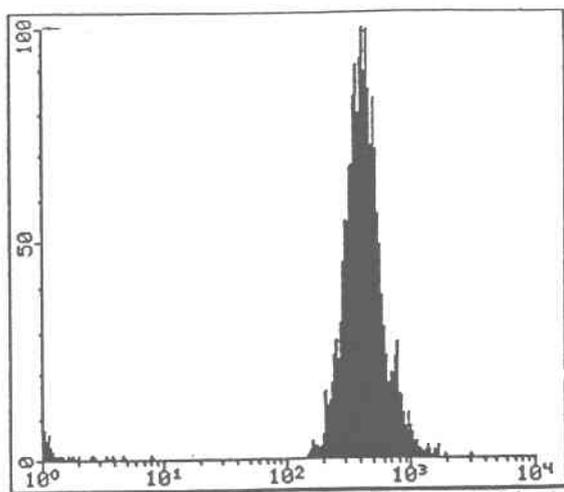
FIGURE 16. Cytogramme de la population traitée aux micro-ondes après 96 h d'incubation dans le milieu nutritif AAP 1X.

TABLEAU XV

Évaluation de l'intensité relative de fluorescence liée à la chlorophylle (650 nm) par des tests de Mann-Withney ($p < 0.05$) pour le témoin et le groupe traité aux micro-ondes durant 60 s au jour 0 et au jour 4 ($n = 3$).

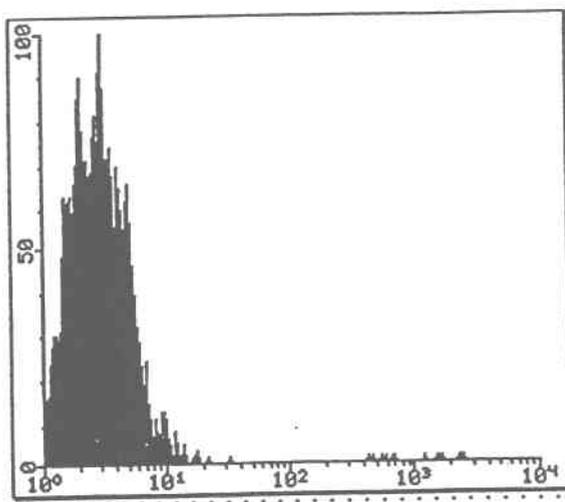
GROUPES	\bar{x} URF 650 nm	Mann- Withney
Témoin jour 0 vs témoin jour 4	115.78 182.07	rejetée
Témoin jour 0 vs traité jour 0	115.78 106.89	rejetée
Témoin jour 4 vs traité jour 4	182.07 14.54	rejetée
Traité jour 0 vs traité jour 4	106.89 14.54	rejetée

GROUPE TÉMOIN



NOMBRE de CELLULES

GROUPE TRAITÉ aux MICRO-ONDES



FLUORESCENCE À 650 NM (chlorophylle)

FIGURE 17. Histogrammes de la fluorescence chlorophyllienne de la population témoin et traitée aux micro-ondes après 96 h d'incubation dans le milieu nutritif AAP 1X.

témoin au jour 4. Ceci s'explique probablement par le fait que la population au jour 4 se situait au début de la phase logarithmique de croissance tandis que les algues du jour 0 provenaient d'une croissance de 8 jours (phase stationnaire de croissance).

3.3- Évaluation de la CL_{50} du sulfate de cuivre et du chlorure de mercure par cytométrie en flux.

La validation de la méthodologie développée pour l'estimation des CL_{50} par cytométrie a été accomplie à l'aide des toxiques de référence (le sulfate de cuivre et le chlorure de mercure). Afin de s'assurer de la qualité des tests, des tests standards algaux en microplaque estimant la CL_{50} ont été également effectués dans le but de comparer nos valeurs avec celles de la littérature.

Des solutions de travail de 0.055 mg/L et de 0.070 mg/L pour le Cu^{2+} et le Hg^{2+} , respectivement, ont été préparées pour l'expérimentation sur l'inhibition de croissance. Puisque la majorité des métaux s'adsorbent sur le verre (Goudey, 1987), la concentration de Cu^{2+} a été déterminée par absorption atomique 24 h après la préparation de la solution. Suite à une période d'exposition de 96 h des algues en présence des toxiques, la densité cellulaire a été déterminée à l'aide d'un compteur électronique de particules (Coulter Counter, modèle ZM) pour chacune des concentrations des toxiques. Les figures 18 et 19 illustrent les courbes dose-réponse obtenues pour les tests d'inhibition de croissance. Les pourcentages d'inhibition calculés pour chaque concentration sont présentés aux tableaux XVI et XVII pour le sulfate de cuivre et le chlorure de mercure, respectivement.

La CL_{50} 96 h estimée par régression linéaire pour le Cu^{2+} est de 0.025 mg/L (I.C. 95%: 0.022 mg/L - 0.027 mg/L; r: 97 %). Celle-ci se rapproche de la littérature (0.048 mg/L selon Hickey *et al.*, 1991; entre 0.052 mg/L et 0.104 mg/L selon Blaise *et al.*, 1986; 0.006 mg/L selon van Coillie *et*

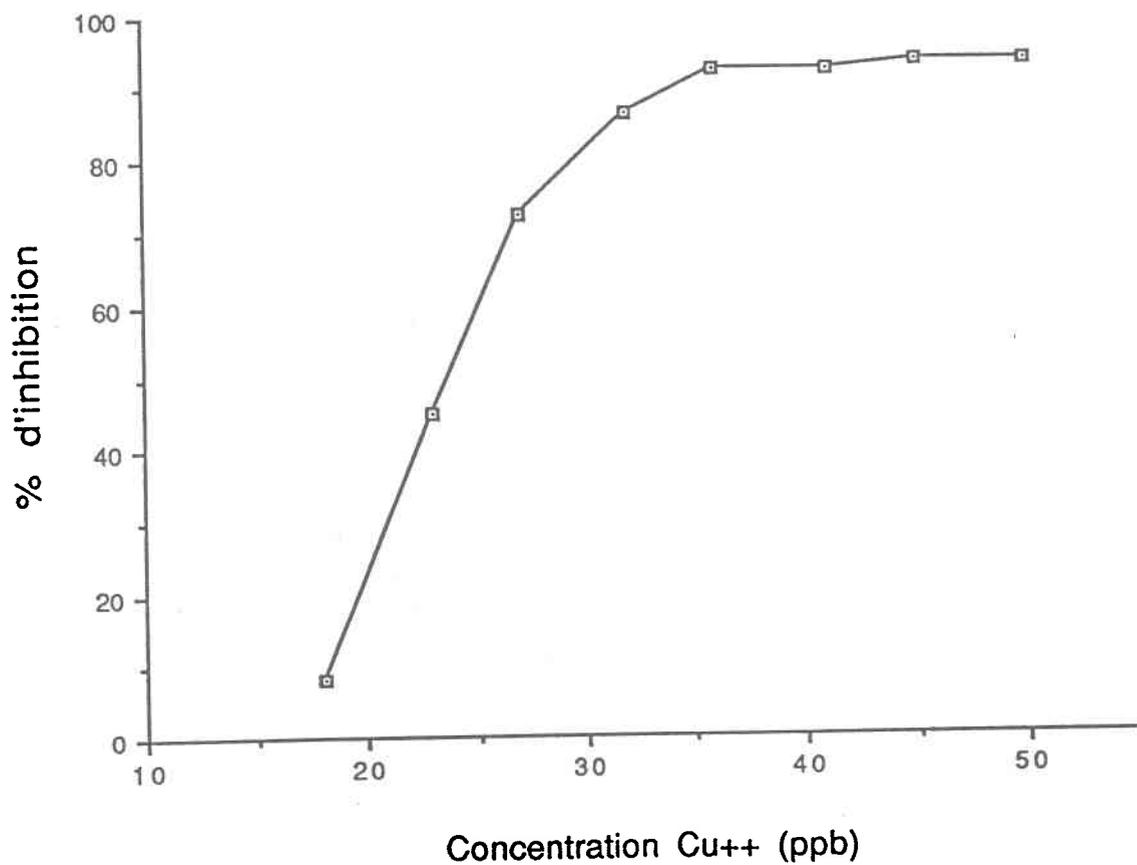


FIGURE 18. Courbe dose-réponse du test d'inhibition de croissance après une exposition de 96 h des algues en présence du cuivre.

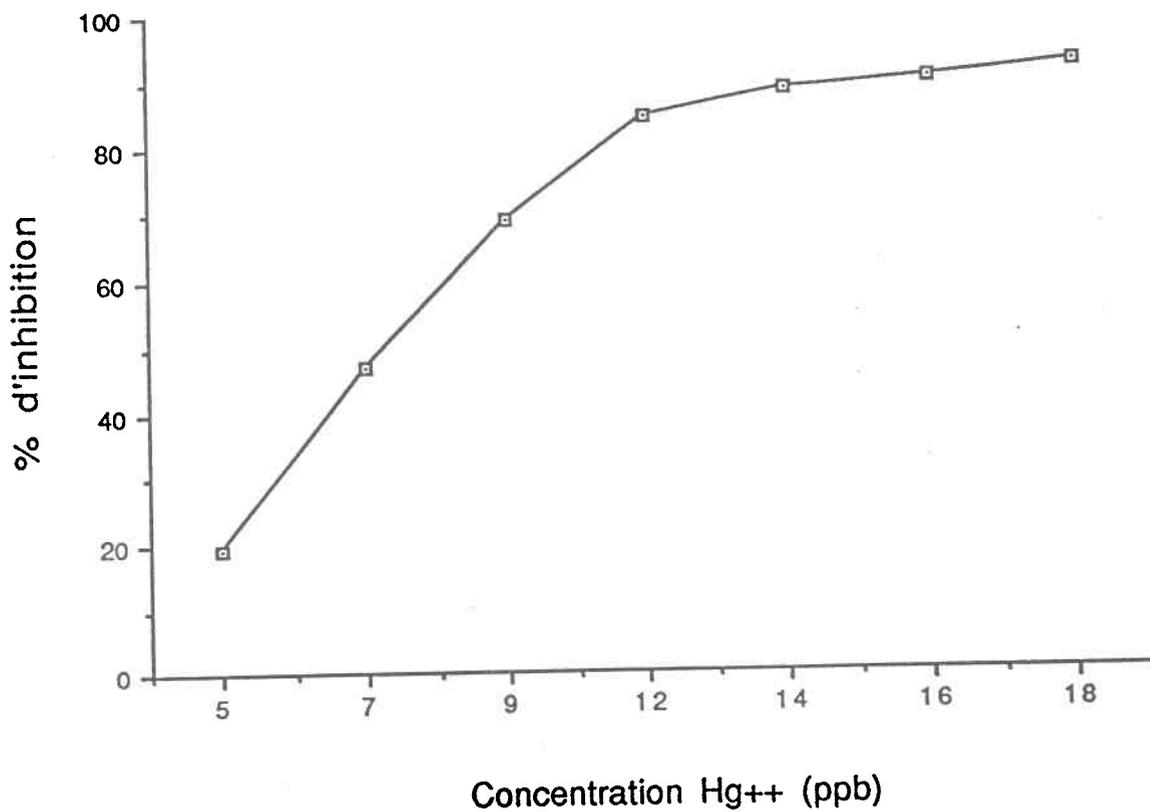


FIGURE 19. Courbe dose-réponse du test d'inhibition de croissance après une exposition de 96 h des algues au mercure.

TABLEAU XVI

Pourcentages d'inhibition de croissance obtenus après l'exposition de 96 h des algues en présence du Cu²⁺.

Concentrations Cu ²⁺ mg/L	n	Coefficients de variation (%)	Inhibition de croissance (%)
0.050	3	16.6	92.7
0.045	3	17.0	92.9
0.041	3	1.0	92.6
0.036	3	9.2	92.5
0.032	3	9.8	86.3
0.027	3	4.7	71.6
0.023	3	2.8	45.2
0.018	3	8.3	7.9

Régression linéaire

Pente: 5.75

Ordonnée à l'origine: -91.0320

Coefficient de corrélation: 97 %

TABLEAU XVII

Pourcentages d'inhibition de croissance obtenus après l'exposition de 96 h des algues en présence du Hg^{2+} .

Concentrations Hg^{2+} mg/L	n	Coefficients de variation (%)	Inhibition de croissance (%)
0.018	3	16.6	91.6
0.016	3	17.0	90.1
0.014	3	1.0	88.1
0.012	3	9.2	83.7
0.009	3	9.8	68.5
0.007	3	4.7	47.2
0.005	3	4.6	18.6

Régression linéaire

Pente: 7.75

Ordonnée à l'origine: -10.6693

Coefficient de corrélation: 97 %

al., 1982), compte tenu de la variabilité des réponses pour les tests algaux (Thellen *et al.*, 1989; van Coillie *et al.*, 1982). La différence observée avec la littérature peut s'expliquer également par la méthode utilisée pour déterminer la concentration du cuivre. Plusieurs auteurs ne mentionnent pas si leurs concentrations ont été déterminées de façon nominale ou quantitative, ce qui peut entraîner également des variations dans l'estimation des CI_{50} .

La CI_{50} 96 h estimée par régression linéaire pour le Hg^{2+} est de 0.008 mg/L (I.C. 95%: 0.006 mg/L - 0.010 mg/L; $r = 97\%$). Celle-ci est semblable à la CI_{50} rapportée par Hickey *et al.*, 1991, estimée à 0.020 mg/L (I.C. 95%: 0.007 mg/L - 0.035 mg/L). Suite à l'évaluation des CI_{50} 96 h pour ces deux toxiques, les tests de létalité ont été entrepris.

Les résultats des tests de létalité sont illustrés à la figure 20 et le tableau AXII à l'annexe rapporte les pourcentages de viabilité. Les algues intoxiquées par le sulfate de cuivre localisées dans la fenêtre 2 (fenêtre des cellules viables) présentent une activité estérasiqne et une fluorescence élevée de la chlorophylle caractéristiques des cellules viables. Le tableau AXIII de l'annexe expose les valeurs des fluorescences (à 530 nm et 650 nm) obtenues pour le groupe témoin et le groupe exposé aux différentes concentrations de sulfate de cuivre pour les populations des deux fenêtres (viables et non viables).

Des tests sur l'égalité des distributions (Student modifié, $p < 0.05$) avant et après incubation au FDA pour les populations situées à l'intérieur de chacune des fenêtres ont été effectués dans le but de vérifier la présence d'activité enzymatique. Les tests réalisés sur la population de la fenêtre 2 indiquent que l'intensité de fluorescence à 530 nm présente une augmentation significative après incubation au FDA, confirmant ainsi

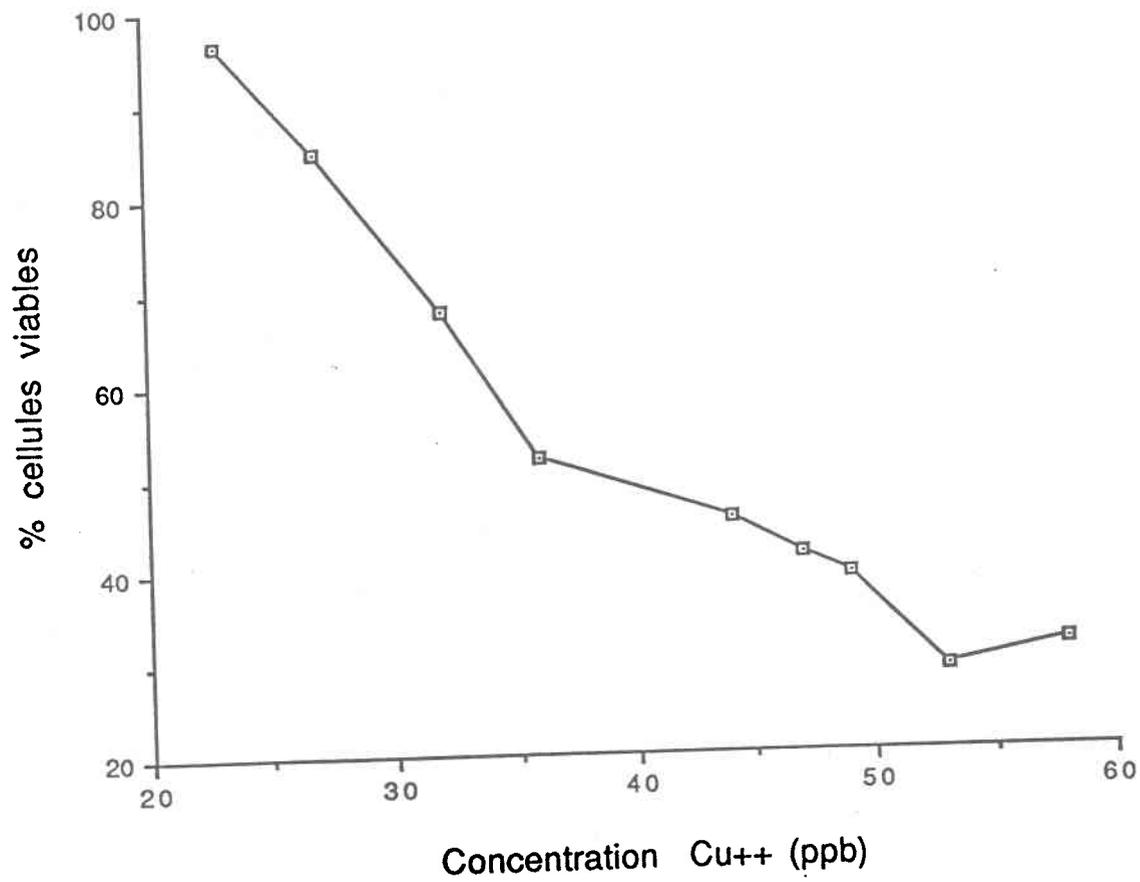


FIGURE 20. Pourcentage de viabilité des cellules algales après une exposition de 96 h au cuivre.

l'activité estérasique. Par contre, les tests effectués sur la population située dans la fenêtre 1 indiquent l'absence d'activité estérasique pour la majorité des groupes puisque les cellules algales fluorescent à la même intensité avec ou sans FDA (tableau XVIII). Une différence significative des fluorescences à 530 nm après l'ajout du FDA pour cinq populations localisées dans la fenêtre 1 est observée: le témoin et les groupes exposés à 0.032 mg/L, 0.047 mg/L, 0.053 mg/L et 0.058 mg/L de Cu^{2+} . Pour le groupe témoin et celui exposé à 0.032 mg/L de Cu^{2+} , l'augmentation de fluorescence suite à l'incubation au FDA s'explique soit par une faible activité estérasique encore présente, soit par des molécules de fluorescéine adsorbées sur des débris cellulaires tel que mentionné précédemment. Cette augmentation de fluorescence demeure tout de même très faible à comparer avec l'intensité de fluorescence obtenue pour les populations cellulaires situées dans la fenêtre 2. L'intensité de fluorescence se démarque par un facteur de 10 pour le témoin soit une moyenne de 18.93 URF, population de la fenêtre 1, contre 101.88 URF (tableau AXIII à l'annexe), population de la fenêtre 2. Pour le groupe exposé à 0.032 mg/L de Cu^{2+} , la moyenne est de 72,42 URF, population de la fenêtre 1, et de 123,88 URF (tableau AXIII à l'annexe), population de la fenêtre 2. La différence moins élevée chez cette dernière est expliquée par l'augmentation de l'autofluorescence à 530 nm des populations intoxiquées localisées dans la fenêtre 1 (voir tableau XIX). La fluorescence à 650 nm de la chlorophylle pour tous les groupes exposés au sulfate de cuivre est également très faible chez la population localisée dans la fenêtre 1 (tableau AXIII à l'annexe). Malgré quelques différences significatives pour la fluorescence à 530 nm (FDA), les cellules témoin et les groupes exposés retrouvés à l'intérieur de la fenêtre 1 sont non viables. Le tableau XX présente les pourcentages de mortalité obtenus résultant du test de létalité. La CL_{50} 96 h estimée par régression linéaire est de 0.042 mg/L (I.C. 95%: 0.030 mg/L - 0.046 mg/L; r: 96 %). Les résultats indiquent que la CL_{50} est plus élevée que la Cl_{50} d'un facteur de deux. Les concentrations algostatiques et algicides ne sont donc pas éloignées l'une de l'autre. Le

TABLEAU XVIII

Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1 par des tests de Student ou Student modifié (lors d'une inégalité des variances). Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.05$ ou $0,0005$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le sulfate de cuivre.

GROUPES [Cu ²⁺] mg/L	\bar{x} URF* sans FDA	\bar{x} URF* avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	7.40	18.93	rejetée ¹
0.023	15.32	31.02	acceptée ¹
0.027	38.29	50.00	acceptée ¹
0.032	63.15	72.42	rejetée ¹
0.036	63.26	69.31	acceptée ¹
0.042	63.88	56.27	acceptée ²
0.044	70.53	73.33	acceptée ²
0.047	82.61	78.93	rejetée ²
0.049	85.52	75.25	acceptée ²
0.053	86.08	111.14	rejetée ²
0.058	84.34	76.01	rejetée ²

*: les résultats ont été obtenus à l'aide du logiciel LYSYS

1: test de Student modifié ($p < 0,0005$)

2: test de Student ($p < 0,05$)

μ_1 : moyenne en URF pour les groupes non-exposés au FDA

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

TABLEAU XIX

Évaluation de l'augmentation de l'autofluorescence à 530 nm par un test de Tukey ($p < 0,05$) chez les populations cellulaires localisées dans la fenêtre 1 et 2 lors des expérimentations avec le sulfate de cuivre. Les groupes possédant la même lettre ne sont pas significativement différents entre eux.

GROUPES [Cu ²⁺] mg/L	\bar{x} URF* fenêtre 1	\bar{x} URF* fenêtre 2
Témoin	7.4 a	83.02 a
0.023	15.31 b	86.10 a
0.027	38.28 c	85.50 a
0.032	63.15 d	95.02 b
0.036	63.26 d	96.12 b
0.042	63.88 d	115.01 b
0.044	70.53 e	104.35 b
0.047	82.60 e	106.93 b
0.049	85.51 e	114.19 c
0.053	83.41 e	114.50 c
0.058	84.34 e	117.12 c

*: les résultats ont été obtenus par le logiciel LYSYS

TABLEAU XX

Pourcentages de mortalité obtenus chez *Selenastrum capricornutum* après une exposition de 96 h au Cu^{2+} .

[Cu ²⁺] mg/L	C.V%	Mortalité %
Témoin	10.8	0
0.023	10.5	3.84
0.027	12.3	15.29
0.032	6.6	33.05
0.036	8.6	47.99
0.044	13.9	54.35
0.047	6.69	58.57
0.049	10.40	60.90
0.053	1.47	71.50
0.058	4.51	68.58

cuiivre présente une forte toxicité chez l'algue *S. capricornutum* puisque ses effets létaux se manifestent à de faibles concentrations.

Les résultats du test de létalité algal effectué avec le chlorure de mercure indiquent aussi la présence de populations de cellules non viables (fenêtre 1) et viables (fenêtre 2). La population viable diminue avec l'augmentation de la concentration du chlorure de mercure. Afin de vérifier la présence d'activité estérasique des populations situées à l'intérieur des deux fenêtres, des tests de Student ont été effectués entre les groupes non-exposés au FDA et les groupes exposés. L'augmentation significative de fluorescence à 530 nm après incubation au FDA confirme la présence de l'activité estérasique. Les résultats des tests apparaissent au tableau XXI et les fluorescences (530 nm et 650 nm) obtenues lors de l'expérimentation sont présentés au tableau AXIII de l'annexe.

Les tests de Student évaluant l'activité estérasique de la population située dans la fenêtre 1 confirment bien son absence, car il n'y a pas de différence significative entre la fluorescence à 530 nm avant et après incubation au FDA pour tous les groupes exposés aux différentes concentrations de Hg^{2+} . Chez ces derniers, l'autofluorescence liée à la chlorophylle est également très faible et significativement différente de la population localisée dans la fenêtre 2 (voir tableau XXII). Cette population est donc représentative de cellules non-viables. Par contre, une différence significative est observée pour la fluorescence à 530 nm lors de l'ajout du FDA chez la population témoin (tableau AXIV à l'annexe). Ainsi que commenté lors de l'analyse des résultats sur les tests de létalité avec le sulfate de cuiivre, l'autofluorescence à 650 nm et la fluorescence liée au FDA sont tellement faibles qu'on considère non viable le groupe localisé dans la fenêtre 1 de la population témoin. Le tableau XXIII rapporte les pourcentages de mortalité obtenus à partir des concentrations de Hg^{2+} retenues pour la régression linéaire.

TABLEAU XXI

Évaluation de l'activité estérasiqne (fluorescence à 530 nm) pour la population située dans la fenêtre 2 par des tests de Student ($p < 0,05$).

GROUPES [Hg ²⁺] mg/L	\bar{x} URF* sans FDA	\bar{x} URF* avec FDA	Student H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$
Témoin	342.25	532.75	Rejetée
0.005	343.00	553.33	Rejetée
0.009	345.33	538.00	Rejetée
0.014	341.33	563.33	Rejetée
0.018	364.00	567.33	Rejetée
0.023	413.33	601.33	Rejetée
0.027	413.00	577.33	Rejetée
0.036	451.33	590.00	Rejetée
0.045	442.33	623.00	Rejetée
0.055	460.00	641.00	Rejetée

*: les résultats obtenus ont été analysés par le logiciel FACScan
 μ_1 : moyenne en URF à 530 nm des groupes non exposés au FDA
 μ_2 : moyenne en URF à 530 nm des groupes exposés au FDA

TABLEAU XXII

Comparaison de l'autofluorescence de la chlorophylle (650 nm) de la population située dans la fenêtre 1(1) à celle située dans la fenêtre 2 (2) par des tests de Student ($p < 0,05$) pour les différentes concentrations de mercure.

GROUPES [Hg ²⁺] mg/L	\bar{x} URF* (1)	\bar{x} URF* (2)	Student H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$
Témoin	38.00	871.33	rejetée
0.005	213.67	852.00	rejetée
0.009	65.67	859.00	rejetée
0.014	81.00	854.67	rejetée
0.018	70.00	879.00	rejetée
0.023	137.33	913.33	rejetée
0.027	166.00	924.00	rejetée
0.036	92.66	943.67	rejetée
0.045	31.67	948.67	rejetée
0.055	44.00	954.33	rejetée

*: les résultats ont été analysés avec le logiciel FACScan

TABLEAU XXIII

Pourcentages de mortalité obtenus chez *Selenastrum capricornutum* après une exposition de 96 h au Hg^{2+} .

[Hg^{2+}] mg/L	n	Coefficient de variation (%)	Mortalité (%)
0.018	3	5.79	37.78
0.023	3	2.24	59.61
0.027	3	4.81	71.55
0.036	3	7.51	86.48
0.045	3	3.05	94.9

La CL₅₀ déterminée est de 0.021 mg/L (I.C. 95%: 0.015 - 0.026 mg/L; r: 97%). Le Hg²⁺ présente donc une toxicité élevée chez l'algue *S. Capricornutum*.

Les résultats des tests statistiques effectués sur l'autofluorescence à 530 nm (spectre vert) de la chlorophylle, indiquent qu'il y a endommagement du photosystème pour les deux tests. En effets, la fluorescence verte, liée à la chlorophylle endommagée, augmente en fonction des concentrations de métaux. Parallèlement, une diminution de la fluorescence à 650 nm (spectre rouge) de la chlorophylle en fonction de l'augmentation des concentrations des toxiques est observée. Le cuivre et le mercure agissent sur le photosystème soit en inhibant l'activité photosynthétique ou en réduisant son contenu cellulaire (Rai *et al.*, 1981; Bartlett *et al.*, 1974). Les analyses cytométriques confirment bien ces effets.

3.4- Phytotoxicité des herbicides

3.4.1- 2,4-D

Le 2,4-D (acide acétique 2,4-Dichlorophénoxy) est un analogue des auxines (hormone de régulation de la croissance chez les plantes supérieures). Il appartient à la famille des acides phénoxyques. Il est un herbicide de type systémique qui s'introduit directement dans le tissu végétal. Son mode d'action stimule de façon excessive la croissance occasionnant la formation d'un tissu tumoral destructeur. Malgré que les auxines soient inexistantes chez les algues, le 2,4-D agirait chez ces dernières en inhibant le processus du transport d'énergie dans le photosystème (Miller *et al.*, 1985).

À partir d'une solution mère de 1,18 g de 2,4-D diluée dans 50 mL d'acétone 100%, une solution aqueuse de 45 mg/L (eau Super Q) a été préparée pour le test de létalité et une solution de 29,50 mg/L (eau Super Q) a été préparée pour le test d'inhibition de croissance. Le pourcentage final d'acétone le plus élevé pour ces deux tests était de 0,9%. À cette concentration aucune toxicité n'a été observée pour les tests de 96 h d'inhibition de croissance (St-Laurent *et al.*, 1992). Afin de vérifier si l'acétone pouvait provoquer un effet létal après 96 h d'exposition, nous avons effectué des tests préliminaires de létalité. Dans une microplaque, les algues étaient exposées à 0,9% d'acétone et une autre microplaque servait de témoin. La concentration cellulaire au jour 0 était d'environ 20000 cellules/mL. Après l'exposition de 96 h, des lectures cytométriques ont été prises afin de mesurer le pourcentage de mortalité. À partir de 10 puits sélectionnés au hasard dans chaque microplaque, aucune différence significative n'a été observée entre le groupe témoin et le groupe traité à l'acétone (voir tableau XXIV). Pour tous les tests algaux entrepris par la suite où l'acétone était utilisé comme véhicule, les témoins ont toujours été soumis au même pourcentage d'acétone que les groupes traités.

Les CI_{50} et CL_{50} du 2,4-D calculées par régression linéaire sont de 24,16 mg/L (I.C. 95%: 19,10 mg/L - 28,41 mg/L; r : 88 %) et de 33,37 mg/L (I.C. 95%: 29,94 mg/L - 36,80 mg/L; r : 98 %), respectivement. Les valeurs obtenues pour les deux paramètres de mesures (CI_{50} et CL_{50}) sont très semblables. Les pourcentages de mortalité et d'inhibition sont présentés aux tableaux XXV et XXVI. Puisque les CI_{50} mesurées sont estimées à partir d'un compteur électronique de particules qui ne permet pas de différencier les cellules viables et mortes, il est possible de mesurer autant les cellules mortes que les cellules viables. De plus, les observations microscopiques ont confirmé que les cellules algales mortes peuvent garder leur forme même après 96 h (voir section 3.2.1.2). La cytométrie permet l'acquisition d'une information supplémentaire importante pour l'interprétation biologique des résultats. Puisque les deux paramètres de

TABLEAU XXIV

Pourcentages de viabilité obtenus après une exposition de 96 h des cellules algales à 0.9 % d'acétone.

GRUPE TÉMOIN (%)	GRUPE TRAITÉ (%)
97.9	91.2
86.3	95.8
89.1	83.4
93.1	91.3
82.4	98.1
93.3	88.3
95.8	85.4
91.4	93.4
88.6	90.2
92.8	95.5

TABLEAU XXV

Pourcentages de mortalité chez l'algue *Selenastrum capricornutum* après une exposition de 96 h à l'herbicide 2,4-D.

Concentration mg/L	n	C.V. %	Mortalité %
42.01	3	0.9	94.08*
40.98	3	2.7	83.05*
39.88	3	7.7	69.12*
34.93	3	8.8	54.51*
25.64	3	16.4	21.53*
24.78	3	18.2	2.16*

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

CL₅₀: 33,37 mg/L

I.C. 95%: 29,94 mg/L - 36,80 mg/L

Ordonnée à l'origine: -91.129

Pente: 4.22

TABLEAU XXVI

Pourcentages d'inhibition de croissance chez l'algue *Selenastrum capricornutum* après une exposition de 96 h à l'herbicide 2,4-D.

Concentration mg/L	n	C.V. %	Inhibition %
29.03	3	8.2	97.5
28.56	3	10.6	93.4
28.20	3	4.6	87.1
27.73	3	12.7	78.7
27.26	3	3.6	80.2*
26.79	3	7.4	66.3*
26.31	3	5.1	59.8*
25.84	3	12.2	52.6
25.49	3	5.1	29.9*

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

CI₅₀: 24,16 mg/L

I.C. 95%: 19,10 mg/L - 28,41 mg/L

Ordonnée à l'origine: -670.27

Pente: 30.35

mesure sont très proche l'un de l'autre, le 2,4-D semble agir de façon algicidal plutôt qu'algistatique aux concentrations testées.

Afin de certifier la présence d'activité estérasique, des tests de Student ont été effectués sur la fluorescence à 530 nm (verte) pour chacune des concentrations et ce pour les cellules de la fenêtre 1 (cellules non viables) et de la fenêtre 2. Une différence significative de fluorescence verte après ajout du FDA démontrera la présence d'activité estérasique. Les résultats des tests sont présentés aux tableaux XXVII et XXVIII. Ces derniers confirment la présence d'une activité estérasique pour tous les groupes situés dans la fenêtre 2 (tableau XXVIII). Par contre, une augmentation de fluorescence verte après ajout du FDA est observée pour plusieurs concentrations de 2,4-D (tableau XXVII) pour le groupe situé dans la fenêtre 1. Ceci est peut être attribuable à la présence d'une certaine activité estérasique et/ou à des débris cellulaires sur lesquels des molécules de fluorescéine pourraient être liées (voir section 3.2.1.1 et 3.2.1.2). Cependant, même si l'activité estérasique persiste pour ces groupes, l'autofluorescence chlorophyllienne y demeure faible et significativement différente du groupe de cellules localisé dans la fenêtre 2 (voir tableau XXIX). Ceci traduit très certainement une conséquence létale. Les résultats des fluorescences pour tous les groupes en fonction des concentrations de 2,4-D sont présentés au tableau AXV à l'annexe.

Le 2,4-D, se solubilisant plus facilement dans les alcools et les solutions alcalines, n'est pas sujet au lessivage ou à l'écoulement de surface vers les ruisseaux ou les plans d'eau (SAGE, 1988). Il est rapidement adsorbé par la matière organique du sol. De plus, les micro-organismes dégradent facilement le 2,4-D si les conditions du milieu sont favorables à leur développement. En comparaison, il semble peu toxique pour la truite (358 mg/L⁻¹ en test statique) et ne se bioaccumule pas chez les organismes aquatiques (SAGE, 1988). Nos résultats suggèrent que les algues y sont plus sensibles. Les résidus de 2,4-D peuvent persister de 2

TABLEAU XXVII

Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1 par des tests de Student ou Student modifié (lors d'une inégalité des variances). Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.05$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le 2,4-D.

GROUPES [2,4-D] mg/L	\bar{x} URF sans FDA	\bar{x} URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	73.2	124.2	acceptée ¹
42.01	183.3	348.0	rejetée ²
40.98	203.7	338.0	rejetée ²
39.88	179.3	337.7	rejetée ¹
34.93	179.3	345.3	rejetée ²
25.64	213.3	370.3	acceptée ¹
24.78	144.0	126.0	acceptée ¹

1: test de Student modifié

2: test de Student

μ_1 : moyenne en URF pour les groupes non-exposés au FDA

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

TABLEAU XXVIII

Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 2 par des tests de Student ou Student modifié (lors d'une inégalité des variances). Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.05$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le 2,4-D.

GROUPES [2,4-D] mg/L	\bar{x} URF sans FDA	\bar{x} URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	252.6	484.2	rejetée ²
42.01	380.3	438.7	rejetée ¹
40.98	379.0	471.3	rejetée ¹
39.88	368.7	418.0	rejetée ²
34.93	399.7	454.7	rejetée ¹
25.64	354.0	476.7	rejetée ²
24.78	334.0	482.3	rejetée ²

1: test de Student modifié

2: test de Student

μ_1 : moyenne en URF pour les groupes non-exposés au FDA

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

TABLEAU XXIX

Évaluation de l'intensité de l'autofluorescence chlorophyllienne (spectre rouge à 650 nm) des populations situées dans les fenêtres 1 et 2 par des tests de Student. Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.05$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le 2,4-D.

GROUPES [2,4-D] mg/L	\bar{x} URF fenêtre 1	\bar{x} URF fenêtre 2	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	99.6	692.0	rejetée
42.01	62.6	736.7	rejetée
40.98	90.3	741.7	rejetée
39.88	84.7	751.3	rejetée
34.93	88.3	768.3	rejetée
25.64	43.0	756.0	rejetée
24.78	102.7	759.0	rejetée

à 6 mois dans le plancton et les plantes aquatiques (SAGE, 1988). À ce point de vue, le 2,4-D peut donc représenter un danger pour le phytoplancton ainsi que pour les organismes qui s'en alimentent.

3.4.2- Diquat dibromide

Le diquat dibromide (6,7-dihydrodipyrido[1,2- α :2',1'-c]pyrazinediium ion (9,10-dihydro-8a, 10a-diazoniaphenanthrene-2A), est un herbicide de la famille des ammoniums quaternaires. Il est généralement utilisé pour aider à la culture de légumineuses mais peut être également utilisé pour combattre les algues. Soluble dans l'eau, il est souvent appliqué directement dans le milieu aquatique. Le diquat cationique forme des radicaux libres stables responsables de l'activité herbicidale. Lors de l'activité photosynthétique, l'ion superoxyde est généré et provoque des dommages cytoplasmiques et membranaires. Puisque le diquat est un dication, il est rapidement inactivé par les minéraux du sol (Douglas, 1987).

Une solution aqueuse de 0.060 ml/L (eau Super Q) a été préparée pour l'expérimentation à partir de la solution mère contenant 25% de diquat dibromide (P.M.: 257 g/L). Les CI_{50} et CL_{50} obtenues pour cet herbicide sont de 0.009 mg/L (I.C. 95%: 0.008 mg/L - 0.010 mg/L; r: 97 %) et de 0.072 mg/L (I.C. 95%: 0.049 mg/L - 0.095 mg/L; r: 97 %), respectivement. Ces résultats indiquent que le diquat dibromide présente une forte toxicité pour l'algue *S. capricornutum*. Les tableaux XXX et XXXI exposent les résultats des pourcentages d'inhibition et de mortalité observés pour chacun des tests. Les deux paramètres de mesure indiquent que le diquat provoque son effet algistatique à des concentrations qui se distinguent nettement de celles qui s'avèrent algicides.

Les tests de Student effectués sur la fluorescence verte à 530 nm indiquent que pour les deux populations de la fenêtre 1 (tableau XXXII) et de la fenêtre 2 (XXXIII), qu'il y a présence d'une activité estérasiq

TABLEAU XXX

Pourcentages d'inhibition de croissance chez l'algue *Selenastrum capricornutum* après une exposition de 96 h à l'herbicide diquat dibromide.

Concentration mg/L	n	C.V. %	Inhibition %
0.014	3	2.5	78.6
0.013	3	8.1	78.4*
0.011	3	2.7	68.7*
0.010	3	2.0	59.2*
0.008	3	5.9	39.5*
0.007	3	7.2	17.1*
0.005	3	2.3	2.5
0.004	3	3.0	3.9

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

CI₅₀: 0.009 mg/L

I.C. 95%: 0.008 mg/L - 0.010 mg/L

Ordonnée à l'origine: -46.03

Pente: 11.13

TABLEAU XXXI

Pourcentages de mortalité chez l'algue *Selenastrum capricornutum* après une exposition de 96 h à l'herbicide diquat dibromide.

Concentration mg L ⁻¹	n	C.V. %	Mortalité %
0.127	3	4.19	93.69*
0.091	3	11.21	65.13*
0.073	3	20.65	44.41*
0.036	3	25.77	25.95*

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

CL₅₀: 0.072 mg L⁻¹

I.C. 95%: 0.049 mg L⁻¹ - 0.095 mg L⁻¹

Ordonnée à l'origine: -4.90

Pente: 0.76

TABLEAU XXXII

Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1 par des tests de Student ou Student modifié (lors d'une inégalité des variances). Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.05$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le diquat.

GROUPE [diquat] mg/L	\bar{x} URF sans FDA	\bar{x} URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	94.17	230	rejetée ²
127.27	391.7	520.3	rejetée ²
90.91	321.3	502.0	rejetée ¹
72.73	304.7	494.7	rejetée ¹
36.36	312.0	504.0	rejetée ²

1: test de Student modifié

2: test de Student

μ_1 : moyenne en URF pour les groupes non-exposés au FDA

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

TABLEAU XXXIII

Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 2 par des tests de Student. Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.05$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le diquat dibromide.

GROUPE [diquat] mg/L	\bar{x} URF sans FDA	\bar{x} URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	344.2	579.2	rejetée
127.27	487.7	697.7	rejetée
90.91	401.0	727.3	rejetée
72.73	388.0	717.7	rejetée
36.36	394.3	754.0	rejetée

μ_1 : moyenne en URF pour les groupes non-exposés au FDA

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

des différences significatives entre les fluorescences vertes avant et après l'ajout de FDA sont évidentes. L'observation visuelle, à l'aide d'un microscope à fluorescence, a cependant confirmé que l'augmentation de la fluorescence verte pour le groupe localisé dans la fenêtre 1, suite à l'ajout du FDA, pourrait être attribuable aux molécules de fluorescéine adsorbées sur des cellules. La diminution d'autofluorescence chlorophyllienne suggère fortement que ces cellules sont non viables. Beaucoup de molécules de fluorescéine étaient également adsorbées sur des débris cellulaires. Puisque le diquat dibromide affecte la membrane cellulaire, il est supposé que les cellules ont relarguées rapidement la fluorescéine dans le milieu, ce qui traduit un état de non viabilité (Berglund *et al.*, 1988).

Une centrifugation aurait du être faite suite à l'ajout du FDA pour éliminer les débris cellulaires et les cellules mortes sur lesquels les molécules de fluorescéine se sont adsorbées (voir section 3.2.1.2). Après cette étape, des lectures cytométriques auraient permis de justifier la létalité cellulaire de façon plus certaine. Cependant, l'intensité de fluorescence verte liée à l'activité estérasique est beaucoup plus élevée pour la population située dans la fenêtre 2, représentant les cellules viables (tableau XXXIII). De plus, l'autofluorescence chlorophyllienne à 650 nm est très faible (voir tableau AXVI de l'annexe) pour les cellules situées dans la fenêtre 1 confirmant ainsi que les cellules sont dans un état de non viabilité.

3.4.3- Métolachlore

Le métolachlore (2-chloro-6'ethyl-N-(2-methoxy-1-methylethy)acet-*O*-toluidide) appartient à la famille des alpha-chloro-acétamides. Le mécanisme d'action du métolachlore est encore peu connu mais puisqu'il possède les mêmes caractéristiques chimiques que d'autres membres de cette famille tels le propachlore et l'alachlore, il semble raisonnable d'assumer qu'il possède le même mode d'action (Chairman, 1983). Le métolachlore est un inhibiteur de croissance des racines. Il peut également endommager l'intégrité membranaire et inhiber la synthèse lipidique et

protéique. En milieu naturel, le métolachlore est rapidement adsorbé par les acides humiques et autres matières organiques des sols. Il n'est donc ni sujet au transport par ruissellement ni par le lessivage des sols. De plus, il est facilement biodégradé par les microorganismes du sol et présente une faible toxicité en général (SAGE, 1988).

À partir d'une solution mère, 0.181 mg a été prélevé et dilué dans 250 mL d'acétone. Un volume de 10 mL y a été prélevé et dilué dans 100 mL d'eau Super Q afin d'obtenir une solution de 78.554 mg/L à 10% d'acétone. De celle-ci, des solutions de travail ont été préparées. Le pourcentage final d'acétone le plus élevé était de 0,6% ce qui demeure en dessous du seuil toxique vis-à-vis *S. capricornutum*.

Les CI_{50} et CL_{50} obtenues par régression linéaire pour cet herbicide sont de 0.069 mg/L (I.C. 95%: 0.058 mg/L - 0.081 mg/L; r : 91 %) et 0.232 mg/L (I.C. 95%: 0.211 mg/L - 0.238 mg/L; r : 85 %), respectivement. Les résultats du test d'inhibition sont présentés au tableau XXXIV et ceux du test de létalité au tableau XXXV. Avec une CI_{50} 3 fois plus élevée que la CL_{50} , les concentrations algicides du métolachlore ne sont pas tellement éloignées de celles qui sont algistatiques. Contrairement à la faible toxicité réputée pour cet herbicide (Audus, 1976), nos données indiquent qu'il est relativement toxique pour *S. capricornutum* puisque ses effets algicides se manifestent bien en deçà de 1 mg/L. Son innocuité vis-à-vis des microalgues du milieu récepteur n'est donc pas nécessairement assuré.

L'activité estérasiqne estimée par des tests de Student est révélée pour les groupes de la fenêtre 1 (tableau XXXVI) et de la fenêtre 2 (tableau XXXVII). La présence de cette activité chez les populations de la fenêtre 1 peut être causée par des artéfacts tels des molécules de fluorescéine adsorbées sur les débris cellulaires ou les cellules mortes, perte d'intégrité membranaire, etc. Par contre, le système chlorophyllien présente des

TABLEAU XXXIV

Pourcentages d'inhibition de croissance chez l'algue *Selenastrum capricornutum* après une exposition de 96 h à l'herbicide métolachlore.

Concentration mg/L	n	C.V. %	Inhibition %
0.086	3	10.8	72.6*
0.082	3	21.6	63.1*
0.072	3	3.9	59.3*
0.066	3	12.0	48.3*
0.060	3	8.6	28.2*

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

CL₅₀: 0.069 mg/L

I.C. 95%: 0.058 mg/L - 0.081 mg/L

Ordonnée à l'origine: -50.20

Pente: 1.44

TABLEAU XXXV

Pourcentages de mortalité chez l'algue *Selenastrum capricornutum* après une exposition de 96 h à l'herbicide métolachlore.

Concentration mg/L	n	C.V. %	Mortalité %
0.500	3	4.7	90.63
0.454	3	6.0	89.51*
0.364	3	10.5	78.11*
0.345	3	18.9	74.49*
0.327	3	25.9	67.26*
0.300	3	7.42	62.29*
0.200	3	14.32	54.07*
0.164	3	13.35	26.15*

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

CI₅₀: 0.232 mg/L

I.C. 95%: 0.211 mg/L - 0.238 mg/L

Ordonnée à l'origine: 4.67

Pente: 0.195

TABLEAU XXXVI

Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1 par des tests de Student. Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.05$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le métolachlore.

GROUPES [metolachl.] mg/L	\bar{x} URF sans FDA	\bar{x} URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	24.6	213.6	rejetée
0.500	18.3	323.7	rejetée
0.454	28.0	329.0	rejetée
0.364	39.0	357.7	rejetée
0.345	45.0	369.7	rejetée
0.327	65.7	367.7	rejetée
0.273	57.7	309.0	rejetée
0.200	33.7	300.0	rejetée
0.164	64.3	332.0	rejetée

μ_1 : moyenne en URF pour les groupes non-exposés au FDA

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

TABLEAU XXXVII

Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 2 par des tests de Student. Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.05$) effectués sur les données de l'expérimentation avec le métolachlore.

GROUPES [metolachl.] mg/L	x URF sans FDA	x URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	212.0	551.2	rejetée
0.500	738.7	949.7	rejetée
0.454	825.7	952.0	rejetée
0.364	790.0	961.0	rejetée
0.345	771.3	954.0	rejetée
0.327	779.7	942.0	rejetée
0.273	743.3	947.3	rejetée
0.200	291.7	951.3	rejetée
0.164	622.0	930.0	rejetée

μ_1 : moyenne en URF pour les groupes non-exposés au FDA

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

signes d'endommagement très nets puisque l'autofluorescence est très faible (voir tableau AXVII à l'annexe).

2.4.4- Atrazine

L'atrazine (2,4-diamine, 6-chloro-N-ethyl-N'--(1-methylethyl)-1,3,5-triazine), appartenant à la famille des s-chloro-triazines, présente un mode d'action identique au diuron. Elle se lie au centre réactionnel du PSII (photosystème II) empêchant ainsi le transfert des électrons de la protéine QA à QB (figure 21). L'atrazine est relativement soluble dans l'eau (30 mg/L à 20°C). Elle peut être adsorbée sur les particules du sol mais être désorbée facilement par la pluie (SAGE, 1988) et se retrouver dans le milieu aquatique. La quantité d'atrazine transportée lors d'une forte pluie est inversement reliée à la période de temps entre l'application d'atrazine et le moment où la pluie se produit (Klaine *et al.*, 1988). Par contre, dans le milieu aquatique, l'atrazine ne s'accumule pas dans les niveaux trophiques supérieurs. Elle est relativement non toxique pour les invertébrés et les poissons mais présente une forte toxicité pour le phytoplancton (Buser, 1990). Elle inhibe la photosynthèse à des concentrations aussi faibles que de 0.001 à 0.005 mg/L.

À partir d'une solution mère de 0.3 mg/L, nous avons préparé une solution aqueuse de 0.1 mg/L. Suite à l'incubation des algues en présence d'atrazine à différentes concentrations, les pourcentages d'inhibition et de mortalité ont été calculés. Les tableaux AXIII et AXIV à l'annexe présentent les résultats des fluorescences obtenus pour les deux tests.

Les CI_{50} et CL_{50} se caractérisant par des valeurs de 0.026 mg/L (I.C. 95%: 0.019 mg/L - 0.032 mg/L; r: 90%) et de 0.026 mg/L (I.C. 95%: 0.023 mg/L - 0.027 mg/L; r: 92%), respectivement. Les tableaux XXXVIII et XXXIX présentent les résultats des tests. Puisque les deux paramètres de mesure sont identiques et que les effets délétères sont détectés à de faibles

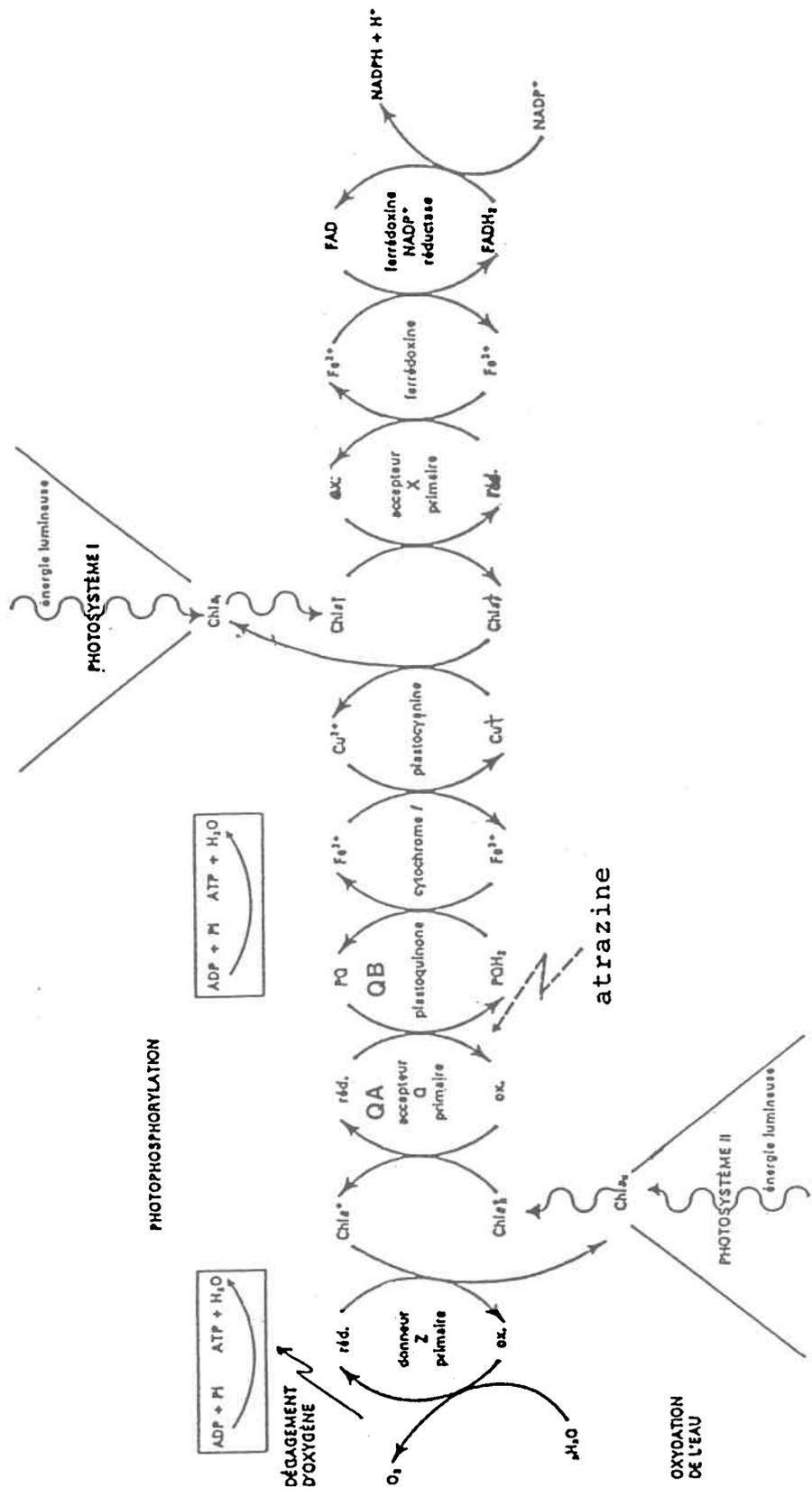


FIGURE 21. Mode d'action de l'atrazine dans la chaîne d'électrons du photosystème

TABLEAU XXXVIII

Pourcentages d'inhibition de croissance chez l'algue *Selenastrum capricornutum* après une exposition de 96 h à l'atrazine.

Concentration mg/L	n	C.V. %	Inhibition %
0.036	3	10,0	91,1*
0.032	3	0,8	85,7*
0.027	3	3,2	77,8*
0.025	3	1,3	29,3*
0.021	3	9,6	20,9*
0.016	3	6,8	-34,2

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

CI₅₀: 0.026 mg/L

I.C. 95%: 0.019 mg/L - 0.032 mg/L

Ordonnée à l'origine: -78,44

Pente: 4,95

TABLEAU XXXIX

Pourcentages de mortalité chez l'algue *Selenastrum capricornutum* après une exposition de 96 h à l'atrazine.

Concentration mg/L	n	C.V. %	mortalité %
0.055	3	2,73	82,72
0.050	3	4,23	82,90
0.045	3	2,00	79,45*
0.040	3	4,05	74,74*
0.035	3	3,06	69,23*
0.030	2		64,15*
0.027	3	11,49	53,46*
0.023	3	25,07	40,54*
0.018	3	40,53	5,48

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

CL₅₀: 0.026 mg/L

I.C. 95%: 0.023 mg/L - 0.027 mg/L

Ordonnée à l'origine: 6,77

Pente: 1,69

Coefficient de corrélation: 91,7%

concentrations, l'atrazine présente un potentiel toxique élevé chez l'algue *S. capricornutum*. Afin d'expliquer ces résultats, plusieurs hypothèses (autres que celles mentionnées précédemment) peuvent être formulées. Il se peut qu'un effet létal aigu puisse être produit dans les quelques heures après l'ajout de l'atrazine, tuant ainsi une bonne partie de la population algale. Les cellules encore viables se sont par la suite multipliées. Il est également possible que le premier effet délétère soit l'inhibition de croissance puisque l'atrazine intervient au niveau du photosystème et que l'énergie nécessaire à la croissance n'est pas adéquatement fournie par l'activité photosynthétique. Pour cette dernière hypothèse, les effets létaux se produisent beaucoup plus tard. Dans les deux cas, les cellules les plus résistantes pourront se multiplier. Ces hypothèses s'appliquent d'ailleurs pour tous les toxiques démontrant des effets (sub) létaux (CI₅₀ et CL₅₀) identiques.

Afin de mieux comprendre la nature de l'effet toxique, un suivi de la toxicité devrait être fait quotidiennement pendant la période d'exposition de 96 h. Des lectures cytométriques sur une base journalière pourraient nous informer de l'état réel des algues et à quel moment la létalité algale commence à se manifester. Cette information serait pertinente puisque les effets de toxicité aigus seraient connus et permettraient une meilleure connaissance du risque environnemental. En effet, les plus grandes pertes d'atrazine des terres agricoles vers le milieu aquatique se produisent lors des premières averses de pluie suite à l'épandage. Elles peuvent atteindre des moyennes de 1 à 5 % (Klaine *et al.*, 1988). Une forte concentration d'atrazine se retrouve dans le milieu dans un court laps de temps. Le phytoplancton est donc sujet à subir une exposition aiguë d'atrazine ou autres herbicides.

Quelques chercheurs se sont intéressés aux bioessais en laboratoire afin d'évaluer la toxicité de l'atrazine. Selon les travaux de Gala et Giesy (1990) qui ont étudié l'effet de l'atrazine vis-à-vis de l'algue *S.*

capricornutum à l'aide de la cytométrie en flux, ils estimèrent à 0.128 mg/L une diminution de 50% du taux de croissance spécifique. Ces résultats furent obtenus suite à une exposition de 48 h parce qu'ils n'observèrent pas d'augmentation de la mortalité après 48 h à cette concentration. Cette différence entre les expériences de Gala et Giesy et les nôtres peut s'expliquer par la technique employée pour réaliser le test algal. Gala et Giesy utilisèrent le test algal en erlenmeyers selon le protocole développé par la US EPA (1978) tandis que nous avons utilisé le test algal miniaturisé en microplaque développé par Blaise *et al.*, (1986). De plus une variabilité interlaboratoire pourrait expliquer la différence observée (Thellen *et al.*, 1989; van Coillie *et al.*, 1982). Selon notre protocole la létalité algale est fonction de deux variables (l'autofluorescence chlorophyllienne et la fluorescence liée au FDA). Gala et Giesy (1990) quant à eux, ne l'estiment qu'en tenant compte de la fluorescence liée au FDA. Ceci peut également affecter le calcul du pourcentage de cellules mortes. Suite à l'endommagement du photosystème, on peut enregistrer une augmentation de l'autofluorescence verte à 530 nm qui interfère avec la fluorescence liée au clivage du FDA (fluorescence verte à 530 nm). En ne tenant pas compte de cette autofluorescence verte avant l'ajout du FDA, il est possible de surestimer les cellules viables uniquement par la mesure de la fluorescence à 530 nm. Selon les résultats obtenus lors des expériences avec l'atrazine, on observe, à certaines concentrations, une autofluorescence verte très élevée chez les cellules ne présentant aucune activité estérasique. Cette autofluorescence verte peut même être presque aussi élevée que la fluorescence verte liée au clivage du FDA chez les cellules viables du témoin (voir tableaux LX et LXI). Des erreurs d'interprétations sont donc facilement introduites et amènent une surestimation du pourcentage de cellules viables. L'unique mesure de la fluorescence verte ne peut à elle seule certifier l'état de la cellule. Il semble plus prudent d'estimer la létalité algale en tenant compte de l'autofluorescence chlorophyllienne et de la fluorescence verte liée au clivage du FDA par les estérases.

TABLEAU LX

Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1 par des tests de Student ou Student modifié (lors d'une inégalité des variances). Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.05$) effectués sur les données de l'expérimentation avec l'atrazine.

GROUPES [Atrazine] mg/L	\bar{x} URF sans FDA	\bar{x} URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	60.24	127.5	rejetée ¹
0.018	179.00	141.33	acceptée ¹
0.023	219.00	147.68	acceptée ¹
0.027	170.00	127.68	acceptée ¹
0.030	202.50	143.50	rejetée ²
0.035	157.68	169.00	acceptée ¹
0.040	148.68	127.00	acceptée ²
0.045	121.33	164.33	acceptée ¹
0.050	174.68	183.00	acceptée ²
0.055	212.68	172.00	acceptée ¹

1: test de Student modifié

2: test de Student

μ_1 : moyenne en URF pour les groupes non-exposés au FDA

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

TABLEAU LXI

Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 2 par des tests de Student ou Student modifié (lors d'une inégalité des variances). Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.05$) effectués sur les données de l'expérimentation avec l'atrazine.

GROUPE [Atrazine] mg/L	\bar{x} URF sans FDA	\bar{x} URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	336.00	425.00	rejetée ²
0.018	348.00	450.67	rejetée ²
0.023	370.68	465.68	rejetée ²
0.027	389.33	475.33	rejetée ²
0.030	417.00	505.68	rejetée ¹
0.035	405.33	509.33	rejetée ²
0.040	400.33	514.33	rejetée ²
0.045	410.68	528.68	rejetée ²
0.050	426.33	528.00	rejetée ²
0.055	424.33	529.68	rejetée ²

1: test de Student modifié

2: test de Student

μ_1 : moyenne en URF pour les groupes non-exposés au FDA

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

Butler *et al.* (1975) effectuèrent des études en laboratoire afin de déterminer les effets de l'atrazine sur l'inhibition de croissance. Ils déterminèrent qu'à des concentrations aussi faibles que 0.01 mg/L des effets inhibiteurs étaient mesurés chez les algues. McCloskey et Bayer (1990) observèrent une diminution de 50% de l'évolution de l'oxygène, paramètre nous informant de l'état de l'activité photosynthétique, à une concentration de 0.043 mg/L d'atrazine.

Afin d'évaluer l'activité estérasiq, des tests de Student sur la fluorescence verte (530 nm) avant et après ajout de FDA ont été réalisés pour le groupe situé dans la fenêtre 1 et le groupe situé dans la fenêtre 2. Les valeurs brutes des fluorescences se retrouvent au tableau AXV de l'annexe. Les tableaux LX et LXI exposent les résultats des tests statistiques effectués sur la fluorescence verte pour les deux populations (fenêtre 1 et fenêtre 2). La population cellulaire localisée dans la fenêtre 1 ne présente aucune activité estérasiq à l'exception du groupe témoin. La fluorescence chlorophyllienne présente une faible intensité et témoigne donc que les cellules sont dans un état létal (tableau AXVIII à l'annexe).

3.4.5- Cyanazine

La cyanazine (2-[[4-chloro-6-(éthylamino)-s-triazine-2-yl]-2-methylpropionitrile) appartient à la même famille d'herbicide que l'atrazine (s - chloro-triazines) et présente une grande solubilité (171 mg/L à 25°C). Elle est donc encore plus soluble que l'atrazine. Sa DL₅₀ (dose létale) orale observée chez le rat est de 334 mg/kg alors que celle de l'atrazine, est de 1990 mg/kg (Stevens et Summer, 1991). Jusqu'à présent, très peu d'études ont été publiées sur la toxicité de la cyanazine pour le phytoplancton. Sa solubilité peu favoriser son entrée dans le milieu aquatique lors de précipitations suite à son application sur les terres agricoles. La cyanazine est souvent utilisée avec l'atrazine pour combattre les mauvaises herbes dans les cultures de maïs (SAGE, 1988).

Une solution mère de 30 mg/L a été préparée et rediluée pour obtenir une solution de travail de 0.030 mg/L pour le test de létalité. Pour le test d'inhibition de croissance, une solution de travail de 0.10 mg/L a été utilisée. Suite à l'exposition de 96 h des algues en présence de la cyanazine à différentes concentrations, le pourcentage d'inhibition de croissance et de mortalité ont été évalués.

Les tableaux LXII et LXIII présentent les résultats obtenus pour les tests d'inhibition de croissance et de mortalité algale, respectivement. La Cl_{50} a été estimée à 0.059 mg/L (I.C. 95%: 0.047 mg/L - 0.072 mg/L; r: 97 %) et la CL_{50} à 0.146 mg/L (I.C. 95%: 0.124 mg/L - 0.207 mg/L; r: 81 %).

Ces deux paramètres de toxicité ne sont pas identiques, comme c'est le cas pour l'atrazine, et démontrent une toxicité moins importante. La cyanazine demeurent toutefois relativement phytotoxique puisque ses effets (sub) létaux chroniques se manifestent à moins de 1 mg/L.

L'activité estérasique des populations cellulaires localisées dans chacune des deux fenêtres est présentée aux tableaux LXIV et LXV. Les résultats démontrent la présence d'une activité estérasique pour la population localisée dans la fenêtre 2 (tableau LXV) tandis qu'aucune activité estérasique n'est mise en évidence pour la population située dans la fenêtre 1 (tableau LXIV). Par contre, une forte **autofluorescence verte** avant l'ajout du FDA est observée et diminue après l'incubation au FDA (tableau LXIV). Nous ne pouvons offrir l'explication de ce phénomène puisque nous n'avons pu investir d'avantage durant nos travaux. Il est concluant, cependant, de constater qu'il n'y a pas eu d'augmentation de la fluorescence verte (FDA) chez les groupes de la fenêtre 1, et que ceci reflète bien des populations algales non viables. Les résultats des fluorescences sont présentés au tableau AXVI de l'annexe.

TABLEAU LXII

Pourcentages d'inhibition de croissance chez l'algue *Selenastrum capricornutum* après une exposition de 96 h à la cyanazine.

Concentration mg/L	n	C.V. %	Inhibition %
0.091	3	2.3	69.1*
0.082	3	0.7	64.4*
0.073	3	4.7	58.6*
0.064	3	5.7	56.0*
0.055	3	0.9	49.4*
0.045	3	3.6	43.7
0.036	3	9.8	34.4
0.027	3	6.0	23.0
0.018	3	7.3	18.8
0.009	3	2.7	15.2

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

CI₅₀: 0.059 mg/L

I.C. 95%: 0.047 mg/L- 0.072 mg/L

Ordonnée à l'origine: 8.18

Pente: 0.70

TABLEAU LXIII

Pourcentages de mortalité chez l'algue *Selenastrum capricornutum* après une exposition de 96 h à la cyanazine.

Concentration mg/L	n	C.V. %	mortalité %
0.100	3	33.80	15.17
0.118	3	24.14	16.82*
0.136	3	8.02	26.92*
0.145	3	2.80	30.24*
0.165	3	16.89	40.65*
0.172	3	7.58	45.81*
0.182	3	2.05	85.04*
0.228	3	3.67	84.21

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

CL₅₀: 0.145 mg/L

I.C. 95%: 0.126 mg/L - 0.207 mg/L

Ordonnée à l'origine: -77.89

Pente: 0.82

Coefficient de corrélation: 80.2%

TABLEAU LXIV

Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1 par des tests de Student ou Student modifié (lors d'une inégalité des variances). Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.05$) effectués sur les données de l'expérimentation avec la cyanazine.

GROUPES [Cyanazine] mg L ⁻¹	\bar{x} URF sans FDA	\bar{x} URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	179.80	128.40	rejetée ¹
0.100	283.00	190.68	rejetée ²
0.118	293.00	155.33	rejetée ¹
0.136	209.33	151.68	rejetée ¹
0.145	195.68	123.00	rejetée ²
0.164	206.00	117.33	rejetée ²
0.172	189.67	148.33	acceptée ¹
0.182	152.33	123.68	rejetée ¹
0.228	156.00	121.67	acceptée ²

1: test de Student modifié

2: test de Student

μ_1 : moyenne en URF pour les groupes non-exposés au FDA

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

TABLEAU LXV

Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 2 par des tests de Student. Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.05$) effectués sur les données de l'expérimentation avec la cyanazine.

GROUPES [Cyanazine] mg/L	\bar{x} URF sans FDA	\bar{x} URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	347.60	577.20	rejetée
0.100	389.68	654.68	rejetée
0.118,	420.68	519.68	rejetée
0.136	422.00	518.68	rejetée
0.145	418.33	520.33	rejetée
0.164	409.33	520.33	rejetée
0.172	412.00	521.68	rejetée
0.182	409.00	522.68	rejetée
0.227	414.68	568.00	rejetée

μ_1 : moyenne en URF pour les groupes non-exposés au FDA
 μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

3.4.6- Conclusions et recommandations sur les herbicides

Des tests de 96 h d'inhibition de croissance effectués en microplaque par St-Laurent *et al.* (1992) sur les mêmes herbicides indiquent des résultats identiques ou similaires aux CI_{50} obtenues lors de cette étude (voir tableau LXVI). Par cette comparaison, nous pouvons certifier que la technique en microplaque a été maîtrisée.

Cette étude sur quelques herbicides a permis de cerner les effets algistatiques ou algicides et d'identifier ceux qui présentent un potentiel toxique élevé pour le phytoplancton. La figure 22 résume les résultats des CL_{50} obtenus lors des tests de létalité algale. Ce sont les triazines qui présentent la toxicité la plus élevée pour l'algue *S. capricornutum*. Les effets attribuables à ces herbicides, tout en étant très certainement algistatiques au départ, deviennent rapidement algicides, telle que la cytométrie en flux nous en a informé. Le diquat dibromide, producteur de radicaux libres, ainsi que le métolachlore, présentent également une forte toxicité. Par contre, le 2,4-D s'avère beaucoup moins toxique. Des études plus approfondies sur le métolachlore, plus toxique que le 2,4-D, devraient être poursuivies, car les réponses algales qu'il engendre (très forte augmentation de l'autofluorescence verte sans mortalité cellulaire) seraient intéressantes à interpréter. De plus, des travaux devraient tester cet herbicide en même temps que l'atrazine puisqu'ils sont souvent utilisés ensemble en mélange (SAGE, 1988).

3.5- Évaluation de la toxicité en considérant les effets létaux et sublétaux

Dans toute évaluation écotoxicologique, deux aspects principaux doivent être considérés afin de bien cerner le potentiel toxique d'une substance ou d'un mélange complexe de substances. L'un de ces aspects préconise d'entreprendre des essais à différents paliers trophiques et l'autre de mesurer différentes variables d'effets. Cette étude a touché

TABLEAU LXVI

Comparaison des CI50 obtenues avec les herbicides de cette étude et celles rapportées par St-Laurent *et al.*, (1992)

HERBICIDES	CI50 mg/L St-Laurent 1992	CI50 mg/L Ménard Présente étude
2,4-D	24.20	24.16
Métolachlore	0.060	0.069
Diquat dibromide	0.005	0.009
Cyanazine	0.017	0.059

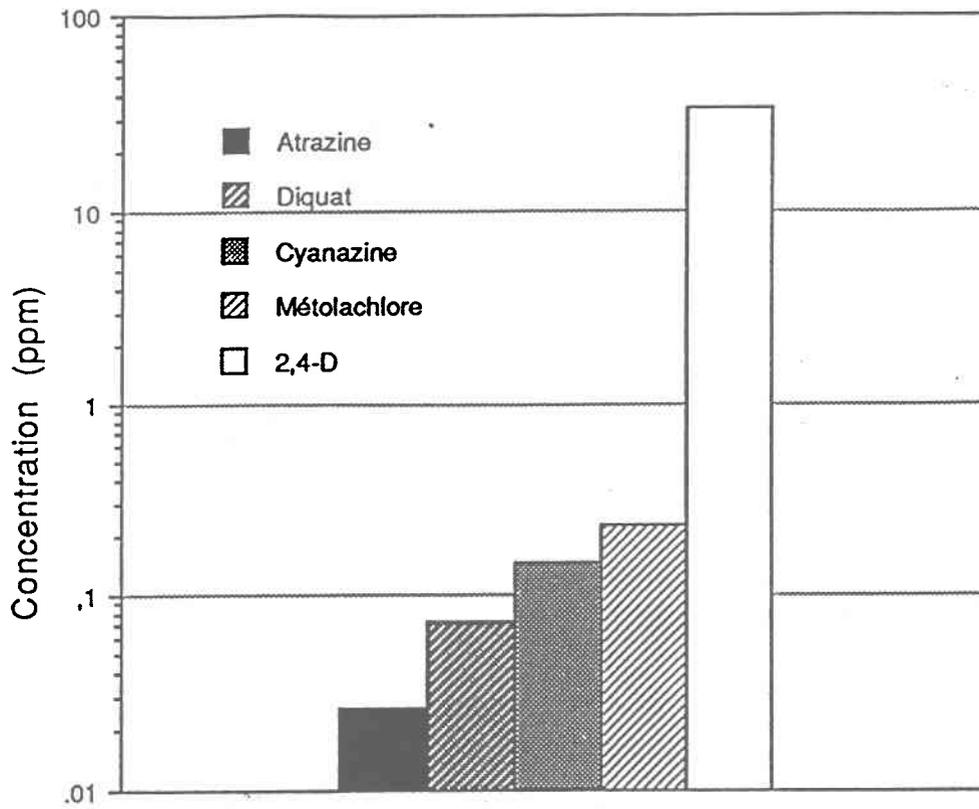


FIGURE 22. Comparaison des CL₅₀ 96 h obtenues pour les herbicides lors des tests de létalité effectués avec l'algue *Selenastrum capricornutum*.

principalement au deuxième aspect. La détermination des CI_{50} et CL_{50} aura donc permis de mieux caractériser le potentiel toxique de quelques produits chimiques.

Le tableau LXVII présente les valeurs de létalité et de sublétalité obtenues pour les différents produits testés lors de cette étude, ainsi que le rapport L/S (valeur de létalité déterminée par la CL_{50} sur valeur de sublétalité déterminée par la CI_{50}) qui existe entre ces deux effets.

Il est évident que toutes ces substances produisent des effets à la fois algistatiques et algicides, telles que le font ressortir leurs valeurs respectives des CI et CL_{50} . Sur le plan de la sublétalité, le diquat dibromide et le mercure révèlent le plus fort potentiel toxique (CI_{50} de 0.009 et 0.008 mg/L, respectivement) vis-à-vis de *S. capricornutum*. Par contre, lorsque la létalité est considérée, l'atrazine s'avère toute aussi toxique que le mercure à tuer les algues (CL_{50} de 0.026 et 0.021 mg/L, respectivement). Enfin, le rapport L/S indique que la concentration d'atrazine qui inhibe la croissance algale est très semblable à celle qui les tue ($L/S=1$ pour l'atrazine). Ce rapport L/S de 1 suggère que l'atrazine présente un risque potentiellement plus élevé pour le phytoplancton que le diquat dibromide ($L/S=8$), par exemple, où les concentrations algistatiques et algicides sont nettement plus démarquées.

L'analyse des différentes mesures de variables d'effet, comme celles que nous mettons en relation ici, nous permettent de mieux comprendre le potentiel toxique des contaminants. Le test de létalité développé à l'aide de la cytométrie en flux aura donc contribué en ce sens.

TABLEAU LXVII

Réponse de l'algue *Selenastrum capricornutum* aux différents produits chimiques étudiés considérant la létalité (L), la sublétalité (S), et le rapport L/S.

Produits chimiques	Létalité (L)		Sublétalité (S)		Ratio L/S
	CL ₅₀	CL ₅₀ 96 hres mg/L	CL ₅₀	CL ₅₀ 96 hres mg/L	
Atrazine	0,026	0,026	0,026	0,026	1,0
2,4-D	33,4	33,4	24,2	24,2	1,4
Cu ²⁺	0,042	0,042	0,025	0,025	1,7
Cyanazine	0,15	0,15	0,06	0,06	2,5
Hg ²⁺	0,021	0,021	0,008	0,008	2,6
Métolachlore	0,23	0,23	0,07	0,07	3,4
Diquat dibromide	0,07	0,07	0,009	0,009	8,0

CONCLUSION

Cette étude visait le développement d'un test de létalité algal en microplaque à l'aide de la cytométrie en flux. La technique cytométrique s'est révélée sensible et fiable pour différencier les cellules viables et mortes de *S. capricornutum*.

Des expériences avec deux fluorochromes, le FDA et le C-FDA, ont d'abord été réalisées pour sélectionner le meilleur révélateur de viabilité chez l'algue *S. capricornutum*. Des cinétiques estérasiques ont aussi été effectuées sur les deux fluorochromes, afin d'en évaluer le temps optimal d'incubation permettant d'obtenir une démarcation significative entre l'autofluorescence verte et la fluorescence verte due au clivage du FDA. Les cinétiques estérasiques ont été réalisées à différentes concentrations de FDA soit 1 μM , 5 μM , 10 μM , 24 μM et à 17,73 μM de C-FDA. Le C-FDA n'a pas été retenu puisqu'il présentait des difficultés d'incorporation et d'hydrolyse vis-à-vis de *S. capricornutum*. Par contre, les résultats obtenus avec le FDA ont été performants. À l'aide de ce marqueur, on observait une augmentation significative de la fluorescence liée à la fluorescéine lors du clivage du FDA après de courtes périodes d'incubation.

Les cinétiques ont également permis de sélectionner une concentration optimale de FDA ainsi qu'un temps d'incubation approprié afin de mieux mettre en évidence la viabilité algale. Ce temps d'incubation fut fixé à 30 min et la concentration optimale de FDA retenue a été de 5 μM .

L'unique mesure de l'activité estérasiqne, révélée par le clivage du FDA, ne pouvait, à elle seule, constituer une preuve irréfutable de la viabilité cellulaire puisque certains toxiques inhibent cette activité. Le choix de l'autofluorescence chlorophyllienne comme deuxième marqueur s'est donc

avéré important pour davantage caractériser les populations viables et non viables. De plus, l'autofluorescence chlorophyllienne sert d'indicateur précoce d'un effet altérant la cellule algale.

La dernière étape de validation du test de létalité a été de mesurer des cellules mortes par cytométrie afin de caractériser le patron cellulaire spécifique à cette population. Pour ce faire, les cellules algales ont été traitées aux micro-ondes à différents temps et nous avons démontré qu'un traitement de 60 s suffisait à les tuer. Les patrons cellulaires de létalité ont été mesurés au jour 0 (après le traitement) et suite à une incubation de 96 h des cellules dans un milieu nutritif. Les résultats ont démontré que la chlorophylle ne se dégradait qu'après un certain temps, puisque les cellules traitées aux micro-ondes émettant de l'autofluorescence chlorophyllienne au jour 0 présentaient un patron équivalent aux cellules non traitées. Les patrons obtenus après 96 h se distinguaient nettement de celui des cellules viables (témoin). La létalité cellulaire a été confirmée par des tests en milieu AAP 1X liquide et en milieu AAP 1X gélosé. L'absence de croissance algale sur le milieu AAP 1X gélosé et dans le milieu AAP 1X liquide confirma la mortalité cellulaire. Cette expérimentation a servi à justifier le fenêtrage spécifique retenu pour distinguer les deux populations algales, soit celle des cellules viables et celle des cellules mortes. Durant chacune des étapes protocolaires, des observations visuelles ont été effectuées par microscopie à fluorescence pour valider les résultats obtenus par cytométrie.

La validation de la méthodologie développée pour l'estimation des CL_{50} et des CI_{50} a été accomplie à l'aide de deux toxiques de référence, soit le sulfate de cuivre et le chlorure de mercure. Des tests d'inhibition de croissance ont également été effectués en parallèle pour comparer les deux paramètres de mesure (CL_{50} et CI_{50}). Pour ces deux toxiques, les CL_{50} et CI_{50} étaient assez rapprochées les unes des autres. Nous avons également pu constater un effet d'endommagement du photosystème par les deux

toxiques. Les lectures cytométriques nous informent donc sur l'état physiologique de la cellule en plus de son état viable.

Une fois la méthodologie bien rodée, les tests de létalité et d'inhibition de croissance ont été réalisés sur quelques herbicides d'importance pour le Québec, en ce qui concerne leur réévaluation écotoxicologique. Ce sont l'atrazine, la cyanazine, le 2,4-D, le métolachlore et le diquat. La plus forte toxicité algale s'est manifestée avec les triazines (atrazine et cyanazine) ainsi qu'avec le diquat (famille des ammoniums quaternaires). Le métolachlore s'est avéré un peu moins toxique que les triazines. Le 2,4-D, un représentant de la famille des acides phénoxyques, présentait la plus faible toxicité. Le risque potentiel encouru pour le phytoplancton semble donc plus élevé après exposition aux triazines et aux ammoniums quaternaires.

Les possibilités d'effectuer des analyses biparamétriques sur chacune des cellules, de quantifier les signaux optiques émis par celles-ci, d'effectuer des lectures sur quelques milliers de cellules en quelques secondes, ont donc contribué au développement d'un test de létalité précis, sensible et simple. Puisque ce test s'effectue en microplaque, il y aura lieu à l'avenir d'envisager l'automatisation des lectures cytométriques, ce qui favorisera l'emploi de ce test pour des évaluations écotoxicologiques.

La CL_{50} est parfois difficile à obtenir pour certains produits car les fourchettes de concentrations où la mortalité se manifeste sont parfois très étroites. Il arrive que le test doit être répété afin d'obtenir une courbe dose-réponse fiable pour effectuer une régression linéaire. Il est aussi possible que les courbes ne soient pas nécessairement linéaires. Dans ce cas, on doit procéder à une transformation des données par le modèle mathématique le plus approprié pour linéariser la relation, ce qui devient parfois fastidieux. Aux fortes concentrations toxiques, la densité algale est souvent très faible, ce qui allonge le temps de lecture et augmente la variabilité statistique. Ces

difficultés peuvent être résolues en mesurant les NOEC et LOEC de létalité au lieu de la CL₅₀. Au niveau de l'évaluation du risque environnemental, il peut être plus judicieux d'établir la toxicité à l'aide de ces deux paramètres. Ceux-ci sont des indicateurs d'un seuil de toxicité et sont donc plus sensibles que les valeurs médianes des courbes doses-réponses (Costan *et al.*, 1993).

Enfin, ce test de létalité permet de combler une lacune dans le domaine de l'évaluation écotoxicologique. L'emploi futur de cet outil bioanalytique, en association avec d'autres bioessais appliqués à l'heure actuelle, devrait contribuer à une meilleure connaissance de l'écotoxicité des produits chimiques.

REFERENCES

- AESCHBACHER, M., C.A. REINHARDT, G. ZBINDEN, (1986). "A rapid cell membrane permeability test using fluorescent dyes and flow cytometry". Cell Biology and Toxicology. Vol. 2, pp. 247-255.
- ALEXANDER, L. M., M. WILKINSON, (1987). "A protocol for the validation of vital and mortal stains". Botanica Marina. Vol. 30, pp. 109-113.
- ARONSON, J.G., (1973). "The effect of some common insecticides upon C-14 uptake in phytoplankton". M.S. thèse, Université du Nébraska, Lincoln, 96 pages.
- AUDUS, J.C. (1976). Herbicides. Physiology, biochemistry, ecology. Ed. par Audus, L.J. Academic Press. 2ième ed. Vol. 2. p. 53.
- BARTLETT, L., F. W. RABE, W.H. FUNK, (1974). "Effects of copper, zinc and cadmium on *Selenastrum capricornutum*." Water Research. Vol. 8, pp. 179-185.
- BAISH, H. (1978). "Effects of X-Rays on cell membranes. II. Changes of permeability measured by fluorescein efflux". Radiat. Environ. Biophys. Vol. 15, pp.
- BECTON DICKINSON, (1988). "FACScan™ User's Guide, September 1988". Becton Dickinson, Immunocytometry Systems. CA 94043, U.S.A.
- BERGLUND, D.L., R. E. TAFFS, N.P. ROBERTSON, (1987). "A rapid analytical technique for flow cytometric analysis of cell viability using calcofluor white M2R¹". Cytometry. Vol. 8, pp. 421-426.
- BERGLUND, D.L., S. EVERSMAAN, (1988). "Flow cytometric measurement of pollutant stresses on algal cells. Cytometry. Vol. 9, pp. 150-155.
- BERGLUND, D.L., S. STROBEL, F. SUGAWARA, G. STROBEL, (1988). "Flow cytometry as a method for assaying the biological activity of phytotoxins". Plant Science. Vol. 56, pp. 183-188.

- BLAISE, C., N. BERMINGHAM, R. VAN COILLIE, (1985). "La méthode d'évaluation écotoxicologique intégrée: une contribution à la lutte contre l'écotoxicité". Bulletin de la qualité des eaux. Vol. X, pp. 4-11.
- BLAISE, C., R. LEGAULT, N. BERMINGHAM, R. VAN COILLIE, (1986). "A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment". Toxicity Assessment: An International Quarterly. Vol. 1, pp. 261-281.
- BLAISE, C., (1991). "Microbiotests in aquatic ecotoxicology: characteristics, utility, and prospects". Environmental Toxicology and Water Quality. Vol. 6, pp. 145-155.
- BLANK, H., G. WALLIN, S. WANGBERG, (1984). "Species dependant variation in algal sensitivity to chemical compounds". Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 8, pp. 339-351.
- BONALY-CANTAREL, J., (1988). "Cytophysiologie et cytotoxicologie chez les algues unicellulaires. Action du cadmium sur des cellules d'*Eglina gracilis*. Apport de la cytométrie en flux liquide". Bull. Soc. Bot. Fr., 135, Lettres bot., pp. 27-40.
- BOUDOU, A., F., RIBEYRE., (1989a). Aquatic ecotoxicology fundamental concepts and methodologies. CRC Press, Floride, Vol. 1, 326 pages.
- BOUDOU, A., F. RIBEYRE. (1989b). Aquatic ecotoxicology fundamental concepts and methodologies. CRC Press, Floride, Vol. 2, 314 pages.
- BOYLE, T.P., (1984). "The effect of environmental contaminants on aquatic algae". Algae as ecological indicators. Edition L. Elliot Shubert, Academic Press Inc, London, pp. 237-255.
- BRUNING, J.W., M.J. KARDOL, R. ARENTZEN, (1980). "Carboxyfluorescein fluorochromasia assays. 1. Non-radioactively labeled cell mediated lympholysis". Journal of Immunological Methods. Vol. 33, pp. 33-44.
- BUSER, H.R., (1990). "Atrazine and other s - triazine herbicides in lakes and in rain in Switzerland". Environ. Sci. Technol. Vol. 24, No. 7. pp. 1049-1058.
- BUTLER, G.L., T.R. DEASON, J.C. O'KELLEY, (1975). "The effect of atrazine, 2,4-D, methoxychlor, carbaryl and diazinon on the growth of planktonic algae". Brit. Phycol. J. Vol. 10, pp. 371-376.

- BUTLER, G.L., T.R. DEASON, J.C. O'KELLEY, (1975). "The effect of atrazine, 2,4-D, methoxychlor, carbaryl and diazinon on the growth of planktonic algae". Brit. Phycol. J. Vol. 10, pp. 371-376.
- CASARETT, I., L.J. DOULL, (1986). Toxicology. Macmillan Publishing Company, London, 3^{ième} editions, 974 pages.
- CAUX, P.Y., S. FORREST, (1989). "Pesticides in tributaries of the St-Lawrence River." Direction des eaux intérieures, centre Saint-Laurent, Environnement Canada, 134 pages.
- CHAIRMAN, B., (1983). Herbicide Handbook. Published by Weed Science Society of America., Illinois, fifth ed.
- CHIAUDANI, G., M. VIGHI, (1974). "The N:P ratio test with *Selenastrum capricornutum* to predict eutrophisation in lakes". Water Research. Vol. 8, pp. 1063-1069.
- CHIAUDANI, G., M. VIGHI, (1978). "The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies". Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie. Vol 21, pp. 316-329.
- CHRISTENSEN, E., X. RONOT, M. ADOLPH, (1988). "Effects of manganese, copper and lead on *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella stigmatophora*". Water Research. Vol. 13, pp. 79-92.
- COMBRIER, E., X. RONOT, M. ADOLPH, (1988). La cytométrie en flux. MEDSI/McGRAW HILL, Paris. Vol. 1, pp. 113-121.
- COSTAN, G., N. BERMINGHAM, C. BLAISE, J.F. FERARD, (1993). "Potential ecotoxic effects probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents". Environ. Toxicol. Water Qual. Vol. 8 (accepté pour publication).
- COUTURE, P., R. VAN COILLIE, P.G.C. CAMPBELL, C. THELLEN, (1981). "Le phytoplancton, un réactif biologique sensible pour détecter rapidement la présence de toxiques". INSERM, Vol. 106, pp. 255-272.
- COUTURE, P., S.A. VISSER, R. VAN COILLIE, C. BLAISE, (1985). "Algal bioassays: their significance in monitoring water quality with respect to nutrients and toxicants". Schweiz. Z. Hydrol. Vol. 47, pp. 128-158.

- CRIPPEN, R.W., J.L. PERRIER, (1974). "The use of neutral red and evans blue for live-dead determination of marine plankton". Stain Technology. Vol. 49, pp. 97-104.
- CUCCI, T.L., S.E. SHUMWAY, W.S. BROWN, C.R. NEWELL, (1989). "Using phytoplankton and flow cytometry to analyze grazing by marine organisms". Cytometry. Vol. 10, pp. 659-669.
- CUNNINGHAM, A., J.W. LEFTLEY, (1986). "Application of flow cytometry to algal physiology and phytoplankton ecology". FEMS Microbiology Reviews. Vol. 32, pp. 159-164.
- DEMERS, S., D. KIMBERLY, T. CUCCI, (1989). "A flow cytometric approach to assessing the environmental and physiological status of phytoplankton". Cytometry. Vol. 10, pp. 644-652.
- DIVE, C., P. WORKMAN, J.V. WATSON, (1987). "Improved methodology for intracellular enzyme reaction and inhibition kinetics by flow cytometry". Cytometry. Vol. 8, pp. 552-561.
- DORSEY, J., C.M. YENTSCH, S. MAYO, C. MCKENNA, (1989). "Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae". Cytometry. Vol. 10, pp. 622-628.
- DOUGLAS, H., (1987). The Agrochemicals Handbook. Ed. Douglas, H. Second ed. The Royal Society of Chemistry.
- DRESSEL, D.M., D.R. HEINLE, M.C. GROTE. (1972). "Vital staining to sort dead and live copepods". Chesapeake Science. Vol. 13, pp. 156-159.
- FORREST, J.I.M., (1984). "Possible applications of flow cytometry in the aquatic sciences. A Review". European Appl. Res. Rept.- Environ. and Nat. Res. Sect. Vol. 2, pp. 387-400.
- GAFF, D.F., O. OKONG'O-OGOLA, (1971). "The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells". J. Exp. Bot. Vol. 22, pp. 756-758.
- GALA, W., J.P. GIESY, (1990). "Flow cytometric techniques to assess toxicity to algae". Aquatic Toxicology and Risk Assessment. 13 ième vol. Ed. Landis/van der Schalie. ASTM. Baltimore, USA. pp. 237-246.

- GALBRAITH, D.W., K. R. HARKINS, R.A. JEFFERSON, (1988). "Flow cytometric characterization of the chlorophyll contents and size distributions of plant protoplasts". Cytometry. Vol. 9, pp. 75-83.
- GONÇALVES, M.L., M.F.C. VILHENA, A.M. SAMPAYO, (1988). "Effect of nutrients, temperature and light on uptake of cadmium by *Selenastrum capricornutum* Printz". Water Research. Vol. 22, pp. 1429-1435.
- GOUDEY, J.S., (1987). "Modeling the inhibitory effects of metals on phytoplankton growth". Aquatic Toxicology. Vol. 10, pp. 265-278.
- GRAZYNA, K., L. FALKOWSKI, S.K. HOFFMANN, L.S. SZCZEPANIAK, (1987). "Replacement of magnesium by copper (II) in the chlorophyll porphyrin ring of planktonic algae". Acta Physiologiae Plantarum. Vol. 9., pp. 43-52.
- GREENE, J.C., W.E. MILLER, T. SHIROYAMA, (1975). "Utilization of algal assays to assess the effect of municipal, industrial and agricultural wastewater effluents upon phytoplankton production in the Snake River system". Water Air and Soil Pollution. Vol. 4, pp. 415-434.
- HICKEY, C.W., C. BLAISE, G. COSTANT, (1991). "Microtesting appraisal of ATP and cell recovery toxicity end points after acute exposure of *Selenastrum capricornutum* to selected chemicals". Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal. Vol. 6, pp. 383-403.
- HOSMANI, S.P., (1987). "Algal diversity as a measure of water pollution". Acta Botanica Indica. Vol. 15, pp. 320-322.
- HOWELL, S., W.J. BLASCHKO, M.C. DREW, (1975). "Inhibitor effects during the cell cycle in *Chlamidomonas reinhardtii* : an analyses of cell block points". Journal Cell Biology. Vol. 67, p. 126.
- HYNES, H.B.N., (1960). The biology of polluted waters. Liverpool University Press, Liverpool.
- JEANNE, N., (1979). "Effets du lindane sur la division, le cycle cellulaire et les biosynthèses de deux algues unicellulaires". Can. J. Bot. Vol. 57, p. 1464.

- JOUANY, J.M., (1981). "Les tests d'écotoxicité aiguë chez les algues et les macrophytes". Compte rendu du Colloque International d'Écotoxicologie. Editions Leclerc, H. et D. Dive. Les colloques de l'INSERM, France. Vol. 106, pp. 169-181.
- JOUBERT, G., (1980). "A bioassay application for quantitative toxicity measurements, using the green algae *Selenastrum capricornutum*." Water research. Vol. 14, pp. 1759-1763.
- JOUBERT, G., (1981). "Étude comparative des réactions à la toxicité entre la truite *Salmo gaidneri* et quatre autres intégrateurs biologiques sur 36 cas de bioessais statiques." Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques. Ottawa, No. 990, pp. 251-264.
- KARATAGLIS, S., L. SYMOENIDIS, M. MOUSTAKAS, (1988). "Effect of toxic metals on the multiple forms of esterases of *Triticum aestivum* cv *Vergina*". Jouranal of Agronomy and Crop Science. Vol. 160, pp. 106-112.
- KAUFMAN, D.D., P.C. KEARNEY, (1976). HERBICIDES Physiology. Biochemistry. Ecology. Academic Press, 2^{ième} ed., London. Vol. 2, pp. 52-53.
- KEIGHAN, E., (1977). "Caractérisation du niveau d'enrichissement et de la toxicité des eaux du bassin du fleuve Saint-Laurent". Comité d'étude sur le fleuve Saint-Laurent. Environnement Canada, Service de la protection de l'environnement, région Québec, rapport technique N° 6, 153 pages.
- KLAINE, S. J., M.L. HINMAN, K.R. WINDELMANN, K.R. SAUSER, (1988). "Caracterization of agricultural nonpoint pollution: pesticides migration in a west Tennessee watershed". Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 7, pp. 609-614.
- KRUTH, H., (1982). "Flow cytometry: rapid biochemical analysis of single cells (Review)". Analytical Biochemistry. Vol. 125, pp. 225-242.
- LEGENDRE, L., C. YENTSCH, (1989). "Overview of flow cytometry and image analysis in biological oceanography and limnology". Cytometry. Vol. 10, pp. 501-510.
- LEHNINGER, A.L., (1982). Principles of Biochemistry Worth Publishers, Inc. New York, 1011 pages.

- LI, W.K.W., (1989). "Shipboard analytical flow cytometry of oceanic ultraphytoplankton". Cytometry. Vol. 10, pp. 564-579.
- MARTIN, J.C., D.E. SWARTZENDRUBER, (1980). "Time: A new parameter for kinetic measurements in flow cytometry". Science. Vol. 207, pp. 199-200.
- McCLOSKEY, W. B., D.E. BAYER, (1990). "Atrazine absorption and effects on photosynthesis in wheat leaf protoplasts". Pesticides Biochemistry and Physiology. Vol. 37. pp. 227-238.
- McGINNES, K.M, G. CHAPMAN, R. MARKS, R. PENNY, (1985). "A fluorescence NK assay using flow cytometry". Journal of Immunology Method. Vol. 86, pp. 7-15.
- METEZEAU, P., G. DELAMARE, (1988). La cytométrie en flux. MEDSI/McGRAW HILL, Paris. Vol. 1, p. 18.
- METEZEAU, P., G. FRELAT, (1991). "Principes, potentialités et limites de la cytométrie en flux. Applications en microbiologie". Annal Biology. pp. 39-57.
- MILLER, W., J.C. GREENE, T. SHIROYAMA, (1978). "The *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay bottle test. EPA-600/9-78-018, Corvallis, Orégon, 125 pages.
- MILLER, W.E., S.A. PERTERSON, J.C. GREENE, C.A. CALLAHAN, (1985). "Comparative toxicology of laboratory organisms for assessing hazardous waste sites". J. Environm. Qual. Vol. 12, No. 4., pp. 569-574.
- MUIRHEAD, K.A., P.K. HORAN, G. POSTE, (1985). "Flow cytometry: present and future (Review)". Biotechnology. Vol. 3, pp. 337-355.
- NAUWELAERS, F., G. DE ROBERT, M. DEPONT, J.M. GOFFLOT, (1988). La cytométrie en flux. MEDSI/McGRAW HILL, Paris. Vol. 1, pp. 335-337.
- NYHOLM, N., (1989). "Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae". Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 8, pp. 689-703.

- OLSON, R.J., E.R. ZETTLER, O.K. ANDERSON, (1989). "Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry". Cytometry. vol. 10, pp. 636-643.
- PEETERS, J.C.H., G.B.J. DUBELAAR, J. RINGELBERG, J.W.M. VISSER, (1989). "Optical plankton analyser: a flow cytometer for plankton analysis, I: desing considerations". Cytometry. Vol. 10, pp. 522-528.
- PERSIDSKY, M.D., G.S. BAILLIE, (1977). "Fluorometric test of cell membrane integrity". Cryobiology. Vol. 14, pp. 322-331.
- PHINNEY, D.A., T.L. CUCCI, (1989). "Flow cytometry and phytoplankton". Cytometry. Vol. 10, pp. 511-521.
- PIERREZ, J., P. METEZEAU, P. PONCELET, J.P. LE PICHON, (1988) La cytométrie en flux. MEDSI/McGRAW HILL, Paris. Vol. 1., pp. 51-53
- PREMAZZI, G., G. BUONACCORSI, P. ZILIO, (1989). "Flow cytometry for algal studies". Water Research. Vol. 23, pp. 431-442.
- PRICE, B.J., V.H. KOLLMAN, G.C. SALZMAN, (1978). "Light-scatter analysis of microalgae". Biophysical Journal. Vol. 22, pp. 29-38.
- PROSPERI, E., A.C. CROCE, G. BOTTIROLI, R. SUPINO, (1986). "Flow cytometric analysis of membrane permeability properties influencing intracellular accumulation and efflux of fluorescein". Cytometry. Vol. 7, pp. 70-75.
- RAI, L.C., J.P. GAUR, H.D. KUMAR, (1981). "Phycology and heavy-metal pollution". Biol. Rev. Vol. 56, pp. 99-151.
- REYNOLDS, C.S., (1987). "The response of phytoplankton communities to changing lake environments". Scweiz. Z. Hydrol. Vol. 55, pp. 134-141.
- REESE, M.J., (1937). "The microflora of non-calcarous streams Rheidol and Melindewr with special reference to water pollution from lead mines in Cardiganshire". Journal of Animal Ecology. Vol. 56, pp. 99-151.

- ROTMAN B., B.W. PAPERMASTER, (1966). "Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters". Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA. Vol. 55, pp. 134-141.
- ROY, S., L. LEGENDRE, (1979). "DCMU-enhanced fluorescence as an index of photosynthetic activity in phytoplankton". Marine Biology. Vol. 55, pp. 93-101.
- SAGE. (1988). Recueil des principaux pesticides en usage au Québec. Edité par: Cossette, D., Giroux, I., Poulin, R. SAGE ltée, 4700 boul Wilfrid-Hamel, Québec, P.Q. 3 vol. Rapport confidentiel.
- SALISBURY, F.B., C.W. ROSS, (1985). Plant Physiology. Wadsworth Publishing Company, 3^{ième} éd., California, p.183.
- SAMUELSSON, G., G. OQUIST, (1977). "A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on *in vivo* chlorophyll fluorescence". Physiol. Plant. Vol. 40, pp. 315-319.
- SHERRER, B. (1984). Biostatistique. Gaëtan Morin, Québec, 850 pages.
- SMITH, R.L., (1980). Ecology and field biology. Harper and Row, New-York, 3^{ième} édition, 835 pages.
- SONTAG, W., (1977). "A comparative kinetic study on the conversion of fluorescein diacetate to fluorescein in living cells and *in vitro*". Rad. and Environ. Biophys. Vol. 14, p. 1-12.
- ST-LAURENT, D., C. BLAISE, P. MacQUARRIE, R. SCROGGINS, B. TROTTIER, (1992). "Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures". Environmental Toxicology and Water Quality. Vol. 7, pp. 35-48.
- STEVENS, J.T., D. SUMMER, (1991). Handbook of Pesticide Toxicology. Ed. Wayland J. Hayes et Edward R. Laws. Academic Press. Vol. 3. pp. 1318-1325.
- TAYLOR, J.A., D.W. WEST, (1980). "The use of evan's blue stain to test the survival of plant cells after exposure to high salt and high osmotic pressure". Journal of Experimental Botany. Vol. 31, pp. 571-576.

- THELLEN, C., C. BLAISE, Y. ROY, C. HICKEY, (1989). "Round robin testing with the *Selenastrum capricornutum* microplate toxicity assay. Hydrobiologia. Vol. 188/189, pp. 259-268.
- TREVORS, J.T., C.I. MAYFIELD, W.E. INNIS, (1983). "The use of electron transport system activity for assessing toxicant effects on algae". Water, Air, and Soil Pollution. Vol. 19, pp. 361-367.
- THOMAS, W.M., B.M. JUDY, W.R. LOWER, G.F. KRAUSE, W.W. SUTTON, (1990). "Time-dependent toxicity assessment of herbicide contaminated soil using the green alga *Selenastrum capricornutum*". Plants for toxicity assessment. Editeurs, Wang, W., w. Gorsuch, J.W. Lower. Ed. ASTM, pp. 235-254.
- U.S. EPA, (1971). "Algal assay procedure bottle test". National Eutrophication Research Program. Corvallis, Oregon, United States, 82 pages.
- U.S. EPA, (1988). "Users guide for a computer program for Dunnett's procedure in the analysis of data from a short-term chronic toxicity tests with aquatic organisms". Par Statistical Support Staff Computer Sciences Corporation, 62 pages.
- VAN COILLIE, R., P. COUTURE, R. CHOENERT, C. THELLEN, (1982). "Mise au point d'une évaluation rapide de la toxicité originale des effluents et de leurs composantes à l'aide d'algues". Environnement Canada, MAS, Rapport contractuel, 130 pages.
- VISSER, J.W.M., A.A.M. JONGELING, H.J. TANKE, (1979). "Intracellular pH-determination by fluorescence measurements". The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. Vol. 27, pp. 32-35.
- VOLLENWEIDER, R.A., (1966). "Advances in defining critical loading levels for phosphorus in lake eutrophication". Mem. Ist. Ital. Idrobiologia. Vol. 33, pp. 53-83.
- WALSH, G.E., (1983). "Cell death and inhibition of population growth of marine unicellular algae by pesticides". Aquatic toxicology. Vol. 3, pp. 209-214.
- WALSH, G.E., R. G. MERRILL, (1984). "Algal bioassays of industrial and energy process effluents". Algae as an indicators. Academic Press, London. pp. 329-360.
- WETZEL, R.G., (1983). Limnology. Saunders College Publishing, Montreal, 2^{ème} édition, 432 pages.

- WETZEL, R.G., (1983). Limnology. Saunders College Publishing, Montreal, 2^{ième} édition, 432 pages.
- XU, C., J. AUGER, A. GOVINDJEE, (1990). "Chlorophyll a fluorescence measurements of isolated spinach thylakoids obtained by using single-laser-based flow cytometry". Cytometry. Vol. 11, pp. 349-358.
- YENTSCH, C. M., (1981). "Flow cytometric analysis of cellular saxitoxin in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis* var. *excavata*." J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Vol. 19, pp. 611-621.
- YENTSCH, C. M., (1983). "Flow cytometry and cell sorting: a technique for analysis and sorting of aquatic particles". Limnol. Oceanogr. Vol. 28, pp. 1275-1280.
- YENTSCH, C.M., T.L. CUCCI, D.A. PHINNEY, J.A. TOPINKA, (1986). " Real-time caractérisation of individual marine particles at sea: Flow cytometry". Tidal mixing and plankton dynamics. Ed. Bowman M., Peterson W., Yentsch, C.M., Peterson W. T. Lecture notes on coastal and estuarine studies. Vol. 17, Springer-Verlag, New-York, pp. 414-448.
- YENTSCH, C., J. CAMPBELL, (1991). "Phytoplankton growth: perspectives gained by flow cytometry". Journal of Plankton Research. Vol. 13, Supplément, pp. 83-108.
- ZAR, J.H., (1984). Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, Toronto, 2^{ième} éditions, 718 pages.

ANNEXE

TABLEAU AI

Analyse de comparaisons multiples (Tukey, $p < 0,05$, $n = 3$) sur la fluorescence à 530 nm (spectre vert) suite à l'incubation des cellules avec $1\mu\text{M}$ de FDA. Le tableau présente les résultats obtenus pour les deux expériences. Les groupes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents entre eux.

GROUPES	Temps min	\bar{x} URF* à 530 nm	Tukey
Expérience 1	5	346.67	a
	10	403.67	b
	20	423.33	b
	30	442.00	b,c
	45	449.67	c
	60	474.67	c
	90	470.33	c
	120	465.00	c
Expérience 2	5	382.33	a
	10	437.67	b
	20	465.67	b,c
	30	467.33	b,c
	45	474.67	c
	60	480.67	c
	90	479.33	c
	120	474.67	c

*: les résultats ont été analysés sur le logiciel FACScan

TABLEAU AII

Analyse de comparaisons multiples (Tukey, $p < 0,05$, $n = 3$) sur la fluorescence à 530 nm (spectre vert) suite à l'incubation des cellules avec 5 μM de FDA. Le tableau présente les résultats obtenus pour les deux expériences. Les groupes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents entre eux.

GROUPES	Temps min	\bar{x} URF* à 530 nm	Tukey
Expérience 1	5	289.67	a
	10	332.67	b
	20	385.00	c
	30	434.00	d
	45	463.67	e
	60	479.00	e,f
	90	507.67	f
	120	508.00	f
Expérience 2	5	302.67	a
	10	358.33	b
	20	406.67	c
	30	444.33	d
	45	462.67	e,f
	60	489.33	f,g
	90	508.67	g,h
	120	526.00	h

*: les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel FACScan

TABLEAU AIII

Analyse de comparaisons multiples (Tukey, $p < 0,05$, $n = 3$) sur la fluorescence à 530 nm (spectre vert) suite à l'incubation des cellules avec 10 μM de FDA. Le tableau présente les résultats obtenus pour les deux expériences. Les groupes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents entre eux.

GROUPES	Temps min	\bar{x} URF* à 530 nm	Tukey
Expérience 1	5	303.33	a
	10	340.67	b
	20	381.67	c
	30	400.00	c
	45	429.67	d
	60	447.67	d,e
	90	460.33	e,f
	120	472.67	f
Expérience 2	5	372.67	a
	10	430.67	a,b
	20	468.67	b,c
	30	498.33	c,d
	45	517.00	c,d
	60	524.00	c,d
	90	516.67	c,d
	120	554.33	d

*: les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel FACScan

TABLEAU AIV

Analyse de comparaisons multiples (Tukey, $p < 0,05$, $n = 3$) sur la fluorescence à 530 nm (spectre vert) suite à l'incubation des cellules avec 24 μM de FDA. Le tableau présente les résultats obtenus pour les deux expériences. Les groupes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents entre eux.

<u>GROUPES</u>	<u>Temps min</u>	<u>\bar{x} URF à 530 nm*</u>	<u>Tukey</u>
Expérience 1	5	695.00	a
	10	725.33	a,b
	20	745.33	b
	30	744.33	b
	45	748.33	b
	60	745.33	b
	90	736.67	b
	120	724.67	a,b
Expérience 2	5	645.33	a
	10	681.67	b,c
	20	710.67	c,d
	30	727.00	d
	45	728.00	d
	60	722.00	d
	90	691.33	c
	120	659.33	a,b

*: les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel FACScan

TABLEAU AV

Analyse de comparaisons multiples (Tukey, $p < 0,05$, $n = 3$) sur la fluorescence à 530 nm (spectre vert) suite à l'incubation des cellules avec $17,73 \mu\text{M}$ de C-FDA. Le tableau présente les résultats obtenus pour les deux expériences. Les groupes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents entre eux.

GROUPES	Temps min	\bar{x} URF* à 530 nm	Tukey
Expérience 1	5	312.00	a
	10	337.33	a,b
	20	360.67	b,c
	30	374.67	b,c
	45	403.33	c,d
	60	431.33	d,e
	90	460.67	e,f
	120	489.00	f
Expérience 2	5	261.00	a
	10	288.67	a
	20	312.67	a
	30	337.33	b,c
	45	373.00	c,d
	60	394.33	d,e
	90	442.00	e,f
	120	462.00	f

*: les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel FACScan

TABLEAU AVI

Analyse de comparaisons multiples (Tukey, $p < 0,05$, $n = 3$) sur l'autofluorescence à 530 nm (spectre vert) du témoin à 1 % d'acétone. Le tableau présente les résultats obtenus pour les deux expériences. Les groupes ayant les mêmes lettres, ne sont pas significativement différents entre eux.

GROUPES	Temps min	\bar{x} URF* à 530 nm	Tukey
Expérience 1	5	243.00	a
	10	255.00	a
	30	291.33	b
	45	300.33	b,c
	60	323.67	c
	90	351.67	d
	120	364.33	d
Expérience 2	5	248.00	a
	20	257.67	a
	45	266.00	a
	60	264.67	a
	90	276.33	a
	120	280.33	a

*: les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel FACScan

TABLEAU AVII

Tableau d'analyse de covariance: comparaison des droites de régressions des cinétiques estérasiques du FDA et du C-FDA pour la première expérience.

GROUPES	Σx^2	Σxy	Σy^2	erreur résiduelle	degré de liberté
témoin	88 650.00	98 069.08	1 951 927.58	1 843 438.65	22
FDA 1 μM	88 650.00	103 103.50	4 325 329.63	4 205 416.14	22
FDA 5 μM	88 650.00	118 010.85	4 284 919.52	4 127 823.51	22
FDA 10 μM	88 650.00	124 240.95	5 037 772.98	4 863 652.12	22
FDA 24 μM	88 650.00	136 141.29	9 718 647.00	9 509 572.55	22
C-FDA 17,73 μM	88 650.00	143 589.35	2 914 890.49	2 682 314.05	22
Pooled reg.				27 232 217.02	132
Rég. commune	531 900	723 155.02	28 233 487.21	27 250 307.7	102

$F_c = 0.0175$ $F_t = 2.29$ ($F_{0.05, 5, 132}$)
 $F_c < F_t$ les pentes ne sont pas égales entre elles.

TABLEAU AVIII

Tableau d'analyse de covariance: comparaison des droites de régressions des cinétiques estérasiques du FDA et du C-FDA pour la deuxième expérience.

GROUPES	Σx^2	Σxy	Σy^2	erreur résiduelle	degré de liberté
témoïn	85 650.00	45 536.53	1 086 633.73	1 086 633.19	16
FDA 1 μM	88 650.00	133 339.42	3 989 610.02	3 989 608.52	22
FDA 5 μM	88 650.00	120 773.08	4 112 597.59	4 112 596.23	22
FDA 10 μM	88 650.00	101 354.42	3 589 418.19	3 589 417.05	22
FDA 24 μM	88 650.00	152 801.68	10 676 351.63	10 676 349.91	22
C-FDA 17,73 μM	88 650.00	116 218.16	3 422 866.48	3 422 865.17	22
Pooled reg.				27 232 217.02	126
Rég. commune	531 900	670 023.29	26 877 477.64	26 877 476.38	100

$F_c = 7.0975 \times 10^{-6}$ $F_t = 2.29$ ($F_{0,05, 5, 132}$)
 $F_c < F_t$ les pentes ne sont pas égales entre elles.

TABLEAU AIX

Tableau des valeurs de fluorescence à 530 nm (spectre vert) obtenues avant et après incubation au FDA pour les groupes de cellules exposés aux micro-ondes (M.O.) à différents temps.

GROUPES	URF sans FDA*	URF sans FDA*
Témoin	95.63	108.10
	95.83	110.10
	95.97	110.14
M.O. 15 s	95.67	109.45
	96.62	111.05
	96.89	110.19
M.O. 30 s	97.22	102.85
	96.72	103.62
	97.06	103.52
M.O. 60 s	101.73	102.33
	103.74	105.86
	102.42	102.50

*: les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel LYSYS

TABLEAU AX

Fluorescence à 530 nm (spectre vert) observée pour le groupe exposé aux micro-ondes (M.O.) pendant 60 s et le groupe témoin . Le tableau donne les résultats des fluorescences obtenus suite à l'incubation au FDA et avant et après centrifugation au jour 0 et au jour 4.

		JOUR 0		JOUR 4	
		CENTRIFUGATION		CENTRIFUGATION	
GROUPES		URF* avant	URF* après	URF* avant	URF* après
Témoin		139.16	140.22	136.77	137.00
		136.62	143.35	138.18	136.95
		138.00	145.32	137.29	135.12
M.O. 60 s		99.75	100.01	97.30	99.70
		99.76	99.46	99.14	96.78
		99.64	99.72	—	95.05

*: les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel LYSYS

TABLEAU AXI

Résultats de la fluorescence à 530 nm (spectre vert) observés pour le groupe exposé aux micro-ondes (M.O.) pendant 60 s et le groupe témoin. Le tableau donne les résultats des fluorescences obtenus avant et après incubation au FDA pour le jour 0 et le jour 4.

GROUPES	JOUR 0			JOUR 4		
	URF* sans FDA	FDA URF*	avec FDA URF*	sans FDA URF*	sans FDA URF*	avec FDA URF*
Témoin	90.46	139.16	98.29	136.77		
	89.19	136.62	96.84	138.18		
	89.45	138.00	97.00	137.29		
M.O. 60 s	102.16	99.75	92.05	97.30		
	101.91	99.76	93.84	99.14		
	101.22	99.64	94.46	—		

*: les valeurs sont obtenues à l'aide du logiciel LYSYS

TABLEAU AXII

Tableau représentant les pourcentages de viabilité obtenus lors du test de létalité algal sur le Cu^{2+} .

$[\text{Cu}^{2+}]$ mg L ⁻¹	n	C.V. %	Viabilité %
0.023	3	1.40	96.16
0.027	3	3.57	84.71
0.032	3	4.00	67.95
0.036	3	9.40	52.01
0.044	3	22.20	45.65
0.047	3	21.11	41.43
0.049	3	16.20	39.10
0.053	3	3.90	29.00
0.058	3	7.35	31.42

TABLEAU AXIII

Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le sulfate de cuivre.

GROUPES [Cu ²⁺] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF* 650 nm	\bar{x} URF* 530 nm avant FDA	\bar{x} URF* 530 nm après FDA	\bar{x} URF* 650 nm	\bar{x} URF* 530 nm avant FDA	\bar{x} URF* 530 nm après FDA
Temoin	8.48 7.23 10.31	11.33 5.28 5.59	17.63 18.65 20.51	168.49 170.17 170.85	81.93 83.19 83.93	100.14 101.80 101.38
0.023	8.44 8.03 11.67	9.75 20.88 —	25.11 37.87 30.09	169.64 172.16 171.90	85.35 86.81 —	111.21 110.68 111.54
0.027	16.07 16.06 12.89	42.03 34.54 —	50.17 53.74 46.09	167.42 168.89 167.69	85.93 85.07 —	110.92 106.53 110.25
0.032	16.82 14.05 13.87	64.42 61.88 —	73.30 71.55 72.42	167.50 169.67 168.48	94.05 95.98 —	113.91 125.42 132.30

TABLEAU AXIII (suite)
 Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le sulfate de cuivre.

GROUPES [Cu ²⁺] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF* 650 nm	\bar{x} URF* 530 nm avant FDA	\bar{x} URF* 530 nm après FDA	\bar{x} URF* 650 nm	\bar{x} URF* 530 nm avant FDA	\bar{x} URF* 530 nm après FDA
0.036	13.86	65.29	67.28	168.03	98.97	125.41
	14.79	61.23	73.29	167.87	93.27	136.92
	12.65	—	67.37	168.88	—	128.01
0.042	11.31	80.40	79.74	168.31	110.59	136.59
	3.67	47.36	44.62	170.03	98.12	150.19
	3.32	—	44.46	167.29	—	144.40
0.044	13.64	67.68	72.63	167.97	110.59	132.69
	17.21	73.38	76.20	166.78	98.12	130.04
	14.62	—	71.16	167.26	—	133.77
0.047	11.99	84.07	78.63	170.72	99.68	134.45
	12.31	81.14	79.39	171.17	114.18	137.62
	11.26	—	78.78	170.04	—	151.83

TABLEAU AXIII (suite)
 Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le sulfate de cuivre.

GROUPES [Cu ²⁺] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF* 650 nm	\bar{x} URF* 530 nm avant FDA	\bar{x} URF* 530 nm après FDA	\bar{x} URF* 650 nm	\bar{x} URF* 530 nm avant FDA	\bar{x} URF* 530 nm après FDA
0.049	10.73 13.13 11.26	81.40 89.63 —	74.01 74.55 77.20	169.34 167.69 168.96	115.23 113.14 —	142.72 149.59 151.67
0.053	11.11 10.80 12.31	82.64 84.19 —	80.59 78.32 79.58	169.51 167.68 165.42	102.53 126.46 —	151.67 143.66 146.27
0.058	15.74 11.85 9.54	83.58 85.10 —	77.65 75.00 75.38	166.43 167.08 170.27	113.60 120.64 —	137.30 138.50 148.80

*: les résultats ont été analysés avec le logiciel LYSYS

TABLEAU AXIV

Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le chlorure de mercure.

GROUPES [Hg ²⁺] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF* 650 nm	\bar{x} URF* 530 nm avant FDA	\bar{x} URF* 530 nm après FDA	\bar{x} URF* 650 nm	\bar{x} URF* 530 nm avant FDA	\bar{x} URF* 530 nm après FDA
Témoin	41 34 39	88 90 73	217 192 219	869 869 876	338 335 344	537 523 538
0.005	354 99 188	356 97 245	235 173 226	845 849 862	352 331 346	558 545 557
0.009	73 71 53	90 208 124	204 176 239	863 861 853	344 358 342	527 560 554
0.014	84 81 78	126 207 355	235 191 223	859 854 851	340 360 355	555 577 558

TABLEAU AXIV (suite)

Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le chlorure de mercure.

GROUPES [Hg ²⁺] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF* 650 nm	\bar{x} URF* 530 nm avant FDA	\bar{x} URF* 530 nm après FDA	\bar{x} URF* 650 nm	\bar{x} URF* 530 nm avant FDA	\bar{x} URF* 530 nm après FDA
0.018	67 107 36	96 204 202	242 170 283	886 883 868	355 371 365	578 560 553
0.023	182 161 69	181 272 366	154 197 182	927 921 892	408 429 366	605 560 574
0.027	266 81 151	276 174 116	156 200 191	935 937 900	416 428 395	589 594 588
0.036	43 129 106	131 347 142	124 201 230	954 948 929	452 489 413	624 590 601

TABLEAU AXIV (suite)
 Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le chlorure de mercure.

GROUPES [Hg ²⁺] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF* 650 nm	\bar{x} URF* 530 nm avant FDA	\bar{x} URF* 530 nm après FDA	\bar{x} URF* 650 nm	\bar{x} URF* 530 nm avant FDA	\bar{x} URF* 530 nm après FDA
0.045	23	105	247	946	460	572
	23	92	191	961	440	616
	49	193	172	939	427	611
0.055	74	241	231	959	476	540
	12	265	170	954	444	529
	46	191	275	950	460	697

*: les résultats ont été analysés avec le logiciel FACScan.

TABEAU AXV

Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le 2,4-D.

GROUPES [2,4-D] mg L ⁻¹	FENETRE 1		FENETRE 2			
	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA
Témoin	41 285 66 73 33	10 136 73 23 28	74 249 94 121 83	692 697 684 689 699	180 280 263 266 274	470 469 503 490 489
42.01	56 81 51	168 213 169	345 343 356	735 737 738	375 376 390	432 470 474
40.98	99 78 94	212 194 205	337 337 340	740 743 742	361 409 367	464 476 473
39.88	90 79 85	192 158 188	325 349 339	749 755 750	360 365 381	409 425 420

TABLEAU AXV (suite)
 Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la
 létalité algale avec le 2,4-D

GROUPES [2,4-D] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA
34.93	104 73 88	194 150 194	326 350 360	770 771 764	408 375 416	455 453 456
25.64	54 35 40	57 93 211	206 124 154	756 755 757	324 376 363	470 445 454
24.78	252 6 50	336 49 47	114 122 142	760 759 758	357 323 322	501 460 486

TABLEAU AXVI

Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le diquat dibromide

GROUPES [diquat] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA
Témoin	169	90	177	710	346	569
	53	65	177	707	345	569
	38	86	170	706	346	575
	288	202	179	701	338	569
	69	61	186	705	346	572
	16	61	491	705	344	621
127.27	108	370	507	667	527	615
	113	387	519	702	455	710
	140	418	535	671	481	768

TABLEAU AXVI (suite)

Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le diquat dibromide

GROUPES [diquat] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA
90.91	178 115 143	355 279 330	507 519 535	680 688 696	401 395 407	615 710 768
72.73	195 146 186	350 300 366	498 490 496	679 682 686	385 387 392	717 718 718
36.36	264 230 216	337 393 396	524 477 511	683 384 680	394 393 396	755 745 762

TABLEAU AXVII

Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le métolachlore

GROUPES [Métolachi.] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA
Témoin	41	44	311	698	201	535
	3	22	188	703	205	549
	77	13	246	701	215	552
	7	34	165	702	221	558
	10	10	158	694	218	562
454.55	6	12	307	807	718	947
	17	40	306	803	813	950
	5	17	374	812	780	959
363.66	32	55	323	805	788	959
	8	24	352	802	816	960
	23	38	398	806	766	964
345.45	53	73	395	793	766	947
	23	30	331	798	743	950
	10	32	383	803	805	965

TABLEAU AXVII(suite)

Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le métolachlore

GROUPES [Métolachl.] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA
327.27	43 79 19	71 82 44	344 408 943	803 801 797	793 729 817	936 948 943
272.73	71 37 34	67 47 59	310 303 314	786 791 792	721 780 729	945 942 955
200.0	56 25 41	39 27 35	267 289 344	783 784 783	295 290 290	959 948 947
163.64	73 4 23	66 58 69	351 303 342	775 787 779	286 58 69	920 918 952

TABLEAU AXVIII

Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec l'atrazine.

GROUPES [Atrazine] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA
Témoin	28 48 27 16	69 63 64 45	179 95 118 118	873 874 875 871	332 339 338 335	425 427 423 425
0.018	56 13 43	110 74 353	153 156 115	881 884 888	349 355 355	444 453 455
0.023	277 168 122	299 208 150	113 171 159	912 901 905	375 367 370	465 453 479
0.027	186 105 104	231 118 161	117 134 132	909 912 907	390 384 394	482 471 473

TABLEAU AXVIII (suite)
 Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la
 létalité algale avec l'atrazine.

GROUPES [Atrazine] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA
0.030	167 149	177 228	142 145	912 905	399 456	501 521
0.035	101 141 133	133 192 148	168 117 222	916 913 903	406 414 396	503 493 532
0.040	118 153 127	128 181 137	106 176 99	917 913 905	403 406 392	491 533 519
0.045	102 93 116	116 112 136	160 157 176	917 915 907	405 414 413	544 507 535

TABLEAU AXVIII(suite)

Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec l'atrazine.

GROUPES [Atrazine] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA
0.050	107 116 118	150 173 201	176 196 177	917 915 907	415 455 409	526 538 520
0.055	128 146 280	165 170 303	113 206 197	916 908 910	446 413 414	553 529 507

TABLEAU AXIX
 Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la
 létalité algale avec la cyanazine.

GROUPES [Cyanazine] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA
Témoins	141 232 83 111 172	233 110 132 298 126	103 106 116 183 134	701 696 691 700 691	350 346 345 350 347	588 552 580 589 577
0.100	259 39 282	359 163 327	210 182 180	755 757 787	394 385 390	670 682 612
0.118	58 65 61	247 257 375	104 114 248	787 791 784	414 416 432	527 516 516

TABLEAU AXIX (suite)

Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec la cyanazine.

GROUPES [Cyanazine] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA
0.136	69	280	522	790	421	522
	43	196	513	794	425	513
	23	152	521	788	420	521
0.145	60	287	107	782	424	514
	9	105	127	786	415	522
	42	195	135	786	416	522
0.164	37	231	125	776	408	522
	44	223	111	781	413	523
	17	164	116	774	407	515
0.172	77	301	158	780	414	528
	12	114	126	783	413	518
	18	154	161	779	409	519

TABEAU AXIX (suite)

Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec la cyanazine.

GROUPES [Cyanazine] mg L ⁻¹	FENETRE 1			FENETRE 2		
	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA	\bar{x} URF 650 nm	\bar{x} URF 530 nm avant FDA	\bar{x} URF 530 nm après FDA
0.182	8	160	127	778	412	516
	20	136	140	777	407	528
	13	161	104	776	409	524
0.228	10	106	104	773	430	557
	4	185	153	773	409	558
	3	177	108	770	404	589