

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE

PRESENTE A

L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

INRS-EAU

par

Danielle Rodrigue

Mise au point d'un protocole miniaturisé d'étude  
de l'activation génotoxique de produits  
chimiques par l'algue *Selenastrum capricornutum*

OCTOBRE 1991

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tout d'abord mon directeur de thèse, le docteur Pierre Couture, Doyen des Etudes Supérieures et de la Recherche, UQAR, pour son support lors de l'élaboration de cette étude.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à mon co-directeur de thèse, le docteur Christian Blaise, Chercheur scientifique, Centre Saint-Laurent, Environnement Canada, pour ses judicieux conseils, son appui constant ainsi que sa disponibilité ayant permis de mener à terme cette étude.

J'offre toute ma gratitude au docteur Norman Bermingham, Chef de la section Ecotoxicologie, Centre Saint-Laurent, Environnement Canada, pour son soutien financier.

Ma profonde reconnaissance s'adresse également au personnel du Laboratoire Capitaine Bernier, Centre Saint-Laurent, Environnement Canada, tout particulièrement au docteur Georges Costan, à Manon Harwood et Richard Legault pour leur très précieuse aide et leur support moral.

## RESUME

Les produits chimiques relâchés dans l'environnement lors des processus industriels, des méthodes d'agriculture et d'élevage modernes, bref de toute activité anthropogénique constituent un risque potentiel de mutations génétiques que l'on se doit d'évaluer afin de protéger l'environnement et la santé des êtres vivants. Une démarche relativement nouvelle en toxicologie environnementale consiste à étudier l'activation mutagénique/génotoxique de produits chimiques par les plantes. Cette activation végétale peut aussi s'effectuer par les algues. Notre contribution dans cet axe de recherche fut de mettre au point un protocole d'interaction sur microplaque à 96 puits mettant en évidence l'activation génotoxique de produits chimiques par l'algue *Selenastrum capricornutum*. Le potentiel d'activation de 3 produits chimiques de référence (NOP, MNNG et 4NQO) et de 9 herbicides (Imazaméthabenz, 2,4-D, Piclorame, Glyphosate, Bromoxynil, Métolachlore, Hexazinone, Cyanazine et Atrazine) a été évalué par l'indicateur microbien *Escherichia coli* PQ37 en utilisant la procédure standard du SOS Chromotest. Ce faisant, l'influence de différentes variables d'interaction sur le phénomène d'activation génotoxique algale fut étudié. Il s'agit de la concentration du produit chimique, la biomasse algale, la phase de croissance algale, la luminosité, le temps d'interaction, l'activation mammalienne S9 mix, l'espèce algale et l'indicateur génotoxique.

Les herbicides se sont révélés non génotoxiques et non activables par les algues dans nos conditions expérimentales tandis que les produits chimiques de référence ont donné des réponses intéressantes d'activation (NOP et 4NQO) ou de désactivation (MNNG) de leur génotoxicité endogène. L'importance relative de chaque variable d'interaction sur le phénomène d'activation génotoxique algale dépend de chaque produit chimique. Toutefois, en général, les meilleurs résultats d'activation (ou de désactivation) ont été obtenus avec une concentration de produit relativement élevée, une biomasse algale de  $10E7$  c/mL, un temps d'interaction de 4 h, une incubation à l'obscurité, en absence d'activation mammalienne S9 mix, la phase de croissance algale ayant laissé des ambiguïtés dans son interprétation. L'utilisation de 2 indicateurs bactériens plutôt qu'un est recommandée car certains produits activables ne seraient peut-être pas détectés par le SOS Chromotest alors qu'ils le seraient par le test d'Ames.

# TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
REMERCIEMENTS .....	ii
RESUME .....	iii
TABLE DES MATIERES .....	iv
LISTE DES TABLEAUX .....	vii
LISTE DES FIGURES .....	ix
CHAPITRE 1. INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 2. MATERIEL ET METHODES .....	19
2.1 Choix des produits chimiques .....	19
2.1.1 Produits chimiques de référence ..	19
2.1.2 Herbicides étudiés .....	20
2.1.3 Solvant employé .....	20
2.2 Variables et procédure d'interaction .....	22
2.2.1 Espèce algale et conditions expé- rimentales de croissance .....	22
2.2.2 Biomasse algale .....	23
2.2.3 Phase de croissance algale .....	24
2.2.4 Concentration des substances chimiques à l'étude .....	25
2.2.5 Préparation de la microplaque d'interaction .....	28
2.2.6 Conditions expérimentales lors de l'étude d'interaction .....	30
2.2.7 Filtration du contenu des puits des microplaques d'interaction ...	31

	<u>Page</u>
2.3 Dépistage de génotoxicité avec le SOS Chromotest .....	33
2.3.1 Principe du test .....	33
2.3.2 Préparation des microplaques .....	36
2.3.3 Mise en évidence de l'activité génotoxique.....	41
2.3.4 Calcul de l'activité génotoxique .	43
2.4 Analyse statistique des résultats .....	47
2.4.1 Comparaison de moyennes sur les facteurs d'induction .....	48
2.4.2 Analyse de variance factorielle sur les facteurs d'induction .....	48
2.4.3 Comparaisons multiples (contrastes <i>a posteriori</i> ) .....	49
 CHAPITRE 3. RESULTATS ET DISCUSSION .....	 50
3.1 Expériences préliminaires .....	50
3.1.1 Courbes de croissance algale .....	51
3.1.2 Evolution du pH dans la microplaque d'interaction .....	51
3.1.3 Génotoxicité des produits chimiques .....	54
3.1.3.1 Produits de référence .....	54
3.1.3.2 Herbicides .....	56
3.2 Mise au point du protocole d'étude d'interaction algale .....	63
3.2.1 Essais préliminaires .....	64
3.2.2 Validation du protocole définitif .....	65
3.2.3 Pondération des variables d'interaction .....	70
3.2.3.1 Concentration du produit ..	72
3.2.3.2 Biomasse algale .....	75
3.2.3.3 Phase de croissance .....	78

3.2.3.4	Luminosité .....	81
3.2.3.5	Temps d'interaction .....	83
3.2.3.6	Activation mammalienne ....	86
3.2.3.7	Espèce algale .....	88
3.3	Application du protocole d'étude d'interaction .....	90
3.3.1	Cas du MNG .....	91
3.3.2	Cas du 4NQO .....	96
3.3.3	Cas des herbicides .....	98
CHAPITRE 4. CONCLUSION .....		103
BIBLIOGRAPHIE .....		119

# LISTE DES TABLEAUX

		<u>Page</u>
1	Revue bibliographique des produits chimiques ayant subi une potentialisation mutagénique suite à une activation végétale .....	7
2	Revue bibliographique du potentiel d'activation végétale des produits chimiques à l'étude tel que révélé par le test d'Ames et le SOS Chromotest .....	17
3	Produits chimiques de référence utilisés pour la mise au point du protocole d'étude d'interaction algale .....	20
4	Liste des herbicides évalués à l'aide du protocole d'étude d'interaction .....	21
5	Valeurs des CI50-96h des produits chimiques et concentrations utilisées lors des études d'interaction .....	27
6	Concentrations des solutions de travail et concentrations utilisées pour la conduite du SOS Chromotest avec le NOP, MNNG et 4NQO .....	57
7	Concentrations des solutions de travail, concentrations pour la conduite du SOS Chromotest et limite de solubilité dans l'eau des herbicides .....	58
8	Concentrations des produits chimiques utilisées lors de l'application du protocole d'étude d'interaction .....	60
9	Rapports F et significativité de l'ANOVA simple sur la toxicité du NOP pour évaluer la répétabilité du protocole d'étude d'interaction algale en fonction de différentes variables .....	68

		<u>Page</u>
10	Analyse factorielle de variance de l'activation génotoxique du NOP par l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	71
11	Tests de comparaisons multiples "intervalles HSD de Tukey à 95 %" destinés à évaluer l'influence de la biomasse algale sur le degré d'activation du NOP .....	77
12	Analyse factorielle de variance de la désactivation génotoxique du MNNG par l'algue <i>S. capricornutum</i> .....	95
13	Analyse factorielle de variance de l'activation génotoxique du 4NQO par <i>S. capricornutum</i> .....	99
14	Résumé des changements du potentiel génotoxique des produits chimiques de référence soumis au protocole d'étude d'interaction algale ....	100
15	Effet des différentes variables sur la géotoxicité des produits chimiques de référence lors de l'application du protocole d'étude d'interaction algale .....	114

# LISTE DES FIGURES

		<u>Page</u>
1	Répartition des échantillons dans la microplaque lors de l'étude d'interaction .....	29
2	Schéma des différentes étapes du protocole d'étude d'interaction .....	32
3	Courbe dose-réponse typique d'un produit génotoxique selon le SOS Chromotest .....	35
4	Schéma du protocole pour le SOS Chromotest ...	38
5	Répartition des échantillons dans la microplaque lors de la réalisation du SOS Chromotest .	39
6	Courbe de croissance moyenne de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	52
7	Courbes de dose-réponse du NOP, MNNG et 4NQO avec ou sans S9 mix .....	55
8	Patron d'activation du NOP par <i>S. capricornutum</i> en phase stationnaire, incubée à l'obscurité et dont le SOS Chromotest a été réalisé sans S9 mix .....	74
9	Effet du S9 mix sur le patron d'activation du NOP par <i>S. capricornutum</i> en phase log et incubée à l'obscurité .....	87
10	Patron d'activation du NOP par <i>Chlorella vulgaris</i> en phase log, incubée à l'obscurité et dont le SOS Chromotest a été réalisé sans S9 mix .....	89
11	Patron de désactivation du MNNG par <i>S. capricornutum</i> en phase log ou sta, incubée à l'obscurité ou à la lumière, et dont le SOS Chromotest a été réalisé sans S9 mix .....	92
12	Patron d'activation du 4NQO par <i>S. capricornutum</i> en phase log ou sta, incubée à l'obscurité ou à la lumière, et dont le SOS Chromotest a été réalisé sans S9 mix .....	97

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

Le problème relativement inquiétant de la pollution de l'eau oblige les sociétés industrialisées à se doter de moyens de la détecter efficacement et à moindre coût afin de protéger l'environnement et la santé des êtres vivants. La pollution chimique introduit annuellement dans les écosystèmes des millions de tonnes de substances toxiques (Cornaby, 1981; Wang et coll., 1987). Outre les polluants complexes issus des procédés industriels de transformation (électrolyse de l'alumine, procédé de blanchiment des

papetières etc.), on estime que de 30 000 à 40 000 produits chimiques circulent sur le marché canadien (Gazette du Canada, 1989), dont près de 6 000 formulations de pesticides (Environnement Canada, 1990). Cairns (1981) rappelle que les produits chimiques de synthèse ayant des propriétés mutagènes (affectant le matériel génétique des cellules) sont généralement plus puissants et dangereux que ceux d'origine naturelle, d'où la nécessité de détecter efficacement le potentiel mutagénique des produits chimiques.

Une démarche relativement nouvelle en toxicologie environnementale consiste à étudier l'activation de produits chimiques en mutagènes par les plantes. Ces produits chimiques sont appelés promutagènes puisqu'ils nécessitent une activation par un système biologique (mammalien ou végétal) avant d'exprimer leur mutagénicité. L'activation mammalienne est utilisée de façon routinière depuis 1975 en parallèle avec la réalisation du test de mutagénicité classique (test d'Ames avec *Salmonella typhimurium* et le S9 mix; Ames et coll., 1975). Il a été démontré (Gentile et Plewa, 1982; Plewa et Gentile, 1982) qu'une variété de produits chimiques sont des promutagènes végétaux. Plusieurs de ces produits sont également des promutagènes animaux

tandis que les autres ne sont activables que par l'entremise d'un système végétal. Ces derniers, spécifiques au système végétal, sont d'une importance notable car ils représentent une sphère négligée de la mutagénèse environnementale. Ils peuvent néanmoins affecter l'humain par une variété de cheminements incluant, par exemple, leur concentration progressive par le biais de la chaîne alimentaire (Gentile et coll., 1986a).

Considérant l'accroissement rapide de l'utilisation des pesticides en agriculture moderne, il est primordial de déterminer la compatibilité de ces produits avec l'environnement et la santé publique. Leur présence dans l'environnement, particulièrement celle des herbicides, insecticides et fongicides, favorise les contacts directs avec les plantes, d'où leur possibilité d'être métaboliquement transformés. Tel qu'observé avec le métabolisme animal, des produits inactifs ou promutagènes peuvent être activés en mutagènes et, puisque les sentiers métaboliques végétaux sont parfois très différents de ceux retrouvés chez les animaux (Menn, 1978), il s'ensuit que les produits métaboliques finaux peuvent aussi être différents. Par exemple, le fongicide thiabendazole est converti en 5-hydroxythiabendazole chez les animaux mais en benzimidazole

et benzimidazole-2-carboxamide chez les plantes (Vonk et Sijpesteijn, 1977). Ceci signifie qu'un produit chimique, métabolisé d'abord par un système végétal et ensuite par un système animal, peut produire une molécule bionocive non détectée par les tests de mutagénicité habituels, comme le test d'Ames, avec lequel seule l'activation métabolique mammalienne (S9 mix) est utilisée (Wildeman et Nazar, 1982). D'où la nécessité de tester la séquence d'activation suivante:

$$\text{PRODUIT} + \text{PLANTE} = [\text{PI}]^{\text{a}}$$
$$[\text{PI}] + \text{S9 mammalien} = \text{Produit final 1}^{\text{b}}$$

en complément de celle-ci (test d'Ames habituel):

$$\text{PRODUIT} + \text{S9 mammalien} = \text{Produit final 2}^{\text{c}}$$

---

a [PI] = Produit intermédiaire résultant du métabolisme végétal.

b Produit final résultant des métabolismes végétal et mammalien consécutifs.

c Produit final résultant du métabolisme mammalien uniquement.

Les procédures généralement appliquées dans l'étude du phénomène d'activation végétale utilisent des méthodes *in vivo* et *in vitro*. Dans les méthodes *in vivo*, le produit chimique est appliqué (épanché ou incorporé à l'eau d'arrosage) sur des plantes intactes vivantes. Dans les méthodes *in vitro*, le produit est incorporé à un homogénat stérile de plante ou coincubé avec des cellules de plantes en culture. Pour les deux systèmes, un extrait de plante ou de surnageant ayant subi l'activation est ensuite mis en contact avec un indicateur biologique microbien pour détecter l'activité génotoxique (Gentile et Plewa, 1982). Contrairement aux animaux qui possèdent un foie, il n'existe pas, chez les plantes, un organe unique de détoxification métabolique. Un certain nombre d'études physiologiques (Bidwell, 1979) ont toutefois indiqué qu'il y avait généralement un taux métabolique élevé dans les jeunes plants, particulièrement dans les régions méristématiques à croissance rapide (Wildeman et Nazar, 1982). Ceci explique la fréquence de l'emploi de jeunes plants dans la plupart des études *in vivo*.

L'avantage principal des méthodes *in vivo*, en recourant à des plantes intactes, est celui de bien mimer les

conditions rencontrées en agriculture. Il existe cependant des désavantages tels que la possibilité de contamination microbiologique du matériel végétal, les artéfacts dans les tests microbiens dus à la présence de nutriments dans les échantillons, la transformation ou dégradation du produit à l'extérieur de la plante, la possible modification des métabolites ou l'induction de réactions chimiques durant l'homogénéisation, l'extraction ou la concentration des échantillons. L'atrazine (2-chloro-4-éthylamino-6-isopropylamino-s-triazine) fut le premier herbicide reconnu génotoxique par un indicateur microbien suite à une activation végétale *in vivo* (Gentile et Plewa, 1976; Gentile et coll., 1977; Gentile et Gentile, 1975; Plewa et Gentile, 1976). Selon une hypothèse, il serait un promutagène de plante (Gentile et Plewa, 1982). Ces derniers auteurs ont d'ailleurs testé 32 pesticides et combinaisons de pesticides pour vérifier leur potentiel de transformation en mutagènes par le maïs (*Zea mays*) dans des conditions expérimentales *in vivo*. On retrouve au tableau 1 une revue bibliographique de l'ensemble des produits chimiques ayant subi une potentialisation mutagénique suite à une activation végétale.

TABLEAU 1: Revue bibliographique des produits chimiques ayant subi une potentialisation mutagénique suite à une activation végétale

Produit chimique	Agent végétal d'activation	Indicateur microbien de l'activité génotoxique	Référence
Aflatoxine B1	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	1,2
	<i>Tulipa gesneriana</i>	<i>S. typhimurium</i>	3
2-acétylamino-fluorène	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	4
	<i>Zea mays</i>	<i>S. cerevisiae</i>	4
Alachlore	<i>Zea mays</i>	<i>S. cerevisiae</i>	6
	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	1,5
Aniline	<i>Pisum sativum</i>	<i>S. typhimurium</i>	7
	<i>Nicotiana tabaccum</i>	<i>S. typhimurium</i>	7
2-amino-fluorène	<i>Pisum sativum</i>	<i>S. typhimurium</i>	8,15
	<i>Nicotiana tabaccum</i>	<i>S. typhimurium</i>	9,11,12 13,16
	<i>S. capricornutum</i>	<i>S. typhimurium</i>	10
	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>S. typhimurium</i>	14,16
	<i>Daucus carota</i>	<i>S. typhimurium</i>	14,16
	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	15

TABLEAU 1: Revue bibliographique des produits chimiques ayant subi une potentialisation mutagénique suite à une activation végétale (suite)

Produit chimique	Agent végétal d'activation	Indicateur microbien de l'activité génotoxique	Référence
Atrazine	Tubercule de pomme de terre	<i>S. cerevisiae</i>	17
		<i>A. nidulans</i>	17
	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	1,6,35
	<i>Zea mays</i>	<i>S. cerevisiae</i>	18,19 34,35
	<i>Zea mays</i>	<i>E. coli</i>	35
	<i>Nicotiana glauca</i>	<i>A. nidulans</i>	20
	<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	21
		<i>Streptomyces coelicolor</i>	21
Azide de sodium	<i>Triticum aestivum</i>	<i>S. typhimurium</i>	25
	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>S. typhimurium</i>	33
Benzo(a)-pyrène	<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>S. typhimurium</i>	3,22
	<i>S. capricornutum</i>	<i>S. typhimurium</i>	23,24
Captan	<i>Triticum aestivum</i>	<i>S. typhimurium</i>	25,26
	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	25

TABLEAU 1: Revue bibliographique des produits chimiques ayant subi une potentialisation mutagénique suite à une activation végétale (suite)

Produit chimique	Agent végétal d'activation	Indicateur microbien de l'activité génotoxique	Référence
Chlordane	<i>Zea mays</i>	<i>S. cerevisiae</i>	27
	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	1,25
Cyanazine	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	1,6
Diallate	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	1
	<i>Triticum aestivum</i>	<i>S. typhimurium</i>	25
Dibromure d'éthylène	<i>Tradescantia</i> sp.	<i>E. coli</i>	29
		<i>A. nidulans</i>	29
7,12-diméthyl benzanthracène	<i>Tulipa gesneriana</i>	<i>S. typhimurium</i>	28
Diquat	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	25
	<i>Triticum aestivum</i>	<i>S. typhimurium</i>	26
Fonofos *	<i>Zea mays</i>	<i>S. cerevisiae</i>	1,27

TABLEAU 1: Revue bibliographique des produits chimiques ayant subi une potentialisation mutagénique suite à une activation végétale (suite)

Produit chimique	Agent végétal d'activation	Indicateur microbien de l'activité génotoxique	Référence
Heptachlore	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	1,27
Hydrazide maléique	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	1,2,5
Niclofène	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	25
	<i>Triticum aestivum</i>	<i>S. typhimurium</i>	26
N-phényl-N-carboxyphénylurée	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	4
		<i>S. cerevisiae</i>	4
2-nitro-p-phénylène-diamine	<i>Pisum sativum</i>	<i>S. typhimurium</i>	7
m-phényl-ènediamine	<i>Pisum sativum</i>	<i>S. typhimurium</i>	7
		<i>S. capricornutum</i>	<i>S. typhimurium</i>
	<i>Nicotiana tabaccum</i>	<i>S. typhimurium</i>	11,13,16
	<i>Tradescantia paludosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	30

TABLEAU 1: Revue bibliographique des produits chimiques ayant subi une potentialisation mutagénique suite à une activation végétale (suite)

Produit chimique	Agent végétal d'activation	Indicateur microbien de l'activité génotoxique	Référence
NOP **	<i>Nicotiana tabaccum</i>	<i>S. typhimurium</i>	12,31
	<i>Pisum sativum</i>	<i>S. typhimurium</i>	7,31
	<i>Gossypium</i> sp.	<i>S. typhimurium</i>	14
	<i>Daucus carota</i>	<i>S. typhimurium</i>	14
	<i>S. capricornutum</i>	<i>S. typhimurium</i>	24
o-phényl-ènediamine	<i>Pisum sativum</i>	<i>S. typhimurium</i>	7
4NQO *	<i>S. capricornutum</i>	<i>E. coli</i>	32
Pentachloro-2,4-cyclopendiène-1-yl	<i>Triticum aestivum</i>	<i>S. typhimurium</i>	25,26
	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	25
Procyazine	<i>Zea mays</i>	<i>S. typhimurium</i>	1,6
Propachlore	<i>Zea mays</i>	<i>S. cerevisiae</i>	1,6

TABLEAU 1: Revue bibliographique des produits chimiques ayant subi une potentialisation mutagénique suite à une activation végétale (suite)

Produit chimique	Agent végétal d'activation	Indicateur microbien de l'activité génotoxique	Référence
Terbufos *	<i>Zea mays</i>	<i>S. cerevisiae</i>	1,27
Triallate	<i>Triticum aestivum</i>	<i>S. typhimurium</i>	26
Ziram	<i>Triticum aestivum</i>	<i>S. typhimurium</i>	25,26

Références 1 Gentile et Plewa, 1982. 2 Gentile et Plewa, 1983b. 3 Higashi et coll., 1982. 4 El Tarras et coll., 1985. 5 Gentile et Plewa, 1980a. 6 Plewa et coll., 1984. 7 Gentile et coll., 1987a. 8 Gentile et Plewa, 1983a. 9 Plewa et coll., 1983. 10 Sauser et Klaine, 1990. 11 Wagner et coll., 1990. 12 Gentile et coll., 1986. 13 Gentile et coll., 1986a. 14 Gentile et coll., 1987. 15 Gentile et Plewa, 1988. 16 Plewa et coll., 1988. 17 Loprieno et Adler, 1980. 18 Plewa et Gentile, 1975. 19 Plewa et Gentile, 1976. 20 Benigni et coll., 1979. 21 Loprieno et coll., 1980. 22 Higashi et coll., 1981. 23 Schoeny et coll., 1985. 24 Gentile et coll., 1990. 25 Wildeman et Nazar, 1982. 26 Rasquinha et coll., 1988. 27 Gentile et coll., 1982. 28 Pannkova et coll., 1985. 29 Scott et coll., 1978. 30 Anderson et coll., 1988. 31 Gentile et coll., 1985. 32 Harwood et coll., 1989. 33 Veleminsky et coll., 1987. 34 Gentile et Plewa, 1975. 35 Gentile et coll., 1977.

\* = ces produits subissent une désactivation végétale.

\*\* = on note pour le NOP un accroissement de sa mutagenicité de départ.

Dans les méthodes *in vitro*, on expose des cellules de plantes en culture ou des homogénats de plantes (ou cellules de plantes) stériles à un produit chimique. Un indicateur microbien est par la suite mis en contact avec un extrait du mélange d'activation pour détecter le pouvoir mutagénique du produit. Une variante de ces méthodes, nommée "test de coincubation" a été utilisée par Gentile et coll. (1986a). Avec cette technique, ils ont incubé ensemble les cellules de plante, le produit chimique et l'indicateur microbien. Après une certaine période d'interaction, ils ont ajouté un aliquot de ce mélange à une gélose molle et étalé le tout sur un milieu sélectif en boîte de Pétri pour effectuer la numération éventuelle des mutants de *Salmonella typhimurium*. Un important avantage de ces méthodes est qu'elles permettent de comparer l'activation végétale et l'activation mammalienne (S9 mix).

Une voie de recherche tout à fait capitale est celle qui cherche à identifier les promutagènes dépendant du système photosynthétique (Gentile et Plewa, 1982). Certains auteurs (Rasquinha et coll., 1988) ont d'ailleurs utilisé un homogénat de cellules végétales comme source d'enzymes métaboliques dans un test d'Ames. L'emploi de telles procédures permet donc de détecter les promutagènes

spécifiques au système d'activation végétale tels que l'atrazine, la cyanazine, le propachlore, l'alachlore et l'heptachlore (Plewa et coll., 1984).

Même si la potentialisation mutagénique par voie végétale est connue depuis une décennie, peu d'information est cependant disponible concernant les mécanismes enzymatiques de transformation métabolique et l'analyse du mutagène résultant de ce système d'activation, comparativement aux études d'activation animale (Higashi, 1988). Quelques études ont néanmoins traité du métabolisme des xénobiotiques chez les plantes supérieures (Baldwin, 1977; Menn, 1978; Lamoureux et Frear, 1979; Mumma et Hamilton, 1979; Shimabukuro et Walsh, 1979; Dohn et Krieger, 1981).

Le système végétal possède également des propriétés antimutagéniques. Fujimoto et coll. (1987) ont démontré cette propriété chez 3 types de plantes aquatiques: *Potamogeton crispus* L., *Leersia japonica* Makino et *Polygonum hydropiper* L. Ces 3 plantes ont réduit significativement la mutagénicité du benzo(a)pyrène, un mutagène direct. Les deux premières ont également réduit la mutagénicité du 2-nitrofluorène.

L'activation végétale peut aussi s'effectuer par les algues. Evaluer le rôle des algues dans la mutagénèse environnementale est important pour plusieurs raisons. Les algues sont ubiquistes dans les eaux douces et sont ultimement exposées à une grande variété de produits chimiques par l'entremise des eaux industrielles ou domestiques, de ruissellement et d'infiltration. Elles sont, par ailleurs, à la base de la chaîne alimentaire aquatique et constituent un vaste réservoir métabolique en contact très étroit avec l'eau. Plusieurs algues unicellulaires sont également caractérisées par une grande surface d'absorption. Cette propriété constitue aussi un facteur significatif dans l'assimilation de diverses substances chimiques présentes dans la colonne d'eau (Sausser et Klaine, 1990).

Notre contribution dans cet axe de recherche voué aux études portant sur l'activation génotoxique par les systèmes végétaux consiste à mettre au point un protocole d'étude d'interaction sur microplaque à 96 puits. A l'aide de l'algue *Selenastrum capricornutum* (Chlorophycée) comme microorganisme d'interaction, nous voulons aussi étudier le potentiel d'activation de différents produits chimiques de référence, soit le 4-nitro-o-phénylènediamine (NOP), le N-méthyle-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) et le 4-Nitro-

quinoline-N-oxyde (4NQO) et d'herbicides (Imazaméthabenz, 2,4-D, Piclorame, Glyphosate, Bromoxynil, Métochloré, Hexazinone, Cyanazine et Atrazine). Quant à la détection de l'activation nous recourons à l'indicateur microbien *Escherichia coli* PQ37 en utilisant la procédure du SOS Chromotest (test de génotoxicité). Le tableau 2 présente les résultats rapportés dans la littérature concernant les tests de mutagénicité (Ames) et de génotoxicité (SOS Chromotest) effectués avec les produits chimiques nommés ci-haut. Leur potentiel d'activation végétale est également indiqué.

Nous tenions à élaborer un protocole d'étude d'interaction algale qui soit rapide, simple et économique. Dans cette optique, l'usage des microplaques à 96 puits est séduisant de même que le SOS Chromotest, qui est plus économique et plus rapide que le test d'Ames. Comme produit modèle pour la mise au point du protocole nous avons choisi le NOP, lequel est un dérivé d'aniline. Il a déjà servi de modèle pour des études d'activation végétale avec les pesticides car les anilines sont des produits de dégradation connus d'un grand nombre de pesticides (Lamoureux et Frear, 1979). A cause de l'association entre ces produits de dégradation et les plantes, une meilleure compréhension de leur mutagénicité suite au phénomène d'activation végétale

TABLEAU 2: Revue bibliographique du potentiel d'activation végétale des produits chimiques à l'étude tel que révélé par le test d'Ames et SOS Chromotest

Produit	Ames	SOS Chromotest	Activation végétale
Atrazine	- 1,4,15,16 17,18,24	- 1,24	> 4,23,28,29,30 31,32,33,34 0 17
Bromoxynil	- 16,22	i	i
Cyanazine	- 1,5,19	- 1	> 4,23
2,4-D	- 5,16	i	i
Glyphosate	- 3,5	i	0 3
Hexazinone	i	- 2	i
Imaza- méthabenz	i	i	i
Métolachlore	- 4,21	i	0 4,23
MNNG	+ 7,12,14,24,25	+ 8,9,12,14,24,25	0 8
NOP	+ 6,13	+ 12	> 6,10,11,26,27
4NQO	+ 7,24,25	+ 1,8,24,25	< 8
Piclorame	- 16,20	i	i

Références: 1 Xu et Schurr, 1990. 2 Williamson, 1988. 3 Wildeman et Nazar, 1982. 4 Plewa et coll., 1984. 5 Schirasu et coll., 1981. 6 Gentile et coll., 1990. 7 De Flora et coll., 1984. 8 Harwood, 1987. 9 Mamber et coll., 1986. 10 Gentile et coll., 1985. 11 Gentile et coll., 1986. 12 Otha et coll., 1984. 13 Ames et coll., 1975b. 14 von der Hude et coll., 1988. 15 Butler et Hoagland, 1989. 16 Anderson et coll., 1972. 17 Sauser et Klaine, 1990. 18 Trotter et coll., 1990b. 19 Pauli et coll., 1991. 20 Trotter et coll., 1990a. 21 Kent et coll., 1991. 22 Anderson et coll., 1973. 23 Gentile et Plewa, 1982. 24 Quillardet et Hofnung, 1985. 25 Gentile et coll., 1987a. 26 Gentile et coll., 1987. 27 Loprieno et Adler, 1980. 28 Plewa et Gentile, 1975. 29 Plewa et Gentile, 1976. 30 Benigni et coll., 1979. 31 Loprieno et coll., 1980. 32 Gentile et Plewa, 1975. 33 Gentile et coll., 1977.

i = introuvé dans la littérature      - = résultat négatif  
 + = résultat positif                      0 = aucun changement  
 < = diminution de la mutagénicité ou génotoxicité  
 > = augmentation de la mutagénicité ou génotoxicité

est primordiale pour une gestion du risque que représentent ces agents pour l'environnement et la santé publique (Gentile et coll., 1985). Les herbicides ont, quant à eux, été choisis vu leur utilisation courante au Canada. Une diversité de végétation indésirable, tant aquatique que terrestre, peut être contrôlée par l'application de ces produits (Anonyme, 1988). De plus, ces herbicides ayant déjà fait l'objet d'études concernant leur phytotoxicité (CI50-96h) envers l'algue *Selenastrum capricornutum* (St-Laurent et coll., 1991), ils constituaient donc un choix logique pour nos travaux.

## CHAPITRE 2

### MATERIEL ET METHODES

#### 2.1 Choix des produits chimiques

##### 2.1.1 Produits chimiques de référence

Trois produits chimiques reconnus pour leur activité génotoxique ont été utilisés lors de la mise au point du protocole d'interaction algale (tableau 3). Vu la miniaturisation envisagée du protocole, ces produits ont permis de fixer les volumes et les concentrations nécessaires afin d'obtenir une réponse génotoxique détectable par le SOS Chromotest. De plus, le NOP a été utilisé pour confirmer la répétabilité du protocole d'interaction.

TABLEAU 3: Produits chimiques de référence utilisés pour la mise au point du protocole d'étude d'interaction algale

Appellation	Caractéristique	Référence
MNNG (N-méthyle-N'-nitro-N-nitroso-guanidine)	Cancérogène	Harwood et coll. 1989
NOP (4-nitro-o-phénylènediamine)	Mutagène	Gentile et coll. 1985, 1986, 1987a
4NQO (4-Nitro-quinoline-N-oxyde)	Mutagène	Quillardet et coll. 1985b

### 2.1.2 Herbicides étudiés

Neuf herbicides couramment utilisés au Canada et représentant sept classes de substances chimiques ont aussi été évalués à l'aide du protocole d'étude d'interaction algale (tableau 4).

### 2.1.3 Solvant employé

Le DMSO (diméthylsulfoxyde) 10% fut le solvant employé pour la dissolution de ces produits afin de préparer les solutions mères et de travail ainsi que les dilutions

TABLEAU 4: Liste des herbicides évalués à l'aide du protocole d'étude d'interaction algale

Nom	Classe chimique	Manufacturier
Atrazine	Triazine	Reidel-deHaën
Bromoxynil	Benzonitrile	Rhône-Poulenc Agriculture
Cyanazine	Triazine	E.I. du Pont de Nemours & Co
2,4-D *	Composé phénolique	Dow Chemical Canada
Glyphosate	Acide aliphatique	Monsanto Canada Inc
Hexazinone	Triazine	E.I. du Pont de Nemours & Co
Imaza- méthabenz	Imidazolinone	American Cyanamid Co
Métolachlore	Acétamide	Ciba-Geigy Canada Ltd
Piclorame	Acide picolinique	Dow Chemical Canada

\* Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

expérimentales. Ce solvant est d'ailleurs recommandé lors de l'utilisation du SOS Chromotest (Orgenics Ltd, 1988). Tous les produits chimiques, y compris les herbicides (voir 2.1.2), étaient solubles dans le DMSO, ce qui a permis de n'utiliser qu'un seul solvant lors de nos travaux. De plus, on connaît bien la fourchette des concentrations toxiques de ce solvant vis-à-vis de l'algue utilisée dans notre étude (Environnement Canada, 1989a).

## 2.2 Variables et procédure d'étude d'interaction

### 2.2.1 Espèce algale et conditions expérimentales de croissance

Bien connue comme algue modèle en toxicologie aquatique en Amérique du Nord (Blaise et coll., 1986; USEPA, 1978, 1985), l'algue verte unicellulaire *Selenastrum capricornutum* Printz (ATCC 22662) a été choisie pour nos travaux. Par ailleurs, son emploi récent en tant que bioindicateur d'interaction dans une étude d'activation de la génotoxicité du NOP (Gentile et coll., 1990) nous a également incités à l'utiliser.

Le milieu de culture utilisé, soit le 1X AAP ("Algal Assay Procedure": USEPA, 1978), les conditions de température ( $24 \pm 2$  °C), de lumière (lampes fluorescentes "cool white",  $95 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) et d'agitation (100 rpm) sont classiques et déjà bien décrites (Environnement Canada, 1989a).

Les cultures d'algues employées pour nos travaux expérimentaux provenaient d'un prélèvement de 2 mL d'une culture d'entretien en phase logarithmique de croissance

(Environnement Canada, 1989a). Ce prélèvement était transféré aseptiquement dans 1 L de milieu AAP stérile contenu dans un erlenmeyer d'une capacité de 4 L.

Un essai seulement a été effectué avec *Chlorella vulgaris* sp., une autre algue verte unicellulaire dont l'emploi comme organisme bioanalytique est aussi populaire (voir, par exemple, Truhaut et coll., 1980) afin de comparer son patron d'activation avec celui de *S. capricornutum*. L'entretien de cette algue et l'essai expérimental subséquent ont été réalisés sous les mêmes conditions que pour *S. capricornutum*.

#### 2.2.2 Biomasse algale

Trois biomasses algales ( $10E5$ ,  $10E6$  et  $10E7$  c/mL) ont été retenues en tenant compte d'études déjà effectuées dans le domaine (Schoeny et coll., 1985; Harwood et coll., 1989; Gentile et coll., 1990; Sauser et Klaine, 1990). Ces biomasses sont obtenues en concentrant la culture d'algue d'entretien par une série de centrifugations (2000 g, 15 min.) et lavages subséquents des culots avec une solution de  $\text{NaHCO}_3$  15 mg/L. Afin d'obtenir la densité cellulaire expérimentale requise, on dénombre les algues concentrées à

l'aide d'un compteur électronique de particules muni d'une cellule de 70  $\mu\text{m}$  (Coulter Counter, Modèle ZM). Ensuite, celles-ci sont diluées avec un volume précis de  $\text{NaHCO}_3$  15mg/L, de façon à ce que chaque puits d'une microplaque d'interaction reçoive  $10^5$ ,  $10^6$  ou  $10^7$  cellules par mL (section 2.2.5). Quelques essais ont aussi été réalisés avec une biomasse algale de  $10^8$  c/mL afin de comparer le patron d'activation avec celui de la biomasse  $10^7$  c/mL.

### 2.2.3 Phase de croissance algale

Des algues en phase logarithmique (6 jours) et stationnaire (10 jours) ont été utilisées afin de tenir compte de l'influence possible de l'âge des algues sur la réponse d'interaction. Gentile et coll. (1986, 1987, 1990) ont déjà rapporté des réponses d'activation qui variaient en fonction de ce facteur. Nous avons donc précisé les temps correspondant à chacune des deux phases de croissance (log et sta) en établissant la courbe de croissance de *S. capricornutum* en fonction de nos conditions expérimentales en laboratoire. Cette courbe fut établie par dénombrement cellulaire provenant de prélèvements journaliers de cultures d'algues croissant dans trois erlenmeyers de 4 L contenant chacun 1 L de milieu AAP 1X (inoculum de 20 000 c/mL).

#### 2.2.4 Concentration des substances chimiques à l'étude

Pour chaque produit chimique évalué, trois concentrations ont été choisies en tenant compte de sa CI50-96h (concentration inhibant de 50% la croissance cellulaire après 96 h d'exposition) vis-à-vis de *S. capricornutum*. Cette valeur de CI50-96h nous servait de guide dans la sélection de la plus forte concentration d'essai (10 X CI50-96h). Par contre, les produits chimiques de référence (NOP, MNNG, et 4NQO) ont été testés à des concentrations parfois bien au delà de leur CI50-96h respectives afin d'accroître le pouvoir de détection de l'indicateur de génotoxicité (SOS Chromotest) décrit plus loin. Nous justifions cette décision en considérant qu'une CI50-96h témoigne par définition d'une exposition de 96 h alors que notre protocole d'interaction en était un de 4 h. D'un point de vue toxicologique, il est permis de croire que les algues pourraient ne pas être irréversiblement agressées par de plus fortes concentrations de produits chimiques si l'exposition ne dure que 4 h. En effet, de récents travaux comparant des CI50-4h (test d'exposition de 4 h suivi d'une période de récupération de 96 h) avec des CI50-96h pour 9 produits chimiques démontrent bien une plus grande tolérance de *S. capricornutum* envers ces produits après une exposition de seulement 4 h (Hickey

et coll., 1991). Par ailleurs, l'objectif visé étant de mettre en évidence un potentiel d'activation génotoxique d'un produit chimique par l'entremise des algues, il n'est pas absolument essentiel que celles-ci demeurent viables durant toute la durée de l'exposition. Même en assumant un effet algicidal dû à une trop forte concentration d'un produit, les algues pourraient avoir, au préalable, métabolisé une partie de la substance étudiée et modifier son activité génotoxique.

Habituellement, 0.5 X C1 (plus forte concentration d'essai) constituait la seconde concentration (C2) et 0.25 X C1 la troisième concentration (C3). Le tableau 5 présente les CI50-96h de chaque produit chimique utilisé ainsi que les concentrations testées (C1, C2 et C3) dans notre étude.

Lorsque la valeur de la CI50-96h n'était pas connue (NOP et MNNG), elle était déterminée à l'aide du microtest algal avec *S. capricornutum* (Blaise et coll., 1986).

TABLEAU 5: Valeurs des CI50-96h des produits chimiques et concentrations utilisées lors des études d'interaction

Produit chimique	CI50-96h (mg/L)	Concentrations d'interaction (mg/L)		
		C1	C2	C3
NOP	31,50	140,00	70,00	35,00
MNNG	6,00 <sup>a</sup>	6,00	3,00	1,50
4NQO	7,10 <sup>a,c</sup>	20,00	10,00	5,00
Atrazine	30,00 <sup>a,b</sup>	300,00 <sup>a</sup>	150,00 <sup>a</sup>	75,00 <sup>a</sup>
Bromoxynil	3,50 <sup>b</sup>	35,00	17,50	8,75
Cyanazine	17,00 <sup>a,b</sup>	170,00 <sup>a</sup>	85,00 <sup>a</sup>	42,50 <sup>a</sup>
2,4-D	24,00 <sup>b</sup>	240,00	120,00	60,00
Glyphosate	8,00 <sup>b</sup>	80,00	40,00	20,00
Hexazinone	28,00 <sup>a,b</sup>	280,00 <sup>a</sup>	140,00 <sup>a</sup>	70,00 <sup>a</sup>
Imaza-méthabenz	90,00 <sup>b</sup>	900,00	450,00	225,00
Métolachlore	51,00 <sup>a,b</sup>	510,00 <sup>a</sup>	255,00 <sup>a</sup>	127,50 <sup>a</sup>
Piclorame	23,00 <sup>b</sup>	230,00	115,00	57,50

- <sup>a</sup> Ces valeurs sont en µg/L  
<sup>b</sup> St-Laurent et coll., 1991  
<sup>c</sup> Harwood, 1987

### 2.2.5 Préparation de la microplaque d'interaction

Le protocole a été établi entièrement à partir d'une microplaque en polystyrène de 96 puits à fonds ronds de marque Linbro. La figure 1 illustre la disposition des catégories de témoins et de traitements dans la microplaque d'interaction. Par convention, les biomasses algales ( $10E5$ ,  $10E6$  et  $10E7$  c/mL) furent amenées dans chacun des puits par l'apport d'un volume de 120  $\mu$ L. De façon similaire, les concentrations finales de chaque produit chimique furent produites par l'ajout d'un volume de 100  $\mu$ L. La légende de la figure 1 précise les emplacements expérimentaux. Les puits "4" constituent le contrôle négatif pour les algues, les puits "5" le contrôle négatif algues + solvant, les puits "6" le contrôle négatif pour le solvant et les puits "7", "8" et "9" les contrôles C1, C2 et C3, respectivement. Enfin, les puits "10" ne contiennent que de l'eau et du solvant.

La configuration type de la microplaque d'interaction a été conçue pour minimiser l'incidence de contamination entre puits adjacents imputable au phénomène de volatilité (Thellen et coll., 1989). Pour cette raison, et aussi pour assurer une constance volumétrique, nous avons ajouté de

		COLONNE											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
R A N G E E	A	1A	1A	1A	1A	1B	1B	1B	1B	1C	1C	1C	1C
	B	4	4	4	4					6	6	6	6
	C	2A	2A	2A	2A	2B	2B	2B	2B	2C	2C	2C	2C
	D												
	E	3A	3A	3A	3A	3B	3B	3B	3B	3C	3C	3C	3C
	F												
	G	5	5	5	5		10	10		8	8	8	8
	H	7	7	7	7		10			9	9	9	9

FIGURE 1: Répartition des échantillons dans la microplaque lors de l'étude d'interaction

<u>No de puits</u>	<u>Traitements</u>
1A	120 $\mu$ L 10E5 c/mL + 100 $\mu$ L C1
1B	120 $\mu$ L 10E6 c/mL + 100 $\mu$ L C1
1C	120 $\mu$ L 10E7 c/mL + 100 $\mu$ L C1
2A	120 $\mu$ L 10E5 c/mL + 100 $\mu$ L C2
2B	120 $\mu$ L 10E6 c/mL + 100 $\mu$ L C2
2C	120 $\mu$ L 10E7 c/mL + 100 $\mu$ L C2
3A	120 $\mu$ L 10E5 c/mL + 100 $\mu$ L C3
3B	120 $\mu$ L 10E6 c/mL + 100 $\mu$ L C3
3C	120 $\mu$ L 10E7 c/mL + 100 $\mu$ L C3
4	120 $\mu$ L 10E7 c/mL + 100 $\mu$ L NaHCO <sub>3</sub>
5	120 $\mu$ L 10E7 c/mL + 100 $\mu$ L DMSO 10%
6	120 $\mu$ L NaHCO <sub>3</sub> + 100 $\mu$ L DMSO 10%
7	120 $\mu$ L NaHCO <sub>3</sub> + 100 $\mu$ L C1
8	120 $\mu$ L NaHCO <sub>3</sub> + 100 $\mu$ L C2
9	120 $\mu$ L NaHCO <sub>3</sub> + 100 $\mu$ L C3
10	120 $\mu$ L H <sub>2</sub> O + 100 $\mu$ L DMSO 10%
non identifié	220 $\mu$ L H <sub>2</sub> O

l'eau (220  $\mu$ L) aux puits non utilisés de la microplaque d'interaction. Même si le potentiel d'évaporation des puits périphériques observé lors des tests de toxicité de 96 h avec algues s'avérait inexistant dans notre cas, vu le court temps d'incubation de 4 h retenu pour l'interaction (voir 2.2.6), nous avons tout de même scellé chaque microplaque dans un sac de plastique transparent en polyéthylène selon la procédure recommandée (Blaise et coll., 1986).

#### 2.2.6 Conditions expérimentales lors de l'étude d'interaction

L'incubateur à microplaques (New Brunswick, modèle Psychrotherm G27) était maintenu à une température de  $24 \pm 2$  °C. Les microplaques y étaient soit incubées à la lumière (voir 2.2.1), soit à l'obscurité afin de déceler l'influence possible de la lumière sur l'activation métabolique.

Inspirés par les études de Gentile et coll. 1990 et de Schoeny et coll. 1985, selon lesquelles certains produits chimiques seraient métabolisés rapidement (3 h pour le NOP) alors que d'autres nécessiteraient plus de 24 h (48 h pour le benzo-a-pyrène), nous avons retenu 4 h et 24 h comme temps d'interaction correspondant à une exposition aiguë et chronique, respectivement.

Pour des raisons d'ordre pratique (importantes biomasses d'algues concentrées dans de petits volumes) et par souci de développer un protocole miniaturisé relativement rapide, nous n'avons pas expérimenté au-delà d'un temps d'exposition de 24 h. En fait, outre un seul essai réalisé avec un temps d'interaction de 24 h, tous les autres ont été effectués avec un temps d'interaction de 4 h.

#### 2.2.7 Filtration du contenu des puits des microplaques d'interaction

Après la période d'interaction, le contenu des puits de chaque microplaque était transféré dans une microplaque "filtrante" spéciale dont le fond de chaque puits était constitué d'un filtre de 0,65  $\mu\text{m}$  (Millipore Cat. no. MADVN6550). Un appareil de filtration (Millipore "Vacuum Manifold", Cat. no. MAVM09600) permettait de récolter les filtrats dans une microplaque ordinaire (appelée microplaque de filtrats) placée sous la microplaque "filtrante". Ces microplaques de filtrats étaient par la suite entreposées 10 à 12 heures à 4 °C à l'obscurité. La figure 2 illustre les étapes du protocole d'étude d'interaction.

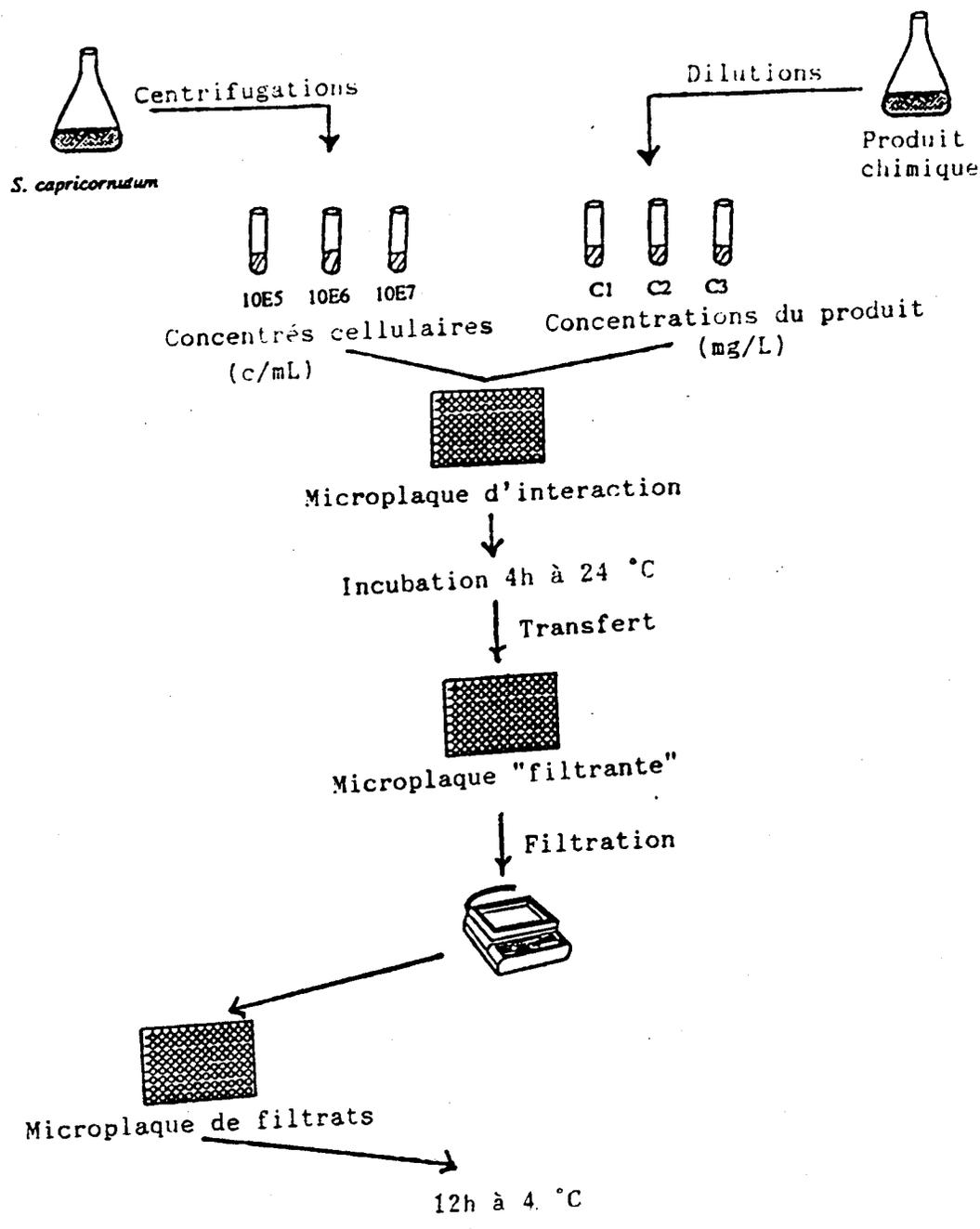


FIGURE 2: Schéma des différentes étapes du protocole d'étude d'interaction

### 2.3 Dépistage de génotoxicité avec le SOS Chromotest

La génotoxicité est détectée par le SOS Chromotest. Il s'agit d'un test colorimétrique de dépistage rapide (quelques heures) du potentiel génotoxique de substances pures et d'échantillons complexes sous forme aqueuse (Organics Ltd, 1986, 1988; Fish et coll., 1987; Harwood et coll., 1989).

#### 2.3.1 Principe du test

La bactérie *Escherichia coli* PQ37 est le résultat de manipulations génétiques ayant pour but de modifier son système de réparation SOS, de neutraliser sa capacité de réparation par excision et d'augmenter la perméabilité de sa membrane cellulaire. Les modifications sur son système SOS consistent en la fusion du gène structurel lacZ, codant pour la synthèse de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase, aux gènes *sfiA* contrôlant la réponse SOS. Egalement, la suppression de la région lacZ normale a pour conséquence de rendre l'activité de la  $\beta$ -galactosidase strictement dépendante de l'expression des gènes *sfiA* (Quillardet et Hofnung, 1985). Ainsi, lorsqu'une réponse SOS est induite par des agents génotoxiques, la production de  $\beta$ -galactosidase traduit une

tentative de réparation d'ADN par la bactérie. L'enzyme est dosée par réaction colorimétrique en ajoutant un chromogène.

Un échantillon est considéré génotoxique lorsque la concentration de  $\beta$ -gal est significativement élevée. Cependant, une faible induction de cette enzyme ne signifie pas nécessairement une absence de potentiel génotoxique de la part de l'échantillon évalué. En effet, certains produits à la fois génotoxiques et toxiques testés à de trop fortes concentrations peuvent inhiber la synthèse protéinique occasionnant ainsi une inhibition de l'induction de la  $\beta$ -galactosidase (Quillardet et Hofnung, 1985). La mesure d'une seconde enzyme, celle-ci constitutive pour la cellule bactérienne, la phosphatase alcaline, reflète la viabilité cellulaire et permet de prendre en compte un effet toxique. Un échantillon est considéré toxique s'il provoque une baisse significative de la phosphatase alcaline comparativement aux témoins (Environnement Canada, 1989b).

La réponse génotoxique s'exprime sous forme de relation de dose-réponse, comme l'illustre la figure 3. La pente de la portion linéaire de la courbe permet de calculer le potentiel d'induction génotoxique de l'échantillon ou le SOSIP ("SOS Induction Potential": Orgenics Ltd, 1986, 1988).

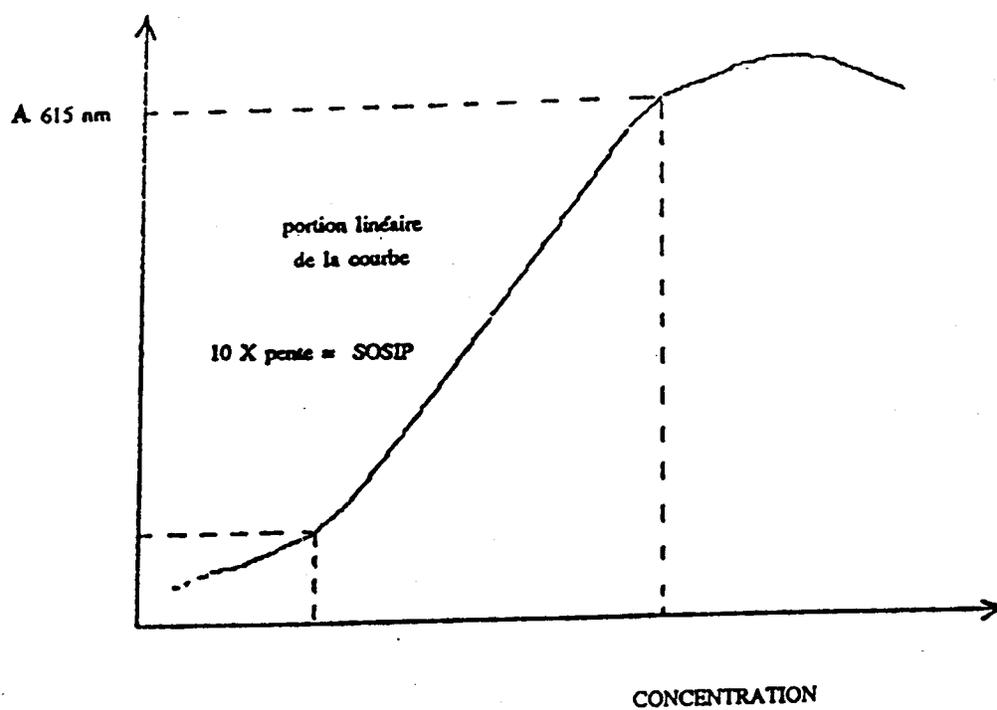


FIGURE 3: Courbe dose-réponse typique d'un produit génotoxique selon le SOS Chromotest (Environnement Canada, 1989b)

Pour un produit chimique, la valeur SOSIP reflète son potentiel d'induction par nmole pour les bactéries du SOS Chromotest. Plus une valeur de SOSIP est élevée, plus le potentiel génotoxique de l'échantillon est élevé (Quillardet et Hofnung, 1985)

En vertu du protocole original, le SOSIP est utilisé pour qualifier un échantillon si la courbe de dose-réponse a été générée avec au moins huit concentrations. C'est le cas par exemple pour les contrôles positifs 4NQO et 2AA qui sont incorporés dans la procédure du SOS Chromotest. La miniaturisation de notre protocole d'interaction ne nous permettait pas de tester plus de trois concentrations d'un même produit par microplaque. Nous avons donc choisi d'exprimer les résultats en termes de facteurs d'induction (voir 2.3.4). Comme pour le SOSIP, plus la valeur du facteur d'induction (FI) est élevée, plus le potentiel génotoxique de l'échantillon est élevé.

### 2.3.2 Préparation des microplaques

Les tests de génotoxicité furent réalisés sur microplaque avec des trousse commerciales du SOS Chromotest de la compagnie Organics, selon le protocole recommandé

(Orgenics Ltd., 1988). La figure 4 illustre les différentes étapes de la conduite du SOS Chromotest.

Le test débute par la réhydratation de la culture bactérienne lyophilisée en ajoutant un volume de 20 mL de bouillon nutritif. Celle-ci est alors incubée au bain-marie agitateur (Grant SS40-D, 190 rpm) pendant une période de 12 heures.

Deux heures avant la fin de la période d'incubation nocturne, on introduit dans deux microplaques SOS (Linbro, fonds plats) 50  $\mu$ L du contenu de chaque puits (1A, 1B, 1C, 2A ... 8, 9 et 10) de la microplaque de filtrats et ceci en triplicata selon la disposition illustrée à la figure 5. Les trois premières colonnes de chaque microplaque SOS sont réservées aux blancs, témoins et contrôle positif du test SOS.

Les quatre premiers puits de la colonne 1 (blanc) contiennent 10  $\mu$ L de DMSO 10% ainsi que 100  $\mu$ L de milieu de culture. Les quatre derniers puits de cette même colonne contiennent 50  $\mu$ L de DMSO 4,55% ainsi que 100  $\mu$ L de milieu de culture. Nous avons ainsi modifié la concentration de DMSO afin qu'elle soit identique à celle contenue dans les

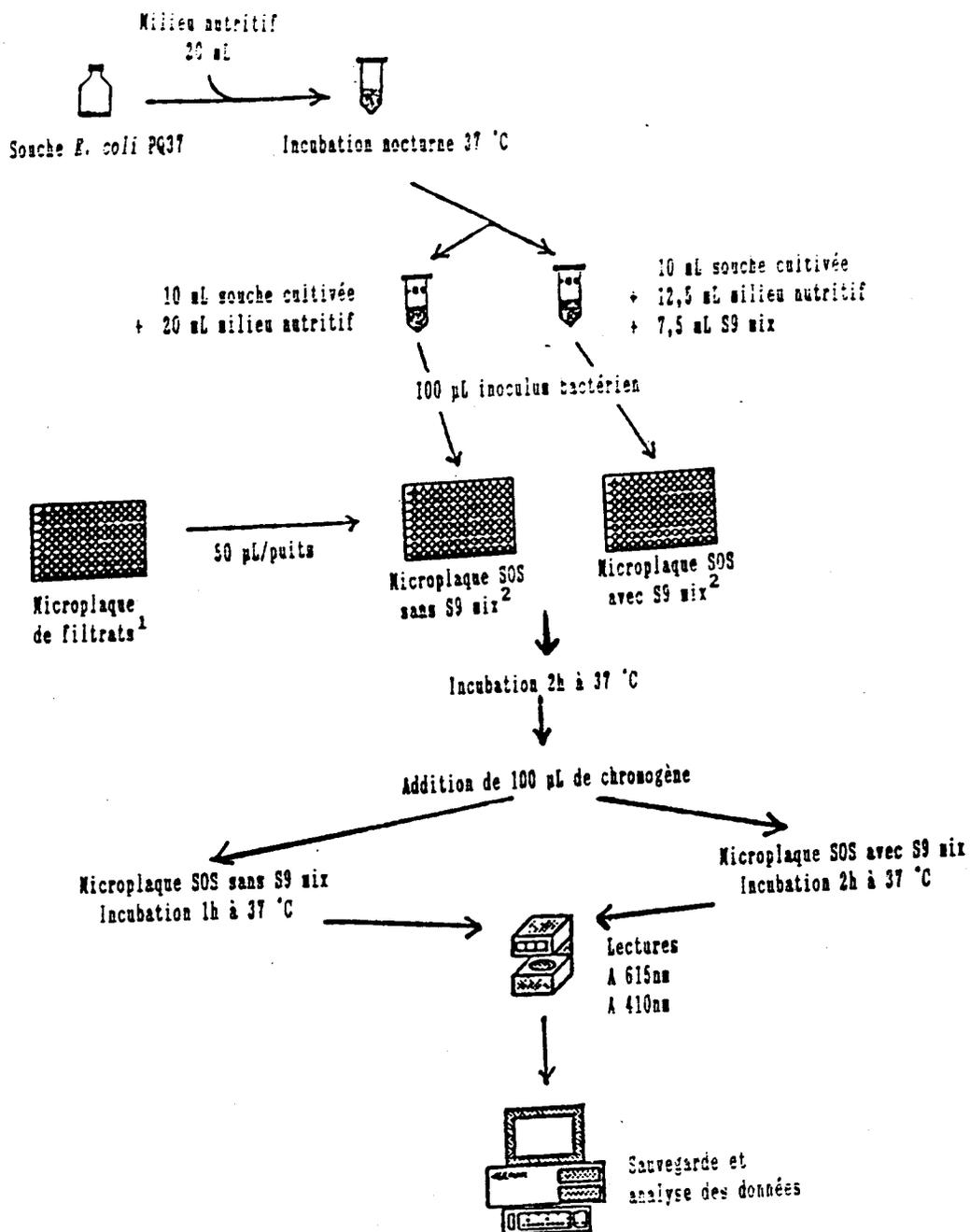


FIGURE 4: Schéma du protocole pour le SOS Chromotest  
 1: [DMSO] =  $(100 \mu\text{L}/220 \mu\text{L}) \times 10\% = 4,55\%$   
 2: [DMSO] =  $(50 \mu\text{L}/150 \mu\text{L}) \times 4,55\% = 1,52\%$

		COLONNE											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
R A N G E	A	B	T	C	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
	B	B	T	C	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
	C	B	T	C	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
	D	B	T	C	4	5	6	7	8	9	10		
	E	BF	TF	C	4	5	6	7	8	9	10		
	F	BF	TF	C	4	5	6	7	8	9	10		
	G	BF	TF	C									
	H	BF	TF	C									

FIGURE 5: Répartition des échantillons dans la microplaque lors de la réalisation du SOS Chromotest

- B** : Blancs du test SOS  
10  $\mu$ L DMSO 10% + 100  $\mu$ L milieu de culture
- BF** : Blancs des filtrats  
50  $\mu$ L DMSO 4,55% + 100  $\mu$ L milieu de culture
- T** : Témoins du test SOS  
10  $\mu$ L DMSO 10% + 100  $\mu$ L (bactéries + milieu de culture)
- TF** : Témoins des filtrats  
50  $\mu$ L DMSO 4,55% + 100  $\mu$ L (bactéries + milieu de culture)
- C** : Contrôle positif en 8 concentrations  
4NQO pour la microplaque sans S9 mix  
2AA pour la microplaque avec S9 mix  
10  $\mu$ L du contrôle + 100  $\mu$ L (bactéries + milieu de culture)
- 1A à 10** : 50  $\mu$ L de filtrats + 100  $\mu$ L (bactéries + milieu de culture)

puits de filtrats. La figure 4 montre les calculs des concentrations finales de DMSO pour les filtrats dans la microplaque SOS. Une concentration de 2% de DMSO dans chaque puits de la microplaque SOS constituerait une concentration maximale au-delà de laquelle il y aurait un effet toxique sur l'indicateur bactérien (Organics Ltd., 1988). Notre procédure tient donc compte de ce seuil toxique du DMSO vis-à-vis des bactéries du SOS Chromotest.

Les quatre premiers puits de la colonne 2 (témoin) contiennent 10  $\mu$ L de DMSO 10% ainsi que 100  $\mu$ L de milieu de culture + bactéries. Les quatre derniers puits de cette colonne contiennent 50  $\mu$ L de DMSO 4.55% ainsi que 100  $\mu$ L de milieu de culture + bactéries.

La colonne 3 constitue le contrôle positif pour le SOS Chromotest et permet de confirmer la bonne performance de l'indicateur bactérien. Pour la microplaque sans S9 mix, le 4-Nitroquinoline-N-oxyde (4NQO), mutagène connu, est utilisé. Quant à la microplaque avec S9 mix, le 2-Aminoanthracène (2AA), un pro-mutagène, est employé. Sept concentrations sont préparées pour chacun des contrôles positifs à partir de solutions de 10  $\mu$ g/mL pour le 4NQO et de 100  $\mu$ g/mL pour le 2AA fournies dans la trousse SOS. Le

solvant utilisé pour les dilutions est le DMSO 10%, également fourni dans la trousse SOS. Un volume de 10 µL de chacune des huit concentrations du contrôle positif (solution mère et les sept dilutions) est déposé dans la colonne 3 de la microplaque appropriée.

L'activation métabolique consiste à ajouter aux bactéries un extrait de foie de rat traité avec l'Aroclor 1254 (S9 mix). La microplaque avec S9 mix servira donc à déceler les produits pro-mutagènes ou pro-cancérogènes en simulant le processus d'activation métabolique mammalien. Un produit pro-mutagène est un produit non mutagène en soi mais qui peut être transformé en mutagène après activation. Le métabolisme animal ou végétal peut constituer un tel agent d'activation afin de réaliser cette transformation. La microplaque ne recevant pas de S9 mix servira quant à elle à détecter les produits directement activables par l'algue *S. capricornutum*.

### 2.3.3 Mise en évidence de l'activité génotoxique

Une fois la période d'incubation nocturne terminée, on dépose 100 µL de la solution bactérienne (milieu de culture + bactéries) dans chacun des puits de la microplaque sans S9

mix sauf dans ceux de la colonne 1 (blanc). Pour la microplaque avec S9 mix, 100  $\mu$ L du mélange milieu de culture + bactéries + S9 mix sont introduits dans chaque puits à l'exception également de ceux de la colonne 1. Les deux microplaques sont ensuite incubées à 37 °C pendant 2 h.

La mise en évidence de l'activité génotoxique se fait par la mesure photométrique simultanée de la  $\beta$ -galactosidase et de la phosphatase alcaline à l'aide de deux chromogènes: le 5-bromo-4-chloro-3- $\beta$ -D-galactoside (X-gal), substrat transformé en produit bleu par la  $\beta$ -galactosidase et le p-nitrophényle phosphate (PNPP), substrat transformé en produit jaune par la phosphatase alcaline. Ainsi, à la fin de la période d'incubation de 2 h, 100  $\mu$ L du mélange des deux chromogènes sont ajoutés à tous les puits des deux microplaques. Ces dernières sont réincubées à la même température pendant 1 h pour la microplaque sans S9 mix et pendant 2 h pour la microplaque avec S9 mix, afin de permettre aux deux réactions enzymatiques de produire un développement de couleur ultérieurement mesurable par photométrie.

Finalement, la lecture colorimétrique s'effectue avec un spectrophotomètre à microplaques (Titertek - Multiskan,

modèle MC340). On mesure ainsi les absorbances (A) à 615 nm, témoignant d'une agression génotoxique par induction de  $\beta$ -galactosidase, et à 405 nm, témoignant de la viabilité cellulaire par production de la phosphatase alcaline. L'appareil est relié à un micro-ordinateur (IBM compatible) permettant ainsi la saisie et le traitement des données d'absorbance à l'aide d'un logiciel commercial (Skan Soft I - Flow Laboratories) adapté aux besoins du SOS Chromotest.

La première colonne des microplaques sert à calibrer le spectrophotomètre et permet également de retrancher l'absorbance due aux réactifs sans activité bactérienne. La deuxième colonne de chacune des microplaques mesure l'absorbance des bactéries en présence des seuls réactifs et constitue le bruit de fond du témoin (Environnement Canada, 1989b).

#### 2.3.4 Calcul de l'activité génotoxique

Tout d'abord, les lectures à 405 nm doivent être corrigées pour retrancher l'empiètement colorimétrique du bleu sur le jaune. En effet, le filtre à 405 nm ayant un spectre relativement large, une surestimation des valeurs d'absorbance à cette longueur d'onde peut se produire. On

trouve dans la trousse SOS une petite microplaque à 16 puits constituée de deux colonnes de 8 puits. Une des colonnes sert de blanc tandis que la deuxième contient un gradient de concentrations de  $\beta$ -galactosidase. L'ajout du chromogène permet d'établir une courbe-étalon à partir de laquelle on peut déterminer le pourcentage de couleur bleue lue avec le filtre à 405 nm. La correction s'effectue selon la formule suivante:

$$A_{405} \text{ corrigée} = A_{405} E - (A_{615} E \times \frac{A_{405} \text{ St.}}{A_{615} \text{ St.}})$$

où:

$A_{405}$  corrigée = valeur précise de A de la phosphatase alcaline corrigée pour l'empiètement colorimétrique

$A_{405} E$  =  $A_{405}$  de l'échantillon pour une concentration donnée

$A_{615} E$  =  $A_{615}$  de l'échantillon pour une concentration donnée

$A_{405} CE$  =  $A_{405}$  de la courbe étalon dont la valeur est la plus rapprochée de  $A_{405} E$

$A_{615} CE$  =  $A_{615}$  de la courbe étalon dont la valeur est la plus rapprochée de  $A_{615} E$ .

Ensuite, les lectures à 615 nm doivent être corrigées à la hausse pour la toxicité en tenant compte de la viabilité bactérienne. Si A 405 corrigée provenant d'un puits ayant contenu une concentration d'un échantillon est égale ou inférieure à A 405 moyenne du témoin de laquelle est déjà aussi soustraite la valeur de deux écarts-types, l'échantillon est considéré toxique. Un facteur de correction (FC) est calculé de la façon suivante:

$$FC = A_0 / A_x$$

où:

$A_0$  = A 405 moyenne associée à la réaction de la phosphatase alcaline en absence d'échantillon (témoin)

$A_x$  = A 405 associée à la réaction de la phosphatase alcaline en présence d'une concentration donnée d'échantillon testé

Les A 615 sont alors corrigées ainsi:

$$A \text{ 615 corrigée} = A \text{ 615 E} \times FC$$

où:

A 615 corrigée = A 615 corrigée pour la toxicité

A 615 E = A 615 de l'échantillon pour une concentration donnée

FC = Facteur de correction

Après avoir effectué les corrections précédentes qui s'imposent, les résultats des tests SOS furent enfin exprimés en facteurs d'induction (FI). Ils sont déterminés selon la formule suivante:

$$FI = A\ 615\ cE / A\ 615\ mcT$$

où:

FI = Facteur d'induction

A 615 cE = A 615 corrigée de l'échantillon pour une concentration donnée

A 615 mcT = A 615 moyenne corrigée en absence d'agent mutagène (témoin)

L'utilisation de facteurs d'induction normalise les réponses et permet la comparaison entre les essais avec ou sans S9 mix et entre les différentes expériences (Environnement Canada, 1989b). Par définition, le témoin a un FI de 1,0 (Legault, 1990). La plupart des chercheurs ayant utilisé le SOS Chromotest (Quillardet et coll., 1985b; Olivier et Marzin, 1987; von der Hude et coll., 1988;

Beausoleil, 1989; Legault, 1990) préconisent d'utiliser un FI de 1,5 comme seuil de significativité génotoxique. Dans la plupart des cas, c'est ce dernier que nous avons retenu pour nos travaux.

#### 2.4 Analyse statistique des résultats

La première étape consiste à vérifier la performance du SOS Chromotest en examinant les valeurs SOSIP des deux contrôles positifs. On considère normal un SOSIP situé entre 50 et 70 pour le 4NQO et entre 1 et 3 pour le 2AA (Environnement Canada, 1989b). Pour chaque contrôle positif, un graphique des A 615 en fonction des concentrations testées est établi. On identifie la portion linéaire de l'ensemble des points (Orgenics Ltd, 1986, 1988). L'équation de la droite de régression ( $y = a + bx$ ) nous donne la valeur du SOSIP correspondant à 10 X le terme b (pente de la droite). Un test d'hypothèse nulle ( $H_0: b=0$ ) est effectué en considérant que la distribution suit la loi de Student. Ce test permet de vérifier si la pente calculée est significativement différente de zéro et donc si le produit s'avère génotoxique (Harwood, 1987; Environnement Canada, 1989b). Par la suite, les opérations statistiques se poursuivent au niveau des FI tel qu'expliqué ci-bas.

#### 2.4.1 Comparaison de moyennes sur les facteurs d'induction

Les différences entre traitements ont été évaluées à l'aide de l'ANOVA-One Way (3 traitements et plus) ou du test de "t" (2 traitements), selon le cas. Ces tests paramétriques sont assez robustes pour supporter des écarts de normalité ou d'homogénéité des variances. Néanmoins, ces critères d'application ont été vérifiés (Zar, 1984) et le résultat obtenu a toujours indiqué l'adéquation, si bien que nos données n'ont nécessité aucune transformation.

#### 2.4.2 Analyse de variance factorielle sur les facteurs d'induction

Les expériences conçues pour tester plusieurs facteurs simultanément (e.g. concentration du NOP, concentration en algues, phase de croissance algale, lumière-obscurité) ont été traitées à l'aide de l'analyse factorielle de variance (Winer, 1971; Kirk, 1982). Les plans expérimentaux étaient parfaitement orthogonaux (facteurs croisés) et balancés (nombre égal de données par cellule) pour une puissance optimale de l'analyse (Underwood, 1981; Zar, 1984). Les facteurs étant fixes (modèle I d'ANOVA, Zar, 1984), le rapport F est calculé à partir de la moyenne des carrés de chaque facteur sur la moyenne des carrés de l'erreur

résiduelle. La valeur du rapport F indique la contribution d'un facteur à la variance totale; c'est-à-dire son importance relative dans l'explication du phénomène observé. L'analyse considère aussi l'interaction entre chaque facteur. Lorsque l'interaction est significative, il y a dépendance entre les facteurs, c'est-à-dire influence d'un facteur sur un autre.

#### 2.4.3 Comparaisons multiples (contrastes *a posteriori*)

Le test de Tukey (Zar, 1984) a été utilisé pour déterminer quels sont les niveaux d'un facteur qui diffèrent significativement entre eux. En effet, lorsque l'analyse de variance indique qu'un facteur est significatif, le rejet de l'hypothèse nulle ( $H_0: u_1 = u_2 = u_3 = \dots = u_n$ ) n'implique pas nécessairement que toutes les moyennes soient différentes. Par exemple, le facteur concentration en algues comprend trois concentrations algales différentes (niveaux du facteur) soit  $10E5$ ,  $10E6$  et  $10E7$  c/mL. L'analyse de variance indique que ce facteur est significatif (rejet de  $H_0$ ) et le test de Tukey révèle que la concentration  $10E7$  c/mL est significativement différente des concentrations  $10E5$  et  $10E6$  c/mL, alors que ces dernières ne diffèrent pas significativement entre elles.

## CHAPITRE 3

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Expériences préliminaires

Avant même d'entreprendre nos travaux avec le protocole d'étude d'interaction, il nous fallait connaître la courbe de croissance de l'algue *Selenastrum capricornutum* dans nos conditions de laboratoire et d'étude, l'évolution du pH dans une microplaque d'interaction ainsi que la génotoxicité de départ des produits chimiques utilisés.

### 3.1.1 Courbes de croissance algale

Trois erlenmeyers d'une capacité de 4 L contenant chacun 1 L de milieu AAP et un inoculum de 20 000 c/mL (cellules de 4 jours) servirent pour effectuer le suivi de la courbe de croissance de *S. capricornutum* dans nos conditions de laboratoire. Les dénombrements cellulaires journaliers révélèrent que la phase log moyenne se situait à 6 j d'incubation tandis que le début de la phase sta était atteint aux alentours de 10 j. Ce dernier critère repose sur le postulat qu'une augmentation de croissance journalière de moins de 5 % reflète bien l'arrivée de la phase sta (USEPA, 1978). La figure 6 illustre la moyenne des trois valeurs de croissance obtenues aux différents temps. Les résultats de cette expérience nous permettaient donc de fixer à 6 j et à 10 j, respectivement, le prélèvement d'algues en phase log et en début de phase sta pour nos travaux d'interaction subséquents, afin d'étudier la variable "phase de croissance algale".

### 3.1.2 Evolution du pH dans la microplaque d'interaction

Afin de savoir si notre protocole d'étude d'interaction nécessitait un tampon pour stabiliser le pH des puits des

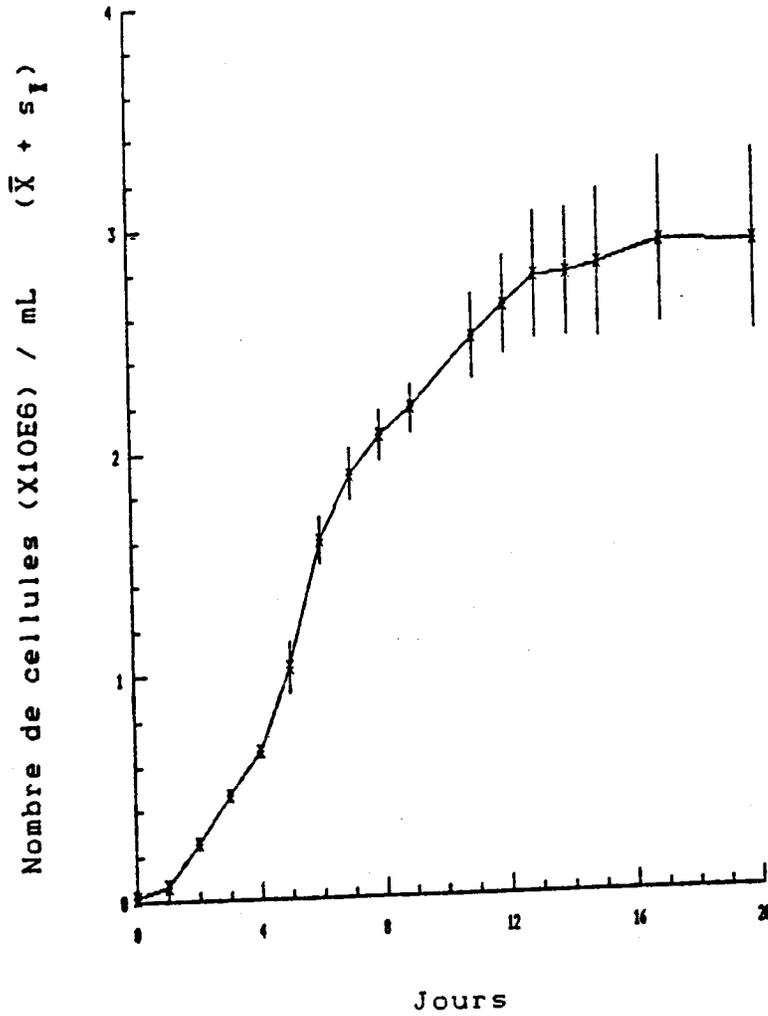


FIGURE 6: Courbe de croissance moyenne de *Selenastrum capricornutum*

microplaques expérimentales, nous en avons mesuré l'évolution en utilisant une biomasse algale de  $10E7$  c/mL. A partir d'un pH initialement fixé à  $7,0 \pm 0,5$ , des échantillons d'algues en phase log et sta, ainsi que leur milieu de culture, furent introduites dans deux microplaques chacun. Une paire de microplaques log et sta fut ensuite incubée durant 4 h alors que l'autre paire le fut durant 24 h. A la fin des périodes d'incubation respectives, le contenu (220  $\mu$ L) des 8 puits de chaque colonne d'une microplaque fut combiné afin de permettre la mesure du pH. Douze mesures de pH furent ainsi obtenues pour chaque microplaque.

Après 4 h d'incubation, l'augmentation moyenne du pH se situa à 0,65 et à 0,92 unité de pH pour les algues log et sta, respectivement. De même, après 24 h d'incubation, l'augmentation moyenne fut de 1,15 et de 1,7 unité de pH pour les algues log et sta, respectivement.

Ces mesures de l'évolution du pH selon nos conditions expérimentales en microplaque nous ont portés à conclure que l'ajout d'un tampon stabilisateur s'avérait superflu, car la variation du pH se trouve bien à l'intérieur de la plage maximale retrouvée (pH maximum = 10) chez les algues en

phase sta, suite à une croissance en erlenmeyers (USEPA, 1978). Nous voulions également éviter l'écueil d'une éventuelle interférence (antagonisme ou synergisme) du tampon avec l'activation algale lors de nos expériences d'interaction ainsi qu'un effet phytotoxique du tampon lui-même (Hassett et coll., 1981). Notons cependant que Gentile et coll. (1985) proposent un pH de 6,7 pour l'activation optimale du NOP par des extraits de plants de *Pisum sativum* et de *Nicotiana tabaccum*, activation détectée par l'indicateur bactérien *Salmonella typhimurium* TA98.

### 3.1.3 Génotoxicité des produits chimiques

Afin de connaître la fourchette de concentrations des produits à l'étude détectables par le SOS Chromotest, leur courbe de dose-réponse génotoxique a été établie. Ceci avait le double avantage de permettre de mieux situer le choix des concentrations d'interaction (algue-produit chimique) pour le futur protocole.

#### 3.1.3.1 Produits de référence

La figure 7 illustre les courbes de dose-réponse, avec ou sans S9 mix, des trois produits de référence utilisés

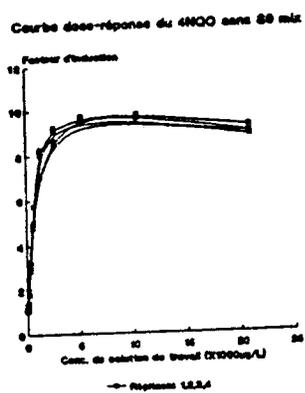
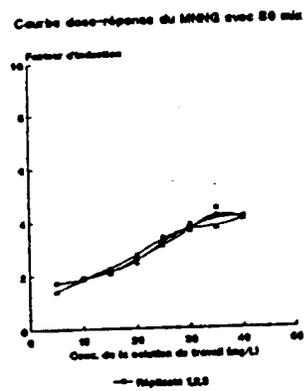
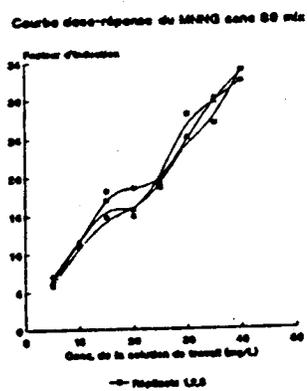
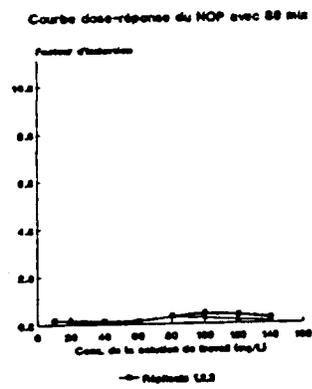
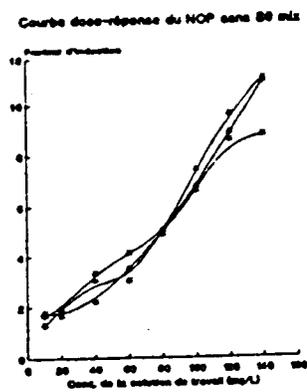


FIGURE 7: Courbes de dose-réponse du NOP, MNNG et 4NQO avec ou sans S9 mix

dans notre étude soit le NOP, le MNNG et le 4NQO. Le NOP et le 4NQO, produits mutagènes, sont complètement dégradés par le S9 mix. C'est pour cela que la plupart des expériences avec le NOP et le 4NQO ont été effectuées sans activation mammalienne (section 3.2 et 3.3.2 respectivement). Le MNNG, cancérigène reconnu, n'est pas complètement dégradé par le S9 mix, mais la pente significativement atténuée traduit néanmoins l'efficacité du système enzymatique mammalien à le détoxiquer. Les concentrations retenues pour l'interaction algale se sont situées à l'intérieur de la gamme de dose-réponse obtenue à cette étape-ci. Elles reflétaient donc des concentrations qui produisaient des FI significativement plus élevés que le témoin (blanc) du SOS Chromotest. Le tableau 6 précise les concentrations des solutions de travail des trois produits de référence ainsi que les concentrations correspondantes auxquelles furent exposées les bactéries lors du SOS Chromotest.

#### 3.1.3.2 Herbicides

Aucune génotoxicité n'a été détectée avec les solutions d'herbicides et ce, même à des concentrations plusieurs fois supérieures à leur CI50-96h, ou approchant la limite de solubilité du produit dans l'eau. Le tableau 7 indique les

TABLEAU 6: Concentrations des solutions de travail et concentrations utilisées pour la conduite du SOS Chromotest avec le NOP, MNNG et 4NQO

Produit chimique	Conc. des solutions de travail (mg/L)	Conc. pour le SOS Chromotest (mg/L)
MNNG	5,000	0,450
	10,000	0,910
	15,000	1,360
	20,000	1,820
	25,000	2,270
	30,000	2,730
	35,000	3,180
	40,000	3,640
	NOP	10,000
20,000		1,820
40,000		3,640
60,000		5,450
80,000		7,270
100,000		9,090
120,000		10,910
140,000		12,730
4NQO*	10,190	0,930
	20,390	1,850
	40,780	3,710
	81,560	7,420
	163,125	14,830
	326,250	29,660
	625,500	56,860
	1305,000	118,640
	2610,000	237,270
	5220,000	474,550
10437,500	948,860	
20875,000	1897,730	

\* Les concentrations pour le 4NQO sont en µg/L.

TABLEAU 7: Concentrations des solutions de travail, concentrations pour la conduite du SOS Chromotest et limite de solubilité dans l'eau des herbicides

Herbicide	Limite de solubilité dans l'eau* (mg/L)	Concentrations des solutions de travail (mg/L)	Concentrations pour le SOS Chromotest (mg/L)
Atrazine	28 à 20°C	30,000	2,730
		3,000	0,270
		0,300	0,027
Bromoxynil	130 à 25°C	105,300	9,570
		10,530	0,957
		1,050	0,096
Cyanazine	171 à 25°C	138,600	12,600
		13,860	1,260
		1,386	0,126
2,4-D	620 à 20°C	500,400	45,490
		50,040	4,550
		5,000	0,455
Glyphosate	12000 à 25°C	9720,000	883,640
		972,000	88,360
		97,200	8,840
Hexazinone	3300 à 25°C	26730,000	2430,000
		2673,000	243,000
		267,300	24,300
Imazaméthabenz	1370	1109,700	100,880
		110,970	10,088
		11,097	1,000
Métolachlore	530 à 20°C	477,000	43,360
		47,700	4,336
		4,770	0,434
Piclorame	430 à 25°C	348,030	31,640
		34,800	3,164
		3,480	0,320

\* Tiré de The Agrochemicals Handbook, 1988.

concentrations des solutions de travail des herbicides, leurs équivalents en concentrations lors de l'exposition durant la conduite du SOS Chromotest ainsi que leur limite de solubilité dans l'eau.

L'absence de génotoxicité des herbicides n'exclut pas la possibilité qu'ils soient activables par un système enzymatique algal et les concentrations choisies pour les expériences d'interaction subséquentes ont tenu compte de la toxicité de chaque produit vis-à-vis des algues et vis-à-vis des bactéries du SOS Chromotest. Pour l'étude de l'interaction, la concentration la plus élevée de la solution de travail C1 correspondait à 10 fois la CI50-96h. En fait, dès le départ, cette forte concentration est réduite de plus de la moitié par simple dilution, ainsi que l'indique le tableau 8. La concentration d'herbicide à l'intérieur du puits d'interaction n'était en réalité que 4,5 fois sa CI50-96h. Aux concentrations utilisées pour l'étude d'interaction, aucune toxicité bactérienne ne fut notée lors de la conduite ultérieure du SOS Chromotest. Les concentrations d'herbicides présentes dans les puits de la microplaque du SOS Chromotest figurent au tableau 8, et un exemple de leur calcul est fourni en annotation.

TABLEAU 8: Concentrations des produits chimiques utilisées lors de l'application du protocole d'étude d'interaction

Produit chimique	Conc. solutions de travail (mg/L)		Conc. interaction (mg/L)	Conc. pour le SOS Chromotest (mg/L)
	C1	C2		
Atrazine	300,00		136,36	45,45
	150,00		68,18	22,73
	75,00		34,09	11,36
Bromoxynil	35,00		15,91	5,30
	17,50		7,95	2,65
	8,75		3,98	1,33
Cyanazine	170,00		77,27	25,76
	85,00		38,64	12,88
	42,50		19,32	6,44
2,4-D	240,00		109,09	36,36
	120,00		54,54	18,18
	60,00		27,27	9,09
Glyphosate	80,00		36,36	12,12
	40,00		18,18	6,06
	20,00		9,09	3,03
Hexazinone	280,00		127,27	42,42
	140,00		63,64	21,21
	70,00		31,82	10,61
Imazaméthabenz	900,00		409,09	136,36
	450,00		204,54	68,18
	225,00		102,27	34,09
Métolachlore	510,00		231,82	77,27
	255,00		115,91	38,64
	127,50		57,95	19,32
MNNG	6,00		2,73	0,91
	3,00		1,37	0,45
	1,50		0,68	0,23

TABLEAU 8: Concentrations des produits chimiques utilisées lors de l'application du protocole d'étude d'interaction (suite)

Produit chimique	Conc. solutions de travail (mg/L)	Conc. interaction (mg/L)	Conc. pour le SOS Chromotest (mg/L)
	C1 C2 C3		
NOP	140,00	63,64	21,21
	70,00	31,82	10,61
	35,00	15,91	5,30
4NQO	20,00	9,09	3,03
	10,00	4,54	1,51
	5,00	2,27	0,76
Piclorame	230,00	104,54	34,85
	115,00	52,27	17,42
	57,50	26,14	8,71

Exemple de calcul des concentrations pour le NOP:

C1 = 140 mg/L = solution de travail

Dans la microplaque d'interaction

$$(100 \mu\text{L} / 220 \mu\text{L}) \times 140 \text{ mg/L} = 63,64 \text{ mg/L}$$

où: 100  $\mu\text{L}$  est le volume de la solution de travail utilisé lors de l'interaction

220  $\mu\text{L}$  est la somme du volume du concentré algal (120  $\mu\text{L}$ ) + volume de la solution de travail (100  $\mu\text{L}$ )

La concentration réelle d'interaction (à l'intérieur du puits de la microplaque d'interaction) est donc de 63,64 mg/L.

Dans la microplaque SOS

$$(50 \mu\text{L} / 150 \mu\text{L}) \times 63,64 \text{ mg/L} = 21,21 \text{ mg/L}$$

où: 50  $\mu\text{L}$  est le volume de filtrat (provenant de la filtration du contenu des puits de la microplaque d'interaction) utilisé lors du protocole SOS

150  $\mu\text{L}$  est le volume total à l'intérieur d'un puits de la microplaque SOS

La concentration SOS (à l'intérieur du puits de la microplaque SOS) est donc de 21,21 mg/L.

Ces expériences préliminaires sur les produits chimiques de référence et les herbicides soulignent bien l'importance d'ajuster les concentrations des produits afin d'optimiser les chances de mettre en évidence un effet de génotoxicité. Il est clair que cet ajustement est complexe et peut être propre au produit puisqu'il implique des facteurs de sens contraire. D'une part, la conduite de l'étude d'interaction algale avec une forte concentration du produit chimique augmente certes le potentiel de détection du SOS Chromotest, mais risque d'occasionner des problèmes de toxicité aussi bien vis-à-vis des algues que vis-à-vis de l'indicateur de génotoxicité, avec des conséquences imprévisibles sur les résultats. D'autre part, la conduite

de l'étude d'interaction algale à des concentrations dépourvues de toxicité pour les algues et les bactéries du SOS Chromotest réduit nettement le pouvoir du SOS Chromotest à détecter un effet.

En bref, le degré de succès dans la mise en évidence d'une activation génotoxique d'une molécule est intimement lié à sa nature chimique, nécessairement, mais aussi à ses caractéristiques physico-chimiques (e.g. hydro-solubilité) et toxicologiques à l'égard des indicateurs algaux et bactériens utilisés.

### 3.2 Mise au point du protocole d'étude d'interaction algale

Après avoir sélectionné les concentrations d'interaction des produits lors des expériences préliminaires (section 3.1.3), les premiers essais d'un protocole d'étude d'interaction furent effectués en utilisant le NOP comme modèle. Rappelons ici que ce choix repose sur le fait que le NOP est génotoxique sans S9 mix et que l'on a déjà démontré que son potentiel génotoxique était accru par l'algue *S. capricornutum* (Gentile et coll., 1990). Il constituait donc un produit idéal pour la mise au point de notre protocole.

### 3.2.1 Essais préliminaires

Puisqu'un volume maximal de seulement 250-300  $\mu\text{L}$  peut être introduit dans le puits d'une microplaque, l'ajout de volumes appropriés de NOP (à partir des concentrations C1, C2 et C3 des solutions de travail: voir tableau 6) et de biomasse algale ( $10\text{E}5$ ,  $10\text{E}6$  et  $10\text{E}7$  c/mL) se devait d'être bien ajusté, de façon à optimiser la réponse génotoxique de l'indicateur bactérien (SOS Chromotest).

Des essais initiaux furent entrepris avec des volumes de 20  $\mu\text{L}$  de chacune des concentrations C1, C2, C3 de NOP et de 200  $\mu\text{L}$  de chacune des biomasses algales ( $10\text{E}5$ ,  $10\text{E}6$ ,  $10\text{E}7$  c/mL) placés dans un puits d'une microplaque. Suite à une incubation de la microplaque de 4 h, ces essais ne révélèrent aucune génotoxicité 1) du NOP seul, 2) ni du NOP avec les algues. Lors de ces essais, le volume du contenu d'un puits d'une microplaque d'interaction transféré vers un puits de microplaque du SOS Chromotest n'était que de 10  $\mu\text{L}$ .

Nous avons par la suite modifié les apports volumétriques de NOP et d'algues durant la phase d'interaction à 100  $\mu\text{L}$  et 120  $\mu\text{L}$  respectivement, afin d'accroître la quantité de NOP durant l'interaction. En

plus, le volume du contenu d'un puits d'une microplaque d'interaction transféré vers un puits de microplaque du SOS Chromotest fut augmenté de 10  $\mu$ L à 50  $\mu$ L afin d'accroître également la concentration de NOP (ou de NOP activé par les algues) auprès des bactéries du SOS Chromotest.

Ces modifications se sont avérées fructueuses car elles ont effectivement généré des réponses génotoxiques avec le NOP (en absence et en présence d'algues), ainsi qu'en témoigne la prochaine section. Elles ont donc permis de finaliser le protocole d'interaction, dont les étapes spécifiques pour l'interaction et la détection génotoxique ont été rapportées aux figures 1 et 5 (section Matériel et Méthodes).

### 3.2.2 Validation du protocole définitif

Ces modifications volumétriques au protocole d'interaction comportent certains avantages. En plus d'une plus forte concentration d'exposition des algues au NOP (et donc une plus grande possibilité d'interaction), une concentration de DMSO plus élevée (4,55% : voir figure 4) durant l'interaction pourrait rendre les membranes cellulaires plus perméables. Cet effet perturbateur du DMSO

sur l'intégrité membranaire des algues pourrait ainsi favoriser un meilleur contact métabolique avec le NOP et accroître la réponse d'activation. Enfin, il est évident que les concentrations plus élevées de NOP lors de l'interaction vont aussi assurer une meilleure détection d'activité génotoxique par le SOS Chromotest.

En revanche, l'augmentation des concentrations de NOP et de DMSO durant l'interaction présente le désavantage potentiel d'accroître les effets toxiques vis-à-vis des algues et, par ricochet, vis-à-vis des bactéries du SOS Chromotest lors de la mesure subséquente de la génotoxicité. Pour ces dernières, le SOS Chromotest comporte des contrôles adéquats permettant de détecter la toxicité de l'échantillon et d'y appliquer un facteur de correction approprié. Par contre, confrontées à des concentrations de NOP et de DMSO plus fortes que celles imposées aux bactéries du SOS Chromotest, il est certain que les algues sont davantage vulnérables à l'effet toxique durant l'interaction. Un effet toxique marqué est cependant peu probable avec une courte période d'exposition de 4 h, quoique plus probable avec un temps d'exposition plus long. Cet effet du temps d'exposition (4 h vs 24 h) sur la réponse d'activation du NOP par les algues sera traité à la section 3.2.3.5.

Dans le cas extrême où un effet algicidal surviendrait durant une période d'interaction aussi courte que 4 h, il ne serait quand même pas exclu qu'une activation génotoxique puisse se manifester, car les réactions métaboliques algales responsables de l'activation d'un produit chimique pourraient avoir eu lieu avant la mort cellulaire.

Malgré cette contrainte d'effet toxique potentiel, nous avons procédé à la validation du protocole d'interaction avec le NOP. Afin de nous assurer de sa répétabilité, trois essais avec les mêmes variables d'interaction ont été réalisés à des jours différents et les résultats apparaissent au tableau 9. Les variables étudiées à cette fin étaient la phase de croissance algale (log et sta), la luminosité (obscurité et lumière), la concentration du produit (C1, C2 et C3) et la biomasse algale (10E5, 10E6 et 10E7 c/mL).

Considérés globalement, les rapports F et leur significativité, révèlent des informations générales concernant les conditions expérimentales LOG LUM, LOG OBS, STA LUM et STA OBS (3 essais réalisés dans chaque cas) du protocole d'étude d'interaction (tableau 9).

TABLEAU 9: Rapports F et significativité de l'ANOVA simple sur la toxicité du NOP pour évaluer la répétabilité du protocole d'étude d'interaction algale en fonction de différentes variables

		Concentrations de NOP (mg/L)		
		35	70	140
LOG LUM	10E5	2,308 <sup>ns</sup>	0,283 <sup>ns</sup>	3,260 <sup>ns</sup>
	10E6	3,084 <sup>ns</sup>	0,710 <sup>ns</sup>	2,299 <sup>ns</sup>
	10E7	9,928 <sup>**</sup>	7,960 <sup>*</sup>	0,626 <sup>ns</sup>
LOG OBS	10E5	0,042 <sup>ns</sup>	1,400 <sup>ns</sup>	0,236 <sup>ns</sup>
	10E6	5,318 <sup>*</sup>	6,287 <sup>*</sup>	2,936 <sup>ns</sup>
	10E7	33,897 <sup>***</sup>	36,686 <sup>***</sup>	5,423 <sup>*</sup>
STA LUM	10E5	1,076 <sup>ns</sup>	0,406 <sup>ns</sup>	0,252 <sup>ns</sup>
	10E6	4,583 <sup>*</sup>	1,231 <sup>ns</sup>	1,466 <sup>ns</sup>
	10E7	36,423 <sup>***</sup>	20,853 <sup>***</sup>	34,311 <sup>***</sup>
STA OBS	10E5	3,871 <sup>ns</sup>	0,062 <sup>ns</sup>	0,710 <sup>ns</sup>
	10E6	7,058 <sup>*</sup>	0,067 <sup>ns</sup>	0,632 <sup>ns</sup>
	10E7	109,306 <sup>***</sup>	6,208 <sup>*</sup>	0,000 <sup>ns</sup>

ns = p > 0,05

\* = p < 0,05

\*\* = p < 0,01

\*\*\* = p < 0,001

Note: Tous les essais avaient une durée de 4 h et on compare l'activation génotoxique du NOP (avec ou sans algues) pour trois essais dans chaque cas.

Premièrement, peu importe les variables d'interaction, l'emploi d'une biomasse de  $10E5$  c/mL n'engendre jamais une activation génotoxique du NOP significativement différente du NOP sans algues. Deuxièmement, on observe une activation génotoxique du NOP 4 fois sur 12 avec une biomasse algale de  $10E6$  c/mL. Enfin, cette activation du NOP se manifeste 10 fois sur 12 avec une biomasse de  $10E7$  c/mL.

Ces observations traduisent donc bien l'importance du facteur "biomasse algale" dans l'activation génotoxique du NOP. Il est également clair que sur les trois biomasses utilisées, celle de  $10E7$  c/mL se distingue des deux autres par sa meilleure capacité d'activation du NOP dans nos conditions d'étude. Avec cette biomasse d'activation, la répétabilité du protocole apparaît adéquate (10 activations du NOP sur 12).

La non activation génotoxique du NOP avec  $10E7$  c/mL ne s'est produite qu'à deux reprises à la plus forte concentration d'interaction de NOP ( $C1 = 140$  mg/L, solution de travail) en conditions LOG LUM et STA OBS. Dans tous les cas, cependant, la biomasse algale de  $10E7$  c/mL démontre invariablement sa capacité d'activer le NOP à partir d'une solution de travail, peu importe qu'elle soit de 35, 70 ou

de 140 mg/L. De ce point de vue, la répétabilité du protocole d'interaction est de 100%.

Puisqu'il est possible que les paramètres idéaux pour l'activation algale soient différents d'une classe de produits chimiques à l'autre, nous avons continué à utiliser les trois biomasses algales dans la poursuite de nos travaux. L'activation algale semble dépendante de divers facteurs qui sont commentés dans la section qui suit.

### 3.2.3 Pondération des variables d'interaction

Divers facteurs peuvent influencer la réponse d'activation génotoxique d'une molécule chimique lors de la conduite du protocole d'interaction. Il s'agit de 1) la concentration du produit, 2) la biomasse algale, 3) la phase de croissance, 4) la luminosité, 5) le temps d'interaction, 6) la présence du S9 mix (lorsque l'on décide de l'incorporer au SOS Chromotest), et 7) l'espèce algale.

Compte tenu du plus grand nombre d'expérimentations réalisées avec les quatre premiers de ces facteurs, il nous a été possible de comparer leur importance relative à partir d'une analyse factorielle de variance (tableau 10).

TABLEAU 10: Analyse factorielle de variance de l'activation génotoxique du NOP par l'algue *Selenastrum capricornutum*

Variable(s)	SC	DL	MC	F
CONCNOB (A)	7,122	2	3,561	184,810 <sup>***</sup>
LUMOBS (B)	0,259	1	0,259	13,460 <sup>***</sup>
CONCALGUES (C)	2,789	2	1,394	72,370 <sup>***</sup>
PHASE (D)	0,961	1	0,961	49,860 <sup>***</sup>
A X B	0,540	2	0,270	14,010 <sup>***</sup>
A X C	0,337	4	0,084	4,370 <sup>**</sup>
B X C	0,347	2	0,173	9,000 <sup>***</sup>
A X D	0,230	2	0,115	5,980 <sup>**</sup>
B X D	0,432	1	0,432	22,400 <sup>***</sup>
C X D	0,534	2	0,267	13,850 <sup>***</sup>
Résidu	1,696	88	0,019	

\*\* =  $p < 0,005$

\*\*\* =  $p < 0,001$

DL = degré de liberté

F = rapport F

MC = moyenne des carrés

SC = somme des carrés

Note: Les facteurs fixes sont la concentration du NOP (A), la luminosité (B), la biomasse algale (C) et la phase de croissance (D); expérience du 01-02-1991.

L'information se dégageant de cette analyse statistique fait l'objet des sous-sections qui suivent. On y traitera également de l'influence des trois derniers facteurs en fonction des résultats expérimentaux (moins nombreux) obtenus.

### 3.2.3.1 Concentration du produit

Il n'est pas surprenant de constater que la concentration du NOP (CONCNO) constitue la variable d'interaction ayant le plus de poids dans la valeur du rapport F ( $F = 184,81$ ) de l'analyse factorielle de variance (tableau 10). Etant donné que les concentrations de NOP employées dans nos expériences se situent dans la portion linéaire de la courbe dose-réponse du NOP (figure 3), les FI augmentent en fonction de la concentration de la substance, ce qui ne traduit pas nécessairement une plus forte activation algale avec des concentrations plus élevées de NOP. En effet, la différence entre les facteurs d'induction des échantillons sans algues et de ceux avec algues n'est pas plus grande à 140 qu'à 70 ou 35 mg/L comme l'indiquent les valeurs des rapports F du tableau 9 (on compare les trois valeurs d'une même ligne). Par contre, l'emploi de plus fortes concentrations de NOP en soi, lors de

l'interaction, produira des FI plus élevés et favorisera la détection d'une activation algale par le SOS Chromotest. A titre d'exemple, la figure 8 illustre le patron d'activation du NOP aux trois concentrations du produit par trois biomasses algales en phase sta, incubées à l'obscurité et dont le SOS Chromotest a été réalisé sans S9 mix.

Plusieurs auteurs ont démontré une relation linéaire entre la concentration du produit et l'activation végétale. Gentile et coll. (1986) ont noté qu'en présence de cellules de *Nicotiana tabaccum*, une augmentation de la concentration de NOP entraînait une augmentation du nombre de révertants chez *Salmonella typhimurium* TA98. Plewa et coll. (1983) concluèrent qu'une augmentation de la concentration de 2-aminofluorène, en présence des mêmes cellules végétales, provoquait également une augmentation du nombre de révertants chez *Salmonella typhimurium* TA98. Anderson et coll. (1988) ont, quant à eux, établi une courbe de dose-réponse entre le nombre de révertants chez *Salmonella typhimurium* TA98 et la concentration de m-phénylènediamine en présence de *Tradescantia paludosa*, relation atteignant un plateau aux plus fortes concentrations de produit. Enfin, Sauser et Klaine (1990), utilisant aussi le m-phénylènediamine en présence de *Selenastrum capricornutum*,

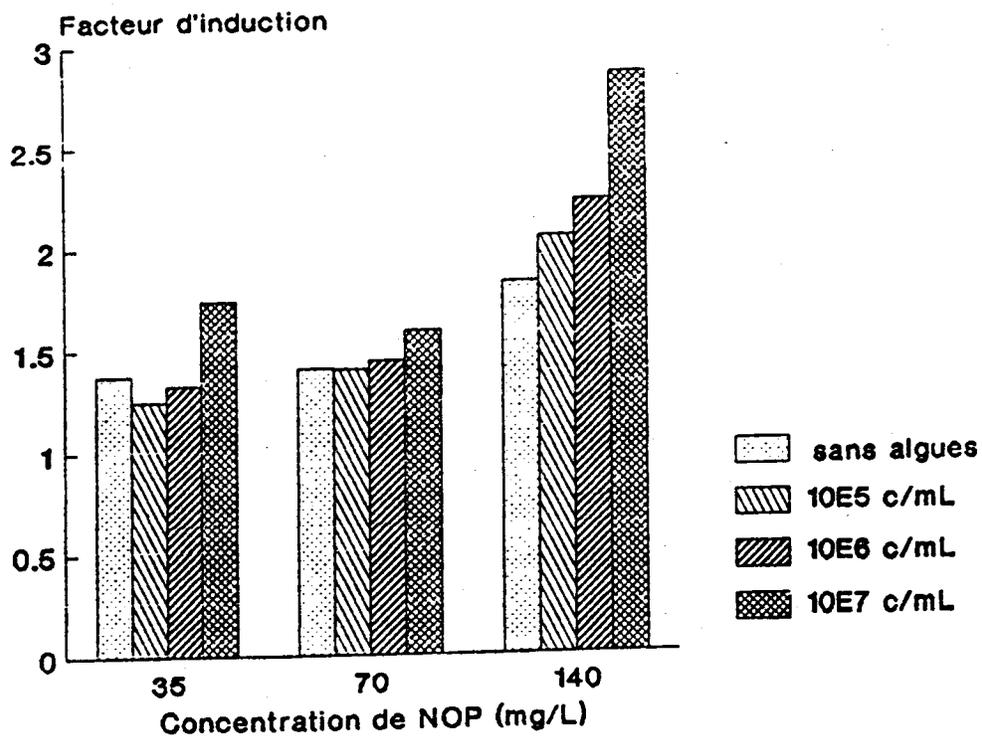


FIGURE 8: Patron d'activation du NOP par *S. capricornutum* en phase stationnaire, incubée à l'obscurité et dont le SOS Chromotest a été réalisé sans S9 mix

concluèrent que la variable "concentration du produit" avait une plus grande influence sur l'augmentation du nombre de révertants chez *S. typhimurium* TA98 que la variable temps d'incubation. Par contre, ces mêmes auteurs attribuent le même niveau d'importance à ces deux variables en ce qui concerne l'activation de l'aflatoxine B1 par *S. capricornutum* détectée par l'indicateur bactérien *S. typhimurium* TA98, démontrant ainsi que l'importance des variables d'interaction dépend, entre autres, du produit chimique lui-même.

#### 3.2.3.2 Biomasse algale

D'après les valeurs du rapport F de l'analyse de variance présentée au tableau 10, la biomasse algale (CONCALGUES) arrive seconde en importance. Ceci confirme bien qu'une augmentation de la biomasse favorise une augmentation de l'activité génotoxique du NOP. On peut davantage se rendre compte de cet effet en se référant au tableau 9 où une biomasse de  $10E7$  c/mL révèle des rapports F plus élevés que chez les deux autres biomasses algales dans tous les cas où une réponse d'induction génotoxique significative s'est manifestée. La figure 8 nous permet aussi de constater que c'est la biomasse de  $10E7$  c/mL qui

génère les plus forts FI au NOP comparativement aux FI du NOP sans activation algale.

L'analyse de ces résultats nous a incités à évaluer le protocole d'étude d'interaction algale avec des biomasses de  $10E6$ ,  $10E7$  et  $10E8$  c/mL afin de savoir si une plus forte biomasse ( $10E8$  c/mL) activerait davantage le NOP. Sur quatre expériences, trois ne révélèrent aucune différence significative entre les deux plus fortes biomasses (tableau 11). L'expérience qui a donné une différence significative entre ces deux biomasses a aussi généré des plus forts FI pour la biomasse  $10E8$  c/mL. De leur côté, Gentile et coll. (1990) ont démontré avec *S. capricornutum* une meilleure activation du NOP par une biomasse de  $3 \times 10E8$  c/mL, biomasse maximale utilisée dans leurs travaux. Leurs conditions expérimentales étant nettement différentes des nôtres: 1) tubes vs miniaturisation en microplaque; 2) interaction de 3 h vs 4 h; 3) *Salmonella typhimurium* comme indicateur génotoxique avec le test d'Ames vs *Escherichia coli* comme indicateur génotoxique avec le SOS Chromotest), il n'est pas surprenant que les biomasses requises pour optimiser les réponses d'activation génotoxique du NOP puissent être différentes par rapport aux nôtres. Attendu qu'une biomasse de  $10E8$  c/mL nécessite un plus grand effort

TABLEAU 11: Tests de comparaisons multiples "intervalles HSD de Tukey à 95 %" destinés à évaluer l'influence de la biomasse algale sur le degré d'activation du NOP

Expérience	Biomasse algale (c/mL)		
	10E6	10E7	10E8
1 LOG	1,653 <sup>a</sup>	1,758 <sup>b</sup>	1,813 <sup>b</sup>
2 STA	1,674 <sup>a</sup>	2,062 <sup>b</sup>	2,096 <sup>b</sup>
3 LOG	1,608 <sup>a</sup>	2,016 <sup>b</sup>	2,136 <sup>c</sup>
4 STA	1,591 <sup>a</sup>	1,775 <sup>b</sup>	1,828 <sup>b</sup>

Incubation de 4 h à l'obscurité

Note: Pour une même expérience, les valeurs reliées par une même lettre ne sont pas significativement différentes selon une probabilité de 95%

pour obtenir le concentré cellulaire et qu'elle ne semble pas offrir de potentiel d'activation génotoxique du NOP nettement supérieur à celui de 10E7 c/mL dans nos conditions expérimentales, nous préconisons l'emploi d'une biomasse de 10E7 c/mL dans l'application du protocole d'étude d'interaction algale.

Jusqu'à la fin de nos travaux, nous avons tout de même continué d'utiliser les trois biomasses 10E5, 10E6 et 10E7 c/mL afin de vérifier si les conclusions tirées des expériences avec le NOP s'appliqueraient également aux

autres produits à l'étude. A cet égard, nos résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs, dont Gentile et coll. (1986, 1986a), à l'effet qu'une augmentation du nombre de révertants chez *S. typhimurium* TA98 soit reliée à une augmentation de la biomasse cellulaire de *N. tabaccum* incubée en présence de NOP ou de 2-aminofluorène. De même, Gentile et coll. (1990) ont démontré que l'activation du NOP, détectée par l'indicateur bactérien *S. typhimurium* TA98, augmentait en fonction d'une augmentation de la biomasse algale de *S. capricornutum*. Cependant, l'activation optimale du NOP dans nos conditions expérimentales semble atteinte avec une biomasse algale de  $10^7$  c/mL tandis que Gentile et coll. (1990) rapportent qu'une biomasse de  $3 \times 10^8$  c/mL n'avait pas encore révélé de plateau d'activation génotoxique pour ce même produit. Finalement, Anderson et coll. (1988) ont démontré qu'une augmentation de la biomasse cellulaire de *Tradescantia paludosa* favorisait une meilleure activation du m-phénylènediamine à l'aide de l'indicateur *S. typhimurium* TA98.

### 3.2.3.3 Phase de croissance

Sur un total de cinq expériences réalisées avec des algues en phase log et sta, quatre n'ont pu confirmer une

influence significative de la phase de croissance algale (PHASE) lors d'analyses factorielles de variance comme celle du tableau 10. Celle-ci touche d'ailleurs la dernière expérience qui attribua à la phase de croissance un niveau de significativité très élevé (rapport F de 49,86). Des tests de "t" effectués après chacune des cinq expériences pour comparer la phase log et sta à l'obscurité ou à la lumière n'ont généralement pas démontré de significativité sauf pour cette cinquième expérience qui assigna à la phase sta de forts FI. Hormis cette exception, l'importance de la variable phase de croissance algale reste non confirmée en ce qui concerne notre protocole d'étude d'interaction algale, contredisant ainsi Gentile et coll. (1985, 1986a, 1987, 1990) et Anderson et coll. (1988) qui ont déjà rapporté des réponses d'activation qui variaient en fonction de ce facteur. En effet, l'étude de Gentile et coll. (1990) a démontré que des cellules de 9 j de *S. capricornutum* en phase sta activaient davantage le NOP que les mêmes algues en phase log. Egalement, Gentile et coll. (1986a) ont rapporté que des cellules de *N. tabaccum* en début de phase sta étaient plus efficaces à activer le NOP que celles en phase log. Ces auteurs expliquent que l'activation du NOP est accrue par les peroxydases (Gentile et coll., 1985), que ces enzymes sont relativement stables et s'accumulent à

l'intérieur des cellules (Baldwin, 1977; Dohn et Krieger, 1981; Yamazaki, 1974) et que leur concentration augmente à la toute fin de la phase log, d'où une meilleure activation du NOP par les cellules en phase sta. D'autres études de Gentile et coll. (1987) ont rapporté l'activation du NOP et du 2-aminofluorène par des cellules de coton (*Gossypium* sp.) et de carotte (*Daucus carota*). Leurs travaux démontrent que le 2-aminofluorène était davantage activé par les cellules de coton en début de phase log et au milieu de cette phase pour les cellules de carotte. Le NOP l'était davantage par les cellules de coton en milieu de phase log et en phase sta pour les cellules de carotte. Dans le même ordre d'idée, Anderson et coll. (1988) ont démontré que le m-phénylènediamine avait son maximum d'activation par des cellules de *Tradescantia paludosa* clone 03 en milieu de phase log tandis que les cellules du clone 4430 l'activait mieux en fin de phase log. Tous ces auteurs s'accordent à relater que l'activation végétale varie, entre autres, en fonction de la phase de croissance des cellules, ce que nous n'avons que partiellement réussi à confirmer avec notre protocole miniaturisé.

#### 3.2.3.4 Luminosité

L'importance du rapport F ( $F = 13,46$ ) de la variable luminosité (LUMOBS) dans l'analyse de variance du tableau 10 pourrait être aussi bien liée au caractère photosensible du produit chimique qu'à l'interaction algue-lumière. Dans le cas du NOP, ce caractère photosensible s'exprime par l'inter-relation CONCNOP (A) X LUMOBS (B), tandis que l'inter-relation algue-lumière correspond à LUMOBS (B) X CONCALGUES (C). Pour d'autres analyses factorielles de variance résultant d'expérimentations autres que celle rapportée au tableau 10, l'interaction (A) X (B) est soit (hautement) significative, ou non significative. N'ayant pu confirmer dans la littérature la photosensibilité du NOP, nous lui supposons tout de même une certaine instabilité à la lumière, quoique nos travaux n'ont pu trancher définitivement la question. Concernant cet effet de la lumière, une étude sur l'assimilation du cadmium par l'algue *S. capricornutum* démontra que sa prise en charge augmentait en fonction de la diminution des facteurs nourriture, température et lumière (Simoes Gonçalves et coll., 1988). Si une meilleure assimilation du cadmium s'effectue en absence de lumière, pourrait-on relier une meilleure activation algale du NOP au facteur obscurité ? Ce dernier facteur, à

notre connaissance, n'a pas vraiment été étudié en relation avec le phénomène d'activation végétale.

Gentile et coll. (1985) ont toutefois démontré que des extraits de plants de pois *Pisum sativum* et de tabac *Nicotiana tabaccum* (fraction S9) utilisés dans l'activation du NOP étaient sensibles à la chaleur. En supposant que la température dans les puits des microplaques incubées à la lumière était plus élevée que celle dans les puits des microplaques incubées à l'obscurité, cela pourrait expliquer en partie la meilleure activation détectée à l'obscurité. Il semble cependant difficile de croire que la température à l'intérieur des puits puisse beaucoup varier vu la courte période d'incubation de 4 h généralement appliquée pour notre protocole d'interaction. Signalons, toutefois, les résultats d'un suivi thermographique de 8 j, réalisé en conditions de luminosité semblables aux nôtres, du contenu volumétrique d'un puits de microplaque et d'un erlenmeyer de 125 mL, tous les deux employés pour la conduite de tests de toxicité avec *S. capricornutum*. Celui-ci révéla que la température du puits de la microplaque était en moyenne de 2 °C plus élevée que celle de l'erlenmeyer (Blaise, 1984).

Toujours en rapport avec la variable luminosité, les cas du MNNG et du 4NQO présentent des particularités différentes du NOP et seront discutés dans les sections 3.3.1 et 3.3.2 respectivement.

#### 3.2.3.5 Temps d'interaction

Pour connaître l'importance du temps d'interaction sur le phénomène d'activation algale, deux expériences identiques (algues en phase log incubées à l'obscurité) comportant des temps d'interaction respectifs de 4 h et 24 h ont révélé que l'activation algale était comparable. En effet, un test de "t" effectué sur les FI sans algues et avec algues ( $10E7$  c/mL) à 4 h donne comme niveau de significativité une valeur de 0,0014 soit hautement significatif; le même test sur les FI sans algues et avec algues ( $10E7$  c/mL) à 24 h donne, quant à lui, une valeur de 0,00017, soit très hautement significatif. Par ailleurs, un test de "t" sur les FI avec algues ( $10E7$  c/mL) à 4 h et 24 h a donné comme niveau de significativité une valeur de 0,103, soit un résultat non significatif: ceci veut dire qu'il n'y a pas de différence significative entre les FI 4 h et 24 h à la biomasse algale  $10E7$  c/mL.

En résumé;

FI sans algues 4 h	
FI avec algues (10E7 c/mL) 4 h	"t" = 0,00140**
FI sans algues 24 h	
FI avec algues (10E7 c/mL) 24 h	"t" = 0,00017***
FI avec algues (10E7 c/mL) 4 h	
FI avec algues (10E7 c/mL) 24 h	"t" = 0,10300 <sup>ns</sup>

où;

ns = p > 0,05  
 \*\* = p < 0,005  
 \*\*\* = p < 0,001

A la lumière de ces résultats, dans l'application ultérieure du protocole, nous avons opté pour un temps d'interaction de 4 h puisqu'une période d'interaction de 24 h ne donnait pas de meilleure activation.

Ces résultats suggéraient donc que, dans l'application de notre protocole, un temps d'interaction adéquat pour l'activation du NOP se situerait autour de 4 h. Gentile et coll. (1990) ont obtenu des résultats semblables dans leur étude sur l'activation du NOP par *S. capricornutum*. Ils ont trouvé que l'activation du NOP augmentait en fonction du temps d'interaction et que l'activation optimale survenait

après 3 h. Par contre, une autre étude (Gentile et coll., 1986a) sur l'activation du NOP entreprise avec des cellules de *N. tabaccum* fixa plutôt le temps d'interaction optimal à 192 h. Ceci semble indiquer que le temps d'activation optimal d'un même produit varie en fonction du système végétal choisi. Cette même étude établit également le lien qui existe entre l'activation du 2-aminofluorène par *N. tabaccum* et l'accroissement du temps d'interaction jusqu'à un optimum de 72 h. Le même système d'activation végétale nécessiterait donc des temps d'interaction différents selon les produits chimiques utilisés.

Les études rapportées dans la littérature apparaissent parfois discordantes en ce qui a trait aux meilleurs temps d'interaction. D'une part, Plewa et coll. (1983) ont démontré que le temps d'interaction optimal du 2-aminofluorène avec des cellules de *N. tabaccum*, activation détectée par le test d'Ames (*S. typhimurium* TA98), était de 2 h, alors que d'autre part, Gentile et coll. (1986a), avec les mêmes cellules végétales et le même indicateur bactérien, ont plus tard fixé cette valeur à 72 h. Deux protocoles différents utilisant des conditions expérimentales différentes sont probablement à l'origine de cette divergence. Ces contradictions apparentes démontrent

bien la complexité que peut engendrer la présence simultanée de plusieurs variables dans le phénomène d'activation végétale.

#### 3.2.3.6 Activation mammalienne

Même si nous savions, à la lumière des expériences précédentes sur la génotoxicité des produits chimiques (section 3.1.3), que le S9 mix dégradait le NOP, nous avons tout de même réalisé une expérience d'interaction (algues en phase log et sta, incubées à la lumière et à l'obscurité, pendant 4 h) suivie d'une détection de l'activité génotoxique du NOP à l'aide du SOS Chromotest avec S9 mix. Cette expérience s'imposait afin de savoir s'il n'existait pas un phénomène de synergisme entre les algues et le S9 mix qui pourrait alors davantage activer le produit. Comme le montre la figure 9b (algues en phase log, incubées à l'obscurité, pendant 4 h, et dont le SOS Chromotest a été réalisé avec S9 mix), le S9 mix dégradait toujours le NOP (ou ses métabolites génotoxiques) après interaction algale. Une expérience d'interaction, réalisée en conditions identiques, mais sans S9 mix lors du SOS Chromotest, indique bien que le NOP a été activé par les algues (figure 9a). Cette dégradation se produit peu importe la biomasse, la

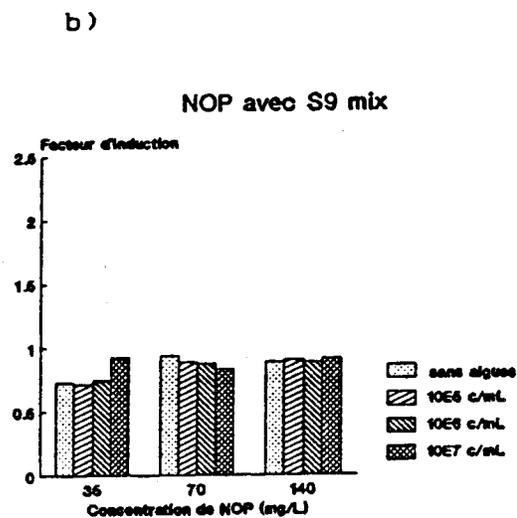
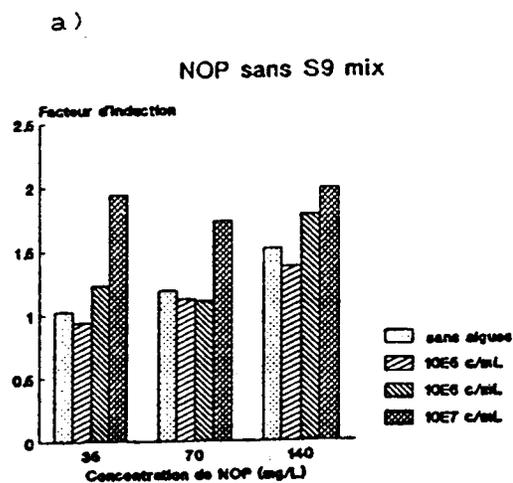


FIGURE 9: Effet du S9 mix sur le patron d'activation du NOP par *S. capricornutum* en phase log et incubée à l'obscurité

phase de croissance de l'algue, la concentration de NOP ou la luminosité. Certaines études confirment ces résultats. D'une part, Gentile et coll. (1986) ont détecté une légère diminution de la mutagénicité du NOP par le S9 mammalien. D'autre part, Gentile et coll. (1987a) ont démontré que la mutagénicité du NOP est réduite chez les deux souches bactériennes *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100 en présence de S9 mammalien, malgré qu'elle soit augmentée en présence d'extrait de plante (pois ou tabac).

#### 3.2.3.7. Espèce algale

Le patron d'activation du NOP obtenu avec l'algue *Chlorella vulgaris* sp. (figure 10) ressemble beaucoup à celui produit par *S. capricornutum* (figures 8 et 9a). L'importance des variables, d'après les valeurs du rapport F obtenues lors d'une analyse factorielle de variance comme celle du tableau 10, est également la même pour les deux espèces. Toutefois, le test de "t" comparant la phase log (obs ou lum) des deux algues s'avère hautement significatif ( $t = 0,0015$ ), indiquant que leur degré d'activation est différent. Ce constat n'est pas nécessairement surprenant puisqu'il s'agit de chlorophycées d'espèces différentes.

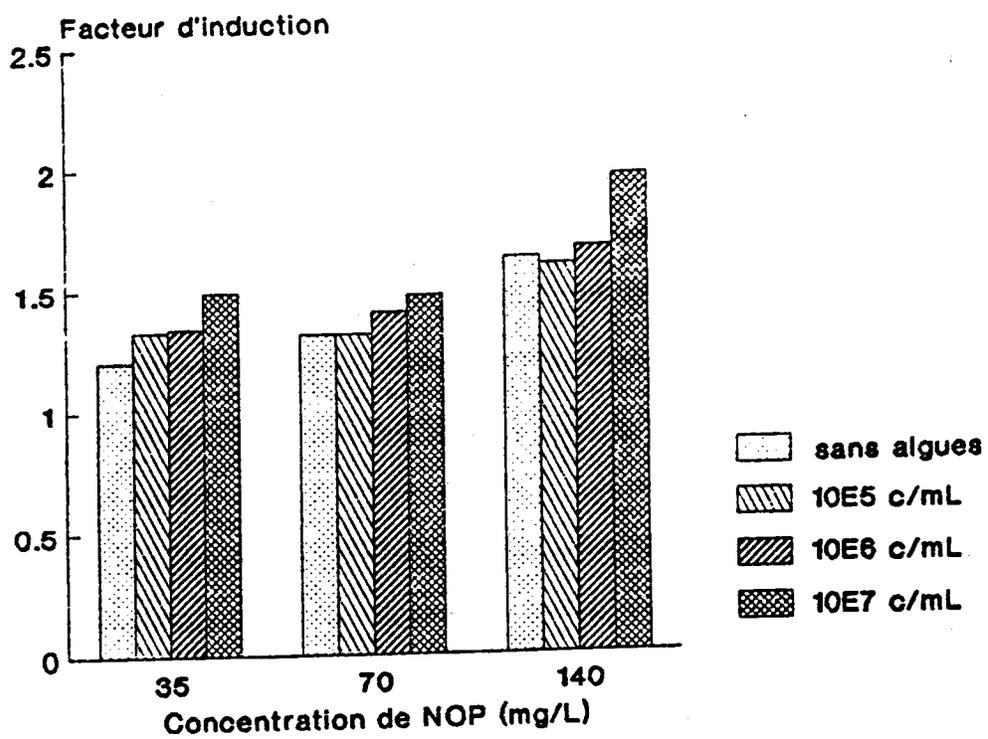


FIGURE 10: Patron d'activation du NOP par *Chlorella vulgaris* en phase log, incubée à l'obscurité et dont le SOS Chromotest a été réalisé sans S9 mix

Wildeman et Nazar (1982) trouvèrent également des différences significatives entre le potentiel d'activation de plusieurs pesticides par des homogénats de jeunes plants de luzerne (*Medicago sativa*), de maïs (*Zea mays*), d'haricot (*Vicia faba*), de pois (*Pisum sativum*), de tournesol (*Helianthus annuus*), de tabac (*Nicotiana tabaccum*) et de blé (*Triticum aestivum*). Malgré la différence du pouvoir d'activation notée entre *Selenastrum* et *Chlorella*, il semble bien que les réactions biochimiques responsables de l'activation du NOP soient similaires chez ces deux espèces algales. Ceci suggère aussi que notre protocole d'interaction pourra fort probablement s'appliquer à d'autres espèces algales.

### 3.3 Application du protocole d'étude d'interaction

Après l'étude des variables d'interaction avec le NOP, nous avons voulu connaître leur influence sur d'autres produits chimiques. Un agent alkylant (MNNG) et un composé nitroaromatique (4NQO), structurellement différents du NOP, ont été sélectionnés pour tester le protocole d'interaction. Le tableau 14 présentera plus tard fait une synthèse des résultats du potentiel d'activation des produits chimiques de référence (NOP, MNNG et 4NQO) suite à l'application du

protocole d'interaction algale. Par la suite, le protocole a été appliqué aux 9 herbicides énumérés précédemment.

### 3.3.1 Cas du MNNG

L'analyse factorielle de variance révèle que la luminosité constitue le facteur d'interaction le plus important dans le cas du MNNG. Etant décomposable à la lumière (Lenga, 1985), les FI obtenus avec ce produit sans algues à la lumière sont pratiquement la moitié de ceux produits à l'obscurité. Les expériences subséquentes avec le MNNG se sont donc déroulées à l'obscurité afin de mieux isoler le rôle des autres variables d'interaction. Nos résultats n'ont pu démontrer que le produit était activable par les algues. Bien au contraire, les algues semblent dégrader le MNNG ou tout au moins diminuer sa génotoxicité (figure 11). En effet, les FI obtenus avec les différentes concentrations de MNNG incubées avec une biomasse algale de  $10E7$  sont significativement plus faibles que ceux des autres biomasses et des témoins sans algues, la différence étant davantage marquée à la lumière. L'ordre croissant des valeurs FI suit le patron  $10E7 < 10E6 < 10E5$ , celles des biomasses  $10E5$  et  $10E6$  c/mL n'étant toutefois pas

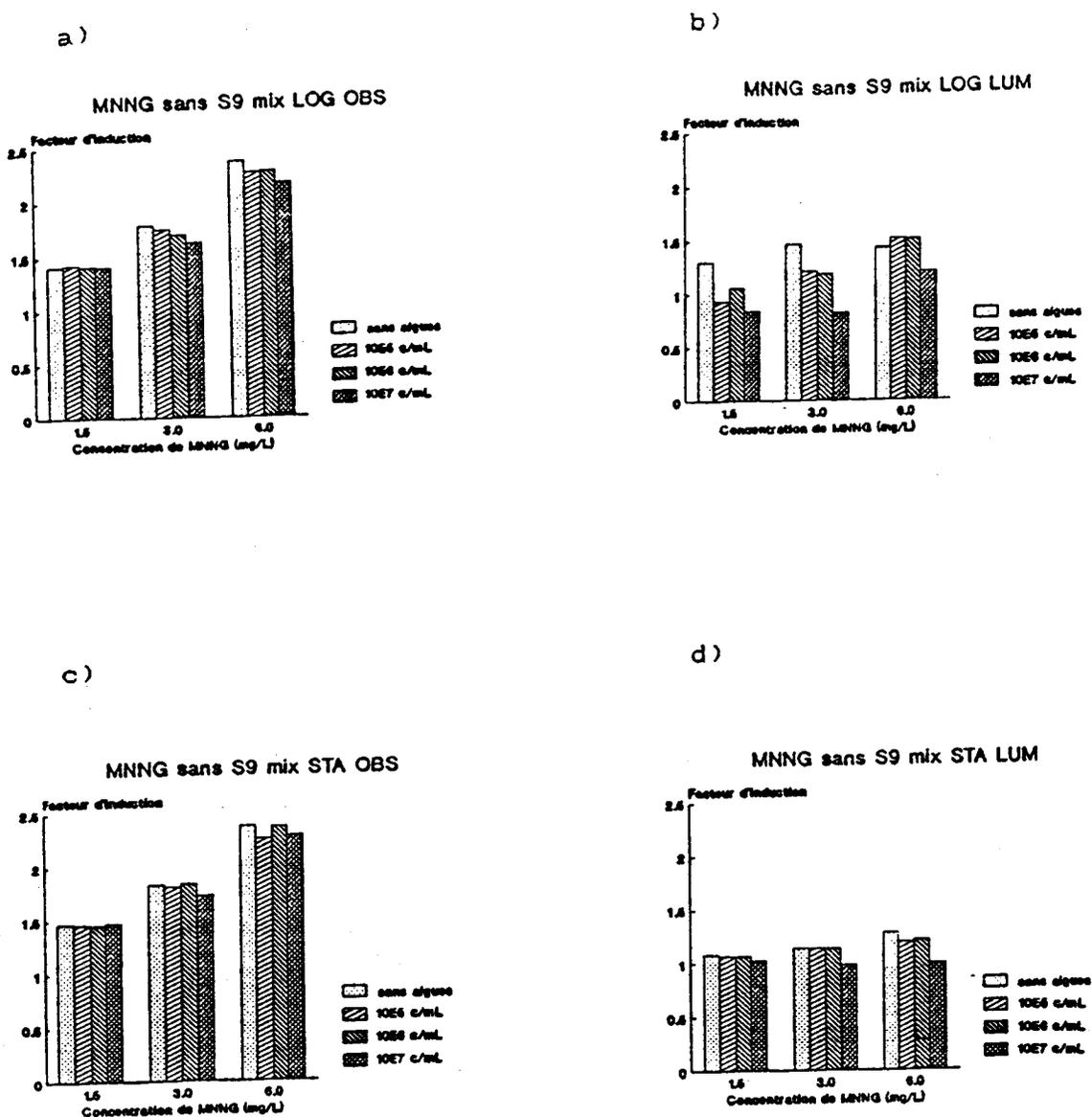


FIGURE 11: Patron de désactivation du MNNG par *S. capricornutum* en phase log ou sta, incubée à l'obscurité ou à la lumière, et dont le SOS Chromotest a été réalisé sans S9 mix

significativement différentes des témoins sans algues (résultats statistiques non illustrés).

Ces résultats diffèrent de ceux rapportés à partir d'autres travaux au niveau de la désactivation génotoxique du MNNG par les algues. Ainsi, Harwood et coll. (1989) ont rapporté que l'activité génotoxique du MNNG était virtuellement inchangée après exposition à l'algue *S. capricornutum*. De même, Gentile et coll. (1978) ont démontré que le MNNG n'était pas activé par des homogénats de maïs. Malgré que la non activation du MNNG par un système végétal semble donc assez bien reconnue, aucune autre étude ne nous permet, par contre, d'appuyer le fait que les algues diminueraient la génotoxicité de ce produit.

Le S9 mix diminue la génotoxicité du MNNG mais ce dernier demeure tout de même génotoxique (figure 7). Gentile et coll. (1978) corroborent ce fait que le MNNG subit une désactivation mutagénique par le S9 mammalien. En outre, les algues ( $10^7$  c/mL) contribuent, seules ou avec le concours du S9 mix, à diminuer la génotoxicité du MNNG (tableau 14).

Comme pour le NOP, une concentration plus élevée de MNNG induit des FI plus élevés. Cependant, les différences

entre les FI produits par les biomasses algales d'interaction et le MNNG sans algues sont les mêmes d'une concentration de MNNG à l'autre. Ceci indique que le MNNG n'est ni plus ni moins dégradé à l'une ou l'autre (6, 3 ou 1,5 mg/L) des concentrations d'essai.

Finalement, comme pour le NOP, la phase de croissance algale, constitue une variable d'interaction difficile à interpréter, car sans S9 mix la phase log n'est pas significativement différente de la phase sta tandis qu'en présence de S9 mix les deux phases sont très significativement différentes l'une de l'autre (résultats statistiques non illustrés). Outre le fait que des métabolites/enzymes algaux différents puissent être présents en phases log et sta, et qu'ils aient pu interagir différemment avec le S9 mix, il est difficile d'expliquer ces résultats.

En résumé, une analyse de variance à 5 facteurs rappelle, en ordre décroissant d'importance, les variables suivantes: LUMOBS > ACTIVATION > CONCMNNG > PHASE ≥ CONCALGUES (tableau 12).

TABLEAU 12: Analyse factorielle de variance de la désactivation génotoxique du MNNG par l'algue *S. capricornutum*

Variable(s)	SC	DL	MC	F
CONCMNNG (A)	4,138	2	2,069	143,350 <sup>***</sup>
CONCALGUES (B)	0,347	2	0,174	12,040 <sup>***</sup>
LUMOBS (C)	24,261	1	24,261	1000,000 <sup>***</sup>
PHASE (D)	0,271	1	0,271	18,760 <sup>***</sup>
ACTIVATION (E)	6,090	1	6,090	421,960 <sup>***</sup>
A X B	0,302	4	0,075	5,230 <sup>***</sup>
A X C	2,280	2	1,140	78,980 <sup>***</sup>
B X C	0,533	2	0,266	18,460 <sup>***</sup>
A X E	1,422	2	0,711	49,270 <sup>***</sup>
B X E	0,083	2	0,042	2,870 <sup>ns</sup>
C X E	4,531	1	4,531	313,920 <sup>***</sup>
D X E	0,138	1	0,138	9,570 <sup>**</sup>

ns =  $p > 0,05$

\*\* =  $p < 0,005$

\*\*\* =  $p < 0,001$

DL = degré de liberté

F = rapport F

MC = moyenne des carrés

SC = somme des carrés

Note: Les facteurs fixes sont la concentration du MNNG (A), la biomasse algale (B), la luminosité (C), la phase de croissance (D) et l'activation mammalienne S9 mix (E); expérience du 1-12-1990.

### 3.3.2 Cas du 4NQO

Le 4NQO, comme le NOP, est activable par les algues (figure 12). La biomasse algale  $10E7$  c/mL augmente significativement la génotoxicité du produit par rapport aux témoins sans algues, peu importe la concentration du produit ou la luminosité. Les FI provenant des interactions avec les biomasses algales de  $10E5$  et de  $10E6$  c/mL ne sont pas significativement différentes des FI du 4NQO sans algues. La lumière ne semble pas avoir eu d'effet sur le 4NQO car lorsque l'analyse factorielle de variance est appliquée sur les FI du 4NQO sans algues, l'interaction  $CONC4NQO \times LUMOBS$  est toujours non significative peu importe les autres variables d'interaction. Harwood et coll. (1989) confirment aussi que la lumière n'a eu aucun effet significatif sur le 4NQO dans leurs conditions expérimentales. Pourtant, le 4NQO est réputé sensible à la lumière (Lenga, 1985).

Malgré la dégradation connue du 4NQO par le S9 mix (Quillardet et coll., 1985b; Quillardet et Hofnung, 1985), nous avons voulu investiguer la possibilité d'un effet de synergisme entre les algues et le S9 mix à son égard. Les résultats ont démontré que le 4NQO est toujours dégradé par le S9 mix même après interaction algale, comme le NOP.

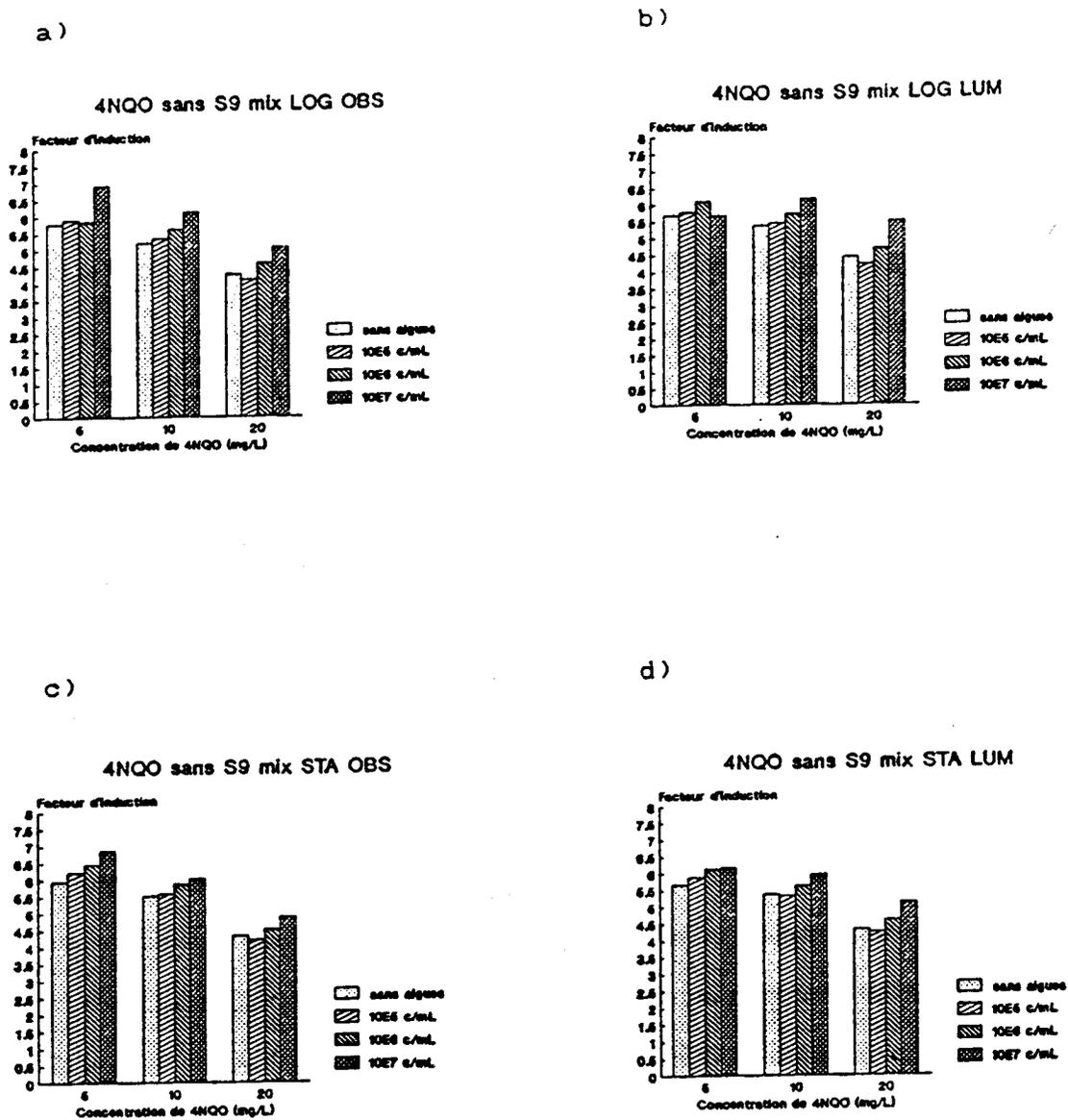


FIGURE 12: Patron d'activation du 4NQO par *S. capricornutum* en phase log ou sta, incubée à l'obscurité ou à la lumière, et dont le SOS Chromotest a été réalisé sans S9 mix

Comme pour le NOP et le MNNG, la signification des résultats en fonction de la phase de croissance algale demeure énigmatique. Sans S9 mix, les deux phases ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre au niveau des FI tandis qu'en présence de S9 mix elles le sont d'une façon très hautement significative (résultats statistiques non illustrés). Ainsi que nous l'avons avancé dans le cas du MNNG, il pourrait s'agir d'une interaction liée à la présence de métabolites/enzymes algaux différents lors de la phase log et sta, lesquels produiraient des réactions particulières en présence de S9 mix et, ultimement, affecteraient les FI. En résumé, l'analyse factorielle de variance à 5 facteurs accorde l'ordre décroissant d'importance suivant aux variables d'interaction pour le 4NQO: ACTIVATION > CONC4NQO > LUMOBS > PHASE ≥ CONCALGUES (tableau 13).

### 3.3.3 Cas des herbicides

Non génotoxiques en soi (section 3.1.3.2), les 9 herbicides n'ont nullement été activés par *S. capricornutum*, suite à l'application de notre protocole algal. Les algues n'ont donc eu aucune influence détectable à leur égard en ce qui a trait à leur potentiel génotoxique. Il s'agit d'une

TABLEAU 13: Analyse factorielle de variance de l'activation génotoxique du 4NQO par *S. capricornutum*

Variable(s)	SC	DL	MC	F /
CONC4NQO (A)	53,888	2	26,944	113,640 <sup>***</sup>
CONCALGUES (B)	1,549	2	0,774	3,270 <sup>†</sup>
LUMOBS (C)	3,249	1	3,249	13,700 <sup>***</sup>
PHASE (D)	1,487	1	1,487	6,270 <sup>†</sup>
ACTIVATION (E)	145,204	1	145,204	612,430 <sup>***</sup>
A X B	2,178	4	0,544	2,300 <sup>ns</sup>
A X C	1,707	2	0,854	3,600 <sup>†</sup>
B X C	1,358	2	0,679	2,860 <sup>ns</sup>
A X E	282,009	2	141,005	594,720 <sup>***</sup>
C X E	1,453	1	1,453	6,130 <sup>†</sup>
D X E	0,935	1	0,935	3,940 <sup>†</sup>

ns =  $p > 0,05$

† =  $p < 0,05$

\*\*\* =  $p < 0,001$

DL = degré de liberté

F = rapport F

MC = moyenne des carrés

SC = somme des carrés

Note: Les facteurs fixes sont la concentration du 4NQO (A), la biomasse algale (B), la luminosité (C), la phase de croissance (D) et l'activation mammalienne S9 mix (E); expérience du 8-01-1991.

TABLEAU 14: Résumé des changements du potentiel génotoxique des produits chimiques de référence soumis au protocole d'étude d'interaction

Produit chimique	Potentiel génotoxique sans interaction algale		Potentiel génotoxique après interaction (10E7 c/mL)							
	-S9	+S9	Phase logarithmique				Phase stationnaire			
			LUM		OBS		LUM		OBS	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
NOP	+	-	++/+	-	++	-	++/+	-	++	-
MNGG	++	+	+/-	-	+	-	+/-	-	+	-
4NQO	+	-	++	-	++	-	++	-	++	-

-S9: sans S9 mammalien (S9 mix)

+S9: avec S9 mammalien (S9 mix)

bonne nouvelle pour l'environnement puisque les résidus d'herbicides utilisés en agriculture sont susceptibles de se retrouver en milieu aquatique. Selon les résultats de nos travaux, ces résidus ne seraient donc pas transformés par les algues en produits génotoxiques.

D'autres herbicides, ainsi que nous en avons déjà fait mention (tableau 1), sont potentiellement activables par divers systèmes végétaux, comme l'ont confirmé plusieurs chercheurs. Il est possible que la mise en évidence de l'activation génotoxique d'un produit réside dans le choix de l'indicateur biologique détectant cette activation. Le test d'Ames constituait l'outil de détection pour la plupart des auteurs tandis que le SOS Chromotest constituait le nôtre. Bien que la concordance entre la détection de la génotoxicité de substances chimiques variées soit de l'ordre de 90% en moyenne pour ces deux tests (Otha et coll., 1984; Quillardet et coll., 1985b; Vigerstad et coll., 1988; von der Hude et coll., 1988), il n'en demeure pas moins que l'un des deux pourrait être plus approprié à détecter une activation génotoxique, selon la molécule impliquée.

D'autres différences (par exemple, le choix du système d'activation végétale, l'emploi de cellules entières ou

d'homogénéat de cellules), ainsi que les autres variables d'interaction déjà discutées, pourraient aussi expliquer les divergences de résultats que l'on retrouve dans la littérature dans ce domaine de pointe qu'est l'activation génotoxique de produits chimiques par des systèmes végétaux. Au vu des facteurs multiples qui peuvent façonner la réponse ultime d'une activation végétale vis-à-vis une substance à l'étude, de nombreux efforts restent encore à être déployés dans cet axe de recherche qui s'avère aussi important pour l'environnement qu'il est complexe.

## CHAPITRE 4

### CONCLUSION

La mise au point d'un protocole d'étude d'interaction miniaturisé sur microplaque à 96 puits a été réalisée à partir d'expériences mettant en évidence l'activation ou la désactivation génotoxique de produits chimiques (NOP, MNNG et 4NQO) par l'algue *Selenastrum capricornutum*. Le protocole est simple car il ne nécessite pas d'appareillage complexe. Il se réalise facilement avec des microplaques à 96 puits à fonds ronds (Linbro), un incubateur classique (Environnement Canada, 1989a), des microplaques à 96 puits à filtres de

0,65  $\mu\text{M}$  (Millipore Cat. no MADVN6550), un système de filtration de microplaques (Millipore Cat. no MAVM09600) et le nécessaire pour l'entreprise d'un SOS Chromotest classique (Organics Ltd., 1986, 1988). Il est pratique car les microplaques nécessitent peu d'espace d'utilisation et peu de temps de préparation/utilisation. Finalement, sa rentabilité est bonne comparativement aux tests de mutagénicité courants (e.g. test d'Ames), due en grande partie au test indicateur de génotoxicité utilisé (SOS Chromotest). En effet, le test d'Ames coûte entre 750 et 2 000 dollars l'analyse (Klaassen et coll., 1986) tandis qu'un SOS Chromotest coûte entre 200 et 400 dollars l'analyse (Bermingham, 1989).

La répétabilité du protocole a été confirmée à l'aide du NOP comme produit modèle. De plus, sa mise au point a apporté une meilleure connaissance des facteurs qui interviennent dans la réponse d'induction (FI).

Nous nous sommes toutefois heurtés à la complexité de la réponse d'activation algale, laquelle s'avère dépendante de plusieurs variables: 1) le produit chimique, 2) la biomasse algale, 3) la phase de croissance algale, 4) la luminosité, 5) le temps d'interaction, 6) l'activation

mammalienne S9 mix, 7) l'espèce algale et 8) l'indicateur de génotoxicité. Les 7 premières variables ont été étudiées lors de nos travaux et une description en est faite ci-dessous. Un tableau récapitulatif (tableau 15) des effets de ces variables sur la génotoxicité des produits chimiques de référence suivra la dite description.

1) le produit chimique:

Le choix des concentrations d'essai du produit chimique pourra avoir un impact toxique sur l'indicateur algal d'interaction et sur l'indicateur bactérien de génotoxicité également. La nature chimique et la solubilité du produit chimique sont aussi des facteurs dont il faut tenir compte dans le choix du produit ou de celui de ses concentrations d'essai.

Autant que possible, les concentrations d'essai devront être plus faibles qu'une concentration reconnue toxique (e.g. CI50-96 h) vis-à-vis de l'indicateur algal d'interaction (*S. capricornutum*) et de l'indicateur de génotoxicité (*Escherichia coli* PQ37). Il survient alors la possibilité de choisir des concentrations trop faibles pour être détectées par l'indicateur de génotoxicité (SOS

Chromotest dans notre cas), comme discuté à la section 3.1.3.2. En bref, cela nécessite parfois l'emploi de concentrations d'essai qui peuvent s'avérer toxiques aux algues afin d'augmenter la sensibilité de l'indicateur de génotoxicité et traduit bien la complexité de tels ajustements. Il est également suggéré de choisir les concentrations d'essai à l'intérieur de la portion linéaire de la courbe de dose-réponse du produit préalablement établie, lorsque le produit démontre une génotoxicité intrinsèque.

Comme nos résultats l'indiquent, la nature chimique du produit influence la réponse d'interaction algale. En effet, les herbicides étudiés se sont révélés non génotoxiques et non activables par les algues aux concentrations utilisées, tandis que les produits chimiques de référence ont donné des réponses intéressantes d'activation (NOP et 4NQO) ou de désactivation (MNNG) de leur potentiel génotoxique. Plusieurs autres produits chimiques ont été étudiés en rapport avec le phénomène d'activation végétale (tableau 1) lors de nombreuses études. Aussi, la plupart de ces études démontrent l'importance de la nature chimique du produit en obtenant des réponses d'activation différentes selon le type de produit chimique étudié. L'hydrosolubilité du produit

chimique est évidemment importante car cette propriété favorisera le contact du produit (ou d'une partie du produit) avec les cellules algales, augmentant ainsi les chances d'interaction.

Selon nos résultats, le poids de la variable "concentration du produit", tel que révélé par la valeur de son rapport F lors d'une analyse factorielle de variance comme celle du tableau 10, dépend de chaque produit chimique. Par exemple, le protocole d'interaction appliqué à un produit photodégradable, tel que le MNNG, aura démontré que la concentration du produit se situe au troisième rang de la dite analyse factorielle de variance, après la luminosité et l'activation mammalienne (S9 mix). Le NOP et le 4NQO ont, quant à eux, attribué à cette variable d'interaction un premier et deuxième rang, respectivement.

Plusieurs auteurs ont démontré une relation linéaire entre la concentration du produit et l'activation végétale (Gentile et coll., 1986; Plewa et coll., 1983; Anderson et coll., 1988; Sauser et Klaine, 1990), ce que nos résultats n'ont réussi que partiellement à mettre en évidence. En effet, les FI augmentent en fonction de la concentration du produit mais la différence entre les FI des échantillons

sans algues et de ceux avec algues n'est pas plus grande à la plus forte concentration du produit qu'aux plus faibles concentrations (voir l'exemple du NOP au tableau 9).

2) la biomasse algale:

Une augmentation de la biomasse algale favorise une augmentation de l'activité génotoxique du produit (NOP et 4NQO) ou une désactivation génotoxique du produit (MNNG). Des trois biomasses généralement utilisées lors de nos travaux ( $10E5$ ,  $10E6$  et  $10E7$  c/mL), la biomasse  $10E7$  c/mL a donné les meilleurs résultats, et ce, avec nos trois produits de référence. Quelques essais avec la biomasse  $10E8$  c/mL ont révélé que cette dernière biomasse ne semblait pas offrir de potentiel d'activation génotoxique du NOP qui soit nettement supérieur à celui d'une biomasse de  $10E7$  c/mL dans nos conditions expérimentales. Gentile et coll. (1990) ont pourtant démontré avec *S. capricornutum* une meilleure activation du NOP par une biomasse de  $3 \times 10E8$  c/mL, comme discuté dans la section 3.2.3.2. L'idée générale que l'augmentation de la biomasse végétale favorise une augmentation de l'activité génotoxique du produit est corroborée par plusieurs auteurs (Gentile et coll., 1986, 1986a, 1990; Anderson et coll., 1988). Malgré que la non

activation du MNNG par un système végétal semble assez bien reconnue (Harwood et coll., 1989; Gentile et coll., 1978), aucune autre étude ne nous permet d'appuyer le fait que les algues diminueraient la génotoxicité de ce produit.

### 3) la phase de croissance algale:

Pour les trois produits chimiques de référence (NOP, MNNG et 4NQO), la signification des résultats en fonction de la phase de croissance algale demeure énigmatique. Sans S9 mix, les deux phases (log et sta) ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre au niveau des FI tandis qu'en présence de S9 mix elles le sont d'une façon très significative. Il pourrait s'agir d'une interaction liée à la présence de métabolites/enzymes algaux différents lors de la phase log et sta, lesquels produiraient des réactions particulières en présence de S9 mix et, ultimement, affecteraient les FI. L'importance de la variable "phase de croissance algale" reste donc ambiguë en ce qui concerne notre protocole d'interaction, contrairement aux études de Gentile et coll. (1985, 1986a, 1987, 1990) et Anderson et coll. (1988) qui ont rapporté des réponses d'activation précises en fonction de ce facteur.

4) la luminosité:

L'importance de ce paramètre dans une analyse factorielle de variance comme celle du tableau 10 peut être aussi bien liée au caractère photosensible du produit chimique qu'à l'interaction "algue-lumière". L'interaction "produit chimique-lumière" est non significative pour le 4NQO, produit pourtant réputé sensible à la lumière (Lenga, 1985). Harwood et coll. (1989) rapportent aussi que la lumière n'a eu aucun effet significatif sur le 4NQO dans leurs conditions expérimentales. Concernant le NOP, cette interaction "produit chimique-lumière" est parfois significative, parfois non significative. N'ayant pu confirmer dans la littérature la photosensibilité du NOP, nous lui supposons tout de même une certaine instabilité à la lumière, quoique nos travaux n'ont pu trancher définitivement la question. Pour ce qui est du MNNG, le produit étant photodégradable, l'interaction "produit chimique-lumière" est évidemment très hautement significative. Afin de mettre en évidence une interaction algale avec ce produit, les expériences se sont déroulées à l'obscurité, ce qui révéla une diminution de sa génotoxicité de départ à la plus forte biomasse d'exposition.

5) le temps d'interaction:

La variable "temps d'interaction" n'a été étudiée qu'avec le NOP. Deux expériences identiques (algues en phase log incubées à l'obscurité) avec des temps d'interaction respectifs de 4 h et 24 h ont révélé que l'activation algale était comparable (section 3.2.3.5). Ces résultats suggèrent donc qu'un temps d'interaction adéquat dans l'application de notre protocole pour l'activation du NOP pourrait se situer autour de 4 h, en accord avec Gentile et coll. (1990) qui ont obtenu des résultats semblables dans leur étude sur l'activation du NOP par *S. capricornutum*. Par contre, une autre étude (Gentile et coll., 1986a) sur l'activation du NOP entreprise avec des cellules de *N. tabaccum* fixa plutôt le temps d'interaction optimal à 192 h. Ceci semble indiquer que le temps d'activation optimal d'un même produit varie en fonction du système végétal choisi. Réciproquement, un même système végétal d'activation nécessiterait des temps d'interaction différents selon les produits chimiques utilisés (Gentile et coll., 1986a).

6) l'activation mammalienne S9 mix:

Au départ, sans algues, le S9 mix dégrade les trois produits chimiques de référence à différents degrés (section 3.1.3). Sachant cela, nous étions tout de même intéressés à savoir s'il n'existait pas un phénomène de synergisme entre les algues et le S9 mammalien qui pourrait alors quand même activer le produit. Dans les trois cas, le S9 mix dégradait toujours le produit chimique ou ses métabolites génotoxiques, en présence comme en absence d'algues. Certaines études confirment ces résultats pour le NOP (Gentile et coll., 1986, 1987a), comme pour le 4NQO (Quillardet et coll., 1985b; Quillardet et Hofnung, 1985; Harwood et al., 1989) et le MNNG (Gentile et coll., 1978). Dans le cas du MNNG, les algues (10E7 c/mL) contribuent seules ou avec le concours du S9 mix à diminuer la génotoxicité du MNNG (tableau 14).

7) l'espèce algale:

Le patron d'activation du NOP obtenu avec l'algue *Chlorella vulgaris* sp. (figure 10) ressemble beaucoup à celui produit par *S. capricornutum* (figures 8 et 9a). Toutefois, les tests statistiques (section 3.2.3.7)

TABLEAU 15: Effet des différentes variables sur la génotoxicité des produits chimiques de référence lors de l'application du protocole d'étude d'interaction algale

Variable d'interaction	Produit chimique de référence		
	NOP	MNNG	4NQO
Concentration du produit C1>C2>C3	FI C1>C2>C3 mais activation à C1=C2=C3 pour une même biomasse algale	FI C1>C2>C3 mais désactiv. à C1=C2=C3 pour une même biomasse algale	Idem au NOP
Biomasse algale c/mL 10E5 10E6 10E7 10E8	FI 10E7≥10E8> 10E6>10E5	FI 10E7<10E6< 10E5	FI 10E7> 10E6>10E5
Phase de croissance de l'algue log sta	Sans S9 mix: FI log ≈ sta avec S9 mix: FI log ≠ sta	Idem au NOP	Idem au NOP
Luminosité obs lum	+ algues: FI obs ≥ lum	- algues: FI obs > lum + algues: FI obs >> lum	+ algues: FI obs ≈ lum
Temps d'interaction 4 h 24 h	+ algues: FI 4h ≈ 24h	Non étudié	Non étudié

TABLEAU 15: Effets des différentes variables sur la génotoxicité des produits chimiques de référence lors de l'application du protocole d'étude d'interaction algale (suite)

Variable d'interaction	Produit chimique de référence		
	NOF	MNNG	4NQO
Activation mammalienne ± S9 mix	± algues: FI -S9 > +S9	- algues: FI -S9 > +S9 + algues: FI -S9 >> +S9	Idem au NOF
Espèce algale <i>Selenastrum</i> <i>Chlorella</i>	FI Sel. ≠ Chl.	Non étudié	Non étudié

Dans une optique de recherche à long terme dans ce domaine, soulignons la nécessité d'effectuer d'autres travaux fondamentaux afin de mieux élucider les relations qui existent entre les différentes variables vues précédemment, particulièrement celles comportant des ambiguïtés d'interprétation.

chimique et l'effet de l'activation mammalienne combinée à la phase sta, n'ont été que partiellement élucidés ou confirmés et nécessiteraient des recherches plus approfondies.

Dans une optique d'application du protocole d'interaction algale à court terme, son utilité comme test de dépistage pour les produits chimiques et les échantillons environnementaux (extraits d'effluents, de lixiviats, de sédiments) nous semble intéressante. En effet, le potentiel génotoxique activable de ces échantillons (surnageant) pourrait être vérifié à l'aide de notre protocole.

En fonction des résultats de nos travaux, nous recommandons les coordonnées suivantes lors de l'application présente du protocole d'interaction algale avec *S. capricornutum*:

- trois concentrations de produit chimique (ou extrait d'effluent, etc.);
- Une biomasse algale de  $10E7$  c/mL (section 3.2.3.2);
- Une exposition (temps d'interaction) de 4 h, puisqu'une exposition de 24 h n'a pas donné de meilleure activation (section 3.2.3.5;

- Incubation à la lumière et à l'obscurité, pour tenir compte de la photosensibilité des produits;
- Phase de croissance stationnaire, puisqu'il s'agit de la phase de croissance où les peroxydases sont les plus abondantes (section 3.2.3.3);
- Utilisation de deux indicateurs bactériens plutôt qu'un, car certains produits activables ne seraient peut-être pas détectés par le SOS Chromotest alors qu'ils le seraient par le test d'Ames. A ce sujet, mentionnons l'étude de Legault (1990) rappelant l'impossibilité d'un seul test de dépistage à pouvoir capter l'activité génotoxique propre à tous les xénobiotiques.

## BIBLIOGRAPHIE

- AMES, B.N., McCANN, J. and YAMASAKI, E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31: 347-364.
- AMES, B.N., KAMMEN, H.O. and YAMASAKI, E., 1975b. Hair dyes are mutagenic: Identification of a variety of mutagenic ingredients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 2423-2427.
- ANDERSON, K.J., LEIGHTY, E.G. and TAKAHASHI, M.T., 1972. Evaluation of herbicides for possible mutagenic properties. *J. Agric. Food Chem.*, 20 (3): 649-656.
- ANDERSON, R.N., BEHRENS, R., WARNES, D.D. and NELSON, W.W., 1973. Bromoxynil for control of common cocklebur and wild common sunflower in soybeans. *Weed Science* 21 (2): 103-106.
- ANDERSON, V.A., PLEWA, M.J. and GENTILE, J.M., 1988. The plant activation of m-phenylenediamine by *Tradescantia* clone 03 and clone 4430 cells in liquid suspension culture. *Mutat. Res.* 197: 303-312.
- ANONYME, 1988. *The Agrochemicals Handbook*. The Royal Society of Chemistry. The University, Nottingham, NG7 2RD, England.
- BALDWIN, B.C., 1977. Xenobiotic metabolism in plants, in: D.V. Parke and R.L. Smith (Eds.), *Drug Metabolism: From Man to Microbe*. Taylor and Francis, London, pp. 181-217.
- BEAUSOLEIL, C., 1989. Etude de la mutagénicité de lixivats de déchets industriels à l'aide du SOS Chromotest. Mémoire, Centre des Sciences de l'Environnement, Université de Metz, Metz, 78 p.
- BENIGNI, R., BIGNAMI, M., CAMONI, I., CARERE, A., CONTI, G., IACHETTA, R., MORPURGO, G. and ORTALI, V.A., 1979. A new *in vitro* method for testing plant metabolism in mutagenicity studies. *J. Tox. Environ. Health* 5: 809-819.

- ENVIRONNEMENT CANADA, 1989a. Détermination de la toxicité sub-létale sur microplaque avec l'algue *Selenastrum capricornutum* Printz. Protocole de travail, Environnement Canada, Conservation et Protection, Longueuil, Québec, 13 p.
- ENVIRONNEMENT CANADA, 1989b. Détermination de la génotoxicité (SOS Chromotest). Protocole de travail, Environnement Canada, Conservation et Protection, Longueuil, Québec, 26 p.
- ENVIRONNEMENT CANADA, 1990. Les toxiques dans le St-Laurent: une menace invisible mais réelle, dans: Bilan Saint-Laurent, Centre Saint-Laurent, Montréal, juin 1990, 8 p.
- FISH, F., LAMPERT, I., HALACHMI, A., RIENSENFELD, G. and HERZBERG, M., 1987. The SOS Chromotest Kit: a rapid method for the detection of genotoxicity. Toxicity Assessment 2: 135-147.
- FUJIMOTO, T., OSE, Y., SATO, T., MATSUDA, H., NAGASE, H. and KITO, H., 1987. Antimutagenic factors in aquatic plants. Mutat. Res. 178: 211-216.
- GAZETTE DU CANADA, 1989. Loi canadienne de protection de l'environnement. Environnement Canada, Ottawa, pp. 543-545.
- GENTILE, M.J. and GENTILE, J.M., 1975. A maize-microbe bioassay for the detection of proximal mutagenicity in agricultural chemicals. Maize Genetics Coop. Newsl. 49: 40-43.
- GENTILE, J.M. and PLEWA, M.J., 1975. A bioassay for screening host-mediated proximal mutagens in agriculture. Mutat. Res. 31: 317.
- GENTILE, J.M. and PLEWA, M.J., 1976. Plant activation of herbicides into mutagens-the mutagenicity of atrazine metabolites in maize kernels. Mutat. Res. 38: 390-391.
- GENTILE, J.M. and PLEWA, M.J., 1980a. The activation of promutagens by green plants. Environ. Mutagenesis 2: 312.

- GENTILE, J.M. and PLEWA, M.J., 1982. Plant dependant mutagen assays, in: R.A. Fleck and A. Hollaender (Eds.), Genetic Toxicology: An Agricultural Perspective, Plenum, New York, pp. 327-352.
- GENTILE, J.M. and PLEWA, M.J., 1983a. Metabolism of chemicals by cell free plant extracts. Environ. Mutagenesis 5: 373.
- GENTILE, J.M. and PLEWA, M.J., 1983b. The maize-microbe bioassay; A unique approach to environmental mutagenesis, in: A.R. Kobler, T.K. Wong, L.D. Grant, R.S. De Woskin and T.J. Hughes (Eds.), In vitro Toxicity Testing of Environmental Agent, Current and Future Possibilities, Part A: Survey of Test Systems, Plenum, New York, pp. 151-166.
- GENTILE, J.M. and PLEWA, M.J., 1988. The use of cell free systems in plant activation studies. Mutat. Res. 197: 173-182.
- GENTILE, J.M., WAGNER, E.D. and PLEWA, M.J., 1977. The detection of weak recombinogenic activities in the herbicides propachlor and alachlor using a plant-activation bioassay. Mutat. Res. 48: 113-116.
- GENTILE, J.M., OVERTON, L.K. and SCHUBERT, J., 1978. Inactivation of N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the Ames *Salmonella* / Microsome test. Naturwissenschaften 65, S, 659.
- GENTILE, J.M., GENTILE, G.J. and PLEWA, M.J., 1986. In vitro activation of chemicals by plants: a comparison of techniques. Mutat. Res. 164: 53-58.
- GENTILE, J.M., PLUYMERS, D. and PLEWA, M.J., 1986a. Promutagen activation as a function of growth curve dynamics in the plant cell/coincubation assay. Mutat. Res. 173: 181-185.
- GENTILE, J.M., GENTILE, G.J. and PLEWA, M.J., 1987a. Mutagenicity of selected aniline derivatives to *Salmonella* following plant activation and mammalian hepatic activation. Mutat. Res. 188: 185-196.

- GENTILE, J.M., GENTILE, G.J., TOWNSEND, S. and PLEWA, M.J., 1985. In vitro enhancement of the mutagenicity of 4-nitro-o-phenylenediamine by plant S-9. Environ. Mutagenesis 7: 73-85.
- GENTILE, J.M., HEYDENBURG, D., HERTEL, L. and PLEWA, M.J., 1987. Plant cells at different stages in their growth curve differentially activate promutagens. Mutat. Res. 191: 151-155.
- GENTILE, J.M., LIPPERT, M., JOHNSON, P. and SHAFER, T., 1990. Activation of chemical promutagens by *Selenastrum capricornutum* in the plant cell/microbe coincubation assay. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 44: 729-736.
- GENTILE, J.M., GENTILE, G.J., BULTMAN, J., SECHRIEST, R., WAGNER, E.D. and PLEWA, M.J., 1982. An evaluation of the genotoxic properties of insecticides following plant and animal activation. Mutat. Res. 101: 19-29.
- HARWOOD, M., 1987. Procédure d'ensemble de dépistage du potentiel génotoxique des eaux résiduaires en tenant compte des interactions phytoplanctoniques. Mémoire, INRS-EAU, Université du Québec, Québec, 109 p.
- HARWOOD, M., BLAISE, C. and COUTURE, P., 1989. Algal interactions with the genotoxic activity of selected chemicals and complex liquid samples. Aquatic Toxicology 14: 263-276.
- HASSETT, J.M., JENNETT, J.C. and SMITH, J.E., 1981. Microplate technique for determining accumulation of metals by algae. Appl. Environ. Microbiol. 41:1097-1106.
- HICKEY, C.W., BLAISE, C. and COSTAN, G., 1991. Microtesting appraisal of ATP and cell recovery toxicity end points after acute exposure of *Selenastrum capricornutum* to selected chemicals. Environ. Toxicol. and Water Quality, (in press).
- HIGASHI, K., 1988. Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. Mutat. Res. 197: 273-288.

- HIGASHI, K., IKEUCHI, K. and KARASAKI, Y., 1982. Use of metabolic activation systems of tulip bulbs in the Ames test for environmental mutagens. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 505-510.
- HIGASHI, K., NAKASHIMA, Y., KARASAKI, Y., FUKUNAGA, M. and MIZUGUCHI, Y., 1981. Activation of benzo(a)pyrene by microsomes of higher plant tissues and their mutagenicity. *Biochem. Int.* 2: 373-380.
- KENT, R.A., PAULI, B.D., TROTTER, D.M. et GAREAU, J., 1991. *Recommandations pour la qualité de l'eau au Canada: Métolachlore. Etude no 184, série scientifique, Direction générale des eaux intérieures, Direction de la qualité des eaux, Environnement Canada, Ottawa, 41 p.*
- KIRK, R.E., 1982. *Experimental design: procedures for the behavioral sciences, 2 ed., Brooks-Cole Publishing, Belmont, Cal., 911 p.*
- KLAASSEN, C.D., AMDUR, M.O. and DOULL, J., 1986. *Toxicology The Basic Science of Poisons, Macmillan Publishing Co., Toronto, 974 p.*
- LAMOUREUX, G.L. and FREAR, D.S., 1979. Pesticide metabolism in higher plants: In vitro enzyme studies, in: D.G. Paulson, D.S. Frear and E.P. Marks (Eds.), *Xenobiotic Metabolism: In Vitro Methods, ACS Symposium Series No. 97, Washington: American Chem. Soc., pp. 77-128.*
- LEGAULT, R., 1990. *Evaluation de deux tests de dépistage de génotoxocité, le SOS Chromotest et le Mutatox, par rapport au test d'Ames. Mémoire, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, 144p.*
- LENGA, R.E., 1985. *The Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data, Edition 1, Sigma-Aldrich Corporation, Milwaukee, Wisconsin, USA, 1999 p.*
- LOPRIENO, N., and ADLER, I.D., 1980. Cooperative programme of the EEC on short-term assays for mutagenicity, in: R. Montesano, H. Bartsch and L. Tomatis (Eds.), *Molecular and Cellular Aspects of Carcinogen Screening Tests, IARC Publ. no 27, Lyon, pp. 331-341.*

- LOPRIENO, N., BARALE, R., MARIANI, L., PRESCIUTTINI, S., ROSSI, A.M., SBRANA, I., ZACCARO, L., ABBONDANDOLO, A. and BONNATTI, S., 1980. Results of mutagenicity tests on the herbicide atrazine. *Mutat. Res.* 74: 250.
- MAMBER, S.W., OKASINSKI, W.G., PINTER, C.D. and TUNAC, J.B., 1986. The *Escherichia coli* K-12 SOS Chromotest spot test for simple, rapid detection of genotoxic agents. *Mutat. Res.* 171: 83-90.
- MENN, J.J., 1978. Comparative aspects of pesticide metabolism in plants and animals. *Environ. Health Perspect.* 27: 113-124.
- MUMMA, R.O. and HAMILTON, R.H., 1979. Xenobiotic metabolism in higher plants: in vitro tissue and cell culture techniques, in: D.V. Parke and R.L. Smith (Eds.), *Drug Metabolism: from Microbe to Man*, Taylor and Francis, London, pp. 35-76.
- OLIVIER Ph. and MARZIN, D., 1987. Study of genotoxic potential of 48 inorganic derivatives with the SOS Chromotest. *Mutat. Res.* 189: 263-269.
- ORGENICS LTD., 1986. The SOS Chromotest blue kit, Instructions for use. Orgenics Ltd., Document Location: SOS-II/sosbins.mss, Yavne 70650, Israël, 23 p.
- ORGENICS LTD., 1988. The SOS Chromotest blue kit, version 4.1, Instructions for use, Orgenics Ltd., Document Instruct/sosbON, Yavne 70650. Israël, 19 p.
- OTHA, T., NAKAMURA, N., MORIYA, M., SHIRASU, Y. and KADA, T., 1984. The SOS-function-inducing activity of chemical mutagens in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 131: 101-109.
- PANKKOVA, K., VELEMINSKY, J. and GICHNER, T., 1985. Metabolic activation of 7,12-dimethylbenzanthracene in the Salmonella assay using extracts from bulbs of *Tulipa gesneriana*, Proc. IV Int. Conf. on Environmental Mutagens, Stockholm, 4 , 298.

- PAULI, B.D., KENT, R.A. et WONG, M.P., 1991. Recommandations pour la qualité de l'eau au Canada: Cyanazine. Etude no 180, série scientifique, Direction générale des eaux intérieures, Direction de la qualité des eaux, Environnement Canada, Ottawa, 29 p.
- PLEWA, M.J. and GENTILE, J.M., 1975. A maize-microbe bioassay for the detection of proximal mutagenicity in agricultural chemicals. Maize Genetics Coop. Newsl. 49: 40-43.
- PLEWA, M.J. and GENTILE, J.M., 1976. The mutagenicity of atrazine: a maize-microbe bioassay. Mutat. Res. 38: 287-292.
- PLEWA, M.J. and GENTILE, J.M., 1982. The activation of chemical mutagens by green plants, in: A. Hollaender and F.J. de Serres (Eds.), Chemical Mutagens, Principles and Methods for their detection, vol. VII, Plenum, New York, pp. 401-420.
- PLEWA, M.J., WAGNER, E.D. and GENTILE, J.M., 1988. The plant cell/microbe coincubation assay for the analysis of plant-activated promutagens. Mutat. Res. 197: 207-219.
- PLEWA, M.J., WEAVER, D.L., BLAIR, L.C. and GENTILE, J.M., 1983. Activation of 2-aminofluorene by cultured plant cells. Science 219: 1427-1429.
- PLEWA, M.J., WAGNER, E.D., GENTILE, G.J. and GENTILE, J.M., 1984. An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. Mutat. Res. 136: 233-245.
- QUILLARDET, P. and HOFNUNG, M., 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. Mutat. Res. 147: 65-78.
- QUILLARDET, P., BELLECOMBE, C. and HOFNUNG, M., 1985b. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. Mutat. Res. 147: 79-95.
- RASQUINHA, I.A., WILDEMAN, A.G. and NAZAR, R.N., 1988. Studies on the use of plant extracts in assessing the effects of plant metabolism on the mutagenicity and toxicity of pesticides. Mutat. Res. 197: 261-272.

- SAUSER, K.R. and KLAINE, S.J., 1990. Activation of promutagens by a unicellular green alga. Plants for toxicity assessment, ASTM STP 1091, W. Wang, J.M. Gorsuch and W.R. Lower (Eds.), American Society for Testing Materials, Philadelphia, pp. 324-332.
- SCHOENY, R., CODY, T., RADIKE, M. and WARSHAWSKY, D., 1985. Mutagenicity of algal metabolites of Benzo(a)pyrene for *Salmonella typhimurium*. Environ. Mutagenesis 7: 839-855.
- SCHOENY, R., CODY, T., WARSHAWSKY, D.F. and RADIKE, M., 1988. Metabolism of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons by photosynthetic algal species. Mutat. Res. 197: 289-302.
- SCOTT, B.R., SPARROW, A.H., SCHWEIMMIE, S.S. and SCHAIER, L.A., 1978. Plant metabolic activation of 1,2-dibromoethane (EDB) to a mutagen of greater potency. Mutat. Res. 49: 203-212.
- SEARLE, C.E., HARNDEN, D.G., VERNITT, S. and GYDE, O.H.B., 1975. Carcinogenicity and mutagenicity tests of some hair colorants and constituents. Nature 255: 506-507.
- SHIMABUKURO, R.H. and WALSH, W.C., 1979. Xenobiotic metabolism in plants: in vitro tissue, organ and isolated cell techniques, in: D.V. Parke and R.L. Smith (Eds.), Drug metabolism: from Microbe to Man, Taylor and Francis, London, pp. 1-34.
- SHIRASU, Y., MORIYA, M., TEZUKA, H., TERAMOTO, S., OHTA, T. and INOUE, T., 1981. Mutagenicity screening studies on pesticides, in: T. Sugimura, S. Kondo and H. Takebe (Eds.), Environmental Mutagens and Carcinogens; Proceedings of the 3rd International Conference on Environmental Mutagens, Tokyo, pp. 331-335.
- SIMOES GONÇALVES, M.L.S., VILHENA, M.F.C. and ANTONIO SAMPAYO, M., 1988. Effect of nutrients, temperature and light on uptake of cadmium by *Selenastrum capricornutum* Printz. Wat. Res. 22 (11): 1429-1435.

- ST-LAURENT, D., BLAISE, C., MACQUARRIE, P., SCROGGINS, R. and TROTTIER, B., 1991. Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures. Environ. Toxicol. and Water Quality, (in press).
- THELLEN, C., BLAISE, C., ROY, Y. and HICKEY, C., 1989. Round Robin testing with *Selenastrum capricornutum* microplate toxicity assay. Hydrobiologia 188/189: 259-268.
- TROTTER, D.M., KENT, R.A. et WONG, M.P., 1990a. Recommandations sur la qualité de l'eau pour le piclorame au Canada. Etude no 178, série scientifique, Direction générale des eaux intérieures, Direction de la qualité des eaux, Environnement Canada, Ottawa, 70 p.
- TROTTER, D.M., BARIL, A., WONG, M.P. et KENT, R.A., 1990b. Recommandations sur la qualité de l'eau pour l'atrazine au Canada. Etude no 168, série scientifique, Direction générale des eaux intérieures, Direction de la qualité des eaux, Environnement Canada, Ottawa, 101 p.
- TRUHAUT, R., FERARD, J.F. and JOUANY, J.M., 1980. Cadmium IC50 determination of *Chlorella vulgaris* involving different parameters. Ecotoxicol. Environ. Safety, 4: 215-223.
- UNDERWOOD, A.J., 1981. Techniques of analysis of variance in experimental marine biology and ecology. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 19: 513-605.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1978. The *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay bottle test. Experimental Design, Application and Data Interpretation. Protocol EPA/600/9-78-018. Corvallis Environmental Research Lab., Office of Research and Development, Corvallis, Oregon, 126 p.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1985. Technical Support Document for Water Quality-based Control. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- VELEMINSKY, J., ROSICHAN, J.L., JURICEK, M., KLEINHOF, A., NILAN, R.A. and GICHNER, T., 1987. Interaction of the mutagenic metabolite of sodium azide synthesized *in vitro*, with DNA of barley embryos. Mutat. Res. 181:73-79.

- VIGERSTAD, T.J., THOMAS, R.D. and CHOPRA, C., 1988. SOS Chromotest- A comparative review, Bioresponse Ltd., Bethesda, Maryland, USA, pp. 1-30.
- von der HUDE, W., BEHM, C., GÜRTLER, R. and BASLER, A., 1988. Evaluation of the SOS Chromotest. *Mutat. Res.* 203: 81-94.
- VONK, J.W. and SIJPESTEIJN, A.K., 1977. Metabolism, in: R.W. Marsh (Ed.), *Systemic fungicides*, Longman, London, pp. 160-175.
- WAGNER, E.D., VERDIER, M.M. and PLEWA, M.J., 1990. The biochemical mechanisms of the plant activation of promutagenic aromatic amines. *Environ. Mol. Mut.* 15: 236-244.
- WANG, Y.Y., FLESSEL, C.P., CHANG, K., DIBARTOLOMEIS, M.J., SIMMONS, B., SINGER, H. and SUNS, S., 1987. Evaluation guidelines for preparing waste water samples for Ames testing. *Environ. Sc. Res.* 36: 67-87.
- WILDEMAN, A.G. and NAZAR, R.N., 1982. Significance of plant metabolism in the mutagenicity and toxicity of pesticides. *Can. J. Genet. Cytol.* 24: 437-449.
- WILLIAMSON, D.A., 1988. Hexazinone residues in surface and groundwater at two sites within Agassiz provincial forest, Manitoba, Canada. *Water Poll. Res. J. Canada*, 23 (3): 434-449.
- WINER, B.J., 1971. *Statistical principles in experimental design*, 2 ed., McGraw-Hill, New York, 907 p.
- XU, H.H. and SCHURR, K.M., 1990. Genotoxicity of 22 pesticides in microtitration SOS Chromotest. *Toxicity Assessment* 5: 1-14.
- YAMAZAKI, I., 1974. Peroxidase, in: O. Hayaish (Ed.), *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*, Academic Press, New York, pp. 535-558.
- Zar, J.H., 1984. *Biostatistical analysis*, 2 ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 718 p.