

CSL-1185
SC041601
m4sd

TD
427
HYG
M45
1992
c.1

**DÉTERMINATION DE LA PHYTOTOXICITÉ
DE L'ATRAZINE, DE LA CYANAZINE,
DU BUTYLATE ET DU MCPA
PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX**

Rapport du projet Pestfund n° 24

Lucie Ménard

Direction des eaux intérieures
Centre Saint-Laurent
Environnement Canada

Février 1992

Remerciements

Je tiens à remercier la Direction des eaux intérieures qui par son support administratif m'a accordé la possibilité de mener à terme cette étude. J'offre également ma reconnaissance au Dr. Christian Blaise qui a su me soutenir scientifiquement tout au long de cette recherche. Je remercie tout particulièrement les fonds PESTFUND de la Division des pesticides d'Environnement Canada qui par leur support financier ont permis la réalisation de cette étude.

RÉSUMÉ

L'objectif de la présente étude a été d'évaluer la phytotoxicité d'herbicides sur les producteurs primaires de l'écosystème aquatique. L'organisme retenu comme indicateur biologique de la toxicité a été l'algue verte unicellulaire Selenastrum capricornutum. L'évaluation du pourcentage de mortalité et de l'inhibition de croissance a permis d'estimer deux paramètres de mesure soit la CI_{50} et la CL_{50} . La comparaison de ces deux paramètres a permis de préciser les herbicides exerçant des effets algicides.

Les essais biologiques sur l'algue Selenastrum capricornutum ont été réalisés en microplaque. Les algues ont été incubées pendant une période de 96 heures en présence de chacun des herbicides permettant d'évaluer la toxicité chronique de ces derniers. Suite à l'incubation, la CI_{50} a été estimée par compteur électronique de particules (modèle ZM) et la CL_{50} a été mesurée à l'aide de la cytométrie en flux (modèle FACScan).

L'évaluation toxicologique a été réalisée sur quatre herbicides soit l'atrazine, la cyanazine, le MCPA et le butylate. Le dé-éthyl atrazine, un métabolite de l'atrazine, a également été retenu pour l'estimation de la CI_{50} . De ces quatre herbicides, deux se sont révélés très toxiques, soit la cyanazine (CI_{50} : 0.059 ppm; CL_{50} : 0.145 ppm) et l'atrazine (CI_{50} : 0.026 ppm; CL_{50} : 0.026 ppm). Le MCPA (CI_{50} : 1.940 ppm; CL_{50} : 2.13 ppm) et le butylate (CI_{50} : 6.470 ppm; CL_{50} : 9.790 ppm) ont présenté une faible toxicité pour les deux essais biologiques. Le dé-éthyl atrazine s'est révélé beaucoup moins toxique que la molécule mère, l'atrazine. Une CI_{50} de 0.740 ppm a été obtenue pour le dé-éthyl atrazine représentant une toxicité d'environ 26 fois moins élevée que pour l'atrazine.

L'estimation des paramètres de mesure a permis de préciser le danger pour la communauté phytoplanctonique associé à chacun des herbicides. Puisque seules l'atrazine et la cyanazine ont présenté une toxicité élevée chez l'algue Selenastrum capricornutum, nous suggérons d'approfondir les études sur ces deux herbicides.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the phytotoxicity of herbicides on aquatic autotrophic organisms, using the unicellular alga Selenastrum capricornutum as a biological indicator. Assessment of death percentage and growth inhibition allowed the evaluation of two measuring parameters: the inhibitant concentration 50 (IC50), and the lethal concentration 50 (LC50). By comparing these two parameters, we were able to point out herbicides with algicidal or algistatic effects.

Bioassays on Selenastrum capricornutum were realized on microplate. The algae were incubated for 96 hours in presence of each of the four herbicides tested for their chronic toxicity. The IC50 was estimated using a particle electronic counter (model ZM), and flowcytometry (model FACScan) was used to determine the LC50.

The four herbicides selected for toxicological evaluation were atrazine, cyanazine, MCPA and butylate. De-ethyl atrazine, an atrazine metabolite, was also selected to estimate the LC50. Two of the herbicides tested proved to be very toxic: cyanazine (IC 50: 0.059 ppm; LC50: 0.145 ppm) and atrazine (IC50: 0.026 ppm; LC50: 0.026 ppm). MCPA (IC50: 1.940 ppm; LC50: 2.130 ppm) and butylate (IC50: 6.470 ppm; LC50: 9.790 ppm) showed a low toxicity in both bioassays. De-ethyl atrazine, with an IC50 of 0.740 ppm, proved far more less toxic (26 times less toxic) than atrazine, the mother molecule.

Assessment of measuring parameters has allowed to precise the danger that each of the four herbicides tested presents for the phytoplanktonic community. In view of the high toxicity of atrazine and cyanazine for Selenastrum capricornutum, we recommend further studies with these two herbicides.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	xi

CHAPITRE I. INTRODUCTION

1.1- Problématique: présence des pesticides en milieu aquatique.....	1
1.1.1- Historique.....	1
1.1.2- Danger de l'infiltration des pesticides dans l'écosystème aquatique.....	2
1.1.3- Les pesticides dans le fleuve Saint-Laurent et ses tributaires.....	4
1.1.3.1- Les premiers développements.....	4
1.1.3.2- Etat des connaissances.....	6
1.1.4- Les effets adverses des pesticides sur les organismes.....	7
1.1.5- Sélection des herbicides retenus pour les tests.....	9
1.1.5.1- Mode d'action, potentiel toxique, propriétés physico-chimiques et application des herbicides sélectionnés.....	10
1.2- Importance de phytoplancton dans l'écosystème aquatique.....	15
1.2.1- Les polluants et le phytoplancton.....	16

1.3-	Les biotests algaux.....	19
1.3.1-	Historique et principes généraux des microbiotests.....	19
1.3.2-	Les essais sur les herbicides sélectionnés.....	23
1.4-	La cytométrie en flux.....	24
1.4.1-	Technique de pointe.....	24
1.4.2-	Etat actuel de la recherche en milieu aquatique.....	25
1.4.3-	Evaluation de la létalité.....	26
1.4.4-	La cytométrie en flux pour mesurer la létalité algale.....	27
1.5-	Le diacétate de fluorescéine et l'autofluorescence chlorophyllienne, marqueurs de viabilité.....	27
1.5.1-	Le diacétate de fluorescéine.....	27
1.5.2-	L'autofluorescence comme indicateur de viabilité.....	29
1.6-	Objectifs de la recherche.....	31

CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1-	Matériel biologique et entretien des cultures.....	32
2.2-	Considérations techniques du cytomètre.....	33
2.2.1-	Système optique.....	34
2.2.2-	Ecoulement des fluides.....	38

2.3-	Procédure de létalité algale par cytométrie en flux.....	38
2.4-	Biotests algaux d'inhibition de croissance (CI ₅₀) et de létalité (CL ₅₀).....	40
2.4.1-	Principes du test d'inhibition.....	42
2.4.2-	Principes du test de létalité.....	42
2.5-	Solutions de travail des herbicides.....	44
2.6-	Analyses statistiques des résultats.....	49
2.6.1-	Estimation de l'activité estérasique.....	49
2.6.2-	Evaluation de l'autofluorescence.....	49
2.6.3-	Estimation des CI ₅₀ et CL ₅₀	50
2.6.4-	Estimation de la CSEO et CMEO.....	51
CHAPITRE III. RÉSULTATS ET DISCUSSION		
3.1-	L'atrazine.....	54
3.2-	La cyanazine.....	66
3.3-	Le dé-éthyl atrazine.....	73
3.4-	Le butylate.....	76
3.5-	MCPA.....	84
3.6-	Effets des herbicides sélectionnés sur la fluorescence chlorophyllienne.....	92
3.7-	Synthèse des résultats et recommandations.....	95
CHAPITRE IV. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....		
100		
BIBLIOGRAPHIE.....		102
ANNEXES.....		113

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I	Liste du matériel et produits.....46
Tableau II	Liste des herbicides.....47
Tableau III	Pourcentage d'inhibition de croissance suite à l'exposition d'atrazine chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i>56
Tableau IV	Pourcentage de mortalité suite à l'exposition d'atrazine chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i>57
Tableau V	Atrazine, test de student sur l'évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1.....64
Tableau VI	Atrazine, test de student sur l'évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 2.....65
Tableau VII	Pourcentage d'inhibition de croissance suite à l'exposition de cyanazine chez l'algue <i>Selenastrum</i> <i>capricornutum</i>67
Tableau VIII	Pourcentage de mortalité suite à l'exposition de cyanazine chez l'algue <i>Selenastrum</i> <i>capricornutum</i>68
Tableau IX	Cyanazine, test de student sur l'évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1.....70

Tableau X	Cyanazine, test de student sur l'évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 2.....71
Tableau XI	Pourcentage d'inhibition de croissance suite à l'exposition de dé-éthyl atrazine chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i>75
Tableau XII	Pourcentage d'inhibition de croissance suite à l'exposition de butylate chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i>77
Tableau XIII	Pourcentage de mortalité suite à l'exposition de butylate chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i>79
Tableau XIV	Butylate, test de student sur l'évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1.....82
Tableau XV	Butylate, test de student sur l'évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 2.....83
Tableau XVI	Pourcentage d'inhibition de croissance suite à l'exposition de MCPA chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i>85
Tableau XVII	Pourcentage de mortalité suite à l'exposition de MCPA chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i>87
Tableau XVIII	MCPA, test de student sur l'évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 1.....90

Tableau XIX	MCPA, test de student sur l'évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population située dans la fenêtre 2.....	91
-------------	---	----

ANNEXES

Tableau AI	Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec l'atrazine.....	113
Tableau AII	Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec la cyanazine.....	116
Tableau AIII	Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le butylate.....	119
Tableau AIV	Fluorescence à 650 nm (chlorophylle) et à 530 nm (FDA) résultant de l'expérience sur la létalité algale avec le MCPA.....	123

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1. Mode d'action de l'atrazine dans la chaîne d'électrons du photosystème.....	11
Figure 2. L'algue verte <i>Selenastrum capricornutum</i>	22
Figure 3. Système optique du cytomètre, modèle FACScan.....	36
Figure 4. Cytogramme des patrons cellulaires de l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> et les paramètres expérimentaux.....	37
Figure 5. Cytogramme de la fluorescence verte liée au clivage du FDA en fonction de l'autofluorescence rouge chlorophyllienne.....	39
Figure 6. Configuration de la microplaque.....	41
Figure 7. Protocole de létalité par cytométrie en flux avec l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i>	45
Figure 8. Cytogramme de populations cellulaires intoxiquées à différentes concentrations d'atrazine.....	55
Figure 9. Histogramme de la fluorescence verte liée à l'activité estérasique diminuant significativement en fonction des concentrations de cyanazine suite à une exposition de 96 heures.....	72

Figure 10.	Diminution de l'autofluorescence chlorophyllienne à 650 nm chez des cellules algales exposées à la cyanazine.....	74
Figure 11.	Fenêtrage des populations algales viables (fenêtre R1) et non viables (fenêtre R2) suite à une exposition au butylate.....	80
Figure 12.	Courbe dose-effet du pourcentage d'inhibition de croissance en fonction des concentrations de MCPA chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i>	88
Figure 13.	Histogramme représentant l'augmentation de l'autofluorescence chlorophyllienne en fonction des concentrations de cyanazine chez les algues suite à une exposition de 96 heures.....	94
Figure 14.	Histogramme récapitulatif des résultats des CI_{50} et CL_{50} obtenues après des incubations de 96 heures des algues en présences des différents herbicides.....	97
Figure 15.	Courbes dose-effet représentant les inhibitions de croissance pour l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> en fonction des concentrations de chacun des herbicides suite à une exposition de 96 heures.....	98
Figure 16.	Courbes dose-effet représentant la létalité chez l'algue <i>Selenastrum capricornutum</i> en fonction des concentrations de chacun des herbicides suite à une exposition de 96 heures.....	99

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1- Problématique: présence des pesticides en milieu aquatique

1.1.1- Historique

Il y a 35 ans, la mise en marché des pesticides a entraîné des changements importants dans les pratiques agricoles. En diminuant de façon significative les parasites, les maladies fongiques, les pertes causées par l'invasion des insectes, les plantes compétitrices, les pesticides ont permis d'augmenter significativement la production agricole. Selon le rapport SAGE (1988), 180 matières actives ont été employées en 1982 au Québec pour la fabrication de pesticides. Ces derniers pouvant être utilisés en agriculture, en forêt ou dans les villes. Parmi ceux-ci, les herbicides sont les plus utilisés. Ils représentent 75 % des ventes de pesticides au Canada (Eidt, D.C. 1983). Malgré l'aspect économique important, l'utilisation des pesticides fait de plus en plus l'objet de controverses sur le plan de la contamination environnementale.

La dépendance de l'agriculture aux fertilisants synthétiques et aux pesticides continue de s'accroître en raison de la demande pour une plus grande productivité agricole. L'accroissement de leur utilisation conduit conséquemment à une augmentation du taux de pesticides dans l'environnement et en particulier dans l'écosystème aquatique. Il apparaît donc important d'évaluer l'impact potentiel des pesticides sur la faune et la flore aquatique.

1.1.2- Danger de l'infiltration des pesticides dans l'écosystème aquatique

Les pesticides peuvent se retrouver dans le milieu aquatique par une contamination directe (épandage direct dans les cours d'eau pour contrer la prolifération algale). Le lessivage des sols, le transport atmosphérique (application du pesticide par aérosol; volatilité; érosion par le vent), le transfert latéral (ruissellement) ou le transfert vertical par le drainage des sols vers les eaux souterraines sont tous des sources de contamination indirecte qui potentiellement peuvent contaminer les eaux de surface (Eidt, D.C., 1983).

Les sources de contamination du milieu aquatique par les pesticides proviennent principalement de l'activité agricole dans une proportion de 68 % (Cooper, 1991). D'après cet auteur, les autres sources proviennent surtout de l'industrie et des forêts.

Le devenir des pesticides dans l'environnement semble difficile à établir. Plusieurs facteurs conditionnent la

mobilité ou le transfert des produits dans les différents écosystèmes. Le rapport SAGE (1988) identifie les principaux facteurs qui conditionnent cette mobilité tels:

- "- quantité de pesticides au sol ou sur les végétaux
- topographie du terrain
- caractéristiques des matériaux de surface (perméabilité, teneur en matière organique, acidité, etc)
- propriétés physico-chimiques du pesticide (adsorption sur les sols, solubilité, volatilité, biodégradation, photodégradation)
- conditions climatologiques, en particulier les précipitations (intensité et durée), la température, l'ensoleillement"

La bioaccumulation des pesticides dans les organismes est un autre facteur conditionnant la mobilité des pesticides dans l'environnement. La toxicité des pesticides varie également selon les propriétés intrinsèques à chacun d'eux (formulation, forme moléculaire, etc). Par exemple, la biodisponibilité peut varier selon le coefficient octanol/eau; le pH, la présence de sels dissolvants, la matière organique et la température peuvent modifier la solubilité (Cooper, 1991).

Les pesticides caractérisés par une grande stabilité, une persistance élevée et un caractère lipophile présentent un potentiel de toxicité chronique. Ils peuvent être également bioaccumulés dans les organismes ou s'accumuler dans les sédiments. Ces pesticides peuvent causer des effets néfastes chroniques dans la chaîne alimentaire. Par contre, les pesticides présentant un caractère hydrophile peuvent entraîner un effet toxique aigu. Idéalement, les essais biologiques de toxicité devront tenir compte des propriétés physico-chimiques de chacun d'eux. Par exemple,

les tests de toxicité aiguë devraient être réalisés en priorité sur des pesticides hydrophiles tandis que les tests de toxicité chronique ou de bioaccumulation devraient être faits préférentiellement sur des pesticides lipophiles.

L'écosystème aquatique est dynamique. Il est caractérisé par des échanges continuels avec le sol, les sédiments, les interfaces et le biote. Les pesticides peuvent se retrouver dans plusieurs compartiments abiotiques ou biotiques de l'écosystème. Un effet direct des pesticides sur des organismes cibles peut provoquer des effets indirects sur d'autres organismes non ciblés. Par exemple, l'infiltration des herbicides dans l'écosystème aquatique peut entraîner des effets adverses sur le phytoplancton. Les effets sur la communauté phytoplanctonique peuvent à leur tour provoquer des effets indirects sur les brouteurs (zooplancton). Un déséquilibre du biote aquatique peut donc survenir, dépassant les simples effets directs et perturber plusieurs niveaux trophiques (Lampert et al., 1989).

Le manque de connaissances sur la toxicité des herbicides met en relief l'importance de multiplier les recherches dans ce domaine afin d'avoir une meilleure compréhension de leur devenir dans l'écosystème aquatique.

1.1.3- Les pesticides dans le fleuve Saint-Laurent et ses tributaires

1.1.3.1- Les premiers développements

Au Québec, au début des années 1970, la prolifération algale dans les rivières drainant des bassins agricoles fut un des premiers effets observables de l'impact de l'agriculture sur l'écosystème aquatique. Le problème majeur était lié à l'enrichissement des eaux en substances nutritives telles que l'azote, le phosphore et le carbone. C'est un peu plus tard, vers le milieu des années 1970, que le ministère des Richesses naturelles (Québec) manifesta ses premières préoccupations sur le risque associé aux pesticides dans les eaux des sous-bassins typiquement agricoles. A cette époque, les triazines, les substances organophosphorées et organochlorées étaient analysées. En 1978, ce ministère créa un réseau de surveillance des substances toxiques incluant les pesticides organochlorés afin d'évaluer le niveau de contamination de rivières localisées dans des bassins versants à activité agricole intense.

Une des premières études d'envergure sur les pesticides au Québec a été réalisée en 1988 par SAGE Ltée. Ce rapport préliminaire comporte trois volumes regroupant une synthèse détaillée sur les principaux pesticides en usage au Québec. On y retrouve les caractéristiques physico-chimiques des pesticides, leur toxicité, les ventes au Québec, le type d'épandage, les cultures visées, etc.

Dans le but d'approfondir les connaissances et de suivre l'évolution de la recherche et du développement en matière de pesticides, Environnement Canada se dotait d'un programme sur les pesticides au milieu des années 1980. En 1988, le premier rapport annuel était publié. Depuis, chaque année, un rapport sur les diverses activités de

recherches dans ce domaine menées à l'intérieur des différents ministères au Canada est publié.

1.1.3.2- État des connaissances

Chaque année au Québec 2,7 millions de kilogrammes de pesticides sont vendus sur le marché. En 1986, 22,9 millions d'hectares furent traités aux herbicides (Freemark et al., 1990). Malgré cette utilisation massive des pesticides, les connaissances de leur potentiel toxique sont limitées.

Le phytoplancton représente des organismes cibles lors de l'infiltration des herbicides dans le milieu aquatique. Pourtant, peu d'études ont été réalisées sur la phytotoxicité des herbicides vis à vis cette communauté. Les directives pour l'homologation des pesticides publiées par la Communauté Économique Européenne (CEE) exigent qu'un test d'inhibition de croissance algale ainsi qu'un test mesurant une variable d'effet sur une plante supérieure soient faits (Freemark et al., 1990). Ces auteurs spécifient également l'importance d'évaluer la létalité puisque aucune récupération n'est possible suite à ce type d'agression pour les organismes atteints.

Depuis le milieu des années 1980, quelques études *in situ* ou en laboratoire (St-Laurent et al., 1991; Blaise et al., 1991; Caux et al., 1989; Environnement Canada, 1988) ont permis d'évaluer l'atteinte toxique des organismes vivant dans un milieu contaminé aux pesticides.

Les essais *in situ* combinés aux bioessais de

laboratoire permettront d'obtenir une connaissance plus approfondie du risque encouru par l'écosystème aquatique suite à l'apport de pesticides. Afin d'évaluer ce risque, il est important de développer et/ou d'utiliser les outils existants tels les bioessais qui ont fait leurs preuves dans l'évaluation du potentiel toxique de produits chimiques. Présentement, la quantité et la disponibilité des données utilisables pour évaluer ce risque sont limitées. Un minimum de données est pourtant requis pour le développement de critères sur la qualité des eaux dans le but de protéger la vie aquatique. Ces données peuvent être obtenues par des essais biologiques. La mesure des réponses chroniques et/ou aiguës fournit des paramètres importants pour l'établissement des recommandations (Wong et al., 1988). En effet, selon la méthodologie de calcul des critères de qualité de l'eau pour les substances toxiques du ministère de l'Environnement du Québec (MENVIQ, 1990) deux critères de respect de la vie aquatique doivent être déterminés pour assurer sa protection. Le critère de toxicité aquatique chronique (CTAC) pour assurer la protection à long terme (durant tout le cycle de vie) et le critère de toxicité aquatique aiguë (CTAA) pour assurer la vie des organismes exposés aux toxiques pour une courte période.

1.1.4- Les effets adverses des pesticides sur les organismes

Les pesticides peuvent pénétrer les cellules par la membrane cellulaire. Cette voie d'entrée des pesticides peut se faire par transport passif (ne requérant pas d'énergie) ou par transport actif (requérant de l'énergie).

En règle générale, les pesticides à caractère lipophile pénètrent la cellule par transport passif et ceux à caractère hydrophile traversent la membrane cellulaire par transport actif. A l'intérieur de la cellule, le devenir des pesticides peut varier selon les diverses caractéristiques physico-chimiques du pesticide. Les mécanismes de biotransformation peuvent transformer les pesticides permettant soit leur élimination par excrétion, leur bioaccumulation ou leur bioactivation (Boudou et Ribeyre, Vol. 1, 1989).

La faible solubilité de certains pesticides peut présenter une affinité pour la bioaccumulation dans les lipides des organismes. La bioaccumulation algale peut offrir un avantage pour les autres organismes en rendant le contaminant moins biodisponible pour les invertébrés et les poissons, au moins temporairement, et diminuer ainsi l'impact toxique. Par contre, la persistance des pesticides dans les algues peut jouer un rôle important dans le transport du contaminant à travers la chaîne alimentaire (Boyle, 1984).

Des effets au niveau du métabolisme (photosynthèse, respiration, synthèse protéique, etc), peuvent également être observés (Boudou et Ribeyre, Vol. 2, 1989).

La réponse algale vis-à-vis des agressions toxiques peut varier d'une espèce à l'autre (Blank et al., 1984). Cette variation de la sensibilité chez les espèces peut être utilisée comme indicateur de stress dans la communauté phytoplanctonique (Reynolds, 1987). En 1987, Hosmani étudia l'effet de la pollution organique sur la diversité

algale en milieu naturel. Il calcula un index de diversité et démontra que celui-ci diminuait aux endroits les plus pollués et augmentait au fur et à mesure qu'on s'éloignait de la source de pollution. La présence de toxiques tels les pesticides provoquant des effets létaux ou sublétaux peut favoriser le développement d'une espèce au détriment d'une autre.

1.1.5- Sélection des herbicides retenus pour les tests

Puisque ce sont les herbicides qui sont le plus utilisés en agriculture au Québec, quatre d'entre eux ont été retenus afin d'évaluer la phytotoxicité sur les producteurs primaires de l'écosystème aquatique. Des quatre herbicides sélectionnés, trois sont listés comme étant prioritaires au Québec (SAGE, 1988) soit l'atrazine, le butylate et le MCPA. Par leur mode d'action (inhibiteurs de la photosynthèse), les triazines (atrazine et cyanazine) représentent un danger direct pour le phytoplancton, producteurs primaires de l'écosystème aquatique. Les effets inhibiteurs du système photosynthétique des triazines peuvent diminuer le rendement photosynthétique des algues et perturber ainsi l'équilibre de l'écosystème. Les triazines sont également des herbicides très utilisés dans la pratique agricole. En 1982, une enquête sur la quantité de pesticides vendus aux fermiers au Québec a révélé que les triazines et les triazoles constituaient les groupes de pesticides les plus vendus, soit un total de 570.8 tonnes (Trotter et al., 1990). La cyanazine employée quelques fois avec l'atrazine a été retenue comme deuxième représentant de cette classe d'herbicides. Une évaluation toxicologique a également été

réalisée sur le dé-éthyl atrazine, un métabolite de l'atrazine.

Par leur solubilité élevée (voir section suivante), le butylate et le MCPA soulèvent des préoccupations quant à la possibilité de contamination des cours d'eau en milieu agricole (rapport SAGE, 1988). Selon ce même rapport, l'utilisation de ces herbicides au Québec a connu une forte hausse depuis 1982. Ces deux herbicides ont donc été retenus pour l'évaluation toxicologique. Le tableau II présente la provenance des herbicides retenus pour les tests.

1.1.5.1- Mode d'action, potentiel toxique, propriétés physico-chimiques et application des herbicides sélectionnés

Les triazines inhibent la photosynthèse en bloquant le transport des électrons du photosystème II au photosystème I. Les herbicides présentant ce mode d'action sont souvent qualifiés de type DCMU (dichlorométhylurée). Plus précisément, il bloque le transfert d'électrons entre l'accepteur primaire d'électrons, la plastoquinone Q_a , et l'accepteur d'électrons secondaire, la plastoquinone Q_b (Purcell et al., 1990). La figure 1 illustre le mode d'action des triazines. L'altération du photosystème entraîne l'inhibition de la biosynthèse des composés organiques essentiels à la survie de la cellule végétale. Le mode d'action des triazines est qualifié de systémique sélectif parce qu'elles s'introduisent directement dans les organismes visés (SAGE, 1988).

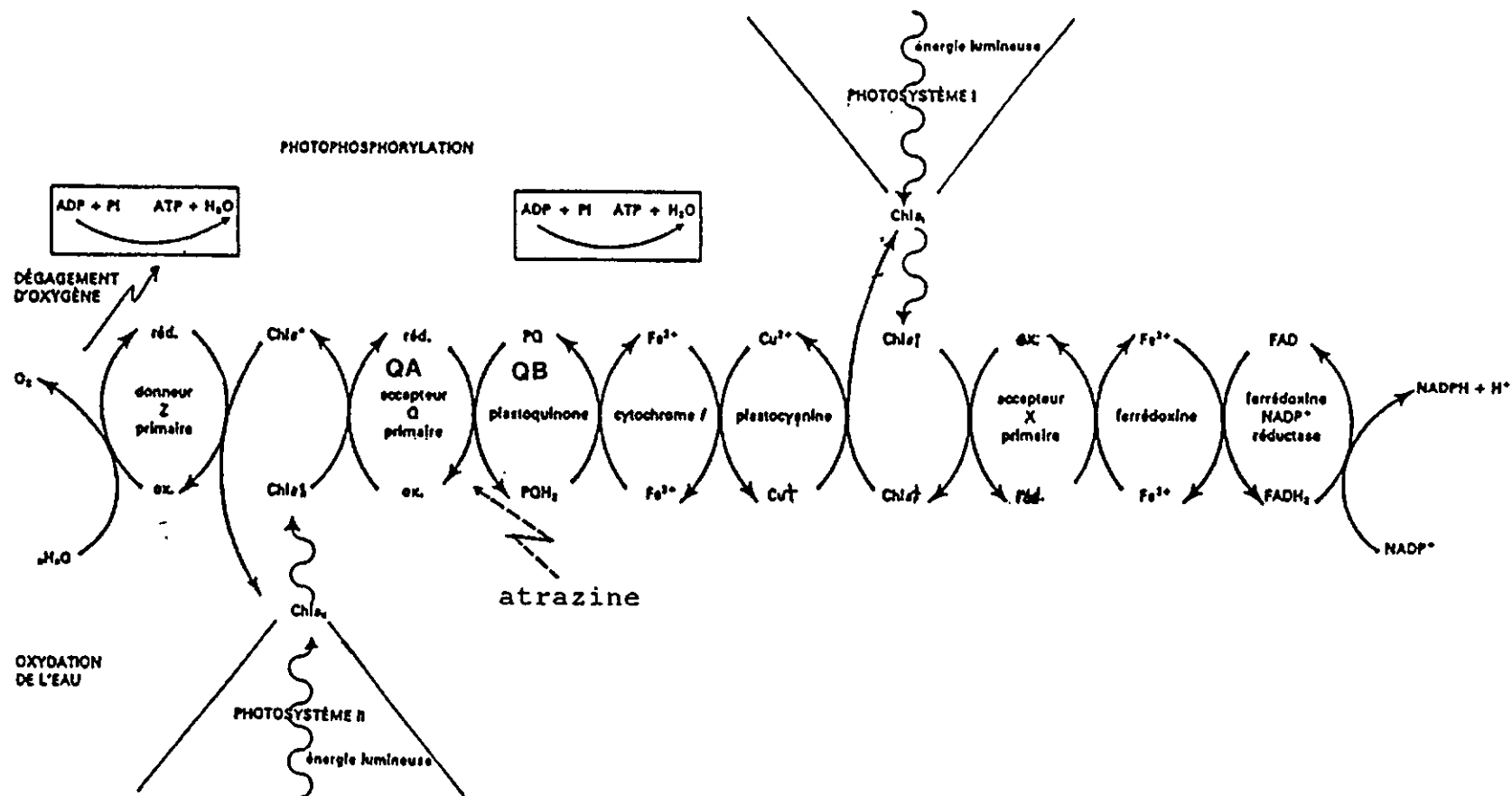


FIGURE 1. Mode d'action de l'atrazine dans la chaîne d'électrons du photosystème

L'atrazine, nom générique du 2,4-diamine, 6-chloro-N-éthyl-N'-(1-méthyléthyl)-1,3,5-triazine, est relativement soluble dans l'eau (30 mg L^{-1} à 20°C). Elle peut être adsorbée sur les particules du sol mais être désorbée facilement par la pluie et se retrouver dans le milieu (SAGE, 1988). La quantité d'atrazine transportée lors d'une tempête est inversement reliée à la période de temps entre l'application d'atrazine et le moment où la tempête a lieu (Klaine et al., 1988). Par contre, dans l'écosystème aquatique, l'atrazine ne s'accumule pas dans les niveaux trophiques supérieurs. Elle est relativement non toxique pour les invertébrés et les poissons mais présente une forte toxicité pour le phytoplancton. Elle peut inhiber la photosynthèse à des concentrations aussi faibles que 0.001 à 0.005 mg L^{-1} (Hans-Rudolf Buser, 1990).

La cyanazine (2-[[4-chloro-6-(éthylamino)-s-triazine-2-yl]amino]-2-méthylpropionitrile), appartenant à la même famille d'herbicide que l'atrazine, les triazines, présente une solubilité de 171 mg L^{-1} à 25°C . Elle est donc plus soluble que l'atrazine. La DL_{50} (dose létale) orale observée chez le rat est de 334 mg kg L^{-1} présentant une toxicité plus élevée que l'atrazine, la DL_{50} étant de 1900 à 3000 mg kg^{-1} chez cette dernière (Stevens et Summer, 1991). Jusqu'à présent, très peu d'études ont été faites sur la toxicité de la cyanazine chez le phytoplancton. Sa solubilité peut favoriser son entrée dans le milieu aquatique lors de précipitations suite à son application sur les terres agricoles. La cyanazine est souvent utilisée avec l'atrazine pour combattre les mauvaises herbes dans les cultures de maïs (SAGE, 1988).

Les triazines sont utilisées surtout pour protéger les cultures de maïs contre le chiendent et le souchet qui peuvent envahir, dans certains cas, jusqu'à 25% du territoire cultivable.

Le butylate est un herbicide de la famille des thiocarbamates. Ces derniers agissent sur la biosynthèse des lipides. Ils provoquent des changements au niveau de la cire épicuticulaire en réduisant la biosynthèse des lipides cuticulaires. Ces changements apportent une plus grande perméabilité foliaire. Cette perméabilité rend les plantes plus susceptibles aux traitements subséquents avec des herbicides appliqués sur le feuillage. Les thiocarbamates ont également des effets sur le métabolisme des lipides en général. Ils peuvent occasionner une diminution de la biosynthèse des acides gras dans les phospholipides et les galactolipides et interférer sur la biosynthèse des gibberélines, hormones de croissance (Böger et al., 1989).

Le butylate (S-ethyl diisobutyl thiocarbamate), relativement soluble dans l'eau (45 mg L^{-1} à 20°C) peut être facilement transporté par l'eau de pluie dans le milieu aquatique. Selon le rapport SAGE (1988), les carbamates sont biodégradables et ne s'accumulent pas dans l'environnement vu leur caractère très peu lipophile. Cependant, le butylate, comme plusieurs thiocarbamates, peut être toxique pour les algues et les plantes aquatiques (SAGE, 1988).

Le butylate est un herbicide systémique à large spectre. Il est employé sur les champs de maïs pour

combattre les mauvaises herbes à larges feuilles, les graminées annuelles, le souchet et la panic d'automne (SAGE, 1988).

L'acide 4-chloro-2-n-méthylphénoxyacétique (MCPA) appartient à la famille des acides chloro-phénoxyques. Il agit comme un homologue d'hormone de croissance végétale, les auxines synthétiques (Stevens et al., 1991). Il entraîne une prolifération désordonnée du tissu végétal favorisant la formation de tumeur. Par contre, le MCPA pourrait agir autrement chez les algues puisque chez ces dernières il y a absence d'hormones de croissance. Des études récentes indiquent qu'il pourrait exercer sa toxicité au niveau du photosystème en bloquant le transport des électrons (Thomas et al., 1990).

Le MCPA est un herbicide qui présente également une grande solubilité (800 mg L^{-1} de 20 à 30°C). Il peut, tout comme le butylate, se retrouver rapidement dans le milieu aquatique s'il y a de fortes pluies suite à son épandage. Dans une région où les précipitations peuvent être abondantes, le MCPA peut s'infiltrer dans le milieu aquatique et présenter un danger. Par contre, il semble moins toxique pour la faune aquatique que beaucoup d'autres herbicides (SAGE, 1988).

Le MCPA est également un herbicide systémique sélectif, qui est surtout employé dans la culture de céréales et de pois verts. Il aide à combattre la mauvaise herbe annuelle à larges feuilles incluant moutarde, chénopode, herbe à poux, ortie des champs, etc (SAGE, 1988).

Le dé-éthyl atrazine est un des produits de dégradation de l'atrazine que l'on retrouve souvent dans le milieu aquatique. Le dé-éthyl atrazine est le principal métabolite de l'atrazine. Il est régulièrement détecté dans les eaux de surface ou les eaux souterraines contaminées par l'atrazine (Pionke et al., 1990). Suite à une campagne d'échantillonnage menée par Bernard Rondeau d'Environnement Canada, dans le bassin hydrographique de la rivière Yamaska (Québec, printemps 1991), plusieurs échantillons présentaient des niveaux détectables de dé-éthyl atrazine. Ce métabolite de l'atrazine semble présenter encore une phytotoxicité (Pionke et al., 1990; Winkelmann et al., 1991). Celle-ci pourrait être associée aux chlores restant sur la molécule car une déchloration complète de la molécule d'atrazine, suivie d'une hydroxylation, forme un métabolite non chloré soit l'hydroxyatrazine ne présentant aucune phytotoxicité (Winkelmann et al., 1990). De plus, selon ces auteurs, le dé-éthyl atrazine est reconnu comme étant persistant dans l'environnement. Puisque ce dernier est détecté régulièrement dans l'eau et que peu d'études ont permis d'évaluer son impact sur le phytoplancton, il est intéressant de le retenir comme contaminant.

1.2- Le phytoplancton dans l'écosystème aquatique

Le phytoplancton dans l'écosystème aquatique est la principale composante autotrophe du plancton. Il se compose de plusieurs espèces algales formant des associations particulières selon les propriétés physico-chimiques du milieu.

Le fonctionnement de l'écosystème aquatique est basé sur la fixation de l'énergie solaire par la photosynthèse permettant la production de composés organiques (Smith, 1980). Par leurs capacités photosynthétiques, les algues sont situées au premier maillon de la chaîne alimentaire. Elles ont un rôle important dans les fonctions de minéralisation des éléments chimiques, de production d'oxygène dissous, de formation de composés azotés, des cycles de substances organiques et inorganiques, etc. Ces fonctions dépendent de la dynamique des populations et cette dernière dépend de la variabilité saisonnière des températures, de l'intensité des radiations solaires, des concentrations d'éléments nutritifs dans l'eau, et du broutage par les animaux (Walch et al., 1984). Les algues sont donc considérées comme les piliers de l'organisation du biote aquatique supportant ainsi le développement de la biomasse des niveaux trophiques supérieurs.

1.2.1- Le rôle des algues comme indicateurs de pollution environnementale

Par le rôle spécifique du phytoplancton comme pilier de la chaîne alimentaire dans l'écosystème aquatique, les algues sont devenues rapidement des indicateurs pour déterminer les effets stimulateurs et inhibiteurs des substances polluantes dans l'environnement aquatique.

Les altérations naturelles et anthropogéniques sur la qualité de l'eau peuvent bouleverser les différentes fonctions associées au phytoplancton. Ces altérations sont susceptibles de provoquer des changements dans la composition des espèces algales de la communauté

phytoplanctonique, d'augmenter ou de diminuer le niveau de productivité primaire et les niveaux d'organisation de l'écosystème, d'affecter la composition chimique de l'eau, etc.

Les problèmes anthropogéniques d'eutrophisation des lacs et des cours d'eau ont été parmi les premières grandes préoccupations des dommages causés aux systèmes aquatiques (Vollenweider, 1966; Chiaudani et al., 1974; Keighan, 1977). Déjà, en 1971, l'Environmental Protection Agency des États-Unis (USEPA) proposait deux protocoles permettant de caractériser le niveau d'enrichissement des eaux en substances nutritives. Un de ces protocoles mesurait le potentiel de fertilité (mesure de biomasse algale après incubation de 21 jours en présence d'échantillons d'eau par rapport à un témoin), l'autre permettait de mesurer la contribution de l'azote et du phosphore sur la stimulation de la croissance algale.

Au Québec, la première étude à l'aide d'un indicateur biologique algal sur la caractérisation de la qualité des eaux du fleuve Saint-Laurent a été réalisée par Keighan et al., en 1977. Il mesurait entre autres le potentiel de fertilité à l'aide du test développé par l'USEPA en 1971.

Parallèlement à la problématique de l'eutrophisation, une autre grande problématique inquiétait les chercheurs, celle de la contamination de l'écosystème aquatique par les métaux lourds. Déjà en 1937, en Grande-Bretagne, Reese faisait paraître un article sur les problèmes de pollution rencontrés dans deux rivières (Rheidol et Melindwr) passant à proximité de mines de plomb (Reese, 1937). Il observa une différence significative au niveau de la flore algale

en amont et en aval de ces mines. Un peu plus tard, en 1960, Hynes observa l'impact de la pollution du cuivre au niveau des associations, entre les espèces algales et leurs proportions respectives, en amont et en aval de rejets d'une raffinerie de cuivre dans la rivière Churnet, un tributaire de la rivière Dove (Angleterre). Cette étude est considérée comme un exemple classique des effets directs d'un polluant affectant la communauté phytoplanctonique. Rai et al., en 1981, nous livrent un document intitulé "Phycology and Heavy-Metal Pollution" résumant les effets de plusieurs métaux lourds sur le métabolisme algal.

Les effets sur le phytoplancton des contaminants organiques et des mélanges complexes de contaminants (ex.: effluents industriels) ont également fait l'objet de nombreuses recherches. En 1973, Aronson évaluait les effets aigus de plusieurs insecticides sur la prise en charge du carbone 14 (méthode développée par Steeman-Nielsen) chez plusieurs espèces phytoplanctoniques. En 1975, Greene et al. utilisaient les essais algaux pour évaluer l'impact des rejets municipaux, industriels et agricoles sur la production phytoplanctonique. Au Québec, en 1981, Joubert effectua une étude comparative des effets délétères, suite à l'exposition de différents organismes à des effluents provenant de différentes sources. Les algues *Selenastrum capricornutum* et *Chlamydomonas variabilis* ont été retenues lors de cette étude.

Comme les algues représentent des indicateurs sensibles pour dépister les effets adverses des toxiques et qu'elles peuvent subir des atteintes suite à l'apport de

pesticides dans le milieu aquatique, nous les avons utilisées comme indicateur de phytotoxicité des herbicides.

1.3- Les biotests algaux

1.3.1- Historique et principes généraux des microbiotests

La détérioration de la qualité de l'eau par des produits toxiques ou des stimulants de croissance algale provenant des activités industrielles, agricoles ou municipales, présente un problème de premier ordre. Les premières études entreprises pour évaluer le degré de détérioration utilisaient surtout les paramètres chimiques (conductivité, oxygène dissous, etc) et physiques (pH, température, turbidité, etc) du milieu aquatique. Dans le cadre d'une politique de caractérisation de la ressource, ces paramètres, bien qu'importants, s'avéraient insuffisants. Il est devenu impératif de développer en parallèle la caractérisation biologique du milieu.

Différentes composantes de la communauté scientifique ont entrepris des recherches sur l'utilisation d'indicateurs biologiques du milieu. Les indicateurs biologiques *in situ* présentent un outil intéressant pour caractériser le niveau d'atteinte du milieu aquatique. Cependant, la diversité de ces indicateurs biologiques, facilement utilisables et ne présentant pas trop de variabilité dans le milieu pour démontrer une relation directe de causes à effets, invite les chercheurs à beaucoup de prudence. Par contre, les bioessais effectués en laboratoire, où les différents paramètres chimiques et physiques du milieu sont réduits et contrôlés, offrent des

techniques intéressantes pour mettre en relation directe la toxicité et la réponse physiologique ou métabolique des organismes utilisés (Keighan, 1977).

Les bioessais en laboratoire ou les essais *in situ* sont des sources d'information encore peu exploitées pour évaluer la toxicité des pesticides. Les bioessais en laboratoire sont peu coûteux, sensibles et généralement standardisés; ils présentent des outils intéressants pour mesurer le potentiel toxique des pesticides. Les bioessais de laboratoire peuvent également être très utiles lors de l'homologation des substances toxiques telles les pesticides. En précisant la toxicité potentielle des pesticides à l'aide des bioessais de laboratoire, nous pouvons par la suite prioriser pour les études *in situ* les sites contaminés par les pesticides présentant de fortes toxicités. Dans le cadre de projets de monitoring, de caractérisation des effluents, des produits de lessivage, etc, les bioessais présentent des modèles de prédiction de la toxicité pouvant même servir de base aux normes gouvernementales pour la protection du milieu aquatique.

Depuis les années 1970, les algues unicellulaires ont retenu l'attention comme réactif biologique potentiel pour les bioessais. Cela tient d'une part au fait qu'elles sont des bioindicateurs sensibles de pollution, que leurs cycles biologiques sont de courte durée, qu'elles ont le potentiel de bioaccumuler, et, d'autre part, qu'elles composent une grande proportion du phytoplancton et sont de culture et de manipulation relativement faciles. Les algues unicellulaires qui ont été retenues pour ce genre d'essais sont représentées essentiellement par les Chlorophycées,

les Diatomées et quelques Cyanophycées (Jouany, 1981)

Les microbiotests utilisent des organismes unicellulaires ou de petits organismes pluricellulaires, que l'on expose à différentes concentrations d'échantillons liquides toxiques et sur lesquels on mesure un effet spécifique (Blaise, 1991).

En 1978, l'USEPA publia un protocole permettant de mesurer le potentiel de croissance (Miller et al., 1978). Ce protocole a été conçu dans le but de détecter la présence de facteurs nutritifs et permettait de détecter l'effet inhibiteur de substances toxiques lorsque les cultures algales présentaient des conditions optimum de croissance. L'algue retenue pour effectuer ces tests était *Selenastrum capricornutum* (voir figure 2). Cette algue a été isolée en 1959 de la rivière Nitelva dans la région d'Akershus en Norvège par l'Institut Norvégien pour la recherche en eau. *Selenastrum capricornutum* est une algue ubiquitaire qui s'adapte facilement à diverses conditions environnementales. Elle adopte une morphologie en forme de croissant de lune (Miller et al., 1978). Elle mesure 7,49 μm de longueur et 2,14 μm de largeur ce qui correspond à un volume cellulaire moyen de 71,8 μm^3 .

Selenastrum capricornutum représentait l'espèce algale la plus utilisée en laboratoire. Au Québec, plusieurs études ont permis de vérifier l'efficacité des tests biologiques avec *Selenastrum capricornutum*. La polyvalence d'utilisation de ce réactif biologique pour préciser les répercussions environnementales potentielles des composés toxiques a été prouvée par diverses études (St-Laurent et

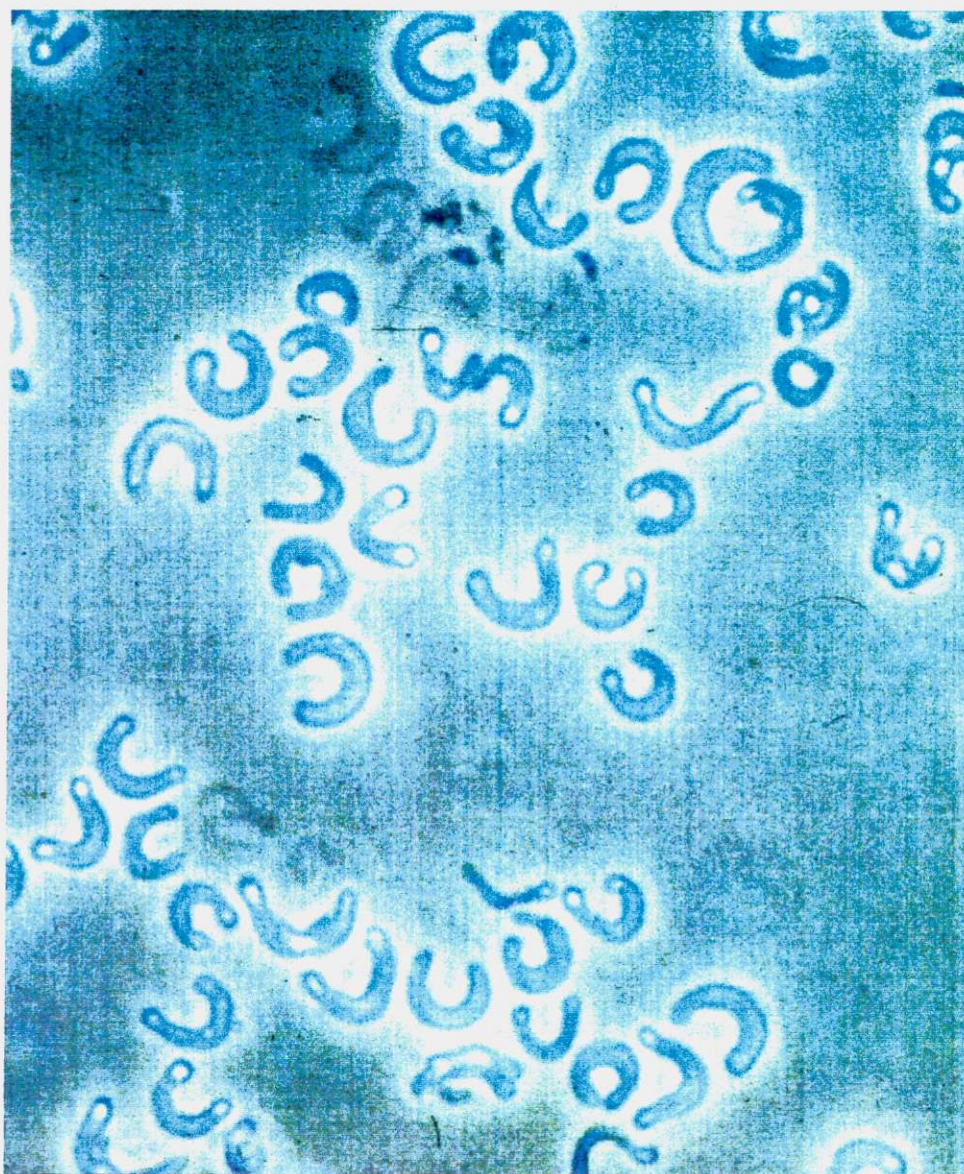


FIGURE 2. L'algue verte *Selenastrum capricornutum*

al., 1991; Thellen et al., 1989; Blaise et al., 1986; Couture et al., 1985; Van Coillie et al., 1982; Couture et al., 1981; Joubert, 1980).

Des études ont également été menées à l'aide de ce test biologique pour évaluer l'impact des métaux lourds (Chiaudi et al., 1978; Christensen et al., 1979; Rai et al., 1981), des rejets industriels (Van Coillie et al., 1982; Couture, 1981; Joubert, 1980), des pesticides (St-Laurent, 1991; Blaise et al., 1991; Thomas et al., 1990; Caux et al., 1988;), etc. Présentement, le test d'inhibition de croissance algale est recommandé sur le plan international par l'Organisation pour la Coopération Économique et le Développement (OCDE) pour des évaluations écotoxicologiques (Nyholm, 1989).

Le protocole développé par l'USEPA était effectué en erlenmeyers. Dans le but d'alléger la technique, Blaise (1986) proposa un protocole miniaturisé remplaçant le test en erlenmeyers par un test en microplaques. L'utilisation de la microplaque offre plusieurs avantages tels la rapidité d'exécution du test, plus économique, prend moins d'espace que la technique en erlenmeyers et offre un potentiel d'automatisation (Blaise, 1991).

1.3.2- Les essais sur les herbicides sélectionnés

Dans le cadre de la problématique de la contamination du milieu aquatique par les pesticides, deux réponses algales sont possibles. Une réponse de type chronique, associée à l'apport graduel des pesticides dans le milieu et l'autre réponse est de type aigu. Elle peut survenir

surtout au printemps lors de fortes précipitations suite à l'application des pesticides sur les terres agricoles. Dans le cadre de cette recherche, les effets sublétaux et létaux ont été mesurés suite à une incubation de 96 heures correspondant à une exposition de type chronique.

Les essais biologiques mesurant les effets chroniques ont été réalisés selon le protocole miniaturisé en microplaque développé par Blaise (1986) pour mesurer l'effet des quatre herbicides retenus et du dé-éthyl atrazine sur la croissance et la létalité chez l'algue *Selenastrum capricornutum*.

1.4- La cytométrie en flux

1.4.1- Technique de pointe

La microscopie a permis nombre d'études sur la morphologie cellulaire. Cependant, les critères morphologiques se sont avérés insuffisants pour estimer les effets délétères, suite à une exposition toxique et sont quelquefois empreints de subjectivité. L'analyse individuelle des cellules est essentielle pour comprendre les fonctions et mécanismes des cellules normales et altérées. L'emploi de marqueurs cellulaires spécifiques d'un élément, d'un constituant, ou d'un mécanisme cellulaire, comme l'activité enzymatique, a permis un avancement considérable pour le repérage, le dénombrement des différents types cellulaires ou la compréhension des mécanismes d'action, tant en recherche qu'en analyse biomédicale. La cytométrie en flux se situe au carrefour de toutes ces techniques. Elle quantifie plusieurs signaux

optiques diffusés par les cellules prises une à une, entraînées dans un flux liquide. Elle permet d'observer les variations et la distribution des propriétés cellulaires au sein d'une population (Métézeau, 1988).

La cytométrie en flux se distingue par trois caractéristiques essentielles. Premièrement, elle permet des analyses multiparamétriques, mesure plusieurs paramètres optiques simultanément tels la fluorescence à 530 nm, la fluorescence à 650 nm, la lumière diffusée à angle droit, etc, et elle permet éventuellement de les corrélérer (voir section 1.4.3). Deuxièmement, elle analyse les cellules individuellement comme en microscopie. Finalement, elle permet la quantification des signaux optiques émis par les cellules. De plus, la rapidité (observation de quelques milliers de cellules par seconde) à laquelle elle enregistre les informations, permet d'observer un nombre important de cellules, favorisant la fiabilité des données statistiques (Métézeau, 1991).

1.4.2- État actuel de la recherche en milieu aquatique

C'est vers la fin des années 1970 que la cytométrie en flux a été identifiée comme outil potentiel pour la recherche en milieu aquatique (Yentsch et al., 1991; Phinney et al., 1989; Premazzi et al., 1988). Comme le cytomètre n'accepte que des particules en suspension et de taille se situant entre 1 μm et 150 μm , le phytoplancton, composé essentiellement d'organismes unicellulaires, se prête bien aux analyses cytométriques. De plus, le phytoplancton possède des pigments photosynthétiques tels que la chlorophylle, permettant l'analyse cytométrique de

la fluorescence chlorophyllienne. On peut donc effectuer une analyse biparamétrique en utilisant l'autofluorescence chlorophyllienne et un autre paramètre optique.

La cytométrie en flux peut être utilisée pour les études d'écotoxicité en laboratoire. Premazzi (1989) employa la cytométrie en flux lors de tests de toxicité sur l'acide nitrilotriacétique (NTA), le cuivre et le cadmium en utilisant plusieurs espèces algales. Berglund et Eversman (1988) réalisèrent une étude portant sur l'évaluation du stress causé par la pollution atmosphérique sur le lichen, à l'aide des techniques cytométriques. La cytométrie en flux permet des analyses sur le cycle cellulaire chez les algues (Bonaly-Cantarel, 1988), l'autofluorescence chlorophyllienne (Xu et al., 1990; Demers et al., 1989) etc. Elle peut également être employée pour les études limnologiques et océanographiques (Legendre et al., 1989). Ces analyses permettent une meilleure compréhension des mécanismes et des effets des toxiques sur le phytoplancton.

1.4.3- Évaluation de la létalité

La mesure des effets sublétaux et létaux présente une grande importance dans l'évaluation du risque. Les tests mesurant les effets sublétaux nous informent de la présence d'un stress cellulaire. Ce sont des tests de dépistage précoce du potentiel toxique d'un contaminant. Par contre, l'évaluation de la létalité cellulaire est importante puisque les algues subissant une atteinte toxique létale ne peuvent récupérer ou s'adapter à la pollution. Les effets algicides (provoquant la mort) sont considérés comme des

agressions plus directes que les effets algistatiques (ne provoquant pas de mortalité).

1.4.4- La cytométrie en flux pour mesurer la létalité algale

La viabilité cellulaire a été obtenue par la lecture de deux paramètres optiques soit la présence de l'activité enzymatique des estérasiques à l'aide d'un marqueur fluorescent, le diacétate de fluorescéine (longueur d'émission: 530 nm), et l'autofluorescence chlorophyllienne (longueur d'émission: 650 nm). Sur chacune des cellules, la viabilité a été révélée par la présence de l'activité estérasique et par l'autofluorescence chlorophyllienne. La lecture simultanée de ces deux signaux optiques a permis de nous informer sur l'état de la cellule. Ainsi, la mesure simultanée de ces deux paramètres optiques certifiant la viabilité cellulaire a offert un grand avantage sur les techniques conventionnelles de mesures microscopiques.

1.5- Le diacétate de fluorescéine et l'autofluorescence chlorophyllienne, marqueurs de viabilité

1.5.1- Le diacétate de fluorescéine

Il est impératif de bien connaître les propriétés des colorants pour marquer les cellules viables et non viables. Les répercussions sur le métabolisme cellulaire et les propriétés physico-chimiques du colorant devront être connues et minimisées. Il est également essentiel de bien connaître leur qualité spectrale dans le cas de leur utilisation avec d'autres marqueurs.

Dans le cadre de cette étude, nous avons fait un choix parmi les colorants fluorescents supravitaux. Ceux-ci pénètrent les cellules viables et non viables mais se fixent uniquement dans les cellules viables. Ils s'avèrent peu ou non toxiques et sont liposolubles. Ils traversent donc facilement la membrane cellulaire (Combrier et al., 1988). Reconnu en tant que colorant fluorescent fiable pour révéler la viabilité cellulaire, nous avons retenu le diacétate de fluorescéine ou FDA (Rotman et Papermaster, 1966; Berglund et al., 1988; Gala, 1990). Plusieurs études ont permis de vérifier l'efficacité du FDA comme marqueur de viabilité en révélant l'activité estérasique chez les cellules algales (Gala, 1990; Dorsey et al., 1989; Berglund et al., 1988).

Le FDA est une molécule non polaire (ester d'acide gras) et non fluorescente. Ces propriétés facilitent sa pénétration à travers la membrane des cellules viables et mortes. A l'intérieur des cellules vivantes, des estérases non spécifiques cliveront le lien ester des acétates pour libérer la fluorescéine. L'hydrolyse du FDA se produit à 95 % dans le cytoplasme (Sontag, 1977). La fluorescéine étant hydrophile demeure captive du cytoplasme des cellules viables dont la membrane cellulaire est en bon état physiologique (Combrier et al., 1988; Dorsey et al., 1989). La fluorescéine dont le spectre d'émission est à 530 nm (spectre vert), est captée par le détecteur à fluorescence verte du cytomètre. La fluorescence est transmise en unités relatives de fluorescence (URF). Chez les cellules non viables, le FDA ne pourra être clivé étant donné l'absence d'activité estérasique.

L'intensité de fluorescence verte dépend de l'activité des estérases, du pH intracellulaire (Visser et al., 1979) et de l'intégrité membranaire (Persidsky et al., 1979, Prosperi et al., 1986, Aeschbacher et al., 1986). La perte de l'intégrité membranaire permettra un relargage plus rapide de la fluorescéine. La diminution du pH intracellulaire et de l'activité estérasique pourra réduire l'intensité de fluorescence verte.

1.5.2- L'autofluorescence comme indicateur de viabilité

L'unique mesure de l'activité des estérases liée à l'intensité de fluorescence verte ne constitue pas une preuve irréfutable de viabilité. Étant donné que certains toxiques peuvent inhiber l'activité estérasique tels que: certains métaux (Karataglis et al., 1988) et organophosphorés (Casarett et Doull, 1986), et que d'autres peuvent l'induire ou l'activer tels que: les pesticides de la famille des chloroacétamides (Kaufman et al., 1976), il s'est avéré essentiel d'incorporer un deuxième indicateur de viabilité à notre procédure.

Notre choix s'est porté sur la fluorescence chlorophyllienne. La fluorescence chlorophyllienne est employée dans de nombreuses recherches en toxicologie. Il a été démontré qu'elle pouvait être un bon indicateur de l'état physiologique de la cellule végétale (Xu et al., 1990; Premazzi et al., 1989; Samson et al., 1988; Roy et al., 1979; Samuelsson et al., 1977).

Lorsque l'énergie d'excitation n'est pas utilisée dans la photosynthèse, les pigments chlorophylliens perdent

cette énergie sous forme de chaleur ou de fluorescence (Salisbury et Ross, 1985). Lorsque excitée à 488 nm, la chlorophylle des cellules algales saines fluoresce autour de 650 nm (spectre rouge), laquelle est captée par le détecteur à fluorescence rouge du cytomètre. En utilisant l'autofluorescence, nous évitons un chevauchement de fluorescence avec celle émise par le FDA (fluorescence verte). Nous évitons également l'emploi d'un deuxième fluorochrome, allégeant davantage le protocole. L'accumulation intracellulaire de fluorescéine n'interfère pas avec l'autofluorescence (Dorsey et al., 1989). Il est à noter cependant que l'autofluorescence ne peut pas non plus apporter à elle seule une garantie absolue de viabilité. En effet, plusieurs toxiques peuvent altérer l'autofluorescence sans nécessairement entraîner une conséquence algicide (Samuelsson et al., 1977; Roy et al., 1979; Grazyna et al., 1987). L'évaluation de la létalité à l'aide de ces deux marqueurs permettra d'effectuer des analyses biparamétriques des signaux optiques sans difficultés d'interprétation.

La viabilité étant fonction et de la mesure de l'intensité de fluorescence verte liée à l'activité estérasique et de l'autofluorescence liée à la chlorophylle, un fenêtrage cytométrique, établi selon ces deux critères, a permis de différencier clairement entre cellules vivantes et mortes (voir section 2.3 du chapitre matériel et méthodes).

1.6- Objectifs de la recherche

Les objectifs de cette étude consistent à évaluer la toxicité de quatre herbicides et d'un métabolite: l'atrazine, la cyanazine, le butylate, le MCPA et le dé-éthyl atrazine (métabolite de l'atrazine). L'utilisation de deux bioessais, un mesurant un effet subléthal soit l'inhibition de croissance et l'autre mesurant la létalité algale, permettra l'évaluation de la toxicité associée aux herbicides mentionnés envers une espèce algale, *Selenastrum capricornutum*. Mise à part l'atrazine, aucune évaluation phytotoxécologique sur l'algue *Selenastrum capricornutum* n'a été faite à ce jour sur la cyanazine, le butylate et le MCPA et le dé-éthyl atrazine. Suite à cette étude, des recommandations pourront être apportées pour le développement de recherches futures ou pour l'utilisation de ces herbicides en milieu agricole.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1- Matériel biologique et entretien des cultures

L'organisme retenu pour les tests a été l'algue *Selenastrum capricornutum*, souche ATCC 22662. Les algues ont été mises en culture dans un milieu nutritif d'AAP 1X (Algal Assay Procedure: U.S. EPA, 1978). Ce dernier a été obtenu à partir de cinq solutions de macro et microéléments. Un volume de 1 ml a été prélevé de cinq solutions contenant les éléments nutritifs et ajouté à 900 ml d'eau déionisée (Millipore Super-Q). Le volume de la solution a été complété à 1 L. Les concentrations finales de macroéléments et de microéléments étaient les suivantes:

Macro-éléments

.Nitrate de Sodium, NaNO_3	25,5 mg/L
.Chlorure de Magnésium, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10,0 mg/L
.Chlorure de Calcium, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,42 mg/L
.Sulfate de Magnésium, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14,7 mg/L
.Phosphate de Potassium, K_2HPO_4	1,04 mg/L
.Bicarbonate de Sodium, NaHCO_3	15,0 mg/L

Micro-éléments

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

Le pH du milieu a été ajusté à $7,5 \pm 0,1$ en utilisant 0,1N d'hydroxyde de sodium ou d'acide hydrochlorique. Le milieu nutritif a été ensuite filtré à $0.45 \mu\text{m}$ (tableau I, p. 46) sous conditions stériles. Chaque litre de milieu a été réparti dans des erlenmeyers de 2 L. Un inoculum de $100 \mu\text{l}$ d'algues provenant d'une culture en phase logarithmique de croissance (généralement de 7 jours) a été ajouté dans un des erlenmeyers contenant 1 L de milieu nutritif. Les milieux restants ont été entreposés à 4°C à la noirceur. La culture a été incubée pendant une période de 7 jours avec agitation (100 rpm), à 24°C sous luminosité continue (approximativement $95 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$). Un repiquage de la culture d'algues a été effectué hebdomadairement dans un milieu AAP frais afin de maintenir les cultures en phase de croissance logarithmique.

2.2- Considérations techniques du cytomètre

L'appareil utilisé appartenait au modèle FACScan (Becton Dickinson). La mesure de cinq paramètres optiques peut être captée simultanément sur chacune des cellules. Les cinq paramètres optiques analysés sont: la lumière

diffusée à petits angles (FSC: foward side scatter), la lumière diffusée à angle droit (SSC: side scatter) et l'émission de fluorescence à trois longueurs d'onde différentes. Un mode d'amplification linéaire ou logarithmique peut être obtenu pour chacun des détecteurs optiques (Becton Dickinson, 1988).

Pour les besoins de nos travaux, les signaux optiques quantifiés provenaient de molécules fluorescentes. Le modèle FACScan offre la possibilité de réaliser des études sur des molécules fluorescentes dont la longueur d'onde d'émission se situe à 530 ± 15 nm (FL1: spectre vert), à 585 ± 22 nm (FL2: spectre orange) et > 650 nm (FL3: spectre rouge). Les molécules fluorescentes retenues pour la réalisation des travaux ont été: le diacétate de fluorescéine fluoresçant à 530 nm et la fluorescence provenant des pigments chlorophylliens (650 nm).

2.2.1- Système optique

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

Le système optique du cytomètre en flux, composé de miroirs dichroïques et de filtres, quantifie séparément les différents signaux optiques émis par une cellule. Après avoir traversé cette succession de miroirs et de filtres, les signaux optiques sont acheminés vers des systèmes de

détection, les photomultiplicateurs (PMT). Le FACScan est composé de trois photomultiplicateurs captant l'émission de fluorescence. A chacun des photomultiplicateurs est associé un filtre passe-bande spécifique à une longueur d'onde (voir figure 3). Les signaux électriques livrés par les photomultiplicateurs sont transformés par un convertisseur analogique digital (CAD) en signaux digitalisés. Le modèle FACScan possède un CAD de 10 bits. Les signaux sont digitalisés en 2^{10} , offrant 1024 valeurs discontinues. Tout signal optique issu du cytomètre est transformé par le CAD en une valeur digitalisée répartie entre les 1024 valeurs. Ainsi, selon l'intensité du signal, la valeur du canal qui lui est la plus proche lui est attribuée (Pierrez et al., 1988).

La localisation de la population cellulaire de *Selenastrum capricornutum* a été effectuée avec l'aide des signaux optiques FSC et SSC. La combinaison de ces deux paramètres optiques était la plus fiable pour discriminer les populations cellulaires (Muirhead et al., 1985). Par la suite, la population cellulaire a été localisée en fonction de la fluorescence émise à 530 nm (diacétate de fluorescéine) et 650 nm (chlorophylle). Les valeurs des amplifications et des détections (statuts expérimentaux) pour discriminer la population algale sont présentées à la figure 4. Les résultats des analyses peuvent être présentés sous forme de cytogramme biparamétrique où les paramètres mesurés sont corrélés deux par deux, chaque cellule étant figurée par un point (figure 4). Des histogrammes monoparamétriques peuvent également être générés.

- 1 Filtre rouge
- 2 Filtre orange
- 3 Filtre vert

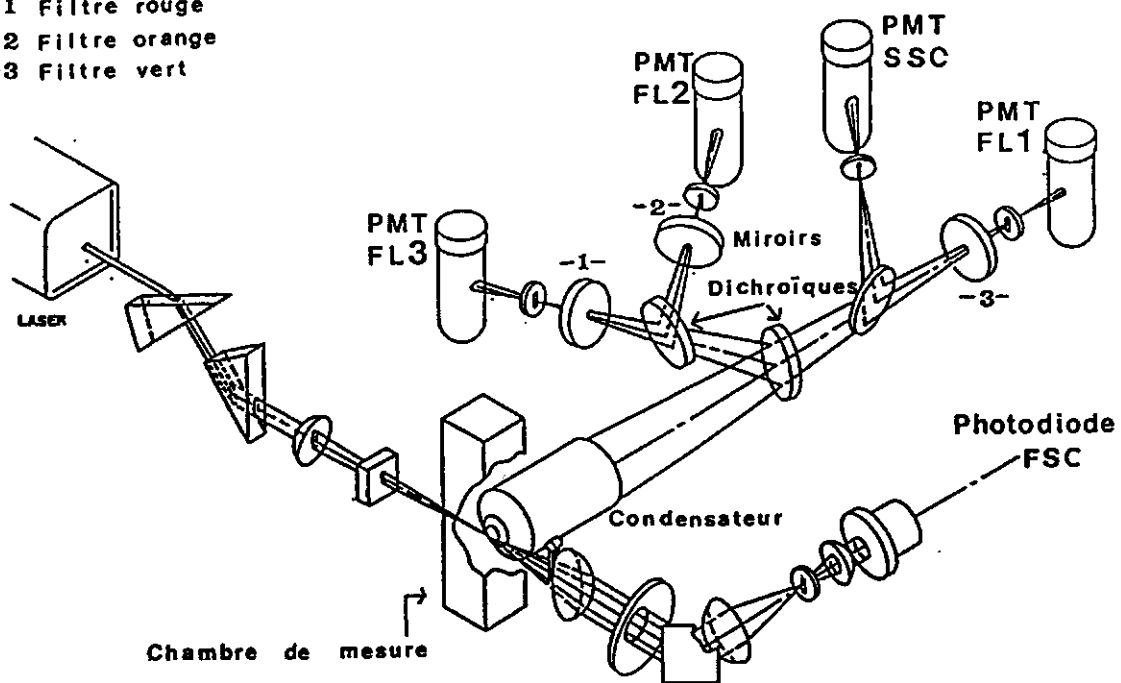
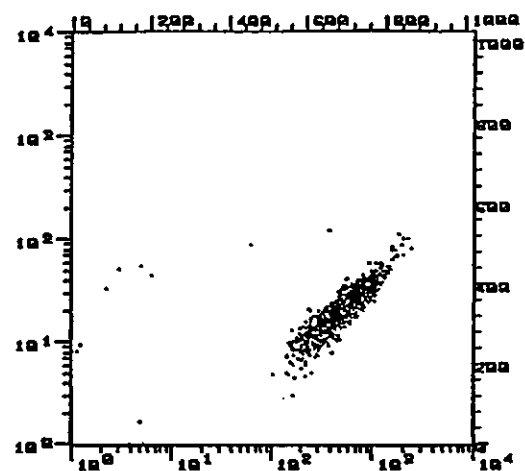


FIGURE 3. Système optique du cytomètre, modèle FACScan

Unités relatives de fluorescence (URL)

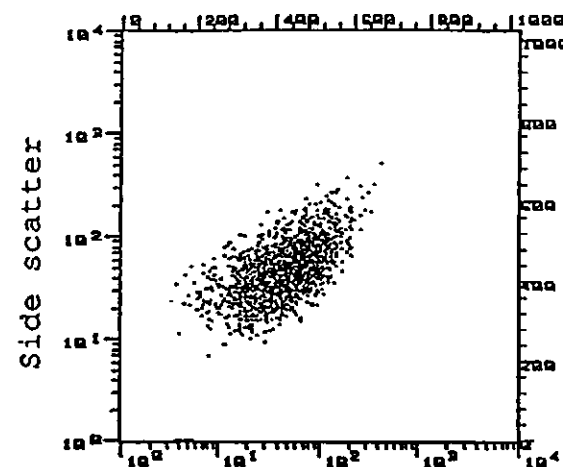
Fluorescence verte (530 nm)



Fluorescence rouge (>650 nm)

Unités relatives de fluorescence (URL)

Unités relatives de lumière diffusée



Forward scatter

Unités relatives de lumière diffusée

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

FIGURE 4. Cytogrammes des patrons cellulaires de l'algue *Selenastrum capricornutum* et les paramètres expérimentaux

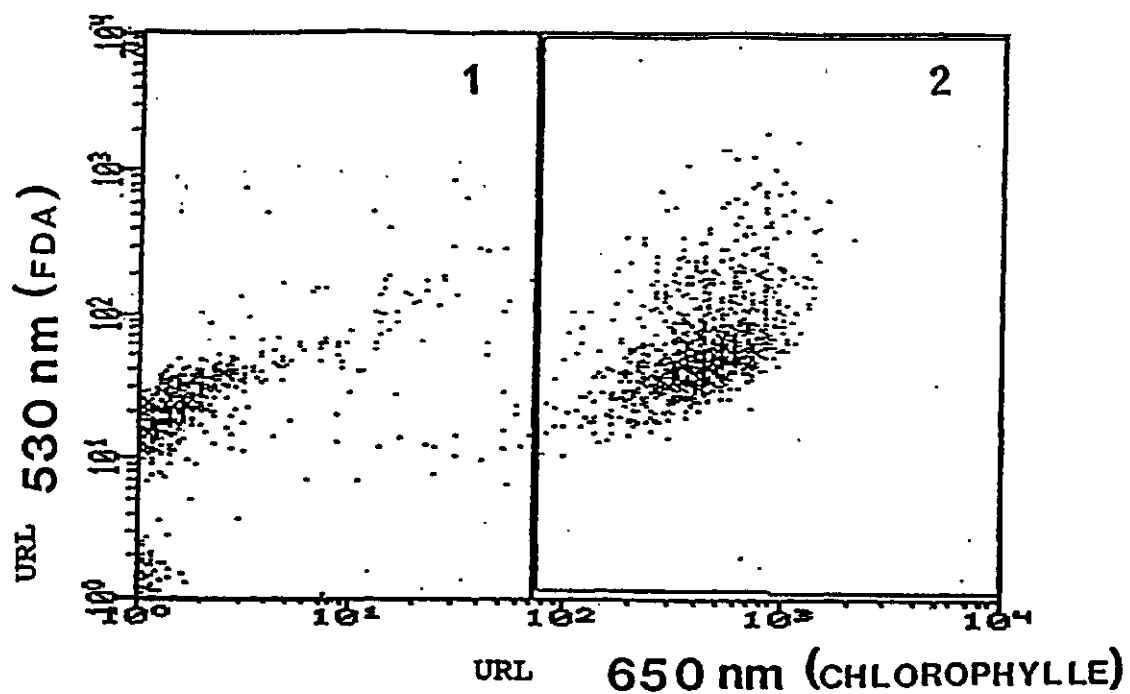
2.2.2- Écoulement des fluides

La séparation et l'entraînement des cellules dans la chambre de mesure sont obtenus par un système à deux flux laminaires. Les cellules, sous les forces hydrostatiques, sont entraînées au centre du flux liquide, permettant un positionnement adéquat dans la chambre de mesure (Métézeau et al., 1988). Au centre de la chambre de mesure, un faisceau lumineux (le laser) intercepte les cellules.

2.3- Procédure de létalité algale par cytométrie en flux

Les résultats de fluorescence pour chacune des cellules au sein de la population sont présentés sous forme d'un cytogramme de la fluorescence verte (FDA) en fonction de l'autofluorescence chlorophyllienne (figure 5). Les populations de cellules viables et non viables s'y distinguent facilement. Pour chaque expérience, un fenêtrage a été établi autour de chacune des deux populations. Ceci a permis d'estimer le pourcentage de cellules viables et non viables. Le fenêtrage a été établi en fonction de l'activité estérasique et chlorophyllienne des témoins pour chacune des expérimentations. La population de cellules mortes sera localisée dans la fenêtre 1 et la population de cellules viables sera localisée dans la fenêtre 2.

Il a été important d'effectuer des lectures cytométriques avant l'ajout du FDA, car une atteinte toxicologique sévère peut provoquer une dégénérescence chlorophyllienne. Cette dégénérescence peut être causée par la mortalité cellulaire ou par un endommagement sévère



Fenêtre 1: population cellulaire non viable

Fenêtre 2: population cellulaire viable

FIGURE 5. Cytogramme de la fluorescence verte liée au clivage du FDA en fonction de l'autofluorescence rouge chlorophyllienne.

du système chlorophyllien ou de la cellule. L'autofluorescence chlorophyllienne chez ces cellules change de spectre d'émission et les cellules émettent dans le vert autour de 530 nm au lieu d'émettre dans le rouge comme chez les cellules viables ou saines (Gala, 1990; Berglund, 1987). Cette situation provoque un chevauchement des fluorescences avec le FDA. Afin de discriminer entre l'augmentation de la fluorescence verte chlorophyllienne et celle émise par le FDA, des lectures cytométriques ont dû être effectuées avant et après l'ajout de FDA pour certifier la présence ou l'absence d'activité estérasique. L'obtention d'une intensité de fluorescence verte significativement plus élevée après incubation au FDA a confirmé la présence d'activité des estérases et donc la viabilité cellulaire.

2.4- Biotests algaux d'inhibition de croissance (CI_{50}) et de létalité (CL_{50})

Les tests algaux d'inhibition de croissance et de létalité ont été entrepris selon un protocole semblable à celui du bioessai algal en microplaque développé par Blaise (1986). La figure 6 expose la disposition expérimentale de la microplaque pour les bioessais.

Afin de déterminer les CI_{50} et CL_{50} , des mesures de dénombrement cellulaire (compteur de particules) et cytométriques respectivement ont été prises en triplicata pour chacune des concentrations du toxique. Un nombre de cinq réplicats ont été mesurés pour le groupe témoin. Pour chaque mesure paramétrique (CI_{50} et CL_{50}), une courbe dose-réponse a été obtenue. Les CL_{50} et CI_{50} ont été intrapolées par régression linéaire.

		COLONNES											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RANGÉES	A	EAU											
	B	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10		
	C	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10		
	D	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
	E	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10		
	F	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10		
	G	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10		
	H	EAU											

FIGURE 6. Configuration de la microplaque.

Les puits périphériques contiennent deux cents microlitres d'eau déionisée. Les colonnes deux à onze sont réservées pour chacune des concentrations du toxique (T). Les dilutions du toxique sont effectuées de la colonne deux à onze, de la plus forte concentration à la plus faible. Pour chacune des concentrations cinq échantillons subdivisés sont analysés. La rangée D est exclusivement réservée au groupe témoin (C: contrôle).

2.4.1- Principes du test d'inhibition

Suite à l'exposition toxique, l'estimation de l'inhibition de croissance a été effectuée par dénombrement cellulaire à l'aide du compteur électronique de particules. La variable retenue pour l'évaluation de la CI_{50} a été le niveau de croissance obtenu suite à une exposition toxique de 4 jours en comparant la biomasse algale des groupes exposés par rapport aux groupes témoins.

2.4.2- Principes du test de létalité

La létalité a été quantifiée pour chaque toxique testé à l'aide du cytomètre en flux. Ces tests en microplaque ont été faits en duplicata. Suite à l'incubation de 4 jours, seulement un des duplicatas a été traité au FDA. Des lectures cytométriques ont été prises sur chacune des microplaques. L'intensité de la fluorescence à 530 nm émise par les algues, avant et après l'ajout de FDA, permettra de vérifier la présence d'activité estérasique.

Avant d'entreprendre les lectures cytométriques, le contenu de chacun des puits a été transféré dans les puits d'une microplaque à filtration. Dans cette dernière, le fond de chacun des puits est remplacé par un filtre de 0,65 μm . Cette étape a permis d'éliminer les possibilités de chelation du FDA par le toxique pouvant causer une diminution de la disponibilité du FDA. La compétition au niveau du transport membranaire entre le FDA et autres substances organiques (Dive et al., 1987) a été également éliminée et le cytomètre n'a pas été contaminé par les toxiques.

La filtration de la microplaque a été réalisée comme suit: suite au transfert du contenu de chacun des puits dans les puits correspondants de la microplaque à filtration, le milieu dans lequel baigne les algues est retiré par aspiration sous vide à l'aide d'une pompe. Les algues retenues par les filtres sont ensuite resuspendues dans 180 μ l de milieu frais AAP 1X.

Afin de vérifier la viabilité, le traitement des algues contenues dans chacune des microplaques s'est fait comme suit: dans les puits d'une des microplaques, une concentration finale de 5 μ M de FDA a été obtenue par l'ajout d'un volume de 20 μ l d'une solution de travail de FDA à 50 μ M (0,5 % acétone). Le temps d'incubation nécessaire afin de s'assurer une réponse adéquate de l'activité estérasique, a été établi à 30 minutes (Ménard et al, 1991). Dans le but de respecter le temps d'incubation de 30 minutes pour tous les puits, les réactifs (FDA, acétone) ont été ajoutés dans les puits par intervalle de cinq minutes entre chaque concentration de toxique. Ceci a permis d'effectuer les lectures au cytomètre dans le temps prévu d'incubation. La figure 7 illustre les étapes du protocole. La concentration finale d'acétone étant de 0.05 %, un volume de 20 μ l d'une solution de 0.5 % d'acétone a été ajouté dans l'autre microplaque. Rappelons ici que la microplaque sans FDA a constitué notre témoin pour évaluer l'autofluorescence verte (530 nm) liée à un sévère endommagement possible du système chlorophyllien par le toxique (voir section 2.3).

Pour effectuer les lectures cytométriques, le contenu des puits (200 μ l) a été transféré dans un tube contenant

100 μ l de milieu isotonique (tableau I) et 10 μ l de FDA 50 μ M. La lecture cytométrique de chaque tube a été effectuée sur 2 000 cellules.

Pour chacune des concentrations toxiques, le pourcentage de mortalité a été établi par fenêtrage des populations viables et non viables. Le pourcentage de mortalité obtenu pour les différentes concentrations a été corrigé par le pourcentage de mortalité obtenu chez le témoin. Celui-ci étant égal à 100 % de viabilité.

2.5- Solutions de travail des herbicides

L'atrazine , la cyanazine, le butylate et le MCPA utilisés pour les tests provenaient de la compagnie Riedel-de Haën (voir tableau II). À partir d'une solution mère de 0.3 mg L⁻¹ d'atrazine, une dilution a été effectuée pour obtenir une solution de travail de 0.1 mg L⁻¹ . La solution de travail de la cyanazine a été préparée à partir d'une solution mère de 30 mg L⁻¹ et rediluée pour obtenir une solution de travail de 0.30 mg L⁻¹ pour le test de létalité. Pour le test d'inhibition de croissance, une solution mère de 10 mg L⁻¹ a été diluée afin d'obtenir une solution de travail de 0.10 mg L⁻¹.

Un échantillon de dé-éthyl atrazine, solubilisé dans le benzène, a été traité par jet d'azote pour l'évaporation du benzène et le dé-éthyl atrazine a été redilué dans de l'eau SQ. Un échantillon d'eau a été envoyé à la compagnie Novalab (Lachine, P.Q.) pour en connaître la concentration finale. L'échantillon a été analysé par chromatographie en

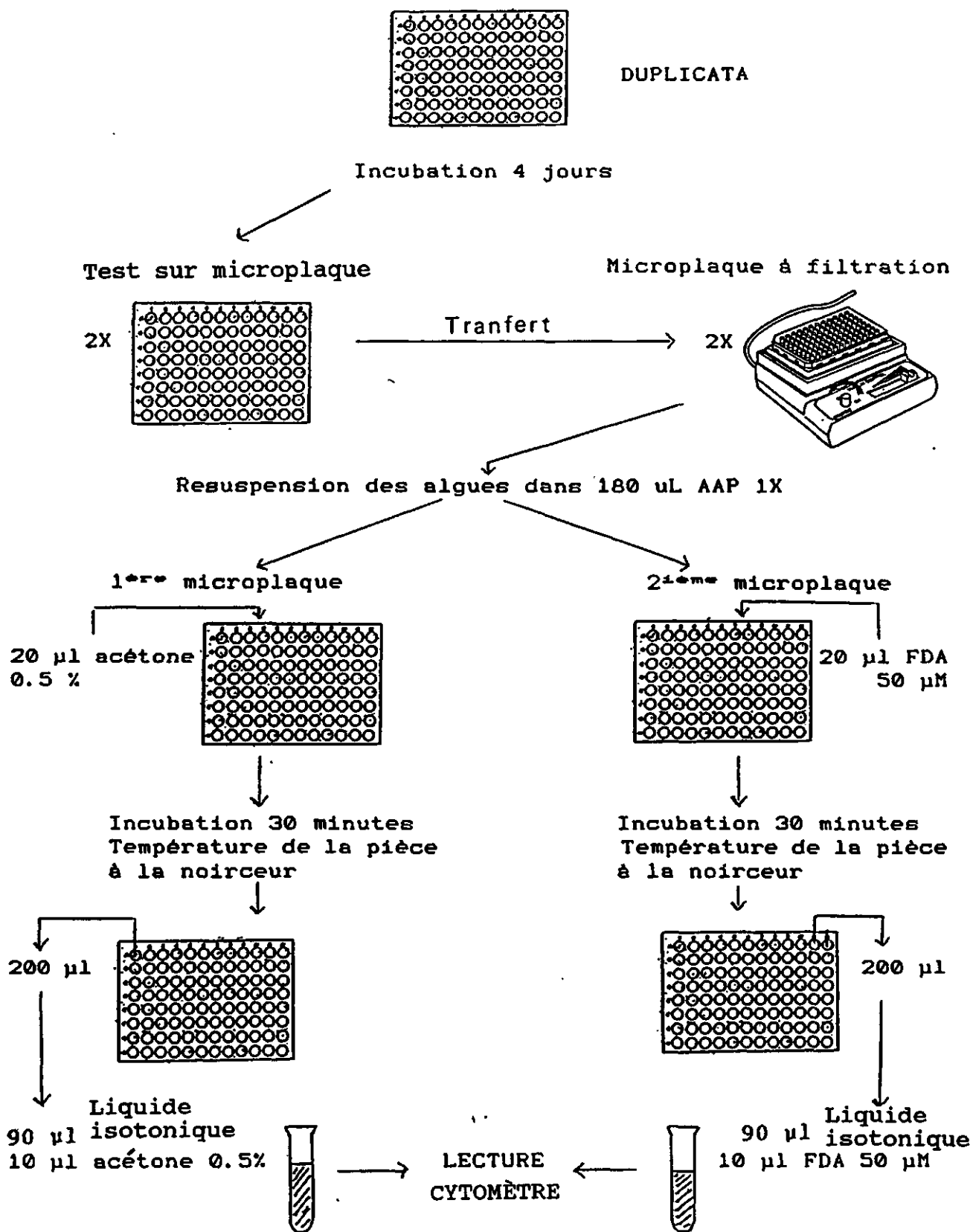


FIGURE 7. Protocole de létalité par cytométrie en flux avec l'algue verte *Selenastrum capricornutum*.

TABLEAU I

Liste du matériel et produits

MATÉRIEL PRODUITS	DESCRIPTION	COMPAGNIE
FDA	Fluorochrome	Molecular Probes F-1303
ACÉTONE	Solvant	Fisher A40B-4
HEMATALL	Liquide isotonique	Fisher CS606-20
Microplaque à filtration	Microplaque avec filtre 0,65 µm	Millipore MADVN6550
Filtre 0,45 µm	Filtration milieux AAP	MSI E04TF04700

TABLEAU II

Liste des herbicides

NOM	COMPAGNIE	N°. CATALOGUE
ATRAZINE	Riedel-de Haën	35702
CYANAZINE	Riedel-de Haën	35679
MCPA	Riedel-de Haën	35737
BUTYLATE	Riedel-de Haën	35551

phase gazeuse avec détection à l'azote. La concentration de la solution a été estimée à 28 mg L^{-1} . Cette solution mère a été diluée afin d'obtenir une solution de travail de 1 mg L^{-1} . Du à certaines difficultés techniques, les seuls résultats rapportés sont ceux du test d'inhibition de croissance.

La solution de travail du butylate a été préparée à partir d'une solution mère de $0,23 \text{ kg L}^{-1}$ et a été diluée afin d'obtenir une solution de travail de 50 mg L^{-1} dans 1% d'acétone. La concentration finale d'acétone contenue dans les microplaques était de 0.91 %. Une microplaque témoin contenant 0.91 % d'acétone a servi de contrôle pour vérifier la toxicité de l'acétone. Suite à une incubation de 96 heures de la microplaque contenant 0.91 % d'acétone et une microplaque témoin ne contenant pas le solvant, des comptes cellulaires et une vérification de la viabilité ont été effectués. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux microplaques. L'acétone à 0.91 % ne présente donc pas de toxicité pour l'algue *Selenastrum capricornutum*. Cette non toxicité de l'acétone à 0.91 % est confirmée par une étude menée par St-Laurent et al. (1991).

Les solutions de travail du MCPA utilisées pour les bioessais algaux ont été préparées à partir d'une solution-mère de 200 mg L^{-1} . Une solution de 20 mg L^{-1} a été préparée pour les tests de létalité et une solution de 2 mg L^{-1} a été préparée pour les tests d'inhibition de croissance.

2.6- Analyse statistique des résultats

Des analyses statistiques ont été réalisées sur les variables suivantes: l'activité estérasique et l'autofluorescence. L'estimation de la CI_{50} et de la CL_{50} a été obtenue par régression linéaire effectuée sur chacun des groupes. Des tests de Bonferroni ($p < 0.05$) ont été effectués afin de comparer le pourcentage de mortalité obtenu, pour chacune des concentrations de toxique avec le témoin, permettant ainsi d'évaluer la CSEO (concentration (maximale) sans effet observé) et la CMEO (concentration minimal avec effet observé).

2.6.1- Estimation de l'activité estérasique

Des tests de Student (test unilatéral ou $p(\mu_{i1} > \mu_{j2}) < 0.05$) ou de Student modifié lors d'une inégalité des variances (test unilatéral, $p(\mu_{i1} > \mu_{j2}) < 0.05$) ont été réalisés sur la fluorescence verte pour chacune des concentrations de toxiques avant (μ_{i1}) et après incubation au FDA (μ_{j2}). L'obtention d'une augmentation significative de fluorescence verte après incubation au FDA a certifié la présence de l'activité estérasique. L'activité estérasique a été évaluée pour la fenêtre 1 (cellules non viables) et la fenêtre 2 (cellules viables).

2.6.2- Évaluation de l'autofluorescence

Des tests de variance (ANOVA) ont été effectués sur l'autofluorescence chlorophyllienne à 650 nm pour les groupes localisés dans la fenêtre 2 (population de cellules viables). Les cellules localisées dans la fenêtre 1 ne

présentant qu'une faible fluorescence à 650 nm ont été exclues de ces tests. Si le test a confirmé une inégalité entre les groupes, un test de Tukey (comparaison multiple, $p < 0.05$) a été fait afin de déterminer les groupes qui étaient différents entre eux. La mesure de l'autofluorescence à 650 nm, liée à la chlorophylle saine, a permis d'évaluer l'atteinte du système photosynthétique des groupes tests. Une augmentation significative de la fluorescence rouge chez les groupes tests indiquera une atteinte au niveau du système photosynthétique.

2.6.3- Estimation des CI_{50} et CL_{50}

L'estimation des CI_{50} et CL_{50} a été obtenue par régression linéaire simple, effectuée sur les points se retrouvant dans la partie linéaire de la courbe. La régression est de type $Y = a + bX$, où:

Y = pourcentage de mortalité obtenu pour chacune des concentrations des toxiques

a = ordonnée à l'origine

b = la pente de la droite de régression

X = concentration du toxique

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

L'évaluation des CI_{50} et CL_{50} a été réalisée par prédiction inverse selon l'équation suivante:

$$\hat{X}_i = \frac{Y_i - a}{b}$$

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

(Zar, 1984)

Les intervalles de confiance à 95 %, pour la prédiction inverse, ont été calculées selon l'équation suivante:

$$\bar{X} + \frac{b(Y_i - \bar{Y})}{K} \pm \frac{t}{K} \sqrt{s_{y.x}^2 \left(\frac{(Y_i - \bar{Y})^2}{x^2} \right) + K \left(1 + \frac{1}{n} \right)}$$

ou $K = b^2 - t^2 s^2$

$$\Sigma x^2 = \Sigma (x_i - \bar{x})^2$$

(Zar, 1984)

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

2.6.4- Estimation de la CSEO et CME0

La CSEO est définie comme étant la plus forte concentration où aucun effet n'est observable et la CME0 comme étant la plus faible concentration où l'effet est

observé. Afin d'établir la CSEO et la CMEO, un test statistique de comparaison multiple a été réalisé. Le test de comparaison multiple est fondé sur les résultats d'une série de comparaisons de moyennes prises deux par deux. L'objectif du test est donc de déterminer si la moyenne du groupe témoin diffère significativement de chacune des moyennes des autres groupes. Le test statistique doit donc comparer les réponses obtenues pour chacune des concentrations en rapport avec le témoin. La concentration maximale sans effet observé, c'est à dire la plus forte concentration où aucune différence significative n'est observée avec le témoin, a été retenue comme valeur de CSEO. La CMEO est estimée à partir de la concentration minimale où un effet est observé, donc la première concentration où une différence significative est obtenue par rapport au témoin.

Pour ce faire, le test de Bonferroni a été choisi. Ce dernier est un test de comparaison multiple semblable au test de Dunnett. Le test de Bonferroni a été sélectionné préférentiellement au test de Dunnett puisque le nombre d'échantillons subdivisés par groupe pouvaient varier. Pour certains échantillons le nombre d'échantillons subdivisés pouvaient varier entre 6 et 3. En règle

générale, le témoin ayant plus d'échantillons subdivisés que les groupes tests, qui eux pouvaient présenter de 3 à 4 échantillons subdivisés.

Les CSEO et CMEO ont été déterminées uniquement pour les tests de létalité.

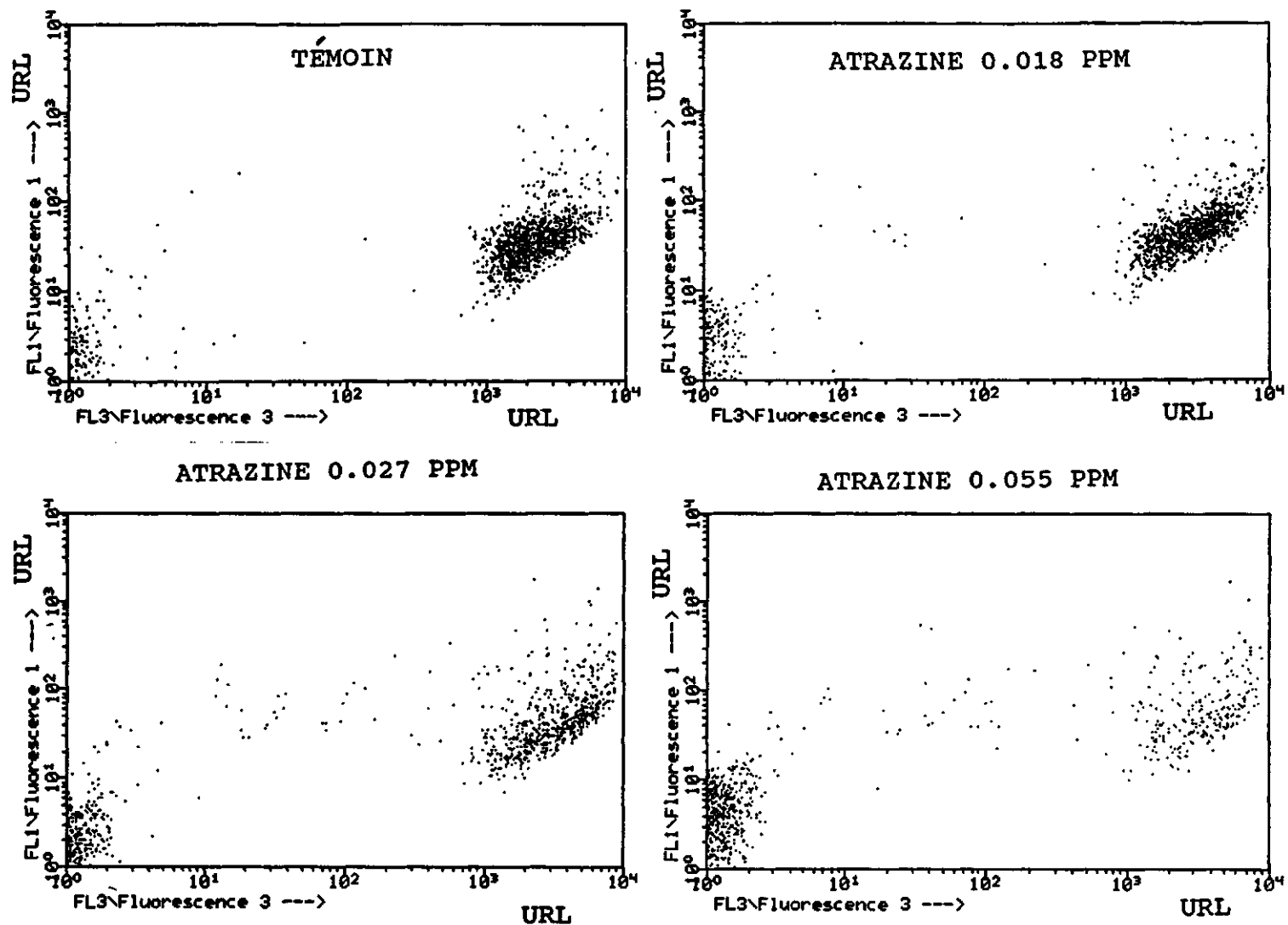
CHAPITRE 3

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1- Atrazine

Suite à l'incubation des algues en présence d'atrazine les pourcentages d'inhibition et de mortalité ont été calculés. On observe une diminution de la population de cellules viables avec l'augmentation des concentrations d'atrazine (figure 8). Les tableaux III et IV présentent les résultats obtenus pour les deux tests.

La CI_{50} et CL_{50} évaluées par régression linéaire sont de 0.026 mg L^{-1} (I.C. 95%: $0.02 \text{ mg L}^{-1} - 0.03 \text{ mg L}^{-1}$; $r: 0.90$) et de 0.026 mg L^{-1} (I.C.: $0.02 \text{ mg L}^{-1} - 0.027 \text{ mg L}^{-1}$; $r: 0.92$) respectivement. Les valeurs obtenues pour ces deux paramètres de mesure (i.e. CI_{50} et CL_{50}) sont identiques au niveau de l'interprétation biologique. L'atrazine présente donc un patron de toxicité de type algicide (effets létaux) plutôt qu'algistatique (effets sublétaux). Ces résultats peuvent s'expliquer par l'utilisation du compteur électronique de particules comme outil analytique pour mesurer l'inhibition de croissance. Les CI_{50} étant estimées à partir de ce dernier et que celui-



Fluorescence 1: fluorescence à 530 nm liée au clivage du FDA

Fluorescence 3: fluorescence à 650 nm liée à la chlorophylle

FIGURE 8. Cytogramme de populations cellulaires intoxiquées à différentes concentrations d'atrazine

TABLEAU III

Pourcentage d'inhibition de croissance de l'algue *Selenastrum capricornutum* suite à une exposition de 96 heures à l'atrazine

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

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

Cl₅₀: 0.026 ppm

I.C. 95%: 0.019 ppm - 0.032 ppm

Ordonnée à l'origine: -78,44

Pente: 4,95

TABLEAU IV

Pourcentage de mortalité suite à l'exposition d'atrazine chez
l'algue *Selenastrum capricornutum*

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

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

CL₅₀: 0.026 ppm

I.C. 95%: 0.023 ppm - 0.027 ppm

Ordonnée à l'origine: 6,77

Pente: 1,69

ci ne permet pas de différencier les cellules viables et mortes, il est possible de calculer des cellules mortes autant que des cellules viables.

Les tests d'inhibition de croissance algale se font donc sans regard sur les effets algicides du produit. La cytométrie a permis l'acquisition de cette information supplémentaire importante pour l'interprétation biologique des résultats. De plus, l'observation visuelle au microscope à fluorescence a confirmé que les cellules mortes gardaient en général leur forme même après les tests de 96 heures. La lyse cellulaire de l'algue semble prendre un certain temps à se produire après la mortalité, ce qui ne permet pas au compteur électronique de particules d'éliminer ces cellules lors des lectures puisqu'elles ont une forme identique ou semblable aux cellules viables. Ces explications sont valables pour toutes les autres expérimentations de cette étude.

Comme les deux paramètres de mesure sont identiques et que les effets délétères sont détectés à de faibles concentrations, l'atrazine présente un potentiel toxique élevé chez l'algue *Selenastrum capricornutum*. Afin d'expliquer ces résultats plusieurs hypothèses peuvent être formulées. Si le produit présente une toxicité élevée, il se peut que la létalité survienne dans les quelques heures après l'ajout du toxique, tuant ainsi une bonne partie de la population algale. Les cellules viables restantes se sont par la suite multipliées. Puisque l'atrazine intervient au niveau du photosystème, il est possible également que l'inhibition de croissance survienne en premier lieu puisque la croissance demande de l'énergie qui

ne peut être adéquatement fournie par la photosynthèse, les effets létaux se produisant beaucoup plus tard. Dans les deux cas les cellules les plus résistantes pourront se multiplier. Afin de répondre à ces questions, un suivi des variables d'effet (pourcentage de mortalité et pourcentage d'inhibition de croissance) devrait être fait régulièrement pendant la période de 96 heures. Des lectures cytométriques sur une base journalière nous informeront de l'état réel des algues et à quel moment la létalité algale commence à se manifester. L'obtention de cette information serait pertinente puisque les effets de toxicité aiguë pourront être connus et permettront une meilleure évaluation du risque environnemental. En effet, les plus grandes pertes d'atrazine des terres agricoles se produisent lors des premières averses de pluie. Elles peuvent atteindre des pertes moyennes de 1% à 5% (Klaine, 1988). Une forte concentration d'atrazine se retrouve dans le milieu dans un court laps de temps. Le phytoplancton dans le milieu naturel est donc sujet à cette exposition.

La CSEO mesurée pour la létalité algale a été estimée à 0.018 mg L^{-1} tandis que la CMEQ est de 0.023 mg L^{-1} . Au niveau environnemental, des concentrations supérieures à la NOEC ont été détectées à l'embouchure des rivières Chibouette et Yamaska selon un échantillonnage ponctuel effectué par Bernard Rondeau d'Environnement Canada (Direction des Eaux Intérieures) au printemps 1991. Il trouva des concentrations de l'ordre de 0.019 mg L^{-1} . Caux (1988) détectèrent également des concentrations d'atrazine dans les eaux de surface de la rivière Saint-Régis (Québec) de l'ordre de 0.022 mg L^{-1} . Selon la présente étude, c'est

aux environs de ces concentrations qu'ont été estimées la CI_{50} et la CL_{50} . Puisque les tests confirment un potentiel toxique élevé à 0.026 mg L^{-1} , il serait important d'effectuer des tests *in situ* afin d'évaluer la toxicité à ces endroits.

Déjà, quelques études sur l'atrazine ont été réalisées à partir d'étangs artificiels. Neugebaur (1990), par exemple, ont appliqué de l'atrazine à trois concentrations, soit 0.02 mg L^{-1} , 0.10 mg L^{-1} et 0.30 mg L^{-1} dans deux étangs artificiels compartimentés. L'atrazine a été appliquée sur une période de 8 semaines. Suite à la contamination des étangs, des observations ont été faites sur une période de deux ans. La première année, ils observèrent dans tous les compartiments contaminés par l'atrazine un changement dans les paramètres physico-chimiques. La contamination a également entraîné une décomposition des algues filamenteuses. Aucun effet sur la structure de la communauté phytoplanctonique n'a été observé lors de la première année. Cependant, à la deuxième année ils remarquèrent un changement notable dans la structure de la communauté phytoplanctonique et ce à toutes les concentrations. Les Cryptophycées et les Cyanophycées dominent la communauté au détriment des Chlorophycées. Ils observèrent également une diminution de la productivité algale et de la biomasse à toutes les concentrations testées. Par contre, à 0.02 mg L^{-1} ils notèrent une récupération après sept jours. Cette expérimentation vient confirmer l'importance d'effectuer des tests *in situ* afin d'estimer le danger réel que présente l'atrazine pour l'écosystème aquatique dans les rivières drainant des bassins à fortes activités agricoles.

Plusieurs chercheurs se sont également intéressés aux bioessais en laboratoire afin d'évaluer la toxicité de l'atrazine. Gala (1990) évalua l'effet de l'atrazine chez *Selenastrum capricornutum* à l'aide de la cytométrie en flux. Il mesura une diminution de 50% du taux de croissance spécifique à 0.13 mg L^{-1} . Les résultats ont été obtenus suite à une exposition de 48 heures. A cette concentration, Gala n'observa aucune mortalité après une incubation de 48 heures. Cette différence dans les résultats obtenus entre les expérimentations de Gala et nos expérimentations peuvent s'expliquer par la technique utilisée pour réaliser le test algal. Gala utilise le test algal en erlenmeyers selon le protocole développé par l'USEPA en 1978 tandis que nous utilisons le test algal miniaturisé en microplaque développé par Blaise en 1986. De plus, comme il existe une variabilité interlaboratoire pour les tests algaux (Thellen, 1989; Whitton, 1984; Van Coillie, 1982), la différence observée pourrait s'expliquer par de cette variabilité.

Comme illustré à la figure 8, la létalité algale a été estimée par cytogramme en tenant compte de la fluorescence liée au clivage du FDA (530 nm) et de l'autofluorescence chlorophyllienne. Gala ne tient pas compte de l'autofluorescence chlorophyllienne. Cette différence peut également affecter le pourcentage final de cellules mortes.

L'atrazine affectant le photosystème peut causer une diminution de l'énergie disponible pour le bon fonctionnement de l'activité enzymatique en général et des estérases par le fait même. Une diminution de l'activité estérasiqye peut amener une diminution de l'intensité de la

fluorescence verte liée au clivage du FDA. Malgré la diminution de la fluorescence verte liée au clivage du FDA, on peut enregistrer une fluorescence verte élevée. Cependant, cette fluorescence verte peut être causée par une augmentation de l'autofluorescence verte suite à un endommagement sévère de la chlorophylle (voir section 2.4 du chapitre matériel et méthodes). Les cellules mortes présentent, entre autres, ce patron de fluorescence suite à la dégradation de la chlorophylle. La chlorophylle fortement endommagée n'émet plus à 650 nm (spectre rouge) mais émet à 530 nm (spectre vert) ce qui interfère avec les lectures de la fluorescence verte liée au clivage du FDA. Comme expliqué à la section 2.4 du chapitre matériel et méthodes, cette situation nous a amené à effectuer des lectures cytométriques avant l'ajout du FDA afin de mesurer l'autofluorescence verte. En ne tenant pas compte de cette autofluorescence verte, on pourrait surestimer le pourcentage de cellules viables. Selon les résultats obtenus lors de nos expérimentations, on observe une augmentation de l'autofluorescence verte lorsque la concentration d'atrazine augmente chez des cellules ne présentant aucune activité estérasique. Cette autofluorescence verte peut parfois être aussi élevée que la fluorescence verte liée au clivage du FDA, chez les cellules viables du témoin (voir tableau VI). Des erreurs d'interprétation peuvent donc facilement s'introduire et entraîner une surestimation du pourcentage de cellules viables. L'unique mesure de la fluorescence verte ne peut à elle seule certifier l'état de la cellule. Conséquemment, l'estimation de la létalité par la mesure de l'autofluorescence chlorophyllienne et de la fluorescence verte liée au clivage du FDA par les estérases, a permis

une meilleure évaluation de l'état physiologique réel de la cellule.

Butler , 1975 effectuèrent des études en laboratoire afin de déterminer les effets de l'atrazine sur l'inhibition de croissance. Ils déterminèrent qu'à des concentrations aussi faibles que 0.01 mg L^{-1} on retrouvait des effets inhibiteurs chez les algues. McCloskey et Bayer (1990) observèrent une diminution de 50% de l'évolution de l'O_2 , variable nous informant de l'état de l'activité photosynthétique, à une concentration de 0.043 mg L^{-1} d'atrazine. Ces résultats se retrouvent dans le même ordre de grandeur que les valeurs des paramètres de mesure obtenues pour nos expérimentations.

Afin d'évaluer l'activité estérasique, des tests de Student ($p \leq 0,05$) sur la fluorescence verte (530 nm), avant et après ajout du FDA, ont été réalisés pour les groupes situés dans la fenêtre 1 et les groupes situés dans la fenêtre 2. Le tableau AI en annexe présente les valeurs brutes obtenues et les tableaux V et VI offrent les résultats des tests statistiques effectués sur la fluorescence verte pour les deux populations. La population cellulaire des groupes contaminés à l'atrazine située dans la fenêtre 1 ne présente aucune activité estérasique. Cependant, on note pour quelques groupes une différence significative au niveau de la fluorescence verte. Par exemple, le groupe contaminé à 0.030 mg L^{-1} d'atrazine présente une autofluorescence verte plus élevée avant l'ajout du FDA. Il est présentement difficile d'interpréter ces résultats. Des expériences plus approfondies pourraient nous éclairer sur ces résultats mais

TABLEAU V

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

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

1: test de Student modifié

2: test de Student

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

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

TABLEAU VI

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

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

1: test de Student modifié

2: test de Student

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

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

cette recherche dépassait le cadre de nos travaux. La confirmation de l'absence d'activité estérasique est par contre irréfutable. Cette situation confirme l'importance de mesurer l'autofluorescence verte des populations algales avant l'ajout du FDA pour ne pas conclure à la présence d'une activité estérasique lorsqu'il s'agit d'une augmentation de l'autofluorescence verte suite à l'endommagement de la chlorophylle.

On observe également une différence significative de la fluorescence à 530 nm après ajout du FDA pour le groupe témoin situé dans la fenêtre 1. Cette augmentation peut s'expliquer soit par la présence d'une faible activité estérasique, soit par des molécules de fluorescéine adsorbées sur les débris cellulaires. Par contre, la fluorescence chlorophyllienne présente une faible intensité, les cellules sont dans un état proche de la létalité.

3.2- Cyanazine

Les résultats obtenus pour la cyanazine démontrent également une diminution significative de la viabilité et de la croissance en fonction de l'augmentation des concentrations. Les tableaux VII et VIII présentent les résultats obtenus pour l'inhibition de croissance et la mortalité algale respectivement. La CI_{50} estimée par régression linéaire est de 0.059 mg L^{-1} (I.C. 95%: 0.047 mg L^{-1} - $71,65 \text{ mg L}^{-1}$; r : 0.97) tandis que la CL_{50} obtenue est de 0.146 mg L^{-1} (I.C. 95%: 0.124 mg L^{-1} - 0.207 mg L^{-1} ; r : 0.81). Les valeurs des concentrations pour les deux paramètres de mesure sont plus élevées, ce qui démontre que

TABLEAU VII

Pourcentage d'inhibition de croissance suite à l'exposition à la
cyanazine chez l'algue *Selenastrum capricornutum*

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

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

Cl₅₀: 0.059 ppm

I.C. 95%: 0.047 ppm - 0.072 ppm

Ordonnée à l'origine: 8.18

Pente: 0.70

TABLEAU XVIII

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

GROUPES [MCPA]	x URF sans FDA	x URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	80.75	211.25	rejetée ²
2.72 ppm	78.50	356.50	rejetée ²
2.45 ppm	75.25	292.00	rejetée ²
2.27 ppm	83.00	264.75	rejetée ¹
2.09 ppm	78.75	159.25	rejetée ²
1.82 ppm	100.00	292.00	rejetée ²
1.73 ppm	96.25	262.00	rejetée ¹

1: test de Student modifié

2: test de Student

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

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

la cyanazine présente une toxicité moins élevée que l'atrazine. De plus, les deux paramètres de mesure (CI_{50} et CL_{50}) ne sont pas identiques comme c'est le cas pour l'atrazine. L'effet létal est signalé à des concentrations plus élevées que l'effet inhibiteur de croissance. Les effets de subléthalité sont donc les premiers effets décelés. La cyanazine semble présenter une toxicité de type algistatique puisque les effets létaux se présentent à des concentrations plus élevées.

Les pentes calculées par les régressions linéaires sont également plus faibles pour les deux paramètres de mesure (CI_{50} : 0,70 et CL_{50} : 0.82) que celles rencontrées pour l'atrazine (CI_{50} : 4,95 et CL_{50} : 1,69). Le potentiel toxique de la cyanazine apparaît moins élevé que l'atrazine. La CSEO et la CMEC calculées sont par le fait même plus élevées, soit de 0.118 mg L⁻¹ pour la CSEO et de 0.136 mg L⁻¹ pour la CMEC.

L'estimation de l'activité estérasique des populations cellulaires localisées dans chacune des deux fenêtres est présentée aux tableaux IX et X. Les résultats démontrent la présence d'une activité estérasique pour la population localisée dans la fenêtre 2 (tableau X) tandis qu'aucune activité estérasique ne persiste chez la population située dans la fenêtre 1 (tableau IX) certifiant la mortalité cellulaire. La figure 9 illustre l'activité estérasique révélée par la fluorescence verte liée au clivage du FDA. Chez les cellules exposées à la cyanazine, on note la présence d'une courbe bimodale identifiant deux populations. La population présentant une faible fluorescence verte identifie les cellules non viables et

TABLEAU IX

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

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

1: test de Student modifié

2: test de Student

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

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

TABLEAU X

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

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

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

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

NOMBRE de CELLULES

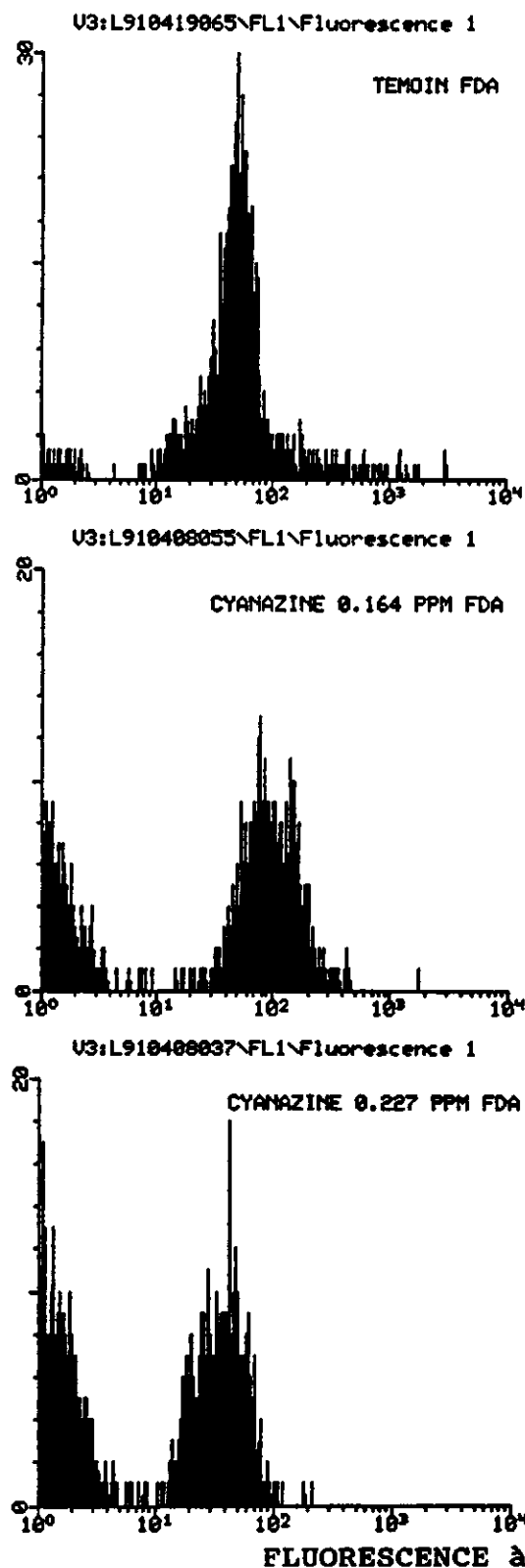


FIGURE 9. Histogramme de la fluorescence verte liée à l'activité estérasique diminuant significativement en fonction des concentrations de cyanazine suite à une exposition de 96 heures. La courbe bimodale représentant les cellules algales mortes (faible fluorescence) et les cellules algales viables (fluorescence élevée).

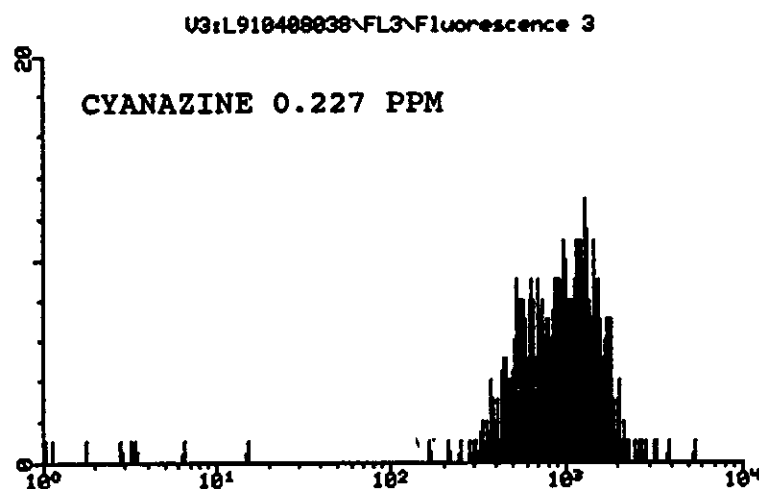
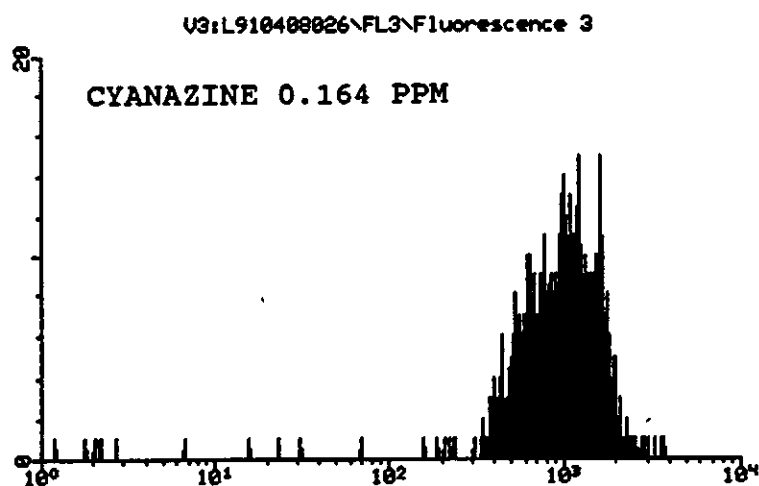
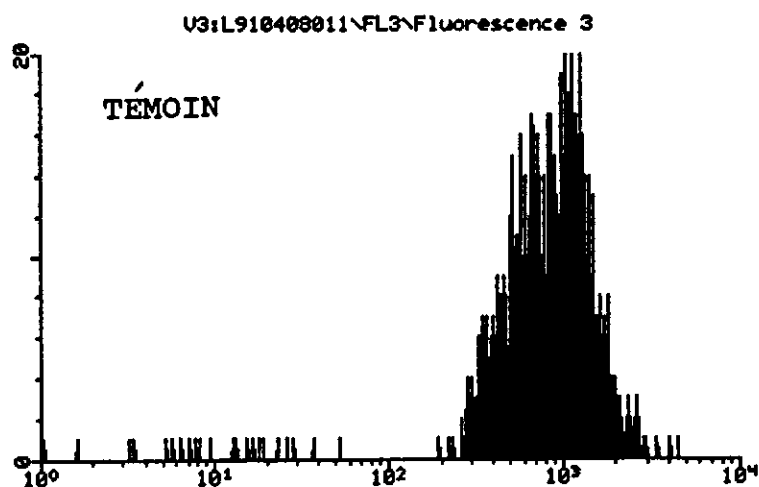
la population fluoresçant plus fortement représente les cellules viables. On peut observer une augmentation du nombre de cellules mortes en fonction de l'élévation des concentrations de cyanazine. Une diminution significative de l'autofluorescence chlorophyllienne à 650 nm (spectre rouge) est également observée en fonction des concentrations de cyanazine. Cette diminution est illustrée à la figure 10.

On observe par contre une forte autofluorescence verte avant l'ajout du FDA, diminuant après l'incubation au FDA. Cette situation qui semble se répéter (voir résultats de l'atrazine) demande une recherche expérimentale plus approfondie, afin d'expliquer ce phénomène.

3.3- Le dé-éthyl atrazine

Selon le bioessai algal d'inhibition de croissance, le dé-éthyl atrazine semble beaucoup moins toxique que la molécule mère, l'atrazine. La CI_{50} estimée est de 0.74 mg L^{-1} (I.C. 95%: 0,66 mg L^{-1} - 0,83 mg L^{-1} ; r: 0.96) ce qui représente une toxicité environ 26 fois moins élevée. Cette valeur correspond aux valeurs rencontrées dans la littérature, stipulant que le dé-éthyl atrazine est environ 20 fois moins toxique que l'atrazine, selon les espèces algales (Pionke , 1990). Les pourcentages d'inhibition de croissance en fonction des concentrations sont présentés au tableau XI.

NOMBRE de CELLULES



FLUORESCENCE à 650 nm (chlorophylle)

FIGURE 10. Diminution de l'autofluorescence chlorophyllienne à 650 nm chez les cellules algales exposées à la cyanazine.

TABLEAU XI

Pourcentage d'inhibition de croissance suite à l'exposition au dé-éthyl atrazine chez l'algue *Selenastrum capricornutum*

Concentration ppm	n	C.V. %	Inhibition %
0,91	3	1.4	65.0*
0,86	3	5.6	61.4*
0,82	3	4.7	58.9*
0,77	3	5.2	57.9*
0,73	3	4.1	52.6*
0,68	3	8.5	40.7*
0.64	3	10.3	34.7*
0.59	3	12.1	31.5*
0.55	3	3.2	26.1*
0.50	3	7.0	22.3*

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

Cl₅₀: 0.75 ppm

I.C. 95%: 0.66 ppm-0.83 ppm

Ordonnée à l'origine: -34.72

Pente: 113.34

3.4- Butylate

L'hypothèse initiale vérifiée, la viabilité et la croissance algale diminuent de façon significative en fonction de l'augmentation des concentrations. Par contre, des herbicides testés dans cette étude, le butylate est le moins toxique. La CI_{50} a été estimée à $6,47 \text{ mg L}^{-1}$ (I.C. 95%: $0,94 \text{ mg L}^{-1} - 13,53 \text{ mg L}^{-1}$; $r: 0.84$) et la CL_{50} à $9,79 \text{ mg L}^{-1}$ (I.C. 95%: $5,55 \text{ mg L}^{-1} - 14,04 \text{ mg L}^{-1}$; $r: 0.93$). L'interprétation biologique des résultats indique que les valeurs des paramètres de mesure sont identiques. Les tableaux XII et XIII présentent les résultats des pourcentages d'inhibition de croissance et de létalité observés pour chacun des tests. L'augmentation du nombre de cellules à l'intérieur de la fenêtre 1 (fenêtre des cellules non viables), en fonction des concentrations, est illustrée à la figure 11.

Puisque les effets délétères ne s'observent qu'à des valeurs de concentrations élevées, l'environnement doit être fortement contaminé par le butylate pour que les espèces phytoplanctoniques subissent une atteinte toxique. Par contre, les effets à ces concentrations signalent une toxicité de type algicide plutôt qu'algistatique puisque son mode d'action premier semble être de tuer les algues plutôt que d'inhiber leur croissance. Ainsi, une contamination des eaux à ces concentrations aura un effet sévère sur les organismes. Selon un échantillonnage effectué en 1987 et 1988 au Québec par Caux, indique que les plus fortes concentrations de butylate signalées dans les eaux de surface sont de 0.002 mg L^{-1} pour la rivière Saint-Jacques et de 0.0019 mg L^{-1}

TABLEAU XII

Pourcentage d'inhibition de croissance suite à l'exposition de butylate chez l'algue *Selenastrum capricornutum*

Concentration ppm	n	C.V. %	Inhibition %
45.45	3	5.9	90.1
36.36	3	14.7	90.8
27.27	3	4.9	90.3
18.18	3	4.2	84.8*
9.09	3	5.7	77.9*
7.95	3	11.2	63.8*
6.82	3	1.1	59.8*

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

TABLEAU XII (suite)

Pourcentage d'inhibition de croissance suite à l'exposition de butylate chez l'algue *Selenastrum capricornutum*

Concentration ppm	n	C.V. %	Inhibition %
5.68	3	11.8	42.6*
4.55	3	10.8	40.7*
3.41	3	1.1	20.7*

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

Cl₅₀: 6.47 ppm

I.C. 95%: 0.94 ppm-13.53 ppm

Ordonnée à l'origine: 25.01

Pente: 3.87

TABLEAU XIII

Pourcentage de mortalité suite à l'exposition du butylate chez
l'algue *Selenastrum capricornutum*

Concentration ppm	n	C.V. %	mortalité %
18.18	4	2.39	93.66*
9.09	4	16.84	54.20*
7.95	4	25.00	48.36*
6.82	4	26.80	29.73*
4.55	4	26.64	7.52*

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

CL₅₀: 9.79 ppm

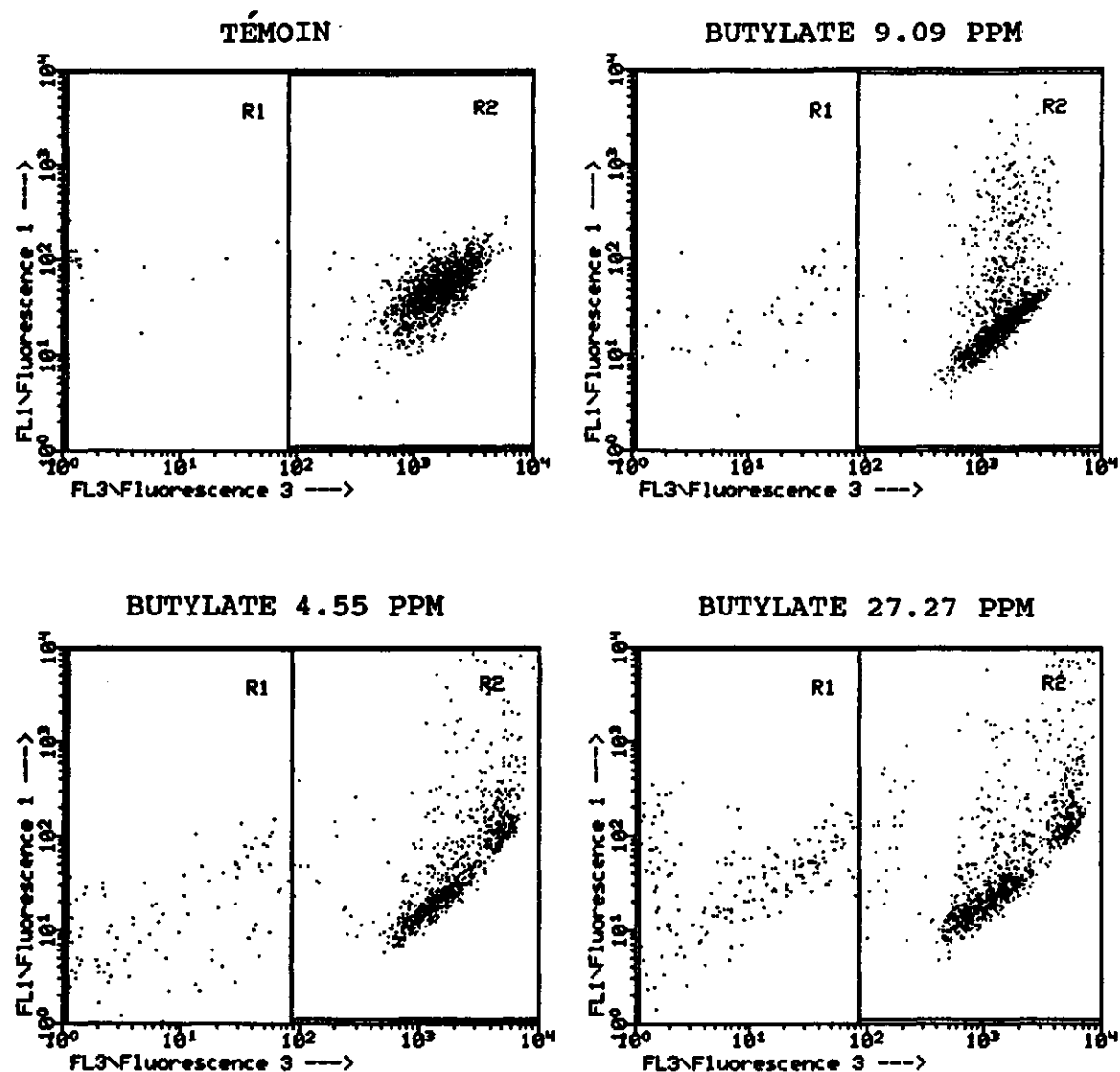
I.C. 95%: 5.55 ppm-14.04 ppm

Ordonnée à l'origine: -6.03

Pente: 5.73

Coefficient de corrélation: 93%

FLUORESCENCE à 530 nm (FDA) URL



FLUORESCENCE à 650 nm (chlorophylle) URL

FIGURE 11. Fenêtrage des populations algales viables (fenêtre R1) et non viables (fenêtre R2) suite à une exposition au butylate.

pour la rivière Tortue.

Les pentes obtenues aux concentrations testées pour les deux variables d'effet, soit l'inhibition de croissance et la mortalité cellulaire, sont relativement fortes suggérant que le butylate présente un potentiel toxique non négligeable. Au niveau environnemental, il est peu probable de retrouver des concentrations aussi élevées dans les eaux de surface. Par contre, étant donné son caractère soluble, il peut être transporté facilement lors d'une pluie. Une forte pluie, suite à l'épandage de cet herbicide sur les terres agricoles, pourrait entraîner des concentrations assez élevées de butylate dans le milieu aquatique. Cet apport de butylate dans le milieu pourrait exposer les organismes de façon aiguë. Comme mentionné, les tests effectués lors de cette expérience sont des tests de type chronique. Les effets aigus du butylate devraient donc être mesurés. La CSEO et la CMEO pour cet herbicide ont également été calculées. Ces paramètres ont été mesurés pour la variable de létalité. La valeur de la CSEO est de $4,55 \text{ mg L}^{-1}$ et la valeur de la CMEO obtenue pour cette même variable est estimée à $6,82 \text{ mg L}^{-1}$.

Les tests de Student effectués sur la fluorescence à 530 nm liée au clivage du FDA, pour les populations localisées dans les deux fenêtres soit, la fenêtre 1 et la fenêtre 2, sont présentés aux tableaux XIV et XV. Les valeurs des fluorescences qui ont permis ces calculs sont présentées au tableau AIII en annexe. Les tests statistiques effectués sur ces deux populations confirment la viabilité des cellules localisées dans la fenêtre 2. On mesure une augmentation significative de fluorescence

TABLEAU XIV

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

GROUPES [Butylate]	x URF sans FDA	x URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	148.80	299.60	acceptée ¹
18.18 ppm	122.75	113.00	acceptée ¹
9.09 ppm	213.00	170.75	acceptée ²
7.95 ppm	263.25	166.00	acceptée ¹
6.82 ppm	262.50	183.5	acceptée ¹
4.55 ppm	228.33	135.68	acceptée ¹

1: test de Student modifié

2: test de Student

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

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

TABLEAU XV

Évaluation de l'intensité de fluorescence à 530 nm de la population algale située dans la fenêtre 2 par des tests de Student. Tests unilatéraux ($p: (\mu_1 > \mu_2) < 0.05$) réalisés sur les données du test de létalité effectué avec le butylate.

GROUPES [Butylate]	x URF sans FDA	x URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	367.40	564.40	rejetée
18.18 ppm	636.00	791.00	rejetée
9.09 ppm	576.00	805.00	rejetée
7.95 ppm	540.25	829.50	rejetée
6.82 ppm	558.00	762.75	rejetée
4.55 ppm	480.00	714.00	rejetée

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

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

verte, suite à l'ajout de FDA et une autofluorescence chlorophyllienne élevée certifiant le bon état de la chlorophylle. Par contre, la population cellulaire localisée dans la fenêtre 1 ne présente aucune activité estérasique, les tests de Student réalisés sur les groupes avant et après incubation au FDA n'offrent aucune différence significative pour la fluorescence verte. Une très faible fluorescence chlorophyllienne à 650 nm (spectre rouge) est également observée pour tous les groupes.

3.5- MCPA

Parmi les herbicides testés, le MCPA se situe parmi les moins toxiques. Suite à l'incubation des algues en présence du MCPA, les pourcentages d'inhibition et de létalité ont été évalués. Les tableaux XVI et XVII présentent les valeurs obtenues pour les tests. La CI_{50} estimée est de $1,93 \text{ mg L}^{-1}$ (I.C. 95%: $1,78 \text{ mg L}^{-1}$ - $2,10 \text{ mg L}^{-1}$; $r:0.97$) et la CL_{50} est évaluée à $2,13 \text{ mg L}^{-1}$ (I.C. 95%: $1,87 \text{ mg L}^{-1}$ - $2,38 \text{ mg L}^{-1}$; $r: 0.95$). La courbe dose-effet des pourcentages d'inhibition est illustrée à la figure 12. Les paramètres de mesure calculés présentent également des valeurs identiques. On peut donc associer cette toxicité à un effgicide plutôt qu'algostatique. Les valeurs des pentes des régressions linéaires, obtenues pour chacun des bioessais, sont très élevées et similaires soit 78,00 pour le test d'inhibition de croissance et 73,00 pour le test de létalité algale. Comme mentionné pour le butylate, le MCPA présente un potentiel toxique élevé à ces concentrations.

Le MCPA présente donc un risque toxique non négligeable puisque les effets toxiques apparaissent rapidement.

TABLEAU XVI

Pourcentage d'inhibition de croissance suite à l'exposition de
MCPA chez l'algue *Selenastrum capricornutum*

Concentration ppm	n	C.V. %	Inhibition %
2.27	3	18.7	78.9
2.00	3	2.5	76.0*
1.82	3	9.5	51.6*
1.73	3	6.7	45.7*
1.64	3	12.5	37.7*
1.55	3	7.8	28.8*

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

TABLEAU XVI (suite)

Pourcentage d'inhibition de croissance suite à l'exposition de
MCPA chez l'algue *Selenastrum capricornutum*

Concentration ppm	n	C.V. %	Inhibition %
1.45	3	6.5	26.1*
1.36	3	2.1	15.4*
1.27	3	14.0	9.3

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

Cl₅₀: 1.94 ppm

I.C. 95%: 1.78 ppm-2.10 ppm

Ordonnée à l'origine: -101.55

Pente: 78.12

TABLEAU XVII

Pourcentage de mortalité suite à l'exposition du MCPA chez
l'algue *Selenastrum capricornutum*

Concentration ppm	n	C.V. %	mortalité %
2.72	4	0.99	85.61
2.45	4	6.19	75.47
2.27	4	7.64	63.24
2.09	4	9.84	60.05
1.82	4	21.51	24.34
1.73	4	23.41	13.08

*: points retenus pour estimer la régression linéaire

Régression linéaire

CL₅₀: 2.13 ppm

I.C. 95%: 1.87 ppm-2.38 ppm

Ordonnée à l'origine: -106.16

Pente: 73.30

Coefficient de corrélation: 95%

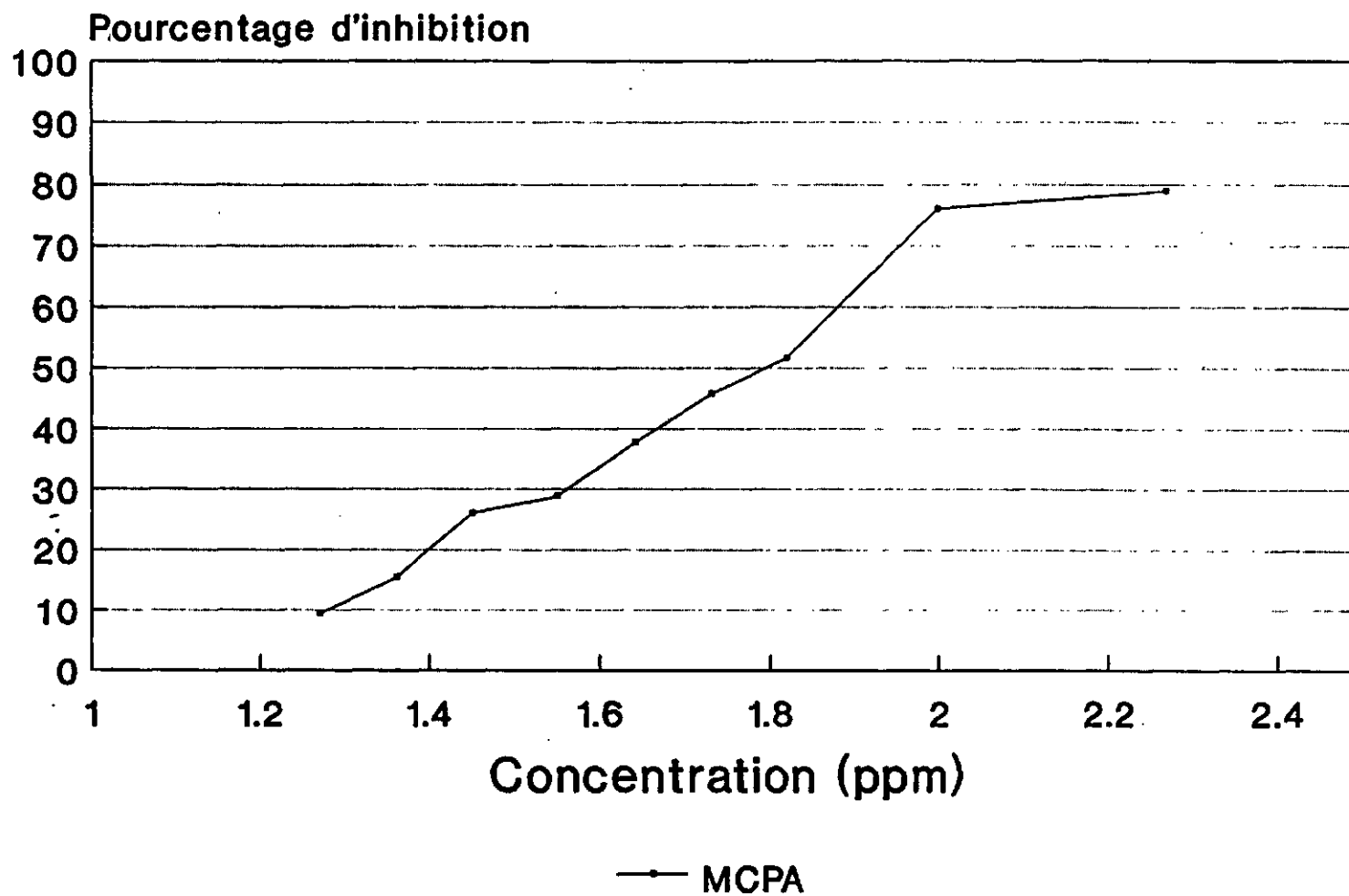


FIGURE 12. Courbe dose-effet du pourcentage d'inhibition de croissance en fonction des concentrations de MCPA chez l'algue Selenastrum capricornutum.

Le risque environnemental que pourrait causer le MCPA est plutôt de l'ordre de la toxicité aiguë que de la toxicité chronique pour ces deux variables d'effets car ceux-ci sont observés aux fortes concentrations seulement. Des tests de toxicité aiguë apporteraient une information intéressante pour cet herbicide.

Les tableaux XVIII et XIX nous informent sur l'activité estérasique des cellules viables (fenêtre 2) et celles supposées non viables (fenêtre 1). Les résultats des fluorescences sont présentés au tableau AIV en annexe. Les résultats des tests révèlent la présence d'activité estérasique pour les deux populations.

Comme le mode d'action principal du MCPA est d'agir comme analogue des auxines (hormones de croissance chez les végétaux supérieurs) et que les algues ne synthétisent pas d'auxines, le MCPA aurait donc un autre mode d'action chez celles-ci. Il semble que le MCPA ne présente pas une forte toxicité chez les algues (Miller et al., 1985). Sa faible toxicité pourrait expliquer la présence d'activité estérasique de la population localisée dans la fenêtre 1. Par contre, la très faible autofluorescence chlorophyllienne à 650 nm (spectre rouge) nous permet de supposer que cette population cellulaire est morte. De plus, la microscopie à fluorescence a permis l'observation d'un bon nombre de molécules de fluorescéine adsorbées sur les membranes cellulaires et les débris cellulaires, laissant supposer que les membranes cellulaires sont altérées. Cette altération membranaire peut permettre un relargage rapide de fluorescéine. Ceci pourrait expliquer la différence significative entre la fluorescence verte

TABLEAU XVIII

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

GROUPES [MCPA]	x URF sans FDA	x URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	80.75	211.25	rejetée ²
2.72 ppm	78.50	356.50	rejetée ²
2.45 ppm	75.25	292.00	rejetée ²
2.27 ppm	83.00	264.75	rejetée ¹
2.09 ppm	78.75	159.25	rejetée ²
1.82 ppm	100.00	292.00	rejetée ²
1.73 ppm	96.25	262.00	rejetée ¹

1: test de Student modifié

2: test de Student

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

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

TABLEAU XIX

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

GROUPES [MCPA]	x URF sans FDA	x URF avec FDA	Student $H_0: \mu_1 = \mu_2$
Témoin	379.00	584.00	rejetée ²
2.72 ppm	402.25	541.75	rejetée ²
2.45 ppm	388.00	544.25	rejetée ²
2.27 ppm	391.00	526.50	rejetée ²
2.09 ppm	403.00	545.50	rejetée ²
1.82 ppm	494.00	597.25	rejetée ¹
1.73 ppm	484.50	608.50	rejetée ¹

1: test de Student modifié

2: test de Student

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

μ_2 : moyenne en URF pour les groupes exposés au FDA

avant l'ajout du FDA et après incubation avec le FDA observée chez la population cellulaire située dans la fenêtre 1. Le MCPA pourrait donc altérer la membrane cellulaire des algues mais cette hypothèse reste à vérifier.

3.6- Effet des herbicides sélectionnés sur la fluorescence chlorophyllienne

Le principe de la photosynthèse repose sur la captation de l'énergie lumineuse par les molécules de chlorophylle contenues dans les chloroplastes. L'énergie photonique excite les molécules de chlorophylle qui transmettront cette énergie jusqu'au centre réactionnel. Les molécules de chlorophylle devront, suite à l'excitation, retourner à l'état stable. Lorsque la chlorophylle retourne à l'état stable, il y a production de fluorescence à 650 nm (spectre rouge) ou de chaleur. La chlorophylle possède donc une fluorescence naturelle. Cependant, si l'énergie n'est pas immédiatement transmise jusqu'au centre réactionnel, les pigments chlorophylliens perdent cette énergie sous forme d'une plus grande production de chaleur ou de fluorescence (Beuffe, 1987).

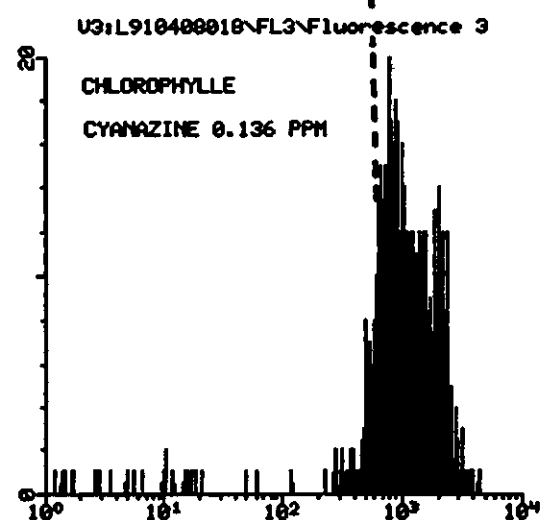
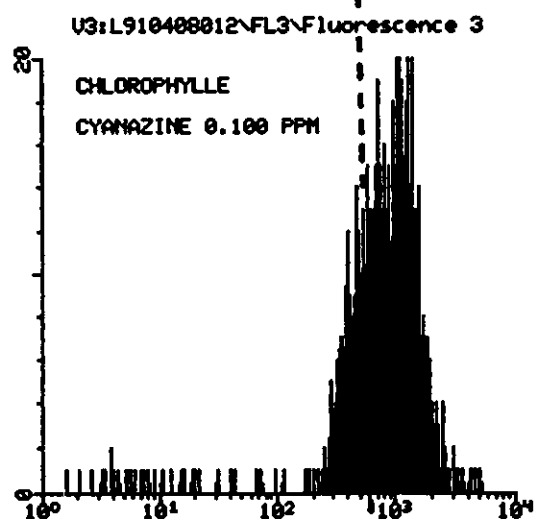
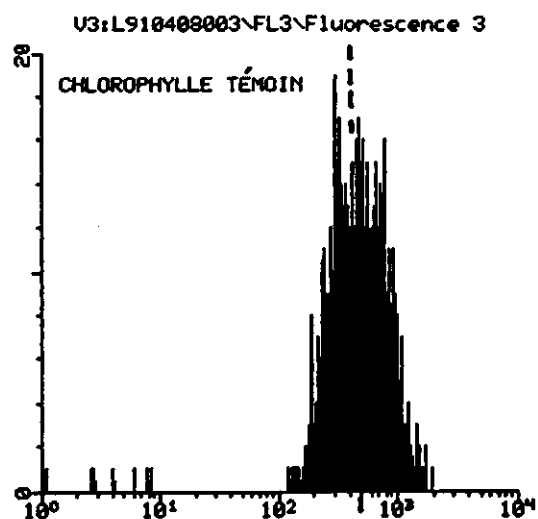
L'autofluorescence chlorophyllienne à 650 nm peut augmenter suite à un blocage du transfert d'énergie d'excitation. C'est ce qui se passe suite à l'ajout de DCMU (3(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-diméthylurée). Deux des herbicides testés ont un mode d'action similaire au DCMU soit la cyanazine et l'atrazine. En observant les valeurs de fluorescences chlorophylliennes à 650 nm des cellules algales localisées dans la fenêtre 2 (cellules viables) aux

tableaux AI et AII de l'annexe, nous remarquons une augmentation de fluorescence à 650 nm en fonction des concentrations pour ces deux herbicides. Une analyse de variance et une régression linéaire ont donc été effectuées afin de vérifier la possibilité d'une corrélation positive entre l'augmentation de l'autofluorescence rouge et la concentration d'herbicides. Les valeurs utilisées pour effectuer les analyses sont présentées en annexe aux tableaux AI et AII pour l'atrazine et la cyanazine respectivement dans la colonne de la fluorescence à 650 nm de la fenêtre 2 (population de cellules viables). Nous avons retenu les mêmes points que ceux utilisés pour effectuer la régression linéaire sur le pourcentage de mortalité. La pente obtenue pour la régression linéaire de l'atrazine est de 0.94 (valeur de t calculé: 8,05) et de 0.40 (valeur de t calculé: 7,80) pour la cyanazine.

On observe dans les deux cas une corrélation positive. Le coefficient de corrélation calculé pour la cyanazine est de 83% et de 86% pour l'atrazine. L'atrazine et la cyanazine entraînent donc un blocage dans le transfert de l'énergie. Ce blocage est mis en évidence par l'augmentation de la fluorescence chlorophyllienne (650 nm) illustrée à la figure 13. La chlorophylle des populations de cellules viables semble donc être atteinte. L'énergie d'excitation des électrons de la chlorophylle ne peut être transmise adéquatement et ce phénomène semble augmenter en fonction des concentrations de cyanazine et d'atrazine.

Par contre, les régressions linéaires effectuées sur le MCPA et le butylate nous donnent des coefficients de corrélation beaucoup moins élevés soit de 53% pour le MCPA

NOMBRE de CELLULES



FLUORESCENCE à 650 nm (chlorophylle) URL

FIGURE 13. Histogramme représentant l'augmentation de l'autofluorescence chlorophyllienne en fonction des concentrations de cyanazine chez les algues suite à une exposition de 96 heures.

et de 77% pour le butylate. Les valeurs des pentes des droites de régression obtenues sont de 5.4 (valeur de t calculée de: 3.2) pour le MCPA et de 2.4 (valeur de t calculée de: 5.69) pour le butylate. Les valeurs utilisées pour effectuer les régressions sont présentées en annexe aux tableaux AIII et AIV pour le MCPA et le butylate respectivement dans la colonne des valeurs des fluorescences à 650 nm de la fenêtre 2.

Ces deux herbicides ne possèdent pas le même mode d'action que les triazines (voir section 1.1.4.1 de l'introduction); ils n'interviennent pas au niveau du photosystème. Cependant, le coefficient de corrélation du butylate (77 %) supporte la présence d'une légère altération au niveau du système chlorophyllien.

La technique cytométrique, utilisée pour révéler la viabilité cellulaire, peut donc également informer sur le mode d'action de certains herbicides. Des effets sublétaux peuvent être mesurés et informer sur l'état physiologique de la population cellulaire viable. Une recherche plus approfondie sur les mesures cytométriques des effets sublétaux algaux provoqués par les herbicides, pourrait nous indiquer de façon précoce le risque encouru par le phytoplancton vis-à-vis des herbicides.

3.7- Synthèse des résultats et recommandations

La figure 14 résume les résultats obtenus lors de cette recherche. Les courbes de CI_{50} et des CL_{50} sont illustrées aux figures 15 et 16 respectivement. Selon les bioessais réalisés sur l'algue *Selenastrum capricornutum*,

la plus forte toxicité algale est associée aux triazines, représentées par l'atrazine et la cyanazine. Cette situation n'est guère surprenante, étant donné le mode d'action des triazines. On décèle également une phytotoxicité associée au dé-éthyl atrazine. Cette toxicité demeure tout de même moins élevée que celle estimée pour la molécule mère d'atrazine. Le MCPA et le butylate ont présenté une faible phytotoxicité chez l'algue *Selenastrum capricornutum*.

Les valeurs des paramètres de mesure obtenues pour trois des quatre herbicides soit le butylate, le MCPA et l'atrazine étant identiques pour chacun de ces herbicides, on peut conclure que ces derniers se caractérisent par des effets de type algicide plutôt qu'algistatique. Par contre, la cyanazine demeure potentiellement plus toxique que le butylate et le MCPA puisqu'elle tue les algues à des concentrations beaucoup plus faibles.

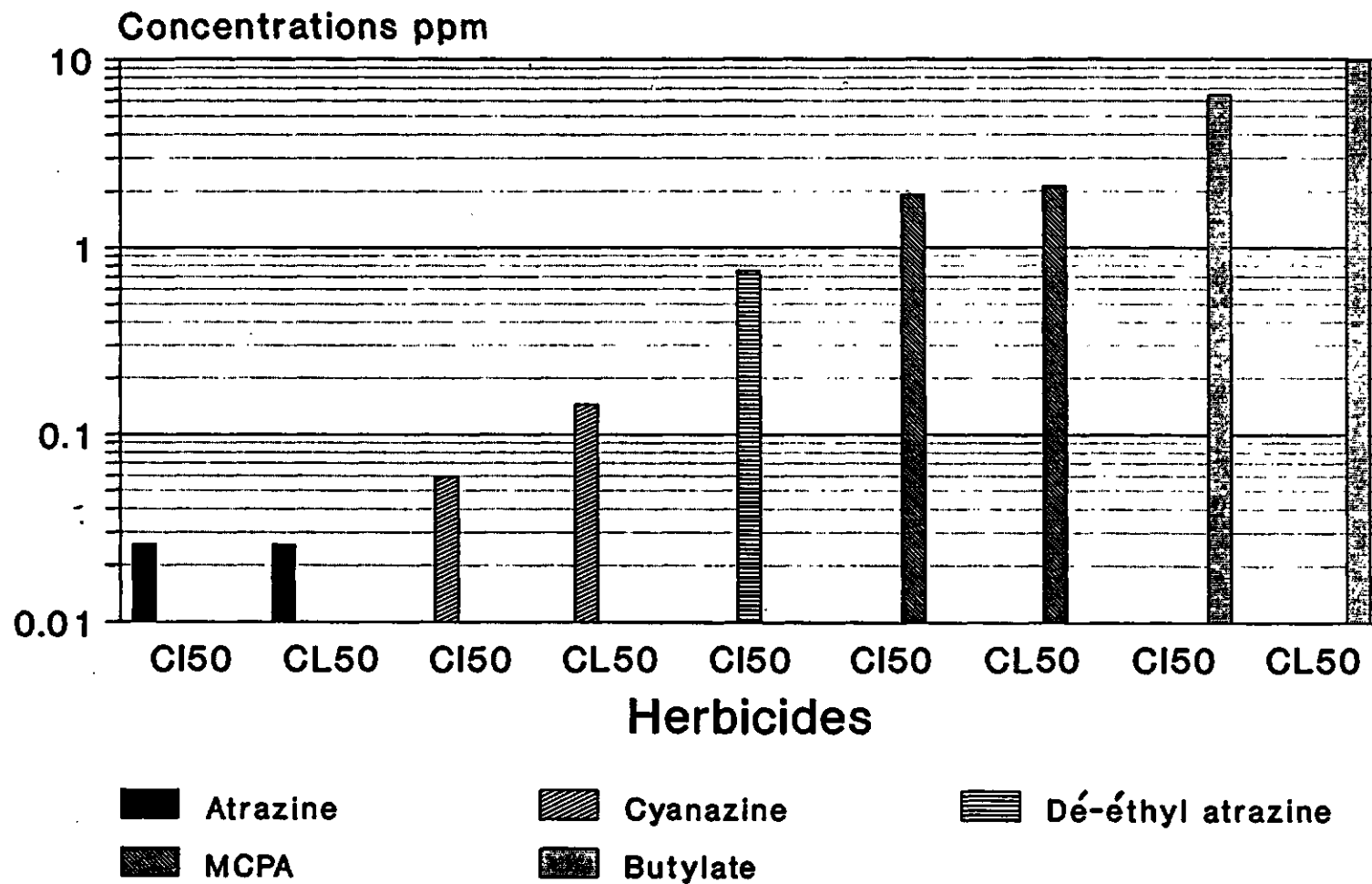


FIGURE 14. Sommaire des résultats des CI50 et CL50 obtenues après des incubations de 96 heures des algues en présence des différents herbicides.

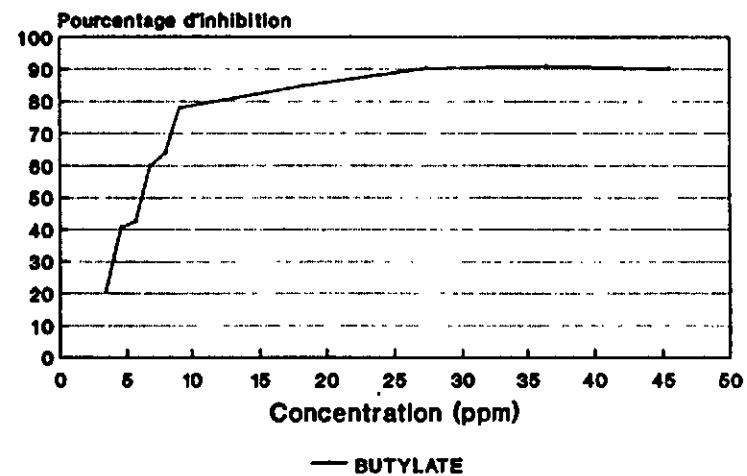
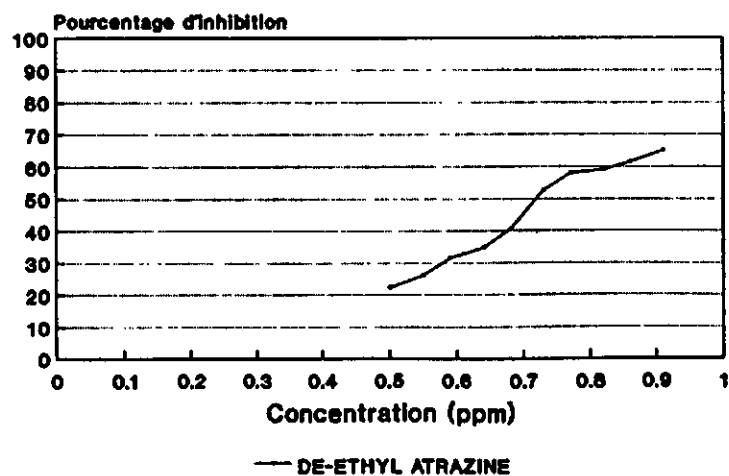
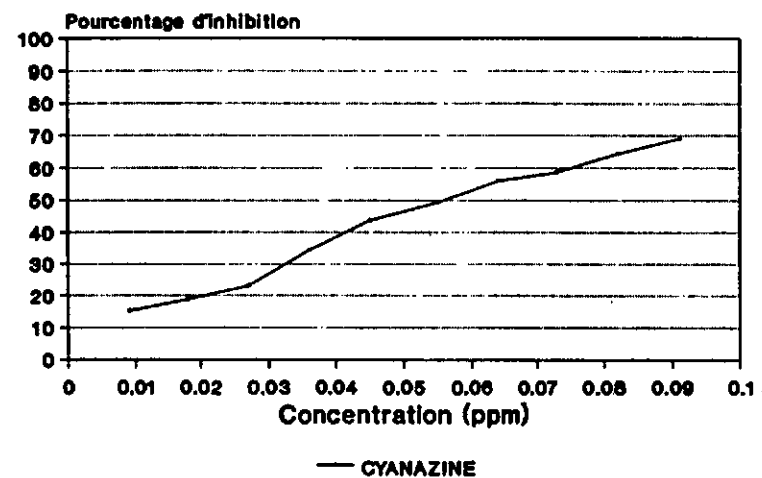
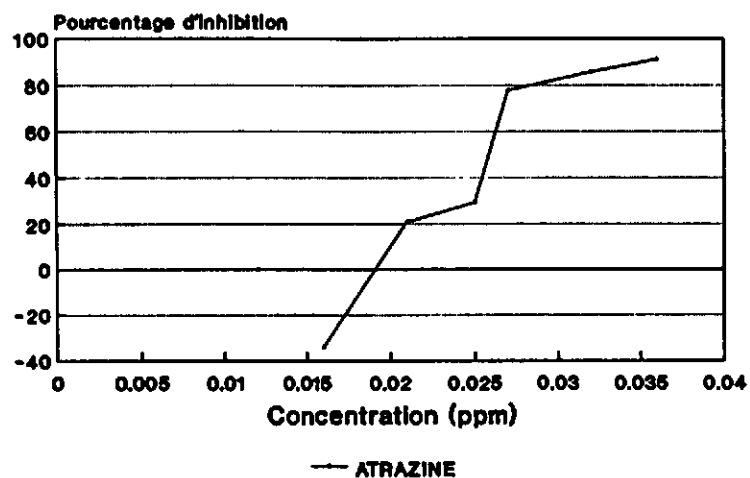


FIGURE 15. Courbes dose-effet représentant les inhibitions de croissance pour l'algue Selenastrum capricornutum en fonction des concentrations de chacun des herbicides suite à une exposition de 96 heures

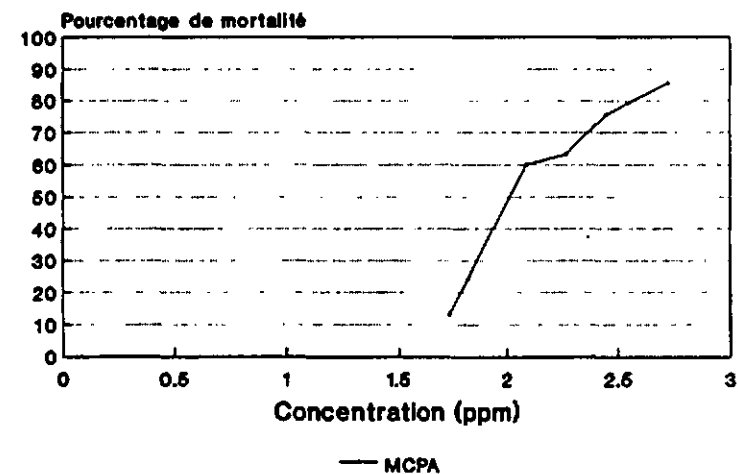
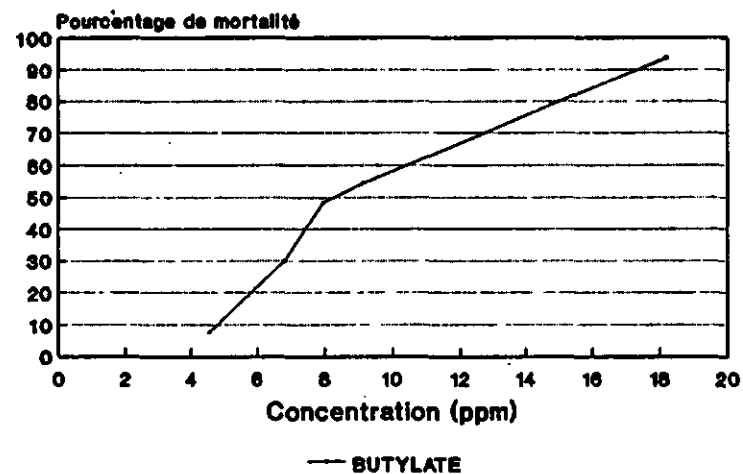
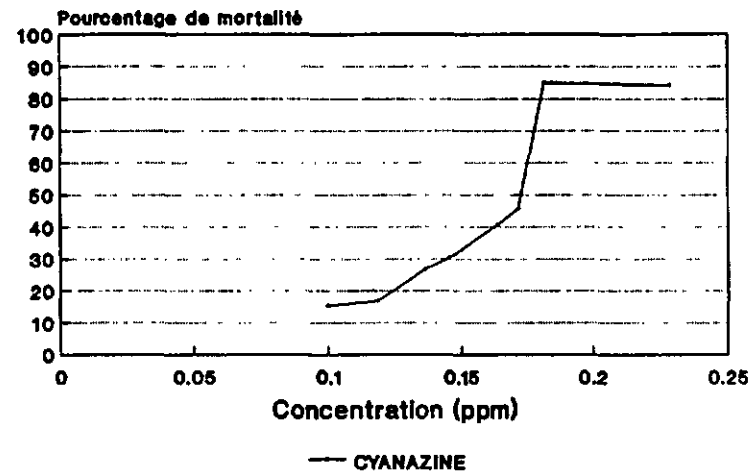
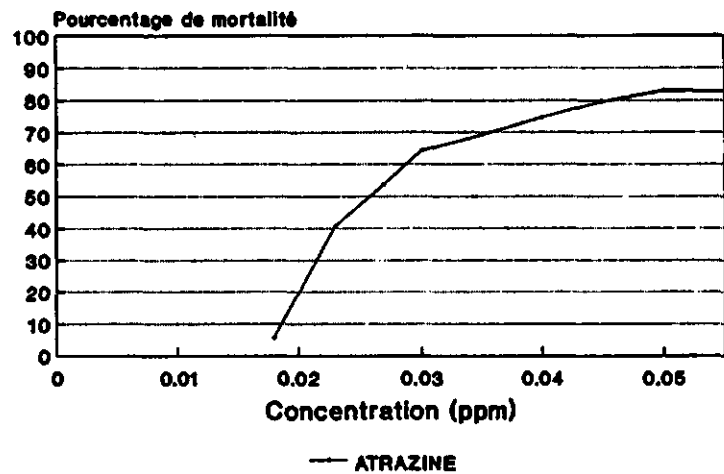


FIGURE 16. Courbes dose-effet représentant la létalité chez l'algue Selenastrum capricornutum en fonction des concentrations de chacun des herbicides suite à une exposition de 96 heures.

CHAPITRE 4

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Cette étude avait comme objectif d'évaluer la toxicité de quatre herbicides (l'atrazine, la cyanazine, le MCPA et le butylate) et d'un des métabolites majeurs de l'atrazine soit le dé-éthyl atrazine. Le matériel biologique utilisé a été l'algue verte *Selenastrum capricornutum*. Les bioessais qui ont été retenus sont le test chronique d'inhibition de croissance (96 heures) et le test chronique de létalité par cytométrie en flux. Ces deux variables nous ont permis d'estimer deux paramètres de mesure soit la CI_{50} (paramètre de sublétalité) et la CL_{50} (paramètre de létalité) sur chacun des herbicides.

L'évaluation de la toxicité de certains pesticides par des bioessais de laboratoire, nous a permis de vérifier leurs effets phytotoxiques. La mesure de paramètres tels les CI_{50} et des CL_{50} nous informe sur le danger potentiel d'un toxique pour le milieu aquatique. Puisque seules l'atrazine et la cyanazine présentent une toxicité élevée, il serait recommandé d'effectuer des tests *in situ* aux endroits ciblés par leur contamination, afin de connaître l'impact réel de ces herbicides dans un milieu naturel.

Les bioessais de laboratoire de logistique beaucoup plus simple et beaucoup moins coûteux que les essais *in situ*, nous ont permis de discriminer entre les herbicides les plus toxiques et les moins toxiques, afin de cibler et d'orienter nos recherches futures. Pour les recherches futures, nous recommandons également d'effectuer des tests de toxicité aiguë, puisque le système aquatique est également sujet à ce genre d'exposition (ruissellement causé par une forte pluie, suite à l'épandage de pesticides). Dans le but d'évaluer le risque associé à la phytotoxicité de produits toxiques, les bioessais algaux demeurent donc un outil de choix.

BIBLIOGRAPHIE

- Aeschbacher, M., C.A. Reinhardt, G. Zbinden, (1986). "A rapid cell membrane permeability test using fluorescent dyes and flow cytometry". Cell Biology and Toxicology, Vol. 2, p. 247-255.
- Aronson, J.G., (1973). "The effect of some common insecticides upon C-14 uptake in phytoplankton". M.S. thèse, Université du Nebraska, Lincoln. 96 pages
- Becton Dickinson, (1988). FACSscantm User's Guide, September 1988. Becton Dickinson, Immunocytometry Systems. CA 94043, U.S.A.
- Berglund, D.L., S. Strobel, F. Sugawara, G. Strobel, (1988). "Flow cytometry as a method for assaying the biological activity of phytotoxins". Plant Science Vol. 56, p. 183-188.
- Berglund, D.L., S. Eversman, (1988). "Flow cytometric measurement of pollutant stresses on algal cells". Cytometry, Vol. 9, p. 150-155.
- Beuffe, H., (1987). "Mise au point d'un protocole de test de toxicité aiguë à court terme, sur les algues, basé sur la variation de fluorescence induite par le DCMU". Groupe de méthodologie en écotoxicologie des produits chimiques (Groupement de Bordeaux).
- Blaise, C., (1991). "Microbiotests in aquatic ecotoxicology: characteristics, utility, and prospects". Environmental Toxicology and Water Quality, Vol. 6, pp. 145 - 155
- Blaise, C., R. Legault, N. Bermingham, R. Van Coillie, P. Vasseur, (1986). "A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment". Tox. Assess. Vol. 1, pp. 261 - 281

- Blaise, C., M. Harwood, (1991). "Contribution à l'évaluation écotoxicologique du Tébutiuron - un herbicide de la classe des urées substituées." Revue des Sciences de l'Eau. Vol. 4, pp. 121- 134
- Blank, H., G. Wallin, S. Wängberg, (1984). "Species-dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds". Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 8, pp. 339 - 351
- Böger, P., G. Sandmann, (1989). Target sites of herbicide action Ed. Peter Böger et Gerhard Sandmann. CRC Press. 295 p.
- 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". Bull. Soc. bot. Fr., 135, Lettres bot., (1), pp. 27 - 40
- Boudou, A., F. Ribeyre, (1989). Aquatic ecotoxicology fundamental concepts and methodologies. CRC Press, Florida Vol. 1, pp. 43 - 71
- Boudou, A., F. Ribeyre, (1989). Aquatic ecotoxicology fundamental concepts and methodologies. CRC Press, Florida Vol. 2, pp. 163 - 185
- Boyle, T.P., (1984). "The effect of environmental contaminants on aquatic algae". Algae as ecological indicators Ed. L. Elliot Shubert, Academic Press Inc, London, pp. 237 - 255
- Buser, H-R., (1990). "Atrazine and other s-triazine herbicides in lakes and in rain in Switzerland". Environ. Sci. Technol. Vol. 24, No. 7. pp. 1049 - 1058

- Casarett, I., L.J. Doull, (1986). Toxicology
Macmillan Publishing Company, London, 3^{ème} édition
p. 73
- Caux, P.-Y., S. Forrest, (1989). "Pesticides in
tributaries of the St. Lawrence River." Rapport 1987
- 1988. Réseau et hydrologie, Région Québec.
Laboratoire du Capitaine Bernier. Environnement
Canada. 134 p.
- Chiaudani, G., M. Vighi, (1974). " The N:P ration and test
with *Selenastrum capricornutum* to predict
eutrophisation in lakes". Water Research, Vol. 8, pp.
1063 - 1069
- Christensen, E.R., J. Scherfig, P.S. Dixon, (1979).
"Effects of manganese, copper and lead on *Selenastrum*
capricornutum and *Chlorella stigmatophora*". Water
Research, Vol. 13, pp. 79 - 92
- Combrier, E., X. Ronot, M. Adolph, (1988). La
cytométrie en flux. MEDSI/McGRAW HILL, Paris,
Vol. 1, pp. 113-121
- Cooper, K., (1991). Handbook of Pesticide Toxicology. Ed.
Wayland J. Hayes et Edward R. Laws. Academic Press.
Vol. 1 pp. 463 - 466
- Couture, P., S.A. Visser, R. Van Coillie, C. Blaise,
(1985). "Algal bioassays: their significance in
monitoring water quality with respect to nutrients
and toxicants". Schweiz. Z. Hydrol. Vol. 47, pp.
128-158
- Couture, P., R. Van Coillie, P.G.C. Campbell, C.
Thellen, (1981). "Le phytoplancton, un réactif
biologique sensible pour détecter rapidement la
présence de toxiques". INSERM, Vol. 106, pp. 255-272

- Couture, P., (1981). "Contribution de bioessais avec algues pour l'étude des impacts environnementaux en eaux douces". Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, 128 pages
- Demers, S., D. Kimberly, T. Cucci, (1989). "A flow cytometric approach to assessing the environmental and physiological status of phytoplankton". Cytometry. Vol. 10. pp. 644 - 652
- Dive, C., P. Workman, J.V. Watson, (1987). "Improved methodology for intracellular enzyme reaction and inhibition kinetics by flow cytometry". Cytometry Vol. 8, p. 552-561.
- Dorsey, J., C.M. Yentsch, S. Mayo, C. McKenna, (1989). "Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae". Cytometry Vol. 10, pp. 622-628.
- Eidt, D.C., (1983). "Pesticides in forestry and agriculture". Aquatic Toxicology. Ed. par Jérôme O. Nriagu, John Wiley and Sons. Vol. 13 dans la série: Advances in Environmental Science and Technology. 525 p.
- Environnement Canada, (1991). "Pesticides - Recherche et Surveillance". Rapport annuel 1988 - 1989. Ministère des Approvisionnements et Services Canada. No. En40-11/13-1989F
- Environnement Canada, (1990). "Pesticides - Recherche et Surveillance". Rapport annuel 1987 - 1988. Ministère des Approvisionnements et Services Canada. No. En40-11/13-1988F
- Environnement Canada, (1988). "Pesticides - Recherche et Surveillance". Rapport annuel 1986 - 1987. Ministère des Approvisionnements et Services Canada. No. En49-11/13-1987F

- Freemark, K., P. MacQuarrie, S. Swanson, H. Peterson, (1990). "Development of guidelines for testing pesticide toxicity to nontarget plants for Canada". Aquatic Toxicology and Risk Assessment. Edité par Landis, W.G., Van der Schalie, H.W. Ed. ASTM, 13^{ième} Volume. pp. 14 - 27
- Gala, W., J.P. Giesy, (1990). "Flow cytometric techniques to assess toxicity to algae". Aquatic Toxicology and Risk Assessment. 13^{ième} vol. Ed. Landis\ van der Schalie. ASTM. Baltimore, USA. pp. 237-246
- Greene, J.C., W.E. Miller, T. Shiroyama, (1975). "Utilization of algal assays to assess the effect of municipal, industrial and agricultural wastewater effluents upon phytoplankton production in the Snake River system". Wat. Air Soil Pollut. Vol. 4, pp. 415 - 434
- Hosmani, S.P., (1987). "Algal diversity as a measure of water pollution". Acta Botanica Indica, Vol. 15, pp. 320 - 322
- Hynes, H.B.N., (1960). The biology of polluted waters. Liverpool University Press, Liverpool.
- Jouany, J.M., (1981). "Les tests d'écotoxicité aiguë chez les algues et les macrophytes". Compte rendu du Colloque International d'Ecotoxicologie. Editions Leclerc, H. et Dive, D. Les Colloques de l'INSERM, France, pp. 169 - 181
- Joubert, G., (1980). "A bioassay application for quantitative toxicity measurements, using the green algae *Selenastrum capricornutum*". Water Reseach Vol. 14, pp. 1769-1763

- Joubert, G., (1981). "Etude comparative des réactions à la toxicité entre la truite *Salmo gairdneri* et quatre autres intégrateurs biologiques sur 36 cas de bioessais statiques". Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques. Ottawa, No. 990, pp. 251 - 264
- Karataglis, S., L. Symoenidis, M. Moustakas, (1988). "Effect of toxic metals on the multiple forms of esterases of *Triticum aestivum* cv Vergina". J. Agronomy and Crop Science. Vol. 160, pp. 106-112.
- Kaufman, D.D., P.C. Kearney, (1976). HERBICIDES Physiology, Biochemistry, Ecology. Academic Press, 2^{ieme} ed., London, Vol. 2, pp. 52-53
- Keighan, E., (1977). "Caractérisation du niveau d'enrichissement et de la toxicité des eaux du bassin du fleuve St-Laurent". Comité d'étude sur le fleuve St-Laurent. Environnement Canada, Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec, Rapport technique No. 6, 153 pages.
- Klaine, S.J., M.L. Hinman, K.R. Windelmann, K.R. Sauser, J.R. Martin, I.W. Moore, (1988). "Characterization of agricultural nonpoint pollution: pesticide migration in a west Tennessee watershed". Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 7. pp. 609 - 614
- Lampert, W., W. Fleckner, E. Pott, U. Schober, K.U. Störkel, (1989). "Herbicides effects on planktonic systems of different complexity." Hydrobiologia. Vol. 188/189, pp. 415 - 424
- Legendre, L., C.M. Yentsch, (1989). "Overview of flow cytometry and image analysis in biological oceanography and limnology". Cytometry. Vol. 10. pp. 501 - 510

- McCloskey, W.B., D.E. Bayer, (1990). "Atrazine absorption and effects on photosynthesis in wheat leaf protoplasts". Pesticides Biochemistry and Physiology. Vol. 37. pp. 227 - 238
- Ménard, L., C. Blaise, P. Couture, (1992). "Développement d'un test de létalité algale par cytométrie en flux". Mémoire de maîtrise INRS-eau. 191 pp.
- MENVIQ, (1990). "Méthodologie de calcul de critères de qualité de l'eau pour les substances toxiques". Direction de l'expertise scientifique, MENVIQ, Québec EMA89. 147 p.
- Miller, W.E., J.C. Greene, T. Shiroyama, (1978). "The *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay bottle test". Us Environmental Protection Agency Report, No.EPA-600/9-78-018, Corvallis, Oregon, 126 pages
- Miller, W.E., S.A. Perterson, J.C. Greene, C.A. Callahan, C.A. (1985). "Comparative toxicology of laboratory organisms for assessing hazardous waste sites". J. Environ. Qual. Vol. 12, No. 4. pp. 569-574
- Muirhead, K.A., P.K. Horan, G. Poste, (1985). "Flow cytometry: present and future (Review)". Biotechnology Vol. 3., 337-355.
- Neugebauer, K., F.J. Zieris, W. Huber, (1990). "Ecological effects of atrazine on two outdoor artificial freshwater ecosystems". Z. Wasser Abwasser-Forsch. Vol. 23. pp. 11 - 17
- Nyholm, N., (1989). "Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae". Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 8, pp. 689 - 703

- Phinney, D.A., T.L. Cucci, (1989). "Flow Cytometry and Phytoplankton". Cytometry. Vol. 10. pp. 511 - 521
- Pierrez, J., P. Metezeau, P. Poncelet, J.P. Le Pichon, (1988) La cytométrie en flux. MEDSI/McGRAW HILL, Paris, Vol. 1., pp. 51-53
- Pionke, H.B., D.W. Glotfelty, (1990). "Contamination of groundwater by atrazine and selected metabolites". Chemosphère. - Vo. 21, No. 6. pp. 813 - 822
- Premazzi, G., G. Buonaccorsi, P. Zilio, (1989). "Flow cytometry for algal studies". Water Research. Vol. 23, No. 4. pp. 431 - 442
- Premazzi, G., G. Buaonaccorsi, S. Binda, A. Brazzzelli, P. Zillio, (1988). "Application of laser flow cytometry to water quality assessment". Joint Research Center. Commission of the European Communities. Ispra Establishment. pp. 1 - 20
- Prosperi, E., A.C. Croce, G. Bottiroli, R. Supino, (1986). "Flow cytometric analysis of membrane permeability properties influencing intracellular accumulation and efflux of fluorescein". Cytometry Vol. 7, p. 70-75.
- Rai, L.C., J.P. Gaur, H.D. Kumar, (1981). "Phycology and heavy-metal pollution". Biol. Rev. Vol. 56. pp. 99 - 151
- Reese, M.J., (1937). "The microflora of non-calcareous streams Rheidol and Melinder with special reference to water pollution from lead mines in Cardiganshire". Journal of Animal Ecology, Vol. 25, pp. 385 - 407
- Reynolds, C.S., (1987). "The response of phytoplankton communities to changing lake environments". Scweiz. Z. Hydrol. Vol. 49, No. 2, pp. 220 - 236

- Rotman, B., B.W. Pepermaster, (1966). "Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters". Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA Vol. 55, p. 134-141.
- Roy, S., L. Legendre, (1979). "DCMU-enhanced fluorescence as an index of photosynthetic activity in phytoplankton". Marine Biology Vol. 55, pp. 93-101
- SAGE, (1988). Recueil des principaux pesticides en usage au Québec. Edité par: Cossette, D., Giroux, I., Poulin, R. SAGE Ltée, 4700 boul. Wilfrid-Hamel, Québec, P.Q. 3 vol. Rapport confidentiel.
- Salisbury, F.B., C.W. Ross, (1985). Plant Physiology Wadsworth Publishing Company, 3^{ième} éd., California, p.183.
- Samson, G., R. Popovic, (1988). "Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants". Ecotoxicology and Environmental Safety. pp. 272 - 277
- Samuelsson, G., G. Oquist, (1977). "A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on in vivo chlorophyll fluorescence". Physiol. Plant Vol. 40, pp. 315-319
- Sherrer, B., (1984). Biostatistique. Gaëtan Morin, Québec, 854 pages.
- Smith, R.L., (1980). Ecology and field biology. Harper and Row, New-york, 3^{ième} édition, p. 20

- Sontag, W., (1977). "A comparative kinetic study on the conversion of fluorescein diacetate to fluorescein in living cells and in vitro". Rad. and Environ. Biophys. Vol. 14, p. 1-12.
- St- Laurent, D., C. Blaise, P. MacQuarrie, R. Scroggins, B. Trottier, (1991). "Comparative assessment of herbicides phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures". Environmental Toxicology and Water Quality. Vol. 6, issue 4.
- Stevens, J.T., D. Summer, (1991). Handbook of Pesticide Toxicology. Ed. Wayland J. Hayes et Edward R. Laws. Academic Press. Vol. 3 pp. 1318 - 1325
- Thellen, C., C. Blaise, Y. Roy, C. Hickey, (1989) "Round robin testin with the *Selenastrum capricornutum* microplate toxicity assay". Hydrobiologia Vol. 188/189, pp. 259-268
- Thomas, W.M., B.M. Judy, W.R. Lower, G.F. Krause, W.W. Sutton, (1990). "Time-Dependent toxicity assessment of herbicide contaminated soil using the green alga *Selenastrum capricornutum*". Plants for toxicity assessment. Edité par Wang, W., Gorsuch, J.W., Lower, W. Ed. ASTM, pp. 235 - 254.
- Trotter, D.M., A. Baril, M.P. Wong, R.A. Kent, (1990). "Recommandations sur la qualité de l'eau pour l'atrazine au Canada". Etude No. 168, Série scientifique Direction générale des eaux intérieures. 101 p.
- USEPA, (1971). "Algal assay procedure bottle test". National Eutrophication Research Program, Corvallis, Oregon, 82 pages

- Van Coillie, R., P. Couture, R. Schoenert, C. Thellen, (1982). "Mise au point d'une évaluation rapide de la toxicité originale des effluents et de leurs composantes à l'aide d'algues". Environnement Canada, Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec, Rapport contractuel, 130 pages.
- Visser, J.W.M., A.A.M. Jongeling, H.J. Tanke, (1979). "Intracellular pH-determination by fluorescence measurements". The Journal of Histochemistry and Cytochemistry Vol. 27, p. 32-35.
- Vollenweider, R.A., (1966). "Advances in defining critical loading levels for phosphorus in lake eutrophication". Mem. Ist. Ital. Idrobiologia, Vol. 33, pp. 53 - 83
- Wong, M., R. Kent, (1988). "Developing canadian water quality pesticides guidelines for protection of aquatic life." Water Poll. Res. J. Canada. Vol. 23, No.4, pp. 500 - 509
- Xu, C., J. Auger, Govindjee. (1990). "Chlorophyll a fluorescence measurements of isolated spinach thylakoids obtained by using single-laser-based flow cytometry". Cytometry. Vol. 11. pp. 349 - 358
- Yentsch, C.M., L. Cucci, D.A. Phinney, (1984). "Flow cytometry and cell sorting: problems and promises for biological ocean science research". Marine Phytoplankton and Productivity. Eds. Holm-Hansen, O., Bolis, L., and Gilles, R. pp. 141 - 155
- Zar, J.H., (1984). Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, Toronto, 2^{ième} édition, 718 p.

ANNEXE

TABLEAU AI

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

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

TABLEAU AI (suite)

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

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

TABLEAU AI (suite)

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

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

TABLEAU AII

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

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

TABLEAU AII (suite)

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

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

TABLEAU AII (suite)

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

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

TABLEAU AIII

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

	FENÊTRE 1			FENÊTRE 2		
GROUPES [Butylate] ppm	x URF 650 nm	x URF 530 nm avant FDA	x URF 530 nm après FDA	x URF 650 nm	x URF 530 nm avant FDA	x URF 530 nm après FDA
Témoin	78	153	371	826	362	570
	36	91	308	836	365	537
	166	171	225	830	367	551
	75	182	285	833	372	586
	66	147	309	832	371	578
18.18	8	144	103	866	672	788
	7	150	130	871	654	845
	16	72	125	870	639	703
	8	125	94	872	564	828

TABLEAU AIII

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

	FENÊTRE 1			FENÊTRE 2		
GROUPES [Butylate] ppm	x URF 650 nm	x URF 530 nm avant FDA	x URF 530 nm après FDA	x URF 650 nm	x URF 530 nm avant FDA	x URF 530 nm après FDA
9.09	64	170	216	848	468	796
	60	272	169	867	661	790
	119	194	164	874	589	837
	111	216	134	858	586	797
7.95	145	170	189	832	378	805
	88	299	132	868	672	792
	123	325	174	850	567	847
	112	259	169	852	544	874

TABLEAU AIII (suite)

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

	FENÊTRE 1			FENÊTRE 2		
GROUPES [Butylate] ppm	x URF 650 nm	x URF 530 nm avant FDA	x URF 530 nm après FDA	x URF 650 nm	x URF 530 nm avant FDA	x URF 530 nm après FDA
6.82	110	247	166	831	560	758
	112	225	163	838	552	710
	158	368	163	832	620	780
	142	210	242	832	500	803
4.55	132	247	120	820	503	751
	162	181	117	823	359	689
	101	257	170	820	578	702

TABLEAU AIV

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

	FENÊTRE 1			FENÊTRE 2		
GROUPES [MCPA] ppm	x URF 650 nm	x URF 530 nm avant FDA	x URF 530 nm après FDA	x URF 650 nm	x URF 530 nm avant FDA	x URF 530 nm après FDA
Témoïn	18	87	156	712	367	551
	65	90	199	709	370	584
	61	80	221	719	408	605
	101	66	269	710	371	596
2.72	7	75	373	741	394	562
	11	79	379	722	419	536
	9	88	309	750	408	536
	1	72	365	727	388	564
2.45	13	87	322	722	431	562
	13	78	254	723	381	543
	12	64	311	717	373	531
	8	72	281	716	367	541

TABLEAU AIV (suite)

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

	FENÊTRE 1			FENÊTRE 2		
GROUPES [MCPA] ppm	x URF 650 nm	x URF 530 nm avant FDA	x URF 530 nm après FDA	x URF 650 nm	x URF 530 nm avant FDA	x URF 530 nm après FDA
2.27	8	75	276	714	364	529
	12	95	299	717	407	505
	24	81	252	723	437	502
	29	81	232	721	421	532
2.09	32	84	94	714	364	576
	19	74	169	717	407	537
	9	74	214	723	437	535
	21	83	160	721	421	534
1.82	20	118	294	729	545	588
	24	76	238	726	374	614
	66	103	313	719	514	599
	29	103	323	730	543	588

