

Article

« Contribution à l'évaluation écotoxicologique du Tébutiuron - un herbicide de la classe des urées substituées »

C. Blaise et M. Harwood

Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science, vol. 4, n° 1, 1991, p. 121-134.

Pour citer cet article, utiliser l'information suivante :

URI: <http://id.erudit.org/iderudit/705093ar>

DOI: 10.7202/705093ar

Note : les règles d'écriture des références bibliographiques peuvent varier selon les différents domaines du savoir.

Ce document est protégé par la loi sur le droit d'auteur. L'utilisation des services d'Érudit (y compris la reproduction) est assujettie à sa politique d'utilisation que vous pouvez consulter à l'URI <https://apropos.erudit.org/fr/usagers/politique-dutilisation/>

Érudit est un consortium interuniversitaire sans but lucratif composé de l'Université de Montréal, l'Université Laval et l'Université du Québec à Montréal. Il a pour mission la promotion et la valorisation de la recherche. Érudit offre des services d'édition numérique de documents scientifiques depuis 1998.

Pour communiquer avec les responsables d'Érudit : info@erudit.org

Contribution à l'évaluation écotoxicologique du Tébutiuron – un herbicide de la classe des urées substituées

Ecotoxicological assessment of Tebutiuron a substituted urea class herbicide

C. BLAISE¹, M. HARWOOD¹

Reçu le 16 février 1989, accepté pour publication le 19 septembre 1990*

RÉSUMÉ

Une étude écotoxicologique a été menée à l'égard du Tébutiuron (TB), un phytocide homologué inhibant la croissance de végétation nuisible, afin de mieux cerner son impact sur le milieu aquatique susceptible d'être affecté par des épandages terrestres. La toxicité du TB a été évaluée en réalisant des bioessais à trois paliers écologiques, soit avec la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*), avec l'algue *Selenastrum capricornutum* et avec la bactérie (*Photobacterium phosphoreum*) du système Microtox®. Parmi ces trois indicateurs, les algues se sont montrées les plus sensibles (CI50 = 0,08 mg · L⁻¹), suivies des truites (CI50 = 115 mg · L⁻¹) et enfin, des bactéries du système Microtox® (CI50 = 328 mg · L⁻¹). Des résidus maximaux variant de 0,091 à 0,18 mg · L⁻¹ rapportés pour le TB en milieu aquatique, suite à des applications expérimentales, laissent donc croire que seules les algues pourraient être victimes d'une agression marquée. D'autre part, les essais réalisés avec le SOS Chromotest ont démontré que le TB était faiblement génotoxique sans activation métabolique. En revanche, des algues exposées à 1 mg · L⁻¹ de TB durant 4 heures n'ont pu ni (dés)activer ni bioaccumuler l'herbicide. En général, notre enquête corrobore certaines données générées pour fins d'homologation de ce produit, lesquelles concluaient en faveur de son innocuité relative à l'égard de l'environnement aquatique. Les effets chroniques que pourrait avoir une longue exposition de faibles concentrations de TB sur certains paliers écologiques devraient cependant faire l'objet d'investigations futures.

Mots clés : *Tébutiuron, herbicide, toxicité, génotoxicité.*

1. Centre Saint-Laurent, Service de la Conservation et de la Protection de l'Environnement, Environnement Canada, 105, rue McGill, Montréal, Québec, H2Y 2E7.

* Les commentaires seront reçus jusqu'au 30 octobre 1991.

SUMMARY

A wide array of chemical products are commonly used to inhibit the growth of a diversity of undesirable vegetation types for numerous purposes. In forestry applications, herbicides can improve ranges, contribute to silviculture and facilitate rights-of-way management, for example. Among congeners of the substituted urea class herbicides, Tebuthiuron (TB) has proven efficient for such activities. Since its commercial appearance in 1974, this broad-spectrum weed killer was employed to control a variety of herbaceous and woody plants. When applied on soil before or during the onset of plant emergence, TB irreversibly affects photosynthesis after being absorbed by roots and translocated to its target sites. Prior to its registration as a herbicide, TB had undergone extensive (eco)toxicological testing which had generally indicated low potential for environmental concern, with regards to terrestrial and avian fauna. Although TB is generally purported to be unproblematic towards fish, the overall impact of substituted urea class herbicides is still not fully documented, as far as various members of the aquatic community are concerned. The experimental results presented herein – specifically on TB – contribute both confirmatory as well as some new information in this respect.

In our study, TB toxicity was investigated at three ecological levels by undertaking acute bioassays with rainbow trout (*Salmo gairdneri*), algae (*Selenastrum capricornutum*) and bacteria (*Photobacterium phosphoreum*). Among these bio-indicators, algae proved to be the most sensitive ($EC_{50} = 0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), followed by rainbow trout ($LC_{50} = 115 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and bacteria ($EC_{50} = 328 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Since maximum TB residues lying between 0.091 and $0.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ have been reported for aquatic systems following experimental terrestrial applications, our toxicity results suggest that only algae could be adversely affected following acute exposure to the herbicide.

Additional tests performed with the SOS Chromotest, a bacterial colorimetric assay for detecting DNA-damaging agents, first showed that TB is weakly genotoxic without metabolic activation. Since recent genotoxicity studies have revealed that vegetal systems can either detoxify, activate or uptake specific chemicals, we then explored this possibility by exposing *S. capricornutum* ($10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$) to $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of TB for 4 h. Results of this acute exposure indicated an absence of positive (detoxication) or negative (activation, accumulation) phytoplanktonic interactions. Indeed, the genotoxic characteristics of TB, before and after algal exposure, were unaltered, as demonstrated by SOS Chromotest assays. In this same experiment, a similar assay on TB-exposed algal cells (i.e. SOS Chromotest on an algal cell solvent extract) detected no genotoxic activity.

In conclusion, our study corroborates existing data generated for TB registration purposes and essentially supports the notion that this chemical is relatively harmless towards the aquatic environment under normal use conditions. Nevertheless, an important caveat remains concerning chronic effects on specific organisms, which could result from long term exposure to low concentrations of TB. Since such potential effects have not yet been adequately addressed, further studies are warranted in this area.

Key-words : *Tebuthiuron, herbicide, toxicity, genotoxicity.*

INTRODUCTION

L'utilisation de produits chimiques pour détruire et contrôler la végétation nuisible constitue une activité contemporaine de grande envergure. Sur le plan forestier, on se sert d'herbicides à plusieurs fins (aménagement de zones, amélioration de sylviculture, établissement d'emprises de lignes, etc.). Parmi les herbicides constituant le groupe des urées substituées, le Tébuthiuron (TB) se prête fort bien à ces pratiques. Introduit dès 1974, cet herbicide non sélectif s'avère efficace à supprimer une gamme variée d'espèces herbacées et ligneuses (ELANCO, 1983). Appliqué en période de pré-émergence ou en début d'émergence, le TB est biosorbé par les racines et, après translocation, produit alors son effet au niveau des sites de photosynthèse en inhibant ce processus (HATZIOS et PENNER, 1980). Au cours de son homologation, le TB a fait l'objet de diverses évaluations toxicologiques et écotoxicologiques, ainsi que l'ont rapporté plusieurs documents scientifiques (PARÉ et SAINT-JEAN, 1979 ; SPENCER, 1981 ; ENVIRONNEMENT CANADA, 1982 ; ELANCO, 1983 ; WORTHING et WALKER, 1983 ; USDA, 1986). Bien que les urées substituées soient généralement réputées peu nocives vis-à-vis des mammifères terrestres, des oiseaux et de la faune ichthyenne (DOULL *et al.*, 1980 ; ELANCO, 1983), leur potentiel écotoxique à l'égard des paliers écologiques du milieu aquatique est encore mal compris. Soucieux d'apporter des précisions en ce sens, des tests de toxicité (sur bactéries, micro-algues et poissons) et de génotoxicité (système bactérien) ont été entrepris avec le TB. Les résultats de cette investigation sont relatés ci-après.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les divers essais ont été réalisés avec du Tébuthiuron (TB) pur : diméthyl-1,3 (tert-butyl-5 thiadiazole-1, 3, 4 yl-2)-1 urée (Formule empirique : $C_9H_{16}N_4OS$). Ce produit est un solide cristallin incolore ayant un poids moléculaire de 228,31 et une solubilité aqueuse de 2 500 mg · L⁻¹ à 25 °C. En solution aqueuse, cet herbicide s'avère relativement non volatil, résiste à l'hydrolyse et ne démontre qu'un faible potentiel de photodécomposition (USDA, 1986). Ces caractéristiques favorisent donc son évaluation avec les tests d'écotoxicité et de génotoxicité décrits plus loin. Dans tous les cas, les résultats des essais ont été rapportés en fonction de concentrations nominales de TB.

Tests d'écotoxicité

Le test de bioluminescence avec *Photobacterium phosphoreum* a été réalisé afin d'apprécier le danger potentiel représenté par le TB au niveau bactérien. Les essais ont été effectués à l'aide du photomètre Microtox® modèle 2055, selon la procédure normalisée recommandée (BECKMAN

INSTRUMENTS INC., 1982). Les concentrations testées de l'herbicide ont été de 0 (contrôle), 31,3, 62,5, 125, 250 et 500 mg · L⁻¹. Nous avons rapporté des CI50 (5 mn, 15 °C) pour le TB, où :

CI50 : la concentration réduisant de 50 % la luminescence normalement produite par le réactif bactérien ;

(5 mn, 15 °C) : durée de l'essai (5 mn) pendant lequel le réactif bactérien est exposé aux diverses concentrations de l'échantillon testé à une température contrôlée de 15 ± 0,1 °C.

L'algue verte unicellulaire *Selenastrum capricornutum* (ATCC n° 22662) a été employée comme bioindicateur pour établir la phytotoxicité du TB. Les essais, dont la durée d'exposition était de 96 h, ont été réalisés par technique miniaturisée sur microplaque (BLAISE *et al.*, 1986a). Les biomasses résultantes des algues témoin et des algues exposées à chaque concentration de TB (fourchette de 8 concentrations comprises entre 0,05 et 0,5 mg · L⁻¹) ont été dénombrées par comptage électronique (Compteur Coulter modèle ZM, cellule avec ouverture de 70µ). On calculait par la suite les pourcentages d'inhibition de croissance pour préciser la CI50.

Un bioessai de toxicité létale aiguë de type statique (CL50-96 h) a été réalisé avec la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* Richardson), selon une méthode normalisée en vigueur au Canada (ENVIRONNEMENT CANADA, 1980). Huit poissons (poids moyen ± écart type = 10,3 ± 3,5 g ; taille moyenne ± écart type = 8,9 ± 1,3 cm) ont été exposés par réservoir d'essai contenant un volume final de 60 L. Les concentrations testées de TB ont été les suivants : 0 (contrôle), 50, 75, 100, 130, 180, 240, 320 et 420 mg · L⁻¹.

Tests de génotoxicité

La génotoxicité du TB a été évaluée à l'aide du SOS Chromotest qui utilise une souche d'*Escherichia coli* manipulée sur le plan génétique (QUILLARDET *et al.*, 1982). Ce réactif bactérien détecte la présence de molécules chimiques qui sont dommageables vis-à-vis de l'ADN. Lors d'une telle agression, les gènes *sfia* associés à la fonction SOS sont induits et leur niveau d'expression est mesuré grâce à une fusion *sfia*/opéron lac Z. Etant donné que le gène structurel lac Z est responsable de la synthèse de l'enzyme B-galactosidase mais que la région lac Z normale de l'opéron lac Z a été supprimée, toute activité de B-galactosidase résulte de l'expression des gènes *sfia* et donc d'une réponse de réparation d'ADN découlant d'une agression génotoxique. L'essai, réalisé sur microplaque, consiste donc à exposer les bactéries à une série de concentrations de l'échantillon à tester et de quantifier la production de B-galactosidase par colorimétrie à une densité optique de 615 nm (ORGENICS LTD., 1986). Lorsque l'on obtient une courbe dose-réponse significative (test t démontrant que la pente calculée est significativement différente de 0 : SNEDECOR et COCHRAN, 1984), la pente reflète le potentiel d'induction de la fonction SOS ou SOSIP (« SOS inducing potency »). Le SOSIP est, par définition, le potentiel d'induction de la fonction SOS par nanomole de produit testé. Plus la valeur SOSIP est élevée, plus le potentiel d'induction génotoxique est fort. Pour divers produits, on a rapporté des valeurs SOSIP variant de 0,004 jusqu'à 26 000 (QUILLARDET *et al.*, 1982).

La possibilité de modification des propriétés génotoxiques du TB par le phytoplancton a été investiguée en exposant *S. capricornutum* à l'herbicide. Un pré-test d'exposition a tout d'abord été réalisé afin de préciser une concentration de TB qui ne présenterait pas d'inhibition de croissance durant une période de 4 h. Ce temps d'exposition nous semblait représentatif car le phytoplancton, en milieu lotique tout au moins, n'est vraisemblablement pas en contact avec de fortes concentrations de TB pendant longtemps. Ce pré-test, tout comme le test d'exposition subséquent, a été entrepris avec un inoculum de $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (équivalant à $10^6 \text{ cellules} \cdot \text{mL}^{-1}$) dans des conditions expérimentales classiques (MILLER *et al.*, 1978). Les algues ont d'abord été soumises à un contact de 4 h à une gamme de concentrations de TB. Par la suite, on ré-inoculait les algues en milieu sain. Leur récupération après 4 jours, comparée à celle des algues témoin, permettait alors de préciser les concentrations de TB n'ayant eu aucun effet sur leur croissance suite à l'exposition.

Après avoir sélectionné une concentration non inhibitrice de l'herbicide pour vérifier les interactions algales vis-à-vis de son activité génotoxique, le véritable test a été effectué dans six erlenmeyers de 4L contenant chacun un volume expérimental (3 x erlenmeyers avec $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de TB) et contrôle (3 x erlenmeyers avec eau déionisée du système Millipore Super Q) de 1 L et la biomasse algale spécifiée. Après l'exposition, les algues ont été recueillies par centrifugation (10 mn à 3 000 rpm : centrifugeuse IEC Centra-7, tête #216) et les culots expérimentaux et contrôles ont été respectivement combinés. Les tests de génotoxicité ont alors été exécutés sur les surnageants (également recombinés) contrôles et expérimentaux ainsi que sur les extraits des culots algaux (USEPA, 1985) solubilisés dans 1 mL de DMSO (diméthyl sulfoxyde). Aucune activité génotoxique n'a été détectée dans les surnageants et extraits algaux contrôles, assurant ainsi que ni les algues ni la procédure d'extraction ne pouvaient contribuer une génotoxicité artificielle.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Tests d'écotoxicité

La toxicité du TB vis-à-vis d'indicateurs représentant les niveaux bactérien, algal et ichthyen est précisée au tableau 1. En général, nos résultats s'accordent avec ceux déjà rapportés pour les mêmes niveaux écologiques (ELANCO, 1983 ; USDA, 1986).

Tout d'abord, les bactéries du test Microtox® s'avèrent les moins sensibles ($\text{CI}_{50} = 328 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Le seul autre test rapporté pour le niveau bactérien concerne l'activité de l'enzyme nitrogénase chez la bactérie terrestre *Azotobacter chroococcum* qui a été mesurée suite à une durée d'exposition au TB non précisée. Aucune inhibition d'activité ne fut notée à $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (USDA, 1986).

Tableau 1 Toxicité du Tébutiuron (TB) à trois paliers écologiques.

Table 1 Toxicity of Tebutiuron (TB) at three ecological levels.

Palier écologique	Organisme	Paramètre écotoxique ^a	TB en mg · L ⁻¹ ± écart type	Référence méthodologique
Bactéries	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	CI50-5 mn	328 ± 47 (n = 4)	BECKMAN, 1982
Algues	<i>Selenastrum capricornutum</i>	CI50-96 h	0,08 ± 0,03 (n = 5)	BLAISE <i>et al.</i> , 1986a
Poissons	<i>Salmo gairdneri</i> Richardson	CL50-96 h	115 ± 10 (n = 1)	ENVIRONMENT CANADA, 1980

a. CI ou CL50 : Concentration d'inhibition (CI) ou de létalité (CL) à 50 % pendant une durée précise.

Les biotests algaux, par ailleurs, démontrent bien les propriétés phytotoxiques du TB alors qu'environ 0,1 mg · L⁻¹ suffit pour inhiber de 50 % la croissance chez *S. capricornutum*. Pour cette même espèce, on signale près de 60 % d'inhibition de croissance après 96 h d'exposition à 0,05 mg · L⁻¹ de TB (ADAMS *et al.*, 1985). Comparativement, on a rapporté une diminution de l'activité de l'enzyme nitrogénase chez l'algue bleue-verte *Anabaena flos-aquae* exposée durant 48 h à une concentration de TB de 10 mg · L⁻¹. Cette enzyme n'était cependant pas affectée à une concentration de 3 mg · L⁻¹ (USDA, 1986). De plus, la croissance d'algues vertes exposées au TB durant une période non précisée aurait été inhibée entre 1,2 et 1,5 mg · L⁻¹ alors qu'aucun effet n'aurait été observé à 0,013 mg · L⁻¹. Ces mêmes algues auraient eu une croissance normale lorsque replacées dans leur milieu de croissance sans TB (ELANCO, 1983).

Enfin, l'essai réalisé avec la truite arc-en-ciel permet de situer la concentration de TB responsable d'une mortalité significative après 96 h d'exposition (tableau 1). Des bioessais comparables indiquent des CL50 d'un ordre de grandeur similaire pour diverses espèces ichthyennes : crapet arlequin (*Lepomis macrochirus*), 112 mg · L⁻¹ ; truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*), 144 mg · L⁻¹ ; tête-de-boule (*Pimephales promelas*) et poisson doré (*Carassius auratus*), > 160 mg · L⁻¹ (USDA, 1986). Signalons également que, parmi les urées substituées pour lesquelles on a réalisé des essais ichthyens de type aigu (à l'exception du Chloroxuron : CL50-96 h de 430 mg · L⁻¹ pour la truite arc-en-ciel), le TB s'avère comparativement moins toxique que ces congénères. Ainsi, on a rapporté, pour le Chlorobromuron, le Diuron, le Fluometuron, le Linuron et le Noruron, des CL50-96 h variant de 1,4 à 37 mg · L⁻¹, lors d'essais entrepris avec la truite arc-en-ciel, le poisson doré, la barbe du nord et le crapet à oreilles bleues (MAYER et ELLERSIECK, 1986).

Au cours du test létal aigu, nous avons aussi constaté que plusieurs poissons avaient l'abdomen anormalement gonflé après 24 h d'exposition aux concentrations suivantes de TB : 100 (1 poisson sur 8), 130 (4 poissons sur 8) et 180 (3 poissons sur 8) mg · L⁻¹. Tous ces poissons moribonds nageaient invariablement à l'envers ou à la verticale avant leur décès éventuel. Une autopsie succincte révéla la présence d'un liquide incolore remplissant entièrement la cavité abdominale, ainsi qu'une décoloration hépatique et une vessie nataoire hypertrophiée par rapport aux poissons

contrôles. Ces symptômes, qui sont communs chez les salmonidés en proie à certaines maladies infectieuses (ROBERTS et SHEPHERD, 1974), ont aussi été signalées chez des individus exposés à certains pesticides (JONES, 1973). Signalons, dernièrement, que la courbe de toxicité du TB résultant du test de létalité est asymptomatique. Cet herbicide présente donc un seuil de létalité ($115 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) en deçà duquel une mortalité aiguë cessera de se manifester (fig. 1). Cette information suggère que le TB est rapidement absorbé et métabolisé sans que le mécanisme de détoxification n'entraîne de conséquences létales pour le poisson à des concentrations de TB inférieures à $115 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Ce constat corrobore les résultats d'une étude réalisée avec le crapet arlequin (*Lepomis macrochirus*) démontrant une faible bioconcentration (maximum de 10 x rapidement atteinte après 7 jours), laquelle déclina progressivement jusqu'à la fin des 28 jours d'exposition à 0,01 et à $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de TB (ELANCO, 1983).

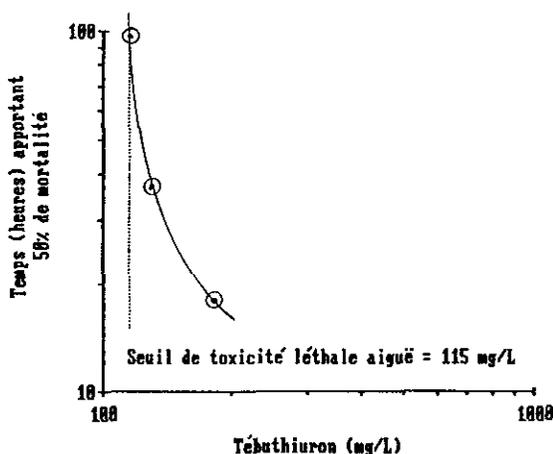


Figure 1 Courbe de toxicité (log-log) du Tébutiuron pour l'essai réalisé avec la truite arc-en-ciel.

Toxicity curve of Tebutiuron resulting from the rainbow trout bioassay.

L'impact potentiel du TB vis-à-vis des organismes aquatiques ne peut être appréhendé qu'en fonction du degré de contamination attendu suite à des exercices d'application réels. De telles expériences, menées en systèmes lotiques et lentiques, auraient démontré des concentrations maximales de TB de $0,091 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ et de $0,18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivement, amenés aux différents cours d'eau par ruissellement après divers épisodes pluviaux (ELANCO, 1983). En supposant que ces concentrations retrouvées en milieu aquatique sont représentatives, elles ne devraient pas poser de problème à l'égard des bactéries aquatiques dans la mesure où l'indicateur du test Microtox® reflète bien la sensibilité de ce groupe.

Chez les algues, cependant, on ne peut exclure la possibilité d'effets sublétaux, car les résidus de TB pouvant se retrouver dans les cours d'eau

récepteurs surpassent la concentration entraînant une inhibition de 50 % de la croissance algale chez *S. capricornutum* (tableau 1). Quoique cette probabilité soit vraisemblablement peu élevée en milieu lotique à cause de phénomènes de dilution et de diffusion, elle peut être plus forte en milieu lentique. Ici, en effet, on a retrouvé des concentrations de TB variant de 0,08 à 0,18 mg · L⁻¹ présentes durant une période consécutive de trois mois (ELANCO, 1983). Bien que des expositions ultra-aiguës (4 h) au TB ne semblent pouvoir induire des effets irréversibles chez *S. capricornutum* qu'à des concentrations irréalistes (fig. 2), ceux-ci pourraient néanmoins se produire aux concentrations attendues (i.e. 0,08 à 0,18 mg · L⁻¹) suite à une exposition correspondant à la période de persistance du TB dans le milieu aquatique. Une investigation future de ce genre est justifiable afin de comprendre le risque associé à une exposition chronique du TB vis-à-vis des algues.

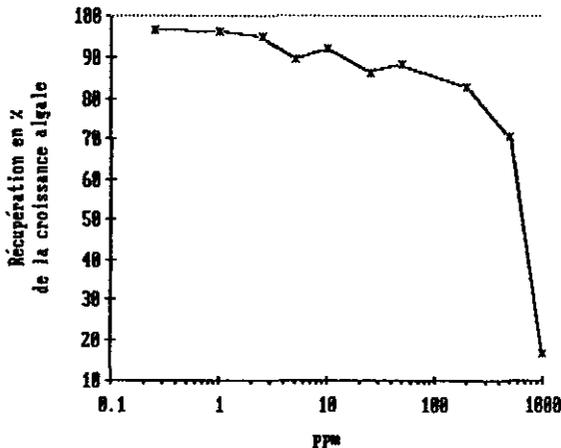


Figure 2 Récupération après 4 jours de *S. capricornutum*, suite à une exposition de 4 h au Tébutiuron, en pourcentage de la croissance des algues non exposées (témoin).

Recovery of S. capricornutum after 4 days, expressed in % of control growth, following a 4 h exposure to Tebutiuron.

Les concentrations de TB réputées présentes dans les cours d'eau suite à un programme d'application (maximum de 0,18 mg · L⁻¹ selon ELANCO, 1983) sont bien en deçà du seuil de mortalité aiguë pour la faune ichthyenne (CL50 variant de 112 à plus de 160 mg · L⁻¹), ainsi que rapporté précédemment. En ce qui concerne les effets chroniques, seule l'étude d'ELANCO (1983) signale des concentrations sans danger de 26 mg · L⁻¹ pour la truite arc-en-ciel et de 9,3 mg · L⁻¹ pour le tête-de-boule exposés au TB durant 45 et 33 jours, respectivement. En considérant que l'on applique le facteur de sécurité de 0,01 pour des substances bioaccumulables (MACEK, 1985) à la valeur de la CL50 obtenue pour notre bioessai réalisé avec la truite arc-en-ciel, le seuil de subléthalité s'établirait à 1,15 mg · L⁻¹ (i.e. 115 x 0,01 = 1,15). Ainsi, il est peu probable que les résidus de TB trouvés en milieu aquatique puissent

occasionner des effets sublétaux chez le poisson. Cependant, l'absence d'études rapportant des seuils sublétaux précis pour le TB, en faisant appel à des paramètres physiologiques variés (par exemple, McLEAY et HOWARD, 1977 ; BLAISE *et al.*, 1986b ; GORDON and McLEAY, 1986 ; KOVACS, 1986), est néanmoins une lacune qui devrait être corrigée à l'avenir. Des enquêtes sont donc encouragées en ce sens.

Tests de génotoxicité

Quatre tests réalisés avec le SOS Chromotest ont démontré que le TB est faiblement génotoxique sans activation métabolique (*tableau 2*). Trois de ces tests ont exhibé des doses-réponses à partir desquelles des valeurs de SOSIP ont pu être calculées (*fig. 3* : tests 1, 2 et 3). L'absence de dose-réponse pour l'un des tests établit néanmoins qu'une production de B-galactosidase significative a eu lieu, laquelle résulte vraisemblablement d'une agression génotoxique (*fig. 3* : test 4). Les valeurs de SOSIP (0,078,

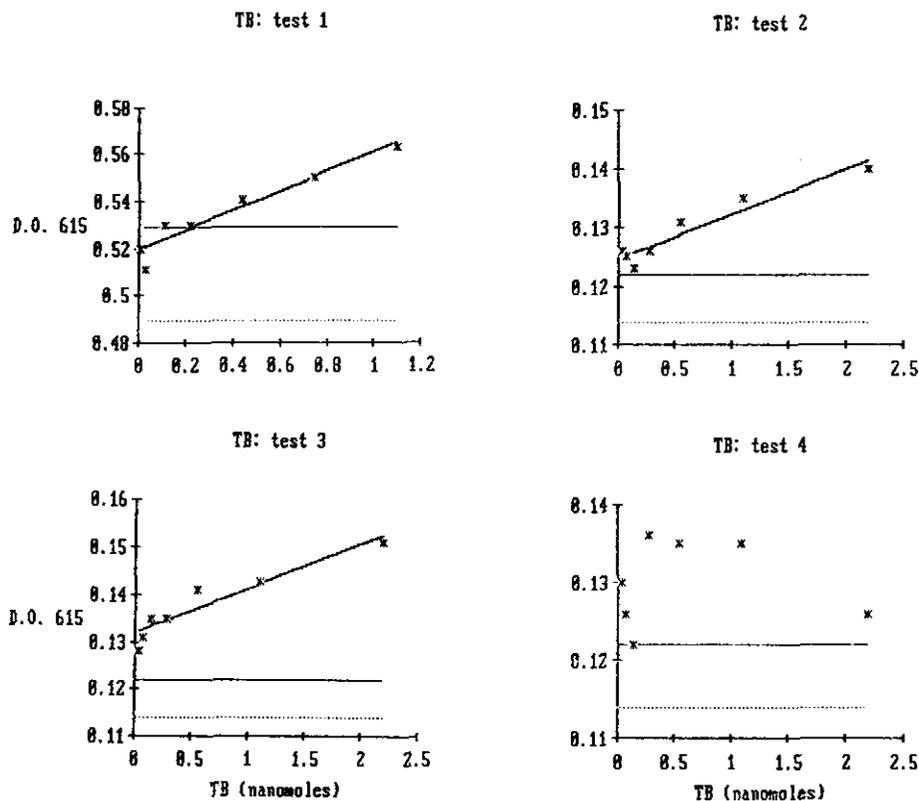


Figure 3 Courbes dose-réponse de génotoxicité du Tébuthiuron (TB). La production de base de B-galactosidase du réactif bactérien non exposé est indiquée : Moyenne (.....), moyenne plus 2 fois l'écart type (—).

Genotoxic dose-response curves of Tebuthiuron (TB). Background B-galactosidase activity in unexposed SOS Chromotest bacteria is indicated : Mean (.....), mean plus twice standard deviation (—).

Tableau 2 Réponses génotoxiques du Tébuthiuron obtenues avec le SOS Chromotest sans activation métabolique.

Table 2 *SOS Chromotest genotoxic activity of Tebuthiuron without metabolic activation.*

Test	SOSIP ^a (± écart type)	t ^b	SMG ^c	Figure correspondante
1 ^d	0,4216 (± 0,042)	16,08	0,24	fig. 3, test 1
2 ^e	0,078 (± 0,0015)	5,26	< 0,034	fig. 3, test 2
3 ^e	0,094 (± 0,0015)	6,23	< 0,034	fig. 3, test 3
4 ^e	incalculable ^f	—	incalculable ^f	fig. 3, test 4

a. SOSIP : Potentiel d'induction des gènes SOS par nanomole de produit testé.

b. Les valeurs du test t indiquent que les pentes (= SOSIP/10) calculées à partir des droites de régression (de type $y = a + bx$) de la figure 3 sont significativement différentes de 0.

c. Le SMG (seuil minimal génotoxique) est la concentration en nanomoles de Tébuthiuron (TB) à partir de laquelle un effet génotoxique statistiquement significatif se manifeste. Cette concentration est obtenue au croisement de la courbe de régression dose-réponse avec la ligne de la valeur de densité optique (DO615) correspondant à la production de base de β -galactosidase par le réactif bactérien non exposé plus 2 fois son écart type (voir fig. 3, test 1). Pour les tests 2 et 3, le SMG du TB est inférieur à la plus faible concentration testée, soit 0,034 nanomole (voir fig. 3, tests 2 et 3).

d. SOSIP des contrôles positifs pour ce test : 4NQO^g = 78,5 ; 2AA^g = 1,1.

e. SOSIP des contrôles positifs pour les tests 2, 3 et 4 : 4NQO^g = 79,9 ; 2AA^g = 2,4.

f. Non calculable à cause de l'absence de dose-réponse (voir fig. 3, test 4).

g. Intégrés au SOS Chromotest, ces contrôles témoignent de la performance du réactif bactérien à l'égard d'agresseurs génotoxiques agissant sans (4NQO : 4-amino quinoline oxyde) et avec (2AA : 2-amino anthracene) activation métabolique.

0,094 et 0,416) indiquent un faible potentiel d'induction génotoxique pour le TB, lorsque comparées aux SOSIP caractérisant diverses substances, dont certaines sont cancérigènes (QUILLARDET *et al.*, 1982). Les valeurs de SMG (voir annotation c, tableau 2) suggèrent que le TB initie son activité génotoxique à partir de 0,24 nanomole ou moins (< 0,034 nanomole). Lorsque ces valeurs sont transformées en concentration de TB exposée aux bactéries du SOS Chromotest, on obtient respectivement 0,5 mg · L⁻¹ et < 0,07 mg · L⁻¹. (Par exemple : 0,24 nanomole x le poids moléculaire du TB de 228,31 = 54,79 ng. Ce poids se trouve en contact avec 110 uL de la solution bactérienne lors de l'entreprise du SOS Chromotest. Nous avons donc une concentration de TB de 54,79 ng · 110 uL⁻¹ correspondant à 0,5 mg · L⁻¹). Le TB pourrait donc théoriquement induire un stress génotoxique en milieu lentique (résidu maximal rapporté de TB de 0,18 mg · L⁻¹) et lotique (résidu maximal rapporté de TB de 0,091 mg · L⁻¹) après un épandage (ELANCO, 1983).

Les agressions du TB vis-à-vis du matériel génétique apparaissent relativement faibles, par contre, si l'on se base sur les résultats de divers tests de tératogénéicité, de cancérogénéicité et de mutagénéicité rapportés pour cet herbicide (ELANCO, 1983 ; USDA, 1986). Seul un test de mutagénéicité sur six (test *in vitro* sur cellules lymphômes de souris) démontre un effet mutagène significatif sans activation métabolique à des concentrations supérieures à 400 mg · L⁻¹ (USDA, 1986). En général, on s'accorde à considérer que la classe d'herbicides que constituent les urées substituées ne semble pas présenter de danger important à l'égard des effets génotoxiques. Une exception notable est à signaler, cependant, alors que le Monuron fut la cause de cancers pulmonaires et hépatiques chez des souris dont la nourriture contenait l'herbicide (DOULL *et al.*, 1980). Par ailleurs, il est intéressant de constater que le TB s'est avéré génotoxique (nos résultats avec le SOS

Chromotest) et mutagénique (cellules lymphômes de souris : USDA, 1986) sans activation métabolique seulement. Ceci suggère que le métabolisme hépatique des mammifères est en mesure de détoxifier l'effet génotoxique de cet herbicide et n'entraîne pas, au contraire, une activation. Quoique la métabolisation ichthyenne du TB soit réputée rapide (ELANCO, 1983), aucune étude n'a encore fait état des conséquences génotoxiques que pourraient produire chez de jeunes poissons une exposition chronique (3 mois ou plus) à de faibles concentrations de TB. Des expériences de ce genre, utilisant les techniques de BLACK *et al.* (1985), ou de VAN DER GAAG et VAN DE KERKHOFF (1985), pourraient s'avérer révélatrices en ce sens.

Nous avons également étudié la capacité du phytoplancton à modifier les propriétés génotoxiques du TB. En effet, différentes interactions (détoxification, activation, accumulation) sont possibles lorsque des végétaux sont exposés à des produits chimiques ayant un potentiel génotoxique (LEVINE, 1984 ; PLEWA *et al.*, 1984 ; SCHOENY, 1985 ; HARWOOD *et al.*, 1989). Le choix de $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de TB comme concentration d'exposition à *S. capricornutum* repose sur les résultats d'un test de pré-exposition de type « exposition-récupération » où les algues ont été soumises à une gamme de concentrations de TB durant 4 h (fig. 2).

Les résultats d'interactions algales vis-à-vis de la génotoxicité du TB sont présentés au tableau 3. On remarque, tout d'abord, que le SOSIP du surnageant TB après exposition n'est pas significativement différent de celui de la solution TB avant exposition. Une activation ou désactivation métabolique de la part des algues vis-à-vis du TB ne s'est donc pas manifestée. Par ailleurs, l'absence d'activité génotoxique dans l'extrait du culot algal après exposition suggère qu'une bioamplification du TB aux niveaux supérieurs de la chaîne trophique aquatique soit peu probable par l'entremise des algues. Cependant, des expériences semblables de plus longues durées (24 h ou

Tableau 3 Effet des algues ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) sur la génotoxicité du Tébuthiuron ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), mesuré avec le SOS Chromotest, après une exposition de 4 h.

Table 3 Interaction of algae ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) on the genotoxic activity of Tebuthiuron ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) after a 4 h exposure.

Matériel testé	SOSIP* (\pm écart type)	t_b	Remarques
Solution TB avant exposition	1,85 (\pm 0,62)	7,72	Les SOSIP avant et après exposition ne sont pas significativement différents (test t ; Snedecor et Cochran, 1984)
Surnageant TB après exposition	2,46 (\pm 0,97)	10,91	
Extrait du culot algal après exposition	non génotoxique	-	Aucune activité génotoxique lorsque les extraits du culot algal correspondant à une fourchette de 0,003 - 0,18 mg d'algues furent exposés au réactif bactérien du SOS Chromotest

a. Pour les produits purs, le SOSIP est le potentiel d'induction des gènes SOS par nanomole. La possibilité que les algues réagissent avec le TB au cours de cette expérience ne nous permet plus, cependant, de rapporter le SOSIP de cette façon. Nous avons donc choisi d'exprimer celui-ci par mL avant et après exposition. Ceci explique les valeurs différentes de SOSIP présentées ici comparativement à celles du tableau 2.

b. Les valeurs du test t indiquent que chacun des SOSIP est significativement différent de 0.

plus) permettraient de mieux appréhender le risque à cet égard. Les travaux de SCHOENY *et al.*, (1985), par exemple, ont démontré que le benzo(a)pyrène, un hydrocarbure aromatique polycyclique, s'était accumulé chez *S. capricornutum* entre 1 et 4 jours à une exposition de $1,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Par comparaison, des résidus et métabolites de TB plus ou moins importants ($0,08$ à $3,84 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) ont été retrouvés dans certaines espèces de végétation ligneuse comestible pour la faune terrestre plus d'un an après l'épandage et ce, malgré un bon pouvoir de métabolisation de l'herbicide (USDA, 1986).

CONCLUSIONS

Cette évaluation écotoxicologique du Tébutiuron corrobore, en général, les résultats des divers tests qui ont été réalisés dans le cadre de l'homologation de ce produit (ELANCO, 1983 ; USDA, 1986). L'utilisation de cet herbicide, aux fins prescrites, ne devrait donc pas, en principe, présenter de risques vis-à-vis du milieu aquatique, lorsque l'on considère l'ensemble des données générées à son égard. Cependant, certaines inquiétudes persistent quant aux effets chroniques que pourrait avoir une longue exposition de faibles concentrations de TB sur certains paliers écologiques. Ces préoccupations plaident en faveur d'enquêtes bioanalytiques additionnelles afin de confirmer l'innocuité du TB sur le plan de la chronicité. A cette fin, on pourrait envisager les tests suivants : test de biodégradabilité bactérienne ; test algal CL50 de type « exposition (24 h et plus)/récupération » ; test d'interactions algales sur la géotoxicité du TB avec périodes d'exposition de 24 h et plus ; tests visant à préciser des seuils de sublétaleté pour les poissons et les invertébrés ; tests de cancérogénicité avec de jeunes poissons exposés à de faibles concentrations de TB pendant trois mois ou plus.

REMERCIEMENTS

Nous remercions la Direction Régionale du Service de la Conservation et de la Protection de l'Environnement (Environnement Canada, Région du Québec) pour la compréhension et l'appui apportés à ces travaux. La collaboration et les conseils apportés par Hydro-Québec (Vice-présidence Environnement, Direction Appareillage, Direction Santé et Sécurité) ont contribué à bien orienter les divers essais réalisés en laboratoire. Aux personnes-ressources de cette agence, nous sommes vivement reconnaissants. L'assistance technique de M. Richard Legault et de Mme Sylvie Bisson a été très appréciée. Enfin, nous exprimons notre gratitude à Angèle Cameron pour la dactylographie du manuscrit.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMS N., GOULDING K.H., DOBBS A.J., 1985. Toxicity of eight water-soluble organic chemicals to *Selenastrum capricornutum* : a study of methods for calculating toxic values using different growth parameters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 14 : 333-345.
- BECKMAN INSTRUMENTS INC., 1982. Microtox™ System Operating Manual, Beckman Instruments 015-555879. Beckman Instruments Inc., Microbics Operations, Carlsbad, Ca 92008, USA, 12 sections, 70 p.
- BLACK J.J., MACCUBIN A.E., SCHIFFERT M., 1985. A reliable, efficient, microinjection apparatus and methodology for the *in vitro* exposure of rainbow trout and salmon embryos to chemical carcinogens. *J. Natl. Cancer Inst.*, 75 : 1123-1128.
- BLAISE C., LEGAULT R., BIRMINGHAM N., VAN COILLIE R., VASSEUR P., 1986a. A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Tox. Assess.*, 1 : 261-281.
- BLAISE C., TROTTIER B., VAN COILLIE R., COUTURE P., 1986b. Evaluation de la toxicité sublétales des effluents industriels vis-à-vis du poisson en mesurant l'ATP du muscle squelettique. *Water Poll. Res. J. Canada*, 21 : 71-90.
- DOULL J., KLAASSEN C.D. and AMDUR M.O. (eds), 1980. Toxicology, the basic science of poisons (Second Edition). Macmillan Publishing Co., Inc., 778 p.
- ELANCO, 1983. Graslan Technical Manual. Elanco Products Company, Indianapolis, Indiana, USA, 106 p.
- ENVIRONMENT CANADA, 1980. Standard procedure for testing the acute lethality of liquid effluents. Environmental Protection Service, Report EPS 1-WP-80-1, 11 p.
- ENVIRONMENT CANADA, 1982. A compendium of information on agricultural pesticides used in the Atlantic Region. Environmental Protection Service, Atlantic Region, 490 p.
- GORDON M.R., McLEAY D.J., 1986. Laboratory test procedures for assessing the acute and chronic effects toward salmonid fish caused by the brush control herbicide Krenite. In : Proceedings of the 11th Annual Aquatic Toxicity Workshop : November 13-15, 1984, Vancouver, B.C. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* N° 1480, 291-293.
- HARWOOD M., BLAISE C., COUTURE P., 1989. Algal interactions with the genotoxic activity of selected chemicals and complex liquid samples. *Aquat. Toxicol.*, 14 : 263-276.
- HATZIOS K.K., PENNER D., 1980. Localizing the action of two thiazolol herbicidal derivatives. *Pesticide Biochem. Physiol.*, 13 : 237-243.
- JONES J.R.E., 1973. Fish and river pollution. Butterworth and Co., Toronto. 230 p.
- KOVACS T., 1986. Effects of bleached kraft mill effluent on freshwater fish : a Canadian perspective. *Water Poll. Res. J. Canada*, 21 : 91-118.
- LEVINE H.G., 1984. The use of seaweeds for monitoring coastal waters. In : Shubert L.E. (ed.), *Algae as ecological indicators*. Academic Press Inc., 189-210.
- MAYER F.L., ELLERSIECK M.R., 1986. Manual of acute toxicity : Interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. US Fish Wildl. Serv., Resour. Publ. 160, 579 p.
- McLEAY D.J., HOWARD T.E., 1977. Comparison of rapid bioassay procedures for measuring toxic effects of bleached kraft mill effluents to fish. In : Proceedings of the 3rd Aquatic Toxicity Workshop, Halifax, Canada. Environmental Protection Service Technical report N° EPS-5-AR-77-1, 141-155.
- MILLER W.E., GREENE J.C., SHIROYAMA T., 1978. The *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay bottle test : Experimental design, application, and data interpretation protocol. US Environmental Protection Agency Report N° EPA-600/9-78-018, Corvallis, OR, 136 p.
- ORGENICS Ltd., 1986. The SOS Chromotest blue kit - Two step version 3, Instructions for use. Organics Ltd., Yavne 70650, Israel, 23 p.
- PARÉ J., SAINT-JEAN R., 1979. Répertoire des pesticides : données sur les produits

- utilisés au Québec. Bureau d'étude sur les substances toxiques, Environnement Québec, 397 p.
- PLEWA M.J., WAGNER E.D., GENTILE G.J., GENTILE J.M., 1984. An evaluation of genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mut. Res.*, 136 : 233-245.
- QUILLARDET P., HUISMAN O., D'ARI R., HOFNUNG M., 1982. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia Coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 : 5971-5975.
- ROBERTS R.J., SHEPHERD C.J., 1974. Handbook of trout and salmon diseases. Fishing News Books Ltd., England, 168 p.
- SCHOENY R., CODY T., RADIKE M., WARSHAWSKY D., 1985. Mutagenicity of algal metabolites of benzo(a)pyrene for *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mutagen.*, 7 : 839-855.
- SNEDECOR G.W., COCHRAN W.G. (eds), 1984. Méthodes statistiques. Association de coordination et technique agricole, 6e édition, Paris, 649 p.
- SPENCER E.Y., 1981. Guide to the chemicals used in crop protection. Agriculture Canada, Research Branch, December 1981, Publication 1093 (seventh edition), 595 p.
- USDA (United States Department of Agriculture), 1986. Pesticide background statements Volume I. Herbicides (supplement). Forest Service, Agriculture Handbook n° 633, 48 p. and appendices.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1985. Guidelines for preparing environmental and waste samples for mutagenicity (Ames) testing : Interim procedures and panel meeting proceedings. EPA/600/4-85/058, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas NV 89114, 255 p.
- VAN DER GAAG M.A., VAN DE KERKHOFF J.F.J., 1985. Mutagenicity testing of water with fish : a step forward to a reliable assay. *Sci. Tot. Environ.*, 47 : 293-298.
- WORTHING C.R., WALKER S.B. (eds.), 1983. The Pesticide Manual, a world compendium : Seventh Edition. British Crop Protection Council Publishers, 695 p.