

11-02-97

CSL-5508
SC0701 M45e
ex. 2

Estimation du potentiel toxique des sédiments d'eau douce à l'aide d'un essai de contact direct avec des micro-algues

Lucie Ménard

Section écotoxicologie et chimie environnementale

CENTRE DE DOCUMENTATION CSL
105, MCGILL, 2ième étage
MONTREAL (Québec) H2Y 2E7
Tél. (514) 283-2762
Fax: (514) 283-9451

Centre Saint-Laurent
Conservation de l'environnement
Environnement Canada

Décembre 1996

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 :

Lucie Ménard, 1996. *Estimation du potentiel toxique des sédiments d'eau douce à l'aide d'un essai de contact direct avec des micro-algues*. Environnement Canada - Région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent. Rapport scientifique et technique ST-71, 43 pages.

© Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1996

N° de catalogue En 153-86/1996F

ISBN 0-662-81678-1

Perspective de gestion

Ce rapport est publié dans le cadre du plan d'action fédéral-provincial Saint-Laurent Vision 2000 (SLV 2000). Afin de mieux servir les stratégies de protection de l'écosystème du fleuve Saint-Laurent, l'unité de recherche en bioanalyse de la section écotoxicologie et chimie environnementale compte parmi ses mandats le développement d'essais biologiques capables d'évaluer l'impact des sédiments contaminés sur les organismes aquatiques. Les essais biologiques serviront à l'évaluation de la qualité des sédiments, à l'établissement de normes de protection pour la vie aquatique et à l'identification de lieux contaminés prioritaires dans le but d'efforts d'assainissement. Ils s'insèrent dans le volet d'aide à la prise de décision afin de fournir des outils permettant aux gestionnaires de prendre des résolutions en matière environnementale.

Le présent rapport décrit les résultats d'une recherche entreprise afin de déterminer le potentiel toxique de sédiments dulcicoles à l'aide d'un essai de contact direct utilisant l'algue *Selenastrum capricornutum*.

Management Perspective

This report is published as part of the federal-provincial St. Lawrence Vision 2000 action plan (SLV 2000). In order to better serve the ecosystem-protection strategies targeting the St-Lawrence River, one of the mandates of the bioanalytic research group of the Ecotoxicology and Environmental Chemistry Section, St. Lawrence Centre, Environment Canada, is the development of bioassays for use in assessing the impact of contaminated sediments on aquatic organisms. These bioassays will serve to assess sediment quality, establish standards for the protection of aquatic life and identify priority contaminated sites. This work comes under the Decision-Support component of SLV 2000, with the aim of providing managers with the tools to undertake environmentally-sound decisions.

This report presents the results of a study to determine the toxic potential of freshwater sediments on the alga *Selenastrum capricornutum* using a direct-contact assay.

Résumé

Ce rapport décrit la méthodologie développée dans le but d'évaluer le potentiel toxique de sédiments d'eau douce à l'aide d'un essai utilisant des micro-algues. Lors de l'essai, les algues sont directement exposées aux sédiments favorisant ainsi leur contact avec les contaminants. L'exposition par contact direct reflète l'aspect innovateur de l'essai.

L'algue *Selenastrum capricornutum* a été choisie comme espèce étalon et la diminution de la fluorescence (liée à l'inhibition de l'activité des estérases et à la perte d'intégrité membranaire) a été retenue comme variable d'effet. Le paramètre d'effet mesuré est la CE_{50} , concentration efficace qui diminue la fluorescence de 50 %. L'activité estérasique et l'intégrité membranaire sont révélées à l'aide d'un fluorochrome, le diacétate de fluorescéine (DAF). L'intensité de fluorescence émise par les cellules est mesurée à l'aide d'un cytomètre en flux. Cet appareil présente l'avantage de quantifier spécifiquement les signaux optiques diffusés par chacune des cellules tout en éliminant le bruit de fond causé par les particules sédimentaires. La cytométrie en flux peut également analyser plusieurs signaux optiques à la fois et enregistrer les informations d'un nombre important de cellules dans un court laps de temps. Toutes ces caractéristiques ont privilégié le choix de cet appareil.

La première phase du projet visait l'optimisation des conditions expérimentales. Ainsi, on a pu démontrer qu'une densité cellulaire de 1×10^6 cellules / mL en présence de 10 % p/v de sédiment s'avérait adéquate pour les lectures cytométriques. La concentration optimale de DAF, permettant d'évaluer l'activité estérasique, a été établie à 30 μ M.

Dans un deuxième temps, des sédiments de référence contaminés à différents degrés ont servi à valider l'essai. Une carte de contrôle a également été produite à partir des résultats recueillis suite à une série d'essais réalisés sur un sédiment contaminé avec des métaux. En règle générale, les essais ont mis en évidence que les contaminants métalliques agissaient plus rapidement sur la diminution de la fluorescence des algues que les contaminants organiques. L'essai biologique s'est également avéré sensible à démarquer la toxicité des sédiments entre eux.

Abstract

This report describes a biological method developed to assess the toxic potential of freshwater sediments using micro-algae. In test, the algae were exposed to sediments to stimulate contact with the contaminants. The aspect of direct exposure is what distinguishes this innovative assay.

The alga *Selenastrum capricornutum* was selected as the standard species and diminished fluorescence (associated with inhibited esterase activity and the loss of membrane integrity) was chosen as the variable of effect. The measured parameter of effect is EC_{50} , the effective concentration that reduces fluorescence by 50 %. Esterase activity and membrane integrity are detected using a fluorochrome, fluorescein diacetate. The intensity of fluorescent light emitted by these cells is measured with a flow cytometer. This apparatus has the advantage of specifically quantifying the optical signals diffused by each cell while eliminating the background noise caused by sediment particles. The flow cytometer is also able to analyse several optical signals simultaneously and record information on a large number of cells in a short lapse of time. The flow cytometer was selected for all these reasons.

The aim of the first phase of the project was to optimize experiment conditions. We were thus able to show that a cell density of 1×10^6 cells/ mL in 10 % p/v of sediment is adequate for cytometric readings. The optimal concentration of fluorescein diacetate — the level which esterases activity could be assessed — was set at 30 μ M.

For the second part, reference sediments at various degrees of contamination were used to validate the assay. A control chart was also produced based on the results of a series of assays conducted on metal-contaminated sediments. In general, the assays pointed up the fact that metals diminish fluorescence in algae at a faster rate than do organic contaminants. The bioassay also proved to be capable of identifying varying degrees of toxicity among sediments.

Table des matières

RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VI
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	X
1 INTRODUCTION	1
1.1 Problématique	1
1.2 Les indicateurs de stress chez les organismes aquatiques	3
1.3 Les estérases et le diacétate de fluorescéine	3
1.4 La cytométrie en flux	4
2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	5
2.1 Matériel	5
2.1.1 Culture des algues	5
2.1.2 Solutions de travail	5
2.1.2.1 Diacétate de fluorescéine (DAF)	5
2.1.2.2 Bicarbonate de sodium	5
2.2 Méthode	6
2.2.1 Procédures de l'essai de diminution de la fluorescence chez l'algue	6
2.2.1.1 Préparation de la suspension d'algues	6
2.2.1.2 Préparation des concentrations d'essais	6
2.2.1.3 Mesure de la fluorescence liée à l'activité estérasique et à l'intégrité membranaire	7
2.2.1.4 Traitement des données	11
2.3 Travaux exploratoires	13
3 RÉSULTATS ET DISCUSSION	16
3.1 Ségrégation des algues par cytométrie	16
3.2 Sélection des concentrations d'algues et de sédiments	23
3.3 Cinétiques estérasiques	24

3.4	Contrôle de qualité	26
3.4.1	Carte de contrôle	26
3.4.2	Évaluation du seuil d'effet	28
3.5	Application de l'essai sur des sédiments frais	30
3.6	Application de l'essai sur des sédiments de référence	31
3.7	Conclusion	38

REMERCIEMENTS	39
----------------------	-----------

RÉFÉRENCES	40
-------------------	-----------

Liste des figures

1	L'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> vue par microscopie à fluorescence	2
2	Schéma des étapes du protocole de l'essai chez <i>Selenastrum capricornutum</i>	9
3	Création des marqueurs à partir des populations d'algues témoins marquées et non marquées par le DAF	12
4	Protocole expérimental de dégradation de la chlorophylle des algues par micro-ondes	14
5	Cytogrammes et histogrammes présentant la diminution de la fluorescence chlorophyllienne dans le temps	21
6	Cytogrammes présentant la taille cellulaire (FSC) en fonction de l'autofluorescence rouge (650 nm) des algues et des sédiments avec et sans la barrière optique R1	22
7	Évaluation des cinétiques estérasiques chez <i>S. capricornutum</i> pour 30 μM et 60 μM de diacétate de fluorescéine	25
8	Carte de contrôle des CE_{50} obtenues avec le sédiment de référence Sud-1 de Sudbury, INRE Burlington	27
9	Histogrammes présentant le nombre d'algues en fonction de la fluorescence verte (530 nm) liée à l'activité estérasique et à l'intégrité membranaire	29
10	Courbes de toxicité obtenues avec des sédiments de référence provenant de l'INRE, exposition de 4 heures; (A) contaminés par des métaux; (B) contaminés par des substances organiques	36
11	Courbes de toxicité obtenues avec des sédiments de référence provenant de l'INRE, exposition de 24 heures; (A) contaminés par des métaux; (B) contaminés par des substances organiques	37

Liste des tableaux

1	Préparation des concentrations d'essais pour la réalisation du test avec algues en phase solide	7
2	Tests de Student ($p \leq 0,05$) pour l'évaluation de la fluorescence verte (530 nm) chez les groupes témoin et traité aux micro-ondes avant et après incubation au DAF	18
3	Tests de Tukey ($p \leq 0,05$) pour l'évaluation de la fluorescence chlorophyllienne chez les groupes témoin et traité aux micro-ondes. Les groupes possédant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents entre eux	19
4	Conditions des essais pour la sélection des concentrations d'algues et de sédiments	23
5	CE ₅₀ obtenues pour les essais réalisés sur les sédiments du port de Montréal, du lac Saint-François et du port de Hamilton	30
6	Résultats des essais réalisés avec l'algue <i>S. capricornutum</i> sur des sédiments de référence suite à une exposition de 4 heures	32
7	Résultats des essais réalisés avec l'algue <i>S. capricornutum</i> sur des sédiments de référence suite à une exposition de 24 heures	33

Définitions

Autofluorescence. - Fluorescence intrinsèque aux cellules. Par exemple, *Selenastrum capricornutum* émet de l'autofluorescence à 650 nm (chlorophylle).

Barrières d'acquisition. - Limites inférieure et supérieure d'acquisition des données. Les données localisées à l'intérieur de ces limites sont les seules acceptées et gardées en mémoire dans le système informatique.

Événements. - Toutes particules, vivantes ou non, captées par les photomètres du cytomètre.

Fenêtre. - Terme utilisé dans le langage associé au cytomètre localisant une population cellulaire spécifique.

Milieu d'essai. - Solution de NaHCO_3 utilisée comme diluant.

Qualité optique. - Paramètres optiques spécifiques à une population cellulaire ou à un groupe de particules.

Sédiment témoin. - Sédiment non contaminé.

Sédiment d'essai. - Sédiment soupçonné d'être contaminé.

DAF. - Diacétate de fluorescéine.

CE_{50} . - Concentration efficace qui informe sur une diminution de 50% de la fluorescence liée à l'inhibition de l'activité estérasique ou à la perte d'intégrité membranaire.

FSC. - Forward side scatter, lumière diffusée à petits angles, corrélée avec la taille cellulaire.

SSC. - Side scatter, lumière diffusée à angle droit, précise la réfringence cellulaire.

FL1. - Fluorescence verte, 530 nm.

FL3. - Fluorescence rouge, 650 nm.

1 Introduction

1.1 PROBLÉMATIQUE

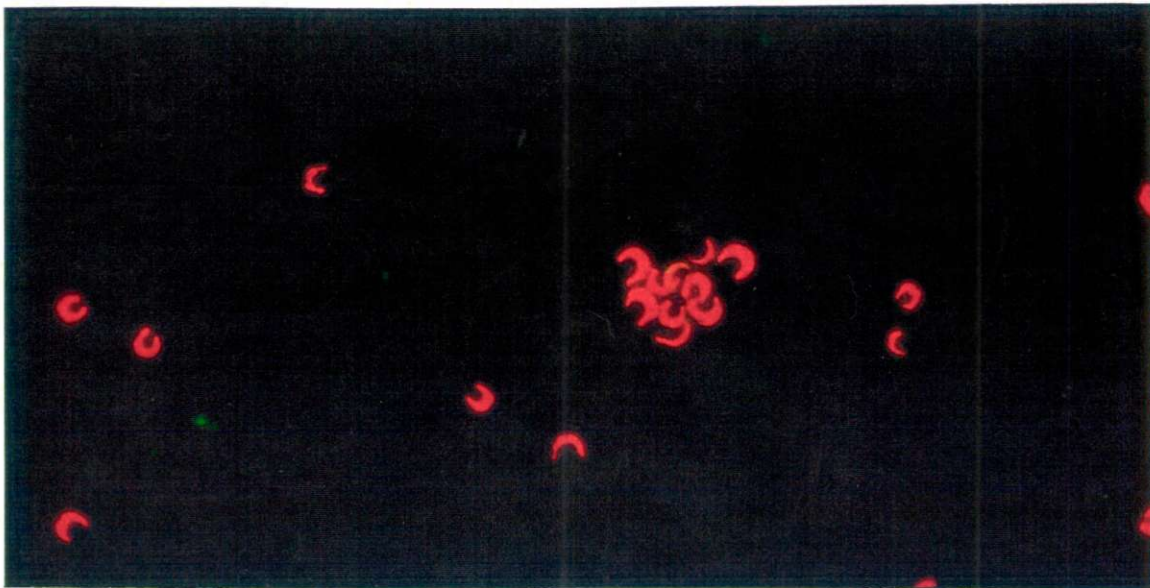
Depuis le début des années 1980, la communauté scientifique s'intéresse à la mise au point d'essais biologiques (*in situ* ou en laboratoire) pour évaluer le potentiel toxique des sédiments. Cet intérêt découle d'une meilleure connaissance des impacts des sédiments contaminés sur les écosystèmes aquatiques et de la persistance des toxiques dans le temps. Les sédiments forment en quelque sorte un puits dans lequel s'accumulent des substances nocives et constituent par la suite une source de contaminants pour le milieu aquatique. Plusieurs activités anthropogéniques, par exemple le dragage et la navigation, peuvent remettre en suspension les substances toxiques associées aux sédiments dans la zone pélagique. Par conséquent, nombre d'organismes aquatiques peuvent être affectés par cette source de pollution. Il apparaît donc essentiel de déterminer les effets nocifs qu'occasionnent ces activités sur la faune et la flore pélagiques (Burton, 1992).

Le phytoplancton est depuis longtemps reconnu pour son rôle fondamental dans la production primaire de l'écosystème aquatique (Wetzel, 1983). Son altération peut provoquer des changements dans la composition des espèces, diminuer ou augmenter le niveau de productivité primaire et ainsi perturber les niveaux d'organisation de l'écosystème. L'eutrophisation par les algues a été l'une des premières grandes préoccupations des scientifiques qui ont étudié les dommages causés au milieu aquatique. Vu son rôle capital, le phytoplancton, a été très vite considéré comme un bon indicateur pour évaluer les perturbations engendrées par les polluants. Les micro-algues servent d'ailleurs depuis longtemps d'indicateur de toxicité lors d'évaluation en laboratoire (Blaise *et al.*, 1986; Couture *et al.*, 1985; Blank *et al.*, 1984; Boyl, 1984; Chiaudani et Vigh, 1978; Miller *et al.*, 1978).

L'algue *S. capricornutum* est l'une des espèces phytoplanctoniques les plus utilisées lors d'essais en laboratoire. Cette dernière a été retenue pour l'élaboration de l'essai normalisé d'inhibition de la croissance sur 96 heures (Blaise *et al.*, 1986, Miller *et al.*, 1978). Une étude évaluant la toxicité d'élutriats de sol et de sédiments sur trois organismes aquatiques, soit le cladocère *Daphnia magna*, la bactérie luminescente *Vibrio fischeri* et l'algue *S. capricornutum*, a

permis de vérifier que cette dernière manifestait une sensibilité supérieure aux autres espèces de l'essai (Keddy *et al.*, 1994). Son ubiquité, sa sensibilité et son utilisation répandue en laboratoire ont fait de *S. capricornutum* un choix intéressant pour le développement d'un essai algal capable d'estimer le potentiel toxique de sédiments.

La figure 1 présente une photo de l'algue prise avec un microscope à fluorescence. *S. capricornutum* est une algue en forme de croissant dont la taille est de 7,5 μm de longueur par 2,1 μm de largeur. Ses dimensions lui confèrent un volume cellulaire moyen de 71,8 μm^3 (Gonçalves *et al.*, 1988).



- L'image a été grossie 400 fois

Figure 1 L'algue *Selenastrum capricornutum* vue par microscopie à fluorescence

Les tests avec phytoplancton actuellement utilisés ne peuvent mesurer que la toxicité de la phase liquide des sédiments (eau interstitielle). Malgré la pertinence de cette évaluation, la mise en évidence de la toxicité des sédiments entier pose des difficultés. Plusieurs essais effectués avec la bactérie *Vibrio fisheri* (Microtox phase solide et liquide) ont par ailleurs démontré que l'effet toxique obtenu avec l'eau interstitielle, les éluutriats et les extractions aux solvants était beaucoup plus faible que l'effet observé lors de contact direct avec des organismes (Tay *et al.*,

1992; Kwan et Dutka, 1992; Brouwer *et al.*, 1990). Ces connaissances nous ont amenées à favoriser le développement d'un essai de contact direct du phytoplancton avec les sédiments.

1.2 LES INDICATEURS DE STRESS CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES

Les organismes doivent continuellement s'adapter aux variations de leur milieu par des mécanismes permettant de maintenir leur équilibre homéostatique. Cette adaptation fait appel à la régulation de mécanismes physiologiques et (ou) biochimiques. Des études toxicologiques exploitent de tels mécanismes comme indicateurs de stress (Dumont, 1993). Par exemple, certains systèmes enzymatiques réagiront à une agression chimique. On a ainsi démontré que chez le poisson les métalloprotéines sont activées en présence d'une contamination par des métaux; dans un milieu pollué par des substances organiques, on constate une activation des oxydases à fonctions mixtes (Stegeman *et al.*, 1992). Parmi les producteurs primaires, les travaux de Byl et Klaine (1991) ont révélé que les peroxydases étaient induites chez *Hydrilla verticillata*, une plante aquatique, après une exposition aux herbicides. L'activité de la galactosidase a également été utilisée comme indicateur biochimique de stress toxique chez les algues (Peterson et Stauber, 1996). À la fin des années 1980, plusieurs chercheurs se sont intéressés aux estérases pour mettre en évidence les effets toxiques de contaminants sur le phytoplancton (Saint-Laurent et Blaise, 1995; Cachot *et al.*, 1994; Gilbert *et al.*, 1992; Ménard, 1992; Gala et Giesy, 1990; Dorsey *et al.*, 1989). Ces études ont démontré que cette classe d'enzymes répondait très bien au stress provoqué par les contaminants. Par conséquent, les estérases ont été sélectionnées comme un des indicateurs de stress chez *S. capricornutum* et le principe de l'essai repose donc en partie sur la capacité des contaminants à inhiber l'activité estérasique diminuant ainsi la fluorescence.

1.3 LES ESTÉRASES ET LE DIACÉTATE DE FLUORESCÉINE

Les estérases sont des enzymes cytoplasmiques présentes chez toutes les espèces d'algues. Le diacétate de fluorescéine (DAF) fut utilisé pour révéler leur activité (Rotman et Papermaster, 1966). Le DAF, molécule hydrophobe, pénètre facilement les algues. Il est composé de deux acétates et d'une molécule de fluorescéine. Les estérases des algues, en clivant le lien ester, permettront la libération de la fluorescéine, celle-ci étant hydrophile, elle demeurera captive du cytoplasme des cellules vivantes dont la membrane est en bon état physiologique (Dorsey *et*

al., 1989; Combrier *et al.*, 1988). La fluorescéine est une molécule qui émet dans le vert à 530 nm lorsqu'elle est excitée à 480 nm. Son intensité d'émission dépendra de l'activité des estérases, de l'état métabolique de la cellule, du pH intracellulaire et de l'intégrité membranaire (Gala et Giesy, 1990; Aeschbacher, *et al.*, 1986; Prospero, *et al.*, 1986; Persidsky et Baillie, 1977). La diminution de l'intensité de la fluorescence, mesurée à l'aide de la cytométrie en flux, permettra d'évaluer principalement la réduction de l'activité estérasique et la perte d'intégrité membranaire, puisque la fluorescéine pourra facilement s'échapper des cellules dont la membrane est endommagée.

1.4 LA CYTOMÉTRIE EN FLUX

La cytométrie en flux est utilisée depuis plus de dix ans comme outil de recherche en milieu aquatique. Ses avantages sont rapportés dans plusieurs publications relatant son utilisation dans de nombreux cadres de recherche tant au niveau écologique (Legendre et Yentsch, 1989; Olson, 1989; Li 1989) que toxicologique (Yentsch et Campbell, 1991; Cucci *et al.*, 1989; Dorsey *et al.*, 1989; Bonaly-Cantarel, 1988; Berglund et Eversman, 1988). Le développement de l'essai décrit dans le présent rapport a été possible grâce aux avantages qu'offrent la cytométrie en flux, notamment pour la ségrégation des différentes particules à partir de leurs qualités optiques spécifiques.

Le cytomètre mesure les signaux lumineux émis par chacune des particules (cellules ou autres) passant par la chambre de lecture: ce sont les paramètres optiques. Ces signaux seront mis à profit pour évaluer l'activité estérasique ou l'intégrité membranaire ainsi que pour séparer les algues des particules sédimentaires. Cinq paramètres optiques sont captés simultanément sur chacune des particules, soit la lumière diffusée aux petits angles, qui est corrélée avec la taille, la lumière diffusée à angle droit, qui permet l'étude de la réfringence et de la complexité du cytoplasme et l'émission de fluorescence à trois longueurs d'ondes (530 nm, 585 nm et 650 nm). L'intensité de chacun de ces paramètres permettra la ségrégation des particules par groupe possédant des caractéristiques optiques similaires. Ainsi, *S. capricornutum*, présentant des qualités optiques spécifiques et constantes, sera ainsi bien définie. La création de barrières autour d'un groupe (algues ou sédiments) limitera l'acquisition des données associées aux algues uniquement en éliminant le bruit de fond causé par les sédiments.

2 Matériel et méthodes

2.1 MATÉRIEL

2.1.1 Culture des algues

La micro-algue verte *S. capricornutum* utilisée pour effectuer les essais est mise en culture dans un milieu nutritif spécifique. Ce milieu contient les macro- et microéléments essentiels à sa croissance. Le pH du milieu est ajusté à $7,5 \pm 0,1$ en utilisant des solutions de HCl ou NaOH à 0,1N. Le milieu est filtré à $0,45 \mu\text{m}$ afin d'assurer sa stérilité, puis un volume de 500 mL est transféré stérilement dans un erlenmeyer de 2 L et conservé à 4°C . On obtient une culture d'algues en ajoutant dans l'erlenmeyer un inoculum de $100 \mu\text{L}$ d'algues (2×10^5 cellules/ $100 \mu\text{L}$) provenant d'une culture en phase logarithmique de croissance (c.-à-d. âgée de 5 à 7 jours). Le milieu inoculé est ensuite incubé à 24°C pendant 7 jours sous agitation (100 rpm) et luminosité continues. Pour réaliser les essais, une culture âgée de 6 à 8 jours est utilisée. Le lecteur qui voudrait en connaître plus sur l'entretien des algues est prié de se référer au rapport SPE 1/RM/25 (Environnement Canada, 1993).

2.1.2 Solutions de travail

2.1.2.1 Diacétate de fluorescéine (DAF)

Le diacétate de fluorescéine est solubilisé dans l'acétone. Dans une fiole jaugée de 100 mL, verser environ 60 mL d'acétone, ajouter 0,250 g de DAF, puis compléter avec l'acétone. On obtient ainsi une solution ayant une concentration de 6 mM de DAF. Recouvrir la fiole jaugée de papier d'aluminium afin de garder la solution de DAF à l'obscurité, puisqu'elle est photosensible. Conserver cette solution à 4°C pour une durée de 3 mois maximum.

2.1.2.2 Bicarbonate de sodium

Le bicarbonate de sodium (NaHCO_3) a servi de milieu d'essai lors de l'expérimentation. Afin de maintenir une osmolarité identique à celle du milieu de culture algal, 56,6 mg de NaHCO_3 sont ajoutés à 1 L d'eau purifiée. Le pH est ensuite ajusté à $7,5 \pm 0,1$ en ajoutant quelques gouttes d'acide chlorhydrique 1N. Cette solution doit être stérilisée à l'aide d'une

membrane filtrante de 0,45 μm , puis mise en bouteille (stérile) et conservée à 4 °C pour une période n'excédant pas quatre mois.

2.2 MÉTHODE

2.2.1 Procédures de l'essai de diminution de la fluorescence chez l'algue

2.2.1.1 Préparation de la suspension d'algues

Transférer stérilement 150 mL de la culture d'algues dans un bécher. Déterminer la concentration cellulaire tel que décrit dans la méthode n° CPQ403EO (Centre Saint-Laurent, 1996). L'essai nécessitant un volume de 350 mL d'algues à une concentration de 1×10^6 cellules/mL, le volume et la suspension d'algues finaux devront être ajustés en conséquence.

2.2.1.2 Préparation des concentrations d'essais

La réalisation de l'essai requiert 6 g de sédiments témoins et 6 g de sédiments soumis à l'essai. La préparation des tubes (20 x 150 mm) est décrite au tableau 1. Chaque concentration s'effectue en triplicata (3 x tubes par concentration).

Tous les tubes doivent être fermés hermétiquement à l'aide d'une pellicule de Parafilm™, puis placés dans un agitateur à rotation verticale continue (20 à 25 RPM). L'exposition se réalise à la température de la pièce (24 °C) pendant 4 et 24 heures.

La figure 2 présente une schématisation des étapes à suivre pour la réalisation de l'essai.

Tableau 1
Préparation des concentrations d'essais pour la réalisation du test avec algues en phase solide

Identification des tubes	Suspension d'algues (mL)	Sédiments (g)	Concentration de sédiments (% p/v)
Témoin algues	10	0	0
Témoin sédiments	0	1	10
Témoin algues et sédiments	20	2**	10
10 %	20	2***	10
5 %	10	10	5
2,5 %	10	10	2,5
1,25 %	10	10	1,25
0,63 %	10	10	0,63
0,31 %	10	10	0,31
0,16 %	10	10	0,16

* Ajouter 10 mL de NaHCO₃

** Agiter le tube et en retirer 10 mL.

*** Faire des dilutions en série 1 : 2 à partir du tube identifié 10 % jusqu'à 0,16 % en retirant 10 mL (dilution 10 : 20).

2.2.1.3 Mesure de la fluorescence liée à l'activité estérasique et à l'intégrité membranaire

Avant de procéder aux lectures cytométriques, il est nécessaire d'examiner au microscope à fluorescence le contenu des sédiments témoins et d'essais afin de vérifier s'ils renferment d'autres espèces d'algues pouvant se confondre avec *S. capricornutum*. Dans l'affirmative, il faut s'assurer qu'elles n'interfèrent pas avec les propriétés optiques de l'algue. Le témoin sédiments le confirmera.

L'exposition de 4 ou 24 h terminée, faire sédimenter cinq minutes puis effectuer les étapes suivantes :

- Retirer 2 mL de surnageant de chacune des éprouvettes contenant les sédiments d'essais à 10 % p/v. Transférer dans les tubes de lectures cytométriques (tube en polystyrène 12 x 75 mm Falcon™). Répéter ces opérations pour le sédiment d'essai à 5 % p/v, le sédiment témoin et le témoin algues.
- Passer les tubes au cytomètre en commençant par le groupe d'algues témoins afin d'évaluer l'autofluorescence verte. Après lecture du premier tube, ajouter 10 µL de la solution de diacétate de fluorescéine à 6 mM (concentration finale de DAF de 30 µM, 0,05 % acétone). Régler le temps d'incubation à 15 min au moyen d'un chronomètre. Procéder identiquement pour le groupe de sédiments témoins puis pour le groupe de sédiments d'essais à 10 % p/v et à 5 % p/v.

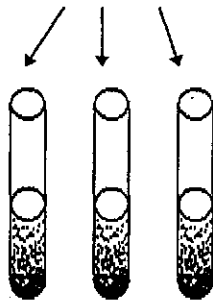
- Pendant la période d'incubation de 15 min, préparer les autres tubes cytométriques en transférant 2 mL des éprouvettes contenant de 2,5 % p/v à 0,16 % p/v de sédiments d'essais.
- L'incubation de 15 min terminée, repasser tous les tubes au cytomètre afin d'évaluer l'activité estérasique.
- Lorsque les lectures sont terminées, répéter les mêmes étapes pour les groupes restants.



Culture d'algues en phase logarithmique de croissance.
Diluer la culture avec la solution de NaHCO_3 afin d'obtenir
un volume de 350 mL à 10^6 cellules / mL



Transférer 10 mL dans chacune des éprouvettes,
à l'exception des sédiments témoins et du groupe d'essai à 10 % p/v

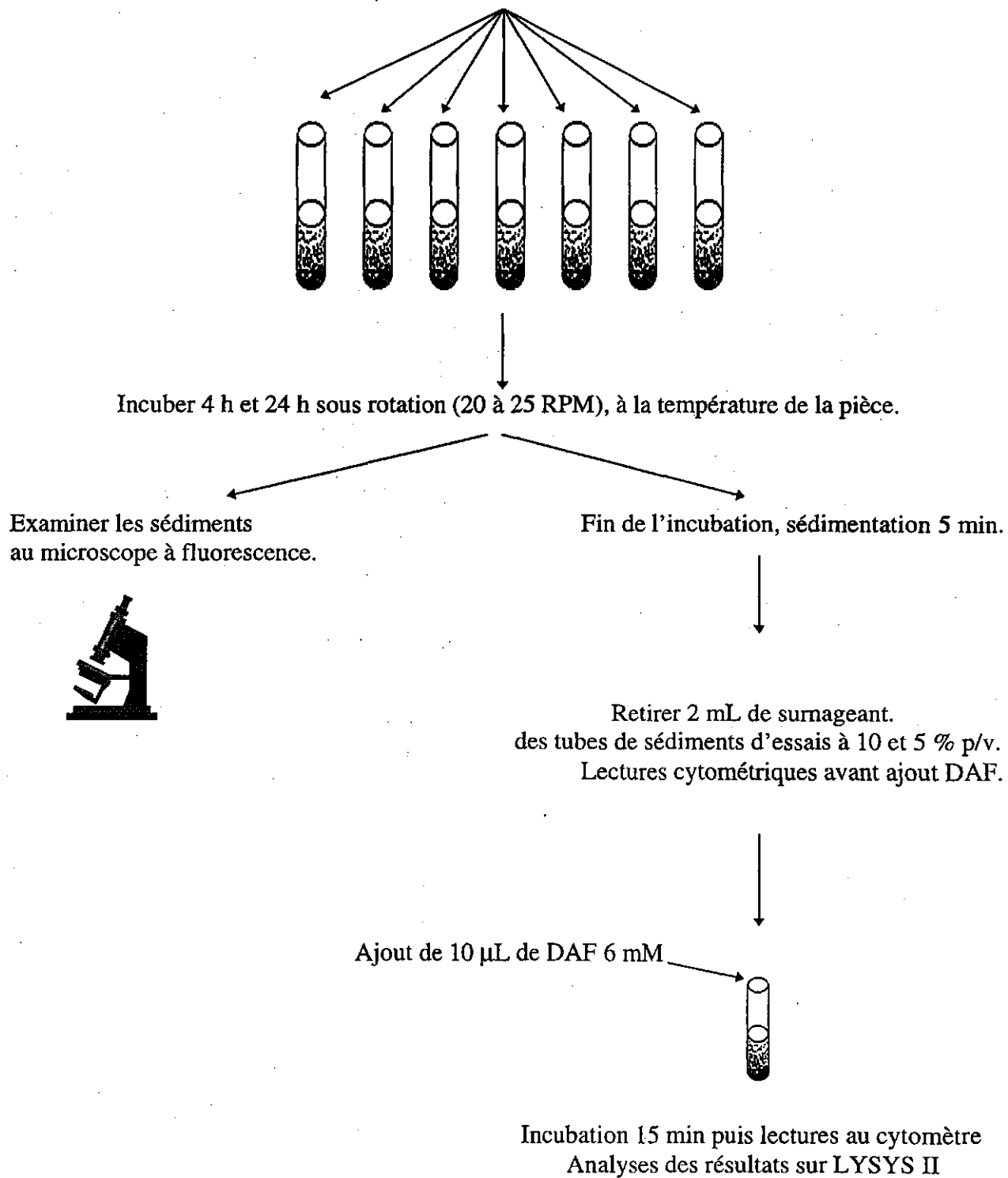


Introduire 2 g de sédiments témoins et 2 g de sédiments d'essais à 10 % p/v
dans les éprouvettes appropriées en triplicata

Ajouter 20 mL de la solution algale à 10^6 cellules / mL
dans les éprouvettes témoins et 10 % p/v de sédiments d'essais.
Effectuer les dilutions 1 : 2 à partir des éprouvettes 10 % de sédiments d'essais.

Dilutions en série (suite p. 9)

Figure 2 Schéma des étapes du protocole de l'essai chez *S. capricornutum*



2.2.1.4 Traitement des données

Utiliser le logiciel LYSYS II pour le traitement des données. La mesure de l'activité des estérases se fait telle que décrit à la section 13 de la méthode n° CPQ403EO (Centre Saint-Laurent, 1996). En voici un bref résumé :

- Créer un histogramme présentant les lectures en fluorescence verte (530 nm) de l'échantillon d'algues témoins avant et après l'ajout de DAF. Les essais étant conduits en triplicata pour chacune des concentrations, on aura donc un recouvrement ("overlay") de 6 histogrammes, c'est à dire trois avant l'ajout de DAF (mesure de l'autofluorescence) et trois après ajout de DAF.
- Sur cet histogramme, définir, à l'aide de marqueurs, la borne inférieure et supérieure de la fluorescence émise par la population d'algues après l'ajout de DAF. Créer un deuxième marqueur sur la population dont les lectures ont été prises avant l'ajout de DAF. Une figure analogue à celle présentée à la figure 3 devrait être obtenue. Sauvegarder ces marqueurs.
- En reprenant individuellement les données de chaque réplicat d'algues témoins, calculer à l'aide des marqueurs la proportion d'algues contenue dans la fenêtre 1 (marqueur 1) puis dans la fenêtre 2 (marqueur 2).
- Déterminer également le pourcentage de cellules de chacune des fenêtres pour tous les autres groupes soumis à l'essai.
- Estimer la perte de fluorescence de la façon suivante :

$$DF = \frac{St - Se}{St} \times 100$$

où DF = diminution de la fluorescence, exprimée en %

St = % moyen d'algues localisées au niveau du marqueur 1 chez le groupe algues-sédiments témoins.

Se = % moyen d'algues localisées au niveau du marqueur 1 pour un groupe d'essai.

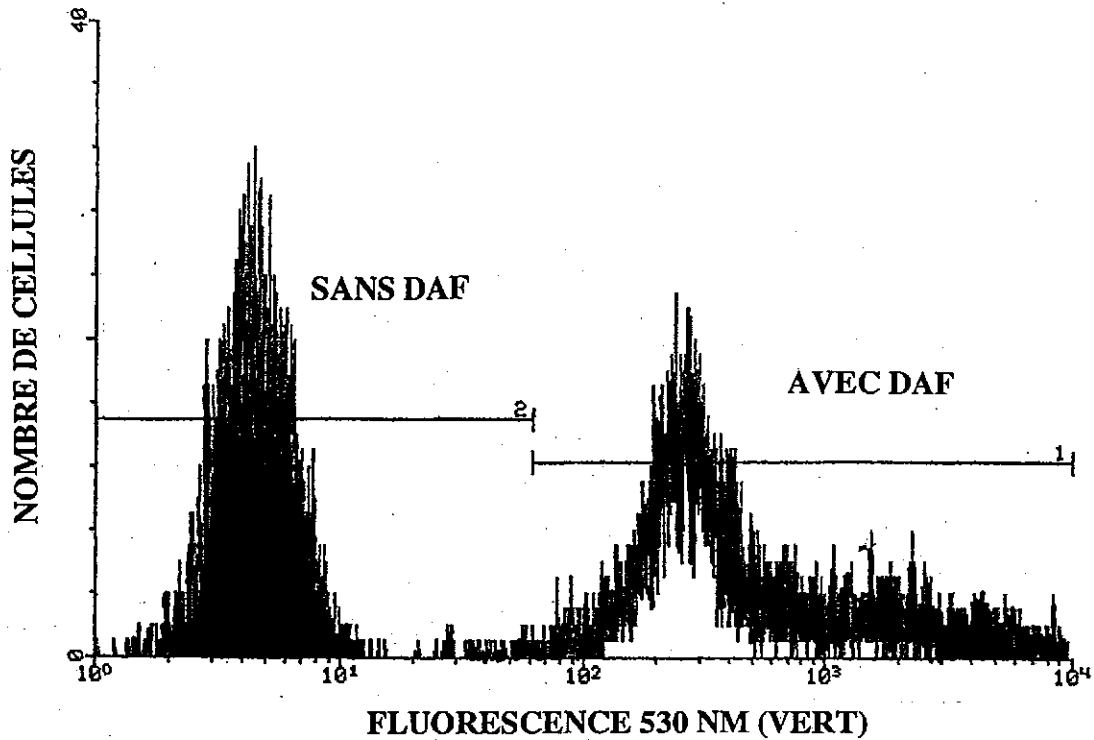


Figure 3 Création des marqueurs à partir des populations d'algues témoins marquées et non marquées par le DAF

À partir de ces calculs, une courbe concentration-réponse présentant le pourcentage de diminution de la fluorescence (en ordonnée) en fonction du pourcentage de sédiments (en abscisse) est créée. L'estimation de la concentration efficace qui diminue la fluorescence de 50 % (CE_{50}) est obtenue à l'aide d'une droite de régression tracée à partir des points localisés dans la partie linéaire de cette courbe. La régression est de type $Y = a + bX$, où Y représente le pourcentage de perte de fluorescence (50%); a représente l'ordonnée à l'origine; b , la pente de la droite de régression; et X , la concentration des sédiments (CE_{50}). L'évaluation des CE_{50} se fait par prédiction inverse selon l'équation suivante :

$$CE_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

2.3 Travaux exploratoires

Le développement d'une méthode nécessite des travaux préliminaires afin de choisir judicieusement les paramètres méthodologiques qui permettront l'obtention d'une réponse biologique optimale.

Les premières expériences s'orientent vers l'élimination du bruit de fond causé par les sédiments lors du passage de l'échantillon dans le cytomètre. Les paramètres optiques spécifiques à *S. capricornutum* permettent de bien séparer les événements associés aux algues de ceux attribuables aux sédiments. Le but de cette expérimentation est de vérifier le temps nécessaire à la disparition de la fluorescence chlorophyllienne de cellules mortes puisqu'elle constitue un des paramètres pour l'élimination du bruit de fond. Ainsi nous devons répondre à la question suivante: est-ce que les cellules mortes se confondront avec les sédiments éliminant ainsi toute possibilité de lectures cytométriques?

Les fluorescences liées au DAF et à la chlorophylle ont été évaluées sur une population d'algues témoin et traité 120 s aux micro-ondes. Des lectures cytométriques ont été effectuées sur ces deux groupes aux temps 0, 1, 2, 4 et 24 h. Afin de s'assurer de la létalité des cellules provenant du groupe traité et de la viabilité des cellules témoins, un aliquote de 100 μ L de chacun des deux groupes a étéensemencé dans un volume de 100 mL de milieu nutritif. Suite à une incubation de 96 h, la viabilité a été vérifiée par microscopie et à l'aide du cytomètre en flux. Le protocole est présenté à la figure 4.

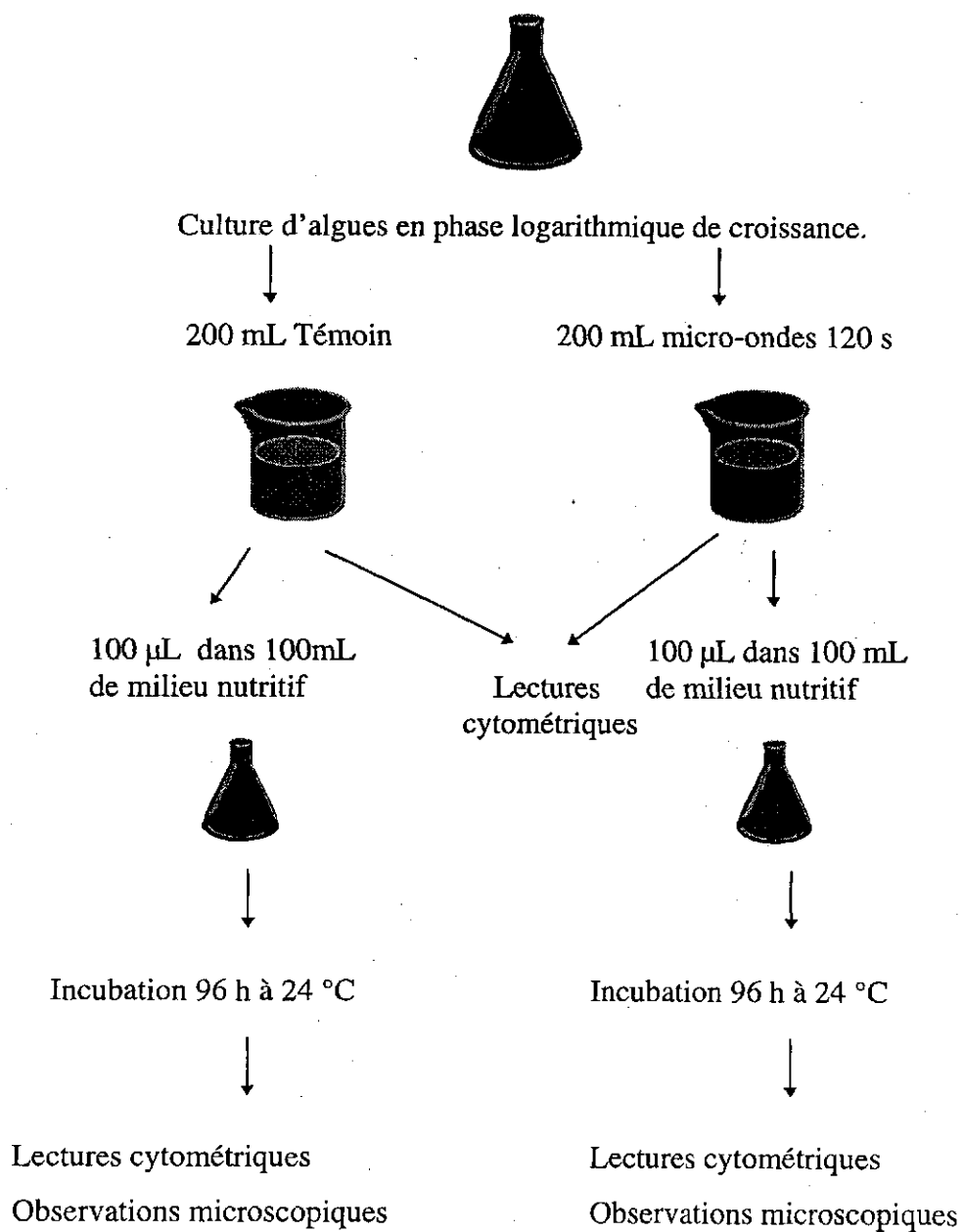


Figure 4 Protocole expérimental de dégradation de la chlorophylle des algues par micro-ondes.

Les sédiments entraînant avec eux une portion substantielle d'algues lors de la sédimentation, le maintien d'une concentration suffisante d'algues dans le surnageant pour l'analyse cytométrique est donc également capital. On doit s'assurer du passage de 2000 cellules dans la chambre de lecture du cytomètre en deçà de 2 min. Des expériences ont été réalisées afin d'estimer la quantité de sédiments maximale à introduire dans le milieu d'essai et d'évaluer l'inoculum cellulaire idéal pour les mesures cytométriques.

La recherche s'est poursuivie dans le but de sélectionner une concentration de DAF révélant l'activité estérasiqne ou la perte d'intégrité membranaire sans ambiguïté dans un court laps de temps. Des sédiments non toxiques à une concentration de 10 % p/v ont été incubés en présence de 10^6 cellules / mL pendant 4 h sous rotation continue à la température de la pièce. Des cinétiques estérasiqnes *in vivo* réalisées avec 30 et 60 μ M de DAF ont été effectuées. Des lectures cytométriques prises régulièrement suite à l'ajout de DAF ont permis de tracer les cinétiques estérasiqnes.



3 Résultats et discussion

3.1 SÉGRÉGATION DES ALGUES PAR CYTOMÉTRIE

Le succès de l'essai reposait sur la séparation des algues et des sédiments. Deux méthodes ont été évaluées dans ce but : (1) la filtration de l'échantillon et (2) la centrifugation. Aucune cependant ne s'est révélée efficace. La cytométrie en flux est alors apparue comme la seule offrant cette possibilité. L'élimination du bruit de fond s'effectue par le simple ajout de barrières optiques positionnées autour de la population désirée, soit celle des algues ou des sédiments. Le but des premières expérimentations était donc d'isoler les algues baignant parmi les particules sédimentaires par l'addition de barrières optiques.

Il fallait au préalable s'assurer que les particules sédimentaires ne bloqueraient pas le cytomètre, celui-ci n'acceptant que des particules de taille inférieure à 150 μm . Il est reconnu qu'une sédimentation de 5 min élimine les particules de sable et de limon de plus de 25 μm de diamètre (Courchesne, F. et S. Savoie, 1991). Quelques essais ont démontré qu'une sédimentation de plus de 10 min entraîne une perte substantielle d'algues, celle-ci fut donc limitée à 5 min.

Les premiers essais ont été accomplis avec des sédiments témoins provenant du lac Saint-Louis. Une solution d'algues de 4×10^6 cellules / mL baignant dans le milieu d'essai a été ajoutée aux sédiments afin d'obtenir une concentration de 10 % (p/v) de sédiments. Après une agitation de 30 s, une sédimentation de 5 min a été effectuée. Un volume de 1 mL a été prélevé du surnageant et analysé au cytomètre sans la présence de barrières optiques. Le nombre d'événements (algues et sédiments) évalué par le cytomètre était cependant trop élevé, le système informatique n'ayant pas la puissance requise pour traiter un si grand nombre de données. Une première sélection devait donc être réalisée afin d'éliminer une bonne partie des événements indésirables. Un échantillon d'algues a été passé dans l'appareil afin de mettre en place un seuil d'acquisition. Celui-ci a été effectué sur la taille cellulaire (paramètre optique FSC), limitant ainsi l'acquisition des données à tous les événements qui étaient de taille égale ou supérieure aux algues. Ce seuil a été établi à 300 unités relatives de lumière.

Afin d'éliminer complètement le bruit de fond causé par les sédiments, on a misé sur les propriétés optiques de *S. capricornutum* pour bien circonscrire la population. Ainsi, la chlorophylle (λ 650 nm) des algues a été l'un des paramètres optiques jugée le plus adéquat pour les discriminer des sédiments. La taille cellulaire (FSC) spécifique de *S. capricornutum* a également été retenue.

Notre intention étant de tracer une barrière autour de la population d'algues en fonction de la taille cellulaire et de la chlorophylle on devait savoir si la fluorescence chlorophyllienne des algues ayant subi une exposition à un sédiment toxique de 4 et 24 heures posséderaient le même patron optique que les cellules saines. Afin de répondre à cette interrogation, nous avons envisagé la pire des situations soit le cas où toutes les cellules seraient mortes après quelques heures. Des cellules algales ont donc été tuées intentionnellement par micro-ondes.

Les résultats ont confirmé la mortalité des algues du groupe traité aux micro-ondes après 96 heures d'incubation. Une observation visuelle des solutions d'algues témoin et traité a permis de constater que la solution était demeurée transparente pour le groupe traité et que le groupe témoin présentait une coloration verte évidente. Nous avons confirmé par microscopie à fluorescence qu'aucune cellule du groupe traité n'avait survécu puisqu'il ne restait que des débris cellulaires à l'inverse du groupe témoin pour qui les algues étaient abondantes et saines (fluorescence chlorophyllienne très intense). L'activité estérasiqque et l'intégrité membranaire ont aussi été vérifiées par cytométrie en flux. Ces deux paramètres ont été jugés excellents chez le groupe témoin mais puisqu'il ne restait que des débris cellulaires et qu'aucune émission de fluorescence chlorophyllienne n'a été décelée pour le groupe traité, les analyses cytométriques n'ont pu être réalisées sur ce groupe.

L'analyse à l'aide du DAF des deux paramètres (activité estérasiqque et intégrité membranaire) a fait l'objet d'un suivi dès les premières heures suite au traitement des algues aux micro-ondes. Aux temps 0, 1, 2, 4 et 24 h, des lectures cytométriques ont été prises en triplicata sur les groupes traité et témoin. Dans le but de vérifier la présence d'une augmentation de fluorescence, des tests de Student ont été effectués sur les résultats obtenus avant et après l'ajout de DAF. Une augmentation significative de fluorescence verte certifie la présence d'une activité métabolique et de l'intégrité membranaire. Le tableau 2 présente les résultats de ces tests.

Tableau 2
Tests de Student ($p \leq 0,05$) pour l'évaluation de la fluorescence verte (530 nm) chez les groupes témoin et traité aux micro-ondes avant et après incubation au DAF.

Groupes	Temps* (heures)	n	Tests statistiques
			$H_0 : x \text{ URF}^{**} \text{ sans DAF} = x \text{ URF avec DAF}$
Témoin	0	3	(10,10 = 99,02) rejetée
	1	3	(8,71 = 103,95) rejetée
	2	3	(8,48 = 148,48) rejetée
	4	3	(8,29 = 254,63) rejetée
	24	3	(6,787 = 205,88) rejetée
Traité	0	3	(9,82 = 99,147) rejetée
	1	3	(9,42 = 114,28) rejetée
	2	3	(9,00 = 65,75) rejetée
	4	3	(9,39 = 19,50) rejetée
	24	3	(14,07 = 18,80) acceptée

* : temps alloué entre chaque lecture cytométrique après le traitement aux micro-ondes

** : unités relatives de fluorescence

Selon les résultats, nous observons pour tous les groupes témoin et traité la présence d'activité estérasiq. Par contre, pour le groupe traité on assiste à une baisse graduelle de la fluorescence verte (530 nm) jusqu'à sa disparition après 24 h signifiant la perte de l'activité métabolique ou d'intégrité membranaire. Au temps 4 h, l'analyse statistique confirme une différence significative avant et après ajout du DAF. En regard des valeurs obtenues, la très faible fluorescence liée au clivage du DAF à ce temps indique un affaiblissement notable de l'activité estérasiq. ou de l'intégrité membranaire.

La fluorescence chlorophyllienne a également été mesurée par cytométrie aux cinq temps mentionnés ci-haut. Les moyennes obtenues pour chacun des groupes et les résultats des tests de comparaison multiple (Tukey $p \leq 0,05$) sont fournis au tableau 3. Ces résultats démontrent que la tendance est la même que celle observée pour la fluorescence verte, c'est à dire que l'émission de fluorescence chlorophyllienne diminue significativement après 24 h. Par contre, l'émission de fluorescence est beaucoup moins élevée (5 fois moins) chez le groupe traité par rapport au groupe témoin, et ce dès le temps 0, laissant supposer des dommages au système chlorophyllien.

Tableau 3
Tests de Tukey ($p \leq 0,05$) pour l'évaluation de la fluorescence chlorophyllienne chez les groupes témoin et traité aux micro-ondes. Les groupes possédant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents entre eux.

Groupes	Temps* (heures)	n	Moyennes FL3**	Résultats tests statistiques
Témoin	0	3	1450	a
	1	3	1454	a
	2	3	1436	a
	4	3	1386	b
	24	3	1117	b
Traité	0	3	321	c
	1	3	288	c
	2	3	271	c
	4	3	294	c
	24	3	136	d

* : temps alloué entre chaque lecture cytométrique après le traitement aux micro-ondes

** : fluorescence chlorophyllienne (650 nm)

La diminution de fluorescence chlorophyllienne est illustrée aux cytogrammes présentés à la figure 5. On observe une réduction de la fluorescence en fonction du temps chez le groupe traité par rapport au témoin. Puisque les tests seront réalisés sur une période d'exposition de 4 et 24 h, les barrières d'acquisition ne pourront être établies autour de la population d'algues étant donné qu'elle se déplace en fonction du temps et probablement de l'atteinte toxique. Il a donc été convenu d'établir les barrières d'acquisition sur les sédiments.

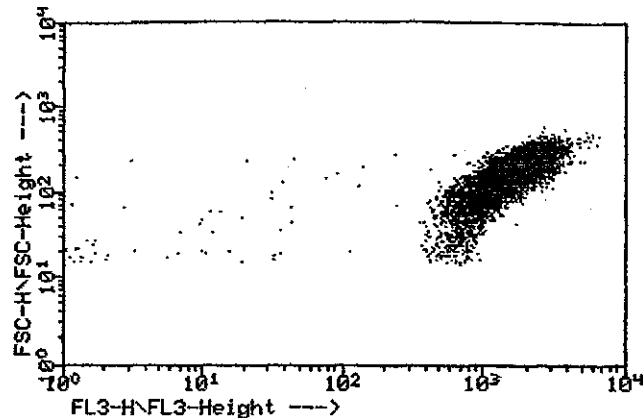
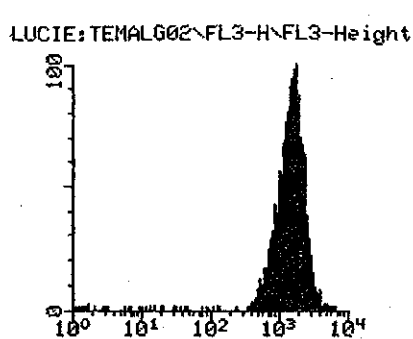
Tel que le montre la figure 6, l'utilisation de la taille cellulaire en fonction de la fluorescence chlorophyllienne s'est avérée appropriée pour circonscrire les deux groupes, soit les algues, localisées à droite du cytogramme et les sédiments situés dans la barrière R1. Précisons que l'acquisition des données a été réalisée sur 10 000 événements. Le cytogramme 1 de cette figure présente une population d'algues. Le cytogramme 2 montre des algues en présence de

sédiments. Ceux-ci n'ayant pas la même signature optique que les algues, leur séparation est facilitée. La mise en place de la barrière R1 sur les sédiments élimine presque en totalité le bruit de fond tel qu'illustrée au troisième cytogramme. Ceux-ci interfèrent très peu lors de l'acquisition des données relatives aux algues.

CYTOGRAMME 1

TEMPS : 0 H

LUCIE:TEMALG02

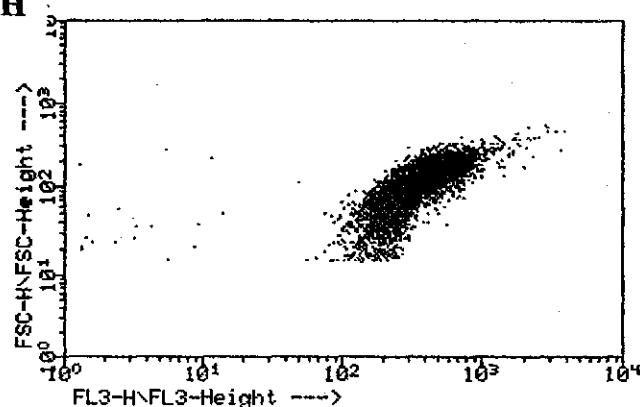
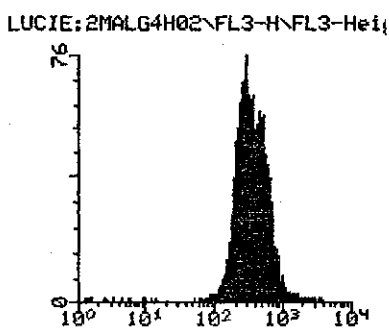


CYTOGRAMME 2

TEMPS : 4 H

LUCIE:2MALG4H02

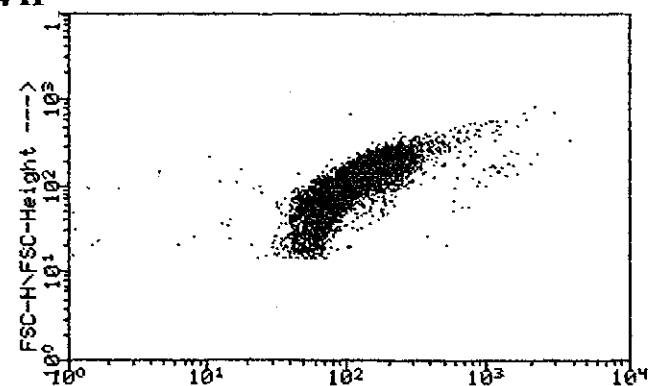
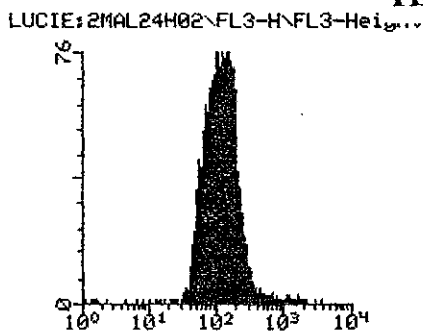
NOMBRE DE CELLULES



CYTOGRAMME 3

TEMPS : 24 H

LUCIE:2MAL24H02



FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE (FL3)

Figure 5 Cytogrammes et histogrammes présentant la diminution de la fluorescence chlorophyllienne en fonction du temps.

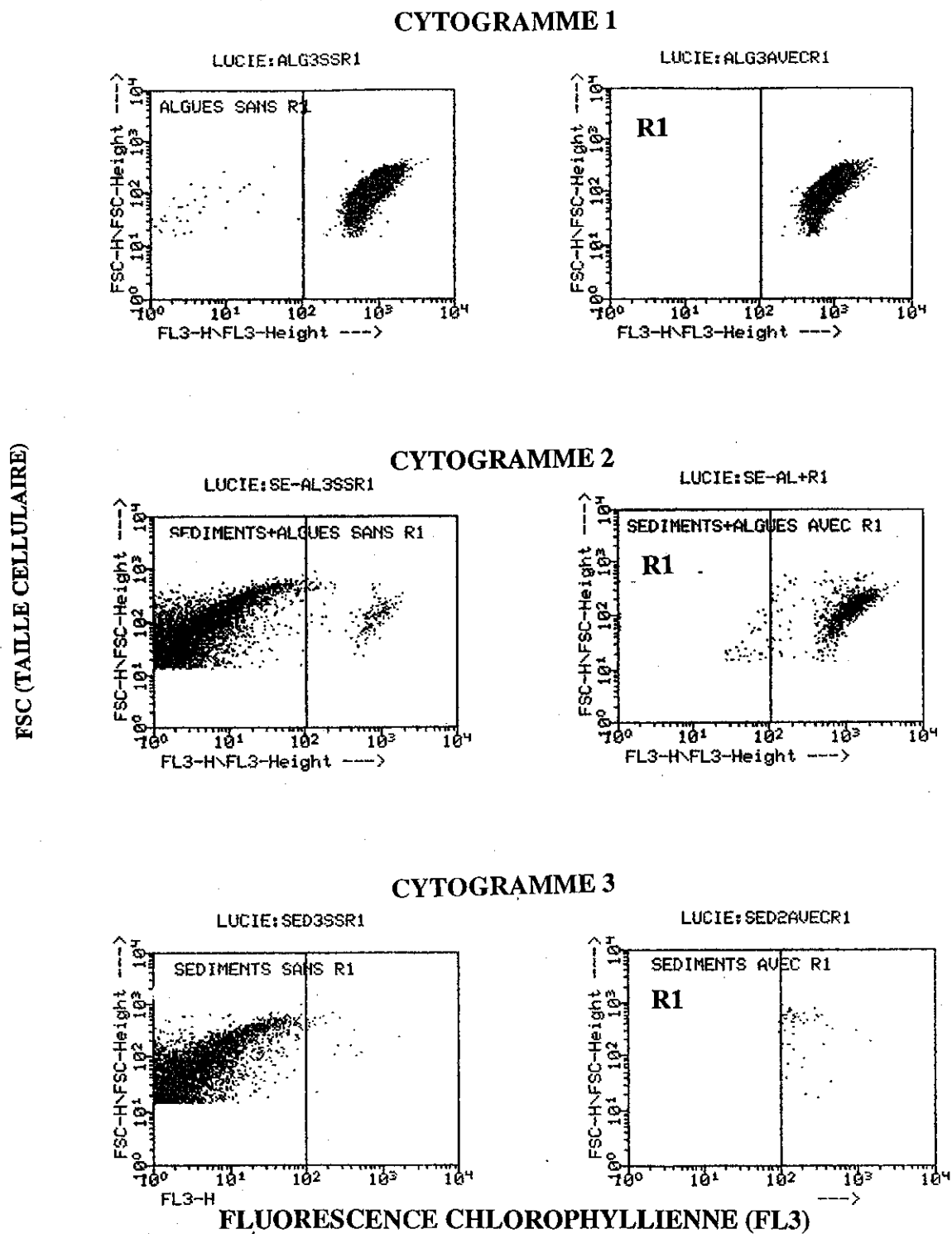


Figure 6 Cytogrammes présentant la taille cellulaire (FSC) en fonction de l'autofluorescence rouge (650 nm) des algues et des sédiments avec et sans la barrière optique R1.

3.2 SÉLECTION DES CONCENTRATIONS D'ALGUES ET DE SÉDIMENTS

La séparation des algues et des sédiments réalisée, le choix des concentrations respectives restait à fixer afin d'établir les paramètres méthodologiques optimaux et ce, dans le respect des deux principales conditions suivantes :

- un inoculum d'algues optimal qui permet l'acquisition cytométrique sur 2000 algues en deçà de 2 min en présence des sédiments;
- une concentration maximale de sédiments entraînant une perte minimale d'algues lors de la sédimentation afin de respecter la première condition.

Cinq essais ont été réalisés et sont présentés au tableau 4.

Tableau 4
Conditions des essais pour la sélection des concentrations d'algues et de sédiments

Numéro de l'essai (Condition)	Concentration de sédiments (% p/v en poids humide)	Concentration d'algues (cellules / mL)
1	10	500 000
2	10	1 000 000
3	20	1 000 000
4	50	1 000 000
5	50	4 000 000

Le temps de sédimentation fixé à 5 min a été respecté pour chacun des essais. Un volume de 1 mL du surnageant fut ensuite transféré dans les tubes pour les lectures cytométriques. Les conditions des essais 1 et 4 n'ont pas permis de bien démarquer la population d'algues au cytomètre. Dans le premier cas, la concentration d'algues était trop faible. Dans l'autre, la densité élevée des sédiments occasionnait une perte considérable de cellules lors de l'étape de sédimentation. L'essai 3 semblait plus prometteur mais le temps d'acquisition des données sur 2000 cellules était nettement supérieur à 2 min.

Pour ce qui est des conditions 2 et 5 la population d'algues était bien définie au cytomètre et le temps d'acquisition sur 2000 cellules se situait autour de 2 min, indiquant une

concentration cellulaire adéquate. Dans le cas de l'essai no 5 cependant un nombre trop élevé d'événements occasionnait des erreurs au niveau du système informatique. Les conditions liées au deuxième essai, soit une concentration de sédiments de 10 % p/v et une concentration de 1×10^6 cellules / mL, ont donc été retenues pour le protocole expérimental.

3.3 CINÉTIQUES ESTÉRASIQUES

L'activité estérasique de *S. capricornutum* a été évaluée à l'aide du DAF. L'objectif consistait à définir le temps d'incubation et la concentration de DAF optimaux. Ainsi, des cinétiques estérasiques *in vivo* ont été réalisées avec et sans la présence de sédiments. Rappelons ici que les sédiments utilisés pour effectuer ces essais provenaient du lac Saint-Louis. Les conditions des essais sont indiquées ci-après :

- 30 μ M de DAF et 10^6 cellules / mL
- 30 μ M de DAF, 10^6 cellules / mL et les sédiments (10 % p/v)
- 60 μ M de DAF et 10^6 cellules / mL
- 60 μ M de DAF, 10^6 cellules / mL et les sédiments (10 % p/v)

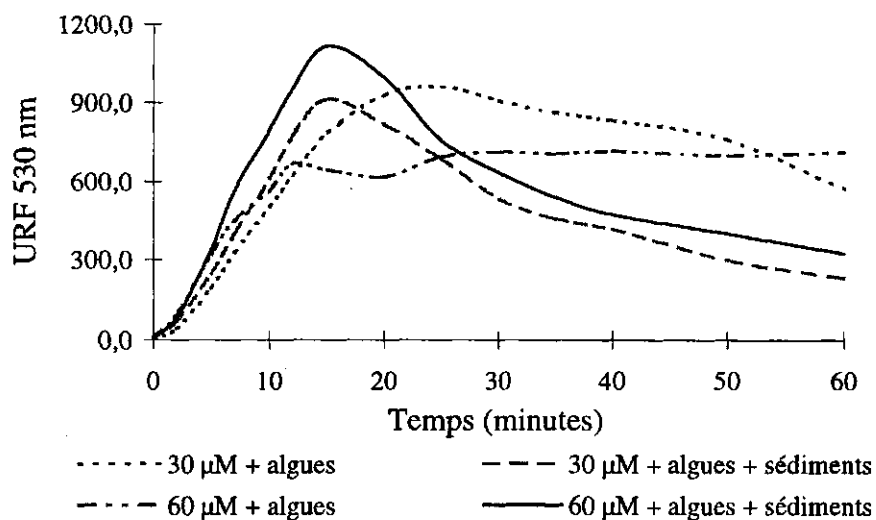


Figure 7 Évaluation des cinétiques estérasiqes chez *S. capricornutum* pour 30 μM et 60 μM de diacétate de fluorescéine. URF : unités relatives de fluorescence

Les cinétiques estérasiqes obtenues démontrent des modèles différents en fonction de la présence ou de l'absence des sédiments. Théoriquement, une courbe de cinétique enzymatique présente une phase de plateau, ou phase stationnaire, caractérisée par un équilibre entre le niveau de formation du substrat et son relargage dans le milieu (Lenhinger, 1982). Le modèle conventionnel a été obtenu pour les cinétiques estérasiqes en l'absence de sédiments. Par contre, tel que démontré à la figure 7, la présence de sédiments réduit la durée de la phase de plateau. Il y a rapidement diminution d'émission de lumière laissant supposer une perte de fluorescéine, qui pourrait résulter d'une réduction de la perméabilité membranaire causée par l'effet abrasif des sédiments sur les parois cellulaires. Il apparaît donc important d'effectuer les lectures rapidement après l'incubation de 15 minutes avec le DAF.

La fluorescence maximale pour toutes les cinétiques estérasiqes est atteinte après une exposition de 12 à 25 min au DAF. La figure 7 indique également que l'écart entre les cinétiques

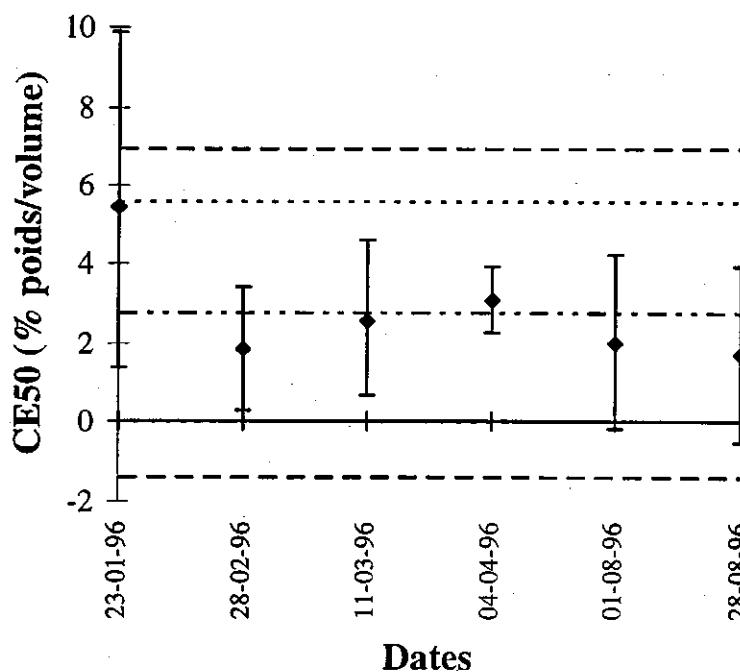
estérasiques effectuées avec 60 μM de DAF est plus grand que celui retrouvé entre les cinétiques estérasiques obtenues avec 30 μM . En présence des sédiments, les algues soumises à 60 μM de DAF émettent une fluorescence maximale tandis qu'en absence de sédiments, leur fluorescence est nettement plus faible. Le caractère hydrophobe de la molécule de DAF expliquerait en partie cette situation. L'ajout de sédiments pourrait favoriser une diminution de la polarité du milieu augmentant ainsi ses propriétés hydrophobes. Le DAF se solubiliserait donc mieux en présence de sédiments. Par contre, à une concentration de 60 μM de DAF, la solubilité dans un milieu polaire serait plus faible expliquant les valeurs peu élevées de fluorescence émise par les algues en l'absence de particules sédimentaires. Cette concentration de DAF poserait des problèmes lors de la lecture de la fluorescence pour le témoin algal qui ne contient pas de sédiments. Notre choix s'est donc fixé sur l'emploi de 30 μM de DAF. La période d'incubation a été établie à 15 minutes.

3.4 CONTRÔLE DE QUALITÉ

3.4.1 Carte de contrôle

Selon le document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité, il est recommandé d'établir une carte de contrôle également dénommée "cartes des moyennes" (Environnement Canada, 1990). Celle-ci est obtenue à partir de l'ajout dans le temps des CE_{50} calculées à partir d'un même sédiment de référence. Ce diagramme présentera la date de l'essai en abscisse et la CE_{50} en ordonnée. Une plage de variabilité admise pour les essais est ainsi calculée afin de vérifier sa fiabilité.

Une carte de contrôle, présentée à la figure 8, a été créée à partir de six essais réalisés avec le sédiment de référence Sud-1 (lac de la région de Sudbury, Ontario). Les valeurs des CE_{50} ont été obtenues suite à une exposition de 4 h. Selon l'US EPA (United States Environmental Protection Agency), l'établissement des limites d'avertissement et de contrôle ne devrait pas se faire avant la réalisation d'au moins cinq essais.



Moyenne: 2,78

Limite supérieure de contrôle : 6,95

Limite supérieure d'avertissement: 5,56

Limite inférieure d'avertissement: -0,01

Limite inférieure de contrôle: -1,4

N.B. Chaque losange représente une CE₅₀ accompagnée de ses intervalles de confiance à 95 %

Figure 8 Carte de contrôle des CE₅₀ obtenues avec le sédiment de référence SUD-1 de Sudbury, INRE Burlington

Les cinq derniers essais montrent une faible variabilité, telle que mise en évidence par le faible écart entre les valeurs des CE₅₀ et la moyenne. On se rappellera toutefois que les limites d'une carte de contrôle peuvent changer dans le temps avec la venue de nouvelles données.

La figure 9 illustre des histogrammes d'algues recueillies à la suite d'une exposition de 4 h avec le sédiment Sud-1. Ces histogrammes démontrent bien la progression de la toxicité. Rappelons que la population d'algues localisée entre le marqueur 1 possède une activité estérasiqque et une intégrité membranaire normales, contrairement à celles du marqueur 2. On notera, à la concentration de 10 % p/v de sédiments, que la fluorescence des algues est à son plus faible (marqueur 1) et qu'elle augmente au fur et à mesure que la concentration de sédiments diminue.

3.4.2 Évaluation du seuil d'effet

En chimie analytique, le seuil d'effet correspond à la limite de détection. Il représente la variabilité intrinsèque liée à l'essai. Celle-ci est due aux manipulations, à la précision des appareils, aux réactifs ou à l'état physiologique du matériel biologique utilisé. L'estimation de cette variabilité permettra de préciser une limite inférieure où la variable d'effet mesurée sera significativement différente du témoin.

Le seuil d'effet pour le présent essai a été déterminé à partir de trois essais réalisés dans le temps avec des cultures d'algues différentes. Ce seuil correspond à 8 % p/v pour les tests de 4 et 24 h. Ainsi, les valeurs de diminution de fluorescence égales ou inférieures à 8 % p/v ne peuvent être considérées comme étant significativement différentes du témoin lors de l'analyse des données. Afin de préciser la variabilité du seuil d'effet, celui-ci devra être estimé de façon périodique.

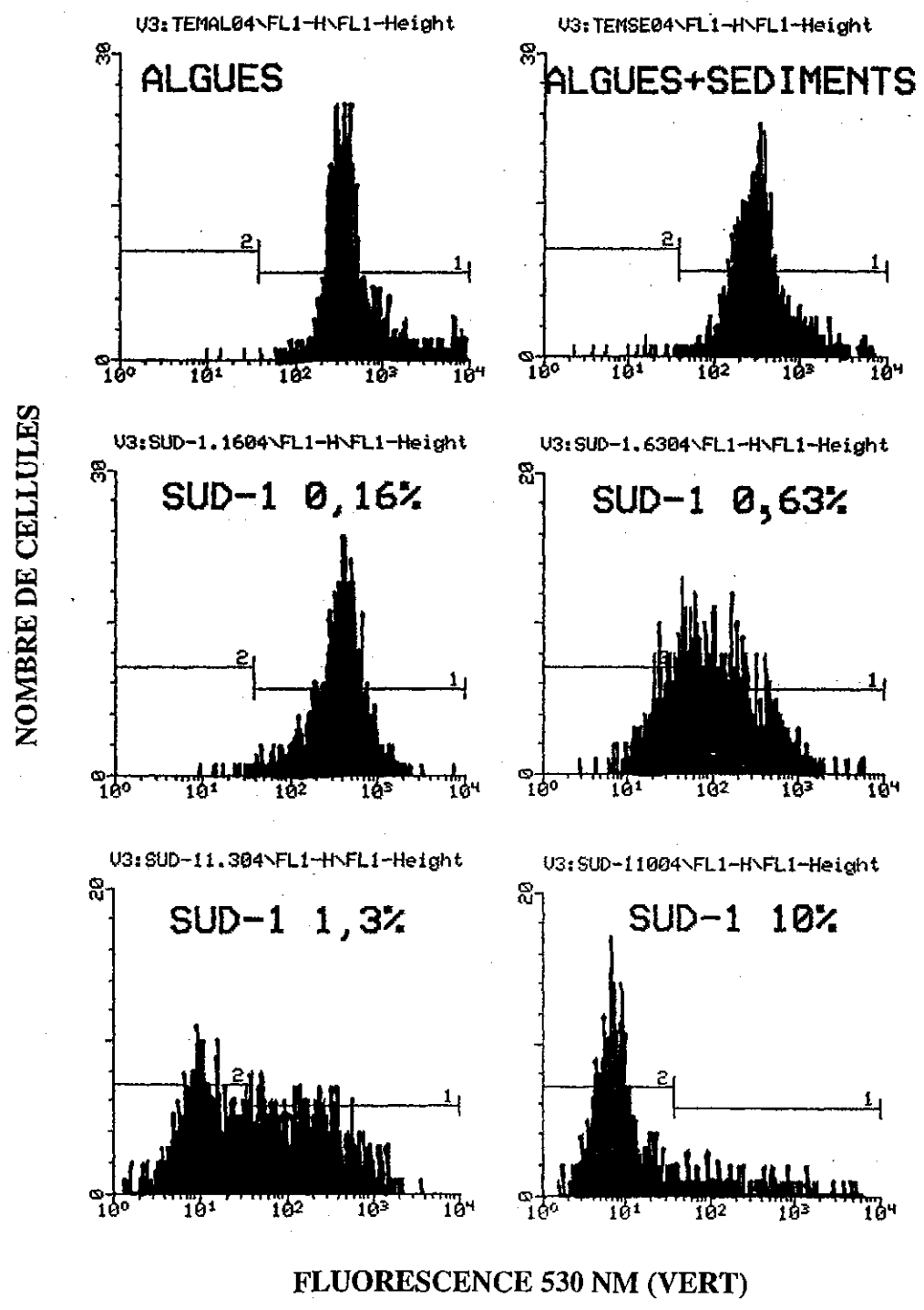


Figure 9 Histogrammes présentant le nombre d'algues en fonction de la fluorescence verte (530 nm) liée à l'activité estérasique et à l'intégrité membranaire

3.5 APPLICATION DE L'ESSAI SUR DES SÉDIMENTS FRAIS

Les premières analyses ont été réalisées sur des sédiments provenant du port de Montréal (Québec), du lac Saint-François (Québec) et du port de Hamilton (Ontario). Il s'agissait de vérifier la capacité de l'essai à discriminer la toxicité d'échantillons de sédiments de sources diverses. Trois échantillons de sédiment du port de Montréal ont été analysés en fonction du temps afin d'évaluer la fiabilité de la procédure expérimentale. Le tableau 5 présente les résultats.

Tableau 5
CE₅₀ obtenues pour les essais réalisés sur les sédiments du port de Montréal, du lac Saint-François et du port de Hamilton

Provenance des sédiments	CE ₅₀ (% p/v en sédiments) (poids humide)	Intervalle de confiance
Port de Montréal (05-12-95)	1,247	0,727 - 3,289
Port de Montréal (12-12-95)	0,748	0,942 - 2,408
Port de Montréal (23-01-96)	0,237	0,097 - 0,570
Lac Saint-François (06-06-96)	> 10	> 10
Port de Hamilton (02-02-96)	1,659	1,410 - 4,412

Un test de comparaison multiple (Kruskal-Wallis, analyse par rang) a été effectué sur les données des 5 échantillons. L'analyse a démontré que les sédiments du port de Montréal indiquaient une toxicité significativement plus élevée que ceux provenant du port de Hamilton. Aucune toxicité n'a été décelée pour le sédiment du lac Saint-François à la plus forte concentration testée (10 % p/v). Ces résultats suggèrent que l'essai permet de bien discriminer le niveau de toxicité des sédiments de sources différentes.

Il est aussi intéressant de noter que la toxicité rapportée pour les sédiments du port de Montréal augmente dans le temps. Les deux premiers essais, réalisés à deux semaines d'intervalles, ont démontré un potentiel toxique similaire. Les pentes des droites de régression le confirment (12,37 pour le premier et de 13,34 pour le deuxième). Par contre, le troisième test, effectué cinq semaines plus tard sur le même échantillon de sédiments réhomogénéisés, a indiqué

une nette augmentation de la toxicité (pente de 87,11). Ce phénomène n'est probablement pas lié à la précision de l'essai mais plutôt à des variations physico-chimiques résultant de l'entreposage prolongé des sédiments.

Il est reconnu que le temps de préservation des échantillons de sédiments à 4 °C avant l'évaluation de la toxicité par des bioessais est limité (Burton, 1995; Chapman, 1995). Il est d'ailleurs recommandé que les essais sur les sédiments soient effectués dans les deux semaines suivant l'échantillonnage. Des analyses de laboratoire ont démontré, par exemple, que les concentrations d'ammoniaque pouvaient fortement varier au cours d'une année d'entreposage et ainsi affecter la toxicité (Moore *et al.*, 1995). Ce phénomène serait cyclique et non associé aux caractéristiques géophysiques des sédiments. Il serait plutôt dû aux cycles de dégradation bactérienne des composés organiques nitrifiés (Ankley *et al.*, 1990). L'ammoniaque peut être un facteur influençant la toxicité réelle. Les changements de pH, de potentiel redox, l'activité bactérienne, *etc.*, peuvent affecter la biodisponibilité des contaminants et être responsables de changements physico-chimiques entraînant également des variations dans le niveau de toxicité.

3.6 APPLICATION DE L'ESSAI SUR DES SÉDIMENTS DE RÉFÉRENCE

Une douzaine de sédiments de référence ont été obtenus de l'Institut national de recherche sur les eaux (INRE) de Burlington. Ces sédiments ont été déshydratés et caractérisés chimiquement (Institut de recherche sur les eaux, 1995). Certains d'entre eux étaient contaminés par des composés organiques (PAH, BPC, chlorobenzène), d'autres par des métaux traces. L'essai a été réalisé en utilisant des temps d'exposition de 4 et 24 h. Les résultats des essais et des analyses chimiques sont consignés aux tableaux 6 et 7.

Tableau 6
Résultats des essais réalisés avec l'algue *S. capricornutum* sur des sédiments de référence
suite à une exposition de 4 heures

Échantillons	CE ₅₀ (% p/v)	CMEO'	CSEO''	HAP	BPC	Chlorobenzènes
	Poids sec	(% p/v)	(% p/v)	(µg / g)	(µg / g)	(µg / g)
Polluants organiques						
EC-1	0,16 (-0,27 - 0,56)	0,02	<0,02	5-20	2,00	
EC-2	0,35 (0,21 - 0,05)	0,04	0,02	0,5-3,0	1,16	0,02-0,2
EC-3	>10	5	2,5	0,1-0,5	0,66	0,05-0,25
EC-4	N.D.***	N.D.***	N.D.***	0,2-1,0	0,56	
EC-5	N.D.***	N.D.***	N.D.***	0,1-0,5	0,60	
EC-6	>10	2,5	1,25	0,02-0,2	0,105	
EC-7	>10	5	2,5	0,02-0,2	0,021	0,05-0,5
				Concentrations totales		
Polluants métalliques				As, Se, Hg	en métaux traces (µg / g)	
WQB-1	0,06 (-1,68 - 1,45)	>0,16	<0,16	oui	1-2000	
WQB-3	≥1,25	>0,16	<0,16	oui	1-1400	
TH-1	0,925 (-0,82 - 2,52)	0,31	0,16	non	1-900	
HR-1	N.D.***	1,25	0,63	non	0,3-1100	
SUD-1	1,725 (-0,53 - 3,93)	0,63	0,031	non	0,1-1000	

* Concentration minimale d'effet observé.

** Concentration sans effet observé.

*** Non déterminée, voir graphiques

Tableau 7
Résultats des essais réalisés avec l'algue *S. capricornutum* sur des sédiments de référence
suite à une exposition de 24 heures

Échantillons	CE ₅₀ (% p/v) Poids sec	CMEO [*] (% p/v)	CSEO ^{**} (% p/v)	HAP (µg / g)	BPC (µg / g)	Chlorobenzènes (µg / g)
Polluants organiques						
EC-1	0,08 (-0,16 - 0,30)	0,02	<0,02	5-20	2,00	
EC-2	0,32 (0,19 - 0,45)	0,07	0,04	0,5-3,0	1,16	0,02-0,2
EC-3	>10	5	2,5	0,1-0,5	0,66	0,05-0,25
EC-5	>10	1,25	0,63	0,2-1,0	0,56	
EC-6	>10	5	2,5	0,1-0,5	0,60	
EC-7	3,26 (2,11 - 4,50)	0,31	0,16	0,02-0,2	0,105	0,05-0,5
Concentrations totales						
Polluants métalliques				As, Se, Hg	en métaux traces (µg/g)	
WQB-1	2,35 (1,26 - 3,48)	0,59	0,29	oui	1-2000	
WQB-3	<0,15	<0,15	<0,15	oui	1-1400	
TH-1	1,57 (-0,31 - 3,41)	0,31	0,16	non	1-900	
HR-1	≥9	1,12	0,57	non	0,3-1100	
SUD-1	5,4	2,33	1,17	non	0,3-1100	

* Concentration minimale d'effet observé.

** Concentration sans effet observé.

De façon générale, les résultats présentés au tableau 6 démontrent, après l'exposition de 4 h, que les échantillons contaminés par des métaux traces sont plus toxiques pour les algues que ceux contenant des polluants organiques. Parmi tous les échantillons, WQB-1 semble le plus toxique avec une CE₅₀ de 0,059 % p/v. Les CE₅₀ de EC-1 et EC-2 sont également très basses, soit de l'ordre de 0,163 % p/v et de 0,349 % p/v, respectivement, tandis que TH-1 affiche une valeur de 0,925 % p/v.

Les courbes concentration-réponse des essais de 4 h ont été tracées à la figure 10. Elles nous informent que des différences existent entre les échantillons contaminés par des substances organiques et ceux qui le sont par des métaux traces. En général, les sédiments riches en métaux révèlent une toxicité plus élevée à l'exception de EC-1 et EC-2 fortement contaminés par des HAP.

Pour la majorité des échantillons, les concentrations-réponses présentent des courbes de forme sigmoïde. Par contre, cinq échantillons (WQB-1, WQB-3, HR-1, EC-4 et EC-5) présentent des courbes en cloche suite à une incubation de 4 h. Dans le cas où des CE_{50} ont été calculées, les valeurs utilisées ont été sélectionnées parmi les données indiquant une toxicité aux faibles concentrations de sédiments. Quelques hypothèses pourraient expliquer la forme en cloche des courbes. Par exemple, la biodisponibilité des substances toxiques diminuerait aux concentrations les plus élevées de sédiments. Il pourrait également y avoir un masquage de la toxicité par des éléments nutritifs. Aux fortes concentrations, ceux-ci agiraient alors de stimulants du métabolisme et camoufleraient l'effet de toxicité. Des réponses antagonistes entre différentes molécules pourraient aussi se manifester aux concentrations les plus élevées. Par contre, tel que démontré à la figure 11A et 11B, ce genre d'effet disparaît en général après 24 heures d'incubation.

Le tableau 7 montre les résultats des essais obtenus après 24 h d'exposition. On remarque que l'effet toxique des métaux diminue avec le temps à l'exception de l'échantillon WQB-3. Il semble y avoir une récupération des algues vis-à-vis de ce type de contamination. En effet, il existe des polypeptides chez les algues capables de chélater les métaux tout comme le font les métalloprotéines chez les mammifères. Ces polypeptides, que l'on nomme phytochélatines, peuvent lier le Zn, Cd, Hg, Cu, Pb *etc.*, et ainsi détoxiquer les cellules algales d'un excès de métaux. Ces mécanismes de détoxification pourraient expliquer en partie la diminution de la toxicité rencontrée avec les contaminants métalliques en fonction du temps (de Phillipis et Pallaghy, 1994).

En revanche, la toxicité des échantillons contaminés par des substances organiques augmente en fonction du temps d'exposition. Les contaminants organiques, de poids moléculaire plus élevé que les métaux, traverseraient probablement la membrane cellulaire plus lentement en sollicitant le transport actif. De plus, plusieurs d'entre eux requièrent une activation métabolique avant de réagir, d'où un délai dans la réponse toxique. Par exemple, plusieurs PAH subissent une activation métabolique par les cytochromes p450 avant de devenir potentiellement plus toxique (Cassarett and Doull's, 1991).

De façon générale, la toxicité des sédiments augmente avec la hausse de la concentration de contaminants. Il existe donc un lien direct entre la diminution de la fluorescence chez les algues due à l'inhibition de l'activité estérasiqque ou à la perte d'intégrité membranaire et le contenu des sédiments en substances toxiques.

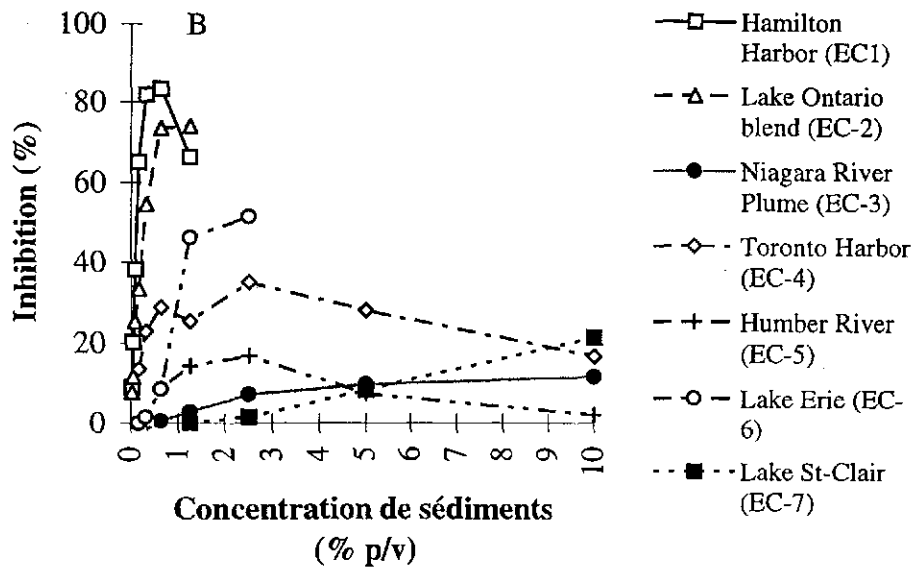
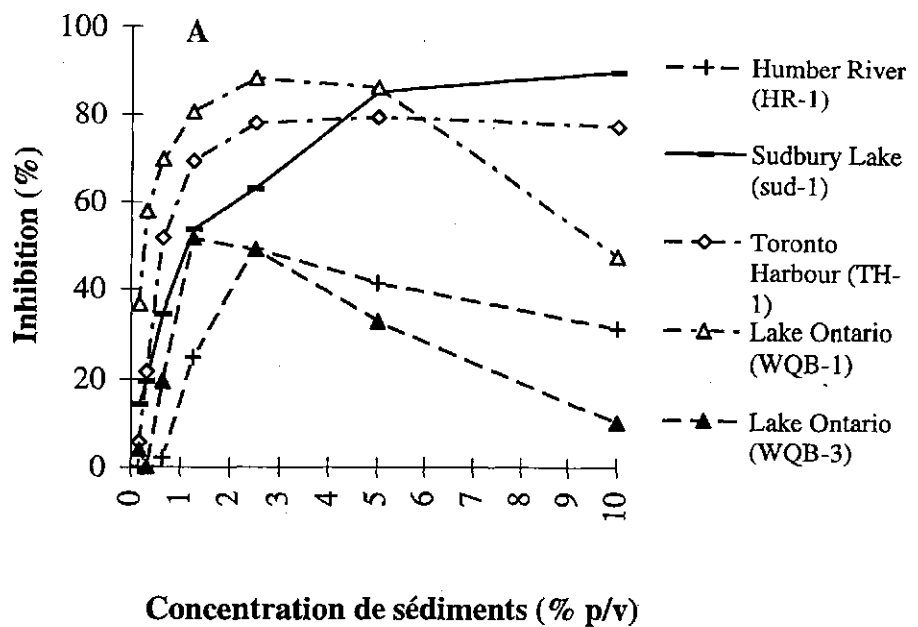


Figure 10 Courbes de toxicité obtenues avec des sédiments de référence provenant de L'INRE, exposition de 4 heures
A: contaminés par des métaux;
B: contaminés par des substances organiques

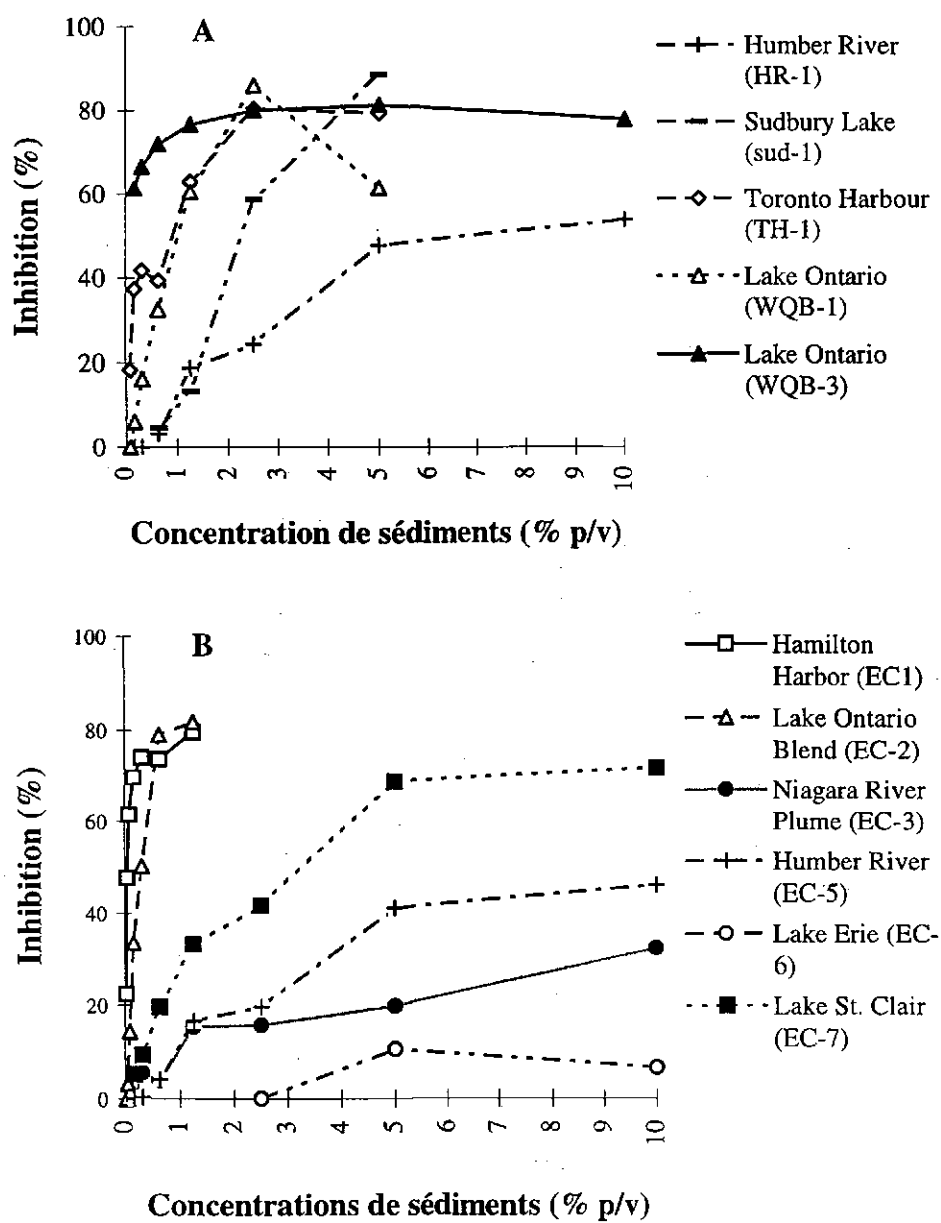


Figure 11 Courbes de toxicité obtenues avec des sédiments de référence provenant de l'INRE, exposition de 24 heures
A: contaminés par des métaux;
B: contaminés par des substances organiques

3.7 CONCLUSION

L'objectif de cette étude visait le développement d'un essai de toxicité de contact direct algues-sédiments. La diminution de la fluorescence, causée par l'inhibition de l'activité des estérases ou la perte d'intégrité membranaire, mise en évidence par le DAF, a été retenue comme variable d'effet. La première partie de l'étude a permis de fixer les conditions optimales de l'essai. La deuxième étape vérifiait sa fiabilité à discriminer entre le potentiel toxique de divers échantillons de sédiments.

L'essai s'est révélé fiable pour évaluer la toxicité des sédiments. Il semble donc prometteur pour la mise en évidence du potentiel toxique des sédiments à l'aide d'un bioindicateur algal. Cet essai de contact direct sédiments-algues est présentement inégalé. Les réponses sont obtenues rapidement après des expositions de 4 ou de 24 h et les manipulations sont très simples. La mesure de la fluorescence des algues prise après ces deux périodes d'exposition permet de quantifier l'intensité toxique d'un sédiment par inhibition de l'activité des estérases ou par la perte d'intégrité membranaire. Les essais réalisés sur des sédiments de référence ont indiqué que les métaux traces intoxiquaient plus rapidement les cellules algales que les contaminants organiques.

L'utilisation de la cytométrie en flux pour révéler la fluorescence présente toutefois certaines contraintes. Des limites existent quant au nombre d'échantillons pouvant être analysés journalièrement. Il est donc prévu de transformer certaines étapes de l'essai afin de l'adapter en microplaques avec lecture sur un fluorimètre pour révéler l'activité estérasique. La mise au point d'un tel essai réduira considérablement les coûts associés à la technique et permettra de mesurer la toxicité d'un plus grand nombre d'échantillons de sédiments par jour.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement M. Richard Legault (CSL), M. Donald Saint-Laurent (DPE), mon directeur M. Christian Blaise (CSL) ainsi que le module d'édition (CSL) qui ont corrigé avec attention ce document. Sans la collaboration de toutes ces personnes il ne présenterait pas la même qualité finale.

Références

- Aeschbacher, M., C.A. Reinhardt et G. Zbinden (1986). «A rapid cell membrane permeability test using fluorescent dyes and flow cytometry», *Cell Biology and Toxicology*, 2 : 247-255.
- Ankley, G.T., A. Katko et J.W. Arthur (1990). «Identification of ammonia as an important sediment-associated toxicant in the lower Fox River and Green Bay, Wisconsin», *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9 : 313-322.
- Berglund, D.L. et S. Eversman (1988). «Flow cytometric measurement of pollutant stresses on algal cells », *Cytometry*, 9:150-155.
- Blaise, C., R. Legault, N. Bermingham et R. Van Coillie (1986). «A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment», *Toxicity Assessment: An International Quarterly*, 1 : 261-281.
- Blank, H., G. Wallin et S. Wangberg (1984). «Species dependant variation in algal sensitivity to chemical compounds», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8 : 339-351.
- Bonaly-Cantarel, J. (1988). «Cytophysiologie et cytotoxicologie chez les algues unicellulaires. Action du cadmium sur des cellules d'*Euglena gracilis*. Apport de la cytométrie en flux liquide», *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 135 : 27-40.
- Boyle, T.P. (1984). «The effect of environmental contaminants on aquatic algae», Algae as ecological indicators. Edition L.Elliot Shubert, Academic Press Inc, London, 237-255.
- Burton, G.A. Jr. (1995). «Critical issues in sediment bioassays and toxicity testing», *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 4 : 151-156.
- Burton, G.A.. (1992). *Sediment Toxicity Assessment*, G.A. Burton, Jr., (Éd.), Lewis Publishers, 457 pages.
- Brouwer, H., T. Murphy et L. McArdle (1990). «A sediment-contact bioassay with *Photobacterium phosphoreum*», *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9 : 1353-1358.
- Byl, T.D. et S.J. Klaine (1991). «Peroxidase activity as an indicator of sublethal stress in the aquatic plant *Hydrilla verticillata* (Royle)», Plants for Toxicity Assessment: Second Volume, ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W. Wang and M.A. Lewis, (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 101-106.
- Cachot, J., L.A Romana. et F. Galgani (1994). «In vivo esterase activity in protoplasts as a bioassay of environmental quality», *Aquatic Botany*, 48 : 297-312.

- Casarett, I. et L.J. Doull (1991). *Toxicology. The basic Science of poisons*, Pergamon Press, 4^e édition, 1033 pages.
- Centre Saint-Laurent, Environnement Canada (1996). «Mesure de l'activité estérasique de *Selenastrum capricornutum*. Technique par cytométrie en flux pour les échantillons aqueux», CPQ403E0, 35 pages.
- Chapman, P.M. (1995). «Sediment quality assessment: status and outlook», *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 4 : 183-194.
- Chiaudani, G., et M. Vighi (1978). «The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies», *Verhandlungen Internationale Verinigung Limnologie*, 21 : 316-329.
- Combrier, E.X., S. Ronot et M. Adolph (1988). *La cytométrie en flux*, MEDSI/McGRAW HILL ed., Paris, 1 : 113-121.
- Courchesne, F. et S. Savoie (1991). *Méthodes de laboratoire en pédologie*. N° 91 -02 Notes et documents. Département de géographie. Université de Montréal. Décembre 1991.56 pages.
- Couture, P., S.A. Visser, R. van Coillie et C. Blaise (1985). «Algal bioassays: their significance in monitoring water quality with respect to nutrients and toxicants», *Schweiz. Z. Hydrol.*, 47 : 128-158.
- Cucci, T.L., S.E. Shumway, W.S. Brown et C.R. Newell (1989). «Using phytoplankton and flow cytometry to analyze grazing by marine organisms», *Cytometry*, 10 : 659-669.
- De Fillipis, L.F. et C.K. Phallaghy (1994). «Heavy metals: sources and biological effects» Algae and Water Pollution, chap. 2, *Advances in Limnology*, 42 : 31-77.
- Dorsey, J., C.M. Yentsch, S. Mayo et C. McKenna (1989). «Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae», *Cytometry*, 10 : 622-628.
- Dumont, P. (1993). *Sensibilité et spécificité des indicateurs biochimiques et physiologiques en rapport avec l'étude de la dynamique des populations: interface entre l'écologie et la toxicologie*, Thèse de doctorat à l'Université du Québec à Montréal, pp. 12-56.
- Environnement Canada (1990). *Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence*, Conservation et Protection, rapport SPE 1/RM/12, 91 pages.
- Environnement Canada, (1993). *Méthode d'essai biologique: essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum**, Conservation et Protection, rapport SPE 1/RM/25, 43 pages.

- Gala, W. et J.P. Giesy (1990). «Flow cytometric techniques to assess toxicity to algae», *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, 13 : 237-246.
- Gilbert, F., F. Galgani et Y. Cadiou (1992). «Rapid assessment of metabolic activity in marine microalgae: application in ecotoxicological tests and evaluation of water quality», *Marine Biology*, 112 : 199-205.
- Gonçalves, M.L., M.F.C. Vilhena, A.M. Sampayo (1988). «Effect of nutrients, temperature and light on uptake of cadmium by *Selenastrum capricornutum* Printz», *Water Research*, 22 : 1429-1435.
- Kwan, K.K. et B.J. Dutka (1992). «Evaluation of Toxi-Chromotest direct sediment toxicity testing procedure and microtox solid-phase Testing Procedure», *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49 : 656-662
- Legendre, L. et C. Yentsch (1989). «Overview of flow cytometry and image analysis in biological oceanography and limnology», *Cytometry*, 10 : 501-510.
- Lenhinger, A.L. (1982). *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, Inc. New York, 1011 pages.
- Li, W.K.E. (1989). «Shipboard analytical flow cytometry of oceanic ultraphytoplankton», *Cytometry*, 10 : 564-579.
- Ménard, L. (1992). *Développement d'un test de létalité algal par cytométrie en flux*, Mémoire de maîtrise de L'institut national de la recherche scientifique (INRS-eau), Québec (Québec), 155 pages.
- Miller, W., J.C. Green et T. Shiroyama (1978). «The *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay bottle test». EPA-600/9-78-018, Corvallis, Oregon, 125 pages.
- Moore, D. W., T.M. Dillon et E.W. Gamble (1995). «Long-term storage of sediments: implications for sediment toxicity testing», *Environmental Pollution*, 89 : 147-154.
- Olson, R.J., E.R. Zettler et O.K. Anderson (1989). «Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry», *Cytometry*, 10 : 636-643.
- Persidsky, M.D. et G.S. Baillie (1977). «Fluorometric test of cell membrane integrity», *Cryobiology*, 14 : 322-331.
- Perterson, S.M. et J.L. Stauber (1996). «New algal enzyme bioassay for the rapid assessment of aquatic toxicity», *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56 : 750-757.

- Prosperi, E., A.C. Croce, G. Bottiroli et R. Supino (1986). «Flow cytometry analysis of membrane permeability properties influencing intracellular accumulation and efflux of fluorescein», *Cytometry*, 7 : 70-75.
- Rotman, B. et B.W. Papermaster (1966). «Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters», *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 55 : 143-141.
- Saint-Laurent, D. et C. Blaise (1995). «Validation of a microplate-based algal lethality test developed with the help of flow cytometry», *Environmental Toxicology Assessment*, Mervyn Richardson, (éd.), Taylor and Francis publishers, chap. 11 : 137-155.
- Stegeman, J.J., M. Brouwer, R. T. DiGiulio, L. Forlin, B.A. Fowler, B.M. Sanders et P.A. Van Veld (1992). «Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect», *Biomarkers, Biochemical, Physiological, and histological markers of anthropogenic stress*, R.J. Hugget, R.A. Kimerle, P.M. Mehrle et H.L. Bergman, (éd.), A special publication of SETAC, Lewis Publishers, chap. 6 : 235-347.
- Tay, K.L., K.G. Doe et S.J. Wade (1992). «Sediment bioassessment in Halifax harbour», *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11 : 1567-1581.
- Wetzel, R.G. (1983). *Limnology*, Saunders College Publishing, Montréal, 2^e édition, 432 pages.
- Yentsch, C. et J. Campbell (1991). «Phytoplankton growth: perspectives gained by flow cytometry», *Journal of Plankton Research*, 13 : 83-108 (supplément).