# UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

Mémoire présenté à

L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

comme exigence partielle de la maîtrise ès sciences (eau)

par

Cristina Madariaga

Comparaison de la sensibilité de diverses sondes physiologiques en toxicologie aquatique: toxicité du Cd sur l'algue <u>Selenastrum capricornutum</u>

Janvier 1986

À Tomas Orbea

#### REMERCIEMENTS

J'aimerais dédier cette page à tous ceux qui m'ont procuré leur aide lors de la réalisation de mon mémoire de maîtrise:

- pour leur support scientifique, pour leur confiance ainsi que pour leur amitié, à mes deux directeurs de thèse, les professeurs Jean-Christian Auclair et Pierre Couture;

 à l'INRS-Eau qui m'accepta parmi ses étudiants de maîtrise et mit à ma disposition tous ses moyens professionnels et matériels, et très spécialement à tous mes professeurs;

- au Gouvernement du Pays Basque qui s'intéressa à mon projet et m'accorda, grâce à son Département d'Éducation, Université et Recherche, une bourse d'étude;

- au "Consorcio de Aguas del Gran Bilbao" qui m'offra son aide désintéressée si jamais j'en avais besoin;

- à Michelle Bordeleau et Lance Blomme grâce à la collaboration patiente de qui j'ai pû mener à but mes travaux au laboratoire;

à Lise Raymond pour la dactylographie de mon mémoire de thèse;

i

 à Monsieur Ramon Martin Mateo, Recteur à l'Université de Alicante (Espagne) qui me facilita les premiers contacts avec l'INRS et m'encouragea à y poursuivre mes études;

- au Canada, et très particulièrement à la Province de Québec, qui m'accueilla chaleureusement dès mon arrivée et où j'ai rencontré de chers amis qui ont su alléger mon éloignement de l'Espagne. Avec eux j'ai vécu deux années inoubliables. Je veux nommer très spécialement Carmen Deschênes, Carole Lachapelle, David Berryman, Jean-Christian Auclair et Lance Blomme.

À mes parents; à ma famille.

### SOMMAIRE ET CONCLUSIONS

L'objectif de ce travail était de préciser les effets du Cd sur diverses sondes physiologiques afin de discuter de son effet sur certaines fonctions; on a pu préciser également dans quelle mesure ces sondes, à savoir la charge énergétique, la fluorescence, l'ATP et l'assimilation de carbone, peuvent être utilisées comme paramètre de routine en toxicologie sur des populations de la chlorophycée Selenastrum capricornutum.

Nos travaux ont permis de mettre au point une méthodologie analytique originale capable d'extraire et de doser les nucléotides adénylates ATP, ADP et AMP pour calculer la charge énergétique cellulaire. L'emploi routinier de ce paramètre ne peut cependant être recommandé, vu les manipulations trop complexes qui s'y rattachent. Par ailleurs, l'utilisation de la fluorescence et en particulier du rapport  $\Delta F/F_{DCMU}$  a permis de mettre en évidence la sensibilité des algues aux fortes concentrations de Cd après 1 et 5 h d'exposition. Il apparaît également que la densité cellulaire n'a pas d'influence sur l'expression de la toxicité du Cd à 1000 et 100 µg Cd.L-<sup>1</sup>. De plus, il semblerait que l'activité du photosystème II (PSII) et non celle du photosystème I (PSI) soit davantage affectée.

Les expériences réalisées pour préciser les effets sur le pool en ATP cellulaire suggèrent une légère augmentation de ce pool, la teneur en Cd

iii

de 300  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> semblant en effet induire un stress environnemental suffisamment fort pour provoquer l'augmentation du pool.

Enfin, l'assimilation de carbone s'est révélée le paramètre le plus sensible pour détecter les effets d'inhibition du Cd à 300  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>. Après 5 h d'exposition, une diminution de 44% du processus photosynthétique est observé alors qu'après 24 h cette diminution est de 64%.

# TABLE DES MATIÈRES

	Page
REMERCIEMENTS	i
SOMMAIRE ET CONCLUSIONS	111
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	xi
Chapitre I: Introduction générale	1
Chapitre II: Signification des sondes physiologiques: CE <sub>A</sub> , fluorescence, ATP cellulaire, carbone assimilé	7
2.1 Objectif	8
2.2 La charge énergétique en nucléotides adénylates	9
2.3 Fluorescence "in vivo" et fluorescence induite par le DCMU	13
2.4 L'AIP cellulaire	16
2.5 Activite photosynthetique: carbone assimile	17
Chapitre III: Développement méthodologique pour la détermination	
de la CE <sub>A</sub>	19
3.1 Objectif	20
3.2 Matériel et méthode	21
3.2.1 Préparation des cultures	21
3.2.2 Extraction des nucléotides	21
3.2.3 Dosage des nucléotides	23

3.3 Matériel et méthodes	26
3.3.1 Préparation des cultures	26
3.3.2 Extraction des nucléotides	26
3.3.3 Dosage des nucléotides	33
3.4 Expériences de mise au point de la méthode	
Exemple d'applications, résultats et discussion	40
3.4.1 Expérience no 1	41
3.4.2 Expérience no 2	46
3.4.3 Expérience no 3	50
3.4.4 Expérience no 4	54
3.4.5 Expérience no 5	59
3.4.6 Expérience no 6	61
3.4.7 Expérience no 7	63
3.5 Conclusions	67
Chapitre IV: Utilisation d'autres sondes physiologiques	69
4.1 Introduction	70
4.2 Matériel et méthodes	71
4.2.1 Préparation des cultures	71
4.2.2 Mesures de fluorescence	71
4.2.3 Mesures d'ATP cellulaire	72
4.2.4 Mesures du C assimilé	75
4.2.5 Expériences, résultats et discussion	76
CONCLUSION	115
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	117

# LISTE DES TABLEAUX

Page

Tableau 3.1:	Mode de dilution des cultures dans le tampon TRIS-EDTA pour tenir compte de l'effet de dilution lorsque l'extraction est directe	28
Tableau 3.2:	Mode de dilution des cultures dans le mélange PCA-EDTA pour tenir compte de l'effet de dilution lorsque l'extraction est directe	30
Tableau 3.3:	Mode de dilution des cultures dans le mélange DMSO-MOPS pour tenir compte de l'effet de dilution lorsque l'extraction est directe	32
Tableau 3.4:	Droites de calibration pour l'ATP obtenues à partir des étalons préparés suivant les trois procédures d'extraction TRIS-EDTA, PCA, DMSO	42
Tableau 3.5:	Concentrations totales d'ATP dans les échantillons en femtogrammes d'ATP par cellule selon les différents volumes de culture extraits	43
Tableau 3.6:	Concentrations en ATP, ADP et AMP dosées dans les solutions étalon M1 et M2	48
Tableau 3.7:	Concentrations en ATP, ADP et AMP dosées dans les échantillons d'algues	49
Tableau 3.8:	Concentrations en ATP, ADP et AMP dosées dans les solutions	51
Tableau 3.9:	Concentrations en ATP, ADP et AMP dosées dans les échantillons	52

Tableau 3.10:	Droites étalon d'ATP et AMP construites à partir des étalons dosés avec les réactifs purifiés et non purifiés	56
Tableau 3.11:	Pourcentages de conversion de l'AMP en ATP avec l'emploi des réactifs purifiés	57
Tableau 3.12:	Pourcentages de conversion d'AMP en ATP, avec ajout de 35 nM et 70 nM ATP, en fonction de divers temps d'incubation	60
Tableau 3.13:	Pourcentages de conversion d'AMP en ATP, avec ajout de 70 nM et 100 nM ATP, en fonction de divers temps d'incubation	62
Tableau 3.14:	Droites de calibration utilisées pour calculer les concentrations d'ATP, ADP et AMP dans les échantillons	65
Tableau 3.15:	Concentrations d'ATP, ADP et AMP calculées après l'analyse des étalons mélange	66
Tableau 4.1:	Comparaison entre les quantités d'ATP.cell- <sup>1</sup> obtenues lorsque l'extraction est directe ou précédée de filtration	73
Tableau 4.2:	Évolution avec le temps de la croissance d'algues, exprimée en N cell.mL <sup>-1</sup> , dans les cultures exposées à 0, 10, 100 et 1000 µg.L <sup>-1</sup> de Cd	78
Tableau 4.3:	Variations temporelles des valeurs de F et F <sub>DCMU</sub> avec des cultures de même densité cellulaire initiale (445 860 cell.mL <sup>-1</sup> ) exposées à 0, 10, 100 et	
	1000 µg.L <sup>-1</sup> de Cd	79

Tableau 4.4:	Valeurs de $\Delta F/F_{DCMU}$ et pourcentage de leur	
	déterminées au temps 0	81
Tableau 4.5:	Comparaison des moyennes des valeurs ΔF/F <sub>DCMU</sub> des cultures exposées au Cd avec celle de la culture contrôle, par l'application du test T-Student d'égalité des moyennes (variances inconnues et supposées égales)	82
Tableau 4.6:	Variations temporelles des valeurs de F et F <sub>DCMU</sub> des cultures exposées aux mêmes concentrations de Cd (1 000 µg.L <sup>-1</sup> ) avec des densités cellulaires initiales différentes	87
Tableau 4.7:	Valeurs de ∆F/F <sub>DCMU</sub> et pourcentages de leur diminution avec le temps par rapport à celles déterminées au temps zéro	88
Tableau 4.8:	Comparaison des moyennes des valeurs de $\Delta F/F_{DCMU}$ des cultures exposées à la même concentration de Cd (1000 µg.L <sup>-1</sup> ) mais avec des densités cellulaires initiales différentes. Application du test T-Student d'égalité des moyennes (variances inconnues et supposées égales)	89
Tableau 4.9:	Variations temporelles de valeurs de F et de F <sub>DCMU</sub> , des cultures exposées à la même concentration de Cd (100 µg.L <sup>-1</sup> ), avec des densités cellulaires initiales différentes	93
Tableau 4.10:	Valeurs de ∆F/F <sub>DCMU</sub> et pourcentages de leur diminution avec le temps par rapport à celles déterminées au temps zéro	94

Tableau 4.11:	Comparaison des moyennes des valeurs de ∆F/F <sub>DCMU</sub> des	
	cultures exposées à la même concentration de Cd	
	(100 µg.L <sup>-1</sup> ) avec des densités cellulaires initiales	
	différentes. Test T-Student d'égalité des moyennes	
	(variances inconnues mais supposées égales)	96

- Tableau 4.12: Variation temporelle des valeurs de F et  $F_{DCMU}$ dans la culture contrôle et celle exposée à 300 µg.L<sup>-1</sup> de Cd. Valeurs de  $\Delta F/F_{DCMU}$  et pourcentages de leur diminution avec le temps par rapport à celles déterminées au temps zéro ...... 102
- Tableau 4.14:Variation avec le temps de la quantité d'ATP-cell-1dans la culture contrôle et celle exposée à 300  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>de Cd107
- Tableau 4.15:Évolution dans le temps du  ${}^{12}$ C assimilé par les<br/>cellules de la culture contrôle et celle exposée à<br/>300 µg.L ${}^{-1}$  de Cd .....114

## LISTE DES FIGURES

Page

Figure 3.1:	Relation entre les concentrations d'ATP et les volumes de culture d'algues pour la méthode d'extraction TRIS-EDTA	45
Figure 4.1:	Relation entre F et F <sub>DCMU</sub> au temps zéro et les densités cellulaires des cultures: expérience no 2 .	92
Figure 4.2:	Relation entre F et F <sub>DCMU</sub> au temps zéro et les densités cellulaires des cultures: expérience no 3 .	97
Figure 4.3:	Relation de proportionnalité entre les valeurs de F aux temps 18h30m et 24h30m et les densités cellulaires initiales: expérience no 3	98
Figure 4.4:	Relation de proportionnalité entre les valeurs de F <sub>DCMU</sub> aux temps 18h30m et 24h30m et les densités cellulaires initiales des cultures 1, 2, 3 et 4: expérience no 3	99
Figure 4.5:	Variations avec le temps du pool d'ATP.cell <sup>-1</sup> dans la culture expérimentale	109
Figure 4.6:	Variations avec le temps du pool d'ATP.cell- <sup>1</sup> dans la culture contrôle	110



Chapitre I

Introduction générale

La détérioration accrue du milieu aquatique conséquente au déversement incontrôlé et continu de diverses substances altéragènes pose, de nos jours, un grave problème de contamination environnementale auquel doivent faire face les sociétés industrielles. Pour pouvoir assurer la protection de la ressource aquatique, les gestionnaires de l'environnement, et en particulier ceux spécialisés dans le domaine de la toxicologie aquatique, ont besoin d'outils efficaces leur permettant de diagnostiquer l'ampleur de l'agression toxique sur ce système suite à l'apport de substances allochtones.

Les études des composantes physiques et chimiques de l'eau après un déversement de substances altéragènes fournissent une bonne partie des renseignements nécessaires pour connaître les phénomènes toxicologiques. Cependant, il est majoritairement accepté en ce moment que l'agression toxique sur la biota du milieu n'est pas suffisamment précisée par ce genre d'études compte tenu du fait que la biodisponibilité des substances n'est pas prise en compte. Pour cette raison, les tests biologiques sont apparus indispensables et jouent un rôle fondamental dans la caractérisation des sources polluantes du milieu aquatique (Maciorowski et al., 1981, 1982).

Il existe une grande variété de bioessais utilisant des poissons, invertébrés, phytoplancton, bactéries (Maciorowski <u>et al</u>., 1983). Ceux qui emploient des organismes phytoplanctoniques se sont avérés particulièrement utiles à l'intérieur de programmes de surveillance de la qualité de rejet industriel (Joubert 1980; Blaise et Couture 1984). Ceci s'explique si l'on

-2-

tient compte de l'importance exceptionnelle du phytoplancton dans l'organisation de l'écosystème aquatique, car, en tant que producteurs primaires, ces microorganismes constituent le premier maillon de la chaîne trophique. De plus, les bioessais avec algues sont simples, rapides et relativement peu coûteux, contrairement à ceux qui utilisent des invertébrés et/ou des poissons.

Lors de la planification d'un test de toxicité avec algues, deux aspects doivent être considérés:

- 1- le genre de test, c'est-à-dire sa réalisation en laboratoire ou dans le milieu naturel;
- 2- les paramètres pour mesurer la réponse au toxique du phytoplancton.

La plupart des efforts de recherche en toxicologie aquatique ont été concentrés sur le développement de bioessais au laboratoire. Ainsi, par exemple, beaucoup d'études ont été réalisées sur les effets toxiques des métaux traces sur des cultures monospécifiques (Rai <u>et al</u>., 1981). Cette approche permet d'évaluer la toxicité relative (par rapport à l'espèce utilisée) et d'approfondir la connaissance de phénomènes aussi importants que la biodisponibilité des métaux ou leurs effets synergiques ou antagonistes. Par contre, son inconvénient majeur est que les résultats obtenus au laboratoire peuvent être difficilement transposables au milieu et considérés comme la réponse au toxique de la communauté indigène, étant donné les grandes

-3-

différences qui séparent un système de l'autre (conditions environnementales contrôlées / non contrôlée; cultures monospécifiques / multiplicité d'espèces, etc.) (Harris, 1980, Cairns, 1980). Il semble donc exister un besoin de développer d'autres méthodes permettant des études directement sur le biota du milieu, pour mieux caractériser la capacité polluante d'une substance.

Par ailleurs, la signification des valeurs est aussi reliée aux paramètres dont on dispose pour évaluer l'action toxique sur le phytoplancton. Habituellement, dans les bioessais de laboratoire, on se sert du comptage cellulaire effectué à divers intervalles de temps. Les résultats sont comparés avec la croissance qui a lieu dans une culture contrôle (non exposée au toxique). Cette façon de procéder, qui permet de déterminer les variations produites sur le taux de division cellulaire ( $\mu$ ) comme conséquence de l'action toxique, est difficilement applicable au milieu naturel, étant donné que les méthodes développées au laboratoire pour déterminer la biomasse (poids frais/sec, carbone cellulaire, protéines totales, microscopie directe, etc.) sont normalement peu satisfaisantes lorsqu'appliquées sur le milieu (Karl, 1980).

En conséquence, la recherche de paramètres biochimiques capables de caractériser rapidement la toxicité réelle d'une substance déversée s'avère essentielle (Karl, 1980, Rainer <u>et al</u>., 1979). C'est dans cette perspective que le présent travail a été réalisé.

-4-

Dans cette étude, l'accent est mis uniquement sur l'approche au laboratoire, en utilisant des cultures en vrac de l'algue test <u>Selenastrum</u> <u>capricornutum</u> et le cadmium (Cd) comme substance toxique de référence. Les raisons qui ont favorisé leur emploi sont, d'une part, que <u>S</u>. <u>capricornutum</u> est l'espèce la plus utilisée dans les bioessais avec algues, comme en témoigne la revue bibliographique publiée par Leischman <u>et al</u>. (1979), et que, d'autre part, le Cd peut être une source importante de contamination de l'environnement (air, eau), particulièrement dans les régions industrielles (McLean et Willianson, 1977). Il est aussi bien connu que l'accroissement de biomasse de <u>S</u>. <u>capricornutum</u>, mesuré sur quelques jours (5-7), est fortement inhibé par ce métal (Bartlett <u>et al</u>., 1974, Chiaudani et Vighi, 1978).

Les objectifs du travail étaient les suivants:

- une étude d'un paramètre biochimique, soit la charge énergétique en nucléotides adénylates (CE<sub>A</sub>) en tant que sonde physiologique cellulaire susceptible de refléter la toxicité du Cd sur les cultures d'algues;
  - en même temps, étant donné que la CE<sub>A</sub> est un paramètre d'utilisation récente en toxicologie aquatique (Chapitre II) et que sa détermination au laboratoire exige des manipulations complexes, on a voulu comparer sa sensibilité de réponse à l'action toxique avec celle d'autres sondes physiologiques demandant des manipulations plus simples. On en a choisi trois, deux d'entre elles

étant déjà bien connues en toxicologie aquatique, l'ATP cellulaire et l'assimilation de carbone. La troisième, la fluoresence "in vivo" et la fluorescence induite par le DCMU, a été très récemment appliquée en toxicologie et pour cela il nous a paru intéressant d'en discuter ici.

Dans toutes les expériences réalisées, le temps d'exposition des algues au toxique était très court (maximum 1 jour), avec un suivi des paramètres à des intervalles de temps rapprochés (minutes, heures). Pour cette raison, afin d'assurer un effet nuisible sur le phytoplancton, les doses du toxique utilisées sont plus fortes (10, 100, 300, 1000  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>) que celles employées habituellement (Chiaudani et Vighi, 1978).

# Chapitre II

Signification des sondes physiologiques: CE<sub>A</sub>, fluorescence, ATP cellulaire, carbone assimilé 2.1 Objectif

Ce chapitre se propose de fournir aux lecteurs une compréhension plus approfondie de quatre sondes physiologiques employées dans l'expérimentation de ce travail, en faisant un bref commentaire sur les deux points suivants:

- leur signification au niveau de la physiologie cellulaire en discutant des raisons qui ont mené à les considérer comme indicateurs possibles d'une situation de stress physiologique;

- leur application dans le domaine de la toxicologie en précisant les avantages et désavantages de leur utilisation dans les bioessais avec algues. 2.2 La charge énergétique en nucléotides adénylates

Les nucléotides adénylates font partie d'une série de molécules nommées nucléosides et nucléotides qui sont essentielles pour la viabilité et la croissance d'un organisme.

Le rôle central des nucléotides adénylates (ATP: Adénosine triphosphate; ADP: adénosine diphosphate; AMP: adénosine monophosphate) à l'intérieur du métabolisme cellulaire est celui de transporteur intermédiaire de l'énergie chimique entre les deux compartiments fonctionnels, le catabolisme et l'anabolisme. Ces nucléotides se constituent ainsi les agents de couplage stoechiométriques universels de toutes les séquences métaboliques (Atkinson, 1971).

Atkinson (1971), en se basant sur l'interrelation de ces trois molécules (2 ADP + 2  $P_i \stackrel{*}{\leftarrow} 2$  ATP +  $H_20$ ; AMP + ATP  $\stackrel{*}{\leftarrow} 2$  ADP), élabora un patron de l'état physiologique cellulaire, désigné sous le terme de "charge énergétique en nucléotides adénylates" (CE<sub>A</sub>), exprimé par la formule:

$$CE_{A} = \frac{[ATP] + \frac{1}{2} [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

où: [ ]: concentrations molaires

Cette variable représente l'équivalent d'une mesure linéaire de la quantité totale d'énergie chimique potentielle, momentanément contenue dans le "pool" des trois nucléotides (Karl, 1980). Théoriquement, le système serait complètement "chargé" lorsque les trois molécules seraient sous la forme d'ATP ( $CE_A = 1$ ) et complètement "déchargé" lorsqu'elles se trouve-raient sous la forme d'AMP ( $CE_A = 0$ ).

Les premières études <u>in vitro</u> montraient une certaine hétérogénéité dans la réponse de l'activité de plusieurs enzymes face à la présence des adénylates. Celle-ci pouvait être affectée par les concentrations individuelles de l'ATP, ADP ou AMP, ou encore, dans la plupart des cas apparemment, par le rapport des concentrations ATP/ADP ou ATP/AMP (Atkinson, 1969). Ceci appuya l'idée d'Atkinson selon laquelle l'activité des enzymes de régulation serait reliée à un seul paramètre représentatif de l'état énergétique de la cellule, la  $CE_A$ , lequel devrait être gardé pratiquement constant afin de maintenir l'homéostase cellulaire (Atkinson <u>et al.</u>, 1975; Atkinson, 1977).

La littérature publiée avant 1971 (Chapman <u>et al</u>., 1971) montre que la  $CE_A$  se situe entre les valeurs de 0,8 et 0,9. Des travaux plus récents, utilisant une méthodologie plus avancée, montrent des valeurs de 0,9. Cette constance dans le rapport des nucléotides adénylates indique que le contrôle in vivo doit être exercé par le rapport entre les trois composantes du "pool", et non par la concentration totale des trois molécules. Des réponses confirmant ceci ont été observées <u>in vitro</u> (Atkinson, 1969; Shen et al., 1968, Atkinson, 1977).

-10-

L'emploi paramétrique de la  $CE_A$  pour quantifier l'état physiologique cellulaire a été utilisé dans plusieurs études comme outil pour caractériser une situation de stress environnemental sur divers organismes: limitation de substances nutritives (Chapman <u>et al.</u>, 1971), température (Falkowski, 1977) et salinité (Ivanovici, 1980). Bien que théoriquement la gamme de variation de la  $CE_A$  se situe entre 0 et 1, les données empiriques obtenues à partir de cultures montrent des valeurs de  $CE_A$  supérieures à 0,7 lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance dans un environnement qui leur est favorable, entre 0,5 et 0,7 lorsque, comme résultats d'une situation de stress, les cellules sont uniquement viables et, finalement, des valeurs inférieures à 0,5 indiquent des conséquences physiologiques irréversibles.

Plus récemment, la  $CE_A$  a été déterminée non seulement sur des cultures monospécifiques mais aussi sur des communautés phytoplanctoniques du milieu naturel (Witzel, 1979; Riemann and Wium-Andersen, 1982). Il est important de souligner que, dans ce contexte, les déterminations de  $CE_A$  réalisées conduisent à des interprétations difficiles, car la valeur calculée est la moyenne de plusieurs  $CE_A$  correspondant à une grande diversité d'organismes qui peuvent présenter des différences dans leur état physiologique (Karl, 1980; Riemann and Wium-Andersen, 1982). Par ailleurs, dans le domaine de la toxicologie des métaux lourds, la  $CE_A$  a été rarement utilisée.

Citons, cependant, Riemann et Wium-Andersen (1982) qui ont étudié l'effet du Hg et du Cu sur la CE<sub>A</sub>de cultures monospécifiques d'algues en

phase exponentielle de croissance, ainsi que sur du phytoplancton naturel après 4 h d'exposition aux toxiques. Dans les deux cas, la CE<sub>A</sub> du phytoplancton (cultures au laboratoire et communauté naturelle) subit des changements suffisamment importants pour permettre de prédire rapidement les effets toxiques des substances testées. Fitzwater et al. (1983) ont aussi réalisé une expérience similaire, afin de voir l'effet sur la  $CE_A$  d'une population phytoplanctonique marine lorsqu'elle est exposée à l'action d'une forte dose de Cu pendant 6 h. Leurs résultats ont été comparés avec les changements produits sur l'assimilation du <sup>14</sup>C et la somme totale des adénylates ( $A_T$ ): tandis que la CE<sub>A</sub> est maintenue pratiquement constante, l'assimilation du  $^{14}$ C et les A<sub>T</sub> diminuent fortement. Ces observations ont mené les auteurs aux conclusions suivantes: les cellules phytoplanctoniques peuvent maintenir constante la CE, même lorsqu'elles supportent une forte situation de stress (comme le montre l'inhibition de  $^{14}$ C et  $A_T$ ) et ceci jusqu'au moment où la dose toxique devienne létale ou que le temps d'exposition soit suffisamment long. Pour ces raisons, la  $CE_A$  doit être utilisée avec d'autres indicateurs de la "santé" métabolique. Finalement, ils proposent la réalisation d'études de plus longue durée pour déterminer jusqu'à quel point la CE<sub>A</sub> peut être maintenue constante lorsque les activités photosynthétiques sont gravement affectées.

Probablement que le grand avantage de l'utilisation de la CE<sub>A</sub> comme paramètre toxicologique réside dans la possibilité de pouvoir distinguer entre des effets toxiques létaux et sublétaux, ainsi que pour permettre une caractérisation rapide de la toxicité. Cependant, la méthodologie pour la détermination des concentrations des trois nucléotides demeure assez compliquée et coûteuse, ce qui présente un grand désavantage lors de son application routinière pour les bioessais. Il est important de souligner que d'autres études dans ce domaine sont nécessaires avant de pouvoir bien établir l'utilité de la  $CE_A$  comme paramètre toxicologique.

## 2.3 Fluorescence "in vivo" et fluorescence induite par le DCMU

Lorsque la lumière est absorbée par une cellule phytoplanctonique, les processus de fluorescence et de photosynthèse découlent de l'énergie d'excitation disponible et apparaissent complémentaires: lorsque le rendement photochimique diminue, il augmente la production de fluorescence. Cependant, le rendement photochimique varie selon les espèces considérées, et à l'intérieur d'une même espèce selon les conditions environnementales du moment (disponibilité de l'azote, lumière, etc.). Pour ces raisons, les déterminations de la fluorescence <u>in vivo</u>, souvent utilisées dans le milieu naturel comme mesure de la chlorophylle phytoplanctonique, sont assujetties à une variabilité qui rend la méthode <u>in vivo</u> peu utile, car elle demande plusieurs et fréquentes calibrations pour une bonne interprétation des données.

Slovacek et Hannan (1978) ont démontré que l'addition de l'herbicide 3 (3,4 dichlorophényl) 1,1 diméthylurea (DCMU) normalise les mesures de fluorescence <u>in vivo</u> (de façon analogue lorsque la fluorescence est déterminée sur les pigments préalablement extraits), le DCMU étant un inhibiteur

-13-

de la chaîne de transport d'électrons entre le photosystème II (PSII) et le photosystème I (PSI). Le DCMU induit ainsi une émission de fluorescence maximale par unité de chlorophylle, puisque l'énergie qui normalement aurait été utilisée dans le processus photochimique est bloquée et dissipée sous forme de lumière (fluorescence). Les auteurs concluent que les mesures de fluorescence après ajout de DCMU seraient donc un meilleur outil pour des déterminations plus fiables des concentrations de chlorophylle-a ou de biomasse.

En même temps, étant donné que l'énergie émise sous forme de fluorescence <u>in vivo</u> n'est plus disponible pour la photosynthèse, sous des conditions contrôlées, elle peut être une mesure de l'inefficacité photosynthétique d'une cellule (Vincent, 1981).

Quelques auteurs ont ainsi essayé d'établir des corrélations entre la fluorescence induite par le DCMU et la capacité photosynthétique des algues. Samuelsson et Öquist (1977) montrent que pour quatre espèces d'algues vertes unicellulaires, il existe une bonne corrélation entre la photosynthèse (mesurée avec la technique du <sup>14</sup>C-CO<sub>2</sub>) et l'augmentation de la fluorescence induite par le DCMU ( $F_{DCMU}/F$ ). À des bas taux de photosynthèse, l'incrément de la fluorescence induite par le DCMU est plus petit que lorsque les taux de photosynthèse sont plus élevés. Roy et Legendre (1979) proposent que pour une même intensité lumineuse,  $F_{DCMU}/F$  peut être utilisé comme un bon indicateur du stress nutritionnel, car il présente un patron de comportement similaire à celui du taux de photosynthèse spécifique P/B (mg C.L<sup>-1</sup>.chlo a<sup>-1</sup>) et il est plus facile à mesurer. Ce parallélisme dans le comportement de l'indice  $F_{DCMU}/F$  avec la photosynthèse cellulaire a mené récemment à l'idée d'utiliser la fluorescence comme indice toxicologique. De plus, les travaux réalisés sur quelques métaux (Cd, Cu, Pb) comme possibles inhibiteurs du processus photosynthétique cellulaire ont appuyé son application dans ce champ de la toxicologie (Homer et al., 1980; Couture <u>et al.</u>, 1981).

Un des avantages de l'emploi de ces paramètres (F,  $F_{DCMU}$ ) dans les bioessais de toxicité avec algues est la simplicité des manipulations à réaliser au laboratoire, la méthode étant très rapide. Ceci favorise la caractérisation de la toxicité d'une substance dans de courts intervalles de temps. De plus, cette technique minimise les risques d'altération de la forme chimique du toxique. Il est bien connu que la croissance modifie le pH du milieu et en conséquence peut affecter la spéciation des toxiques inorganiques; les produits extracellulaires peuvent aussi modifier la spéciation par complexation avec les substances inorganiques et les rendre ainsi moins biodisponibles.

La procédure est cependant d'application récente et d'autres études sont nécessaires avant de pouvoir l'adapter comme méthode standard dans les bioessais avec algues, ainsi que l'ont proposé Wong et Couture (1986).

### 2.4 L'ATP cellulaire

Compte tenu de ses caractéristiques biochimiques, l'ATP a été considéré comme un paramètre indicateur de la biomasse phytoplanctonique:

- c'est une molécule universelle dans tous les organismes, et elle est associée à la matière vivante car elle présente un temps de survie très court après la mort cellulaire;
- dans des conditions normales, les niveaux d'ATP cellulaire sont relativement constants dans plusieurs cellules et tissus, ce qui indique un mécanisme cellulaire très efficace et sensible pour le contrôle de la concentration d'ATP (Atkinson, 1971, 1977);
- les concentrations d'ATP semblent être proportionnelles à d'autres mesures traditionnelles de biomasse comme le poids sec ou le carbone organique (Holm-Hansen, 1970);
- la procédure du dosage est sensible, relativement simple et très spécifique.

De plus, étant un constituant très dynamique à l'intérieur de la cellule (Chapman et Atkinson, 1977), et par son rôle dans le métabolisme (Atkinson, 1971), l'ATP a été étudié comme un possible indicateur sensible et rapide des répercussions nuisibles causées sur l'organisme par des changements dans les conditions environnementales. Ainsi, Holm-Hansen (1970) signale des diminutions d'ATP de 20 à 50% par rapport au contrôle lorsque les algues ont été cultivées dans un milieu limitant en azote ou en phosphore. Par ailleurs, Pridmore et Hewitt (1983) montrent que l'addition de nitrate ou d'ammonium aux cultures déficientes en azote fait augmenter significativement le niveau d'ATP cellulaire. Brezonik <u>et al</u>. (1975) signalent aussi des augmentations de l'ATP après un ajout de phosphate aux algues cultivées dans un milieu limitant en cet élément. En ce qui concerne la toxicologie, Brezonik <u>et al</u>. (1975) et Kennicutt (1980) montrent des variations rapides de l'ATP cellulaire, lorsque les algues sont exposées à une substance toxique, comme le Hg. Kennicutt (1980) propose son utilisation routinière dans les bioessais pour caractériser l'impact des polluants dans l'environnement aquatique.

#### 2.5 Activité photosynthétique: carbone assimilé

La photosynthèse est un processus métabolique qui comprend deux étapes bien distinctes:

- la phase lumineuse, qui représente le captage de l'énergie lumineuse par les pigments qui absorbent la lumière, et sa transformation en énergie chimique et pouvoir réducteur (ATP et NADPH);
- la phase obscure, durant laquelle les produits riches en énergie formés pendant la première étape (ATP et NADPH) sont utilisés pour réduire des molécules de CO<sub>2</sub> en glucose et d'autres hexoses par la voie métabolique du cycle de Calvin. Cette phase de la photosynthèse ne demande pas la présence de lumière.

Le taux d'assimilation (réduction) du  $CO_2$  durant cette phase obs-Cure peut être évalué par la méthode du carbone radioactif <sup>14</sup>C-CO<sub>2</sub>, introduite pour la première fois par Steemann-Nielsen en 1952. La méthode se révéla d'une importance exceptionnelle dans le domaine de l'écologie aquatique car elle ouvrait les portes aux études de productivité primaire des écosystèmes d'eau marine (Strikland et Parsons, 1968) et d'eau douce (Saunders <u>et al</u>., 1962). Elle a reçu pour cette raison, une attention spéciale de la part des chercheurs dans ce domaine, et beaucoup de travaux ont été réalisés dans le but de résoudre les nombreux problèmes inhérents à la méthode (Peterson, 1980; Colijn et al., 1983).

Dans le domaine de la toxicologie aquatique, elle a été aussi employée comme technique servant à évaluer les effets inhibiteurs causés par une substance toxique sur l'activité photosynthétique des algues. Elle apparaît comme un indicateur sensible à la toxicité (Blinn <u>et al.</u>, 1977; Couture <u>et al.</u>, 1981; Fitzwater <u>et al.</u>, 1983). Les manipulations au laboratoire sont relativement simples. Chapitre III

Développement méthodologique pour la détermination de la CE<sub>A</sub>

#### 3.1 Objectif

Parmi les objectifs de ce travail, définis dans le chapitre I qui sert d'introduction générale, figure une étude de la  $CE_A$  en tant que variable toxicologique appliquée sur une culture d'algue. Pour arriver à réaliser une telle étude, il est indispensable de pouvoir compter sur une procédure méthodologique suffisamment au point pour permettre des déterminations fiables de  $CE_A$ . Dans le cas présent, lors de l'application de la méthodologie décrite dans la littérature (voir sections suivantes), le dosage des nucléotides adénylates, et en particulier celui de l'AMP, s'est avéré un problème de premier ordre dont la solution a demandé un effort expérimental considérable.

Ce chapitre présente, premièrement, un aperçu général de la méthodologie à suivre pour la détermination de la CE<sub>A</sub>, avec quelques considérations extraites de la littérature, deuxièmement, une description des méthodes mises au point et, finalement, les expériences les plus représentatives réalisées pour préciser:

le choix de la méthode d'extraction des nucléotides;

essais réalisés jusqu'à sa résolution.

-

la mise en évidence des problèmes pour doser l'AMP ainsi que les
# 3.2 Matériel et méthode

La détermination des valeurs de CE<sub>A</sub> sur des cultures d'algues au laboratoire comprend trois étapes successives.

# 3.2.1 Préparation des cultures

Les cultures d'algues se développent sous des conditions environnementales contrôlées: température, lumière, pH. Pour se rapprocher des conditions d'acidité des eaux des lacs du Bouclier canadien, dans le but d'une possible application de la  $CE_A$  au milieu naturel, le pH des cultures est maintenu aux alentours de 6-6,3 par ajout automatique de  $CO_2$ .

# 3.2.2 Extraction des nucléotides

La procédure pour extraire les nucléotides doit assurer:

- une mort et lyse cellulaire rapide;
- une extraction complète;
- la déactivation totale et irréversible des enzymes;
- la stabilité à long terme des extraits, c'est-à-dire aucune hydrolyse chimique ou enzymatique.

La littérature présente de nombreuses méthodes d'extraction, dont Karl (1980) fait une revue exhaustive. Bien que quelques-unes de ces méthodes soient utilisées plus souvent que d'autres, le fait qu'elles soient appliquées sur des matériaux et organismes très divers (sols, sédiments, eaux, algues, bactéries, champignons...) avec des rendements d'extraction qui ne sont toujours pas bien définis, en rend le choix "a priori" d'une d'entre elles très difficile. Trois méthodes d'extraction ont été étudiées:

- l'extraction avec le tampon 'TRIS-EDTA' (tris(hydroxyméthyl) aminométhane-éthylènediaminetetraacétate) à 100°C;
- l'extraction avec le PCA (acide perchlorique) à 0°C;
- l'extraction avec le solvant organique DMSO (diméthylsulfoxide) à température ambiante.

Les deux premières sont très souvent utilisées avec les algues. La troisième, dont l'emploi est moins fréquent, est toutefois très facile et rapide d'application. De plus, elle assure une grande stabilité des extraits (Jacubczak et Leclerc, 1980), car le DMSO inhibe très efficacement les enzymes responsables de l'hydrolyse de l'ATP (ATP-ases).

Il est de pratique courante, surtout lorsqu'il s'agit d'échantillons pauvres en matériel biologique, de concentrer les organismes sur un filtre avant d'extraire les nucléotides des cellules. Ainsi, il est possible d'assurer une quantité suffisante de nucléotides dans l'échantillon et d'éviter des problèmes de limite de détection lors de son dosage.

Par contre, quelques auteurs ont signalé que la filtration peut conduire à des diminutions importantes d'ATP (Jakubczak et Leclerc, 1980; Jones et Simon, 1977; Karl, 1979). Karl (1979) suggère, en se basant sur les résultats de Sutcliffe et al. (1976), que le "stress" imposé aux cellules par la filtration provoquerait un réarrangement du "pool" des nucléotides intracellulaires, ce qui expliquerait une diminution de l'ATP, une CE<sub>A</sub> plus basse et aucun changement dans les adénylates totales ([ATP] + [ADP] + [AMP]).

Dans cette perspective, et afin d'obtenir des déterminations fiables de CE<sub>A</sub> permettant de détecter les changements métaboliques causés par l'ajout du Cd, nous avons appliqué les trois méthodes d'extraction sans filtration préalable, c'est-à-dire par une extraction directe.

#### 3.2.3 Dosage des nucléotides

1

P

La technique pour le dosage des nucléotides adénylates est basée sur la réaction bioluminescente du complexe luciférine-luciférase avec 1'ATP:

ATP +  $LH_2$  +  $0_2$   $\longrightarrow$  AMP + PP<sub>1</sub> +  $CO_2$  + P + hv (1)luciférase =  $LH_2 =$ luciférine réduite  $PP_i =$ pyrophosphate inorganique = produit lumière émise hv =

Pour chaque échantillon, les nucléotides sont dosés successivement. Les concentrations en ATP sont obtenues directement, tandis que celles en ADP et AMP sont calculées par différence, suite aux conversions enzymatiques de ces deux nucléotides en ATP, selon les réactions suivantes:

$$ADP + PEP \rightarrow ATP + Pyruvate (2)$$

$$AK$$

$$AMP + ATP \rightarrow 2 ADP (3)$$

- PK : pyruvate kinase
- AK : adénylate kinase ou myokinase
- PEP : phosphoenolpyruvate

Les deux méthodes les plus couramment employées pour quantifier l'ATP en exploitant la réaction de bioluminescence (1) sont:

- L'enregistrement de la hauteur du pic de l'émission lumineuse qui a lieu habituellement à l'intérieur de 0,5 première seconde, après l'injection du complexe luciférine-luciférase;
- ii) l'intégration du flux lumineux pendant une certaine période de temps (10 s).

L'avantage de l'analyse en utilisant la hauteur du pic par rapport à l'intégration sur 10 seconde est de minimiser les interférences provenant

d'autres enzymes ou substrats qui peuvent être présents dans les réactifs utilisés (luciférase, PK, AK) lorsqu'ils ne sont pas purifiés. Par exemple, la présence dans la préparation enzymatique d'autres nucléotides triphosphates (CTP = triphosphate de cytosine, UTP = triphosphate d'urydine) peut induire une émission lumineuse. Comme la cinétique de la réaction lumineuse dépendante de l'ATP est plus rapide, l'enregistrement de la hauteur du pic à l'intérieur de 0.5 seconde diminue l'effet de ces interférences (Holm-Hansen et Karl, 1978). Lorsqu'il faut déterminer les concentrations d'AMP, le problème est particulièrement important car l'AK et le PEP sont stables à la chaleur et peuvent causer une synthèse continue d'ATP quand ils entrent en contact avec la préparation de luciférase non purifiée (Holm-Hansen et Karl, 1978). Donc, en utilisant des réactifs non purifiés, il est fortement recommandé de procéder par l'enregistrement du pic de l'émission lumineuse plutôt que par l'intégration du flux pendant une certaine période de temps.

L'emploi des réactifs purifiés offre le grand avantage d'augmenter la sensibilité de la méthode puisqu'ils devraient être libres de ces sources de contamination. Par contre, étant très coûteux, il semble désavantageux de les utiliser en routine.

L'appareil dont dispose le laboratoire de l'INRS-Eau (1251 luminomètre, LKB Wallac) permet l'enregistrement de la hauteur du pic ainsi que l'intégration du flux lumineux. On a mené des expériences avec les deux types de réactifs en utilisant les deux modes de lecture.

#### 3.3 Matériel et méthodes

# 3.3.1 Préparation des cultures

Les expériences ont été réalisées avec l'algue verte unicellulaire <u>S. capricornutum</u>. Les cultures sont conservées dans le milieu AAP modifié selon Chiaudani et Vighi (1978). La température est contrôlée à 20°C, le pH est maintenu entre 6 et 6,3, et la lumière est constante, avec une intensité de 115  $\mu$ E.m<sup>-2</sup>.sec<sup>-1</sup>. Il y a aussi une agitation continue pour empêcher l'agglomération des algues.

Les expériences ont été réalisées pendant la phase de croissance exponentielle qui est déterminée par dénombrement cellulaire à l'aide d'un compteur de particules (Coulter Counter Model TA).

# 3.3.2 Extraction des nucléotides

A- Protocole pour extraction avec le tampon TRIS-EDTA adapté de Lumac (1980) et Holm-Hansen et Karl (1978)

Les principales étapes sont les suivantes:

 préparer la solution tampon TRIS-EDTA à des concentrations différentes selon le volume d'algues à extraire, afin de tenir compte de l'effet de dilution sur les concentrations finales, causé par l'ajout direct (sans filtration) des algues (tableau 3.1); ajuster le pH du tampon à 7,75 et faire stériliser à l'autoclave pendant 30 minutes;

- ii) dans des tubes à essai stériles, faire chauffer le volume de tampon choisi jusqu'à 100°C. Ajouter les algues et laisser bouillir pendant 3 minutes;
- iii) retirer immédiatement de la chaleur, ramener au volume initial avec de l'eau millipore (il y a perte d'eau par évaporation) et conserver à -20°C jusqu'au moment de l'analyse;
- iv) les solutions étalons se préparent le jour de l'analyse à partir des solutions concentrées de chacun des trois nucléo-tides préalablement préparées et conservées à -20°C. Les dilutions se font avec le tampon TRIS-EDTA (TRIS 45 mM EDTA 3,6 mM) de façon à obtenir une série d'étalons couvrant une gamme particulière de concentrations (200 mM 0,1 mM).

Signalons que l'ajout d'EDTA semble augmenter la stabilité des extraits, probablement parce que l'EDTA déactive les enzymes responsables de la conversion des nucléotides, en complexant des métaux, tel le Mg<sup>2+</sup>, qui agissent comme cofacteurs de ces réactions (Lundin and Thore, 1975).

-27-

Tableau 3.1: Relation entre les différentes concentrations du tampon TRIS-EDTA et les volumes d'algues employés pour tenir compte de l'effet de dilution lorsque l'extraction est directe.

VOLUMES	VOLUMES	[]	[ ]	[ ] FINALE	VOLUME
DE CULTURE	TRIS-EDTA	TRIS	EDTA	TRIS-EDTA	FINAL
0,5 mL	4,5 mL	50 mM	4 mM	45 mM - 3,6 mM	5 mL
1,0 mL	4,0 mL	56,25 mM	4,5 mM	45 mM - 3,6 mM	5 mL
1,5 mL	3,5 mL	64,28 mM	5,14 mM	45 mM - 3,6 mM	5 mL
BLANC* O,5 mL	4,5 mL	50 mM	4 mM	45 mM - 3,6 mM	5 mL

\* EAU MILLIPORE

B- Protocole pour extraction avec le PCA adapté de Larsson et Olsson (1979).

Les principales étapes sont les suivantes:

- préparer une solution d'EDTA (100 mM) et des solutions de PCA à des concentrations différentes selon le volume d'algues à extraire (tableau 3.2). Ramener la température des solutions à 0°C;
- ii) ajouter simultanément les solutions d'EDTA et PCA aux algues et laisser pendant 20 à 30 m  $\sim$  à 0°C dans un bain de glace;
- iii) neutraliser les extraits jusqu'à pH 7,75 avec une solution
  KOH (2,5 M) HEPES (0,2 M). Il y a formation d'un précipité
  de KCl0<sub>4</sub> (perchlorate de potassium) qui est enlevé par centrifugation (12 000 x g, 10 m.) (centrifugeuse SORVAL RC-2B,
  ROTOR HB4); conserver les échantillons à -20°C jusqu'au moment de l'analyse;
- iv) les étalons se préparent le jour de l'analyse à partir des solutions concentrées de chacun des trois nucléotides en suivant exactement le même protocole que pour la culture d'algues (i, ii, iii).

Tableau 3.2: Mode de dilution des cultures dans le mélange PCA-EDTA pour tenir compte de l'effet de dilution lorsque l'extraction est directe.

VOLUMES	VOLUMES	VOLUMES	[ ]	[ ]	[ ]	VOLUME
DE CULTURE	PCA	EDTA	PCA	EDTA	FINALE PCA	FINAL
0,5 mL	1,5 mL	0,2 mL	0,93 M	100 mM	1,4 M	2,2 mL
1,0 mL	1,0 mL	0,2 mL	1,40 M	100 mM	1,4 M	2,2 mL
1,5 mL	0,5 mL	0,2 mL	2,8 M	100 mM	1,4 M	2,2 mL
BLANC* 0,5 mL	1,5 mL	0,2 mL	0,93 M	100 mM	1,4 M	2,2 mL

\* EAU MILLIPORE

C- Protocole pour extraction avec le DMSO adapté de Jakubczak et Leclerc (1980)

Les principales étapes sont les suivantes:

- préparer des solutions de MOPS ("4-morpholinopropane sulphinic acid") à différentes concentrations selon le volume d'algues à extraire (tableau 3.3). Ajuster le pH à 7,75 avec du NaOH (hydroxide de sodjum) et faire stériliser dans l'autoclave pendant 30 min. Ajouter 8,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (sulfate de magnésium) lorsque la solution de MOPS a une concentration 10 mM. Si la solution de MOPS doit être concentrée, il faut réajuster la quantité de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ajoutée;
- ii) ajouter les algues au DMSO. Agiter avec un vortex pendant
   15 secondes, laisser au repos pendant 2 min, ajouter la solution de MOPS et agiter.
   Conserver à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.
- iii) à partir des solutions concentrées de chacun des trois nucléotides, les étalons sont préparés par dilution dans la solution de MOPS (10 mM). Ils suivent par la suite la même procédure que la culture d'algues.

Tableau 3.3: Mode de dilution des cultures dans le mélange DMSO-MOPS pour tenir compte de l'effet de dilution lorsque l'extraction est directe.

VOLUMES	VOLUMES	VOLUMES	[]	[]	[ ]	VOLUME
DE CULTURE	DMSO	MOPS	DMSO	MOPS	FINALE MOPS	FINAL
0,5 mL	4,5 mL	5 mL	14 M	10 mM	5 mM	10 mL
1,0 mL	4,5 mL	4,5 mL	14 M	11,11 mM	5 mM	10 mL
1,5 mL	4,5 mL	4,0 mL	14 M	12,5 mM	5 mM	10 mL
BLANC* 0,5 mL	4,5 mL	5 mL	14 M	10 mM	5 mM	10 mL

\*EAU MILLIPORE

# 3.3.3 Dosage des nucléotides

A- Protocole d'utilisation des réactifs non purifiés

Les composés employés proviennent de "Sigma Chemical Company". Ils sont les suivants:

- extrait de luciférine-luciférase de luciole (FLE-50)
- phosphoenolpyruvate (PEP P = 7002)
- pyruvate kinase (PK, type II P = 1506; 5,6 mg protéine.mL<sup>-1</sup>)
- adénylate kinase (AK, grade V; 7 mg protéine.  $mL^{-1}$ )

Préparation des réactifs (adapté de Falkowski, 1977)

# Réactif A

Cette solution contient:

- 75 mM en phosphate de potassium ( $K_2HPO_4$ ); pH = 7,4
- 15 mM en chlorure de magnesium (Mg Cl<sub>2</sub>)

Pour éviter la formation d'un précipité lorsque la solution est préparée, on doit conserver au réfrigérateur les solutions suivantes: - 10 mL d'une solution 150 mM en  $K_2HPO_4$ ; pH = 7,4

- 10 mL d'une solution 30 mM en MgCl<sub>2</sub>

Le jour de l'analyse, on mélange 5 mL de chacune pour obtenir le réactif A.

# <u>Réactif B</u>

Cette solution contient:

- 75 mM en  $K_2HPO_4$  (pH = 7,4)
- 15 mM en MgCl<sub>2</sub>
- 0,5 mM en PEP
- 20 µg de PK

La solution est préparée en ajoutant le jour de l'analyse les réactifs suivants:

- 6 mL de réactif A
- 1,08 g de PEP
- 0,428 mL de PK

# <u>Réactif</u> <u>C</u>

Cette solution contient:

- 75 mM en  $K_2$ HPO<sub>4</sub>, pH = 7,4
- 15 mM en MgCl<sub>2</sub>
- 0,5 mM en PEP
- 20 µg de PK
- 25 µg de AK

Cette dernière solution est préparée en ajoutant le jour de l'analyse 3 mL de réactif B à 0,214 mL de AK.

Avant d'être utilisées, les suspensions enzymatiques de PK et AK doivent être centrifugées (2000 x g, 3 à 5 m) et les précipités resuspendus dans des volumes équivalents d'une solution 75 mM en  $K_2HPO_4$ , pH = 7,4 (Karl et Homl-Hansen, 1978).

# Luciférine - luciférase

Chaque fiole d'extrait lyophilisé de luciférine-luciférase est reconstituée avec 25 mL d'eau millipore (tel que recommandé par la compagnie Sigma). L'enzyme est gardée toute la nuit en obscurité et à la température de la pièce, pour réduire le niveau d'émission lumineuse intrinsèque à la préparation. Le résidu insoluble qui reste est éliminé par centrifugation (12 000 x g, 10 m) et le surnageant transféré dans une fiole stérilisée prêt à être utilisé.

Puisque les fioles d'extrait de luciférine - luciférase peuvent présenter des différences considérables dans leur activité enzymatique, il est recommandé, lorsqu'il est nécessaire, d'en employer une grande quantité, et de mélanger le contenu de plusieurs fioles avant leur utilisation afin d'uniformiser l'activité des préparations (Holm-Hansen et Karl, 1978).

Après avoir procédé aux dosages, le volume résiduel de la préparation enzymatique peut être gardé à -20°C et réutilisé plus tard. Cependant, il ne faut pas répéter la congélation.

Analyse des échantillons (adapté de Holm-Hansen et Karl, 1978)

Les étapes pour doser l'ATP, l'ATP + ADP et l'ATP + ADP + AMP sont les suivantes:

- i) décongeler les échantillons qui contiennent les nucléotides extraits, et, dans des tubes à essais préalablement identifiés mélanger:
- 200  $\mu$ l d'échantillon + 50  $\mu$ l de réactif A (dosage ATP);
- 200 μL d'échantillon + 50 μl de réactif B (dosage ATP + ADP);
- 200 μl d'échantillon + 50 μL de réactif C (dosage ATP + ADP + AMP);

- ii) bien agiter et laisser incuber 30 min. à la température de la pièce (25°C). L'incubation des échantillons mélangés avec le réactif A n'est pas nécessaire, car il n'y a lieu aucune conversion enzymatique de nucléotide en ATP n'a lieu;
- iii) introduire les tubes pour doser l'ATP + ADP et l'ATP + ADP + AMP dans un bain d'eau bouillante pendant 2 min. pour désactiver la PK. Laisser s'ajuster à la température de la pièce. Les échantillons sont maintenant prêts pour l'analyse;
- iv) pipetter 100 μL de chacun des tubes à essais dans des petites éprouvettes et introduire dans le luminomètre. Injecter 100 μL de la préparation enzymatique luciférine-luciférase (Lumac, 1980) et lire le signal électrique (millivolts) indiqué par l'appareil.

Lorsque les échantillons sont seulement analysés pour doser l'ATP, les 100  $\mu$ l de la préparation luciférine-luciférase sont injectés directement dans 100  $\mu$ l de l'échantillon; donc, il n'est pas nécessaire d'utiliser le réactif A. B- Protocole d'utilisation des réactifs purifiés (Lumac, 1980)

Les composés employés proviennent de la compagnie Lumac. Ils sont les suivants:

- réactif A: 25 mM HEPES 10 mM KCl; pH = 7,75
- réactif B: phosphoenolpyruvate lyophilisé et pyruvate kinase
- réactif C: myokinase (ou adénylate kinase) dans 3.2 M de  $(NH_4)_2 SO_4$
- tampon LUMIT: 25 mM HEPES, pH = 7,75
- LUMIT PM: luciférine-luciférase purifiée lyophilisée.

#### Préparation des réactifs

#### <u>Réactif A</u>

Il est déjà prêt pour utiliser.

# <u>Réactif</u> B

Diluer le contenu de la bouteille marquée réactif B avec 3,4 mL de réactif A. La stabilité du réactif est de 12 h à la température de la pièce (21°C).

# <u>Réactif</u> <u>C</u>

Mélanger 1,7 mL de réactif B reconstitué comme décrit ci-dessus avec 20  $\mu$ L de la bouteille marquée réactif C. La stabilité du réactif est de 3 h à la température de la pièce (21°C).

### Lumit PM

Reconstituer une bouteille marquée LUMIT PM avec 5 mL de tampon LUMIT. La stabilité du réactif est de 12 h à 21°C. La préparation qui n'a pas été utilisée peut être congelée (-20°C) et gardée pendant plusieurs mois. Il ne faut pas répéter la congélation.

Pour la même raison mentionnée dans le paragraphe sur la préparation de la luciférine-luciférase non purifiée, il est préférable de mélanger les contenus de plusieurs bouteilles de LUMIT PM (appartenant au même lot ou provenant de lots différents) lorsqu'il est nécessaire d'utiliser une grande quantité d'enzyme.

#### Analyse des échantillons

Les étapes sont les mêmes que celles décrites dans la section sur l'utilisation des réactifs non purifiés, avec les changements suivants:

- i) mélanger dans les tubes à essais:
- = 100 μL d'échantillon + 100 μL de réactif A: tubes pour ATP;
- 100 µL d'échantillon + 100 µL de réactif B; tubes pour
   ATP+ADP;

100 µL d'échantillon + 100 µL de réactif C: tubes pour
 ATP+ADP+AMP;

ii) laisser incuber pendant 30 min. à la température de la pièce.

Cependant, lors de certaines expériences, on notera que les temps d'incubation furent prolongés à 1h, 2h et 3h;

- iii) la désactivation par la chaleur de la PK n'est pas nécessaire car les réactifs employés sont réputés libres des sources de contamination;
- iv) introduire dans le luminomètre 100 μL de chacun des mélanges échantillon + réactif, lesquels réagiront avec 100 μL de LUMIT PM.
- 3.4 Expériences de mise au point de la méthode. Exemple d'applications, résultats et discussion

# 3.4.1 Expérience no 1

Cette expérience a été réalisée dans le but de comparer trois méthodes d'extraction: TRIS-EDTA, PCA et DMSO.

Afin de vérifier la constance de l'efficacité d'extraction et l'absence de "quenching" en présence de plus grandes quantités d'organismes, la linéarité de la relation entre le volume d'algues employé pour l'extraction et la quantité d'ATP dosé est vérifiée. À cette fin, les dosages et les extractions ont été réalisés sur trois volumes différents de culture selon les techniques déjà décrites.

Les échantillons ont été analysés seulement pour doser l'ATP, avec l'emploi de la préparation enzymatique luciférine-luciférase non purifiée (provenant de "Sigma Chemical Company"), et le signal lumineux a été enregistré en mode pic (Tableaux 3.4 et 3.5)

#### Discussion

Le tampon TRIS-EDTA est l'extractant qui interfère le moins avec le signal lumineux émis lors de la réaction enzymatique de l'ATP avec la luciférase, puisque, parmi les trois droites étalon, c'est celle du TRIS-EDTA qui présente la pente la plus forte (tableau 3.4). Donc, cette méthode serait la plus sensible pour doser de basses concentrations d'ATP; elle est d'ailleurs l'une des plus utilisée dans la littérature (Karl, 1980). Tableau 3.4: Droites de calibration pour l'ATP obtenues à partir des étalons préparés suivant les trois procédures d'extraction TRIS-EDTA, PCA, DMSO.

Droites			
etalons	TRIS-EDTA	PCA	DMSO
n	8	8	8
r <sup>2</sup>	0,9974	0,9696	0,9998
a	-8,83	-2,19	-0,2
b	4,3	0,59	1,0

n = nombre de points

 $r^2$  = coefficient de détermination

a = ordonnée à l'origine

b = pente de la droite

Tableau 3.5: Concentrations totales d'ATP dans les échantillons en femtogrammes d'ATP par cellule selon les différents volumes de culture extraits.

	Т	RIS-EDT	٩		PCA			DMSO	
	volume	s algue:	s (mL)	volume	s algue	s (mL)	volume	es algu	es (mL)
	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5
[ATP]	3,9	5,8	3,9	7,1	15,6	25,8	3,2	7,1	10,4
Cv	0,25	0,07	0,31	0,07	0,06	0,09	0,08	0,09	0,07
fg.cel-	58	43	19	60	66	72	95	105	103

[ATP] = concentration totale d'ATP, exprimées en nM

C<sub>V</sub> = coefficients de variation calculés sur les [ATP], avec n = 6 (chaque volume extrait en triplicata et analysé deux fois)

fg.cell<sup>-1</sup>= femtogrammes d'ATP par cellule

Cependant, l'analyse du contenu en ATP des échantillons montre une mauvaise relation entre la quantité dosée et les volumes d'algues employés (tableau 3.5; figure 3.1). Le fait d'ajouter la culture d'algue froide (20°C) sur la solution de TRIS-EDTA bouillante (100°C) cause probablement une baisse de la température, laquelle doit demeurer élevée pour une bonne désactivation des ATP-ases (Holm-Hansen et Karl, 1978). En conséquence, l'extraction directe avec le TRIS-EDTA est inefficace.

La droite étalon correspondant à l'extraction avec le PCA a la pente la plus faible (tableau 3.4). Elle serait une méthode ayant un pouvoir de résolution plus faible que les deux autres.

La linéarité de la relation ATP dosé vs volume culture d'algues (Tableau 3.5) employé est bonne ( $r^2 = 0,9971$ ), mais la droite ne passe pas par l'origine (a = 3,7), ce qui indique une perte d'ATP, probablement au moment de la formation du précipité de perchlorate de potassium, qui peut entraîner la co- précipitation des molécules d'ATP (Lundin et Thore, 1975). La réplicabilité de l'extraction est assez bonne, avec des C<sub>y</sub> inférieurs à 10%, mais la méthode est longue et compliquée.

Le DMSO se présente comme un bon extractant. La pente de la droite étalon est intermédiaire entre celle du TRIS-EDTA et celle du PCA, avec le meilleur coefficient de détermination r<sup>2</sup> (tableau 3.4).

-44-



Figure 3.1: Relation entre les concentrations d'ATP et les volumes de culture d'algues pour la méthode d'extraction TRIS-EDTA.

La relation concentration d'ATP vs volume d'algues est très bonne, la droite de régression ayant les caractéristiques suivantes:  $r^2 = 0,9977$ . a = -0,3; b = 6,9. La replicabilité de l'extraction est très acceptable (tableau 3.5). Les manipulations exigées au laboratoire sont faciles et de courte durée.

Suite à ces résultats et ces considérations, les méthodes avec le tampon TRIS-EDTA et le PCA ont été rejetées et les expériences ont été poursuivies avec l'extraction au DMSO.

#### 3.4.2 Expérience no 2

Cette expérience représente le premier essai réalisé pour doser les trois nucléotides d'adénine dans des cultures d'algues, en utilisant les réactifs non purifiés. Le signal lumineux a été enregistré en mode pic et intégration.

Puisque l'efficacité de la réaction catalysée par l'adénylate kinase dépend de la concentration totale des trois nucléotides dans l'échantillon (Karl et Holm-Hansen, 1978), on s'est servi d'un mélange des solutions étalon mélange des trois molécules pour déterminer le pourcentage de transformation de l'AMP en ATP. Les proportions d'ATP, d'ADP et d'AMP présentes dans ces solutions ont été choisies en se basant sur le dépliant "Environmental applications" de la compagnie Lumac (1980); elles étaient les suivantes:

-46-

M1: 20 nM ATP + 5 nM ADP + 2 nM AMP M2: 10 nM ATP + 10 nM ADP + 10 nM AMP

Les droites de calibration pour l'ATP, selon les valeurs obtenues en mode pic ou en mode intégration, présentaient les caractéristiques suivantes:

PIC	n = 6	INTÉGRATION	n = 6
	r <sup>2</sup> = 0,9997		r <sup>2</sup> = 0,9993
	a = 0,66		a = -4,75
	b = 1,34		b = 8,48

#### Discussion

Les résultats correspondant aux solutions étalon M1 et M2 montrent la récupération totale de l'ATP présent (tableau 3.6). Dans les échantillons d'algues (Tableau 3.7), la linéarité de la relation ATP dosé vs volume est bonne, bien que le coefficient de détermination soit un peu plus bas que dans l'expérience précédente ( $r^2 = 0,981$ ).

En ce qui concerne les deux autres nucléotides, il n'y a pas eu de résultats positifs. Lors de l'injection de la préparation luciférineluciférase dans les échantillons traités pour doser l'ADP, il s'est produit une émission continue de lumière ce qui a empêché l'enregistrement d'un signal maximal dans le mode pic. Les signaux électriques dans le mode inté-

Solution étalon	Mode d'enregistrement	[ATP]	[ADP]	[AMP]
	PIC	20,2		
M1	cγ	0,02	-	-
MT	INTÉGRATION	20,1	30.8	_
	c <sub>v</sub>	0,03	55,0	_
	PIC	10,1	_	_
MO	cγ	0,04	-	_
ML	INTÉGRATION	10,4	10.2	
	с <sub>v</sub>	0,03	43,2	-

Tableau 3.6: Concentrations en ATP, ADP et AMP dosées dans les solutions étalon M1 et M2.

[] : exprimées en nM

 $C_V$  : coefficient de variation; n = 6 (chaque étalon fait en triplicata et analysé deux fois)

Tableau 3.7:	Concentrations en ATP,	ADP et AMP	dosées dans	les échantillons
	d'algues.			

MODE	[]	ATP ]		[AI	DP]		[/	AMP]	
<b>D'ENREGISTREMENT</b>	<b>Volumes</b>	algue	s(mL)	Volumes	algu	es(mL)	Volumes	algue	s(mL)
	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5
PIC	3,0	6,1	8,5	-	-	-	-	_	-
°۲	0,11	0,01	0,01	-	-	-		-	-
INTÉGRATION	3,7	6,7	9,2		-	-	-	-	-
°۷	0,08	0,01	0,001	-	-	-	-	-	-

 $C_V = coefficient de variation; n = 9 (chaque volume extrait en triplicata et analysé trois fois)$ 

[] = exprimées en nM

gration, lorsque transformés en concentrations d'ATP donnent des valeurs aberrantes (tableau 3.6). Cela révèle un problème de contamination en ATP, soit à cause d'une mauvaise dénaturation de la PK, ou encore à cause d'autres sources difficiles à préciser.

Finalement, il ne s'est produit aucune transformation d'AMP en ATP, même dans les solutions étalon. De plus, l'ajout aux échantillons du réactif C semble avoir un effet de "quenching" sur le signal lumineux, lequel est plus faible que celui obtenu lors du dosage de l'ATP seul.

# 3.4.3 Expérience no 3

Cette expérience a été menée dans les mêmes conditions et avec les mêmes objectifs que la précédente, sauf que, compte tenu des problèmes rencontrés lors du dosage de l'ADP et AMP, les analyses ont été réalisées à l'aide des réactifs purifiés (Tableaux 3.8 et 3.9).

Les proportions des trois nucléotides dans les solutions étalons M1 et M2 étaient aussi les mêmes que lors de l'expérience no 2.

La droite étalon pour le dosage de l'ATP présente les caractéristiques suivantes: Tableau 3.8: Concentrations en ATP, ADP et AMP dosées dans les solutions étalons M1 et M2.

Solution étalon	Mode enregistrement	[ATP]	[ADP]	[AMP]
	PIC	21,3	3,9	
м1	c <sub>v</sub>	0,01	0,05	-
n <b>i</b>	INTÉGRATION	21,1	3,8	_
	с <sub>v</sub>	0,02	0,04	-
	PIC	10,6	8,0	
M2	с <sub>v</sub>	0,01	0,04	-
ΓIZ	INTÉGRATION	10,5	7,7	
	c <sub>v</sub>	0,02	0,05	-

[ ] : exprimés en nM

Cv : coefficient de variation; n = 4 (chaque étalon fait en duplicata et analysé deux fois) Tableau 3.9: Concentrations en ATP, ADP et AMP dosées dans les échantillons d'algues.

MODE	[	ATP ]		[AI	DP]		[/	AMP]	
<b>D'ENREGISTREMENT</b>	Volumes	algu	es(mL)	<b>Volumes</b>	algue	s(mL)	Volumes	algues	s(mL)
	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5
PIC	3,3	6,7	10,3	1,0	1,8	4,0	-	-	-
۲	0,07	0,01	0,01	0,01	0,06	0,06			
INTÉGRATION	3,2	6,6	10,2	1,2	1,9	3,9	-	-	-
с <sub>v</sub>	0,08	0,01	0,02	0,01	0,06	0,05	-	-	-

 $C_V$  = coefficient de variation; n = 6 (chaque volume extrait en triplicata et analysé deux fois)

[] = exprimés en nM

MODE PIC:n = 6MODE INTÉGRATION:n = 6 $r^2 = 0,9999$  $r^2 = 0,9998$ a = -0,47a = -7,56b = 3,4b = 29,06

#### Discussion

La pente de la droite étalon pour l'ATP, obtenue dans cette expérience avec les réactifs purifiés, est pratiquement trois fois plus élevée que celle des droites des deux expériences précédentes. L'emploi de ces réactifs permet d'augmenter la sensibilité de la méthode lors du dosage des nucléotides.

La linéarité de la relation ATP dosé vs volume d'algues est très bonne, avec une droite de régression ( $r^2 = 0,9997$ ; a = -0,2; b = 7) comparable à celle calculée avec les données de l'expérience no 1 correspondant à l'extraction avec le solvant DMSO ( $r^2 = 0,998$ ; a = -0,3; b = 6.9). Cela met en évidence que pour le dosage de l'ATP, on peut employer les réactifs non purifiés ou purifiés.

L'ADP a été dosé autant dans les solutions étalon, avec un pourcentage de récupération d'environ 80% (Tableau 3.8), que dans les échantillons d'algues où la relation [ADP] vs volume d'algues peut être considérée comme bonne ( $r^2 = 0,93$ ; a = -0,7; b = 3). Donc, en éliminant les sources de contamination, le dosage de l'ADP ne pose pas de problèmes. Dans l'expé-

rience no 7, le temps d'incubation des échantillons a été prolongé de 30 min. à 1 h, pour voir si le pourcentage de récupération augmentait à 100%.

Par contre, comme dans l'expérience antérieure, on n'a détecté aucune transformation de l'AMP en ATP, et le réactif C affaiblit aussi le signal lumineux.

3.4.4 Expérience no 4

Les résultats obtenus lors de l'expérience précédente situaient le problème méthodologique pour la détermination des valeurs de CE<sub>A</sub>, au niveau du dosage de l'AMP, et plus concrètement au niveau de l'efficacité des réactions de conversion de cette molécule en ATP. Karl et Holm-Hansen (1978) ont montré que la transformation d'AMP en ATP, via les réactions couplées AK/PK, est dépendante de la concentration de l'ATP. Pour une même concentration d'AMP, plus la quantité d'ATP augmente dans l'échantillon, plus l'efficacité de conversion est grande, jusqu'à atteindre un plateau où elle devient constante.

Pour celà, et compte tenu que, jusqu'à ce moment, aucune transformation détectable ne s'était produite autant dans les solutions étalons que dans les échantillons d'algues et indépendamment de l'emploi d'une sorte ou l'autre de réactifs enzymatiques, il est possible de conclure que la quantité présente d'ATP recommandée par Lumac était insuffisante pour favoriser un bon rendement des réactions. Dans cette perspective, l'expérience présente visait à établir le pourcentage de conversion sur une série de solutions étalon d'AMP de différentes concentrations, lesquelles contenaient un ajout supplémentaire d'ATP équivalent à une concentration finale de 70 nM.

Cette quantité a été choisie en se basant sur les résultats de Karl et Holm Hansen (1978). Le temps d'incubation était de 30 min. De plus, pour tenir compte de l'effet "quencheur" du réactif C, deux séries d'étalons d'ATP ont été analysées avec et sans réactif C. L'expérience a été menée avec les deux types de réactifs et le signal lumineux a été enregistré en mode pic. Les concentrations des différents étalons étaient les suivantes:

étalons ATP: 0, 5, 25 et 50 nM dosés avec le réactif A;
étalons ATP: 0, 5, 25 et 50 nM dosés avec le réactif C;
étalons AMP: 0, 5, 25 et 50 nM dosés avec le réactif C.

#### Discussion

La comparaison des pentes entre les droites de calibration pour l'ATP, obtenues lorsque les étalons sont analysés avec et sans réactif C (tableau 3.10), montre effectivement que celui-ci cause un affaiblissement du signal, affaiblissement qui est moins important lorsque le réactif est purifié.

En conséquence, afin de tenir compte de cet effet, au moment de transformer les mV en concentrations d'AMP, il faut se référer à la droite

Tableau 3.10: Droites étalon d'ATP et AMP construites à partir des étalons dosés avec les réactifs purifiés et non purifiés.

RÉACTIF	S NON PURI	FIÉS	RÉACTIFS PURIFIÉS			
ATP(+ RA)	ATP(+ RC)	AMP(+ RC)	ATP(+ RA)	ATP(+ RC)	AMP(+ RC)	
4	4	4	4	4	4	
0,9997	0,9945	0,8927	0,9998	0,9999	0,9866	
-0,2	0,21	-0,08	0,4	-0,74	-2,21	
0,54	0,12	0,02	4,62	3,9	1,97	
	RÉACTIF ATP(+ RA) 4 0,9997 -0,2 0,54	RÉACTIFS NON PURI ATP(+ RA) ATP(+ RC) 4 4 0,9997 0,9945 -0,2 0,21 0,54 0,12	RÉACTIFS NON PURIFIÉS ATP(+ RA) ATP(+ RC) AMP(+ RC) 4 4 4 0,9997 0,9945 0,8927 -0,2 0,21 -0,08 0,54 0,12 0,02	RÉACTIFS NON PURIFIÉS       RÉACTI         ATP(+ RA) ATP(+ RC) AMP(+ RC)       ATP(+ RA)         4       4       4         0,9997       0,9945       0,8927       0,9998         -0,2       0,21       -0,08       0,4         0,54       0,12       0,02       4,62	RÉACTIFS NON PURIFIÉS       RÉACTIFS PURIFIÉS         ATP(+ RA) ATP(+ RC) AMP(+ RC)       ATP(+ RA) ATP(+ RC)         4       4       4         0,9997       0,9945       0,8927       0,9998       0,9999         -0,2       0,21       -0,08       0,4       -0,74         0,54       0,12       0,02       4,62       3,9	

(+ RA) : dosé avec le réactif A

(+ RC) : dosé avec le réactif C
	SIGNAUX E	N mV	
CONCENTRATIONS ÉTALONS EN nM	étalons ATP (+RC)	étalons AMP	% conversion AMP → ATP
0	0	0	0
5	18,3	9,5	52 ± 10
20	96,3	39,4	$41 \pm 5$
25	194,9	100,2	51 ± 7

Tableau 3.11: Pourcentages de conversion de l'AMP en ATP avec l'emploi des réactifs purifiés

% conversion: rapport entre le signal donné par l'étalon d'AMP (moyenne de trois lectures moins la valeur correspondant à 70nM ATP) et celui qui correspond à l'étalon d'ATP de même concentration, dosé avec le réactif C.  $\pm$ : limites de l'intervalle autour de la moyenne calculés à partir de  $\bar{X} \pm \sigma$ . correspondant aux étalons d'ATP auxquels on a ajouté préalablement le réactif C.

Avec l'emploi des réactifs non purifiés, il ne se produit aucune transformation d'AMP en ATP, la pente de la droite "AMP + RC" étant presque nulle (tableau 3.10). Cela peut être attribuable à deux choses: ou bien la réaction enzymatique n'a pas eu lieu parce que le réactif C n'était pas actif, ou bien les concentrations d'AMP étaient trop basses pour être détectées. Cependant, Karl et Holm-Hansen (1978) accordent à cette procédure une limite de détection pour l'AMP de 1 nM.

Malheureusement, la qualité des réactifs ne peut pas être testée lors de l'expérience. Il nous a semblé qu'il s'agissait de produits délicats dont la qualité peut varier d'une série de production à l'autre, il est donc difficile de comparer les résultats avec ceux d'autres auteurs. Les seuls étalons absolus dans toute la méthodologie sont les étalons des trois nucléotides.

En utilisant les réactifs purifiés pour l'analyse des étalons, la conversion se situe entre 40 et 50%, les intervalles autour des moyennes étant très larges (tableau 3.11). Il faut signaler que le prix extrêmement coûteux de ces réactifs empêche de faire un nombre suffisant de lectures d'un même échantillon pour avoir une bonne précision de l'écart type autour de la moyenne.

# 3.4.5 Expérience no 5

Elle a été réalisée pour déterminer si l'ajout de 70 nM d'ATP dans les étalons d'AMP était trop élevé, c'est-à-dire, si avec un ajout moins concentré, le pourcentage de conversion aurait été le même. Il faut tenir compte que pour les basses concentrations d'AMP (< 1 nM), le signal lumineux qui correspond à l'AMP transformé en ATP peut représenter une très petite partie de l'émission totale de lumière, ce qui peut amener des problèmes de limites de détection (Holm-Hansen et Karl, 1978). Donc, il est souhaitable de faire un ajout d'ATP le moins concentré possible. La nouvelle quantité testée était donc de 35 nM (concentration finale).

Le temps d'incubation des échantillons a été augmenté au-dessus de 30 min., afin de vérifier si le temps était suffisant pour que les réactions enzymatiques atteignent leur équilibre (tableau 3.12). Les concentrations des étalons employées étaient les suivantes:

- ÉTALONS ATP: 0, 50 nM dosés avec le réactif C
- ÉTALONS AMP: 0, 50 nM dosés avec le réactif C

À partir de cette expérience, toutes les autres analyses ont été réalisés avec les réactifs purifiés. Tableau 3.12: Pourcentages de conversion d'AMP en ATP, avec ajout de 35 nM et 70 nM ATP, en fonction de divers temps d'incubation.

TEMPS	% CONVERSION AM	P → ATP
INCUBATION	AJOUT 35 nM	AJOUT 70 nM ATP
30 m	* 6,1 ± 1,7	38,5 ± 1,5
1 h	22,7 ± 0,3	55,9 ± 0,9
2 h	39,7 ± 0	-
3 h	49,4 ± 2	-

 calculés à partir de la moyenne de deux lectures du même échantillon ± la différence avec les pourcentages qui correspondent à ces deux lectures.

- valeurs rejetées.

#### Discussion

Le meilleur pourcentage de conversion a lieu avec l'ajout de 70 mM. En conséquence, celui de 35 nM peut être considéré comme insuffisant pour obtenir un maximum d'efficacité des réactions de transformation.

L'augmentation du temps d'incubation améliore sensiblement les pourcentages, autant lorsque l'ajout est de 35 nM comme de 70 nM. Il semble donc possible qu'un temps de 30 min. soit trop court pour permettre l'accomplissement des réactions.

La raison pour laquelle dans l'expérience précédente, où le temps était de 30 min., les pourcentages de transformation étaient plus élevés que celui obtenu dans cette expérience, pour le même temps, se trouve peut être dans le fait d'avoir utilisé des réactifs provenant de lots différents, donc qui peuvent présenter des caractéristiques enzymatiques qui diffèrent.

### 3.4.6 Expérience no 6

Afin de déterminer la limite supérieure de la quantité d'ATP nécessaire pour une efficacité de conversion optimale, des étalons d'AMP ont été analysés après un ajout d'ATP de 100 nM (concentration finale) et les résultats comparés avec ceux où l'ajout était de 70 nM. Tous les temps d'incubation se sont prolongés jusqu'à 3 h (tableau 3.13). Les concentrations des étalons employés étaient les suivantes: Tableau 3.13: Pourcentages de conversion d'AMP en ATP, avec ajout de 70 nM et 100 nM ATP, en fonction de divers temps d'incubation.

TEMPS	% CONVERSION	AMP → ATP
INCUBATION	AJOUT 70 nM	AJOUT 100 nM ATP
30 m	36,8 ± 1,1	38,7 ± 3,8
1 h	58,7 ± 2,7	58,7 ± 1,6
2 h	71,0 ± 0	62,5 ± 2,2
3 h	69,8 ± 1,8	59,1*

Les intervalles sont calculés comme dans le tableau 3.12.

\* Manque de donnée pour calculer l'intervalle.

ÉTALONS ATP: 0, 50 nM, dosés avec le réactif C
 ÉTALONS AMP: 0, 50 nM, dosés avec la réactif C

#### Discussion

D'après les résultats il est possible de conclure que l'ajout de 70 nM est celui qui favorise une conversion maximale, car avec l'ajout de 100 nM il ne se produit aucun gain dans les pourcentages.

En même temps cela confirme l'effet positif d'augmenter les temps d'incubation des échantillons. En prolongeant celui-là de 30 min. à 2 h, la transformation de l'AMP est augmentée d'environ 20%.

## 3.4.7 Expérience no 7

Étant donné que jusqu'ici les pourcentages de transformation ont été calculés sur des étalons préparés exclusivement avec le nucléotide AMP, dans l'expérience présente la conversion a été testée sur des étalons mélange des trois molécules<sup>1</sup>. Pour avoir une meilleure précision au moment de calculer les concentrations d'ADP, une droite de calibration a été construite à partir des solutions de concentrations connues de ce nucléotide (Tableau 3.14). Les concentrations dans les étalons utilisés étaient les suivantes:

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Situation plus proche à celle présente dans un échantillon obtenu à partir des cellules vivantes.

-	ETALONS	ATP:	0,	5,	20,	50	) nt	1 d	osés	a	vec	le	réactif	A
-	ÉTALONS	ADP:	0,	5,	20,	50	) nM	1 d	osés	a١	vec	le	réactif	B
-	ÉTALONS	ATP:	0,	5,	20,	50	) nt	1 d	osés	a١	/ec	le	réactif	C
-	MÉLANGE	1:	15	nM	ATP	+	10	nM	ADP	+	5	nM	AMP	
-	MÉLANGE	2:	15	nM	ATP	+	0	nM	ADP	+	15	nM	AMP	
-	MÉLANGE	3:	0	nM	ATP	+	10	nM	ADP	+	5	nM	AMP	

Il est recommandé que l'ATP supplémentaire nécessaire pour le dosage de l'AMP soit inclu dans les étalons au moment de leur préparation, au lieu de faire l'ajout juste avant l'analyse avec des volumes très petits d'une solution concentrée en ATP. La première façon de procéder est sans doute plus précise.

Les temps d'incubation des échantillons préparés pour doser l'ADP et l'AMP étaient d'une heure et de deux heures respectivement.

### Discussion

Les résultats montrent que les concentrations réelles dans les étalons mélanges se retrouvent très bien après le dosage (Tableau 3.15).

En particulier, les pourcentages de conversion obtenus pour l'AMP, bien que différents pour chacun des mélanges, peuvent être considérés dans le même ordre de grandeur (autour de 70%) que celui obtenu dans l'expérience précédente (Tableau 3.13, temps 2 h, ajout 70 nM ATP). Il est important de souligner que les valeurs présentées dans le tableau 3.15 ont été calculées

DROITE	ATP (+ RA)	ATP (+RC)	ADP (+RB)
n	4	4	4
r <sup>2</sup>	0,9959	0,9939	0,9937
a	2,43	2,51	3,59
b	3,73	3,15	4,0

Tableau 3.14:	Droites de	e calibr	ation	utilisées	s pour	calculer	les
	concentratio	ons d'ATP,	ADP et	AMP dans	les écha	ntillons.	

-9

-65-

Tableau 3.15: Concentrations d'ATP, ADP et AMP calculées après l'analyse des étalons mélange.

MÉLANGES	[ATP]	[ADP]	[AMP]	% CONVERSION AMP → ATP
M1	16,4 ± 0	10,9 ± 0,6	2,8 ± 10	56 ± 0
M2	<b>16,0</b> ± 0	0	10,1 ± 0,5	67 ± 4
M3	0	12,0 ± 1,5	6,3 ± 2,2	126 ± 44

- % ± : calculés à partir de la moyenne de deux lectures du même échantillon
   ± la différence avec les pourcentages qui correspondent à ces deux lectures;
- []: concentrations exprimées en nM
- ± : représente l'écart de la moyenne autour des deux lectures du même échantillon

uniquement sur deux lectures d'un même échantillon ce qui empêche une meilleure précision dans les résultats. Par exemple, la concentration d'AMP dosée dans M3 et calculée à partir de la moyenne, est plus élevée que celle qui correspond réellement à l'étalon et en conséquence le pourcentage de conversion dépasse même 100%. Cependant, en faisant le calcul à partir de la valeur plus basse, la concentration serait de 4,1 nM et le pourcentage d'environ 80%, ce qui semble plus cohérent.

#### 3.5 Conclusions

Les expériences réalisées afin de mettre au point la méthodologie analytique pour l'extraction et le dosage des nucléotides adénylates nous permettent les observations suivantes:

- Pour doser l'ATP des échantillons, on peut employer la préparation enzymatique luciférine-luciférase purifiée ou non purifiée et utiliser le mode pic d'enregistrement du signal lumineux.
- Le dosage de l'ADP et AMP s'est avéré impossible lorsque les réactifs employés sont du type non purifié.
- Lorsque les sources de contamination sont éliminées par l'emploi de réactifs purifiés, il est équivalent d'enregistrer le signal électrique correspondant à la réaction bioluminescente, soit en mode pic, soit en mode intégration.

- Pour obtenir une bonne efficacité de la réaction de conversion de l'AMP en ATP il est absolument nécessaire de faire un ajout d'ATP (70 nM, concentration finale) sur les échantillons où on veut doser l'AMP, ainsi que de les laisser incuber pendant 2 h. On obtient ainsi un pourcentage de transformation entre 70 et 80%.
- Le signal exprimé en millivolts peut être transformé en concentrations d'AMP en se référant à une droite construite à partir d'étalons d'ATP dosés en présence du réactif C, afin de tenir compte de l'effet quencheur de ce réactif.
- Il est préférable de laisser incuber les échantillons pour doser l'ADP jusqu'à 1 h de temps. Cela assure une récupération de l'ADP initial de 100%.

Chapitre IV

Utilisation d'autres sondes physiologiques

### 4.1 Introduction

Les expériences présentées dans ce chapitre ont été réalisées en complémentarité avec celles discutées au chapitre précédent sur le développement méthodologique de la  $CE_{\Delta}$ .

Étant donné la complexité qu'implique au laboratoire la détermination de la CE<sub>A</sub> et en conséquence son grand désavantage pour être utilisée comme un paramètre de routine, il semblait intéressant d'essayer en même temps d'autres indicateurs de toxicité exigeant moins d'opérations complexes au laboratoire. Ceci permettrait d'avoir des critères comparatifs sur lesquels baser la convenance d'utilisation d'un paramètre ou l'autre selon les besoins du moment.

Comme il a déjà été expliqué dans l'introduction générale, l'approche suivie dans le cadre de ce travail concernait la réalisation d'expériences à court terme (quelques heures, 1 jour) comprenant un suivi de l'effet toxique à des intervalles de temps rapprochées (minutes, heures). Les sondes physiologiques à choisir devaient donc remplir deux conditions de départ: être susceptibles de refléter un effet sur une échelle courte de temps et, pour cette raison, être d'utilisation facile sans de longues et complexes manipulations au laboratoire. Les trois indicateurs choisis étaient:

-70-

- la fluorescence "in vivo" (F) et la fluorescence induite par le DCMU (F<sub>DCMU</sub>);
- l'ATP cellulaire;

l'activité photosynthétique (assimilation de carbone).

Les deux dernières variables ont déjà été utilisées comme indicateurs de toxicité pour des métaux lourds (chapitre II). Par contre, la fluorescence connait de plus rares applications dans ce domaine et, pour cette raison, elle a reçu une attention spéciale.

#### 4.2 Matériel et méthodes

## 4.2.1 Préparation des cultures

Comme dans le chapitre III, il s'agit de cultures de l'algue <u>S</u>. <u>capricornutum</u> cultivées dans le milieu de culture AAP modifié selon Chiaudani et Vighi (1978).

### 4.2.2 Mesures de fluorescence

 i) Prélever 5 mL d'échantillon (culture d'algues) dans un tube à fluorescence et prendre la lecture correspondant à F; ii) Par la suite, ajouter au même échantillon 100  $\mu$ L d'une solution éthanolique de DCMU (5,8 mg/100 mL) (Roy et Legendre, 1979), bien mélanger et prendre la lecture correspondant à F<sub>DCMU</sub>;

Le fluoromètre utilisé était un Turner Designs.

### 4.2.3 <u>Mesures d'ATP cellulaire</u>

L'extraction des nucléotides cellulaires, comme il a déjà été considéré dans le chapitre précédent, peut comporter une filtration préalable des algues, afin de concentrer le matériel biologique sur un filtre, ou bien faire abstraction de cette étape en ajoutant directement les algues dans le milieu extractant.

Au moment d'établir les protocoles à suivre pour la détermination de la CE<sub>A</sub>, la décision de procéder par extraction directe semblait la plus adéquate, d'après la littérature spécialisée. Cependant, dans cette partie du travail, il a été vérifié si, effectivement, la filtration causait une diminution dans le pool d'ATP cellulaire, par comparaison entre les deux façons de procéder.

Les résultats obtenus sont présentés au tableau 4.1.

VOLUMES DE CULTURES FILTRÉES	[ATP]	ATP.cell-1	VOLUMES DE CULTURES (EXTRACTION	[ATP ]	ATP.cell <sup>-1</sup>
	*	**	DIRECTE)	*	**
2 mL	3,4	43 ± 7	0,5 mL	0,8	41 ± 1
c <sub>v</sub>	0,12		¢	0,02	
5 mL	8,2	42 ± 8	1,0 mL	1,6	41 ± 2
C۷	0,19		۲	0,03	
10 mL	18,2	46 ± 2	1,5 mL	2,3	39 ± 2
с <sub>V</sub>	0,04		c <sub>y</sub>	0,04	

Tableau 4.1: Comparaison entre les quantités d'ATP.cell-<sup>1</sup> obtenues lorsque l'extraction est directe ou précédée de filtration.

\* [ATP] : concentration totale d'ATP, exprimée en nM

\*\* ATP.cell<sup>-1</sup>: quantité d'ATP.cell<sup>-1</sup>, exprimée en fg.cell<sup>-1</sup>

: écart autour de la moyenne calculé à partir de  $\bar{X} \pm \sigma$ 

- ± Cv
- : coefficient de variation calculé avec n = 6 (chaque volume
  - extrait par triplicata et analysé deux fois).

Les résultats ne montrent pas de différence dans la quantité d'ATP par cellule calculée pour les algues qui ont subi une filtration et celles qui ont été traitées sans filtration. En conséquence, étant donné que la filtration permet de procéder à l'extraction avec une plus grande quantité de matériel biologique, la méthodologie suivie dans cette section du travail était la suivante:

- i) filtrer l'échantillon sur un filtre millipore (HA, 0,45 µm)
- introduire immédiatement le filtre dans le DMSO (4,5 mL) en évi tant que le filtre sèche (Holm-Hansen et Karl, 1978)
- iii) bien agiter jusqu'à la dissolution du filtre
- iv) compléter le volume jusqu'à 10 mL en ajoutant du tampon MOPS (5,5 mL, 10 mM) et garder l'échantillon à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.

L'ajout du tampon provoque une précipitation du filtre, mais ceci ne cause aucune interférence avec le dosage de l'ATP. Le jour de l'analyse, une fois l'échantillon décongelé, il est centrifugé pendant 10 min. (centrifugeuse clinique). Le surnageant est conservé pour analyse.

- v) préparer les étalons exactement comme les échantillons d'algues
- vi) doser l'ATP comme décrit dans le chapitre III (3.1 analyse des échantillons).

## 4.2.4 Mesures du Cassimilé

L'activité photosynthétique, mesurée au moyen du <sup>14</sup>C assimilé, est exprimée en termes de mg <sup>12</sup>C ass.h<sup>-1</sup>.cell<sup>-1</sup>, et est calculée au moyen du rapport:

$${}^{12}C_{ass} = \frac{{}^{14}C_{ass x} {}^{12}C_{disp}}{{}^{14}C_{disp}} x 1,06$$
  
où: ass = assimilé 1,06 = facteur de correction pour  
disp = disponible 1'assimilation sélective de  
l'isotope (Plumb et Lee, 1979)

La procédure utilisée pour connaître le <sup>14</sup>C<sub>disp</sub>, le <sup>14</sup>C<sub>ass</sub> et le <sup>12</sup>C<sub>disp</sub> est la suivante:

- i) déposer 5 mL de l'échantillon d'algues dans une fiole à scintillation et ajouter 25  $\mu$ L de NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> (bicarbonate de sodium -<sup>14</sup>C, 20,0  $\mu$ Ci dans 1 mL d'eau stérile);
- immédiatement après, transférer 25 μL de cette fiole dans une autre et ajouter 100 μL de phénéthylamine, afin de piéger le <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, ainsi que 5 mL d'aquasol. Ces fioles sont prêtes pour être comptées. Les cpm obtenues (corrigées pour les 5 mL de culture) correspondent au <sup>14</sup>C<sub>disp</sub> pour le matériel biologique présent dans les 5 mL de cultures échantillonnées;

- incuber l'échantillon à partir duquel on a prélevé les 25 µL,
   pendant 20 min., à la même intensité lumineuse que les cultures
   d'algues utilisées pour l'expérience;
- iv) après l'incubation, filtrer les organismes sur un filtre millipore (HA, 0,45  $\mu$ m) préalablement rinçé trois fois avec 2 mL H<sub>2</sub>O millipore. Introduire le filtre dans une fiole à scintillation avec 5 mL d'aquasol. L'échantillon est prêt pour le comptage. Les cpm obtenus correspondent au <sup>14</sup>C<sub>ass</sub> pendant 20 min. Quelques échantillons ont été filtrés sur deux filtres afin de vérifier l'efficacité de la filtration. Les résultats ont montré que les cpm dégagées du deuxième filtre étaient négligeables;
- v) le <sup>12</sup>C<sub>disp</sub> est calculé en utilisant le pH, l'alcalinité et les constantes de dissociation, selon Stumm et Morgan (1981);
- vi) le compteur à scintillation utilisé était un 1215 Rackbeta-Liquid Scintillation Counter (LKB Wallac).
- 4.2.5 Expériences, résultats et discussion

A- Expérience no 1

D'une culture mère de <u>S</u>. <u>capricornutum</u> en phase exponentielle de croissance, cultivée dans les mêmes conditions de pH, température et lumière

décrites dans le chapitre III (matériel et méthodes: 1- préparation des cultures), quatre volumes de 100 mL ont été prélevés dans des erlenmeyers de 250 mL et ensuite placés dans un aquarium à la même température et intensité lumineuse, le pH n'étant pas contrôlé.

Une des cultures a été utilisée comme contrôle (culture 0) et les trois autres ont reçu une solution de  $CdSO_4$  (sulphate de cadmium), les concentrations finales de Cd étant respectivement de 10 µg.L<sup>-1</sup> (culture 1), de 100 µg.L<sup>-1</sup> (culture 2) et de 1000, µg.L<sup>-1</sup> (culture 3). Les erlenmeyers ont été agités régulièrement durant l'incubation.

Après l'ajout du Cd, il y a eu un suivi de la croissance des algues (Tableau 4.2), en faisant un dénombrement cellulaire à trois temps différents (0, 3h, 4h). Par ailleurs, à chaque heure durant 5 h, ainsi qu'au temps zéro (immédiatement après l'ajout), les valeurs de F et F<sub>DCMU</sub> ont été déterminées.

#### Discussion

Les valeurs de F correspondant à la culture 1 présentent très peu de différence par rapport au contrôle (culture 0) (tableau 4.3) et les quelques petites différences au niveau de F<sub>DCMU</sub> ne semblent pas pouvoir être attribuables à un effet du Cd sur le système photosynthétique. Les augmentations avec le temps des deux mesures fluorimétriques dans les deux cultu-

Tableau 4.2: Évolution avec le temps de la croissance d'algues, exprimée en N cell.mL<sup>-1</sup>, dans les cultures exposées à 0, 10, 100 et 1000  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> de Cd.

-	TEMF	PS	TÉ	MOIN	10	μg(	Cd.L-	1 100	)μ	g Cd.L-1	1000	µg Cd.L	-1
	0		<b>4</b> 45	860		445	860	4	445	860	445	860	
	3	h	574	890		585	330	!	526	200	474	120	
	4	h	694	900		670	750	į	570	570	<b>49</b> 8	140	
		_				-			_				_

Tableau 4.3: Variations temporelles des valeurs de F et F<sub>DCMU</sub> avec des cultures de même densité cellulaire initiale (445 860 cell.mL<sup>-1</sup>) exposées à 0, 10, 100 et 1000 μg.L<sup>-1</sup> de Cd.

TEMPS	СULTI (О µg.	JRE O .L- <sup>1</sup> Cd)	CULT وىب 10)	URE 1 .L- <sup>1</sup> Cd)	CULTI بس 100)	JRE 2 g.L- <sup>1</sup> Cd)	CULTUI بىر 1000)	RE 3 g.L- <sup>1</sup> Cd)
	F	F DCMU	F	F <sub>DCMU</sub>	F	FDCMU	F	F <sub>DCMU</sub>
0	11,0	36,0	11,0	36,0	11,0	35,0	11,0	35,0
1 h	11,0	36,0	11,0	37,0	11,0	32,0	15,0	25,0
2 h	11,0	36,0	11,0	39,0	11,0	32,0	18,0	24,0
3 h	12,0	39,0	13,0	43,0	11,0	35,0	20,0	25,0
4 h	16,0	53,0	16,0	50,0	12,0	-	22,0	25,0
5 h	18,0	58,0	18,0	56,0	14,0	43,0	22,0	23,0

- : donnée manquante

res sont probablement un reflet de la croissance cellulaire qui a eu lieu, comme l'indiquent les mesures du dénombrement (tableau 4.2).

L'analyse des changements dans l'incrément de la fluorescence  $\Delta F(F_{DCMU}-F)$  constitue une façon d'étudier la réponse de la population algale face au toxique. Cependant, il est intéressant de signaler que la normalisation des valeurs de  $\Delta F$  (i.e.  $F_{DCMU}-F$ ) en utilisant le rapport  $\Delta F/F_{DCMU}$ permet d'éliminer la variabilité associée aux différentes concentrations cellulaires présentes dans les cultures traitées (Slovacek et Hannan, 1977). Il est possible ainsi d'isoler l'effet toxique causé sur le système photochimique cellulaire exclusivement. De plus, ce rapport permet la comparaison de l'effet causé au niveau cellulaire sur des populations de différentes densités. Vincent (1980) le définit comme l'expression de la "capacité de fluorescence cellulaire".

Dans ce contexte, étant donné que pour la culture 1, les pourcentages de diminution de  $\Delta F/F_{DCMU}$  par rapport à t = 0 calculés à chaque heure, sont nuls ou près de zéro (tableau 4.4), et appuyé par le fait que la moyenne des valeurs n'est pas significativement différente de celle du contrôle (tableau 4.4 et 4.5), il n'est pas possible de conclure qu'il y a eu un effet nuisible sur la photochimie cellulaire, telle que reflétée par ce rapport.

Dans la culture 2, F et  $F_{DCMU}$  montrent des valeurs plus faibles que celles obtenues dans la culture 0. Par ailleurs,  $F_{DCMU}$  diminue légèrement pendant la première et deuxième heure, rejoint la valeur correspondante

-80-

TEMPS	CULTURE	0	CULTURE	1	CULTURE	2	CULTURE	3
	∆F/F <sub>DCMU</sub>	z	∆F/F <sub>DCMU</sub>	%	∆F/F <sub>dcmu</sub>	%	∆F/F <sub>dcmu</sub>	%
0	0,69		0,69		0,69		0,69	
1 h	0,69	0	0,70	0	0,66	4	<b>U,4</b> 0	42
2 h	0,69	0	0,72	0	0,66	4	0,25	64
3 h	0,69	0	0,70	0	0,69	0	0,20	71
4 h	0,70	0	0,68	1	-	-	0,12	83
5 h	0,70	0	0,68	1	0,67	3	0,04	94
_ X:∆F/F <sub>DCMU</sub>	0,69		0,70		0,67		0,28	
Cγ	0,007		0,02		0,02		0,8	

Tableau 4.4: Valeurs de  $\Delta F/F_{DCMU}$  et pourcentage de leur diminution avec le temps par rapport à celles déterminées au temps 0.

- : donnée manquante

 $\Delta F/F_{DCMU} = (F_{DCMU}-F) / F_{DCMU}$ 

Tableau 4.5: Comparaison des moyennes des valeurs △F/F<sub>DCMU</sub> des cultures exposées au Cd avec celle de la culture contrôle, par l'application du test T-Student d'égalité des moyennes (variances inconnues et supposées égales).

MOYENNES TESTÉES	VALEURS DE t	NIVEAU DE SIGNIFICATION $\alpha = 0,05$	NIVEAU DE SIGNIFICATION $\alpha = 0,01$
CULTURE O CULTURE 1	1,52	H <sub>o</sub> acceptée	H <sub>o</sub> acceptée
CULTURE O CULTURE 2	3,03	H <sub>o</sub> rejetée	H <sub>o</sub> rejetée
CULTURE O CULTURE 3	4,32	H <sub>o</sub> rejetée	H <sub>o</sub> rejetée

 $\alpha$  = probabilité de rejeter H<sub>0</sub> ( $\mu_1$  =  $\mu_2$ ) alors qu'elle est vraie,  $\mu_1$  et  $\mu_2$  étant les moyennes des populations.

au temps zéro, au début de la troisième heure, et augmente de façon significative à la cinquième heure. Ce comportement, ainsi que les résultats du dénombrement cellulaire, indiquent que la population a subi une phase d'acclimatation courte, comme le montre la densité cellulaire qui est légèrement décalée dans le temps par rapport à celle de la culture contrôle.

En même temps, le rapport △F/F<sub>DCMU</sub> montre une diminution de 4% après 1 h d'exposition au Cd (tableau 4.4), ces résultats reflètant une légère toxicité du métal sur la photochimie cellulaire.

Dans la culture 3, il y a deux phénomènes qui se produisent en même temps. D'une part, F augmente très visiblement dès le début de l'expérience, et d'autre part, F<sub>DCMU</sub> diminue brusquement pendant la première heure pour rester à peu près constant par la suite (tableau 4.3).

Cet incrément de F ne peut être entièrement attribué à une augmentation de biomasse, comme le montre le dénombrement cellulaire (tableau 4.2) et le fait que F<sub>DCMU</sub> ne change presque pas.

Le site d'action du Cd dans les chloroplastes et la façon dont ce métal interfère avec le bon fonctionnement du système photosynthétique soulèvent des questions complexes qui ne sont pas encore complètement éclaircies, mais il paraît évident que le Cd affecte seulement l'activité du photosystème II (PSII) et non celle du photosystème I (PSI) (Li et Miles, 1975; Hampp <u>et al., 1976; Baszynski et al., 1980</u>). Puisque F<sub>DCMU</sub> est directement relié à l'activité du PSII, la diminution de ce paramètre dans la culture 3 indique une forte inhibition de ce photosystème. Par conséquent, le processus photochimique devient moins efficace et puisque photochimie et fluorescence sont des fonctions complémentaires (Roy et Legendre, 1979), il n'est pas étonnant d'observer une augmentation de F.

Le rapport  $\Delta F/F_{DCMU}$  est diminué de presque 100% après 5 h d'exposition au Cd (tableau 4.4). De plus, l'incrément dans la biomasse pendant les 5 h est presque nul. Ces résultats traduisent de façon évidente l'activité toxique du Cd au niveau cellulaire et de la population.

Les résultats de cette expérience mènent aux conclusions suivantes:

la sonde physiologique fluorescence (F; F<sub>DCMU</sub>) est sensible à une forte concentration de Cd (1000 μg.L<sup>-1</sup>) à l'intérieur d'une période d'exposition variant entre 1 et 5 h;
elle ne reflète aucune toxicité lorsque la concentration de Cd est de 10 μg.L<sup>-1</sup>; avec 100 μg.L<sup>-1</sup>, l'effet n'est pas très marqué entre 1 h et 5 h d'exposition.

Les résultats reportés dans la littérature par des auteurs qui ont travaillé sur la toxicité du Cd avec l'algue <u>S</u>. <u>capricornutum</u> montrent des effets nuisibles de ce métal à des concentrations beaucoup plus basses que

-84-

celles employées dans cette expérience. Par exemple, Chiaudani et Vighi (1978) dans des conditions expérimentales semblables aux nôtres (milieu de culture 1 AAP sans EDTA, même pH initial) trouvent des inhibitions de croissance de 50% à 3,9  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> de Cd. Toutefois, il faut signaler que les temps d'incubation étaient de 96 h et 7 jours et que la quantité d'inoculum était différente (4 x 10<sup>3</sup> cell.mL<sup>-1</sup> au lieu de 445 860 cell.mL<sup>-1</sup>). Comme indiqué par Kleppel et McLaughlin (1980), la densité cellulaire initiale peut avoir une influence importante sur la toxicité. Les deux expériences suivantes ont été réalisées afin de vérifier cette hypothèse.

B- Expériences no 2 et no 3

Réalisées en deux jours consécutifs, toutes les deux ont été menées en suivant la même procédure expérimentale.

À partir de la culture mère employée dans l'expérience no 1, quatre cultures expérimentales ont été préparées, par dilution avec du milieu AAP modifié, chacune contenant une densité cellulaire différente: 5 000 cell.mL<sup>-1</sup> (culture 1), 10 000 cell.mL<sup>-1</sup> (culture 2), 25 000 cell.mL<sup>-1</sup> (culture 3) et 50 000 cell.mL<sup>-1</sup> (culture 4). L'expérience no 3 incluait aussi une cinquième culture comme témoin (culture 0) avec 50 000 cell.mL<sup>-1</sup>.

Chacune des quatre cultures a reçu la même quantité d'une solution de CdSO<sub>4</sub>, les concentrations finales de Cd étant de 1000 µg.L<sup>-1</sup> dans l'expérience no 2 et de 100 µg.L<sup>-1</sup> dans l'expérience no 3. Les erlenmeyers ont été placés dans un aquarium dans les mêmes conditions de température et lumière décrites antérieurement, le pH n'étant pas contrôlé, et ont subi une agitation régulière pendant la durée de l'expérience.

Des mesures de fluorescence, F et F<sub>DCMU</sub>, ont été déterminées tout au long de l'expérience (temps zéro, immédiatement après l'ajout) (Tableaux 4.6, 4.7, 4.8).

Discussion (expérience no 2)

L'analyse des résultats présentés aux tableaux 4.6, 4.7 et 4.8 met en évidence les faits suivants:

F augmente légèrement jusqu'au temps 3 h;

- la diminution la plus marquée de  $F_{DCMU}$  se fait dans les 15 premières minutes; les valeurs de  $F_{DCMU}$  restent à partir de ce moment pratiquement constantes jusqu'à 3 h;
- les variations dans les valeurs de  $\Delta F/F_{DCMU}$  montrent qu'il s'est produit une diminution de la capacité de fluorescence cellulaire, et que cette diminution est plus grande avec le temps;
- les tests d'égalité des moyennes de ΔF/F<sub>DCMU</sub> ne montrent aucune différence significative entre les cultures. De plus, les pourcentages de diminution de ce rapport sont pratiquement les mêmes pour chacune des cultures, sauf dans la culture 1, où ils sont toujours plus faibles.

Tableau 4.6: Variations avec le temps des valeurs de F et  $F_{DCMU}$  des cultures exposées aux mêmex concentrations de Cd (1 000 µg.L<sup>-1</sup>) avec des densités cellulaires initiales différentes.

TEMPS	CULTURE 1	CULTURE 2	CULTURE 3	CULTURE 4
	(5000 cell.mL <sup>-1</sup> )	$(10000 \text{ cell.mL}^{-1})$	(25000 cell.mL <sup>-1</sup> )	(50000 cell.mL <sup>-1</sup> )

	F	FDCMU	F	FDCMU	F	F <sub>DCMU</sub>	F	F <sub>DCMU</sub>
0	0,22	0,54	0,30	0,80	0,80	2,20	1,50	4,30
15 m	0,15	0,30	0,30	0,56	0,80	1,80	1,50	3,20
30 m	0,16	0,32	0,30	-	0,80	1,60	1,50	2,60
1 h	0,16	0,30	0,30	0,53	0,86	1,50	1,60	2,60
1h40m	0,20	0,32	0,38	0,60	1,00	1,60	2,00	3,20
2h30m	0,20	0,37	0,42	0,60	1,00	1,60	2,00	3,20
3 h	0,20	0,32	0,42	0,60	1,10	1,60	2,00	2,90
20 h	0,12	0,14	0,28	0,30	0,73	0,76	1,40	1,40

- : donnée manquante

TEMPS			CULTURE 0		CULTURE 1		CULTURE 3		CULTURE 4	
		PS	(5000 cell.mL <sup>-1</sup> )(10000 cell.mL <sup>-1</sup> )(25000 cell.mL <sup>-1</sup> )(50000 cell.mL <sup>-1</sup> )							
			∆F/F <sub>DCMU</sub>	%	∆F/F <sub>DCMU</sub>	%	∆F/F <sub>DCMU</sub>	%	∆F/F <sub>DCMU</sub>	%
0			0,59		0,63		0,64		0,65	
15	m		0,50	15	0,46	27	0,55	14	0,53	18
30	m		0,50	15	-	-	0,50	22	0,42	35
1	h		U <b>,</b> 47	20	0,43	32	0,43	33	0,38	42
1	h	40m	0,38	36	0,36	43	0,38	40	0,38	42
2	h	30m	0,46	22	0,30	52	0,38	40	0,38	42
3	h		0,38	36	0,30	52	0,31	52	0,31	52
20	h		0,14	76	0,07	89	0,04	87	0,00	100
<u>x</u> :	۵ł	F/F <sub>DCM</sub>	0,47		0,41		0,46		0,44	
cγ			0,15		0,32		0,29		0,27	

\* la moyenne est calculée avec les 7 premières valeurs, c'est-à-dire jusqu'au temps 3 h

Tableau 4.7: Valeurs de  $\Delta F/F_{DCMU}$  et pourcentages de leur diminution avec le temps par rapport à celles déterminées au temps zéro.

Tableau 4.8: Comparaison des moyennes des valeurs de ΔF/F<sub>DCMU</sub> des cultures exposées à la même concentration de Cd (1000 μg.L<sup>-1</sup>) mais avec des densités cellulaires initiales différentes. Application du test T-Student d'égalité des moyennes (variances inconnues et supposées égales).

MOYENNES TESTÉES	VALEURS DE t	NIVEAU DE SIGNIFICATION $\alpha = 0,05$
CULTURE 1 CULTURE 2	1,076	H <sub>o</sub> acceptée
CULTURE 1 CULTURE 3	0,1948	H <sub>o</sub> acceptée
CULTURE 1 CULTURE 4	0,5792	H <sub>o</sub> acceptée
CULTURE 2 CULTURE 3	0,7547	H <sub>o</sub> acceptée
CULTURE 2 CULTURE 4	0,4498	H <sub>o</sub> acceptée
CULTURE 3 CULTURE 4	0,3257	H <sub>o</sub> acceptée

 $\alpha$  = probabilité de rejeter H<sub>0</sub> ( $\mu_1$  =  $\mu_2$ ) alors qu'elle est vraie.

Ce dernier phénomène pourrait être non significatif si on admet que les valeurs de F et de  $F_{DCMU}$  (temps zéro) correspondant à une concentration de 5000 cell.mL<sup>-1</sup> sont près de la limite de détection du fluorimètre (= 2000 - 2500 cell.mL<sup>-1</sup>).

Dans les quatres cultures, ces pourcentages sont légèrement inférieurs à ceux de la culture 3 de l'expérience précédente; par exemple, à 3 h, ils sont respectivement de 52 et 71%, la concentration de Cd utilisée étant la même dans les deux cas. Ces différences pourraient s'expliquer par les faits suivants:

- les expériences ne sont pas réalisées exactement dans les mêmes conditions; dans l'expérience présente, les algues subissaient une dilution avec le milieu de culture, alors que dans l'expérience no 1 elles étaient simplement prélevées du ballon contenant la culture mère;
- les cellules provenant de la culture mère étaient, dans cette expérience plus âgées d'un jour que dans l'expérience no 1;
  - après 20 h, F et F<sub>DCMU</sub> sont presque égales à toutes les concentrations, ce qui donne des pourcentages d'inhibition de la capacité de fluorescence cellulaire d'environ 100% (comme dans la culture 3 de l'expérience no 1). Cependant, les deux mesures ont diminué par rapport à celles prises pendant les trois premières heures. Cela indique qu'il y a eu probablement réduction de la population

viable, si on tient compte qu'il existe une très bonne relation de proportionnalité entre le dénombrement et les valeurs de F et  $F_{DCMH}$ (temps zéro) (figure 4.1).

Discussion (expérience no 3)

Comme dans l'expérience no 1, l'effet causé par une concentration de 100 g.L- de Cd ne se reflète pas très fortement sur la fluorescence. Les changements de  $F_{DCMU}$  pendant les deux heures de contact avec le Cd restent très faibles (tableau 4.9).

Cependant, jusqu'au temps 2 h, les cultures expérimentales réagissent différemment du contrôle:

le rapport F/F<sub>DCMU</sub> est diminué en relation avec les valeurs déterminées au temps zéro, dans toutes les cultures exposées au Cd. En moyenne, cette diminution est d'environ 5% (tableau 4.10), un résultat qui est du même ordre de grandeur que celui calculé dans l'expérience no 1, pour la culture 2 (100 g.L<sup>-</sup> de Cd), lorsque le temps d'exposition était aussi de 2 h. Cette concordance dans les résultats se produit malgré que les densités cellulaires initiales des cultures utilisées dans les deux expériences soient nettement différentes (expérience no 1, culture 2: 445 860 cell.mL<sup>-</sup> vs expérience no 3, cultures 1, 2, 3 et 4: 5 000, 10 000, 25 000 et 50 000 cell.mL<sup>-</sup> respectivement);

-91-



Figure 4.1: Relation entre F et F<sub>DCMU</sub> au temps zéro et les densités cellulaires des cultures: expérience no 2.
Tableau 4.9: Variations temporelles de valeurs de F et de  $F_{DCMU}$ , des cultures exposées à la même concentration de Cd (100 µg.L<sup>-</sup>), avec des densités cellulaires initiales différentes.

TEMPS	CULTURE 0 (50 000 cell.mL- )		CULTURE 1 (5 000 cell.mL- )		CULTURE 2 (10 000 cell.mL- )		CULTURE 3 (25 000 cell.mL <sup>-</sup> )		CULTURE 4 (50 000 cell.mL <sup>-</sup> )	
	F	F <sub>DCMU</sub>	F	F <sub>DCMU</sub>	F	F <sub>DCMU</sub>	F	F <sub>DCMU</sub>	F	FDCMU
0	1,50	3,50	0,14	0,36	0,28	0,63	0,73	1,60	1,40	3,20
15 m	1,50	3,50	0,14	0,33	0,27	0,62	0,72	1,50	1,50	3,10
30 m	1,50	3,60	0,14	0,30	0,27	0,58	0,72	1,50	1,50	3,00
1 h	1,50	3,70	0,11	0,30	0,26	0,58	0,70	1,50	1,40	3,00
2 h	1.50	4,20	0,16	0,33	0,29	0,64	0,67	1,50	1,40	3,00
18h30m	4,40	13,0	0,16	0,48	0,34	0,90	0,94	2,40	2,00	5,30
24h30m	6,00	18,0	0,19	0,57	0,39	1,00	1,00	2,70	2,40	6,40

TEMPS		\$	CULTURE 0		CULTURE 1		CULTURE 2		CULTURE 3		CULTURE 4	
			F/F <sub>DCMU</sub>	%	F/F <sub>DCMU</sub>	%	F/F <sub>DCMU</sub>	%	F/F <sub>DCMU</sub>	%	F/F <sub>DCM</sub>	U <sup>%</sup>
0			0,57		0,61		0,56		0,54		0,56	
15	m		0,57	0	0,58	5	0,56	0	0,52	4	0,52	7
30	m		0,58	0	0,53	13	0,53	5	0,52	4	0,50	11
1	h		0,59	0	0,58	5	.0,55	2	0,53	2	0,53	5
2	h	30m	0,64	0	0,52	15	0,55	2	0,55	0	0,53	5
18	h	30m	0,66	0	0,66	0	0,62	0	0,61	0	0,62	0
24	h	30m	0,66	0	0,66	0	0,61	0	0,63	0	0,63	0
	: 1	F/Fpg	.,0,59		0,56		0,55		0,53		0,53	
c,	V	DCI	0,05		0,07		0,02		0,03		0,04	

Tableau 4.10: Valeurs de  $F/F_{DCMU}$  et pourcentages de leur diminution avec le temps par rapport à celles déterminées au temps zéro.

\* moyennes calculées avec le 5 premières valeurs (temps 2 h)

les moyennes des valeurs de  $F/F_{DCMU}$  sont toutes significativement différentes du contrôle, sauf pour la culture 1 (tableau 4.11).

Les déterminations de F et  $F_{DCMU}$  à 18h 30min. et 24h 30min. montrent un comportement nouveau par rapport à celui présenté pendant les deux premières heures, car les deux valeurs augmentent dans toutes les cultures. Il y a eu, en conséquence, une reprise de la capacité de fluorescence cellulaire, après une phase d'acclimatation. Effectivement, les valeurs de F/F<sub>DCMU</sub>à 18 h 30 min. et 24 h 30 min. sont même plus élevées qu'au temps zéro. Il est possible de penser que les cellules avaient déjà leur capacité de fluorescence légèrement diminuée au début de l'expérience, du fait que la culture utilisée commençait la phase stationnaire de croissance.

De plus, il est intéressant de remarquer qu'autant les valeurs de F comme celles de F<sub>DCMU</sub> gardent, comme au temps zéro, une bonne relation de proportionnalité avec les densités cellulaires initiales (figures 4.2, 4.3 et 4.4). Cela semble indiquer que toutes les cultures ont subi une phase d'acclimatation de même durée.

En conséquence, à la vue des résultats des expérience no 1, 2 et 3, il est possible de conclure que:

aucun effet relié à la densité cellulaire ne s'est manifesté sur la toxicité au niveau cellulaire (capacité de fluorescence cellulaire) lorsque la concentration de métal utilisée est de 1000 μg.L<sup>-1</sup> et de 100 μg.L<sup>-</sup>;

-95-

Tableau 4.11: Comparaison des moyennes des valeurs de ΔF/F<sub>DCMU</sub> des cultures exposées à la même concentration de Cd (100 μg.L-<sup>1</sup>) avec des densités cellulaires initiales différentes. Test T-Student d'égalité des moyennes (variances inconnues mais supposées égales).

MOYENNES TESTÉES	VALEURS DE t	NIVEAU DE SIGNIFICATION $\alpha = 0,05$	NIVEAU DE SIGNIFICATION $\alpha = 0,01$
CULTURE O CULTURE 1	1,4033	H <sub>o</sub> acceptée	H <sub>o</sub> acceptée
CULTURE O CULTURE 2	2,8233	H <sub>o</sub> rejetée	H <sub>o</sub> acceptée
CULTURE O CULTURE 3	4,1974	H <sub>o</sub> rejetée	H <sub>o</sub> rejetée
CULTURE O CULTURE 4	3,6882	H <sub>o</sub> rejetée	H <sub>o</sub> rejetée
CULTURE 1 CULTURE 2	0,5646	H <sub>o</sub> acceptée	H <sub>o</sub> acceptée
CULTURE 1 CULTURE 3	1,6760	H <sub>O</sub> acceptée	H <sub>o</sub> acceptée
CULTURE 1 CULTURE 4	1,5399	H <sub>o</sub> acceptée	H <sub>o</sub> acceptée
CULTURE 2 CULTURE 3	2,5095	H <sub>o</sub> rejetée	H <sub>o</sub> acceptée
CULTURE 2 CULTURE 4	1,7966	H <sub>o</sub> acceptée	H <sub>o</sub> acceptée
CULTURE 3 CULTURE 4	0,0000	H <sub>o</sub> acceptée	H <sub>o</sub> acceptée



Figure 4.2: Relation entre F et F<sub>DCMU</sub> au temps zéro et les densités cellulaires des cultures: expérience no 3.



Figure 4.3: Relation de proportionnalité entre les valeurs de F aux temps 18h30m et 24h30m et les densités cellulaires initiales: expérience no 3.



Figure 4.4: Relation de proportionnalité entre les valeurs de F<sub>DCMU</sub> aux temps 18h30m et 24h30m et les densités cellulaires initiales des cultures 1, 2, 3 et 4: expérience no 3.

cependant, une concentration de 100 μg.L<sup>-1</sup>, lorsque les densités cellulaires sont faibles (cultures de l'expérience no 3), induit des phases d'acclimatation plus longues que sur une culture plus concentrée (culture 2, de l'expérience no 1). Cela signifie, à un degré de toxicité sublétale, un effet différent selon que l'on considère le niveau d'organisation cellulaire ou le niveau d'organisation population.

Il est possible aussi que l'état physiologique des cultures de l'expérience no 3, lesquelles se trouvaient à la fin de la phase exponentielle de croissance, ait favorisé une phase d'acclimatation plus longue.

C- Expérience no 4

Cette expérience avait pour but de comparer la sensibilité des trois sondes physiologiques choisies: fluorescence, ATP cellulaire et assimilation du C, lorsqu'une culture de <u>S</u>. <u>capricornutum</u> était exposée à une concentration donnée de Cd.

Les résultats des expériences précédentes ne montrent pas des effets toxiques très prononcés liés à la fluorescence lorsque la concentration de Cd utilisée était de 100  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>. Afin d'assurer une réponse avec les trois paramètres, la dose toxique a été augmentée à 300  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>. De plus, signalons qu'au moment de commencer l'expérience, la culture se trouvait au début de la phase exponentielle de croissance. La procédure suivie a été la suivante:

La culture cultivée sous des conditions de température, lumière et pH contrôlées (20°C, 115  $\mu$ E.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et pH 6,3) était divisée en deux volumes égaux (1,5L), au moment où la phase exponentielle de croissance débutait. Un des volumes a été utilisé comme culture contrôle, et l'autre comme culture expérimentale (i.e. ajout de 300  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> de Cd) et tous les deux ont été replacés dans l'aquarium dans les mêmes conditions de départ (T°, lumière, pH et agitation continue).

À chaque heure, pendant huit heures (temps zéro avant l'ajout du Cd) ainsi qu'à 24 heures, on a effectué des mesures de fluorescence (F et  $F_{DCMU}$ ), d'extraction de l'ATP cellulaire, de fixation du <sup>14</sup>C et de dénombrement cellulaire.

#### Discussion (fluorescence et dénombrement)

L'ajout du Cd est mis en évidence à deux niveaux: premièrement, au niveau cellulaire, la capacité de fluorescence est diminuée de 15% pendant les huit premières heures, pour atteindre 23% après 1 jour d'exposition (Tableau 4.12). Cependant, bien que le pourcentage d'inhibition des valeurs de  $\Delta F/F_{DCMH}$  est plus grand lorsque la dose toxique est plus forte:

- 4% avec 100  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> (expériences 1 et 3);

- 15% avec 300 µg.L<sup>-1</sup> (expérience 4);

- 100% avec 1000  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> (expériences 1 et 2);

Tableau 4.12: Variation avec le temps des valeurs de F et  $F_{DCMU}$  dans la culture contrôle et celle exposée à 300 µg.L<sup>-1</sup> de Cd. Valeurs de  $\Delta F/F_{DCMU}$  et pourcentages de leur diminution avec le temps par rapport à celles déterminées au temps zéro.

TEMPS		CULTURE CONTRÔLE			CULTURE EXPÉRIMENTALE					
		F	F <sub>DCMU</sub>	∆F/F <sub>DCMU</sub>	2/0	F	F <sub>DCMU</sub>	∆F/F <sub>DCMU</sub>	%	
0		5,20	15,0	0,65		5,20	15,0	0,65		
1	h	6,00	16,0	0,63	3	5,90	14,0	0,58	10	
2	h	6,10	17,0	0,64	2	5,90	13,0	0,55	15	
3	h	6,30	18,0	0,65	0	5,80	13,0	0,55	15	
4	h	6,90	19,0	0,64	2	5,90	13,0	0,55	15	
5	h	7,00	20,0	0,65	Û	5,90	13,0	0,55	15	
6	h	7,40	21,0	0,65	0	5,80	13,0	0,55	15	
7	h	7,70	23,0	0,67	0	5,80	13,0	0,55	15	
8	h	8,00	24,0	0,67	0	5,90	13,0	0,55	15	
24	h	23,0	64,0	0,64	2	6,50	13,0	0,50	23	
x: ΔF/I	Босми			0,65				0,56		
cv	DCHU			0,02				0,07		

\* Le test t-Student d'égalité des moyennes, appliqué sur les moyennes des valeurs de  $\Delta F/F_{DCMU}$  (n = 10), donne des moyennes significativement différentes aux niveaux de signification  $\alpha$  = 0,05 et  $\alpha$  = 0,01. cette variable semble tout de même une sonde peu sensible à l'intoxication si on tient compte que les pourcentages ne sont pas très élevés (sauf pour 1000  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> de Cd) en relation avec les fortes concentrations de Cd utilisées. Ceci suggère (pour des cellules intactes) que la quantité de cadmium pouvant atteindre l'intérieur du chloroplaste est très faible.

Deuxièmement, au niveau population, la croissance est fortement affectée. L'incrément de la biomasse avec le temps est presque nul par rapport à celui de la culture contrôle (tableau 4.13)

## Discussion (ATP cellulaire)

Dans le but de déterminer si le pool d'ATP cellulaire se voit modifié, par rapport à celui d'un contrôle, comme conséquence de la présence d'une substance toxique dans le milieu de culture, il est nécessaire de référer la concentration totale d'ATP à une mesure de la biomasse présente, sinon les résultats peuvent conduire à plusieurs interprétations. Par exemple, une diminution dans la concentration totale d'ATP peut être expliquée par une diminution dans le pool intracellulaire, mais aussi par une baisse de la population viable.

Dans les expériences qu'on retrouve dans la littérature sur l'étude des variations de l'ATP cellulaire causées par une situation de stress environnemental (manque d'un élément nutritif, présence d'une substance

TEMPS	CULTURE CONT	RÔLE	CULTURE EXPÉRIMENTALE		
	$-$ X cell.mL <sup>-1</sup> ± $\sigma$	cv	$-$ X cell.mL <sup>-1</sup> ± $\sigma$	c <sub>v</sub>	
0	178 800 ± 6080	0,03	178 800 ± 6080	0,03	
1 h	249 080 ± 2120	0,009	224 960 ± 9440	0,04	
2 h	205 160 ± 1520	0,007	175 680 ± 720	0,004	
3 h	204 520 ± 1360	0,007	172 480 ± 1640	0,01	
4 h	235 520 ± 1960	0,008	182 560 ± 3240	0,02	
5 h	266 280 ± 5280	0,02	182 040 ± 2480	0,01	
6 h	289 720 ± 3680	0,01	185 920 ± 2320	0,01	
7 h	<b>299 480 ± 4680</b>	0,02	193 160 ± 920	0,005	
8 h	312 320 ± 5880	0,02	207 600 ± 520	0,003	
24 h	607 840 ± 24240	0,04	238 000 ± 1680	0,007	

Tableau 4.13: Évolution de la croissance avec le temps dans la culture contrôle et celle exposée à 300  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> de Cd.

X cell.mL<sup>-1</sup>  $\pm \sigma$ : calculées sur trois comptages différents du même échantillon toxique, variation de pH), les résultats sont présentés de façon assez hétérogène:

- pourcentage d'ATP par rapport à un contrôle (Kennicutt, 1980;
  Pridmore et Hewitt, 1983);
- pourcentage d'ATP en fonction du carbone organique cellulaire
  (Riemann et Wium-Andersen, 1981; Holm-Hansen, 1970);
- concentration d'ATP dans l'échantillon, quantité d'ATP par unité de chlorophylle-a (Brezonick et al., 1975);
- concentration d'ATP par milligrammes de protéine (Schimz et Holzer, 1979).

Ceci rend la comparaison des résultats avec ceux d'autres auteurs très difficile, particulièrement au niveau quantitatif, si en plus on tient compte de la variabilité des espèces utilisées et du fait que les concentrations cellulaires sont rarement indiquées.

Dans cette expérience, comme dans les précédentes où l'ATP a été extrait, la concentration totale d'ATP est divisée par le nombre total de cellules. Donc, les résultats présentés sont assujettis à deux sources d'erreur, celle associée à la détermination des concentrations d'ATP et celle liée au comptage cellulaire. Les résultats concernant l'extraction de l'ATP, présentés dans le tableau 4.14, montrent que la replicabilité de la méthode est bonne, avec des  $C_V$  toujours inférieurs à 10%, sauf pour les extractions correspondant aux temps 5h, 6h et 7h de la culture contrôle. Cette situation est difficilement explicable car les manipulations expérimentales ont toujours été faites de façon rigoureuse.

Les comptes cellulaires sont présentés dans le tableau 4.13. La brièveté des intervalles de temps ainsi que le besoin de réaliser les autres mesures soit ATP, <sup>14</sup>C et fluorescence empêchait la préparation de replicats, cependant chaque échantillon a été compté trois fois et les C<sub>y</sub> correspondants ne dépassent pas 3%.

En même temps, les comptages réalisés sur la culture contrôle semblent en accord avec les résultats de  $F_{DCMU}$ , étant donné que la droite de régression associée à ces deux variables présente un r<sup>2</sup> = 0,9604.

Il reste, néanmoins, que les comptes obtenus pour le temps 1 h, autant pour la culture contrôle que pour la culture expérimentale, sont trop élevés en relation avec le précédent (temps zéro) et ceux qui suivent (temps 2h, 3h). De plus, les résultats correspondant aux concentrations totales d'ATP pour le temps 1 h ne confirment pas cette brusque augmentation de biomasse (Tableau 4.14). Pour ces raisons, on a considéré ces valeurs comme erronées (présence probable de saletés ou de bulles d'air dans l'appareil) et en conséquence on ne tient pas compte des résultats d'ATP-cell-<sup>1</sup> pour le

TEMPS	CUL	TURE CO	NTRÔLE	CULTURE EXPÉRIMENTALE		
	[ATP]	cv	ATP.cell-1	[ATP]	с <sub>v</sub>	ATP.cell-
0	16,8 ± 1,0	0,05	52,0	16,8 ± 1,0	0,05	52,0
1 h	17,3 ± 0,6	0,03	-	17,6 ± 0,5	0,03	-
2 h	17,6 ± 1,2	0,07	47,0	18,2 ± 0,7	0,03	57,0
3 h	$19,2 \pm 0,8$	0,04	5,1,0	18,5 ± 0,5	0,02	59,0
4 h	$20,9 \pm 0,6$	0,03	49,0	17,9 ± 0,6	0,03	54,0
5 h	24,3 ± 2,9	0,12	50,0	18,7 ± 1,1	0,06	56,0
6 h	22,6 ± 4,3	0,19	42,0	19,1 ± 0,9	0,05	56,0
7 h	24,6 ± 3,6	0,14	45,0	18,6 ± 0,7	0,03	53,0
8 h	22,0 ± 0,8	0,04	38,0	19,3 ± 0,3	0,02	51,0
24 h	46,5 ± 2,2	0,05	42,0	23,7 ± 1,3	0,05	54,0
: ATP.ce	1]-1		46,2			54,6
V			0,10			0,04

Tableau 4.14: Variation avec le temps de la quantité d'ATP-cell-<sup>1</sup> dans la culture contrôle et celle exposée à 300  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> de Cd.

[ATP]: concentration moyenne d'ATP totale dans l'échantillon, en nM, calculée sur trois réplicats, chacun analysé deux fois (n = 6)

ATP.cell<sup>-1</sup>: exprimée en fg.cell<sup>-1</sup>

- : voir explication dans le texte

temps 1h, lors de l'analyse des résultats. Les figures 4.5 et 4.6 montrent l'évolution avec le temps du pool d'ATP intracellulaire dans les deux cultures. On peut constater les faits suivants:

- les valeurs dans la culture expérimentale se maintiennent toujours au dessus de celles de la culture contrôle. Les deux moyennes (Tableau 4.14) sont significativement différentes au niveau  $\alpha$  = 0,01. Cependant, l'allure des deux figures se ressemblent et il paraît exister un certain parallélisme dans le temps;
- pour la culture expérimentale il ne se produit aucune diminution de l'ATP.cell<sup>-1</sup> avec le temps. On remarque plutôt une constance autour de la moyenne ( $C_V = 4\%$ ) avec des fluctuations explicables aux erreurs associées aux mesures;

d'après les résultats il est possible de conclure que dans la culture expérimentale il n'y a pas eu mort cellulaire. Bien que le compteur de particules ne permet pas de différencier entre cellules viables et cellules mortes ou débris cellulaires (Rehnberg <u>et al</u>., 1982; Butterwick <u>et al</u>., 1982), une réduction dans la population viable aurait causé une diminution dans la concentration d'ATP dans l'échantillon, étant donné le court temps de survie de cette molécule;



Figure 4.5: Variations avec le temps du pool d'ATP.cell-<sup>1</sup> dans la culture expérimentale.



Figure 4.6: Variations avec le temps du pool d'ATP.cell-<sup>1</sup> dans la culture contrôle.

les valeurs pour la culture contrôle fluctuent plus que pour la culture expérimentale ( $C_V = 10\%$ ). Ces fluctuations peuvent peutêtre être associées au fait que les cellules se divisent continuellement (la culture n'est pas synchronisée) et l'ATP est sans doute une molécule qui participe dans le processus de mitose cellulaire. Cependant, on n'a pas trouvé de références qui puissent appuyer cette hypothèse. Les extractions dans des intervalles de temps plus courts pourraient contribuer à éclairer ce problème.

Finalement, il reste à savoir pourquoi le pool d'ATP.cell<sup>-1</sup> de la culture expérimentale se maintient toujours supérieur à celui des cellules de la culture contrôle. Il y a deux possibilités:

- (i) supposer que la présence du Cd aurait causé une augmentation du pool. Cette hypothèse est cependant difficile à soutenir, car d'après la théorie sur la régulation du métabolisme cellulaire (Atkinson, 1977), la cellule a tendance à maintenir son pool d'ATP constant. Lorsque le stress environnemental est suffisamment fort pour empêcher le maintien de l'homéostase cellulaire, le pool diminue;
- (ii) la différence est due à la variabilité inter-cultures (ballons différents, contrôleurs de pH différents, etc.). Dans ce cas, le pool est gardé constant pendant le temps d'exposition au toxique.

Cette hypothèse semble la plus plausible, bien que d'autres expériences sont nécessaires pour pouvoir confirmer qu'au moins, dans les conditions où nos expériences ont été réalisées, le pool d'ATP reste inchangeable.

-112-

Si on admet cette hypothèse, on pourrait conclure que l'ATP ne constitue pas un bon indicateur du stress auquel les algues sont soumises, puisqu'une diminution ne pourrait être observée que dans la mesure où tous les processus de la division cellulaire sont inhibés.

Holm-Hansen (1970) fait remarquer que dans des études ou la viabilité cellulaire était déterminé, le niveau d'ATP par cellule viable était maintenu uniforme pendant des périodes de stress nutritionnel. D'un autre côté, Brezonik et al. (1975) montrent que la diminution dans le contenu d'ATP ( $\mu$ g.L<sup>-1</sup>) d'une culture de Chlorella exposée à 100  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> de Hg pendant 80 m est due principalement à des changements dans le pool d'ATP cellulaire, plutôt qu'à une réduction dans la population des cellules viables. Il conclut, en conséquence, que des doses létales de Hg ne sont pas nécessaires pour induire des changements dans le pool d'ATP.

Dans tous les cas, lorsqu'on utilise l'ATP comme indicateur de toxicité, il est très important:

de pouvoir déterminer la viabilité des cellules présentes.

- a) de référer les quantités d'ATP à une mesure de biomasse;
- b)

### Discussion (assimilation de carbone)

La culture expérimentale présente un comportement bien différencié de celui de la culture contrôle car l'effet toxique du Cd se manifeste très clairement par les variations du taux d'assimilation du <sup>12</sup>C dans le temps (Tableau 4.15). Pendant les trois premières heures, la toxicité n'est pas mise en évidence; la quantité de <sup>12</sup>C assimilé est en moyenne de 10,6 x 10<sup>-10</sup> ( $C_{\gamma} = 0,02$ ), valeur très semblable à celle du contrôle, 11,9 x 10<sup>-10</sup> ( $C_{\gamma} = 0,25$ ). Cependant, après 7h, il s'est produit une diminution d'environ 44%. Après 24 h elle est de 64%.

Ces résultats appuient ceux d'autres auteurs (Couture <u>et al.</u>, 1981, Fitzwater <u>et al.</u>, 1983, Hamp <u>et al.</u>, 1975) sur le fait de pouvoir considérer l'assimilation du <sup>14</sup>C comme indicateur sensible à la toxicité causée par certains métaux (Cd, Cu).

TEMPS	CULTURE (	CONTRÔLE	CULTURE EXPÉRIMENTALE		
	<sup>14</sup> C assimilé cpm.h <sup>-1</sup>	<sup>12</sup> C assimilé mg.h <sup>-1</sup> .cell <sup>-1</sup>	<sup>14</sup> C assimilé cpm.h <sup>-1</sup>	<sup>12</sup> C assimilé mg.h <sup>-1</sup> .cell <sup>-1</sup>	
0	17 292	9,5 x $10^{-10}$	19 116	$10,4 \times 10^{-10}$	
1 h	23 952	-	19 416	-	
2 h	22 368	$10,7 \times 10^{-10}$	19 143	10,6 x 10 <sup>-10</sup>	
3 h	36 942	$17,6 \times 10^{-10}$	19 332	10,9 x 10 <sup>-10</sup>	
4 h	19 359	$8,0 \times 10^{-10}$	12 051	$6,4 \times 10^{-10}$	
5 h	38 445	$14,1 \times 10^{-10}$	17 691	9,5 x 10 <sup>-10</sup>	
6 h	30 741	$10,4 \times 10^{-10}$	13 524	7,1 x $10^{-10}$	
7 h	33 156	10,8 x 10- <sup>10</sup>	10 674	5,6 x $10^{-10}$	
8 h	33 300	$10,4 \times 10^{-10}$	13 320	$6,3 \times 10^{-10}$	
24 h	98 508	$15,8 \times 10^{-10}$	13 977	5,7 x $10^{-10}$	
: <sup>12</sup> C ass	imilé	11,9 x 10 <sup>-10</sup>			
V		0,25			

Tableau 4.15:	Évolution dans le temps du <sup>12</sup> C assimilé par les cellules de la
	culture contrôle et celle exposée à 300 $\mu$ g.L <sup>-1</sup> de Cd.

#### CONCLUSIONS

Étant donné le besoin surgi de consacrer un effort considérable à la mise au point de la méthodologie pour la détermination des valeurs de  $CE_A$ , il fut rejeté, dans le cadre de cette étude, la réalisation des expériences sur l'utilisation de la  $CE_A$  comme paramètre toxicologique sur les cultures de <u>S. capricornutum</u>.

Du point de vue de la méthode analytique, l'apport le plus important de ce travail concerne le dosage de l'AMP, en particulier:

- le besoin d'employer un réactif purifié;
- l'augmentation de temps d'incubation des échantillons à deux heures;
- l'importance de tenir compte de l'effet "quencheur" du réactif C.

Du côté de l'applicabilité de la  $CE_A$  en tant que sonde physiologique dans le domaine de la toxicologie aquatique, il est important de tenir compte de l'exigence des manipulations complexes en laboratoire, ainsi que de l'emploi des réactifs délicats et très coûteux. Donc, son utilisation n'est pas recommandée comme paramètre de routine.

 Le rapport \Delta F/F<sub>DCMU</sub> ou "capacité de fluorescence cellulaire" met clairement en évidence la toxicité du Cd sur le système photochimique de la cellule, lorsque sa concentration est de 1000  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> (1 à 5 h d'exposition). Il se montre, cependant, peu sensible à l'intoxication pour des concentrations de 100  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> (1 à 5 h d'exposition) et de 300  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> (1 à 8 h d'exposition). Cela suggère, que pour des cellules intactes, la quantité de Cd pouvant atteindre les chloroplastes est faible.

Aucun effet de densité n'est mis en évidence sur la toxicité au niveau cellulaire lorsque la concentration de Cd est de 100  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> et de 1000  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>.

Les résultats des expériences sont en accord avec l'idée suggérée par d'autres auteurs sur le fait que le Cd endommage davantage le PSII que le PSI.

- La concentration de 300 μg.L<sup>-1</sup> de Cd semble n'avoir aucun effet sur le pool d'ATP cellulaire si on admet que celui-ci est maintenu constant pendant les 24 h d'exposition. Cependant, étant donné certains résultats rapportés dans la littérature, ceci devrait être confirmé par d'autres expériences suivant la même approche que celle de l'expérience présentée dans ce travail.
- L'assimilation du carbone se montre le paramètre le plus sensible à la toxicité du Cd, avec un pourcentage de diminution par rapport au contrôle de 64% après 24 h d'exposition (300  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> de Cd).

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ATKINSON, D.E. (1969).

Regulation of enzyme function. Ann. Rev. Microbiol., 23: 47-68.

ATKINSON, D.E. (1971).

Adenine nucleotides as universal stoichiometric metabolic coupling agents. Adv. Enzyme. Regul., 9: 207-219.

ATKINSON, D.E. (1977).

Cellular energy metabolism and its regulation. Academic Press, New York, 293 pp.

ATKINSON, D.E., ROACH, P.J. and SCHWEDES, J.S. (1975).

Metabolite concentrations and concentration ratio in metabolic regulation. Adv. Enzyme Regul., 13: 393-411.

BARTLETT, L., RABE, F.W. and FUNK, W.H. (1974).

Effects of copper, zinc and cadmium on <u>Selenastrum</u> <u>capricornutum</u>. Water Res., <u>8</u>: 179-185.

BASZYNSKI, T., WAJDA, L., KROL, M., WOLINSKA, D., KRUPA, Z. and TUKENDORF, A. (1980).

Photosynthetic activities of cadmium - treated tomato plants. Physiol. Plant, <u>48</u>: 365-370.

BLAISE, C. et COUTURE, P. (1984).

Détection à l'aide d'un bio-essai (<u>Selenastrum</u> <u>capricornutum</u>) des répercussions d'un rejet minier sur l'environnement aquatique: toxicité ou enrichissement en substance essentielle? Hydrobiologia, <u>114</u>: 39-50. BLINN, D.W., TOMPKINS, T. and ZALESKI, L. (1977).

Mercury inhibition of primary productivity using large volume plastic chambers "in situ". J. Phycol., 13: 58-61.

BREZONIK, P.L., BROWNE, F.X. and FOX, J.L. (1975).

Application of ATP to plankton biomass and bioassay studies. Water Res., 9: 155-162.

BUTTERWICK, C., HEANEY, S.I. and TALLING, J.F. (1982).

A comparison of eight methods for estimating the biomass and growth of planktonic algae. Br. Phycol. J., <u>17</u>: 69-79.

CAIRNS, J. Jr. (1980).

Beyond reductionism. The Virginia Tech. Magazine, 3: 30.

CHAPMAN, A.G. and ATKINSON, D.E. (1977).

Adenine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast. Adv. Microb. Physiol., 15: 253-306.

CHAPMAN, A.G., FALL, L. and ATKINSON, D.E. (1971).

Adenylate energy charge in <u>Escherichia coli</u>. during growth and starvation. J. Bacteriol., 108(3): 1072-1086.

CHIAUDANI, G. and VIGHI, M. (1978).

The use of <u>Selenastrum</u> <u>capricornutum</u> batch cultures in toxicity studies. Mitt. Internat. Verein Limnol., 21: 316-329.

COLIJN, F., GIESKES, W.W.C. and ZEVENBOOM, W. (1983).

The measurements of primary production: problems and recommendations. Hydrobiol. Bull., 17(1): 29-51. -119-

COUTURE, P., VAN COILLIE, R., CAMPBELL, P.G.C. et THELLEN, C. (1981).

Le phytoplancton, un réactif biologique sensible pour détecter rapidement la présence de toxiques. Les colloques de l'INSERM, <u>106</u>: 255-272. FALKOWSKI, P.G. (1977).

The adenylate energy charge in marine phytoplankton: the effect of temperature on the physiological state of <u>Skeletonema costatum</u>. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 27: 37-45.

FITZWATER, S.E., KNAUER, G.A. and MARTIN, J.H. (1983).

The effects of Cu on the adenylate energy charge of open ocean phytoplankton. J. Plank. Res., 5(6): 935-938.

HAMPP, R., BEULICH, K. and ZIEGLER, H. (1976).

Effects of zinc and cadmium on photosynthetic  $CO_2$  - fixation and hill activity of isolated spinach chloroplasts. Z. Pflanzenphysiol., <u>77</u>: 336-344.

HARRIS, G.P. (1980).

Temporal and spatial scales in phytoplankton ecology. Mechanisms, methods, models and management. Can. J. Fish. Aquat. Sci.,  $\underline{37}$ : 877-900.

HOLM-HANSEN, 0. (1970).

ATP levels in algal cells as influenced by environmental conditions. Plant and Cell Physiol., 11: 689-700.

HOLM-HANSEN, O. and KARL, D.M. (1978).

Biomass and adenylate energy charge determination in microbial cell extracts and environmental samples. Methods Enzymol., <u>57</u>: 73-85.

HOMER, J.R., COTTON, R. and EVANS, E.H. (1980).

Whole leaf fluorescence as a technique for measurement of tolerance of plants to heavy metals. Oecologia (Berl.), 45: 88-89.

IVANOVICI, A.M. (1980).

The adenylate energy charge in the estuarine mollusc. <u>Pyrazus</u> <u>ebenius</u>. Laboratory studies of responses to salinity and temperature. Comp. Biochem. Physiol., 66A: 43-55.

JAKUBCZAK, E. et LECLERC, H. (1980).

Mesure de l'ATP bactérien par bioluminescence: étude critique des méthodes d'extraction. Ann. Biol. Clin., 38: 297-304.

JONES, J.G. and SIMON, B.M. (1977).

Increased sensitivity in the measurement of ATP in freshwater samples with a comment on the adverse effect of membrane filtration. Freshwater Biol., 7: 253-260.

JOUBERT (1980).

A bioassay application for quantitative toxicity measurements, using the green algae <u>Selenastrum capricornutum</u>. Water Res., <u>14</u>: 1759-1763. KARL, D.M. (1979).

Comments on a paper by J.G. Jones and B.H. Simon, "Increased sensitivity in the measurement of ATP in freshwater samples with a comment on the adverse effect of membrane filtration. Freshwater Biol.,  $\underline{9}$ : 281-284.

KARL, D.M. (1980).

Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. Microbiol. Rev., 44(4): 739-796.

KARL, D.M. and HOLM-HANSEN, O. (1978).

ATP, ADP and AMP determinations in water samples and algal cultures. <u>In</u>: Hellebust, J.A. et Craigie, J.S. (eds). Handbook of phycological methods, physiological and biochemical methods, Cambridge University Press, New-York, pp. 197-206. KARL, D.M. and HOLM-HANSEN, O. (1978).

Methodology and measurement of adenylate energy charge ratios in environmental samples. Mar. Biol., 48: 185-197.

KENNICUTT II, M.C. (1980).

ATP as an indicator of toxicity. Water Res., 14: 325-328.

KLEPPEL, G.S. and McLAUGHLIN, J.J.A. (1980).

PCB toxicity to phytoplankton: effects of dose and density-dependent recovery responses. Bull. Environm. Contam. Toxicol., <u>24</u>: 696-703.

LARSSON, C.M. and OLSSON, T. (1979).

Firefly assay of adenine nucleotides from algae: comparison of extraction methods. Plant and Cell Physiol., 20(1): 145-155.

LEISCHMAN, A.A., GREENE, J.C. and MILLER, W.E. (1979).

Bibliography of literature pertaining to the genus <u>Selenastrum</u>. U.S. Environmental Protection Agency. Oregon. EPA-600/9-79-021, 192 p.

LI, E.H. and MILES, C.D. (1975).

Effects of cadmium on photoreaction II of chloroplasts. Plant. Science Letters, 5: 33-40.

LUMAC, (1980).

Environmental applications. Lumac B.V., P.O. Box 31101. 6370 AC Shaesberg. The Netherlands.

LUNDIN, A. and THORE, A. (1975).

Comparison of methods for extraction of bacterial adenine nucleotides determined by firefly assay. Appl. Microbiol. <u>30</u>: 713-721.

MACIOROWSKI, A.F., SIMS, J.L., LITTLE, L.W. and GERRARD, E.D. (1981). Bioassays-procedure and results. J. Wat. Pollut. Control Fed., <u>53</u>: 974-993. MACIOROWSKI, A.F., LITTLE, L.W., RAYNOR, L.F., SIMS, R.C. and SIMS, J.L. (1982).

Bioassays-procedure and results. J. Wat. Pollut. Control Fed., <u>54</u>: 830-854.

MACIOROWSKI, A.F., LITTLE, L.W., RAYNOR, L.F., SIMS, R.C. and SIMS, J.L. (1983).

Bioassays-procedure and results. J. Wat. Pollut. Control Fed., <u>55</u>: 801.

McLEAN, M.W. and WILLIANSON, F.B. (1977).

Cadmium accumulation by the marine red alga <u>Phorphyra</u> <u>umbilicalis</u>. Physiol. Plant., <u>41</u>: 268-272.

PETERSON, B.J. (1980).

Aquatic primary productivity and the  ${}^{14}C-CO_2$  method: A history of the productivity problem. Ann. Rev. Ecol. Syst., 11: 359-385.

PLUMB, R.H. and LEE, G.F. (1979).

A comparison of carbon-14 incubation techniques. Water, Air and Soil Pollution, 11: 289-299.

PRIDMORE, R.D. and HEWITT, J.E. (1983).

ATP as a short term bioassay response parameter for nitrogen deficiency in algae. Water Res., 17(9): 1189-1191.

RAI, L.C., GAUR, J.P. and KUMAR, H.D. (1981).

Phycology and heavy metal pollution. Biol. Rev., 56: 99-151.

RAINER, S.F., IVANOVICI, A.M. and WADLEY, V.A. (1979).

Effect of reduced salinity on adenylate energy charge in three estuarine molluscs. Mar. Biol., 54: 91-99.

REHNBERG, B.G., SCHULTZ, D.A. and RASCHKE, R.L. (1982).

Limitations of electronic particle counting in reference to algal assays. Journal WPCF, 54(2): 181-186.

RIEMANN, B. and WIUM-ANDERSEN, S. (1981).

The ATP and total adenine content of four unicellular and colonial green algae. Oikos, 36: 368-373.

RIEMANN, B. and WIUM-ANDERSEN, S. (1982).

Predictive value of adenylate energy charge for metabolic and growth states of planktonic communities in lakes. Oikos 39: 256-260.

ROY, S. and LEGENDRE, L. (1979).

DCMU - enhanced fluorescence as in index of photosynthetic activity in phytoplankton. Mar. Biol., 55: 93-101.

SAMUELSSON, G. and OQUIST, G. (1977).

A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on "in vivo" chlorophyll fluorescence. Physiol. Plant, <u>40</u>: 315-319.

SAUNDERS, G.W., TRAMA, F.B. and BACHMAN, R.W. (1962).

Evaluation of a modified  $C^{14}$  technique for shipboard estimation of photosynthesis in large lakes. Great Lakes Res. Publ. No 8. Ann Arbor: Inst. Sci. Technol., Univ. Michigan, 61 pp.

SCHIMZ, K. and HOLZER, H. (1979).

Rapid decrease of ATP content in intact cells of <u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u> after incubation with low concentrations of sulfite. Arch. Microbiol., <u>121</u>: 225-229. SHEN, L.C., FALL, L., WALTON, G.M. and ATKINSON, D.E. (1968).

Interaction between energy charge and metabolite modulation in the regulation of enzymes of amphibolic sequences. Phosphofurctokinase and pyruvate dehidrogenase. Biochemistry, 7(11): 4041-4045.

SLOVACEK, R.E. and HANNAN, P.J. (1977).

In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll- $\underline{a}$ . Limnol. Oceanogr., 22(5): 919-925.

STEEMANN-NIELSEN, E. (1952).

The use of radioactive carbon  $(C^{14})$  for measuring organic production in the sea. J. Cons. Int. Expl. Mer., 18: 117-140.

STIKLAND, J.D.H. and PARSONS, T.R. (1968).

A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, 310 pp.

STUMM, W. and MORGAN, J.J. (1981).

Aquatic Chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. Wiley Interscience, 780 pp.

SUTCLIFFE, W.H., ORR, E.A. and HOLM-HANSEN, O. (1976).

Difficulties with ATP measurements in inshore waters. Limnol. Oceanogr., 31: 145-149.

VINCENT, W.F. (1980).

Mechanisms of rapid photosynthetic adaptation in natural phytoplankton communities. II. Changes in photochemical capacity as measured by DCMUinduced chlorophyll fluorescence. J. Phycol., 16: 568-577.

VINCENT, W.M. (1981).

Photosynthetic capacity measured by DCMU-induced chlorophyll fluorescence in an oligotrophic lake. Freshwat. Biol., 11: 61-78. WITZEL, K.P. (1979).

The adenylate energy charge as a measure of microbial activities in aquatic habitats. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn Limnol., <u>12</u>: 145-165. WONG and COUTURE. (non publié).

Toxicity screening using phytoplankton. In: B.J. Dutka and G. Bitton (eds). Toxicity Testing Using Microorganisms. CRC Press, Boca Raton, Fla. (sous-presse).

