

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE DE MAÎTRISE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

INRS-Eau

par

Hélène Marquis

Mise en évidence d'un mécanisme de résistance suite à une  
intoxication au cadmium chez Selenastrum capricornutum

Juin 1989

## Résumé

Le présent travail se veut une contribution à l'amélioration des connaissances de l'effet toxique du Cd sur Selenastrum capricornutum. A cette fin, deux groupes d'algues cultivées en sacs ont été exposées à 30 et 70 ppb de  $\text{Cd(II).L}^{-1}$  respectivement pendant une période de 20 j. La croissance de ces algues en fonction de la concentration de Cd à laquelle elles étaient exposées a été étudiée. Des chromatographies des protéines isolées de la fraction cytoplasmique de ces algues et du Cd qui leur était associé ont aussi été réalisées.

Les résultats de cette étude révèlent que plus la concentration de Cd est élevée, moins le taux de croissance des algues est grand. En présence d'une concentration peu élevée de Cd, on a pu observer en début d'exposition un choc toxique suivi d'une récupération marquée de la part de la population. On a aussi observé que plus la concentration de Cd est élevée, plus les cellules accumulent de Cd, et ce surtout dans des protéines de faibles poids moléculaires. Ainsi, l'induction de protéines de faibles poids moléculaires en présence de Cd a été clairement démontrée. Toutefois, le poids moléculaire de même que la quantité exacte de protéines synthétisées n'ont pu être déterminés. On croit cependant qu'un polymère du glutathion du type  $(\alpha\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  serait en cause.

## Remerciements

Je remercie MM. Pierre Couture et Emilien Pelletier pour avoir dirigé ce travail et pour l'aide précieuse et l'encouragement qu'ils m'ont apportés. Je remercie Mme Francine Denizeau de l'U.Q.A.M. qui a accepté de juger ce travail. Je remercie aussi Mme Jocelyne Pellerin de l'U.Q.A.R. de même que MM. Denis Lorrivée et Raynald Côté de l'U.Q.A.C. pour leurs conseils judicieux.

Je tiens à souligner la contribution de M. Claude Thellen et les techniciens du laboratoire sur les bio-essais du Ministère de l'Environnement du Québec qui ont fourni les algues pour les tests préliminaires de cette étude. En outre, je remercie la technicienne Michelle G.-Bordeleau de l'I.N.R.S.-eau, Mme Linda Bouchard de l'U.Q.A.C. et les techniciens de l'I.N.R.S.-océanologie Gervais Ouellette, Marc Leclerc et tout spécialement Ghislain Canuel pour l'aide technique et le temps qu'ils m'ont consacrés. Je remercie également M. Jean-Luc Mouget du G.R.E.R.E.B.A. de l'Université Laval pour son aide dans l'extraction des protéines.

Je voudrais aussi souligner l'aide précieuse de Mme Nathalie Plante pour l'aspect statistique de cette étude.

Enfin, ce travail n'aurait pu être réalisé sans l'aide financière du Fonds F.C.A.R. et de l'I.N.R.S.-eau.

## Table des matières

	Page
Résumé .....	ii
Remerciements .....	iii
Table des matières .....	iv
Liste des figures .....	vii
Liste des tableaux .....	ix
Introduction .....	1
Matériel et méthodes .....	11
1. Choix et culture des cellules végétales .....	11
1.1 Origine de la culture .....	11
1.2 Description du milieu de culture .....	12
1.3 Ensemencement des milieux de culture .....	14
1.4 Cultures en sacs .....	14
1.5 Déroulement de l'expérience .....	17
1.6 Fin de l'expérimentation .....	18
2. Traitement des échantillons .....	19
3. Extraction des protéines .....	20
4. Chromatographie des protéines .....	21
4.1 Préparation du gel et montage de la colonne .....	21
4.2 Calibration de la colonne .....	22

4.3 Application de l'échantillon .....	26
5. Dosage des protéines .....	26
5.1 Dosage des protéines par la méthode du bleu de Commassie .....	26
5.2 Dosage des protéines par mesure de l'absorbance dans l'ultra-violet .....	28
6. Dosage du Cd .....	28
6.1 Dosage du Cd dans les milieux de culture .....	28
6.2 Dosage du Cd au four au graphite .....	30
7. Traitement des données .....	30
8. Produits chimiques .....	32
Résultats .....	33
1. Croissance de <u>S. capricornutum</u> .....	33
1.1 Croissance avant contamination au Cd .....	33
1.2 Croissance après contamination au Cd .....	33
2. Contenu en Cd des milieux de culture .....	40
3. Chromatogrammes des protéines et peptides et du Cd associé .....	43
3.1 Chromatogrammes des algues témoins .....	43
3.2 Chromatogrammes de la deuxième condition expérimentale	46
3.3 Chromatogrammes de la troisième condition	

<b>expérimentale</b> .....	<b>49</b>
<b>4. Cadmium contenu dans les fractions</b> .....	<b>51</b>
<b>5. Dosage des protéines par la méthode du bleu de Commassie</b> .....	<b>52</b>
<b>6. Balayage dans l'ultra-violet</b> .....	<b>56</b>
<b>Discussion</b> .....	<b>58</b>
<b>1. Concentration de Cd et taux de croissance</b> .....	<b>58</b>
<b>2. Concentrations effectives de Cd</b> .....	<b>60</b>
<b>3. Concentration de Cd et synthèse de peptide</b> .....	<b>62</b>
<b>4. Synthèse de peptides et taux de croissance</b> .....	<b>65</b>
<b>5. Identification des peptides chélateurs</b> .....	<b>68</b>
<b>6. Effet global du Cd sur <u>S. capricornutum</u></b> .....	<b>69</b>
<b>6.1 Morphologie des cellules</b> .....	<b>69</b>
<b>6.2 pH des milieux de culture</b> .....	<b>73</b>
<b>6.3 Présence de peptides phytochélateurs</b> .....	<b>74</b>
<b>6.4 Mode d'action possible du Cd</b> .....	<b>77</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>79</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>81</b>

## Liste des figures

Figure	Page
1 Toxicologie aquatique: une science multidisciplinaire .....	2
2 Montage expérimental .....	15
3 Calibration de la colonne à chromatographie .....	24
4 Profil d'élution des protéines étalons et du glutathion .....	25
5 Courbe étalon réalisée avec de l'albumine sérique bovine .....	27
6 Croissance de <u>S. capricornutum</u> entre le 14 juin et le 11 juillet .	34
7 Croissance de <u>S. capricornutum</u> entre le 12 juillet et le 1 août ...	35
8 Croissance des cellules de <u>S. capricornutum</u> soumises à trois conditions expérimentales .....	36
9 Chromatogrammes des algues témoins .....	43
10 Concentration de Cd dans les fractions des chromatographies effectuées avec les protéines extraites des algues témoins .....	44
11 Chromatogrammes de la deuxième condition expérimentale .....	46
12 Concentrations de Cd associées aux fractions de la deuxième condition expérimentale .....	47
13 A. Profil d'élution des protéines extraites des algues exposées à 70 ppb de Cd(II) .....	49
13 B. Concentrations de Cd associées aux fractions .....	49

<b>14</b>	<b>Concentration de protéines dans les chromatographies des algues</b>	
	témoins .....	<b>52</b>
<b>15</b>	<b>Concentration de protéines des chromatographies des algues de la</b>	
	<b>deuxième condition expérimentale .....</b>	<b>53</b>
<b>16</b>	<b>Concentration de protéines des chromatographies des algues de la</b>	
	<b>troisième condition expérimentale .....</b>	<b>54</b>
<b>17</b>	<b>Balayage entre 200 et 300 nm de la fraction 87 de la troisième</b>	
	<b>condition expérimentale .....</b>	<b>56</b>
<b>18</b>	<b>Distribution des espèces de Cd soluble dans l'eau douce .....</b>	<b>76</b>

## Liste des tableaux

Tableau		Page
1	Conditions d'utilisation du four au graphite .....	31
2	A. Analyse de variance des données de croissance pour les trois conditions expérimentales .....	38
2	B. Comparaison des taux de croissance de chacune des conditions expérimentales .....	38
3	Evolution des pH des milieux de culture .....	39
4	Quantité totale de Cd(II) dans les milieux de culture .....	41
5	Quantité de Cd(II) dosée dans les surnageants .....	42
6	Quantité de Cd(II) dosée dans les culots .....	42

## INTRODUCTION

L'écotoxicologie est un domaine d'étude offrant des possibilités de recherches multiples (fig. 1). Parmi celles-ci mentionnons l'étude qualitative et quantitative des effets adverses de produits xénobiotiques sur les organismes aquatiques. L'étude du transport, de la distribution, de la transformation et du destin de ces produits dans le milieu (Rand et Petrocelli, 1985) est aussi intéressante. L'écotoxicologie touche deux champs d'activités principaux: l'un ayant trait à la gestion de l'environnement et l'autre à la recherche. Le premier a contribué au développement de bio-essais et à la précision de normes pour sauvegarder la qualité de l'environnement. Le second considère surtout les mécanismes d'action chimiques et biochimiques et les processus physiologiques. Ce deuxième champ d'activités se développe activement depuis quelques années. Mentionnons, à titre d'exemple, les recherches effectuées récemment sur les mécanismes d'action conférant une résistance aux organismes vivant dans des milieux pollués par les métaux. Il va sans dire que ces deux champs de l'écotoxicologie sont étroitement liés et que les connaissances acquises par les activités de recherche influencent grandement l'orientation des travaux des gestionnaires de l'environnement.

L'étude du processus de résistance chez les algues unicellulaires

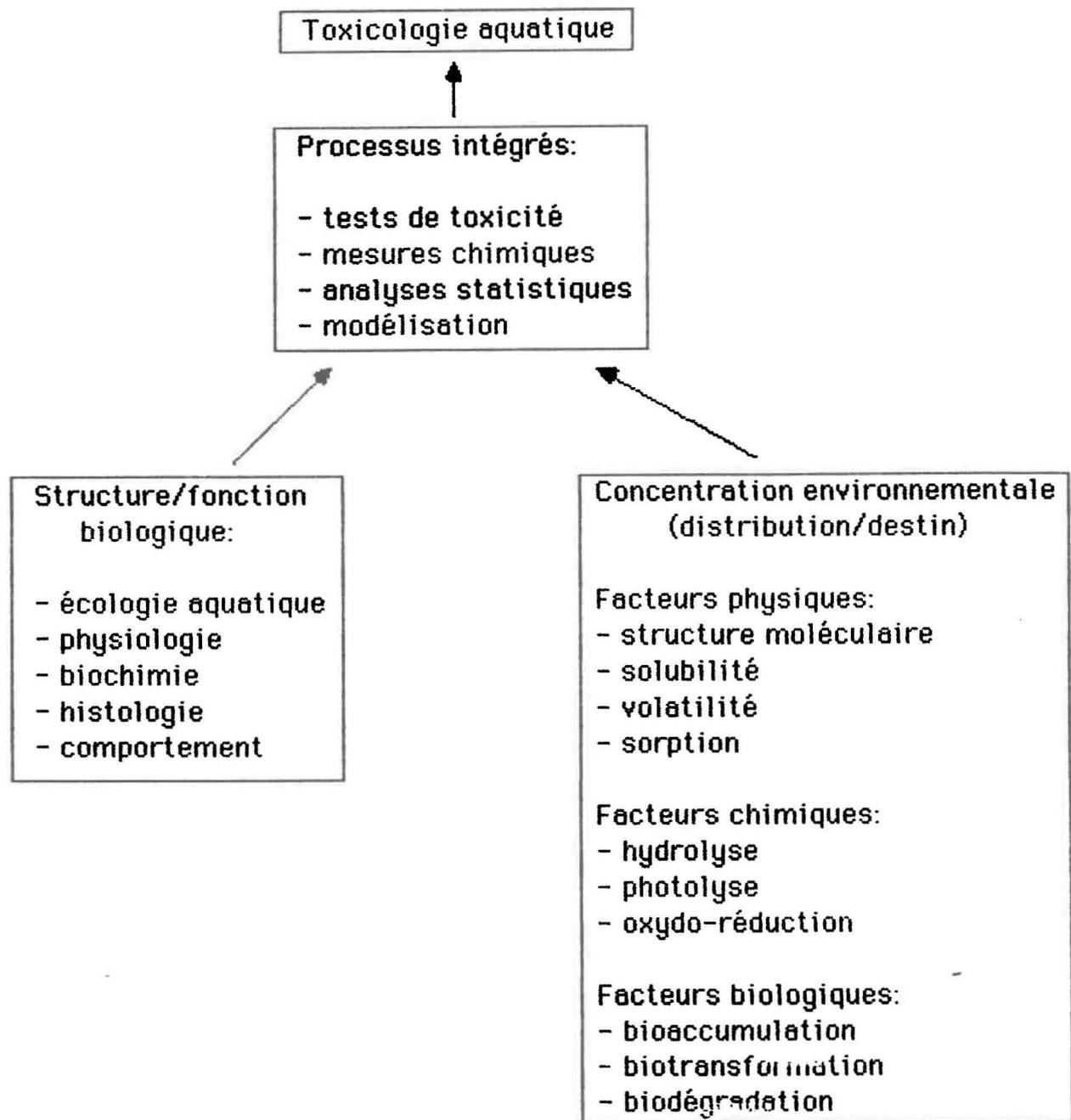


Figure 1. Toxicologie aquatique: une science multidisciplinaire.  
(adapté de Rand et Petrocelli, 1985).

est une avenue particulièrement intéressante. On sait depuis quelque temps déjà que les algues unicellulaires peuvent développer une résistance à un milieu pollué (Sorentino, 1978; Rai, 1981; Stokes, 1983). Cette résistance peut devenir un élément problématique majeur dans l'environnement du fait que ces algues font partie de la chaîne alimentaire. En effet, les espèces résistantes étant favorisées, elles deviennent dominantes dans le peuplement et ont un rôle déterminant sur l'intégration de polluants dans les divers maillons de la chaîne. L'étude de l'accumulation des métaux et de la façon dont ils sont métabolisés est particulièrement importante dans la compréhension du phénomène.

Les études réalisées sur l'accumulation des métaux ont permis d'acquérir des informations sur la prise en charge de métaux par des populations tolérantes et non-tolérantes de micro-algues. Ces études ont mis en lumière deux mécanismes. Premièrement, la concentration de métal accumulée par les populations résistantes est plus faible que celle accumulée par les populations non-résistantes (Foster, 1977; Borioud et al., 1985). En deuxième lieu, pour les mêmes concentrations de métal, le taux de croissance des populations tolérantes sera beaucoup moins affecté que celui des populations non-résistantes (Foster, 1977).

Les résultats obtenus dans les expériences ayant trait à la prise

en charge et à l'accumulation de métaux chez les algues unicellulaires révèlent que les mécanismes de résistance sont et/ou impliquent des mécanismes de détoxification (Stokes, 1983).

Parmi ces mécanismes de résistance, mentionnons entre autres, la synthèse de protéines de type métallothionéines.

Depuis quelques années, plusieurs chercheurs ont tenté de faire la lumière sur la présence et le rôle des métallothionéines. Ces protéines fixatrices de métaux de faibles poids moléculaires ont été relativement bien étudiées chez les vertébrés (Ridlington et al., 1981) et particulièrement chez les humains (Rugstad et Norseth, 1975). De telles protéines ont été mises en évidence chez les plantes vasculaires supérieures. Toutefois, les chercheurs en biologie végétale ne sont pas unanimes quant à leurs caractéristiques: synthèse, poids moléculaire, etc.. Même leur nom est sujet à controverse: certains les appellent des phytométallothionéines (Rauser, 1987), d'autres des phytochélatines (Grill, 1985).

Il existe des évidences quant au pouvoir de détoxification des protéines fixatrices de métaux. Il est bien connu qu'une souche d'algues non-résistante mise en contact avec une concentration même faible de métal décline parce que le métal se lie aux organites de la cellule ou intervient dans des voies métaboliques et ainsi, empêche son bon

fonctionnement (Nuzzi, 1972; Foster, 1977; Saboski, 1977; Sorentino, 1978; Smith, 1983; Stauber et Florence, 1987; Bastien et Côté, 1989a). Par contre, la présence de protéines fixatrices de métaux diminuerait la quantité de métal "disponible" pour les organites et les diverses voies métaboliques de la cellule. On croit que les protéines fixatrices de métaux auraient un effet protecteur sur les organites et les voies métaboliques en désactivant les métaux dans la cellule. La population d'algues aura ainsi la possibilité de croître à un rythme d'autant plus près de celui d'une population normale que la concentration de métal actif sera faible (Butler et al., 1980; Bastien et Côté, 1988 a et b).

Plusieurs scénarios ont été suggérés quant aux processus de détoxification. Généralement, on pourrait distinguer dans le processus de détoxification deux genres de mécanismes dont l'activation est très différente comme nous le constaterons plus loin. En effet, l'un résulterait en la synthèse de métallothionéines et l'autre serait caractérisé par la présence de phytochélatines.

Très récemment, Bastien et Côté (1988b) ont proposé une séquence d'événements qui expliquerait le premier genre de mécanisme décrit ci-haut. La série d'événements suggérée décrit les mécanismes

activés par la cellule à court, moyen et long terme suite à une intoxication au cuivre. Brièvement, les étapes sont les suivantes:

i) en moins de 24 h, on observe une altération des membranes et un déséquilibre osmotique;

ii) entre 24 h et 4 j, on constate une diminution du taux de croissance, une augmentation du nombre d'inclusions intravacuolaires, une accumulation d'amidon et de lipides;

iii) entre 72 h et 15 j, les cellules sont peu actives;

iv) après 22 j, la densité cellulaire du groupe expérimental est semblable à celle du groupe témoin. Les cellules démontrent la présence de nombreux ribosomes, un développement prononcé du réticulum endoplasmique et une activité de synthèse accrue. De plus, on observe la disparition des inclusions intravacuolaires;

v) après 50 j, le facteur de bioaccumulation du groupe expérimental est très faible (17) et les taux de croissance des deux groupes sont identiques.

A partir de ces événements, on peut poser l'hypothèse de l'existence de processus ou mécanismes importants de détoxification. A court terme, les granules de polyphosphates ou inclusions intravacuolaires lieraient le cuivre, le rendant ainsi moins disponible au reste de la cellule. A moyen terme, l'appareil de synthèse serait appelé à se développer. Et

enfin, à long terme, les protéines synthétisées iraient lier le cuivre présent dans la cellule. Etant donné que le facteur de bioaccumulation est très faible, on peut croire que le complexe "protéine fixatrice-cuivre" serait libéré dans l'environnement. Plusieurs auteurs ont suggéré l'existence d'un tel processus pour le cuivre ainsi que pour d'autres métaux (Foster, 1977; McKnight et Morel, 1979; Rai et al., 1981; Stokes, 1983; Bariaud et al., 1985). D'autres auteurs ont proposé que ces protéines fixatrices de métaux migreraient vers la membrane extérieure de la cellule et iraient lier le métal avant même qu'il n'entre dans la cellule (Butler et al., 1980; Smith, 1983).

On peut dire que la synthèse de protéines fixatrices de métaux constitue un mécanisme de résistance très puissant. En effet, après 22 j d'expérimentation, on n'a observé aucune différence entre le taux de croissance du groupe expérimental et celui du groupe témoin (Bastien et Côté, 1989b).

Le deuxième type de mécanisme de détoxification résulterait en la présence de phytochélatines. Les phytochélatines ont été isolées de presque tous les végétaux, des plantes supérieures aux algues unicellulaires. Par leur structure différente,  $(\alpha\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  où  $n = 2$  à  $11$  (Grill et al., 1987b), et la présence de liens  $\alpha\text{-glutamyl}$ , les phytochélatines seraient

induites via la polymérisation enzymatique de précurseurs peptidiques tels que le glutathion ou la  $\gamma$ -glutamyl-cystéine. Ainsi, les phytochélatines ne seraient pas induites directement par les gènes comme c'est le cas pour les métallothionéines (Grill et al., 1986, 1987b). D'après ces considérations, on serait donc en présence d'une divergence évolutive entre les plantes et les animaux (Gekeler et al., 1988). En effet, la synthèse de métallothionéines serait le moyen de désintoxication privilégié chez tous les animaux mais pas chez les plantes.

La plupart des travaux effectués récemment sur les mécanismes de résistance développés par les microorganismes phytoplanctoniques concernent soit leur ultrastructure (Saboski, 1977; Smith, 1983; Bastien et Côté, 1988 a et b), soit la présence ou l'absence de mécanismes d'exclusion des métaux chez ceux-ci (Foster, 1977; McKnight et Morel, 1979; Rai et al., 1981; Bariaud et al., 1985). Pour ce qui est des protéines fixatrices de métaux, beaucoup reste à faire. Certains auteurs mentionnent la présence de complexes organo-métalliques mais apportent très peu de renseignements sur ceux-ci (Butler et al., 1980; Rai et al., 1981; Smith, 1983; Stokes, 1983).

Quelques caractérisations des protéines fixatrices de métaux ont été réalisées chez les algues unicellulaires. Bariaud et coll. (1985) ont isolé

de la fraction soluble de la cellule d'Euglena gracilis un type de protéines de poids moléculaire élevé (PM > 50 000) auquel plus de 80% du cadmium cellulaire était lié. Par contre, seulement quelques traces de cadmium étaient associées à la fraction où aurait dû se trouver les métallothionéines (PM 10 000). Piccinni et coll. (1985) ont isolé chez Euglena gracilis deux protéines fixatrices de cuivre dont les poids moléculaires (7 000 et 3 500) et la composition en acides aminés étaient très différents.

Gekeler et coll. (1988), pour leur part, ont isolé chez Chlorella fusca des peptides phytochélateurs dont la structure,  $(\alpha\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  où  $n = 2$  à 5, se rapproche beaucoup du glutathion. Par ailleurs, les auteurs rapportent que des espèces de 6 des 10 classes des Phycophytes ont aussi synthétisé des peptides phytochélateurs après une exposition au cadmium. Ces résultats ainsi que des résultats antérieurs portant sur les plantes supérieures (Grill et al., 1985, 1987a, b) amènent les auteurs à suggérer que tous les végétaux possèderaient un même mécanisme de chélation des métaux c'est-à-dire, la synthèse de phytochélatines.

Des études similaires ont été effectuées chez les bactéries. Higham et Sadler (1984) ont isolé chez Pseudomonas putida trois protéines fixatrices de métal dont les poids moléculaires se situaient entre 4 000 et 7 000. De même, Vercheval (1988) a mis en évidence une protéine fixatrice de métal de poids moléculaire 20 000 chez Alcaligenes eutrophus.

On se rend compte que les informations sur les protéines fixatrices de métaux chez les microorganismes, particulièrement phytoplanctoniques, sont assez limitées. Dans cette perspective, le présent travail vise l'amélioration des connaissances sur la présence des protéines fixatrices de métaux en relation avec le taux de croissance des populations d'algues unicellulaires. Ainsi, nous comptons confirmer ou infirmer trois hypothèses en considérant les relations entre, d'une part, la prise en charge du cadmium (Cd) et les taux de croissance (H1 et H2), et d'autre part, la présence de protéines fixatrices (H3):

H1) plus la concentration de Cd est élevée, plus la cellule accumule de Cd;

H2) plus la concentration de Cd est élevée, plus le taux de croissance est faible;

H3) la présence de protéines fixatrices de Cd est d'autant plus importante que la concentration de celui-ci est élevée.

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Choix et culture des cellules végétales.

Des algues de l'espèce Selenastrum capricornutum sont utilisées pour cette étude en raison de l'abondance du genre Selenastrum dans les eaux douces du continent nord-américain et de sa grande tolérance à diverses conditions environnementales (Rodhe, 1978). De plus, les travaux récents effectués par notre équipe de recherche sur cette espèce (Cluis et al., 1988; Thompson et al., 1987; Langis et al., 1986; Wong et Couture, 1986), ont permis de bien se familiariser avec les caractéristiques physiologiques de cette espèce.

#### 1.1 Origine de la souche.

Les algues de l'espèce S. capricornutum sont des algues unicellulaires de la classe des Chlorophycées et de l'ordre des Chlorococcales. Cette algue a été isolée de la rivière Nivelta en Norvège par Olav M. Skulberg en 1959. Ces algues sont unicellulaires et sont non-motiles pendant tout leur cycle vital (Miller et al., 1978). La souche ATCC 22662 de l'American Type Culture Collection au Maryland a été utilisée.

## 1.2 Description du milieu de culture.

Le milieu de culture de type AAP (Algal Assay Procedure: Stein, 1973) modifié par l'absence d'EDTA est réalisé. Les solutions-mères de micronutriments sont filtrées sur un filtre de 0,45 µm avant d'être utilisées pour la préparation des milieux de culture.

Les solutions ainsi obtenues sont agitées puis autoclavées (autoclave: Market Forge Sterilmatic, modèle; STM-E, Type C) pendant 20 à 40 min dépendamment du volume des contenants utilisés. La solution-mère de fer est ajoutée après le refroidissement des milieux de culture. Le tout est ensuite filtré sur un filtre Millipore de type GS de 0,22 µm à l'aide d'une pompe Masterflex de Cole Parmer (modèle no. 7564-00). Un filtre de 0,45 µm est utilisé lorsque de grands volumes de milieu de culture doivent être filtrés.

Il est à noter que toute la verrerie utilisée pour la préparation des milieux de culture est lavée à l'acide nitrique 10-15%, rincée 3 fois à l'eau déminéralisée et 3 fois à l'eau nanopure, pour être ensuite autoclavée 20 min. Tous les accessoires (filtres, porte-filtre, seringue, aiguille, pipettes, tiges de verre, etc.) sont aussi rincés à l'eau déminéralisée et autoclavés 20 min dans des sacs à autoclaver.

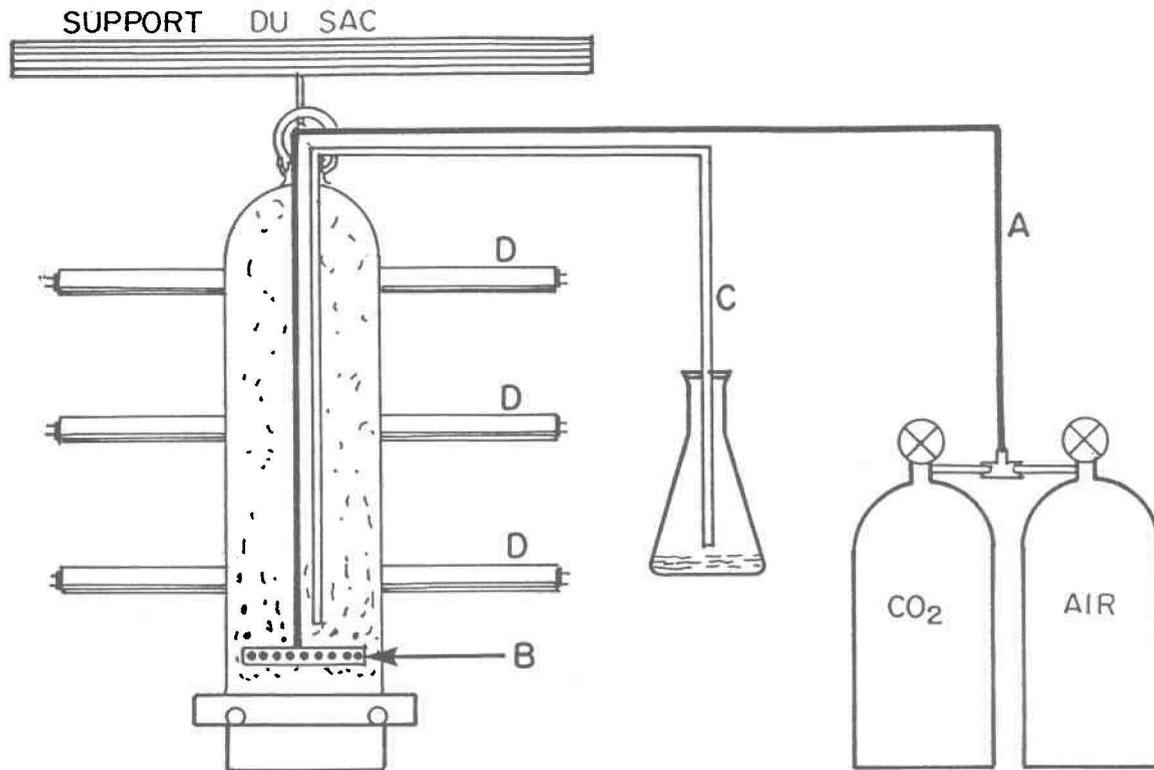
### 1.3 Encemencement des milieux de culture.

En début d'expérience, les souches de S. capricornutum sont transférées dans 3 erlenmeyers de 250 mL. Le contenu de chacun de ces erlenmeyers sert d'inoculum pour un erlenmeyer de 4 L. La croissance s'effectue en éclairage continu (2 fluorescents de 48 po., lumière blanche GE) et à la température de la pièce (entre 21 et 25 °C). L'ensemencement des milieux de culture est réalisé quand les cellules sont en phase exponentielle de croissance. La densité cellulaire est déterminée quotidiennement par la méthode de l'hémacytomètre à l'aide d'un microscope en contraste de phase (Ortholux 2 Leitz).

### 1.4 Cultures en sacs.

Afin de s'assurer d'obtenir une quantité suffisante de protéines végétales pour les étapes subséquentes de l'expérience, nous avons procédé à la mise en culture dans des sacs de plastique (fig. 2). Ce genre de culture permet de travailler avec un grand volume de milieu de culture sans les problèmes d'éclairage qui en résultent habituellement. En effet, sur toute la longueur du sac, son épaisseur maximale est de 30 cm.

Les sacs de plastique se présentent sous forme de rouleau et sont



**Légende:**

- a: tuyau d'arrivée du CO<sub>2</sub> et de l'air (ajustement du pH).
- b: tube perforé permettant l'arrivée d'air dans le sac.
- c: tuyau de prélèvement.
- d: fluorescent.

Figure 2. Montage expérimental.

coupés de façon à obtenir un volume variant de 40 à 50 L environ. Les sacs sont lavés à l'eau de Javel commerciale et ensuite rincés plusieurs fois à l'eau déminéralisée et à l'eau nanopure. Puis, les sacs sont doublés, en cas de fuite, et suspendus dans le laboratoire humide de l'INRS-Océanologie à Pointe-au-Père.

Les milieux de culture ont été préparés, comme décrit précédemment, aux laboratoires de l'INRS-Océanologie à Rimouski. Quelques 120 L de milieu de culture ont été transportés à Pointe-au-Père dans des contenants de type jerrycan de 10 et 20 L. Ces contenants ont tout d'abord été rincés à l'eau déminéralisée puis, une solution de 5% d'eau de Javel commerciale-eau déminéralisée était ajoutée et les contenants étaient mis à tremper pour 24 h ou plus. Par la suite, ils étaient rincés 3 fois à l'eau déminéralisée et 3 fois à l'eau nanopure. Finalement, les contenants étaient remplis d'eau nanopure jusqu'à utilisation.

Chaque erlenmeyer de 4 L servait d'inoculum pour un sac de plastique. Les sacs ont étéensemencés le 2 août 1988 et chacun contenait environ 40 L de milieu de culture.

Les solutions-mères de Cd divalent (Cd II) étaient réalisées à partir d'un étalon de Cd (BDH) 1mg = 1mL. La verrerie servant à cette fin avait été nettoyée selon le protocole décrit à la section 1.2. Le pH des solutions-mères était ajusté à 7,00 avec du NaOH 10% à l'aide d'un pHmètre

(Radiometer, modèle PHM62).

L'alimentation en air des sacs était assurée grâce à un cylindre d'air comprimé. Un cylindre de CO<sub>2</sub> était relié au tube d'air comprimé et permettait l'ajustement simultané du pH dans les sacs. Généralement, un mélange d'environ 2% CO<sub>2</sub>- 98% air comprimé circulait dans les sacs. Enfin, c'est par le tuyau de prélèvement qu'étaient recueillies quotidiennement les quantités de milieu de culture servant à la détermination du pH, au décompte cellulaire et aux différents prélèvements requis pour l'expérimentation.

### 1.5 Déroulement de l'expérience.

Les solutions-mères de Cd ont été ajoutées aux sacs le 3 août 1988, ce qui constituait le jour 0 de l'expérience. Les conditions expérimentales étaient les suivantes:

Sac 1: Témoin (aucun ajout de Cd).

Sac 2: 30 ppb de Cd(II)

Sac 3: 70 ppb de Cd(II)

Tout au long de l'expérience, la densité cellulaire, de même que le pH ont été déterminés quotidiennement. L'éclairage était en continu au début de l'expérience mais une photopériode 12:12 a été instaurée à t = 72 h. La

température se situait à environ 20 °C et variait très peu.

Des prélèvements pour l'analyse du contenu total en Cd par spectrophotométrie d'absorption atomique (four au graphite) ont été effectués aux temps suivants: 24 h et 72 h, 5, 10, 15 et 20 j.

### 1.6 Fin de l'expérimentation.

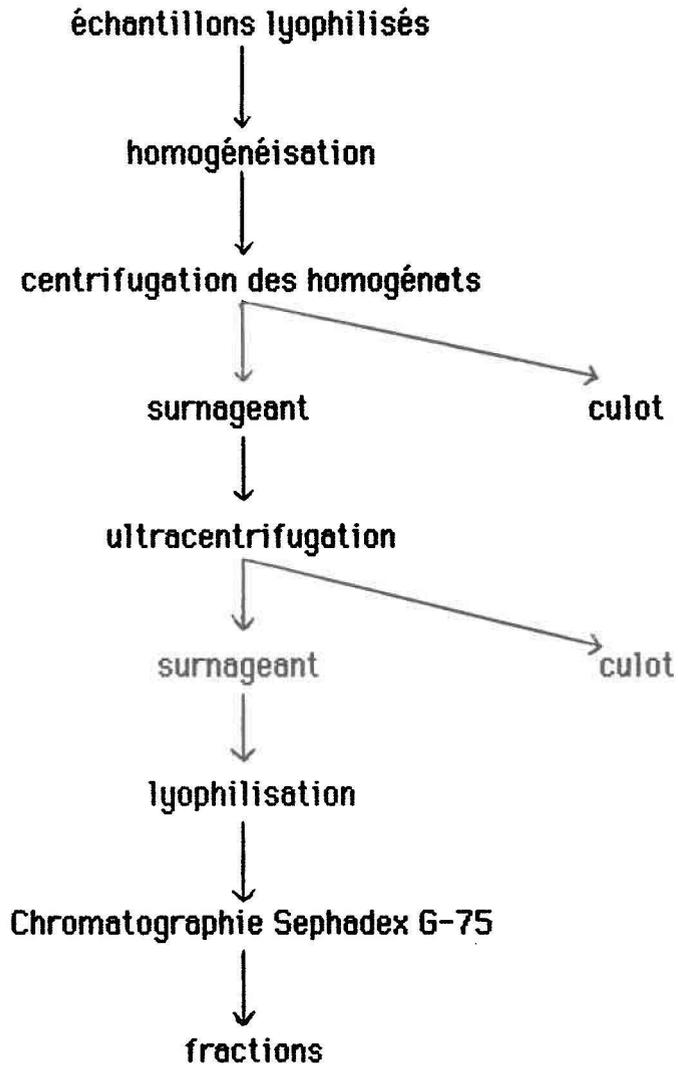
Les milieux de culture ont été centrifugés en continu à l'aide d'une centrifugeuse Beckman J-21C, rotor JCF-Z, à 15 °C. La vitesse de centrifugation pour le sac témoin était de 14 000 g et de 10 000 g pour les sacs contenant 30 et 70 ppb de Cd(II). La vitesse de la pompe (Masterflex de Cole Parmer, modèle no. 7564-00) était de 320 mL.min<sup>-1</sup>.

Après la centrifugation de chacun des sacs, les cellules végétales étaient lavées avec 300 mL d'EDTA 10<sup>-3</sup> M à pH 7,20 et ensuite rincées avec 400 mL d'eau déminéralisée. Le système de centrifugation était lavé à l'eau nanopure entre chaque centrifugation.

Le culot de cellules fut mis dans des bouteilles de polypropylène et les cellules ont été congelées à -80 °C pour un temps minimal de 3 h. Puis, les cellules furent lyophilisées sous vide à -55 °C (lyophilisateur: Virtis Unitrad, modèle 10-100), à une pression de 20 micromètres de Hg, et conservées au congélateur (-20 °C) jusqu'à utilisation.

## 2. Traitement des échantillons

Le diagramme suivant résume le traitement des échantillons:



Le détail de chacune de ces étapes est discuté dans le texte qui suit.

### 3. Extraction des protéines

Toutes les étapes qui suivent sont réalisées à 4 °C à moins d'indications contraires.

Du tampon Tris/HCl 0,01 M à pH 8,6 auquel on additionne entre 5 et 10 mM de 2-mercaptoéthanol et 0,02% de  $\text{NaN}_3$  est ajouté aux échantillons lyophilisés à raison de 5 mL par 100 mg de cellules (poids sec). La présence de 2-mercaptoéthanol dans la solution aide à réduire les risques de redistribution du Cd causés par l'oxydation des thiols (Minkel et al., 1980). De plus, l'azide de sodium est utilisé comme antibactérien. Ce produit est reconnu comme étant non-réactif avec les protéines et ne modifie pas leur comportement chromatographique (Pharmacia Fine Chemicals).

L'homogénéisation est réalisée à l'aide d'une presse de French (French Pressure Cell Press; AMISCO; piston de 1 po. de diamètre; sélecteur à HIGH ratio; pression à 2 000 au cadran). Un volume d'environ 40 mL peut être traité lors d'un passage dans la presse de French. Le liquide récupéré est barboté avec de l'azote gazeux. Deux passages à 30 000 psi (2 041 atm) ont été nécessaires afin de briser la majorité des cellules. Le bris des cellules a été vérifié au microscope optique (Wild Hurbrugg).

L'homogénat est centrifugé à 8 000 g et 4 °C pendant 50 min (Centrifugeuse Beckman J-21C, rotor JS 7,5 avec adaptateurs pour tubes de

50 mL). Le surnageant est prélevé et ultracentrifugé (Ultracentrifugeuse Beckman, modèle L2-65B, rotor SW 40 Ti) pendant 90 min à 105 000 g et 4°C. Le surnageant résultant de cette ultracentrifugation est recueilli dans des bouteilles de polypropylène, remis au congélateur à -80 °C jusqu'à congélation parfaite. Par la suite, le surnageant contenant les protéines est lyophilisé sous vide comme décrit précédemment (voir la section 1.6) et conservé au congélateur.

#### **4. Chromatographie des protéines**

##### **4.1 Préparation du gel et montage de la colonne.**

Le gel Sephadex G-75 (Pharmacia Fine Chemicals) est mis à gonfler dans du tampon Tris/HCl (0,01 M; pH 8,6; 0,02% NaN<sub>3</sub>) pendant 24 h à 4°C. Ensuite, le gel est dégazé sous vide et entreposé à 4°C.

Une colonne Pharmacia en polycarbonate (hauteur: 100 cm; diamètre: 20 mm) est utilisée. Avant utilisation, la colonne est lavée à l'acide nitrique 10 à 15%, rincée à l'eau déminéralisée et à l'eau nanopure. La colonne est emplie d'eau nanopure jusqu'à ce qu'elle soit utilisée. Tous les accessoires de la colonne ont aussi trempé dans de l'eau nanopure.

Le remplissage de la colonne est effectué comme suit: la colonne

est d'abord empli de tampon Tris/HCl puis le gel Sephadex est déposé dans la colonne goutte à goutte à l'aide d'une pipette Pasteur. La colonne est placée en chambre froide à 4 °C. Du tampon est mis à circuler dans la colonne pendant 2 à 3 j afin de terminer la sédimentation et le tassement du gel. De l'albumine sérique bovine est passée dans la colonne pour assurer le revêtement du gel. La colonne est alors prête à être utilisée.

Un réservoir de tampon est relié au haut de la colonne. La sortie de la colonne est reliée au collecteur de fractions de type colimaçon (Gilson, modèle MFK Fractionator) via une pompe. Le débit de la pompe (Gilson, modèle Minipuls 2) est de  $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , des fractions de 4 mL sont recueillies. La hauteur du gel dans la colonne est de 96 cm, ce qui correspond à un volume total de gel de  $302 \text{ cm}^3$ .

#### 4.2 Calibration de la colonne.

La colonne est calibrée à l'aide de protéines et d'un peptide étalons de poids moléculaires connus. En premier lieu, le volume mort de la colonne est déterminé avec du bleu de Dextran (PM 2 000 000). Quatre protéines étalons et un peptide sont ensuite utilisés pour calibrer la colonne: l'albumine sérique bovine (PM 66 000), l'anhydrase carbonique (PM 29 000), le cytochrome C (PM 12 400), l'aprotinine (PM 6 500) et le glutathion réduit

(PM 307,3).

A l'intérieur des limites d'exclusion de la colonne (entre 3 000 et 70 000 daltons de poids moléculaire), il existe une relation linéaire entre le logarithme du poids moléculaire d'une protéine et sa constante d'éluion ( $K_e$ ). Le passage des protéines dans la colonne à chromatographie est déterminé par la lecture de l'absorbance des fractions à 280 nm. On établit ainsi une courbe de calibration propre à la colonne. Le calcul de la constante d'éluion s'effectue comme suit:

$$K_e = \frac{V_e}{V_0} = \frac{\text{Volume d'éluion de la protéine}}{\text{Volume mort de la colonne}}$$

Une droite est ensuite tracée avec en ordonnée le logarithme du poids moléculaire des protéines étalons et en abscisse leur constante d'éluion (fig. 3). Ceci nous permet de déterminer par interpolation le poids moléculaire d'une protéine à l'aide de sa constante d'éluion.

Comme les protéines et peptides liant les métaux toxiques retrouvés dans les plantes sont parfois très petits (Stauber et Florence, 1986, 1987), du glutathion a aussi été passée sur la colonne. Ceci a été effectué dans la but de calibrer de façon approximative les peptides correspondant à ce volume d'éluion (fig. 4).

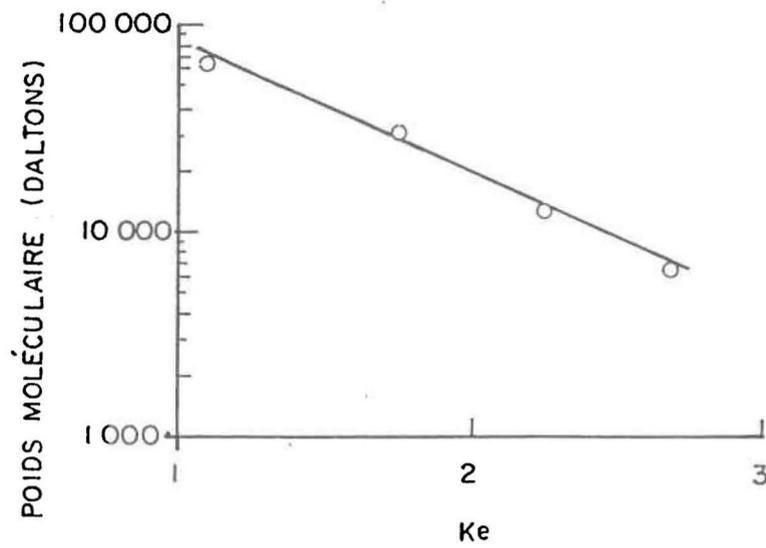


Figure 3. Calibration de la colonne à chromatographie d'après les poids moléculaires et les volumes d'élution des protéines étalons.

#### **4.3 Application de l'échantillon.**

Environ  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  de protéines lyophilisées sont redissoutes dans 5 mL de tampon Tris/HCl (0,01 M; pH 8,6) avec 0,02%  $\text{NaN}_3$  et 5 à 10 mM de 2-mercaptoéthanol. L'échantillon est déposé sur la colonne et une élution descendante est effectuée par passage de tampon à un débit de  $0,2 \text{ mL.min}^{-1}$ . Des fractions de 4,0 mL sont recueillies dans des éprouvettes de verre qui ont été préalablement lavées à l'acide nitrique 10 à 15% pendant 24 h et à l'eau nanopure pendant 24 h aussi. Une chromatographie complète prend environ 24 h.

### **5. Dosage des protéines**

#### **5.1 Dosage des protéines par la méthode du bleu de Commassie.**

Les protéines contenues dans les homogénats, les surnageants et les fractions sont dosées par la méthode du bleu de Commassie (Bradford, 1976) à l'aide du réactif Bio-rad. Une courbe étalon de type Eppendorf est réalisée avec de l'albumine sérique bovine (fig. 5). Le dosage des échantillons est effectué en ajoutant 200  $\mu\text{L}$  de réactif Bio-rad à 800  $\mu\text{L}$  d'échantillon et en lisant l'absorbance à 595 nm (spectrophotomètre Perkin

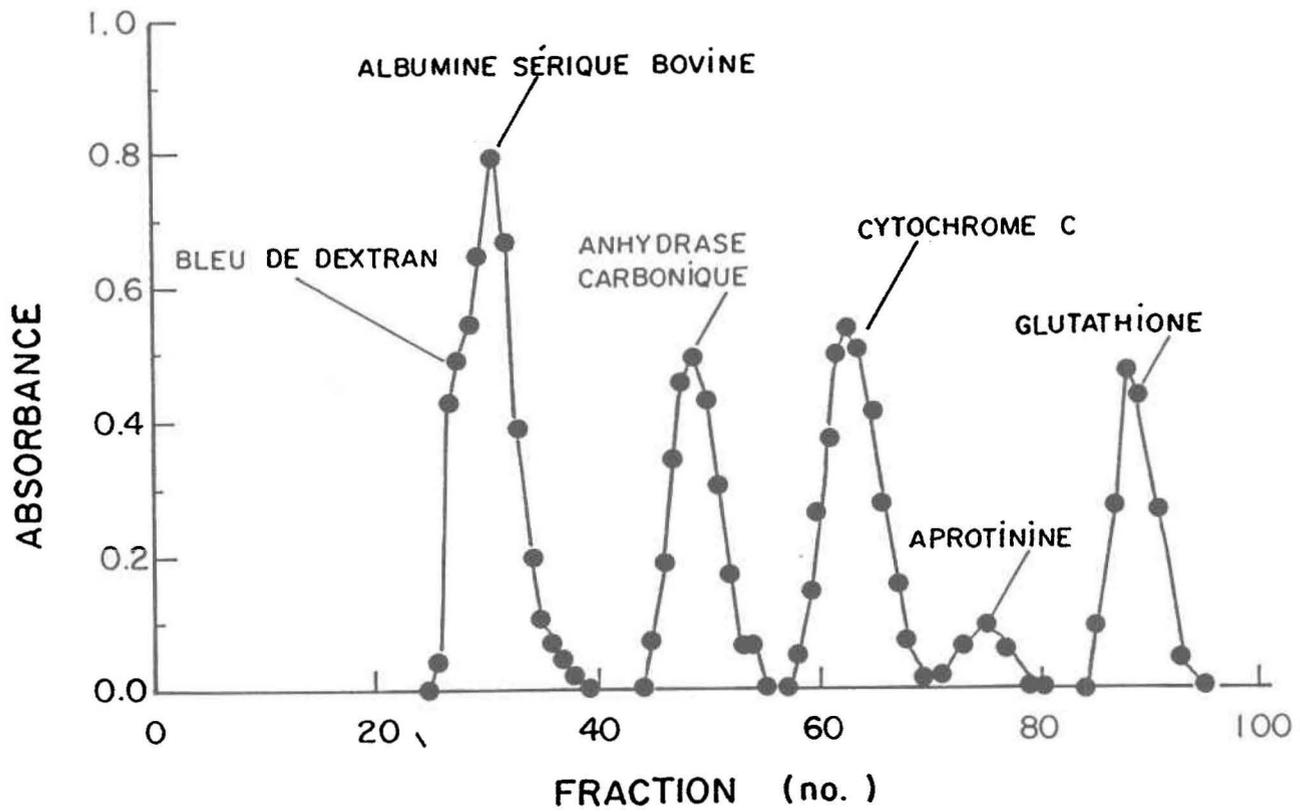


Figure 4. Profil d'élution des protéines étalons et du glutathion. Protéines étalons dosées à 280 nm, glutathion dosé à 236 nm.

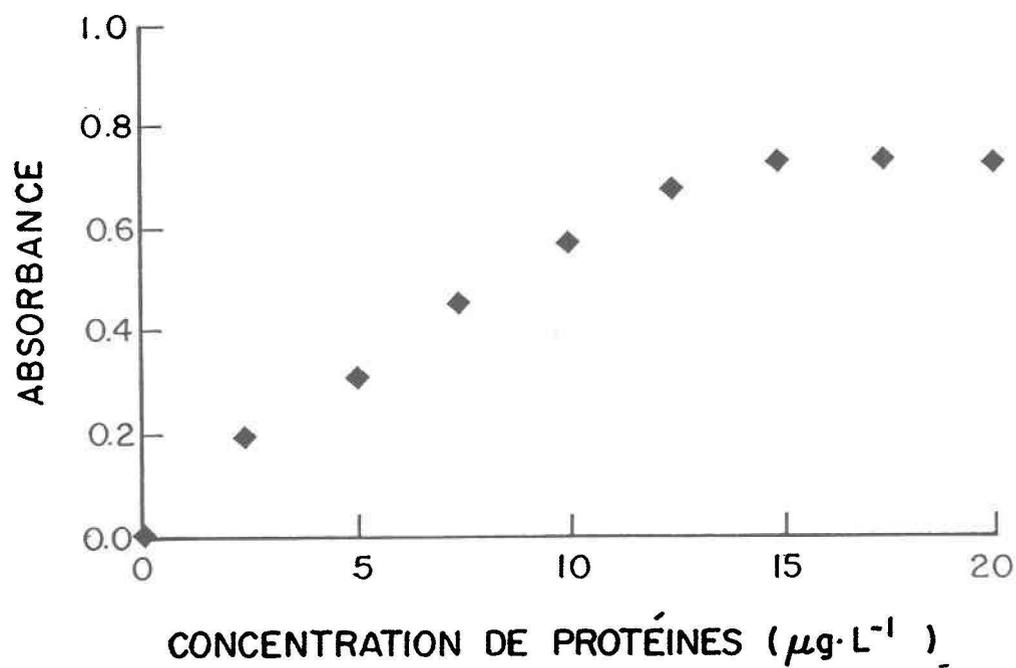


Figure 5. Courbe étalon de type Eppendorf réalisée avec de l'albumine sérique bovine. Absorbance des fractions lue à 595 nm.

Elmer Coleman 575) 10 min après l'addition du réactif. Le mélange est stable entre 10 min. et une heure après l'addition du réactif. Des cuvettes de verre sont utilisées et elles sont nettoyées avec de l'éthanol 70%.

## **5.2 Dosage des protéines par mesure de l'absorbance dans l'UV.**

L'évaluation de la concentration en protéines dans les fractions est effectuée à la fin de la chromatographie par mesure de l'absorbance dans l'UV à 2 longueurs d'onde (254 et 280 nm) sur un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 3 UV/VIS (Série 37573). La lecture à 280 nm correspond à la longueur d'onde d'absorption des acides aminés aromatiques et celle à 254 nm à l'absorption due à la liaison Cd-cystéine (Kägi et Vallee, 1960).

En outre, des balayages ont été effectués entre 200 et 300 nm sur les fractions les plus représentatives des chromatogrammes.

## **6. Dosage du Cd**

### **6.1 Dosage du Cd dans les milieux de culture.**

Afin de suivre l'évolution de la concentration en Cd au cours des 20 jours d'expérience, 6 prélèvements ont été réalisés aux temps

mentionnés à la section 1.5. A chaque échantillonnage, 20 mL de milieu de culture auquel on ajoutait 5 mL d'acide nitrique qualité Aristar étaient conservés dans une fiole jaugée de 25 mL à 4°C. Les fioles jaugées étaient prélevées pour l'analyse des métaux: une fois à l'acide nitrique 70% ACS, 3 fois à l'acide nitrique 5%, rincées à l'eau déminéralisées et à l'eau nanopure.

Le contenu des fioles était centrifugé (Centrifugeuse Sorvall Superspeed RC2-B, rotor SA600) à environ 30 000 g à 12 °C pendant 20 min. Le but de cette étape est de recueillir les cellules non digérées par l'acide afin de leur faire subir une digestion complète avant l'analyse au spectrophotomètre d'absorption atomique.

Ainsi, le surnageant est recueilli pour analyse subséquente. Le culot, lui, est minéralisé par une méthode de digestion aux micro-ondes. Les culots de cellules et de l'acide nitrique 70% qualité Aristar sont mis dans des réacteurs en Teflon. Les réacteurs sont par la suite placés dans des contenants, fermés hermétiquement, au four à micro-ondes où la température et la pression permettent la minéralisation des échantillons. Après refroidissement, les culots digérés, de même que les surnageants, sont remisés à 4°C jusqu'au moment de l'analyse de leur contenu en Cd.

## **6.2 Dosage du Cd au four au graphite.**

Le dosage du Cd dans les fractions et dans les milieux de culture est fait par spectrophotométrie d'absorption atomique au four au graphite (GTA-95 de Varian). L'appareil est muni d'un système d'injection automatique, d'un enregistreur et d'un correcteur de bruit de fond au deutérium. Les conditions de dosage figurent au tableau 1.

Les concentrations de Cd dans les solutions analysées sont obtenues par référence à des courbes étalons établies à partir de la même matrice. La limite de détection de l'appareil pour le cadmium est de 0,1 ppb. Lorsqu'on se situe en-dessous de ce seuil critique, les dosages sont effectués par addition d'étalon.

## **7. Traitement des données**

Pour chaque jour et chaque condition expérimentale, 6 comptes cellulaires ont été effectués. Ces 6 comptes sont considérés comme distincts l'un de l'autre dans le traitement des données.

L'analyse de variance et les tests de t ont été réalisés avec SAS. Les données n'ont pas été transformées.

**Tableau 1. Conditions d'utilisation du four au graphite (GTA-95 Varian) pour le dosage du Cd.**

**Caractéristiques:**

	<b>Cd</b>
Longueur d'onde (nm)	228,8
Largeur de fente (nm)	0,4
Intensité de la lampe (mA)	4,0
Volume injecté ( $\mu\text{L}$ )	10,0
Correcteur au $\text{D}_2$	oui
Injection à chaud ( $^{\circ}\text{C}$ )	45,0

**Cycles du four:**

1. Séchage a, b, c	75, 5, 3
2. Calcination a, b, c	200, 50, 3
3. Calcination a, b, c	300, 10, 3
4. Calcination a, b, c	300, 5, 3
5. Calcination a, b, c	300, 2, 0
6. Atomisation a, b, c	2000, 0, 0
7. Atomisation a, b, c	2000, 2, 0
8. Atomisation a, b, c	2300, 1, 3

a = température ( $^{\circ}\text{C}$ ),

b = temps de montée de la température (sec),

c = débit de gaz ( $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

## **8. Produits chimiques**

- Gel Sephadex G-75: Sigma Chemical Co. et Pharmacia Fine Chem.
- Bleu de Dextran: Pharmacia Fine Chemicals.
- Protéines étalons: Sigma Chemical Co.
- Glutathion: Boehringer Mannheim GmbH
- Azoture de sodium: Sigma Chemical Co.
- 2-mercaptoéthanol: JT Baker Chemical Co.
- Acide nitrique: Réactif ACS. Fisher Scientific Co.
- Standard de cadmium: Produits chimiques BDH Ltée
- Tampon Tris/HCl: Sigma Chemical Co.
- Produits chimiques pour milieu de culture: Fisher Scientific Co.
- Réactif Bio-rad: Biorad 3<sup>rd</sup> et Griffin.

## **RESULTATS**

### **1. Croissance de Selenastrum capricornutum.**

#### **1.1 Croissance avant la contamination au Cd.**

La culture-mère de S. capricornutum a été transférée dans 3 erlenmeyers de 250 mL chacun. La figure 6 présente le taux de croissance de ces 3 souches entre le 14 juin et le 11 juillet. Les taux de croissance sont relativement semblables dans les 3 erlenmeyers.

Par la suite, les 3 souches étaient réparties dans 4 erlenmeyers de 4 L chacun. Entre le 12 juillet et le 1<sup>er</sup> août, la croissance des 4 souches a été très rapide quoique assez variable d'un erlenmeyer à l'autre (fig. 7).

Le pH des milieux de culture a été vérifié à l'aide de papier à pH tout au long de la croissance et il se situait généralement autour de 7,0.

#### **1.2 Croissance après l'intoxication au Cd.**

Le contenu des erlenmeyers de 4 L a été partagé dans les 3 sacs de plastique servant à l'expérimentation proprement dite. La figure 8 représente le taux de croissance des cellules de S. capricornutum entre le 3

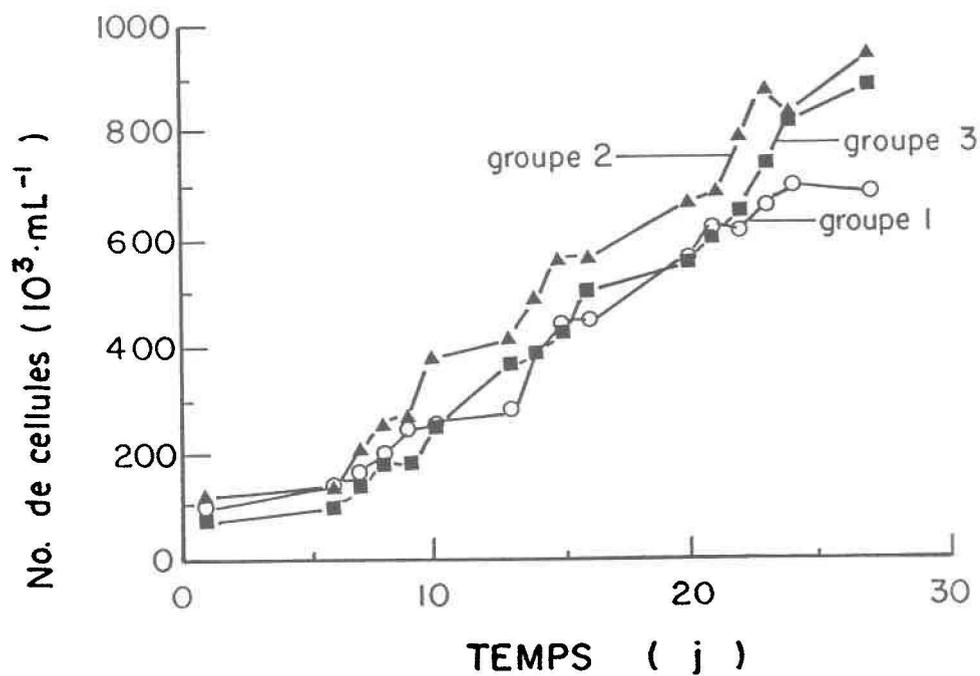


Figure 6. Croissance de S. capricornutum entre le 14 juin et le 11 juillet.  
Chaque point représente la moyenne de 6 comptes cellulaires,  
les coefficients de variation sont inférieurs à 5%.

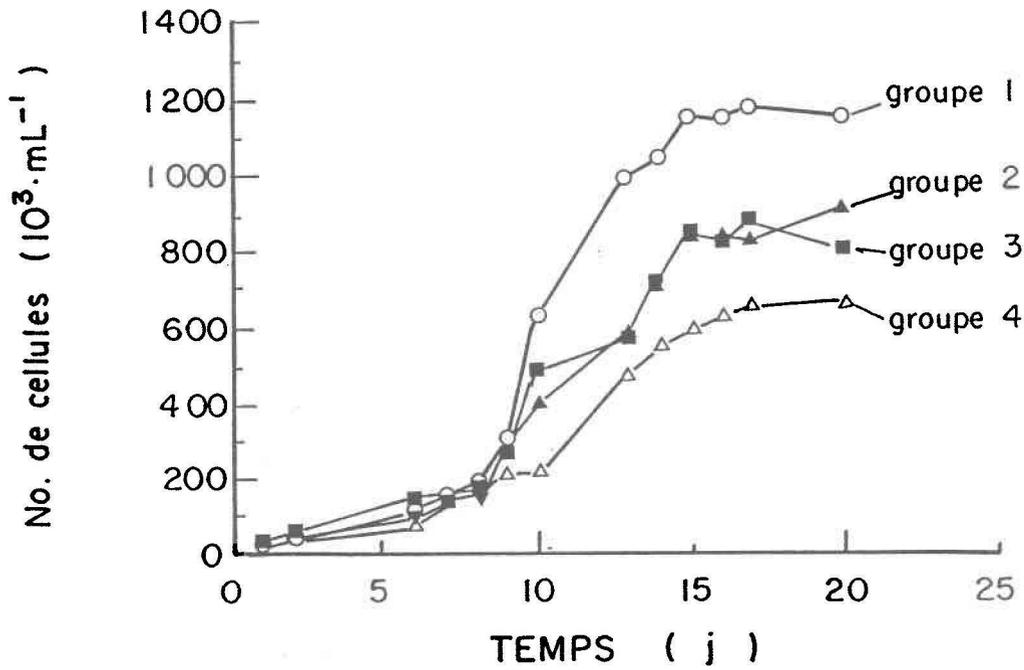


Figure 7. Croissance de *S. capricornutum* entre le 12 juillet et le 1 août. Chaque point représente la moyenne de 6 comptes cellulaires, les coefficients de variation sont inférieurs à 5%.

NOMBRE DE CELLULES (  $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  )

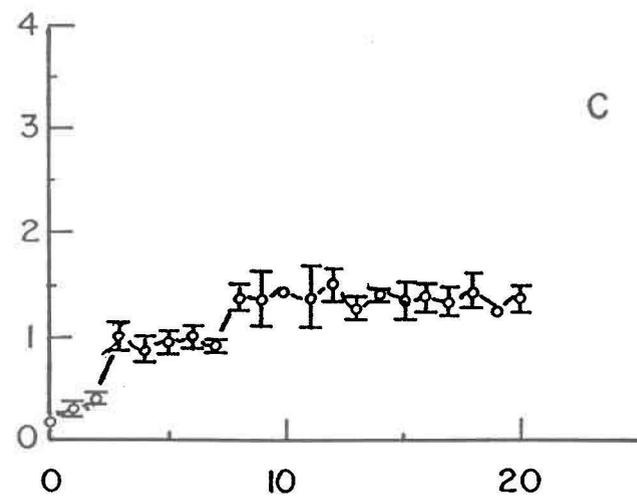
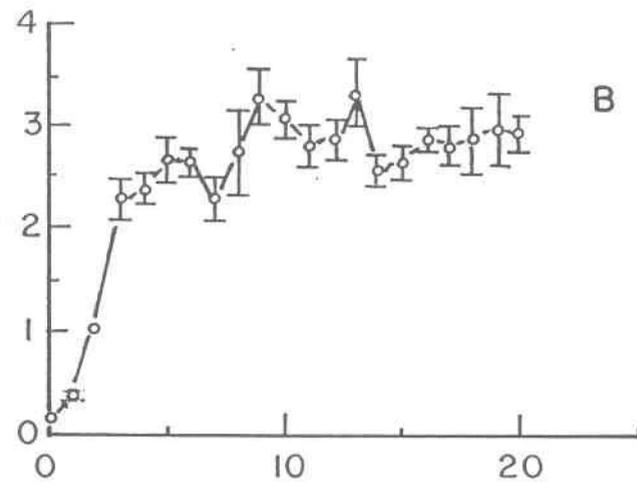
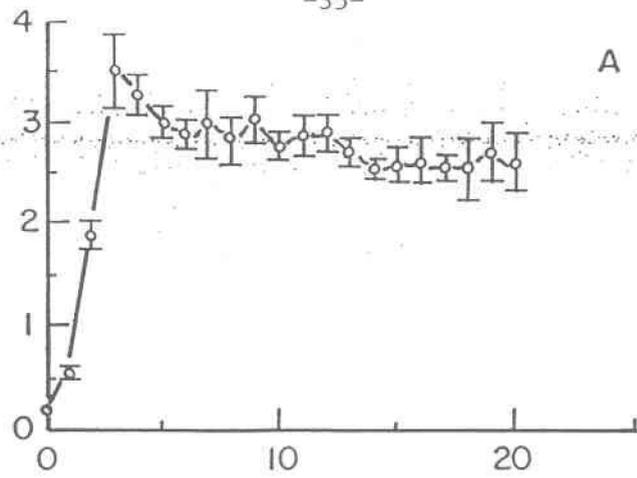


Figure 8. Croissance des cellules de *S. capricornutum* soumises à 3 conditions expérimentales: A: témoin, B: 30 ppb de Cd(II), C: 70 ppb de Cd (II). Chaque point représente la moyenne de 6 comptes cellulaires. Intervalles de confiance à 99% sur les moyennes indiqués.

août et le 23 août 1988 avec les intervalles de confiance à 99% sur les moyennes, soit pendant les 20 j de l'expérience.

Les résultats de l'analyse de variance (tabl. 2A) démontrent qu'il existe une interaction entre les 3 conditions expérimentales et le temps. On ne peut donc interpréter les taux de croissance qu'en tenant compte à la fois des conditions expérimentales et du jour considéré. Les données étaient normales ( $P=11,9\%$ ) et aucun patron n'a été décelé dans l'analyse des résidus.

La croissance des cellules contenues dans les sacs témoin et 30 ppb de Cd(II) est très similaire surtout à partir du huitième jour d'expérimentation. En effet, entre le jour 1 et le jour 7, les moyennes des sacs témoin et 30 ppb de Cd(II) sont significativement différentes ( $P=0,0001$ ) sauf aux jours 5 et 6 où  $P<10\%$  (tabl. 2B).

Par contre, pour le sac contenant 70 ppb de Cd(II), la croissance est beaucoup plus faible que pour les 2 autres conditions expérimentales (fig. 8). A partir du deuxième jour d'expérience et ce jusqu'à la fin de l'expérimentation, le nombre moyen de cellules de la troisième condition est toujours significativement différent des nombres moyens de cellules des 2 premières conditions (tabl. 2B).

Le pH des milieux de culture tout au long de l'expérience est présenté au tableau 3 pour les 3 conditions expérimentales. Généralement, le pH se situe entre 6,0 et 7,0 sauf aux jours 9 et 14 où il chute sous 6,0.

**Tableau 2A. Analyse de variance des données de croissance pour les trois conditions expérimentales.**

Source de variation	degrés de liberté	somme des carrés	F	P
- Condition expérimentale	2	286437,37	1972,59	<0,0001
- Temps	21	152142,27	104,78	<0,0001
- Interaction	40	102819,63	35,40	<0,0001

**Tableau 2B. Comparaison des taux de croissance des algues de chacune des conditions expérimentales. Identification des sacs: T= témoin; 30= 30 ppb de Cd(II) et 70= 70 ppb de Cd(II). Tests de t, valeurs de P présentées.**

Jour	T et 30	T et 70	30 et 70
0	0,8656	0,5882	0,7096
1	0,0001	0,0001	0,0365
2	0,0001	<0,0001	0,0001
3	0,0001	0,0001	0,0001
4	0,0001	0,0001	0,0001
5	0,0086	0,0001	0,0001
6	0,0979	0,0001	0,0001
7	0,0001	0,0001	0,0001
8	0,5882	0,0001	0,0001
9	0,0336	0,0001	0,0001

Tableau 3. Evolution du pH des milieux de culture pendant l'expérimentation.

Jour	Témoin	30 ppb Cd(II)	70 ppb Cd(II)
0	7,05	7,22	7,52
1	7,51	7,63	7,38
2	7,87	8,03	7,11
3	8,39	8,35	7,08
4	6,38	6,38	5,81
5	6,23	6,11	6,14
6	6,16	6,19	6,14
7	6,26	6,11	6,19
8	6,44	6,43	6,21
9	5,77	5,81	5,88
10	7,15	6,85	6,78
11	6,92	7,17	6,93
12	7,05	7,05	7,18
13	7,46	7,24	7,34
14	5,61	5,88	6,08
15	6,71	6,86	6,84
16	7,30	7,15	7,11
17	6,12	6,19	6,20
18	7,34	7,26	7,30
19	7,03	7,29	7,59
20	6,87	6,48	6,02

## **2. Contenu en Cd des milieux de culture.**

Des échantillons du mélange "cellules de S. capricornutum et milieu de culture" ont été pris tout au long de l'expérience afin de déterminer le contenu réel en Cd des milieux de culture.

On peut constater, d'après les résultats présentés au tableau 4, que la concentration en Cd des milieux de culture varie quelque peu pendant les 20 j de l'expérience. En outre, les concentrations maximales de Cd retrouvées dans les milieux de culture sont inférieures à celles ajoutées dans les sacs au jour 0 de l'expérimentation.

Les tableaux 5 et 6 présentent les concentrations de Cd dosées dans les surnageants des milieux de culture acidifiés et dans les culots de cellules digérés par la méthode aux micro-ondes respectivement. On notera que les quantités de Cd dosées par la méthode aux micro-ondes sont très faibles.

Les quantités de Cd(II) contenues dans les protéines extraites des algues témoins utilisées pour les chromatographies étaient de 3,8 et 3,5  $\mu\text{g Cd(II) / g}$  de protéine (poids sec). Pour la deuxième condition expérimentale les quantités de Cd(II) étaient de 128 et 115  $\mu\text{g Cd(II) / g}$  de protéine. Enfin, pour la troisième condition expérimentale, elle était de 689  $\mu\text{g Cd(II) / g}$  de protéine.

Tableau 4. Quantité totale de Cd(II) dosée dans les milieux de culture.  
Concentrations en ppb.

Jour	Témoin	30 ppb de Cd(II)	70 ppb de Cd(II)
1	0	1,03	1,30
2		2,21	8,03
3		6,56	9,72
5		6,90	15,72
10		5,60	11,32
15		8,67	14,09
20	1,01	7,41	13,47

Tableau 5. Quantité de Cd(II) dosée dans les surnageants de milieux de culture centrifugés. Concentrations en ppb.

Jour	Témoin	30 ppb de Cd(II)	70 ppb de Cd(II)
1	0	1,03	1,30
2		2,21	8,03
3		6,56	9,72
5		6,90	15,72
10		5,60	11,32
15		8,67	14,09
20	0	7,41	13,47

Tableau 6. Quantité de Cd(II) dosée dans les culots de milieux de culture centrifugés; digestion aux micro-ondes. Concentrations en ppb.

Jour	Témoin	30 ppb de Cd(II)	70 ppb de Cd(II)
1	0	0	0
2		0	0
3		0	0
5		0	0
10		0	0
15		0	0
20	1,01	0	0

### 3. Chromatogrammes des protéines et peptides et du Cd associé.

#### 3.1 Chromatogrammes des algues témoins.

Les résultats de deux chromatographies effectuées avec les protéines extraites des algues témoins apparaissent à la figure 9. Pour chaque chromatogramme, 2 pics principaux sont visibles par leurs empreintes à 254 et 280 nm. Le premier pic contient des protéines de poids moléculaires élevés ( $PM > 80\ 000$ ) et le deuxième pic des protéines de faibles poids moléculaires ( $PM < 5\ 000$ ). Le deuxième pic est composé d'un mélange de polypeptides, de fragments d'acides nucléiques et de molécules biologiques de petite taille (Brown et al., 1977).

Dans le premier pic, les absorbances à 254 et à 280 nm sont en phase tandis que dans le deuxième pic (fig. 9), le maximum d'absorbance à 254 nm est décalé vers la droite par rapport au maximum d'absorbance à 280 nm. La distribution du Cd lié aux protéines est indiqué à la figure 10 et est très près de la limite de détection (0,1 ppb).

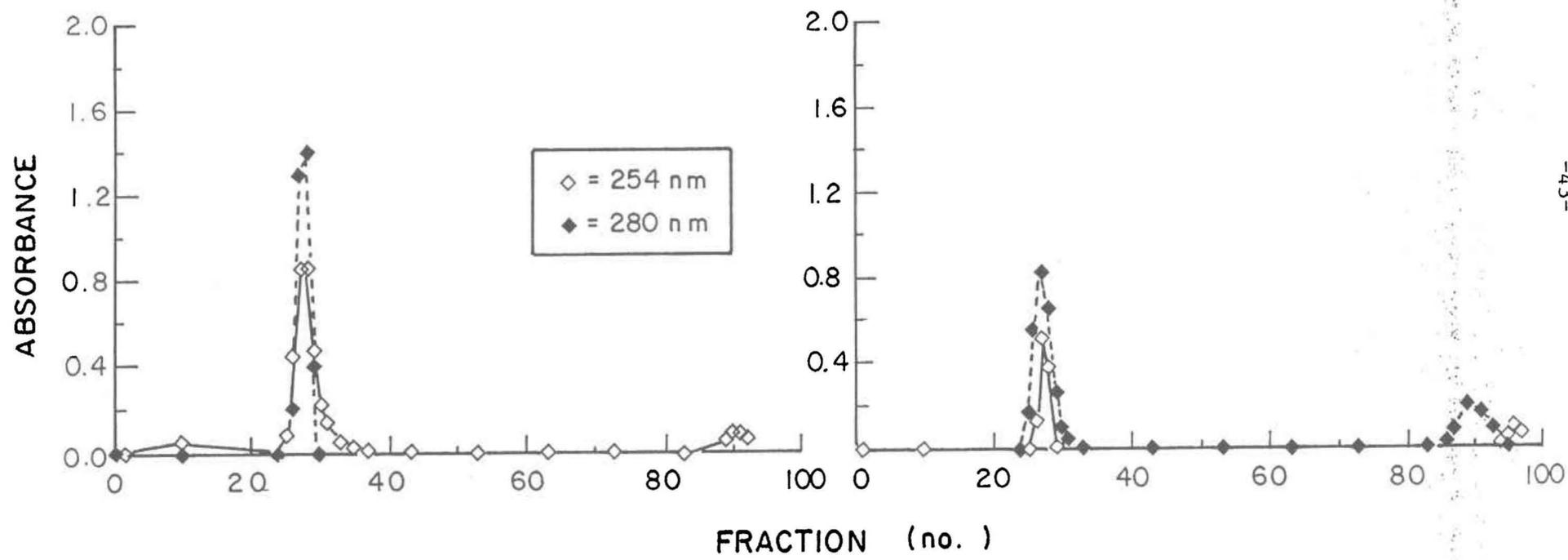


Figure 9. Profil d'élution des chromatographies réalisées avec les protéines extraites des algues témoins.

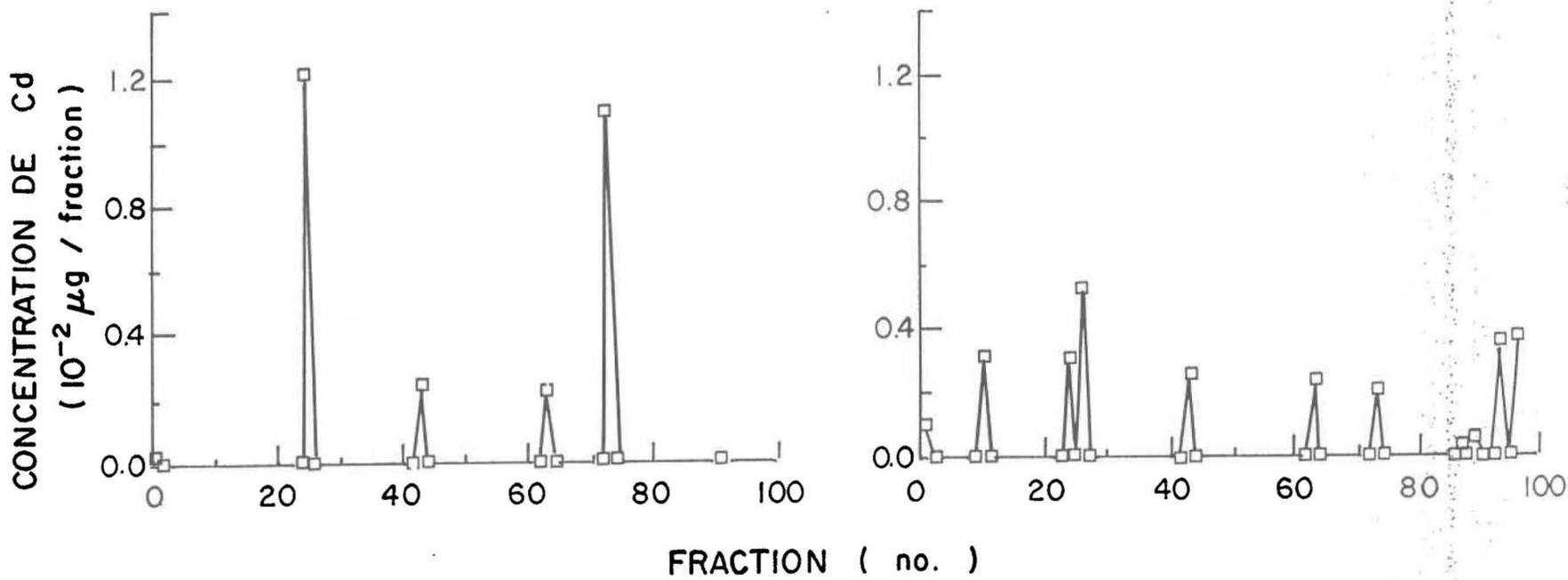


Figure 10. Concentration de Cd dans les fractions des chromatographies effectuées avec les protéines extraites des algues témoins.

### 3.2 Chromatogrammes de la deuxième condition expérimentale.

Comme pour la première condition expérimentale, les résultats de 2 chromatographies effectuées avec les protéines extraites des algues exposées à 30 ppb de Cd(II) sont présentés à la figure 11.

Ici encore on remarque la présence de 2 pics. Ces pics se situent environ aux mêmes endroits que pour la condition expérimentale précédente. L'allure du premier pic ressemble beaucoup à celle du premier pic de la première condition expérimentale.

Par contre, le deuxième pic s'étendant des fractions 87 à 97 environ est beaucoup plus prononcé que dans le cas des algues témoins. Les 3 maxima observés sont tous décalés l'un par rapport à l'autre. En premier lieu, on observe un maximum de concentration de Cd entre les fractions 85 et 87 (fig. 12). Suit le maximum d'absorption à 280 nm vers les fractions 89 et 90, et enfin le maximum d'absorbance à 254 nm à la fraction 95 (fig. 11).

Les concentrations de Cd associées aux 2 pics des 2 chromatogrammes se situent aux alentours de 0,20 µg de Cd(II)/fraction. Ces résultats présentés à la figure 12 mettent en évidence une accumulation localisée de Cd car la concentration nominale de Cd dans la sac était de 30 ppb de Cd(II) et la concentration maximale observée de 9 ppb de Cd(II). On a retrouvé un total de 128 µg de Cd(II) et de 115 µg de Cd(II) par g dans les 50

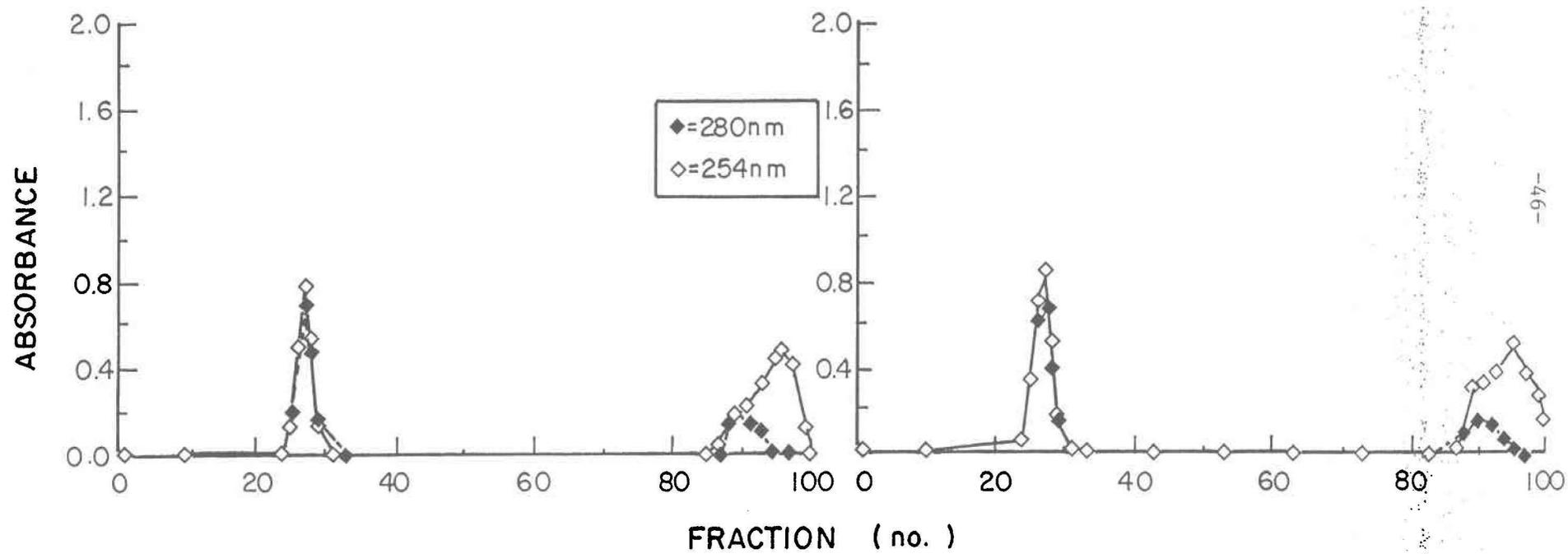


Figure 11. Chromatogrammes de la deuxième condition expérimentale: 30 ppb de Cd(II).

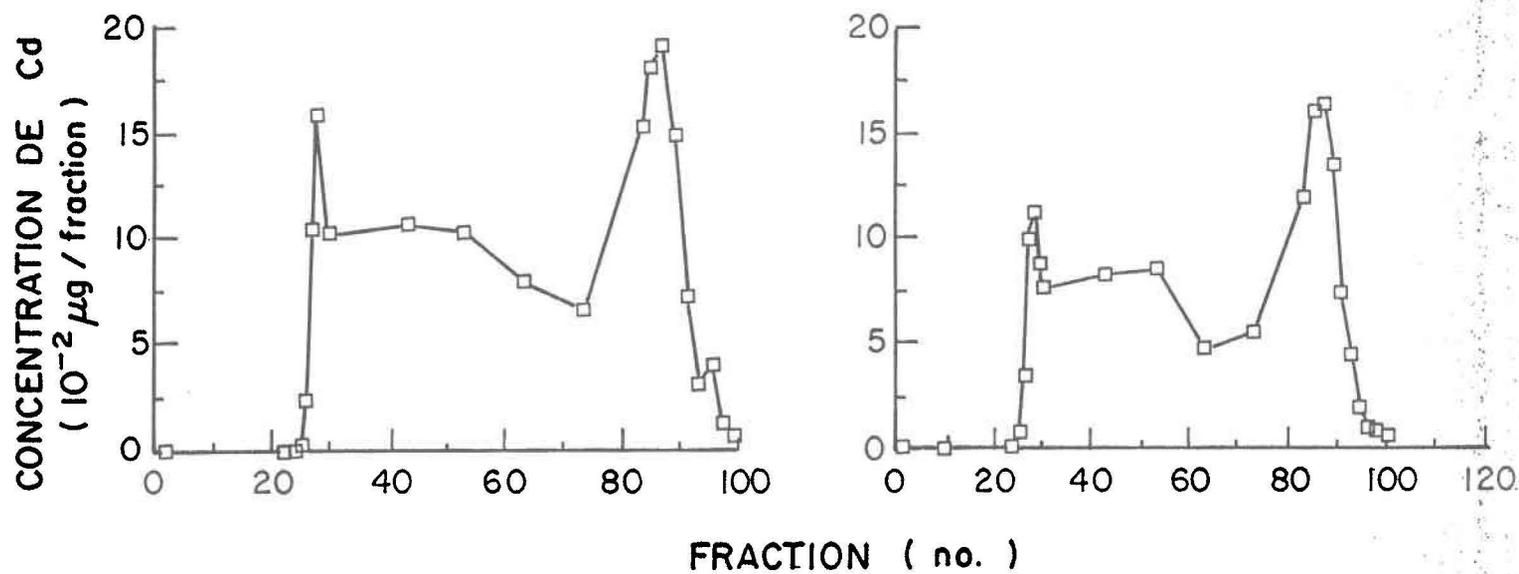


Figure 12. Concentration de Cd associée aux fractions des chromatogrammes réalisés avec les protéines extraites des algues de la deuxième condition expérimentale.

mg de protéines (poids sec) utilisées pour les première et deuxième chromatographies respectivement.

### 3.3 Chromatogramme de la troisième condition expérimentale.

Le chromatogramme des protéines extraites des algues soumises à une concentration de 70 ppb de Cd(II) est très semblable à ceux de la deuxième condition expérimentale. Les seules différences relevées sont que les concentrations de Cd et que l'absorbance à 254 et à 280 nm y sont beaucoup plus élevées (fig. 13A). On retrouve encore les 2 pics identifiés précédemment sur les autres chromatogrammes. Le premier pic est toujours au niveau de la fraction 27 et le deuxième pic s'étend des fractions 85 à 97.

On note encore les 3 maxima du deuxième pic identifiés pour la deuxième condition expérimentale (fig. 11 et 12). Leur patron d'élution correspond exactement à celui décrit auparavant pour la deuxième condition expérimentale.

Les concentrations de Cd(II) associées aux 2 pics du chromatogramme sont environ de 0,70 et de 0,85  $\mu\text{g}$  de Cd(II) respectivement pour le premier et le second pics (fig. 13B). On remarque encore une accumulation locale de Cd mais cette fois-ci beaucoup plus marquée que pour la condition 30 ppb de Cd(II). En effet, au deuxième pic,

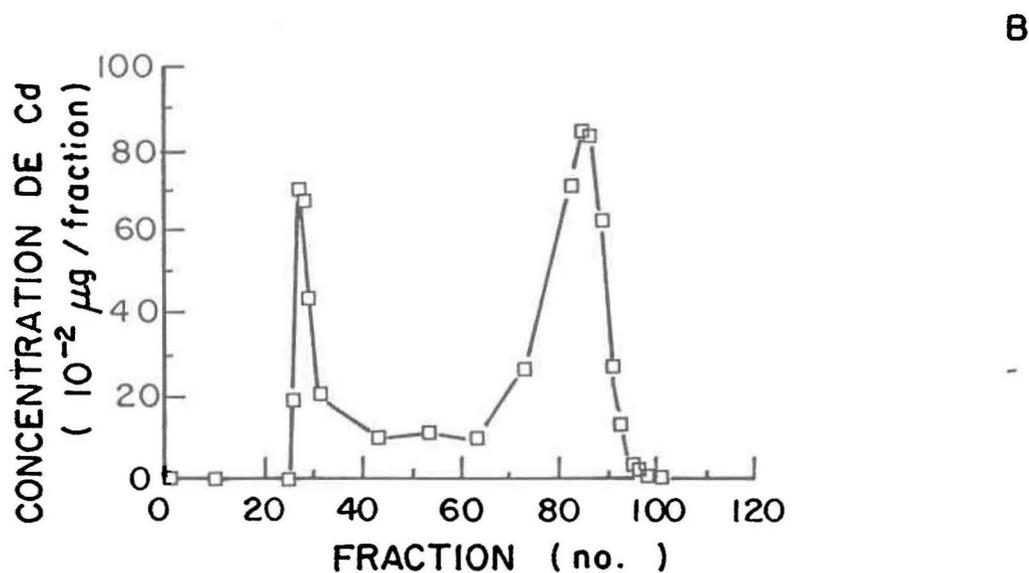
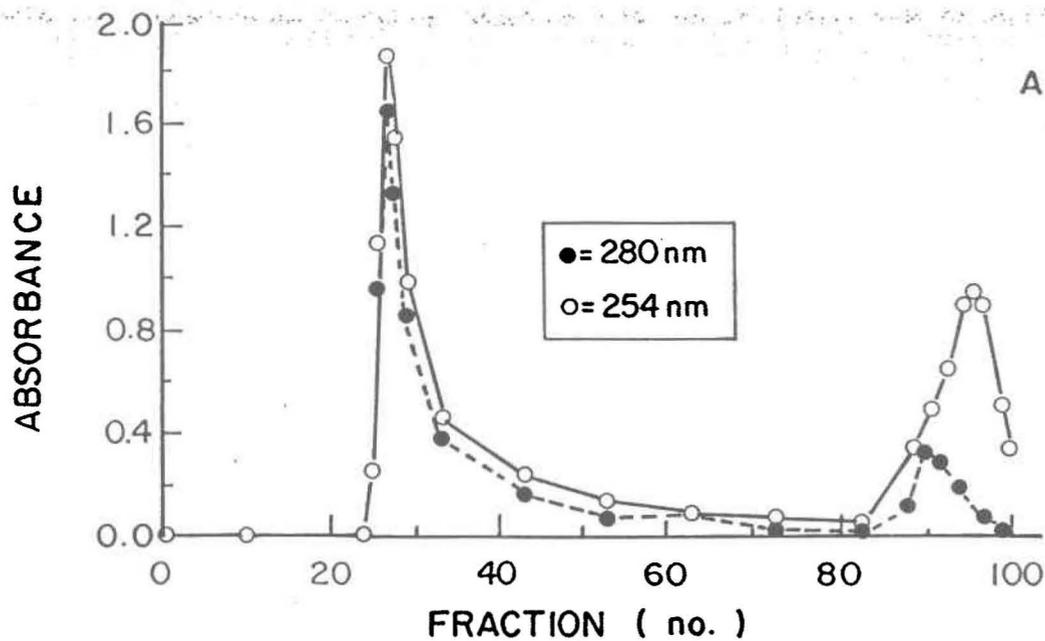


Figure 13A. Profil d'éluion des protéines extraites des algues exposées à 70 ppb de Cd(II).

13B. Concentration de Cd associée aux fractions.

pour une concentration de protéines (absorbance à 280 nm) environ le double de celle de la deuxième condition, on dénote une concentration de Cd(II) 5 fois plus élevée (0,85 µg vs 0,20 µg). L'équivalent de 689 µg de Cd(II) par g de poids sec a été dosé dans les 50 mg de protéines lyophilisées utilisées pour la chromatographie. Il faut ici se rappeler que la concentration nominale du Cd ajoutée au sac était de 70 ppb de Cd(II) et que la concentration réelle maximale dosée était de 16 ppb de Cd<sup>2+</sup> (tabl. 4).

#### **4. Cd contenu dans les fractions.**

On remarque aux figures 9 à 13 que les maxima correspondant au Cd(II) dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique et à l'absorbance à 254 nm dans le deuxième pic ne concordent pas. Ces deux mesures caractérisent pourtant toutes deux le Cd contenu dans les fractions. On sait toutefois que l'absorbance à 254 nm ne représente pas uniquement le Cd mais est reconnu généralement comme étant le lien Cd-cystéine. De plus, on sait que plusieurs substances différentes absorbent dans cette région de l'ultra-violet et qu'elles peuvent interférer dans le dosage d'un seul et unique type de substances.

## 5. Dosage des protéines par la méthode du bleu de Commassie.

Les protéines contenues dans chacune des fractions sont dosées par la méthode du bleu de Commassie (Bradford, 1976) afin d'en évaluer la concentration. La figure 14 présente les résultats des dosages effectués sur les fractions des deux chromatogrammes des algues témoins. Dans les deux cas, on remarque un pic très élevé, au-delà des limites de détection de la méthode, entre les fractions 25 et 29. Ces fractions correspondent au volume mort de la colonne et contiennent les très grosses protéines dont la taille ne peut être déterminée par le type de gel utilisé. Un deuxième pic est visible à la fraction 53. Ensuite, la concentration de protéines diminue progressivement mais demeure stable à partir de la fraction 70 environ.

Pour les algues exposées à 30 ppb de Cd(II), le profil des concentrations de protéines correspond en tout point à celui des algues témoins (fig. 15). On remarque la présence du pic représentant le volume mort de la colonne puis le pic de la fraction 53. Toutefois, ce deuxième pic est très peu prononcé dans le deuxième chromatogramme. Tout comme pour les algues témoins, la concentration varie très peu à partir de la fraction 70.

Les résultats des dosages effectués pour la troisième condition expérimentale (fig. 16) sont semblables à ceux obtenus pour les deux

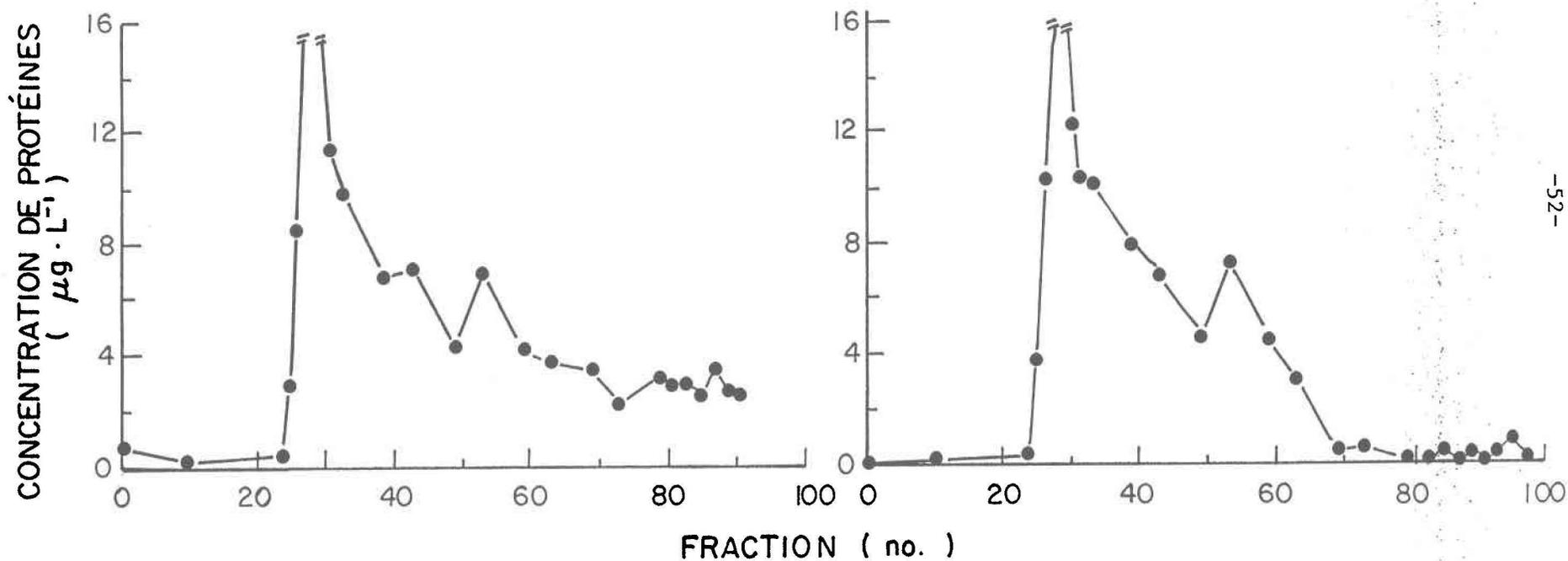


Figure 14. Concentration de protéines dans les fractions des chromatographies réalisées avec les algues témoins.

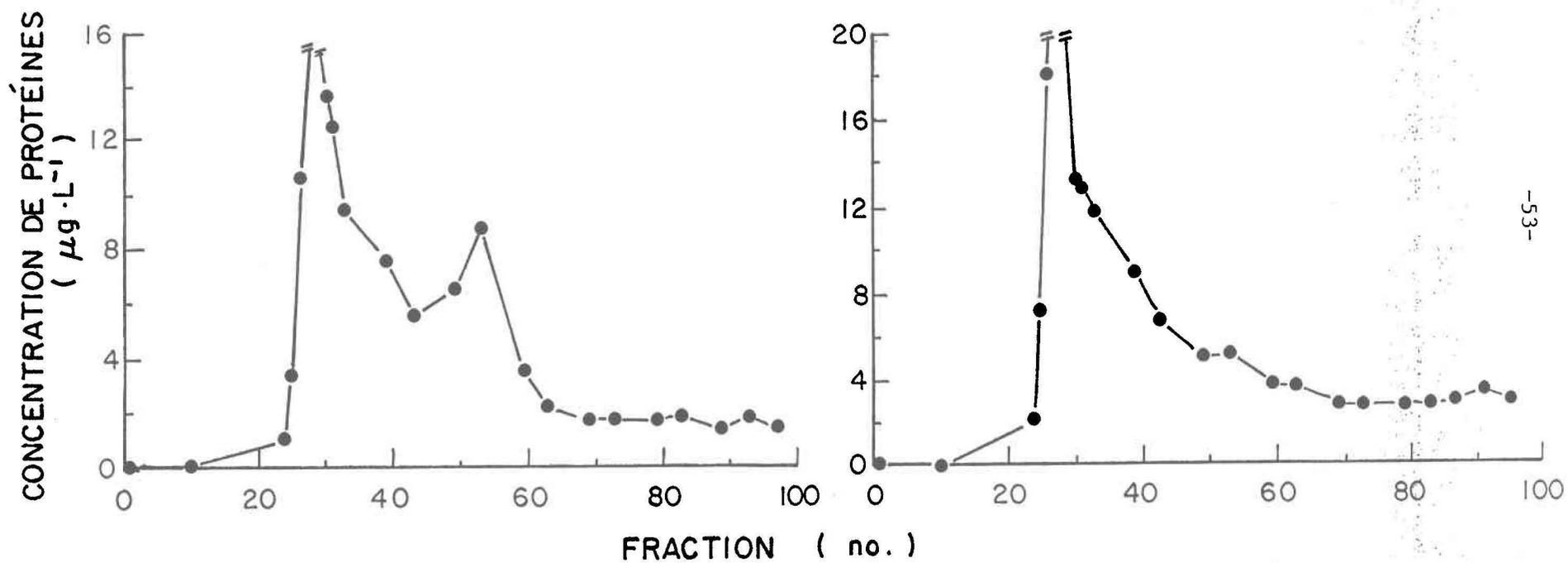


Figure 15. Concentration de protéines dans les fractions des chromatographies réalisées avec les protéines isolées des algues exposées à 70 ppb de Cd(II).

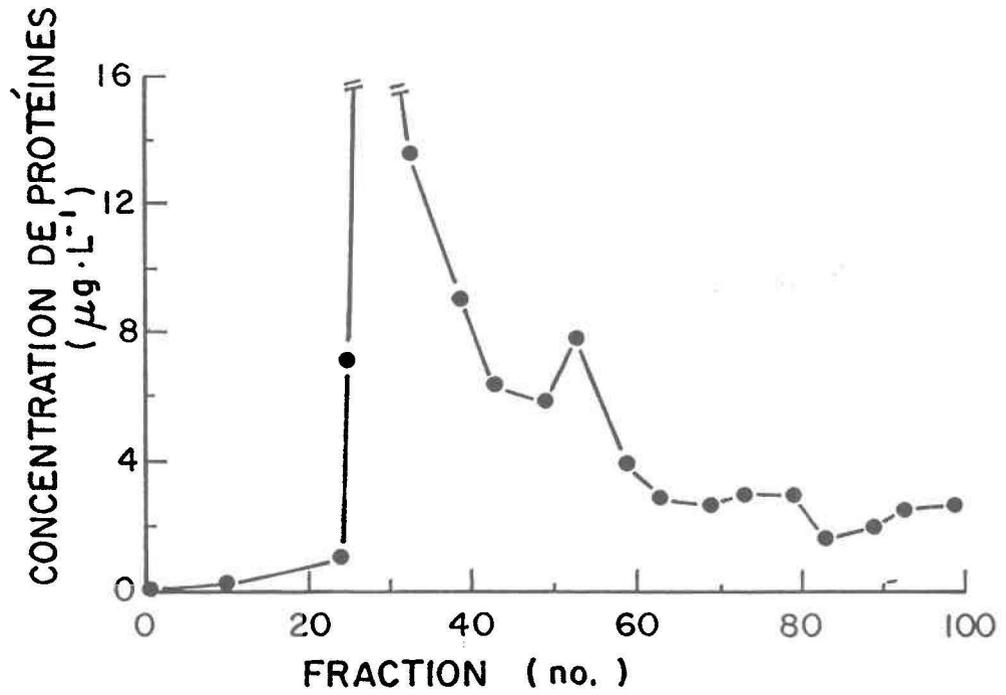


Figure 16. Concentration de protéines contenue dans les fractions résultant de l'éluion des protéines de la troisième condition expérimentale.

premières conditions. Dans tous les cas, les concentrations de protéines dosées dans les fractions ayant un intérêt dans le cadre de cette étude, soient les fractions 80 à 100, varient entre 2 et 4  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Une seule exception, les concentrations dosées dans la deuxième chromatographie des algues témoins se situent autour de 0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

#### **6. Balayage dans l'ultra-violet.**

Un balayage entre 200 et 300 nm a été effectué sur les fractions les plus significatives des chromatographies. Ces fractions correspondent aux deuxièmes maxima d'absorbance détectés à 280 et 254 nm. Ainsi, pour la fraction 87 de la chromatographie de la troisième condition expérimentale, le maximum d'absorption dans l'ultra-violet a lieu aux environs de 230 nm (fig. 17).

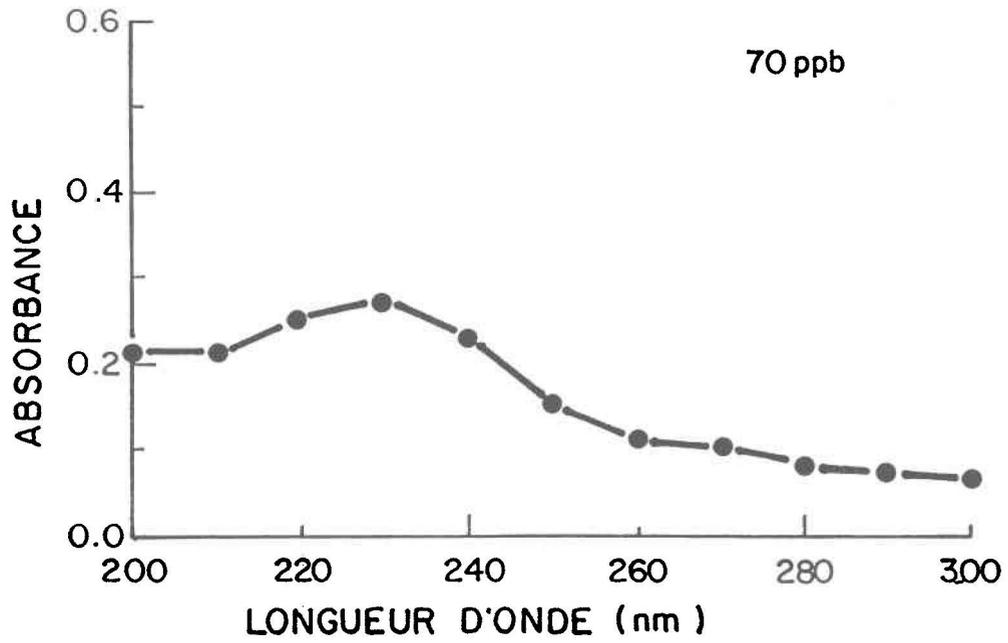


Figure 17. Balayage entre 200 et 300 nm de la fraction 87 de la chromatographie de la troisième condition expérimentale (fig. 13).

## DISCUSSION

### **1. Concentration de Cd et taux de croissance.**

L'utilisation d'une condition expérimentale témoin, de même que de deux concentrations de Cd, 30 et 70 ppb de Cd(II), permet de discriminer nettement l'effet de diverses concentrations de Cd sur le taux de croissance des algues (fig. 8). Au début de l'expérience, les algues réagissent très fortement aux conditions qui leur sont imposées. L'effet du choc toxique combiné à l'effet de dilution dû au transfert des souches dans les sacs se fait particulièrement sentir lors des sept (7) premiers jours de l'expérience. Pendant cette période, le taux de croissance le plus élevé est mis en évidence chez les algues témoins, tandis que les algues soumises à 30 ppb de Cd(II) présentent un taux de croissance inférieur. Les algues exposées à 70 ppb de Cd(II) quant à elles affichent le plus faible taux de croissance. On a aussi observé lors du décompte cellulaire que les cellules de S. capricornutum des deuxième et troisième conditions expérimentales étaient plus grosses que les algues témoins. Plus la concentration de Cd était élevée, plus les algues semblaient gonflées. Ce type d'observation est souvent réalisé lors d'expérience du même genre ( Foster, 1977; Smith, 1983; Skowronski et al., 1985; Heuillet et al., 1986; Stauber et Florence,

1986; Bastien et Côté, 1988a).

A partir du septième jour de croissance, les taux de croissance des algues des groupes témoin et exposées à 30 ppb de Cd(II) sont de plus en plus semblables (tabl. 2B). Le taux de croissance des algues de la deuxième condition est même supérieur à celui des algues témoins vers la fin de l'expérience (fig. 8). Par contre, le taux de croissance des algues de la troisième condition expérimentale demeure très stable tout au long de l'expérience et est environ la moitié des taux de croissance des autres conditions.

D'après ces considérations, il semble qu'une concentration de 30 ppb de Cd(II) soit idéale pour observer d'une part l'effet toxique du Cd sur S. capricornutum et d'autre part, la récupération que cette espèce réalise en quelques jours seulement. Il semble en effet d'après les résultats obtenus qu'une concentration de 70 ppb de Cd(II) soit trop élevée pour permettre toute récupération de la part de la population d'algues sans toutefois inhiber complètement leur métabolisme. Mentionnons que les algues de cette condition ont un volume cellulaire visiblement supérieur à celui des algues des autres conditions et ce, tout au long de l'expérience. Cette incapacité à récupérer complètement se reflète par un faible taux de croissance qui n'affiche aucune évidence de récupération par le fait qu'il n'augmente jamais (fig. 8).

On est à même de constater que pour l'espèce S. caprinornutum, les concentrations potentiellement toxiques sont plutôt faibles ce qui en fait une espèce très fragile aux variations brusques de concentration de Cd (Chiaudani et Vighi, 1978). Par contre, le pouvoir de récupération de cette espèce lorsque la concentration de Cd n'est pas trop élevée est très marqué.

## **2. Concentrations effectives de Cd.**

On remarque au tableau 4 la différence entre les concentrations nominales de Cd: 0, 30 et 70 ppb de Cd(II) et les concentrations réelles dosées dans les sacs: 1, 9 et 16 ppb de Cd(II). Dans le cas du sac témoin, la présence de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd(II) n'affecte en rien le taux de croissance des algues (fig. 8).

Cependant, pour les deuxième et troisième conditions expérimentales, il y a nettement perte de Cd. Le Cd n'étant pas un métal qui se volatilise facilement, la perte de Cd s'expliquerait par la complexation d'une partie du Cd aux parois des sacs de plastique. Cette explication est probablement plausible car plus la quantité d'algues augmente, plus la concentration de Cd en solution augmente aussi (tabl. 4). En effet, au début de l'expérience la quantité d'algues donc de sites de complexation en

suspension est très faible, ce qui rend les grandes parois du sac très attirantes pour le Cd. Puis, la population d'algues croit rapidement et on remarque que la quantité de Cd en solution augmente immédiatement.

Etant donné que lorsque la population d'algues augmente la concentration de Cd en solution augmente aussi, on ne saurait dire si le fait d'utiliser des sacs en plastique plutôt qu'en polycarbonate induit un biais à l'expérience. Ce point reste à être clarifié.

On remarque toutefois qu'à partir du cinquième jour d'expérience, la concentration de Cd contenue en solution et dans les algues se stabilise et même diminue un peu (tabl. 4). Une explication possible de ce phénomène serait que les algues mortes sédimentent au fond du sac entraînant avec elles le Cd qu'elles contiennent. Cependant, étant donné que la concentration de Cd en solution et lié aux algues demeure assez stable jusqu'à la fin de l'expérience, on peut croire qu'au fur et à mesure que la concentration de Cd en solution diminue, le Cd lié aux parois se remet progressivement en solution. Ce phénomène pourrait être associé à l'établissement d'un équilibre paroi-suspension lorsque la phase exponentielle de croissance est terminée.

### 3. Concentration de Cd et synthèse de peptide.

L'étude des cinq (5) chromatogrammes présentés précédemment ainsi que celle des concentrations de Cd associées aux fractions, nous permet d'observer que la majorité du Cd dosé dans les protéines est concentré les protéines de faible poids moléculaire. Bien sûr, on ne tient pas compte du Cd aux très grosses protéines qui sont éluées avec le volume mort de la colonne. Diverses précautions ont été prises pour s'assurer que le cadmium demeure fixé là où il l'était dans la cellule, et ne migre pas vers d'autres sites de complexation lors de l'extraction des protéines. Dans un premier temps, du 2-mercaptoéthanol a été ajouté au tampon servant à la remise en solution des algues lyophilisées prévenant ainsi l'oxydation des sites de complexation. Ensuite, de l'azote gazeux a été barboté dans la solution d'algues lysées permettant d'éviter l'action néfaste de l'oxygène.

Il est très difficile d'après les résultats obtenus de déterminer exactement le poids moléculaire, de même que la quantité de peptides à laquelle est lié le deuxième pic de Cd des conditions 30 et 70 ppb de Cd(II).

Premièrement, les peptides retrouvés dans la fraction à laquelle est associée la plus forte concentration de Cd (fig. 12 et 13B) ont un poids moléculaire très faible. Ce poids moléculaire ne peut être déterminé par la méthode habituelle consistant à reporter le  $K_e$  d'éluion de la fraction sur le

graphique de calibration de la colonne (fig. 3). En effet, le  $K_e$  de la fraction se situe au-delà des limites d'exclusion de la colonne. Il ne s'agit pas là d'un fait exceptionnel. A titre d'exemple, Robinson et coll. (1987) ont isolé un peptide phytochélateur dont le poids moléculaire était d'environ 776 et celui isolé par Rauser (1987) était de 3 000.

Deuxièmement, les résultats de dosage des protéines (fig. 14, 15 et 16) pour les fractions qui nous intéressent, soient 80 à 95, sont identiques peu importe la condition étudiée. Ceci démontre que le réactif Bio-rad est impuissant à déterminer la concentration de peptide des fractions où la concentration de cadmium est élevée. Une constatation que l'on est à même de faire lorsqu'on observe les figures 4, 12 et 13B est que le maximum de concentration de Cd correspond à la fraction où élue le glutathion. On sait que la structure du glutathion est Glu-Cys-Gly. On peut faire alors l'hypothèse qu'on est bel et bien en présence de glutathion mais que le réactif Bio-rad utilisé dans le dosage des protéines ne s'associe pas aux acides aminés contenus dans le glutathion. Il faut toutefois être prudent en essayant d'établir un lien entre le glutathion et le pic de Cd(II) dosé. La fraction où a élue le glutathion peut contenir une gamme de molécules de poids moléculaires très variés. Cette fraction peut contenir toutes les molécules se situant entre 350 et 1 200 de poids moléculaire, par exemple. Il s'agit d'une variation de poids moléculaire du simple au quadruple. C'est un

écart important pour de si petites molécules.

Lors du dosage des protéines par le réactif Bio-rad, les résultats du dosage de différentes concentrations de l'albumine sérique bovine servaient pour établir une courbe étalon (fig. 5). Les concentrations de protéines dans les fractions étaient déduites d'après cette courbe. Afin de vérifier si diverses concentrations de glutathion pouvaient être dosées par le réactif Bio-rad, une courbe étalon du même type que celle impliquant l'albumine sérique bovine a été réalisée. Les résultats étaient on ne peut plus clairs: peu importe la concentration de glutathion dosée, les résultats du dosage à 595 nm donnaient tous zéro (0).

Troisièmement, la mesure de l'absorbance des fractions à 280 nm ne peut être très fiable dans l'évaluation qualitative de la quantité de peptides liant le Cd. Effectivement, on sait que la mesure de l'absorbance à 280 nm peut être utilisée comme indicateur de la concentration de protéines. Toutefois, ce qu'on dose à cette longueur d'onde ce sont les cycles des acides aminés aromatiques contenus dans les protéines. Or, le glutathion et les polymères du glutathion décelés chez les végétaux ne contiennent pas d'acides aminés aromatiques. On ne peut donc accorder beaucoup d'importance au fait qu'avec la condition 30 ppb de Cd(II) l'absorbance à 280 nm soit de 0,2 (fig. 11) et qu'à 70 ppb de Cd(II) elle soit de 0,4 (fig.13A), c'est-à-dire le double.

Malgré le fait qu'on ne puisse déterminer avec rigueur la concentration de peptides contenus dans les fractions 80 à 95, il est clair que la présence de Cd a induit la synthèse de peptides. Il nous suffit de comparer les concentrations de Cd dosées (fig. 12 et 13B) pour les conditions 30 et 70 ppb de Cd(II) pour se rendre compte que les réponses pour la condition 70 ppb de Cd(II) sont supérieures. En effet, 67% du Cd(II) total se situe entre les fractions 73 et 101 pour la troisième condition expérimentale. Par contre, seulement 39 et 29% du Cd(II) total dosé dans les protéines extraites des algues exposées à 30 ppb de Cd(II) est contenu dans ces fractions. A partir de ces faits, on peut suggérer que la quantité de peptides synthétisés est reliée à la concentration de Cd en solution. Ceci revient à dire que plus la concentration de Cd en solution est élevée, plus la concentration de peptides riches en cystéine synthétisés est élevée. L'incorporation d'un précurseur radioactif pourrait aider à la compréhension du phénomène.

#### **4. Synthèse de peptides et taux de croissance.**

Bien qu'on ne puisse déterminer avec précision la concentration de même que le poids moléculaire des peptides synthétisés par les algues des deuxième et troisième conditions expérimentales, il est évident lorsqu'on

regarde les taux de croissance des algues soumises aux trois conditions (fig. 8) que la concentration de Cd influence grandement leur croissance.

Pour la condition 30 ppb de Cd(II), on remarque à la figure 8 que le taux de croissance des algues à partir du jour huit (8) d'expérience est similaire à celui des algues témoins. Cette constatation met en valeur l'efficacité des peptides induits par la présence de Cd à lier le Cd présent dans la cellule. Le taux de croissance d'une population d'algues nous permettant de vérifier s'il y a développement d'un mécanisme de tolérance (Bariaud et Mestre, 1984), on peut soupçonner que les peptides synthétisés empêchent le Cd d'interférer avec les voies métaboliques des cellules. Les cellules auraient alors un comportement normal malgré le fait qu'elles contiennent une quantité assez élevée de Cd. En effet, une concentration nominale de 30 ppb de Cd(II) a été ajoutée au sac de la deuxième condition expérimentale pour donner une concentration maximale dosée d'environ 9 ppb de Cd(II) en solution (tabl. 4). Le résultat de cette contamination est qu'entre 115 et 128  $\mu\text{g Cd(II)/g}$  de protéines (poids sec) étaient liés à la cellule à la fin de l'expérience. A titre de comparaison, entre 3,5 et 3,8  $\mu\text{g Cd(II)/g}$  de protéines (poids sec) étaient liés aux algues témoins. Ainsi, une concentration de 30 ppb de Cd(II) serait idéale pour observer, d'une part, le choc toxique en début d'expérience, et d'autre part, la récupération et la croissance normale des algues grâce à la séquestration du métal par des

peptides.

Pour la condition 70 ppb de Cd(II), il semble que même si une certaine synthèse peptidique, que l'on soupçonne supérieure à celle de la deuxième condition, a lieu, elle ne soit pas suffisante pour permettre une récupération appréciable de la part des algues (fig. 8). Le taux de croissance des algues de cette condition est très stable à partir du huitième jour d'expérimentation et est environ deux fois plus faible que celui des algues des deux premières conditions.

Bien que 70 ppb de Cd(II) aient été ajoutés au sac de la troisième condition, seulement 16 ppb de Cd(II) étaient en solution (tabl. 4). La quantité de Cd liée aux peptides synthétisés était quant à elle de 689 µg Cd(II)/g de protéines (poids sec). Nous sommes en présence d'une concentration de Cd(II) lié aux cellules environ 5 à 6 fois supérieure à celle de la deuxième condition. Il semble donc qu'une concentration de 70 ppb de Cd(II) en solution excède la capacité de séquestration des peptides induits par la présence de Cd dans les cellules. Une autre hypothèse pouvant expliquer l'état physiologique anormal des cellules est que le pool de précurseurs des peptides chélateurs est épuisé. L'excès de Cd pourrait alors interférer avec les voies métaboliques des cellules diminuant ainsi leur croissance.

D'après ces considérations on peut mettre en évidence que la

présence de peptides fixateurs de Cd confère aux cellules un taux de croissance d'autant plus près de la normale que la concentration de Cd en solution est faible. Au-delà d'une certaine concentration la synthèse de peptides chélateurs ne serait plus suffisante pour désactiver le métal.

### **5. Identification des peptides chélateurs.**

Les pics du dosage du Cd (fig. 12 et 13B) de même que le balayage dans l'ultra-violet (fig. 17) peuvent aider à l'identification des peptides chélateurs de Cd. Toutefois, on se doit d'être prudent dans l'interprétation de ces figures.

Nous avons de bonnes raisons de croire que ce peptide chélateur est le glutathion ou un polymère du glutathion. En effet, le Cd(II), étant fortement attiré par les groupements sulphydryles, irait se lier au glutathion, remplaçant l'hydrogène du lien SH. Comme le Cd(II) est divalent une autre molécule de glutathion viendrait se lier formant ainsi un dimère. Ce complexe serait probablement peu stable. Il serait ensuite oxydé, entraînant la formation de Cd<sup>0</sup> et de GSSG. La polymérisation continuerait jusqu'à ce que des composés plus stables soient formés.

Ces résultats sont en accord avec la littérature existant sur le sujet. La plupart des peptides ou protéines identifiées chez les algues sont

des polymères du glutathion. Très récemment par exemple, Gekeler et coll. (1988) ont isolé de la fraction protéique de C. fusca un peptide phytochélateur ayant la structure suivante  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  où  $n=2$  à 5. Ce type de polymère a aussi été isolé chez les végétaux supérieurs avec un nombre d'unités peptidiques variant cette fois de 3 à 7 (Grill et al., 1985a). On se rappellera que la structure du glutathion est Glu-Cys-Gly. Lors de la polymérisation, la glycine serait remplacée par un lien  $\gamma$ -glutamyl entre l'acide glutamique et la cystéine de chaque résidu composant le polymère (Grill et al., 1985b). D'après Robinson et Thurman (1986), ce type de lien indique que les peptides sont induits par des enzymes et non par les gènes comme c'est le cas pour les métallothionéines.

## **6. Effet global du Cd sur *S. capricornutum*.**

### **6.1 Morphologie des cellules.**

De façon générale, il a été observé qu'une addition de métal toxique, ici le Cd, a entraîné des anomalies morphologiques chez les cellules de *S. capricornutum*. Comme c'est le cas chez plusieurs espèces d'algues, *Phaeodactylum tricornutum* (Nuzzi, 1972), *C. vulgaris* (Foster, 1977), *Skeletonema costatum* (Smith, 1983), *Sticococcus bacillaris* (Skowroński et

al., 1985), Dunaliella bioculata (Heuillet et al., 1986), C. pyrenoidosa (Stauber et Florence, 1986) et C. vulgaris et Scenedesmus quadricauda (Bastien et Côté, 1988 a et b), la présence d'un métal toxique en solution a provoqué une augmentation du volume cellulaire chez S. capricornutum.

Cette augmentation du volume cellulaire pourrait avoir deux causes principales. Premièrement, selon Stauber et Florence (1986), l'effet principal de l'ajout de métal toxique, dans leur expérience avec le cuivre, sur les algues, serait une destruction des sites actifs des enzymes et une diminution du rapport GSH/GSSG par l'inhibition de la glutathione réductase. Une diminution du rapport glutathion réduit (GSH) et glutathion oxydé (GSSG) résulterait en un arrêt de la mitose. Comme on sait que les métaux sont très attirés par les groupements sulphydryles (SH), il n'est pas impossible qu'ils interagissent aussi avec la méthionine, autre acide aminé contenant du soufre. Or, la méthionine jouerait un rôle important dans la formation du fuseau achromatique lors de la division cellulaire (Davies, 1976). De plus, il est bien connu que deux acides aminés, la méthionine et la sérine, servent à la synthèse de la cystéine (Lehninger, 1982). La cystéine est l'un des acides aminés composant le glutathion. La synthèse et le rôle exact du glutathion chez le phytoplancton et les végétaux en général ne semblent pas être connus (Kurelec, 1977; Beevers et al., 1982). De plus, Jones et coll. (1987) rapportent que le Cd peut interagir avec l'enzyme transformant les acides

gras saturés en acides gras polyinsaturés. Les acides gras polyinsaturés font partie des lipides membranaires et jouent un rôle important dans l'intégrité des membranes. En outre, ils sont essentiels aux niveaux supérieurs de la chaîne trophique. On est à même de constater qu'il n'est pas facile de déterminer tous les effets de la liaison d'un métal toxique avec les groupements SH sur la biochimie d'une cellule.

Deuxièmement, on a observé à quelques reprises que la photosynthèse était peu affectée par la présence de métal toxique (Butler et al., 1980; Stauber et Florence, 1986). Ainsi, dans notre expérience, l'effet combiné d'une suppression de la mitose et du maintien de l'activité photosynthétique pourrait expliquer le gonflement des cellules après l'intoxication au Cd.

Cette augmentation de volume cellulaire du phytoplancton pourrait avoir une conséquence physiologique indirecte. En effet, une cellule gonflée présente un rapport surface/volume plus élevé qu'une cellule normale. Ainsi, pour une même concentration ou quantité de métal dans une cellule, le rapport métal/matériel cellulaire serait beaucoup plus faible dans une cellule gonflée que dans une cellule normale. On serait en présence d'un phénomène de dilution.

L'observation de ces très grosses cellules induites par la présence de Cd nous suggère quelques explications quant à la localisation du Cd dans

la cellule. Comme Stauber et Florence (1986) l'ont proposé, l'augmentation du volume cellulaire serait due à l'accumulation de carbone dans la cellule. Le carbone ne pourrait être excrété ou utilisé dans la division cellulaire puisque la division est inhibée. Le Cd, tout comme le cuivre dans le cas de Stauber et Florence, ne semble pas ici affecter la photosynthèse. De plus, la majorité des fonctions cellulaires, surtout dans le cas de la deuxième condition expérimentale, ne semblent pas inhibées, ce qui suggère que le Cd(II) aurait été désactivé par les groupements SH intracellulaires plutôt que membranaires. Ainsi, pour les algues soumises à la deuxième condition expérimentale, on a de bonnes raisons de croire que le Cd(II) se trouve chélaté soit par la cystéine ou par le glutathion dans le cytoplasme de la cellule.

Pour ce qui est de la troisième condition expérimentale, comme la concentration interne de Cd est très élevée (fig. 13B), on pourrait croire que tous les sites des peptides chélateurs étant occupés, il y a débordement du Cd sur les autres métabolites cellulaires. L'excès de métal irait même jusqu'à affecter les protéines membranaires (Stauber et Florence, 1986). Il pourrait s'en suivre une augmentation de la perméabilité membranaire ce qui entraînerait la rupture de la cellule. D'ailleurs, quelques cellules exposées à 70 ppb de Cd(II) ont été observées presque vides de leur contenu cellulaire.

## 6.2 pH des milieux de culture.

On a mentionné précédemment que la concentration de Cd ionique, Cd(II), pour S. capricornutum était très faible. Effectivement, 16 ppb de Cd(II) sont suffisants pour réduire considérablement le taux de croissance de la population d'algues et empêcher toute récupération (fig. 8).

Un des facteurs influençant beaucoup la biodisponibilité et la toxicité d'un métal en solution est le pH (Skowroński et al., 1985; Wong, 1987). Il semblerait que l'espèce d'algue de même que le milieu de culture utilisé joueraient sur l'effet toxique du métal. Ainsi, Skowronski et coll. (1985) rapportent que pour l'espèce Sticococcus bacillaris le Cd est moins toxique à un pH entre 2,7 et 5,5 qu'à un pH se situant entre 6,0 et 7,0. Les auteurs croient que le Cd est moins toxique à faibles pH parce qu'une compétition existe entre les ions  $H^+$  et le Cd(II) pour les sites membranaires où la prise en charge a lieu. Wong (1987) rapporte que des pH basiques au-delà de 8,0 atténuent l'effet toxique du Cd sur les algues. A des pH élevés, les ions métalliques précipitent sous forme d'hydroxydes.

Le pH des milieux de culture lors de l'expérimentation variait la plupart du temps entre 5,61 et 7,63 (tabl. 3). Il existe une seule exception aux jours 2 et 3 pour les sacs témoin et celui contenant 30 ppb de Cd(II) puisqu'à ce moment le pH se situe au-dessus de 8,0. On peut dire qu'en

résumé tout au long de l'expérience, les pH se rangeaient dans la gamme permettant d'observer un effet toxique maximal du Cd sur les algues. La figure 18 présente la distribution des espèces solubles du Cd dans l'eau douce pour des pH de 4 à 9.

### 6.3 Présence de peptides phytochélateurs.

D'après l'analyse des résultats effectuée au point 5 précédent, il y a tout lieu de croire qu'un polymère du glutathion serait la phytochélatine riche en cystéine, donc en soufre, induite par la présence de Cd dans les milieux de culture. Dans la plupart des cas rapportés dans la littérature, les phytochélatines se présentent sous la forme ( $\gamma$ -Glu-Cys) $_n$ -Gly (Grill et al., 1985b, 1987; Gekeler et al., 1988) ou si leur structure n'est pas identifiée formellement, on pense toutefois qu'elle est différente de celle des métallothionéines (Fujita et al., 1977; Stokes, 1977; Bariaud et al., 1985; Rauser, 1987). Selon le schéma proposé précédemment, les peptides phytochélateurs agiraient comme intermédiaires entre le Cd(II) et le Cd<sup>0</sup>, inoffensif pour la cellule. On pourrait toutefois retrouver au même moment dans les cellules tous les intermédiaires entre le glutathion et les polymères peptidiques stables.

Bien qu'on sache maintenant que la plupart des algues

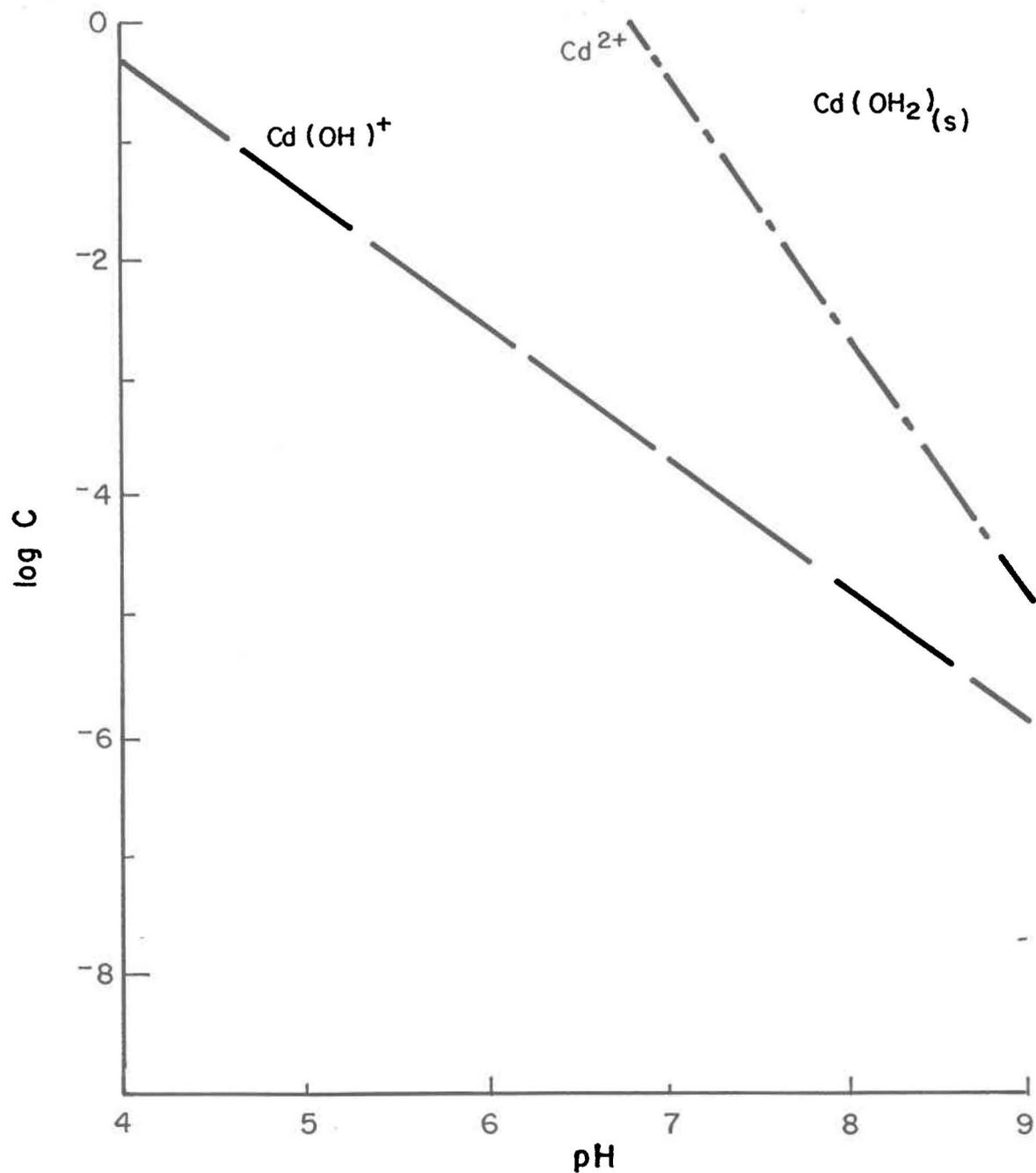


Figure 18. Distribution des espèces solubles de cadmium en eau douce pour des pH se situant entre 4 et 9. Valeurs des constantes ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ ;  $P = 1 \text{ atm}$ ;  $I = 0$ ) tirées de Smith et Martel (1976).

unicellulaires synthétise des phytochélatines pour contrer l'action néfaste des métaux toxiques sur leur métabolisme, peu de choses sont connues sur le comportement du complexe phytochélatine-métal. Certains auteurs ont suggéré que ce complexe serait excrété dans le milieu ambiant (Cossa, 1976; Foster, 1977; Kettle et deNoyelles, 1986). Heuillet et coll. (1986) quant à eux proposent que le complexe pourrait être accumulé dans les vacuoles de la cellule.

Un autre mécanisme de détoxification consisterait en une diminution de la prise en charge du Cd(II) par un changement de la perméabilité membranaire. Ce mécanisme pourrait conférer une résistance aux souches exposées au Cd (Bariaud et Mestre, 1984; Bariaud et al., 1985). Un tel mécanisme existe bel et bien chez la bactérie Staphylococcus aureus (Weiss et al., 1978). La résistance au Cd chez cette bactérie est due à deux (2) plasmides (Silver, 1984). Le premier, *cadA*, permettrait l'efflux du Cd hors de la cellule. Il s'agirait d'un système d'échange du type  $Cd(II)/2H^+$  nécessitant de l'énergie (ATP). Le rôle du deuxième, *cadB*, est moins bien connu. On croit cependant que ce plasmide induit une activité de complexation qui serait due à une composante membranaire du type métallothionéine. On ne sait toutefois pas si le type de résistance que le deuxième plasmide provoque pourrait être plausible chez le phytoplancton.

On sait en effet que les phytochélatines diffèrent des métallothionéines surtout par le fait que leur synthèse n'est pas induite directement par les gènes (Grill et al., 1986, 1987).

#### 6.4 Mode d'action possible du Cd.

A la lumière de ces données, on peut proposer un scénario des différentes moyens utilisés par la cellule pour contrer la toxicité du cadmium.

Le Cd, métal non essentiel pour la cellule, emprunterait le système de transport d'un métal essentiel pour entrer dans la cellule. Il s'agirait d'un métal qui lui est chimiquement similaire, le manganèse ou le zinc par exemple (Weiss et al., 1978). On croit que l'inhibition des transporteurs membranaires du Mn(II) serait dépendante de la concentration intracellulaire de ce métal mais que la concentration de Cd(II) n'aurait aucun effet sur eux (Silver, 1978).

La cellule de phytoplancton lierait ensuite le Cd(II) au pool de glutathion intracellulaire. Une activité de polymérisation du glutathion plus marquée pourrait se produire à ce moment. On ne peut affirmer si la liaison du Cd(II) par le glutathion constitue en soi un mécanisme de résistance ou s'il s'agit d'une méthode de détoxification efficace mais temporaire. Si on

considère la deuxième hypothèse, il se pourrait qu'à long terme il se produise un efflux spécifique du Cd(II) au niveau membranaire comme c'est le cas chez S. aureus (Silver, 1984).

Etant donné la ressemblance sur plus d'un point des bactéries et des algues unicellulaires, les résultats obtenus sur les bactéries pourraient servir de base à des recherches futures sur les mécanismes de résistance des microorganismes phytoplanctoniques.

## Conclusion

Pendant les 7 premiers jours d'exposition au Cd, les algues de l'espèce Selenastrum capricornutum réagissent très fortement. Ceci se traduit par un taux de croissance faible par rapport à celui des algues témoins. Par la suite, les algues exposées à 30 ppb de Cd(II) démontrent une récupération marquée. Par contre, une concentration de 70 ppb de Cd(II) semble trop élevée pour permettre toute récupération de la part de la population: le taux de croissance reste stable jusqu'à la fin de l'expérience et est environ la moitié de ceux des autres groupes.

On a noté que les concentrations nominales et réelles dosées de Cd(II) dans les sacs diffèrent quelque peu. Ce phénomène peut s'expliquer par la complexation du Cd sur les parois des sacs de plastique. Au fur et à mesure que la quantité d'algues, c'est-à-dire de sites de complexation, en solution augmente, il se produirait une désorption du Cd(II) des parois vers les algues en solution.

Lors des chromatographies, la majorité du Cd dosé dans les protéines extraites des algues était associé aux fractions contenant les protéines de très faible poids moléculaire (peptides). Le réactif Bio-rad s'est montré impuissant à doser les peptides contenus dans ces fractions. Bien qu'on ne puisse déterminer la quantité de peptides induits par la présence de

Cd, il est clair que plus la concentration de Cd en solution est élevée, plus la quantité de peptides induits est importante. Toutefois, il semble qu'une concentration de 70 ppb cd Cd(II) en solution excède la capacité de séquestration des peptides induits par la présence de Cd dans les cellules. Les taux de croissance des populations concernées en sont la preuve.

Nous ne pouvons identifier formellement les peptides chélateurs isolés des cellules phytoplanctoniques mais nous croyons que le glutathion et/ou un polymère du glutathion seraient en cause. En effet, le Cd(II) en se liant aux groupements sulphydryles des molécules de glutathion pourrait induire la polymérisation de celles-ci. Nous croyons que dans l'avenir, les études du même genre devraient inclure des dosages du glutathion et des groupements sulphydryles des peptides induits par la présence de métal.

## BIBLIOGRAPHIE

- Bariaud, A. et J. C. Mestre. 1984. Heavy metal tolerance in a cadmium-resistant population of *Euglena gracilis*. Bull. Envir. Contam. Toxicol., 32: 597-601.
- Bariaud, A., M. Bury et J. C. Mestre. 1985. Mechanisms of Cd<sup>2+</sup> resistance in *Euglena gracilis*. Physiol. Plant., 63: 382- 386.
- Bastien, C. et R. Côté. 1988a. Effets du cuivre sur l'ultrastructure de *Scenedesmus quadricauda* et *Chlorella vulgaris*. Int. Revue Ges. Hydrobiol., 73: sous presse.
- Bastien, C. et R. Côté. 1988b. Variations temporelles de l'ultrastructure de *Scenedesmus quadricauda* exposée au cuivre lors d'une expérience à long terme. Int. Revue Ges. Hydrobiol., 73: sous presse.
- Beevers, L. et al.. 1982. Nucleic acids and proteins in Plants. I: Structure, biochemistry, and physiology of proteins. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, vol. 14A. Boulter et Parthier eds, 768 p.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the Quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- Butler, M., A. E. J. Haskew et M. M. Young. 1980. Copper tolerance in the green alga, *Chlorella vulgaris* Plant, Cell and Environment, 3: 119-126.
- Chiaudani, G. et M. Vighi. 1978. The use of *Selenastrum capr.* batch cultures in toxicity studies. Mitt. Internat. Verein. Limnol., 21: 316-329.
- Cluis, D., P. Couture, R. Bégin et S. A. Visser. 1988. Potential eutrophication assessment in rivers: relationship between produced and exported loads. Schweiz. Z. Hydrol., 50: (sous-presse).
- Cossa, D. 1976. Sorption du cadmium par une population de la diatomée *Phaeodactylum tricorutum* en culture. Mar. Biol., 34: 163-167.
- Davies, A. G. 1976. An assessment of the basis of mercury tolerance in *Dunaliella tertiolecta*. J. mar. bio. Ass. U. K., 56: 39-57.

Foster, P. L. 1977. Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green alga. *Nature*, 269: 322-323.

Fujita, M., K. Iwasaki et E. Takabatake. 1977. Intracellular distribution of mercury in freshwater diatom, *Synedra* cells. *Environ. Res.*, 14: 1-13.

Gekeler, W., E. Grill, E.-L. Winnacker et M. H. Zenk. 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.*, 150: 197-202.

Grill, E., E.-L. Winnacker et M. H. Zenk. 1985a. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 30: 674-676.

Grill, E., M. H. Zenk et E.-L. Winnacker. 1985b. Induction of heavy metal sequestering phytochelatin by cadmium in cell cultures of *Rauvolfia serpentina*. *Naturwiss*, 72: 432-434.

Grill, E., E.-L. Winnacker et M. H. Zenk. 1986. Synthesis of seven different homologous phytochelatins in metal-exposed *Schizosaccharomyces pombe* cells. *FEBS Lett.*, 197: 115-120.

Grill, E. 1987a. Phytochelatins, the heavy metal binding peptides of plants: characterization and sequence determination. In: *Metallothionein II*. Eds. Kagi et Kojima. Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 317-323.

Grill, E., E.-L. Winnacker et M. H. Zenk. 1987b. Phytochelatins, a class of metal binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. USA*, 84: 439-443.

Heuillet, E., A. Moreau, S. Halpern, N. Jeanne et S. Puisseux-Dao. 1986. Cadmium binding to a thiol-molecule in vacuoles of *Dunaliella biaculata* contaminated with CdCl<sub>2</sub>: electron probe microanalysis. *Bio. Cell*, 58(1): 79-85.

Higham, D. P., P. J. Sadler et M. D. Scawe. 1985. Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* novel cadmium proteins. *Science*, 225: 1043-1046.

Jones, G. J., P. D. Nichols, R. D. Johns et J. D. Smith. 1987. The effect of mercury and cadmium on the fatty acid and sterol composition of the marine diatom *Asterionella glacialis*. *Phytochemistry*, 26(5):

1343-1348.

- Kägi, J. H. R. et B. L. Vallee. 1960. Metallothionein: a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. Jour. Biol. Chem., 235: 3460-3465.
- Kettle, W. D. et F. deNoyelles Jr. 1986. Effects of cadmium stress on the plankton communities of experimental ponds. J. Freshwater Ec., 3(4): 433-443.
- Kurelec, B. et al. 1977. Phytoplankton: presence of  $\delta$ -glutamyl cycle enzymes. Comp. Biochem. Physiol., 56B: 415-419.
- Langis, R., P. Couture, J. De la Noüe et N. Méthot. 1986. Induced responses on algal growth and phosphate removal by three molecular weight DOM fractions from a secondary effluent. Journal of Water Pollution Control Federation, 58: 1073-1077.
- Lehninger, A. L. 1982. Principles of biochemistry. Worth Publishers Inc.. New York, 1011 p.
- McKnight, D. M. et F. M. M. Morel. 1979. Release of weak and strong copper-complexing agents by algae. Limnol. Oceanogr., 24(5): 823-837.
- Miller, W. E., J. C. Greene et T. Shiroyama. 1978. The *Selenastrum capricornutum* Printz Algal Assay Bottle Test. Experimental design, application, and data interpretation protocol. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Oregon. pp. 19-20.
- Minkel, D. T., K. Poulsen, S. Wielgus, C. F. Shaw et D. H. Petering. 1980. On the sensitivity of metallothioneins to oxydation during isolation. Biochem. J., 191: 475-485.
- Nuzzi, R. 1972. Toxicity of mercury to phytoplankton. Nature, 237: 38-40.
- Pharmacia Fine Chemicals. Filtration sur gel: Théorie et Pratique. Manuel d'utilisation de la colonne à chromatographie.
- Piccinni, E., O. Coppellotti et L. Guidolin. 1985. Chelatins in *Euglena gracilis* and *Achromonas danica*. Comp. Biochem. Physiol., 82C (1): 29-36.

- Rai, L. C., J. P. Gaur et H. D. Kumar. 1981. Phycology and heavy-metal pollution. Biol. Rev., 56: 99-151.
- Rand, G. M. et F. R. Petrocelli. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology. Hemisphere Publishing, New York. 666 p.
- Rausser, W. E. 1987. The Cd-binding protein from tomato compared to those of other vascular plants. In: Metallothionein II. Ed. Kagi et Kojima. Birkhauser Verlag, Basel. pp. 301-308.
- Ridlington, J. W., D. C. Chapman, D. E. Goeger et P. D. Whanger. 1987. Metallothionein and Cu-chelatin: characterization of metal-binding proteins from tissues of four marine animals. Comp. Biochem. Physiol., B: Comp. Biochem., 70B(1): 93-104.
- Robinson, N. J. et D. A. Thurman. 1986. Isolation of a copper complex and its rate of appearance in roots of *Mimulus guttatus*. Planta, 169: 192-197.
- Robinson, N. J., K. Barton, C. M. Naranjo, L. O. Sillerud, J. Truwheila, K. Watt et P. J. Jackson. 1987. Characterization of metal binding peptides from cadmium resistant plant cells. In: Metallothionein II. Eds. Kagi et Kojima. Birkhauser Verlag, Basel. pp. 323-327.
- Rodhe, W. 1978. Algae in culture and nature. Mitt. Int. Ver. Limn., 21: 7-20.
- Rugstad, H. E. et T. Norseth. 1975. Cadmium resistance and content in cadmium-binding protein in cultured human cells. Nature, 257: 136-137.
- Saboski, E. M. 1977. Effects of mercury and tin on frustular ultrastructural of the marine diatom, *Nitzschia liebethrutti*. Water, Air, and Soil Pollution, 8: 461-466.
- Silver, S. 1978. In: Bacterial transport. B. P. Rosen éd. Dekker, New York. 684 p.
- Silver, S. 1984. In: Changing metal cycles and human health. J. O. Nriagu éd. Dallem Konferenzen 1984. Springer-Verlag, Berlin. pp. 199-223.
- Skowronski, T., M. Jakuboski et B. Pawlik. 1985. Cadmium toxicity to green alga *Stichococcus bacillaris*. Acta Microbiologica Polonica, 34(3-4): 309-312.

Smith, M. A. 1983. The effects of heavy metal on the cytoplasmic fine structure of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta). *Protoplasma*, 116: 14-23.

Smith, R. M. et A. E. Martell. 1976. Critical stability constants. In: *Inorganic complexes: Vol. 4*. Plenum Press, New York.

Sorrentino, C. 1978. The effects of heavy metals on phytoplankton. A review. *Phykos*, 18: 149-161.

Stauber, J. L. et T. M. Florence. 1986. Reversibility of copper-thiol binding in *Nitzschia closterium* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Aquatic Toxicology*, 8: 223-229.

Stein, J. R. 1973. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge, University Press, 448 p.

Stokes, P. M. 1977. A low molecular weight copper binding protein in a copper tolerant strain of *Scenedesmus acutiformis*. In: *Trace Substances in environmental health - IX. Proceedings of U. of Missouri's 11th Annual Conference on Trace Substances in Environmental Health*. D. D. Hemphill éd., pp. 146-155.

Stokes, P. M. 1983. Responses of freshwater algae to metals. In: *Progress in Physiological Research*, vol. 2, Round E. et Chapman A. édés., Elsevier Science Publishers B. V., New York, pp. 87-112.

Thompson, P.-A., P. Couture, C. Thellen et J.-C. Auclair. 1987. Structure-function relationships for monitoring cellular stress and recovery responses with *Selenastrum capr*. *Aquatic Toxicology*, 10: 291-305.

Vercheval, C. 1988. Etude des protéines de faible poids moléculaire fixatrices de  $Zn^{++}$  induites lors de la culture d'*Alcaligenes eutrophus* CH<sub>34</sub> en présence de cet ion. Mémoire de Licence. Université de Liège. 61 p.

Weiss, A. A., S. Silver et T. G. Kinscherf. 1978. Cation transport alteration with plasmid-determined resistance to cadmium in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemo.*, 14(6): 856-865.

Wong, P. T. S. et P. Couture. 1986. Toxicity screening using phytoplankton. In: B. J. Dutka et G. Bitton (eds). Toxicity testing using microorganisms. Volume II, CRC Press, Boca Raton, Fla, pp. 79-100.

Wong, P. T. S. 1987. Toxicity of cadmium to freshwater microorganisms, phytoplankton, and invertebrates. In: Cadmium in the aquatic environment. Ed. J. O. Nriagu et J. B. Sprague. John Wiley & Sons, N. Y. pp. 117-138.