

RAPPORT SCIENTIFIQUE
ET TECHNIQUE

**ÉLABORATION ET ÉVALUATION
D'UNE MÉTHODOLOGIE POUR
ESTIMER LE POTENTIEL
GÉNOTOXIQUE DE SÉDIMENTS
CONTAMINÉS**

Rapport ST-168

Élaboration et évaluation d'une méthodologie pour estimer le potentiel génotoxique de sédiments contaminés

M. Bombardier, N. Bermingham, R. Legault, A. Fouquet et P. Turcotte
Section Écotoxicologie et chimie environnementale

COMMENTAIRES DES LECTEURS

Veillez adresser vos commentaires sur le contenu du présent rapport au Centre Saint-Laurent, Conservation de l'environnement, Environnement Canada – Région du Québec, 105, rue McGill, 7^e étage, Montréal (Québec), H2Y 2E7.

On devra citer la publication comme suit :

Bombardier, M., N. Bermingham, R. Legault, A. Fouquet et P. Turcotte (1998). *Élaboration et évaluation d'une méthodologie pour estimer le potentiel génotoxique de sédiments contaminés*. Environnement Canada - Région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent. Rapport scientifique et technique ST-168, 76 pages.

Remerciements

Sincères remerciements à Christine Girard et Manon Harwood du Centre Saint-Laurent (CSL) pour la réalisation des tests de génotoxicité, ainsi qu'à France Robert (CSL) pour la réalisation des étapes d'extraction, de concentration et de fractionnement des extraits. Nous tenons également à remercier Raymond Vezeau (CSL) pour ses commentaires judicieux et Monique Simond (CSL) pour la relecture de ce document. Les échantillons de sédiments de la baie des Anglais ainsi que les résultats des analyses physico-chimiques afférents à ces sédiments ont été gracieusement fournis par Daniel Cyr (Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli, Québec).

Résumé

Cette étude, entreprise au Centre Saint-Laurent (CSL) d'Environnement Canada, a porté sur l'élaboration d'une méthodologie de fractionnement couplée à l'évaluation génotoxicologique des fractions organiques de sédiments contaminés. Cette méthodologie implique a) l'extraction des contaminants organiques de la matrice sédimentaire à l'aide d'un solvant organique; b) la concentration de l'extrait par évaporation et sous jet d'azote; c) le passage de l'extrait à travers une colonne d'adsorption chromatographique afin d'obtenir des fractions réparties selon le poids moléculaire des solutés; et d) l'exécution d'un test microbien de génotoxicité sur les fractions résultant de la procédure d'extraction et de la chromatographie. L'application de cette méthodologie requiert une fraction organique susceptible de renfermer des substances anthropogéniques reconnues pour leurs propriétés génotoxiques, ainsi qu'un test de génotoxicité fiable, sensible et reconnu par la communauté scientifique. Trois fractions organiques de sédiments ont été recueillies : l'extrait brut ou non fractionné (F_0), la fraction contenant des macromolécules (> 800 uma, désignée F_1), et la fraction renfermant des molécules de poids intermédiaire (entre 250 et 800 uma, désignée F_2). Ces fractions ont été soumises à trois tests de génotoxicité, soit le SOS Chromotest, le Mutatox et le test de fluctuation. Bien que cette méthodologie n'ait pas encore été validée, la présente étude a démontré a) qu'elle permet d'isoler et de déceler la présence de substances pouvant endommager l'ADN d'organismes exposés; b) qu'elle élimine presque complètement les métaux présents dans la matrice sédimentaire de départ; c) que des trois tests examinés, le SOS Chromotest est le plus adéquat pour dépister la présence d'agents génotoxiques dans des extraits organiques de sédiments obtenus par fractionnement; et d) que la fraction F_2 est la plus appropriée pour la détection de génotoxiques potentiels associés à des sédiments. Des travaux sont actuellement en cours au CSL pour déterminer la variance associée à cette méthodologie.

Abstract

This study, undertaken at the St. Lawrence Center (SLC) of Environment Canada, dealt with the elaboration of a methodology for the genotoxicological evaluation of sediments. This methodology is based on a) the extraction of organic contaminants of concern from the sediment matrix using an organic solvent; b) the concentration of the extract through evaporation and a nitrogen stream; c) the passing of the extract through a chromatographic adsorption column to obtain fractions separated according to the molecular weight of the solutes; and d) the execution of a genotoxicity test on fractions resulting from the extraction procedure and chromatography. Application of this approach requires the use of a fraction of organic extract likely to contain anthropogenic substances known for their genotoxic properties, and a genotoxicity assay that is reliable, sensitive and recognized by the scientific community. Three organic fractions of sediment were collected : the raw or non-fractionated extract (F_0), the fraction containing macromolecules (> 800 uma, designated as F_1), and the fraction comprising molecules of intermediate-weight (between 250 and 800 uma, designated as F_2). These fractions were submitted to three genotoxicity assays — SOS Chromotest, Mutatox and the fluctuation test. Although this approach has not been validated yet, this study demonstrated that a) it has the capacity to isolate and detect substances which may potentially damage the DNA of exposed organisms; b) it removes almost all metals present in the original sediment matrix; c) of the three assays examined, the SOS Chromotest best detects the presence of genotoxic agents in the organic extracts of sediments obtained by fractionation; and d) the fraction F_2 is the most appropriate for the detection of potential sediment-associated genotoxicants. Further work is presently underway at the SLC to determine the variance associated with this methodology.

Table des matières

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	iv
ABSTRACT	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	ix
DÉFINITIONS	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
1 INTRODUCTION	1
1.1 JUSTIFICATION DES MÉTHODES, SOLVANTS ET MATÉRIEL EMPLOYÉS POUR LA PRÉPARATION DES EXTRAITS ORGANIQUES	5
1.2 PRINCIPES DES TESTS DE GÉNOTOXICITÉ SÉLECTIONNÉS	7
2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	8
2.1 SÉLECTION ET PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS DE SÉDIMENTS	8
2.1.1 Sédiments de la baie des Anglais	8
2.1.2 Sédiments de référence certifiés pour les BPC : HS-2	9
2.1.3 Sédiments de référence certifiés pour les HAP : HS-3	9
2.2 EXTRACTION ORGANIQUE, CONCENTRATION ET FRACTIONNEMENT	10
2.3 ANALYSE DES MÉTAUX LOURDS DANS LES EXTRAITS ORGANIQUES	14
2.4 BIOESSAIS	15
2.4.1 Préparation des extraits	15
2.4.2 Gammes de concentrations testées	15
2.4.3 SOS Chromotest	15
2.4.4 Mutatox	19
2.4.5 Test de fluctuation	21
2.4.6 Critères de comparaison des bioessais	23
3 RÉSULTATS ET DISCUSSION	24
3.1 TOXICITÉ, GÉNOTOXICITÉ ET MUTAGÉNICITÉ DES EXTRAITS	24

3.1.1	Blancs d'extraction	24
3.1.2	Comparaison des fractions des extraits organiques de sédiments	28
3.1.3	Influence du S9	31
3.1.4	Potentiel de discrimination des tests de génotoxicité	36
3.1.5	Évaluation comparative des tests de génotoxicité	38
3.2	CONSIDÉRATIONS SCIENTIFIQUES ET PRATIQUES	40
3.2.1	Reconnaissance par la communauté scientifique	41
3.2.2	Simplicité	41
3.2.3	Coûts	42
3.2.4	Autres considérations	42
3.3	PRÉSENCE DE MÉTAUX LOURDS DANS LES SÉDIMENTS ET LEURS DIVERS EXTRAITS ORGANIQUES	42
4	CONCLUSION	45
	RÉFÉRENCES	49
	ANNEXES	
1	Teneurs en contaminants organiques des sédiments à l'étude	57
2	Résidu insoluble dans le dichlorométhane et retenu sur les membranes de 0,45 µm	61

Liste des figures

1	Extraction, concentration et fractionnement des substances organiques de sédiments	12
2	Réponses génotoxiques mesurées chez <i>V. fischeri</i> à de faibles concentrations de DCM et de DMSO	28
3a	Génotoxicité de sédiments de référence certifiés (HS-2 et HS-3)	32
3b	Génotoxicité de sédiments prélevés à trois sites de la baie des Anglais (BA-1, BA-2 et BA-3)	34
4	Influence du S9 sur le potentiel génotoxique des extraits organiques	35
5	Distribution spatiale de la génotoxicité des extraits de sédiments de la baie des Anglais	37
6	Pourcentage de concordance entre les tests de génotoxicité	38

Liste des tableaux

1	Localisation des sites de la baie des Anglais	9
2	Liste des hydrocarbures aliphatiques polycycliques analysées et résultats de génotoxicité rapportés dans la littérature pour les organismes sélectionnés	10
3	Concentrations en extraits organiques non fractionnés (F ₀) utilisées pour le SOS Chromotest	16
4	Nombre de réplicats et gammes de concentrations utilisés selon le type de bioessai	16
5	Disposition des échantillons dans la microplaque pour le test Mutatox	20
6	Critères de détection utilisés pour la génotoxicité	22
7	Génotoxicité des fractions organiques des échantillons de sédiments	26
8	Réponses aux tests de génotoxicité selon la nature de la fraction organique et en fonction de la présence ou de l'absence de S9	29
9	Résultats d'analyse de l'hétérogénéité des courbes de concentration-réponse pour la fraction F2 des extraits de la baie des Anglais, sites BA-1 et BA-2	36
10	Évaluation comparative du SOS Chromotest, du Mutatox et du test de fluctuation en fonction de considérations scientifiques, techniques et pratiques	40
11	Contenu en métaux lourds des sédiments entiers et de leurs extraits organiques	43

Définitions

Absorbance - Valeur numérique caractérisant le pouvoir d'absorption de lumière d'une solution à une longueur d'onde définie. Dans ce document, les termes « absorbance » et « lecture colorimétrique » sont synonymes.

Blanc de dilution - Mesure de l'absorbance (couleur, turbidité) de l'échantillon, du diluant et du bouillon nutritif sans les bactéries.

Blanc d'extraction - Eau purifiée ayant subi toutes les étapes de la procédure d'extraction, de concentration et de fractionnement et dont la concentration du(des) paramètre(s) d'intérêt(s) est négligeable ou non mesurable. L'analyse du blanc permet de quantifier le niveau de contamination introduit dans le laboratoire et l'analyse des échantillons.

Chromatographie d'exclusion - Procédé d'analyse par percolation d'un fluide à travers une substance rigide et poreuse, sans tenir compte des processus physico-chimiques conduisant à la séparation des substances dans l'appareil. La chromatographie d'exclusion réfère au procédé dans lequel la phase stationnaire est formée de perles de substance poreuse comme le produit commercial appelé Bio-Beads[®] (Laboratoires Bio-Rad, Mississauga, Ontario), la phase mobile étant un liquide. Ce type de chromatographie permet une séparation des constituantes selon leur poids moléculaire.

Collecteur de fractions - Dispositif permettant de recueillir dans des récipients séparés des portions séquentielles de l'éluat d'une colonne chromatographique.

Concentration des extraits - Opération consistant à réduire le volume des extraits par distillation et sous jet d'azote de sorte que la quantité de substances dissoutes par unité de volume est augmentée.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO) - Il s'agit de la plus faible concentration qui provoque chez des organismes exposés des effets (généto)toxiques statistiquement et(ou) empiriquement significatifs.

Concentration-réponse - Relation entre les concentrations d'exposition et la réponse observée.

Concentration sans effet observé (CSEO) - Il s'agit de la plus forte concentration qui ne provoque chez des organismes exposés aucun effet (généto)toxique statistiquement et(ou) empiriquement significatif.

Configuration - Disposition ou emplacement des échantillons dans une microplaque.

Critère de détection - Valeur au-dessous ou au-dessus de laquelle un effet, un résultat ou une réponse est jugé statistiquement et(ou) empiriquement significatif.

Critères de significativité - Conditions ou ensemble de conditions qui doivent être rencontrées pour qu'un effet, un résultat ou une réponse soit jugé statistiquement et(ou) empiriquement significatif.

Digesté - Produit obtenu par l'opération de la digestion.

Digestion - Opération consistant à laisser un liquide en contact avec une substance à une température supérieure à la température ordinaire mais n'atteignant pas le point d'ébullition.

Eau déionisée - Eau qui a été purifiée de ses ions par circulation dans des colonnes de résine ou dans un appareil d'osmose inversée.

Échantillon enrichi - Échantillon dans lequel une quantité connue d'une ou plusieurs substances chimiques ont été ajoutées avant les étapes de préparation et d'analyse.

Éluant - Liquide ou mélange de liquides servant à pratiquer l'élution.

Éluat - Nom donné au liquide d'élution sortant d'une colonne et ayant dissous ou entraîné une ou plusieurs substances qui avaient été retenues par adsorption.

Élution - Destruction par un solvant liquide convenable d'un produit d'adsorption, réalisée sur une colonne d'adsorption chromatographique ou sur une colonne d'échangeur d'ions.

Étalonnage - Procédure permettant d'établir une échelle de mesure à l'aide d'un instrument.

Extraction - Opération qui a pour but d'entraîner des substances à l'aide d'un solvant volatil.

Extraits organiques - Expression qui désigne un groupe d'échantillons dont les substances lipophiles ont été extraites, concentrées et transférées dans un solvant approprié et non génotoxique.

F₀ - Extrait brut. Premier extrait obtenu de sédiments traités de façon à en retirer le contenu en substances organiques. Dans la présente étude, cet extrait a été soumis à un fractionnement ultérieur.

F₁ - Fraction organique de l'extrait brut (F₀) obtenue par chromatographie d'exclusion et contenant des substances de poids moléculaire supérieur à 800 uma (unités de masse atomique).

F₂ - Fraction organique de l'extrait brut (F₀) obtenue par chromatographie d'exclusion et contenant des substances de poids intermédiaire, c.-à-d. variant entre 250 et 800 uma.

Fractionnement - Procédé d'analyse basée sur une différence de propriété physique (solubilité, poids moléculaire, adsorption, etc.).

Génotoxique - qui agit comme une substance qui est toxique au génome, c.-à-d. qui altère la structure de l'ADN, induit sa réparation ou interrompt sa réplication. La mutagénèse, la cancérogénèse, l'induction de phage, l'inhibition de la division cellulaire et le bris de chromosomes représentent tous des attaques au génome et peuvent être désignés comme « effets génotoxiques ».

Inoculum - Milieu de culture renfermant des bactéries (par ex., *E. coli* PQ37) qui seront soumises à un test de génotoxicité.

Mutagène - Qui cause une modification stable et héréditaire dans le code génétique. La *mutagénicité* représente l'expression d'un effet mutagène.

Répétabilité - Mesure de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur un même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins l'un des éléments suivants est différent: le jour, l'analyste ou l'appareillage.

Réponse génotoxique - Absence ou présence d'une activité génotoxique. Dans le premier cas, la réponse est dite négative (-), et dans le second cas, la réponse est dite positive (+).

Sédiments de référence génotoxique - Sédiments contaminés reconnus pour causer des effets génotoxiques chez les organismes testés. Il servent à comparer la génotoxicité relative de sédiments inconnus, pour effectuer des comparaisons interlaboratoires et pour évaluer la reproductibilité (précision) du test dans le temps.

Sédiments de référence certifié (SRC) - Sédiments dont une propriété est certifiée par une procédure techniquement valide, délivré par un organisme autorisé et accompagné d'un certificat attestant de cette propriété. La mesure répétée d'un SRC ayant subi toutes les étapes de la méthode informe sur l'exactitude (biais) et la précision de la méthode d'analyse sans considérer l'effet de matrice de l'échantillon.

Solvant de transport - Solvant dans lequel sont totalement ou partiellement dissoutes les substances à soumettre aux bioessais.

Soxhlet - Fiole conique munie d'un réfrigérant sphérique, servant à l'extraction.

Spectrophotométrie - Méthode de dosage colorimétrique utilisant un spectrophotomètre à prisme ou à réseau.

Témoin négatif - Échantillon composé de DMSO (1 % v.v⁻¹) et de l'inoculum bactérien.

Témoin positif - Échantillon contenant une substance génotoxique de référence.

Temps de rétention - Temps exprimé en minutes entre l'introduction d'un échantillon dans le liquide vecteur (solvant) de la chromatographie et l'apparition de la concentration maximale des substances d'intérêt dans le détecteur.

Traité - Un échantillon ou une dilution de ce dernier, ou encore une concentration d'échantillon.

Liste des abréviations

A ₄₀₅	absorbance à 405 nm
A ₆₂₀	absorbance à 620 nm
2AA	2-aminoanthracène
ADN	acide désoxyribonucléique
AQ/CQ	assurance et contrôle de la qualité
B[a]P	benzo[a]pyrène
<i>β-gal</i>	β-galactosidase
BPC	biphényles polychlorés
°C	degré Celsius
cm	centimètre
CMEO	concentration minimale avec effet observé
CNRC	Centre national de recherche du Canada
CPG/SM	chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CSL	Centre Saint-Laurent
d	abréviation internationale (dies)
DCM	dichlorométhane
DMSO	diméthyle sulfoxyde
F ₀	extrait non fractionné, ou extrait brut
F ₁	fraction macromoléculaire (> 800 uma)
F ₂	fraction intermédiaire (250-800 uma)
FI	facteur d'induction
FICV	facteur d'induction corrigé pour la viabilité
FR	facteur de réduction
g	gramme
h	heure
HAP	hydrocarbures aromatiques polycycliques
HS-2	sédiments certifiés par le CNRC pour les BPC
HS-3	sédiments certifiés par le CNRC pour les HAP
IML	Institut Maurice Lamontagne
j	jour

kg	kilogramme
L	litre
ME	milieu d'essai Mutatox sans S9
MES9	milieu d'essai Mutatox avec S9
mg	milligramme
mg-Éq.sec.mL ⁻¹	mg-équivalents de sédiments secs par millilitre
min	minute
mL	millilitre
MNNG	N-méthyle-n'-nitro-n-nitrosoguanidine
N	nombre d'échantillons
4NQO	4-nitroquinoline-N-oxyde
%	pour cent
<i>Pal</i>	phosphatase alcaline
PNPP	p-nitrophényle phosphate
PON	procédure opératoire normalisée
SCG	sédiment de contrôle génotoxique
S9	fraction microsomiale de foie de rat
SEP	seuil d'effet ponctuel
SET	seuil d'effet temporel
SRC	matériaux de référence certifiés
µL	microlitre
µm	micromètre
uma	unité de masse atomique (g.mol ⁻¹)
URL	unité relative de lumière
v.v ⁻¹	volume sur volume
\bar{x}	moyenne arithmétique
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

1 Introduction

Pour identifier les sédiments contaminés, les agences responsables de la protection de l'environnement (par ex., U.S. EPA, 1977; Ontario Ministry of the Environment, 1988; Environnement Canada et ministère de l'Environnement du Québec, 1992) se basaient, à l'origine, exclusivement sur les critères de qualité (concentrations chimiques de contaminants). Bien qu'elle facilite la prise de décision, cette approche comporte des limitations importantes (Cairns et van der Schalie, 1980; Long et Chapman, 1985; Chapman, 1986; Chapman, 1990). Entre autres, elle est basée sur l'analyse de substances individuelles, substances qui peuvent produire des effets (géo)toxiques à des concentrations inférieures à la limite de détection des appareils analytiques, et ne fournit aucune information sur la biodisponibilité des contaminants. De plus, le respect des critères de qualité des sédiments ne garantit pas la protection des organismes du milieu. En effet, il est possible de mettre en évidence une dégradation de l'écosystème lorsque les teneurs en contaminants sont inférieures aux critères (par ex., Ellis *et al.*, 1982). Les inquiétudes grandissantes quant au degré de protection conféré par ces critères ont provoqué le développement d'approches complémentaires pour l'évaluation de la qualité des sédiments. Plusieurs d'entre elles font appel à des tests de toxicité, couplés à des analyses chimiques, ce qui permet d'identifier le type et la sévérité des impacts potentiels ainsi que la biodisponibilité des contaminants associés aux sédiments (IJC, 1988; Reynoldson et Zarull, 1993; Environnement Canada, 1993). Les bioessais offrent les principaux avantages suivants. Tout d'abord, ils constituent le seul type d'outils empiriques actuellement disponibles pour évaluer les interactions entre les contaminants dans les mélanges complexes, tels que souvent retrouvés dans les sédiments. Ensuite, leur utilisation n'est pas spécifique à un seul contaminant et ils ne requièrent pas, *a priori*, la connaissance de la nature et des mécanismes d'interaction entre les agents toxiques. Enfin, ils peuvent être réalisés relativement rapidement et sont peu coûteux comparativement à l'analyse chimique d'une large gamme de substances individuelles.

La problématique des effets chroniques résultant d'actions chimiques sur le matériel génétique des organismes est de plus en plus considérée dans les évaluations de qualité des

sédiments. Les essais de génotoxicité incluent entre autres les tests bactériens de mutagénicité, les tests mesurant les dommages à l'ADN de cultures cellulaires, ainsi que les méthodes cytogénétiques telles que les aberrations au niveau de l'anaphase et l'échange de chromatides soeurs. Ces tests sont habituellement réalisés sur des matrices liquides. Pour diverses raisons (c.-à-d. sensibilité, simplicité, résultats, paramètres d'effet, polyvalence et coût), seulement quelques-uns d'entre eux ont reçu une attention particulière. Le SOS Chromotest (*Escherichia coli* PQ37), le Mutatox¹ (*Vibrio fischeri* M169) et le test d'Ames (*Salmonella typhimurium* TA98 et TA100) sont parmi les plus utilisés en génotoxicologie environnementale.

Afin d'obtenir une matrice liquide compatible pour la réalisation des tests de génotoxicité, les sédiments sont *a priori* généralement soumis à des étapes d'extraction, de concentration et de fractionnement (ECF) à l'aide de solvant(s) organique(s). Les techniques de ECF permettent non seulement de solubiliser les contaminants organiques, mais également de réduire la complexité de la matrice sédimentaire à des fractions chimiquement distinctes. Ces fractions sont ensuite soumises aux bioessais et peuvent être analysées chimiquement pour identifier les substances génotoxiques en cause. Plusieurs approches décrites dans la littérature ont fait appel au couplage de techniques de ECF et d'un microbiotest pour estimer le potentiel génotoxique de sédiments (White *et al.*, 1998a; Balch *et al.*, 1995; Gagné *et al.*, 1995; Gagné et Blaise, 1995; Hoke *et al.*, 1994; Marvin *et al.*, 1994; Ho et Quinn, 1993; Fernández *et al.*, 1992; Grifoll *et al.*, 1992; Johnson, 1992a; Langevin *et al.*, 1992; Holoubek *et al.*, 1990; Grifoll *et al.*, 1990; Metcalfe *et al.*, 1990; West *et al.*, 1986). Cependant, aucune de ces approches n'a été validée en termes de variabilité des résultats obtenus. Leur convenance pour une utilisation à grande échelle n'a donc pas été démontrée. Dans un processus de validation, la variabilité inhérente à la méthode doit être évaluée et considérée lors de l'interprétation des résultats (ASTM, 1992). Cette variabilité peut résulter d'un certain nombre de facteurs (par ex., erreurs aléatoires inévitables, analyste, calibration de l'équipement, différences au niveau des échantillons testés, la température et la qualité du solvant). Par ailleurs, il y a un manque de contrôles, autant négatifs (c.-à-d. relativement exempts de contaminants) que positifs (par ex., sédiments certifiés du CNRC), pour relativiser le potentiel génotoxique de sédiments inconnus.

¹ Mutatox est une marque de commerce de la compagnie Azur Environmental (Carlsbad, CA).

La comparaison à des sédiments de référence est requise pour l'interprétation des données. L'analyse de ces extrêmes (c.-à-d. contrôles négatifs et contrôles positifs) permettrait entre autres de déterminer les conditions à partir desquelles les tests de dépistage de génotoxicité ne sont plus fiables (Cairns, 1988; Chapman, 1995) et d'évaluer l'efficacité des méthodes d'extraction pour les contaminants organiques de la matrice sédimentaire.

La présente étude se rapporte à certaines de ces lacunes. Le principal objectif est de proposer une méthodologie standardisée, simple et efficace pour estimer le potentiel génotoxique de sédiments à partir d'extraits organiques. La méthodologie proposée ne se veut pas innovatrice puisqu'elle est fondée sur des techniques déjà existantes. Elle favoriserait toutefois l'uniformité des évaluations génotoxicologiques de sédiments et pourrait être préconisée advenant qu'il faille procéder à l'évaluation du potentiel génotoxique de matériaux destinés au dragage avant leur dépôt en eau libre. La méthodologie pourrait également être considérée dans le calcul de l'indice SED-TOX (Bombardier *et al.*, 1998). L'indice SED-TOX intègre les résultats d'une batterie de tests réalisés sur différentes phases d'exposition (eau interstitielle, phase solide-humide, extrait organique et sédiments entiers) et permet de relativiser le potentiel (géo)toxique de sédiments en provenance d'une multitude de sites.

L'étude a été divisée en deux phases. Les travaux de la phase I, qui font l'objet du présent rapport, ont porté sur a) l'élaboration d'une procédure pour l'extraction et la concentration de substances organiques et l'isolation de fraction(s) génotoxique(s) de sédiments; b) la sélection d'un test de génotoxicité; et c) la sélection d'une fraction organique susceptible de renfermer davantage de substances génotoxiques. Pour ce faire, trois tests communément utilisés en génotoxicologie environnementale, soit le SOS Chromotest, le Mutatox et le test de fluctuation, ont été comparés quant à leur pouvoir de discrimination, leur sensibilité, leur concordance, et selon des critères scientifiques, techniques et pratiques. Trois fractions organiques ont également été évaluées pour leur potentiel génotoxique; il s'agit de l'extrait brut ou non fractionné (désigné F₀), de la fraction renfermant les macromolécules de poids moléculaire supérieur à 800 uma (désignée F₁), et de la fraction contenant des molécules de poids variant entre 250 et 800 uma (désignée F₂). Par ailleurs, le contenu en métaux lourds des extraits organiques de sédiments a été déterminé puisque des travaux antérieurs (Gagné *et al.*, 1998)

effectués au CSL ont révélé, à l'aide d'un biomarqueur d'exposition (métalothionéine), la présence de métaux lourds dans des extraits organiques de sédiments. La contribution des métaux à la génotoxicité des sédiments ou les interférences qu'ils pourraient avoir sur les réponses génotoxiques ne sont pas examinées dans la présente étude mais pourraient faire l'objet d'une évaluation plus poussée. La phase II, actuellement en cours, porte sur la validation de la procédure d'évaluation de la génotoxicité des sédiments ainsi que sur la sélection de sédiments de contrôle génotoxique (SCG) permettant de relativiser la génotoxicité de sédiments inconnus.

Les travaux de la phase I serviront à répondre à quatre questions spécifiques.

1. Est-ce que la procédure proposée pour l'extraction, la concentration et le fractionnement des substances organiques offre une matrice propice à l'exécution de tests bactériens de génotoxicité ?
2. Est-ce que cette procédure permet d'éliminer les métaux des échantillons qui seront soumis aux bioessais ?
3. Parmi les trois tests sélectionnés (SOS Chromotest, Mutatox et test de fluctuation), lequel devrait être favorisé dans une méthodologie normalisée d'évaluation de la génotoxicité d'extraits organiques de sédiments ?
4. Quelle fraction organique est la plus appropriée pour évaluer le potentiel génotoxique des sédiments, celle résultant de l'extraction (F_0) ou l'une de celles recueillies par chromatographie d'exclusion (F_1 et F_2) ?

La sélection du microbiotest sera basée sur les critères suivants : fiabilité et facilité d'interprétation des résultats; simplicité, rapidité d'exécution et économie; facilité d'obtention des organismes et minimisation des efforts requis pour le matériel biologique en termes d'élevage ou d'entretien; minimisation des volumes ou des poids d'échantillons requis; rapidité des réponses et sensibilité aux contaminants; rendement analytique élevé; reconnaissance par la communauté scientifique. Une comparaison du potentiel génotoxique des trois fractions organiques considérées permettra de déterminer laquelle est la plus appropriée dans le cadre d'une évaluation génotoxicologique de sédiments contaminés.

1.1 JUSTIFICATION DES MÉTHODES, SOLVANTS ET MATÉRIEL EMPLOYÉS POUR LA PRÉPARATION DES EXTRAITS ORGANIQUES

Tel que précisé précédemment, la méthodologie proposée pour extraire, concentrer et fractionner les extraits organiques de sédiments n'intègre pas de techniques innovatrices et ne constitue pas une nouvelle application des méthodes préconisées. Elle implique a) l'extraction en continu à l'aide d'un système Soxhlet et d'un solvant, le dichlorométhane (DCM); b) l'évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif et sous jet d'azote; et c) l'élution des substances organiques par chromatographie d'exclusion (filtration sur gel). Les extraits sont ensuite transférés dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO), puis soumis à des tests de génotoxicité.

Les avantages conférés par le type d'extraction proposé dans ce document sont les suivants: i) l'extraction se fait toujours avec du solvant renouvelé (c.-à-d. non contaminé); ii) l'extraction se fait au point d'ébullition du solvant, favorisant ainsi la dissolution des substances d'intérêt; iii) l'extraction peut se faire sur une longue période de temps et ce, avec un minimum de supervision. Le choix du DCM comme solvant se basait sur plusieurs facteurs. D'abord, le DCM est couramment employé pour l'extraction de substances organiques à partir de sédiments (Holoubek *et al.*, 1990; MacGregor *et al.*, 1994). En deuxième lieu, parmi tous les solvants disponibles, il constitue le meilleur compromis lorsque les substances à extraire sont variées et qu'aucun groupe spécifique de polluants, tels les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ou les biphényles polychlorés (BPC), n'est ciblé (U.S. EPA, 1986). Enfin, en raison de ses propriétés physico-chimiques, ce solvant laisse relativement moins de traces dans le résidu que d'autres solvants d'extraction lorsque l'on évapore l'extrait à sec. Toutefois, en raison des effets toxicologiques qu'il peut engendrer (DeMarini *et al.*, 1991; Jongen *et al.*, 1978), le DCM ne peut servir de véhicule dans les tests de génotoxicité. Après les étapes d'extraction, de concentration et de fractionnement, il faut donc le remplacer par un solvant plus compatible avec les bioessais. Le DMSO a été sélectionné à cette fin. Il est sans aucun doute le solvant le plus utilisé dans les recherches sur la génotoxicité des produits chimiques (Mersch-Sundermann *et al.*, 1992; Xu et Schurr, 1990; von der Hude *et al.*, 1988) et sur celles d'extraits organiques de mélanges complexes liquides et solides tels que des effluents industriels (Rao *et al.*, 1994), des eaux de surface (Filipic, 1995; Vargas *et al.*, 1995; Reifferscheid *et al.*, 1991), des sédiments (Jarvis *et al.*, 1996; La Rocca *et al.*, 1996; Marvin *et al.*, 1994; 1995; Fernandez *et al.*, 1992;

Johnson, 1992a; Langevin *et al.*, 1992; West *et al.*, 1986), des particules atmosphériques d'origine urbaine (Courtois *et al.*, 1992), des émissions de moteurs diesel (Kado *et al.*, 1996), des particules en suspension dans les eaux de surface et des effluents (White *et al.*, 1996; 1998a; Engwall *et al.*, 1996; Durant *et al.*, 1994; Grifoll *et al.*, 1992) et des tissus d'invertébrés et de poissons (White *et al.*, 1998b). Il est aussi reconnu comme étant non génotoxique envers *V. fischeri* M169 (Mutatox) (Arfsten *et al.*, 1994) et *E. coli* PQ37 (Quillardet *et al.*, 1985), et non mutagène pour *S. typhimurium* TA100 (Hakura *et al.*, 1993; DeMarini *et al.*, 1991). Cependant, il a été démontré qu'il peut induire ou inhiber l'activité génotoxique de certains composés chimiques (Maron *et al.*, 1981). Son utilisation peut donc comporter certains inconvénients. Pour parer à ces lacunes, la concentration maximale de DMSO dans les bains d'essai est maintenue à 1 % v.v⁻¹ pour tous les tests de génotoxicité.

Les lipides et autres composés de poids moléculaire élevé (par ex., acides humiques et fulviques, chlorophylle) peuvent interférer dans les tests de génotoxicité. Ils sont séparés des micropolluants (par ex., HAP et BPC) par chromatographie d'exclusion. La résine Bio-Beads[®] S-X3 (Laboratoires Bio-Rad, Mississauga, Ontario), composée de zéolites synthétiques et de polymères organiques, sert d'agent de séparation. La méthode utilisée est basée sur la procédure élaborée par l'Agence américaine de protection de l'environnement (U.S. EPA, 1986). Pour chacun des extraits bruts (F₀), l'éluat de la colonne d'exclusion sur gel est recueilli en trois fractions (F₁, F₂ et F₃). Toutefois, seules les fractions F₁ et F₂ sont conservées pour la réalisation des bioessais. La fraction F₁ renferme des colloïdes et des substances de poids moléculaire élevé, comme des acides humiques et fulviques, des lipides et des hydrocarbures lourds, alors que la fraction F₂ renferme entre autres des micropolluants tels que des HAP, des BPC, des pesticides et des substances phénoliques. La fraction F₃ peut également contenir des micropolluants d'intérêt (par ex., HAP de faible poids moléculaire tels l'acénaphène, l'acénaphthylène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène et des congénères de BPC ([BPC-1 à BPC-14]) mais renferme le soufre élémentaire (S₈) qui est hautement toxique pour les bactéries *Vibrio fischeri* (Pardos *et al.*, 1998; Svenson *et al.*, 1996; Jacobs *et al.*, 1992), *Salmonella typhimurium* (TA98 et TA100 [Abe et Urano, 1996]) et *Escherichia coli* PQ37 (Laboratoire du Centre Saint-Laurent, données non publiées). La fraction F₃ est donc rejetée pour permettre une

évaluation plus juste du potentiel génotoxique des contaminants organiques associés aux sédiments.

1.2 PRINCIPES DES TESTS DE GÉNOTOXICITÉ SÉLECTIONNÉS

Le SOS Chromotest est un test colorimétrique utilisé pour détecter les substances qui provoquent des lésions primaires à l'ADN d'*E. coli* PQ37 (Quillardet et Hofnung, 1985). Chez cette bactérie, le gène *lacZ* qui code pour la β -galactosidase (β -gal) et le gène *sulA* ont été fusionnés par manipulation génétique. Le gène *sulA* appartient au système *SOS* qui est un mécanisme de réparation de l'ADN dit « sujet à erreurs » (Walker, 1987; Devoret, 1992). Lorsqu'une substance génotoxique altère l'ADN bactérien, le gène *sulA* s'active et entraîne par ricochet la synthèse de la β -gal. La souche *E. coli* PQ37 porte également un gène constitutif (non réprimé) pour la phosphatase alcaline (*Pal*). Cette enzyme est utilisée comme un indicateur de la synthèse protéique totale, et son dosage permet *a)* de déterminer la toxicité des substances testées, et *b)* de normaliser les concentrations relatives de β -gal en fonction de la toxicité.

Une variété « sombre » d'une bactérie marine luminescente (*Vibrio fischeri*) représente la pierre angulaire du test Mutatox. Dans son état physiologique normal, le mutant sombre *V. fischeri* M169 émet très peu de lumière, de 10^5 à 10^6 fois moins que la souche sauvage (Bulich, 1992). Ce test mesure la génotoxicité via la capacité des contaminants de réactiver le système de régulation de la bactérie mais ne permet pas de distinguer la nature de l'agression génotoxique.

La souche *S. typhimurium* TA100 du test de fluctuation possède une mutation dans l'un des gènes de l'histidine (un acide aminé essentiel). Sous l'action de mutagènes ou de mutations inverses (en anglais, reverse mutations), les mutants auxotrophes (His^-) recouvrent leur capacité à synthétiser l'histidine et retrouvent leur état prototrophe (His^+) ou sauvage (Venitt *et al.*, 1984).

2 Matériel et méthodes

2.1 SÉLECTION ET PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS DE SÉDIMENTS

Cinq groupes d'échantillons ont été soumis aux bioessais; trois (dénommés BA-1, BA-2 et BA-3) étaient constitués de sédiments prélevés respectivement à trois sites de la baie des Anglais (Baie-Comeau, Québec) et deux étaient composés de sédiments de référence certifiés (SRC [HS-2, HS-3]) fournis par le Conseil national de recherches du Canada (CNRC, Ottawa, Ontario). Les sédiments HS-2 et HS-3 proviennent de zones portuaires de la Nouvelle-Écosse, soit le port de Cass (HS-2) et le port de Halifax (HS-3). Les SRC sont couramment utilisés comme standards pour la chimie analytique de sédiments marins.

2.1.1 Sédiments de la baie des Anglais

La baie des Anglais, située sur la rive nord de l'estuaire du Saint-Laurent, à quelques kilomètres à l'est de Baie-Comeau, a été reconnue comme une région d'intérêt en raison de la forte contamination de ses sédiments (IML, 1997). Des études antérieures ont rapporté des teneurs élevées en HAP, en BPC, en dioxines et furannes, ainsi qu'en métaux lourds (Bertrand *et al.*, 1986; Laliberté, 1991; Brochu *et al.*, 1995).

Trois sites localisés le long d'un transect linéaire et perpendiculaire à la rive ouest de la baie des Anglais (tableau 1) ont été sélectionnés en raison de leur caractérisation chimique (voir l'annexe 1) et de leur toxicité connues, ainsi que du gradient de contamination organique (HAP et BPC) qu'ils présentent : le site BA-1 est le plus contaminé; les teneurs en HAP et BPC aux sites BA-2 et BA-3 sont de 10 à 100 fois inférieures respectivement (Nagler *et al.*, 1998).

Le prélèvement des échantillons a été effectué à l'aide d'une benne de type Van Veen le 31 octobre et le 1^{er} novembre 1994. Ce type d'échantillonneur correspond à la recommandation d'Environnement Canada (1994) pour le prélèvement de gros volumes de sédiments en milieu marin côtier d'eaux profondes, à forts courants et à substrat plutôt fin. La profondeur de pénétration de la benne était de 0-10 cm.

Les sédiments ont été conservés dans des bouteilles en polyéthylène préalablement traitées (lavées à l'acide et rincées à l'hexane). Tous les échantillons ont été congelés à -20 °C jusqu'à leur utilisation en laboratoire.

Tableau 1
Localisation des sites de la baie des Anglais

Sites	Profondeur (m)	Longitude	Latitude
BA-1	34	49°15'05''	68°7'38''
BA-2	84	49°15'03''	68°6'41''
BA-3	101	49°14'95''	68°4'07''

2.1.2 Sédiments de référence certifiés pour les BPC - HS-2

Le HS-2 (mélange complexe de BPC) est un sédiment marin servant de standard pour la détermination des BPC. Sur la base d'un minimum de 32 extractions de sédiments, le standard du HS-2 est de $111,8 \pm 2,5$ µg BPC/kg (voir l'annexe 1). Cette valeur est basée sur l'analyse des 10 congénères suivants : BPC-101, BPC-138, BPC-151, BPC-153, BPC-170, BPC-180, BPC-194, BPC-196, BPC-199 et BPC-209.

2.1.3 Sédiments de référence certifiés pour les HAP - HS-3

Le HS-3 (mélange complexe de HAP) est un sédiment marin servant de standard pour la détermination des HAP. Les teneurs en HAP présentées à l'annexe 1 sont basées sur l'analyse de 22 à 40 sous-échantillons de sédiments chacun. Le standard défini pour le HS-3 est de 283,3 µg de HAP totaux/g sédiments secs, répartis en composés de poids moléculaire faible (126 µg/g) et de poids moléculaire relativement plus élevé (157,3 µg/g). Les 16 substances analysées sont présentées au tableau 2.

Tableau 2
Liste des hydrocarbures aliphatiques polycycliques analysés et résultats de génotoxicité
rapportés dans la littérature pour les organismes sélectionnés

Identification des HAP	Génotoxique * (+/-) **		
	Induction SOS (<i>E. coli</i>)	Mutagenicité (<i>S. typhimurium</i> TA100)	Luminescence (<i>V. fischeri</i>)
<u>Poids moléculaire faible</u>			
Naphtalène	-	-	?
Acénaphtylène	?	?	?
Acénaphthène	?	?	?
Fluorène	-	-	+
Phénanthrène	+	-	+
Anthracène	-	-	+
<u>Poids moléculaire élevé</u>			
Fluoranthène	+	+	+
Pyrène	-/+	-	+
Benzo[<i>a</i>]anthracène	+	+	+
Chrysène	+	+	+
Benzo[<i>a</i>]pyrène	+	+	+
Benzo[<i>b</i>]fluoranthène	+	+	?
Benzo[<i>k</i>]fluoranthène	?	?	-
Benzo[<i>g,h,i</i>]pérylène	+	+	+
Dibenzo[<i>a,h</i>]anthracène	+	+	?
Indéno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrène	+	?	?

* SOS et Ames TA100 : Quillardet et Hofnung, 1993; Mersh-Sundermann *et al.*, 1992. Mutatox : Klammer *et al.*, 1997.

** + : génotoxique; - : non génotoxique; ? : aucune information disponible.

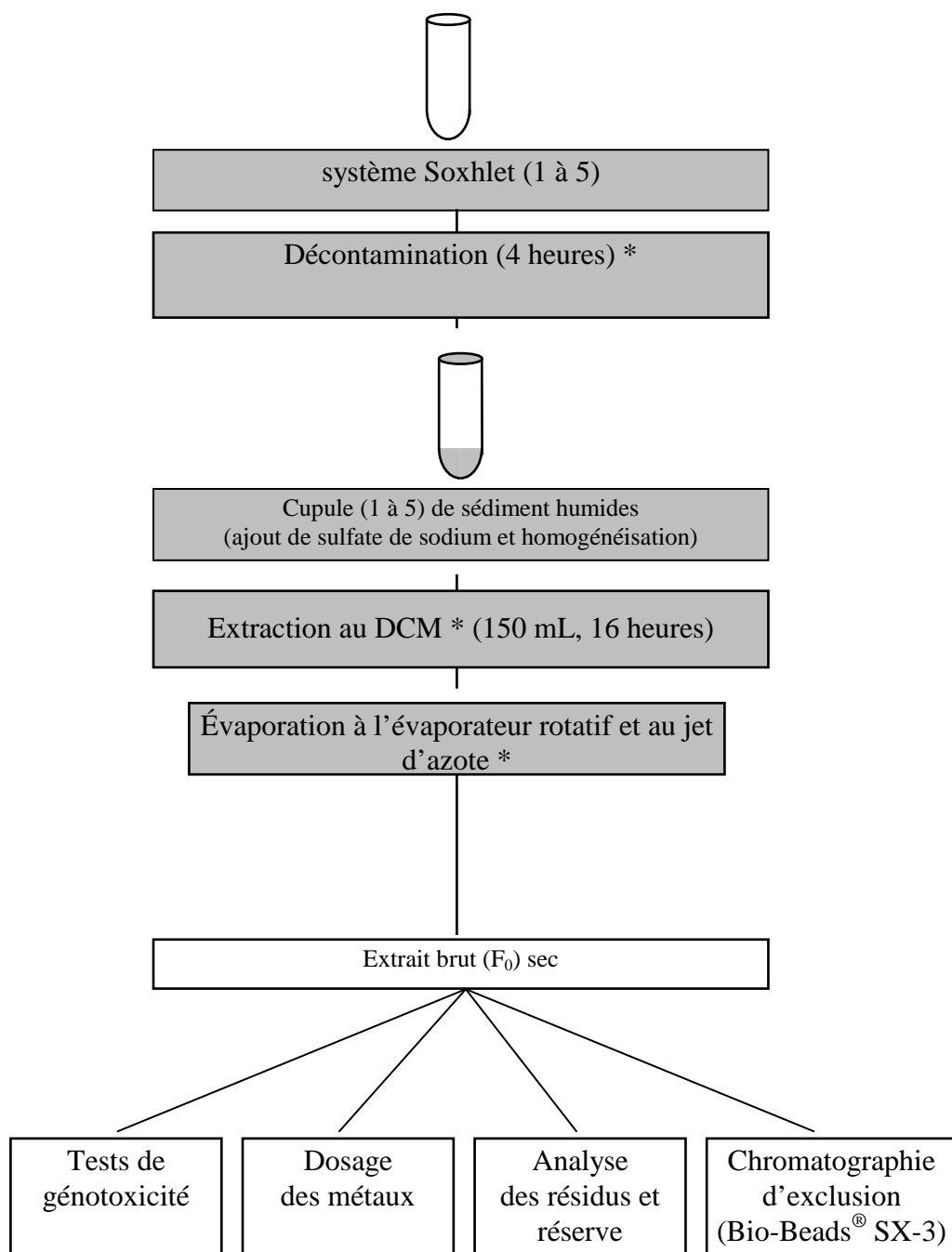
2.2 EXTRACTION ORGANIQUE, CONCENTRATION ET FRACTIONNEMENT

La procédure élaborée au laboratoire du CSL se résume en trois étapes principales i) extraction au Soxhlet; ii) concentration de l'extrait; et iii) fractionnement par filtration sur gel. Avant de procéder aux extractions avec le DCM, des mesures ont été prises afin de prévenir toute contamination possible des échantillons. Ainsi, le DCM a été validé et les réactifs et équipements ont été préparés et décontaminés, le tout selon la procédure d'opération normalisée (Environnement Canada, 1995; PON # LO-PRE-960321 : *Préparation des produits chimiques utilisés pour le traitement des échantillons au laboratoire de chimie organique*). La verrerie a été nettoyée à l'acétone et à l'hexane de qualité « Pesticides », puis séchée au four à 340°C pendant 2 heures et recouverte de papier aluminium préalablement rincé à l'acétone et à l'hexane et séché au four. De plus, une cupule de cellulose vide a été ajoutée au tube extracteur et le système

Soxhlet a été préalablement décontaminé avec 150 mL de DCM pendant 4 heures à un rythme de percolation de 3 à 4 cycles/heure. Finalement, tout le matériel et la verrerie utilisés avant, pendant et après l'extraction ont été rincés trois fois au DCM.

L'extraction des contaminants organiques des sédiments a été réalisée selon la procédure d'opération normalisée d'Environnement Canada (1995 [PON # LO-SOX-960321: *Extraction au Soxhlet des substances organiques dans les matières en suspension, les sédiments et les sols*]) illustrée à la figure 1. Des quantités de 30 g (sédiments lyophilisés HS-2 et HS-3) et de 50 g (sédiments humides de la baie des Anglais) ont été réparties en portions de 10 g dans les systèmes Soxhlet. De plus, des blancs d'extraction ont été utilisés dans le but de quantifier le niveau de contamination provenant du laboratoire lors de la manipulation des échantillons ou de leur analyse et afin de servir d'échantillons témoins dans les tests de génotoxicité. Les blancs d'extraction (constitués uniquement de DCM) ont été traités selon la même procédure que les sédiments. Un seul système Soxhlet a servi à leur extraction. Les systèmes Soxhlet étaient composés d'un ballon de verre à joint rodé de 250 mL à fond plat, d'un tube extracteur à siphon et d'un réfrigérant, et ils étaient montés en série. La température a été contrôlée par un chauffe-ballons à température réglable.

Chaque portion a été recouverte de 20 g de sulfate de sodium et homogénéisée de façon à ce que le sulfate de sodium absorbe l'eau interstitielle des sédiments. Le mélange sédiments-sulfate de sodium a été réparti dans les cupules décontaminées, puis recouvert d'un tampon de laine de verre. L'extraction au DCM (150 mL) a duré 16 heures, à un rythme de percolation de 3 à 4 cycles/heure. Les extraits de sédiments ont été concentrés sous évaporateur rotatif et récupérés dans une fiole jaugée de 50 mL. Le contenu de la fiole (qui correspondait à une concentration de sédiments de 1 g humide.mL⁻¹ pour les échantillons de la baie des Anglais et de 0,6 g sec.mL⁻¹ pour les échantillons de HS-2 et HS-3) a ensuite été réparti en portions destinées aux analyses, à savoir 5 mL pour la réalisation des bioessais, 10 mL pour le dosage des métaux, 30 mL pour la chromatographie d'exclusion et 5 mL pour l'analyse des résidus et la réserve.



* Procédure opératoire normalisée # LO-CON-960331. Environnement Canada, 1995.

Figure 1 Extraction, concentration et fractionnement des substances organiques de sédiments

La portion de 30 mL destinée à la filtration sur gel a été concentrée à 3 mL. Chaque mL d'extrait soumis à la chromatographie d'exclusion correspondait donc à 10 g de sédiments humides pour les sédiments de la baie des Anglais ou 6 g de sédiments secs pour les SRC. Du fait que dans certains cas, cette étape de concentration par un facteur de 10 a engendré un précipité, les extraits ont été filtrés sur une membrane de 0,45 μm (Millipore, Nepean, Ontario). Les membranes ont été conservées pour le dosage des métaux.

Le fractionnement des extraits bruts (F_0) a été effectué par chromatographie d'exclusion moléculaire selon la procédure d'opération normalisée (Environnement Canada, 1995 [PON # LO-CPG-970327: *fractionnement d'extraits de sédiments par chromatographie d'exclusion*]), une variation de la procédure établie par la U.S. EPA (1986). Un système de chromatographie liquide à haute performance a servi pour la chromatographie d'exclusion. La colonne (1 cm x 57 cm) a été préparée avec une résine de type *Bio-Beads*[®] S-X3.

Une quantité de 10 g de résine a été mélangée à 50 mL de DCM et mise de côté pendant approximativement 16 h pour la laisser gonfler. Cette résine a d'abord été transférée dans une colonne de 1 cm de diamètre interne et comprimée à 47 cm. La résine de la colonne a ensuite été traitée au DCM pendant 4 heures, à un débit de 1 mL/min, afin d'en enlever l'air qui y était emprisonné. L'extrait brut de sédiments (F_0) a été injecté sur la colonne par un échantillonneur automatique (1,0 mL destiné à la réalisation des bioessais et 0,5 mL réservé pour le dosage des métaux). L'éluat de la colonne de chromatographie d'exclusion était acheminé vers un détecteur UV/VIS ajusté à une longueur d'onde de 254 nm, et de là vers un collecteur de fractions, ce qui a permis d'identifier les fractions en fonction de leur volume d'élution.

Le collecteur de fractions a été programmé de manière à récupérer les deux premières fractions (F_1 et F_2) selon des plages de rétention délimitées de la façon suivante : F_1 (solutés de masse > 800 uma) entre 10 et 18 minutes; F_2 (solutés de masse 250-800 uma) entre 18 et 35 minutes. Le volume mort correspondait aux dix premières minutes de l'élution et l'éluat des minutes 35 à 50, à de « petites » molécules comme le soufre² (F_3 : < 250 g.mol⁻¹); ces fractions ont été rejetées. Une fois les fractions F_1 et F_2 récupérées, elles ont été concentrées sous jet d'azote jusqu'à un volume variant entre 10 et 20 mL tout en évitant la formation d'un précipité. La

² Soufre élémentaire, S₈.

correspondance entre le temps de rétention des composés d'intérêt et leur poids moléculaire a été validée en injectant à quelques reprises 1 mL d'un mélange d'un échantillon enrichi. Cet échantillon contenait une quantité connue de substances étalons, à savoir : 4 mg/L d'huile végétale; 0,20 mg/L de dioctylphtalate; 0,02 mg/L de pérylène; et 0,05 mg/L de soufre. Les fractions (F_0 , F_1 et F_2) ont été conservées dans le DCM, dans des tubes de verre entreposés à 4 °C jusqu'à l'exécution des tests de génotoxicité.

2.3 ANALYSE DES MÉTAUX LOURDS DANS LES EXTRAITS ORGANIQUES

Pour chacun des échantillons de sédiments, deux types de digesté ont été obtenus et analysés pour leur contenu en métaux : le premier a été obtenu à partir de concentrés d'extrait non fractionné (F_0) et des fractions d'extraits organiques (F_1 et F_2) et le second à partir de résidus solides captés par les membranes de 0,45 μ m. Dans le premier cas, la procédure de digestion a été la suivante. Dans un bécher de 50 mL contenant 1,0 mL d'acide nitrique concentré (à 68 p.cent) de qualité *ULTREX*, un volume de 5,0 mL d'extrait organique de sédiments a été ajouté. Le DCM a ensuite été évaporé en maintenant le bécher sur une plaque chauffante à 80 °C pendant 15 min. Une fois le DCM évaporé, un volume de 1,0 mL de peroxyde d'hydrogène (à 30 p.cent) de qualité *ULTREX* a été ajouté et l'échantillon a été chauffé de nouveau sur une plaque chauffante à 110 °C pendant 10 min en prenant soin d'éviter les effervescences. Le digesté a été transféré dans un ballon volumétrique de 10,0 mL et le volume complété avec de l'eau déminéralisée.

Quant aux résidus solides recueillis sur les membranes, un volume de 2 mL d'acide nitrique de qualité *ULTREX* a d'abord été déposé dans une fiole de 25 mL munie d'un filtre et mis de côté pendant 30 min à la température de la pièce. Un volume de 8 mL d'eau ultrapure (Millipore™, système SuperQ) a ensuite été ajouté, le tout a été mélangé manuellement pendant 2 min et mis de côté pendant 24 h à la température de la pièce. La fiole a été placée dans un bain à ultrasons pendant 45 min, après quoi son contenu a été transféré dans un bécher de 50 mL puis évaporé à sec sur une plaque chauffante. Par la suite, 1,0 mL d'acide nitrique de qualité *ULTREX* et 1,0 mL de peroxyde d'hydrogène (à 30 p.cent) également de qualité *ULTREX* ont été ajoutés. Le tout a été chauffé, transféré dans un ballon volumétrique de 10,0 mL et le volume complété

avec de l'eau déminéralisée. Les métaux lourds ont été quantifiés par spectrophotométrie d'émission atomique au plasma d'argon.

2.4 BIOESSAIS

2.4.1 Préparation des extraits

Les extraits bruts (F_0) conservés dans le DCM ($1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou $0,6\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, selon le cas) ont été évaporés à sec sous jet d'azote ultrapur selon des procédures mises au point au laboratoire du CSL (Environnement Canada, 1995 [PON # LO-CON-960331 : *Concentration d'extraits organiques*]). Un volume de 1 mL de DMSO (Fisher™) a été ajouté à chacun des tubes de verre contenant les résidus d'extraction. Afin de favoriser la dissolution des résidus, les tubes ont été agités au Vortex™ et placés dans un bain à ultrasons pendant 2 min (Branson™, modèle 8200). Afin de limiter les interférences possibles lors des lectures, seules les fractions solubles dans le DMSO ont été soumises aux tests de génotoxicité. À cette fin, les tubes ont été centrifugés pendant 10 min à 700 g (2000 rpm sur Varifuge™, modèle RF avec rotor 2190), puis les surnageants ont été transférés dans des microtubes en polypropylène de 1,5 mL à l'aide d'une pipette Pasteur. Les extraits ont été testés la journée même ou au plus tard 48 h après le changement de solvant. Dans ce dernier cas, les microtubes étaient entreposés à 4 °C jusqu'au moment des analyses.

2.4.2 Gammes de concentrations testées

Le tableau 3 présente les gammes de concentrations préparées pour chacun des extraits, alors que le tableau 4 indique le nombre d'échantillons et de réplicats pour chaque type d'extrait et chaque test de génotoxicité. Les procédures de dilution des extraits sont décrites pour chacun des tests de génotoxicité dans les sections qui suivent.

2.4.3 SOS Chromotest

Les essais SOS Chromotest ont été effectués en microplaques de 96 puits selon la procédure mise au point au laboratoire du CSL (Environnement Canada, 1997a). La souche *E coli* PQ37 a été obtenue de l'Institut Pasteur (Paris, France). Les extraits organiques ont été testés sans

et avec activation métabolique (S9). Le 2-aminoanthracène (2AA) avec S9 et le 4-nitroquinoline-N-oxyde (4NQO) sans S9 ont servi de substances génotoxiques de référence (témoins positifs). Les concentrations maximales testées étaient de 2,0 µg/mL pour le 2AA et de 0,1 µg/mL pour le 4NQO.

Tableau 3
Concentrations en extraits organiques non fractionnés (F₀) utilisées pour le SOS Chromotest

N° concentration	Volume d'extrait (µL.mL ⁻¹)	Concentration (mg-équivalents de sédiments secs par mL)				
		HS-2	HS-3	BA-1	BA-2	BA-3
1	10,00	61,0	59,0	79,0	87,0	95,0
2	5,00	30,5	29,5	39,5	43,5	47,5
3	2,50	15,3	14,8	19,8	21,8	23,8
4	1,25	7,6	7,4	9,9	10,9	11,9
5	0,63	3,8	3,7	4,9	5,4	5,9
6	0,31	1,9	1,8	2,5	2,7	3,0
7	0,16	1,0	0,9	1,2	1,4	1,5
8	0,08	0,5	0,5	0,6	0,7	0,7
9	0,04	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4

Tableau 4
Nombre de réplicats et gammes de concentrations utilisés selon le type de bioessai

Tests	Réplicats par échantillon	Concentration (n ^{os} *)
SOS Chromotest	4 (4) **	Avec et sans activation métabolique : 1 à 9 pour toutes les fractions (F ₀ , F ₁ et F ₂)
Mutatox	3 (5) **	Avec et sans activation métabolique : 1 à 5 pour toutes les F ₀ 1 à 7 pour toutes les F ₀ de HS-3 1 à 8 pour toutes les F ₀ des échantillons BA-1, BA-2 et BA-3
Test de fluctuation	1 (3) **	3 à 7 pour toutes les F ₀ sans activation métabolique 1 à 5 pour toutes les F ₀ avec activation métabolique 2 à 8 pour toutes les F ₀ avec et sans activation métabolique

* Voir tableau 3.

** Entre parenthèses, témoin négatif.

Une première dilution de 1:10 a été effectuée en ajoutant 100 µL d'extrait (conservé dans une solution de DMSO à 100% v.v⁻¹) à 900 µL d'eau déionisée ultrapure (Millipore™, système SuperQ). Une deuxième dilution de 1:5 a été préparée directement dans les microplaques en ajoutant 40 µL de la dilution 1:10 à 160 µL d'eau ultrapure. Des dilutions en série de 1:2 ont été préparées en transférant 100 µL de la dilution 1:5 dans les puits contenant 100 µL d'une solution de DMSO à 2% v.v⁻¹. Huit concentrations d'extrait supplémentaires ont été préparées en utilisant une solution de DMSO à 2 % v.v⁻¹ comme diluant. L'ajout de 100 µL d'inoculum bactérien (avec et sans S9) a constitué un facteur de dilution supplémentaire de 50 p.cent et a abaissé la concentration de DMSO dans les puits à 1 % v.v⁻¹. Le volume final dans chaque puit était de 200 µL. Les témoins négatifs ont été ajustés à la même concentration de DMSO que les traités (1 % v.v⁻¹).

Une culture en phase logarithmique de croissance a servi à préparer les inoculums bactériens avec et sans S9. L'exposition des bactéries et les prises de données ont été effectuées comme suit : les bactéries ont d'abord été exposées aux extraits pour une durée de 2 h à 37 °C; les surnageants ont été éliminés par centrifugation et décantation afin de réduire les possibilités d'interférences au niveau des réactions enzymes-substrats et des lectures colorimétriques; les bactéries ont ensuite été resuspendues dans un tampon contenant un agent lysant et le substrat approprié à chacune des deux enzymes (*Pal* et *β-gal*); puis les microplaques ont été réincubées à 37 °C pour permettre le développement de la couleur. Les absorbances ont été lues à 405 nm (A_{405}) pour la *Pal* et à 620 nm (A_{620}) pour la *β-gal* avec un spectrophotomètre (Multiskan™, modèle MCC340) spécialement conçu pour la lecture des microplaques.

Les résultats ont été exprimés et interprétés selon les directives qui apparaissent dans la méthode d'Environnement Canada (1997a), dont nous donnons un bref aperçu. À noter que les valeurs d'absorbance utilisées, c'est-à-dire les A_{405} et les A_{620} , ont été corrigées pour la couleur associée aux extraits.

Pour le paramètre de toxicité, les concentrations relatives de *Pal* ont été exprimées sous forme de rapports appelés facteurs de réduction (FR) :

$$FR = \frac{\bar{\chi}_{(n=4)} A_{405} \text{ du traité}}{\bar{\chi}_{(n=4)} A_{405} \text{ du témoin négatif}}, \text{ où } \bar{x} = \text{moyenne}$$

La plus petite concentration d'extrait ayant montré un FR égal ou plus petit (\leq) que la plus petite des valeurs entre le seuil d'effet ponctuel (SEP) et le seuil d'effet temporel (SET = 0,90) a été considérée comme la concentration minimale avec effet observé (CMEO). Pour la toxicité, le SEP correspond à la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % des lectures A_{405} du témoin négatif calculé la journée même de l'essai, alors que le SET représente la moyenne historique arrondie des SEP. L'utilisation de deux limites de détection (SEP et SET) fait en sorte qu'un effet toxique ne peut être considéré significatif que si une baisse d'au moins 10 p.cent de l'activité de la *Pal* se manifeste.

Pour la génotoxicité, les concentrations relatives de β -gal ont également été exprimées sous forme de rapports. Il s'agit des facteurs d'induction (FI) et des facteurs d'induction corrigés pour la viabilité (FICV) :

$$FI = \frac{\bar{\chi}_{(n=4)} A_{620} \text{ du traité}}{\chi_{(n=4)} A_{620} \text{ du témoin négatif}}, \text{ où } \bar{x} = \text{moyenne}$$

$$FICV = \frac{FI}{FR}$$

La plus petite concentration d'extrait ayant exhibé un FICV égal ou plus grand (\geq) que la plus grande des valeurs entre le seuil d'effet ponctuel (SEP) et le seuil d'effet temporel (SET = 1,20) a été considérée comme la CMEO. Pour la génotoxicité, le SEP correspond à la limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95 p.cent des lectures A_{405} du témoin négatif calculé la journée même de l'essai, alors que le SET représente la moyenne historique des SEP à laquelle on ajoute un facteur de sécurité. Ici, l'utilisation de deux limites de détection (SEP et SET) fait en sorte qu'un effet génotoxique ne peut être considéré significatif que si une augmentation d'au moins 20 p.cent de l'activité de la β -gal survient. La réponse génotoxique a toutefois été considérée équivoque lorsqu'un FICV $\geq 1,20$ a été observé de façon aléatoire, c.-à-d. en l'absence de relation concentration-réponse monotone.

2.4.4 Mutatox

La trousse commerciale utilisée pour le Mutatox comprenait a) le réactif bactérien lyophilisé, soit *V. fischeri* M169; b) deux milieux d'essai (ME) déshydratés, dont l'un comprend un mélange d'activation pour le dépistage des agents progénotoxiques; et, c) une solution de reconstitution³. Les essais Mutatox ont été réalisés selon les directives générales de la compagnie Azur Environmental. Ce protocole a cependant été modifié de façon à le réaliser en microplaques de 96 puits (Environnement Canada, 1998) plutôt que dans des tubes de verres. Les tests ont été initiés dans des microplaques transparentes afin de pouvoir mesurer la densité cellulaire à 600 nm et ainsi déterminer la toxicité des extraits. Le nombre de concentrations testées pour le Mutatox a varié entre cinq et huit (tableau 4) mais, dans tous les cas, la plus forte concentration représentait une dilution de 1:100 de l'extrait.

Une brève description de ce protocole modifié est présentée ici. En vue de la préparation des microplaques, 15 mL de solution de reconstitution ont été ajoutés à chacune des bouteilles de ME, puis les milieux d'essai ont été combinés dans un bécher de plastique de 50 mL. Des volumes de 2,5 mL du milieu d'essai ont été répartis dans 4 tubes de verre préalablement identifiés. Après avoir réservé un volume de ME pour les témoins négatifs et positifs ainsi que pour les blancs de dilution, le volume résiduel de ME a été ajusté à une concentration de 1 % v.v⁻¹ de DMSO. Des volumes de 225 µL du ME à 1 % v.v⁻¹ DMSO ont été ajoutés dans les puits destinés à recevoir les dilutions en série. Des volumes de 25 µL de chacun des extraits à tester ont été ajoutés aux tubes afin d'obtenir une dilution de 1:100.

Une fois les dilutions préparées et les échantillons déposés dans les puits des microplaques, le réactif bactérien a été reconstitué et ajouté à tous les puits, excepté ceux renfermant les blancs de dilution. Le tableau 5 indique l'emplacement ou la disposition des divers échantillons, les volumes de réactifs déposés dans les différents puits et le nombre de réplicats par échantillon. Des témoins positifs, soit le 2AA (5 µg/mL) et le N-méthyle-n'-nitro-n-nitrosoguanidine (MNNG à 0,1 µg/mL), ont servi à vérifier la sensibilité des réponses des réactifs bactériens respectivement avec et sans S9.

³ Solution saline utilisée pour reconstituer le réactif bactérien.

Tableau 5
Disposition * des échantillons dans la microplaque pour le test Mutatox

Puits (n ^{os})	Échantillons **
A1 - E1	Témoins négatifs (225 µL de ME + 10 µL de réactif bactérien)
A2 - C2	Témoins de dilution (225 µL de ME + 10 µL de solution de reconstitution)
A3 - H5	Dilutions de l'échantillon n° 1 (225 µL de dilution dans du ME + 10 µL de réactif bactérien)
A6 - H6	Témoins de dilution de l'échantillon n° 1 (225 µL de dilution dans du ME + 10 µL de solution de reconstitution)
A7 - H9	Dilutions de l'échantillon n° 2 (225 µL de dilution dans du ME + 10 µL de réactif bactérien)
A10 - H10	Témoins de dilution de l'échantillon n° 2 (225 µL de dilution dans du ME + 10 µL de solution de reconstitution)
A12 - C12	Témoins positifs dans 225 µL de ME + 10 µL de réactif bactérien

* La même configuration a été adoptée pour les essais avec et sans S9.

** Deux échantillons (désignés n°1 et n° 2) peuvent être analysés simultanément.

Après ces préparatifs, le test proprement dit a été réalisé de la façon suivante. Après l'ajout du réactif bactérien, les microplaques transparentes ont été incubées pendant 20 h à 27 °C (les microplaques avec S9 ont préalablement été incubées pendant 45 min à 35 °C). Pour éviter l'évaporation et la possibilité de contamination durant l'incubation, les puits ont été scellés avec des languettes de bouchons pour microtubes. Une fois l'incubation terminée, les absorbances ont été mesurées à 600 nm (A_{600}) avec un spectrophotomètre (Multiskan™, modèle MCC340). Afin de mesurer la luminescence, les échantillons ont été transférés dans des microplaques opaques et blanches (Falcon™), en respectant la même disposition que pour les microplaques transparentes. Un photomètre conçu pour la lecture des microplaques (Dynatech™, modèle ML1000) a été utilisé. La résolution de l'appareil a été réglée au plus bas niveau et la température de la chambre de lecture à 30 °C. Un délai de 3 min a été accordé avant la lecture des unités relatives de lumière (URL). Les résultats de toxicité et de génotoxicité ont été interprétés comme suit.

Pour la toxicité, les A_{600} ont été corrigées en fonction de l'intensité de la couleur des extraits. La baisse de densité cellulaire, qui correspond à la manifestation d'effets toxiques, a été exprimée sous forme de facteurs de réduction (FR) :

$$FR = \frac{\text{médiane}_{(n=3)} A_{600} \text{ du traité}}{\text{médiane}_{(n=5)} A_{600} \text{ du témoin négatif}}$$

Le critère de détection a été arbitrairement fixé à 0,75, ce qui correspond à une baisse de 25 % de la densité cellulaire. Ainsi, la plus petite concentration d'extrait ayant résulté en un $FR \leq 0,75$ a été rapportée comme étant la CMEO.

Pour la génotoxicité, l'activité de luminescence, dont la mesure est exprimée en unités relatives de lumière (URL), a été convertie en facteur d'induction (FI) :

$$FI = \frac{\text{médiane}_{(n=3)} \text{ URL du traité}}{\text{médiane}_{(n=5)} \text{ URL du témoin négatif}}$$

Le critère de détection a été fixé à deux fois la médiane du témoin négatif ou à une valeur FI de 2,0. Par conséquent, la plus petite concentration d'extrait ayant produit une valeur $FI \geq 2,0$ a été rapportée comme étant la CMEO. La réponse génotoxique a été considérée équivoque lorsqu'un $FI \geq 2,0$ a été observé de façon aléatoire, c.-à-d. en l'absence de relation concentration-réponse monotone alors qu'aucune toxicité n'était notée.

2.4.5 Test de fluctuation

Le test de fluctuation a été réalisé selon la méthode de Hubbard *et al.* (1984) adaptée au laboratoire du CSL (Environnement Canada, 1997b). Le milieu d'essai avec et sans activation métabolique a été réparti en portions de 19,8 mL dans des tubes coniques de 50 mL. À ces tubes ont été ajoutés 200 μL d'extrait et 20 μL d'une culture de TA100 reconstituée durant la nuit. Pour chaque tube, des portions de 200 μL du mélange ont été transférées dans des microplaques de 96 puits. Les microplaques ont été scellées dans des sacs de plastique puis incubées 5 jours à 37 °C. Au terme de la période d'incubation, les puits positifs, c'est-à-dire jaunes, partiellement jaunes ou turbides, ont été comptabilisés. Pour vérifier la sensibilité de la souche TA100, deux substances mutagènes de référence ont été testées à chaque essai, soit le 4NQO (0,005 $\mu\text{g/mL}$) et le 2AA (0,5 $\mu\text{g/mL}$). Trois microplaques ont été préparées pour les témoins négatifs (et positifs) alors que seulement une microplaque l'a été pour les échantillons d'extraits. Une microplaque ne renfermant que le milieu d'essai (c.-à-d. sans bactéries) a également été préparée à chaque essai pour vérifier la stérilité des différents réactifs composant le milieu d'essai.

Des échantillons de différentes concentrations ont été testées selon le type d'extrait (F₀, F₁ ou F₂) et selon le milieu d'essai (avec et sans activation métabolique). Des dilutions en série ont été effectuées avec du DMSO dans de petits tubes coniques de 1,5 mL. À cette fin, 500 µL d'extrait ont été transférés dans 500 µL de DMSO et cette opération a été répétée de tube en tube. Des volumes de 200 µL de chacun des extraits ou de chacune des dilutions ont été transférés dans 19,8 mL de milieu d'essai, ce qui représentait une dilution de 1:100.

Le critère de détection a été fixé à une valeur correspondant à une réduction de 50 p.cent du nombre de puits positifs (moyenne de trois microplaques) dans les témoins négatifs. Ainsi, la plus petite concentration d'extrait dont le nombre de puits positifs était égal ou plus petit que 0,5 fois celui du témoin négatif a été rapportée comme la CMEO. Une réponse a été qualifiée de positive (+), c.-à-d. génotoxique, lorsqu'une concentration d'un extrait a produit un résultat égal ou plus grand que le critère de détection du test (tableau 6). La génotoxicité ne doit toutefois pas apparaître de façon aléatoire, soit à une plus faible dilution alors qu'aucune toxicité ni génotoxicité n'est observée aux plus fortes concentrations testées, sinon, la réponse est considérée équivoque. En conservant la même approche, une réponse a été considérée négative lorsque toutes les concentrations testées pour un extrait ont produit des résultats inférieurs aux critères de détection présentés au tableau 6, et cela même si dans certains cas la toxicité a pu masquer la génotoxicité.

Tableau 6
Critères de détection utilisés pour la génotoxicité

Test	Critère de détection
SOS Chromotest	La valeur la plus élevée entre le SEP et le SET, ce qui correspond à une augmentation d'au moins 20 p.cent de l'activité de la β -gal ou à un FICV $\geq 1,20^*$.
Mutatox™	Une augmentation de 100 p.cent des URL ou un FI $\geq 2,0^{**}$.
Test de fluctuation	Un nombre de puits positifs égal ou plus grand que la valeur critique de la table de Gilbert (1980).

* Voir section 2.4.3.

** Voir section 2.4.4.

2.4.6 Critères de comparaison des bioessais

Les fractions d'extraits et les tests de génotoxicité ont été comparés à partir des critères suivants : *a)* pouvoir de discrimination, *b)* sensibilité, *c)* concordance, et *d)* considérations scientifiques, techniques et pratiques. Le pouvoir de discrimination est défini comme étant la capacité à distinguer les niveaux de contamination des échantillons de sédiments. Cette capacité a été évaluée en comparant les réponses génotoxiques mesurées aux concentrations de HAP totaux, retrouvées dans les sédiments. Le choix des HAP se justifie comme suit : i) mis à part l'échantillon HS-2, les teneurs en HAP des sédiments à l'étude sont connues, ii) les HAP sont retrouvés à divers degrés dans les sédiments examinés, et iii) certains HAP sont reconnus pour leur potentiel génotoxique.

En revanche, la faculté de déceler une plus large gamme de contaminants ou encore à dépister de faibles concentrations de contaminants témoigne de la sensibilité. La sensibilité des fractions et des tests de génotoxicité a été évaluée en comparant le nombre de réponses positives (génotoxiques) générées par chacun d'eux.

Le critère de concordance a été évalué en examinant le degré d'accord entre les réponses positives et négatives qu'ont produit chacune des fractions et chacun des tests. Cet exercice permet d'évaluer de manière indirecte la redondance entre les diverses fractions et les tests de génotoxicité.

Enfin, les facteurs suivants ont servi à juger de la simplicité : le niveau de complexité des procédures, le temps requis pour réaliser un test et obtenir une réponse, ainsi que la quantité de matériel et de réactifs biologiques et chimiques devant être préparés pour effectuer un test. Les coûts associés à la réalisation des tests de génotoxicité ont été déterminés sur la base d'un échantillon et pour un lot optimal d'échantillons, c'est-à-dire le nombre d'échantillons pouvant être analysée dans une journée normale de travail (8 h). Ces coûts comprennent le matériel et la main-d'œuvre mais excluent la préparation des extraits. Les investissements en capital (achat d'appareils et d'instruments) nécessaires à la réalisation de chacun des tests de génotoxicité selon les protocoles adoptés dans cette étude ont aussi été déterminés pour les organisations éventuellement intéressées par leur utilisation. À cette fin, les principaux avantages et inconvénients de ces tests seront discutés plus amplement dans le chapitre qui suit.

3 Résultats et discussion

3.1 TOXICITÉ, GÉNOTOXICITÉ ET MUTAGÉNICITÉ DES EXTRAITS

Trois fractions organiques (F₀, F₁ et F₂) ont été préparées pour les deux blancs d'extraction et chacun des cinq échantillons de sédiments, totalisant 21 extraits. Chaque extrait a été analysé avec ou sans S9, à l'aide du SOS Chromotest, du Mutatox et du test de fluctuation, générant un total de 126 courbes de concentration-réponse. Afin d'alléger le tableau 7, seules les données brutes des fractions F₀ et F₂ sont présentées.

3.1.1 Blancs d'extraction

Les blancs d'extraction n'ont causé aucune réponse génotoxique chez *E. coli* PQ37 ni chez la souche T100 de *S. typhimurium*, mais *V. fischeri* M169 a indiqué la présence de mutagènes dans ces deux échantillons (données non présentées). Dans les deux cas, les niveaux de bioluminescence étaient relativement élevés (jusqu'à 32 fois ceux des témoins). Il n'est pas possible d'identifier la cause exacte de ces effets étant donné qu'aucune analyse chimique n'a été réalisée sur les extraits. Deux explications sont néanmoins proposées : a) le Mutatox est sensible au DMSO, même à des concentrations aussi faibles que 1 % v.v⁻¹; ou b) l'évaporation sous jet d'azote n'a pas complètement éliminé le DCM dans les échantillons et le Mutatox réagit positivement à de très faibles concentrations de DCM. Ces hypothèses ont été testées comme suit. Le Mutatox a été réalisé sur une série de dilutions de DCM dans le DMSO (0,1-1,1 µL.mL⁻¹) et de DMSO (0,1-1,0 % v.v⁻¹). Les résultats sont présentés à la figure 2. Des inductions d'activité luminescente supérieures à celles des témoins (FI ≥ 2) ont été mesurées avec le DCM en présence d'activation métabolique, alors qu'aucune génotoxicité n'a été observée avant activation. Le phénomène inverse a été noté avec le DMSO. Ces résultats suggèrent que le Mutatox est trop sensible pour permettre une évaluation adéquate de la génotoxicité des extraits de sédiments, bien que selon la littérature, le DMSO n'est pas reconnu génotoxique pour la bactérie *V. fischeri* M169 (Arfsten *et al.*, 1994). Le DCM est reconnu comme étant mutagène pour *S. typhimurium* (Jongen

et al., 1978) mais aucune information n'existe sur son potentiel génotoxique chez *V. fischeri* M169.

Tableau 7
Génotoxicité des fractions organiques des échantillons de sédiments

Échantillon	Concentration	SOS Chromotest (FICV)				Mutatox (FI)				Test de fluctuation (Nombre de puits positifs)			
		- S9		+ S9		- S9		+ S9		- S9		+ S9	
		F ₀	F ₂	F ₀	F ₂	F ₀	F ₂	F ₀	F ₂	F ₀	F ₂	F ₀	F ₂
HS-3 (HAP totaux = 282,8 µg.g ⁻¹) ^a													
	0,2	1,12	0,91	1,05	1,33*	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	0,5	1,14	0,94	0,99	1,49*	NT	NT	NT	NT	NT	6	NT	23*
	0,9	1,16	1,07	0,97	1,78*	NT	5,7*	NT	1,9	13	12	NT	30*
	1,8	1,14	1,22*	0,98	1,85*	NT	74,8*	NT	1,3	7	10	NT	25*
	3,7	1,13	1,56*	1,05	1,86*	0,9	1,3	2,0*	1,3	4	1	36*	36*
	7,4	1,15	2,05*	1,02	1,91*	0,6	—	1,1	8,1*	5	—	28*	27*
	14,8	1,14	2,86*	1,13	1,94*	4,4*	—	0,2	0,1	3	—	14	17*
	29,5	1,12	3,46*	1,24*	2,04*	27,2*	—	0,5	—	NT	—	13	11
	59,0	1,18	4,20*	1,29*	1,48*	0,2	—	—	—	NT	NT	9	NT
BA-1 (HAP totaux = 34,5 µg.g ⁻¹)													
	0,3	1,12	0,99	1,30*	1,44*	NT	44,1*	NT	4,9*	NT	NT	NT	NT
	0,6	1,14	1,00	1,52*	1,76*	NT	86,2*	NT	6,0*	NT	20	NT	30*
	1,2	1,21*	1,00	2,16*	2,17*	81,0*	20,8*	7,3*	7,7*	11	22	NT	41*
	2,5	1,32*	1,14	2,40*	2,74*	157,0*	1756,2*	56,0*	11,5*	13	21	NT	46*
	4,9	1,55*	1,27*	2,70*	3,20*	226,0*	108,6*	59,0*	7,5*	16	29*	46*	32*
	9,9	1,84*	1,31*	2,76*	3,18*	2,7*	2,1*	26,0*	13,7*	8	26*	29*	44*
	19,8	2,41*	1,68*	2,69*	2,81*	0,0	0,1	0,2	14,8*	10	28*	19	53*
	39,5	2,73*	3,16*	2,50*	3,50*	NT	0,1	NT	0,3	NT	27*	26	36*
	79,0	5,57*	2,44*	2,85*	3,34*	NT	NT	NT	NT	NT	NT	25	NT
BA-2 (HAP totaux = 2,6 µg.g ⁻¹)													
	0,3	0,95	1,01	1,00	1,00	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	0,7	0,94	0,99	1,00	0,99	NT	0,8	NT	2,0*	NT	16	NT	23*
	1,4	0,90	1,00	0,98	0,98	NT	1,1	NT	3,2*	17	14	NT	30*
	2,7	0,93	1,03	1,02	0,93	NT	1,2	NT	3,3*	14	11	NT	25*

SOS Chromotest

Mutatox

Test de fluctuation

Échantillon	Concentration	(FICV)				(FI)				(Nombre de puits positifs)			
		- S9		+ S9		- S9		+ S9		- S9		+ S9	
		F ₀	F ₂	F ₀	F ₂	F ₀	F ₂	F ₀	F ₂	F ₀	F ₂	F ₀	F ₂
BA-2 (suite)	5,4	0,96	1,04	0,90	1,01	2,9*	1,0	3,1*	3,2*	12	20	13	36*
	10,9	0,98	1,05	1,07	1,07	0,2	—	1,8	3,4*	12	22	17	27*
	21,8	1,00	1,04	1,37*	1,22*	0,2	—	4,0*	4,2*	11	23	21	17
	43,5	0,98	1,23*	1,40*	1,47*	—	0,1	1,1	10,3*	NT	24*	34*	10
	87,0	0,87	1,21*	1,20*	1,51*	—	—	0,1	3,2*	NT	NT	40*	NT
BA-3 (HAP totaux = 0,4 µg.g ⁻¹)													
	0,4	0,98	0,93	1,03	1,02	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	0,7	0,95	0,88	1,06	0,98	NT	3,4*	NT	2,0*	NT	13	NT	5
	1,5	0,96	0,85	0,93	0,96	NT	2,2*	NT	2,3*	13	12	NT	8
	3,0	0,95	0,89	0,97	0,99	NT	1,2	NT	8,4*	20	14	NT	8
	5,9	0,98	0,89	0,97	0,95	0,6	4,8*	1,8	7,5*	14	20	11	9
	11,9	0,97	0,89	0,92	0,90	0,2	3,4*	2,0*	7,0*	21*	17	15	14
	23,8	0,86	0,91	0,85	0,94	0,1	0,2	3,2*	7,9*	23*	14	15	13
	47,5	0,79	0,92	1,00	1,09	0,1	0,1	1,7	6,6*	NT	33*	10	18*
	95,0	0,56	0,93	0,87	1,10	—	0,1	0,1	2,1*	NT	NT	6	NT
HS-2 (HAP totaux, non déterminé)													
	0,2	0,99	0,93	1,09	1,06	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	0,5	0,96	0,92	1,05	1,04	NT	NT	NT	NT	NT	13	NT	9
	1,0	1,01	0,89	1,19	1,13	NT	4,4*	NT	0,8	13	7	NT	5
	1,9	1,03	0,91	1,25*	1,34*	NT	7,6*	NT	0,6	10	16	NT	7
	3,8	1,00	0,96	1,54*	1,61*	0,2	1,9*	0,6	0,4	3	10	29*	12
	7,6	0,90	1,15	1,64*	1,71*	—	—	0,5	0,5	5	17*	35*	12
	15,3	0,63	1,70*	1,62*	1,72*	—	—	0,1	0,6	4	20*	19	25*
	30,5	—	2,10*	0,94	1,67*	—	—	—	0,2	NT	23*	13	32*
	61,0	0,04	0,50	—	0,79	—	—	—	—	NT	NT	10	NT

* Réponse génotoxique significative, c.-à-d. répondant aux critères de détection définis pour chaque test (voir sections 2.4.3, 2.4.4 et 2.4.5).

— : la toxicité n'a pas permis la mesure de génotoxicité.

NT: non testé.

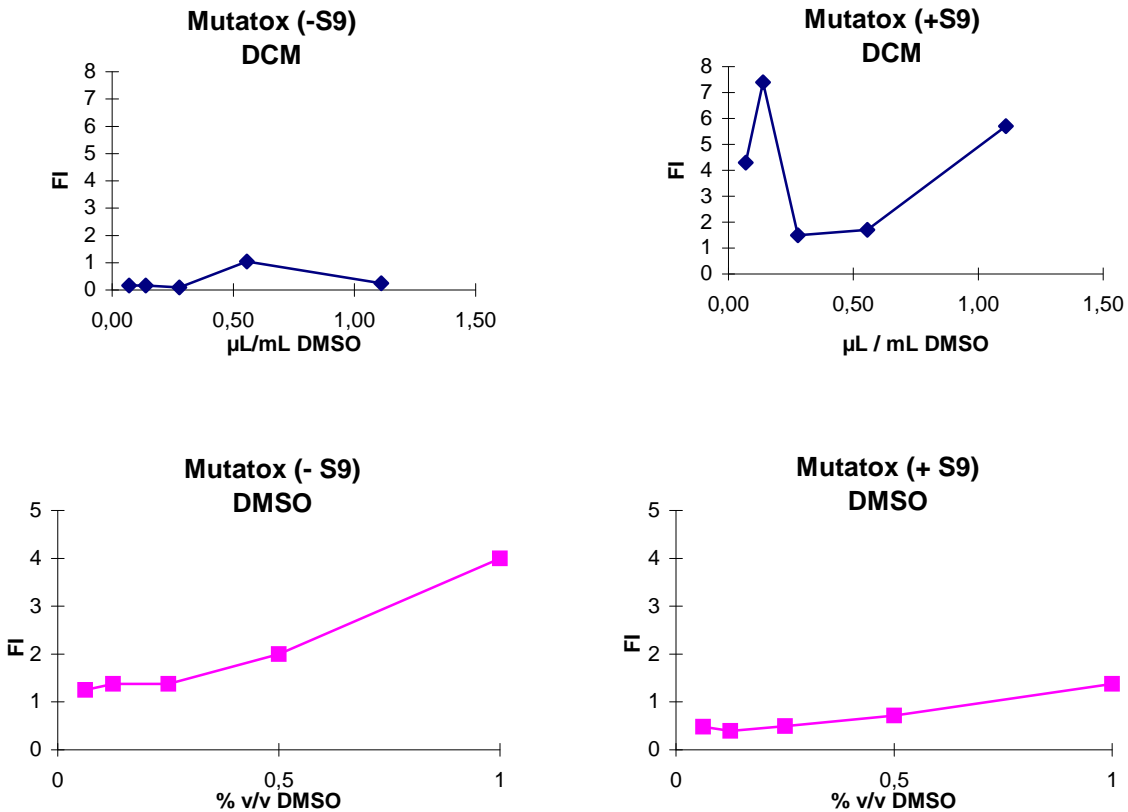


Figure 2 Réponses génotoxiques mesurées chez *V. fischeri* à de faibles concentrations de DCM et de DMSO

3.1.2 Comparaison des fractions des extraits organiques de sédiments

Les analyses effectuées sur différentes fractions organiques ont produit des résultats divergents lors des tests de génotoxicité (tableau 8). Le SOS Chromotest n'a montré aucune induction de β -gal avec la fraction F₁ mais a indiqué la présence d'agents génotoxiques dans l'extrait non fractionné (F₀) et la fraction F₂ des échantillons à l'étude. En revanche, le test de fluctuation et le Mutatox ont généré des réponses génotoxiques avec la fraction F₁, en plus de celles notées avec la F₀ et la F₂. Bien que le pourcentage de réponses positives avec la fraction F₁ soit relativement faible, seulement 40 p.100 (12/30) comparativement à 60 p.100 (18/30) et 80 p.100 (24/30) avec les fractions F₀ et F₂, respectivement (tableau 8), ces résultats sont surprenants compte tenu que les macromolécules isolées dans cette fraction ne sont pas reconnues pour causer des dommages à l'ADN. Au contraire, elles ont généralement un effet de masquage

sur l'activité génotoxique des micropolluants (Holoubek *et al.*, 1990; Ho *et al.*, 1994). Par ailleurs, la membrane externe des bactéries est peu perméable aux solutés de poids moléculaire supérieur à 700 uma (voir revue de Nikaido et Vaara, 1985), ce qui correspond approximativement à la limite d'exclusion de la fraction F1. La fraction F₁ n'est donc pas appropriée pour l'évaluation génotoxicologique de sédiments contaminés.

Tableau 8
Réponses aux tests de génotoxicité selon la nature de la fraction organique
et en fonction de la présence ou de l'absence de S9

Échantillon	Fraction	Sans activation métabolique			Avec activation métabolique		
		SOS Chromotest	Mutatox	Test de fluctuation	SOS Chromotest	Mutatox	Test de fluctuation
HS-2	F ₀	-	-	-	+	-	+
	F ₁	-	+	+	-	-	+
	F ₂	+	+	+	+	-	+
HS-3	F ₀	-	+	-	+	+	+
	F ₁	-	+	-	-	+	+
	F ₂	+	+	-	+	+	+
BA-1	F ₀	+	+	-	+	+	?
	F ₁	-	+	-	-	+	+
	F ₂	+	+	+	+	+	+
BA-2	F ₀	-	?	-	+	?	+
	F ₁	-	-	-	-	+	-
	F ₂	+	-	+	+	+	+
BA-3	F ₀	-	-	+	-	+	-
	F ₁	-	+	-	-	+	+
	F ₂	-	?	+	-	+	+
Σ Échantillons	F ₀	20	60	20	80	80	80
	F ₁	0	80	20	0	60	80
	F ₂	80	80	60	80	80	100
Σ Tests (- S9, + S9)	F ₀				50		
	F ₁				40		
	F ₂				80		

Remarque. - + : réponse génotoxique positive; - : réponse génotoxique négative; ? : réponse génotoxique équivoque; Σ : somme.

En revanche, l'activité génotoxique de la F₂ s'est généralement avérée supérieure à celle de la F₀ et de la F₁ pour tous les organismes testés (résultats non illustrés). Le potentiel accru de la fraction F₂ n'est pas surprenant compte tenu que cette fraction comporte la majorité des contaminants anthropiques présents dans les sédiments, dont plusieurs sont reconnus génotoxiques ou mutagènes. Le taux plus faible de réponses positives avec la fraction F₀ supporte l'hypothèse d'interactions antagonistes ou de masquage par des substances non génotoxiques de poids moléculaire plus élevé dans les extraits bruts. Ce phénomène a déjà été proposé par d'autres auteurs (Gagné *et al.*, 1998; Grifoll *et al.*, 1990; West *et al.*, 1986). Par ailleurs, une analyse des résultats bruts (tableau 7) révèle que, de façon générale, l'activité de génotoxicité notée en présence de S9 avec les extraits non fractionnés (F₀) s'expliquait entièrement par les substances présentes dans la fraction F₂. Ce phénomène était particulièrement évident pour les échantillons fortement contaminés par des HAP (c.-à-d. échantillons HS-3 et BA-1). Ainsi, dans tous les cas où un effet a été détecté chez *E. coli* PQ37 et *S. typhimurium* avec la F₀ de ces deux échantillons, une réponse positive a été obtenue avec la F₂. De plus, une comparaison basée sur différentes dilutions de ces deux fractions indique que l'intensité de l'activité mesurée avec la F₂ était généralement équivalente ou supérieure à celle observée avec la F₀. Dans le Mutatox, la contribution des molécules de poids intermédiaire (F₂) à la génotoxicité de l'extrait brut était moins évidente pour le HS-3 en raison de la toxicité observée avec la fraction F₂ à partir de la dilution de 3,7 mg-Éq.sec.mL⁻¹ (données non illustrées). La baisse subite de la luminescence à partir de la dilution de 4,9 mg-Éq.sec.mL⁻¹ de l'échantillon BA-1 (F₂) en l'absence de S9 est attribuable à un effet toxique agissant sur la croissance des bactéries. La toxicité a donc une influence importante sur les lectures de luminescence dans le Mutatox.

La contribution de la fraction F₂ à la génotoxicité notée avec l'extrait non fractionné des échantillons est mise en évidence graphiquement à la figure 3 (a et b). Cette contribution est particulièrement notable avec le SOS Chromotest. Mis à part l'échantillon BA-3, qui était faiblement contaminé par des HAP⁴, les courbes de la fraction F₂ sont généralement supérieures à celles obtenues avec les extraits non fractionnés des échantillons. Ces résultats indiquent la

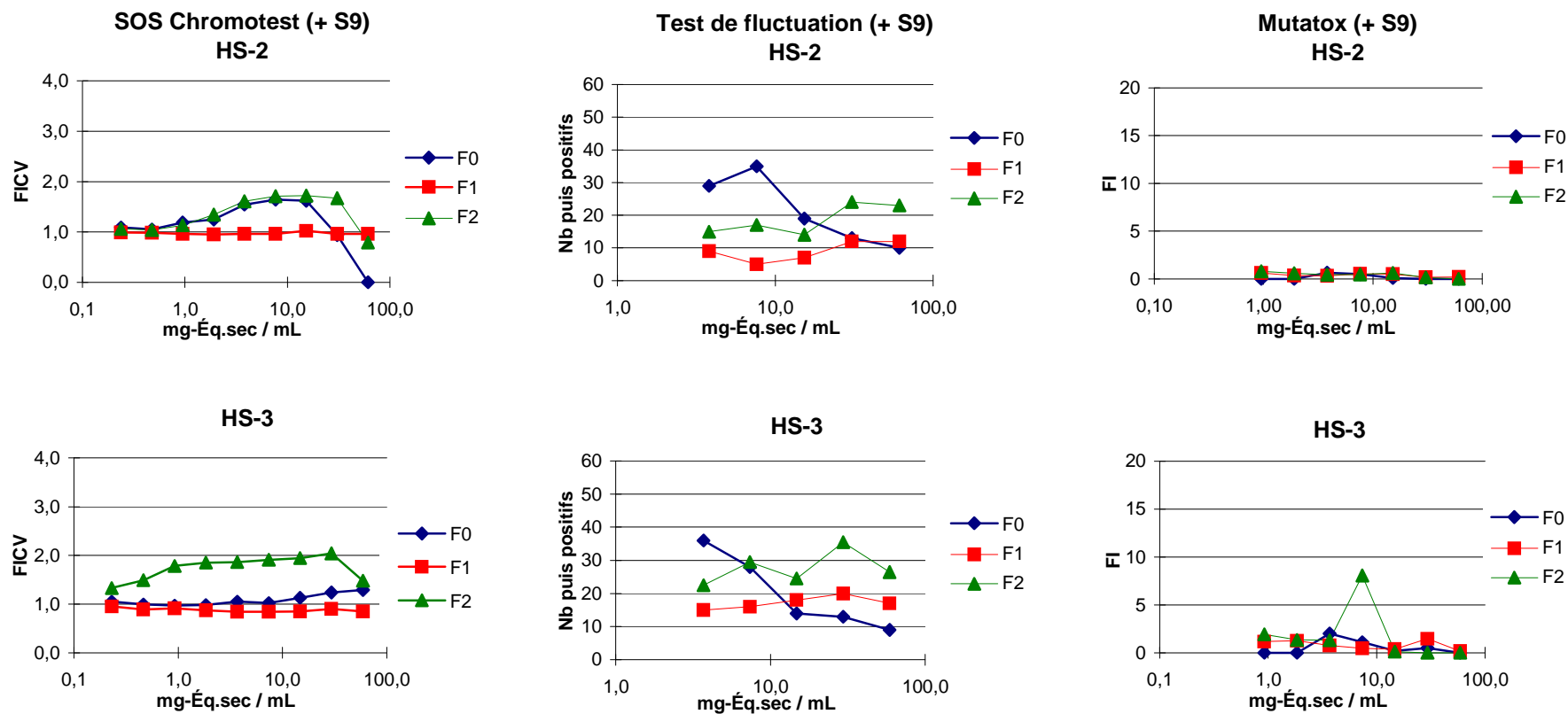
⁴ En effet, la plus forte dilution testée pour l'échantillon BA-3 comportait une concentration de B(a)P bien inférieure (d'un facteur de 30) à la CMEC calculée au laboratoire du CSL (0,15 nmol.mL⁻¹).

sensibilité supérieure de la bactéries *E. coli* PQ37 aux micropolluants isolés dans la fraction F₂ des extraits organiques de sédiments.

3.1.3 Influence du S9

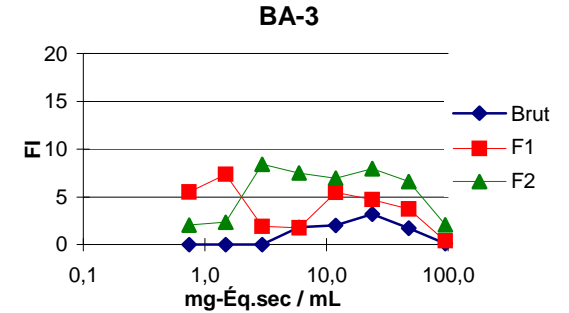
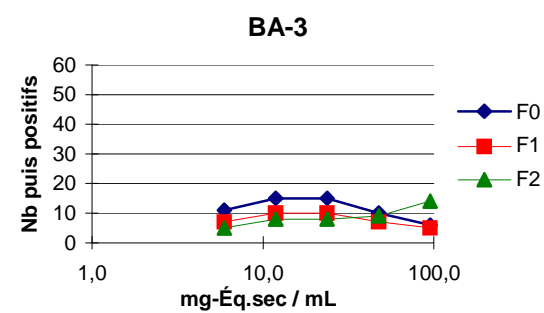
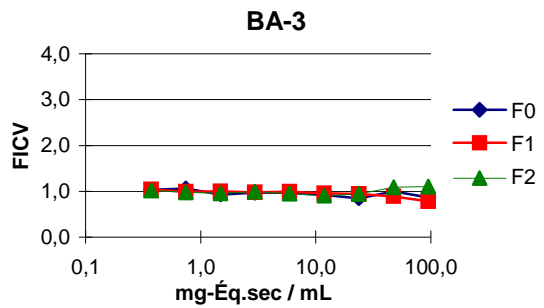
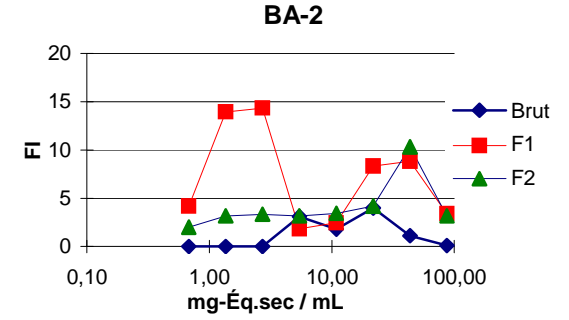
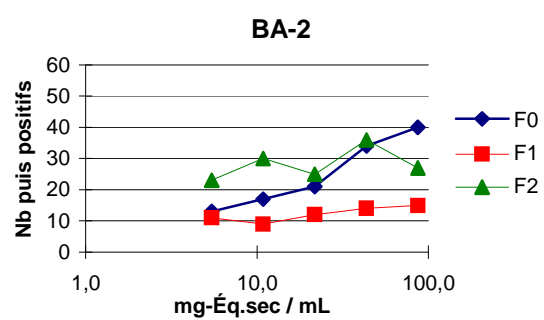
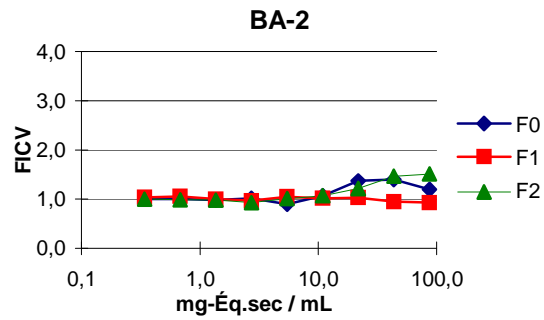
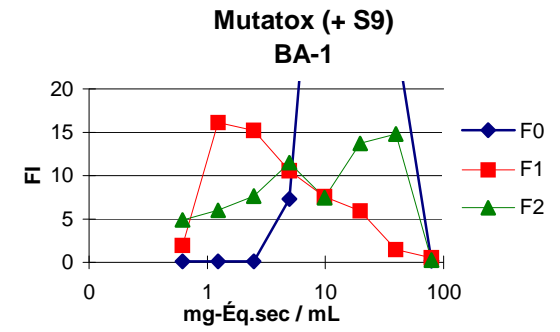
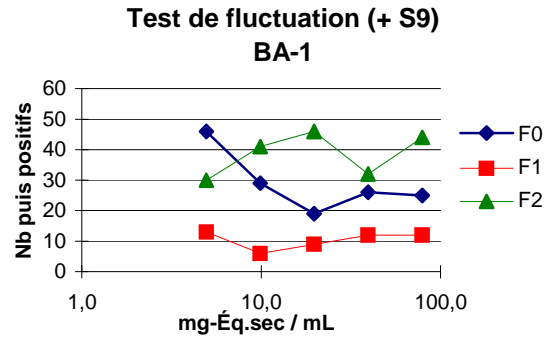
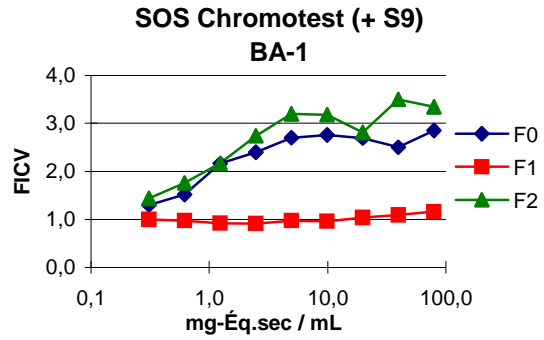
La figure 4 illustre les courbes de concentration-réponse de la fraction F₂ de l'échantillon BA-1 analysée en présence et en l'absence de S9 dans les trois tests; l'allure des courbes est représentative des résultats obtenus avec la fraction F₂ des autres échantillons. De façon générale, l'activation métabolique a augmenté le potentiel génotoxique des extraits organiques de sédiments chez *E. coli* PQ37 et *S. typhimurium*. D'autres auteurs ont également noté que des extraits de sédiments nécessitaient une activation métabolique pour exercer des effets génotoxiques chez *S. typhimurium* et *E. coli* PQ37 (White *et al.*, 1998a; Balch *et al.*, 1995). En fait, à l'exception de Samoiloff *et al.* (1983) et Oishi et Takahashi (1987), peu d'études ont rapporté la présence d'agents génotoxiques à action directe chez *E. coli* PQ37 et *S. typhimurium* dans des extraits organiques de sédiments.

Deux raisons permettent de croire que les substances potentiellement progénotoxiques dans les échantillons qui se sont avérés positifs sont des HAP ou des dérivés de HAP. Premièrement, les extraits qui ont montré un potentiel de génotoxicité supérieur avec S9 dans le test de fluctuation et le SOS Chromotest étaient fortement contaminés par des HAP. En effet, les plus fortes concentrations testées de l'échantillon HS-3 (59 mg-Éq.sec.mL⁻¹) et de l'échantillon BA-1 (79 mg-Éq.sec.mL⁻¹) comportaient respectivement plus de 0,88 et 1,16 nmol.mL⁻¹ de B(a)P, soit des teneurs cinq à huit fois plus élevées que la CMEO calculée au laboratoire du CSL avec le SOS Chromotest. En revanche, la plus forte dilution testée pour l'échantillon BA-3 ne comportait que 0,0005 nmol.mL⁻¹ de B(a)P. Aucune CMEO n'est disponible pour cette substance avec le test de fluctuation. Deuxièmement, il a été démontré que les substances génotoxiques d'échantillons environnementaux requérant une activation métabolique avant d'exercer leurs effets sont souvent des HAP (West *et al.*, 1986; 1988; Donnelly *et al.*, 1988).



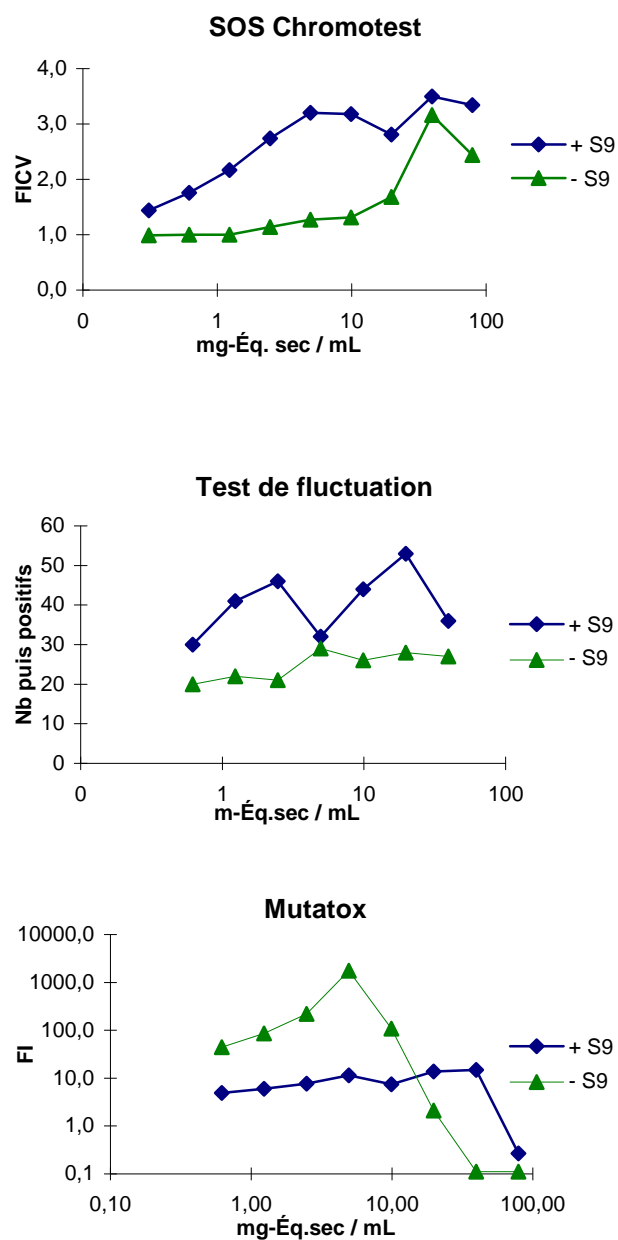
Remarque. - les échelles varient selon le test. Les critères de détection sont les suivants. SOS Chromotest : FICV $\geq 1,2$; Mutatox : FI $\geq 2,0$;
 Test de fluctuation : nombre de puits positifs \geq valeur critique de la table de Gilbert.

Figure 3a Génotoxicité de sédiments de référence certifiés (HS-2 et HS-3)



Remarque. - les échelles varient selon le test. Les critères de détection sont les suivants. SOS Chromotest : FICV $\geq 1,2$; Mutatox : FI $\geq 2,0$;
Test de fluctuation : nombre de puits positifs \geq valeur critique de la table de Gilbert.

Figure 3b Génotoxicité de sédiments prélevés à trois sites de la baie des Anglais (BA-1, BA-2 et BA-3)



Remarque. - Résultats typiques obtenus avec la fraction F₂ de l'échantillon BA-1.

Figure 4 Influence du S9 sur le potentiel génotoxique des extraits organiques

Le potentiel génotoxique des extraits organiques a diminué après ajout de S9 dans le test Mutatox. Cette baisse peut être attribuable à des interférences physiques des protéines du S9 avec l'activité des substances à action indirecte, tel qu'avancé par Courtois *et al.* (1992).

3.1.4 Potentiel de discrimination des tests de génotoxicité

La distribution spatiale de la génotoxicité des sédiments de la baie des Anglais est présentée à la figure 5. Des trois tests, le SOS est indéniablement celui qui a montré le meilleur pouvoir de discrimination entre les trois échantillons de sédiments de la baie des Anglais. En effet, que ce soit avec l'extrait non fractionné ou la fraction F₂, l'échantillon BA-1 a montré les plus fortes inductions de β -gal et ce, à toutes les concentrations analysées. Aucune activité génotoxique n'a été observée avec les extraits de l'échantillon BA-3. Les pentes des portions linéaires des courbes de concentration-réponse pour les échantillons BA-1 et BA-2 démontrent clairement un gradient de génotoxicité de la fraction F₂ qui est conforme avec les niveaux de contamination en HAP des sédiments. Une comparaison statistique des courbes à l'aide de contrastes révèle une différence significative entre les extraits BA-1 et BA-2 (tableau 9).

Tableau 9
Résultats d'analyse de l'hétérogénéité des courbes de concentration-réponse pour la fraction F2 des extraits de la baie des Anglais, sites BA-1 et BA-2

Paramètres	Sites de la baie des Anglais	
	BA-1	BA-2
pende	0,36	0,006
r ²	0,91	0,82
<i>p</i>	< 0,05	0,05
N	5	4
Contraste	<i>F</i> =37,6, <i>p</i> <0,0001	

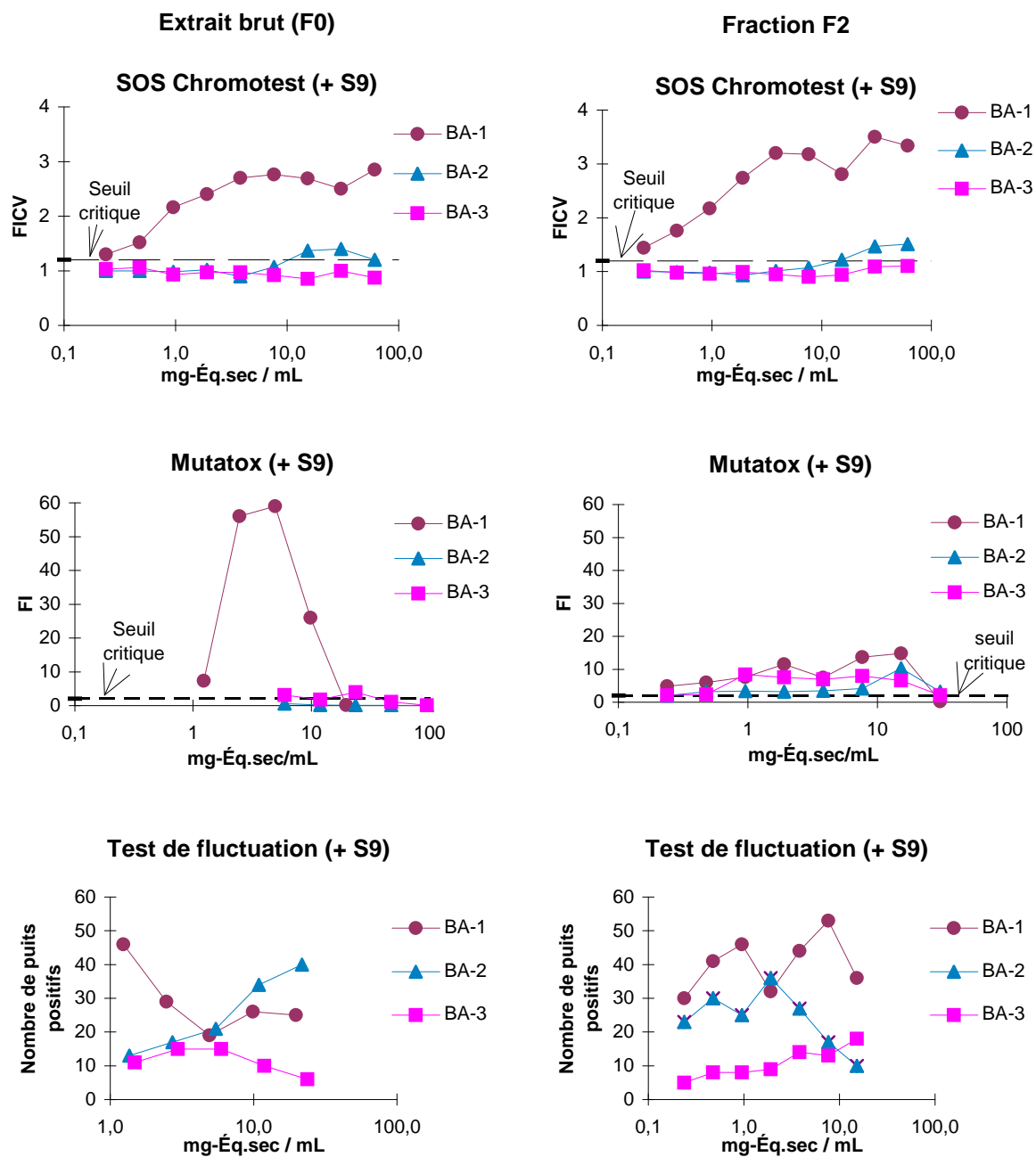


Figure 5 Distribution spatiale de la génotoxicité des extraits de sédiments de la baie des Anglais

3.1.5 Évaluation comparative des tests de génotoxicité

La figure 6a présente les pourcentages de concordance (réponses négatives vs réponses positives) entre les trois tests de génotoxicité réalisés sur les extraits organiques des cinq échantillons de sédiments. Lorsque les réponses des trois fractions et des essais réalisés en l'absence et en présence de S9 sont regroupées, la concordance entre le SOS Chromotest et le test de fluctuation est de 63 p.cent, celle entre le SOS Chromotest et le Mutatox, 43 p.cent, celle entre le Mutatox et le test de fluctuation, 43 p.cent et celle entre les trois tests n'est que de 27 p.cent.

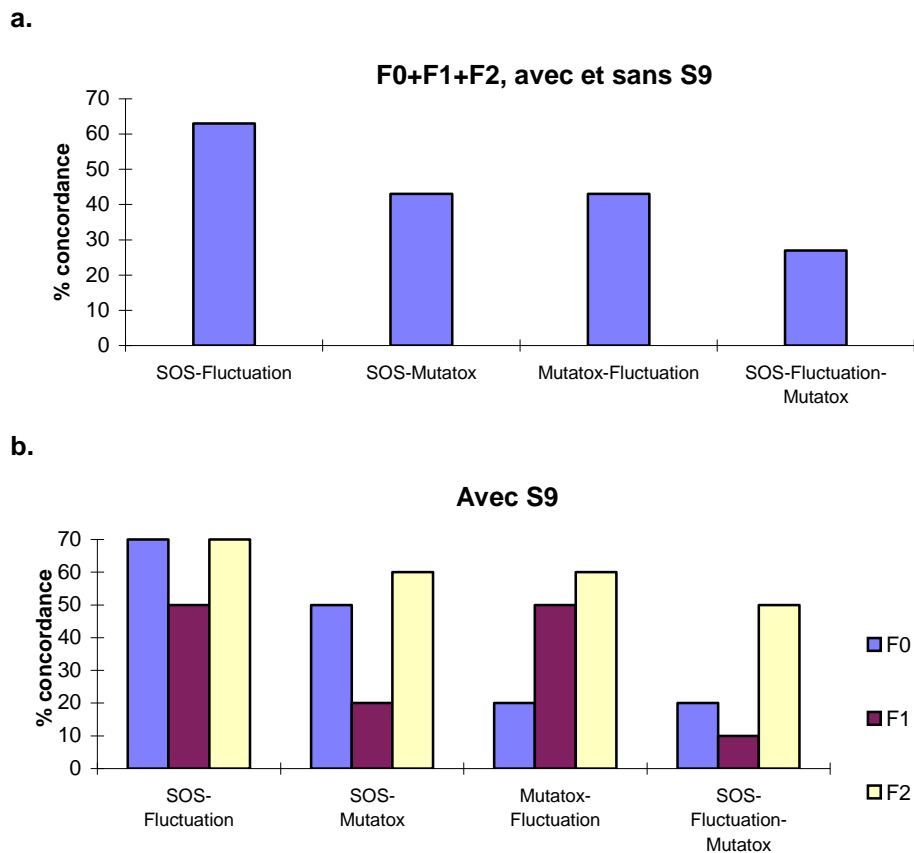


Figure 6 Pourcentage de concordance entre les tests de génotoxicité

En ce qui concerne le nombre total de réponses positives (avec ou sans S9), le Mutatox s'est montré le test le plus sensible (20 réponses positives), suivi du test de fluctuation (18 réponses positives) et du SOS Chromotest (13 réponses positives) (tableau 8). Il est toutefois intéressant de noter que des 20 réponses positives obtenues avec le Mutatox, 6 ont été négatives à

la fois sur le SOS Chromotest et sur le test de fluctuation, alors qu'aucune des 13 réponses positives du SOS Chromotest ne s'est révélée négative à la fois avec le Mutatox et le test de fluctuation. Quant au test de fluctuation, seulement 2 des 18 réponses positives se sont montrées négatives à la fois sur le SOS Chromotest et le Mutatox. Des 17 réponses négatives obtenues avec le SOS Chromotest, 5 ont été positives à la fois sur le Mutatox et le test de fluctuation, alors que des 7 réponses négatives avec le Mutatox, 3 ont été positives à la fois avec le SOS Chromotest et le test de fluctuation. Quant aux 11 réponses négatives du test de fluctuation, seulement 2 ont été positives à la fois avec le Mutatox et le SOS Chromotest. Des différences dans les conditions expérimentales (p. ex., temps d'incubation, composition du S9) et les délais analytiques (il était impossible d'exécuter l'ensemble des analyses simultanément) ont certainement contribué à ces écarts. La sensibilité des organismes et le mode d'action des génotoxiques a également pu avoir une influence importante sur les résultats.

D'autres études ont porté sur la comparaison de tests de génotoxicité réalisés sur des extraits organiques de sédiments. Des pourcentages de concordance (avec S9) variant de 50 à 100 p.cent ont été rapportés entre le Mutatox et le test d'Ames (souche TA100) (Jarvis *et al.*, 1996; Hoke *et al.* 1994). Toutefois, à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur la comparaison du SOS Chromotest avec le test de fluctuation (TA100) pour l'évaluation génotoxicologique d'extraits organiques de sédiments. Par contre, une étude réalisée par McDaniels *et al.* (1993) sur des sols contaminés a révélé une excellente concordance (environ 90 p.cent) entre *E. coli* PQ37 et la souche TA98 de *S. typhimurium*.

L'analyse de concordance pour chacune des fractions révèle que de façon générale, les pourcentages de concordance les plus élevés entre les trois tests ont été obtenus avec la fraction F₂ (figure 6b). En effet, pour cette fraction, les trois tests ont donné le même résultat dans 50 p.cent des cas, alors que pour les fractions F₁ et F₀, les pourcentages de concordance étaient de l'ordre de 10 p.cent et 20 p.cent, respectivement. Par ailleurs, des pourcentages de concordance de 70, 60 et 60 p.cent respectivement ont été obtenus avec la fraction F₂ pour les comparaisons suivantes : SOS Chromotest-test de fluctuation, SOS Chromotest-Mutatox et test de fluctuation-Mutatox.

La plus forte corrélation affichée par les réponses obtenues avec la fraction F₂ des échantillons pourrait signifier que les trois tests de génotoxicité réagissent aux mêmes substances,

fort probablement de la famille des HAP. En effet, ces composés se trouvent principalement dans la fraction F₂ et, tel que déjà précisé, ont souvent été identifiés comme étant responsables de la majeure partie de l'activité génotoxique de sédiments contaminés (Jarvis *et al.*, 1996; Hoke *et al.*, 1994; Fernandez *et al.*, 1992; Johnson, 1992b; Sato *et al.*, 1983).

3.2 CONSIDÉRATIONS SCIENTIFIQUES ET PRATIQUES

Le tableau 10 présente une évaluation comparative basée sur des considérations scientifiques, techniques et pratiques pour les trois tests de génotoxicité utilisés dans cette étude. Pour chacun des critères retenus, un rang (1, 2 ou 3) a été accordé de façon arbitraire à chaque test. Le test ayant obtenu la note globale la plus faible est jugé le plus avantageux. L'évaluation a été effectuée à partir de l'expérience acquise dans nos laboratoires avec ces mêmes tests et à partir d'éléments d'information tirés de la littérature.

Tableau 10
Évaluation comparative du SOS Chromotest, du Mutatox et du test de fluctuation en fonction de considérations scientifiques, techniques et pratiques*

Critère	Ordre de classement		
	SOS Chromotest	Mutatox	Test de fluctuation
Reconnaissance par la communauté scientifique	2	3	1
Simplicité des protocoles	2	1	3
Stérilité (échantillons et matériel)	1	2	3
Interférence de la toxicité sur la génotoxicité	1	1	2
Nombre d'échantillons testés par jour	2	1	2
Temps de réponse	1	2	3
Quantité de matériel et de réactifs	2	1	3
Appareils et équipements (quantité et coût)	2	3	1
Traitement des données (complexité)	2	2	1
Automation	1	1	2
Coût	1	1	2
Σ rangs	21	23	26

* L'ordre de classement a été établi en accordant à chacun des tests le rang 1, 2 ou 3, le premier rang étant jugé supérieur. Les tests offrant à peu près les mêmes avantages ont obtenu le même rang. Le total le plus bas désigne donc le test le plus avantageux.

3.2.1 Reconnaissance par la communauté scientifique

Le test de fluctuation comme tel n'est pas beaucoup utilisé par la communauté scientifique; c'est plutôt le test d'Ames en boîtes de Petri (sur gélose) qui est mondialement reconnu. Le test de fluctuation tient donc sa réputation des souches de *S. typhimurium* du test d'Ames qui ont été développées au début des années 1970 et avec lesquelles, sur dix ans, plus de 5000 produits chimiques avaient été testés (Maron et Ames, 1983). Plus de 2000 laboratoires à travers le monde ont fait usage des souches du test d'Ames et des centaines de travaux scientifiques dans lesquels ces mêmes souches ont été utilisées ont été publiés. Mis au point au début des années 1980, le SOS Chromotest s'est acquis une excellente réputation au fil des années. Il a servi à évaluer l'activité génotoxique de plus de 500 substances chimiques et plus de 100 publications scientifiques portent sur ce test (Quillardet et Hofnung, 1993). La commercialisation définitive du Mutatox s'est effectuée il y a environ cinq ans. Le Mutatox a été soumis à plusieurs études comparatives avec le test d'Ames, études qui ont impliqué des substances pures et des mélanges complexes. De 200 à 300 substances chimiques auraient été testées avec le Mutatox et une cinquantaine au plus d'articles scientifiques auraient été publiés à son sujet.

3.2.2 Simplicité

Des trois tests, le Mutatox est le plus simple à réaliser et le moins laborieux. Les réactifs (seulement 4) sont disponibles commercialement. Il n'est donc pas nécessaire de cultiver et de maintenir la souche bactérienne (p. ex., pas de vérification des marqueurs génétiques à effectuer ni de solutions à préparer). Selon le protocole adopté dans cette étude, un essai comprenant deux échantillons peut être démarré en moins d'une heure. Le SOS Chromotest vient en deuxième place pour la simplicité, et il faut environ deux fois plus de temps pour démarrer un essai avec deux échantillons comparativement au Mutatox. Le test de fluctuation est de loin le plus complexe et le plus laborieux des trois tests; l'analyse de quatre échantillons requiert une journée de travail bien remplie. En ce qui concerne le SOS Chromotest et le test de fluctuation, les souches bactériennes doivent être maintenues et vérifiées, et pour chaque test, plus d'une vingtaine de solutions ou de réactifs doivent être préparés. L'utilisation de trousse commerciales pour ces deux derniers tests allège la préparation des réactifs mais ne simplifie pas la réalisation

de l'essai. L'achat de trousseaux peut s'avérer une option plus coûteuse lorsque le nombre d'échantillons à tester est élevé.

3.2.3 Coûts

Selon les protocoles appliqués, les coûts des essais SOS Chromotest et Mutatox sont d'environ 500 dollars par échantillon, alors qu'il en coûte environ 900 dollars pour la réalisation d'un essai de fluctuation, toujours sur un seul échantillon. Ces coûts excluent les dépenses associées aux infrastructures et la dévaluation (ou l'amortissement) de l'appareillage.

3.2.4 Autres considérations

La stérilité n'est pas essentielle à la réalisation des essais SOS Chromotest et Mutatox, mais le test de fluctuation requiert du matériel stérile et le travail doit être effectué en conditions aseptiques. Il n'est toutefois pas nécessaire d'assurer la stérilité des extraits dans le DMSO, car il est très peu probable que des bactéries survivent dans ce solvant.

Par ailleurs, la mort cellulaire réduit le potentiel de détection d'effets génotoxiques de ces trois tests mais seul le SOS Chromotest permet de corriger la mesure de génotoxicité en tenant compte de la baisse de densité cellulaire. Il serait sûrement possible de normaliser les réponses génotoxiques par rapport à la viabilité des bactéries dans le test de fluctuation et le Mutatox mais à notre connaissance, aucune procédure n'a été établie pour le faire.

Selon les plans expérimentaux appliqués, il est possible d'analyser quatre extraits par jour (excluant la préparation des extraits) avec le test de fluctuation et le SOS Chromotest, comparativement à huit avec le Mutatox.

3.3 PRÉSENCE DE MÉTAUX LOURDS DANS LES SÉDIMENTS ET LEURS DIVERS EXTRAITS ORGANIQUES

Les concentrations de métaux lourds dans les sédiments entiers, les extraits (F₀, F₁ et F₂) ainsi que les résidus recueillis sur les filtres apparaissent au tableau 11. Les données indiquent que les extraits organiques de sédiments renferment des métaux lourds, particulièrement du fer et du zinc. Ces derniers ont été détectés dans l'ensemble des fractions et les résidus de tous les échantillons. De plus, un gradient de contaminants dans les sédiments entiers a été observé au sein

des sites de la baie des Anglais, le site BA-1 étant le plus contaminé (Nagler *et al.*, 1998). Le même gradient de contamination a été retrouvé pour le zinc et le fer, que ce soit par l'analyse des extraits non fractionnés (F₀), celle des résidus ou celle des fractions de la chromatographie (F₁ et F₂).

Tableau 11
Contenu en métaux lourds des sédiments entiers et de leurs extraits organiques

	Paramètres (µg.g ⁻¹ sec)						
	Pb	Cd	Zn	As	Hg	Fe	Mn
<i>Limite de détection</i>	0,03	0,002	0,006	0,02	-	0,002	0,004
BA-1							
Entier	23,65	0,201	88	4,92	0,083	n.d.	n.d.
F ₀	< 0,03	< 0,002	0,034	< 0,02	n.d.	0,051	< 0,004
Résidus	< 0,03	< 0,002	0,043	< 0,02	n.d.	0,060	< 0,004
F1	< 0,03	< 0,002	0,102	< 0,02	n.d.	0,035	< 0,004
F2	< 0,03	< 0,002	0,071	< 0,02	n.d.	0,057	< 0,004
BA-2							
Entier	18,63	0,096	74	2,46	0,035	n.d.	n.d.
F ₀	< 0,03	< 0,002	0,020	< 0,02	n.d.	0,012	< 0,004
Résidus	< 0,03	< 0,002	0,023	< 0,02	n.d.	0,011	< 0,004
F1	< 0,03	< 0,002	0,009	< 0,02	n.d.	0,016	< 0,004
F2	< 0,03	< 0,002	0,011	< 0,02	n.d.	0,005	< 0,004
BA-3							
Entier	16,75	0,062	52	1,61	0,012	n.d.	n.d.
F ₀	< 0,03	< 0,002	0,011	< 0,02	n.d.	0,010	< 0,004
Résidus	< 0,03	< 0,002	0,008	< 0,02	n.d.	0,025	< 0,004
F1	< 0,03	< 0,002	0,011	< 0,02	n.d.	0,017	< 0,004
F2	< 0,03	< 0,002	0,013	< 0,02	n.d.	0,005	< 0,004
HS-2							
Entier	5,06	0,06	8,38	0,48	n.d.	634,73	4,26
F ₀	< 0,05	< 0,003	0,071	< 0,03	n.d.	0,450	< 0,007
Résidus	0,02	< 0,003	0,140	< 0,03	n.d.	1,120	0,010
F1	< 0,05	< 0,003	0,035	< 0,03	n.d.	0,063	< 0,007
F2	< 0,05	< 0,003	0,020	< 0,03	n.d.	0,025	< 0,007
HS-3							
Entier	11,09	0,06	10,56	0,61	n.d.	819,54	4,44
F ₀	< 0,05	< 0,003	0,183	< 0,03	n.d.	0,292	< 0,007
Résidus	0,09	< 0,003	0,113	< 0,03	n.d.	6,080	0,050
F1	< 0,05	< 0,003	< 0,010	< 0,03	n.d.	0,065	< 0,007
F2	< 0,05	< 0,003	0,020	< 0,03	n.d.	0,011	< 0,007

n.d. = non disponible.

Une comparaison des concentrations en métaux totaux des sédiments de la baie des Anglais avec celles mesurées dans les extraits organiques montre toutefois qu'une faible partie

des métaux, c.-à-d. moins de 0.5 p.cent, est récupérée par l'extraction au dichlorométhane dans les systèmes Soxhlet. De plus, les teneurs en métaux retrouvées dans les fractions résultant de la chromatographie d'exclusion sont beaucoup plus faibles que celles retrouvées sur les filtres et dans les extraits non fractionnés. Ces données confirment les résultats d'une étude antérieure réalisée au CSL selon laquelle des métaux lourds peuvent être récupérés dans le DCM lors de l'extraction organique de sédiments (Gagné et Blaise, 1996). Toutefois, le passage de la fraction F_0 sur une membrane de $0,45 \mu\text{m}$ et dans le système de chromatographie d'exclusion élimine la majorité des métaux présents dans l'extrait. Le pourcentage de résidus retenus sur la membrane de $0,45 \mu\text{m}$ est présenté à l'annexe 2.

4 Conclusion

Une méthodologie pour l'estimation du potentiel génotoxique de sédiments contaminés a été élaborée et évaluée avec cinq échantillons de sédiments marins. Cette méthodologie consiste à a) extraire les substances organiques des sédiments à l'aide d'un solvant, b) séparer l'extrait en fractions selon le poids moléculaire des constituants, et c) soumettre ces fractions à des tests de génotoxicité. Nous avons exploité les avantages de la filtration sur gel pour élaborer une procédure permettant de traiter jusqu'à 40 échantillons dans une semaine de travail. La capacité de cette procédure à éliminer les métaux des extraits organiques a également été évaluée. Un aspect important de l'élaboration de cette méthodologie portait sur la sélection d'un test de génotoxicité sensible, fiable et scientifiquement reconnu ainsi que d'une fraction d'extrait organique susceptible de renfermer des substances génotoxiques. Trois bioessais, soit le SOS Chromotest, le Mutatox et le test de fluctuation, ainsi que trois fractions organiques de sédiments (F₀ ou extrait non fractionné, F₁ ou fraction renfermant les macromolécules [c.-à-d. > 800 uma] et F₂ ou fraction contenant des substances de poids moléculaire intermédiaire [c.-à-d. entre 250 et 800 uma]) ont été comparés selon certains critères, telles la sensibilité, la concordance et d'autres considérations scientifiques, techniques et pratiques.

La méthodologie présentée procure une estimation du pire scénario quant à la biodisponibilité des agents génotoxiques présents dans la matrice sédimentaire puisque les tests sont réalisés sur des extraits recueillis à partir d'une méthode d'extraction très efficace. Elle offre certains avantages importants par rapport aux analyses chimiques conventionnelles qui ne tiennent pas compte des interactions chimiques, ni de la biodisponibilité des contaminants. Elle n'élimine cependant pas la nécessité de procéder à des analyses chimiques. Elle doit plutôt être considérée comme un outil de dépistage complémentaire pour identifier les zones touchées par la contamination qui mériteraient une attention particulière, étant donné que les effets génotoxiques peuvent survenir à des concentrations bien inférieures à celles requises pour causer des effets toxiques plus facilement observables (par ex., létalité).

Les réponses aux quatre questions à l'origine de la présente étude peuvent se résumer de la façon suivante. D'abord, la procédure semi-automatique décrite pour l'extraction, la concentration et le fractionnement permet d'isoler les substances génotoxiques de la matrice sédimentaire et de les recueillir dans un solvant compatible à la réalisation de microbioessais. Cette procédure permet également de réduire le nombre et la complexité des fractions qui seront soumises aux tests de génotoxicité. Pour répondre à la deuxième question, cette procédure ne récupère qu'une très faible partie (moins de 0,5 p.cent) des métaux présents dans les sédiments entiers. Ce résultat n'est pas surprenant compte tenu de la nature du solvant (DCM) utilisé pour l'extraction. L'activité génotoxique observée serait donc attribuable à des composés organiques lipophiles : ce type de contamination a effectivement été retrouvé dans tous les sédiments examinés dans le cadre de cette étude. Il serait néanmoins intéressant d'examiner la capacité des métaux à lier ces substances organiques dans les extraits et ainsi de modifier leur potentiel à causer des dommages à l'ADN bactérien.

Quant aux troisième et quatrième questions, la démonstration d'effets génotoxiques des sédiments dépend du bioessai réalisé et de la fraction organique examinée. La présence d'un mélange d'activation métabolique (S9) joue également un rôle important. Les extraits de l'ensemble des échantillons ont induit des réponses positives dans les tests de génotoxicité. Selon notre évaluation, le Mutatox s'est avéré le plus sensible; il a répondu aux très faibles concentrations de DMSO (1 % v.v⁻¹) et possiblement de DCM présentes dans les échantillons d'extrait. La toxicité interfère avec la mesure de génotoxicité dans ce bioessai. D'autres travaux seraient requis pour évaluer la fiabilité du Mutatox s'il est sélectionné pour déterminer le potentiel génotoxique d'extraits organiques de sédiments. Le test de fluctuation vient en deuxième position pour ce qui est de la sensibilité. Toutefois, ce test comporte certains inconvénients qui limitent son utilisation. En effet, il requiert une expertise technique poussée (notamment en techniques d'aseptisation) pour obtenir des résultats fiables; il est de loin le plus laborieux des trois tests et ses coûts sont élevés comparativement à ceux des deux autres bioessais. Le SOS Chromotest est relativement plus simple et rapide à réaliser, montre une bonne concordance avec des tests plus sensibles (Mutatox et test de fluctuation), ne requiert pas des conditions aseptiques, permet de détecter une activité génotoxique en dépit d'un effet toxique,

montre une relation de concentration-réponse et permet de déceler des différences de potentiel de génotoxicité entre des échantillons de sédiments montrant un gradient de contamination. Ces résultats indiquent que le SOS Chromotest procure une base fiable et scientifiquement défendable pour guider la prise de décision dans l'évaluation génotoxicologique de sédiments contaminés. Dans les cas où le SOS Chromotest indiquerait la présence d'agents génotoxiques dans la matrice examinée, le test de fluctuation pourrait être utilisé dans un deuxième temps comme outil de confirmation. Quant à la comparaison des fractions, c'est la fraction F2 qui a montré le potentiel génotoxique le plus important et ce, pour les trois organismes testés. Des réponses positives ont également été notées avec l'extrait non fractionné, mais cette génotoxicité s'expliquait entièrement par les substances présentes dans la fraction F2. Le fractionnement ultérieur des extraits organiques bruts de sédiments et l'utilisation de la fraction F₂ lors de l'exposition des organismes bactériens augmentent le potentiel de détection des tests de génotoxicité. Quant à la fraction F1, elle n'est pas appropriée pour l'évaluation du potentiel génotoxique des sédiments en raison de sa composition chimique et ce, pour deux raisons: i) la membrane externe des bactéries est peu perméable aux solutés présents dans cette fraction (Nikaido et Vaara, 1985); ii) les substances contenues dans la F1 ne sont pas reconnues pour causer des effets génotoxiques.

En résumé, les travaux de la présente étude démontrent que la procédure d'extraction, de concentration et de fractionnement élaborée au CSL pour recueillir la fraction F₂ et la réalisation du SOS Chromotest sur cette fraction permettent de déterminer le potentiel génotoxique de sédiments. Bien que la méthodologie ne peut à elle seule servir à identifier les agents chimiques individuels responsables des effets observés, elle permet de ramener la complexité chimique des sédiments à la considération exclusive des contaminants d'intérêt. La méthodologie procure enfin une procédure rapide, efficace et relativement peu coûteuse pour faire un premier examen du potentiel de sédiments contaminés à causer des dommages génétiques chez des organismes exposés et pour comparer des sites sur la base du danger génotoxique.

Comme toute autre méthode, la variabilité inhérente à cette méthodologie doit être considérée dans l'interprétation des résultats. Cette variabilité peut résulter de plusieurs facteurs, tels que l'efficacité des méthodes de nettoyage de la verrerie, la pureté du solvant et des réactifs, la performance du chromatographe et des appareils de mesure, l'âge et la condition des

organismes, des erreurs aléatoires de l'analyste, la température de la salle d'expérimentation et des différences dans le matériel de laboratoire. Dans la deuxième phase de ce projet, la méthodologie sera validée pour déterminer la variance associée à la procédure d'extraction, de concentration et de fractionnement ainsi qu'aux lectures de génotoxicité.

Références

- Abe, A. et K. Urano (1996). « Characteristics of lethal substances and the removal effect of molecular sulfur in the Salmonella mutagenicity test for river sediments ». *Mutat. Res.*, 351: 61-66.
- Arfsten, D. P., R. Davenport et D. J. Schaeffer (1994). « Reversion of bioluminescent bacteria (Mutatox™) to their luminescent state upon exposure to organic compounds, munitions and metal salts ». *Biomed. and Environ. Sc.*, 7: 144-149.
- ASTM (1992). *Standard practice for conducting an interlaboratory study to determine the precision of a test method*. American society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 20 pages.
- Balch, G.C., C.D. Metcalfe et S.Y. Huestis (1995). « Identification of potential fish carcinogens in sediment from Hamilton Harbour, Ontario, Canada ». *Environ. Toxicol. Chem.*, 14: 79-91.
- Bertrand, P., S. Fournier et Y. Vigneault (1986). *Concentrations en biphényles polychlorés et en métaux dans les sédiments et les organismes marins de la baie des Anglais (Québec)*. Ministère des Pêches et des Océans, Laboratoire de Québec, Québec, Canada. Rapport statistique canadien des sciences halieutiques et aquatiques n°. 568. 50 pages.
- Brochu, C., S. Moore et É. Pelletier (1995). « Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in sediments and biota of the St. Lawrence Estuary ». *Mar. Pollut. Bull.*, 30: 515-23.
- Bulich, A. (1992). *The mode of action by genotoxic agents in the restoration of light in the Mutatox™ test system*. Conférence présentée au 13^e congrès de la SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry), Cincinnati, OH. 11 pages.
- Cairns, J. Jr. (1988). « What constitutes field validation of predictions based on laboratory evidence ? », dans W.J. Adams, G.A. Chapman and W.G. Landis (Éds). *Aquatic toxicology and Hazard Assessment :10th Volume*. STP 971. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. Pp.361-368.
- Cairns, J. Jr. et W.H. van der Schalie (1980). « Biological monitoring Part I: Early warning systems ». *Water Res.*, 14: 1179-1996.
- Chapman, P.M. (1995). « Extrapolating laboratory toxicity results to the field ». *Environ. Toxicol. Chem.*, 14: 927-930.

- Chapman, P.M. (1990). « The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation ». *Sci. Total Environ.*, 97/98: 815-825.
- Chapman, P.M. (1986). « Sediment quality criteria from the sediment quality triad: an example ». *Environ. Toxicol. Chem.*, 5: 957-964.
- Courtois, Y.A., M.L. Pesle et B. Festy (1992). « Activation of pro-mutagens in complex mixtures by rat liver S9 systems ». *Mutat. Res.*, 276: 133-137.
- DeMarini, D. M., B. K. Lawrence, H. G. Brooks et V. Houk (1991). « Compatibility of organic solvents with the Microscreen prophage-induction assay: mutagen interactions ». *Mutat. Res.*, 266: 107-113.
- Devoret, R. (1992). « Les fonctions SOS ou comment les bactéries survivent aux lésions de leur ADN ». *Actualités*, 1: 11-20.
- Donnelly, K.C., K.W. Brown et D.G. Di Giulio (1988). « Mutagenic characterization of soil and water samples from a Superfund site ». *Nucl. Chem. Waste Manag.*, 8: 135-41.
- Durant, J.L., P.A. Monchamp, A.L. Lafleur et H.F. Hemond (1994). « Combined filtration-solid-phase extraction method for recovering organic substances from natural waters in preparation for mutagenicity testing ». *Environ. Sci. Technol.*, 28: 1819-1828.
- Ellis, D.D., C.M. Jones, R.A. Larson et D.J. Schaeffer (1982). « Organic constituents of mutagenic secondary effluents from wastewater treatment plants ». *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 11: 373-382.
- Engwall, M., D. Broman, R. Ishaq, C. Näf, Y. Zebühr et B. Brunström (1996). « Toxic potencies of lipophilic extracts from sediments and settling particulate matter (SPM) collected in a PCB-contaminated river system ». *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 213-222.
- Environnement Canada et ministère de l'Environnement du Québec (1992). *Critères intérimaires pour l'évaluation de la qualité des sédiments du Saint-Laurent*. Centre Saint-Laurent, Conservation de l'environnement, et ministère de l'Environnement du Québec, Montréal, Québec. 28 pages.
- Environnement Canada (1998). *Test Mutatox*. Écotoxicologie et chimie environnementale, Centre Saint-Laurent, Conservation de l'environnement, Montréal, Québec. 43 pages.
- Environnement Canada (1997a). *Test de génotoxicité avec E. coli PQ37 (SOS Chromotest)*. Écotoxicologie et chimie environnementale, Centre Saint-Laurent, Conservation de l'environnement, Montréal, Québec. 65 pages.
- Environnement Canada (1997b). *Test de mutagénicité avec S. typhimurium (test de fluctuation)*. Écotoxicologie et chimie environnementale, Centre Saint-Laurent, Conservation de l'environnement, Montréal, Québec. 67 pages.

- Environnement Canada (1995). *Manuel d'assurance et de contrôle de la qualité*. 2^e édition. Écotoxicologie et chimie environnementale, Centre Saint-Laurent, Conservation de l'environnement, Montréal, Québec. 104 pages et annexes.
- Environnement Canada (1994). *Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essais biologiques*. Direction générale du développement technologique, Ottawa, Ontario. Rapport SPE 1/RM/29. 128 pages et annexes.
- Environnement Canada (1993). *Directives provisoires sur la surveillance dans le cadre de l'immersion en mer*. Division du milieu marin, Hull, Québec. 34 pages.
- Fernández, P. M. Grifoll, A.M. Solanas, J.M. Bayona et J. Albalgés (1992). «Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments». *Environ. Sci. Technol.*, 26: 817-829.
- Filipic, M. (1995). «Mutagenicity and toxicity of water extracts from the Sora river area». *Mutat. Res.*, 342: 1-8.
- Gagné, F., M. Pardos, C. Blaise, P. Turcotte, B. Quémarais et A. Fouquet (1998). «Toxicity identification study of organic extracts resolved by size exclusion chromatography using rainbow trout hepatocytes ». Sous presse.
- Gagné, F. et C. Blaise (1996). «Lethal and sublethal effects of marine sediment extracts on rainbow trout hepatocytes ». *Toxicol. Lett.*, 87: 85-92.
- Gagné, F. et C. Blaise. (1995). «Evaluation of the genotoxicity of environmental contaminants in sediments to Rainbow trout hepatocytes ». *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 10: 217-229.
- Gagné, F. S. Trottier, C. Blaise, J. Sproull et B. Ernst. (1995). «Genotoxicity of sediment extracts obtained in the vicinity of a creosote-treated wharf to rainbow trout hepatocytes ». *Toxicol Lett.*, 78: 175-182.
- Gilbert, R.I. (1980). «The analysis of fluctuation tests ». *Mutat. Res.*, 74 : 283-289.
- Grifoll, M., A.M. Solanas et J.M. Bayona (1992). «Bioassay-directed chemical characterization of genotoxic agents in the dissolved and particulate water phases of the Besos and Llobregat rivers (Barcelona, Spain) ». *Arch. Environ. Toxicol.*, 23: 19-25.
- Grifoll, M., A.M. Solanas et J.M. Bayona (1990). Characterization of genotoxic components in sediments by mass spectrometric techniques combined with Salmonella/Microsome test. *Arch. Environ. Toxicol.*, 19: 175-84.
- Hakura, A., H. Mochida et K. Yamatsu (1993). «Dimethyl sulfoxide (DMSO) is mutagenic for bacterial mutagenicity tester strains». *Mutat Res.*, 303: 127-133.

- Ho, K. T., et J. G. Quinn (1993). «Bioassay-directed fractionation of organic contaminants in estuarine sediment using the new mutagenic bioassay, Mutatox™». *Environ. Toxicol. and Chem.*, 12: 823-830.
- Ho, K. T., L. J. Mills et A. R. Malcom (1994). «The influence of sediment extract fractionation methods on bioassay results». *Environ. Tox. and Water Qual.*, 9 :145-154.
- Hoke, R. A., P. D. Jones, A. E. Maccubbin, M. J. Zabik et J. P. Giesy (1994). «Use of *in vitro* microbial assays of sediment extracts to detect and quantify contaminants with similar modes of action». *Chemosphere*, 28: 16-181.
- Holoubek, I., J. Paasivirta, P. Maatele, M. Lahtipera, I. Holoubkova, P. Korinek, Z. Bohacek et J. Caslavsky (1990). «Comparison of extraction methods for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in sediments ». *Toxicol. Environ. Chem.*, 25: 137-154.
- Houk, V.S. (1992). «The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review». *Mut. Res.*, 277: 91-138.
- Hubbard, S. A., M. H. L. Green, D. Gatehouse et J. W. Bridges (1984). «The fluctuation test in bacteria», dans B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols et C. Ramel (Éds), *Handbook of Mutagenicity Testing*, 2^e édition, Elsevier Science, New York, NY. Pp. 141 - 160.
- IJC (1988). *Procedures for the assessment of contaminated sediment problems in the Great Lakes*. International Joint Commission, Windsor, Ontario. 78 pages.
- IML (1997). *La contamination de la baie des Anglais, feuillet d'information sur l'état de l'environnement marin du Saint-Laurent*. Institut Maurice-Lamontagne, Pêches et Océans Canada, Mont-Joli, Québec. 8 pages.
- Jacobs, M.W., J.J. Delfino et G. Bitton (1992). «The toxicity of sulfur to Microtox® from acetonitrile extracts of contaminated sediments ». *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1137-1143.
- Jarvis, S., M. E. Honeycutt, V. A. McFarland, A. Bulich, et H. C. Bounds (1996). «A comparison of the Ames assay and Mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment». *Ecotox. and Environ. Safety*, 33 :193-200.
- Johnson, B. T. (1992a). «Potential genotoxicity of sediments from the Great Lakes». *Environ. Toxicol. and Water Qual.*, 7: 373-390.
- Johnson, B. T. (1992b). «An evaluation of a genotoxicity assay with liver S9 for activation and luminescent bacteria for detection». *Environ. Toxicol. and Chem.*, 11: 473 - 480.
- Jongen, W.M.F., G.M. Alink et J.H. Koeman (1978). «Mutagenic effect of dichloromethane on *Salmonella typhimurium* ». *Mutat. Res.*, 56: 245-248.

- Kado, N.Y., R.A. Okamoto, P.A. Kuzmicky, C.J. Rathbun et D.P.H. Hsieh (1996). « Integrated supercritical fluid extraction, bioassay and chemical screening methods for analyzing vapor-phase compounds of an environmental complex mixture: diesel exhaust ». *Chemosphere*, 33: 495-516.
- Klamer, H.J.C., L.A. Villerius, J. Roelsma, P.G-J. de Maagd et A. Opperhuizen (1997). « Genotoxicity testing using the Mutatox assay: evaluation of benzo(a)pyrene as positive control ». *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 857-861.
- Kwan, K.K. et B.J. Dutka. (1996). « Development of reference sediment samples for solid phase toxicity screening tests ». *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56: 696-702.
- Laliberté, D. (1991). *Réseau de surveillance des substances toxiques dans le milieu aquatique: teneurs en HAP dans les sédiments près de cinq alumineries du Québec en 1988*. Sous-Ministériat au milieu urbain, Québec, Québec.
- La Rocca, C., L. Conti, R. Crebelli, B. Crochi, N. Iacovella, F. Rodriguez, L. Turrio-Baldassari et A. di Domenico (1996). « PAH content and mutagenicity of marine sediments from the Venice Lagoon ». *Ecotox. and Environ. Safety*, 33: 236-245.
- Langevin, R., J.B. Rasmussen, H. Sloterdijk et C. Blaise (1992). « Genotoxicity in water and sediment extracts from the St Lawrence River system, using the SOS Chromotest ». *Water Resources* 26: 419-429.
- Long, E.R. et P.M. Chapman. (1985). « A sediment quality triad: measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound ». *Mar. Poll. Bull.*, 16: 405-15.
- MacGregor, J.T., L.D. Claxton, J. Lewtas, R. Jensen, W.R. Lower et G.G. Pesch (1994). « Monitoring environmental genotoxicants », dans D.J. Brusick (Éd.), *Methods for genetic risk assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. Pp. 171-243.
- Maron, D. M. et B. N. Ames (1983). « Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test ». *Mut. Res.*, 113: 173-215.
- Maron, D., J. Katzenellenbogen et B. Ames (1981). « Compatibility of organic solvents with the *Salmonella*/microsome test ». *Mutat. Res.*, 88: 343-350.
- Marvin, C.H., J.A. Lundrigan, B.E. McCarry et D.W. Bryant (1995). « Determination and genotoxicity of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from coal-tar-contaminated sediment ». *Environ. Toxicol. Chem.*, 14: 2059-2066.
- Marvin, C.H., M. Tessaro, B.E. McCarry et D.W. Bryant (1994). « A bioassay-directed investigation of Sydney Harbour sediment ». *Sci. Total Environ.*, 156 : 119-131.

- McDaniels, A.E., A.L. Reyes, L.J. Wymer, C. C. Rankin et G. N. Stelma (1993). «Genotoxic activity detected in soils from a hazardous waste site by the Ames test and the SOS colorimetric test». *Environ. and Mol. Mut.*, 22: 115-122.
- Mersch-Sundermann, V., S. Mochayedi et S. Kevekordes (1992). «Genotoxicity of polyaromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37». *Mutat. Res.*, 278: 1-9.
- Metcalf, C.D., G.C. Balch, V.W. Cairns et J.D. Fitzsimons (1990). «Carcinogenic and genotoxic activity of extracts from contaminated sediments in western Lake Ontario ». *Sci. Total Environ.*, 94: 125-141.
- Nagler, J.J., A. Lacroix, M. Fournier, K. Lee, M. Lebeuf et D. G. Cyr (1998). *Toxicological characterization of marine sediments from baie des Anglais on the St. Lawrence Estuary*. Sous presse.
- Nikaido, H. et M. Vaara (1985). «Molecular basis of bacterial outer membrane permeability ». *Microbiol. Rev.*, 49: 1-32.
- Oishi, S. et O. Takahashi. (1987). «Mutagenicity of Tama river sediments ». *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 39: 696-700.
- Ontario Ministry of the Environment (1988). *Guidelines for the management of dredged material*. Ontario Ministry of the Environment, Toronto, Canada.
- Pardos, M., C. Benninghoff, R.L. Thomas et S. Khim-Heang (1998). «Confirmation of elemental sulfur toxicity to Microtox® in organic extracts of freshwater sediments ». Sous presse.
- Quillardet, P. et M. Hofnung (1993). «The SOS Chromotest: a review». *Mutat. Res.*, 297: 235-279.
- Quillardet, P. et M. Hofnung (1985). «The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins, procedures ». *Mutat. Res.*, 147: 65-78.
- Quillardet, P., C. Bellecombe et M. Hofnung (1985). «The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins validation study with 83 compounds». *Mutat. Res.*, 147: 79-95.
- Rao, S.S., B.K. Burnison, D.A. Rokosh et C.M. Taylor (1994). «Mutagenicity and toxicity assessment of pulp mill effluent ». *Chemosphere*, 28: 1859-1870.
- Reifferscheid, G., J. Heil, Y. Oda et R.K. Zahn (1991). «A microplate version of the SOS / umu-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples ». *Mutat. Res.*, 253: 215-222.

- Reynoldson, T.B. et M.A. Zarull (1993). « An approach to the development of biological sediment guidelines », dans S. Woodley, J. Kay et G. Francis (Éds), *Ecological integrity and the management of ecosystems*. St. Lucie Press, Boca Raton, Fla. Pp. 177-200.
- Samoiloff, M.R., J. Bell, D.A. Birkholz, G.R.B. Webster, E.G. Arnoff, R. Pulak et A. Madrid. (1983). « Combined bioassay-chemical fractionation scheme for the determination and ranking of toxic chemicals in sediments ». *Environ. Sci. Technol.*, 17: 329-334.
- Sato, T., T. Momma, Y. Ose, T. Ishikawa et K. Kato (1983). « Mutagenicity of Nagara river sediment ». *Mutat. Res.*, 118: 257-67.
- Svenson, A., E. Edsholt, M. Ricking, M. Remberger et J. Röttorp (1996). « Sediment contaminants and Microtox[®] toxicity tested in a direct contact exposure test ». *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 11: 293-300.
- U.S. EPA (1986). *Test Method for Evaluating Solid Waste. Volume 1A through 1C - Laboratory Manual* (3rd Edition). U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC. Report EPA/SW-846.
- U.S. EPA (1977). *Guidelines for the classification of Great Lakes harbor sediments*. U.S. Environmental Protection Agency, Region V. Chicago, IL. 7 pages.
- Vargas, V.M.F., R.R. Guidobono, C. Jordão et J.A.P. Henriques (1995). « Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures ». *Mutat. Res.*, 343: 31-52.
- Venitt, S., C. Crofton-Sleigh et R. Forster (1984). « Bacterial mutation assays using reverse mutation », dans S. Venitt et J.M. Parry (Éds), *Mutagenicity testing: a practical approach*. IRL Press, Washington, DC. Pp. 45-98.
- von der Hude, W., C. Behm, R. Gürtler et A. Basler (1988). « Evaluation of the SOS Chromotest ». *Mutat. Res.*, 203: 81-94.
- Walker, G.C. (1987). « The SOS response of Escherichia coli », dans F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, B. Magasanik, K.B. Low, M. Schaechter et H.E. Umbarger (Éds), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium, cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washigton, DC. Pp. 1346-1357.
- West, W.R., P.A. Smith, G.M. Booth, G.M. Booth et M.L. Lee (1988). « Isolation and detection of genotoxic components in a Black River sediment ». *Environ. Sci. Technol.*, 22: 224-28.
- West, W.R., P.A. Smith, G.M. Booth et M.L. Lee (1986). « Determination of genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons in a sediment from the Black River (Ohio) ». *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15: 241-249.

- White, P.A., J.B. Rasmussen et C. Blaise (1998a). « Genotoxic substances in the St. Lawrence system I: Industrial genotoxins sorbed to particulate matter in the St. Lawrence, St. Maurice, and Saguenay Rivers, Canada ». *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 286-303.
- White, P.A., J.B. Rasmussen et C. Blaise (1998b). « Genotoxic substances in the St. Lawrence system II: Extracts of fish and macroinvertebrates from the St. Lawrence and Saguenay Rivers, Canada ». *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 304-316.
- White, P.A., J.B. Rasmussen et C. Blaise (1996). « Sorption of organic genotoxins to particulate matter in industrial effluents ». *Environ. Mol. Mutagen.*, 27: 140-151.
- Xu, H. H. et K. M. Schurr (1990). «Genotoxicity of 22 pesticides in microtitration SOS Chromotest». *Toxicity Assessment*, 5: 1-14.

Annexe 1

Teneurs en contaminants organiques des sédiments à l'étude

Les teneurs en HAP totaux et en BPC dans les sédiments de la baie des Anglais diminuent au fur et à mesure qu'on s'éloigne de la rive. Le site BA-1 comporte des concentrations de HAP, BPC et dioxines et furannes chlorés (polychlorodibenzo-p-dioxines ou PCDD et polychlorodibenzofurannes ou PCDF) qui dépassent celles mesurées au site BA-2 par des facteurs respectifs de 12, 10 et 8 et celles du site BA-3 par des facteurs de 98, 104 et 18. En revanche, les niveaux théoriques de HAP dans les sédiments HS-3 sont supérieurs à ceux retrouvés aux sites de la baie des Anglais d'environ un à trois ordres de grandeur. En ce qui concerne les autres classes de paramètres (BPC et PCDD), il n'est pas possible de comparer les teneurs entre les sédiments de la baie des Anglais et ceux des SRC puisque les paramètres pour lesquels des données ont été compilées ne sont pas identiques d'un sédiment à l'autre.

Composition chimique en contaminants organiques des sédiments à l'étude

Paramètres	Baie des Anglais *			SRC **	
	BA-1	BA-2	BA-3	HS-2	HS-3
HAP ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ sec}$)					
Naphtalène	0,193	0,018	0,004	ND	9,000 \pm 0,700
Acénaphthylène	0,008	0,001	-	ND	0,300 \pm 0,100
Acénaphthène	0,492	0,044	0,005	ND	4,500 \pm 1,500
Fluorène	0,480	0,045	0,005	ND	13,300 \pm 3,100
Phénanthrène	3,850	0,390	0,043	ND	85,000 \pm 20,000
Anthracène	0,024	0,009	0,005	ND	13,400 \pm 0,500
Fluoranthène	6,850	0,722	0,093	ND	60,000 \pm 9,000
Pyrène	5,350	0,563	0,076	ND	39,000 \pm 9,000
Benzo(a)anthracène	3,650	0,343	0,066	ND	14,600 \pm 2,000
Chrysène	6,090	0,051	0,002	ND	14,100 \pm 2,000
Benzo(b)fluoranthène	4,270	0,313	0,042	ND	7,700 \pm 1,200
Benzo(k)fluoranthène	2,090	0,005	0,002	ND	2,800 \pm 2,000
Benzo(e)pyrène	2,350	0,063	0,035	ND	ND
Benzo(a)pyrène	3,710	0,008	0,001	ND	7,400 \pm 3,600
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	1,340	0,108	0,018	ND	5,400 \pm 1,300
Dibenz(a,c)anthracène	0,268	0,020	-	ND	ND
Dibenz(a,h)anthracène	0,056	0,004	-	ND	1,300 \pm 0,500
Benzo(ghi)pérylène	0,031	0,002	0,019	ND	5,000 \pm 2,000
Congénères de BPC ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ sec}$)					
77	7,000	0,740	0,090	ND	ND
101	ND	ND	ND	5,420 \pm 3,400	ND
105	43,000	3,030	0,280	ND	ND
118	31,000	4,460	0,410	ND	ND
126	0,230	0,020	0,002	ND	ND
138	ND	ND	ND	6,920 \pm 5,200	ND
151	ND	ND	ND	1,370 \pm 0,070	ND
153	ND	ND	ND	6,150 \pm 0,670	ND
169	0,003	0,001	0,000	ND	ND
170	ND	ND	ND	1,070 \pm 0,150	ND
180	ND	ND	ND	3,700 \pm 0,330	ND
194	ND	ND	ND	0,610 \pm 0,070	ND
196	ND	ND	ND	1,130 \pm 0,120	ND
199	ND	ND	ND	1,390 \pm 0,090	ND
209	ND	ND	ND	0,900 \pm 0,140	ND

Paramètres	Baie des Anglais *			SRC **	
	BA-1	BA-2	BA-3	HS-2	HS-3
PCDD, PCDF (pg.g⁻¹ sec)					
2,3,7,8-T ₄ CDD	< 0,03	0,06	< 0,03	ND	ND
T ₄ CDD	4,10	1,40	0,80	ND	ND
1,2,3,7,8-P ₅ CDD	0,34	0,14	0,10	ND	ND
P ₅ CDD	3,90	1,30	1,00	ND	ND
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDD	0,36	0,14	0,10	ND	ND
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDD	0,78	0,70	0,30	ND	ND
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDD	0,69	0,57	0,30	ND	ND
H ₆ CDD	7,70	6,50	3,20	ND	ND
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDD	15,00	8,60	5,10	ND	ND
H ₇ CDD	28,00	17,00	10,00	ND	ND
OCDD	76,00	45,00	27,00	ND	ND
2,3,7,8-T ₄ CDF	200,00	11,60	1,60	ND	ND
T ₄ CDF	710,00	46,00	8,00	ND	ND
1,2,3,7,8-P ₅ CDF	28,00	2,10	0,30	ND	ND
P ₅ CDF	240,00	17,00	3,00	ND	ND
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDF	20,00	1,70	0,50	ND	ND
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDF	2,80	0,50	0,20	ND	ND
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDF	0,50	< 0,03	< 0,03	ND	ND
2,3,4,6,7,8-H ₆ CDF	1,80	0,40	0,20	ND	ND
H ₆ CDF	40,00	6,50	3,20	ND	ND
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDF	7,90	4,90	3,40	ND	ND
1,2,3,4,7,8,9-H ₇ CDF	0,60	0,20	0,10	ND	ND
H ₇ CDF	14,00	9,00	6,00	ND	ND
OCDF	14,00	6,00	3,00	ND	ND

* Données fournies par Nagler *et al.* (1998).

** Données fournies par le Conseil national de recherches Canada (CNRC).

- = non détecté; ND = non disponible.

Annexe 2

Résidu insoluble dans le dichlorométhane et retenu sur les membranes de 0,45 μm

Le pourcentage de résidu retenu sur la membrane de 0,45 μm a été évalué pour l'ensemble des sédiments. Une comparaison des pourcentages de résidus et des teneurs en fer et en zinc mesurées dans ces derniers indique que plus le résidu est important, plus les teneurs en métaux sont élevées. En admettant que le résidu soit composé de matière organique, tels que des acides humiques et fulviques, un mécanisme expliquant la présence de métaux lourds dans les résidus peut être proposé : les acides humiques ont la capacité de chélater une partie des métaux lourds dans les sédiments. Le complexe ainsi formé serait plus soluble dans le dichlorométhane que le métal non complexé. Une fois le complexe extrait dans le dichlorométhane, celui-ci précipiterait sous forme de résidu, particulièrement sous l'action de la concentration par évaporateur rotatif. Le résidu serait ainsi constitué de substances organiques et de métaux.

Pourcentage de résidu insoluble dans le dichlorométhane des extraits bruts de sédiments

Baie des Anglais	% de résidu	Sédiments de référence certifiés	% de résidu
BA-1	0,26	HS-2	0,42
BA-2	0,12	HS-3	1,37
BA-3	nil		

Théoriquement, la sommation des concentrations mesurées pour un paramètre donné dans le résidu et les deux fractions obtenues par chromatographie d'exclusion devrait être équivalente à la teneur rapportée pour l'extrait non fractionné. Les résultats indiquent toutefois que, pour l'ensemble des sédiments et paramètres étudiés, la sommation des trois concentrations (résidu+F1+F2) est supérieure à la teneur rapportée pour la fraction F_0 . Il est raisonnable de croire que l'analyse des métaux ait sous-estimé les teneurs dans l'extrait non fractionné. En effet, le résidu, principalement constitué de colloïdes, aurait précipité au fond des éprouvettes (il n'aurait donc pas été prélevé dans l'aliquote de la F_0) et n'aurait pas contribué à l'analyse de métaux dans cette fraction. Ces faits supportent l'hypothèse avancée précédemment, à savoir que les métaux lourds ont tendance à précipiter sous forme de résidu dans l'extrait non fractionné.