

# **DIRECTION DES RECHERCHES OCEANIQUES**

**TEST ECOTOXICOLOGIQUE SUR MICROALGUES ET  
LECTEUR DE PLAQUES : MESURES D'ACTIVITES  
ENZYMATIQUES SUR CELLULES IN VIVO.  
APPLICATION A L'EVALUATION DE LA  
QUALITE DU MILIEU**

par

**Franck GILBERT et François GALGANI**



**DRO-90-06-MR**

IFREMER  
 Centre de Nantes  
 B.P. n° 1049  
 44037 Nantes cedex 01

DIRECTION DES RECHERCHES OCEANIQUES

AUTEUR (S) :		CODE :
<i>Franck GILBERT, François GALGANI</i>		N° <u>90-06-MR</u>
TITRE		date : <i>août 90</i>
<i>Test écotoxicologique sur microalgues et lecteur de plaques : mesures d'activités enzymatiques sur cellules in vivo.</i>		tirage nb : 20
<i>Application à l'évaluation de la qualité du milieu.</i>		Nb pages : 39
CONTRAT		DIFFUSION
<i>(intitulé)</i>		libre <input checked="" type="checkbox"/>
N° _____		restreinte <input type="checkbox"/>
		confidentielle <input type="checkbox"/>

**Résumé**

Une nouvelle méthode d'évaluation des effets de différents contaminants sur les microalgues marines (*Tetraselmis suecica*, *Skeletonema costatum*) a été développée. Elle se base sur la mesure de l'activité estérase des cellules à l'aide d'un marqueur en fluorescence, la fluorescéine diacétate (FDA). Les manipulations sont réalisées dans des microplaques et les mesures sont effectuées par un lecteur de plaques en fluorescence. Le pilotage des instruments et le traitement des données sont pris en charge par un logiciel informatique développé spécifiquement pour ce travail. Des applications à des tests écotoxicologiques rapides (calcul de CL 50) et à une évaluation de la qualité du milieu par étude d'échantillons d'eaux sont proposées.

Mots-clés : environnement, écotoxicologie, CL 50, estérase, microalgues, FDA, microplaques.

**Abstract**

A new method for the assessment of several contaminant effects on marine microalgae (*Tetraselmis suecica*, *Skeletonema costatum*) has been developed. The method is based on the measure of cells esterase activity using a fluorimetric stain, fluorescein diacetate (FDA). The experiments are performed in microplates using a fluorimetric microplate reader. The different steps of the experiments and the data processing are controlled by an original specific software. Application of the system for rapid ecotoxicological tests (determination of LC 50) and for assessment of environment quality by observation of water samples are proposed.

Key-words : environment, ecotoxicology, LC 50, esterase, microalgae, FDA, microplates.

## SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION.....	4
MATERIELS ET METHODES.....	3
- CULTURES DE MICROALGUES.....	8
- PREPARATION ET STOCKAGE DES REACTIFS.....	8
- MARQUAGE DES CELLULES : INTEGRATION DES MARQUEURS ET DEVELOPPEMENT DES COLORATIONS.....	3
- DETECTION DES MARQUAGES-PRINCIPES DES MESURES.....	10
- CAMPAGNE EN MER : PRELEVEMENTS D'EAU DE MER DE SURFACE ET CONCENTRATION DES ECHANTILLONS.....	14
- TRAITEMENT INFORMATIQUE DES DONNEES.....	14
RESULTATS.....	15
- ASPECT BIOCHIMIQUE.....	15
- ASPECT CELLULAIRE.....	15
- ASPECT ECOTOXICOLOGIQUE.....	23
- ASPECT MATHEMATIQUE.....	23
- APPLICATION DU TEST.....	28
- ASPECT ENVIRONNEMENTAL.....	28
DISCUSSION.....	35
CONCLUSION.....	37
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	38

## INTRODUCTION

Au niveau environnemental l'écotoxicologie "étude des modalités de contamination de l'environnement par les agents polluants naturels ou artificiels ainsi que leurs mécanismes d'action et effets sur les êtres vivants qui peuplent la biosphère" (Ramade, 1979), est en passe de devenir le pôle d'intérêt de ces prochaines années. L'environnement est en effet de plus en plus soumis à l'apport de substances chimiques de provenance et d'action variées (rejets industriels, agricoles, urbains). Ces substances ne sont pas malgré leurs spécificités sans impact sur les êtres vivants. Leur impact sur le milieu terrestre est connu, mais qu'en est-il de leur effet sur le milieu marin ?

L'autorisation de rejets de produits toxiques est soumise à l'agrément d'autorités administratives. Ces autorisations intègrent les résultats d'études d'impact et de tests de toxicité. A ce titre, les tests d'écotoxicologie sont des outils d'évaluation de la toxicité potentielle des produits. L'effet toxique de contaminants est étudié à l'aide de bio-essais réalisés sur différents organismes aquatiques, des bactéries (Blaise *et al.*, 1981) aux poissons (Blaise *et al.*, 1986 a) en passant par les algues (Joubert, 1983).

Les algues unicellulaires, utilisées pour la première fois lors de bio-essais par Allen et Nelson en 1919, ce sont révélées être un support de choix pour les tests écotoxicologiques (Van Coillie *et al.*, 1983). Cela tient autant à leur place de premier maillon de la chaîne alimentaire qu'aux avantages qu'elles procurent (sensibilité, petits volumes nécessaires, représentativité). Les tests avec algues sont basés soit sur des mesures de croissance (nombre de cellules, biomasse) soit sur des mesures de paramètres biochimiques (incorporation  $^{14}\text{C}$ , ATP, absorption, fluorescence des pigments).

Le choix des bio-essais obéit à une série de critères de validité scientifique et environnementale définis par Van Coillie (1990) :

- simplicité des manipulations et mesures,
- reproductibilité des résultats,
- sensibilité à une très large gamme de polluants,
- optimisation économique (automation et (ou) miniaturisation en séries),
- temps de réponse relativement rapide (moins de cinq jours généralement),
- facilité de se procurer et de conserver les organismes biologiques à tester,
- représentativité des organismes biologiques et des paramètres à tester,
- contrôle des variables de façon à focaliser l'effet toxique.

Aucun bio-essai ne répond totalement à ces critères mais il se doit d'en respecter le plus grand nombre possible. Dans cette optique nous nous sommes penchés sur la réalisation d'un test qui améliorerait certains de ces critères par rapport aux tests existants. En ce sens, l'utilisation d'algues unicellulaires et de lecteurs de plaques (Blaise *et al.*, 1986 b) nous est apparue intéressante. Plusieurs marqueurs d'activité enzymatique ont été testés. Les algues participant au

test ont été sélectionnées pour leur facilité de culture en laboratoire et pour leur représentativité. Deux espèces appartenant à deux groupes différents ont été choisies :

- la Prasinophycée *Tetraselmis suecica* (Fig. 1) fait partie des phytoflagellés, formes libres douées de mouvement grâce à un ou plusieurs flagelles. La cellule ovoïde mesure environ 10  $\mu\text{m}$  et possède en position apicale 4 flagelles égaux légèrement plus courts que le corps cellulaire. Elle est très riche en chlorophylle et possède la propriété de former des kystes. C'est une algue de climat tempéré.
- les Diatomées vivent à l'état planctonique, benthique ou fixé sur des supports divers, elles représentent la majorité du phytoplancton. La cellule est entourée de deux valves silicopeptidiques emboîtées l'une dans l'autre. De nombreuses espèces se présentent sous forme de colonies. *Skeletonema costatum* (Fig. 2) est une Diatomée centrique. Ces deux valves discoïdes ( $\phi$  : 8 à 15  $\mu\text{m}$ ) émettent de fins prolongements siliceux par lesquels les cellules se rattachent et forment de longues chaînes. C'est une espèce pélagique très commune sur les côtes de la mer du Nord, en Manche, en mer Baltique. Son ubiquité en fait une espèce de choix pour la normalisation de tests.

Notre étude a pour but de caractériser des activités enzymatiques sur ces algues unicellulaires. Un système basé sur l'utilisation de lecteur de plaques et un traitement informatique des résultats ont été mis au point en vue de tester l'effet de molécules chimiques dans des conditions normalisables. Par ailleurs, une application à l'évaluation de la qualité du milieu est proposée.

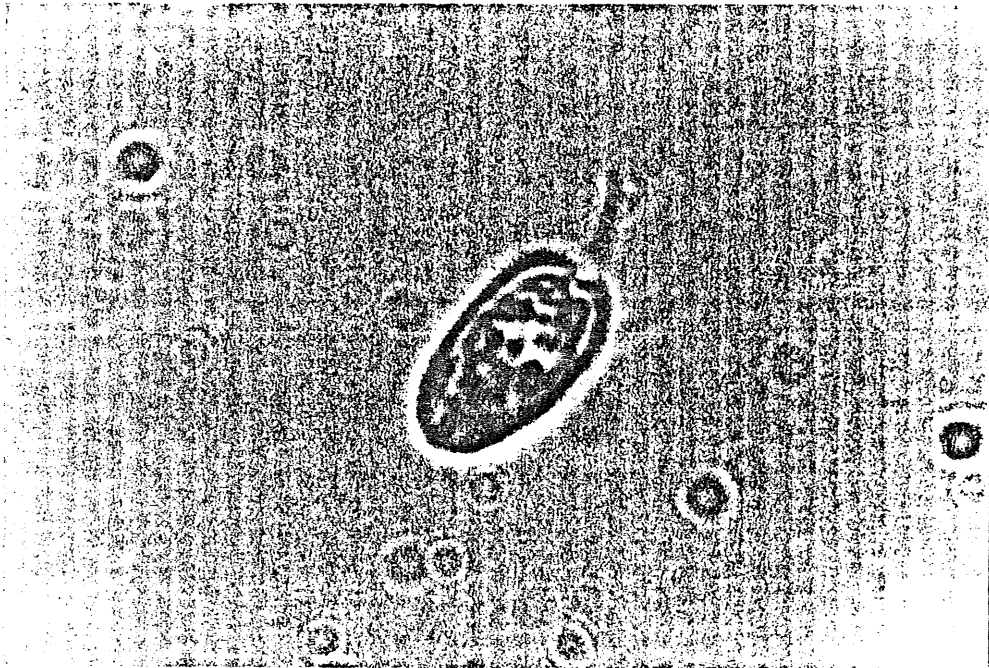


Fig.1. Prasinophycée *Tetraselmis suecica* (X 2800).

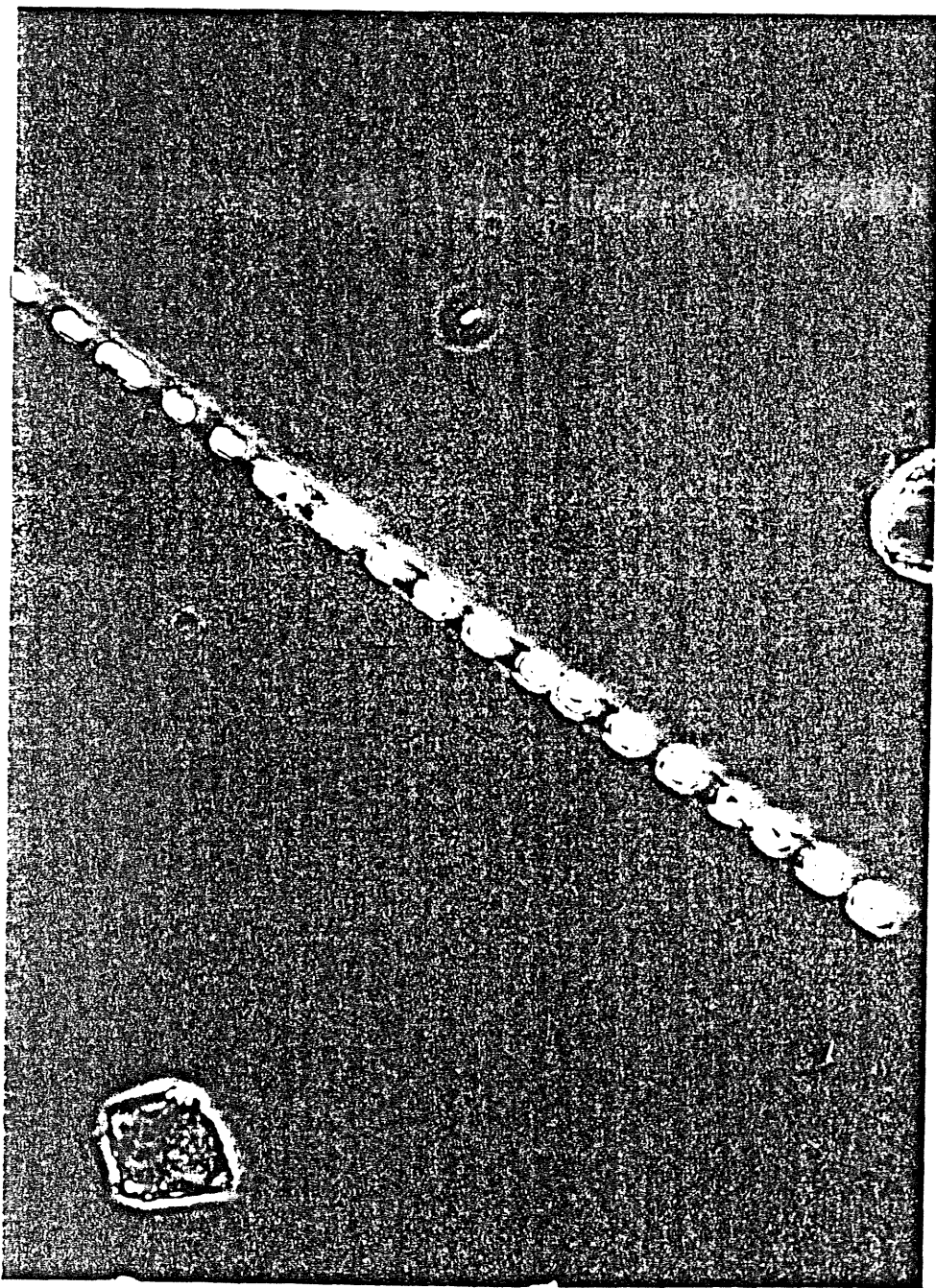


Fig.2. Diatomée *Skeletonema costatum* sous forme de colonie en chaîne (X 500).

## MATERIELS ET METHODES

### CULTURES DE MICROALGUES

La Prasinophycée *Tetraselmis suecica* (Kyling) Butcher provient de la station biologique de Plymouth. Le milieu de culture est de l'eau de mer filtrée (4  $\mu\text{m}$  puis 0.2  $\mu\text{m}$ ) stérilisée (20 minutes à 120° C) enrichie de milieu ESP-Provasoli stérilisé (20 minutes à 120° C). La culture débutée à une concentration de 15 000 cellules/ml est placée dans une salle thermostatée (20° C) et éclairée avec une alternance obscurité - lumière de 12<sup>h</sup>/12<sup>h</sup>. Le suivi de la culture est simultanément réalisé par comptage de cellules (Coulter Multisizer Coultronics, orifice 100  $\mu\text{m}$ /limite inférieure canal 22 : 5.151  $\mu\text{m}$ ) et par mesure d'absorption à 530 nm (Mora et Fabregas, 1980) à l'aide d'un spectrophotomètre (U-2000, Hitachi). La Diatomée centrique *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve fournit par l'Université de Nantes (J.M. Robert, Baie de Bourgneuf) est cultivée avec le même milieu et dans les mêmes conditions d'éclairage et de température. Les comptages de cellules sont réalisés avec un microscope droit (Dialux 20, Wild Leitz) et une cellule de Malassez. Le Dinoflagellé *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, souche PL2V reçue de l'Institut Espagnol d'Océanographie - Centre Côtier de Vigo, est cultivé en eau de mer filtrée stérilisée enrichie de milieu K stérilisé.

Les diverses manipulations de microalgues (échantillonnage, repiquage) sont réalisées sous hotte et avec du matériel stérile.

### PREPARATION ET STOCKAGE DES REACTIFS

La solution stock de Rouge Neutre (Toluyène rouge, produits RAL, Paris) est de 0,4 % (m/v) dans de l'eau distillée. Une dilution au 1/16<sup>ème</sup> dans le milieu de culture permet d'obtenir la solution utilisable. La solution de MTT (Thiazolyl Tetrazolium bromure, Sigma Chemical Company, M-2128) à 0.05 % (m/v) est réalisée avec du milieu de culture. La fluorescéine diacétate (FDA, Sigma Chemical Company, F-7378) est solubilisée dans de l'acétone à une concentration de 0.38 mg/ml. Ces solutions sont placées à l'abri de la lumière à 4° C. Les solutions des molécules à tester sont préparées à l'aide de différents solvants (Tab. I) et stockées à l'abri de la lumière à température ambiante. Diverses solutions participant aux marquages des cellules sont également préparées : solution de formaldéhyde-calcium : 10 ml de solution de formaldéhyde (40 %), 10 ml de chlorure de calcium (10 %), eau distillée qsp. 100 ml ; solution d'acide acétique-éthanol : 1 ml d'acide acétique dans 100 ml d'éthanol (50 %). Pour les marquages sont également utilisés du tampon PBS (pH 7), du diméthylsulfoxyde (DMSO). Le test antibiotique est réalisé avec du sulfate de kanamycine (Labo Bristol-Myers) en solution dans de l'eau distillée.

### MARQUAGE DES CELLULES : INTEGRATION DES MARQUEURS ET DEVELOPPEMENT DES COLORATIONS

Le Rouge Neutre est un colorant spécifique des vacuoles et lipides (Klut *et al.*, 1988). 100  $\mu\text{l}$  d'une solution de Rouge Neutre diluée sont ajoutés dans chaque puits où ont été concentrées, par vidange après ajout de culture, des cellules de microalgues. L'incubation dure 3 heures puis une vidange est effectuée. 200  $\mu\text{l}$  de solution formaldéhyde calcium sont ajoutés. Au bout d'une minute sont opérés une vidange et un rinçage par 100  $\mu\text{l}$  de PBS. Les puits sont remplis alors par 380  $\mu\text{l}$  de solution acide acétique-éthanol.



Tableau I : Molécules utilisées lors des tests

	Catégorie de molécule	Solvant utilisé
Phosalone	Insecticide Acaricide	Acétone
Roténone	Insecticide Acaricide	Acétone
Lindane	Insecticide Acaricide	Acétone
Atrazine	Herbicide	Acétone
Simazine	Herbicide	Acétone
Atrazine + Simazine (1/1 )	Herbicide	Acétone
Sevin L.85 (carbaryl )	Insecticide Acaricide	Acétone
Pentachlorophénol	Traitement du bois	Ethanol
Bichlorure de zinc	Métal	Eau distillée
Sulfate 7-hydrate de zinc	Métal	Eau distillée
Sulfate de cuivre II	Métal	Eau distillée
Dichromate de potassium	Métal	Eau distillée
Tributyl étain (bis) oxyde	Antifouling	Eau distillée
Aminotriazole	Herbicide	Eau distillée
Amétryne	Herbicide	Ethanol

Le MTT (jaune) après pénétration dans la cellule est dégradé en MTT formazan (rose dans DMSO) par une activité déshydrogénase NAD (P)<sup>+</sup> dépendante. La technique de marquage utilisée est la suivante : 250  $\mu\text{l}$  de culture cellulaire et 30  $\mu\text{l}$  de solution MTT sont introduits dans les puits. Suivent une incubation de 2 heures, un apport de 100  $\mu\text{l}$  de DMSO et une agitation de 15 minutes.

Le FDA (molécule apolaire et non fluorescente) est hydrolysé à l'intérieur des cellules par une activité estérase non spécifique. Le produit de cette dégradation est la fluorescéine fluorescente et polaire qui ne peut facilement traverser la membrane cellulaire si celle-ci est en bon état (Klut *et al.*, 1988 ; Klut *et al.*, 1989) (Fig. 3 a). Le protocole de marquage consiste en l'incubation pendant 1 heure de 370  $\mu\text{l}$  de culture cellulaire et de 10  $\mu\text{l}$  de solution FDA. Ensuite vidange du milieu puis resuspension des cellules par 400  $\mu\text{l}$  d'eau de mer filtrée (cf. cultures de microalgues). Lors des mesures de toxicité, le protocole varie : incubation de 360  $\mu\text{l}$  de culture cellulaire et de 10  $\mu\text{l}$  de la solution de molécule à tester. Au bout de 5 heures, ajout de 10  $\mu\text{l}$  de solution FDA. Une heure plus tard vidange puis resuspension par 400  $\mu\text{l}$  d'eau de mer filtrée. Un troisième protocole est appliqué pour tester les échantillons d'eau de mer prélevés lors de la campagne SUBIO. Les cellules en culture sont concentrées par vidange de 400  $\mu\text{l}$  de culture puis resuspendues dans 370  $\mu\text{l}$  d'eau échantillon concentrée. La suite du protocole est identique à celui des tests de toxicité.

Les protocoles sont réalisés dans des plaques en propylène transparent 96 puits de 400  $\mu\text{l}$  environ (microplaques) (Fig. 3 b) avec puits complet pour les techniques ne nécessitant pas de vidange ou avec puits sans fond et membrane de nylon (Loprodyne SM 120 L5 Silent Monitor, Pall) dans les cas de vidange. Les vidanges sont réalisées à l'aide d'un collecteur sous vide pour plaques (SMV MO1, Pall) et d'une pompe à vide (MZ2, Bioblock Scientific). Elles permettent de minimiser les différents bruits de fond et de standardiser les différents puits avant les mesures.

#### DETECTION DES MARQUAGES-PRINCIPES DES MESURES

Pour les protocoles au Rouge Neutre et au MTT est utilisé un spectrophotomètre lecteur de microplaques (Multiskan MCC 340, Titertek) avec lecture des absorptions respectivement à 540 nm et 492 nm après étude des spectres d'absorption (Fig. 4). Pour la technique au FDA, le matériel de lecture est un lecteur de microplaques en fluorescence (Fluoroskan II, Labsystems) utilisant les filtres 485 nm en excitation et 538 nm en émission. Le choix des longueurs d'onde a été réalisé après étude des spectres de fluorescence à l'aide d'un spectrofluoromètre (Turner modèle 430) ; les maxima se situant à 472 nm en excitation et à 502 nm en émission. Le même appareil a servi également à vérifier la non interférence entre l'auto fluorescence des algues due à leur pigments propres et la fluorescence de la fluorescéine (Fig. 5).

Le spectrophotomètre à plaques assure une lecture des puits selon un trajet optique vertical de 10 mm quand les puits sont remplis à 380  $\mu\text{l}$ . La plaque entrère est lue en 5 secondes par une rangée de 8 capteurs. Le lecteur en fluorescence effectue également ses opérations (illumination à la longueur d'onde d'excitation et réception de la longueur d'onde d'émission) à la verticale de chaque puits. Chaque puits est lu pendant 0.1 seconde. La lecture totale de la plaque dure une cinquantaine de secondes du fait des déplacements (lecture colonne par colonne) sous la fenêtre de lecture.

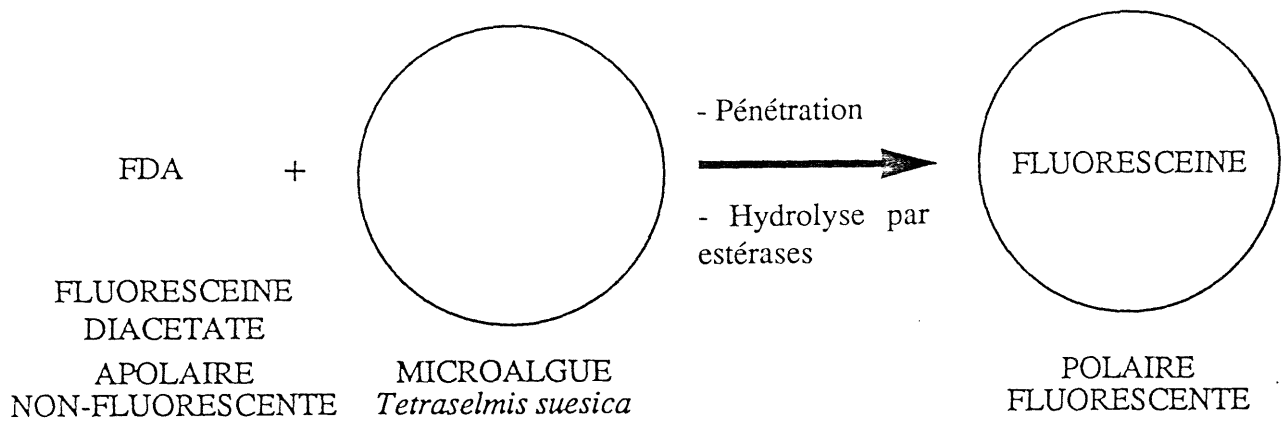


Fig.3a. Principe de marquage cellulaire du protocole FDA.

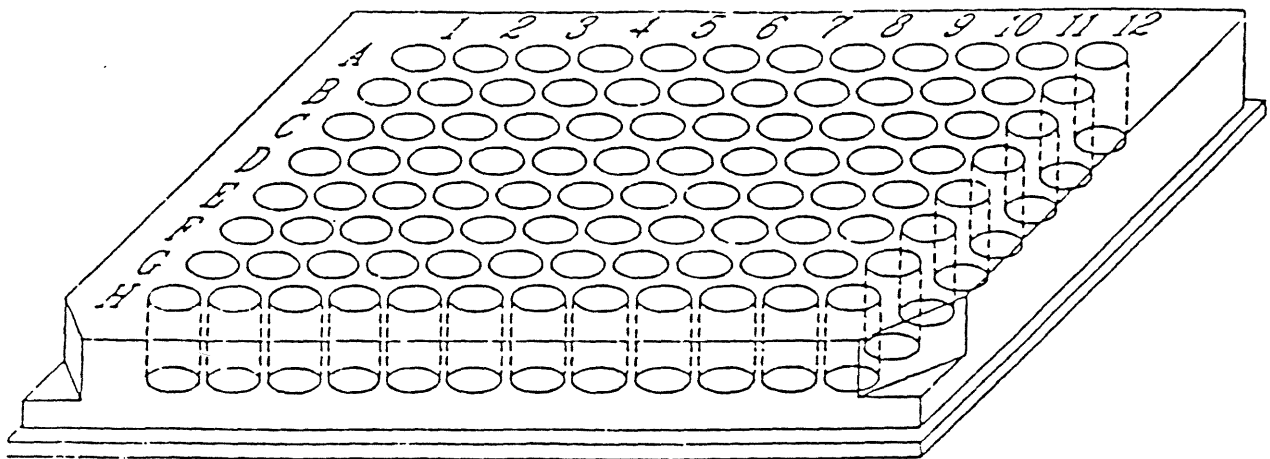


Fig.3b. Microplaque 96 puits utilisée lors des dosages spectrophotométriques et fluorimétriques. Dimensions réelles : 130 x 80 x 13 mm.

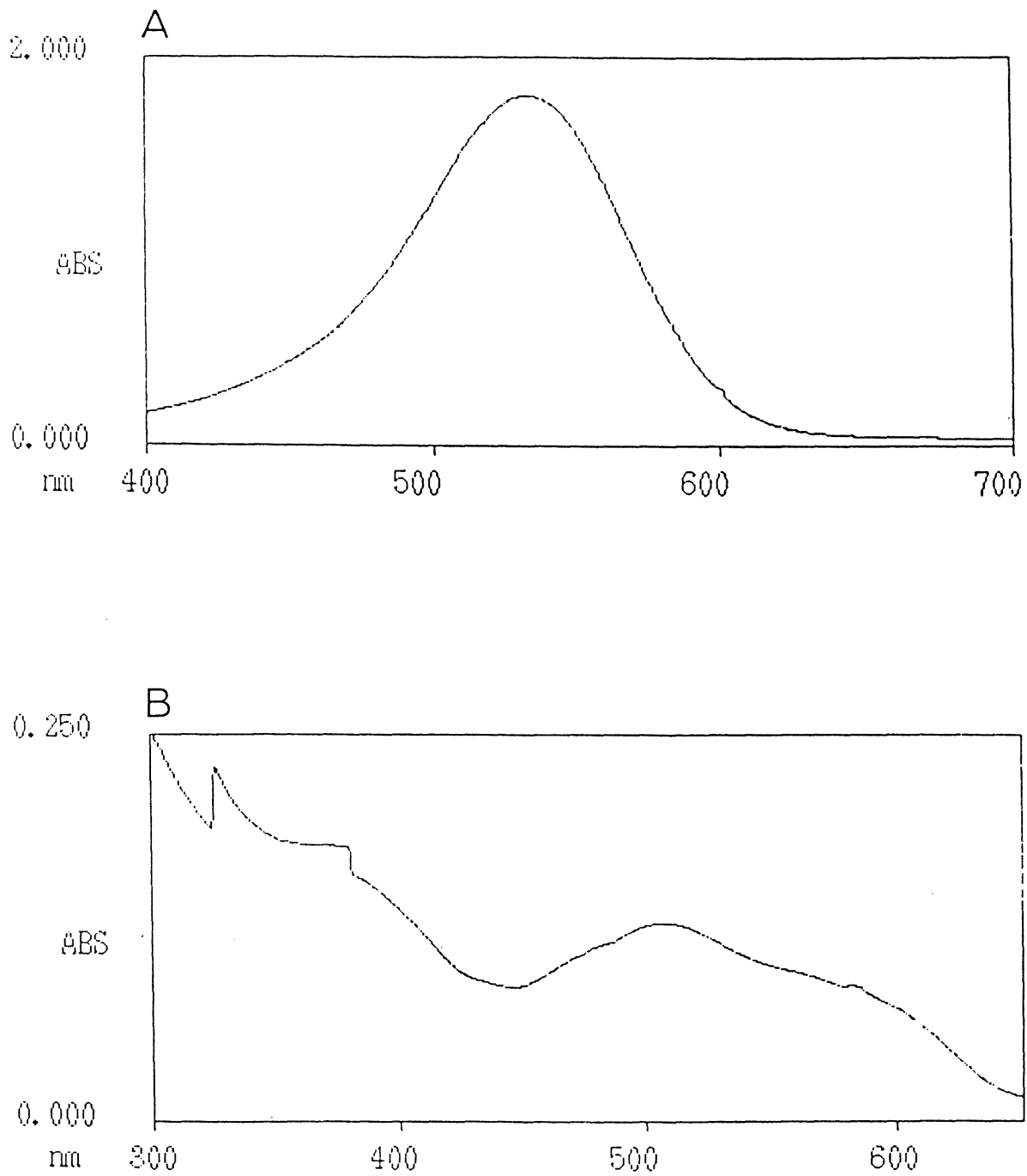


Fig.4. Spectres d'absorption de marqueurs cellulaires.

A : Rouge neutre.  $\lambda_{\text{absorption max.}} = 534.5 \text{ nm}$ .  $\lambda_{\text{abs. utilisée lors des mesures}} = 540 \text{ nm}$ .

B : MTT.  $\lambda_{\text{absorption max.}} = 507.5 \text{ nm}$ .  $\lambda_{\text{abs. utilisée lors des mesures}} = 492 \text{ nm}$ .

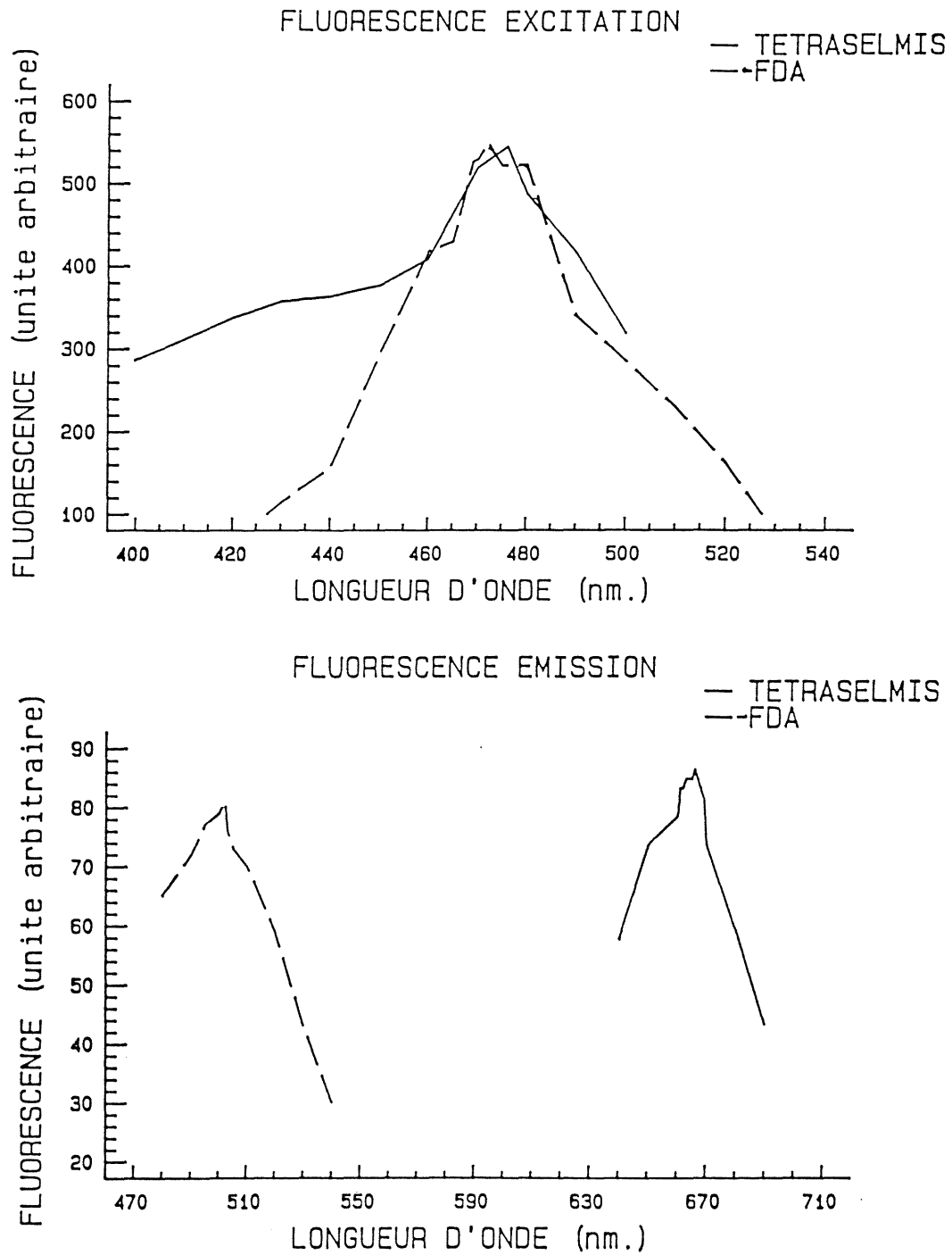


Fig.5. Spectres de fluorescence de *Tetrasmis suecica* et du protocole FDA (fluorescéine produit de la dégradation du FDA).

## CAMPAGNE EN MER : PRELEVEMENTS D'EAU DE MER DE SURFACE ET CONCENTRATION DES ECHANTILLONS

Des prélèvements d'eau de mer de surface (flacons de 250 ml en verre) ont été effectués lors de la campagne en mer SUBIO (28 mai - 2 juin 1990) à bord du N/O GWEN DREZ. Cette campagne avait pour but de réaliser des prélèvements le long d'un gradient de dilution d'effluents de la Seine et de les tester sur l'activité enzymatique des algues. Afin d'augmenter les effets, une technique de concentration des échantillons a été mise en oeuvre : dans les flacons de 250 ml contenant 200 ml d'eau de mer échantillon sont ajoutés 50 ml de solvant d'extraction (dichlorométhane/acétate d'éthyle : 9/1). Agitation par barreau aimanté et agitateur magnétique pendant 5 minutes. On transfère dans une ampoule à décanter et l'on recueille la phase organique (plus dense que l'eau). On ajoute 20 ml de solvant d'extraction à la phase aqueuse et l'on agite 5 minutes. Nouvelle récupération de la phase organique et nouvel ajout de 20 ml de solvant d'extraction à la phase aqueuse. Après 5 minutes d'agitation la phase organique est introduite dans un ballon contenant les deux phases organiques précédemment recueillies. Le solvant est évaporé sur évaporateur rotatif. Une extraction à l'acétone est effectuée (10 ml puis 2 fois 5 ml). L'acétone est récupéré et évaporé. Enfin, on reprend par 3,5 ml d'eau de mer filtrée.

## TRAITEMENT INFORMATIQUE DES DONNEES

Dans un souci de rapidité d'obtention des résultats, un logiciel informatique a été développé au Centre de calcul d'IFREMER Nantes. Il permet le pilotage du lecteur en fluorescence (choix des filtres et lancement de la lecture), la saisie et la sauvegarde des données ainsi que le calcul des  $CL_{50}$ . Le programme, dans lequel ont été rentrées les concentrations en contaminants, reçoit les mesures du lecteur et à partir d'un modèle de relation sigmoïde dose-effet  $Y = Y_0 / (1 + (C/b)^a)$  effectue la transformation linéaire suivante :  $\text{Ln} (Y_0 - Y/Y) = f(\text{Ln } C)$  ;  $Y_0$  fluorescence moyenne du témoin sans contaminant,  $Y$  fluorescence moyenne pour chaque concentration en contaminant et  $C$  concentration en contaminant. Il opère une régression linéaire sur les valeurs obtenues et indique après avoir rejeté les points non significatifs (test de comparaison de moyenne) le coefficient de corrélation et le degré de liberté de la droite obtenue. Au niveau de cette droite est déterminée la valeur de  $CL_{50}$  du contaminant étudié ( $Y = 1/2 Y_0 \rightarrow \text{Ln} (Y_0 - Y/Y) = 0$ ). La suite du programme consiste à retransformer les données en  $(Y/Y_0) = f(C)$  et à tracer la courbe correspondante sur laquelle apparaît la  $CL_{50}$ .

## RESULTATS

### ASPECT BIOCHIMIQUE

Les résultats des différentes courbes d'étalonnage réalisées avec *T. suesica* indiquent clairement l'importante sensibilité de la méthode au FDA par rapport aux deux méthodes colorimétriques Rouge Neutre et MTT (Fig. 6). Le gain de sensibilité avec le spectrofluorimètre Turner réglé sur les maxima d'excitation et d'émission est d'un facteur 18 000 ; celui du lecteur de plaques en fluorescence est d'un facteur de 3 000. Ces valeurs sont obtenues par comparaison des pentes des droites de régression des différents étalonnages. L'étude de plusieurs microalgues (*T. suesica*, *S. costatum* et *P. lima*) montre des sensibilités différentes vis à vis du protocole FDA selon les microalgues (Fig. 7). Le Dinoflagellé *P. lima* est dix fois plus sensible que les deux autres microalgues testées. A noter que dorénavant tous les résultats seront obtenus (sauf indication contraire) à l'aide du lecteur de plaques en fluorescence et de *T. suesica*.

L'utilisation du substrat FDA par l'activité estérase varie dans le temps avec la concentration en FDA (Fig. 8 a). L'affinité de l'enzyme pour ce substrat est quantifiée par la représentation de Lineweaver-Burk ( $1/V = f(1/S)$ ) (Fig. 8 b) qui indique une constante de Michaelis  $K_m$  de  $5.71 \mu\text{M}$ . Par ailleurs, cette valeur qui montre une grande affinité est obtenue avec des cellules *in vivo* et non l'enzyme purifiée et l'on peut penser que l'on obtiendrait un  $K_m$  inférieur (affinité plus forte) avec l'enzyme pure, le passage à travers la membrane de la cellule (barrière physique) ralentissant le contact enzyme-substrat. Ces résultats nous montrent aussi que les travaux sont réalisés en excès de substrat (une heure d'incubation de FDA  $24 \mu\text{M}$ . finaux) et en phase exponentielle d'utilisation. Une grande précision quant au moment de mesure de la fluorescence est donc nécessaire.

La très bonne relation entre le métabolisme des cellules et la fluorescence obtenue par le protocole FDA est démontrée par les coefficients de corrélation des différentes expériences.

### ASPECT CELLULAIRE

Le suivi de la croissance de *T. suesica* (culture débutée avec 15 000 cellules/ml) par comptage de cellules (Fig. 9) et les mesures de fluorescence durant cette croissance montrent que l'activité estérase spécifique (fluorescence rapportée à la quantité de cellules) varie au cours de la croissance (Fig. 10). Elle diminue fortement en phase exponentielle après un maximum atteint avant le démarrage de cette phase (8<sup>ème</sup> jour). Elle est également supérieure en phase plateau (0 jour) qu'en phase exponentielle. Cela semble indiquer une orientation préférentielle des cellules vers d'autres activités métaboliques que l'activité estérase lors de cette phase de division rapide. Pour augmenter la sensibilité des mesures il convient d'utiliser une culture juste avant son démarrage en phase exponentielle. L'étude rapprochée de la croissance en phase exponentielle fait apparaître un rythme circadien de l'activité estérase avec baisse de l'activité durant les périodes obscures (Fig. 11). Ce résultat est en concordance avec le fait que la fluorescence due aux cellules traitées au FDA est corrélée avec l'uptake du dioxyde de carbone par ces mêmes cellules (Dorsey *et al.*, 1988) (Fig. 12). On étudie ensuite la fluorescence en présence d'un inhibiteur de croissance bactérienne, le sulfate de kanamycine. Les résultats de l'action du sulfate de kanamycine sur la culture algale montrent tout d'abord que celui-ci réagit avec le FDA avec pour résultat le développement d'une fluorescence analogue à celle de la fluorescéine (Fig. 13). D'où la nécessité de soustraire aux fluorescences brutes avec microalgues (F) les fluorescences témoins de l'antibiotique (T). L'étude peut alors se porter sur les fluorescences nettes (Fig. 14).

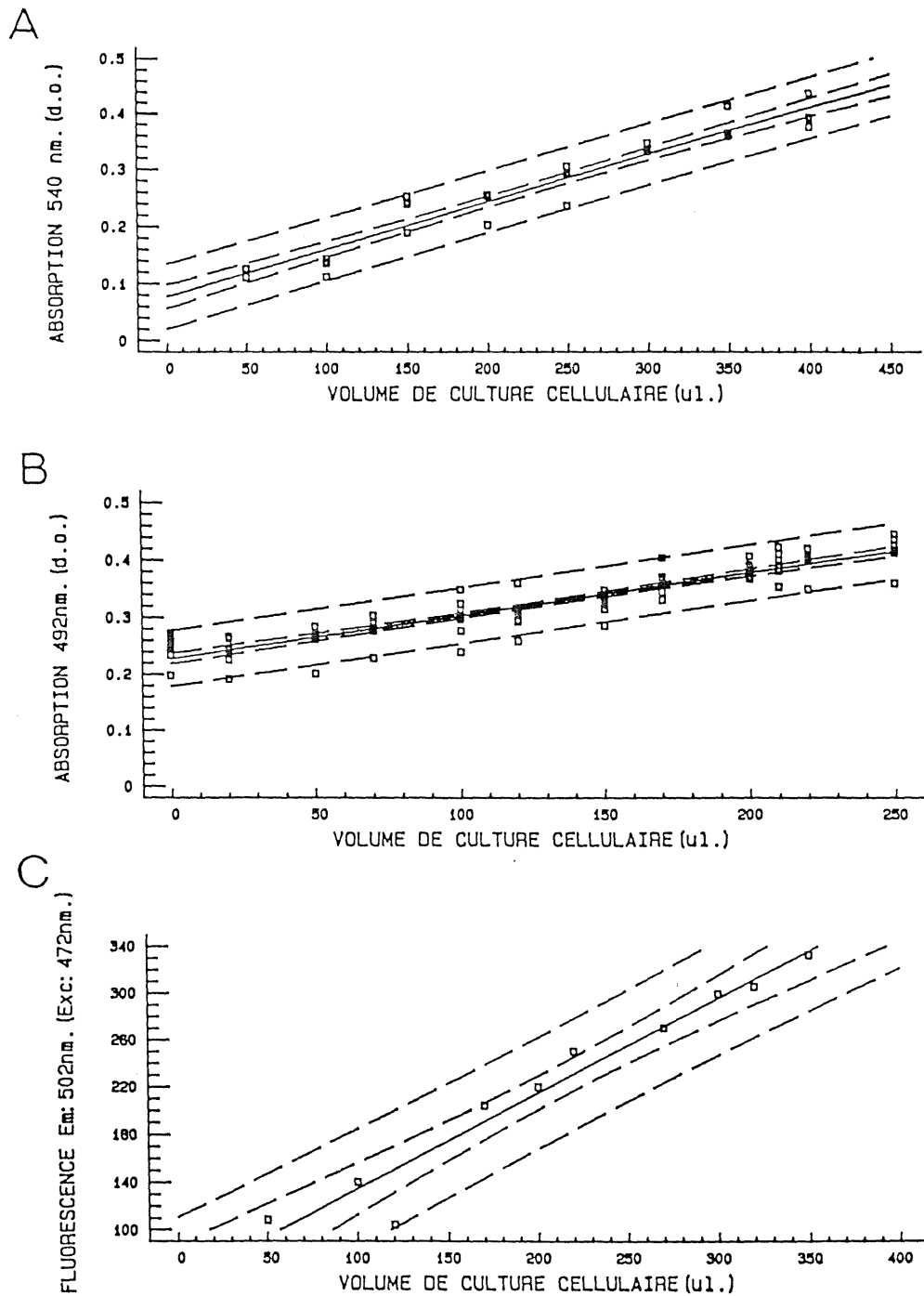


Fig.6. Sensibilité de *Tetraselmis suecica* vis-à-vis de différents marquages cellulaires.  
 A : Protocole Rouge neutre (concentration de la culture cellulaire : 1026000 cellules/ml.).  
 Droite de régression  $Y = 15 \cdot 10^{-7}(X) + 0.077$ . Corrélation  $R = 0.991$ .  
 B : Protocole MTT (665400 cellules/ml.).  
 Droite de régression  $Y = 12 \cdot 10^{-7}(X) + 0.022$ . Corrélation  $R = 0.993$ .  
 C : Protocole FDA - Spectrofluorimètre TURNER (218300 cellules/ml.).  
 Droite de régression  $Y = 0.027(X) + 71.928$ . Corrélation  $R = 0.996$ .



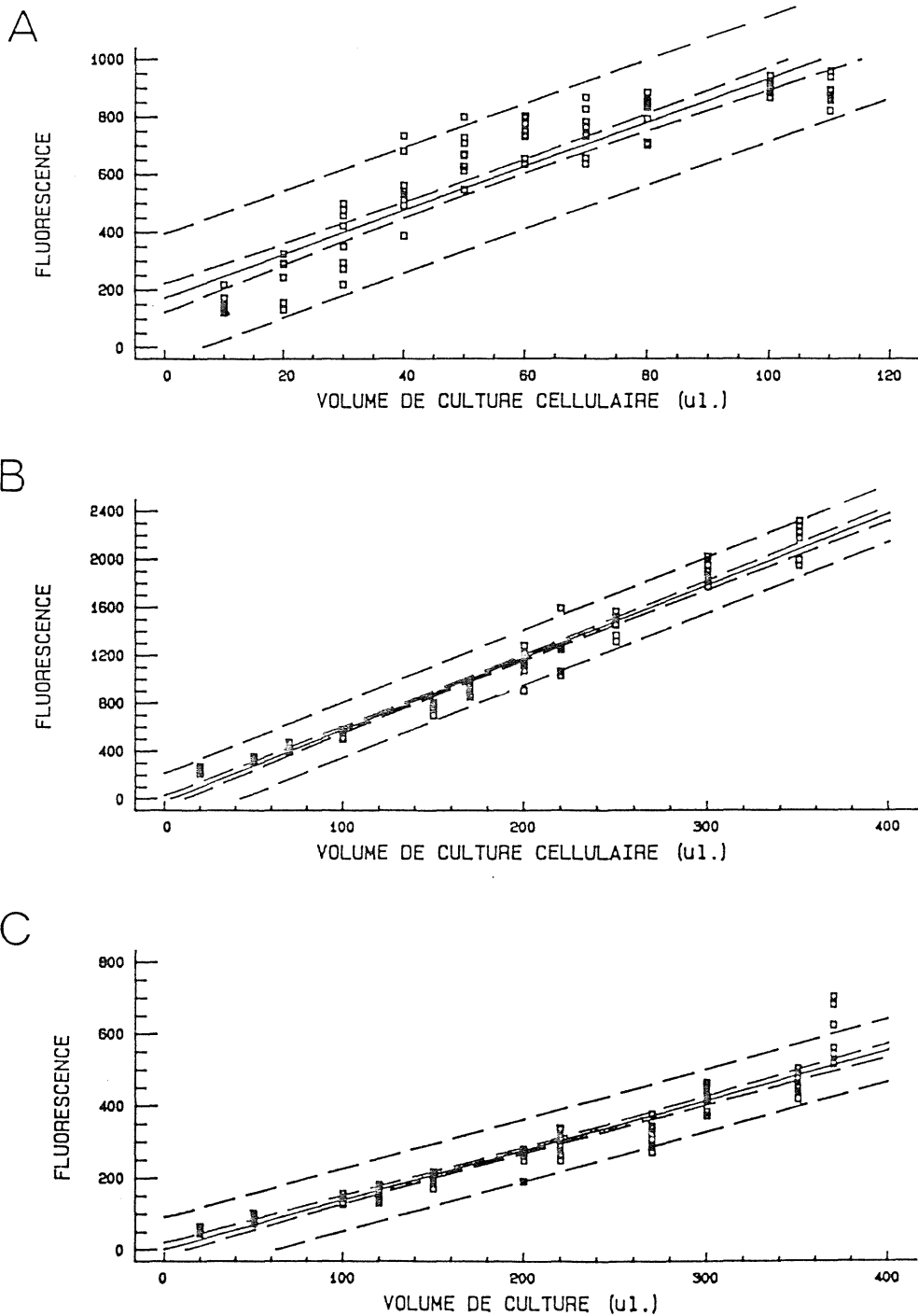


Fig.7. Sensibilité de trois microalgues au protocole de marquage FDA. Lecture effectuée au lecteur de plaques en fluorescence ( $\lambda_{\text{exc}}$  : 485 nm.  $\lambda_{\text{em}}$  : 538 nm.).

A : *Tetraselmis suecica* (concentration de la culture cellulaire : 1409470 cellules/ml.).  
Droite de régression  $Y = 0.005 (X) + 171.602$ . Corrélation  $R = 0.946$ .

B : *Skeletonema costatum* (1412500 cellules/ml.).

Droite de régression  $Y = 0.004 (X) - 22.163$ . Corrélation  $R = 0.991$ .

C : *Prorocentrum lima* (22400 cellules/ml.).

Droite de régression  $Y = 0.061 (X) + 1.138$ . Corrélation  $R = 0.982$ .

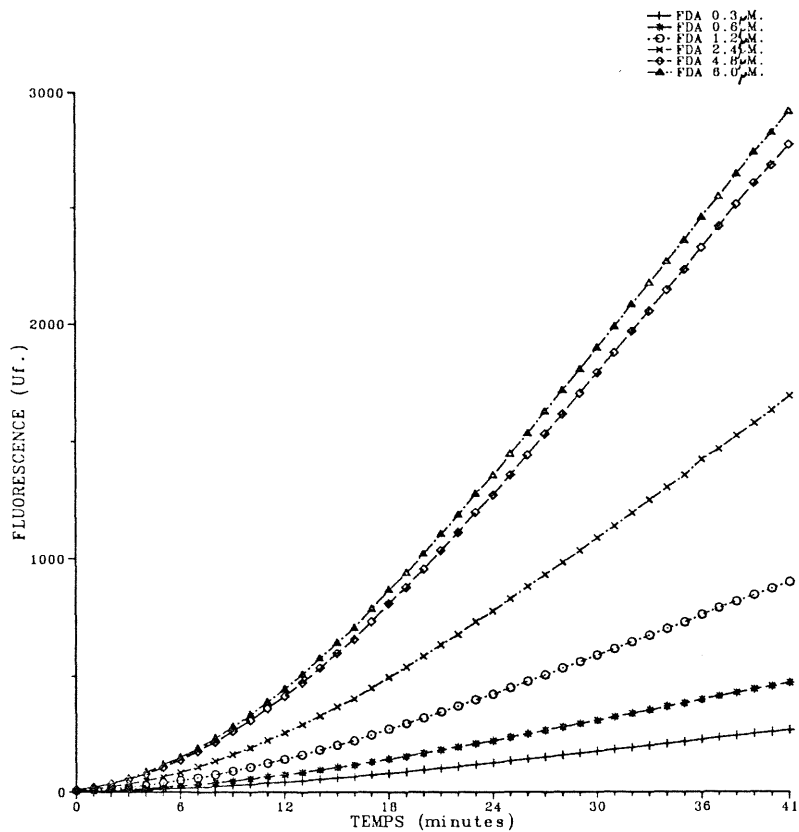


Fig.8a. Cinétique de fluorescence en fonction de différentes concentrations en marqueur FDA.

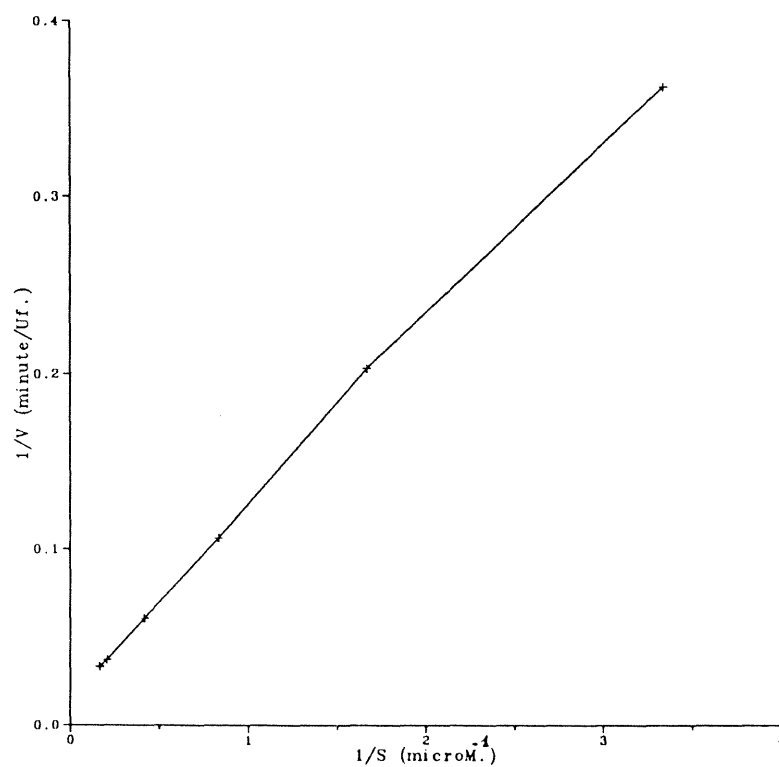


Fig.8b. Représentation de Lineweaver-Burk. Détermination de la constante de Michaélis ( $K_m$ ) pour l'activité estérase *in vivo* vis-à-vis du FDA. Droite d'équation  $1/V = 0.1044 (1/S) + 0.0183$ . Coefficient de corrélation  $R = 0.999$ .  $K_m = 5.71 \mu\text{M}$ .  $V_{\text{max}} = 54.64 \text{ Uf./minute}$ .

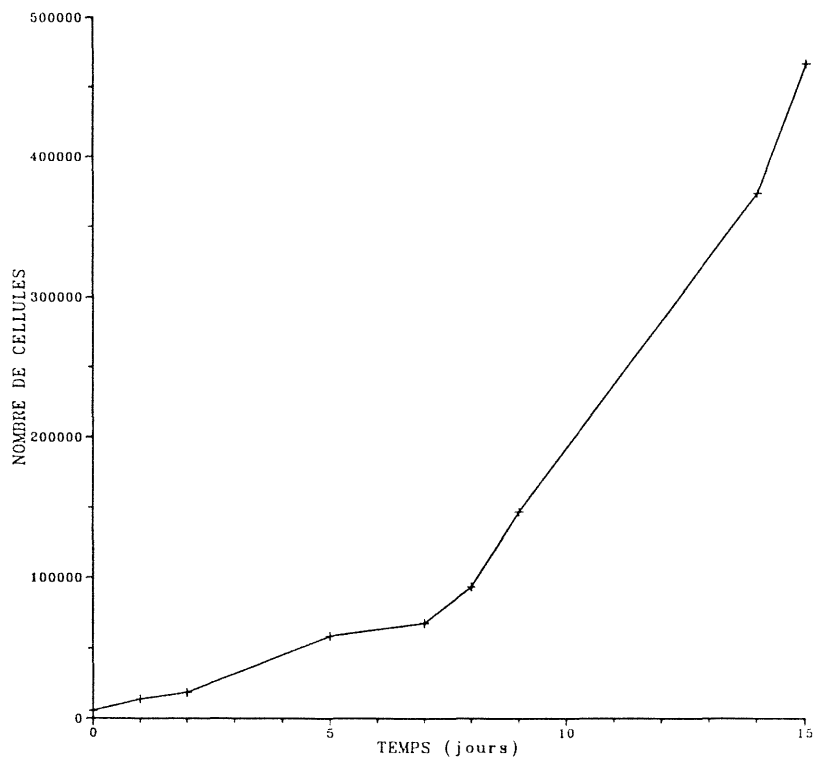


Fig.9. Croissance cellulaire. Culture débutée avec une concentration de 15000 cellules par millilitre.

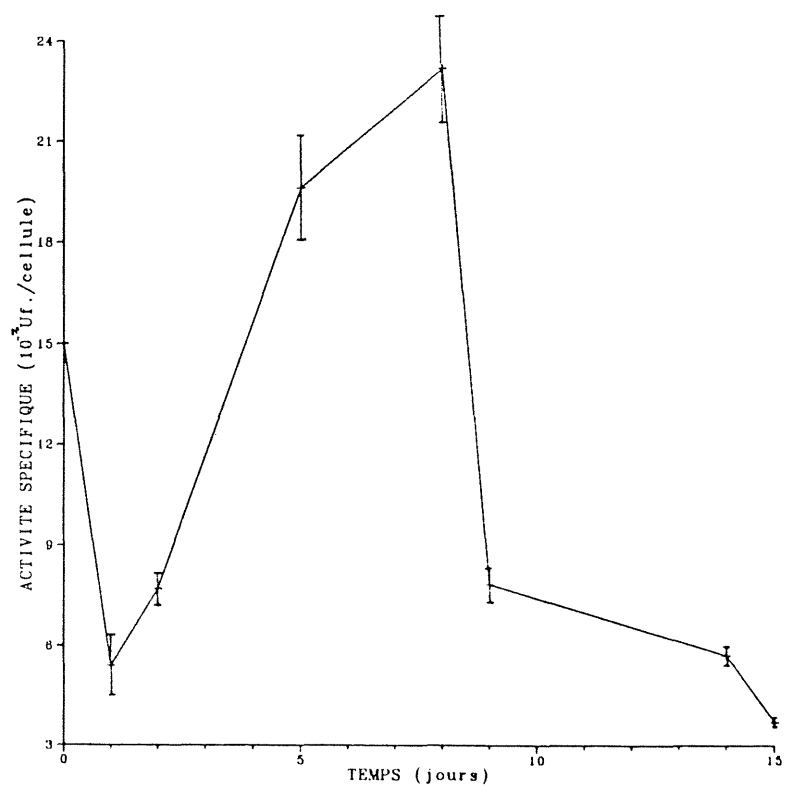


Fig.10. Activité estérase au cours de la croissance cellulaire.

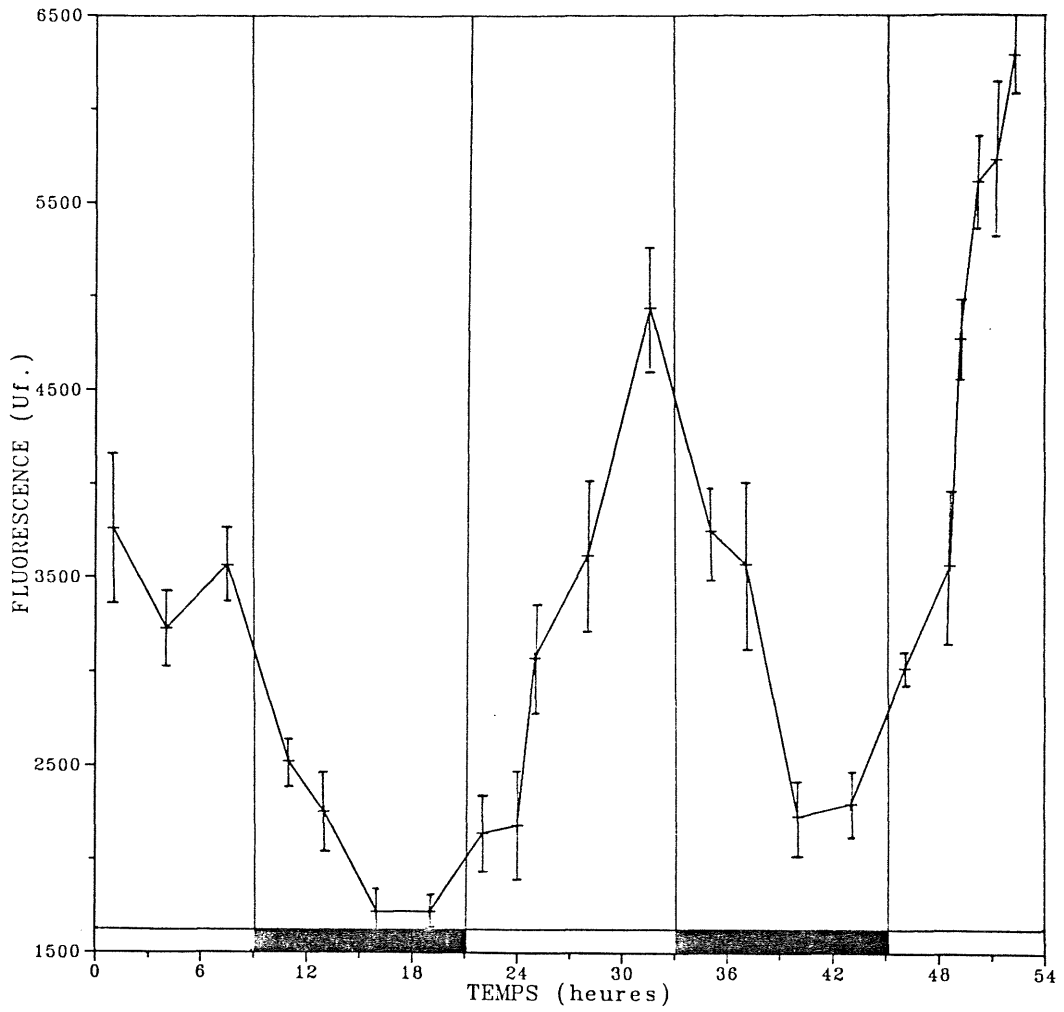


Fig.11. Croissance cellulaire en phase exponentielle. Rythme circadien de la fluorescence dûe au protocole de marquage FDA.

□ : Eclairage

■ : Obscurité

DORSEY ET AL.

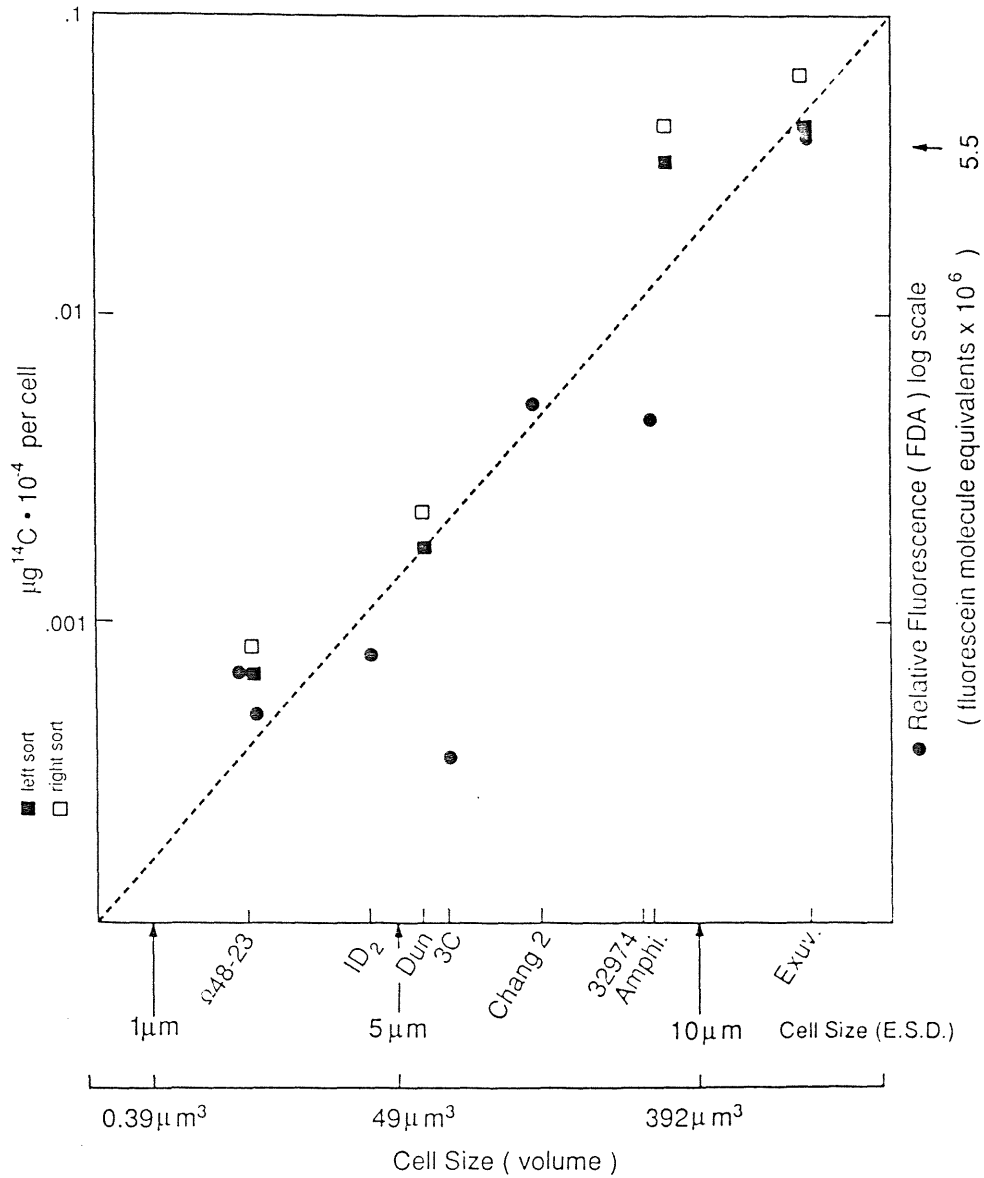


FIG. 4. Allometric relationships of (FDA) relative fluorescence and  $^{14}\text{CO}_2$  uptake for eight microalgal species. Filled circles represent relative fluorescein fluorescence (from FDA) as a function of cell size (E.S.D., equivalent spherical diameter). The eight clones are ordered from smallest to largest cell diameter:  $\Omega 48-23$ ,  $\Omega 48-23$ , unidentified prasinophyte;  $ID_2$ , *Cryptomonas* sp.; Dun, *Dunaliella tertiolecta*; 3C, *Cryptomonas* sp.; Chang 2, *Chroomonas* sp.; 32974, *Cryptomonas* sp.; Amphi, *Amphidinium carterii*; Exuv, *Prorocentrum minimum*.

Each data point represents the mean of 5,000 or more measurements.  $^{14}\text{CO}_2$  measurements were made for four clones:  $\Omega 48-23$ ,  $\Omega 48-23$  unidentified; Dun, *Dunaliella tertiolecta*; 32974, *Cryptomonas* sp.; Amphi, *Amphidinium carterii*. Each data point for  $^{14}\text{C}$  represents the mean of triplicates and has been normalized to the numbers of cells analyzed for comparative purposes. Closed squares are  $^{14}\text{C}$  from left sort (low-fluorescein fluorescent cells) and open squares are  $^{14}\text{C}$  from right sort (high-fluorescein fluorescent cells).

Fig.12. Relation entre l'uptake de  $\text{CO}_2$  et la fluorescence due au protocole FDA (d'après Dorsey *et al.*,1989).

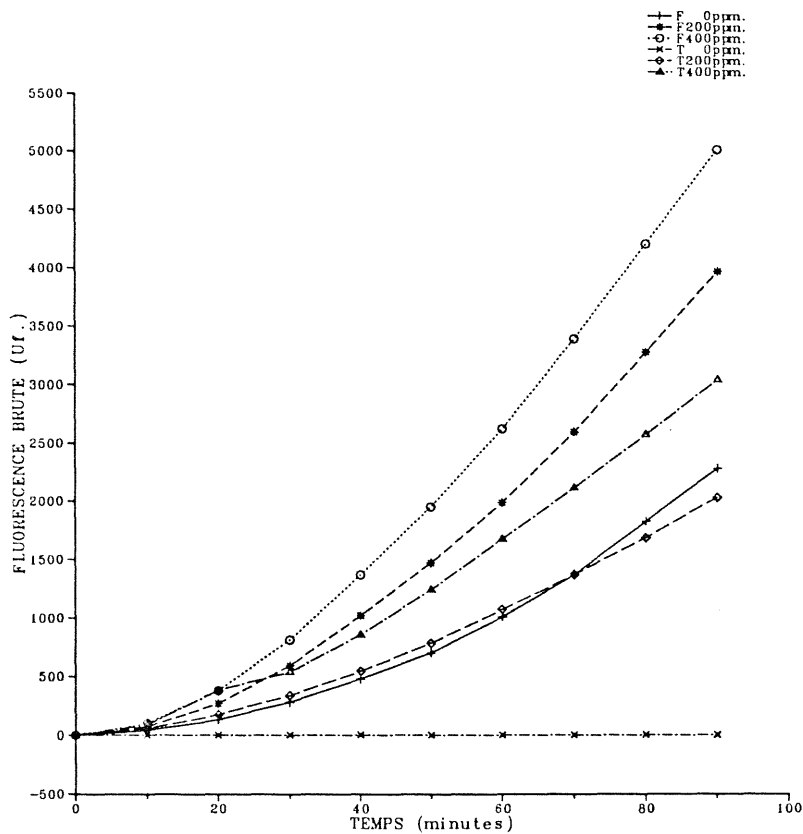


Fig.13. Effet brut de différentes concentrations de sulfate de kanamycine sur une culture de microalgues (F) et sur le marqueur FDA (T).

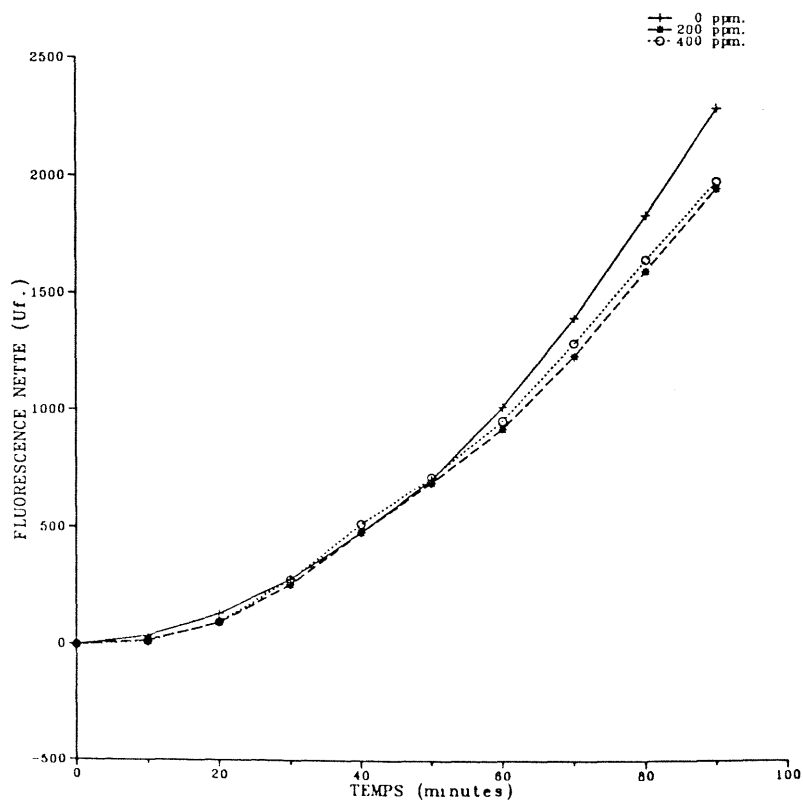


Fig.14. Effet net de différentes concentrations de sulfate de kanamycine sur une culture de microalgues (F-T).

Les concentrations en antibiotique utilisées (200 et 400 ppm.) ont été choisies afin d'inhiber les bactéries (Berland et Maestrini, 1969 a) mais pas les algues. Manquant de références spécifiques à *T. suecica* nous nous sommes référés à des résultats concernant d'autres microalgues (Diatomées) pour le choix des concentrations de l'antibiotique (Berland et Maestrini, 1969 b). D'après les résultats de la fluorescence nette qui ne présentent pas de différence entre les valeurs avec ou sans antibiotique, on peut dire que la fluorescence provient uniquement des algues.

Cependant, au bout de cinquante minutes, la courbe sans antibiotique progresse avec une pente supérieure à celles des deux autres courbes (200 et 400 ppm.). Il se peut donc qu'à partir de ce moment les algues soient également inhibées par le sulfate de kanamycine. Un contrôle de l'action antibiotique sur les bactéries a été réalisé en inoculant dans des tubes stériles contenant 3 ml de milieu de Zobell stérilisé, 0,5 ml de chaque culture cellulaire (0,200 et 400 ppm. en sulfate de kanamycine). Quinze heures plus tard s'est développé un trouble dans le tube sans antibiotique, les deux autres tubes ne s'étant troublés que trente six heures plus tard. Cela signifie l'action efficace de l'antibiotique aux doses utilisées sur les bactéries durant la durée du test.

#### ASPECT ECOTOXICOLOGIQUE

Un travail d'amélioration de sensibilité du test a été réalisé par l'étude de certains de ces paramètres.

L'augmentation du temps de mesure (délai entre la lecture des fluorescences et la vidange de la plaque) entraîne une baisse des valeurs de  $CL_{50}$  (Fig. 15). Au delà d'une heure il n'est plus possible de continuer les mesures dans de bonnes conditions à cause d'un problème de fuite au niveau de la membrane de la plaque. On peut donc obtenir des valeurs plus faibles de  $CL_{50}$  en prolongeant le temps de mesure.

L'augmentation de la durée d'incubation du contaminant quant à elle pose le problème de l'utilisation des solvants. En effet cette expérience menée avec le lindane (en solution dans l'acétone) a pour résultat des valeurs de  $CL_{50}$  plus élevées (Fig. 16). Parallèlement on mesure une baisse de la valeur moyenne du témoin vrai (témoin acétone) sans variation de celle du témoin eau de mer filtrée (Fig. 17). Ceci est explicable par le fait que l'augmentation du temps d'incubation laisse apparaître l'effet toxique du solvant sur les cellules. Effet très inférieur à celui des contaminants qui ne joue donc vraiment qu'au niveau du témoin et pour des temps d'incubation supérieurs à celui utilisé dans notre protocole (5 heures). Seul l'éthanol utilisé comme solvant induit une baisse de la fluorescence du témoin vrai pour 5 heures d'incubation (Tabl. II). Il convient donc, de tester au préalable l'effet du solvant sur les cellules pour les différents temps d'incubation que l'on souhaite utiliser. On ne peut en effet dans certains cas se passer de solvant, la solubilité dans l'eau des contaminants étant très faible. Ce manque de solubilité dans l'eau pose des problèmes pour certains contaminants et nuit au calcul de leur  $CL_{50}$  dans la configuration actuelle du test qui utilise des concentrations élevées en contaminants.

#### ASPECT MATHEMATIQUE

Comme indiqué précédemment, un logiciel informatique permet d'effectuer rapidement les calculs de  $CL_{50}$  ainsi que les représentations  $(Y/Y_0) = f(C)$  (Fig. 18). En outre, il autorise l'utilisateur à supprimer manuellement certaines valeurs aberrantes décelées soit au niveau de la

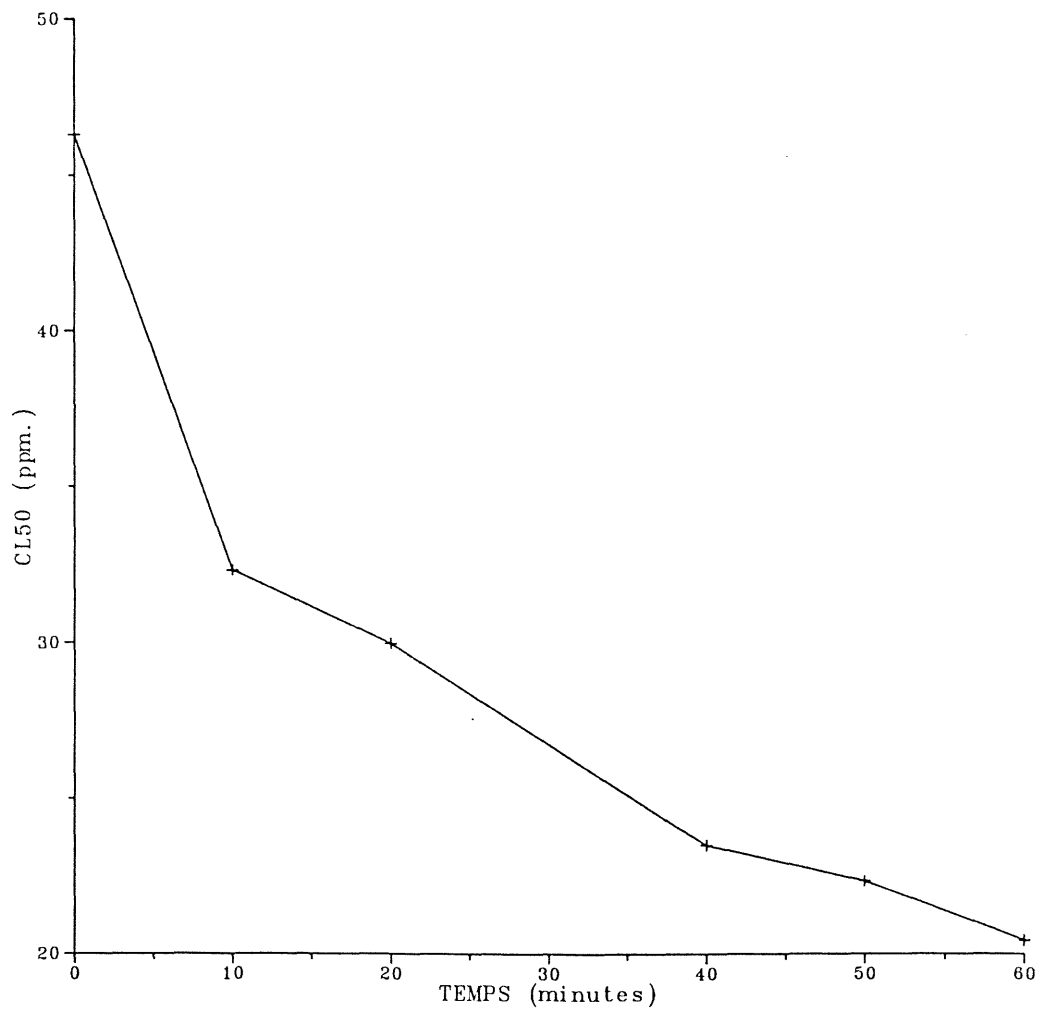


Fig.15. Evolution de la valeur de la CL50 de la Phosalone (solvant acétone) avec le temps de mesure.



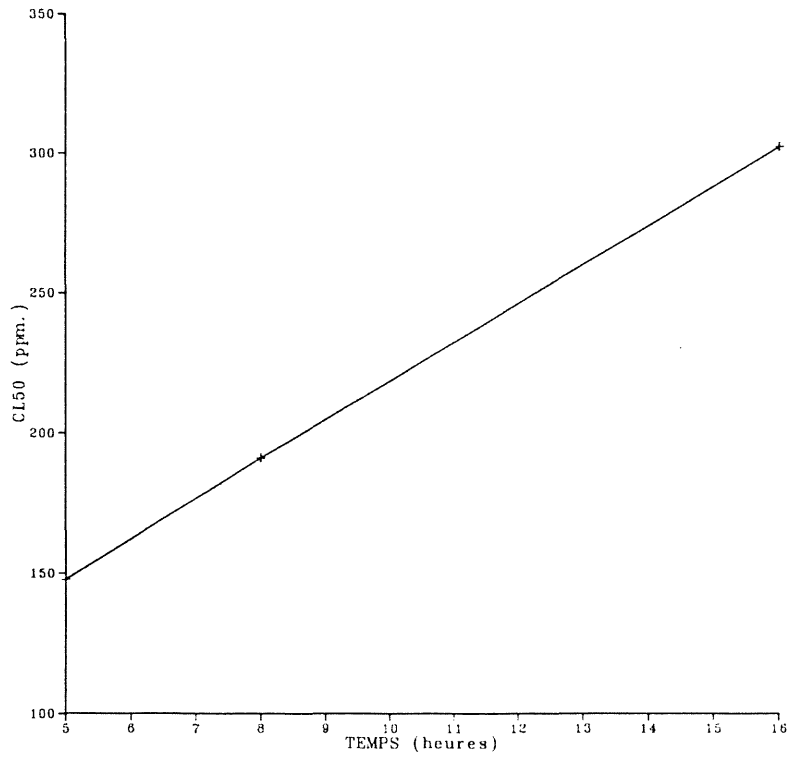


Fig.16. Evolution de la valeur de la CL50 du Lindane (solvant acétone) avec le temps d'incubation.

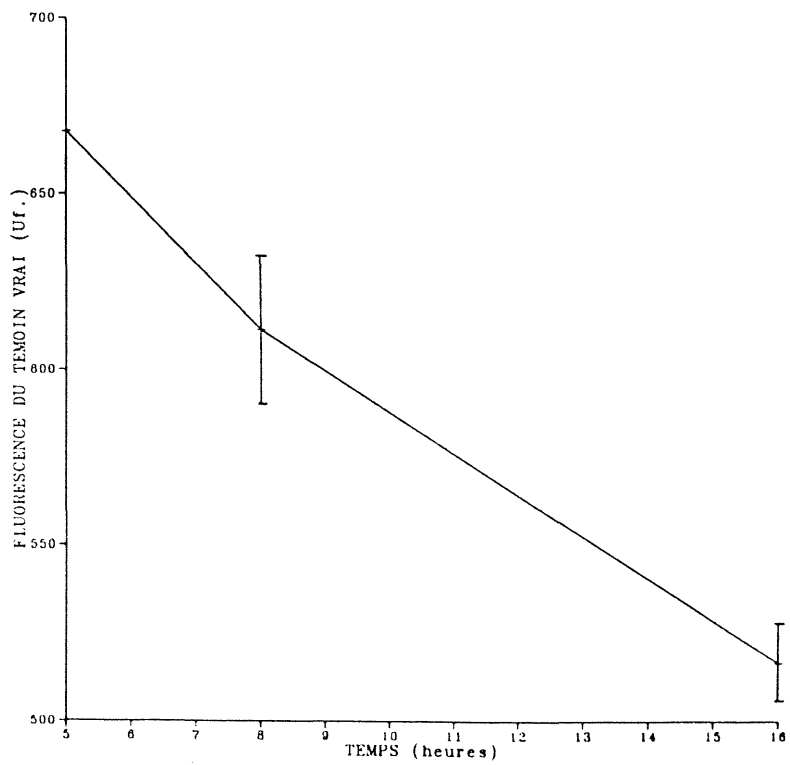


Fig.17. Evolution de la valeur de fluorescence du témoin vrai (acétone) avec le temps d'incubation.

Tableau II : Effet des différents solvants sur la fluorescence  
des témoins vrais - 5 heures d'incubation solvant

	Eau de mer filtrée	Eau distillée	Ethanol	Acétone
Fluorescence moyenne	341.2	357.8	251.2	345.6
Erreur standard	27.61	74.8	31.5	30.7

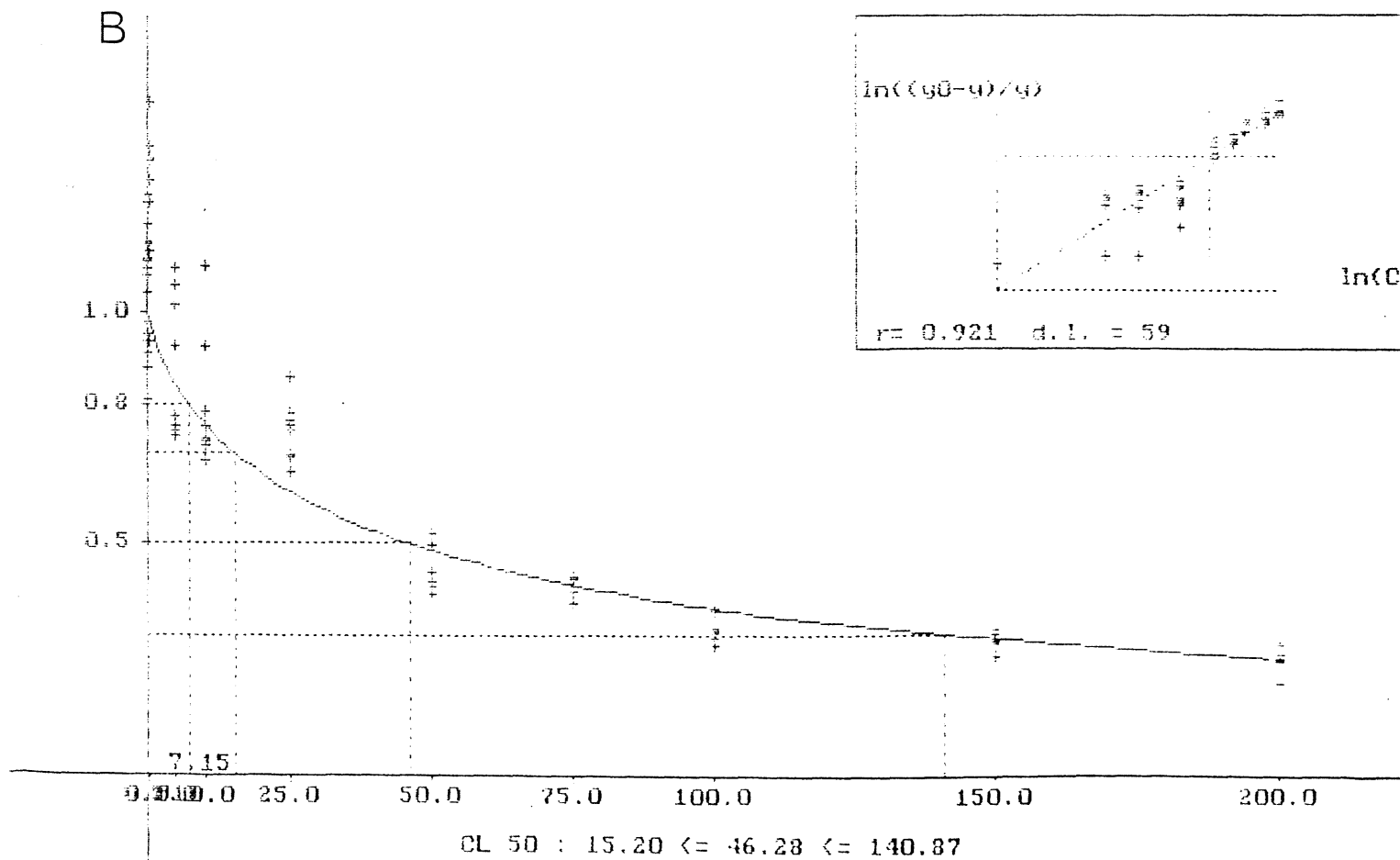
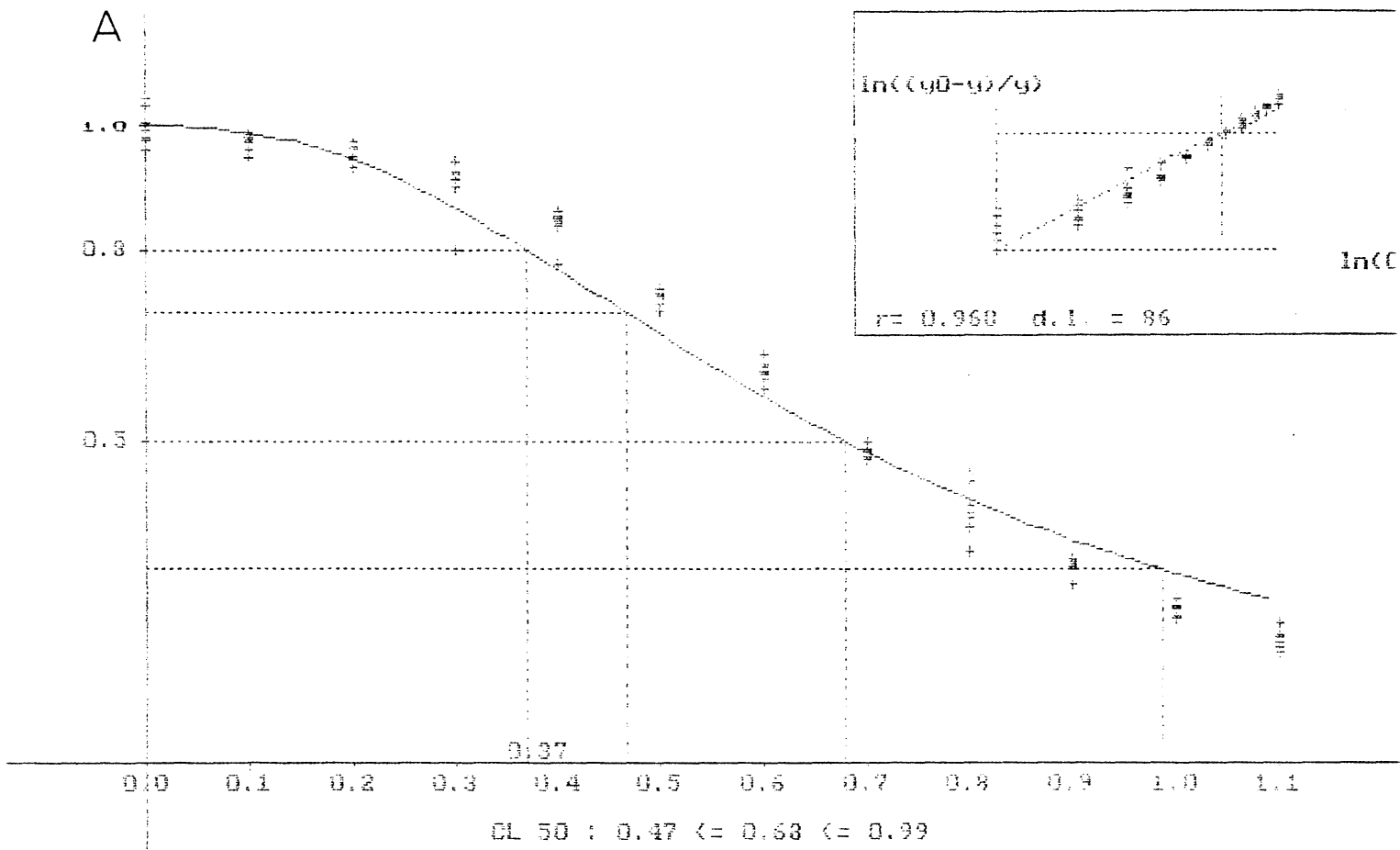


Fig.18. Représentation graphique :  $Y/Y_0 = f(C)$ .  
 A : Courbe théorique.  
 B : Phosalone.

représentation graphique soit au niveau du tableau de données et recalcule ensuite tous les paramètres du test (coefficient de corrélation, degré de liberté,  $CL_{50}$ ).

#### APPLICATION DU TEST

Le test est appliqué à une série de produits dont on obtient les représentations graphiques  $Y/Y_0 = f(C)$  (Fig. 19) et les valeurs de  $CL_{50}$  (Tabl. III). Pour certains produits apparaissent les problèmes de solubilité (atrazine, simazine) ou d'interaction avec le FDA (tributyl étain (bis) oxyde, aminotriazole). Ces problèmes ont pour effets l'impossibilité du calcul des  $CL_{50}$  par le logiciel ou bien un calcul erroné (Fig. 20). Pour chaque produit est également effectuée une mesure avant vidange. Les  $CL_{50}$  issues de ces mesures sont très différentes (Tabl. IV) de celles obtenues après vidange des plaques. Les interférences du milieu étant prises en compte dans ce cas.

Certains produits ont également été testés sans vidange sur *Skeletonema costatum*. Les résultats obtenus ne montrent pas de grandes variations entre les deux microalgues (Tabl. V).

#### ASPECT ENVIRONNEMENTAL

Lors de la campagne en mer SUBIO à bord du N/O GWEN DREZ, il a été procédé à des prélèvements d'eau de mer de surface. Ces échantillons ont été testés au laboratoire sur *T. suecica* à l'aide du protocole FDA (Matériels et Méthodes). Les résultats obtenus avec les eaux de mer de surface ne montrent pas de différence entre les différentes stations de baie de Seine, la station référence 11 et le témoin eau de mer filtrée (Fig. 21 A). Par contre, ceux obtenus avec les concentrats d'eau de mer permettent d'avoir une idée de la qualité des eaux prélevées (Fig. 21 B). Les eaux prélevées en baie de Seine (zone polluée par les apports du fleuve) obtiennent des valeurs de fluorescence significativement inférieures à la station de référence. Le témoin eau de mer filtrée possède la valeur la plus élevée. Les résultats sont difficiles à exploiter quantitativement du fait d'un manque de renseignements quant aux compositions des échantillons.

Cependant, une application du test au niveau environnemental n'est pas à éliminer compte-tenu des moyens d'analyses possibles.

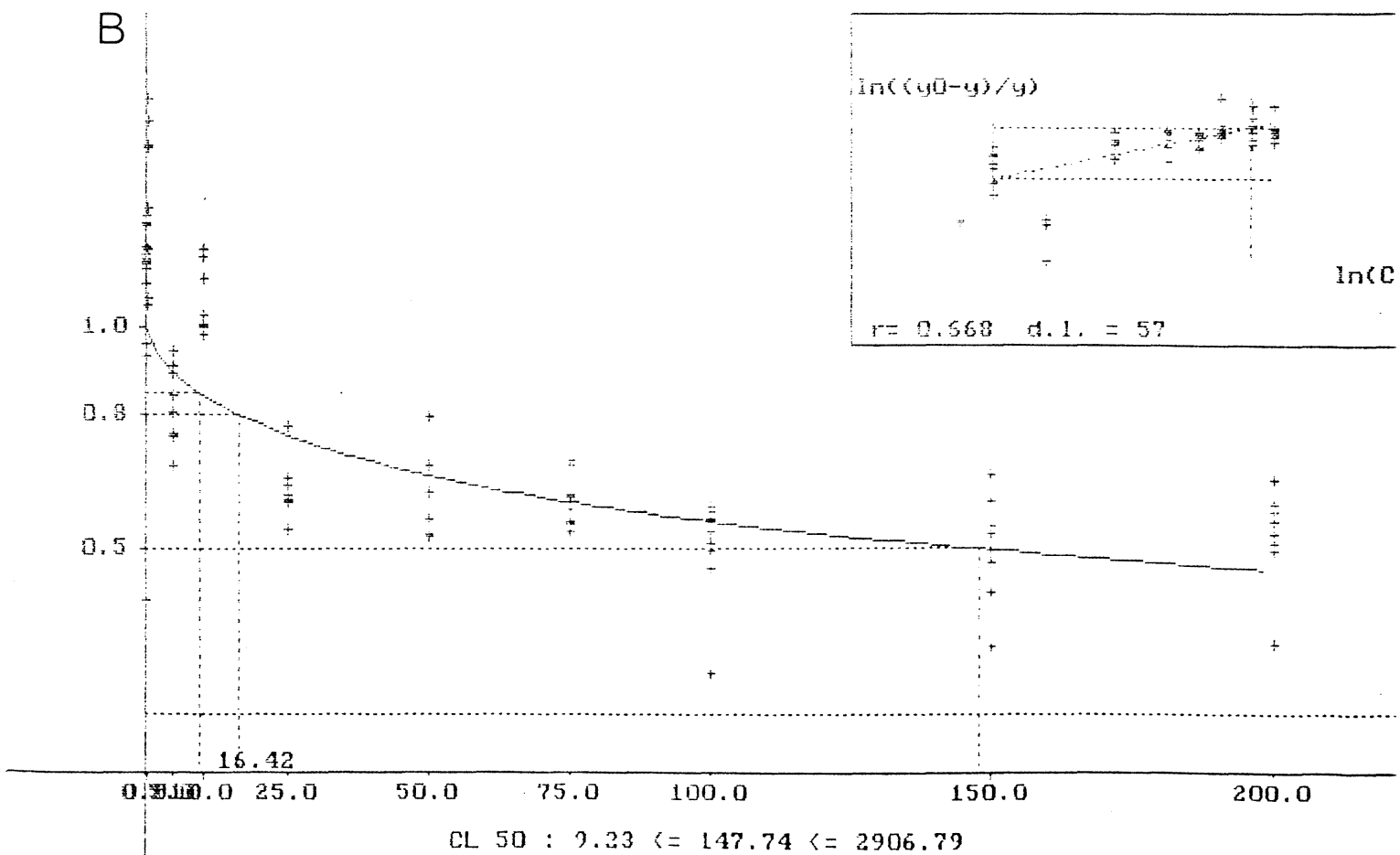
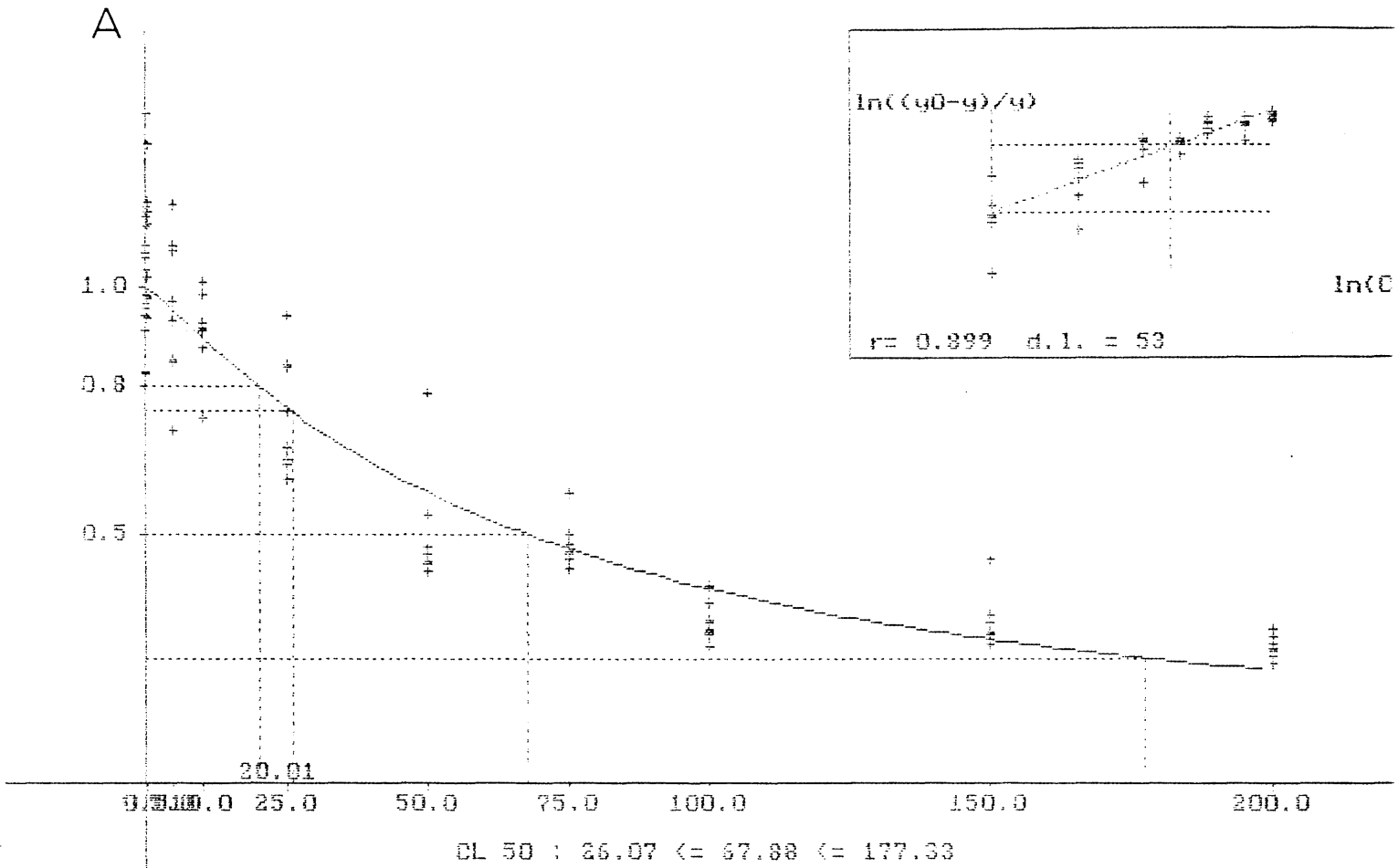


Fig.19. Représentation graphique :  $Y/Y_0 = f(C)$ .

A : Dichlorure de zinc.

B : Roténone.

Tableau III : Valeurs des CL50 obtenues par le protocole FDA à l'aide du lecteur de microplaques en fluorescence et de la microalgue *Tetraselmis suecica* après vidange de la microplaque

	Nombre de mesures utilisées N	Coefficient de corrélation R	CL50 (en ppm.)
Phosalone	61	0.921	46.28
Roténone	55	0.495	723.00
Lindane	59	0.668	147.74
Atrazine	----	----	----
Simazine	----	----	----
Atrazine + Simazine (1/1 )	----	----	----
Sevin L.85 (carbaryl )	47	0.562	336.23
Pentachlorophénol	63	0.546	335.65
Bichlorure de zinc	55	0.889	67.88
Sulfate 7-hydrate de zinc	40	0.791	107.72
Sulfate de cuivre II	44	0.732	117.64
Dichromate de potassium	10	0.890	261.55
Tributyl étain (bis) oxyde	65	- 0.610	0.15
Aminotriazole	----	----	----
Amétryne	----	----	----

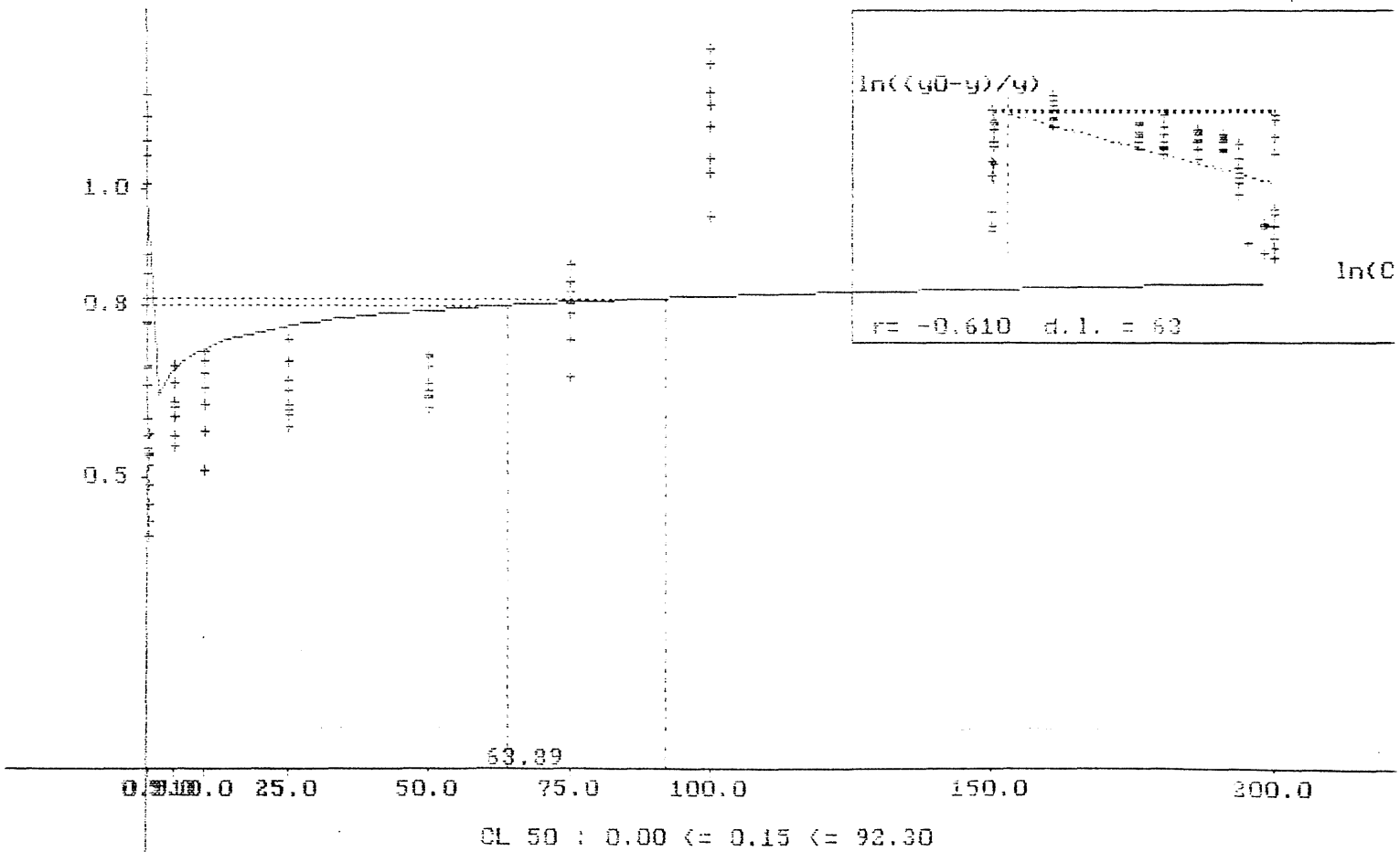


Fig.20. Représentation graphique :  $Y/Y_0 = f(C)$ . Exemple de calcul erroné obtenu avec le Tributyl étain (bis) oxyde.

Tableau IV: Valeurs des CL50 obtenues par le protocole FDA à l'aide du lecteur de microplaques en fluorescence et de la microalgue *Tetraselmis suecica* avant vidange de la microplaque

	Nombre de mesures utilisées N	Coefficient de corrélation R	CL50 (en ppm.)
Phosalone	64	0.762	22.30
Roténone	----	----	----
Lindane	62	0.804	12.70
Atrazine	----	----	----
Simazine	----	----	----
Atrazine + Simazine (1/1 )	----	----	----
Sevin L.85 (carbaryl )	47	0.701	835.57
Pentachlorophénol	71	0.712	8.09
Bichlorure de zinc	54	0.880	20.86
Sulfate 7-hydrate de zinc	48	0.819	30.22
Sulfate de cuivre II	52	0.911	34.66
Dichromate de potassium	36	0.432	617.47
Tributyl étain (bis) oxyde	----	----	----
Aminotriazole	----	----	----
Amétryne	----	----	----



Tableau V: Comparaison de valeurs de CL50 obtenues par le protocole FDA à l'aide du lecteur de plaques en fluorescence et des microalgues *Tetraselmis suecica* et *Skeletonema costatum*.

N : nombre de mesures utilisées.

R : coefficient de corrélation.

CL50 exprimée en ppm.

	<i>Tetraselmis suecica</i>			<i>Skeletonema costatum</i>		
	N	R	CL50	N	R	CL50
Phosalone	64	0.762	22.30	64	0.960	16.61
Lindane	62	0.804	12.70	61	0.623	38.28
Pentachlorophénol	71	0.712	8.09	63	0.702	7.08
Bichlorure de zinc	54	0.880	20.86	64	0.789	20.37
Sulfate de cuivre II	52	0.911	34.66	48	0.838	8.53

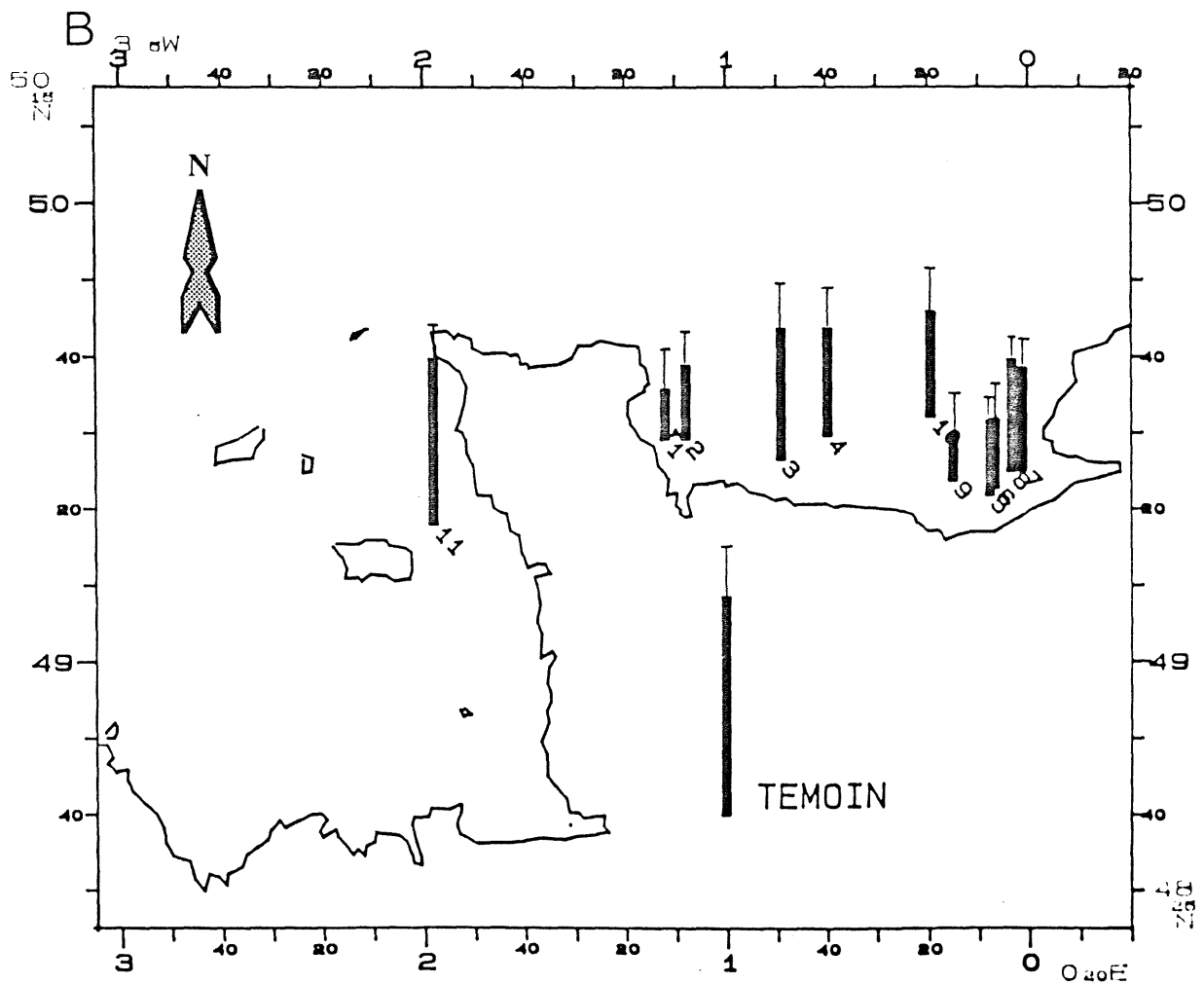
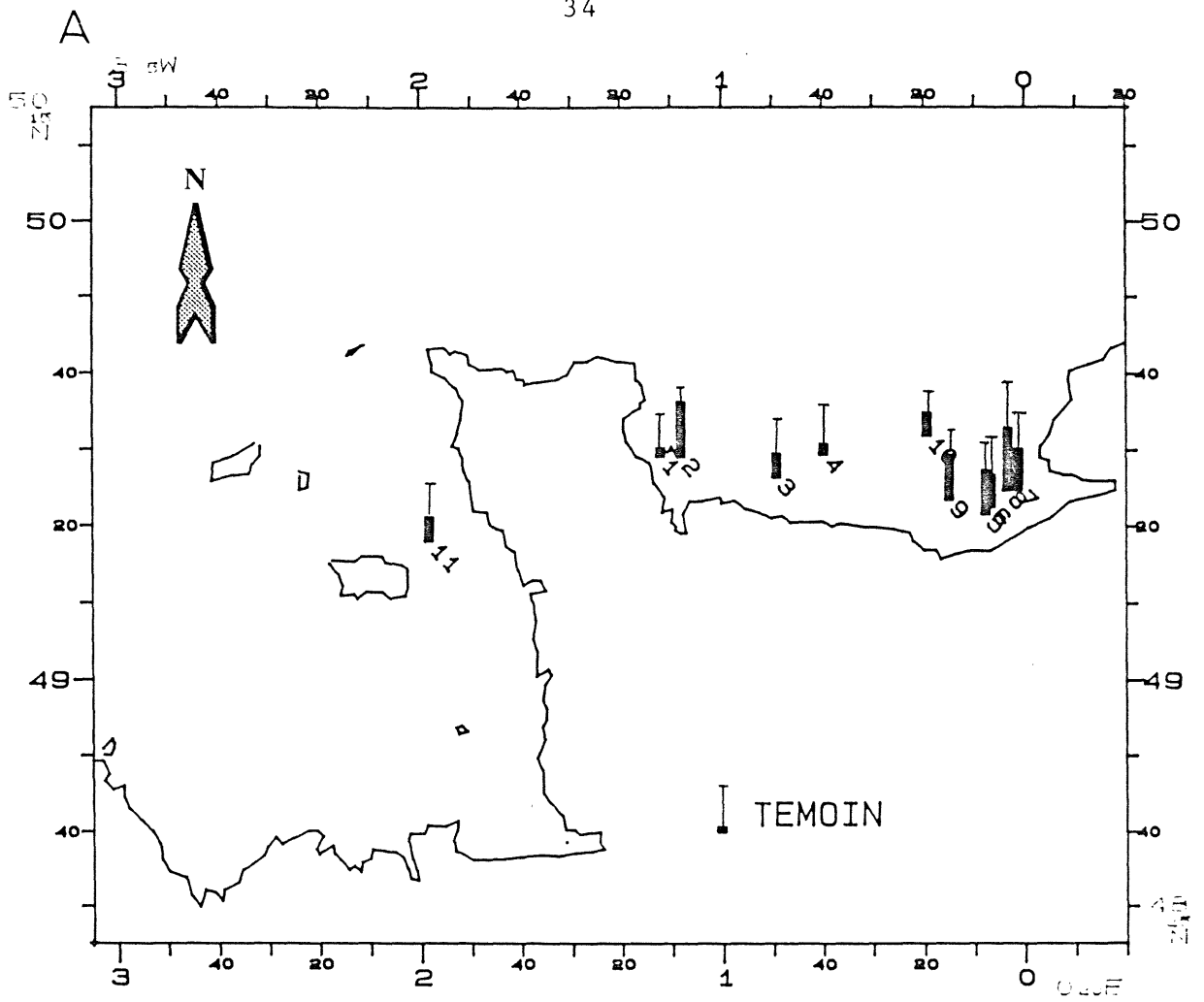


Fig.21. Test FDA des eaux de surface prélevées lors de la mission SUBIO.

A : Eaux.

B : Concentrats d'eau.

## DISCUSSION

Peu d'activités enzymatiques sont actuellement mesurables *in vivo*. Sur cellules animales en monocouches l'activité déshydrogénase est étudiée à l'aide du MTT ou directement à partir du NADH formé (Thorén, 1989). Le FDA est utilisé pour la mesure d'activité estérase de cellules végétales (Gentien, 1985 ; Yentsch *et al.*, 1988 ; Dorsey *et al.*, 1989) et animales (Thorén, 1989). Ces diverses mesures sont effectuées à l'aide d'analyseur d'images et de cytomètres de flux. Notre étude comparée de marqueurs démontre que le FDA est nettement plus sensible que les marqueurs colorimétriques (MTT, Rouge Neutre) sur les algues. L'utilisation des lecteurs de plaques en fluorescence et des microalgues apportent une rapidité d'exécution, une réplicabilité des mesures et donc une plus grande précision statistique. Tout ceci permet la mise en oeuvre d'un test écotoxicologique ainsi que l'introduction de l'informatique dans le test.

Les tests de toxicité sur les algues sont des tests à court terme qui étudient l'effet de produits sur la croissance des algues durant des périodes d'incubation de une à deux semaines (Truhaut *et al.*, 1980 ; Jouany *et al.*, 1983 ; Vasseur *et al.*, 1988). L'exposition des algues aux composés testés dure plus d'un cycle de vie de l'organisme utilisé et pour cela ces tests sont qualifiés de chroniques. Le test réalisé au laboratoire est quant à lui un test aigu de toxicité, l'exposition au composé et la période d'observation étant courtes par rapport au cycle de vie de l'algue (de l'ordre du jour). L'utilisation d'un tel test permet la comparaison rapide de la toxicité sur les algues de contaminants susceptibles d'être retrouvés dans le milieu marin.

Outre l'aspect concernant le protocole proprement dit, la standardisation de la méthode peut être affinée du fait que *T. suecica* (prise en début de phase plateau de croissance) peut, dans des conditions d'obscurité et à 4° C, être conservée durant 3 mois sans modification (P. Lassus, comm. verb.). On peut donc préparer à l'avance des plaques contenant les algues, les stocker et les utiliser au fur et à mesure des besoins.

Pour le calcul des CL<sub>50</sub> le logiciel se base sur le modèle de relation dose-effet sigmoïde élaboré à partir de bio-essais sur mammifères (Emens, 1940 dans Gaines *et al.*, 1980). Lors de ces tests les concentrations en produits prises en compte sont celles trouvées à l'intérieur de l'organisme (ingestion, injection). Les relations dose-effet obtenues en "toxicologie aquatique" considèrent les quantités de produits dans l'eau (milieu externe des organismes) et montrent de grandes similitudes avec le modèle sigmoïde (Adema *et al.*, 1975). Son utilisation dans nos calculs est donc possible. Le calcul s'applique aux valeurs moyennes de fluorescence dans la formule de relation dose-effet  $Y = Y_0 / (1 + (C/b)^a)$ . Une autre forme de calcul, par itération cette fois, accordant des poids différents aux valeurs est actuellement en cours d'élaboration. Elle ne passe plus par le stade de linéarisation et réalise directement l'ajustement de la courbe  $Y/Y_0 = f(C)$  et le calcul de la CL<sub>50</sub>.

Lors des tests, les métaux (cuivre, zinc) se révèlent plus toxiques que les divers insecticides (exceptée la phosalone). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les métaux ont une action directe sur les algues contrairement aux insecticides. En effet, les algues possèdent des protéines spécifiques jouant le rôle de tampon intracellulaire des métaux : les phytochélatines (Price et Morel, 1990). Il y a donc sans conteste un effet des métaux sur les cellules. Par contre, les insecticides ont pour cibles privilégiées des voies métaboliques inexistantes chez les algues. Le lindane (organochloré), par exemple, perturbe la conduction de l'influx nerveux le long des axones (Fournier, 1988).

Il est regrettable de ne pas avoir obtenu de résultats sur les herbicides. Divers problèmes que l'on retrouve en écotoxicologie (manque de solubilité, interaction avec le marqueur) sont apparus avec les herbicides testés et n'ont pu être réglés dans la configuration actuelle du test.

L'étude comparée de plusieurs produits sur deux microalgues (*T. suecica* et *S. costatum*) indique des sensibilités proches pour ce test. Des différences remarquables (sulfate de cuivre II, lindane) ont quand même été trouvées. Elles sont attribuables aux physiologies propres des deux algues qui entraînent des sensibilités différentes à certains produits (Marcaillou-le Baut *et al.*, 1983).

La sensibilité du test peut être améliorée par l'évolution de ses différents paramètres. On peut en effet optimiser les résultats par une variation des temps d'incubation et de mesure. Le choix d'espèces d'algues plus sensibles au marquage FDA ainsi qu'aux contaminants est à envisager. Du point de vue appareillage de mesure, l'utilisation de longueurs d'onde (filtres) se rapprochant plus encore des maxima de fluorescence de la fluorescéine est un facteur à prendre en compte au vue des résultats obtenus avec le spectrofluorimètre (sensibilité x6). L'augmentation de la sensibilité va réduire le problème de la solubilité de certains produits dans la mesure où les quantités à tester seront diminuées. Un plus large éventail de produits pourra alors être étudié.

Les résultats obtenus avec les eaux de mer de surface permettent d'envisager l'utilisation du test pour le contrôle de la qualité des eaux. Déjà au niveau du laboratoire d'autres dosages enzymatiques effectués avec les lecteurs de plaques sont en cours de validation (Galgani *et al.*, 1990 a ; Galgani *et al.*, 1990 b).

## CONCLUSION

Nous disposons avec ce test qui mesure une activité enzymatique sur des microalgues d'un outil simple et rapide de comparaison de l'effet de contaminants (calcul de  $CL_{50}$ ) sur ces organismes. L'utilisation du test pour le contrôle de la qualité des eaux est également envisageable. La technique de marquage au FDA utilisée pour des tests d'activité métabolique sur le phytoplancton (Yentsch *et al.*, 1988) ainsi que la relation entre l'uptake de  $CO_2$  et la fluorescence FDA (Dorsey *et al.*, 1988) ouvrent de nouveaux horizons par leur application au lecteur de plaques. L'écophysiologie des algues, la recherche de conditions optimales de culture (application en aquaculture) ainsi que la comparaison des métabolismes de différentes espèces sont des exemples d'études réalisables avec un gain en rapidité et en efficacité par rapport aux méthodes existantes (dosage de l'ATP, marquage au  $^{14}C$ ). D'autres fluorochromes permettant la mesure d'activités enzymatiques, comme par exemple le FITC-dibutyrate pour l'activité lipase (Klut *et al.*, 1989) sont susceptibles d'apporter des renseignements supplémentaires sur le métabolisme des algues et d'être utilisés pour des tests de toxicité. On peut également réfléchir à de nouveaux marqueurs du fait du développement de lecteur de plaques en luminescence. L'utilisation associée des lecteurs de plaques et des microalgues est promue à un grand avenir par la quantité de renseignements qu'elle peut apporter dans les domaines de l'environnement et de la physiologie des algues.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adema D.M.M, A.O. Hanstveit, R.N. Hooftman et G.J Vink, 1975. Determination of toxicity dans Degrability, Ecotoxicity and Bioaccumulation. The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment, Government Publishing Office The Hague The Netherlands edit, Pays-Bas 2 : 547 - 552.
- Berland B.R. et S.Y. Maestrini, 1969a. Study of bacteria associated with marine algae in culture. II. Action of antibiotic substances. *Mar. Biol.* 3 : 334 - 335.
- Berland B.R. et S.Y. Maestrini, 1969b. Action de quelques antibiotiques sur le développement de cinq Diatomées en culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 3 : 62 - 75.
- Blaise C., B. Ska, G. Sabatini, N. Bermingham et R. Legault, 1981. Potentiel de bioaccumulation de substances toxiques d'eaux résiduaires industrielles à l'aide d'un essai utilisant des algues et des bactéries. *Int. Nat. Santé Rech. Med., Paris* 106 : 155 - 165.
- Blaise C., B. Trottier, R. Van Coillie et P. Couture, 1986 a. Evaluation de la toxicité sub létale des effluents industriels vis-à-vis du poisson en mesurant l'ATP du muscle squelettique. *Wat. Poll. Res. J.* 21 : 71 - 90.
- Blaise C., R. Legault, N. Bermingham, R. Van Coillie et P. Vasseur, 1986b. A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Toxicity Assessment* 1 : 261 - 281.
- Dorsey J., C.M. Yentsch, S. Mayo et C. Mc Kenma, 1989. Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae. *Cytometry* 10 : 622 - 628 + 1 figure h.t.
- Fournier J., 1988. Mode d'action des pesticides dans Chimie des pesticides, Agence de Coopération Culturelle et Technique edit, Edit des Trois Moutiers publ., France : 237 - 244.
- Gaines Das R.E. et M.S. Tydeman, 1980. Iterative weighted regression analysis of logit responses. A computer program for analysis of bioassays and immunoassays. *Comp. Prog. Biomed.* 15 : 13 - 22.
- Galgani F., G. Bocquené et Y. Cadiou, 1990a. Cholinesterase as a sensitive marker of pollution effects in marine organisms. Soumis pour publication.
- Galgani F., G. Bocquené, M. Luçon, D. Grzebyk, F. Letrouit et D. Claisse, 1990 b. EROD measurements in fish from the North West part of France. A monitoring study. Soumis pour publication.
- Gentien P., 1985. Etude de la toxicité de l'effluent urbain de St Malo (Routhouan). Influence de la chloration. Rapport IFREMER DERO-85 09-EL.
- Jouany J.M., J.F. Ferard, P. Vasseur, J. Gea, R. Truhaut et C. Rast, 1983. Interest of dynamic tests in acute ecotoxicity assessment in algae. *Ecotox. Environ. Saf.* 7 : 216-228.
- Joubert G., 1983. Detailed method for quantitative toxicity measurements using the green algae *Selenastrum capricornutum* dans Aquatic Toxicology, J.O. Nriagu edit, Wiley-Intersciences publ., USA 13 : 467 - 485.

- Klut M.E., T. Bisalputra et N.J. Antia, 1988. The use of fluorochromes in the cytochemical characterization of some phytoflagellates. *Histochem. J.* 20 : 35 - 40.
- Klut M.E., J. Stockner et T. Bisalputra, 1989. Further use of fluorochromes in the cytochemical characterization of phytoplankton. *Histochem. J.* 21 : 645 - 650.
- Marcaillou-Le Baut C., M. Bardouil, G. Bocquené, L. Le Déan et P. Truquet, 1983. Etudes préliminaires sur la sensibilité d'organismes planctoniques marins vis-à-vis de deux insecticides et d'un herbicide. Rapport technique ISTPM n° 7, 1983.
- Mora B. et J. Fabregas, 1980. The effect of inorganic and organic mercury on growth kinetics of *Nitzschia acicularis* W. Sm. and *Tetraselmis suecica* Butch. *Can. J. Microbiol.* 26 : 930 - 937.
- Price N.M. et F.M.M. Morel, 1990. Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *Nature* 344 : 658 - 660.
- Ramade F., 1979. Ecotoxicologie. Collection d'Ecologie. Masson publ., France : 1 - 2.
- Thorén S.A., 1989. A semiautomatic image analyzer for cell counts in monolayers. II. Application to toxicity estimation and comparisons between two cell-viability markers, fluorescein diacetate and lactate deshydrogenase. *J. Toxicol. Environ. Health.* 27 : 523 - 532.
- Truhaut R., J.F. Ferard et J.M. Jouany, 1980. Cadmium IC<sub>50</sub> determinations on *Chlorella vulgaris* involving different parameters. *Ecotox. Environ. Saf.* 4, 215 - 223.
- Van Coillie R., P. Couture et S.A. Visser, 1983. The use of algae in aquatic ecotoxicology dans *Aquatic Toxicology*, J.O. Nriagu edit, Wiley. Intersciences publ., USA 13 : 488 - 502.
- Van Coillie R., 1990. Séminaire sur l'optimisation des bio-essais écotoxicologiques (Orléans, 25-27 Septembre 1989) : 16 - 17.
- Vasseur P. et P. Pandard, 1988. Influence of some experimental factors on metal toxicity to *Selenastrum capricornutum*. *Tox. Assess.* 3 : 331 - 343.
- Yentsch C.M., J.W. Campbell et T.L. Gucci, 1988. Is only a fraction of natural phytoplankton populations metabolically active ? Evidence via the FDA staining protocol. *EOS* 69, 1133.