UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

x.

Mémoire présenté à

L'Institut national de la recherche scientifique (Eau)

comme exigence partielle

de la

maîtrise ès sciences de l'eau

par

Brigitte Bérubé

"Contribution à l'étude de l'adsorption et du transport du zinc chez l'algue Chlamydomonas variabilis"

.

~

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions particulièrement monsieur André Tessier qui nous a proposé le sujet de ce mémoire, nous a conseillé au cours de sa réalisation et nous a aidé à réviser le texte.

Nous sommes reconnaissants à monsieur Stephen Bates qui nous a aidé à concevoir et réaliser les expériences de cette étude.

Nos remerciements vont également à monsieur Bernard Veilleux pour son aide apportée lors de l'expérience sur le rôle du fer dans la fixation du zinc.

Nous voulons également remercier monsieur André Parent pour l'élaboration des figures et des graphiques ainsi que mesdemoiselles Johanne Parrot et Anne Provencher pour la dactylographie du manuscrit. RÉSUMÉ

Dans le but d'en arriver à une meilleure compréhension des mécanismes d'adsorption et de transport des métaux à travers la membrane cellulaire du phytoplancton, nous avons étudié ces deux modes de fixation du zinc avec la chlorophycée <u>Chlamydononas variabilis</u> placée dans différentes conditions expérimentales. Ainsi, l'influence sur ces deux modes de la concentration de zinc dissous, de la température et de la compétition entre le zinc et le magnésium, de même que le rôle des groupements sulfhydriles, du fer et du phosphore ont été examinés avec des algues provenant de cultures "batch". Dans chaque expérience, les concentrations de zinc adsorbé ( $[Zn]_a$ ) et de zinc intracellulaire ( $[Zn]_c$ ) ont été déterminées après une incubation de dix minutes.

L'adsorption est fonction de la concentration de zinc ionique libre demeurant dans la solution et est décrite par un isotherme de Langmuir. C'est une réaction endothermique où semblent prédominer des processus d'échange ionique. Le magnésium compétitionne avec le zinc pour les sites d'adsorption; le fer présent normalement dans le milieu de culture et le phosphore ne semblent pas jouer de rôle majeur dans l'adsorption.

Le transport du zinc à travers la membrane peut s'effectuer selon deux mécanismes dont l'un est prépondérant aux faibles valeurs de zinc

ii

libre et l'autre aux fortes valeurs. Le second montre un flux qui est une fonction linéaire de la concentration de zinc libre et suggère que le zinc est transporté dans la cellule par diffusion. Cependant, les valeurs de l'énergie d'activation obtenues en mesurant le flux à différentes températures suggèrent qu'un mécanisme de transport actif pourrait aussi être impliqué. Le magnésium diminue la quantité de zinc transporté alors que le fer présent dans le milieu de culture ne l'affecte pas. Le phosphore semble offrir des sites de fixation du zinc à l'intérieur de la cellule.

## TABLE DES MATIÈRES

Page

۰.

REMERCIEMENTS	i
RÉSUMÉ	ii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
1. INTRODUCTION	1
<ol> <li>1.1 Rôle biochimique du zinc chez les algues</li> <li>1.2 Relation entre la spéciation des métaux et leur</li> </ol>	1
biodisponibilité pour les algues	2
1.3 Les interactions entre les métaux et les algues	4
1.4 Mécanismes de fixation des métaux	5
1.5 Objectif de l'étude	11
2. MATERIEL ET METHODE	12
2.1 Organismes et conditions de culture	12
2.2 Réactifs et verrerie	16
2.3 Procédure expérimentale	16
2.3.1 Procédure générale	16
2.3.2 Expérience 1	19

# Page

2.3.3 Expérience 2	21
2.3.4 Expérience 3	21
2.3.5 Expérience 4	23
2.3.6 Expérience 5	25
2.3.7 Expérience 6	25
2.3.8 Résumé des conditions expérimentales	27
2.3.9 Dénombrement des cellules et poids secs	27
3. RÉSULTATS	29
3.1 Expérience 1	29
3.2 Expérience 2	32
3.3 Expérience 3	32
3.4 Expérience 4	35
3.5 Expérience 5	37
3.6 Expérience 6	37
4. DISCUSSION	40
4.1 Zinc extractible avec EDTA	40
4.1.1 Influence de la concentration de zinc dissous	42
4.1.2 Influence de la température	46
4.1.3 Influence du magnésium	51
4.1.4 Influence du fer	53
4.1.5 Influence du phosphore	55
4.2 Zinc non extractible avec EDTA	55
4.2.1 Influence de la concentration de zinc dissous	57
4.2.2 Influence de la température	61

## Page

4.2.3	Influence du magnésium	65
4.2.4	Influence du fer	66
4.2.5	Influence du phosphore	<b>6</b> 6
5. CON	CLUSION	68
BIBLIOG	RAPHIE	70

ANNEXE

### LISTE DES TABLEAUX

		Page
Tableau 2.1	Composition du milieu AAP	13
Tableau 2.2	Concentrations de zinc et d'EDTA utilisées dans l'expérience 1	20
Tableau 2.3	Concentrations de magnésium et de sodium utilisées dans l'expérience 3	22
Tableau 2.4	Concentrations d'EDTA et de zinc libre utilisées dans l'expérience 4	24
Tableau 2.5	Concentrations d'EDTA et de zinc libre utilisées dans l'expérience 5	26
Tableau 2.6	Résumé des conditions expérimentales pour les six expériences	28
Tableau 3.1	Effets du fer et du phosphore ajoutés à des cultures en phase stationnaire sur l'adsorption et le transport du zinc	39
Tableau 4.1	Paramètres de l'isotherme de Langmuir pour l'ad- sorption du zinc par <u>Chlamydomonas variabilis</u>	45
Tableau 4.2	Changements d'enthalpie standard de la réaction d'adsorption	50
Tableau 4.3	Constantes de vitesse pour le transport du zinc par <u>Chlamydomonas variabilis</u>	60

### LISTE DES FIGURES

÷.

			Page
Figure	1.1	Modèle de l'accumulation du zinc par <u>Phaeodactylum</u> tricornutum	7
Figure	1.2	Comparaison entre le comportement d'un métal à la surface d'une électrode potentiométrique, d'une électrode polarographique et d'une cellule vivante	10
Figure	2.1	Montage expérimental pour la culture des algues en "batch"	15
Figure	2.2	Procédure expérimentale pour distinguer le zinc adsorbé du zinc intracellulaire	17
Figure	3.1	Courbes de croissance de <u>Chlamydomonas</u> variabilis dans le milieu AAP sans zinc	30
Figure	3.2	Relations entre les concentrations de zinc adsorbé ou intracellulaire et la concentration de zinc libre après une incubation de 10 minutes	31
Figure	3.3	Effet de la température sur les concentrations de zinc adsorbé ou intracellulaire pour des incubations de 10 minutes	33
Figure	3.4	Concentrations de magnésium adsorbé, de magnésium intracellulaire, de zinc adsorbé, et de zinc intracellulaire en fonction de la concentration de magnésium libre en solution	34

Figure 3.5	Effet d'un traitement de <u>Chlamydomonas variabilis</u> avec une solution 10 <sup>-4</sup> M de PCMBS sur la concen- tration de zinc adsorbé ou intracellulaire pour	
	des incubations de 10 minutes	36
Figure 3.6	Effet d'un traitement de <u>Chlamydomonas variabilis</u> (initialement privée de fer) avec une solution de	
	fer (0.59 µm) sur la concentration de zinc adsorbé ou intracellulaire	38
Figure 4.1	Isotherme d'adsorption de Langmuir pour l'expérience 1a	44
Figure 4.2	Graphique de ln $\frac{[Zn]_a}{(Q - [Zn]_a) [Zn^{2+}]}$ en fonction de l'inverse de la température	49
Figure 4.3	Relation entre le flux de zinc à travers la membrane de <u>Chlamydomonas</u> <u>variabilis</u> et la concentration de zinc libre en solution	58
Figure 4.4	Graphique de ln F en fonction de l'inverse de la température	63

#### 1. INTRODUCTION

#### 1.1 Rôle biochimique du zinc chez les algues

Le zinc, à cause de sa structure électronique, se combine chimiquement dans l'état d'oxydation +2 et tend à former des complexes relativement stables avec des composés métaboliques comme les protéines. Il ne semble pas être oxydé ou réduit dans des réactions biochimiques (Vallée, 1977).

C'est un métal essentiel à la croissance et au métabolisme des algues. Une déficience produit un arrêt de croissance de même que des changements chimiques importants: disparition des ribosomes, diminution de la synthèse de l'ARN et des protéines, dédoublement du contenu de l'ADN, augmentation du volume cellulaire et accumulation de peptides, d'acides aminés, de nucléotides, de polyphosphates et de protéines rares (Vallée, 1977; Rai et al., 1981).

De fortes concentrations de zinc peuvent cependant devenir toxiques. Elles provoquent une diminution de la chlorophylle et du rapport caroténoïde: chlorophylle, une inhibition de la photosynthèse, une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire et l'apparition d'anomalies morphologiques (Rai <u>et al.</u>, 1981).

## 1.2 <u>Relation entre la spéciation des métaux et leur biodisponibilité</u> pour les algues

La spéciation d'un métal en solution réfère à sa distribution entre ses différentes formes. En effet, en solution, un métal peut exister sous les trois formes suivantes: i) ion libre ou plus précisément ion hydraté; ii) complexé avec des ligands inorganiques; iii) complexé avec des ligands organiques. La détermination de la spéciation d'un métal est très importante car elle conditionne les effets que peut avoir ce métal vis-à-vis plusieurs organismes aquatiques, notamment les algues.

Ces dernières années, plusieurs études effectuées en laboratoire ont mis en évidence le fait que la toxicité d'un métal et son accumulation dans les cellules de phytoplancton sont reliées à l'activité de l'ion métallique libre plutôt qu'à la concentration totale de métal dans le milieu. Sunda et Guillard (1976) furent les premiers à mettre ce phénomène en évidence. Ils démontrèrent, avec la diatomée estuarienne <u>Thalassiosira</u> <u>pseudonana</u>, que l'inhibition de la vitesse de croissance et le contenu en cuivre des cellules étaient fonction de l'activité de l'ion cuivrique (Cu<sup>2+</sup>). Les variations de l'activité de Cu<sup>2+</sup> étaient obtenues indépendamment de celles du cuivre total en changeant la concentration de l'agent chélateur et le pH. De façon semblable, Anderson et Morel (1978) démontrèrent que la toxicité du cuivre pour l'algue marine <u>Gonyaulax tamarensis</u>, telle que mesurée par la perte de motilité des cellules, était reliée à l'activité de l'ion cuivrique. En 1980, Allen <u>et al.</u> mesurèrent l'effet du zinc mis en présence de différents agents chélateurs sur la croissance de l'algue <u>Microcystis aeruginosa</u> et déterminèrent que la toxicité était directement dépendante de la concentration de métal libre plutôt que de la concentration totale de métal. Ils identifièrent les ions  $Zn^{2+}$  et ZnOH<sup>+</sup> comme étant les principales formes du zinc, en plus du complexe formé avec l'agent chélateur.

Ces études démontrent que l'activité des ions métalliques libres détermine la vitesse de fixation de même que les effets biologiques du métal mais ne prouvent pas que les ions libres soient la seule forme biodisponible aux algues. En effet, il semble que d'autres espèces inorganiques peuvent être prises par le phytoplancton. Les résultats de Davies (1978) suggèrent cependant que les métaux liés à des substances organiques ne peuvent être captés.

De nombreux facteurs affectent la spéciation des métaux traces. Ce sont principalement:

- le pH: en général, un pH bas favorise la formation d'ions métalliques libres alors qu'un pH élevé favorise la formation de précipités comme par exemple les oxydes ou hydroxydes (Gadd et Griffiths, 1978; Rai et al., 1981).
- la salinité: en milieu marin, la formation de complexes métalliques avec les anions majeurs de l'eau de mer produit une

diminution de l'activité des ions métalliques libres, comparativement à ce qui se passe dans les eaux douces (Morel <u>et al.</u>, 1979; Rai <u>et al.</u>, 1981).

- 3) la complexation organique: la matière organique dans les eaux naturelles et les ligands artificiels dans les milieux de culture jouent un rôle important dans le contrôle de la toxicité car en complexant les métaux ils réduisent l'activité des ions métalliques libres (Morel <u>et al.</u>, 1979; Förstner et Wittmann, 1981).
- 4) la température: elle peut modifier les équilibres thermodynamiques qui régissent la spéciation et influencer ainsi les processus chimiques et physiques qui ont lieu dans le milieu aquatique (Rai et al., 1981; Förstner et Wittmann, 1981).

#### 1.3 Les interactions entre les métaux et les algues

La membrane cellulaire, directement accessible aux métaux en solution, est le premier site de leur action et par le fait même des dommages qu'ils peuvent occasionner. Elle agit comme barrière de diffusion et protège les systèmes cytoplasmiques (Rothstein, 1959). En effet, les protéines et les lipides de la membrane de même que les protéines et les polysaccharides de la paroi contiennent de nombreux groupements carbonyle, carboxyle, amino, phosphate et sulfhydrile qui peuvent lier les métaux très efficacement et conserver ainsi l'intégrité de la membrane comme barrière de diffusion (De Filippis, 1979; Crist et al., 1981).

En général, l'adsorption des métaux sur les algues est un phénomène réversible et peut être représentée par un isotherme d'adsorption de Langmuir (Crist <u>et al.</u>, 1981). Davies (1973) constata que la concentration de zinc adsorbé à la surface de l'algue marine <u>Phaeodactylum</u> <u>tricornutum</u> augmentait hyperboliquement avec la concentration de zinc en solution dans le milieu. Cette relation était conforme à un isotherme de Langmuir, indiquant qu'il y avait un nombre défini de sites réactifs sur la surface de la cellule. Les métaux lourds sont aussi adsorbés à la surface de cellules mortes (Gadd et Griffiths, 1978; Rai <u>et al.</u>, 1981) ou de fragments de parois cellulaires (Broda, 1972; Crist <u>et al.</u>, 1981) indiquant qu'aucune intervention métabolique n'est impliquée dans ce phénomène.

Les métaux qui ont traversé la membrane et pénétré dans le cytoplasme de la cellule peuvent se fixer sur certains sites. Contrairement à l'adsorption sur la surface des cellules, le transport intracellulaire serait dépendant du métabolisme des algues (Gadd et Griffiths, 1978).

#### 1.4 Mécanismes de fixation des métaux

Broda (1972) suggéra que la fixation du zinc par l'algue <u>Chlorella</u> fusca impliquait trois composantes. La première est un phénomène ré-

versible qui atteint rapidement l'équilibre et correspond à l'adsorption du zinc sur les sites de charges négatives de la membrane. Elle est fortement affectée par la composition de la solution (l'adsorption augmente avec la concentration de zinc en solution) mais non par un apport énergétique ou la température. La membrane est pourvue de deux types de sites possédant des affinités et des capacités de fixation très différentes; des isothermes d'adsorption séparés sont valides pour chacun de ces sites. L'entrée du zinc à l'intérieur de la cellule via un système de transport spécifique est la deuxième composante; elle fait appel à l'ATP comme source d'énergie. C'est donc un phénomène très dépendant de l'énergie et de la température. La dernière composante est celle où le zinc entre à l'intérieur de la cellule par une diffusion lente, indépendante de l'énergie, à travers des pores.

Davies (1973) proposa un mécanisme d'accumulation du zinc par la diatomée <u>Phaeodactylum tricornutum</u>; ce mécanisme implique deux étapes (figure 1.1). Une partie du métal s'adsorbe d'abord à la surface extérieure de la cellule et il s'établit un équilibre entre la solution et les sites d'adsorption. La concentration de zinc adsorbé à l'extérieur de la membrane ( $q_e$ ) est reliée à la concentration de zinc dans le milieu ( $C_e$ ) par un isotherme de type Langmuir. Le zinc est par la suite lentement transporté à travers la membrane à une vitesse ( $\Delta P/\Delta t$ ) proportionnelle au gradient d'activité/concentration ( $q_e - q_i$ ) et à M<sub>F</sub>, où  $q_i$  est la concentration de zinc lié à l'intérieur de la membrane et M<sub>F</sub> est une constante de vitesse. La concentration  $q_i$  devient rapidement en équilibre avec la concentration de métal dans le fluide intracellu-



Figure 1.1: Modèle de l'accumulation du zinc par <u>Phaeodactylum</u> tricornutum. D'après Davies (1973, 1978).

laire  $(C_i)$ . La relation entre  $q_i$  et  $C_i$  s'exprime aussi par un isotherme de Langmuir. Le zinc intracellulaire est par la suite lié à une protéine dont la capacité de liaison maximale (Q(max)) règle la valeur de  $C_i$  et en retour de  $q_i$ , contrôlant ainsi la fixation du zinc. D'après ce modèle, le transport à l'intérieur de la cellule se fait par diffusion et l'incorporation du métal dans la cellule implique une étape préliminaire d'adsorption sur la surface cellulaire.

Cossa (1976) démontra que le cadmium adsorbé sur la diatomée <u>Phaeodactylum tricornutum</u> pouvait être facilement désorbé par la cystéine alors que la fraction absorbée (intracellulaire) ne pouvait être éluée. Davies (1973) avait fait une démonstration semblable en ajoutant de l'EDTA à des cellules de <u>Phaeodactylum tricornutum</u> contenant du zinc. Le zinc adsorbé était rapidement désorbé alors que l'extraction du zinc intracellulaire s'avérait extrêmement lente. Cossa évalua que l'absorption était dépendante de l'adsorption, c'est-à-dire que c'était le cadmium adsorbé qui diffusait à l'intérieur des cellules. Les sites d'adsorption n'étaient que partiellement occupés par le cadmium et ils liaient effectivement d'autres métaux provenant du milieu de culture. Ainsi, il y avait compétition entre le cadmium et le zinc, et l'adsorption du cadmium sur les sites dépendait de leur libération par le zinc.

Whitfield et Turner (1979) développèrent un modèle qui compare le comportement d'un métal, M, à la surface d'une cellule vivante à son comportement à la surface d'une électrode potentiométrique ou d'une

électrode polarographique. Dans le cas de l'électrode potentiométrique, il y a équilibre entre le métal à la surface de la membrane, M<sub>c</sub>, et l'ion libre dans la solution,  $M^{Z^+}$  (figure 1.2a), et le flux,  $F_p$ , est pratiquement nul à l'interface. Dans le cas d'une électrode polarographique, lorsque l'ion métallique est réduit à l'électrode, il se crée un flux (figure 1.2b). Le flux maximum, (F<sub>v</sub>)<sub>max</sub>, dépend de la concentration totale de métal, [M]<sub>t</sub>, des constantes d'équilibre et cinétique et k<sub>d</sub> de la réaction de complexation, et des coefficients de dif-K fusion D des espèces (Buffle, 1979). Ces deux exemples représentent les cas extrêmes de flux d'un métal. Ainsi le rapport & du flux observé sur le flux maximum est de zéro pour les mesures potentiométriques et de un pour les mesures voltammétriques. Dans le cas de l'interface eau-cellule vivante (figure 1.2c), deux étapes sont considérées: 1) l'adsorption du métal sur certains sites à la surface de la cellule et 2) son transport à l'intérieur de la cellule. L'adsorption à la surface est décrite par un isotherme d'adsorption de Langmuir; on suppose que les phénomènes d'adsorption et de désorption sont rapides par rapport au processus de transport. Après s'être adsorbé, le métal traverse la membrane de la cellule. Lorsque la constante de vitesse, k, de transport de M à travers la membrane est suffisamment élevée, la membrane cellulaire peut se comporter de façon semblable à une électrode polarographique. Le transport peut alors être contrôlé par des paramètres chimiques (k<sub>d</sub>) ou physiques (D). Lorsque k<sub>c</sub> est suffisamment faible, la membrane de la cellule se comporte comme une électrode Le transport est alors contrôlé par des facteurs potentiométrique. biologiques (k\_).



Figure 1.2: Comparaison entre le comportement d'un métal à la surface d'une électrode potentiométrique (a), d'une électrode polarographique (b) et d'une cellule vivante (c). D'après Buffle (1979).

Bates <u>et al.</u> (1982) mirent au point une méthode pour distinguer le zinc adsorbé à la surface des algues vertes unicellulaires <u>Scenedesmus</u> <u>subspicatus</u> Hodat et <u>Chlamydomonas variabilis</u> Dangeard du zinc transporté à l'intérieur de la cellule. Le zinc adsorbé, défini opérationnellement comme étant le zinc extrait avec l'EDTA, était fonction de la concentration de zinc ionique libre demeurant dans le milieu de culture et pouvait être décrit par un isotherme de Langmuir. Le zinc transporté à l'intérieur de la cellule, défini opérationnellement comme le zinc demeurant avec la cellule après l'extraction avec l'EDTA, variait linéairement avec la concentration de zinc ionique demeurant en solution. Cette dernière relation suggérait que la majorité du zinc transporté dans la cellule provenait directement de la solution et non de la fraction adsorbée.

#### 1.5 Objectif de l'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre général des recherches effectuées à l'INRS-Eau afin d'identifier les paramètres à mesurer dans le milieu naturel pour évaluer la fraction des métaux traces disponible au phytoplancton. Pour y arriver, il est nécessaire de bien connaître les mécanismes d'adsorption et de transport des métaux à travers la membrane cellulaire. Dans ce cadre, l'objectif de l'étude est d'aider à la clarification des mécanismes d'adsorption et de transport du zinc par Chlamydomonas variabilis. Ce travail comporte six expériences. La première traite de l'effet de la concentration de zinc sur l'adsorption et le transport de ce métal par des algues provenant de souches cultivées en présence de zinc ou de souches carencées en zinc, la seconde de l'effet de la température sur l'adsorption et le transport du zinc, la troisième sur la compétition entre le zinc et le magnésium, la quatrième sur le rôle des groupements sulfhydriles dans la fixation du zinc, la cinquième sur le rôle du fer et la sixième sur l'influence i) du fer et ii) du phosphore ajoutés à des algues en phase stationnaire.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

#### 2.1 Organismes et conditions de culture

Les expériences ont été réalisées avec la chlorophycée <u>Chlamydomonas variabilis</u> Dangeard souche 511/5 provenant de l'ex-centre de recherche hydrobiologique de Gif-sur-Yvette, France. Les cellules utilisées pour les expériences décrites à la section 2.3 provenaient de cultures "batch" qui étaient elles-mêmes alimentées à partir de deux souches de <u>C. variabilis</u>. Ces deux souches étaient maintenues de façon axénique dans un milieu deux fois plus concentré que le milieu AAP (tableau 2.1); l'une était gardée en présence de zinc (1.0 x  $10^{-6}$  M) et l'autre en absence de zinc ajouté depuis plus de deux ans. Les deux souches ont été utilisées dans l'expérience 1 alors que toutes les autres expériences ont été réalisées avec la souche conservée en présence de zinc.

Maaaaata	Conce	entration	Michonutriments	Conce	entration
Macronutriments	mg•1-1	м	MCF UNULT MIETCS	µg•]-1	м
Na NO 3	25.500	3.000 x 10-4	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185.520	3.000 x 10 <sup>-6</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.044	5.994 x 10 <sup>-6</sup>	MnCl 2	264.264	2.100 x 10 <sup>-6</sup>
Mg C1 2	5.700	5.986 x 10 <sup>-5</sup>	ZnCl <sub>2</sub>	32.709	$2.400 \times 10^{-7}$
Mg S0, .7H20	14.700	$5.964 \times 10^{-5}$	CoCl <sub>2</sub>	0.780	$6.007 \times 10^{-9}$
CaC1 2.2H20	4.410	$3.000 \times 10^{-5}$	CuCl 2	0.009	$6.694 \times 10^{-11}$
NaHCO	15.000	$1.786 \times 10^{-4}$	$Na_2MoO_4.2H_2O$	7.260	$3.001 \times 10^{-8}$
5			FeCl 3	96.000	5.918 x 10 <sup>-7</sup>
			Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> 0	300.000	8.059 x $10^{-7}$

Tableau 2.1:	Composition	du	milieu	AAP	(Payne,	1975).	
--------------	-------------	----	--------	-----	---------	--------	--

Les cultures "batch", démarrées avec des aliquotes de l'une des deux souches, contenaient 5000 à 8000 cellules·ml-<sup>1</sup> au premier jour d'incubation. Elles étaient réalisées dans un ballon de six litres contenant le milieu AAP (tableau 2.1) sans zinc; le ballon était placé dans un bain thermostaté à 20°C sous un éclairement continu d'environ  $120 \ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  provenant de tubes fluorescents blancs placés de chaque côté du bain (figure 2.1). Elles étaient constamment agitées et aérées, et le pH était maintenu constant à 7.0 grâce à un contrôleur de pH (New Brunswick Scientific; modèle PH-22) qui permet une addition automatique de CO<sub>2</sub> lorsque le pH dépasse la valeur désirée (pH = 7.0). Une électrode de calomel équipée d'une double jonction, avec du chlorure de potassium dans le réservoir externe, était utilisée avec l'électrode de verre afin d'éviter la diffusion de chlorocomplexes d'argent dans le milieu car l'argent est généralement toxique pour les algues.

Le milieu AAP utilisé pour maintenir les souches ou préparer les cultures était stérilisé à l'autoclave. Afin de minimiser la précipitation d'oxyhydroxydes de fer, les macronutriments et les micronutriments étaient autoclavés séparément. Les cultures d'algues servaient de réservoir de cellules pour réaliser les expériences décrites à la section 2.3. Les conditions mentionnées ci-dessus pour les cultures (T, pH, illumination) ont été maintenues constantes d'une culture à l'autre, afin de minimiser les changements dans les courbes de croissance; Bates <u>et al</u>, (1983a) ont en effet démontré que l'état physiologique (en particulier l'âge) des cultures influe sur l'adsorption du zinc et sur son transport à travers la membrane cellulaire.



-

Figure 2.1: Montage expérimental pour la culture des algues en "batch".

15

#### 2.2 Réactifs et verrerie

Tout le matériel mis en contact avec les cultures ou les diverses solutions a été lavé avec de l'acide nitrique 15% (v/v) et rincé plusieurs fois à l'eau déminéralisée. La plupart des contenants utilisés étaient en pyrex, en polyéthylène ou en téflon.

L'eau déminéralisée ayant servi à préparer les solutions et les milieux de culture a été obtenue avec un système Millipore Milli-Q3RO/Milli-Q2; les produits chimiques utilisés rencontrent les critères de pureté de "l'American Chemical Society". Ces solutions furent rangées dans des bouteilles de polyéthylène ou de téflon et gardées au réfrigérateur.

#### 2.3 Procédure expérimentale

La plupart des expériences suivaient une procédure générale décrite à la section 2.3.1 et à la figure 2.2. Les particularités de chaque expérience sont décrites dans les sections 2.3.2 à 2.3.7.

#### 2.3.1 Procédure générale

Pour chaque expérience, le nombre d'aliquotes requises était prélevé, à un jour donné, des cultures de <u>C. variabilis</u> décrites à la section 2.1. Chaque aliquote (40 ml) était centrifugée pendant dix



Figure 2.2: Procédure expérimentale pour distinguer le zinc adsorbé du zinc intracellulaire. D'après Bates <u>et al.</u>, 1982.

minutes à environ 500 x g dans des tubes à centrifugation en polycarbo-Le surnageant était enlevé par succion en utilisant une pipette nate. Pasteur et remplacé par un volume équivalent de milieu AAP (sans fer afin d'éviter la précipitation de l'hydroxyde de fer) préalablement équilibré toute une nuit avec les concentrations de zinc et d'EDTA désirées et ajusté à pH 7.0. Le milieu de culture original était remplacé par un nouveau milieu afin d'éliminer les agents chélateurs qui auraient pu être produits par les algues et afin de permettre une prééquilibration du zinc avec l'EDTA. Après une incubation de dix minutes à l'obscurité, les échantillons étaient centrifugés pendant dix minutes à 500 x g et une partie du surnageant était prélevée afin de déterminer [Zn]<sub>b</sub>, la concentration de zinc demeurant en solution après l'incubation (figure 2.2). Le culot était resuspendu dans 10.0 ml d'une solution contenant de l'EDTA 10<sup>-4</sup> M et du chlorure de calcium 6 x 10<sup>-4</sup> M à pH 7.0 puis incubé pendant dix minutes à l'obscurité. Après centrifugation (dix minutes à 500 x  $\underline{g}$ ), une partie du surnageant était prélevée pour la détermination de [Zn]<sub>a</sub>, la concentration de zinc adsorbé, définie opérationnellement comme le zinc extrait par l'EDTA (Bates et al., 1982). Le culot était analysé afin de déterminer [Zn], la concentration de zinc intracellulaire, définie opérationnellement comme la concentration de zinc demeurant avec les cellules après l'extraction avec l'EDTA (Bates et al., 1982). Le calcul du bilan  $[Zn]_T = [Zn]_b + [Zn]_a$ + [Zn]<sub>c</sub> permettait de vérifier que le total des fractions obtenues par cette méthode correspondait à la concentration initiale de zinc total [ Zn] <sub>T</sub>.

Le zinc était ajouté sous forme de chlorure de zinc marqué avec du <sup>65</sup>Zn. La radioactivité des échantillons était mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre gamma (LKB Wallac; modèle SC-26, PP-67). Les solutions mères de zinc étaient de plus analysées par spectrométrie d'absorption atomique de flamme avec un spectrophotomètre Varian Techtron (modèle AA-575 ABQ) afin d'obtenir l'activité spécifique.

La concentration de zinc libre demeurant en solution après l'incubation,  $[Zn^{2+}]_b$ , était calculée en utilisant un modèle d'équilibre chimique qui tient compte de la composition du milieu AAP; les constantes d'équilibre utilisées sont données dans Smith et Martell (1974, 1976).

#### 2.3.2 Expérience 1

Cette expérience visait à examiner l'adsorption et le transport du zinc par l'algue <u>C. variabilis</u> pour une large gamme de valeurs de  $[Zn^{2+}]_{b}$ , et également à vérifier si une privation en zinc des algues pouvait influencer ces phénomènes. Les algues furent prélevées des cultures au jour 3 alors que les cellules se trouvaient dans leur phase exponentielle de croissance. Les concentrations de zinc libre variaient entre 0.5 et 32  $\mu$ M; pour ce faire, on a utilisé deux concentrations initiales de zinc, soient 3.06 et 38.24  $\mu$ M, et diverses concentrations d'EDTA (voir tableau 2.2). Cette expérience a été réalisée avec des cellules provenant de la souche maintenue en présence de zinc et, subséquemment, avec des cellules provenant de la souche privée de

where the same state of the same state of the same	the second	
Solution	Concentration totale de zinc (µM)	Concentration d'EDTA (µM)
1 2 3 4 5 6 7	3.06	3.43 3.15 3.05 (3.00)* 3.00 (2.89)* 2.79* (2.71)* 2.31 1.53
8 9 10 11 12	38.24	35.20 30.60 22.90 15.30 7.64

 Les valeurs entre parenthèses ont été utilisées dans l'expérience réalisée avec la souche privée de zinc. zinc (pendant 28 mois). Les concentrations  $[Zn^{2+}]_{b}$ ,  $[Zn]_{a}$  et  $[Zn]_{c}$  ont été déterminées comme décrit à la section 2.3.1.

#### 2.3.3 Expérience 2

On visait ici à déterminer l'effet de la température sur l'adsorption et le flux du zinc. Les algues furent prélevées de la culture au jour 3 et incubées avec le zinc à cinq températures différentes, soient 5, 10, 15, 20 et 25°C. La concentration totale de zinc était de 15.30  $\mu$ M et deux concentrations d'EDTA (7.65 et 12.24  $\mu$ M) furent utilisées. Ceci correpond à des concentrations initiales de Zn<sup>2+</sup> équivalentes à 7.65 et 3.06  $\mu$ M. Les concentrations [Zn<sup>2+</sup>]<sub>b</sub>, [Zn]<sub>a</sub> et [Zn]<sub>c</sub> ont été déterminées comme décrit à la section 2.3.1.

#### 2.3.4 Expérience 3

Cette expérience visait à caractériser l'effet du magnésium sur l'adsorption et le flux du zinc. Les algues furent prélevées de la culture au jour 3. Après l'enlèvement du milieu de culture d'origine, les cellules de <u>C. variabilis</u> furent incubées dix minutes à l'obscurité en présence de solutions de magnésium et de sodium (voir tableau 2.3) puis centrifugées dix minutes à 500 x <u>g</u>. Le surnageant fut aspiré et remplacé par des solutions contenant du magnésium et du sodium aux mêmes concentrations; du zinc (4.35  $\mu$ M) fut également ajouté. On notera que ces solutions ne contenaient que Mg, Na, Cl et Zn; tous les autres constituants du milieu AAP étaient absents. Le chlorure de Tableau 2.3: Concentrations de magnésium et de sodium utilisées dans l'expérience 3.

Solution	Concentration de magnésium (M)	Concentration de sodium (M)
1	0	1.010 x 10 <sup>-3</sup>
2	5.000 x 10 <sup>-6</sup>	9.945 x 10-4
3	1.000 x 10 <sup>-5</sup>	9.795 x 10-4
4	5.000 x 10 <sup>-5</sup>	8.595 x 10-4
5	$1.000 \times 10^{-4}$	7.095 x 10 <sup>-4</sup>
6	3.365 x 10-4	0

sodium était ajouté pour maintenir constante la force ionique des solutions. Les concentrations  $[Zn^{2+}]_b$ ,  $[Zn]_a$ ,  $[Zn]_c$  et les concentrations correspondantes  $[Mg^{2+}]_b$ ,  $[Mg]_a$  et  $[Mg]_c$  furent déterminées. Le magnésium fut mesuré par spectrométrie d'absorption atomique de flamme; afin d'obtenir  $[Mg]_c$ , les algues ont été digérées avec de l'acide nitrique (Bates et al., 1982). L'expérience a été réalisée en triplicata.

#### 2.3.5 Expérience 4

On visait ici à déterminer si le parachloromercuribenzène sulfonate (PCMBS), un produit reconnu pour bloquer les groupements sulfhydriles (Anderson et Morel, 1982), pouvait influencer l'adsorption et le flux du zinc. Les algues furent prélevées de la culture le jour 3 et mises dans des tubes à centrifugation; avant de centrifuger, le PCMBS était ajouté en quantité suffisante pour obtenir une concentration de  $10^{-4}$  M. Après une incubation de trente minutes et une centrifugation de dix minutes à 500 x g, le surnageant fut aspiré et remplacé par du milieu AAP contenant 15.30 µM de Zn et différentes concentrations d'EDTA (voir tableau 2.4). Parallèlement, des échantillons n'ayant pas été mis en contact avec le PCMBS subirent le même traitement. Les concentrations de  $[Zn^{2+}]_b$ ,  $[Zn]_a$  et  $[Zn]_c$  ont été déterminées. L'expérience a été menée en triplicata.

# Tableau 2.4: Concentrations d'EDTA et de zinc libre utilisées dans l'expérience 4.

Solution	Concentration d'EDTA ( $\mu$ M)	Concentration initiale de zinc libre (µM)
1	14.39	0.92
2	13.31	1.99
3	10.71	4.59
4	8.41	6.88
5	5.81	9.48
6	3.37	11.93

#### 2.3.6 Expérience 5

Cette expérience visait à déterminer si une association hypothétique d'oxyhydroxydes de fer à la surface de C. variabilis dans les conditions d'utilisation du milieu de culture AAP pouvait influencer l'adsorption et le flux de zinc. Les algues ont d'abord été cultivées en milieu AAP sans fer ni zinc afin de diminuer la concentration de fer par algue. En phase stationnaire (jour 6), deux séries d'aliquotes de 40 ml ont été prélevées et centrifugées. Le surnageant fut remplacé pour la première série par le milieu AAP avec fer (0.59 µM) mais sans zinc et pour la deuxième par le milieu AAP sans fer ni zinc. La concentration de fer utilisée dans la première série (la même que dans le milieu AAP) correspond à une sursaturation (environ deux fois) par rapport aux oxyhydroxydes de fer si on prend un produit de solubilité de  $10^{-37.1}$ . Après une incubation de trente minutes et une centrifugation de dix minutes à 500 x  $\underline{g}$ , ce milieu fut remplacé par un nouveau milieu sans fer contenant 15.30 µM de zinc et différentes concentrations d'EDTA (voir tableau 2.5). Les concentrations  $[Zn^{2+}]_b$ ,  $[Zn]_a$  et  $[Zn]_{c}$  furent déterminées comme décrit à la section 2.3.1.  $[Fe]_{b}$  fut aussi mesuré. La concentration de fer a été mesurée par spectrométrie d'absorption atomique sans flamme en utilisant une courbe de calibration. L'expérience a été menée en triplicata.

#### 2.3.7 Expérience 6

Cette expérience visait à déterminer si des concentrations de fer ou de phosphates plus élevées que celles utilisées dans le milieu AAP

# Tableau 2.5: Concentrations d'EDTA et de zinc libre utilisées dans l'expérience 5.

Solution	Concentration d'EDTA (µM)	Concentration initiale de zinc libre (µM)
1	15.10	0.38
2	14.39	0.92
3	13.31	1.99
4	10.71	4.59
5	8.41	6.88
6	5.81	9.48
7	3.37	11.93
8	0.77	14.53
avaient une influence sur l'adsorption et le flux du zinc. Une culture en phase stationnaire (1.76 x  $10^6$  cell. ml<sup>-1</sup>) a été séparée en trois pour former trois nouvelles cultures. Du phosphore ( $10^{-4}$  M de phosphates après addition) a été ajouté à la première culture, du fer ( $10^{-5}$  M après addition) à la seconde alors que la dernière servait de témoin; dans chacune, les concentrations de zinc et d'EDTA étaient respectivement de 3.06 et 1.53 µM. Les algues furent par la suite cultivées dans les mêmes conditions de température, de pH et d'illumination que celles décrites à la section 2.1. Le lendemain (jour 1) et le surlendemain (jour 2), quatre aliquotes ont été prélevées dans chacune des trois cultures pour déterminer [ $Zn^{2+}$ ]<sub>b</sub>, [Zn]<sub>a</sub> et [Zn]<sub>c</sub>.

## 2.3.8 Résumé des conditions expérimentales

Un résumé des conditions expérimentales est présenté au tableau 2.6.

## 2.3.9 Dénombrement des cellules et poids secs

Le nombre de cellules était dénombré avec un compteur de particules (Coulter Counter; modèle  $T_A$ ). Les poids secs des cellules étaient déterminés avec une balance électronique (Mettler; modèle ME30), après filtration d'un volume connu de culture sur des filtres Nuclepore (1.0  $\mu$ M, 25 mm de diamètre) pré-pesés, et séchage à 75°C jusqu'à un poids constant. Tableau 2.6: Résumé des conditions expérimentales pour les six expériences.

Expérience	Milieu de culture	Milieu d'incubation du zinc	Température d'incubation du zinc	[EDTA] [µM]	[Zn] T (µM)	Incubation préalable	Analyses	Remarque
1	AAP sans Zn	AAP sans Fe	ambiante	1.53-35.20	i) 3.06 ii) 38.24	-	Zn	2 souches 1) avec Zn 11)carencée en Zn
2	AAP sans Zn	AAP sans Fe	5, 10, 15, 20, 25°C	i) 7.65 ii) 12.24	15.30	-	Zn	-
3	AAP sans Zn	MgCl <sub>2</sub> + NaCl (milieu aqueux)	ambiante	-	4.35	MgC1 <sub>2</sub> + NaC1	Zn, Mg	[Mg <sup>2+</sup> ] = 0 337 μM [Na <sup>+</sup> ]= 0 - 1.01 mM
4	AAP sans Zn	AAP sans Fe	ambiante	3.37-14.39	15.30	PCMBS	Zn	[PCMBS] = 10 <sup>-4</sup> M
5	AAP sans Zn et sans Fe	AAP sans Fe	ambiante	0.77-15.10	15.30	1)AAP sans Zn et avec Fe 11) AAP sans Zn et sans Fe	Zn, Fe	culture en phase sta- tionnaire
6	AAP sans Zn	AAP sans Fe	ambiante	1.53	3.06	-	Zn	3 cultures: i) avec P ii) avec Fe iii) témoin

## 3. RÉSULTATS

La figure 3.1 montre les courbes de croissance de <u>Chlamydomonas</u> <u>variabilis</u> dans le milieu AAP sans zinc pour les expériences 1 à 4. Les courbes sont reproductibles et présentent des pentes semblables. Rappelons que pour ces expériences, les cellules ont été prélevées au jour 3 de la courbe de croissance (en fin de croissance exponentielle), alors que celles pour les expériences 5 et 6, dont les courbes ne sont pas représentées, ont été prélevées lorsqu'elles se trouvaient en phase stationnaire. Il est important de souligner ce point étant donné que Bates <u>et al.</u> (1983a) ont démontré que l'âge de la culture influence fortement l'adsorption et le transport du zinc.

Les résultats des six expériences sont présentés dans les sections 3.1 à 3.6. Des informations supplémentaires sont données en annexe.

#### 3.1 Expérience 1

La figure 3.2 montre les relations qui existent entre les concentrations de zinc adsorbé et intracellulaire (exprimées en µmole par gramme de cellules) et la concentration calculée de zinc libre demeurant en solution après l'incubation de dix minutes. La concentration de zinc adsorbé est reliée de façon hyperbolique à la concentration de zinc libre en solution. Bates <u>et al.</u> (1982) ont précédemment observé le même phénomène avec <u>Scenedesmus</u> <u>subspicatus</u> et <u>Chlamydomonas</u> variabilis mises en présence de zinc. L'adsorption est plus forte pour



Figure 3.1: Courbes de croissance de <u>Chlamydomonas</u> variabilis dans le milieu AAP sans zinc.



Figure 3.2 : Relations entre les concentrations de zinc adsorbé (○) ou intracellulaire (□) et la concentration de zinc libre après une incubation de 10 minutes. (a) souche maintenue en présence de zinc; (b) souche privée de zinc.

les cellules provenant de souches cultivées en présence de zinc (figure 3.2a) que pour les cellules privées de zinc (figure 3.2b). L'accumulation du zinc intracellulaire est une fonction linéaire de la concentration de zinc libre lorsque les algues proviennent de souches maintenues dans un milieu contenant du zinc (figure 3.2a); Bates <u>et al</u>. (1982) avaient obtenu la même relation dans leurs expériences avec <u>S</u>. <u>subspicatus</u> et <u>C</u>. <u>variabilis</u>. Par contre, les algues privées de zinc présentent une discontinuité dans la courbe de  $[Zn]_c vs [Zn^{2+}]_b$ (figure 3.2b).

## 3.2 Expérience 2

L'influence de la température sur les concentrations de zinc adsorbé et intracellulaire, lorsque les concentrations de zinc total et d'EDTA sont maintenues constantes, est présentée à la figure 3.3;  $[Zn]_a$ et  $[Zn]_c$  augmentent linéairement avec la température pour la gamme utilisée dans cette expérience.

## 3.3 Expérience 3

L'influence du magnésium sur l'adsorption et l'accumulation du zinc intracellulaire est illustrée à la figure 3.4; cette figure montre la relation entre, d'une part, les concentrations de magnésium adsorbé  $([Mg]_a)$ , intracellulaire  $([Mg]_c)$ , de zinc adsorbé et intracellulaire, et, d'autre part, la concentration de magnésium libre en solution



Figure 3.3 : Effet de la température sur les concentrations de zinc adsorbé ou intracellulaire pour des incubations de 10 minutes. ( $\circ$ ) : [Zn] lors que [Zn<sup>2+</sup>] = 7.65 µM; ( $\Box$ ) : [Zn] lorsque [Zn<sup>2+</sup>] = 3.06 µM; ( $\bullet$ ) : [Zn] lorsque [Zn<sup>2+</sup>] = 7.65 µM; ( $\blacksquare$ ) : [Zn]<sub>c</sub> lorsque [Zn<sup>2+</sup>] = 3.06 µM.



Figure 3.4 : Concentrations de magnésium adsorbé (Δ), de magnésium intracellulaire (▲), de zinc adsorbé (Ο) et de zinc intracellulaire (□) en fonction de la concentration de magnésium libre en solution. La concentration de zinc libre est de 4.35µM.

 $\left(\left[Mg^{2}+
ight]_{b}
ight)$ . La concentration de magnésium adsorbé augmente graduellement avec la concentration de magnésium en solution. La concentration de magnésium intracellulaire demeure constante, quelle que soit la concentration de magnésium en solution. La concentration de zinc adsorbé augmente jusqu'à une concentration d'environ 10 µM en Mg<sup>2+</sup> puis diminue. La concentration de zinc intracellulaire diminue avec une augmentation de la concentration de magnésium libre.

### 3.4 Expérience 4

Certains métaux, lorsqu'ils sont mis en présence de phytoplancton, peuvent s'attacher aux groupements sulfhydriles des protéines de la membrane pour former des ponts S-métal-S. La membrane du phytoplancton est peu perméable au parachloromercuribenzène sulfonate (Davies, 1978). D'après Davies (1978), ce composé s'attache seulement aux groupements sulfhydriles exposés et en bloque l'accès. Ainsi, Anderson et Morel (1982) empêchèrent le transport du fer à travers la membrane de la diatomée <u>Thalassiosira weissflogii</u> en ajoutant du PCMBS à la culture. Si le zinc s'attachait aux groupements sulfhydriles de la membrane de <u>C. variabilis</u>, l'addition préalable de PCMBS aurait pu les rendre inaccessibles (surtout si la réaction est irréversible) et empêcher l'adsorption du zinc; tel ne fut cependant pas le cas. Ce phénomène est illustré à la figure 3.5 qui montre les courbes d'adsorption et de transport du zinc en présence et en l'absence de PCMBS. Les point des deux courbes d'adsorption ne sont pas significativement différents à un



Figure 3.5 : Effet d'un traitement de <u>Chlamydomonas variabilis</u> avec une solution 10<sup>-4</sup> M de PCMBS sur la concentration de zinc adsorbé ou intracellulaire pour des incubations de 10 minutes. (O) : [Zn], avec PCMBS; (●):[Zn], sans PCMBS; (□) : [Zn]<sub>c</sub> avec PCMBS; (●) : [Zn]<sub>c</sub> sans PCMBS.

niveau de probabilité de 5%. Il en est de même pour les deux droites représentant le zinc intracellulaire; contrairement à une expérience précédente (figure 3.2a), elles ne passent pas par l'origine des axes.

#### 3.5 Expérience 5

Les résultats présentés à la figure 3.6 montrent qu'un traitement des algues avec des concentrations de fer identiques à celles du milieu AAP pendant une courte période a peu d'influence sur l'adsorption et le transport du zinc. Les points des deux courbes d'adsorption ne sont pas significativement différents à un niveau de probabilité de 5%. Il en est de même pour les deux droites représentant le zinc intracellulaire; ces dernières ne semblent pas passer par l'origine, comme c'était le cas à la figure 3.2a.

#### 3.6 Expérience 6

Les effets de l'addition de fer  $(10^{-5} \text{ M})$  ou de phosphore  $(10^{-4} \text{ M})$ à des cultures de <u>C. variabilis</u> en phase stationnaire sont montrés au tableau 3.1. En présence de fer, l'adsorption et l'accumulation intracellulaire du zinc sont significativement différents (P < 0.05) du témoin; l'adsorption du zinc est augmentée en présence du fer alors que la quantité de zinc transportée à l'intérieur de la cellule est plus faible. L'addition de phosphore ne change pas de façon significative (P < 0.05) l'adsorption du zinc alors qu'elle augmente la concentration de zinc intracellulaire de façon significative.



Figure 3.6 : Effet d'un traitement de <u>Chlamydomonas variabilis</u> (initialement privée de fer) avec une solution de fer (0.59  $\mu$ M) sur la concentration de zinc adsorbé ou intracellulaire. (()):[Zn]<sub>a</sub> sans traitement avec Fe; ( $\bullet$ ) : [Zn]<sub>a</sub> après traitement avec Fe; ( $\Box$ ) : [Zn]<sub>c</sub> sans traitement avec Fe.

Tableau 3.1: Effets du fer et du phosphore ajoutés à des cultures en phase stationnaire sur l'adsorption et le transport du zinc.\*

:

Jour		[Zn <sup>2+</sup> ] <sub>b</sub> (µmole•1 <sup>-1</sup> )	[Zn] <sub>a</sub> (µmole,g <sup>-1</sup> )	[Zn] <sub>c</sub> (µmole <sub>s</sub> g <sup>-1</sup> )
	Témoin	3.12 ± 0.02	0.741 ± 0.007	0.118 ± 0.011
1	+Fe	3.14 ± 0.03	0.830 ± 0.042	0.085 ± 0.001
	+P	3.12 ± 0.02	0.760 ± 0.029	0.150 ± 0.005
	Témoin	3.21 ± 0.03	0.733 ± 0.004	0.133 ± 0.005
2	+Fe	3.19 ± 0.02	0.906 ± 0.004	0.079 ± 0.003
	+P	3.19 ± 0.02	0.741 ± 0.004	0.171 ± 0.005

 Les résultats représentent la moyenne de quatre mesures ainsi que l'écarttype. 4. DISCUSSION

4.1 Zinc extractible avec EDTA

Les résultats de Bates et al. (1982) suggèrent que le zinc extrait de la cellule avec l'EDTA 10-<sup>4</sup> M correspond au zinc adsorbé. Davies (1973) avait utilisé de l'EDTA 3 x 10-<sup>3</sup> M et Cossa (1976) de la cystéine pour extraire les métaux liés à la surface cellulaire.

La réaction d'adsorption du zinc sur les sites (S) peut s'écrire:

$$Zn^{2+} + S = Zn_{a}$$
 (4.1)

La constante d'équilibre d'adsorption ( $K_{_{igodoldymbol{O}}}$ ) de la réaction est:

$$K_{\Theta} = \frac{\Theta}{(1-\Theta) [Zn^{2+}]}$$
(4.2)

où  $\Theta = \frac{n_{Zn_a}}{n_{Zn_a} + n_S}$  représente la fraction de sites occupés par le zinc et  $(1-\Theta) = \frac{n_S}{n_{Zn_a} + n_S}$  représente la fraction de sites libres de zinc  $(n_{Zn_a}$  est le nombre de sites occupés et  $n_S$  le nombre de sites libres). La fraction de sites occupés par le zinc s'écrit également:

$$\Theta = \frac{[Zn]_a}{Q}$$
(4.3)

où Q = concentration maximum de zinc adsorbé sur la surface de la cellule. En substituant (4.3) et la définition de (1-0) dans (4.2), on obtient après réarrangement:

$$\left[ Zn \right]_{a} = \frac{K_{\Theta} Q \left[ Zn^{2+} \right]}{1 + K_{\Theta} \left[ Zn^{2+} \right]}$$
(4.4)

Cette équation représente un isotherme de Langmuir; elle peut être réarrangée et écrite:

$$\frac{[Zn^{2+}]}{[Zn]_{a}} = \frac{[Zn^{2+}]}{Q} + \frac{1}{K_{\Theta}Q}$$
 (4.5)

En traçant  $[Zn^{2+}]/[Zn]_a \underline{vs} [Zn^{2+}]$ , un comportement conforme au modèle de Langmuir devrait donner une droite dont la pente est 1/Q et l'ordonnée à l'origine  $1/K_{\Theta}Q$ .

L'adsorption est un phénomène de surface et il est connu que la surface des cellules varie de façon appréciable tout au long de la courbe de croissance (Bates <u>et al.</u>, 1983a). Pour des fins de comparaison, il devient donc important d'exprimer le zinc adsorbé en termes de quantité adsorbée par unité de surface de cellule. La surface des cellules est cependant difficile à mesurer avec précision. On peut cependant l'estimer si on considère les relations suivantes où l'algue est représentée par une sphère de densité unitaire:

$$s = 4\pi r^2$$
 (4.6)

$$V = \frac{4}{3} \pi r^{3}$$
(4.7)  
P = p V (4.8)

où s, V, P et r représentent respectivement la surface, le volume, le poids et le rayon de l'algue, alors que  $\rho$  représente sa densité (qu'on considère ici comme 1g/cm<sup>3</sup>). En combinant les équations (4.6) à (4.8) on obtient:

$$s = 4\pi \left(\frac{3P}{4\pi}\right)^{2/3} \qquad (4.9)$$

qui permet d'exprimer [Zn]<sub>a</sub> en termes de quantité adsorbée par unité de surface de cellule. Notons que l'équation (4.6) donne la surface d'une sphère lisse et ne peut conduire qu'à une valeur minimum de la surface de la membrane.

#### 4.1.1 Influence de la concentration de zinc dissous

Les figures 3.2, 3.5 et 3.6 montrent toutes que  $[Zn]_a$  croît de façon hyperbolique avec  $[Zn^{2+}]_b$ ; exprimer  $[Zn]_a$  en termes de quantité de zinc adsorbé par unité de surface de cellule ne changerait rien à l'allure des courbes. Rappelons que ces courbes sont obtenues pour des concentrations de zinc total constantes ( $[Zn]_b = cte$ ); elles indiquent donc, comme l'ont déjà montré Bates <u>et al.</u> (1982), que l'adsorption du zinc à la surface de Chlamydomonas variabilis est fonction de la con-

centration de zinc libre ( $[Zn^{2+}]_b$ ) plutôt que de celle du zinc total ( $[Zn]_b$ ).

Lorsque  $[Zn^{2+}]_{b}/[Zn]_{a}$  est tracé en fonction de  $[Zn^{2+}]_{b}$ , conformément à l'équation (4.5), on obtient des droites, ainsi qu'il a été prédit par des isothermes de Langmuir; un exemple est donné à la figure 4.1 pour l'expérience 1a. Les valeurs de K<sub>0</sub> et Q obtenues par les droites de régression sont données dans le tableau 4.1 pour les expériences 1, 4 et 5.

Les valeurs de Q et  $K_{\rho}$  obtenues dans ce travail semblent très Bates et al. (1983a) ont étudié l'effet de certains facvariables. teurs sur ces paramètres. Ainsi, ils ont montré que la valeur de Q décroissait fortement avec l'âge de la culture, passant de 65 X 10-10 mole  $cm^{-2}$  (jour 1) à 3 X 10<sup>-10</sup> mole  $cm^{-2}$  (jour 5). Ceci pourrait expliquer la différence entre les valeurs élevées de Q pour l'expérience 1 (jour 3) et les valeurs plus faibles pour l'expérience 5 (jour 6); cependant, les valeurs de l'expérience 4 sont faibles, comparativement à celles de l'expérience 1. Les résultats de Bates et al. (1983a) suggèrent également que les valeurs de K $_{\!\Theta}$  ne sont pas fonction de l'âge de la culture, mais qu'elles dépendent de la présence  $(K_{\Theta} = 0.121 \pm 0.014 \times 10^{6} \text{ l-mole}^{-1})$  ou de l'absence (K<sub> $\Theta$ </sub> = 0.061 ± 0.021 X 10<sup>6</sup> l·mole<sup>-1</sup>) de zinc dans le milieu de culture lors de la croissance. Les valeurs de K $_{\Theta}$  pour l'expérience 1 sont semblables à celles obtenues par Bates et al. (1983a) et leur variation va dans le même sens; les valeurs élevées pour les expériences. 4 et 5 sont cependant difficiles à expliquer.



Figure 4.1 : Isotherme d'adsorption de Langmuir pour l'expérience la.

# Tableau 4.1: Paramètres de l'isotherme de Langmuir pour l'adsorption du zinc par <u>Chlamydomonas variabilis</u>.

-

Frnérience	ĸ		Remarque	
	(10 <sup>6</sup> l.mole <sup>-1</sup> )	(10 <sup>-6</sup> mole.g <sup>-1</sup> )	(10 <sup>-10</sup> mole•cm <sup>-2</sup> )	heinarque
la	0.069	34.1	27.1	jour 3
15	0.056	21.7	18.7	jour 3, cellu- les carencées en zinc
4	0.261	8.6	7.3	jour 3, avec PCMBS
	0.273	8.4	7.1	jour 3, sans PCMBS
5	0.225 0.184	9.6 10.6	7.6 8.4	jour 6, avec Fe jour 6, sans Fe

En considérant que C. variabilis est une sphère de 10µm de diamètre et que le zinc adsorbé a les mêmes dimensions que l'ion hydraté (rayon de 6 X 10-<sup>8</sup> cm), Bates et al. (1982) ont calculé que  $3 \times 10^8$ atomes de zinc étaient nécessaires pour former une monocouche à la surface d'une cellule de C. variabilis. Les valeurs de Q (tableau 4.1) et du poids sec moyen des cellules (5.70 x  $10^{-11}$  g·cell-<sup>1</sup> pour l'expérience la et 8.66 x 10-11 g-cell-1 pour l'expérience 1b) permettent de calculer la quantité maximale d'atomes pouvant être adsorbée par les cellules, c'est-à-dire 1.2 x 10<sup>9</sup> atomes·cell-<sup>1</sup> pour l'expérience la et 1.1 x 10<sup>9</sup> atomes·cell-<sup>1</sup> pour l'expérience 1b. De la même façon, Bates et al. (1982) avaient calculé qu'un maximum de 9 x  $10^8$ atomes de zinc pouvaient s'adsorber à la surface d'une cellule de C. Les cellules peuvent donc adsorber plus de zinc qu'il variabilis. n'est nécessaire pour former une monocouche. Ce phénomène serait dû, selon Bates et al. (1982), au fait que le zinc n'est pas adsorbé seulement à l'extérieur de la membrane cellulaire mais aussi à l'intérieur de la paroi cellulaire qui serait pourvue d'un très grand nombre de sites capables de complexer les métaux.

## 4.1.2 Influence de la température

La constante  $K_{\Theta}$ , qui gouverne l'équilibre entre le zinc adsorbé à la surface de la cellule et le zinc en solution (équation (4.1)), est reliée à la température par l'équation :

$$\ln K_{\Theta} = \frac{-\Delta H^{\circ}}{RT} + \frac{\Delta S^{\circ}}{R}$$
(4.10)

où  $\triangle$  H° représente le changement d'entalphie standard de la réaction, T, la température absolue,  $\triangle$  S°, le changement d'entropie standard et R, la constante des gaz.

L'équation (4.4) après réarrangement s'écrit:

$$K_{\odot} = \frac{[Zn]_{a}}{(Q - [Zn]_{a})[Zn^{2+}]}$$
(4.11)

En substituant (4.11) dans (4.10), on obtient:

$$\ln \frac{[Zn]_{a}}{(Q - [Zn]_{a})[Zn^{2+}]} = \frac{-\Delta H^{\circ}}{RT} + \frac{\Delta S^{\circ}}{R}$$
(4.12)

Entre 5 et 25°C., les variations de  $[Zn^{2+}]$ , sont relativement faibles (voir tableau A.3 en annexe) de sorte que l'on peut considérer que  $[Zn^{2+}]$  est constante. En effet, dans les conditions expérimentales utilisées pour ce travail, où la concentration des métaux autres que le zinc est très faible, la presque totalité de l'EDTA complexe le zinc de sorte que  $[Zn^{2+}]_b \simeq [Zn]_b$  - [EDTA]. Le côté gauche de l'équation (4.12) a été calculé pour Q = 7.1 et 27.1 X  $10^{-10}$  mole·cm<sup>-2</sup> et tracé ensuite en fonction de  $\frac{1}{T}$  à la figure 4.2; la pente de chaque droite nous donne accès à  $\Delta H^{\circ}$ . Les diverses valeurs de  $\Delta H^{\circ}$  ainsi obtenues sont données dans le tableau 4.2. On note que les valeurs de Q utilisées pour le calcul sont les valeurs extrêmes obtenues au cours des diverses expériences (voir le tableau 4.1) et qu'on a fait l'hypothèse que ces valeurs ne variaient pas avec la température. Les valeurs de  $\Delta H^{\circ}$  aident à caractériser le type d'adsorption en cause lorsque du zinc est mis en contact avec des cellules de Chlamydomonas variabilis.

Les réactions d'adsorption physique sont en général exothermiques  $(\Delta H^\circ = -1 \ a \ -13 \ kcal/mole)$  (Haque et Coshow, 1971) et l'adsorption augmente avec une diminution de température (Weber, 1972). L'adsorption du zinc par <u>C. variabilis</u> est par contre une réaction endothermique et elle augmente avec une augmentation de température. Il ne semble donc pas que l'adsorption physique joue un rôle important dans ce cas-ci.

Les réactions d'adsorption où il y a échange d'ions ont un  $\Delta H^{\circ}$ d'environ 2 kcal/mole (Burns et Hayes, 1974) et leur constante d'équilibre est peu affectée par la température. Les valeurs de  $\Delta H^{\circ}$  obtenues dans cette expérience se rapprochent de cette valeur et l'on peut supposer que ce type d'adsorption est important.



Figure 4.2 : Graphique de ln  $\frac{[Zn]_a}{(Q - [Zn]_a) [Zn^{2+}]}$  en fonction de l'inverse de la température. (O) :  $[Zn^{2+}] = 2.8 \ \mu\text{M}$ ,  $Q = 7.1 \ X \ 10^{-10} \ \text{mole} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; ( $\bullet$ ) :  $[Zn^{2+}] = 2.8 \ \mu\text{M}$ ,  $Q = 27.1 \ X \ 10^{-10} \ \text{mole} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; ( $\Box$ ) :  $[Zn^{2+}] = 7.1 \ \mu\text{M}$ ,  $Q = 7.1 \ X \ 10^{-10} \ \text{mole} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; ( $\Box$ ) :  $[Zn^{2+}] = 7.1 \ \mu\text{M}$ ,  $Q = 27.1 \ X \ 10^{-10} \ \text{mole} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; ( $\Box$ ) :  $[Zn^{2+}] = 7.1 \ \mu\text{M}$ ,  $Q = 27.1 \ X \ 10^{-10} \ \text{mole} \cdot \text{cm}^{-2}$ .

[ Zn <sup>2</sup> +]	Q	۵H°
(µ M)	(10 <sup>-10</sup> mole.cm <sup>-2</sup> )	(kcal/mole)
2.8	7.1	4.92
2.8	27.1	3.72
7.1	7.1	3.59
7.1	27.1	2.43

Les réactions d'adsorption chimique sont généralement endothermiques et caractérisées par une augmentation de l'adsorption lorsque la température augmente. Leur constante d'équilibre est plus sensible aux changements de température et leur AH° plus élevé que pour les processus d'échange ionique. Ainsi, les  $\Delta H^{\circ}$  pour l'adsorption du Co<sup>2+</sup> sur les oxydes de fer, d'aluminium et de manganèse sont respectivement 14.9, 14.3 et 6.3 kcal/mole (Tewari et al., 1972); pour l'adsorption de l'uranium sur les oxydes de titane, il est de 5.6 kcal/mole (Yamashita et al., 1980). F.M.M. Morel (communication personnelle) nous a suggéré que des molécules d'hydroxyde de fer provenant du milieu de culture et adhérant à la surface des cellules pourraient constituer des sites pour l'adsorption d'autres métaux. Il ne semble pas que l'adsorption chimique du zinc, notamment sur des oxydes de fer, soit importante car les ∆H° obtenus sont plus faibles que ceux généralement connus pour ce type de réaction.

L'adsorption du zinc sur la membrane des cellules de <u>C. variabilis</u> semble donc être surtout un phénomène d'échange ionique. Cependant, les autres types d'adsorption peuvent aussi être présents dans une proportion que cette expérience ne permet pas de préciser.

## 4.1.3 Influence du magnésium

Il est connu que des cations comme le magnésium et le calcium réduisent la toxicité des métaux lourds à cause de la compétition qu'ils ont avec ces métaux. Ainsi, le magnésium devrait compétitionner

avec le zinc pour les sites d'adsorption de la membrane cellulaire du phytoplancton.

L'adsorption du magnésium sur les cellules de C. variabilis peut, comme dans le cas du zinc, être représentée par un isotherme de Langmuir (figure 3.4). Cette courbe a été tracée en utilisant les valeurs de Q et  $K_{\rho}$  obtenues avec la forme linéaire de l'équation de Langmuir (4.5). La constante d'équilibre ( $K_{\Theta}$ ) est 0.017 l·µmole-<sup>1</sup> et la concentration maximum de magnésium adsorbé à la surface d'une cellule (Q) est de 38.3  $\mu$ mole·g<sup>-1</sup> (35.4 X 10<sup>-10</sup> mole·cm<sup>-2</sup>). La décroissance de  $[Zn]_a$  en fonction de  $[Mg^{2+}]_b$ , accompagnée d'une augmentation de [Mg]<sub>a</sub> (figure 3.4, pour  $[Mg^{2+}]_b > 10\mu M$ ), ainsi que la valeur de Q obtenue pour l'adsorption de Mg, qui est semblable à celle mesurée pour Zn (tableau 4.1; Bates et al., 1983a), suggèrent que le magnésium compétitionne avec le zinc, au moins pour certains sites d'adsorption. La valeur de la constante  $K_{_{\mbox{O}}}$  obtenue pour Mg est cependant plus faible que celles généralement mesurées pour Zn (Tableau 4.1; Bates et al., 1983a), ce qui suggère qu'à concentrations égales, la compétition pour les sites d'adsorption est en faveur du zinc. Ceci pourrait être confirmé par le fait que la diminution de  $[Zn]_a$  (pour  $[Zn^{2+}]_b = 4.35 \mu M$ ) ne se fait sentir que pour  $[Mg^{2+}]_{b}$  > 10µM (figure 3.4); il faut cependant être prudent dans l'interprétation, car il est possible que la surface de l'algue soit changée aux faibles valeurs de magnésium en solution (ou aux fortes valeurs de sodium).

52

.

### 4.1.4 Influence du fer

Anderson et Morel (1982) ont démontré que des oxyhydroxydes de fer pouvaient se coaguler sur l'algue marine <u>Thalassiosira weissflogii</u> lorsque celle-ci était cultivée dans un milieu sursaturé par rapport à ces solides. Selon F.M.M. Morel (communication personnelle), des hydroxydes de fer provenant de milieux de culture sursaturés et coagulés sur les cellules de <u>C. variabilis</u> pourraient être souvent responsables de l'adsorption de métaux; les propriétés d'absorption de ces solides sont en effet bien connues.

Le milieu AAP est légèrement sursaturé par rapport à  $Fe(OH)_3(s)$ ; si on considère que le produit de solubilité de l'hydroxyde amorphe est de  $10^{-3}$  <sup>7,1</sup> (Whittemore et Langmuir, 1975), on calcule en effet un facteur de sursaturation d'environ 2. Le facteur de sursaturation, F<sub>s</sub>, se définit:

$$F_{s} = \frac{P}{K_{s}}$$
(4.13)

où P est le produit des concentrations des ions (dans ce cas-ci P =  $[Fe^{3} + ]$  [OH-]<sup>3</sup>) et K<sub>s</sub> est la valeur numérique du produit de solubilité.

Pour un si faible facteur de sursaturation, la vitesse de formation de la phase solide peut être infiniment faible (Stumm et Morgan, 1981). Les résultats de l'expérience 5 (figure 3.6) suggèrent que sur une période relativement courte (30 minutes) l'association d'oxyhydroxydes de fer avec <u>C. variabilis</u> est faible ou, du moins, qu'elle ne change pas les propriétés d'adsorption de la cellule.

D'autres indices suggèrent que l'adsorption du zinc observée au cours des expériences dans le milieu AAP se fait sur les cellules et non sur des oxyhydroxydes éventuels. En effet, tout au cours de la croissance en "batch" de <u>C</u>. <u>variabilis</u>, Bates <u>et al</u>. (1983b) ont déterminé la concentration de fer associé aux cellules; ils ont ainsi calculé une concentration de fer de  $1.5 \times 10^{-16}$  mole · algue-<sup>1</sup>. Cette valeur correspond de près à la valeur de  $1.3 \times 10^{-16}$  mole Fe · algue-<sup>1</sup> rapportée par Anderson et Morel (1982) comme le quota minimum pour la croissance de <u>Thalassiosira weissflogii</u>. Ces résultats suggèrent que le fer associé à <u>C</u>. <u>variabilis</u> est nécessaire à son métabolisme et n'est pas présent sous forme d'oxyhydroxydes à la surface.

Par ailleurs, une augmentation importante du fer en solution, comme dans l'expérience 6 où une concentration de 10 µmole/l était utilisée au lieu de 0.6 µmole/l dans le milieu AAP, conduit à une augmentation de l'adsorption du zinc (tableau 3.1). Cette augmentation appréciable de zinc adsorbé peut être attribuée à la formation d'oxyhydroxydes de fer qui sont, soit coagulés sur les cellules, soit simplement retenus par centrifugation en même temps que les cellules. Une précipitation relativement rapide d'hydroxyde ferrique n'est pas surprenante puisqu'on calcule ici un facteur de sursaturation d'environ 600.

#### 4.1.5 Influence du phosphore

La membrane cellulaire des algues contient des groupements phosphates capables de lier efficacement les métaux (Crist et al., 1981). Cependant, le phosphore ajouté aux algues sous forme d'orthophosphates dissous est consommé par les cellules qui le transforment rapidement en d'autres composés, notamment les polyphosphates. Ceux-ci sont habituellement entreposés à l'intérieur de la cellule (Keck et Stich, 1957) afin d'être métabolisés par les algues pendant la période de croissance. Le phosphore ne demeurant pas sur la surface cellulaire, cela pourrait expliquer pourquoi il n'y a pas de différence significative entre la concentration de zinc adsorbé sur les cellules auxquelles on a rajouté du phosphore et les cellules témoins (tableau 3.1). Bates (travail non publié) avait cependant trouvé une différence faible mais significative dans l'adsorption du zinc sur des cellules de C. variabilis incubées avec du phosphore pendant au moins quatre heures, comparativement à des cellules témoins; cependant, la différence semblait trop faible pour attribuer un grand rôle au phosphore dans le phénomène d'adsorption.

## 4.2 Zinc non extractible avec EDTA

Le transport du zinc à l'intérieur de la cellule peut vraisemblablement s'effectuer selon différents mécanismes. Ainsi, on peut imaginer que le zinc peut être capté directement de la solution (diffusion passive) ou qu'il peut être d'abord adsorbé sur la surface de la cellule et ensuite transporté dans la cellule (transport actif).

Si le transport est indépendant de l'adsorption, le flux de zinc à travers la membrane cellulaire (F) peut être décrit par :

$$F = \frac{d [Zn]_{c}}{dt} \frac{P}{s} = k_{c} [Zn^{2}+]_{b}$$
(4.14)

où  $k_{c}$  est une constante de vitesse pour le transport du zinc dans la cellule. En combinant (4.9) avec (4.14), on obtient :

$$F = \frac{d [Zn]_{c}}{dt} = \frac{P^{1/3}}{3.3 (\pi)^{1/3}} = k_{c} [Zn^{2+}]_{b}$$
(4.15)

Les équations (4.14) et (4.15) suggèrent que le flux devrait varier linéairement avec  $[Zn^{2+}]_{b}$ .

Si l'adsorption est une étape essentielle au transport du zinc dans la cellule, le flux peut être décrit par:

$$F = \frac{d [Zn]_{c}}{dt} = k'_{c} [Zn]_{a} \qquad (4.16)$$

En combinant les équations (4.4), (4.9) et (4.16), on obtient:

$$F = \frac{d[Zn]_{c}}{dt} \cdot \frac{P^{1/3}}{3.3 (\pi)^{1/3}} = k_{c}^{*} Q \cdot \frac{K_{\theta}[Zn^{2+}]_{b}}{1 + K_{\theta}[Zn^{2+}]_{b}}$$
(4.17)

où k' est une constante de vitesse pour le transport du zinc dans la cellule. L'équation (4.17) suggère que le flux varie de façon asymptotique en fonction de  $[Zn^{2}+]_{b}$ , présentant des pentes respectives de 1 (pour K<sub>0</sub>  $[Zn^{2}+]_{b} << 1$ )) et de 0 (pour K<sub>0</sub>  $[Zn^{2}+]_{b} >> 1$ ).

#### 4.2.1 Influence de la concentration de zinc dissous

La figure 4.3 montre que F est fonction de  $[Zn^{2+}]$  plutôt que de la concentration totale de zinc en solution. Cette figure montre également que tout le zinc adsorbé ne participe pas au flux. En effet, si tout le zinc adsorbé participait au transport, on devrait, étant donné les valeurs de K<sub>0</sub> (voir le tableau 4.1) et la gamme de  $[Zn^{2+}]_b$ , obtenir des asymptotes pour F en fonction de  $[Zn^{2+}]_b$ , en accord avec l'équation (4.17). Ce n'est évidemment pas le cas. Ceci n'élimine cependant pas la participation d'une fraction du zinc adsorbé au flux.

Les expériences la et lb montrent deux comportements un peu différents. Dans le cas de lb, on peut imaginer que le flux total, F, peut être séparé en deux composantes,  $F_1$  et  $F_2$ , où  $F_1$  est prépondérant aux faibles valeurs de  $[Zn^{2+}]_b$  et  $F_2$  aux fortes valeurs (voir la figure 4.3); dans le cas de l'expérience la, la composante  $F_1$  serait trop faible pour être mesurée ici ou inexistante. Dans le cas des expérien-



Chlamydomonas variabilis et la concentration de zinc libre en solution. (●) : expérience la; (○) : expérience lb; (□):expérience 4, avec PCMBS; (●) : expérience 4, sans PCMBS; (△) : expérience 5, avec Fe; (▲) : expérience 5, sans Fe. ces 4 et 5, on pourrait supposer que  $F_1$  et  $F_2$  existent, mais que les concentrations de  $[Zn^{2+}]_b$  utilisées étaient trop élevées pour mettre en évidence  $F_1$ .

La relation entre  $F_2$  et  $[Zn^{2+}]$  pourrait correspondre à un transport par diffusion. D'après ce modèle, il y aurait donc deux systèmes de transport du zinc qui agiraient simultanément et, dépendant de certaines conditions (histoire de l'algue, concentration de zinc dans le milieu d'incubation, etc.), l'un pourrait être prépondérant sur l'autre.

Les valeurs de  $k_c$ , obtenues à partir de  $F_2$  en fonction de  $[Zn^{2+}]$ pour les expériences 1, 4 et 5 sont données dans le tableau 4.3. Les valeurs de la constante correspondant à la composante  $F_2$  du flux obtenues dans les expériences 1 et 4 sont semblables à celles obtenues par Bates <u>et al.</u> (1983a) pour des cellules de <u>C. variabilis</u> cultivées en l'absence de zinc. La constante diminuait avec l'âge de la culture, passant de 1.4 x 10<sup>-5</sup> cm·s<sup>-1</sup> (jour 1) à 1.1 x 10<sup>-5</sup> cm·s<sup>-1</sup> (jour 6). Par contre, la faible valeur de l'expérience 5 peut s'expliquer par le fait que les algues ont été cultivées dans un milieu carencé en fer, ce qui pourrait affecter l'état physiologique des algues et affecter le transport du zinc. Tableau 4.3 : Constantes de vitesse pour le transport du zinc par <u>Chlamydomonas variabilis</u>\*.

Expérience	k <sub>c</sub> (10 <sup>-5</sup> cm•s <sup>-1</sup> )
la	1.10 ± 0.22
1b	0.88 ± 0.11
4	0.87 ± 0.29
5	0.56 ± 0.18

\* On ne considère ici que la composante  $F_2$  du flux.

# 4.2.2 Influence de la température

L'équation générale de variation d'une constante de vitesse (k) en fonction de la température (T) est donnée par l'équation d'Arrhénius:

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$
(4.18)

où  $E_a$  est l'énergie d'activation et A, une constante. En combinant l'équation (4.18) avec l'équation (4.14), on obtient:

$$k_{c} = \frac{F}{[Zn^{2}+]_{b}} = Ae^{-E_{a}/RT}$$
 (4.19)

ou

$$\ln F - \ln [Zn^{2}+]_{b} = \ln A - \frac{E_{a}}{RT}$$
(4.20)

Par ailleurs, en admettant le modèle décrit à la section (4.2.1), le flux total, F, s'écrit :

$$F = F_1 + F_2$$
 (4.21)

avec  $F_1$  dont la forme est celle de l'équation de Michaelis-Menten :

$$F_{1} = \frac{k''c}{K + [Zn^{2+}]_{b}}$$
(4.22)

où k"<sub>c</sub> et K sont des constantes qui peuvent être fonction de T. D'après la figure 4.3, les valeurs de  $[Zn^{2+}]_b$  utilisées dans l'expérience 2 (2.8 et 7.1 X 10<sup>-6</sup>M; tableau A.3 en annexe) sont suffisamment élevées pour que la condition K<<  $[Zn^{2+}]_b$  soit vérifiée; dans ces conditions, l'équation (4.22) s'écrit :

$$F_1 = k''_C$$
 (4.23)

En combinant (4.14), (4.21) et (4.23), on obtient :

$$F = k''_{c} + k_{c} [Zn^{2}+]_{b}$$
 (4.24)

L'équation (4.24) montre que F est une constante pour chaque valeur de  $[Zn^{2}+]_{b}$  utilisée; cependant, F correspond à une combinaison de deux constantes de vitesse. Ce n'est donc que lorsque l'un des deux termes de droite de l'équation (4.24) est négligeable qu'on peut obtenir une valeur correcte pour l'énergie d'activation en traçant ln F vs  $\frac{1}{T}$  en conformité avec l'équation (4.18). La figure 4.4 montre la relation ln F en fonction de  $\frac{1}{T}$ . La pente, supposée égale à  $\frac{-E_{a}}{R}$ , nous a permis de calculer les valeurs suivantes d'énergie d'activation :

6.84 kcal·mole<sup>-1</sup> pour  $[Zn^{2+}]_{b} = 2.8 \ \mu M$ 6.20 kcal·mole<sup>-1</sup> pour  $[Zn^{2+}]_{b} = 7.1 \ \mu M$


Figure 4.4 : Graphique de ln F en fonction de l'inverse de la température. (O) :  $[Zn^{2+}]_b = 2.8\mu$ M; ( $\Box$ ) :  $[Zn^{2+}]_b = 7.1\mu$ M.

L'effet de la température sur les réactions est souvent donné par les biologistes en terme de coefficient de température, désigné par  $Q_{10}$ , qui est le facteur par lequel la vitesse est augmentée lorsque la température augmente de 10°C. On peut le relier à l'énergie d'activation en dérivant l'équation (4.18) :

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_a}{RT^2}$$
(4.25)

ou:

$$\ln \left[\frac{k (T + 10)}{k (T)}\right] = \ln Q_{10} = \frac{10 E}{RT^2}$$
(4.26)

Cette équation nous a permis de calculer un  $Q_{10}$  de 1.4 pour le transport du zinc par <u>C. variabilis</u>. Pour les réactions thermobiologiques,  $Q_{10}$  est environ 2, c'est-à-dire que la vitesse augmente deux fois pour chaque augmentation de 10° (Giese, 1968). Anderson et Morel (1982) déterminèrent un  $Q_{10}$  de 2 ( $E_a \approx 12.3 \text{ kcal/mole}$ ) pour la réaction de fixation du fer par la diatomée <u>Thalassiosira weissflogii</u>. Pour les réactions de diffusion en solution, le  $Q_{10}$  est inférieur à 2. Ainsi, il est de 1.27 ( $E_a \approx 4.2 \text{ kcal/mole}$ ) pour les électrolytes, 1.37 ( $E_a \approx 5.6 \text{ kcal/mole}$ ) pour le sucre et 1.41 ( $E_a \approx 6.1 \text{ kcal/mole}$ ) pour la dextrine (Giese, 1968).

D'après Stumm et Morgan (1981), dans les solutions aqueuses, l'énergie d'activation pour une collision par diffusion est de 3 à 5 kcal/mole. Les deux valeurs d'énergie d'activation obtenues sont plus élevées que celles généralement admises pour la diffusion des électrolytes dans l'eau. Ceci suggère que le transport à travers la membrane ne se passe pas (ou pas uniquement) selon un mécanisme de diffusion libre à travers des pores larges et remplis d'eau; au contraire, la formation et/ou le bris de liaisons pourraient être impliqués. Par exemple, lorsqu'un ion hydraté comme Zn<sup>2+</sup> pénètre dans une cellule, il doit probablement briser une ou plusieurs liaisons avec l'eau d'hydratation pour entrer dans la membrane lipidique. Son mouvement à travers la membrane présente aussi certaines difficultés (Giese, 1968) qui contribuent à augmenter l'énergie d'activation. Ces résultats pourraient également être expliqués par une contribution importante de F<sub>1</sub> et  $F_2$  au flux total; si  $F_1$  est dû à un transport actif, il est alors probable que des formations et ruptures de liaisons soient impliquées. Cette dernière explication trouve un support dans le fait que l'énergie d'activation calculée diminue lorsque [Zn<sup>2+</sup>]<sub>b</sub> augmente, donc lorsque la contribution relative de  $F_2$  (diffusion?) augmente.

#### 4.2.3 Influence du magnésium

La concentration de magnésium intracellulaire demeure constante, quelle que soit la concentration de magnésium en solution, ce qui suggère que le magnésium est peu transporté pendant les dix minutes de l'incuba-

65

tion. La concentration de zinc intracellulaire diminue abruptement entre zéro et 10  $\mu$ M de Mg<sup>2+</sup> puis graduellement par la suite (figure 3.4). La courbe de [Zn]<sub>c</sub> vs [Mg<sup>2+</sup>]<sub>b</sub> ne suit pas celle de [Zn]<sub>a</sub>, du moins aux faibles valeurs de [Mg<sup>2+</sup>]<sub>b</sub>, ce qui suggère que l'adsorption et le transport ne sont pas intimement liés. En ce qui concerne la diminution abrupte de [Zn]<sub>c</sub> avec [Mg<sup>2+</sup>]<sub>b</sub>, elle peut être due aux faibles valeurs de Mg ou aux fortes valeurs de Na; Mg est reconnu pour diminuer la perméabilité des membranes et Na pour l'augmenter (Meryman, 1972).

#### 4.2.4 Influence du fer

La présence du fer aux concentrations du milieu AAP ne semble pas modifier le flux du zinc vers l'intérieur de la cellule (figure 3.6). Par contre, lorsque de fortes concentrations de fer sont utilisées (expérience 6), la quantité de zinc intracellulaire diminue appréciablement (tableau 3.1). Il est possible que les oxydes de fer formés dans ce milieu sursaturé, et coagulés sur la cellule (voir la section 4.1.4) empêchent une partie du zinc de pénétrer à l'intérieur de la cellule, par exemple en bloquant les pores par où passe le zinc.

#### 4.2.5 Influence du phosphore

Les cellules en phase stationnaire auxquelles on a rajouté du phosphore ont une quantité de zinc intracellulaire beaucoup plus élevée que les cellules témoins (tableau 3.1). Il est bien connu que les phosphates ajoutés à des cellules carencées en P sont pris très rapidement par les algues et transformés en poplyphosphates (Lean et Nalewajko, 1976; Bates <u>et al.</u>, 1983b). Ces polyphosphates seraient logés à l'intérieur de la cellule et pourraient offrir des sites supplémentaires pour la fixation du zinc et accélérer ainsi sa pénétration à l'intérieur de la cellule. Ce phénomène ne semble pas causé par un changement dans la division cellulaire car le nombre d'algues est semblable dans la culture témoin et dans celle où le phosphore a été ajouté, et cela à chacun des deux jours de l'expérience (voir tableau A.7 en annexe).

#### 5. CONCLUSION

Les expériences effectuées dans cette étude sur des cultures "batch" de <u>Chlamydomonas variabilis</u> nous ont permis de faire ressortir certaines caractéristiques de l'adsorption et du transport du zinc par cette algue.

L'adsorption du zinc est fonction de la concentration de zinc ionique libre demeurant dans le milieu et peut être décrite par des isothermes de Langmuir. Elle est caractérisée par une constante d'équilibre  $K_{\rho}$  qui varie selon les conditions expérimentales utilisées. Entre 5 et 25°C, l'adsorption augmente avec une augmentation de température. C'est une réaction endothermique où des processus d'échange ionique semblent prédominer sur l'adsorption physique et chimique du D'autre part, le fer, qui peut possiblement se coaguler sur les zinc. algues, ne semble pas être responsable de l'adsorption du zinc, du moins dans les conditions normales du milieu de culture. Quant au phosphore, il ne semble jouer aucun rôle dans l'adsorption du zinc car il se logerait essentiellement à l'intérieur de la cellule. De plus. des cations comme le magnésium compétitionnent avec le zinc pour les sites d'adsorption.

Le transport du zinc à l'intérieur de la cellule peut s'effectuer selon deux mécanismes dont l'un est prépondérant aux faibles valeurs de zinc ionique libre et l'autre aux fortes valeurs. Cette seconde compo-

68

sante du flux est une fonction linéaire de la concentration de zinc ionique libre demeurant en solution, ce qui implique que le zinc est transporté dans la cellule directement de la solution, par diffusion. Par contre, les valeurs de l'énergie d'activation obtenues en mesurant le flux de zinc à différentes températures suggèrent que le transport ne se produit pas seulement par un mécanisme de diffusion libre et pourrait impliquer la contribution d'un transport actif. D'autre part, le fer présent dans le milieu de culture ne semble jouer aucun rôle dans le transport du zinc alors que le phosphore semble offrir des sites de fixation du zinc à l'intérieur de la cellule. Quant au magnésium, sa présence diminue la quantité de zinc transporté dans la cellule.

#### BIBLIOGRAPHIE

ALLEN, H.E., HALL, R.H. et BRISBIN, T.D. (1980). Metal speciation. Effects on aquatic toxicity. Environ. Sci. Technol., 14: 441-443.

ANDERSON, D.M. et MOREL, F.M.M. (1978). Copper sensitivity of Gonyaulax tamarensis. Limnol. Oceanogr., 23 : 283-295.

ANDERSON, M.A. et MOREL, F.M.M. (1982). The influence of aqueous iron chemistry on the uptake of iron by the coastal diatom <u>Thalassiosira</u> weissflogii. Limnol. Oceanogr., 27 : 789-813.

BATES, S.S., TESSIER, A., CAMPBELL, P.G.C. et BUFFLE, J. (1982). Zinc adsorption and transport by <u>Chlamydomonas variabilis</u> and <u>Scenedesmus</u> <u>subspicatus</u> (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. J. Phycol., 18 : 521-529.

BATES, S.S., LÉTOURNEAU, M., TESSIER, A. et CAMPBELL, P.G.C. (1983a). Variation in zinc adsorption and transport during growth of <u>Chlamydomonas</u> variabilis (Chlorophyceae) in batch culture with daily addition of zinc. Can. J. Fish. Aquat. Res. (sous presse).

70

BATES, S.S., LÉTOURNEAU, M., TESSIER, A et CAMPBELL, P.G.C. (1983b). Zinc-phosphorus interactions and variation in zinc accumulation during growth of <u>Chlamydomonas variabilis</u> (chlorophyceae) in batch culture in the continuous presence of zinc. J. Plankton Res. (soumis pour publication).

BRODA, E. (1972). The uptake of heavy cationic trace elements by microorganisms. Annali. Microbiol. Enzinol., 22 : 93-108.

BUFFLE, J. (1979). Le rôle des méthodes électrochimiques en analyse des eaux. Trib. Cebedeau, 32 : 165-176.

BURNS, I.G. et HAYES, M.H.B. (1974). Some physico-chemical principles involved in the adsorption of the organic cation paraquat by soil humic materials. Residue Rev., 52 : 117-146.

COSSA, D. (1976). Sorption du cadmium par une population de la diatomée Phaeodactylum tricornutum en culture. Mar. Biol., 34 : 163-167.

CRIST, R.H., OBERHOLSER, K., SHANK, N. et NGUYEN, M. (1981). Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. Environ. Sci. Technol., 15 : 1212-1217.

DAVIES, A.G. (1973). The kinetics of and a preliminary model for the uptake of radio-zinc by <u>Phaeodactylum tricornutum</u> in culture. <u>In</u> : Radioactive contamination of the marine environment. International Atomic Energy Agency, Vienna, 403-420.

DAVIES, A.G. (1978). Pollution studies with marine plankton. Part II. Heavy metals. Adv. Mar. Biol., 15 : 381-508.

DE FILIPPIS, L.F. (1979). The effect of heavy metal compounds on the permeability of Chlorella cells. Z. Pflanzenphysiol. Bd., 92 : 39-49.

FORSTNER, U. et WITTMANN, G.T.W. (1981). Metal pollution in the aquatic environment, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, 486 p.

GADD, G.M. et GRIFFITHS, A.J. (1978). Microorganisms and heavy metal toxicity. Microbial Ecology, 4 : 303-317.

GIESE, A.C. (1968). Cell physiology, 3rd ed. Saunders Company, Philadelphia, 671 p.

HAQUE, R. et COSHOW, W.R. (1971). Adsorption of isocil and bromacil from aqueous solution onto some mineral surfaces. Environ. Sci. Technol., 5 : 139-141.

KECK, K. et STICH, H. (1957). The widespread occurrence of polyphosphate in lower plants. Annals. Bot., 21 : 611-619.

LEAN, D.R.S. et NALEWAJKO, C. (1976). Phosphate exchange and organic phosphorus excretion by freshwater algae. J. Fish. Res. Board. Can., 33 : 1312-1323. MERYMAN, H.T. (1972). The modification of water structure by divalent cations as a mechanism of membrane permeability control. <u>In</u> : F. Kreuzer et J.F.G. Slegers [eds]. Biomembranes. Plenum Press, New York, p. 341-348.

MOREL, F.M.M., MOREL, N.M.L. et ANDERSON, D.M. (1979). Trace metal speciation and toxicity in phytoplankton cultures. <u>In</u> : Jacoff, F.S. [ed]. Advances in marine research. U.S. E.P.A., Environ. Res. Lab., Narragansett, R.I., U.S., 38-61.

PAYNE, A.G. (1975). Responses of the three test algae of the algal assay procedure: bottle test. Water Res., 9 : 437-445.

RAI, L.C., GAUR, J.P. et KUMAR, H.D. (1981). Phycology and heavy metal pollution. Biol. Rev., 56 : 99-151.

ROTHSTEIN, A. (1959). Cell membrane as site of action of heavy metals. Fedn. Proced., 18 : 1026-1035.

SMITH, R.M. et MARTELL, A.A. (1974). Critical stability constants. Vol. 1. Amino acids. Plenum Press, New York, 469 p.

SMITH, R.M. et MARTELL, A.A. (1976). Critical stability constants. Vol. 4. Inorganic complexes. Plenum Press, New York, 257 p. STUMM, W. et MORGAN, J.J. (1981). Aquatic chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters, 2nd ed. Wiley-Interscience, New York, 780 p.

SUNDA, W.G. et GUILLARD, R.R.L. (1976). The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. J. Mar. Res., 34 : 511-529.

TEWARI, P.H., CAMPBELL, A.B. et LEE, W. (1972). Adsorption of  $Co^{2+}$  by oxides from aqueous solution. Can. J. Chem., 50 : 1642-1648.

VALLEE, B.L. (1977). Recent advances in zinc biochemistry. <u>In</u>: Addison, A.W., CULLEN, W.R., DOLPHIN, D. et JAMES, B.R. [eds]. Biological aspects of inorganic chemistry. John Wiley and Sons, New York, 37-70.

WEBER, W.J. (1972). Physicochemical processes for water quality control. Wiley Interscience, New York, 640 p.

WHITFIELD, M. et TURNER, D.R. (1979). Critical assessment of the relationship between biological thermodynamic and electrochemical availability. <u>In</u> : Jenne, E.A. [ed]. Chemical modeling in aqueous systems. ACS Symp. Ser. No 93, American Chemical Society, 657-680.

WHITTEMORE, D.O. et LANGMUIR, D. (1975). The soubility of ferric oxyhydroxydes in natural waters. Ground Water, 13 : 360 - 365.

YAMASHITA, H., OZAWA, Y. NAKAJIMA, F. et MURATA, T. (1980). The collection of uranium from sea water with hydrous metal oxide. II. The mechanism of uranium adsorption on hydrous titanium (IV) oxide. Bull. Chem. Soc. Jpn., 53 : 1-5.

ANNEXE

Solution	[Zn] <sub>b</sub>	[EDTA]	[Zn <sup>2+</sup> ] <sub>b</sub>	[Zn] <sub>a</sub>	[Zn]a	[Zn] <sub>c</sub>	[Zn] <sub>c</sub>	Bilan
	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)	• g <sup>-1</sup> )	(µM)	• g <sup>-1</sup>	(µM)
1	4.51	3.43	1.10	0.0615	3.58	0.0017	0.101	4.57
2	4.56	3.15	1.42	0.0484	2.81	0.0022	0.126	4.61
3	4.80	3.05	1.76	0.0488	2.84	0.0020	0.115	4.85
4	4.47	3.00	1.48	0.0579	3.36	0.0029	0.167	4.53
5	4.48	2.79	1.70	0.0684	3.98	0.0028	0.160	4.55
6	4.43	2.31	2.13	0.0857	4.99	0.0038	0.222	4.52
7	4.70	1.53	3.17	0.0846	4.92	0.0047	0.271	4.79
8	39.44	35.2	4.29	0.1598	9.29	0.0055	0.322	39.66
9	40.32	30.6	9.73	0.2264	13.16	0.0101	0.585	40.55
10	40.63	22.9	17.74	0.2851	16.59	0.0217	1.263	40.94
11	40.49	15.3	25.19	0.4119	23.95	0.0296	1.720	40.93
12	38.35	76.4	30.71	0.3952	22.98	0.0409	2.378	38.79

## Tableau A.1 : DONNÉES DE L'EXPÉRIENCE 1a

Nombre de cellules : 3.06 X  $10^5$  cell·ml<sup>-1</sup> Poids des cellules : 5.69 X  $10^{-11}$  g·cell<sup>-1</sup>

ar.

 $\dot{\tau}_{i}$ 

Solution	[Zn] <sub>b</sub>	[EDTA]	[Zn <sup>2+</sup> ] <sub>b</sub>	[Zn] <sub>a</sub>	[Zn] <sub>a</sub>	[Zn] <sub>c</sub>	[Zn] <sub>c</sub>	Bilan
	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)	(µmore • g <sup>-1</sup> )	(µM)	(µmore • g <sup>-1</sup>	(µM)
1	3.88	3.43	0.53	0.0333	0.657	0.0247	0.696	3.92
2	3.87	3.15	0.81	0.0311	0.875	0.0343	0.967	3.94
3	3.88	3.00	0.98	0.0386	1.086	0.0415	1.170	3.96
4	3.90	2.89	1.11	0.0390	1.100	0.0455	1.283	3.98
5	3.87	2.71	1.29	0.0638	1.798	0.0517	1.455	3.99
6	3.73	2.31	1.64	0.1672	4.710	0.0433	1.219	3.94
7	3.79	1.53	2.40	0.0914	2.574	0.0504	1.419	3.93
8	38.91	35.2	3.98	0.1619	4.561	0.0539	1.517	39.13
9	38.93	30.6	8.64	0.2323	6.544	0.0597	1.682	39.22
10	39.44	22.9	16.97	0.3313	9.331	0.0832	2.342	39.86
11	38.79	15.3	24.07	0.4611	12.989	0.0999	2.813	39.36
12	38.59	76.4	31.56	0.5017	14.134	0.1109	3.125	39.20

4

Tableau A.2 : DONNÉES DE L'EXPÉRIENCE 1b

Nombre de cellules :  $5.51 \times 10^5$  cell·ml<sup>-1</sup> Poids des cellules :  $7.22 \times 10^{-11}$  g·cell<sup>-1</sup>

Solution	Température	[Zn] <sub>b</sub>	[EDTA]	[Zn <sup>2+</sup> ] <sub>b</sub>	[Zn] <sub>a</sub>	[Zn] <sub>a</sub>	[Zn] <sub>c</sub>	[Zn] <sub>c</sub>	Bilan
	(°C)	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)	• g <sup>-1</sup> )	(µM)	• g <sup>-1</sup>	(µM)
1	5	15.01	12.24	2.80	0.1440	2.496	0.0198	0.342	15.17
2	10	15.06	12.24	2.85	0.1277	2.213	0.0219	0.379	15.21
3	15	15.07	12.24	2.86	0.1460	2.530	0.0307	0.532	15.25
4	20	14.98	12.24	2.77	0.1606	2.783	0.0398	0.689	15.18
5	25	15.12	12.24	2.91	0.1741	3.036	0.0416	0.721	15.33
6	5	14.77	7.65	7.13	0.1952	2.859	0.0282	0.413	14.99
7	10	14.76	7.65	7.12	0.2193	3.211	0.0354	0.518	15.02
8	15	14.63	7.65	6.99	0.2242	3.283	0.0410	0.600	14.90
9	20	14.70	7.65	7.06	0.2292	3.356	0.0487	0.713	14.98
10	25	14.71	7.65	7.07	0.2624	3.841	0.0612	0.896	15.04

Tableau A.3 : DONNÉES DE L'EXPÉRIENCE 2

Nombre de cellules :  $9.51 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ Poids des cellules :  $6.07 \times 10^{-11} \text{ g} \cdot \text{cell}^{-1}$  (solutions 1 à 5)  $7.19 \times 10^{-11} \text{ g} \cdot \text{cell}^{-1}$  (solutions 6 à 10)

Solution	[Zn <sup>2+</sup> ] <sub>b</sub> (µM)	[Zn] <sub>a</sub> (µM)	[Zn] <sub>C</sub> (µM)	Bilan de Zn (µM)	[Mg <sup>2+</sup> ] <sub>b</sub> (µM)	[Mg] <sub>a</sub> (µmole • g <sup>-1</sup>	[Mg] <sub>c</sub> (µmole • g <sup>-1</sup>	Bilan de Mg (µM)
1	4.08	1.604	2.209	4.21	0.24	2.68	22.32	1.08
2	4.18	3.668	1.076	4.34	4.95	4.76	21.43	5.83
3	4.31	3.988	0.772	4.47	9.86	5.95	22.92	10.83
4	4.44	2.573	0.595	4.55	48.73	13.10	23.81	49.97
5	4.22	2.060	0.468	4.33	93.95	16.12	20.79	95.53
6	4.26	1.446	0.342	4.33	354.33	34.81	21.96	356.76

Tableau A.4 : DONNÉES DE L'EXPÉRIENCE 3

Nombre de cellules : 4.24 X  $10^5$  cell·ml<sup>-1</sup> Poids des cellules : 9.02 X  $10^{-11}$  g·cell<sup>-1</sup>

Solution	[Zn] <sub>b</sub>	[EDTA]	[Zn <sup>2+</sup> ] <sub>b</sub>	[Zn] <sub>a</sub>	[Zn]a	[Zn] <sub>c</sub>	[Zn] <sub>c</sub>	Bilan
	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)	(µmore • g <sup>-1</sup> )	(µM)	(µmore • g <sup>-1</sup>	(µM)
1	14.93	14.39	0.65	0.0895	1.979	0.0131	0.290	15.04
2	15.00	13.31	1.73	0.1122	2.482	0.0197	0.437	15.13
3	14.94	10.71	4.24	0.2008	4.441	0.0233	0.515	15.16
4	14.84	8.41	6.44	0.2071	4.581	0.0288	0.636	15.07
5	14.56	5.81	8.76	0.2442	5.404	0.0296	0.655	14.87
6	14.43	3.37	11.06	0.3409	7.543	0.0432	0.955	14.82
7	14.96	14.39	0.67	0.0845	1.872	0.0157	0.347	15.06
8	14.99	13.31	1.72	0.1237	2.736	0.0236	0.523	15.13
9	14.95	10.71	4.25	0.1933	4.277	0.0252	0.557	15.17
10	14.58	8.41	6.18	0.1844	4.080	0.0298	0.659	14.79
11	14.59	5.81	8.79	0.2811	6.218	0.0352	0.778	14.91
12	14.58	3.37	11.21	0.3076	6.805	0.0463	1.024	14.93

Tableau A.5 : DONNÉES DE L'EXPÉRIENCE 4

Solutions 1 à 6 : Avec addition de PCMBS Solutions 7 à 12 : Sans addition de PCMBS

Nombre de cellules : 6.68 X  $10^5$  cell·ml<sup>-1</sup> Poids des cellules : 6.83 X  $10^{-11}$  g·cell<sup>-1</sup>

l		h						
Solution	[Zn] <sub>b</sub>	[EDTA]	[Zn <sup>2+</sup> ] <sub>b</sub>	[Zn] <sub>a</sub>	[Zn] <sub>a</sub>	[Zn] <sub>c</sub>	[Zn]	Bilan
	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)	• g <sup>-1</sup> )	(µМ)	• g <sup>-1</sup>	(µM)
1	15.09	15.10	0.26	0.0850	1.229	0.0473	0.684	15.23
2	15.04	14.39	0.75	0.1198	1.731	0.0470	0.678	15.21
3	15.01	13.31	1.74	0.1598	2.309	0.0569	0.823	15.22
4	14.73	10.71	4.04	0.2509	3.623	0.0565	0.817	15.03
5	14.54	8.41	6.14	0.3154	4.557	0.0708	1.024	14.93
6	14.42	5.81	8.62	0.4202	6.072	0.0726	1.049	14.91
7	14.57	3.37	11.20	0.5306	7.667	0.0767	1.108	15.18
8	14.06	0.77	13.29	0.5200	7.514	0.0850	1.228	14.67
9	15.30	15.10	0.48	0.0873	1.262	0.0505	0.729	15.43
10	15.13	14.39	0.83	0.1107	1.600	0.0499	0.721	15.29
11	15.02	13.31	1.75	0.1559	2.253	0.0531	0.767	15.23
12	14.82	10.71	4.13	0.2914	4.212	0.0624	0.902	15.17
13	14.21	8.41	5.81	0.3631	5.247	0.0718	1.038	14.65
14	14.62	5.81	8.82	0.3829	5.534	0.0670	0.969	15.07
15	14.36	3.37	10.99	0.5064	7.319	0.0781	1.128	14.95
16	14.02	0.77	13.25	0.5751	8.311	0.0869	1.256	14.68

### Tableau A.6 : DONNÉES DE L'EXPÉRIENCE 5

Solutions 1 à 8 : Avec addition de Fe Solutions 9 à 12 : Sans addition de Fe

Nombre de cellules : 1.23 X  $10^6$  cell·ml<sup>-1</sup> Poids des cellules : 5.63 X  $10^{-11}$  g · cell<sup>-1</sup>

1.

Jour	Cul ture	Nombre de cellules (10 <sup>6</sup> cell•ml <sup>-1</sup> )	Poids des cellules (10 <sup>-11</sup> g∙cell <sup>-1</sup>
0		1.76	11.76
1	Témoin	2.03	9.66
	+ Fe	1.59	13.33
	+P	1.91	10.63
2	Témoin	2.27	8.77
	+ Fe	1.74	12.24
	+ P	2.31	8.87

# Tableau A.7 : DONNÉES DE L'EXPÉRIENCE 6

.