

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée à:

L'INRS-Eau

Institut national de la recherche scientifique

comme exigence partielle  
du doctorat ès sciences (eau)

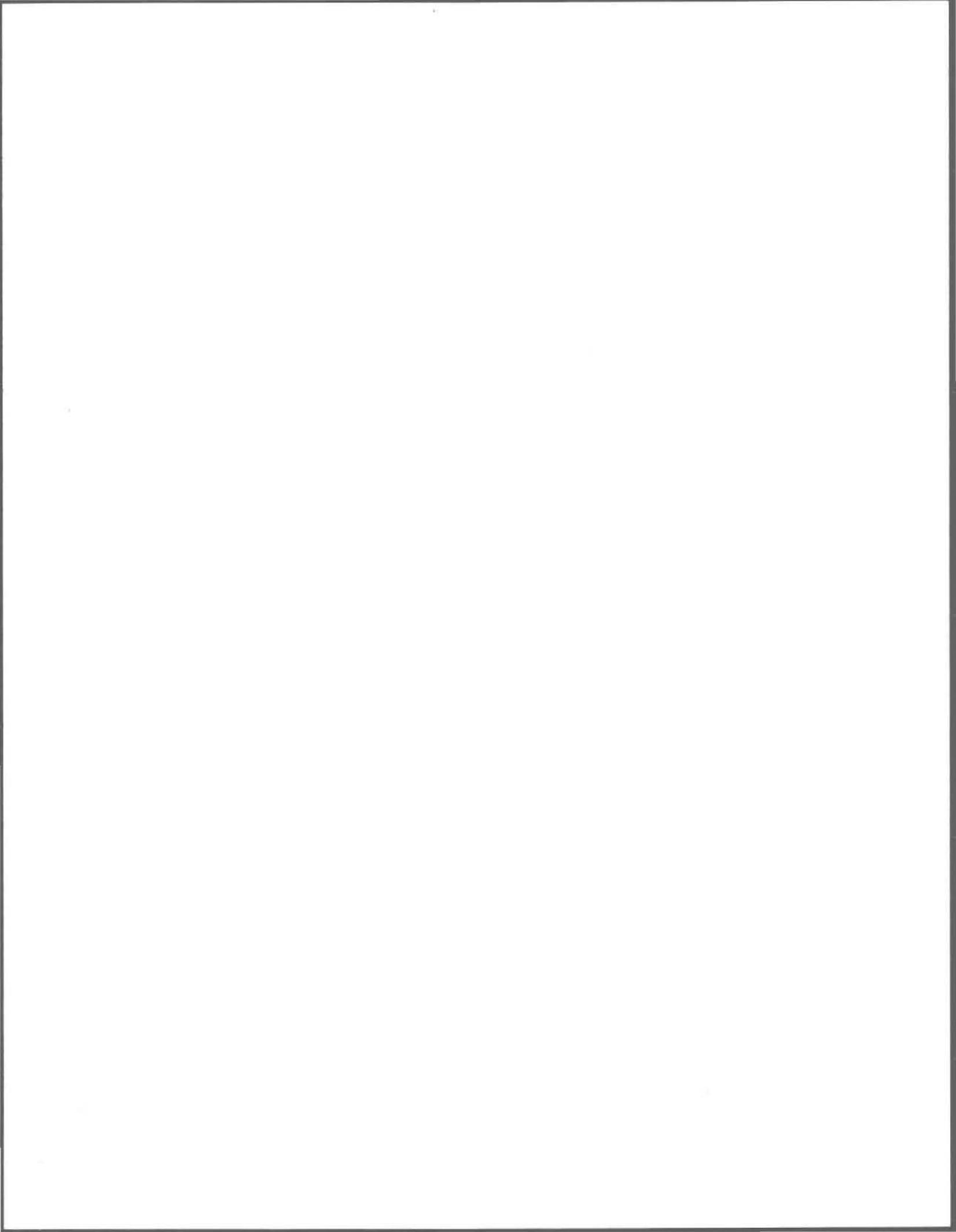
par

Patsy-Ann Thompson

M.Sc. Productivité aquatique

"Récupération de la croissance chez *Selenastrum capricornutum* exposé au  
cadmium: Aspects du métabolisme du carbone"

Juin 1990



## Remerciements

*Un long voyage prend fin... un voyage d'exploration d'un domaine scientifique, mais avant tout d'exploration de soi. Je sors grandie de ce périple qui a mis à l'épreuve mon endurance mais qui, surtout, a stimulé mon imagination et donné naissance à une passion.*

Je remercie les personnes qui m'ont accompagné tout au long du trajet:

- Gaétan et Colette pour leur écoute pendant la période de remise en question qui a précédé ma demande d'admission à l'INRS-Eau;
- mon directeur, Dr Pierre Couture qui a su me donner le type d'encadrement et le support dont j'avais besoin;
- le Dr Peter G.C. Campbell pour ses commentaires judicieux lors de la correction de ma thèse;
- le personnel du laboratoire, madame Michelle Bordeleau et messieurs Bernard Veilleux, Paul Boisvert et Bertrand Dubreuil, pour leur disponibilité et leurs précieux conseils;
- madame Danielle Rodrigue pour l'assistance qu'elle m'a fournie au laboratoire;

- monsieur André Parent pour le dessin des figures apparaissant dans la thèse;
- madame Lise Raymond pour sa grande disponibilité lors de la dactylographie de cette thèse.

Je suis reconnaissante du soutien financier qui m'a été accordé par le CRSNG et par l'INRS-Eau.

Finalement, je remercie Francine qui m'a accompagnée tout au long de cette démarche comme seule une amie peut le faire, m'encourageant et m'appuyant dans les moments difficiles, partageant également les joies qui accompagnent toute réalisation personnelle.

**À toutes et tous, merci**

## Résumé

Les communautés phytoplanctoniques s'acclimatent à la présence de substances toxiques soit par des ajustements physiologiques, soit par le remplacement des espèces sensibles par des espèces plus résistantes. Bien que plusieurs espèces résistantes aux métaux ont été identifiées dans des milieux chroniquement pollués, les ajustements physiologiques rencontrés chez les communautés phytoplanctoniques exposées à des décharges d'effluents toxiques sont méconnus. Cette thèse s'inscrit dans cette problématique et l'objectif général était de mettre en évidence des modifications du métabolisme du carbone reliées à l'acclimatation et à la récupération de la croissance de populations de la Chlorophycée Selenastrum capricornutum exposées à des concentrations sous-létales de Cd.

Les résultats de la première expérience démontrent que dans les premières heures d'exposition au Cd, le rapport protéine/polysaccharide augmente en fonction de la concentration de Cd. Par la suite, malgré une inhibition de la croissance, les quotas cellulaires en protéines et en lipides sont plus élevés chez la population exposée à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  que chez la population témoin. Les quotas élevés en protéines représentent un excès de synthèse par rapport aux besoins de la division cellulaire tandis que les quotas élevés en lipides représentent une accumulation de produits de réserve et peuvent être perçus comme un ajustement physiologique visant à maximiser la croissance en présence de Cd.

La deuxième expérience met en évidence que les cellules algales exposées au Cd sont dans un état d'équilibre délicat entre l'inhibition et la croissance. En effet, la complexation de l'ion libre ( $\text{Cd}^{2+}$ ) dans le milieu de culture entraîne une importante désorption du Cd pris en charge par les cellules et une reprise de la croissance dans les 10 h qui suivent l'ajout de l'agent complexant (EDTA).

Les résultats des deux autres séries d'expériences démontrent d'une part que les effets du Cd sur la photosynthèse sont plus persistants que les effets sur la respiration, et d'autre part que la récupération de ces deux voies métaboliques est essentielle à la récupération de la croissance. La récupération de la croissance semble nécessiter une chaîne chronologique d'évènements métaboliques impliquant la photosynthèse et la synthèse de lipides et de protéines dans un premier temps et la respiration des lipides et la synthèse d'ATP dans un deuxième temps. Par ailleurs, il semble que le taux de croissance atteint par les populations préalablement exposées au Cd dépende du degré de récupération de la photosynthèse.

L'approche utilisée dans cette thèse pour étudier la récupération des populations phytoplanctoniques exposées au Cd a permis de relier les connaissances acquises sur la persistance des effets toxiques du Cd au processus de croissance des algues unicellulaires. De plus, étant donné qu'ultimement ce sera le maintien ou la récupération d'un taux de croissance adéquat qui déterminera le destin d'une espèce dans son milieu, les connaissances acquises par cette approche présentent une plus grande signification écologique que les informations obtenues sur la toxicité du Cd par l'utilisation de bioessais plus traditionnels.

## TABLE DES MATIÈRES

	<u>Page</u>
REMERCIEMENTS .....	i
RÉSUMÉ .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
LISTE DES FIGURES .....	xiii
<b>Chapitre 1: Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 2: Problématique et état des connaissances .....</b>	<b>7</b>
2.1 Problématique .....	8
2.1.1 Structure des communautés phytoplanctoniques .....	8
2.1.2 Processus de résistance aux ions métalliques .....	10
2.2 Croissance algale .....	17
2.2.1 Modèle de la croissance d'algues unicellulaires .....	17
2.2.2 Allocation de carbone et limitation de la croissance .....	19
2.2.3 Limitation de la croissance par le cadmium .....	21
2.3 Besoins énergétiques des cellules algales .....	23
2.3.1 Contribution relative de la photophosphorylation et de la phosphorylation oxydative .....	23
2.3.2 Besoins énergétiques de cellules exposées à des substances toxiques .....	24
2.3.3 Variations dans les besoins énergétiques des cellules .....	27
2.4 Originalité de l'approche méthodologique .....	31

	<u>Page</u>
<b>Chapitre 3: Matériel et méthodes générales .....</b>	<b>33</b>
3.1 Méthode de culture .....	34
3.2 Dénombrement des cellules et mesure de la croissance .....	37
3.2.1 Dénombrement .....	37
3.2.2 Mesure de la croissance .....	37
3.3 Protocole expérimental des expériences de récupération .....	38
3.3.1 Période d'exposition au Cd .....	38
3.3.2 Période de récupération .....	40
3.4 Dosage des nucléotides adénylates .....	47
3.4.1 Dosage de l'ATP .....	48
3.4.2 Dosage de l'ADP .....	48
3.4.3 Dosage de l'AMP .....	54
3.5 Mesure de la respiration .....	59
3.5.1 Mesure de la respiration à l'obscurité .....	62
3.5.2 Mesure de la respiration à la lumière en présence de DCMU ..	63
3.6 Analyse statistique .....	67
<b>Chapitre 4: Modifications du métabolisme de produits de synthèse chez des populations de <u>Selenastrum capricornutum</u> exposées au Cd .....</b>	<b>69</b>
4.1 Introduction .....	70
4.2 Matériel et méthodes .....	73
4.2.1 Protocole expérimental .....	73
4.2.2 Assimilation de carbone .....	74
4.3 Résultats et discussion .....	81

	<u>Page</u>
4.4 Conclusion .....	96
<b>Chapitre 5: Variations des teneurs cellulaires en Cd chez <u>Selenastrum capricornutum</u> pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération de la croissance</b>	99
5.1 Introduction .....	100
5.2 Matériel et méthodes .....	101
5.3 Résultats et discussion .....	103
5.4 Conclusion .....	110
<b>Chapitre 6: Processus de récupération de populations de <u>Selenastrum capricornutum</u> exposées au Cd: I. Photosynthèse et synthèse de macromolécules</b>	113
6.1 Introduction .....	114
6.2 Matériel et méthodes .....	116
6.2.1 Protocole expérimental .....	116
6.2.2 Méthodes de mesures .....	117
6.3 Résultats et discussion .....	121
6.4 Conclusion .....	137
<b>Chapitre 7: Processus de récupération de populations de <u>Selenastrum capricornutum</u> exposées au Cd: II. Métabolisme du carbone et des nucléotides adénylates</b>	139

	<u>Page</u>
7.1 Introduction .....	140
7.2 Matériel et méthodes .....	143
7.2.1 Rôle des macromolécules et des nucléotides adénylates dans le processus de récupération .....	143
7.2.1.1 Dosage des nucléotides adénylates .....	144
7.2.2 Rôle de la respiration dans le processus de récupération ...	146
7.3 Résultats et discussion .....	147
7.3.1 Rôle des macromolécules et des nucléotides adénylates dans le processus de récupération .....	147
7.3.2 Rôle de la respiration dans le processus de récupération ...	160
7.4 Conclusion .....	178
<b>Chapitre 8: Conclusions</b> .....	<b>181</b>
8.1 Conclusions.....	182
8.2 Recherches futures .....	187
<b>Chapitre 9: Bibliographie</b> .....	<b>189</b>
ANNEXE I .....	
ANNEXE II .....	
ANNEXE III .....	

## LISTE DES TABLEAUX

	<u>Page</u>
Tableau 3.1: Analyse de la variance des données de densité cellulaire, de photosynthèse et d'ATP cellulaire d'une population témoin de <u>S. capricornutum</u> et d'une population ayant reçu $2.67 \times 10^{-6}$ M EDTA après 48 h de croissance .....	45
Tableau 3.2: Spéciation du Cd (% du Cd total) dans le milieu de culture AAP modifié, avant et après l'ajout de $2.67 \times 10^{-6}$ M EDTA .....	46
Tableau 3.3: Réactifs utilisés pour le dosage des nucléotides adénylates .....	49
Tableau 3.4: Taux de conversion de l'ADP en ATP après 30 minutes d'incubation à la température de la pièce ( $\sim 22^{\circ}\text{C}$ ) ...	52
Tableau 3.5: Taux de conversion de l'ADP en ATP dans des solutions contenant des concentrations connues de ces deux nucléotides adénylates .....	53
Tableau 3.6: Taux de conversion de l'AMP en ATP après 2h d'incubation à $30^{\circ}\text{C}$ .....	55
Tableau 3.7: Taux de conversion de l'AMP en ATP après 2h d'incubation à $30^{\circ}\text{C}$ avec le réactif C de Karl et Holm-Hansen (1978) .....	57
Tableau 3.8: Effet du rapport AMP/ATP sur le taux de conversion de l'AMP en ATP .....	58
Tableau 3.9: Effet de la durée de l'incubation sur le taux de conversion de l'AMP en ATP .....	60

	<u>Page</u>
Tableau 3.10: Variation de mesures de respiration obtenues par l'incubation de populations de <u>S. capricornutum</u> à l'obscurité (deux séries de mesures; n = 3) .....	64
Tableau 3.11: Effet du DCMU et du méthanol sur la photosynthèse de <u>S. capricornutum</u> .....	66
Tableau 4.1: Taux de croissance ( $\mu^*$ ) de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées au Cd .....	83
Tableau 4.2: Taux de photosynthèse ( $\text{pg C}\cdot\text{cellule}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30, 60 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .....	85
Tableau 4.3: Taux d'incorporation de carbone dans les macromolécules ( $\text{pg C}\cdot\text{cellule}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) au cours des huit premières heures d'exposition à 0,30, 60 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .....	87
Tableau 5.1: Rapport entre les concentrations de Cd absorbé et adsorbé (Cd absorbé/Cd adsorbé) de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 30 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .....	107
Tableau 6.1: Effets du Cd sur la densité cellulaire, la concentration en chl- <u>a</u> dans le milieu, la concentration de chl- <u>a</u> dans les cellules et le taux de photosynthèse pendant la période d'exposition (0 - 48 h) à 0, 30 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ (Anova à 1 critère) .....	124
Tableau 6.2: Taux de croissance ( $\mu\cdot\text{h}$ ) de populations de <u>S. capricornutum</u> pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération .....	125
Tableau 6.3 Taux moyen de photosynthèse de populations de <u>S. capricornutum</u> , pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération .....	126

	<u>Page</u>
Tableau 6.4: Incorporation (%) moyenne dans les macromolécules du carbone assimilé par des populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ pendant les périodes d'exposition et de récupération .....	130
Tableau 6.5: Coefficients de corrélation entre le taux de photosynthèse et les taux de synthèse des macromolécules au cours des périodes d'exposition et de récupération chez les populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .....	132
Tableau 6.6: Taux moyens de synthèse des macromolécules ( $\text{pg C}\cdot\text{cellule}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) pendant les périodes d'exposition et de récupération chez <u>S. capricornutum</u> exposé à 0, 30 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .....	134
Tableau 7.1: Taux de croissance ( $\mu\cdot\text{h}^{-1}$ )* de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .....	150
Tableau 7.2: Taux de photosynthèse ( $\text{pg C}\cdot\text{cellule}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .....	156
Tableau 7.3: Taux de croissance ( $\mu\cdot\text{h}^{-1}$ ) de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30, 100 et 500 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ ..	162
Tableau 7.4: Respiration totale de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 30, 100 et 500 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ exprimée en pourcentage du témoin (A-période d'exposition au Cd; B-période de récupération) .....	165

Tableau 7.5:	Pourcentage <sup>1</sup> du carbone respiré par des populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30, 100 et 500 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , provenant des diverses fractions de macromolécules (A: période d'exposition au Cd; B: période de récupération) .....	169
Tableau 7.6	Comparaison des moyennes (test de t) des données de respiration des macromolécules des populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30, 100 et 500 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .	170

## LISTE DES FIGURES

	<u>Page</u>
Figure 3.1: Taux de photosynthèse d'une population asynchrone de <u>S. capricornutum</u> en fonction de l'intensité lumineuse (culture témoin; 36 000 cellules·mL <sup>-1</sup> ; milieu AAP-EDTA) .....	36
Figure 3.2: Courbe de croissance théorique d'une algue unicellulaire en culture statique .....	39
Figure 3.3: Effet de l'ajout de 2.67 x 10 <sup>-6</sup> M EDTA sur la croissance de <u>S. capricornutum</u> . † indique l'heure de l'ajout d'EDTA (milieu AAP-EDTA) .....	42
Figure 3.4: Effet de l'ajout de 2.67 x 10 <sup>-6</sup> M EDTA sur la photosynthèse de <u>S. capricornutum</u> . † indique l'heure de l'ajout d'EDTA (milieu AAP-EDTA; n = 3, pour le nombre de cellules se référer à la figure 3.3) .....	43
Figure 3.5: Effet de l'ajout de 2.67 x 10 <sup>-6</sup> M EDTA sur le contenu en ATP de cellules de <u>S. capricornutum</u> . † indique l'heure de l'ajout d'EDTA (milieu AAP-EDTA; n = 3; pour le nombre de cellules se référer à la figure 3.3) .....	44
Figure 3.6: Courbe typique d'émission de lumière pour des étalons d'ATP .....	50
Figure 4.1 Proportion (%) de carbone allouée aux quatre fractions de macromolécules .....	78
Figure 4.2: Densité cellulaire de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30, 60 et 100 µg Cd·L <sup>-1</sup> pendant 234 h ..	82

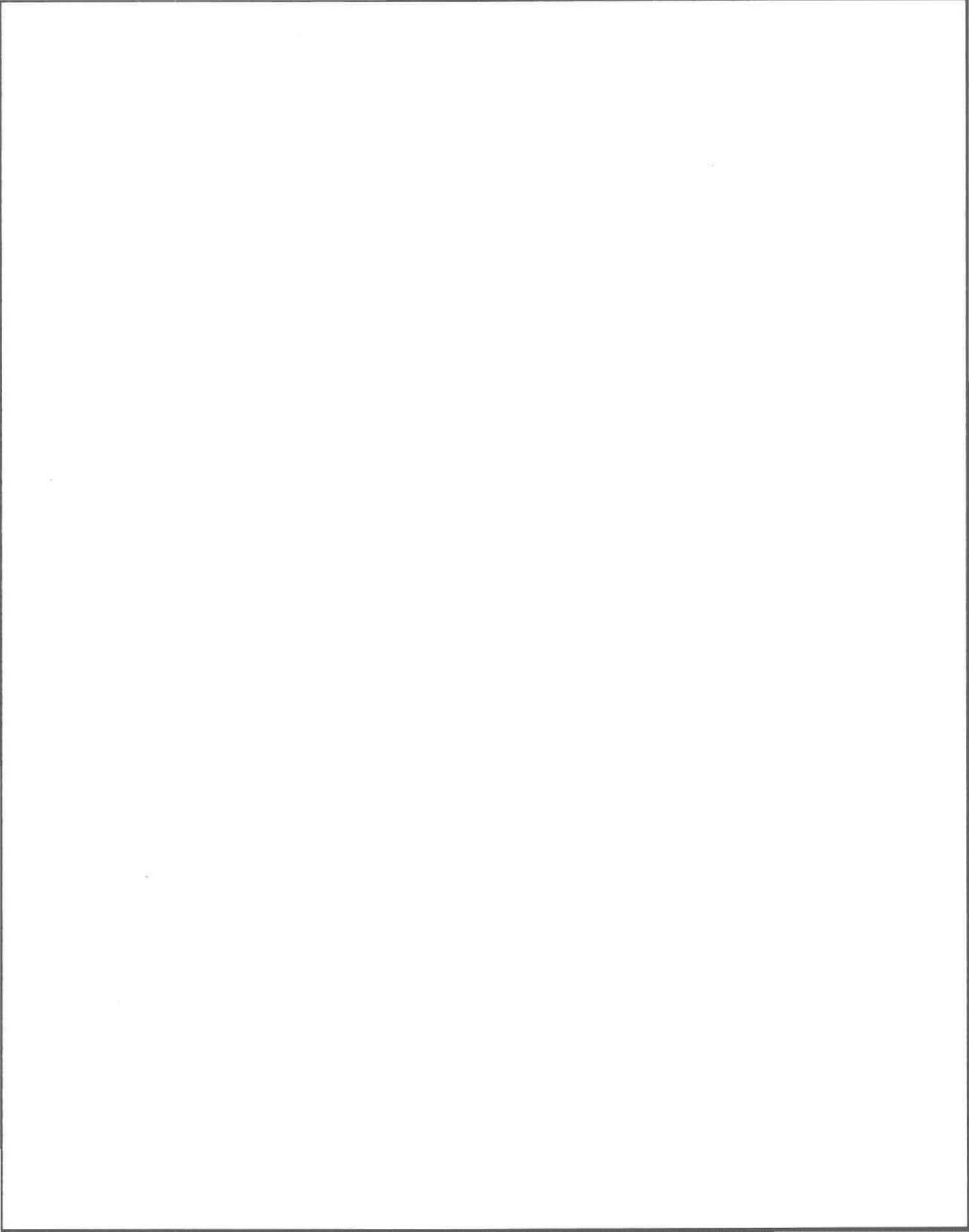
	<u>Page</u>
Figure 4.3: Quotas cellulaires en carbone de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30, 60 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ pendant 234 h .....	89
Figure 4.4: Quotas cellulaires en carbone dans les macromolécules de la population de <u>S. capricornutum</u> témoin (A) et de celles exposées à 30 (B), 60 (C) et 100 (D) $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	91
Figure 4.5: Quotas cellulaires en carbone dans les protéines (A), les lipides (B) et les polysaccharides (C) chez des populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30, 60 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .....	92
Figure 4.6: Rapports protéine / polysaccharide de populations de <u>S. capricornutum</u> après 0,25 h et 4 h d'exposition au Cd .	94
Figure 5.1: Croissance (encadré) et teneurs cellulaires en Cd total ( $\bullet$ ), en Cd adsorbé ( ) et en Cd absorbé ( ) avant et après l'ajout de $2.67 \times 10^{-6}\text{M}$ EDTA chez des populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 30 (A) et 100 (B) $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA .....	104
Figure 6.1 Croissance mesurée selon la densité cellulaire (A) et la concentration de chl-a (B) dans le milieu, de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA ...	122
Figure 6.2: Taux de photosynthèse de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à des concentrations de 0, 30 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA ...	123
Figure 6.3: Concentration en chl-a des cellules de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA .....	127

	<u>Page</u>
Figure 6.4: Pourcentage d'allocation du carbone assimilé aux macromolécules chez des populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0 (A), 30 (B) et 100 (C) $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA .....	129
Figure 7.1: Croissance de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0 ( $\bullet$ ), 30 ( $\Delta$ ) et 100 ( ) $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA .....	149
Figure 7.2: Densité cellulaire ( $\bullet$ ) et $\text{ATP}\cdot\text{cellule}^{-1}$ ( ) de la population de <u>S. capricornutum</u> exposée à 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ (A), et $\text{ATP}/\text{cellule}^{-1}$ de populations exposées à 0 ( $\bullet$ ), 30 (o) et 100 ( ) $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ (B). $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA .....	151
Figure 7.3: Volume cellulaire moyen de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30 et 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA .....	152
Figure 7.4: Rapport ATP/ADP de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0 ( $\bullet$ ), 30 (o) et 100 ( ) $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA .....	154
Figure 7.5: Quotas cellulaires en carbone de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0 ( $\bullet$ ), 30 ( $\Delta$ ) et 100 ( ) $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA .....	157
Figure 7.6: Quotas cellulaires en carbone dans les protéines ( ), les lipides ( ), les polysaccharides ( ) et les métabolites à faible poids moléculaire (o) chez des populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0 (A), 30 (B) et 100 (C) $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA .....	158

Figure 7.7:	Croissance de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0 (•), 30 (o) et 100 ( ) et 500 ( ) $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA .....	161
Figure 7.8:	Pourcentage du quota cellulaire en carbone respiré par des populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0, 30, 100 et 500 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ pendant les périodes d'exposition au Cd (A) et de récupération (B) .....	166
Figure 7.9:	Taux de respiration des polysaccharides chez des populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0 (A), 30 (B), 100 (C) et 500 (D) $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération. $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA .....	172
Figure 7.10:	Taux de respiration des métabolites à faible poids moléculaire chez des populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0 (A), 30 (B), 100 (C) et 500 (D) $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération. $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA ....	173
Figure 7.11:	Taux de respiration des protéines chez des populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0 (A), 30 (B), 100 (C) et 500 (D) $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération. $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA .....	174
Figure 7.12:	Taux de respiration des lipides chez des populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à 0 (A), 30 (B), 100 (C) et 500 (D) $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération. $\uparrow$ indique l'heure de l'ajout d'EDTA .....	176

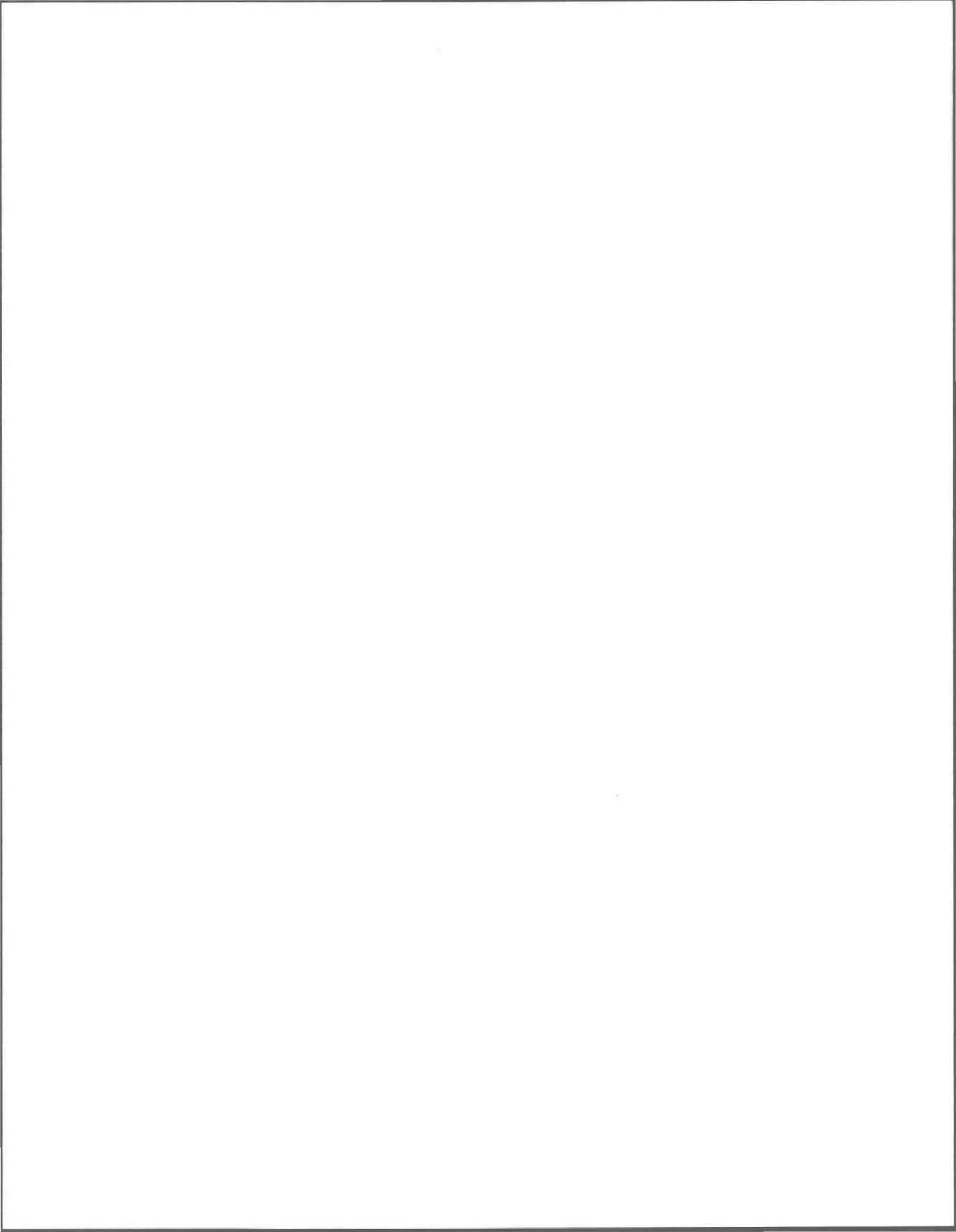
Figure 7.13: Pourcentage de carbone alloué aux lipides chez des populations de S. capricornutum exposées à 0 (•), 30 ( ), 100 ( ) et 500 (Δ) µg Cd·L<sup>-1</sup>. † indique l'heure de l'ajout d'EDTA .....

177



## **Chapitre 1**

### **Introduction**



## 1. Introduction

Les communautés phytoplanctoniques s'adaptent aux variations (lumière, éléments nutritifs, turbulence, etc.) qui caractérisent les milieux aquatiques soit par des ajustements physiologiques, soit par le remplacement des espèces. Les modifications de la structure des communautés, souvent observées dans des milieux perturbés par des apports en substances toxiques, sont une manifestation de cette deuxième réponse adaptative. Plusieurs études (Say et al. 1977; Foster 1981, 1982) ont décrit la flore planctonique de cours d'eau chroniquement contaminés par des métaux. Bien que ces communautés soient appauvries (diversité, richesse), il n'en reste pas moins que plusieurs espèces sont capables de tolérer des concentrations élevées de métaux. On ne connaît cependant que très peu de choses sur les réactions du métabolisme des communautés d'origine et sur les ajustements physiologiques qui ont permis aux espèces tolérantes de devenir dominantes dans ces milieux.

D'autres travaux, comme par exemple l'étude de Couture et al. (1987) (c.f. Annexe I) réalisée sur un tronçon de rivière, ont démontré qu'en aval de rejets d'effluents toxiques le métabolisme des communautés phytoplanctoniques continuait d'être perturbé mais que ces perturbations n'entraînaient pas de modifications dans la structure des communautés. Les connaissances qui permettraient de prédire le destin de ces communautés plus loin en aval de l'effluent, à savoir la récupération des fonctions physiologiques (persistance des effets toxiques) ou encore le développement d'une communauté dominée par des espèces résistantes, sont manquantes.

Considérant, d'une part les efforts considérables de recherche qui sont déployés dans l'étude de l'écophysiologie des communautés phyto-planctoniques, et d'autre part l'ampleur du problème de contamination des milieux aquatiques par des substances toxiques, il est surprenant de constater le peu de connaissances que nous avons sur la physiologie de l'acclimatation et de la résistance aux divers contaminants de l'environnement.

Le présent travail s'inscrit dans cette problématique. Il a pour but de mettre en évidence les ajustements physiologiques associés au développement de la tolérance (acclimatation) ou encore, nécessaires à la récupération de la croissance chez une population exposée à une substance toxique. Ces ajustements trouvent leur importance dans des situations où la toxicité revêt un caractère intermittent et où la période d'exposition peut être relativement courte, par exemple pour des communautés phytoplanctoniques qui sont transportées de l'amont vers l'aval d'une décharge d'effluent. Des efforts considérables sont consentis, à l'intérieur de cette thèse, aux aspects de la récupération de la croissance et de la persistance des effets toxiques. Afin de mieux cerner les ajustements du métabolisme pendant et suite à une agression toxique, l'étude est réalisée au laboratoire avec l'algue verte Selenastrum capricornutum exposée au Cd, un métal dont les effets toxiques sont bien documentés. Cette approche permet de mieux contrôler les facteurs abiotiques et d'éliminer les interactions interspécifiques (ex.: compétition pour les ressources) auxquels les cellules algales dans le milieu réel doivent également s'ajuster.

La problématique et la revue de la littérature présentées au chapitre 2 permettent de poser deux hypothèses générales:

- H<sub>1</sub>: les cellules algales s'acclimateront au Cd par des ajustements du métabolisme du carbone visant à maximiser la croissance en présence de Cd.
- H<sub>2</sub>: la récupération de la croissance sera possible lorsque les activités métaboliques associées au cycle de division cellulaire cesseront d'être inhibées par le Cd.

La vérification de ces hypothèses a nécessité la mise au point de méthodes analytiques (nucléotides adénylates, respiration), d'un système de culture d'algues, ainsi que le développement d'un protocole expérimental permettant de suivre la récupération de la croissance. Les travaux effectués pour établir les divers protocoles expérimentaux utilisés tout au long de la thèse sont présentés au chapitre 3.

L'expérience présentée au chapitre 4 a pour objectif d'infirmer ou de confirmer la première hypothèse. Elle est réalisée selon un protocole traditionnel, en exposant les populations à la substance toxique pendant une longue période. Ce protocole permet de relier le taux de croissance des populations exposées au Cd à leurs quotas cellulaires en produits de réserve (polysaccharides et lipides) et en protéines.

La toxicité du Cd est fonction, d'une part de la concentration de l'ion libre dans le milieu de culture, et d'autre part des teneurs cellulaires en Cd. L'expérience présentée au chapitre 5 a pour objectif de vérifier si la récupération de la croissance, suite à l'ajout d'EDTA au milieu de culture, est le résultat d'une désorption du Cd pris en charge par les cellules.

La deuxième hypothèse générale peut s'exprimer sous la forme de quatre sous-hypothèses; la récupération de la croissance nécessitera:

- H<sub>2.1</sub>: une augmentation de la synthèse et des quotas cellulaires en lipides;
- H<sub>2.2</sub>: une augmentation du taux de respiration et de la respiration des lipides;
- H<sub>2.3</sub>: une augmentation des teneurs cellulaires en ATP.
- H<sub>2.4</sub>: une augmentation de la synthèse de protéines;

Certains processus physiologiques impliqués dans la récupération de la croissance sont mis en évidence au moyen des expériences décrites aux chapitres 6 et 7. Le chapitre 6 porte sur le rôle de la photosynthèse dans la récupération de la croissance et a servi à vérifier les sous-hypothèses H<sub>2.1</sub> et H<sub>2.4</sub>. La vérification des sous-hypothèses H<sub>2.2</sub> et H<sub>2.3</sub> est l'objectif des expériences présentées à l'intérieur du chapitre 7. La première expérience dans ce chapitre a pour but de mesurer les quotas cellulaires en nucléotides adénylates (ATP et ADP), en lipides, en protéines et en polysaccharides pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération. La mesure des taux de respiration et de l'utilisation des macromolécules comme substrat respiratoire pendant ces deux périodes a fait l'objet de la seconde expérience décrite dans le chapitre 7.

Les chapitres 4, 5, 6 et 7 sont des chapitres indépendants comprenant chacun une introduction, une section traitant du matériel et des méthodes propres à chaque expérience, une section résultats et discussion ainsi qu'une conclusion.

Finalement, le chapitre 8 présente l'ensemble des conclusions découlant des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse.

## **Chapitre 2**

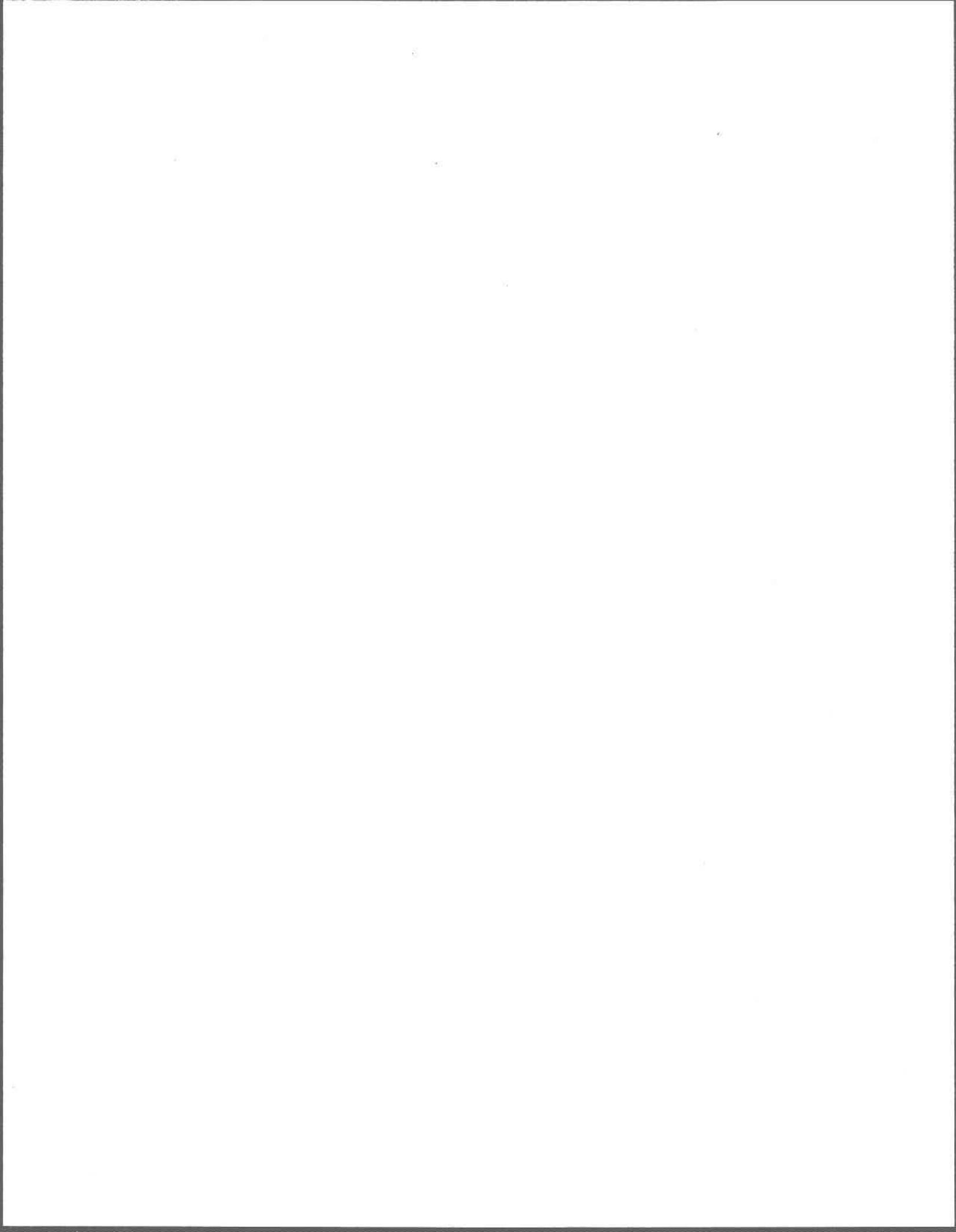
### **Problématique et état des connaissances**

## 2.1 Problématique

### 2.1.1 Structure des communautés phytoplanctoniques

La structure des communautés phytoplanctoniques est d'une part, le résultat de la capacité compétitive des diverses espèces pour les ressources du milieu (Dugdale 1967; Tilman 1977; Smith et Kalff 1983), et d'autre part, du broutage exercé par le zooplancton herbivore. La capacité compétitive des espèces est liée à l'efficacité de processus physiologiques permettant un ajustement aux fluctuations de l'environnement externe afin de maintenir un taux de croissance ( $\mu$ ) s'approchant de  $\mu_{\max}$  (Harris 1984). Le succès compétitif d'une espèce algale est donc fonction de son taux de croissance.

Par ailleurs, dans les écosystèmes perturbés par des apports en substances toxiques, l'abondance des producteurs primaires ainsi que la structure des communautés peuvent être modifiées selon la sensibilité des diverses espèces aux substances toxiques présentes dans l'environnement. La communauté pourra être dominée par des espèces résistantes qui étaient jusqu'à peu importantes parce que moins favorisées par les conditions environnementales prévalant à cette période. En plus de modifier la capacité compétitive des diverses espèces en sélectionnant les espèces les plus résistantes (Mosser et al. 1972; Fisher et al. 1974; Harrison et al. 1977; Thomas et Seibert 1977; Gächter et Mares 1979; Li 1984; Thompson et Côté 1985), les substances toxiques peuvent agir indirectement sur les communautés phytoplanctoniques en réduisant le broutage par l'inhibition du zooplancton (Thomas et al. 1977; Borgmann et al. 1989).



Le taux de croissance est la résultante de l'intégration par les cellules des conditions prévalant dans le milieu, et, à cet égard, il est important de connaître l'impact des substances toxiques sur le taux de croissance. Les difficultés de prédiction des impacts de substances toxiques sur les populations et communautés indigènes proviennent en partie du peu d'information dont nous disposons concernant l'effet des toxiques sur la croissance algale (Goudey 1987), mais également de notre ignorance de la capacité d'acclimatation et de récupération des algues planctoniques à des substances toxiques. Les critères de qualité de l'eau, établis à partir de données de toxicité obtenues au laboratoire, ne tiennent généralement pas compte de l'acclimatation. La majorité des bioessais sont, en effet, de courte durée ( $\leq 96$  h) et utilisent des organismes n'ayant jamais été exposés à la substance testée (Chapman 1985). Or, il semble que le phytoplancton possède une grande capacité à s'acclimater à des substances toxiques. Stockner et Antia (1976) citent de nombreux exemples où la croissance d'algues exposées à diverses substances toxiques débute après une période d'acclimatation de plusieurs jours. De plus, les cellules acclimatées peuvent tolérer le niveau de pollution chronique auquel elles ont été préalablement exposées et peuvent acquérir une tolérance à des concentrations plus élevées de la substance toxique (Stockner et Antia 1976).

Les processus d'acclimatation et de récupération doivent être considérés comme des facteurs déterminants agissant sur la structure des communautés de producteurs primaires. En effet, pour conserver ou retrouver leur position au sein de la communauté, les diverses populations doivent être en mesure de maintenir leur taux de croissance ou de recommencer à croître

lorsque les conditions défavorables auront disparu. Au niveau cellulaire, ceci est rendu possible par des ajustements biochimiques, physiologiques et ultra-structuraux qui aident à maintenir l'homéostasie des cellules (Rand et Petrocelli 1985).

### 2.1.2 Processus de résistance aux ions métalliques

De nombreux travaux descriptifs ont fait état, dans des milieux chroniquement pollués par les métaux, de la présence d'espèces (phytoplancton, périphyton et macrophyte) tolérantes ou résistantes. Le terme tolérance se réfère à une espèce qui est normalement sensible aux métaux en l'absence d'une pollution par les métaux; tandis qu'une espèce sera "résistante" qu'elle ait ou non été en contact avec des métaux (Foster 1982). Foster (1981) a conclu que certaines associations d'espèces algales étaient indicatrices d'une pollution par les métaux. Par ailleurs, le degré de contamination et non un métal en particulier déterminait quelles espèces étaient présentes. Cette auteure avait alors fait l'hypothèse que les algues étaient soit généralement résistantes aux métaux ou qu'elles s'adaptaient facilement à des concentrations élevées de métaux dans l'environnement. D'autres exemples proviennent des travaux de Stokes et al. (1973) qui ont démontré que deux Chlorophycées, Scenedesmus auctiformis et Chlorella fusca, isolées de lacs fortement contaminés en cuivre et en nickel, étaient plus tolérantes à ces métaux que des souches des mêmes espèces cultivées au laboratoire. Par ailleurs, Stokes (1975) a démontré que ces espèces pouvaient perdre leur tolérance au Cu lorsqu'elles étaient cultivées dans des milieux où le Cu était absent. Say et al. (1977) ont, pour leur part, démontré que des populations de trois espèces de la Chlorophycée

filamenteuse Horomidium provenant de cours d'eau fortement contaminés avec le zinc étaient plus tolérantes à de fortes concentrations de ce métal que ne l'étaient des populations originaires de milieux non-pollués. Dans une étude comportant 87 espèces de Chlorophycées isolées de sites contaminés à divers degrés par des métaux, Foster (1982) a tiré plusieurs conclusions concernant la résistance aux métaux:

- 1) quelques espèces résistantes sont présentes naturellement dans des sites non-pollués;
- 2) les communautés algales présentes dans des milieux contaminés sont constituées d'espèces résistantes et d'espèces dont la résistance est de faible à modérée;
- 3) plusieurs espèces de Volvocales-Tetrasporales sont naturellement résistantes aux métaux, particulièrement au Cd;
- 4) les Chlorococcaceae sont toutes sensibles au Cu, même lorsqu'elles proviennent de sites fortement contaminés par le Cu;
- 5) chez les Oocystaceae la tolérance est toujours plus importante aux sites présentant des concentrations élevées de métaux.

De toute évidence, l'importance des effets des métaux sur les producteurs primaires dépendront des espèces colonisant le milieu récepteur. Il faut également considérer qu'un grand nombre d'espèces algales peuvent accroître leur tolérance aux métaux lorsqu'elles y ont été préalablement exposées. Toutefois, il existe peu d'information concernant les ajustements métaboliques qui permettent à ces espèces de survivre et de croître dans des conditions peu propices pour la croissance d'autres espèces. À cet égard,

l'étude de Li (1979) suggère que l'acclimatation au Cd serait plus particulièrement reliée à une modification du métabolisme des protéines. En effet, chez Thalassiosira weissflogii la croissance en présence de Cd est accompagnée de rapports protéine/polysaccharide, protéine/ADN et protéine/ARN plus élevés que chez la population témoin maintenue au même taux de croissance.

Stokes (1983) a suggéré que la tolérance aux métaux pourrait être le résultat de mécanismes permettant:

- 1) d'empêcher ou de retarder la pénétration des métaux à l'intérieur des cellules;
- 2) d'expulser les métaux hors de la cellule lorsqu'ils y ont pénétré;
- 3) de détoxiquer les métaux présents dans la cellule.

### Exclusion

L'hypothèse de l'exclusion des métaux en tant que processus de résistance semble controversée. Certaines études révèlent de plus faibles teneurs en métaux chez des souches tolérantes, tandis que d'autres démontrent le contraire. Par exemple, Stokes (1981) a démontré que chez Scenedesmus les teneurs cellulaires en Cu étaient plus élevées dans les cellules tolérantes que dans les cellules sensibles au Cu, tandis que Bariaud et al. (1985) ont observé une plus grande accumulation de Cd par les cellules non-résistantes d'Euglena gracilis par rapport à des cellules d'une souche résistante au Cd. Les travaux de Li (1980) suggèrent que la récupération de la croissance de populations d'Isochrysis galbana exposées au Cd n'était pas le résultat de l'apparition

d'un processus d'exclusion du métal. Par ailleurs, les travaux de Foster (1977) ont démontré que lorsqu'une souche tolérante au Cu de Chlorella vulgaris était exposée à de plus fortes concentrations de cet ion métallique qu'une souche sensible, les concentrations de Cu à l'intérieur des cellules de ces deux souches étaient identiques lorsque les taux de croissance étaient semblables. Cette espèce semble donc retarder l'entrée de Cu dans les cellules et l'inhibition de la croissance est reliée aux teneurs cellulaires en métaux et non aux concentrations de Cu à l'extérieur des cellules. De Filippis et Pallaghy (1976) ont pour leur part observé que le développement de la tolérance pour le Zn chez Chlorella sp. était relié à un phénomène d'exclusion du métal. Ces auteurs suggèrent par ailleurs que l'exclusion du Zn serait le résultat de l'inhibition de la phase active de l'absorption de l'ion métallique. Il est difficile d'expliquer, à partir des informations disponibles, les différences observées. On ne peut en effet conclure à un processus différent selon les métaux, car, par exemple, le Cu est exclu par C. vulgaris (Foster 1977) mais se retrouve en plus forte concentration chez Scenedesmus sp. (Stokes 1981). Il se pourrait, toutefois, que les mécanismes de tolérance ne soient pas les mêmes d'une espèce à l'autre.

### Séquestration

Plusieurs travaux ont mis en évidence des processus intracellulaires de séquestration des métaux. Les effets toxiques des métaux pour les cellules algales pourraient être réduits ou éliminés par la complexation des ions métalliques à des sites qui ne participent pas au métabolisme. Ceci aurait pour

effet de protéger les enzymes sensibles aux effets des métaux en réduisant leur biodisponibilité à l'intérieur de la cellule (Davies 1976).

Les granules de polyphosphates pourraient jouer un rôle dans la séquestration des métaux. En effet, Sicko-Goad et Stoermer (1979) ont démontré que le Pb pouvait être incorporé dans les granules de polyphosphates. Jensen et al. (1982) et Rachlin et al. (1984) ont, pour leur part, démontré que le Cd absorbé par les Cyanophycées Plectonema boryanum et Anabaena flos-aquae se retrouvait en association avec les granules de polyphosphates. Par ailleurs, d'autres travaux ont démontré que chez des Cyanophycées une exposition au Cd entraînait une augmentation du nombre (Sicko-Goad et Lazinsky 1981) et de la taille (Lazinsky et Sicko-Goad 1983) des granules de polyphosphates. Ces granules sont des inclusions inertes constituant des réserves de phosphate (Rhee 1972, 1973; Aitchison et Butt 1973) et conséquemment, seule une limitation en phosphate pourrait modifier la disponibilité des métaux pour des sites intracellulaires. Toutefois, ce mécanisme de séquestration des métaux pourraient ne pas être utilisé par les cellules algales en milieu naturel. Le phosphore est reconnu comme étant un élément limitant la croissance du phytoplancton en eau douce (Schindler 1974; Healey et Hendzel 1980) et dans ces conditions il est peu probable que des granules de polyphosphates puissent être formées dans les cellules. En effet, selon Cembella et al. (1984) seules les cellules algales exposées à des conditions d'excès de phosphore inorganique accumulent des quantités importantes de polyphosphate.

D'autres sites de séquestration des métaux ont été identifiés chez les algues. Par exemple, Silverberg et al. (1976) ont observé la présence de

complexes de cuivre dans des inclusions localisées à l'intérieur du noyau de cellules de Scenedesmus tolérantes au Cu. Selon ces auteurs, le noyau constituerait un site de détoxification du Cu. Les protéines complexantes de type métallothionéine pourraient également être impliquées dans le processus de séquestration des métaux. Ces protéines, caractérisées par leur faible poids moléculaire (~ 10 000) et par leur contenu élevé en soufre (présence de cystéine), ont été observées chez des algues exposées au Cd (Hart et Bertram 1980; Nagano et al. 1984; Heuillet et al. 1988).

Malgré la mise en évidence de divers sites intracellulaires pouvant complexer les métaux et l'hypothèse généralement avancée que ces processus confèrent une tolérance accrue aux métaux, à notre connaissance aucune expérience n'a formellement démontré que ces processus pouvaient véritablement réduire les effets toxiques des métaux et permettre une reprise de la croissance de populations phytoplanctoniques exposées à des ions métalliques.

Par ailleurs, nous possédons peu d'information concernant les ajustements métaboliques permettant d'une part, l'induction de processus de séquestration des métaux, et d'autre part, la croissance des espèces tolérantes dans des conditions peu propices pour plusieurs espèces. Ces lacunes dans l'état de nos connaissances créent une situation qui contraint l'élaboration de modèles prédictifs de l'impact d'un rejet de métaux toxiques sur les producteurs primaires.

Il apparaît donc important d'acquérir des connaissances sur les processus physiologiques impliqués dans l'acclimatation et dans la récupération

de la croissance suite à des agressions toxiques. Ceci est d'autant plus important que dans des conditions naturelles, les communautés phyto-planctoniques peuvent être exposées à des substances toxiques pendant des périodes relativement courtes, par exemple, lorsque des communautés lotiques sont transportées de l'amont vers l'aval d'une décharge d'effluent. Par ailleurs, la biodisponibilité de la substance toxique libérée dans l'environnement peut varier dans le temps en raison de processus tels que la dilution par les eaux réceptrices, par l'adsorption des contaminants à des particules en suspension, par sédimentation et par complexation à des ligands organiques et inorganiques.

Le présent travail se situe dans ce contexte et a pour objectif de mettre en évidence les processus physiologiques impliqués dans la récupération de la croissance d'une algue exposée au Cd. Le choix du Cd semble tout indiqué, puisque cet élément est classé parmi les métaux traces posant le plus de risques pour l'environnement (Karez et al. 1989). Ce risque provient d'une part du fait que les activités humaines contribuent considérablement à modifier le cycle du Cd dans le milieu aquatique. Le Cd est, en effet, un élément rare dont la concentration dans la lithosphère varie entre 0.1 et 0.2  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (Nriagu 1980) et dont les principales sources sont les eaux usées industrielles et municipales (Raspor 1980) ainsi que (dans les régions éloignées) les retombées atmosphériques. D'autre part, la grande affinité du Cd pour les groupements sulfhydryl facilite sa bioaccumulation. Par ailleurs, les effets toxiques du Cd sont relativement bien documentés (c.f. les revues de Trevors et al. 1986 et de Wong 1987). De plus, un travail antérieur suggère que l'activation du métabolisme de l'ATP est impliquée dans la récupération de la croissance de cellules de Selenastrum capricornutum exposé au Cd et à un effluent industriel

suite à leur transfert dans un milieu non-contaminé (Thompson et al. 1987; Couture et al. 1989) (c.f. Annexe II). Marquis (1989) a démontré que chez S. capricornutum l'accumulation de Cd se fait préférentiellement dans la classe de protéines de faible poids moléculaire dont une augmentation de synthèse est induite par la présence de Cd. Selon cette auteure un polymère de glutathion, une phytochélatine, pourrait être impliqué et constituerait un élément majeur du mécanisme de tolérance au Cd. En effet, l'exposition de plantes supérieures (Grill et al. 1985, 1987) et d'algues (Gekeler et al. 1988) à plusieurs ions métalliques ( $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ) résulte en l'induction de phytochélatines. Cette peptide (( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly; n = 2-11), formée à partir du glutathion, complexerait plus de 90% du Cd pris en charge par les cellules et constituerait un mécanisme de détoxification des métaux et de régulation du métabolisme des métaux essentiels à la croissance (Grill et al. 1985, 1987).

Nous proposons d'aborder cette problématique sous l'angle d'un modèle simple d'ajustements physiologiques d'algues unicellulaires et des évènements du métabolisme associés au processus de division cellulaire. À notre connaissance, une telle approche n'a encore jamais été utilisée dans l'étude de l'acclimatation et de la récupération à une agression toxique. Elle constitue l'originalité de cette thèse.

## 2.2 Croissance algale

### 2.2.1 Modèle de la croissance d'algues unicellulaires

L'assimilation des éléments nutritifs et la photosynthèse peuvent être considérées comme les processus clés de la croissance du phytoplancton.

Ces processus fournissent en effet, les éléments (C, N, P, S, etc.) et l'énergie (ATP) nécessaire à la synthèse des macromolécules et à la division cellulaire. La régulation de ces activités métaboliques est complexe et de nombreux facteurs reliés à des conditions environnementales même passées interviennent (Zevenboom 1986). Conséquemment, le taux de croissance et la composition des algues unicellulaires varieront en réponse à des modifications des conditions environnementales (ex.: lumière, disponibilité des nutriments, température) (Steemann Nielsen et Jorgensen 1968; Morris et al. 1974; Beardall et Morris 1976). Ces constatations ont servi au développement d'un modèle simple d'ajustements physiologiques chez les algues unicellulaires. Ce modèle, proposé par Shuter (1979), est basé sur la répartition du carbone cellulaire en quatre compartiments distincts:

- 1) le carbone associé à l'appareil photosynthétique (pigments, chloroplaste, enzymes du cycle de Calvin) responsable de la conversion du carbone inorganique en carbone organique emmagasiné dans les produits de réserve (hydrates de carbone, lipides);
- 2) le carbone associé à l'appareil de synthèse (ex.: ribosomes, mitochondries) impliqué directement dans la conversion des produits de réserve en matériaux cellulaires fonctionnels (ex.: protéines);
- 3) le carbone associé aux matériaux de structure qui ne sont pas impliqués directement dans le processus de croissance mais qui sont, toutefois, essentiels au maintien de l'intégrité des cellules (ex.: parois et membranes cellulaires, matériel génétique);
- 4) le carbone associé aux produits de réserve (hydrates de carbone et lipides).

Selon ce modèle, la croissance nécessite un flux de carbone des produits de réserve vers les compartiments fonctionnels. De plus, le carbone sera alloué aux divers compartiments de façon à maximiser la croissance dans les conditions environnementales prévalant dans le milieu.

### 2.2.2 Allocation de carbone et limitation de la croissance

Une partie importante du carbone assimilé par la photosynthèse est allouée à la synthèse de protéines lorsque la croissance n'est pas limitée par les conditions environnementales (Morris 1981; Smith et Geider 1985). Par exemple, Harding et al. (1985) ont observé que sur une période de 24 h, des cultures de phytoplancton en croissance active allouaient aux protéines approximativement entre 40 et plus de 50% du carbone assimilé. Hama et al. (1988) ont démontré que pendant un "bloom" phytoplanctonique, observé dans un enclos localisé dans Saanich Inlet (Colombie Britannique), les protéines étaient très abondantes et représentaient plus de 50% de la production totale en carbone organique. Toutefois, des conditions limitantes pour la croissance, comme par exemple l'appauvrissement en éléments nutritifs résultant de plusieurs jours de croissance en culture statique (batch culture), induiront une diminution de la synthèse de protéines et une augmentation de la synthèse d'hydrates de carbone et de lipides (Collyer et Fogg 1955; Mykkestad 1974; Morris 1981). En milieu naturel, une augmentation de la synthèse d'hydrates de carbone au détriment des protéines a également été observée à la fin de "blooms" phytoplanctoniques lorsque les nutriments deviennent limitants (Hitchcock 1978; Morris et Skea 1978; Lancelot 1984). Les faibles températures peuvent également contrôler la croissance et donc, entraîner d'une part une

diminution de l'incorporation de carbone dans les protéines, et d'autre part une augmentation du carbone dans les produits de réserve. Morris et al. (1974) ont observé cet effet d'une diminution de la température chez des populations de la diatomée Phaedactylum tricornutum maintenues au laboratoire.

Les modifications de la synthèse des macromolécules en réponse à diverses conditions environnementales visent à maximiser le taux de croissance. Selon Parnas et Cohen (1976), il existe chez les microorganismes une stratégie pour optimiser le métabolisme des produits de réserve. L'accumulation de produits de réserve lors de conditions peu propices à la croissance constitue une économie pour les cellules puisque ces réserves pourront être converties en protéines au retour de conditions plus favorables. Par ailleurs, dans des conditions limitantes pour la photosynthèse, le catabolisme de ces produits de réserve peut rencontrer les besoins énergétiques des cellules et ainsi maintenir la viabilité des cellules jusqu'au retour de conditions propices à la croissance (Cook 1963, 1966; Handa 1969; Hitchcock 1980; Raven et Beardall 1981). Par exemple, Handa (1969) a démontré que chez Skeletonema costatum, la respiration des produits de réserve, particulièrement les polysaccharides, pouvait maintenir les cellules vivantes pendant plusieurs jours à l'obscurité. Fisher et Schwarzenbach (1978) ont démontré qu'à l'obscurité les besoins énergétiques de la diatomée Thalassiosira pseudonana étaient rencontrés par l'oxydation complète ou partielle des lipides (triglycérides). Dans des conditions où la disponibilité des éléments nutritifs et de l'énergie lumineuse dépassent les besoins immédiats des cellules, un stockage de produits de réserve permet une utilisation ultérieure de ces ressources.

### 2.2.3 Limitation de la croissance par le cadmium

L'extension de l'application de ce modèle d'ajustements physiologiques aux ions métalliques comme facteur limitant la croissance nous amène à faire l'hypothèse (H<sub>1</sub>) que des populations de S. capricornutum répondront à une exposition à des concentrations inhibitrices de Cd en augmentant leur quota cellulaire en produits de réserve. Le Cd est, en effet, susceptible d'agir sur l'assimilation des éléments nutritifs et sur la photosynthèse, les deux processus clés de la croissance du phytoplancton.

Les travaux de Peterson et al. (1984) et Peterson et Healey (1985) démontrent que le Cd inhibe l'assimilation du nitrate, de l'ammonium et du phosphate chez la Chlorophycée Scenedesmus quadricauda. Les concentrations de Cd inhibant 50% de l'assimilation de ces éléments nutritifs étaient respectivement 1090, 880 et 1800  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  à pH 7. Par ailleurs, l'inhibition de la prise en charge des éléments nutritifs diminuait avec le pH, en raison de la compétition entre les ions H<sup>+</sup> et Cd<sup>2+</sup> pour les sites membranaires. Singh et Yadava (1983) ont démontré que le Cd inhibe l'assimilation du nitrate chez la Cyanophycée Anacystis nidulans. Cet effet était cependant observé à une concentration de Cd très élevée (CE<sub>50</sub> = 4000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) par rapport aux concentrations retrouvées dans l'environnement qui peuvent atteindre des niveaux de 15-20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans les eaux réceptrices d'effluents contaminés en Cd (Moore et Ramamoorthy 1984).

Les concentrations de Cd qui inhibent la photosynthèse du phytoplancton sont également très variables. Par exemple, des concentrations de

Cd inférieures à  $10 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  ont significativement perturbé l'assimilation de carbone de communautés naturelles de phytoplancton (Marshall et al. 1983), et de cultures d'Asterionella formosa (Conway et Williams 1979), de S. capricornutum (Couture et al. 1986) et de Spirulina platensis (Azeez et Banerjee 1986). Par contre des concentrations aussi élevées que 500 et  $1000 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  étaient nécessaires pour inhiber l'assimilation de carbone d'Ankistrodesmus falcatus (Wong et al. 1979), de communautés phytoplanctoniques en microcosmes (Nicholas et Abernathy 1987), et d'Anacystis nidulans (Azeez et Banerjee 1986).

Malgré ces différences interspécifiques de sensibilité, l'effet du Cd sur l'assimilation du carbone et des éléments nutritifs semble généralisé. Les populations phytoplanctoniques exposées à des concentrations élevées de Cd devraient donc subir une limitation en éléments nutritifs et conséquemment les cellules devraient réagir à ces carences en diminuant la synthèse de protéines au profit d'une augmentation de la synthèse de produits de réserve ( $H_1$ ). Prévot et Soyer-Gobillard (1986) ont d'ailleurs observé une accumulation de vésicules de lipides et de polysaccharides chez deux espèces de dinoflagellés exposées simultanément au Cd et au Se. Par ailleurs, les quotas cellulaires en lipides chez Scenedesmus bijugatus ont augmenté de 30 et 75% après 12 jours d'exposition à 10 et  $50 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Sathya et Balakrishnan 1988). L'hypothèse d'une accumulation de produits de réserve en réponse à des concentrations de métaux inhibant la croissance est également soutenue par les travaux de Bastien et Côté (1989) concernant la Chlorophycée S. quadricauda exposée à  $250 \mu\text{g Cu}\cdot\text{L}^{-1}$ . En effet, l'inhibition marquée de la croissance pendant les 15 premiers jours de l'expérience était accompagnée d'une accumulation très

importante d'amidon et de lipides, alors que la reprise de la croissance après 22 jours de contact avec le Cu était accompagnée d'une disparition graduelle des produits de réserve (Bastien et Côté 1989).

Signalons enfin que nos travaux vérifieront aussi le corollaire de l'hypothèse H<sub>1</sub>, à savoir que la récupération de la croissance, suite à une exposition à des concentrations sous-léthales de Cd, sera accompagnée d'une augmentation de la synthèse de protéines (H<sub>2.4</sub>).

## 2.3 Besoins énergétiques des cellules algales

### 2.3.1 Contribution relative de la photophosphorylation et de la phosphorylation oxydative

Chez les organismes chlorophylliens le rôle de la photosynthèse ne se limite pas à fournir le carbone nécessaire à la biosynthèse. En présence de lumière, les coûts métaboliques, en termes d'ATP et d'agent réducteur (NADPH), associés aux processus d'entretien des cellules (Penning de Vries 1975) ainsi qu'à la synthèse de nouveaux matériaux cellulaires sont supportés principalement par la photophosphorylation (Raven 1976; Harris 1978). Ainsi pendant les périodes d'activité photosynthétique, le taux de phosphorylation oxydative sera réduit relativement à l'activité respiratoire mesurée à l'obscurité. Il semble par ailleurs que la photosynthèse inhibe la respiration (Myers et al. 1983; Sandmann et Malkin 1983; Doming et Williams 1987). Cette photoinhibition de la respiration serait reliée au transport cyclique d'électrons couplé à la photophosphorylation (Sargent et Taylor 1972) et

impliquerait le photosystème I (Healey et Myers 1971; Simonis et Urbach 1973). La photoinhibition de la respiration pourrait s'expliquer par une compétition entre la cytochrome oxydase et le photosystème I pour le NADPH (Sandmann et Malkin 1983).

L'activité relative de ces deux voies métaboliques (photo-phosphorylation et phosphorylation oxydative) semble régulée par les rapports entre nucléotides adénylates (Ried et al. 1973; Simonis et Urbach 1973; Mangat et al. 1974; Harris 1978). Pendant les périodes éclairées, une diminution de l'activité photosynthétique ou une augmentation des besoins énergétiques des cellules résulteront en une augmentation du taux de respiration, ceci afin de rétablir les rapports entre nucléotides adénylates, comblant ainsi les besoins énergétiques des cellules. Dans cette optique, il se pourrait que l'inhibition de la photosynthèse par le Cd entraîne une augmentation du taux de respiration. Plusieurs travaux suggèrent que le Cd interfère avec les réactions photo-chimiques de la photosynthèse (Li et Miles 1975; Van Duijvendijk-Matteoli et Desmet 1975; Baszynski et al. 1980). Le site d'action du Cd se situerait au niveau des sites de transport d'électrons et de photolyse de l'eau du photosystème II ainsi qu'au niveau de l'enzyme NADP-oxydoréductase (De Filippis et al. 1981a). De Filippis et al. (1981b) ont, de plus, démontré que l'exposition au Cd ( $11 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) entraînait une diminution du rapport ATP/ADP chez Euglena sp.

### 2.3.2 Besoins énergétiques de cellules exposées à des substances toxiques

Dans le cas d'une perturbation de la photosynthèse par le Cd, les besoins énergétiques des cellules pourront être satisfaits par la respiration

dans la mesure où cette voie métabolique n'est pas elle-même inhibée par le Cd. Or, les informations disponibles à ce sujet semblent contradictoires. En effet, les études concernant l'ultrastructure ont démontré que le Cd, à des concentrations variant entre 30 et 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , endommageait les mitochondries (Silverberg 1976; Lue-Kim et al. 1980). Soyer et Prévot (1981) suggèrent d'ailleurs que la perturbation de la structure des mitochondries est un effet spécifique du Cd sur les algues. Cependant, Sathya et Balakrishnan (1988) ont observé une inhibition de la respiration de populations de Scenedesmus bijugatus exposées à 10 et 30  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , tandis que la respiration était stimulée chez la population exposée à 50  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . Lee et al. (1976) ont observé un comportement similaire chez des plantules de fève soya, où une exposition à 101 et 152  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  provoquait une stimulation de la respiration alors que la respiration était inhibée par une concentration de 51  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Une augmentation du taux de respiration pourrait également être le résultat d'une demande accrue en ATP due à des conditions de stress (Raven et Beardall 1981; Relexans et al. 1988). Les besoins énergétiques reliés à l'entretien des cellules, comme par exemple la synthèse de molécules instables (ex. ATP) ou le transport actif récupérant les ions perdus à travers la membrane (Penning de Vries 1975), pourront augmenter en présence de contaminants. Le Cd et le Hg, par exemple, perturbent plusieurs fonctions membranaires telles que la perméabilité aux ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  et le transport moléculaire (Jones et al. 1987).

En plus des cas d'augmentation de la respiration de cellules végétales exposées au Cd mentionnés précédemment, d'autres travaux mettent en

évidence une stimulation de la respiration chez des organismes exposés à des substances toxiques. Par exemple, McBrien et Hassall (1967) ont observé une stimulation de la respiration lorsque Chlorella vulgaris était exposé au Cu dans des conditions aérobies. Par ailleurs, lorsque la respiration était stimulée, le taux de croissance de la population exposée au Cu était semblable à celui de la population témoin. Bien qu'ils n'aient pas effectué de mesure de la respiration, McNaught et al. (1984) ont émis l'hypothèse que le taux de respiration de populations phytoplanctoniques exposées à des BPC (biphényl polychloré) était supérieur à celui de populations témoins. Relexans et al. (1988) ont, pour leur part, observé une augmentation de la respiration de communautés benthiques exposées au Cd et au B-a-P (benzo-[a]-pyrène), tandis que chez ces communautés le Zn inhibait la respiration. Selon ces auteurs, la respiration constitue un processus de résistance aux substances toxiques; dans le cas où soit la nature soit les doses du polluant ne permettent pas le maintien ou la récupération de cette voie métabolique de synthèse d'ATP, il y a empoisonnement et mort de la cellule. Stout et Kilham (1983) ont observé une inhibition de la photosynthèse et une augmentation de la respiration chez des populations de Spirogyra exposées au p-crésol. Contrairement à l'hypothèse de l'activation de la respiration en tant que processus de résistance émise par Relexans et al. (1988), Stout et Kilham (1983) attribuent l'augmentation de la respiration observée en présence de p-crésol à un découplage de la respiration et de la photosynthèse par ce phénol.

Malgré les contradictions observées dans les effets du Cd sur la respiration et l'aspect controversé de l'activation de la respiration en réponses à des substances toxiques, nous faisons l'hypothèse (H<sub>2.2</sub>) que le taux

de respiration de populations de S. capricornutum exposées au Cd augmentera afin de combler les besoins des cellules en ATP, soit en raison d'une inhibition de la photosynthèse, ou soit en raison de besoins accrus en énergie dus au stress occasionné par cette agression toxique.

### 2.3.3 Variations dans les besoins énergétiques des cellules

Dans des conditions favorables, les besoins énergétiques des cellules algales varient au cours du cycle de division cellulaire et en fonction du taux de croissance. L'augmentation des besoins énergétiques en relation avec une augmentation du taux de croissance s'explique par le fait que l'ATP est impliqué dans divers processus reliés à la croissance (Karl 1980; Laws et al. 1983). Certaines études ont démontré que les quotas cellulaires en ATP étaient positivement corrélés avec le taux de croissance de populations bactériennes (Neidhardt et Frankel 1961; Bagnara et Finch 1973) et algales (Sakshaug 1977; Rhee 1978; Hunter et Laws 1981; Kunikane et al. 1986). Par ailleurs, il semble exister un quota cellulaire en ATP optimal, nécessaire à l'atteinte de la phase de croissance exponentielle (Karl 1980). Par exemple, les résultats de Kunikane et al. (1986) ont démontré qu'au cours de la croissance de Scenedesmus dimorphus en culture statique, le contenu en ATP des cellules exprimé en  $\mu\text{g ATP}\cdot\text{mg}^{-1}$  poids sec, a augmenté rapidement pour atteindre sa valeur maximum vers le milieu de la phase de croissance exponentielle. Le contenu cellulaire en ATP diminuait ensuite rapidement pour revenir à son niveau initial.

Une telle augmentation du quota cellulaire en ATP reliée à la phase de croissance exponentielle a également été observée chez des populations de

S. capricornutum en culture statique (Thompson et al. 1987). Par ailleurs, au cours de cette étude, la récupération de la croissance de populations préalablement exposées au Cd et à un effluent industriel contenant des ions métalliques n'était observée qu'aux concentrations de toxiques où une augmentation du rapport ATP/cellule se manifestait pendant la période d'exposition. Contrairement à la population témoin, l'augmentation du quota cellulaire en ATP précédait la phase de croissance exponentielle chez les populations où la croissance était fortement inhibée. Dans ce cas, le contenu cellulaire en ATP plus élevé serait plutôt relié à la reprise de la croissance qu'à la croissance exponentielle.

Sundberg et Nilshammar-Holmvall (1975) ont observé, chez une population synchrone de Scenedesmus sp., une augmentation de l'ATP cellulaire au début du cycle cellulaire, c'est-à-dire suite à la division du noyau. Ces auteurs ont observé d'autres manifestations d'une activation du métabolisme reliée à la division cellulaire. Leurs travaux révèlent, en effet, une augmentation du contenu cellulaire en lipides vers la fin de la phase de division nucléaire. Ce produit de réserve disparaît ensuite rapidement au début de la phase de libération des autospores. Par ailleurs, l'augmentation du contenu cellulaire en ATP coïncide avec l'augmentation du taux de respiration et avec la disparition des lipides. Sundberg et Nilshammar-Holmvall (1975) suggèrent que le catabolisme des lipides fournit l'énergie nécessaire à la division cellulaire. Cette hypothèse est supportée par Tillberg et Kylin (1972) qui ont démontré que les acides gras étaient le principal substrat respiratoire des jeunes cellules de Scenedesmus sp., tandis que les cellules matures faisaient appel aux hydrates de carbone. Des travaux plus récents, notamment

avec Chlorella sp. (Guckert et Cooksey 1990) et Melosira granulata (Sicko-Goad 1986; Sicko-Goad et al. 1986), confirment ce rôle des lipides dans le cycle de division cellulaire.

Pendant les périodes de demande accrue d'énergie, comme semble l'être la période de division cellulaire, l'utilisation des lipides comme substrat respiratoire pourrait être avantageuse puisque ces composés sont catabolisés avec un rendement énergétique élevé (Lehninger 1977). Par exemple, l'oxydation complète de l'acide palmitique génère 8 molécules d'ATP par atome de carbone comparativement à 6 molécules d'ATP par atome de carbone dans le cas de l'oxydation complète du glucose (Lehninger 1977).

Chez Scenedesmus sp., le taux de respiration augmente au moment de la libération des autospores et ne diminue qu'à la fin du cycle cellulaire, au moment de la division du noyau (Sundberg et Nilshammar-Holmvall 1975). Selon Mitchison (1971), chez la plupart des cellules en état de croissance le taux de respiration est relié au taux de synthèse des macromolécules. Par ailleurs, le taux de synthèse des protéines augmente exponentiellement suite à la division cellulaire (Howell et Baumgartel 1978). La diminution du taux de respiration au moment de la division du noyau serait attribuable à l'arrêt de synthèse de l'ARN et des protéines pendant cette phase du cycle cellulaire (Mitchison 1971).

En résumé, la division cellulaire et la croissance subséquente des cellules semblent nécessiter une chaîne chronologique d'évènements métaboliques. Dans un premier temps, vers la fin de la phase de division du

noyau, le contenu en lipides des cellules augmente. Par la suite, l'énergie nécessaire à la division de la cellule est fournie par l'utilisation des lipides comme substrat respiratoire. La croissance des cellules nécessite ensuite un taux élevé de synthèse de protéines. Ces connaissances suggèrent que dans les cas où des substances toxiques inhiberaient la croissance en perturbant la division de la cellule, la récupération des populations touchées devrait se manifester par une activation du métabolisme des lipides et de la respiration.

La division cellulaire des algues est inhibée par le Cd (Berland et al. 1977; Conway 1978; Lue-Kim et al. 1980) à des concentrations aussi faible que  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Selon Davies (1976), le Cd perturberait la division cellulaire en se complexant au soufre de la méthionine, un acide aminé impliqué dans la formation du fuseau achromatique. Si tel est le cas on peut émettre l'hypothèse que la reprise de la croissance d'algues exposées au Cd sera accompagnée d'activités métaboliques typiques à cette phase du cycle cellulaire. Selon le schéma décrit au paragraphe précédent, la récupération de la croissance de populations de S. capricornutum exposées au Cd sera accompagnée d'une augmentation des quotas cellulaires en lipides ( $H_{2.1}$ ) et d'une augmentation de la respiration ( $H_{2.2}$ ). L'augmentation du taux de respiration résultera en une augmentation du contenu des cellules en ATP ( $H_{2.3}$ ).

## 2.4 Originalité de l'approche méthodologique

La grande majorité des travaux sur la toxicité du Cd envers les algues planctoniques ont été réalisés dans le but de caractériser les effets de cet ion métallique sur la croissance (Klass et al. 1974; Berland et al. 1977; Conway 1978; Rachlin et al. 1982; Li 1984; Azeez et Banerjee 1986), la photosynthèse (Pietilainen 1975; Hart et Scaife 1977; Wong et al. 1979; De Filippis et al. 1981a; Nicholas et Abernathy 1987), l'assimilation des éléments nutritifs (Burnison et al. 1975; Li 1978; Singh et Yadava 1983; Peterson et al. 1984; Peterson et Healey 1985) ou sur l'ultrastructure (Burnison et al. 1975; Silverberg 1976). Les liens entre les effets observés et la synthèse de macromolécules et la production d'énergie nécessaire à la croissance ne sont pas toujours mis en lumière par les différents auteurs. Il est de plus souvent impossible de juger de la réversibilité des dommages observés. En conséquence, il est difficile de juger de la signification des effets mis en évidence pour des populations qui peuvent être exposées à des substances toxiques de façon intermittente, ou à des concentrations élevées de la forme biodisponible des métaux pour des périodes relativement courtes.

Les hypothèses vérifiées dans cette thèse visent d'une part à placer les manifestations toxiques du Cd dans un cadre permettant de percevoir l'acclimatation des algues à la substance toxique si elle a lieu. Le cadre méthodologique retenu vise, d'autre part, à développer une approche permettant de porter un jugement sur le potentiel de croissance de populations exposées au Cd et plus particulièrement de la persistance des effets toxiques lorsque les conditions du milieu deviennent moins contraignantes pour la croissance.



## **Chapitre 3**

### **Matériel et méthodes générales**



La méthode de culture des algues utilisée pour l'ensemble des travaux faisant partie de cette thèse est présentée ci-dessous. Les travaux ayant servi à la mise au point des méthodes de dosage des nucléotides adénylates, de mesure de la respiration ainsi que du protocole expérimental utilisé pour les expériences sur la récupération (chapitres 5, 6 et 7) font également partie du présent chapitre. Les méthodes s'appliquant plus particulièrement à certaines expériences seront traitées à l'intérieur des sections matériel et méthodes de chacun des chapitres discutant de ces expériences (chapitres 4, 5, 6 et 7)

### 3.1 Méthode de culture

Toutes les expériences faisant partie de cette thèse ont été réalisées avec des cultures asynchrones de la Chlorophycée Selenastrum capricornutum (American Type Culture Collection, souche 22662). Une culture asynchrone est caractérisée par une croissance dite "en équilibre" (balanced growth) pendant laquelle la composition cellulaire de la population est fixe, puisque la quantité des composés cellulaires augmente exponentiellement (Shuter 1979). Les divers composés cellulaires sont synthétisés à des moments précis au cours du cycle cellulaire (Mitchison 1971; Fraser et Nurse 1978), et conséquemment, l'état de croissance "en équilibre" est une propriété de populations de cellules se divisant de façon asynchrone et non de cellules individuelles. Cette caractéristique des populations algales asynchrones permet de comparer le métabolisme de populations perturbées, comme par exemple par l'intoxication au Cd, à celui d'une population témoin en n'ayant pas à tenir compte des évènements du cycle de division cellulaire. Selon Shuter (1979) une culture algale en croissance exponentielle avec un excès d'éléments nutritifs

(culture statique = batch culture) et une température et une illumination constantes s'approche de l'idéal de la croissance en équilibre. La croissance en équilibre ne se retrouve sans doute pas chez des populations naturelles de phytoplancton puisque les conditions environnementales imposent une synchronicité au cycle cellulaire. Toutefois, selon Shuter (1979) la croissance phytoplanctonique peut être considérée en équilibre lorsque l'on tient compte des taux moyens d'assimilation des divers éléments nutritifs sur toute la période du cycle cellulaire imposé par les conditions de l'environnement.

Les cultures de S. capricornutum ayant servi aux diverses expériences étaient maintenues dans des conditions assurant l'asynchronicité. À cette fin, les populations étaient conservées dans une chambre à environnement contrôlé (Conviron, modèle 3023) sous des conditions d'éclairage continu ( $65 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ : intensité lumineuse saturante pour la photosynthèse; c.f. Figure 3.1), à une température de  $22^{\circ}\text{C}$ , avec un apport régulier en éléments nutritifs (milieu de culture AAP modifié, sans EDTA: Chiaudani et Vigni 1978).

Chaque expérience était réalisée en incubant des populations asynchrones dans des bouteilles en polycarbonate de 20 L. Elles étaient maintenues dans les mêmes conditions d'éclairage et de température que celles décrites au paragraphe précédent. Le pH était maintenu à  $7.2 \pm 0.2$  par l'ajout automatique de  $\text{CO}_2$  (Bates et al. 1985) contrôlé à l'aide d'un système automatique (contrôleur de pH Horizon Ecology Co., modèle 5997). Ce contrôle du pH évite la limitation en carbone (Toerien et al. 1971), minimise les modifications dans la spéciation du Cd au cours des expériences et assure la

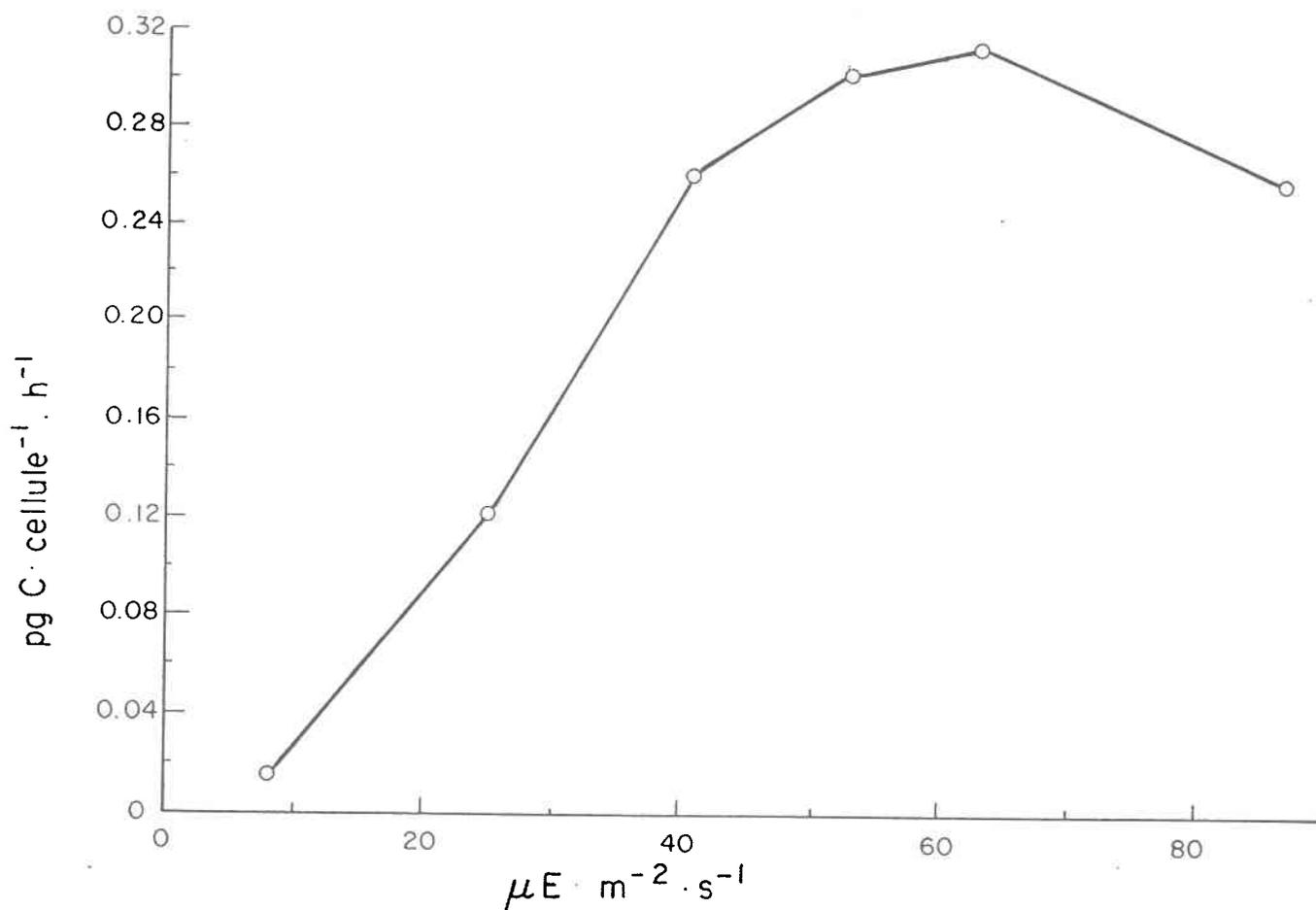


Figure 3.1: Taux de photosynthèse d'une population asynchrone de S. capricornutum en fonction de l'intensité lumineuse (culture témoin; 36 000 cellules · mL<sup>-1</sup>; milieu AAP-EDTA).

prédominance de la forme ionique du Cd (96% du Cd présent sous la forme Cd<sup>2+</sup>: modèle d'équilibres chimiques MINEQL, Westall et al. 1976). Enfin, les cultures étaient agitées au moyen d'un agitateur magnétique en Teflon<sup>R</sup>.

### 3.2 Dénombrement des cellules et mesure de la croissance

#### 3.2.1 Dénombrement

Les cellules étaient comptées quatre fois au moyen d'un compteur électronique de particules muni d'une cellule avec un orifice de 70 µm (Coulter Counter, modèle TA) selon la méthode décrite par le manufacturier et généralement utilisée pour S. capricornutum. Une mesure du volume cellulaire était également obtenue.

#### 3.2.2 Mesure de la croissance

La densité cellulaire maximum ( $X_M$ ) est le paramètre de croissance traditionnellement utilisé lors de bioessais en culture statique (Miller et al. 1978). Il est toutefois difficile de déterminer les facteurs qui contrôlent l'expression de la valeur  $X_M$  (Toerien et al. 1971). En effet,  $X_M$  est fonction de la taille initiale de l'inoculum ( $X_0$ ), du taux de croissance ( $\mu$ ) et du temps requis pour que  $\mu = 0$  ( $t_e$ ) (Figure 3.2).  $X_M$  peut être exprimé par l'équation:

$$X_M = X_0 e^{\mu t_e} \quad (3.1)$$

Le taux de croissance ( $\mu$ ) mesuré pendant la phase exponentielle de croissance (Figure 3.2) apparaît une meilleure mesure de la croissance algale (Toerien et al. 1971). En effet, le taux de croissance  $\mu$  d'un micro-organisme est fonction de la capacité de croissance de l'espèce ( $\mu_{\max}$ ) et des conditions environnementales prévalant au moment de l'expérience. Conséquemment,  $\mu$  devrait être un paramètre permettant une meilleure interprétation des conditions limitantes pour la croissance. Le taux de croissance semble, par ailleurs, être un indicateur sensible de la toxicité des métaux (Hall et al. 1989).

Le taux de croissance a été calculé à partir des données de densité cellulaire au moyen de l'équation suivante:

$$\mu = \frac{\ln X_{n+1} - \ln X_n}{t_{n+1} - t_n} \quad (3.2)$$

où  $X_{n+1}$  = nombre de cellules au temps  $t_{n+1}$   
 $X_n$  = nombre de cellules au temps  $t_n$

(Toerien et al. 1971).

### 3.3 Protocole expérimental des expériences de récupération

#### 3.3.1 Période d'exposition au Cd

Pendant la phase de latence d'une culture statique, les cellules se préparent pour la division cellulaire. Par ailleurs, la période de temps

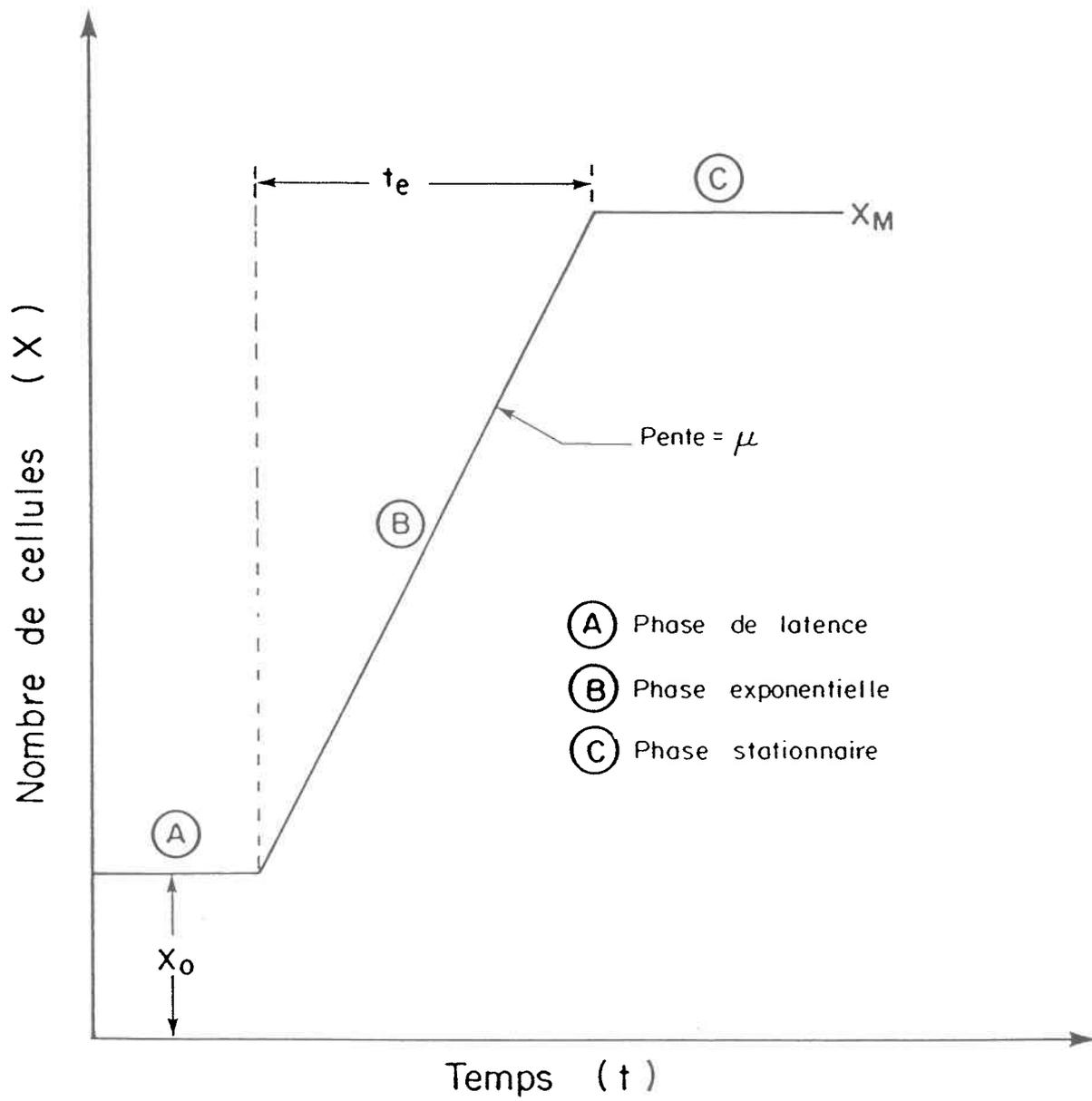


Figure 3.2: Courbe de croissance théorique d'une algue unicellulaire en culture statique.

écoulée entre l'inoculation du milieu de culture et le début de la division cellulaire dépend de l'âge de l'inoculum; c'est-à-dire de l'état physiologique des cellules. Ainsi, l'état physiologique des cellules pendant la phase de latence pourrait être différent d'une expérience à l'autre. Afin d'assurer des conditions physiologiques plus homogènes d'une expérience à l'autre, toutes les expériences ont été initiées au début de la phase exponentielle de croissance. Les expériences ont donc été réalisées au moment où la croissance des populations était "en équilibre" (c.f. section 3.1). Le début de la période d'exposition au Cd de chacune des expériences coïncide avec le début de la phase de croissance exponentielle.

### 3.3.2 Période de récupération

Les expériences présentées aux chapitres 5, 6 et 7 ont pour but de décrire les processus physiologiques impliqués dans la récupération de la croissance, ainsi que les variations dans les teneurs cellulaires en Cd au cours des périodes d'exposition et de récupération. Un protocole expérimental permettant la récupération de la croissance après une exposition au Cd a donc dû être élaboré.

Plusieurs auteurs ont observé la reprise de la croissance d'algues exposées au Cd suite à leur transfert dans du milieu de culture non-contaminé (Cossa 1976; Conway et Williams 1979; Thompson et al. 1987). Thompson et al. (1987) ont cependant observé qu'un tel transfert de S. capricornutum menait à la réapparition d'une phase de latence. Cette méthode de provoquer la désorption ou l'élimination du Cd pris en charge par les cellules et la reprise de la croissance n'a donc pas été retenue pour les fins du présent travail.

Foster et Morel (1982) ainsi que Harrison et Morel (1983) ont démontré que l'inhibition de la croissance de la diatomée Thalassiosira weissflogii par le Cd pouvait être renversée par l'ajout d'EDTA (acide éthylènediaminetetraacétique) au milieu de culture. L'EDTA ( $1.5 \times 10^{-5}M$  et  $2.29 \times 10^{-4}M$ : Harrison et Morel 1983) agissait en diminuant la concentration de l'ion libre de Cd. Leurs résultats suggèrent par ailleurs une reprise de la croissance sans phase de latence préalable. L'ajout d'EDTA directement au milieu de culture apparaissait donc un moyen efficace de provoquer la récupération de la croissance.

Cette méthode a été retenue pour les travaux sur la récupération (chapitres 5, 6 et 7) puisque les résultats d'une expérience préliminaire ont démontré que l'ajout de  $2.67 \times 10^{-6}M$  EDTA, après 48 h de croissance dans les conditions de culture décrites à la section 3.1, n'avait pas d'effet significatif (Tableau 3.1) sur la croissance (Figure 3.3), la photosynthèse (Figure 3.4) et les teneurs cellulaires en ATP (Figure 3.5), de S. capricornutum. L'EDTA semble toutefois améliorer les taux de photosynthèse et ceci pourrait être le résultat d'une augmentation de la disponibilité du fer pour les cellules.

Cette concentration d'EDTA permet de complexer environ 15% de l'ion  $Cd^{2+}$  en solution dans le milieu de culture AAP modifié (Tableau 3.2) (modèle d'équilibres chimiques MINEQL: Westall et al. 1976). Contrairement à des métaux tel que le Cu qui se complexent presque totalement à la matière organique dissoute ou particulaire (Florence 1977), le Cd n'a pas une aussi grande affinité pour ces ligands (Mantoura et al. 1978). Conséquemment la forme  $Cd^{2+}$  peut demeurer importante.

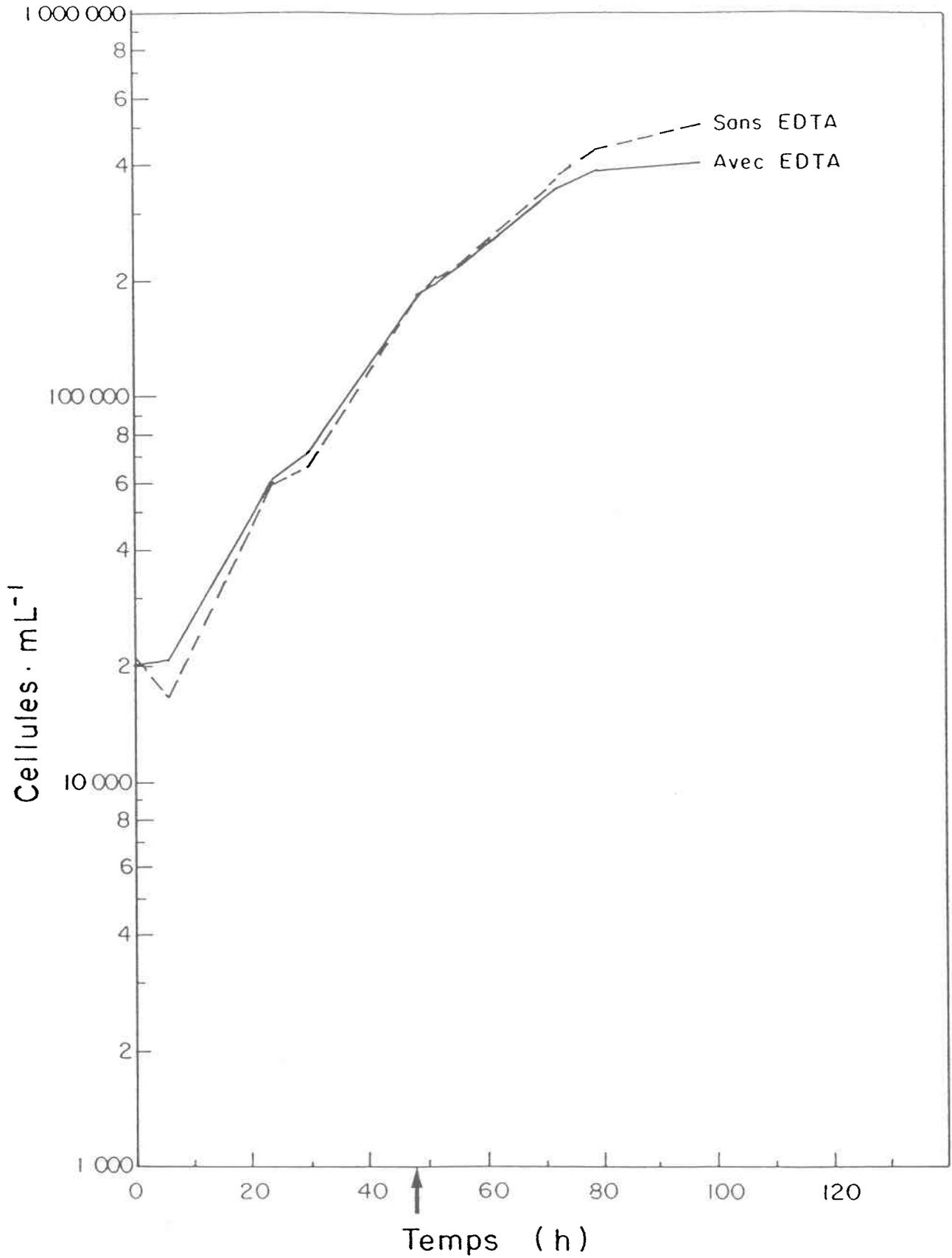


Figure 3.3: Effet de l'ajout de  $2.67 \times 10^{-6}M$  EDTA sur la croissance de *S. capricornutum*. ↑ indique l'heure de l'ajout d'EDTA (milieu AAP-EDTA).

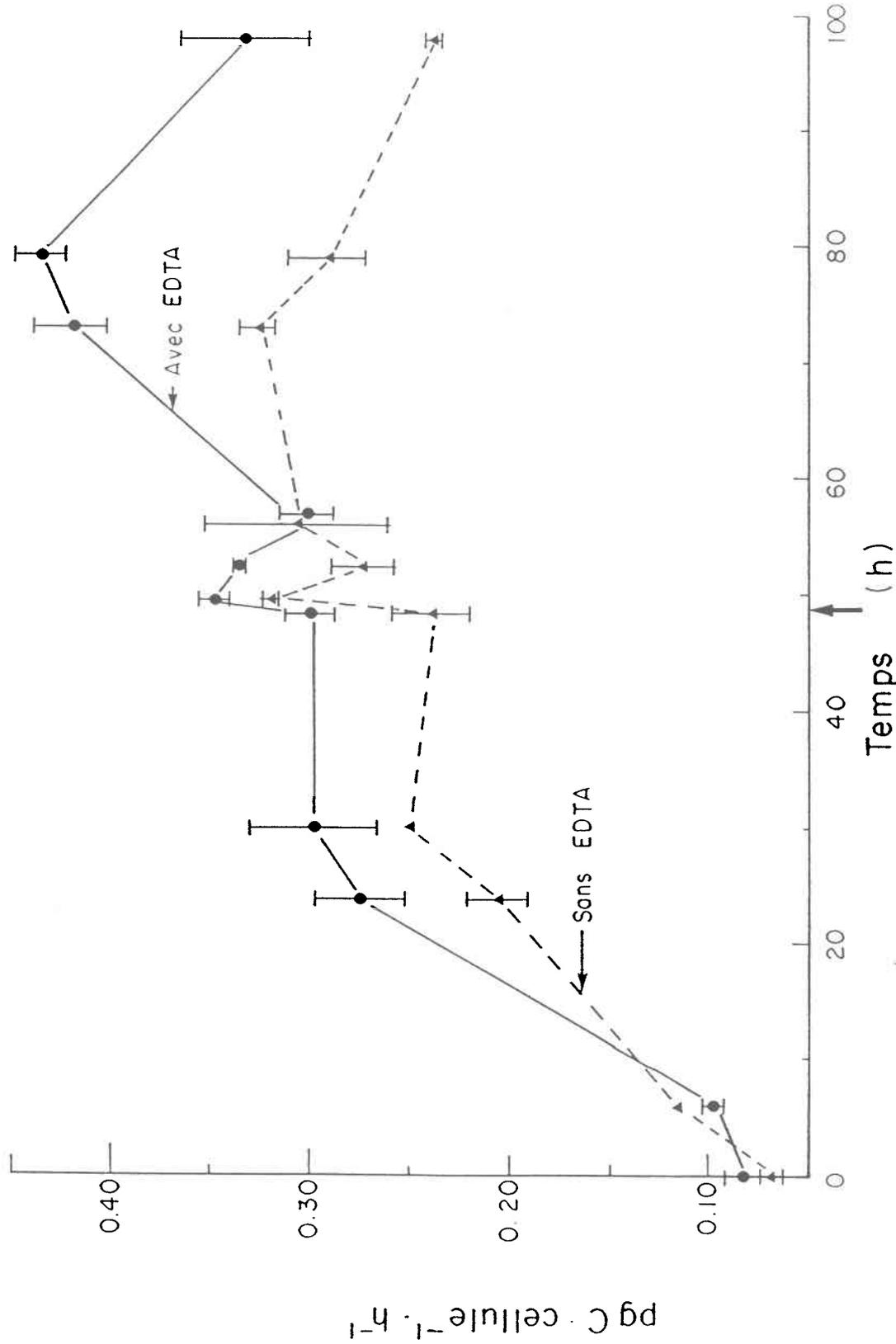


Figure 3.4: Effet de l'ajout de  $2.67 \times 10^{-6}M$  EDTA sur la photosynthèse de S. capricornutum. ↑ indique l'heure de l'ajout d'EDTA (milieu AAP-EDTA; n = 3, pour le nombre de cellules se référer à la figure 3.3).

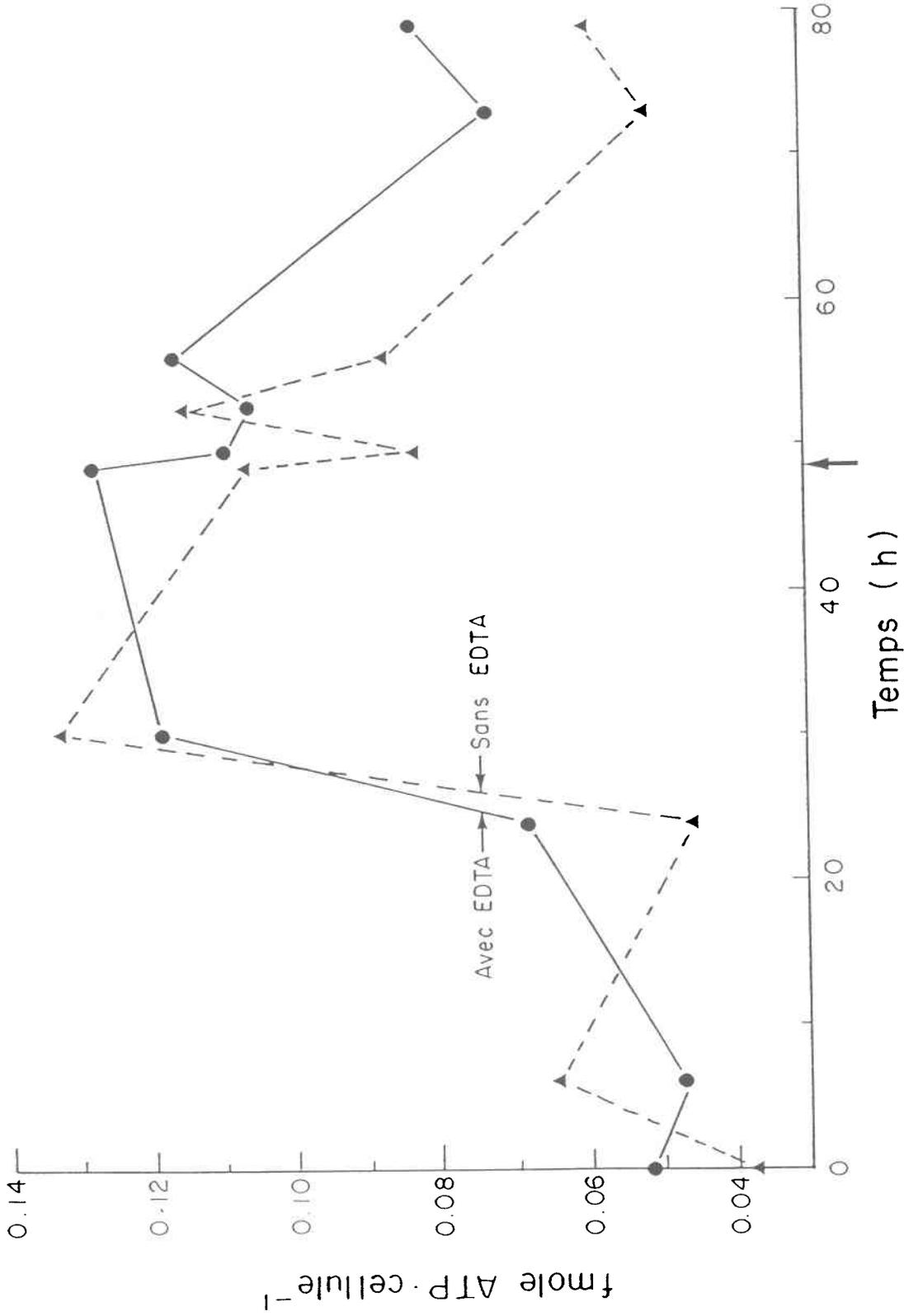


Figure 3.5: Effet de l'ajout de  $2.67 \times 10^{-6}M$  EDTA sur le contenu en ATP de cellules de S. capricornutum. ↑ indique l'heure de l'ajout d'EDTA (milieu AAP-EDTA; n = 3; pour le nombre de cellules se référer à la figure 3.3).

Tableau 3.1: Analyse de la variance des données de densité cellulaire, de photosynthèse et d'ATP cellulaire d'une population témoin de S. capricornutum et d'une population ayant reçu  $2.67 \times 10^{-6}$ M EDTA après 48 h de croissance.

Paramètre	Rapport F	Probabilité
Densité cellulaire (cellules $\cdot$ mL $^{-1}$ )	0.018	0.89
Photosynthèse ( $\mu$ g C $\cdot$ cellule $^{-1} \cdot$ h $^{-1}$ )	3.541	0.07
ATP cellulaire (mole ATP $\cdot$ cellule $^{-1}$ )	0.750	0.40

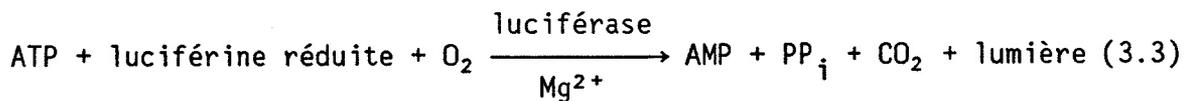
Tableau 3.2: Spéciation du Cd (% du Cd total) dans le milieu de culture AAP modifié, avant et après l'ajout de  $2.67 \times 10^{-6}$ M EDTA.

Cd	Exposition (sans EDTA)		Récupération (avec EDTA)	
	30 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	30 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$
	$\text{Cd}^{2+}$	96.2	96.2	83.8
$\text{Cd}(\text{Cl})^+$	1.6	1.6	1.4	1.4
$\text{Cd}(\text{OH})^+$	1.4	1.4	1.2	1.2
Cd-EDTA	-	-	12.9	12.6

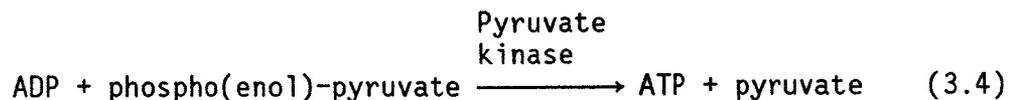
En résumé, dans les expériences traitant de la récupération de la croissance, la période d'exposition au Cd précède l'ajout de  $2.67 \times 10^{-6}M$  EDTA, tandis que la période de récupération y fait suite.

### 3.4 Dosage des nucléotides adénylates

L'ATP peut être mesuré par une variété de méthodes chromatographiques, radio-isotopiques et enzymatiques. La méthode utilisant la réaction bioluminescente du complexe luciférine-luciférase est toutefois largement acceptée étant donné sa rapidité, sa sensibilité et sa reproductibilité (Karl 1980). La méthode de dosage de l'ATP décrite à l'origine par Strehler et Totter (1952) exploite la réaction catalysée par la luciférase:



Cette méthode permet également de mesurer l'ADP et l'AMP après leur conversion enzymatique en ATP (Karl et Holm-Hansen 1978) selon les réactions suivantes:



(Romano et Daumas 1981).

Ces réactions (3.4 et 3.5) nécessitent des enzymes purifiées ainsi qu'une température et un temps de réaction spécifiques. Des expériences ont

donc été réalisées afin de maximiser les conversions enzymatiques de l'ADP et de l'AMP en ATP. Tous les réactifs enzymatiques ainsi que les étalons d'ATP, d'ADP et d'AMP proviennent de la Sigma Chemical Company. La liste des réactifs apparaît au tableau 3.3.

#### 3.4.1 Dosage de l'ATP

Karl et Holm-Hansen (1978) suggèrent de doser l'ATP en ajoutant 50  $\mu\text{L}$  de réactif A qui est une solution contenant 15 mM  $\text{MgCl}_2$  et 75 mM de tampon phosphate, à 200  $\mu\text{L}$  d'extrait d'ATP. Nous avons remplacé cette solution par un tampon (ATP assay mix dilution buffer; Sigma Chemical Company) reconstitué avec de l'eau millipore (système Millipore Milli Q3 RO/Milli-Q2). Le dosage de l'ATP a été effectué en ajoutant 100  $\mu\text{L}$  de tampon (Réactif A) à 100  $\mu\text{L}$  d'extrait.

Cette méthode donne des mesures reproductibles pour la gamme de concentrations d'ATP retrouvées. Les coefficients de variation ont varié entre 7% et 12%. La figure 3.6 donne un aperçu des droites obtenues.

#### 3.4.2 Dosage de l'ADP

La méthode utilisée est dérivée de celle de Karl et Holm-Hansen (1978). L'ADP a été dosée avec un réactif B constitué de tampon de dilution (ATP assay mix dilution buffer; Sigma Chemical Company) contenant 1 mM de phospho(enol)-pyruvate et 1000 unités de pyruvate kinase (1 unité de PK transformera 1.0  $\mu\text{mole}$  PEP en pyruvate par minute à 37°C; Sigma 1986).

Tableau 3.3: Réactifs utilisés pour le dosage des nucléotides adénylates.

Réactif	No. Catalogue*
Adenosine 5'-triphosphate (ATP) standard Disodium salt, lyophilized powder	FL-AAS
Adenosine 5'-diphosphate Sodium salt Grade IX: 95-99% from equine muscle	A6521
Adenosine 5'-monophosphate Sodium salt Sigma Grade 99-100% Type III: crystalline from equine muscle	A1877
Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Assay mix, lyophilized powder	FL-AAM
Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Assay mix, dilution buffer, lyophilized powder	FL-AAB
Phospho(enol)pyruvate trisodium salt hydrate crystalline	P7002
Pyruvate kinase Type III lyophilized essentially salt-free powder from rabbit muscle	P9136
Myokinase from porcine muscle, suspension in 3.2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> solution containing 0.001M EDTA, pH 6.0	M3382

\* Catalogue Sigma, 1988.

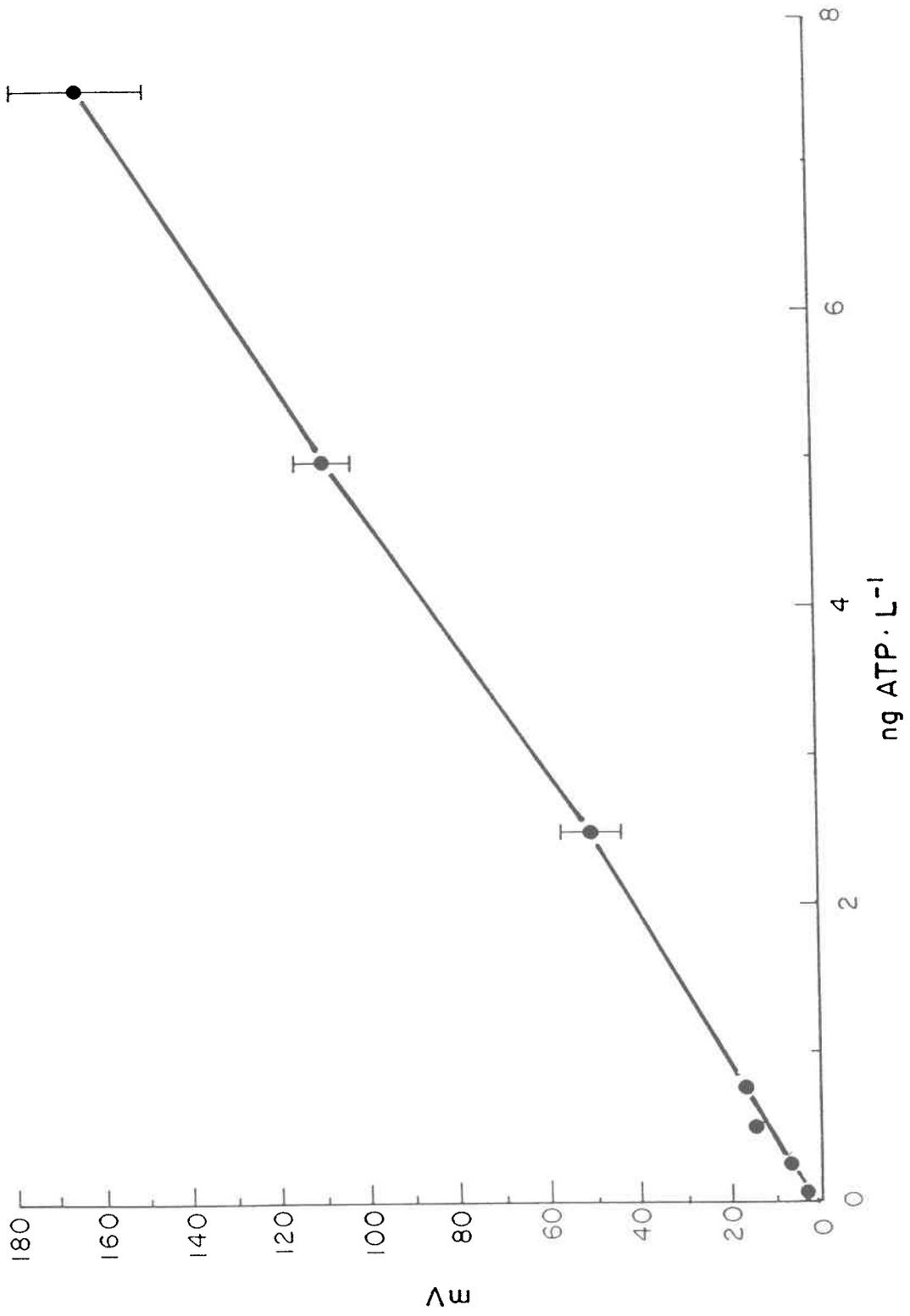


Figure 3.6: Courbe typique d'émission de lumière pour des étalons d'ATP.

L'efficacité de la réaction enzymatique de conversion de l'ADP en ATP a été vérifiée en comparant l'émission de lumière d'étalons d'ADP à celle d'étalons d'ATP pour une plage de concentrations de  $2.5 \times 10^{-10}M$  à  $7.5 \times 10^{-7}M$ . Les étalons d'ATP et d'ADP ont été préparés dans une solution de 4.5 DMSO / 5.5 MOPS (v/v) (DMSO: diméthyl sulfoxyde; MOPS: acide 4-morpholinopropyl-sulfonique). Cent  $\mu L$  d'étalon et 100  $\mu L$  de réactif B étaient pipettés dans des cuvettes. Elles étaient ensuite incubées pendant 30 min à la température de la pièce. À la fin de la période d'incubation, les étalons d'ATP et d'ADP étaient dosés par bioluminescence avec un luminomètre LKB (modèle 1251). Dans ces conditions le taux moyen de conversion de l'ADP en ATP était de 104% (Tableau 3.4).

L'efficacité de ces conditions d'analyse a ensuite été vérifiée sur des solutions contenant des concentrations connues des deux nucléotides adénylates (ATP et ADP). Pour ce faire, 100  $\mu L$  d'échantillon et 100  $\mu L$  de réactif A étaient pipettés dans des cuvettes marquées "A" tandis que 100  $\mu L$  d'échantillon et 100  $\mu L$  de réactif B étaient pipettés dans des cuvettes marquées "B". Après 30 min d'incubation, l'ATP était dosé par bioluminescence. La concentration d'ATP était obtenue directement par la lecture de l'échantillon A; tandis que l'ADP était obtenue par la différence B-A ((ADP + ATP) - ATP). Le taux de conversion de l'ADP en ATP était de l'ordre de 101% (Tableau 3.5).

Étant donné la conversion complète de l'ADP en ATP dans les conditions décrites ci-haut, ce protocole a été utilisé pour les dosages d'ADP effectués pour le travail présenté au chapitre 7.

Tableau 3.4: Taux de conversion de l'ADP en ATP après 30 minutes d'incubation à la température de la pièce (~ 22°C).

Concentration ADP	Conversion*
	%
$2.5 \times 10^{-10} \text{M}$	103
$7.5 \times 10^{-10} \text{M}$	114
$5.0 \times 10^{-9} \text{M}$	104
$7.5 \times 10^{-9} \text{M}$	113
$2.5 \times 10^{-8} \text{M}$	122
$5.0 \times 10^{-8} \text{M}$	97
$7.5 \times 10^{-8} \text{M}$	114
$2.5 \times 10^{-7} \text{M}$	90
$5.0 \times 10^{-7} \text{M}$	88
$7.5 \times 10^{-7} \text{M}$	94

\* Moyenne de trois mesures

Tableau 3.5: Taux de conversion de l'ADP en ATP dans des solutions contenant des concentrations connues de ces deux nucléotides adénylates.

Concentration de nucléotides adénylates	Conversion* %
$5 \times 10^{-8}\text{M ATP} + 5 \times 10^{-8}\text{M ADP}$	107
$5 \times 10^{-8}\text{M ATP} + 5 \times 10^{-9}\text{M ADP}$	93
$7.5 \times 10^{-7}\text{M ATP} + 2.5 \times 10^{-9}\text{M ADP}$	97

\* Moyenne de trois mesures.

### 3.4.3 Dosage de l'AMP

Plusieurs expériences ont été réalisées en vue de mettre au point une méthode de dosage de l'AMP permettant une bonne efficacité de conversion de l'AMP en ATP par les réactions 3.4 et 3.5. Les sous-sections A et B présentent les essais réalisés avec deux réactifs enzymatiques différents, tandis que les essais présentés dans les sous-sections C et D ont servi respectivement à vérifier la concentration d'ATP et la durée d'incubation donnant les meilleurs taux de conversion de l'AMP en ATP. Ces essais ont été effectués en comparant la bioluminescence émise par les étalons d'AMP à celle émise par des étalons d'ATP. Tout comme pour les essais décrits dans les sections précédentes, les étalons ont été préparés dans le DMSO/MOPS.

#### **A - Utilisation d'un réactif C constitué à partir du tampon Sigma**

La solution enzymatique (Réactif C) servant à la conversion de l'AMP en ATP a été préparée en ajoutant 33  $\mu\text{L}$  d'adénylate kinase ( $\sim 250$  unités) par 100 mL de réactif B (c.f. section 3.4.2). Les échantillons (200  $\mu\text{L}$  d'étalon + 192  $\mu\text{L}$  Réactif C + 8  $\mu\text{L}$  ATP  $10^{-9}\text{M}$ ) étaient incubés à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant deux heures (Madariaga 1986). L'ATP était ajouté parce qu'il est nécessaire au déroulement de la réaction (c.f. réaction 3.5). Les résultats de cette expérience démontrent une faible efficacité de conversion de l'AMP en ATP à des concentrations d'AMP  $\leq 2.5 \times 10^{-7}\text{M}$  (Tableau 3.6).

Tableau 3.6: Taux de conversion de l'AMP en ATP après 2h d'incubation à 30°C.

Concentration AMP	% de conversion		
	Série 1*	Série 2*	$\bar{X}$
$7.5 \times 10^{-7}$	73	75	74
$5.0 \times 10^{-7}$	61	88	74.5
$2.5 \times 10^{-7}$	39	39	39
$7.5 \times 10^{-8}$	12	11	11.5
$5.0 \times 10^{-8}$	8	10	9
$2.5 \times 10^{-8}$	12	14	13
$7.5 \times 10^{-9}$	3	9	6
$5.0 \times 10^{-9}$	19	4	11.5
$2.5 \times 10^{-9}$	21	13	17

\* Moyenne de trois mesures.

### **B - Utilisation du réactif C de Karl et Holm-Hansen (1978)**

Cet essai a été réalisé au moyen du réactif C préparé selon la méthode de Karl et Holm-Hansen (1978). Un litre de ce réactif enzymatique contient 75 mM  $K_2HPO_4$ , 15 mM  $MgCl_2$ , 0.5 mM phospho(enol)-pyruvate, 750 unités de pyruvate kinase et 750 unités d'adénylate kinase. Dans des conditions d'incubation identiques à celles du premier essai (A), l'efficacité de la réaction enzymatique demeure inadéquate pour les faibles concentrations d'AMP (Tableau 3.7).

### **C - Modification de la quantité d'ATP ajoutée**

L'efficacité de la réaction de l'adénylate kinase est influencée par la concentration totale de nucléotides adénylates dans l'échantillon (Karl et Holm-Hansen 1978). Dans le but d'améliorer le taux de conversion de l'AMP en ATP le rapport AMP/ATP des échantillons a été varié entre 75 et 750. Les essais ont été effectués avec le réactif C de Karl et Holm-Hansen (1978) et avec les conditions d'incubation décrites en B.

L'efficacité de conversion de l'AMP n'a pas été améliorée par les divers ajouts d'ATP (Tableau 3.8).

### **D - Variation de la durée de l'incubation**

Les travaux de Madariaga (1986) ont démontré que la durée de l'incubation pouvait influencer le taux de conversion de l'AMP en ATP. La

Tableau 3.7: Taux de conversion de l'AMP en ATP après 2h d'incubation à 30°C avec le réactif C de Karl et Holm-Hansen (1978).

Concentration AMP	Conversion*
	%
$7.5 \times 10^{-7}$	72
$5.0 \times 10^{-7}$	40
$2.5 \times 10^{-7}$	7
$7.5 \times 10^{-8}$	2

\* Moyenne de 3 mesures

Tableau 3.8: Effet du rapport AMP/ATP sur le taux de conversion de l'AMP en ATP.

Concentration AMP	Rapport AMP/ATP	Conversion* %
$7.5 \times 10^{-7}$	750	56
	500	55
	250	58
	75	57
$5.0 \times 10^{-7}$	750	45
	500	44
	250	45
	75	48
$7.5 \times 10^{-8}$	750	< 1
	500	< 1
	250	< 1
	75	< 1

\* Moyenne de trois mesures

présente expérience a donc été réalisée afin de vérifier si une modification dans la durée d'incubation pouvait améliorer le taux de conversion de l'AMP en ATP aux concentrations d'AMP  $\leq 2.5 \times 10^{-7}M$ .

Dans les conditions décrites précédemment (B), des durées d'incubation variant entre 0.5h et 2h n'ont pas amélioré le taux de conversion de l'AMP en ATP pour des concentrations d'AMP  $\leq 2.5 \times 10^{-7}M$  (Tableau 3.9).

L'ensemble des travaux qui ont été réalisés démontre que le dosage de l'AMP est impraticable aux concentrations  $\leq 2.5 \times 10^{-7}M$ . Étant donné que les travaux de Thompson et al. (1987) révèlent que les concentrations d'ATP rencontrées dans des cultures de S. capricornutum (densité cellulaire  $\geq 15000$  cellules  $\cdot mL^{-1}$ ) sont généralement inférieures à  $2.3 \times 10^{-7}M$ , seule l'ATP et l'ADP seront dosés dans le présent travail. Le protocole d'extraction des nucléotides adénylates ainsi que la méthode de dosage de l'ATP et de l'ADP sont détaillés à la section 7.2.1.1.

### 3.5 Mesure de la respiration

La respiration génère de l'ATP et du NADH ainsi que des molécules carbonées qui peuvent être utilisées pour les besoins structuraux et de biosynthèse des cellules algales (Burris 1980). Malgré l'importance de la respiration, relativement peu de travaux ont porté sur l'étude de cette voie métabolique chez le phytoplancton (Harris 1978).

Tableau 3.9: Effet de la durée de l'incubation sur le taux de conversion de l'AMP en ATP.

Concentration AMP	Incubation (heure)	Conversion %
7.5 x 10 <sup>-7</sup> M	0.5	1
	1	137
	1.5	105
	2	81
5.0 x 10 <sup>-7</sup> M	0.5	1
	1	31
	1.5	58
	2	76
2.5 x 10 <sup>-7</sup> M	0.5	1.5
	1	4
	1.5	11
	2	31
7.5 x 10 <sup>-8</sup> M	0.5	< 1
	1	< 1
	1.5	4.5
	2	2
5.0 x 10 <sup>-8</sup> M	0.5	< 1
	1	< 1
	1.5	4.5
	2	2
2.5 x 10 <sup>-8</sup> M	0.5	< 1
	1	< 1
	1.5	< 1
	2	< 1

\* Moyenne de quatre mesures.

La respiration est généralement mesurée en suivant les variations des concentrations d'oxygène lors d'incubation à l'obscurité (Young et al. 1980; Stout et Kilham 1983; Falkowski et al. 1985; Grobbelaar et Soeder 1985; Simpson et Eaton 1986). Cette méthode nécessite plusieurs heures d'incubation pour obtenir des diminutions facilement mesurables de la concentration d'oxygène. Par exemple, avec une communauté algale dense ( $500 \mu\text{g Chl-a}\cdot\text{L}^{-1}$ ) il est difficile de percevoir des variations du taux de respiration pouvant survenir à des échelles de temps  $\leq 4$  h (Markager et Sand-Jensen 1989). La mesure de la respiration par cette méthode à la lumière en présence de DCMU (dichlorophényl-diméthylurée) (Yallop 1982) est confrontée aux mêmes difficultés.

La mesure de la respiration à l'obscurité par la perte de  $^{14}\text{CO}_2$  de cellules algales marquées avec du  $^{14}\text{C}$  semble cependant permettre une meilleure sensibilité (Li et al. 1980). Cette méthode permet, par ailleurs, de mesurer l'utilisation des divers substrats de la respiration.

Les travaux de Graham et Turner (1987) suggèrent que le taux de respiration mesuré à l'obscurité peut être différent de celui mesuré à la lumière en présence de DCMU. Ces auteurs considèrent par ailleurs que le taux mesuré en présence de DCMU est plus représentatif de la respiration à la lumière.

L'ensemble de ces considérations nous ont amené à mettre au point une méthode permettant de mesurer la respiration chez S. capricornutum par la perte de carbone soit lors d'une incubation à l'obscurité, soit à la lumière en présence de DCMU.

### 3.5.1 Mesure de la respiration à l'obscurité

À l'instar des travaux de Li et al. (1980), la respiration était mesurée par la perte de carbone lors d'incubation à l'obscurité. À cette fin, 0.15  $\mu\text{Ci } ^{14}\text{C}\cdot\text{mL}^{-1}$  était ajouté à des cultures asynchrones de S. capricornutum et les méthodes décrites à la section 4.2.2 servaient à mesurer la quantité de carbone assimilée et allouée aux macromolécules (protéines, lipides, polysaccharides et métabolites à faible poids moléculaire). La respiration était calculée selon l'équation:

$$R = \frac{C_o - C_n}{t_n} \quad (3.6)$$

où  $C_o$  = quota cellulaire de carbone au moment du prélèvement, en  $\mu\text{g C}\cdot\text{cellule}^{-1}$

$C_n$  = quota cellulaire de carbone à la fin de la période d'incubation, en  $\mu\text{g C}\cdot\text{cellule}^{-1}$

$t_n$  = durée de l'incubation, en heure

R = taux de respiration, en  $\mu\text{g C}\cdot\text{cellule}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$

Cette méthode fournira une évaluation fiable de la respiration dans la mesure où l'excrétion de carbone organique est négligeable. Une expérience préliminaire a démontré, que chez une population témoin de S. capricornutum, l'excrétion de carbone organique est généralement inférieure à 1.5% du carbone photo-assimilé.

Afin de sélectionner la période d'incubation donnant une mesure de la respiration avec une faible variance, des durées d'incubation entre 1 h et 3 h ont été vérifiées. Les résultats de deux expériences effectuées en triple démontrent que les durées d'incubation  $\geq 2$  h fournissent des mesures du taux de respiration avec un coefficient de variation  $< 20\%$  (Tableau 3.10). Par ailleurs, une prolongation de la durée de l'incubation de 2 à 3 h ne contribue pas à diminuer sensiblement le coefficient de variation des mesures.

### 3.5.2 Mesure de la respiration à la lumière en présence de DCMU

Chez les organismes chlorophylliens, le taux de respiration pendant les périodes éclairées est généralement considéré comme étant inférieur au taux de respiration pendant les périodes d'obscurité. En effet, pendant les périodes de lumière, l'ATP nécessaire au fonctionnement des cellules serait en grande partie fourni par la photosynthèse (Harris 1978; Raven et Beardall 1981). Des mesures de respiration effectuées à la lumière seraient donc plus représentatives de l'activité de cette voie métabolique pendant les périodes éclairées. À cet effet, certains auteurs ont mesuré la respiration à la lumière après avoir ajouté du DCMU, un inhibiteur de la photosynthèse (Yallop 1982; Graham et Turner 1987). Or si l'on accepte la théorie du contrôle de la respiration par l'ATP (Raven 1984), l'inhibition de la photosynthèse par le DCMU devrait diminuer la quantité d'ATP générée par cette voie métabolique et ainsi stimuler la respiration. La mesure de la respiration à la lumière en présence de DCMU ne fournirait donc pas non plus une mesure réaliste du taux de respiration à la lumière. Malgré la controverse, cette méthode pourrait être avantageuse si elle fournissait des mesures de la respiration ayant des

Tableau 3.10: Variation de mesures de respiration obtenues par l'incubation de populations de S. capricornutum à l'obscurité . (Deux séries de mesures; n = 3).

Incubation (heure)	Respiration totale		Respiration des macromolécules					
	C.V.*		Lipide C.V.	MFPM C.V.	Polyssaccharide C.V.	Protéine C.V.		
1.0	57.2		62.6	63.7	51.6	58.5		
	31.1		36.3	-	32.1	31.5		
1.5	39.5		35.6	34.6	32.4	37.7		
	28.3		22.3	21.6	33.1	26.0		
2.0	16.7		16.8	16.1	17.2	18.6		
	15.1		12.2	15.6	14.8	13.9		
2.5	17.7		16.8	18.9	16.3	14.3		
	14.1		10.3	15.2	13.9	11.2		
3.0	14.7		14.5	17.6	14.2	15.6		
	7.4		12.2	12.5	11.9	11.2		

\* coefficient de variation =  $\frac{\text{écart-type}}{\text{moyenne}} \times 100$

coefficients de variation inférieurs à ceux obtenus à l'obscurité (c.f. sous-section 3.5.1).

Selon Graham et Turner (1987), avant d'utiliser cette méthode il est important de vérifier la présence de photosynthèse résiduelle. De plus, puisque le DCMU est dissout dans le méthanol, il est nécessaire de vérifier la toxicité de ce solvant à l'égard de S. capricornutum.

#### A - Photosynthèse résiduelle

Six échantillons de 50 mL d'une culture asynchrone de S. capricornutum ont été répartis dans des flacons en polycarbonate de 250 mL. Deux des échantillons ont reçu 0.5 mL de DCMU  $5 \times 10^{-4}M$  (concentration finale  $5 \times 10^{-6}M$ : Yallop 1982) tandis que deux autres échantillons ont reçu 1 mL de DCMU  $5 \times 10^{-4}M$  (concentration finale  $1 \times 10^{-5}M$ : Graham et Turner 1987). Les deux derniers échantillons ont servi de témoins. Chaque échantillon recevait  $10 \mu Ci NaH^{14}CO_3$  et était incubé à la lumière pendant 2 h.

Par rapport au témoin, les deux concentrations de DCMU utilisées inhibaient efficacement la photosynthèse (Tableau 3.11). La photosynthèse résiduelle était  $\leq 8\%$ .

#### B - Effet du méthanol sur la photosynthèse

Le DCMU étant dissout dans le méthanol, il était nécessaire de s'assurer que ce solvant n'avait pas d'effet sur la photosynthèse de S.

Tableau 3.11: Effet du DCMU et du méthanol sur la photosynthèse de S. capricornutum.

Traitement	Inhibition %
$5 \times 10^{-6}$ M DCMU	95
$1 \times 10^{-5}$ M DCMU	92
1/50 (v/v: méthanol/culture)	82
1/100 (v/v: méthanol/culture)	78

capricornutum. À cet effet, les taux de photosynthèse de deux échantillons ayant reçu 0.5 mL de méthanol et de deux autres échantillons ayant reçu 1.0 mL de méthanol étaient comparés à deux témoins. Les résultats de cet essai ont démontré que le méthanol dans des proportions 1/50 et 1/100 (v/v) avait un effet très marqué sur la photosynthèse de S. capricornutum (Tableau 3.11). Les diminutions de l'assimilation de carbone en présence de DCMU seraient donc en grande partie attribuable à la toxicité du méthanol.

Ces constatations nous ont amenés à sélectionner la méthode de mesure de la respiration à l'obscurité. La méthode adoptée est décrite à la section 7.2.2

### 3.6 Analyse statistique

L'hypothèse que les populations exposées au Cd sont significativement différentes des populations témoins est vérifiée par diverses méthodes statistiques sur les données non-transformées. Lorsque les données sont indépendantes dans le temps, des méthodes paramétriques sont utilisées telles que l'analyse de variance à un critère et le test de t. Toutefois lorsque les données sont autocorrélées, des méthodes non-paramétriques sont retenues comme les tests de Kruskal-Wallis et de Wilcoxon.

## Chapitre 4

Modifications du métabolisme de  
produits de synthèse chez des populations de  
Selenastrum capricornutum exposées au Cd



#### 4.1 Introduction

Les manifestations toxiques du Cd peuvent être le résultat d'effets indirects ou directs de l'ion métallique sur la cellule. En effet, d'une part, en occupant des sites membranaires le Cd pourrait empêcher le transport d'éléments nutritifs (oligoéléments) vers l'intérieur de la cellule; d'autre part, le Cd pourrait occuper des sites intra-cellulaires ou remplacer des métaux divalents essentiels au fonctionnement de certaines enzymes (Rebhun et Ben-Amotz 1984). Plusieurs aspects de la toxicité du Cd vis-à-vis du phytoplancton sont traités dans les articles de synthèse réalisés par Wong et al. (1980) et par Trevors et al. (1986). Parmi ceux-ci, mentionnons les dommages aux mitochondries (Silverberg 1976; Lue-Kim et al. 1980; Soyer et Prévot 1981; Byczkowski et Sorenson 1984), l'inhibition de l'assimilation des nitrates (Li 1978; Singh et Yadava 1983) ainsi que l'inhibition de la division cellulaire (Berland et al. 1977; Conway 1978; Lue-Kim et al. 1980). Par ailleurs, même si l'ensemble des auteurs s'entendent pour affirmer que le degré d'inhibition de la croissance semble être fonction de la concentration de Cd dans le milieu de culture (Hart et Scaife 1977; Rachlin et al. 1982; Li 1984), les effets sur la photosynthèse restent controversés. En effet, certaines études ont démontré une inhibition de l'assimilation de carbone à toutes les concentrations de Cd utilisées. C'est le cas, par exemple, des espèces Spirulina platensis (Azeez et Banerjee 1986), Chlorella pyrenoidosa (Hart et Scaife 1977) et Scenedesmus quadricauda (Wong et al. 1979). Par contre, chez d'autres espèces telles qu'Anacystis nidulans (Azeez et Banerjee 1986) et Fragilaria crotonensis (Conway et Williams 1979), la photosynthèse est tantôt inhibée, tantôt stimulée par le Cd. Le fait qu'à l'intérieur d'une même

expérience la photosynthèse soit stimulée aux concentrations intermédiaires de Cd chez une espèce et toujours inhibée chez une autre espèce (Azeez et Banerjee 1986) suggère une certaine capacité de tolérance ou d'acclimatation chez la première.

Cette stimulation de la photosynthèse pourrait être un ajustement métabolique procurant à ces espèces tolérantes au Cd une plus grande viabilité. Par ailleurs, un couplage de cette stimulation de la photosynthèse à une stimulation du métabolisme du carbone, notamment de la synthèse de produits de réserve (lipides et polysaccharides), pourrait conférer un avantage compétitif à ces espèces dès le retour de conditions moins limitantes pour la croissance. Sathya et Balakrishnan (1988) ont observé de telles modifications des voies de synthèse des macromolécules chez deux espèces, Scenedesmus bijugatus et Nitzschia palea, exposées à des concentrations de Cd variant entre 10 et 50  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . Ils ont, en effet, mis en évidence des augmentations des quotas cellulaires en protéines chez les deux espèces pendant une exposition au Cd de dix jours. De plus, les quotas cellulaires d'hydrates de carbone étaient supérieurs à ceux du témoin chez N. palea tandis que les teneurs en lipides étaient supérieures aux valeurs du témoin chez S. bijugatus. Ces modifications peuvent être perçues comme des mécanismes de résistance ou d'acclimatation à une agression toxique par le Cd.

Des teneurs plus élevées en produits de réserve (hydrates de carbone et lipides) pourraient améliorer la viabilité des cellules en fournissant des substrats qui peuvent être métabolisés pour rencontrer les besoins énergétiques des cellules pendant les périodes de besoin accru ou de carence en éléments

nutritifs (Cook 1963; 1966; Rickets 1966; Handa 1969; Parnas et Cohen 1976; Foy et Smith 1980; Hitchcock 1980). Par exemple, chez Escherichia coli un quota cellulaire en glycogène représentant 6-7% du poids de la cellule (poids sec) suffit à maintenir les cellules vivantes pendant 15 h (Parnas et Cohen 1976). Chez des algues exposées au Cd, une augmentation de quotas cellulaires en polysaccharides pourrait maintenir les cellules vivantes et leur permettre de recommencer à se diviser lorsque la biodisponibilité du Cd est réduite (par adsorption, complexation, détoxification intracellulaire, etc.). C'est à ce moment que des réserves lipidiques élevées pourraient avantager les cellules. En effet, il a été démontré que les jeunes cellules utilisent les acides gras comme substrat principal de la respiration (Tillberg et Kylin 1972). Comme il a été mentionné à la sous-section 2.3.3, les acides gras peuvent être oxydés avec un plus grand rendement énergétique que les hydrates de carbone (Lehninger 1977).

Cette revue de la littérature démontre le peu d'informations dont nous disposons sur les effets du Cd sur les grandes voies métaboliques, en particulier celle du carbone. Cependant, les quelques informations disponibles suggèrent que le métabolisme du carbone, principalement les voies de synthèse des protéines, des polysaccharides et des lipides, pourrait jouer un rôle dans l'acclimatation au Cd. La présente expérience a donc pour but de confirmer ou d'infirmier cette hypothèse.

Comme nous l'avons souligné à la section 2.1.2, plusieurs travaux ont mis en évidence des sites de séquestration des métaux à l'intérieur des cellules algales. Toutefois, les informations concernant les processus

physiologiques impliqués dans cette détoxification des métaux sont manquantes. L'approche adoptée dans le présent chapitre pourrait nous éclairer sur les ajustements métaboliques nécessaires au développement de la tolérance et éventuellement à la reprise de la croissance chez des algues planctoniques exposées au Cd.

## 4.2 Matériel et méthodes

### 4.2.1 Protocole expérimental

Une population asynchrone de S. capricornutum a été inoculée à raison de 25 000 cellules·mL<sup>-1</sup> dans quatre bouteilles en polycarbonate contenant 20 L de milieu de culture AAP modifié (Chiaudani et Vighi 1978). Les conditions de culture sont les mêmes que celles décrites à la section 3.1.

À la fin de la période de latence, 3 mCi (111 mBq) de NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> ont été ajoutés à chaque culture. Les cultures ont ensuite été contaminées avec une solution concentrée de 10 000 µg Cd·L<sup>-1</sup> préparée à partir d'une solution standard de 1 mg·mL<sup>-1</sup> (BDH Ltd). Des concentrations nominales de 0 (témoin), 30, 60 et 100 µg Cd·L<sup>-1</sup> étaient ainsi obtenues. Pendant la période d'exposition de 234 h, les concentrations mesurées en Cd ont varié respectivement entre 28.5 et 20.7 µg Cd·L<sup>-1</sup>, entre 64.7 et 59.2 µg Cd·L<sup>-1</sup> et entre 107.6 et 79.2 µg Cd·L<sup>-1</sup> dans les milieux où des concentrations nominales de 30, 60 et 100 µg Cd·L<sup>-1</sup> avaient été ajoutées.

Après une période d'attente de 15 minutes après l'ajout de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  et de Cd, des échantillons étaient prélevés à intervalles réguliers en double pour des mesures de densité cellulaire et de quotas cellulaires en carbone et en macromolécules (20 mL). Les cellules étaient dénombrées avec un compteur électronique de particules muni d'une cellule de 70  $\mu\text{m}$  (Coulter Counter). Les méthodes utilisées pour doser le carbone dans les macromolécules et pour mesurer l'assimilation de carbone sont décrites ci-après.

#### 4.2.2 Assimilation de carbone

##### **A) Photosynthèse et quota cellulaire en carbone**

La méthode de Steemann-Nielsen (1952), qui consiste à incuber des algues en présence de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ , a été utilisée pour mesurer l'assimilation de carbone par la photosynthèse. Par ailleurs, lorsque l'équilibre isotopique est atteint, c'est-à-dire que le rapport  $^{14}\text{C} : ^{12}\text{C}$  à l'intérieur des cellules est égal au rapport externe, l'activité du  $^{14}\text{C}$  dans les cellules peut être utilisée comme mesure de la concentration de carbone organique particulaire dans le milieu (Hobson et Guest 1983). La division de cette concentration par la densité cellulaire donne donc une mesure du quota cellulaire en carbone.

Pour les besoins de la présente expérience, deux échantillons de 20 mL, servant à mesurer l'activité photosynthétique et les quotas cellulaires en carbone, étaient prélevés et filtrés sur des membranes Nuclepore d'une porosité de 0.4  $\mu\text{m}$ . Ces filtres étaient ensuite rincés avec du milieu de culture AAP afin d'éliminer la radioactivité résiduelle (Furnas 1983; Jasper et

Bothwell 1986) et introduits dans des fioles contenant 10 mL de liquide à scintillation de marque Scintiverse II.

La radioactivité était comptée au moyen d'un appareil à scintillation liquide de marque LKB (modèle Rackbeta). Les coups par minute (CPM) étaient transformés en désintégrations par minute (DPM) par l'utilisation d'un étalon interne d'hexadécane (activité:  $0.872 \times 10^6$  DPM·mL<sup>-1</sup>; Amersham) (Couture et al. 1987). Pour ce faire, les échantillons étaient comptés une première fois (CPM<sub>e</sub>) et une activité de 17 440 DPM d'hexadécane (DPM<sub>a</sub>) était ajoutée aux échantillons qui étaient ensuite recomptés (CPM<sub>e+a</sub>). L'efficacité de comptage était alors calculée comme suit:

$$\text{efficacité} = \frac{\text{CPM}_{e+a} - \text{CPM}_e}{\text{DPM}_a} \quad (4.1)$$

Par la suite, en supposant que l'efficacité de comptage de l'ajout d'hexadécane et celle de l'échantillon soient semblables, les DPM d'un échantillon donné étaient calculées à partir de la valeur d'efficacité de comptage obtenue par l'équation (4.1):

$$\text{DPM} = \frac{\text{CPM}_e}{\text{efficacité}} \quad (4.2)$$

La quantité de carbone assimilée était ensuite calculée à l'aide de l'équation de Vollenweider (1974):

$$\mu\text{g C}\cdot\text{L}^{-1} = \frac{{}^{14}\text{C assimilé (DPM}\cdot\text{L}^{-1}) \times {}^{12}\text{C} (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}) \times 1.06}{{}^{14}\text{C (DPM}\cdot\text{L}^{-1})} \quad (4.3)$$

où la constante 1.06 est un facteur de correction pour l'assimilation sélective de l'isotope léger (Plumb et Lee 1979).

Le carbone inorganique dissous (C.I.D.) était mesuré par la méthode conductivimétrique décrite par Stainton et al. (1977) au moyen d'un auto-analyseur Technicon. Le C.I.D. servait à estimer la quantité de  ${}^{12}\text{C}$  disponible dans le milieu. Le  ${}^{14}\text{C}$  disponible dans le milieu de culture était mesuré en ajoutant 100  $\mu\text{L}$  de filtrat (contenant le  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ) à 100  $\mu\text{L}$  de phénéthylamine (New England Nuclear; no. de catalogue NEF-937) dans une fiole à scintillation. Dix mL de liquide à scintillation de marque Scintiverse II étaient ajoutés et l'activité de l'échantillon en DPM était calculée avec les équations (4.1) et (4.2) (Couture et al. 1987).

Tel que mentionné au début de cette section, les mesures effectuées avant l'atteinte de l'équilibre isotopique constituent des mesures du taux d'assimilation de carbone inorganique (en  $\mu\text{g C}\cdot\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ ) tandis que par la suite, l'activité des cellules peut être utilisée comme mesure de la concentration en carbone organique dans les cellules. Il ne semble cependant pas y avoir de consensus concernant le temps requis pour atteindre l'équilibre isotopique. Les estimés varient en effet entre 2 h et moins de 50% du temps de génération des cellules (Lancelot et Mathot 1985; Smith et Geider 1985). Par contre, en tenant compte des considérations de Priscu et Priscu (1984) et de Lancelot et Mathot (1985), nous pouvons considérer que l'équilibre isotopique est atteint

lorsque la proportion de  $^{14}\text{C}$  dans les diverses macromolécules devient relativement stable. Les résultats d'un essai préliminaire avec S. capricornutum suggèrent que l'équilibre isotopique est atteint entre 6 et 20 h (Figure 4.1: voir évolution des protéines). À partir de ce point, les quotas cellulaires en carbone peuvent être calculés au moyen de l'équation:

$$\mu\text{g C}\cdot\text{cellule}^{-1} = \frac{\mu\text{g C}\cdot\text{L}^{-1}}{\text{cellules}\cdot\text{L}^{-1}} \quad (4.4)$$

où la concentration de carbone organique ( $\mu\text{g C}\cdot\text{L}^{-1}$ ) est obtenue par l'équation (4.3).

#### B) Répartition du $^{14}\text{C}$ à l'intérieur des macromolécules et quotas cellulaires en macromolécules

La composition des cellules phytoplanctoniques en protéines, en hydrates de carbone et en lipides, soit les principaux produits de la photosynthèse et du métabolisme du carbone, constitue un indicateur de l'état physiologique des cellules (Myklestad 1974; Conover 1975; Laws et Caperon 1976). Morris et al. (1974) ont développé une technique de fractionnement permettant une évaluation de cet état par la distribution de carbone nouvellement assimilé dans différentes fractions cellulaires. Ils ont utilisé la méthode d'assimilation de  $\text{H}^{14}\text{CO}_3$  de Steemann-Nielsen (1952) suivie par des étapes d'extraction sélective dans différents solvants. On parvient ainsi à fractionner le carbone assimilé en quatre fractions contenant les lipides, les métabolites à faible poids moléculaire, les polysaccharides et les protéines.

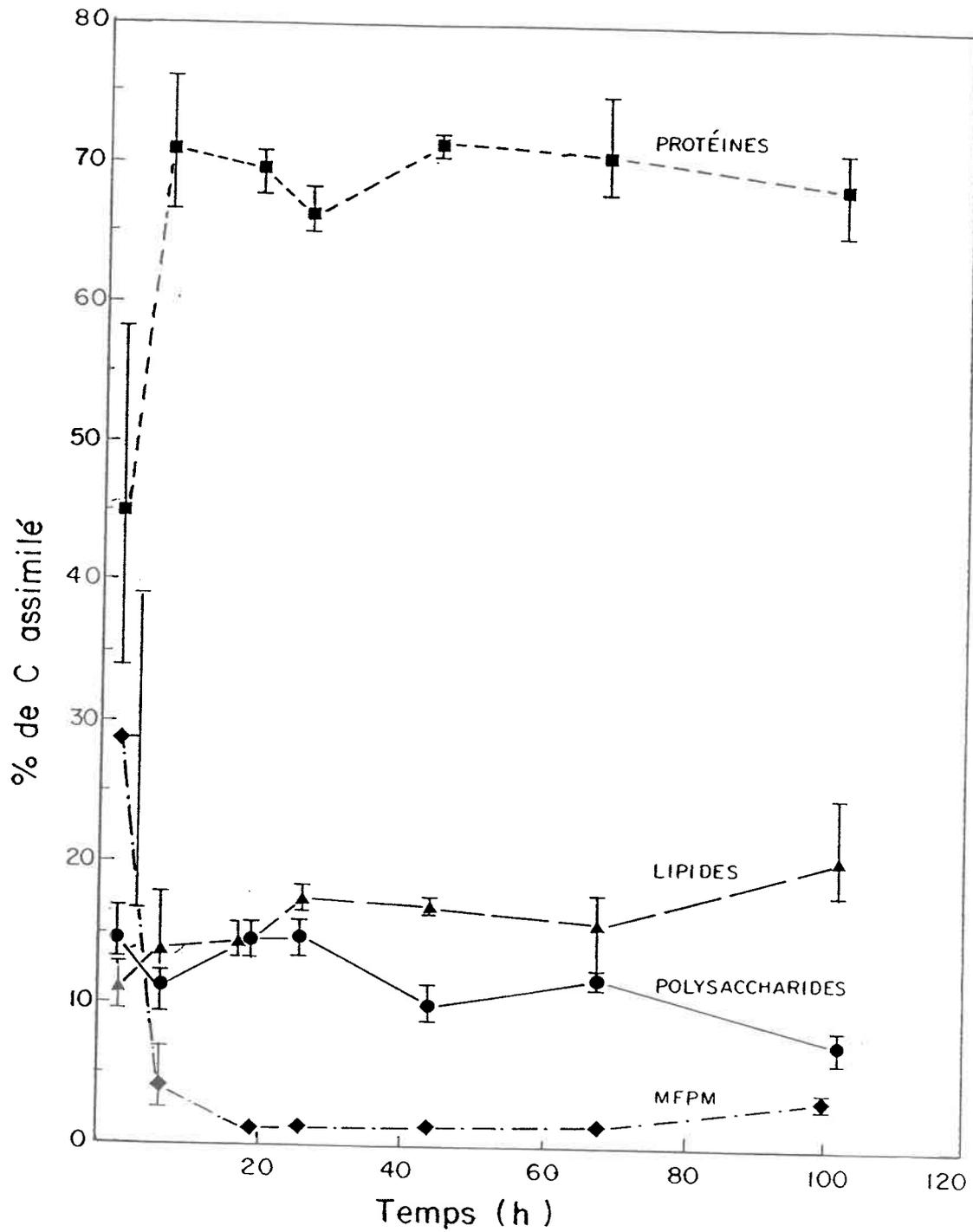


Figure 4.1 Proportion (%) de carbone allouée aux quatre fractions de macromolécules.

Cette méthode permet ainsi d'obtenir un taux de synthèse des diverses macromolécules. Pour les besoins de la présente étude, l'intérêt de cette méthode réside d'une part dans le fait qu'elle a été amplement testée (Morris et Skea 1978; Smith et Morris 1980; Li et Platt 1982; Priscu et Priscu 1984; Lancelot et Mathot 1985; Smith et al. 1987), et d'autre part que, combinée à l'approche de Hobson et Guest (1983), elle peut fournir une mesure des quotas cellulaires de ces diverses macromolécules, par exemple en  $\mu\text{g C}\cdot\text{cellule}^{-1}$  de protéines (c.f. sous-section précédente). L'utilisation de cette méthode pour mesurer les quotas cellulaires de macromolécules semble, du moins dans le cas des polysaccharides, donner des valeurs réalistes. Une étude préliminaire a en effet démontré qu'à la fin de la phase exponentielle, les cellules de S. capricornutum contenaient  $24 \mu\text{g C}\cdot\text{cellule}^{-1}$  en polysaccharides. En utilisant le facteur de conversion "40  $\mu\text{g}$  carbone  $\rightarrow$  100  $\mu\text{g}$  de polysaccharides" proposé par Hitchcock (1978), nous obtenons pour S. capricornutum  $60 \mu\text{g}$  polysaccharides $\cdot\text{cellule}^{-1}$ . Cette valeur est proche du quota cellulaire en polysaccharides chez Skeletonema costatum qui varie entre 25 et  $85 \mu\text{g}\cdot\text{cellule}^{-1}$  selon la température (Hitchcock 1980). La fiabilité de la méthode pour les protéines et les lipides ne peut être évaluée faute de données comparatives dans la littérature.

La méthode de Morris et al. (1974), modifiée par Li et al. (1980), a été utilisée afin d'obtenir des mesures de synthèse et de quotas cellulaires de macromolécules. Deux échantillons de 20 mL de culture étaient prélevés et filtrés sur des membranes en microfibrilles de verre (Whatman GF/C). Les filtres étaient rincés avec du milieu de culture AAP de façon à enlever la radioactivité résiduelle. Ils étaient ensuite conservés au congélateur dans 1.2 mL d'eau déminéralisée jusqu'au moment de l'analyse.

Au moment de l'analyse, les filtres étaient dégelés et 1.5 mL de chloroforme et 3.0 mL de méthanol étaient ajoutés. La suspension était vigoureusement mélangée pendant 1 min avec un agitateur de marque Vortex, incubée à 4°C pendant 10 min pour être ensuite filtrée sur une membrane en microfibrilles de verre (Whatman GF/C). Après le rinçage du filtre avec 1.5 mL de chloroforme, 1.5 mL d'eau déminéralisée étaient ajoutés au filtrat. Ce mélange était agité vigoureusement (Vortex-mixer) pendant 1 min et ensuite centrifugé à 800 x g pendant 10 min. La couche inférieure de chloroforme était prélevée au moyen d'une pipette Pasteur et déposée dans une fiole à scintillation pour être séchée. Dix mL de liquide à scintillation (Scintiverse II) étaient ajoutés directement au résidu séché (Fraction A). La couche supérieure méthanol-eau était déposée dans une fiole à scintillation et 15 mL de liquide à scintillation (Scintiverse II) y étaient ajoutés (Fraction B). Le filtre était déposé dans 4 mL d'acide trichloroacétique (TCA) 5% et chauffé dans un bain thermostaté à 95°C pendant 30 min. La suspension était ensuite filtrée sur une autre membrane en microfibrilles de verre (Whatman GF/C) et rinçée avec 4 mL de TCA 5% froid. Le filtrat était transvidé dans une fiole à scintillation et séché. Le résidu séché était resuspendu dans 1 mL d'eau déminéralisée et 10 mL de liquide à scintillation y étaient ensuite ajoutés (Fraction C). Le matériel insoluble dans le TCA et récolté sur le filtre était placé directement dans une fiole à scintillation et 10 mL de liquide à scintillation y étaient ajoutés (Fraction D). Cette méthode permet ainsi d'extraire les quatre fractions suivantes:

A - lipides (soluble dans le chloroforme);

B - métabolites à faible poids moléculaire (soluble dans le mélange méthanol-eau);

- C - polysaccharides (comprend également les acides nucléiques) (soluble dans le TCA);
- D - protéines (insoluble dans le TCA).

L'activité, la quantité de carbone allouée à chaque fraction ainsi que leur quota en carbone étaient calculés par les méthodes décrites à la sous-section précédente (4.2.2A).

#### 4.3 Résultats et discussion

La croissance de S. capricornutum est très fortement inhibée par le Cd (Figure 4.2; Tableau 4.1). Les taux de croissance ( $\mu_{0-200h}$ ) des populations exposées à 30, 60 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  sont respectivement 26%, 50% et 72% plus faibles que celui du témoin. Il y a d'ailleurs une corrélation négative significative entre  $\mu_{0-200h}$  et la concentration de Cd ( $r = -0.994$ ;  $p = 0.01$ ). L'effet inhibiteur du Cd sur la croissance de plusieurs espèces d'algues planctoniques, évalué en fonction de la biomasse ou du nombre de cellules produits à la fin de la période d'exposition, est largement documenté (Klass et al. 1974; Conway 1978; Rachlin et al. 1982; Li 1984; Azeez et Banerjee 1986). Les travaux de Berland et al. (1977) avec la diatomée S. costatum ont cependant démontré une stimulation initiale de la croissance lors d'expositions à des concentrations de Cd variant entre 25 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . Nos résultats révèlent également une stimulation du taux de croissance lors des premières heures d'exposition ( $\mu_{0-8h}$ ;  $\mu_{8-16h}$ ) à 30 et 60  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tableau 4.1).

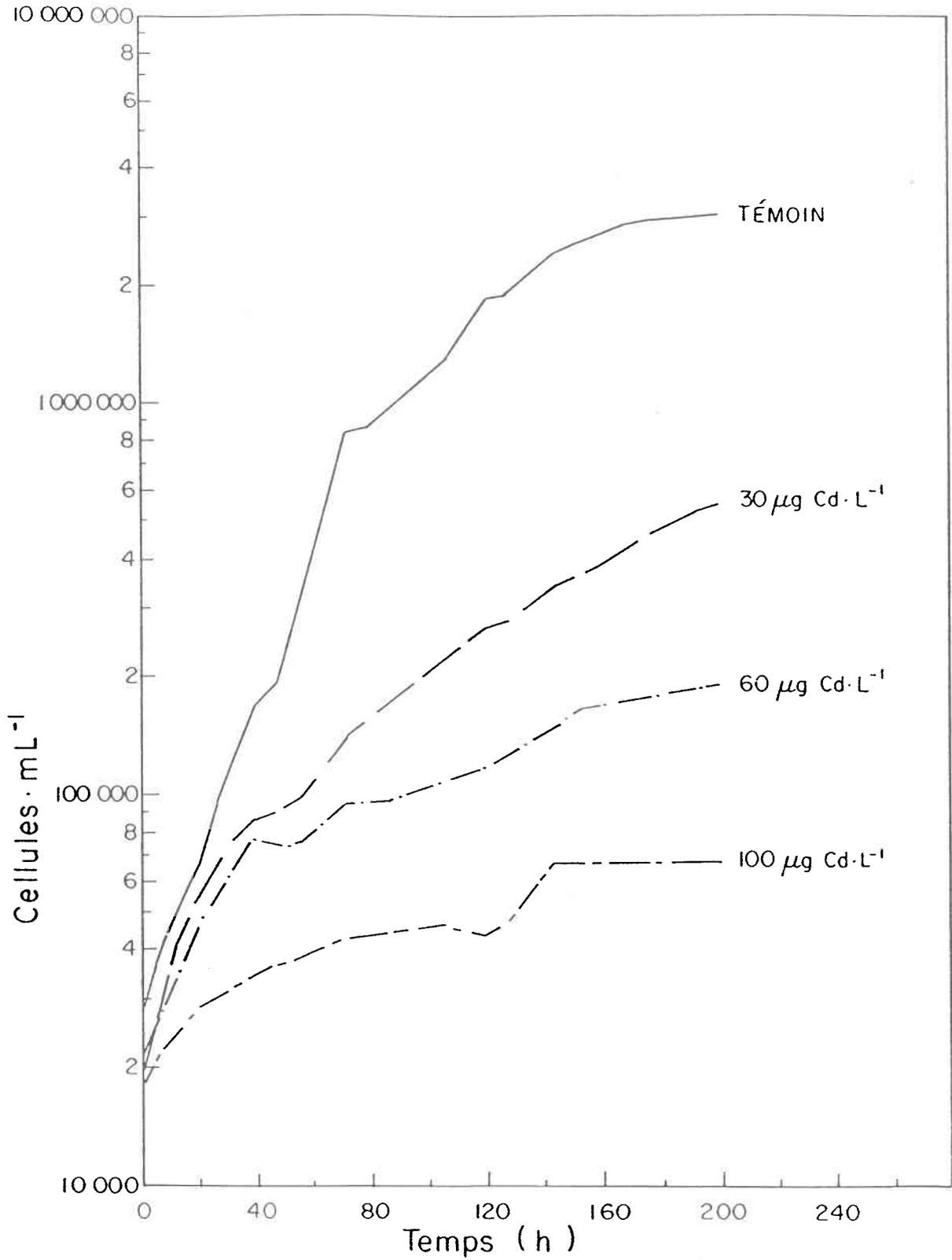


Figure 4.2: Densité cellulaire de populations de *S. capricornutum* exposées à 0, 30, 60 et 100 µg Cd · L<sup>-1</sup> pendant 234 h.

Tableau 4.1: Taux de croissance ( $\mu^*$ ) de populations de S. capricornutum exposées au Cd.

Temps (h)	Témoin	30 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	60 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$
0 - 8	0.052	0.078	0.056	0.024
8 - 16	0.036	0.048	0.038	0.020
16 - 32	0.047	0.028	0.030	0.011
32 - 48	0.023	0.010	0.008	0.008
48 - 72	0.064	0.018	0.010	0.006
72 - 104	0.011	0.014	0.004	0.002
104 - 120	0.026	0.012	0.005	0
120 - 144	0.011	0.011	0.012	0.018
144 - 168	0.008	0.009	0.003	0
168 - 200	0.002	0.241	0.003	0.001
0 - 200	0.023	0.017	0.0115	0.0064

$$* \mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

où  $X_1$  = nombre de cellules au temps  $t_1$

$X_2$  = nombre de cellules au temps  $t_2$

En raison de l'atteinte de l'équilibre isotopique dans la présente expérience après 8 h de contact avec le  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  (voir section 4.2.2A), les taux de photosynthèse et de synthèse des macromolécules ont été calculés pour la période 0-8 h. Pendant cette période, la photosynthèse ( $\text{pg C}\cdot\text{cellule}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) des populations exposées à 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  est significativement plus élevée que celle du témoin. Une inhibition de la photosynthèse est cependant observée à la concentration intermédiaire de Cd (Tableau 4.2).

La stimulation des taux de photosynthèse est difficile à expliquer. En effet, un taux de croissance élevé est parfois accompagné d'une stimulation (30  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de la photosynthèse et parfois d'une inhibition (60  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de cette voie métabolique. Il ne faut toutefois pas oublier que des recherches ont permis d'établir qu'il n'y a pas de lien direct chez le phytoplancton entre la croissance et les mesures de photosynthèse (Morris, 1981; Harris, 1984; Trainor, 1984). La croissance serait en effet plus directement liée à la synthèse de protéines. Bien qu'aucune explication n'ait été fournie pour une stimulation de la photosynthèse en présence de Cd, ce phénomène a déjà été observée. Par exemple, chez Euglena sp. exposée pendant dix jours à 18  $\mu\text{g CdCl}_2\cdot\text{L}^{-1}$ , De Filippis et al. (1981a) ont observé que le taux de photosynthèse exprimé par unité de chlorophylle dépassait la valeur du témoin à partir du quatrième jour d'exposition. D'autre part, les taux de photosynthèse par unité de biomasse ( $\text{C}\cdot\text{chl-a}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) de populations d'Anacystis nidulans exposées à 10 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  étaient supérieurs aux valeurs de la population témoin (Azeez et Banerjee, 1986). Une stimulation de la photosynthèse de la diatomée S. costatum a déjà été observée en réponse à une exposition aiguë de 6 h à des concentrations de Pb variant entre 0.1 et 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Rivkin 1979).

Tableau 4.2: Taux de photosynthèse ( $\mu\text{g C}\cdot\text{cellule}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) de populations de S. capricornutum exposées à 0, 30, 60 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .

	Temps (h)				
	0 → 0.25	0.25 → 2	2 → 4	4 → 6	6 → 8
Témoin	2.0	1.4	0.6	0.7	0.3
30 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	6.0*	2.7*	3.1*	-	6.0*
60 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	1.5	1.2	0.2	0.3	2.4*
100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	3.7*	1.6*	1.5*	2.0*	-

\* Significativement plus élevé que le témoin pour  $p = 0.01$  (Test de t)

Selon Li (1979), un taux de photosynthèse plus élevé chez T. weissflogii exposé au Cd serait une réponse acclimative visant à permettre une croissance optimale en présence de cet ion métallique. Li (1979) a, par ailleurs, démontré que l'acclimatation au Cd se manifestait principalement par une modification du métabolisme des protéines et que plusieurs constituants cellulaires se retrouvaient en plus grandes quantités chez les cellules acclimatées. Dans ce contexte, et étant donné que les effets du Cd sur la photosynthèse de S. capricornutum n'apparaissent pas directement reliés à la concentration du Cd dans le milieu de culture, une meilleure connaissance des effets de ce métal sur le métabolisme du carbone et des produits de synthèse comme les protéines, les lipides et les polysaccharides pourrait aider à mieux comprendre les effets du Cd sur la photosynthèse. Des réponses acclimatives pourraient également être mises en évidence.

Les taux d'incorporation de carbone dans les macromolécules (taux de synthèse) sont également présentés pour les 8 premières heures de l'expérience. Au cours des 8 premières heures dans le cas de la population exposée à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  et au cours des 6 premières heures dans le cas de celle exposée à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , les taux de synthèse des protéines sont supérieurs à ceux du témoin (Tableau 4.3). Chez la population soumise à  $30 \text{ Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , cette stimulation de la synthèse des protéines est accompagnée d'un taux de croissance supérieur à celui du témoin (Tableau 4.1). Dans le cas de la population exposée à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , la production accrue de protéines ne s'accompagne pas de croissance. Ceci pourrait être le résultat d'une inhibition de la division cellulaire par le Cd sans que celui-ci n'interfère avec la synthèse de protéines. Cette hypothèse est supportée par des résultats concernant la

Tableau 4.3: Taux d'incorporation de carbone dans les macromolécules (pg C·cellule<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) au cours des huit premières heures d'exposition à 0,30, 60 et 100 µg Cd·L<sup>-1</sup>.

	Temps (h)				
	0.25	2	4	6	8
<u>Protéines</u>					
Témoin	.89	.67	.35	.35	-.05
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	2.67*	1.63*	1.45*	-.35	7.24*
60 µg Cd·L <sup>-1</sup>	.90	.74	.06	.36	1.58*
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	2.37*	.96*	1.05*	1.01*	-.34
<u>Lipides</u>					
Témoin	.54	.31	-	.17	.15
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	2.30*	.57*	1.01	-.32	3.73*
60 µg Cd·L <sup>-1</sup>	.44	.25	.03	.04	.44*
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	.97*	.35	.32	.72*	-.24
<u>Polysaccharides</u>					
Témoin	.40	.22	.11	.05	.18
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	.72*	.37*	.46*	-.25	1.59*
60 µg Cd·L <sup>-1</sup>	.10	.12	.07	-.02	.31*
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	.23	.19	.10	.42*	.07
<u>MFPM</u>					
Témoin	.16	.05	-	.03	-.04
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	.31*	.17*	.18	-.15	.45*
60 µg Cd·L <sup>-1</sup>	.03	.07	.04	-.04	.07*
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	.15	.11*	.07	.01	-.03

\* Significativement plus élevé que le témoin pour p = 0.01

diatomée S. costatum qui suggèrent qu'initialement, malgré l'inhibition de la croissance, les processus métaboliques intervenant dans les synthèses carbonées et azotées ne sont pas affectés par le Cd (Berland et al. 1977). Les taux de synthèse de lipides sont généralement plus élevés que ceux du témoin aux concentrations de Cd exhibant une stimulation de la photosynthèse (30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Tableau 4.3). Les taux de synthèse des polysaccharides sont inférieurs aux taux du témoin aux deux plus fortes concentrations de Cd, tandis qu'une stimulation de la synthèse de ces macromolécules est observée à 30  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . Les taux d'incorporation de carbone dans la fraction des MFPM sont plutôt erratiques, étant tantôt plus élevés, tantôt plus faibles que ceux du témoin (Tableau 4.3).

Dans un contexte où d'une part le taux de synthèse de macromolécules est stimulé par le Cd, particulièrement aux concentrations de 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , et où d'autre part des phytochélatines complexantes et des vésicules de lipides et d'amidon ont été observées chez des algues exposées au Cd (Rachlin et al. 1984; Prévot et Soyer-Gobillard 1986; Gekeler et al. 1988; Heuillet et al. 1988; Marquis 1989), il devient intéressant d'étudier le métabolisme du carbone en suivant les quotas cellulaires de macromolécules chez S. capricornutum exposé au Cd.

Une augmentation très importante des quotas de carbone est observée chez la population témoin jusqu'à 120 h (Figure 4.3). Elle est indicatrice d'une croissance en équilibre ("balanced growth") (Shuter 1979; Eppley 1981). La diminution subséquente des quotas de carbone coïncide avec l'approche de la phase stationnaire (Figure 4.2). Les quotas cellulaires de carbone de la

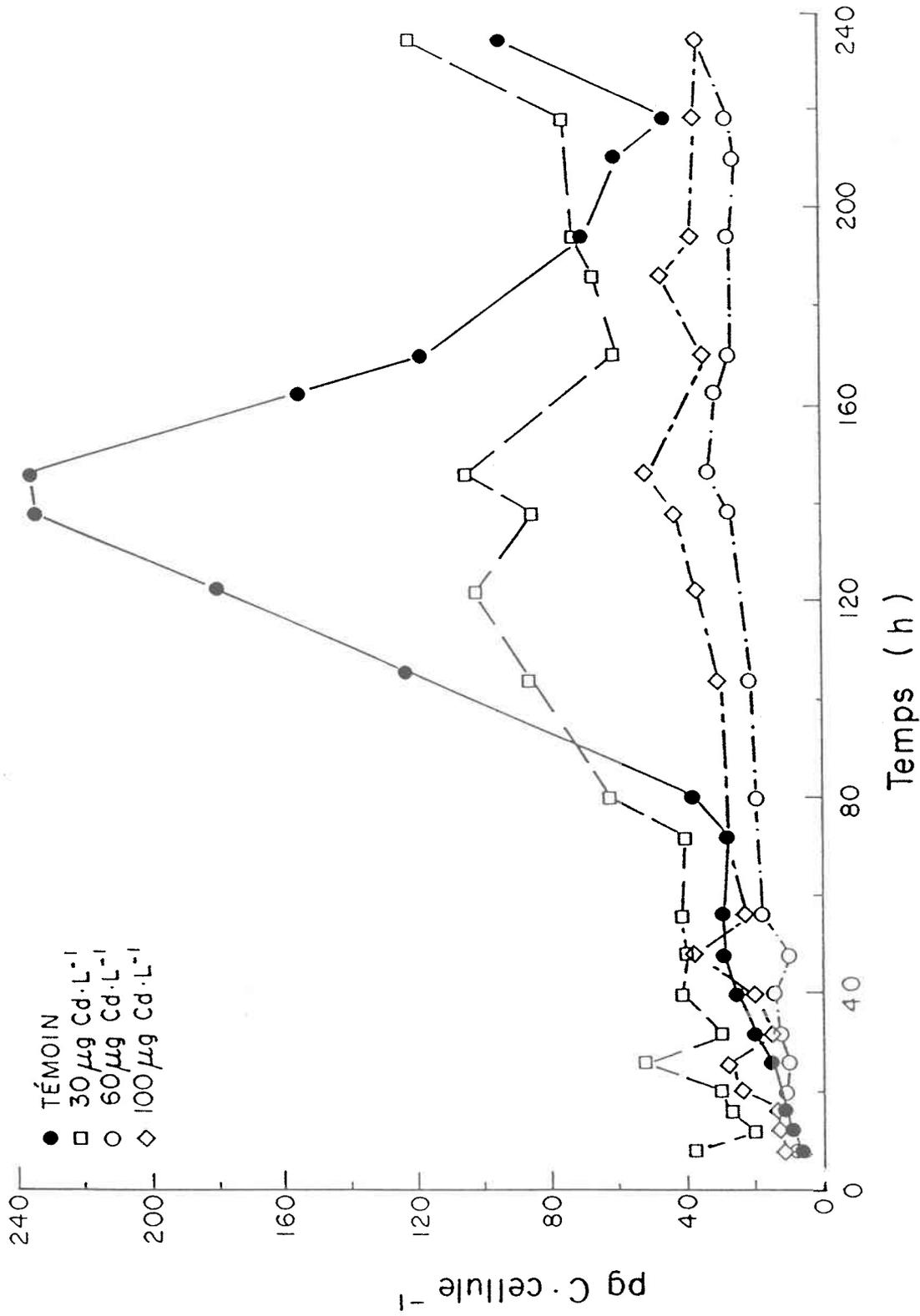


Figure 4.3: Quotas cellulaires en carbone de populations de S. capricornutum exposées à 0, 30, 60 et 100 µg Cd·L<sup>-1</sup> pendant 234 h.

population exposée à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  sont supérieurs à ceux du témoin jusqu'à 80 h. L'augmentation graduelle du contenu en carbone de ces cellules se poursuit jusqu'à la fin de l'expérience; les valeurs n'atteignant toutefois jamais des valeurs aussi élevées que celles observées entre 96 et 170 h chez le témoin (Figure 4.3). D'autre part, chez les populations exposées à 60 et  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , les quotas de carbone sont relativement stables pendant toute la durée de l'expérience et n'excèdent que très rarement les valeurs témoins (Figure 4.3). Les différences observées sont statistiquement significatives ( $F = 19.627$ ;  $\alpha < 0.01$ ) pour la période 8-80 h.

Tout comme les quotas de carbone, l'évolution temporelle des quotas de carbone dans les protéines et les lipides de la population témoin est également représentative d'une croissance en équilibre ("balanced growth") et de l'atteinte de la phase stationnaire après 120 h de croissance (Figure 4.4.a). Comparativement à la population témoin, où les augmentations de quotas cellulaires en protéines et en lipides sont importantes à partir de 80 h, chez les populations exposées à 30, 60 et  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  ces augmentations sont observées respectivement dans les premières 24, 8 et 48 h (Figures 4.4.b,c,d). Pendant la période 8-80 h ces augmentations importantes de protéines et de lipides chez les populations exposées au Cd résultent en des quotas cellulaires significativement plus élevés que chez la population témoin (protéine:  $F = 16.733$   $\alpha < 0.01$ ; lipide:  $F = 8.286$   $\alpha < 0.01$ ). Par exemple, les quotas de carbone dans la fraction protéique sont généralement supérieurs à ceux du témoin jusqu'à 80 h chez la population exposée à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  et jusqu'à 32 h chez celles exposées à 60 et  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figure 4.5.a). De plus, les contenus cellulaires en protéines sont plus élevés à 100 qu'à  $60 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .

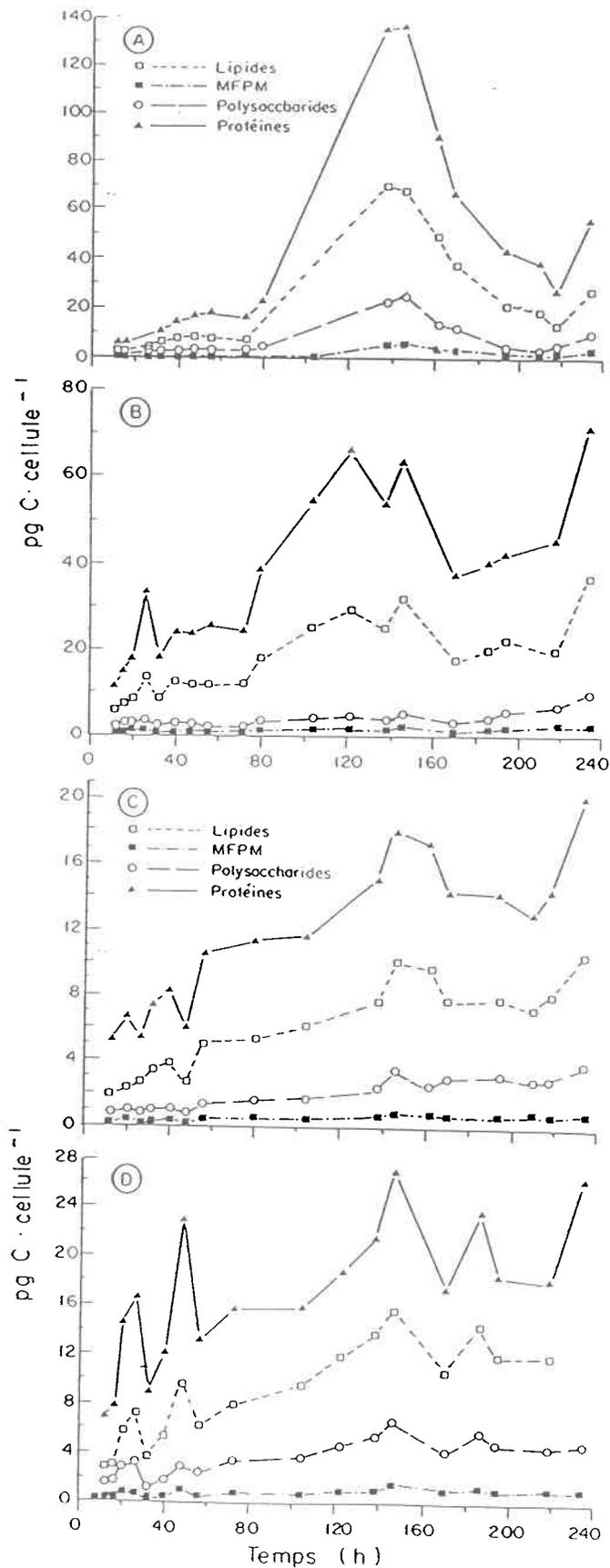


Figure 4.4: Quotas cellulaires en carbone dans les macromolécules de la population de *S. capricornutum* témoin (A) et de celles exposées à 30 (B), 60 (C) et 100 (D)  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .

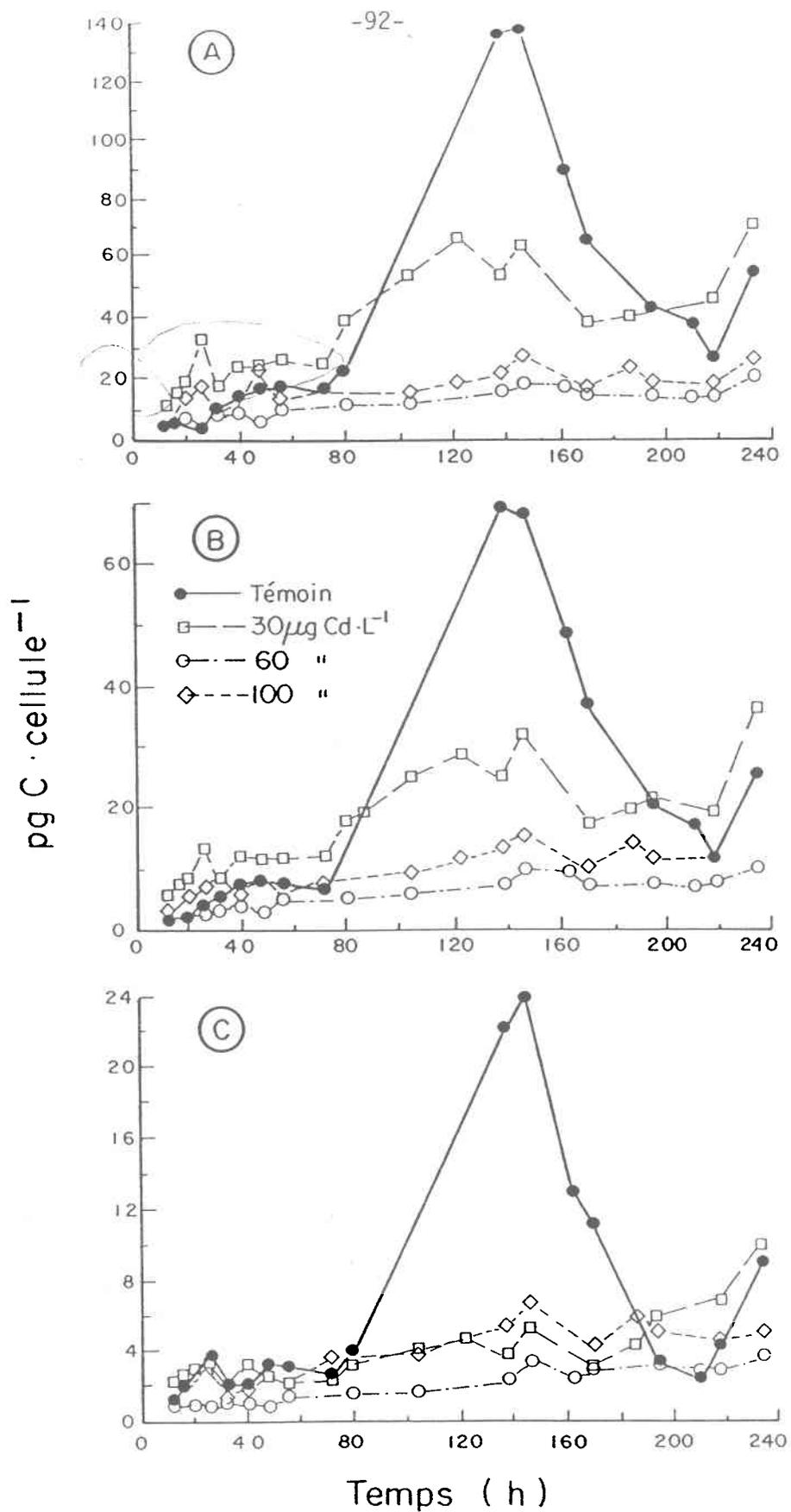


Figure 4.5: Quotas cellulaires en carbone dans les protéines (A), les lipides (B) et les polysaccharides (C) chez des populations de *S. capricornutum* exposées à 0, 30, 60 et 100 µg Cd·L<sup>-1</sup>.

Toutefois, même si en valeur absolue les quotas de protéines atteignent les valeurs les plus élevées à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , dans les 4 premières heures plus les concentrations de Cd sont élevées plus le rapport protéine/polysaccharide est élevé (Figure 4.6). Pour cette période, le rapport protéine/polysaccharide est significativement corrélé à la concentration de Cd ( $r = 0.957$ ;  $p = 0.05$ ). Il apparaît donc que dans la période initiale d'exposition au Cd, S. capricornutum réagit en allouant une plus grande proportion du carbone assimilé aux protéines. Comme mentionné précédemment, ceci pourrait être une réponse métabolique d'acclimatation au Cd. Li (1979) a d'ailleurs observé que le rapport protéine/polysaccharide était plus élevée chez une population de I. weissflogii acclimatée au Cd que chez une population témoin.

Des résultats similaires sont observés pour les quotas cellulaires de carbone lipidique dans le cas des populations soumises à  $30$  et  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . Toutefois, chez la population exposée à  $60 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , ils sont inférieurs aux quotas du témoin pour toute la durée de l'expérience (Figure 4.5.b). Le contenu en lipides des cellules n'est donc supérieur au témoin que chez les populations où une stimulation de la photosynthèse est observée (Tableau 4.2). Sathya et Balakrishnan (1988) ont également observé un contenu en lipides plus élevé chez des populations de Scenedesmus bijugatus exposées à des concentrations de  $10$  à  $50 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . Ils n'ont toutefois pas observé ce phénomène chez la diatomée Nitzschia palea exposée aux mêmes concentrations de Cd. Les acides gras peuvent être estérifiés pour former soit des lipides de réserve (triglycérides) ou soit des lipides de membrane (glycolipides et lipides polaires). Dans des conditions optimales pour la croissance, les micro-organismes synthétisent des acides gras

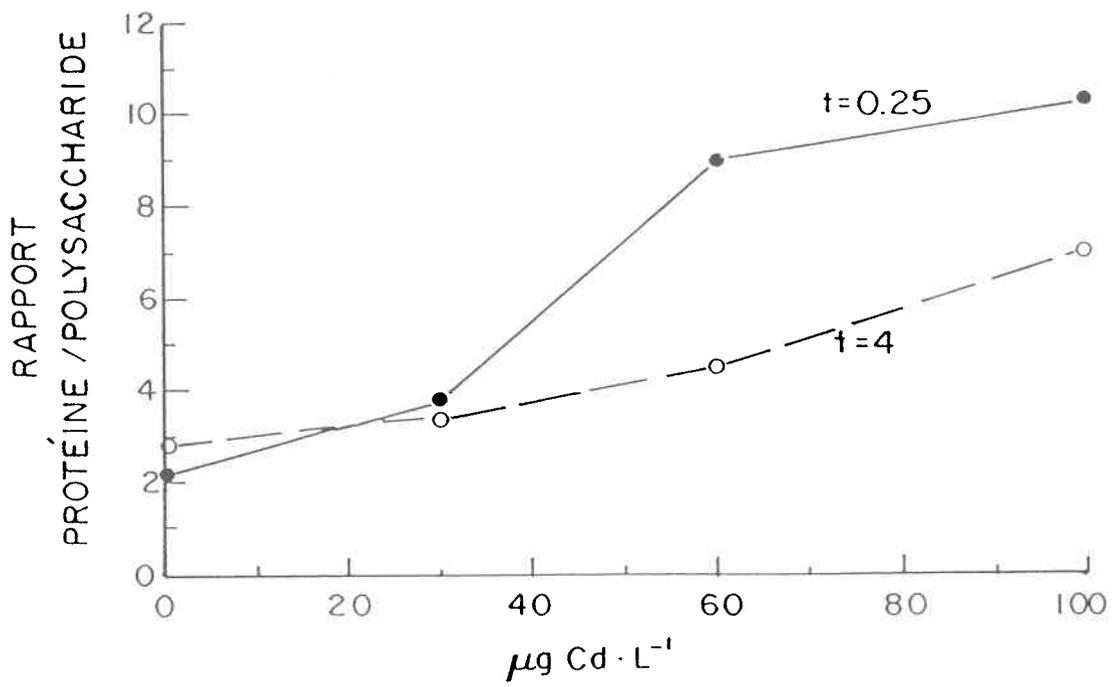


Figure 4.6: Rapports protéine / polysaccharide de populations de S. capricornutum après 0,25 h et 4 h d'exposition au Cd.

principalement pour estérification en des lipides de membranes (Guckert et Cooksey 1990). Toutefois, dans des conditions limitantes pour la croissance mais permettant l'assimilation de carbone, des gouttelettes de lipides s'accumuleront dans le cytoplasme (Cooksey et al. 1987). L'accumulation de lipides chez les algues exposées au Cd pourrait être le résultat d'une prolongation d'un stade du cycle cellulaire pendant lequel la synthèse de triglycérides se continue, dépassant ainsi les besoins de la cellule pour compléter la division cellulaire.

Dans le cas des polysaccharides, les quotas cellulaires sont supérieurs aux valeurs du témoin seulement dans les quarante premières heures d'exposition à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  et à 12 h d'exposition à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figure 4.5.c). Dans le cas de la population témoin et celle exposée à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  ces différences sont significatives ( $T = 4.715$ ;  $p < 0.01$ ).

L'augmentation des quotas cellulaires en lipides ( $30$  et  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et en polysaccharides ( $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ ) pourrait être une forme d'acclimatation au Cd permettant aux cellules de maintenir une plus grande viabilité et éventuellement de récupérer lors d'une disparition ou d'une biodisponibilité réduite de la substance toxique (ex.: dilution, complexation, adsorption, etc.). Il est en effet connu que les besoins métaboliques des algues unicellulaires peuvent être satisfaits par l'utilisation d'hydrates de carbone et de lipides (Cook 1963, 1966; Ricketts 1966; Handa 1969; Parnas et Cohen 1976; Foy et Smith 1980; Hitchcock 1980). Par exemple, Cook (1966) a démontré, chez Euglena gracilis que le paramylon, un polymère de réserve (un  $\beta$ -1,3-glucane insoluble), s'accumulait pendant la période éclairée et était

subséquemment utilisé pendant la scotophase (obscurité) pour fournir l'énergie et le carbone nécessaire à la croissance. Par ailleurs, Handa (1969) a démontré, avec la diatomée S. costatum, que le glucose et le  $\beta$ -1,3-glucane participaient à la respiration algale, tandis que les hydrates de carbone constituant la paroi cellulaire (mannane et pentosane) n'étaient pas utilisés comme substrat respiratoire. Handa (1969) a également démontré que lorsque S. costatum en croissance exponentielle était placé à l'obscurité, la respiration utilisait respectivement 58%, 44% et 28% des quotas cellulaires d'hydrates de carbone, de lipides et de protéines. Par ailleurs, ces composés étaient métabolisés consécutivement: les hydrates de carbone étaient utilisés dans les premiers jours d'obscurité tandis que l'utilisation des protéines ne débutait que lorsque la concentration d'hydrates de carbone cessait de diminuer. Les lipides semblaient être utilisés graduellement et indépendamment du métabolisme des hydrates de carbone et des protéines. Comme nous l'avons déjà mentionné, l'utilisation des lipides dans les périodes de besoin accru d'énergie pourrait être avantageuse puisque ces composés sont catabolisés avec un rendement énergétique élevé (Lehninger 1977). Par exemple, l'oxydation complète de l'acide palmitique fournit 8 ATP par atome de carbone comparativement à 6 ATP par atome de carbone pour l'oxydation complète du glucose (Lehninger 1977).

#### 4.4 Conclusion

Dans les conditions expérimentales de la présente expérience, une inhibition marquée de la croissance est observée. Nos résultats sont donc en accord avec les recherches qui suggèrent que la toxicité du Cd est surtout reliée à une inhibition de la croissance (Trevors et al. 1986).

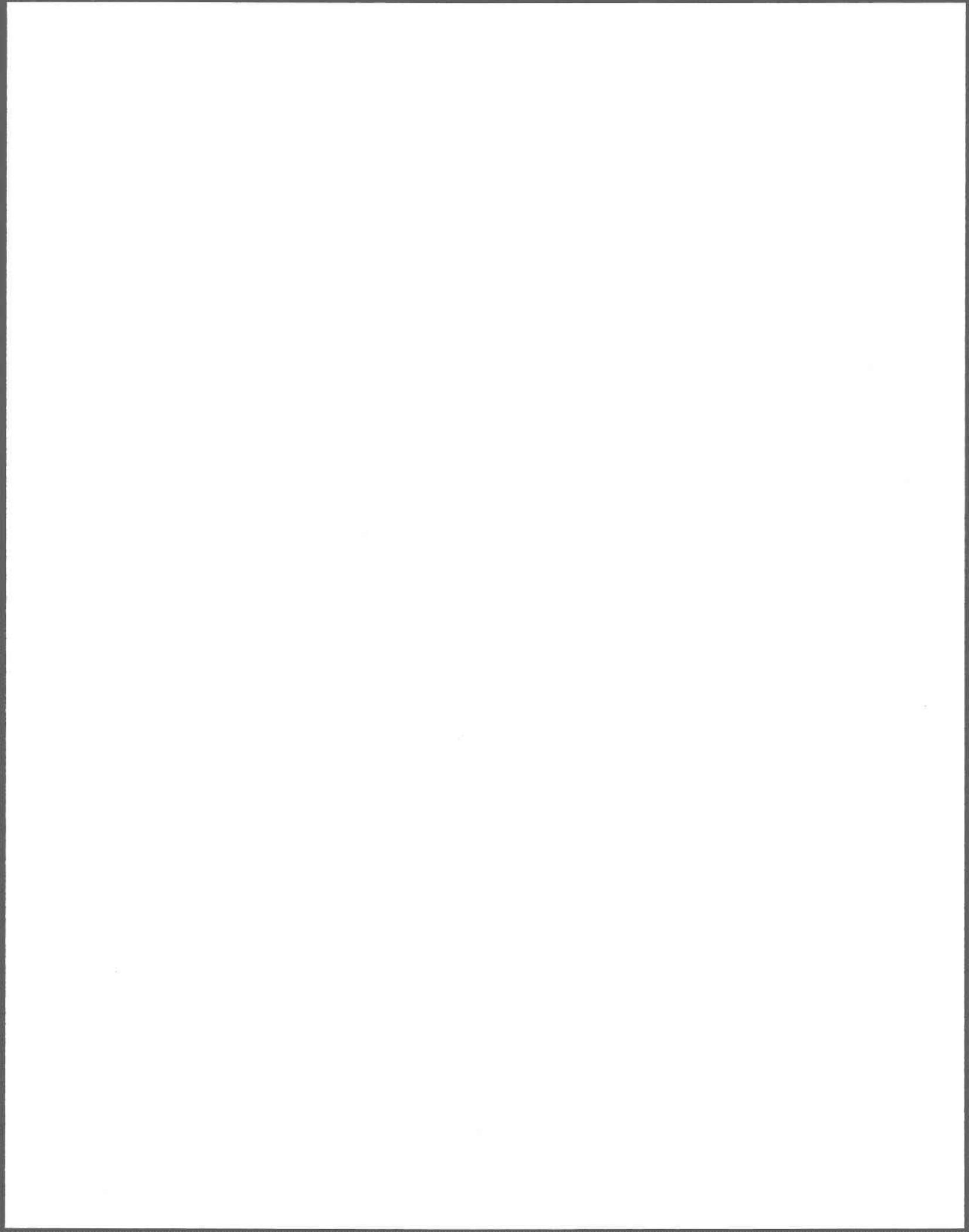
Les résultats de la présente expérience confirment par ailleurs que les voies métaboliques du carbone sont moins perturbées par le Cd que ne l'est la croissance, hypothèse avancée par Berland et al. (1977). De plus, le métabolisme du carbone semble activé pour permettre aux cellules de faire face à cette agression toxique. Les teneurs cellulaires élevées en polysaccharides (exposition à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et en lipides (exposition à 30 et  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ ) pourraient fournir l'énergie nécessaire à maintenir les cellules vivantes jusqu'au retour de conditions moins limitantes pour la croissance.

La comparaison de nos résultats avec ceux de Li (1979) suggère que les populations de S. capricornutum exposées à 30 et à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}$  manifestent des ajustements métaboliques typiques de populations ayant acquis une tolérance au Cd. En effet, les modifications de la composition cellulaire observées à ces concentrations de Cd, à savoir des quotas en protéines, en polysaccharides et en lipides élevés, étaient présentes chez I. weissflogii lorsque la croissance récupérait et devenait semblable au taux de croissance de la population témoin (Li 1979). Les manifestations du métabolisme observées chez la population exposée à  $60 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  ne laissent toutefois pas percevoir d'acclimatation. Il y a cependant lieu de penser que dans la présente expérience une plus longue exposition à 30 et  $100 \mu\text{gCd}\cdot\text{L}^{-1}$  aurait pu résulter en une récupération de la croissance de S. capricornutum.

Par ailleurs, nos résultats confirment l'utilité de la méthode d'incorporation de  $^{14}\text{CO}_2$  dans les macromolécules comme indicateur de l'état physiologique de populations algales. Bien que cette méthode soit couramment utilisée pour étudier l'écophysiologie du phytoplancton (Morris et Skea 1978;

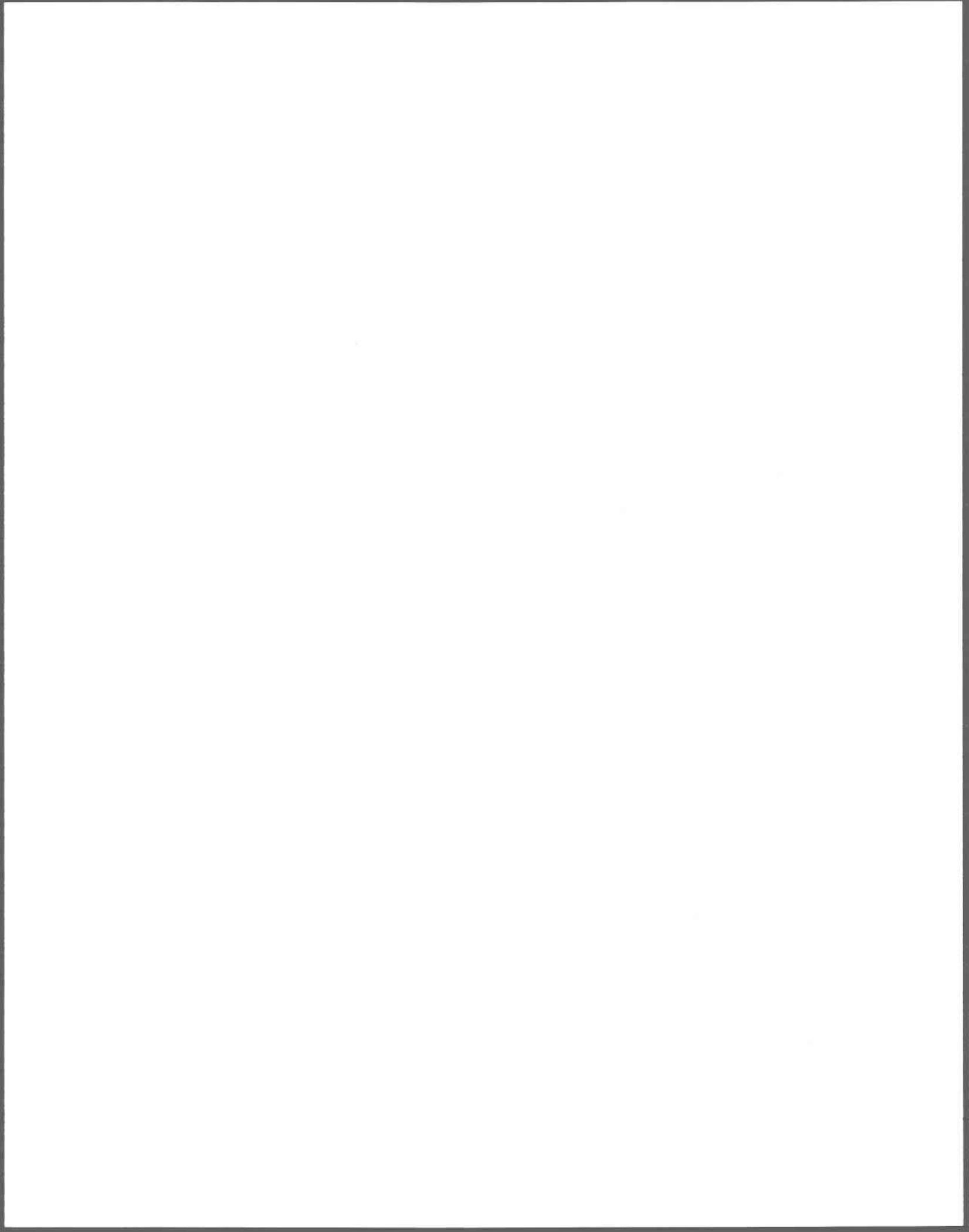
Lancelot et Mathot 1985, Smith et al. 1987), à notre connaissance elle n'a jamais, auparavant, été utilisée pour étudier les ajustements métaboliques impliqués dans l'acclimatation à un ion métallique toxique.

Dans les eaux naturelles les organismes aquatiques seront rarement exposés à des concentrations élevées d'ions métalliques pendant de longues périodes car leur biodisponibilité sera réduite par exemple par des processus de complexation et d'adsorption à de la matière organique et à des argiles. Une telle diminution de la biodisponibilité du Cd pourrait permettre une reprise de la croissance chez des espèces phytoplanctoniques résistantes au Cd. La possibilité d'une reprise de la croissance chez S. capricornutum, espèce pour laquelle la présente expérience a mis en évidence des mécanismes de tolérance au Cd, de même que le rôle des macromolécules et des deux principales voies de production d'ATP, la photosynthèse et la respiration, feront l'objet des chapitres 5, 6 et 7.



## Chapitre 5

Variations des teneurs cellulaires en Cd chez  
Selenastrum capricornutum pendant les périodes  
d'exposition au Cd et de récupération de la croissance



## 5.1 Introduction

Les résultats du chapitre 4 démontrent qu'une longue exposition à de fortes concentrations de Cd entraîne des diminutions importantes et significatives de la croissance chez S. capricornutum. Cependant, nos résultats suggèrent également que les cellules exposées au Cd possèdent des réserves énergétiques qui pourraient permettre le maintien de la viabilité jusqu'au retour de conditions moins contraignantes pour la croissance. Par ailleurs, dans les premières heures d'exposition au Cd une modification du métabolisme des protéines, qui prend la forme d'une augmentation du rapport protéine/polysaccharide, est observée. Selon Li (1979), l'acclimatation au Cd se manifeste par une telle modification du métabolisme.

Ces résultats suggèrent qu'une diminution de la biodisponibilité de l'ion  $Cd^{2+}$  pourrait entraîner une reprise de la croissance chez S. capricornutum. En effet, selon Foster et Morel (1982) la toxicité n'apparaîtrait que lorsque la concentration de métal dans les cellules atteint un niveau critique. De plus, les cellules algales seraient en équilibre délicat entre l'inhibition et la croissance. Ces auteurs ainsi que Harrison et Morel (1983) ont d'ailleurs observé une récupération de la croissance chez la diatomée T. weissflogii après l'ajout d'EDTA au milieu de culture. Foster et Morel (1982) ont démontré que l'EDTA n'agissait pas en entraînant une désorption du Cd pris en charge par les cellules, mais plutôt en diminuant la concentration de l'ion libre ( $Cd^{2+}$ ) dans le milieu de culture. La réponse biologique serait, en effet, proportionnelle à la concentration de l'ion libre (Davey et al. 1973; Cossa 1976; Sunda et Guillard 1976; Sunda et Gillespie 1979; Bernhard et George 1986).

Les travaux de Foster et Morel (1982) et de Harrison et Morel (1983), ainsi que les réponses acclimatatives observées chez S. capricornutum au chapitre précédent, suggèrent que dans le milieu naturel l'inhibition de la croissance de populations phytoplanctoniques par le Cd pourrait n'être que de courte durée. La biodisponibilité du Cd pourrait, en effet, être réduite par des processus comme la complexation et l'adsorption. Le Cd, présent dans les eaux usées domestiques et industrielles, peut se lier à des ligands riches en atomes de soufre, d'azote et de selenium. Le Cd peut ainsi former des complexes stables avec une grande variété de composés organiques tels que les acides humiques, le NTA (acide nitrilotriacétique), l'EDTA, les acides et les sucres aminés et les acides carboxyliques de nature aliphatique et aromatique (Moore et Ramamoorthy 1984).

La présente expérience a donc pour but de vérifier si une diminution de l'activité de l'ion libre ( $Cd^{2+}$ ) par l'ajout d'EDTA au milieu de culture entraînera une reprise de la croissance chez S. capricornutum.

## 5.2 Matériel et méthodes

Deux bouteilles en polycarbonate contenant 20 L de milieu de culture AAP modifié (Chiaudani et Vighi 1978) ont été inoculées avec une population asynchrone de la Chlorophycée S. capricornutum. La densité cellulaire initiale était de 25 000 cellules·mL<sup>-1</sup>.

À la fin de la phase de latence les deux cultures ont été contaminées avec une solution concentrée de Cd afin d'obtenir des concentrations nominales

de 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . Après 48 h d'exposition au Cd, de l'EDTA ( $2.67 \times 10^{-6}\text{M}$  EDTA, concentration finale) a été ajouté à chaque bouteille. La récupération des populations a été suivie durant 49 h après l'ajout de l'agent complexant.

Des mesures de densité cellulaire et de teneur cellulaire en Cd étaient effectuées en double, à intervalles réguliers après les ajouts de Cd et d'EDTA. La densité cellulaire était mesurée selon la méthode décrite à la sous-section 3.2.1, tandis que les teneurs cellulaires en Cd ont été mesurées selon une méthode semblable à celle de Schenck et al. (1988). Quatre échantillons de 250 mL étaient prélevés. Deux des échantillons étaient filtrés (pression  $\leq 100$  mm Hg) sur deux filtres Nuclepore  $0.4 \mu\text{m}$  superposés. Ces filtres étaient conservés pour la détermination du Cd. Une mesure de la concentration totale de Cd dans les algues (teneur totale en Cd, en  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{million de cellules}^{-1}$ ) était obtenue après la soustraction du "blanc" (Cd adsorbé sur le filtre du dessous). Parallèlement, 10 mL d'une solution de  $6.67 \times 10^{-5}\text{M}$  EDTA étaient ajoutés au deux autres échantillons de 250 mL (concentration finale d'EDTA:  $2.67 \times 10^{-6}\text{M}$ ). Après 20 min de contact avec l'EDTA, ces échantillons étaient filtrés tel que décrit plus haut et les filtres conservés pour la détermination du Cd. Une mesure de la concentration de Cd non-extractible à l'EDTA prise en charge par les cellules était ainsi obtenue (Cd absorbé, en  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{million de cellules}^{-1}$ ). La concentration de Cd extractible à l'EDTA associée aux cellules (Cd adsorbé, en  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{million de cellules}^{-1}$ ) était obtenue en calculant la différence: [teneur totale Cd] - [Cd absorbé].

Les concentrations de Cd étaient déterminées au moyen d'un spectrophotomètre à absorption atomique muni d'une fournaise au graphite après digestion des filtres avec 0.5 mL HNO<sub>3</sub> (qualité Aristar). Les bombes en Teflon contenant les filtres et l'acide nitrique étaient incubées pendant 10 min. dans un bain thermostaté à 100°C. L'efficacité de digestion a été vérifiée avec des feuilles de citronier (U.S. Department of Commerce, National Bureau of Standards, matériel standard de référence No. 1572) et celle-ci a varié entre 94 et 102%.

Au cours de l'expérience, la somme de la concentration de Cd en solution et de la concentration de Cd total pris en charge par les cellules représente respectivement entre 70 et 88% et entre 81 et 88% des concentrations nominales de 30 et 100 µg Cd·L<sup>-1</sup> ajoutées aux milieux de culture.

Toute la vaisselle utilisée pour cette expérience était nettoyée en la laissant tremper pendant au moins 12 h dans de l'acide nitrique 10%. Elle était ensuite rincée abondamment avec de l'eau Milli-Q (système Millipore Milli Q3 RO/Milli-Q2). Toutes les solutions étaient préparées avec de l'eau Milli-Q.

### 5.3 Résultats et discussion

Au cours de la période d'exposition au Cd (0.25 - 47.75 h), la croissance de S. capricornutum est fortement inhibée par les deux concentrations de Cd utilisées (Figure 5.1). Les taux de croissance ( $\mu_{0-47.75 h}$ ) des populations exposées à 30 et 100 µg Cd·L<sup>-1</sup> sont respectivement 0.002 et 0. Par ailleurs, suite à l'ajout d'EDTA une importante reprise de la

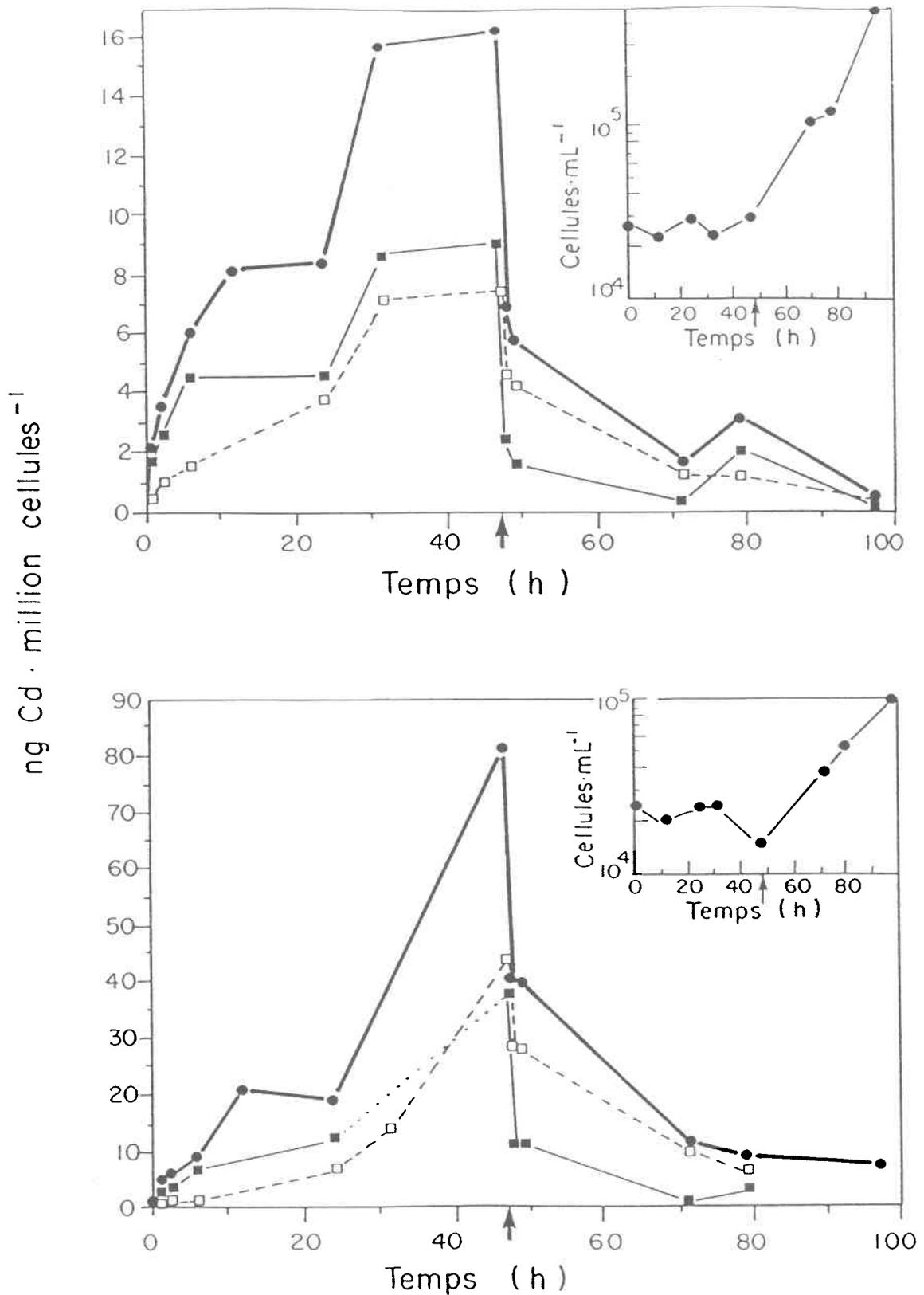


Figure 5.1: Croissance (encadré) et teneurs cellulaires en Cd total (•), en Cd adsorbé (■) et en Cd absorbé (□) avant et après l'ajout de  $2.67 \times 10^{-6}M$  EDTA chez des populations de *S. capricornutum* exposées à 30 (A) et 100 (B)  $\mu g Cd \cdot L^{-1}$ . ↑ indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

croissance est observée aux deux concentrations de Cd. Les taux de croissance ( $\mu_{48-97.5 \text{ h}}$ ) sont en effet de l'ordre de  $0.056 \cdot \text{h}^{-1}$  et de  $0.038 \cdot \text{h}^{-1}$  chez les populations exposées à 30 et  $100 \mu\text{g Cd} \cdot \text{L}^{-1}$ . Chez la diatomée T. weissflogii exposée au Cd, la reprise de la croissance après l'ajout d'EDTA nécessitait un ajout de Fe au milieu de culture (Foster et Morel 1982; Harrison et Morel 1983). Dans le cas présent, l'ajout d'EDTA (sans ajout de métaux traces) était suffisant pour permettre la récupération de la croissance de S. capricornutum. Ceci pourrait soit indiquer des besoins en Fe moins importants chez S. capricornutum que chez T. weissflogii, ou soit une plus grande biodisponibilité du Fe dans nos conditions expérimentales.

Pendant la période d'exposition au Cd, la prise en charge de l'ion métallique par les cellules est très importante. En effet après 48 h d'exposition, les concentrations totales de Cd pris en charge par les cellules exposées à 30 et  $100 \mu\text{g Cd} \cdot \text{L}^{-1}$  sont respectivement 16 et 81 ng Cd-millions de cellules. Li (1979) a, pour sa part, mesuré une concentration de 28 ng Cd-millions de cellules chez T. weissflogii exposée à  $60 \mu\text{g Cd} \cdot \text{L}^{-1}$ . L'absorption de Cd par ces deux espèces semble donc être du même ordre de grandeur. La prise en charge de Cd débute par une phase rapide (15 min.) et est suivie d'une phase plus lente (0.25 - 47.75 h). Dans les 115 premières minutes d'exposition au Cd, le taux de prise en charge est  $3.9$  et  $9.5$  ng Cd-million de cellules $^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  chez les populations exposées respectivement à 30 et  $100 \mu\text{g Cd} \cdot \text{L}^{-1}$ . Au cours de la phase lente de prise en charge du Cd, les taux sont inférieures à  $1.4$  ng Cd-million de cellules $^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  chez la population exposée à  $30 \mu\text{g Cd} \cdot \text{L}^{-1}$  tandis qu'ils sont inférieurs à  $2.5$  ng Cd-million de

cellules<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> chez la population exposée à 100 µg Cd·L<sup>-1</sup>. Plusieurs auteurs ont mis en évidence une assimilation bi-phasique du Cd (Gipps et Coller 1980; Geisweid et Urbach 1983; Skowronski 1986). La phase rapide est considérée comme une phase d'échange d'ions avec la paroi cellulaire, tandis que la phase plus lente correspondrait au transport des ions vers le cytoplasme (Gipps et Coller 1980). Le transport des ions pourrait s'effectuer par diffusion ou par transport facilité (actif ou passif). L'implication du métabolisme des cellules dans la phase plus lente de prise en charge du Cd est supportée par plusieurs travaux. Cette phase semble nécessiter de l'énergie puisqu'elle est réduite ou inhibée à l'obscurité, par l'action de découpleurs du métabolisme tels que le 2-4 dinitrophénol et le carbonyl cyanide m-chlorophénylhydrazone (CCCP), et par le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, un inhibiteur de l'ATPase (Skowronski 1986). Le Cd pourrait être transporté à l'intérieur de la cellule via les sites transporteurs de Zn ou de Mn (Hart et al. 1979; Skowronski 1986).

Les présents résultats démontrent bien que le Cd est absorbé à l'intérieur des cellules plus lentement qu'il s'adsorbe à la paroi cellulaire. Par exemple à 30 µg Cd·L<sup>-1</sup>, 50% du Cd adsorbé est pris en charge dans les six premières heures de l'expérience tandis que 24 h sont nécessaires pour que 50% du Cd absorbé se retrouve à l'intérieur de la cellule. Cette tendance se reflète également dans les rapports entre la concentration de Cd absorbé et adsorbé (Cd absorbé/Cd adsorbé) (Tableau 5.1). En effet, dans les six premières heures de l'expérience la valeur moyenne de ce rapport est de 0.322 (± 0.062) tandis qu'il se situe à une valeur moyenne de 0.826 (± 0.002) pour le reste de la période d'exposition. Bien que les résultats soient plus variables, une tendance similaire est observée à 100 µg Cd·L<sup>-1</sup>. Ces résultats démontrent que

Tableau 5.1: Rapport entre les concentrations de Cd absorbé et adsorbé (Cd absorbé/Cd adsorbé) de populations de S. capricornutum exposées à 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Temps (h)	Concentration de Cd ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
	30	100
0.25	0.32	0.16
1	0.24	0.16
2	0.38	0.31
6	0.34	0.21
24	0.82	0.56
32	0.83	-
47.75	0.83	0.87

la proportion de Cd à l'intérieur de la cellule devient plus importante après 24 h de prise en charge de Cd. Cossa (1976) suggère d'ailleurs que la quantité de Cd absorbé à l'intérieur de la cellule est fonction des teneurs en Cd à la surface de la cellule.

À la fin de la période d'exposition au Cd (47.75 h), 7 et 9 ng Cd·million de cellules<sup>-1</sup> sont respectivement absorbés et adsorbés par les cellules soumises à 30 µg Cd·L<sup>-1</sup>. Les teneurs cellulaires en Cd sont plus importantes chez les cellules en contact avec 100 µg Cd·L<sup>-1</sup>. À cette concentration de Cd, 38 et 44 ng Cd·million de cellules<sup>-1</sup> sont, en effet, absorbés et adsorbés par les cellules (Figure 5.1). De plus, l'absorption de Cd à l'intérieur de la cellules correspond à 45% (30 µg Cd·L<sup>-1</sup>) et 53% (100 µg Cd·L<sup>-1</sup>) de tout le Cd pris en charge (Cd total). Ces valeurs sont inférieures à celles observées chez Ankistrodesmus braunii (Laube et al. 1980) et chez Chlorella regularis (Nakajima et al. 1981). Ces données suggèrent que le degré d'inhibition de la croissance, qui est plus important chez la population exposée à 100 µg Cd·L<sup>-1</sup>, pourrait être relié aux teneurs cellulaires en Cd.

Contrairement aux résultats de Foster et Morel (1982), dans la présente expérience l'ajout de l'agent complexant (EDTA) provoque une importante désorption du Cd pris en charge par les cellules au cours de la période d'exposition à 30 et 100 µg Cd·L<sup>-1</sup> (Figure 5.1). En effet, une heure après l'ajout d'EDTA la concentration de Cd adsorbé aux cellules est réduite de 82% et 70% chez les populations exposées respectivement à 30 et 100 µg Cd·L<sup>-1</sup>. Ces réductions sont en accord avec les valeurs de Cd adsorbé et de Cd cellulaire mesurées à 47 h (Fig. 5.1), c'est-à-dire juste avant l'ajout de

l'EDTA au milieu de culture lui-même. Ces valeurs sont également voisines des taux de perte de Cd de  $\geq 90\%$  observés par Sakaguchi et al. (1979) et par Les et Walker (1984) en lavant avec une solution d'EDTA des cellules algales ayant été exposées au Cd. Cette proportion importante de Cd faiblement lié à la paroi cellulaire est aussi en accord avec les résultats de Cossa (1976) et de Conway et Williams (1979). Les diminutions subséquentes des teneurs cellulaires en Cd semblent reliées à la croissance. Par exemple, à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  entre 48 h et 72 h, il y a une augmentation de la densité cellulaire de 275% qui est accompagnée d'une diminution de 253% du Cd absorbé dans les cellules. Pendant la même période, à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , l'augmentation de 160% de la densité cellulaire est accompagnée d'une diminution de 191% du Cd absorbé. Une proportion du Cd absorbé apparaît donc fortement liée à la cellule et est seulement réduit par le biais de la division cellulaire en étant partagé parmi les nouvelles cellules.

Quarante-huit heures après l'ajout de  $10^{-4}$  M EDTA, Stauber et Florence (1986) ont observé la reprise de la croissance d'une population de Nitzschia closterium préalablement exposée à  $70 \mu\text{g Cu}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cette récupération serait due au lent transport du Cu hors de la cellule. En complexant fortement le Cu(II) en solution, l'EDTA déplacerait l'équilibre  $\text{Cu(I)} - \text{Cu(II)}$  vers le Cu(II) provoquant ainsi une désorption du Cu cellulaire. Dans la présente expérience, l'EDTA ajouté, après une exposition au Cd de 48 h, pourrait agir d'une façon similaire sur l'équilibre Cd-cellule  $\rightleftharpoons \text{Cd}^{2+}$ . L'importante désorption du Cd pris en charge par les cellules ne peut s'expliquer que par un fort degré de complexation à l'EDTA du Cd en solution. Or, le modèle d'équilibres chimiques MINEQL prédit que dans le milieu de culture AAP

seulement 15% du Cd sera complexé à l'EDTA (c.f. sous-section 3.3.2), l'EDTA ayant une plus grande affinité pour le Cu présent dans le milieu. Toutefois puisque l'EDTA est ajouté 48 h après le début de l'expérience, il est probable qu'une importante proportion du Cu a été assimilée par les algues et qu'ainsi la concentration en Cu dissous du milieu est fortement réduite. Dans ce cas, c'est-à-dire en absence de  $\text{Cu}^{2+}$  libre en solution, le modèle MINEQL prédit que tout le Cd en solution sera complexée par le ligand (99.9%), provoquant ainsi l'importante désorption du Cd cellulaire observée au cours de la présente expérience.

Par ailleurs, le court délai observé ici entre l'ajout de l'EDTA et la reprise de la croissance de S. capricornutum, comparativement aux 48 h nécessaires à la récupération chez N. closterium exposé au Cu (Stauber et Florence 1986), pourrait s'expliquer par la plus grande affinité du Cu pour des ligands cellulaires tels que la cystéine et le glutathion (Florence et Stauber 1986).

#### 5.4 Conclusion

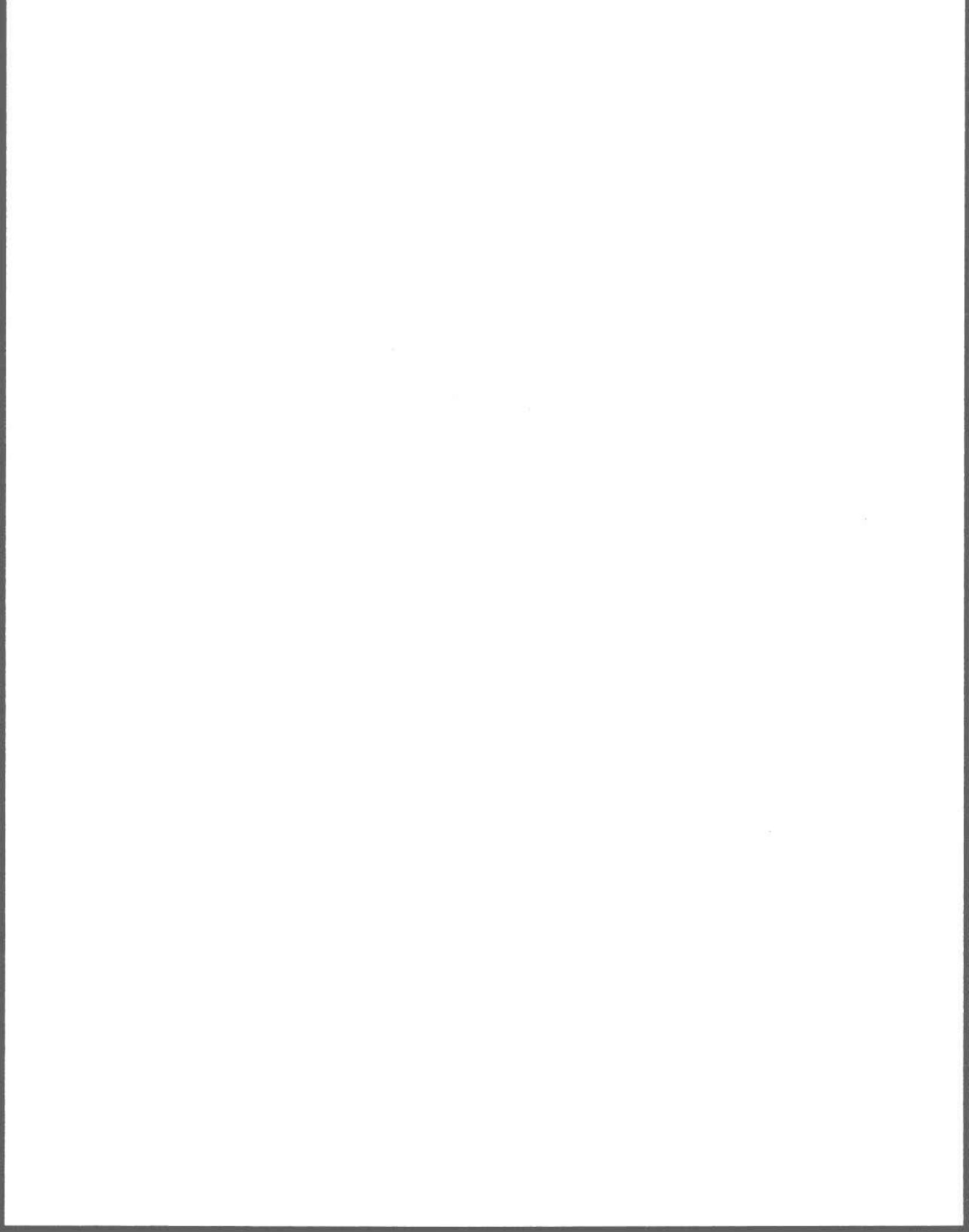
L'inhibition de la croissance apparaît reliée à la présence de Cd adsorbé ou absorbé par les cellules puisque la récupération de la croissance a lieu dans les 10 h suivant l'ajout d'EDTA au milieu de culture, lequel a entraîné une désorption rapide du Cd. Les taux de croissance de la population exposée à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , qui sont plus faibles entre 24 h et 47.75 h ( $\mu = 0.001$ ), au moment où la proportion de Cd absorbé devient plus importante, que dans les premières 24 h ( $\mu = 0.003$ ), suggèrent que le Cd fortement lié à la

cellule est responsable des effets toxiques de ce métal. Ceci pourrait expliquer l'absence d'effet toxique observée au chapitre 4 dans les premières heures d'exposition à certaines concentrations de Cd.

La récupération de la croissance de populations phytoplanctoniques préalablement exposées à des substances toxiques pourrait être le résultat d'une activité métabolique intense. Thompson et al. (1987) ont en effet démontré que la reprise de la croissance de S. capricornutum exposé au Cd et à un effluent industriel était accompagnée d'une augmentation des teneurs cellulaires en ATP. Les deux prochains chapitres seront consacrés à l'évaluation des rôles respectifs de la photosynthèse et de la respiration, les deux principales voies de synthèse de l'ATP chez les algues, dans la récupération de la croissance de S. capricornutum exposé au Cd.

## Chapitre 6

Processus de récupération de populations de Selenastrum capricornutum exposées  
au Cd:I. Photosynthèse et synthèse de macromolécules



## 6.1 Introduction

Les résultats de l'expérience précédente démontrent bien la récupération de la croissance de populations de S. capricornutum suite à une exposition d'une durée de 48 h à 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . Or, la croissance de populations algales est contrôlée par un ensemble de processus qui permettent, d'une part la synthèse de matériaux essentiels à la croissance tels que les protéines ainsi que de produits de réserve (lipides et polysaccharides) (Morris 1981), et d'autre part la réplication du matériel génétique ainsi que la division cellulaire.

Les travaux de Sundberg et Nilshammar-Holmvall (1975), concernant la Chlorophycée Scenedesmus sp., suggèrent que pendant les phases de division nucléaire (réplication de l'ADN) et de formation de nouvelles cellules, les cellules algales sont métaboliquement très actives. Ainsi, pendant cette période, ils ont observé une augmentation des teneurs cellulaires en amidon et en lipides, ainsi qu'une augmentation de la respiration. Par ailleurs, il semble qu'en période de croissance active la synthèse de protéines prédomine chez les algues planctoniques (Fogg 1956; Parsons et al. 1961; Smith et Geider 1985). Le rôle important des macromolécules dans la croissance algale ne peut donc pas être nié.

La synthèse de ces macromolécules nécessite cependant des apports suffisants en phosphore, en azote et en carbone. Or, l'inhibition de l'assimilation photosynthétique du carbone par le Cd est bien documentée. L'inhibition de la photosynthèse par le Cd a, en effet, été observée chez des Chlorophycées (Klass et al. 1974; Overnell 1975; Hart et Scaife 1977; Wong et

al. 1979; Thompson et al. 1987), chez des diatomées (Berland et al. 1977; Conway et Williams 1979; Harrison et Morel 1983) ainsi que chez des Cyanophycées (Azeez et Banerjee 1986). Ce phénomène est donc très répandu chez les algues planctoniques exposées au Cd et pourrait être lié à l'inhibition des processus photochimiques de la photosynthèse ou à l'inhibition d'enzymes impliquées dans l'assimilation du carbone inorganique. Selon Baszynski et al. (1980), Li et Miles (1975) et Van Duijvendijk-Matteoli et Desmet (1975), le transport photosynthétique d'électrons est inhibé par le Cd à un site associé au centre réactionnel du photosystème II. Cette hypothèse est confirmée par les travaux de De Filippis et al. (1981a) qui ont démontré que le Cd interfère avec les activités de transport d'électrons et de photolyse de l'eau du photosystème II et qu'il inhibe l'enzyme NADP-oxydoréductase impliquée dans la réduction du NADP, l'accepteur final d'électrons du photosystème.

L'inhibition de l'activité de l'anhydrase carbonique (Lee et al. 1976; Vallee et Ulmer 1972) et de la ribulose-1,5-diphosphate carboxylase (Kremer et Markham 1982) par le Cd pourrait également résulter en une diminution de la disponibilité du carbone pour la synthèse des macromolécules. En catalysant la conversion de l'ion bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) en  $\text{CO}_2$ , l'anhydrase carbonique joue un rôle significatif dans la photosynthèse (Kremer 1981) en fournissant le  $\text{CO}_2$  qui sera condensé avec l'atome  $\text{C}_2$  de la ribulose-1,5-diphosphate dans le cycle de Calvin (Lehninger 1977). Par ailleurs, cette réaction (ribulose-1,5-diphosphate +  $\text{CO}_2 \rightleftharpoons 2$  3-phosphoglycérate) est catalysée par l'enzyme ribulose-1,5-diphosphate carboxylase (Kremer 1981). Ainsi une diminution de l'activité de l'une ou l'autre de ces deux enzymes par le Cd pourrait diminuer la quantité de phosphoglycérate produite par le cycle de Calvin.

Ces connaissances sur les processus physiologiques impliqués dans la croissance algale ainsi que sur les effets du Cd sur la photosynthèse permettent d'avancer les hypothèses suivantes: la récupération de la croissance de populations de S. capricornutum préalablement exposées au Cd sera la résultat de la récupération de la photosynthèse et sera accompagnée d'un taux élevé de synthèse de protéines (H<sub>2.4</sub>) et de lipides (H<sub>2.1</sub>).

À notre connaissance, la présente expérience constitue la première investigation du rôle de la photoassimilation du carbone dans la récupération de la croissance de populations phytoplanctoniques exposées à des ions métalliques toxiques.

## 6.2 Matériel et méthodes

### 6.2.1 Protocole expérimental

Trois bouteilles en polycarbonate contenant 20 L de milieu de culture AAP modifié (sans EDTA: Chiaudani et Vighi 1978) ont été inoculées avec une population asynchrone de la Chlorophycée S. capricornutum afin d'obtenir une densité cellulaire initiale de 25 000 cellules·mL<sup>-1</sup>. Les conditions de température et d'éclairement étaient celles décrites à la section 3.1. Pendant toute la durée de l'expérience, le pH était maintenu à  $7.2 \pm 0.2$  par l'ajout automatique de CO<sub>2</sub> (Bates et al. 1985), contrôlé à l'aide d'un contrôleur à pH (Horizon Ecology Co., modèle 5997).

Au début de la phase exponentielle de croissance, deux des trois cultures étaient contaminées avec une solution concentrée de Cd afin d'obtenir

des concentrations nominales de 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . La troisième culture servait de témoin. Après 48 h d'exposition au Cd (période d'exposition: 0 - 48 h), de l'EDTA (concentration finale:  $2.67 \times 10^{-6}\text{M}$ ) était ajouté à chacune des cultures afin de complexer le Cd en solution (c.f. sous-section 3.3.2). Suite à l'ajout d'EDTA, l'expérience se poursuivait jusqu'à 96 h (période de récupération: 48.5 - 96 h).

À intervalles réguliers pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération, des mesures de densité cellulaire, de biomasse (chlorophylle-a: chl-a), de taux d'assimilation de carbone et d'allocation du carbone assimilé dans les métabolites à faible poids moléculaire (MFPM), dans les protéines, dans les lipides et dans les polysaccharides ont été effectuées.

#### 6.2.2 Méthodes de mesures

##### a) **Dénombrement des cellules**

À chaque temps d'échantillonnage, les cellules ont été dénombrées quatre fois au moyen d'un compteur électronique de particules (Coulter Counter; modèle TA) muni d'une cellule ayant un orifice de 70  $\mu\text{m}$ .

##### b) **Chlorophylle-a**

La méthode d'extraction de chl-a décrite par Strickland et Parsons (1972) a été retenue pour le présent travail. Deux échantillons de 20 mL de culture étaient filtrés sur des membranes en microfibrilles de verre de 4.5 cm de diamètre (Whatman GF/C). Afin d'éviter l'acidification du filtre et la

destruction possible de la chl-a, 0.5 mL d'une solution saturée de MgCO<sub>3</sub> était ajouté vers la fin de la filtration (Strickland et Parsons 1972). Les filtres étaient conservés à l'obscurité, au congélateur jusqu'au moment du dosage de la chl-a (< 15 jours).

Au moment de l'analyse, les filtres étaient décongelés et broyés dans un faible volume d'acétone à 90% avec un broyeur à tissus. Cette étape vise à améliorer l'efficacité de l'extraction (Yentsch et Menzel 1963) dans 10 mL d'acétone à 90% pendant 24 h à 4°C (Strickland et Parsons 1972). L'extraction terminée, les échantillons étaient centrifugés pendant 10 min à 3000g. Au moyen d'une pipette Pasteur, une aliquote de l'échantillon était prélevée et le dosage était effectué au moyen d'un fluorimètre Turner Designs selon la méthode décrite par APHA et al. (1980). Après correction pour la phéophytine a, un pigment de dégradation de la chl-a qui interfère avec son dosage (Vernon 1960; Patterson et Parsons 1963), la concentration en chl-a dans le milieu de culture était obtenue et est exprimée en  $\mu\text{g chl-}\underline{\text{a}}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### **c) Taux d'assimilation de carbone**

L'activité photosynthétique d'algues planctoniques peut être estimée en mesurant la quantité de <sup>14</sup>C incorporée dans les algues après incubation dans un milieu ayant reçu du NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>. Cette méthode, initialement décrite par Steemann-Nielsen (1952), est largement acceptée et utilisée afin de déterminer la production photosynthétique de divers habitats aquatiques (Li et Goldman 1981; Richardson et al. 1984). Cependant, malgré l'usage répandu de cette méthode une incertitude demeure, à savoir si elle mesure la photosynthèse nette ou brute (Richardson et al. 1984). Or, pour les fins de la présente expérience

la durée de l'incubation en présence de  $^{14}\text{C}$  a été réduite à 2 h afin d'augmenter les probabilités d'obtenir une mesure de la photosynthèse brute (Ryther 1954; Thomas 1964; Malone 1982). Cette question est importante puisque la production primaire nette est définie comme étant égale au taux de photosynthèse brute moins le taux de respiration, et que la respiration peut être inhibée à certaines concentrations de Cd (Lee et al. 1976; Sathya et Balakrishnan 1988). Ainsi, en ne mesurant que le taux de photosynthèse brute les données obtenues aux différentes concentrations de Cd peuvent être comparées et sont représentatives des processus d'assimilation de carbone.

À partir de ces considérations la méthode suivante a servi à mesurer le taux d'assimilation de carbone. À intervalles réguliers, deux échantillons de 50 mL de milieu de culture étaient prélevés et versés dans des flacons Erhlemeyer en polycarbonate de 250 mL. Avant de fermer les flacons et d'incuber les échantillons pendant deux heures à une intensité lumineuse de  $65 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$  (intensité de saturation de la photosynthèse: c.f. section 3.1), une aliquote de 10 mL était prélevée. Neuf mL servaient à la détermination de la concentration de carbone inorganique dissous (mesure du  $\text{H}^{12}\text{CO}_3$  disponible) et 200  $\mu\text{L}$  servaient à la détermination de la radioactivité (mesure du  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  disponible) par les méthodes décrites à la section 4.2.2.

À la fin de la période d'incubation, une aliquote de 20 mL de l'échantillon était filtrée sur une membrane Nuclepore d'une porosité de 0.4  $\mu\text{m}$ . Le filtre était ensuite rincé avec 10 mL de milieu de culture AAP afin d'éliminer la radioactivité résiduelle (Furnas 1983; Jasper et Bothwell 1986). Les filtres séchés étaient ensuite déposés dans une fiole à scintillation contenant 10 mL de liquide à scintillation de marque Scintiverse II. La radio-

activité des échantillons était mesurée par la méthode décrite à la section 4.2.2. Le taux d'assimilation de carbone était ensuite calculé avec l'équation de Vollenweider (1974):

$$\mu\text{g C}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1} = \frac{{}^{14}\text{C assimilé} \times {}^{12}\text{C disponible} \times 1.06}{{}^{14}\text{C disponible} \cdot 2 \text{ h}}$$

Aucune correction pour l'assimilation de carbone à l'obscurité n'a été apportée (Malone 1982; Richardson et al. 1984) puisqu'une expérience préliminaire a démontré que cette valeur était toujours inférieure à 10% de l'assimilation à la lumière.

La deuxième aliquote de 20 mL, servant à mesurer le taux d'incorporation du carbone assimilé dans les fractions macromoléculaires, était filtrée sur une membrane en microfibrilles de verre de 2.5 cm de diamètre (Whatman GF/C). Après rinçage avec 10 mL de milieu de culture AAP, les filtres étaient introduits dans des éprouvettes contenant 1.2 mL d'eau déminéralisée. Ils étaient alors congelés jusqu'au moment de leur analyse. L'analyse était effectuée selon la méthode décrite à la section 4.2.2 et le taux d'incorporation de carbone dans chaque fraction macromoléculaire était calculé avec l'équation de Vollenweider (1974) décrite précédemment.

L'ensemble des résultats d'assimilation de carbone ont ensuite été exprimés par unité de cellule ( $\mu\text{g C}\cdot\text{cellule}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), le volume cellulaire n'ayant pas varié avec la concentration de Cd ( $F = 0.81$ ;  $p = 0.45$ ).

### 6.3 Résultats et discussion

Au cours des 48 premières heures de l'expérience, la densité cellulaire (Figure 6.1A), la biomasse en chl-a (Figure 6.1B) ainsi que l'assimilation de carbone (Figure 6.2) sont significativement plus faibles chez les populations exposées à 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tableau 6.1). Les taux de croissance des populations exposées à 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  sont 60% et 2% du témoin lorsqu'ils sont calculés avec le nombre de cellules (Tableau 6.2A) tandis qu'ils sont 56% et 10% du témoin lorsqu'ils sont calculés avec la chl-a comme mesure de la biomasse algale (Tableau 6.2B). En ce qui a trait à l'activité photosynthétique, les taux d'assimilation de carbone ( $\text{pg C}\cdot\text{cellule}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) sont 62% et 20% de la valeur de la population témoin chez les populations exposées respectivement à 30 et à 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tableau 6.3). Les résultats obtenus à la plus forte concentration de Cd confirment ceux de Berland et al. (1977) qui ont démontré que le taux de division cellulaire de la diatomée Skeletonema costatum était plus sensible à la toxicité du Cd que l'assimilation de carbone. Cependant, à la plus faible concentration de Cd utilisée ici, le degré d'inhibition de la croissance est très similaire à celui de la photosynthèse.

L'inhibition de la photosynthèse par le Cd pourrait être attribuée à deux principaux facteurs. D'une part, la diminution significative de 13% et de 35% des teneurs en chl-a des cellules exposées respectivement à 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figure 6.3; Tableau 6.1) pourrait réduire la quantité d'énergie disponible pour les réactions photochimiques de la photosynthèse. Il existe en effet une relation étroite entre les teneurs en chl-a et l'activité photochimique du centre réactionnel du photosystème (Prézélin 1981). Conway (1978) et Bazzaz et Govindjee (1974) ont respectivement démontré que le Cd diminue les

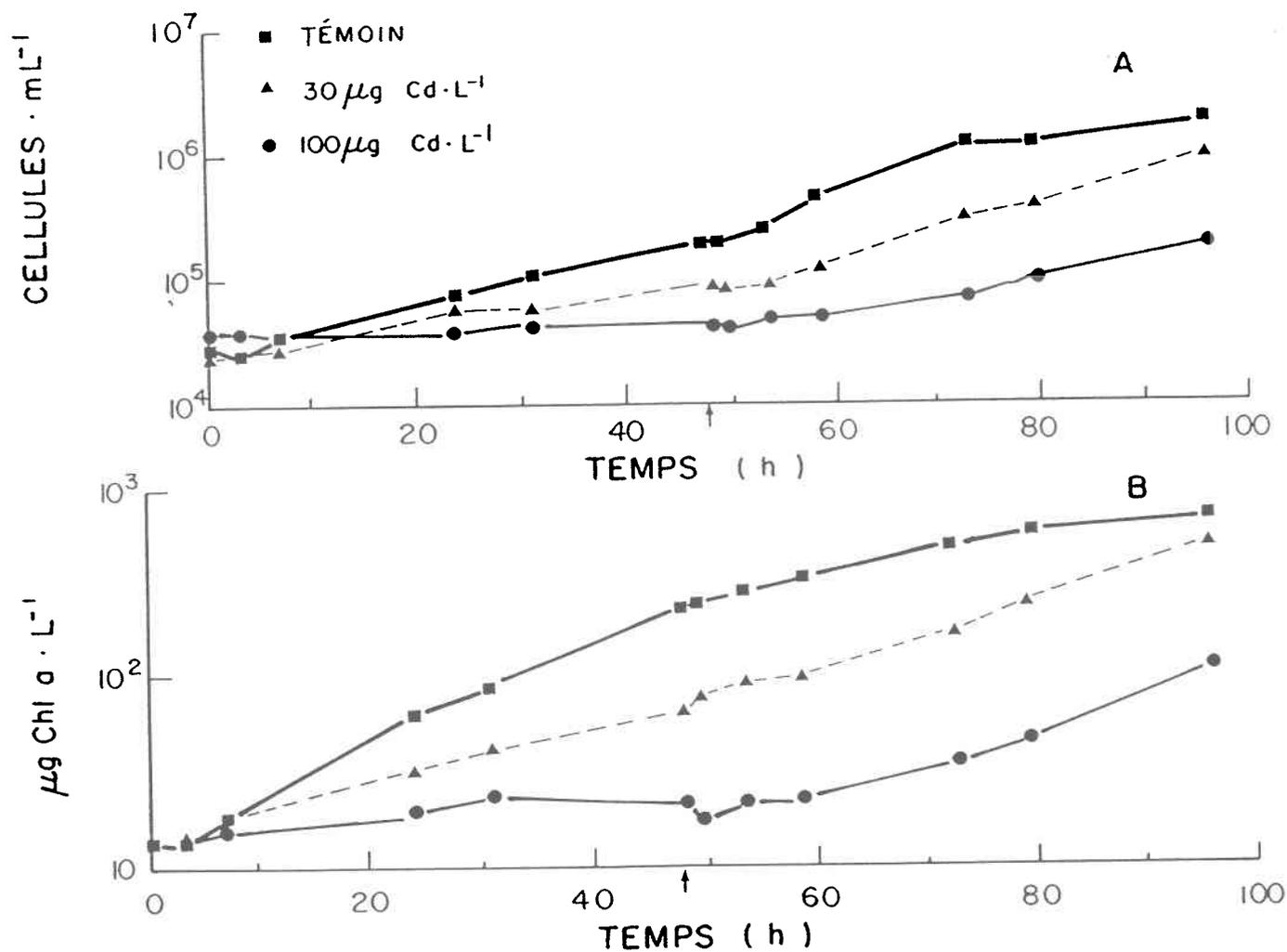


Figure 6.1 Croissance mesurée selon la densité cellulaire (A) et la concentration de chl-a (B) dans le milieu, de populations de *S. capricornutum* exposées à 0, 30 et 100 µg Cd·L<sup>-1</sup>. ↑ indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

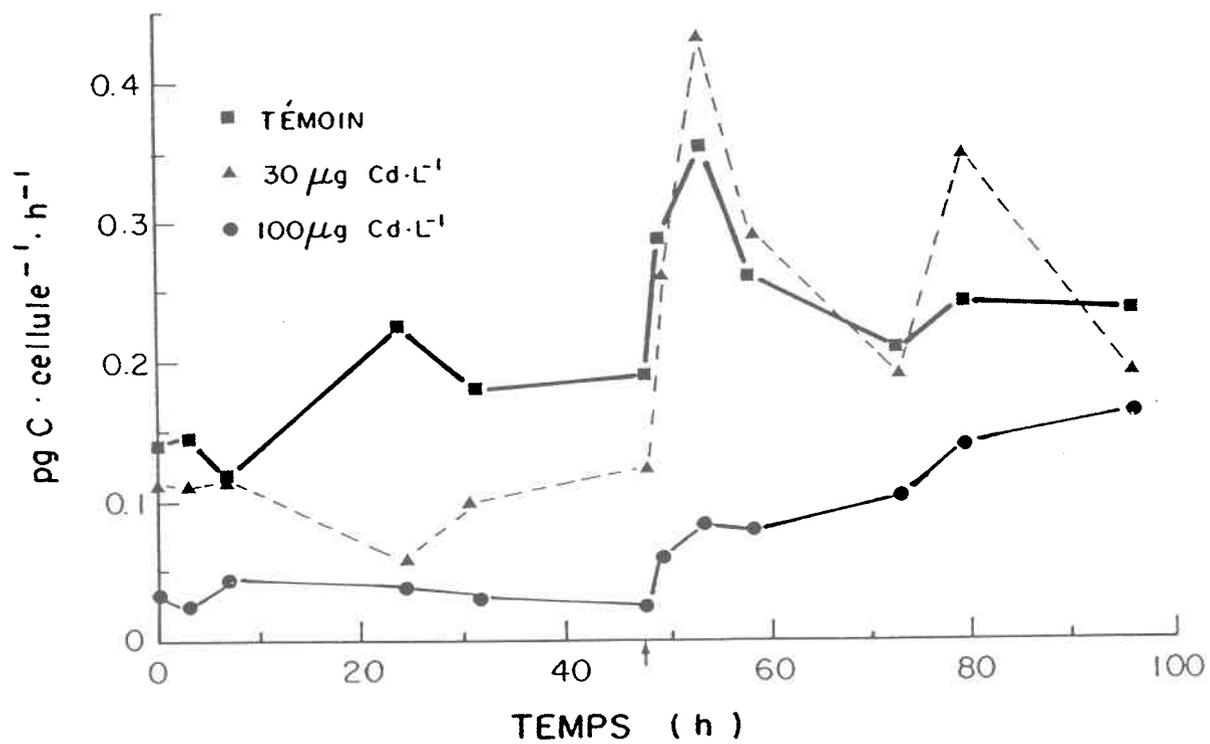


Figure 6.2: Taux de photosynthèse de populations de *S. capricornutum* exposées à des concentrations de 0, 30 et 100 µg Cd·L<sup>-1</sup>. ↑ indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

Tableau 6.1: Effets du Cd sur la densité cellulaire, la concentration en chl-a dans le milieu, la concentration de chl-a dans les cellules et le taux de photosynthèse pendant la période d'exposition (0 - 48 h) à 0, 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . (ANOVA à 1 critère).

PARAMÈTRE	RAPPORT F	PROBABILITÉ
Densité cellulaire (cellules $\cdot\text{L}^{-1}$ )	5.14	0.01 < p < 0.05
Chl-a ( $\mu\text{g Chl-a}\cdot\text{L}^{-1}$ )	4.13	0.01 < p < 0.05
Chl-a $\cdot\text{cellule}^{-1}$ (pg Chl-a $\cdot\text{cellule}^{-1}$ )	6.78	< 0.01
Taux de photosynthèse (pg C $\cdot\text{cellule}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	74.91	< 0.01

Tableau 6.2: Taux de croissance ( $\mu \cdot h$ ) de populations de S. capricornutum pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération.

**A - Densité cellulaire**

[Cd]	$\mu_0 - 48 \text{ h}$	$\mu_{49.5 - 96 \text{ h}}$	% augm.
Témoin	0.040	0.045	13
30 $\mu\text{g Cd} \cdot \text{L}^{-1}$	0.024	0.052	117
100 $\mu\text{g Cd} \cdot \text{L}^{-1}$	0.001	0.032	3200

**B - Chlorophylle-a**

[Cd]	$\mu_0 - 48 \text{ h}$	$\mu_{49.5 - 96 \text{ h}}$	% augm.
Témoin	0.059	0.023	-156
30 $\mu\text{g Cd} \cdot \text{L}^{-1}$	0.033	0.040	21
100 $\mu\text{g Cd} \cdot \text{L}^{-1}$	0.006	0.036	500

Tableau 6.3 Taux moyen de photosynthèse de populations de *S. capricornutum*, pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération.

[Cd]	Exposition		Récupération		
	pg C·cellule <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>	% témoin	pg C·cellule <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	% témoin	% augm.
Témoin	0.167±0.039		0.264±0.054		58%
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	0.103±0.025*	62	0.285±0.089	108	177%
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	0.033±0.007*	20	0.105±0.044*	40	218%

\* Significativement différent du témoin pour p = 0.01.

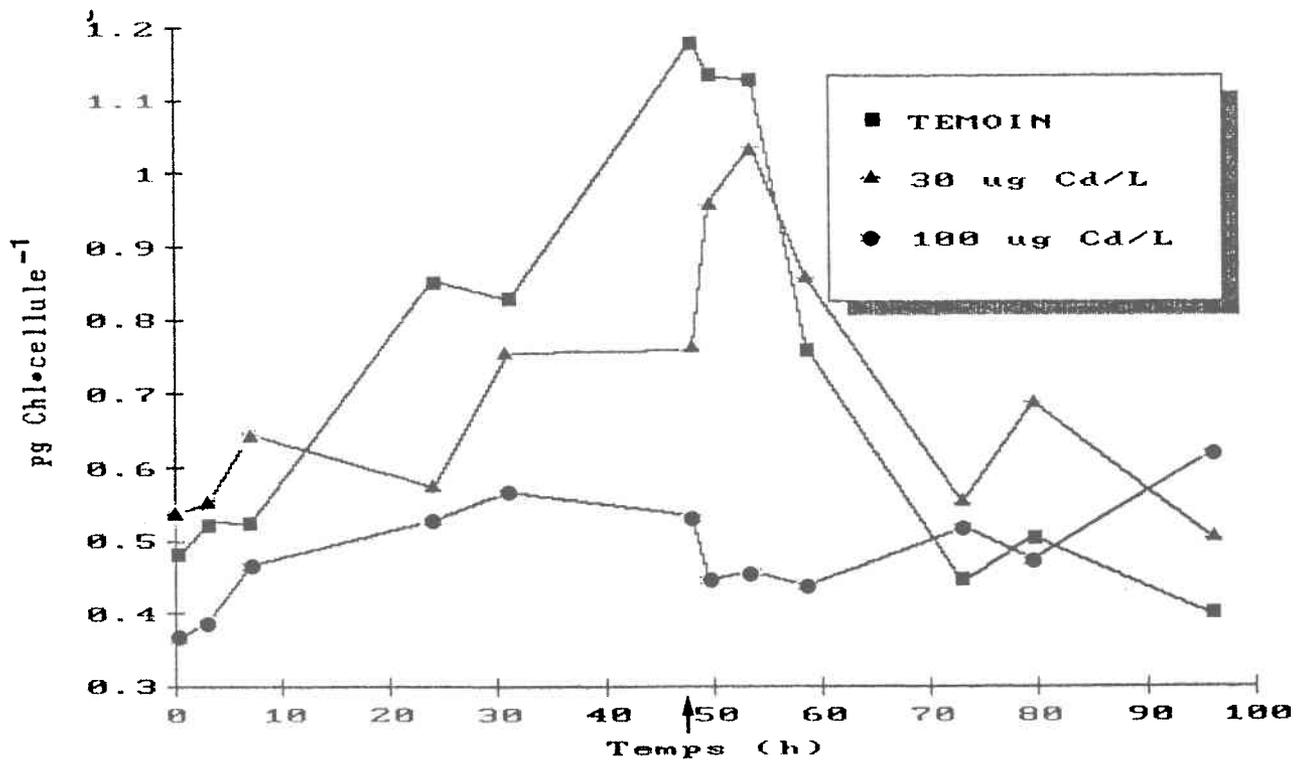


Figure 6.3: Concentration en chl-a des cellules de *S. capricornutum* exposées à 0, 30 et 100 µg Cd·L<sup>-1</sup>. ↑ indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

teneurs en chlorophylle de la diatomée Asterionella formosa et des chloroplastes de maïs. D'autre part, l'inhibition de la photosynthèse pourrait être le résultat de l'inhibition de l'anhydrase carbonique (Vallee et Ulmer 1972) ou des réactions photochimiques de la photosynthèse (Van Duijvendijk-Matteoli et Desmet 1975; Li et Miles 1975; Baszynski et al. 1980; De Filippis et al. 1981a). Les présents résultats ne permettent pas d'identifier avec plus d'exactitude le ou les processus de la photosynthèse qui sont perturbés par le Cd.

À première vue, les résultats d'incorporation de carbone à l'intérieur des fractions de macromolécules suggèrent qu'aux concentrations de Cd utilisées, la carboxylation ainsi que les voies de synthèse des polysaccharides, des lipides et des protéines ne sont pas fortement perturbées pendant les premières 48 h (Figures 6.4A, 6.4B et 6.4C). En effet, les trois populations étudiées allouent, en moyenne, entre 42% et 45% du carbone assimilé aux protéines, entre 25% et 31% aux lipides et entre 14% et 19% aux polysaccharides. Les métabolites à faible poids moléculaire représentent généralement moins de 13% du carbone assimilé. Certaines différences sont cependant observées chez les populations exposées au Cd. Par exemple le % de carbone incorporé dans les polysaccharides est significativement plus élevé que celui du témoin chez les populations exposées au Cd, tandis que le % de carbone incorporé dans les lipides est significativement moins élevé que celui du témoin à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tableau 6.4). Par ailleurs, la proportion de carbone incorporé dans les protéines chez les populations exposées au Cd n'est pas significativement différente de celle du témoin. Cette observation est contraire aux résultats de Kremer et Markham (1982) qui ont observé une

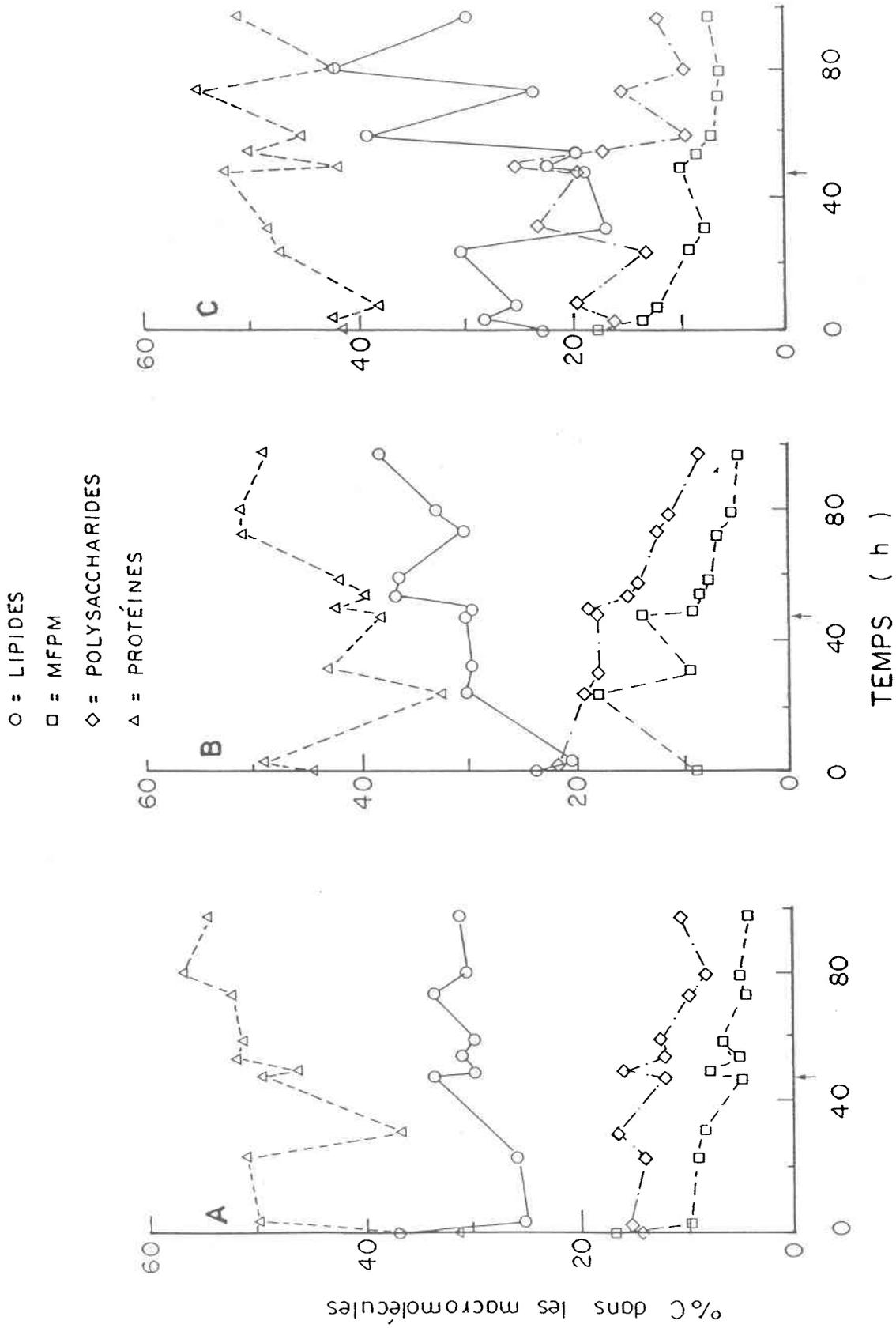


Figure 6.4: Pourcentage d'allocation du carbone assimilé aux macromolécules chez des populations de *S. capricornutum* exposées à 0 (A), 30 (B) et 100 (C) µg Cd·L<sup>-1</sup>. ↑ indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

Tableau 6.4: Incorporation (%) moyenne dans les macromolécules du carbone assimilé par des populations de S. capricornutum exposées à 0, 30 et 100 µg Cd·L<sup>-1</sup> pendant les périodes d'exposition et de récupération.

	Exposition	Récupération
<u>Lipides</u>		
Témoin	31.3 ± 5.6	30.9 ± 3.3
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	28.3 ± 4.5	34.0 ± 4.4*
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	25.4 ± 7.5*	31.8 ± 12.4
<u>MFPM</u>		
Témoin	9.9 ± 4.4	5.6 ± 1.6
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	12.1 ± 4.1	6.9 ± 1.9*
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	10.8 ± 4.2	7.4 ± 2.0**
<u>Polysaccharides</u>		
Témoin	14.4 ± 1.8	11.5 ± 2.9
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	19.1 ± 4.7**	13.3 ± 3.5
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	18.6 ± 4.5**	14.4 ± 6.3
<u>Protéines</u>		
Témoin	43.6 ± 9.4	52.0 ± 4.2
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	41.7 ± 7.6	45.7 ± 5.9**
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	44.9 ± 7.9	46.5 ± 8.6*

\*\* Significativement différent du témoin pour p = 0.01

\* Significativement différent du témoin pour p = 0.05

inhibition de la synthèse de protéines (mesurée par l'incorporation de la  $^{14}\text{C}$ -leucine) chez des sporophytes de l'algue brune Laminaria saccharina exposés à 500 et 1000  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  pendant quatre jours. Ces différences entre les présents résultats et ceux de Kremer et Markham (1982) pourraient être attribuées soit à une plus grande sensibilité aux effets toxiques du Cd des sporophytes comparativement à S. capricornutum, soit aux plus fortes concentrations de Cd et à la durée d'exposition plus longue utilisées par ces derniers.

La synthèse des macromolécules ( $\text{pg C}\cdot\text{cellule}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) apparaît toutefois perturbée par le Cd. En effet, alors que chez la population témoin les taux de synthèse des macromolécules sont significativement corrélés au taux de photosynthèse ( $\text{pg C}\cdot\text{cellule}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), ces corrélations ne sont jamais significatives en présence de 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tableau 6.5).

Après l'ajout d'EDTA (période de récupération), une augmentation importante du taux d'assimilation de carbone est observée (Figure 6.2; Tableau 6.3). En effet, tandis que chez la population témoin le taux de photosynthèse augmente de 58%, chez les populations exposées respectivement à 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  ces augmentations atteignent des valeurs de 177% et 218%. Seule la photosynthèse de la population exposée à 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  demeure significativement plus faible que celle du témoin. L'augmentation du taux de photosynthèse de la population témoin suite à l'ajout d'EDTA pourrait être le résultat d'une augmentation de la bio-disponibilité du fer. Les augmentations du taux de photosynthèse sont accompagnées d'une augmentation de la proportion de carbone assimilé qui est incorporé dans les protéines et d'une diminution du

Tableau 6.5: Coefficients de corrélation entre le taux de photosynthèse et les taux de synthèse des macromolécules au cours des périodes d'exposition et de récupération chez les populations de S. capricornutum exposées à 0, 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .

	Exposition	Récupération
	<u>photosynthèse</u>	<u>photosynthèse</u>
<u>Témoin</u>		
Photosynthèse	1.000	1.000
Lipides	0.607*	0.798*
MFPM	0.592*	0.636*
Polysaccharides	0.559*	0.757*
Protéines	0.371	0.894*
<u>30 <math>\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}</math></u>		
Photosynthèse	1.000	1.000
Lipides	0.363	0.884*
MFPM	0.010	0.689*
Polysaccharides	0.274	0.703*
Protéines	0.436	0.860*
<u>100 <math>\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}</math></u>		
Photosynthèse	1.000	1.000
Lipides	0.150	0.324
MFPM	0.075	0.200
Polysaccharides	0.129	0.300
Protéines	0.192	0.057

\* Significatif pour  $p < 0.05$

% de carbone incorporé dans les MFPM et dans les polysaccharides. Par ailleurs chez les populations exposées au Cd la proportion de carbone allouée aux lipides augmente (Tableau 6.4). De plus au cours de la période de récupération, les taux de synthèse des macromolécules deviennent significativement corrélés au taux de photosynthèse chez la population exposée à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . Ces corrélations demeurent toutefois non-significatives à la concentration de  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tableau 6.5), concentration à laquelle les taux de croissance et de photosynthèse n'atteignent pas les niveaux de la population témoin.

Les augmentations des taux de photosynthèse observées pendant la période de récupération résultent en d'importantes augmentations des taux d'incorporation de carbone dans les fractions macromoléculaires, les augmentations les plus importantes étant observées dans le cas des protéines et des lipides (Tableau 6.6). Chez la population exposée à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  le % d'augmentation de la photosynthèse (119%) et de la synthèse des protéines (117%) (% d'augmentation à  $30 \text{ Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  - % d'augmentation du témoin) correspondent au degré de récupération de la croissance (117%). Chez la population exposée à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  toutefois, la récupération de la croissance est beaucoup plus importante que la récupération de la synthèse des protéines. Certains auteurs suggèrent que le taux d'incorporation de carbone dans les protéines est une meilleure mesure du taux de croissance des populations phytoplanctoniques que le taux total d'assimilation de carbone mesuré par la méthode de Steemann-Nielsen (1952) (Morris 1980; Di Tullio et Laws 1983; Lancelot et Mathot 1985). Ceci peut être expliquée par le fait que la croissance et la division cellulaire dépendent plus de la synthèse de protéines que de la synthèse de produits de réserve tels que les polysaccharides et les

Tableau 6.6: Taux moyens de synthèse des macromolécules (pg C·cellule<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) pendant les périodes d'exposition et de récupération chez S. capricornutum exposé à 0, 30 et 100 µg Cd·L<sup>-1</sup>.

	Exposition	Récupération	% d'augmentation
<u>Lipides</u>			
Témoin	0.052	0.082	58%
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	0.029**	0.097**	234%**
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	0.008**	0.031**	287%**
<u>MFPM</u>			
Témoin	0.017	0.013	-23%
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	0.012**	0.020**	67%**
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	0.004**	0.007**	75%**
<u>Polysaccharides</u>			
Témoin	0.025	0.029	16%
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	0.020*	0.037**	85%**
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	0.006**	0.015**	150%**
<u>Protéines</u>			
Témoin	0.073	0.137	88%
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	0.043**	0.131	205%**
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	0.015**	0.050**	233%**

\*\* Significativement différent du témoin pour p = 0.01

\* Significativement différent du témoin pour p = 0.05

lipides (Li et Harrison 1982). À la lumière de nos résultats et des constatations de Morris (1980), Di Tullio et Laws (1983) et Lancelot et Mathot (1985), il semble donc qu'à la plus forte concentration de Cd, l'inhibition de la croissance peut être attribuée en partie seulement aux faibles taux de synthèse des protéines. En effet alors que durant la période de récupération le taux de croissance de la population exposée à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  se situe à 71% du témoin, son taux de synthèse des protéines n'est que 36% du taux de la population témoin. Le Cd pourrait également inhiber la croissance en perturbant la division cellulaire. En effet, le Cd pourrait, d'une part, provoquer un arrêt de la mitose en se complexant au GSH (glutathion réduit), diminuant ainsi le rapport glutathion réduit: glutathion oxydé (GSH/GSSG) (Florence et Stauber 1986). Or, un rapport GSH/GSSG élevé favorise la division cellulaire (Kosower et Kosower 1978). D'autre part, le Cd pourrait perturber la formation du fuseau achromatique lors de la division cellulaire en se complexant au S de la méthionine, un acide aminé impliqué dans la formation du fuseau achromatique (Davies 1976).

Chez les populations algales, la synthèse de lipides semble jouer un rôle important dans la récupération de la croissance. En effet, chez les populations exposées à 30 et à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , des augmentations de 234% et de 287% du taux d'incorporation de carbone dans les lipides sont observées après l'ajout d'EDTA (Tableau 6.6). Par ailleurs, chez la population exposée à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  le taux de synthèse de lipides est 18% plus élevé que celui du témoin alors que son taux de croissance est 15% plus élevé (Tableau 6.2A).

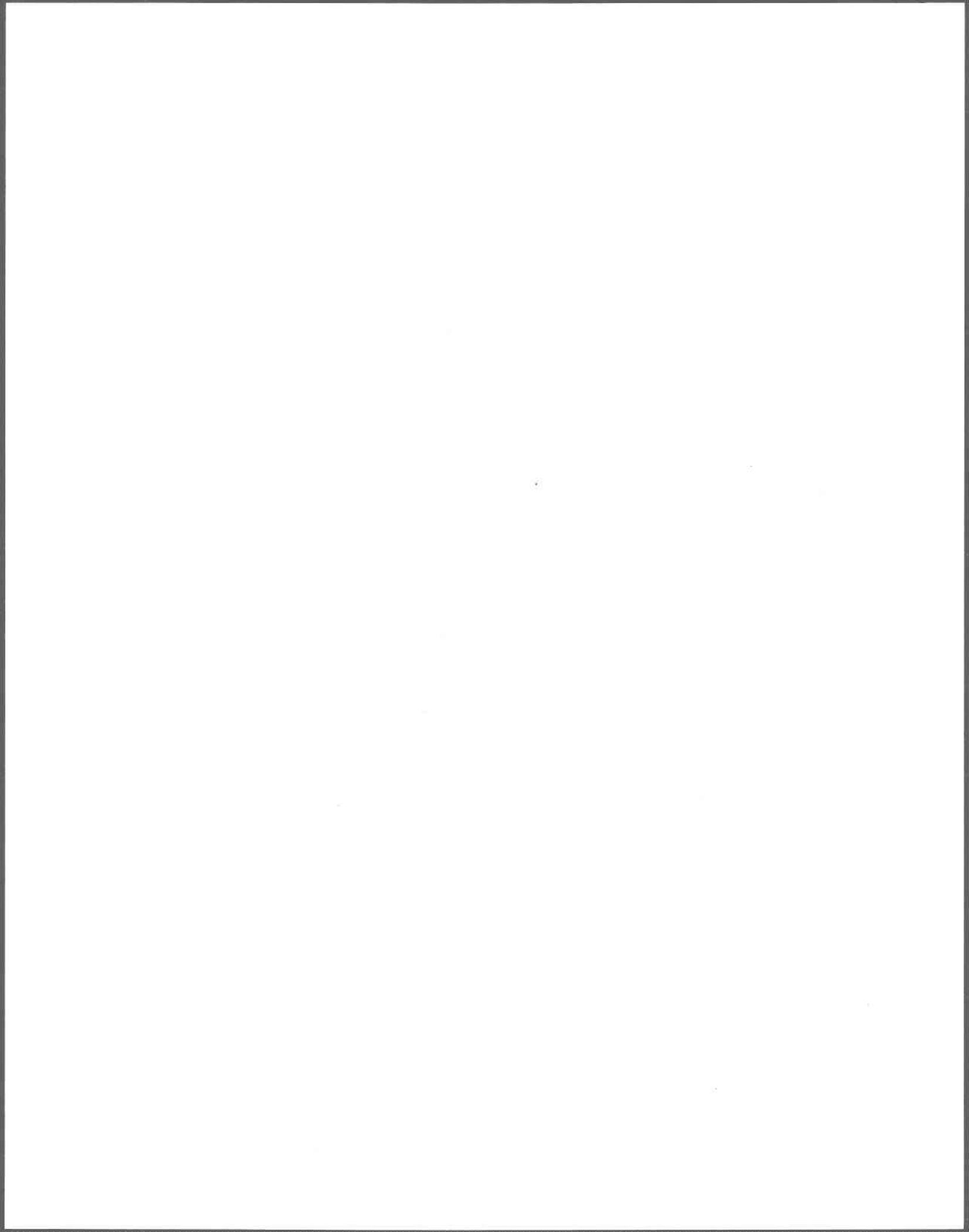
L'importance des lipides dans la récupération de cellules exposées à des métaux à également été observée par Wortman et Bissonnette (1988). Ces auteurs ont en effet démontré que la récupération de la croissance d'Escherichia coli préalablement exposé à un rejet minier acide nécessitait la synthèse de protéines, de lipides et d'ARN. Ces auteurs suggèrent que le besoin de synthèse des lipides serait indicatif de dommage à la paroi cellulaire ou aux membranes cytoplasmiques. Dans ce sens, Wong et al. (1980) suggèrent qu'un des modes d'action du Cd est d'interagir avec la mono-couche de phospholipides exerçant ainsi un effet toxique sur les membranes biologiques. Jones et al. (1987) ont d'ailleurs proposé que la perturbation du métabolisme des lipides par le Cd, entre autre par la diminution des niveaux cellulaires en acides gras polyinsaturés, pouvait occasionner des retards dans la croissance. Les acides gras polyinsaturés seraient, en effet, particulièrement susceptibles à la dégradation par la peroxydation, phénomène accentué par la présence de métaux tel que le Cd et le Hg (Jones et al. 1987). Le rôle des lipides comme produit de réserve pouvant être catabolisé pour fournir de l'énergie aux cellules (Lehninger 1977), particulièrement dans une période de besoins accrus d'énergie comme l'est la période de récupération de la croissance, pourrait aussi expliquer l'augmentation de la proportion de carbone incorporé aux lipides. De fait, des augmentations concomitantes des teneurs cellulaires en lipides et en ATP ont été observées juste avant la division cellulaire chez une population synchrone de la Chlorophycée Scenedesmus sp. (Sundberg et Nilshammar-Holmvall 1975). Tillberg et Kylin (1972) ont d'ailleurs démontré que les jeunes cellules algales utilisaient les acides gras comme substrat principal de la respiration.

#### 6.4 Conclusion

Les résultats de la présente expérience démontrent que l'inhibition de la croissance par le Cd est accompagnée d'une diminution des teneurs cellulaires en chlorophylle-a, le principal pigment photosynthétique, ainsi que d'une diminution importante des taux de photosynthèse. Par ailleurs, bien que la carboxylation et l'importance relative des voies métaboliques de synthèse des lipides, des protéines et des polysaccharides ne semblent pas inhibées par le Cd, le faible taux d'assimilation de carbone chez les populations exposées à 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  résulte en des taux de synthèse des macromolécules qui sont significativement plus faibles que chez le témoin.

Par ailleurs, pendant la période d'exposition le pourcentage de carbone incorporé dans les polysaccharides est significativement plus élevé chez les populations exposées au Cd que chez la population témoin. Cette augmentation relative de la synthèse de produits de réserve dans des conditions limitantes pour la croissance est en accord avec l'hypothèse voulant qu'un ajustement du métabolisme des produits de réserve s'opère selon les conditions du milieu afin de maximiser le taux de croissance ou de favoriser la survie des populations algales pendant les périodes peu favorables pour la croissance (Parnas et Cohen 1976) (c.f. section 2.2). Cette conclusion est supportée par le fait qu'il y a une importante diminution du pourcentage de carbone alloué aux polysaccharides au moment de la récupération de la croissance. De plus, le pourcentage d'allocation de carbone à ce produit de réserve est plus élevée chez la population présentant le taux de croissance le plus faible (Tableaux 6.4 et 6.2A).

L'ajout d'EDTA après 48 h d'exposition à 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  provoque une importante désorption du Cd pris en charge par les cellules, permettant ainsi une reprise de la croissance (c.f. chapitre 5). Cette récupération de la croissance est accompagnée d'une récupération de la photosynthèse et d'augmentations concomitantes des taux de synthèse des macromolécules. De plus, comparativement au témoin la proportion de carbone alloué aux lipides augmente significativement chez les populations préalablement exposées au Cd. Ceci suggère un besoin accru en lipides suite à une exposition au Cd qui pourraient remplir deux besoins différents dans les cellules. D'une part, selon Wortman et Bissonnette (1988) cette augmentation de la synthèse des lipides pourrait servir à réparer les dommages causés par le Cd aux membranes cellulaires. D'autre part, ce produit de réserve pourrait également combler les besoins énergétiques des cellules en étant utilisé dans la phosphorylation oxydative. Il apparaît important de vérifier cette dernière hypothèse puisque des quotas cellulaires en lipides plus élevés que ceux du témoin ont été observés chez S. capricornutum (c.f. chapitre 4) et chez S. bijugatus (Sathya et Balakrishnan 1988) après 10 jours d'exposition au Cd. Cette hypothèse sera vérifiée à l'intérieur du prochain chapitre.



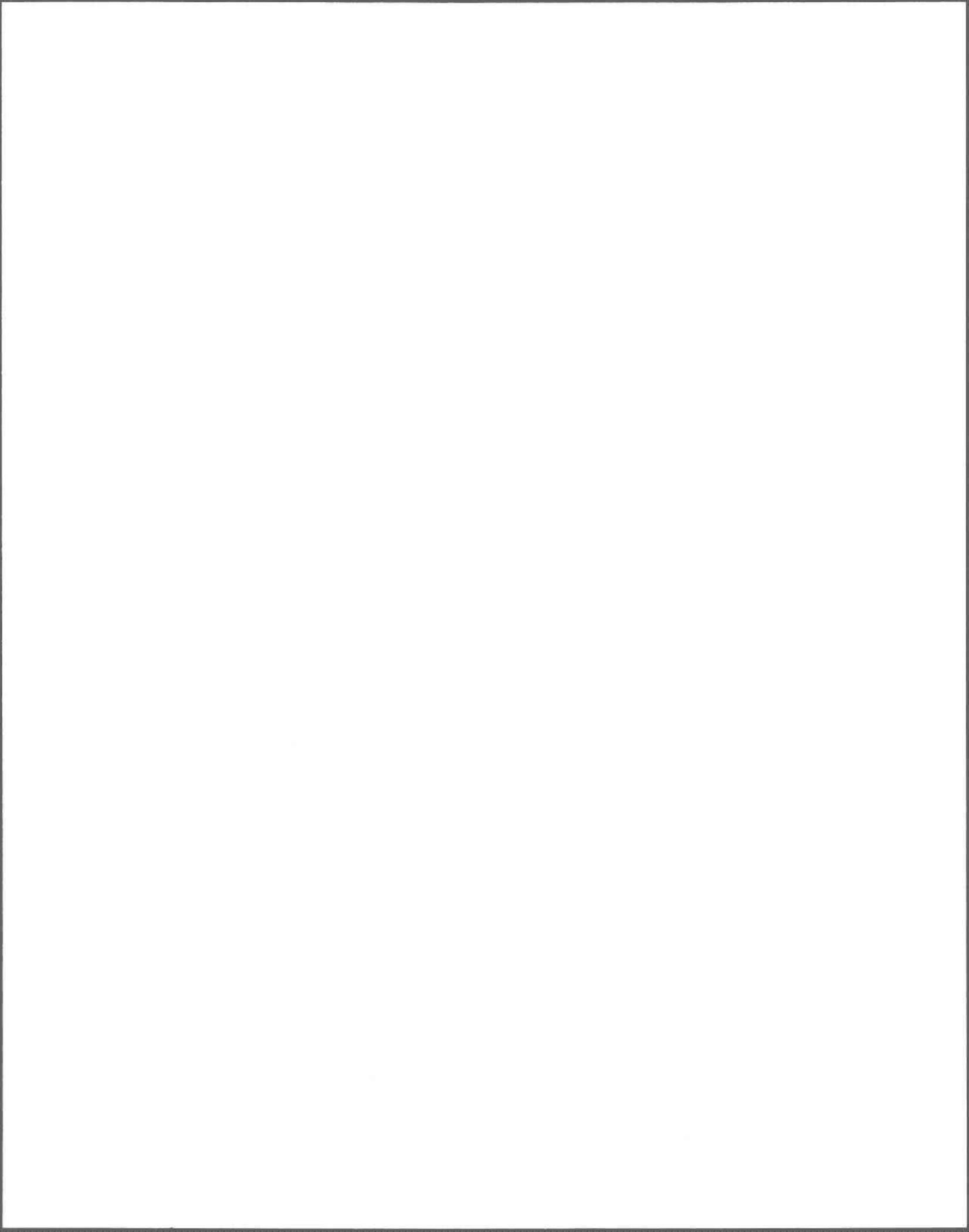
## Chapitre 7

Processus de récupération de populations de Selenastrum capricornutum  
exposées au Cd:

II. Métabolisme du carbone et des nucléotides adénylates<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Thompson, P.A. et P. Couture. 1990. Aquatic Toxicology. Sous presse. (Annexe III)



## 7.1 Introduction

Les résultats des chapitres 5 et 6 indiquent que la diminution des teneurs cellulaires en Cd, après l'ajout d'EDTA, permet la récupération de la photosynthèse et que la reprise de la croissance nécessite une synthèse importante de protéines et de lipides. Or, selon Sundberg et Nilshammar-Holmvall (1975), en plus d'une intense activité de synthèse de macromolécules, les teneurs cellulaires en ATP ainsi que les taux de respiration sont très élevés pendant une période de croissance active.

Il semblerait que suite à une agression par une substance toxique, la reprise de la croissance nécessite un plus grand apport d'énergie sous forme d'ATP. En effet, Thompson et al. (1987) ont observé la récupération de la croissance de populations de S. capricornutum repiquées dans du milieu de culture sain après avoir été exposées pendant 24 et 96 h à des concentrations de Cd variant entre 2 et 32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Chez ces populations, la reprise de la croissance était associée à une augmentation des teneurs cellulaires en ATP.

Chez les organismes chlorophylliens, la production d'ATP est sous le contrôle de la photosynthèse et de la respiration. L'activité relative de ces deux voies métaboliques est régulée par les rapports entre les nucléotides adénylates (Teichler-Zallen et al. 1972; Ried et al. 1973; Simonis et Urbach 1973; Mangat et al. 1974; Harris 1978) et en présence de lumière, l'ATP nécessaire au métabolisme cellulaire est surtout fournie par la photophosphorylation (Harris 1978; Raven et Beardall 1981). Or, des conditions de stress accroissent la demande d'ATP et tendent à augmenter la respiration

(Raven et Beardall 1981; Relaxans et al. 1988). Par conséquent, on peut faire l'hypothèse qu'une augmentation de la respiration pourrait éventuellement fournir les teneurs plus élevées en ATP observées par Thompson et al. (1987). D'ailleurs, lorsque la photosynthèse était inhibée Lee et al. (1976) ont suggéré que la stimulation de la respiration observée chez des jeunes plants de fève soya exposés au Cd avait pour but de combler les besoins en ATP des cellules.

Pour être efficace, cette voie métabolique devra cependant pouvoir bénéficier de substrats pouvant être catabolisés avec un haut rendement énergétique. Il est d'ailleurs généralement reconnu que chez les organismes supérieurs, les produits de réserve constituent un "pool" d'énergie pouvant être utilisé pendant les périodes de faible disponibilité ou de forte demande de sources d'énergie. L'accumulation de produits de réserve se fait d'ailleurs durant la période où les organismes sont confrontés à une diminution de la disponibilité des nutriments ou à une forte demande en énergie (Parnas et Cohen 1976). Dans cette optique, ces auteurs suggèrent qu'il existe chez les micro-organismes une stratégie pour optimiser le métabolisme des produits de réserve, ces produits étant synthétisés vers la fin de la période de croissance exponentielle, soit lorsque le milieu devient carencé. L'extension de ce concept à l'inhibition de la croissance par une substance toxique laisse supposer qu'on peut envisager une augmentation des quotas cellulaires de lipides et de polysaccharides lorsque les micro-organismes sont soumis à des conditions adverses. Cette augmentation pourrait apparaître, d'une part, au cours d'expositions au Cd, et d'autre part, au cours de la période de récupération qui semble être une période de besoin accru en énergie.

Les résultats de l'expérience présentée au chapitre 4 font état d'une augmentation des quotas cellulaires en polysaccharides et en lipides en réponse à des concentrations de 30, 60 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . De plus, l'augmentation des teneurs en lipides était plus importante que celle des polysaccharides. Sathya et Balakrishnan (1988) ont également noté une augmentation du contenu lipidique de cellules de S. bijugatus exposées à des concentrations de Cd variant entre 10 et 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . De plus, les résultats du chapitre 6 indiquent que la récupération de la croissance est accompagnée d'une importante synthèse de lipides. Ces augmentations marquées du métabolisme des lipides pourraient s'expliquer par le fait que le rendement énergétique, exprimé en ATP, de la phosphorylation oxydative est beaucoup plus élevé lorsque des lipides servent de substrats (Lehninger 1977). Ces informations suggèrent qu'une récupération de la croissance suite à une exposition au Cd pourrait être accompagnée d'une utilisation accrue des lipides pendant la respiration.

La présente étude a donc pour but de confirmer ou d'infirmer les hypothèses voulant que la récupération de la croissance de populations de S. capricornutum ayant été exposées à des concentrations sous-létales de Cd nécessite une augmentation des teneurs cellulaires en ATP ( $H_{2.3}$ ), une augmentation du métabolisme des lipides (synthèse dans un premier temps, utilisation dans un deuxième temps) ( $H_{2.1}$ ) et une augmentation du taux de respiration ( $H_{2.2}$ ).

## 7.2 Matériel et méthodes

Deux expériences ont été réalisées selon le protocole décrit à la section matériel et méthodes du chapitre 5. Rappelons, que des bouteilles de 20 L ont été inoculées à raison de  $25\ 000\ \text{cellules}\cdot\text{mL}^{-1}$  avec des populations asynchrones de S. capricornutum obtenues au moyen des conditions de culture décrites à la section 3.1. À la fin de la période de latence, ces cultures furent contaminées en utilisant une solution concentrée de Cd de  $10\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  préparée à partir d'une solution standard de  $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (BDH Ltd). Des concentrations nominales respectives de 0 (témoin), 30 et  $100\ \mu\text{g}\ \text{Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  dans les milieux de la première expérience et de 0, 30, 100 et  $500\ \mu\text{g}\ \text{Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  dans ceux de la seconde expérience étaient ainsi obtenues. Les cultures ont été en contact avec le Cd pendant 48 h; par la suite de l'EDTA (concentration finale:  $2.67 \times 10^{-6}\text{M}$ ) était ajoutée à chaque bouteille. Les 48 ou 72 h qui ont suivi l'ajout de l'agent complexant constituaient respectivement la période de récupération de la première et de la seconde expérience.

Les méthodes qui s'appliquent de façon plus particulière à chacune des deux expériences faisant l'objet de ce chapitre sont décrites ci-après.

### 7.2.1 Rôle des macromolécules et des nucléotides adénylates dans le processus de récupération

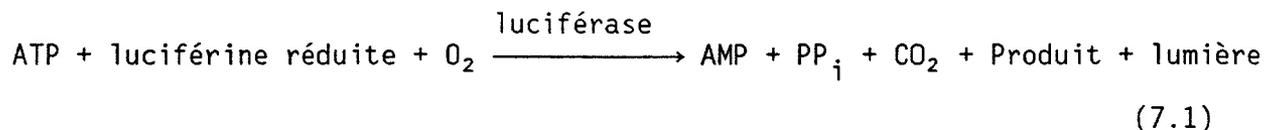
Cette première expérience a été effectuée en ajoutant quatre mCi (148 mBq) de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  simultanément à l'ajout de Cd. Au départ de l'expérience ( $t_0$ ) l'activité spécifique du milieu de culture était  $0.2\ \mu\text{Ci}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Les mesures

de densité cellulaire, de teneur cellulaire en ATP et en ADP, d'assimilation de carbone et de répartition du carbone à l'intérieur des macromolécules, de C.I.D. et de l'activité spécifique du milieu de culture ont débuté 15 min après l'ajout de Cd et de  $^{14}\text{C}$ . Ces mesures ont été effectuées à intervalles réguliers pendant les périodes d'exposition et de récupération. Le nombre de cellules, l'assimilation de carbone, la radioactivité et le C.I.D. étaient mesurés selon les méthodes décrites à la section 4.2.

#### 7.2.1.1 Dosage des nucléotides adénylates

Les expériences décrites à la section 3.4 ont servi à la mise au point de la méthode de dosage des nucléotides adénylates. L'efficacité de conversion de l'AMP en ATP n'étant pas suffisamment élevée ( $\leq 75\%$ ) (c.f. sous-section 3.4.3), seuls l'ATP et l'ADP ont été dosés. À cette fin, quatre échantillons de 20 mL étaient prélevés et filtrés sur des membranes Nuclepore d'une porosité de 0.4  $\mu\text{m}$ . Les nucléotides adénylates étaient aussitôt extraits en plongeant les filtres dans 4.5 mL de diméthyl sulfoxyde (DMSO) et en les agitant vigoureusement pendant 45 s avec un agitateur à éprouvette de marque Vortex. Subséquemment, 5.5 mL d'une solution tampon d'acide 4-morpholinopropyl-sulfonique (MOPS) 10mM à pH 7.4 étaient ajoutés et la suspension était agitée à nouveau pendant 45 s (Couture et al. 1987). Les extraits étaient conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment de l'analyse.

L'ATP était dosé en mesurant l'émission de lumière de la réaction bioluminescente du complexe luciférine-luciférase avec l'ATP (Strehler et Totter 1952):



Les concentrations d'ATP sont ainsi obtenues directement tandis que les concentrations d'ADP sont obtenues par différence suite à sa conversion enzymatique en ATP, selon la réaction suivante:



où: PEP = phospho(enol)-pyruvate

Pk = pyruvate kinase

Au moment de l'analyse les extraits étaient décongelés et, à l'aide d'une pipette automatique, 200 µL d'échantillon étaient répartis dans six cuvettes à luminomètre (Ultra-Vu cuvettes, Elkay Products Inc.). Deux des cuvettes (A et B), servant au dosage de l'ATP, recevaient 200 µL de tampon de dilution (ATP Assay Mix Dilution Buffer, no. de catalogue FL-AAB, Sigma Chemical Company). Deux autres cuvettes (C et D), servant à mesurer l'ADP par sa transformation en ATP, recevaient 200 µL de réactif B contenant 1 mM de phospho(enol)-pyruvate et 1000 unités de pyruvate kinase (Karl et Holm-Hansen 1978). Les deux dernières cuvettes (E et F), servant à corriger (quench correction) les valeurs d'ATP et d'ADP, recevaient une quantité connue d'ATP à laquelle s'ajoutait soit 200 µL de tampon de dilution, soit 200 µL de réactif B.

Après une incubation de 0.5 h, les nucléotides adénylates étaient dosés par luminométrie (luminomètre LKB, modèle 1251) en utilisant 75  $\mu\text{L}$  d'extrait et 125  $\mu\text{L}$  d'enzyme luciférine-luciférase diluée (ATP Assay Mix, no. de catalogue FL-AAM, Sigma Chemical Company). La quantité d'ADP était obtenue en soustrayant la valeur moyenne des cuvettes C et D (ATP + ADP) de la quantité moyenne d'ATP (cuvettes A et B). Les valeurs d'ATP et d'ADP ainsi calculées étaient corrigées (quench correction) en utilisant les cuvettes E et F par la méthode des ajouts dosés telle que décrite par Jacubczak et Leclerc (1980).

#### 7.2.2 Rôle de la respiration dans le processus de récupération

L'expérience a été réalisée en contaminant les cultures avec le Cd deux heures après l'ajout de trois mCi (111 mBq) de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  (activité spécifique:  $0.15 \mu\text{Ci}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). L'échantillonnage a débuté 15 minutes après l'ajout de Cd. La respiration et l'utilisation des macromolécules au cours de la phosphorylation oxydative ont été mesurées à intervalles réguliers à l'obscurité selon le protocole élaboré à la section 3.5.

Ces paramètres ont été mesurés en évaluant la perte de carbone encourue au cours d'une incubation à l'obscurité d'une durée de deux heures, par une méthode dérivée de celles de Li et al. (1980) et de Hobson et Guest (1983). Six échantillons de 60 mL étaient prélevés. Les trois premiers étaient subdivisés en six sous-échantillons de 30 mL dont trois servaient à mesurer le carbone assimilé ( $\text{C}_0$ ); les trois autres servaient à mesurer la répartition du carbone à l'intérieur des macromolécules selon les méthodes décrites dans les sections 4.2.2A et 4.2.2B. Les trois derniers échantillons de 60 mL étaient

répartis dans trois fioles en polycarbonate de 250 mL et incubés à l'obscurité pendant deux heures. À la fin de l'incubation, ces trois derniers échantillons ( $C_2$ ) étaient traités de façon similaire aux trois premiers. Le taux de respiration était obtenu au moyen de l'équation suivante:

$$R = \frac{C_0 - C_2}{t} \quad (6.1)$$

où R : respiration, en  $\mu\text{g C}\cdot\text{cellule}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$

$C_0$  : quota cellulaire de carbone au moment du prélèvement, en  $\mu\text{g C}\cdot\text{cellule}^{-1}$

$C_2$  : quota cellulaire de carbone après 2 h d'incubation à l'obscurité, en  $\mu\text{g C}\cdot\text{cellule}^{-1}$

t : durée de l'incubation, 2 h

Des mesures de densité cellulaire, de C.I.D. et d'activité spécifique du milieu de culture étaient effectuées à chaque temps d'échantillonnage, au moyen des méthodes précédemment décrites.

### 7.3 Résultats et discussion

#### 7.3.1 Rôle des macromolécules et des nucléotides adénylates dans le processus de récupération

Pendant la période d'exposition, la croissance de la population soumise à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  est légèrement inhibée (92% du témoin), tandis qu'aucune

croissance n'est observée chez celle exposée à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figure 7.1; Tableau 7.1).

Chez la population exposée à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , la reprise de la croissance n'est observée que plus de 10 h après l'ajout d'EDTA (Figure 7.1). Ainsi, le taux de croissance ( $\mu$ ) a augmenté de 0 (0-48 h) à  $0.034\cdot\text{h}^{-1}$  (48-94 h) (Tableau 7.1). La récupération de cette population apparaît reliée à une augmentation du contenu cellulaire en ATP (Figure 7.2A). En effet, entre 48 et 73.5 h la valeur du rapport ATP/cellule a augmenté de 0.11 à  $0.16 \text{ pg ATP}\cdot\text{cellule}^{-1}$ . Il est intéressant de noter que même si le volume cellulaire moyen diminue après 25 h à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figure 7.3), les teneurs en ATP des cellules augmentent. Une augmentation, reliée à la croissance, de la valeur du rapport ATP/cellule est aussi observée à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  suite à l'arrêt de croissance observé entre 57.5 et 65.6 h (Figures 7.1 et 7.2B). Chez la population témoin le contenu cellulaire en ATP se situe en-dessous de  $0.08 \text{ pg ATP}\cdot\text{cellule}^{-1}$  (Figure 7.2B). Le contenu en ATP des cellules de la population témoin tend à diminuer vers la fin de l'expérience. De Filippis et al. (1981b) ont observé le même phénomène chez une population d'Euglena en culture statique, qu'ils attribuent à l'atteinte de la phase stationnaire de croissance.

Il y a une différence marquée entre les variations du rapport ATP/ADP de la population témoin et celui des populations exposées au Cd (Figure 7.4). En effet, bien que le contenu cellulaire en ATP de la population témoin soit très variable, après les premières 24 h de l'expérience le rapport ATP/ADP de cette population est très stable et se situe entre 2.05 (24 h) et 1.5 (93.5 h). Malgré que le contenu cellulaire en ATP de la population exposée à

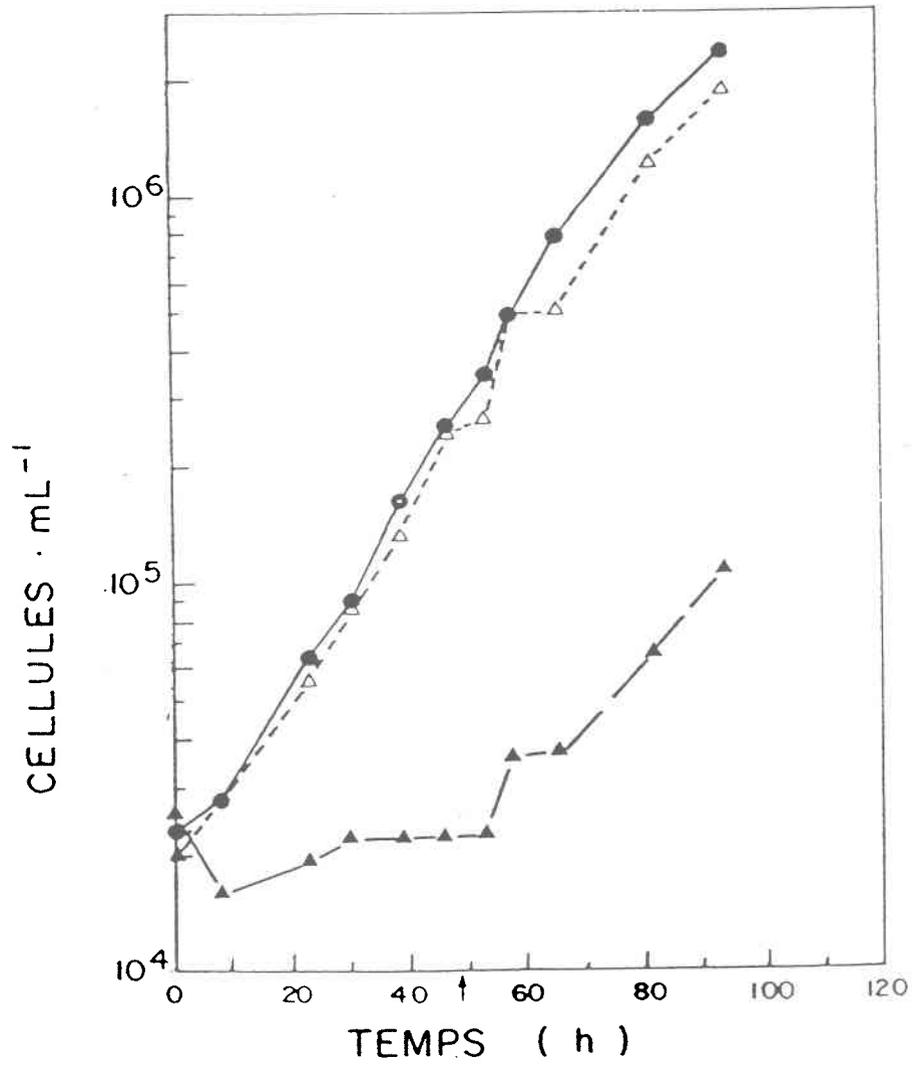


Figure 7.1: Croissance de populations de *S. capricornutum* exposées à 0 (•), 30 (Δ) et 100 (▲) µg Cd·L<sup>-1</sup>. † indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

Tableau 7.1: Taux de croissance ( $\mu \cdot h^{-1}$ )\* de populations de S. capricornutum exposées à 0, 30 et 100  $\mu g \cdot L^{-1}$ .

	Concentration de Cd ( $\mu g \cdot L^{-1}$ )		
	Témoïn	30	100
$\mu$ (0 - 48 h)	0.053	0.049	0
$\mu$ (48 - 94 h)	0.048	0.044	0.034
$\mu$ (0 - 94 h)	0.050	0.047	0.015

$$* \mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

où  $X_1$  = densité cellulaire au temps  $t_1$

$X_2$  = densité cellulaire au temps  $t_2$

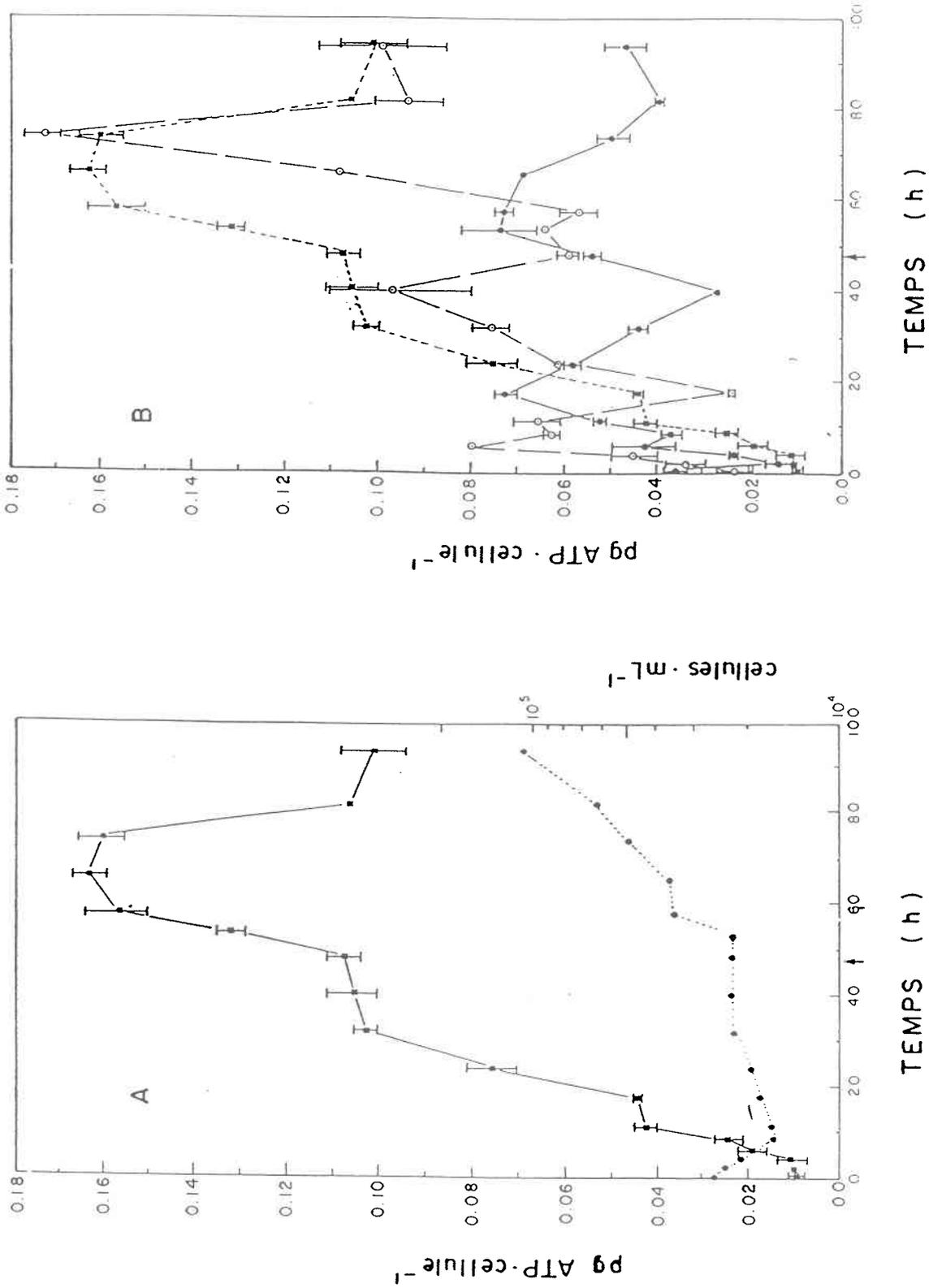


Figure 7.2: Densité cellulaire (●) et ATP·cellule<sup>-1</sup> (■) de la population de S. capricornutum exposée à 100 µg Cd·L<sup>-1</sup> (A), et ATP·cellule<sup>-1</sup> de populations exposées à 0 (●), 30 (⊙) et 100 (■) µg Cd·L<sup>-1</sup> (B). ↑ indique 1'heure de l'ajout d'EDTA.

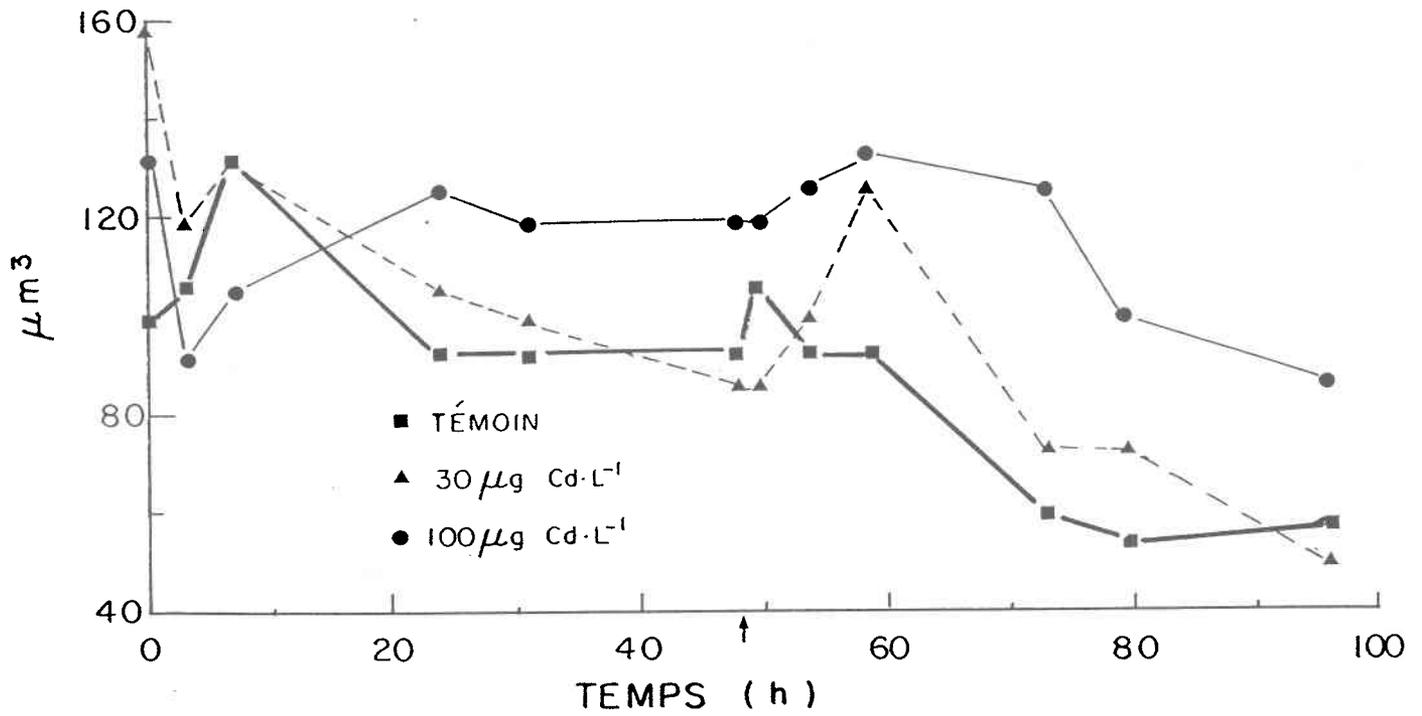


Figure 7.3: Volume cellulaire moyen de populations de *S. capricornutum* exposées à 0, 30 et  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .  $\uparrow$  indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  soit supérieur à celui du témoin, après 24 h de contact avec le métal, le rapport ATP/ADP est inférieur à celui du témoin pendant presque toute la durée de l'expérience (< 73.5 h). Par ailleurs, l'augmentation du contenu cellulaire en ATP observée à 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  après l'ajout d'EDTA est accompagnée d'une augmentation marquée de la valeur du rapport ATP/ADP. Par rapport à l'ADP, la reprise de la croissance s'accompagne donc d'une augmentation progressive de la proportion d'ATP parmi les nucléotides adénylates. Dans le cas de la population exposée à 30  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  le rapport ATP/ADP augmente progressivement au cours des 60 premières heures de l'expérience et devient supérieure à la valeur du témoin après 32 h. Ainsi, chez la population exposée à 30  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  le maintien du taux de croissance à des valeurs proches du témoin (Figure 7.1; Tableau 7.1) semble nécessiter une concentration cellulaire en ATP plus importante que le témoin. Chez une population de la diatomée T. weissflogii acclimatée à 61  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , Li (1979) a observé un contenu cellulaire en ATP plus important que chez la population témoin dont le taux de croissance était semblable à celui de la population acclimatée. Nos résultats ne supportent pas l'hypothèse voulant que la production d'ATP soit inhibée par le Cd. Silverberg (1976) a émis cette hypothèse en observant des dommages à la membrane interne des mitochondries de Chlorophycées exposées à des concentrations de Cd variant entre 30 et 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , car plusieurs enzymes et cytochromes associées à la phosphorylation oxydative sont contenus dans cette membrane (Lehninger 1977). Par contre, dans une étude antérieure Thompson et al. (1987) avaient observé que la reprise de la croissance de S. capricornutum exposé au Cd et à un effluent industriel pouvait être prédite seulement pour les populations présentant une augmentation du rapport ATP/cellule. Les présents résultats démontrent que le rapport ATP/ADP pourrait s'avérer un

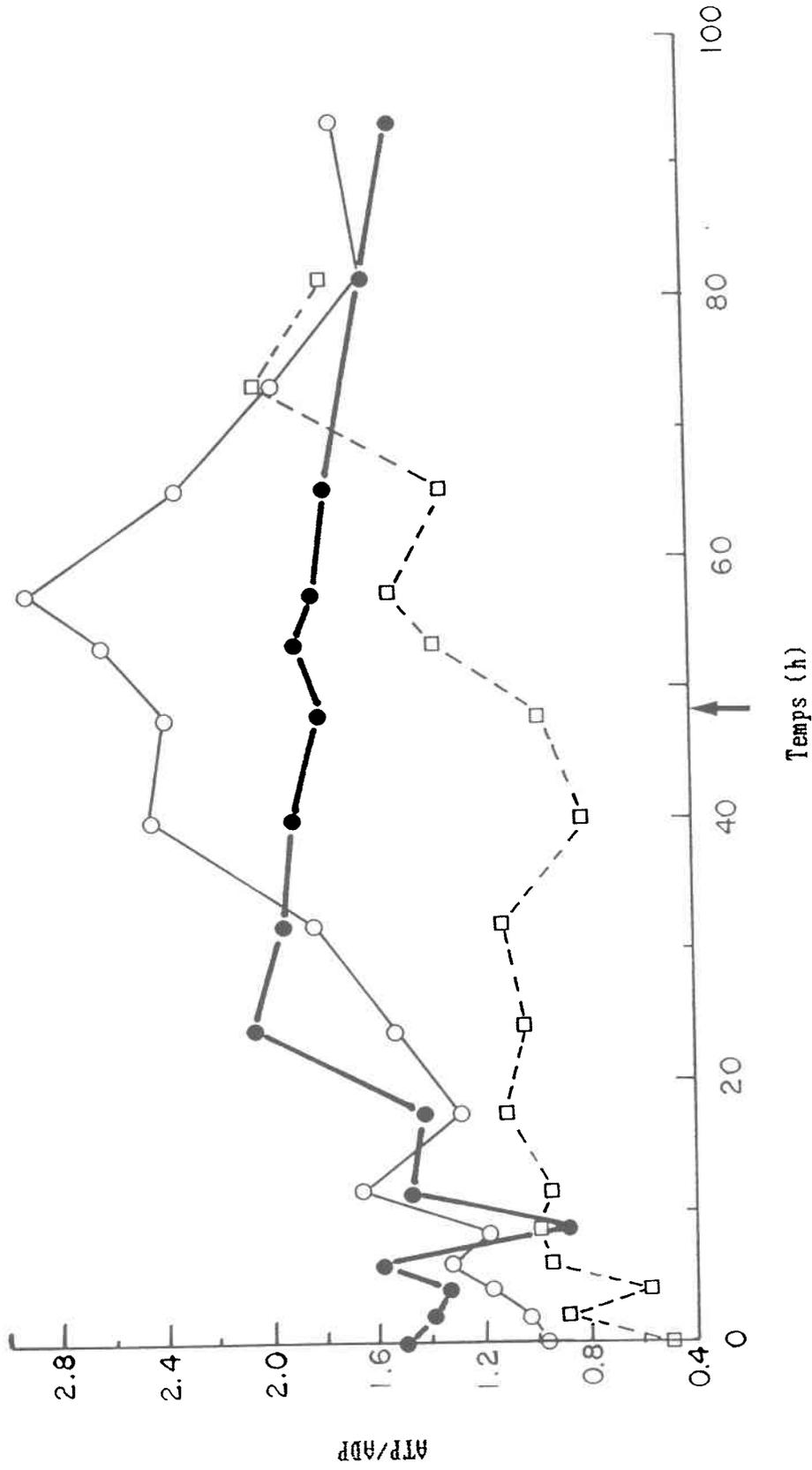


Figure 7.4: Rapport ATP/ADP de populations de *S. capricornutum* exposées à 0 (•), 30 (o) et 100 (□) µg Cd·L<sup>-1</sup>. ↑ indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

indicateur de stress et une variable permettant de prédire une récupération de la croissance.

Dans les premières 48 h de la présente expérience, les résultats concernant le métabolisme du carbone sont similaires à ceux obtenus au cours de l'expérience décrite au chapitre 4. Les taux de photosynthèse (0-11.5 h) des populations exposées au Cd sont significativement plus élevés que ceux du témoin ( $H = 8.93$ ,  $p = 0.01$ ) (Tableau 7.2). Par ailleurs, le contenu cellulaire en carbone et en protéine de la population exposée à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  est supérieur à celui du témoin (Figures 7.5 et 7.6B). Pendant la période d'exposition, les quotas cellulaires de protéines du témoin ont varié entre 0.03 et  $0.171 \text{ pg C}\cdot\text{cellule}^{-1}$  comparativement à des variations de  $0.121$  à  $0.197 \text{ pg C}\cdot\text{cellule}^{-1}$  dans les cellules exposées à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . De plus, la quantité de produits de réserve, tels que les lipides et les polysaccharides, est significativement plus élevée dans les cellules en contact avec le Cd que dans celles du témoin (lipides:  $H = 32.50$ ,  $p < 0.01$ ; polysaccharides:  $H = 36.62$ ,  $p < 0.01$ ). Ces résultats sont en accord avec ceux de Rachlin et al. (1984) et Prévot et Soyer-Gobillard (1986) où un nombre plus important de vésicules lipidiques et d'amidon ont été observées chez des algues exposées au Cd.

Tel que mentionné au chapitre 4, les besoins cataboliques des algues unicellulaires peuvent être comblés par l'utilisation des hydrates de carbone et des lipides (Cook 1963, 1966; Ricketts 1966; Handa 1969; Parnas et Cohen 1976; Foy et Smith 1980, Hitchcock 1980). L'augmentation des teneurs en produits de réserve des populations de S. capricornutum exposées au Cd pourrait

Tableau 7.2: Taux de photosynthèse ( $\mu\text{g C}\cdot\text{cellule}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) de populations de S. capricornutum exposées à 0, 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .

	Temps (h)					
	0.1	2	4	6	8.5	11.5
Témoin	2.17	1.35	1.04	0.93	0.92	0.72
30 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	2.16	2.17	2.01	1.58	1.46	1.36
100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	3.86	1.11	0.92	0.90	0.93	0.92

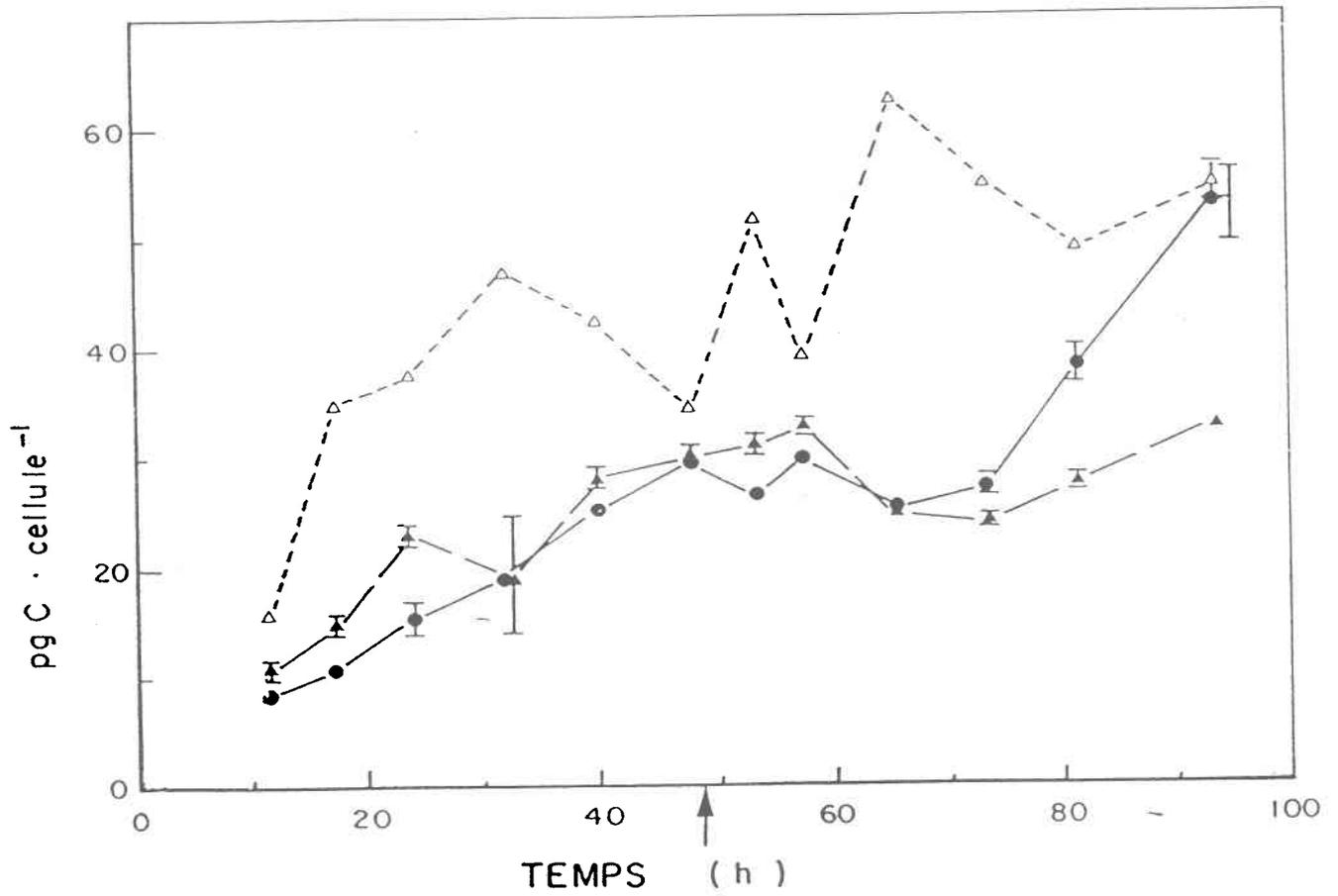


Figure 7.5: Quotas cellulaires en carbone de populations de *S. capricornutum* exposées à 0 (•), 30 (Δ) et 100 (▲) µg Cd·L<sup>-1</sup>. ↑ indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

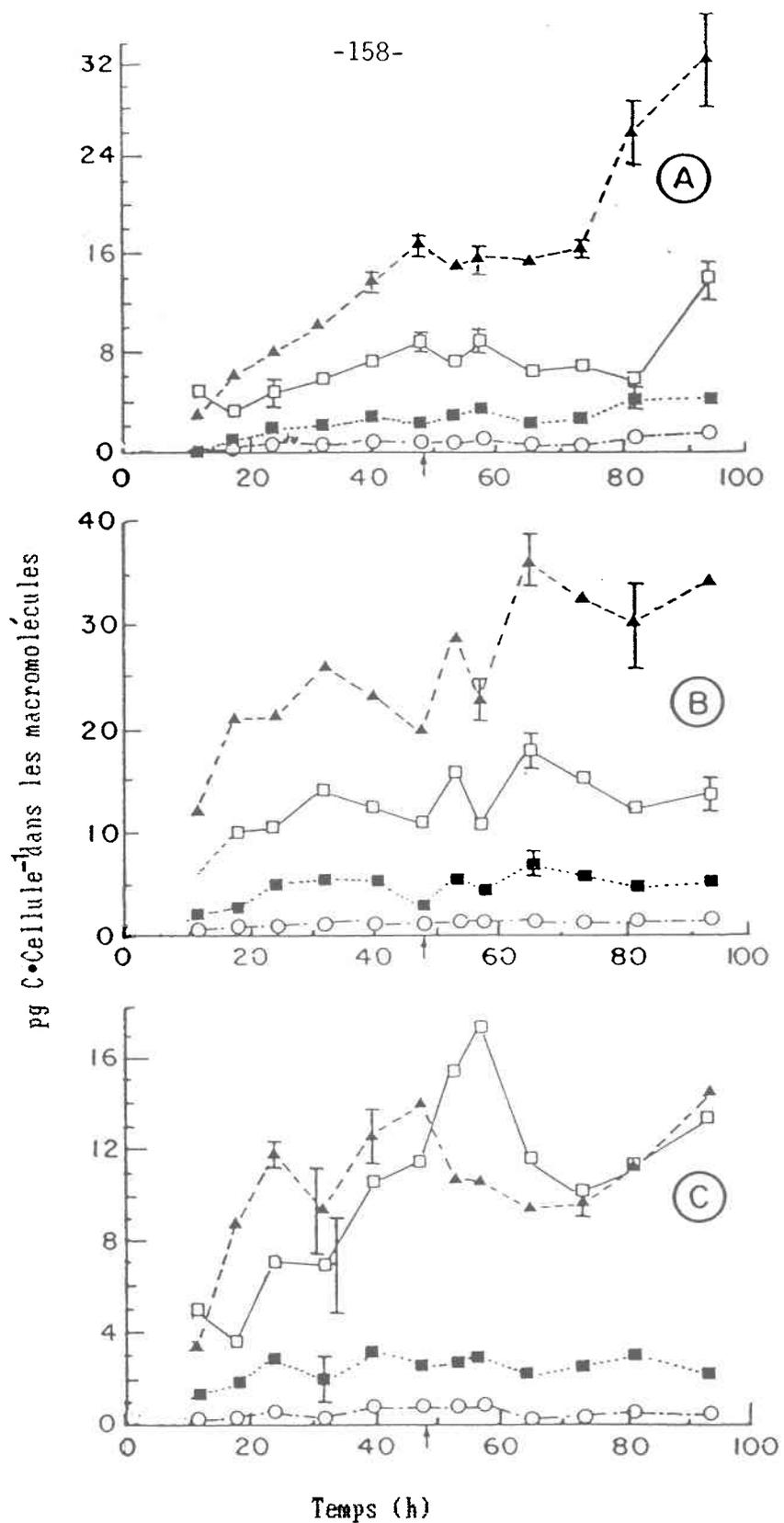


Figure 7.6: Quotas cellulaires en carbone dans les protéines (▲), les lipides (□), les polysaccharides (■) et les métabolites à faible poids moléculaire (○) chez des populations de *S. capricornutum* exposées à 0 (A), 30 (B) et 100 (C) µg Cd·L<sup>-1</sup>. ↑ indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

être une réponse acclimative permettant aux cellules de maintenir une plus grande viabilité et éventuellement de récupérer lorsque la biodisponibilité du métal est réduite par complexation ou adsorption, par exemple.

Pendant la période d'exposition de l'expérience, un patron similaire d'incorporation de carbone dans les macromolécules a été observé chez le témoin et les populations exposées au Cd. Il y a une nette augmentation du contenu en protéines et en lipides des cellules, le quota cellulaire de protéines étant le plus important (Figure 7.6). Les valeurs moyennes du rapport protéine / lipide (11.5-48 h) des populations soumises à 0, 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  sont respectivement 1.65, 1.91 et 1.43. Après l'ajout d'EDTA, soit pendant la période de récupération, les protéines continuent d'être en quantité supérieure aux lipides chez le témoin et chez la population soumise à 30  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . En effet, chez ces populations la valeur moyenne du rapport protéine / lipide est respectivement 2.58 et 2.16. Le patron est très différent chez la population exposée à 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figure 7.6C). Une augmentation importante du quota cellulaire en lipides ainsi qu'une diminution du contenu en protéines sont observées avant la reprise de la croissance, au cours des 10 h qui ont suivi l'ajout d'EDTA et la désorption rapide du Cd qui en résulte (c.f. Chapitre 5). En effet, pendant la récupération de la croissance, le rapport protéine/lipide a diminué pour atteindre une valeur moyenne de 0.87. Cette diminution est concomitante à l'augmentation du contenu cellulaire en ATP et du rapport ATP/ADP (Figures 7.2B et 7.3). Sundberg et Nilshammar-Holmvall (1975) ont observé que des augmentations quasi simultanées du contenu en lipides et en ATP se produisaient juste avant la division cellulaire chez des populations synchrones de Scenedesmus sp.. Ceci nous amène à conclure, que chez la

population précédemment exposée à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , les modifications du contenu cellulaire en lipides et en ATP sont le reflet des activités métaboliques visant à préparer les cellules à se diviser. Lorsque la population récupère, la répartition du  $^{14}\text{C}$  à l'intérieur de ces deux fractions macromoléculaires revient aux niveaux observés avant l'ajout de l'agent complexant. Selon Wortman et Bissonnette (1988) la reprise de la croissance de cellules d'Escherichia coli, préalablement exposées à un rejet minier acide, nécessite la synthèse de lipides, de protéines et d'ARN et une force proton-motrice (gradient de protons).

Nos résultats démontrent que la reprise de la croissance de la population fortement inhibée par le Cd pendant la période d'exposition nécessite une activité métabolique accrue. Chez les organismes photoautotrophes l'énergie nécessaire à l'entretien et à la réparation des cellules peut être fournie, sous forme d'ATP, par l'activité de deux voies métaboliques importantes: la photophosphorylation et la phosphorylation oxydative. De plus, puisque chez les algues planctoniques le taux de respiration est fortement corrélé au taux de croissance (Steemann-Nielsen et Jorgensen 1968; Laws et Caperon 1976), il est probable que la récupération soit accompagnée d'une augmentation du taux de respiration des cellules exposées au Cd.

### 7.3.2 Rôle de la respiration dans le processus de récupération

Au cours de la période d'exposition au Cd (0-46 h) de cette seconde expérience, la croissance des populations de S. capricornutum est fortement inhibée (Figure 7.7; Tableau 7.3). Les taux de croissance ( $\mu_{0-46h}$ ) des

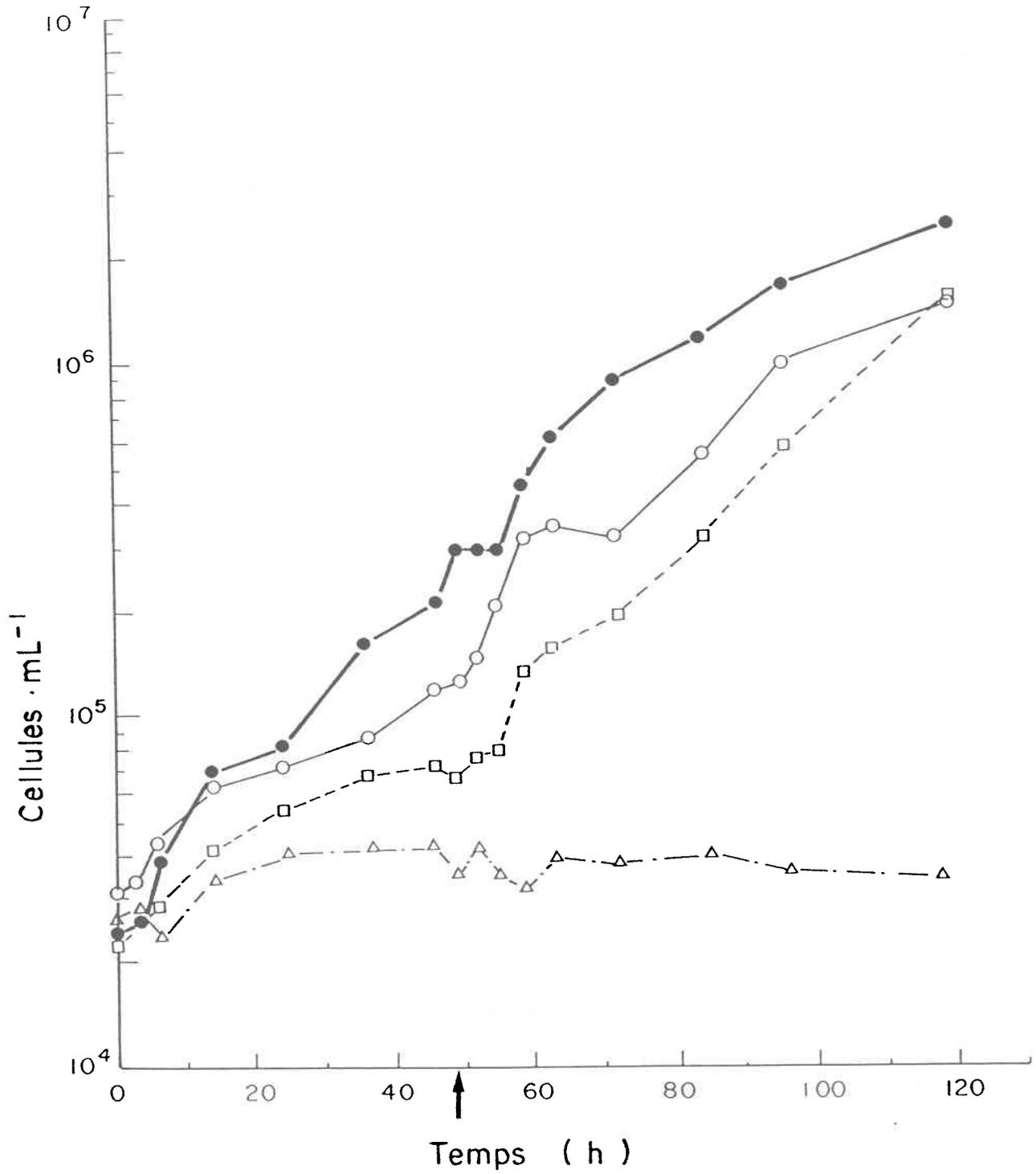


Figure 7.7: Croissance de populations de *S. capricornutum* exposées à 0 (•), 30 (o) et 100 (□) et 500 (Δ) µg Cd·L<sup>-1</sup>. ↑ indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

Tableau 7.3: Taux de croissance ( $\mu \cdot h^{-1}$ ) de populations de S. capricornutum exposées à 0, 30, 100 et 500  $\mu g \text{ Cd} \cdot L^{-1}$ .

	$\mu$ (0-46 h)	$\mu$ (49-120 h)
Témoin	0.048	0.030
30 $\mu g \text{ Cd} \cdot L^{-1}$	0.029*	0.035
100 $\mu g \text{ Cd} \cdot L^{-1}$	0.025*	0.044*
500 $\mu g \text{ Cd} \cdot L^{-1}$	0.012*	0*

\* Significativement différent du témoin pour  $p < 0.01$

populations exposées à 30, 100 et 500  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  sont respectivement 60%, 52% et 25% de la valeur du témoin.

Cette inhibition de la croissance est accompagnée d'une inhibition significative de la respiration ( $F = 5.697$ ;  $p < 0.01$ ). Comparativement à la population témoin, la respiration est inhibée pendant toute la durée de l'exposition chez la population soumise à 30  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . Par contre, dans le cas des populations exposées à 100 et 500  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  l'inhibition de la respiration est précédée d'une courte période au cours de laquelle le taux de respiration est supérieur à celui du témoin (Tableau 7.4A; Figure 7.8). En effet, à 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  le taux de respiration à 0.1 et 3h est respectivement 139% et 89% plus élevé que celui du témoin tandis qu'à 3h, chez la population exposée à 500  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , cette valeur est 39% supérieure à celle du témoin. Les populations exposées à 0, 30, 100 et 500  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  respirent en moyenne respectivement 7.8%, 2.8%, 4.7% et 3.6% de leur quota cellulaire en carbone pendant deux heures d'incubation à l'obscurité.

Ces résultats mettent en évidence qu'un stress causé par une exposition aux plus fortes concentrations de Cd utilisées stimule initialement la respiration. D'autres auteurs ont également observé des stimulations de la respiration lors d'exposition à des métaux. Elles étaient cependant généralement de plus longue durée que celles qui sont observées ici. Par exemple, Sathya et Balakrishnan (1988) ont observé d'une part, une inhibition de la respiration de populations de S. bijugatus exposées à 10 et 30  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , et d'autre part une stimulation de la respiration chez une population exposée à 50  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . Des résultats semblables ont été rapportés lorsque de jeunes

plants de fève soya étaient exposés à des concentrations de 51, 101 et 152  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Lee et al. 1976). Ces auteurs ont en effet observé une stimulation de la respiration aux plus fortes concentrations de Cd. Parallèlement à cette stimulation de la respiration, ils ont noté une augmentation de l'activité de la malate déshydrogénase, une enzyme impliquée dans le cycle des acides tricarboxyliques. L'activité de cette enzyme est corrélée avec le taux de respiration. Lee et al. (1976) suggèrent par ailleurs, qu'aux plus fortes concentrations de Cd, l'augmentation de la respiration aurait pour but de combler les besoins cellulaires en ATP puisqu'une inhibition de la photosynthèse était également observée. Lors d'expériences à court terme menées avec Chlorella sp., Shieh et Barber (1973) ont pour leur part observé des stimulations de la respiration à de faibles concentrations de Hg.

À la lumière de ces résultats, il apparaît que la respiration peut être activée pour combler une partie des besoins énergétiques de cellules exposées au Cd et au Hg. Le fait qu'au cours de la période d'exposition au Cd de la présente expérience la respiration n'est stimulée que pendant une courte période de temps pourrait être dû à une perturbation de la structure des mitochondries (Silverberg 1976) ou à l'inhibition d'enzymes mitochondriales par le Cd (Ahlers et Rösick 1986).

Une récupération de la croissance et une stimulation de la respiration sont observées au cours de la période de récupération (49-120h) de la présente expérience. En effet, l'ajout d'EDTA après 48h d'exposition au Cd résulte en une augmentation très importante de la croissance chez les populations exposées à 30 et 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tableau 7.3). Chez ces populations le taux de croissance

Tableau 7.4: Respiration totale de populations de *S. capricornutum* exposées à 30, 100 et 500  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  exprimée en pourcentage du témoin (A-période d'exposition au Cd; B-période de récupération).

A	Temps (h)						
	0.1	3	6	14	24	36	46
30 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	-72	-9	-81	-66	-26	-100	-100
100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	+139	+89	-68	-39	-72	-2	-85
500 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	-52	+39	-59	-3	-23	-87	-100

B	Temps (h)								
	49	52	55	59	63	72	84	96	120
30 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	+256	-23	-97	-86	+81	+219	+408	+1181	+138
50 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	-65	-63	+108	+75	-28	+120	+584	+566	+437
500 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	+76	-100	+305	+631	-92	+216	+329	+4125	ND*

\* ND : donnée non disponible

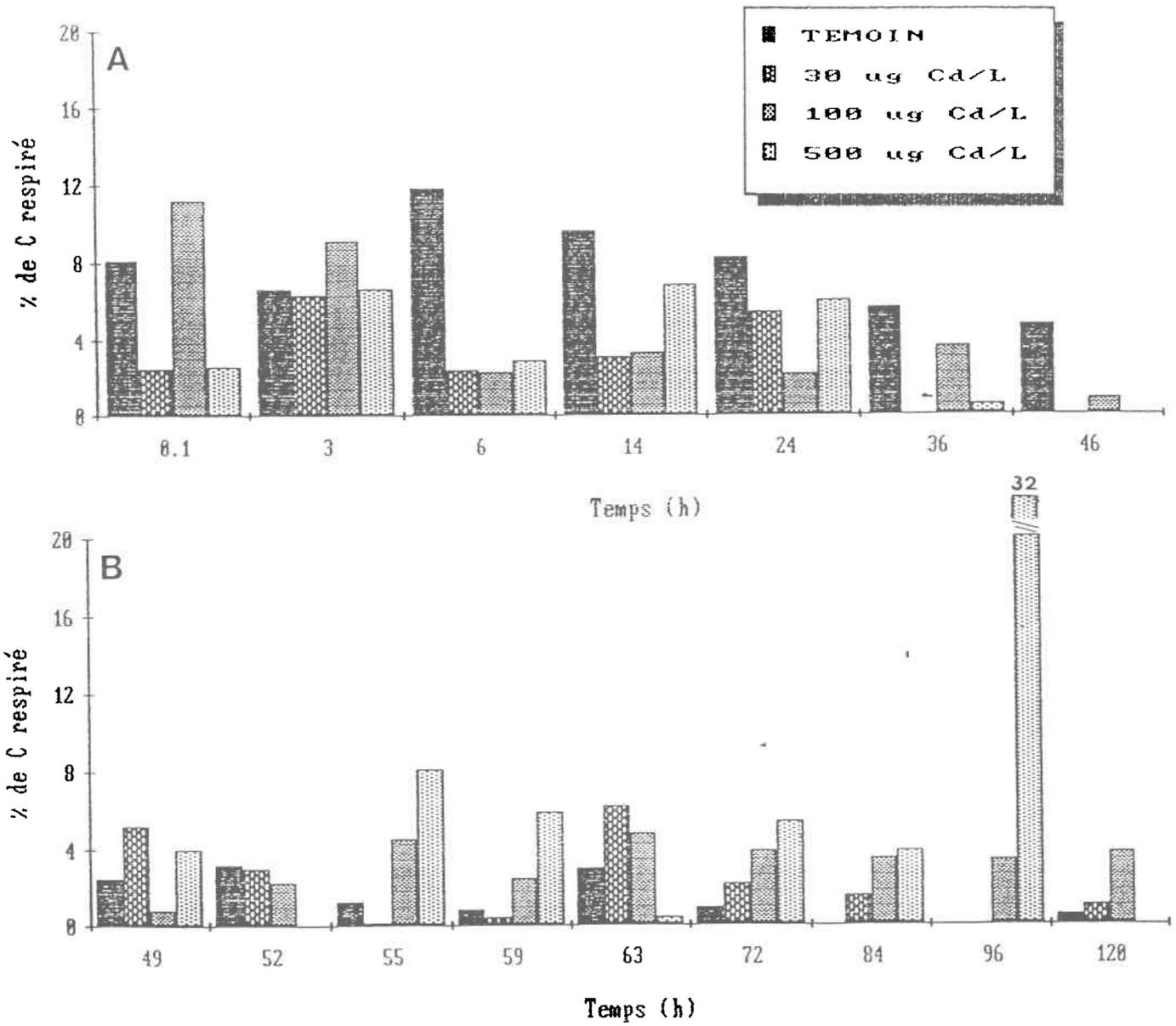


Figure 7.8: Pourcentage du quota cellulaire en carbone respiré par des populations de *S. capricornutum* exposées à 0, 30, 100 et 500 µg Cd·L<sup>-1</sup> pendant les périodes d'exposition au Cd (A) et de récupération (B).

( $\mu$  49-120h) atteint des valeurs respectives de 0.035 et 0.044·h<sup>-1</sup> comparativement à 0.030·h<sup>-1</sup> pour le témoin. Chez la population exposée à 30  $\mu$ g Cd·L<sup>-1</sup> la récupération est immédiate tandis que chez celle exposée à 100  $\mu$ g Cd·L<sup>-1</sup>, elle n'est observée qu'à partir de 55h (Figure 7.7).

L'inhibition de la croissance de la population exposée à 500  $\mu$ g Cd·L<sup>-1</sup> persiste pendant toute la durée de la période de récupération. Malgré l'absence de récupération chez cette dernière, suite à l'ajout d'EDTA la respiration de toutes les populations de S. capricornutum exposées au Cd est très fortement stimulée par rapport à celle du témoin (Tableau 7.4). Par ailleurs, aux concentrations de Cd pour lesquelles une récupération est observée, le début de la reprise de la croissance coïncide avec le début de l'augmentation du taux de respiration, c'est-à-dire à 49 et 55h pour les populations exposées respectivement à 30 et 100  $\mu$ g Cd·L<sup>-1</sup>. Cette observation suggère qu'il existe une relation directe entre la phosphorylation oxydative et la croissance de cellules exposées au Cd. Ahlers et Rösick (1986) ont observé une corrélation entre l'inhibition de la croissance et l'inhibition de l'activité de l'ATPase plasmatique chez des levures exposées au Cd. Cette enzyme est une protéine de la membrane plasmatique des mitochondries, responsable de la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP (Lehninger 1977). L'inhibition de cette enzyme chez les populations de S. capricornutum exposées au Cd pourrait expliquer le faible rapport ATP/ADP observé chez la population exposée à 100  $\mu$ g Cd·L<sup>-1</sup> au cours de l'expérience précédente. La reprise de la croissance, qui a lieu suite à l'importante diminution des teneurs cellulaires en Cd résultant de l'ajout d'EDTA (c.f. Chapitre 5), pourrait s'expliquer par une récupération de l'activité de l'ATPase permettant ainsi la récupération de la phosphorylation

oxydative. Une telle récupération de la phosphorylation oxydative est observée dans la présente expérience. Wortman et Bissonnette (1988) ont d'ailleurs observé que la reprise de la croissance de E. coli, préalablement exposé à un rejet minier acide, nécessite une force proton-motrice, qui est le gradient de protons nécessaire au fonctionnement de l'ATPase (Lehninger 1977). L'augmentation du rapport ATP/ADP au cours de la reprise de la croissance pourrait donc être reliée à la respiration.

Les différences observées dans les taux de croissance et de respiration avant et après l'ajout d'EDTA sont accompagnées par des différences au niveau de l'utilisation des divers substrats respiratoires. Pendant la période d'exposition au Cd, les résultats démontrent en ordre d'importance que les protéines, les MFPM, les polysaccharides et les lipides participent à la respiration (Tableau 7.5A). Les résultats démontrent également qu'il n'y a pas de différences significatives dans l'utilisation des macromolécules entre la population témoin et les populations exposées au Cd (Tableau 7.6). Toutefois, lorsque les produits de réserve sont considérés dans leur ensemble (polysaccharides + lipides), ils fournissent 24% et 25% du C respiré chez les populations exposées à 100 et 500  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  comparativement à 13% chez les populations exposées à 0 et 30  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tableau 7.6A). Globalement, les produits de réserves semblent donc jouer un plus grand rôle dans la respiration des populations exposées aux plus fortes concentrations de Cd, possiblement pour combler plus efficacement les besoins en énergie des cellules.

L'importance relative des différents substrats respiratoires chez S. capricornutum est semblable à l'utilisation des substrats de la respiration

Tableau 7.5: Pourcentage<sup>1</sup> du carbone respiré par des populations de S. capricornutum exposées à 0, 30, 100 et 500 µg Cd·L<sup>-1</sup>, provenant des diverses fractions de macromolécules (A: période d'exposition au Cd; B: période de récupération).

Fractions macromoléculaires				
A - (0-46h)	Protéines	MFPM	Polysaccharides	Lipides
Témoin	67.1 ± 37.6	19.6 ± 18.4	13.0 ± 26.4	0.3 ± 6.8
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	70.7 ± 35.0	16.0 ± 15.6	12.3 ± 19.0	1.1 ± 2.6
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	45.4 ± 40.4	30.8 ± 34.8	18.1 ± 22.6	5.7 ± 9.6
500 µg Cd·L <sup>-1</sup>	62.1 ± 35.3	13.2 ± 8.1	16.0 ± 18.2	8.8 ± 18.0
B - (49-120h)				
Témoin	58.1 ± 39.8	4.7 ± 8.4	33.2 ± 41.2	4.1 ± 8.0
30 µg Cd·L <sup>-1</sup>	48.2 ± 43.6	13.8 ± 32.5	38.0 ± 44.5	0
100 µg Cd·L <sup>-1</sup>	42.1 ± 37.9	6.5 ± 12.4	29.0 ± 35.6	22.5 ± 24.3
500 µg Cd·L <sup>-1</sup>	41.1 ± 40.4	13.9 ± 32.7	14.4 ± 17.6	19.5 ± 37.1

<sup>1</sup> Noter que les valeurs positives (c'est-à-dire synthèse plutôt que respiration) ne sont pas considérées dans le calcul.

Tableau 7.6 Comparaison des moyennes (test de t) des données de respiration des macromolécules des populations de *S. capricornutum* exposées à 0, 30, 100 et 500  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ .

	Période d'exposition			Période de récupération		
	t	p	D.F.	t	p	D.F.
<u>Lipides</u>						
témoin vs 30 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	0.999	0.46	10	1.391	0.09	16
témoin vs 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	-1.18	0.13	10	-1.51	0.05*	16
témoin vs 500 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	-1.577	0.08	8	-0.91	0.19	14
<u>Polysaccharides</u>						
témoin vs 30 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	0.432	0.34	10	-0.003	0.50	16
témoin vs 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	-1.27	0.12	10	0.802	0.22	16
témoin vs 500 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	-1.25	0.119	10	1.411	0.09	14
<u>MFPM</u>						
témoin vs 30 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	0.592	0.28	10	0.524	0.30	16
témoin vs 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	-1.122	0.45	10	1.21	0.12	16
témoin vs 500 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	0.563	0.29	10	0.812	0.20	14
<u>Protéines</u>						
témoin vs 30 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	-0.804	0.22	10	0.185	0.43	16
témoin vs 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	-1.155	0.44	10	1.457	0.08	16
témoin vs 500 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$	0.035	0.49	10	0.719	0.24	14

\* Statistiquement significatif

chez Oscillatoria thiebautii dans des conditions d'intensités lumineuses saturantes ( $I_k$ ). En effet, Li et al. (1980) ont démontré par des mesures à l'obscurité qu'aux fortes et aux faibles intensités lumineuses, la plus grande partie du  $^{14}\text{C}$  perdue par cette espèce provenait des MFPM tandis qu'à des intensités approchant  $I_k$ , le  $^{14}\text{C}$  provenait surtout des fractions à poids moléculaires élevés (protéines > polysaccharides > lipides).

Au cours de la période de récupération, l'utilisation des macromolécules est sensiblement différent de celle décrite ci-haut chez l'ensemble des populations de S. capricornutum (Tableau 7.5B). En effet, l'utilisation des polysaccharides comme substrat respiratoire devient beaucoup plus importante à partir de 72 h chez l'ensemble des populations. De plus, pendant cette période le taux de respiration de cette fraction macromoléculaire diminue avec une augmentation des concentrations de Cd (Figure 7.9). Par ailleurs, lorsque l'utilisation des polysaccharides devient importante, les MFPM ne sont plus utilisés pour la respiration et une incorporation de carbone à cette fraction est observée (Figure 7.10). Cette même tendance, mais de façon moins marquée, est également observée dans le cas des protéines (Figure 7.11).

Une augmentation très marquée et significative de l'utilisation des lipides comme substrat de la respiration est observée pendant la période de récupération chez la population exposée à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tableau 7.6; Figure 7.12). Chez cette population l'utilisation des lipides n'apparaît qu'après une importante augmentation des quotas cellulaires de cette macromolécule (Figure 7.13) et coïncide avec le début de la récupération de la croissance et de la stimulation de la respiration (Figures 7.7 et 7.8; Tableau 7.4B). Une telle

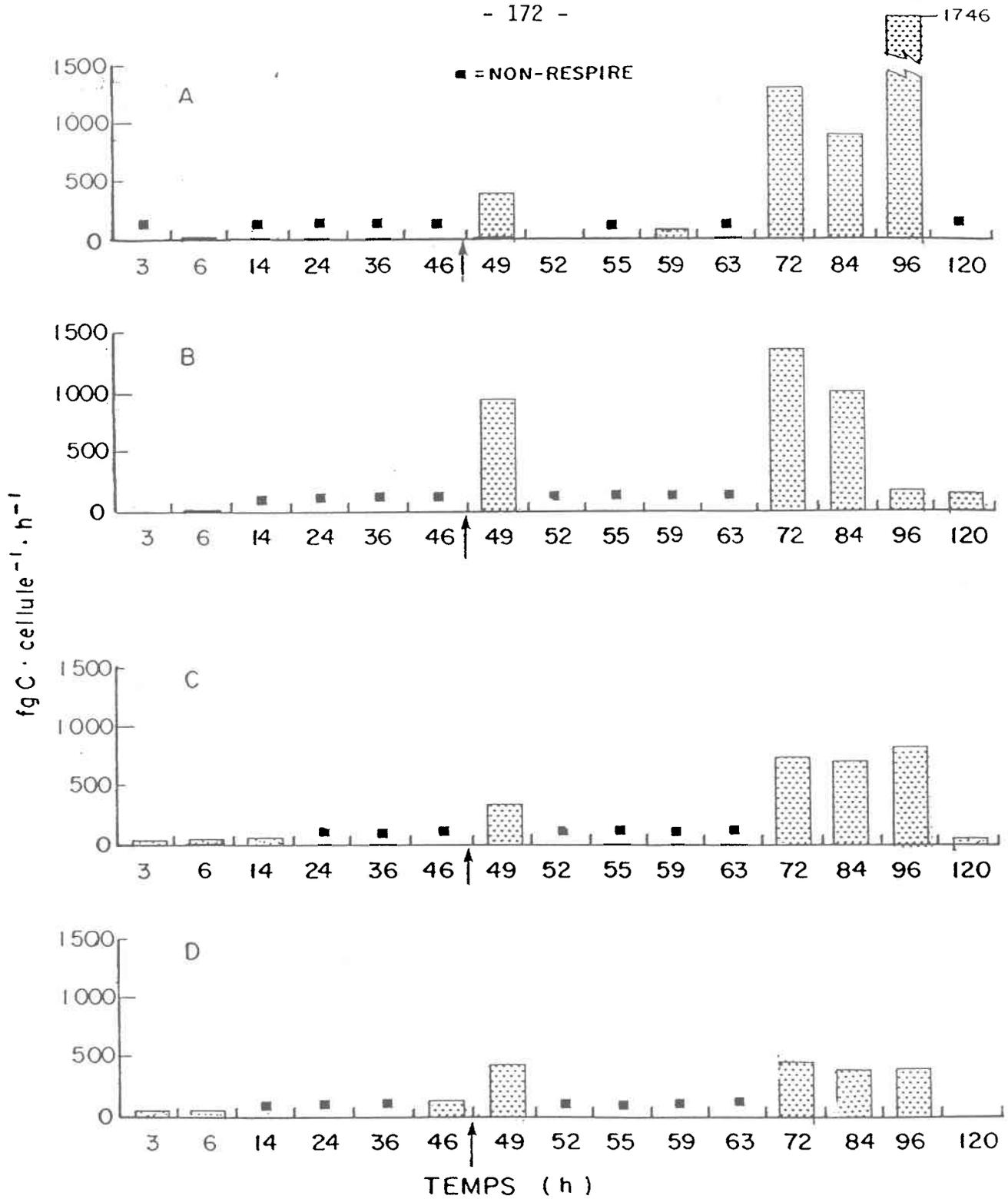


Figure 7.9: Taux de respiration des polysaccharides chez des populations de *S. capricornutum* exposées à 0 (A), 30 (B), 100 (C) et 500 (D)  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération.  $\uparrow$  indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

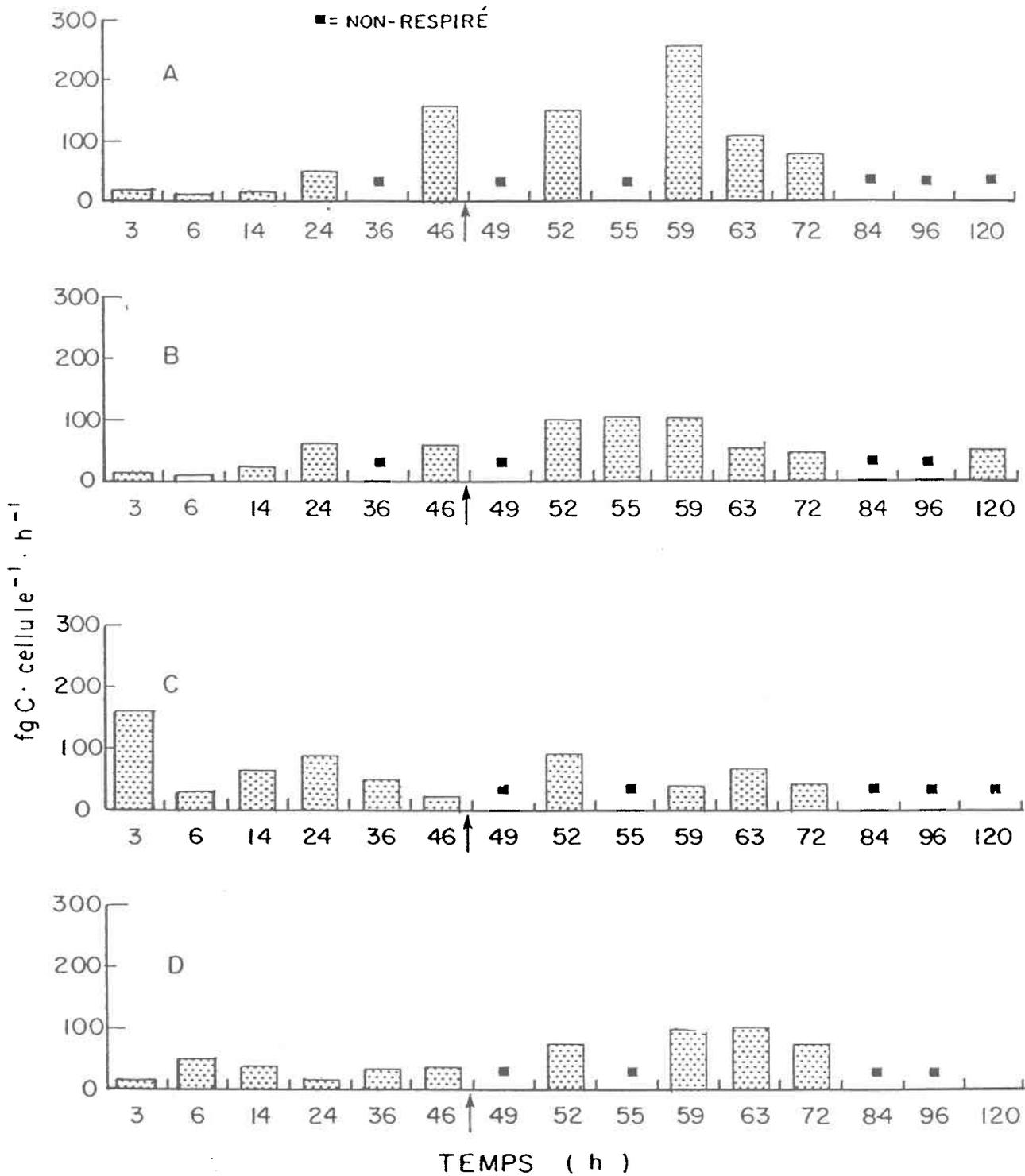


Figure 7.10: Taux de respiration des métabolites à faible poids moléculaire chez des populations de *S. capricornutum* exposées à 0 (A), 30 (B), 100 (C) et 500 (D)  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération.  $\uparrow$  indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

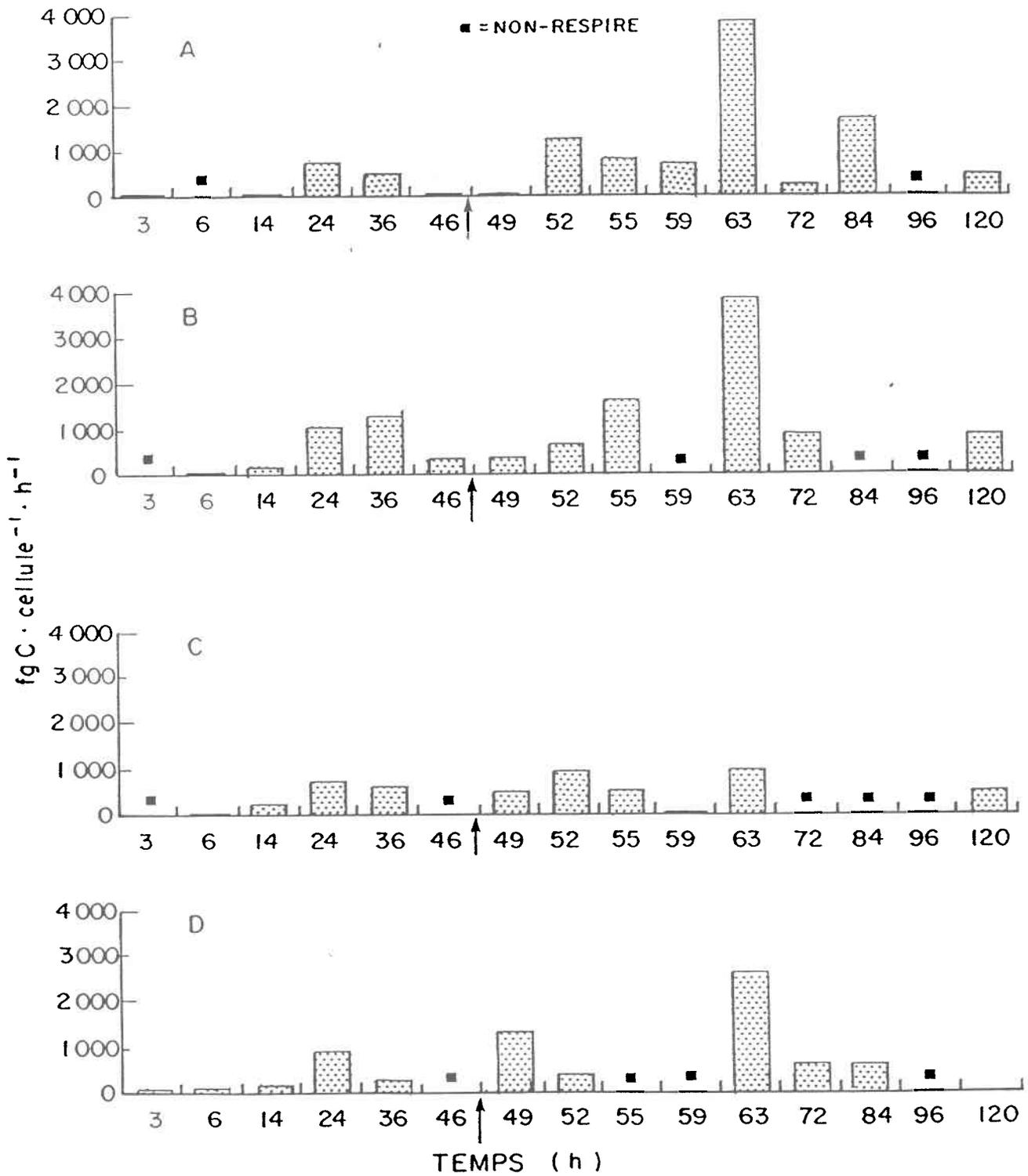


Figure 7.11: Taux de respiration des protéines chez des populations de *S. capricornutum* exposées à 0 (A), 30 (B), 100 (C) et 500 (D)  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération. † indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

augmentation des quotas cellulaires en lipides précédant la reprise de la croissance a également été observée au cours de la première expérience (Figure 7.6C). Par contre, chez la population exposée à  $500 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  la stimulation de la respiration n'est pas accompagnée d'une reprise de la croissance (Tableau 7.4B; Figure 7.7). Chez cette population, la persistance de l'inhibition de la croissance pourrait être expliquée par le fait que l'augmentation des quotas cellulaires en lipides ainsi que le début de la respiration de ce substrat apparaissent tardivement (Figures 7.13 et 7.12). À cette concentration de Cd, la concentration d'EDTA ajoutée n'est probablement pas assez élevée pour réduire suffisamment la biodisponibilité de l'ion  $\text{Cd}^{2+}$ . Il se pourrait également qu'à cette concentration de Cd la récupération de la photosynthèse soit insuffisante pour assurer un taux adéquat de synthèse des macromolécules nécessaires à la croissance. En effet, les résultats de l'expérience présentée au chapitre 6 démontrent que dans nos conditions expérimentales le taux de photosynthèse de la population exposée à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  demeure inférieur à celui du témoin pendant toute la période de récupération. On peut donc supposer que la photosynthèse de la population exposée à  $500 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  demeure fortement perturbée.

Par ailleurs, pendant la période de récupération, la population exposée à  $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  n'utilise pas de lipide comme substrat respiratoire. Chez cette population, l'énergie fournie par les substrats usuels de la respiration semble permettre la reprise de la croissance. D'ailleurs, les besoins énergétiques de cette population sont probablement moins importants que ceux de la population exposée à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  comme en témoignent les rapports ATP/ADP de ces deux populations au cours de l'expérience précédente (Figure 7.3).

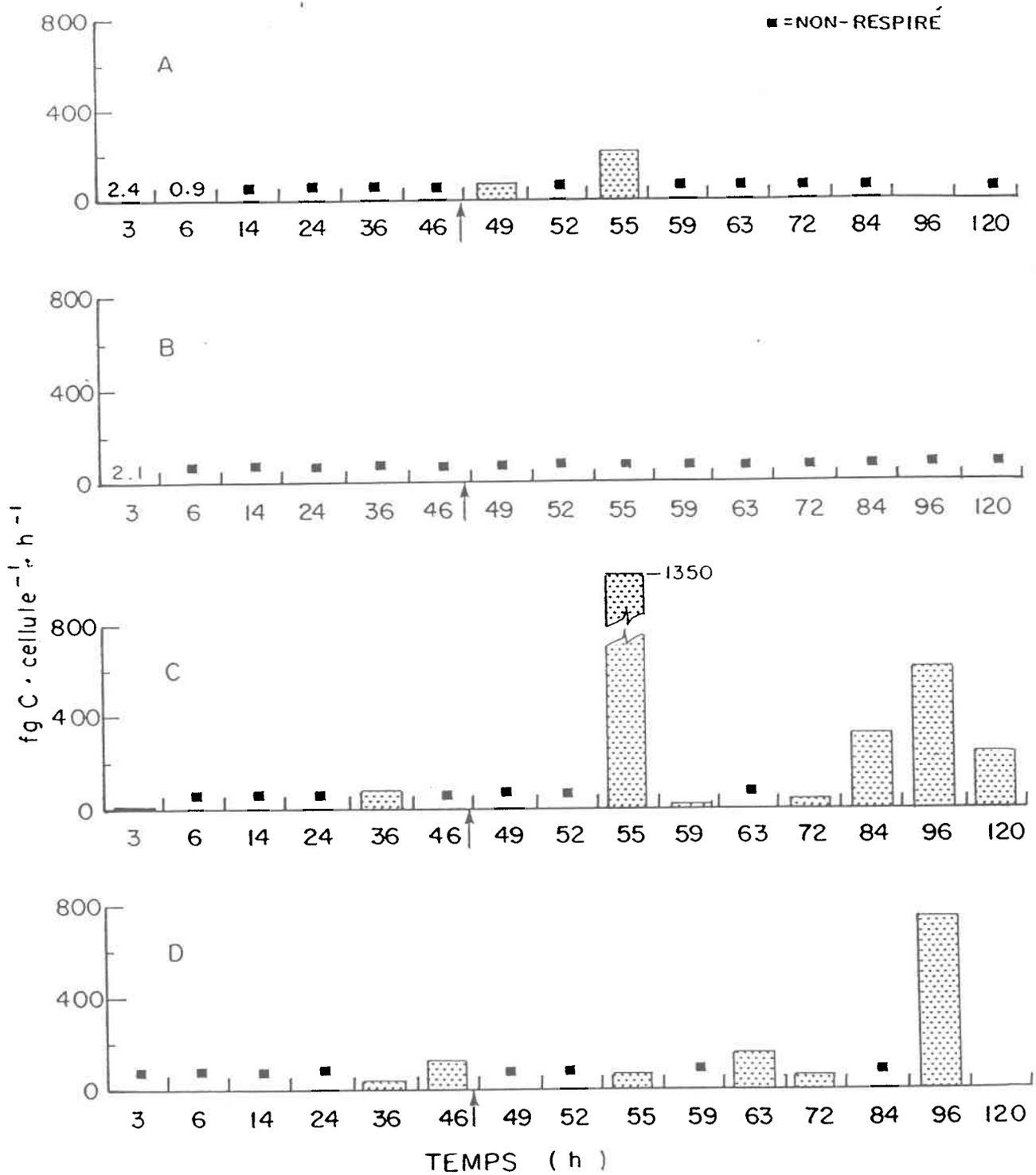


Figure 7.12: Taux de respiration des lipides chez des populations de *S. capricornutum* exposées à 0 (A), 30 (B), 100 (C) et 500 (D) µg Cd·L<sup>-1</sup> pendant les périodes d'exposition au Cd et de récupération. ↑ indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

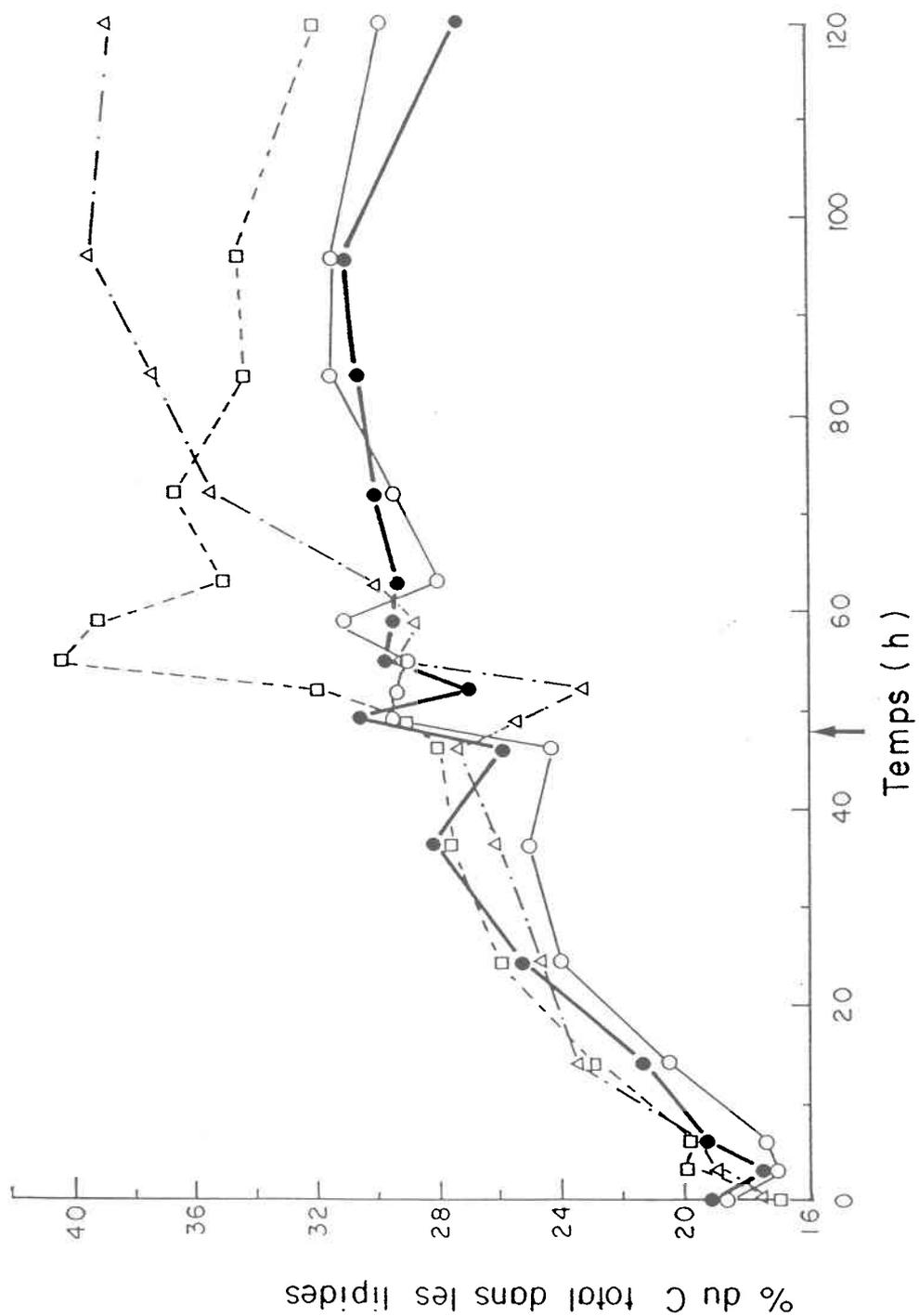


Figure 7.13: Pourcentage de carbone alloué aux lipides chez des populations de *S. capricornutum* exposées à 0 (•), 30 (○), 100 (□) et 500 (Δ) μg Cd·L<sup>-1</sup>. ↑ indique l'heure de l'ajout d'EDTA.

#### 7.4 Conclusion

Les résultats des expériences décrites ci-haut permettent de confirmer les hypothèses mises de l'avant, à savoir que la récupération de la croissance de populations de S. capricornutum ayant été exposées au Cd nécessite de l'énergie sous forme d'ATP et s'accompagne d'une augmentation du métabolisme des lipides ainsi que du taux de respiration.

Suite à l'ajout d'EDTA, la récupération de la croissance semble, en effet, nécessiter une chaîne chronologique d'évènements métaboliques impliquant la photosynthèse et la synthèse de lipides dans un premier temps, et la respiration des lipides et la synthèse d'ATP dans un deuxième temps. Ainsi, la désorption du Cd prise en charge par les cellules après l'ajout d'EDTA est immédiatement suivie d'une reprise de l'activité photosynthétique des cellules qui se traduit par des taux élevés de synthèse de protéines et de lipides (c.f. Chapitre 6). Chez les populations exposées à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  et  $500 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , où la croissance est fortement inhibée, ce carbone nouvellement assimilé est dirigé vers la synthèse des lipides.

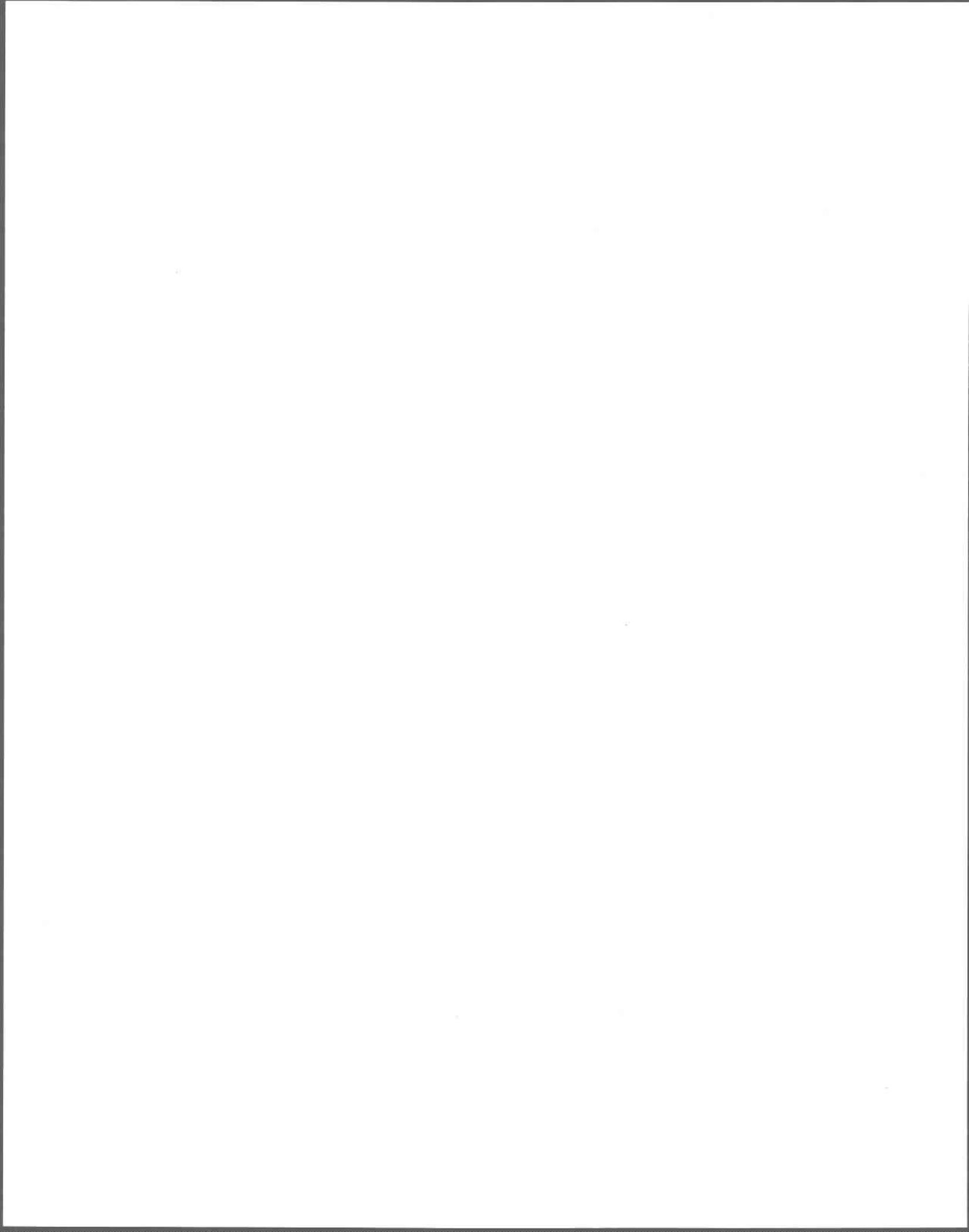
Cette augmentation du quota cellulaire en lipides pourrait préparer les cellules à se diviser comme l'ont suggéré Sundberg et Nilshammar-Holmvall (1975), en fournissant un substrat pouvant être catabolisé avec un bon rendement énergétique. Nos résultats semblent soutenir cette hypothèse puisque d'une part chez la population exposée à  $100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  au cours de la première expérience, une reprise de la croissance et une augmentation des rapports ATP/cellule et ATP/ADP sont observées pendant la période de récupération.

D'autre part, les résultats de la période de récupération de la deuxième expérience démontrent une utilisation accrue des lipides par la respiration chez les populations exposées aux plus fortes concentrations de Cd (100 et 500  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ ). De plus chez la population exposée à 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  la reprise de la croissance est concomitante à une stimulation de la respiration et à une utilisation des lipides par cette voie métabolique.

Nos résultats suggèrent que la récupération de la respiration observée au cours de la deuxième expérience est reposable de l'augmentation des teneurs cellulaires en ATP observée pendant la période de récupération de la première expérience. La désorption du Cd cellulaire résultant de l'ajout d'EDTA pourrait permettre le rétablissement de la force proton-motrice des mitochondries ainsi que la récupération de l'activité de l'ATPase, une enzyme mitochondriale inhibée par le Cd (Ahlers et Rösick 1986), responsable de la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP.

## **Chapitre 8**

### **Conclusions**



## 8.1 Conclusions

Les effets toxiques du Cd chez S. capricornutum ont été étudiés non seulement sur la croissance mais également sur des grandes voies métaboliques telles la photosynthèse et la respiration. Dans l'ensemble, on constate malgré des différences d'une expérience à l'autre que la croissance est inhibée à toutes les concentrations de Cd utilisées, tandis que les résultats des chapitres 6 et 7 (période d'exposition) démontrent que les deux principales voies de synthèse d'ATP, la photosynthèse et la respiration, sont fortement perturbés par le Cd. L'originalité de nos travaux a surtout été de contribuer à l'amélioration des connaissances sur les processus d'acclimatation et de récupération des cellules vis-à-vis du Cd. En effet, nos résultats révèlent que d'une part, une certaine acclimatation à cet ion métallique est possible et que d'autre part, les effets toxiques du Cd pour des concentrations  $\leq 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ne sont pas persistants; une récupération est observée lorsque les ions  $\text{Cd}^{2+}$  en solution dans le milieu de culture sont complexés par l'ajout d'EDTA.

Les ajustements du métabolisme chez S. capricornutum ont été mis en évidence au niveau des modifications de la répartition du carbone dans les macromolécules lors d'expositions au Cd. Ces modifications sont perçues comme des réponses acclimatives au Cd. Le modèle de Shuter (1979), où la croissance algale dépend d'un flux de carbone des produits de réserve vers les protéines, a constitué un outil d'interprétation précieux pour expliquer ces réponses physiologiques.

Les résultats présentés au chapitre 4 démontrent que dans les premières heures d'exposition au Cd, le taux de photosynthèse ainsi que le taux de synthèse des protéines par rapport à celui des polysaccharides (rapport protéine/polysaccharide) sont généralement plus élevés chez les populations exposées que chez la population témoin. Li (1979) a suggéré que ces modifications du métabolisme du carbone visent à maintenir un taux de croissance optimal en présence de Cd. Nos résultats démontrent d'ailleurs que les taux de croissance des populations exposées à 30 et 60  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  sont supérieurs à celui du témoin pendant les 16 premières heures d'exposition.

Par la suite, il semble que la présence de Cd entraîne des perturbations qui ne peuvent être compensées par des ajustements du métabolisme du carbone, car la croissance est inhibée à toutes les concentrations de Cd. Or, même lorsque la croissance est fortement perturbée après 16 h d'exposition au Cd, des modifications des teneurs cellulaires en macromolécules sont observées chez les populations exposées au Cd. Par exemple, chez la population exposée à 30  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  les quotas cellulaires en protéines et en lipides sont plus élevés que chez la population témoin jusqu'à 80 h. Les quotas cellulaires en protéines représenteraient un excès de synthèse par rapport aux besoins en protéines pour la division cellulaire. Pour leur part, les lipides pourraient être vues comme un ajustement du métabolisme du carbone visant à favoriser la survie des cellules en présence de Cd. Les lipides peuvent, en effet, constituer des réserves auxquelles les cellules peuvent faire appel pour combler leurs besoins énergétiques. Les résultats du chapitre 7 démontrent que S. capricornutum peut utiliser les lipides comme substrat respiratoire.

Les réponses acclimatatives observées au chapitre 4 suggèrent que les populations exposées au Cd conservent un potentiel de croissance. Dans ce contexte, les expériences présentées aux chapitres 5, 6 et 7 ont été réalisées afin de connaître la persistance des effets toxiques lorsque la concentration de Cd biodisponible dans le milieu diminue et d'étudier l'implication des processus respiratoires et photosynthétiques dans la récupération de la croissance. Les résultats, après 48 h d'exposition au Cd, démontrent que les effets toxiques ne sont généralement pas persistants et que pour des concentrations de Cd  $\leq 100 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , la récupération de la croissance s'effectue à l'intérieur d'une période  $\leq 10$  h. Il semble que la récupération de la croissance soit liée à l'importante et rapide désorption de Cd qui suit l'ajout de l'agent complexant (EDTA) au milieu de culture. Les résultats du chapitre 5 démontrent en effet que la complexation des ions  $\text{Cd}^{2+}$  dans le milieu de culture entraîne une perte d'environ 80% du Cd adsorbé et d'environ 40% du Cd absorbé par les cellules. La désorption du Cd "adsorbé" à la paroi cellulaire a déjà été observée par de nombreux auteurs (c.f. chapitre 5) et est généralement attribuée au fait que le Cd est faiblement lié aux ligands cellulaires. La perte de Cd dit "absorbé" est par contre plus inusitée et pourrait soit être le résultat d'une concentration trop faible d'EDTA qui aurait sous-estimé la proportion de Cd adsorbé pendant la période d'exposition, soit représenter les ions  $\text{Cd}^{2+}$  transportés ou diffusés à l'intérieur de la cellule qui ne sont pas complexés à des sites intracellulaires. Ce "pool" d'ions pourrait diffuser hors de la cellule lorsque l'équilibre  $\text{Cd}^{2+} \rightleftharpoons \text{Cd-cellule}$  est perturbé, dans notre cas par l'ajout d'EDTA au milieu de culture.

Les expériences présentées à l'intérieur des chapitres 6 et 7 ont permis de mettre en évidence les évènements métaboliques impliqués dans la récupération de la croissance afin d'en arriver à proposer une séquence d'activités associées à la récupération. Nos résultats démontrent pour la première fois d'une part que les effets du Cd sur la photosynthèse sont plus persistants que ceux sur la respiration, et d'autre part que la récupération de ces deux voies métaboliques est essentielle à la récupération de la croissance. La croissance, suite à la désorption du Cd cellulaire, ne sera possible que dans la mesure où les besoins en carbone pour la synthèse de macromolécules ainsi que les besoins énergétiques des cellules peuvent être satisfaits. En ordre chronologique, les étapes rencontrées dans la récupération de la croissance sont: (1) une reprise de la photosynthèse à laquelle est associée une importante augmentation de la synthèse de lipides et de protéines, (2) une augmentation des teneurs cellulaires en ATP (des rapports ATP/cellule et ATP/ADP) qui est concomitante à la récupération de la respiration et à l'utilisation des lipides comme substrat respiratoire préférentiel. Par ailleurs, il semble que le taux de croissance atteint par les populations préalablement exposées au Cd dépende du degré de récupération de la photosynthèse. En effet, le taux de croissance demeure inférieur à celui du témoin lorsque la récupération de la photosynthèse, et donc de la synthèse de macromolécules, n'est que partielle.

Ces observations sont en accord d'une part avec les hypothèses qui soutiennent le modèle de croissance algale et d'autre part avec les activités métaboliques que l'on sait associées aux diverses phases du cycle cellulaire. L'approche que nous avons privilégiée a permis de relier de façon originale les connaissances nouvellement acquises sur la persistance des effets toxiques du

Cd sur le métabolisme algal au processus de croissance. Étant donné qu'ultimement ce sera le maintien ou la récupération d'un taux de croissance adéquat qui déterminera le destin d'une espèce dans son milieu, cette approche semble présenter une plus grande "signification écologique" que les paramètres couramment utilisés dans les bioessais avec algues (ex.: densité cellulaire maximum). En effet, ces paramètres ne permettent pas de juger de la viabilité des cellules.

Nos travaux ont clairement mis en évidence la capacité de cellules algales à récupérer après avoir été exposées à des concentrations relativement élevées d'une substance toxique. Les concentrations de Cd utilisées dans le cadre de cette thèse laissent entrevoir que les populations phytoplanctoniques colonisant des milieux lotiques contaminés par des effluents enrichis en Cd pourraient récupérer de cette agression toxique. Malgré les concentrations élevées de Cd auxquelles S. capricornutum a été exposé (30 à 500  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ ) par rapport aux concentrations retrouvées dans les milieux aquatiques contaminés (jusqu'à 20  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ ), les doses de Cd reçues par les cellules algales pourraient être similaires. Par exemple, on peut estimer que chez la population de S. capricornutum exposée à 100  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  la dose de Cd reçue par unité de chl-a varierait entre 0.4  $\mu\text{g Cd}\cdot\mu\text{g chl-a}^{-1}$  et 6.7  $\mu\text{g Cd}\cdot\mu\text{g chl-a}^{-1}$ , comparativement à une dose qui pourrait atteindre 2  $\mu\text{g Cd}\cdot\mu\text{g chl-a}^{-1}$  dans les écosystèmes aquatiques perturbés (biomasse algale: 10  $\mu\text{g chl-a}\cdot\text{L}^{-1}$ ; concentration de Cd: 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Il ne faut donc pas sous-estimer cette capacité de récupération dans l'établissement de modèles prédictifs de l'impact des substances toxiques sur les communautés phytoplanctoniques. Malgré que notre approche n'ait pas encore été testée avec d'autres substances toxiques et

avec d'autres espèces, les processus mis en évidence au moment de la récupération de la croissance font appel à des aspects fondamentaux de la physiologie cellulaire et conséquemment cette approche offre des possibilités intéressantes pour la définition d'outils fiables pour prédire les dangers associés aux déversements de substances toxiques dans le milieu aquatique. Ceci nous apparaît particulièrement vrai si on y associe les connaissances disponibles (ex.: transformations, partition dans les divers compartiments, dispersion, etc.) sur la concentration biodisponible de la substance testée dans le cours d'eau que l'on souhaite protéger.

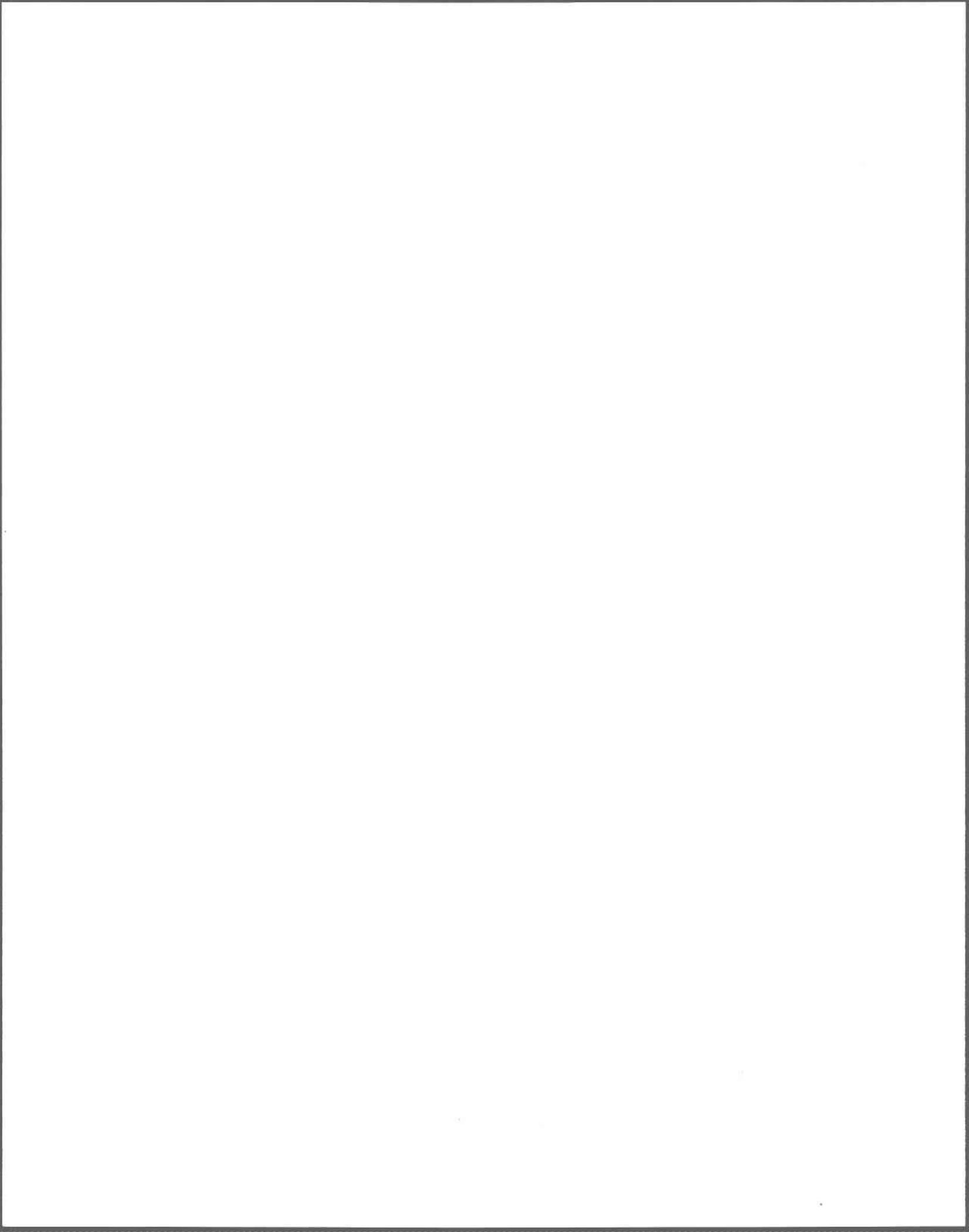
## 8.2 Recherches futures

Nos travaux avec l'algue verte S. capricornutum ont mis en évidence que la récupération à une agression ponctuelle par le Cd nécessitait une séquence bien définie d'activités métaboliques. On ne connaît cependant pas les effets d'une série d'expositions à une substance toxique sur les processus de récupération de la croissance. En conséquence, le développement de modèles adéquats pour la prédiction de l'impact des substances toxiques sur les communautés phytoplanctoniques nécessitera de meilleures connaissances du métabolisme et des structures des communautés exposées à des apports intermittents d'effluents toxiques.

Nos travaux et ceux de Li (1979) suggèrent qu'une exposition au Cd modifie la composition biochimique des algues. Ces modifications pourraient avoir des conséquences sur le zooplancton en changeant la qualité nutritive des cellules algales consommées par ces brouteurs. À notre connaissance un tel impact écotoxicologique d'expositions chroniques à des contaminants de l'environnement aquatique n'a jamais été investigué.

**Chapitre 9**

**Bibliographie**



- Ahlers, J. et E. Rösick. 1986. Cadmium-uptake and influence on plasma membrane functions of yeast. *Toxicol. Environ. Chem.* 11: 291-300.
- Aitchison, P.A. et O.S. Butt. 1973. The relation between the synthesis of inorganic polyphosphate and phosphate uptake by Chlorella vulgaris. *J. Exp. Bot.* 24: 495-510.
- APHA, AWWA et WPCF. 1980. Standard methods for the examination of water and wastewater. 15th ed. American Public Health Association, Washington. 1134 p.
- Azeez, P.A. et D.K. Banerjee. 1986. Effect of copper and cadmium on carbon assimilation and uptake of metals by algae. *Toxicol. Environ. Chem.* 12: 77-86.
- Bagnara, A.S. et L.R. Finch. 1973. Relationships between intracellular contents of nucleotides and 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate in Escherichia coli. *Eur. J. Biochem.* 36: 422-427.
- Bariaud, A., M. Bury et J.C. Mestre. 1985. Mechanism of Cd<sup>2+</sup> resistance in Euglena gracilis. *Physiol. Plant.* 63: 382-386.
- Bastien, C. et R. Côté. 1989. Variations temporelles de l'ultrastructure de Scenedesmus quadricauda exposée au cuivre lors d'une expérience à long terme. *Int. Revue Ges. Hydrobiol.* 74: 207-219.
- Baszynski, T., L. Wajda, M. Krol, D. Wolinska, Z. Krupa et A. Tukendorf. 1980. Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. *Physiol. Plant.* 48: 365-370.
- Bates, S.S., A. Tessier, P.G.C. Campbell et M. Létourneau. 1985. Zinc-phosphorus interactions and variation in zinc accumulation during growth of Chlamydomonas variabilis (Chlorophyceae) in batch culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 86-94.

- Bazzaz, M.B. et H. Govindjee. 1974. Effects of cadmium nitrate on spectral characteristics and light reactions of chloroplasts. *Environ. Lett.* 6: 1-12.
- Beardall, J. et I. Morris. 1976. The concept of light intensity adaptation in marine phytoplankton: some experiments with Phaeodactylum tricornutum. *Mar. Biol.* 37: 377-387.
- Berland, B.R., D.J. Bonin, O.J. Gurin-Ancey, V.I. Kapkov et D.P. Arlhac. 1977. Action de métaux lourds à des doses sublétales sur les caractéristiques de la croissance chez la diatomée Skeletonema costatum. *Mar. Biol.* 42: 17-30.
- Bernhard, M. et S.G. George. 1986. Importance of chemical species in uptake, loss, and toxicity of elements for marine organisms. *In*: Bernhard, M., F.E. Brinckman et P.J. Sadler (Eds.). The importance of chemical "speciation" in environmental processes. Springer-Verlag, Berlin. pp. 385-422.
- Borgmann, U., E.S. Millard et C.C. Charlton. 1989. Effect of cadmium on a stable, large volume, laboratory ecosystem containing Daphnia and phytoplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 399-405.
- Burnison, G., P.T.S. Wong, Y.K. Chau et B.A. Silverberg. 1975. Toxicity of cadmium to freshwater algae. *Proc. Can. Fed. Biol. Soc. Winnipeg*, 18: 182.
- Burris, J.E. 1980. Respiration and photorespiration in marine algae. *Brookhaven Symp. Biol.* 31: 411-432.
- Byczkowski, J.Z. et J.R.J. Sorenson. 1984. Effects of metal compounds on mitochondrial function: a review. *Sci. Total Environ.* 37: 133-162.
- Cembella, A.D., N.J. Antia et P.J. Harrison. 1984. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: A multidisciplinary perspective: Part 2. *CRC Critical Rev. Microbiol.* 11: 13-81.

- Chapman, G.A. 1985. Acclimation as a factor influencing metal criteria. In: Bahner, R.C. et D.J. Hansen (Eds.). Aquatic toxicology and hazard assessment: Eight Symposium, ASTM STP 891. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. pp. 119-136.
- Chiaudani, G. et M. Vighi. 1978. The use of Selenastrum capricornutum batch cultures in toxicity studies. Mitt. Internat. Verein. Limnol. 21: 316-329.
- Collyer, D.M. et G.E. Fogg. 1955. Studies on fat accumulation by algae. I. Expt. Bot. 6: 256-275.
- Conover, S.A.M. 1975. Partitioning of nitrogen and carbon in cultures of the marine diatom Thalassiosira fluviatilis supplied with nitrate, ammonia and urea. Mar. Biol. 32: 321-346.
- Conway, H.L. 1978. Sorption of arsenic and cadmium and their effects on growth, micronutrient utilization and photosynthetic pigment composition of Asterionella formosa. J. Fish. Res. Board Can. 35: 286-294.
- Conway, H.L. et S.C. Williams. 1979. Sorption of cadmium and its effects on growth and the utilization of inorganic carbon and phosphorus of two freshwater diatoms. J. Fish. Res. Board Can. 36: 579-586.
- Cook, J.R. 1963. Adaptation in growth and division in Euglena effected by energy supply. J. Protozool. 10: 436-444.
- Cook, J.R. 1966. Photosynthetic activity during the division cycle in synchronized Euglena gracilis. Plant Physiol. 41: 821-825.
- Cooksey, K.E., J.B. Guckert, S.A. Williams et P.R. Callis. 1987. Fluorometric determinations of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. J. Microbiol. Meth. 6: 333-345.
- Cossa, D. 1976. Sorption du cadmium par une population de la diatomée Phaeodactylum tricornutum en culture. Mar. Biol. 34: 163-167.

- Couture, P., J.C. Auclair, P.A. Thompson et C. Thellen. 1986. Approche écotoxicologique pour caractériser les répercussions d'effluents au niveau population et communauté microbienne aquatique. INRS-Eau, rapport scientifique No 181. 231 p.
- Couture, P., C. Thellen et P.A. Thompson. 1989. Phytoplankton recovery responses at the population and community levels in a hazard and risk assessment study. *Hydrobiologia* 188/189: 269-276.
- Couture, P., C. Thellen, P.-A. Thompson et J.C. Auclair. 1987. Structure and function of phytoplanktonic and microbial communities in relation to industrial wastewater discharge: an ecotoxicological approach in a lotic system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 167-175.
- Davey, E.W., J.J. Morgan et S.J. Erickson. 1973. A biological measurement of the copper complexation capacity of seawater. *Limnol. Oceanogr.* 18: 993-997.
- Davies, A.G. 1976. An assessment of the basis of mercury tolerance in Dunaliella tertiolecta. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 56: 39-57.
- De Filippis, L.F., R. Hampp et H. Ziegler. 1981a. The effects of sub-lethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on Euglena. II. Respiration, photosynthesis and photochemical activities. *Arch. Microbiol.* 128: 407-411.
- De Filippis, L.F., R. Hampp et H. Ziegler. 1981b. The effect of sub-lethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on Euglena. Adenylates and energy charge. *Z. Pflanzenphysiol. Bd* 103: 1-7.
- De Filippis, L.F. et C.K. Pallaghy. 1976. The effect of sub-lethal concentrations of mercury and zinc on Chlorella. III. Development and possible mechanisms of resistance to metals. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 79: 323-335.

- Di Tullio, G.R. et E.A. Laws. 1983. Estimates of phytoplankton N uptake based on  $^{14}\text{CO}_2$  incorporation into protein. *Limnol. Oceanogr.* 28: 179-185.
- Doming, P.J. et W.P. Williams. 1987. The role of respiratory electron flow in the control of excitation energy distribution in blue-green algae. *Biochim. Biophys. Acta* 892: 264-274.
- Dugdale, R.C. 1967. Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification and significance. *Limnol. Oceanogr.* 12: 685-695.
- Eppley, R.W. 1981. Relations between nutrient assimilation and growth in phytoplankton with a brief review of estimates of growth rate in the ocean. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 210: 251-263.
- Falkowski, P.G., Z. Dubinsky et G. Santostefano. 1985. Light-enhanced dark respiration in phytoplankton. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 22: 2830-2833.
- Fisher, N.S., E.J. Carpenter, C.C. Remsen et C.R. Wurster. 1974. Effects of PCB on interspecific competition in natural and gnotobiotic phytoplankton communities in continuous and batch cultures. *Microb. Ecol.* 1: 39-50.
- Fisher, N.S. et R.P. Schwarzenbach. 1978. Fatty acid dynamics in Thalassiosira pseudonana (Bacillariophyceae): Implications for physiological ecology. *J. Phycol.* 14: 143-150.
- Florence, T.M. 1977. Trace metal species in fresh waters. *Water Res.* 11: 681-687.
- Florence, T.M. et J.L. Stauber. 1986. Toxicity of copper complexes to the marine diatom Nitzschia closterium. *Aquat. Toxicol.* 8: 11-26.
- Fogg, G.E. 1956. Photosynthesis and formation of fats in a diatom. *Ann. Biol. London N.S.* 20: 265-285.
- Foster, P.L. 1977. Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green alga. *Nature* 269: 322-323.

- Foster, P.L. 1981. Species associations and metal contents of algae from rivers polluted with heavy metals. *Freshw. Biol.* 12: 17-39.
- Foster, P.L. 1982. Metal resistances of Chlorophyta from rivers polluted by heavy metals. *Freshw. Biol.* 12: 41-61.
- Foster, P.L. et F.M.M. Morel. 1982. Reversal of cadmium toxicity in the diatom: An interaction between cadmium activity and iron. *Limnol. Oceanogr.* 27: 745-752.
- Foy, R.H. et R.V. Smith. 1980. The role of carbohydrate accumulation in the growth of planktonic Oscillatoria species. *Br. Phycol. J.* 15: 139-150.
- Fraser, R.S.S. et P. Nurse. 1978. Novel cell cycle control of RNA synthesis in yeast. *Nature* 271: 726-730.
- Furnas, M.J. 1983. Community structure, biomass and productivity of size-fractionated summer phytoplankton populations in lower Narragansett Bay, Rhode Island. *J. Plankton Res.* 5: 637-655.
- Gächter, R. et A. Mares. 1979. MELIMEX, an experimental heavy metal pollution study: effects of increased heavy metal loads on phytoplankton communities. *Schweiz. Z. Hydrol.* 41: 228-246.
- Geisweid, H.J. et W. Urbach. 1983. Sorption of cadmium by the green microalgae Chlorella vulgaris, Ankistrodesmus braunii and Eremosphaera viridis. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 109.S: 127-141.
- Gekeler, W., E. Grill, E.-L. Winnaker et M.H. Zenk. 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* 150: 197-202.
- Gipps, J.F. et B.A.W. Collier. 1980. Effect of physical and culture conditions on uptake of cadmium by Chlorella pyrenoidosa. *Austr. J. Mar. Freshwater Res.* 31: 747-755.

- Goudey, J.S. 1987. Modeling the inhibitory effects of metals on phytoplankton growth. *Aquat. Toxicol.* 10: 265-278.
- Graham, R.W. et M.A. Turner. 1987. Photoinhibition of respiration in epilithic periphyton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44 (Suppl. 1): 150-153.
- Grill, E., E.-L. Winnaker et M.H. Zenk. 1985. Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230: 674-676.
- Grill, E., E.-L. Winnaker et M.H. Zenk. 1987. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 439-443.
- Grobbelaar, J.U. et C.J. Soeder. 1985. Respiratory losses in planktonic green algae cultivated in raceway ponds. *J. Plankton Res.* 7: 497-506.
- Guckert, J.B. et K.E. Cooksey. 1990. Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in Chlorella (Chlorophyta) during high pH-induced cell cycle inhibition. *J. Phycol.* 26: 72-79.
- Hall, J., F.P. Healy et G.G.C. Robinson. 1989. The interaction of chronic copper toxicity with nutrient limitation in two chlorophytes in batch culture. *Aquat. Toxicol.* 14: 1-14.
- Hama, T., N. Handa, M. Takahashi, F. Whitney et C.S. Wong. 1988. Change in distribution patterns of photosynthetically incorporated C during phytoplankton bloom in controlled experimental ecosystem. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 120: 39-56.
- Handa, N. 1969. Carbohydrate metabolism in the marine diatom Skeletonema costatum. *Mar. Biol.* 4: 208-214.
- Harding, L.W. Jr., B.W. Meeson et T.R. Fisher Jr. 1985. Patterns of photosynthetic carbon metabolism in light-limited phytoplankton. *Mar. Biol.* 89: 121-133.

- Harris, G.P. 1978. Photosynthesis, productivity and growth: The physiological ecology of phytoplankton. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 10: 1-171.
- Harris, G.P. 1984. Phytoplankton productivity and growth measurements: past, present and future. J. Plankton Res. 6: 219-237.
- Harrison, G.I. et F.M.M. Morel. 1983. Antagonism between cadmium and iron in the marine diatom Thalassiosira weissflogii. J. Phycol. 19: 495-507.
- Harrison, W.G., R.W. Eppley et E.H. Renger. 1977. Phytoplankton nitrogen metabolism, nitrogen budgets, and observations on copper toxicity: controlled ecosystem pollution experiment. Bull. Mar. Sci. 27: 44-57.
- Hart, B.A. et P.E. Bertram. 1980. A cadmium-binding protein in a cadmium tolerant strain of Chlorella pyrenoidosa. Environ. Exp. Bot. 20: 175-180.
- Hart, B.A., P.E. Bertram et B.D. Scaife. 1979. Cadmium transport by Chlorella pyrenoidosa. Environ. Res. 18: 327-335.
- Hart, B.A. et B.D. Scaife. 1977. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in Chlorella pyrenoidosa. Environ. Res. 14: 401-413.
- Healey, F.P. et L.L. Hendzel. 1980. Physiological indicators of nutrient deficiency in lake phytoplankton. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37: 442-453.
- Healey, F.P. et J. Myers. 1971. The kok effect in Chlamydomonas reinhardtii. Plant Physiol. 47: 373-379.
- Heuillet, E., F. Guerbette, C. Guenou et J.C. Kader. 1988. Induction of a cadmium-binding protein in a unicellular alga. Int. J. Biochem. 20: 203-210.
- Hitchcock, G.L. 1978. Labelling patterns of carbon-14 in net plankton during a winter-spring bloom. J. exp. mar. Biol. Ecol. 31: 141-153.
- Hitchcock, G.L. 1980. Diel variation in chlorophyll a, carbohydrate and protein content of the marine diatom Skeletonema costatum. Mar. Biol. 57: 272-278.

- Hobson, L.A. et K.P. Guest. 1983. Values of net compensation irradiation and their dependence on photosynthetic efficiency and respiration in marine unicellular algae. *Mar. Biol.* 74: 1-7.
- Howell, S.H. et D.M. Baumgartel. 1978. Regulation of protein synthesis during the cell cycle in Chlamydomonas reinhardi. In: Jeter, J.R., I.L. Cameron, G.M. Padilla et A.M. Zimmerman (Eds.). Cell cycle regulation. Academic Press Inc., New York. pp. 167-184.
- Hunter, B.L. et E.A. Laws. 1981. ATP and chlorophyll a as estimators of phytoplankton carbon biomass. *Limnol. Oceanogr.* 26: 944-956.
- Jacobczak, E. et H. Leclerc. 1980. Mesure de l'ATP bactérien par bioluminescence: étude critique des méthodes d'extraction. *Ann. Biol. Clin.* 38: 297-304.
- Jasper, S. et M.L. Bothwell. 1986. Photosynthetic characteristics of lotic periphyton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 1960-1969.
- Jensen, T.E., M. Baxter, J.W. Rachlin et V. Jani. 1982. Uptake of heavy metals by Plectonema boryanum (Cyanophyceae) into cellular components, especially polyphosphate bodies: an X-ray energy dispersive study. *Environ. Pollut. Ser. A Ecol. Biol.* 27: 119-127.
- Jones, G.J., P.D. Nichols, R.B. Johns et J.D. Smith. 1987. The effect of mercury and cadmium on the fatty acid and sterol composition of the marine diatom Asterionella glacialis. *Phytochemistry*, 26: 1343-1348.
- Karez, C.S., S. Bonotto et S. Puiseux-Dao. 1989. Response of the unicellular giant alga Acetabularia acetabulum to cadmium toxicity and accumulation. *Toxicol. Environ. Chem.* 19: 223-232.
- Karl, D.M. 1980. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.* 44: 739-796.

- Karl, D.M. et O. Holm-Hansen. 1978. Methodology and measurement of adenylate energy charge ratios in environmental samples. *Mar. Biol.* 48: 185-197.
- Klass, E., D.W. Rowe et E.J. Massaro. 1974. The effect of cadmium on population growth of the green alga Scenedesmus quadricauda. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 12: 442-445.
- Kosower, N.S. et E.M. Kosower. 1978. The glutathione status of cells. In: Bourne, G.H. et J.F. Danielli (Eds.). *International Review of Cytology*, 54: 109-160.
- Kremer, B.P. 1981. Dark reactions of photosynthesis. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 210: 44-54.
- Kremer, B.P. et J.W. Markham. 1982. Primary metabolic effects of cadmium in the brown alga, Laminaria saccharina. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 108 S.: 125-130.
- Kunikane, S., M. Kaneko et R. Maehara. 1986. Variation of ATP content in Scenedesmus dimorphus cells grown in a chemostat culture and its comparison with chlorophyll-a content. *Water Res.* 20: 1569-1574.
- Lancelot, C. 1984. Metabolic changes in Phaeocystis poucheti (Hariot) Lagerheim during the spring bloom in Belgian coastal waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 18: 593-600.
- Lancelot, C. et S. Mathot. 1985. Biochemical fractionation of primary production by phytoplankton in Belgian coastal waters during short- and long-term incubations with <sup>14</sup>C-bicarbonate. I. Mixed diatom population. *Mar. Biol.* 86: 219-226.
- Laube, V.M., C.N. McKenzie et D.J. Kushner. 1980. Strategies of response to copper, cadmium, and lead by a blue-green and a green alga. *Can. J. Microbiol.* 26: 1300-1311.

- Laws, E.A. et J. Caperon. 1976. Carbon and nitrogen metabolism by Monochrysis lutheri: measurement of growth-rate-dependent respiration rates. Mar. Biol. 36: 85-98.
- Laws, E.A., D.M. Karl, D.G. Redalje, R.S. Jurick et C.D. Winn. 1983. Variability in ratios of phytoplankton carbon and RNA to ATP and chlorophyll a in batch and continuous cultures. J. Phycol. 19: 439-445.
- Lazinsky, D. et L. Sicko-Goad. 1983. Ultrastructural modification of the blue-green algae following heavy metal exposure. Micron Microsc. Acta 14: 257-258.
- Lee, K.C., B.A. Cunningham, G.M. Paulsen, G.H. Liang et R.B. Moore. 1976. Effects of cadmium on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings. Physiol. Plant. 36: 4-6.
- Lehninger, A.L. 1977. Biochimie. Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. 2e ed. Flammarion médecine. Sciences. Paris, 1088 p.
- Les, A. et R.W. Walker. 1984. Toxicity and binding of copper, zinc, and cadmium by the blue-green alga, Chroococcus paris. Water, Air, Soil Pollut. 23: 129-139.
- Li, E.H. et C.D. Miles. 1975. Effects of cadmium on photoreaction II of chloroplasts. Plant. Sci. Lett. 5: 33-40.
- Li, W.K.W. 1978. Kinetic analysis of interactive effects of cadmium and nitrate on growth of Thalassiosira fluviatilis (Bacillariophyceae). J. Phycol. 14: 545-560.
- Li, W.K.W. 1979. Cellular composition and physiological characteristics of the diatom Thalassiosira weissflogii adapted to cadmium stress. Mar. Biol. 55: 171-180.

- Li, W.K.W. 1980. Cellular accumulation and distribution of cadmium in Isochrysis galbana during growth inhibition and recovery. J. Plankt. Res. 2: 283-294.
- Li, W.K.W. 1984. A modified logistic growth equation: effects of cadmium chloride on the diatom, Thalassiosira weissflogii and the dinoflagellate, Amphidinium carteri in unialgal and bialgal batch cultures. Aquat. Toxicol. 5: 307-313.
- Li, W.K.W., H.E. Glover et I. Morris. 1980. Physiology of carbon photo-assimilation by Oscillatoria thiebautii in the Caribbean sea. Limnol. Oceanogr. 25: 447-456.
- Li, W.K.W. et J.C. Goldman. 1981. Problems in estimating growth rates of marine phytoplankton from short-term <sup>14</sup>C assays. Microb. Ecol. 7: 113-121.
- Li, W.K.W. et W.G. Harrison. 1982. Carbon flow into the end-products of photosynthesis in short and long incubations of a natural phytoplankton population. Mar. Biol. 72: 175-182.
- Li, W.K.W. et T. Platt. 1982. Distribution of carbon among photosynthetic end-products in phytoplankton of the eastern Canadian Arctic. J. Phycol. 18: 466-471.
- Lue-Kim, H., P.C. Wozniak et R.A. Fletcher. 1980. Cadmium toxicity on synchronous populations of Chlorella ellipsoidea. Can. J. Bot. 58: 1780-1788.
- Madariaga, C. 1986. Comparaison de la sensibilité de diverses sondes physiologiques en toxicologie aquatique: toxicité du Cd sur l'algue Selenastrum capricornutum. Mémoire de maîtrise. Université du Québec, INRS-Eau. 125 p.

- Malone, T.C. 1982. Phytoplankton photosynthesis and carbon-specific growth: light-saturated rates in a nutrient-rich environment. *Limnol. Oceanogr.* 27: 226-235.
- Mangat, B.S., W.B. Levin et R.G.S. Bidwell. 1974. The extent of dark respiration in illuminated leaves and its control by ATP levels. *Can. J. Bot.* 52: 673-681.
- Mantoura, R.F.C., A. Dickson et J.P. Riley. 1978. The complexation of metals with humic materials in natural waters. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 6: 387-408.
- Markager, S. et K. Sand-Jensen. 1989. Patterns of night-time respiration in a dense phytoplankton community under a natural light regime. *J. Ecology* 77: 49-61.
- Marquis, H. 1989. Mise en évidence d'un mécanisme de résistance suite à une intoxication au cadmium chez Selenastrum capricornutum. Mémoire de maîtrise. Université du Québec, INRS-Eau. 85 p.
- Marshall, J.S., J.I. Parker, D.L. Mellinger et C. Lei. 1983. Bioaccumulation and effects of cadmium and zinc in a Lake Michigan plankton community. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40: 1469-1479.
- McBrien, D.C.H. et K.A. Hassall. 1967. The effect of toxic doses of copper upon respiration, photosynthesis and growth of Chlorella vulgaris. *Physiol. Plant.* 20: 113-117.
- McNaught, D.C., D. Griesmer, M. Buzzard et M. Kennedy. 1984. PCBs in Saginaw Bay: Development of functional indices to estimate inhibition of ecosystem fluxes. EPA-600/3-84-008. Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency. Duluth, Minnesota. 95 p.

- Miller, W.E., J.C. Greene et T. Shiroyama. 1978. The Selenastrum capricornutum (Printz) algal assay bottle test: Experimental design, application, and data interpretation protocol. EPA-600/9-78-018. U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, Or. 126 p.
- Mitchison, J.M. 1971. The biology of the cell cycle. London, Cambridge University Press. 313 p.
- Moore, J.W. et S. Ramamoorthy. 1984. Heavy metals in natural waters. Applied monitoring and impact assessment. Springer-Verlag, New York. pp. 28-57.
- Morris, I. 1980. Paths of carbon assimilation in marine phytoplankton. In: Falkowski, P.G. (Ed.). Primary productivity in the sea. Plenum Press, New York. pp. 139-159.
- Morris, I. 1981. Photosynthetic products, physiological state, and phytoplankton growth. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 210: 83-102.
- Morris, I., H.E. Glover et C.S. Yentsch. 1974. Products of photosynthesis by marine phytoplankton: the effects of environmental factors on the relative rates of protein synthesis. Mar. Biol. 27: 1-9.
- Morris, I. et W. Skea. 1978. Products of photosynthesis in natural populations of marine phytoplankton from the Gulf of Maine. Mar. Biol. 47: 303-312.
- Mosser, J.L., N.S. Fisher et C.F. Wurster. 1972. Polychlorinated biphenyls and DDT alter species composition in mixed cultures of algae. Science 176: 533-535.
- Myers, J. J.R. Graham et R.T. Wang. 1983. On the O<sub>2</sub> flash yields of two cyanophytes. Biochim. Biophys. Acta 722: 281-290.
- Myklestad, S. 1974. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 15: 261-274.

- Nagano, T., M. Niwa, Y. Suketa et S. Akada. 1984. Isolation, physicochemical properties and amino acid composition of a cadmium-binding protein from cadmium treated Chlorella ellipsoidea. J. Inorg. Biochem. 21: 61-71.
- Nakajima, A., T. Horikoshi et T. Sakaguchi. 1981. Distribution and chemical state of heavy metal ions absorbed by Chlorella cells. Agric. Biol. Chem. 45: 903-908.
- Neidhardt, F.C. et D.G. Fraenkel. 1961. Metabolic regulation of RNA synthesis in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26: 64-74.
- Nicholas, W.D. et A.R. Abernathy. 1987. Inhibition of metabolic hydrogen ion flux resulting from cadmium stress in aquatic microecosystems. Wat. Sci. Tech. 19: 85-94.
- Nriagu, J.O. 1980. Production, uses, and properties of cadmium. In: J.O. Nriagi (Ed.). Cadmium in the environment, part 1: Ecological cycling. John Wiley & Sons Inc. New York, pp. 36-70.
- Overnell, J. 1975. The effect of some heavy metal ions on photosynthesis in a freshwater alga. Pestic. Biochem. Physiol. 5: 19-26.
- Parnas, H. et D. Cohen. 1976. An optimal policy for the metabolism of storage materials in unicellular algae. J. Theor. Biol. 56: 1-18.
- Parsons, T.R., K. Stephens et J.D.M. Stickland. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankton. J. Fish. Res. Board Can. 18: 1001-1016.
- Patterson, J. et T.R. Parsons. 1963. Distribution of chlorophyll a and degradation products in various marine materials. Limnol. Oceanogr. 8: 355-356.
- Penning de Vries, F.W.T. 1975. The cost of maintenance processes in plant cells. Ann Bot. 39: 77-92.

- Peterson, H.G. et F.P. Healey. 1985. Comparative pH dependent metal inhibition of nutrient uptake by Scenedesmus quadricauda (Chlorophyceae). J. Phycol. 21: 217-222.
- Peterson, H.G., F.P. Healey et R. Wagemann. 1984. Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 41: 974-979.
- Pietilainen, K. 1975. Synergistic and antagonistic effects of lead and cadmium on aquatic primary production. Intern. Conf. on Heavy Metals in the Environment. Symposium Proc., 2(pt.2): 861-873.
- Plumb, R.H. et G.F. Lee. 1979. A comparison of carbon-14 incubation techniques. Water, Air, Soil Pollut. 11: 289-299.
- Prévoit, P. et M.O. Soyer-Gobillard. 1986. Combined action of cadmium and selenium on two marine dinoflagellates in culture, Prorocentrum micans Ehrbg. and Cryptocodinium cohnii Biecheler. J. Protozool. 33: 42-47.
- Prézelin, B.B. 1981. Light reactions in photosynthesis. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 210: 1-43.
- Priscu, J.C. et L.R. Priscu. 1984. Photosynthate partitioning by phytoplankton in a New Zealand coastal upwelling system. Mar. Biol. 81: 31-40.
- Rachlin, J.W., T.E. Jensen et B. Warkentine. 1984. The toxicological response of the alga Anabaena flos-aquae (Cyanophyceae) to cadmium. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 13: 143-151.
- Rachlin, J.W., B. Warkentine et T.E. Jensen. 1982. The growth responses of Chlorella saccharophila, Navicula incerta and Nitzschia closterium to selected concentrations of cadmium. Bull. Torrey Bot. Club. 109: 129-135.
- Rand, G.M. et S.R. Petrocelli. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology. Methods and applications. Hemisphere Publishing Corp., New York. 666 p.

- Raspor, B. 1980. Distribution and speciation of cadmium in natural waters. In: Nriagu J.O. (Ed.). Cadmium in the environment. Part I: Ecological cycling. John Wiley & Sons, New York. pp. 148-236.
- Raven, J.A. 1976. Division of labour between chloroplasts and cytoplasm. In: Barber, J. (Ed.). The intact chloroplast. Elsevier, Amsterdam. pp. 403-443.
- Raven, J.A. 1984. Energetics and transport in aquatic plants. New York. Alan R. Liss Inc. 587 p.
- Raven, J.A. et J. Beardall. 1981. Respiration and photorespiration. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 210: 55-82.
- Rebhun, S. et A. Ben-Amotz. 1984. The distribution of cadmium between the marine alga Chlorella stigmatophora and sea water medium. Water Res. 18: 173-178.
- Relexans, J.C., L. Lerat et H. Etcheber. 1988. Une stratégie d'étude des effets de quelques polluants (Cd, Zn, BaP) sur la respiration de communautés benthiques maintenues in vitro. Océanis 14: 411-421.
- Rhee, G.-Y. 1972. Competition between an alga and an aquatic bacterium for phosphate. Limnol. Oceanogr. 17: 505-512.
- Rhee, G.-Y. 1973. A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in Scenedesmus sp. J. Phycol. 9: 495-506.
- Rhee, G.-Y. 1978. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. Limnol. Oceanogr. 23: 10-25.
- Richardson, K., G. Samuelsson et J.-E. Hällgren. 1984. The relationship between photosynthesis measured by <sup>14</sup>C incorporation and by uptake of inorganic carbon in unicellular algae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 81: 241-250.
- Ricketts, T.R. 1966. On the chemical composition of some unicellular algae. Phytochemistry, 5: 67-76.

- Ried, A., I. Setlik, U. Bossert et E. Berkova. 1973. The effect of low irradiance on oxygen exchange in green and blue-green algae. I. Analysis based on transients and adenylate equilibria. *Photosynthetica* 7: 161-176.
- Rivkin, R.B. 1979. Effects of lead on growth of the marine diatom Skeletonema costatum. *Mar. Biol.* 50: 239-247.
- Romano, J.-C. et R. Daumas. 1981. Adenosine nucleotide "energy charge" ratios as an ecophysiological index for microplankton communities. *Mar. Biol.* 62: 281-296.
- Ryther, J.H. 1954. The ratio of photosynthesis to respiration in marine plankton algae and its effect on the measurement of productivity. *Deep-Sea Res.* 2: 134-139.
- Sakaguchi, T., T. Tsuji, A. Nakajima et T. Horikoshi. 1979. Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. XIV. Accumulation of cadmium by green microalgae. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8: 207-215.
- Sakshaug, E. 1977. Limiting nutrients and maximum growth rates for diatoms in Narragansett Bay. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 28: 109-123.
- Sandmann, G. et R. Malkin. 1983. NADH and NADPH as electron donors to respiratory and photosynthetic electron transport in the blue-green alga, Aphanocapsa. *Biochim. Biophys. Acta* 725: 221-224.
- Sargent, D.F. et C.P.S. Taylor. 1972. Light-induced inhibition of respiration in DCMU-poisoned Chlorella caused by photosystem I activity. *Can. J. Bot.* 50: 13-21.
- Sathya, K.S. et K.P. Balakrishnan. 1988. Physiology of phytoplankton in relation to metal concentration. Effect of cadmium on Scenedesmus bijugatus and Nitzschia palea. *Water, Air, Soil Pollut.* 38: 283-297.

- Say, P.J., B.M. Diaz et B.A. Whitton. 1977. Influence of zinc on lotic plants. I. Tolerance of Hormidium species to zinc. *Freshw. Biol.* 7: 357-376.
- Schenck, R.C., A. Tessier et P.G.C. Campbell. 1988. The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. *Limnol. Oceanogr.* 33: 538-550.
- Schindler, D.W. 1974. Eutrophication and recovery in experimental lakes: Implications for lake management. *Science* 184: 897-898.
- Shieh, Y.J. et J. Barber. 1973. Uptake of mercury by Chlorella and its effect on potassium regulation. *Planta* 109: 49-60.
- Shuter, B. 1979. A model of physiological adaptation in unicellular algae. *J. theor. Biol.* 78: 519-552.
- Sicko-Goad, L. 1986. Rejuvenation of Melosira granulata (Bacillariophyceae) from the anoxic sediments of Douglas Lake, Michigan. II. Electron microscopy. *J. Phycol.* 22: 28-35.
- Sicko-Goad, L. et D. Lazinsky. 1981. Accumulation and cellular effects of heavy metals in benthic and planktonic algae. *Micron* 22: 289-290.
- Sicko-Goad, L. et E.F. Stoermer. 1979. A morphometric study of lead and copper effects on Diatoma tenue var. elongatum (Bacillariophyta). *J. Phycol.* 15: 316-321.
- Sicko-Goad, L., E.F. Stoermer et G. Fahnenstiel. 1986. Rejuvenation of Melosira granulata (Bacillariophyceae) from the anoxic sediments of Douglas Lake, Michigan. I. Light microscopy and <sup>14</sup>C uptake. *J. Phycol.* 22: 22-28.
- Sigma Chemical Company. 1986. Bioluminescent adenosine 5'-triphosphate (ATP) assay kit. Technical Bulletin No. BAAB-1 (10-86). 4 p.
- Silverberg, B.A. 1976. Cadmium-induced ultrastructural changes in mitochondria of freshwater green algae. *Phycologia*, 15: 155-159.
- Silverberg, B.A., P.M. Stokes et L.B. Ferstenberg. 1976. Intra-nuclear complexes in a copper-tolerant green alga. *J. Cell Biol.* 69: 210-214.

- Simonis, W. et W. Urbach. 1973. Photophosphorylation in vivo. Ann. Rev. Plant. Physiol. 24: 89-114.
- Simpson, P.S. et J.W. Eaton. 1986. Comparative studies of the photosynthesis of the submerged macrophyte Elodea canadensis and the filamentous algae Cladophora glomerata and Spirogyra sp. Aquat. Bot. 24: 1-12.
- Singh, S.P. et V. Yadava. 1983. Cadmium induced inhibition of nitrate uptake in Anacystis nidulans: interaction with other divalent cations. J. Gen. Appl. Microbiol. 29: 297-304.
- Skowronski, T. 1986. Influence of some physico-chemical factors on cadmium uptake by the green alga Stichococcus bacillaris. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 423-425.
- Smith, A. et I. Morris. 1980. Pathways of carbon assimilation in phytoplankton from the Antarctic Ocean. Limnol. Oceanogr. 25: 865-872.
- Smith, R.E.H., P. Clement, G.F. Cota et W.K.W. Li. 1987. Intracellular photosynthate allocation and the control of Arctic marine ice algal production. J. Phycol. 23: 124-132.
- Smith, R.E.H. et R.J. Geider. 1985. Kinetics of intracellular carbon allocation in a marine diatom. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 93: 191-210.
- Smith, R.E.H. et J. Kalff. 1983. Competition for phosphorus among co-occurring freshwater phytoplankton. Limnol. Oceanogr. 28: 448-464.
- Soyer, M.-O. et P. Prévot. 1981. Ultrastructural damage by cadmium in a marine dinoflagellate, Prorocentrum micans. J. Protozool. 28: 308-313.
- Stainton, M.P., M.J. Capel et F.A.J. Armstrong. 1977. The chemical analysis of fresh water. 2nd Edition. Can. Fish. Mar. Serv. Misc. Spec. Publ. 25. 180 p.
- Stauber, J.L. et T.M. Florence. 1986. Reversibility of copper-thiol binding in Nitzschia closterium and Chlorella pyrenoidosa. Aquat. Toxicol. 8: 223-229.

- Steemann-Nielsen, E. 1952. The use of radioactive carbon ( $^{14}\text{C}$ ) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.* 18: 117-140.
- Steemann-Nielsen, E. et E.G. Jorgensen. 1968. The adaptation of plankton algae. III. With special consideration of the importance in nature. *Physiol. Plant.* 21: 647-654.
- Stockner, J.G. et N.J. Antia. 1976. Phytoplankton adaptation to environmental stresses from toxicants, nutrients, and pollutants - a warning. *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 2089-2096.
- Stokes, P.M. 1975. Adaptation of green algae to high levels of copper and nickel in aquatic environments. *Proc. of the Internat. Conf. on Heavy metals in the environment.* p. 137-154.
- Stokes, P.M. 1981. Multiple metal tolerance in copper tolerant green algae. *J. Plant Nutrit.* 3: 667-678.
- Stokes, P.M. 1983. Responses of freshwater algae to metals. *Prog. Phycol. Res.* 2: 87-112.
- Stokes, P.M., T.C. Hutchinson et K. Krauter. 1973. Heavy metal tolerance in algae isolated from polluted lakes near Sudbury, Ontario. *Water Pollut. Res. Can.* 8: 178-201.
- Stout, J. et S.S. Kilham. 1983. Effects of p-cresol on photosynthetic and respiration rates of a filamentous green alga (*Spirogyra*). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 30: 1-5.
- Strehler, B.L. et J.R. Totter. 1952. Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms. I. Substrate and enzyme determination. *Arch. Biochem. Biophys.* 40: 28-41.
- Strickland, J.D.H. et T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Fish. Res. Board Can. Bulletin No. 167.* 310 p.

- Sunda, W.G. et P.A. Gillespie. 1979. The response of a marine bacterium to cupric ion and its use to estimate cupric ion activity in seawater. *J. Mar. Res.* 37: 761-777.
- Sunda, W.G. et R.R. Guillard. 1976. Relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.* 34: 511-529.
- Sundberg, I. et M. Nilshammar-Holmvall. 1975. The diurnal variation in phosphate uptake and ATP level in relation to deposition of starch, lipid, and polyphosphate in synchronized cells of Scenedesmus. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 76: 270-279.
- Teichler-Zallen, D., G.E. Hoch et T.T. Bannister. 1972. Proc. 2nd Intern. Congr. Photosynth. Res. Vol. 1: 643.
- Thomas, W.H. 1964. An experimental evaluation of the  $^{14}\text{C}$  method for measuring phytoplankton production using cultures of Dunaliella primolecta Butcher. *Fish. Bull.* 63: 273-292.
- Thomas, W.H., O. Holm-Hansen, D.L.R. Seibert, F. Azam, R. Hodson et M. Takahashi. 1977. Effects of copper on phytoplankton standing crop and productivity: controlled ecosystem pollution experiment. *Bull. Mar. Sci.* 27: 34-43.
- Thomas, W.H. et D.L.R. Seibert. 1977. Effects of copper on the dominance and the diversity of algae: controlled ecosystem pollution experiment. *Bull. Mar. Sci.* 27: 23-33.
- Thompson, P.A. et R. Côté. 1985. Influence de la spéciation du cuivre sur les populations phytoplanctoniques naturelles de la rivière du Saguenay, Québec, Canada. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 70: 711-731.
- Thompson, P.A., P. Couture, C. Thellen et J.C. Auclair. 1987. Structure-function relationships for monitoring cellular stress and recovery responses with Selenastrum capricornutum. *Aquat. Toxicol.* 10: 291-305.

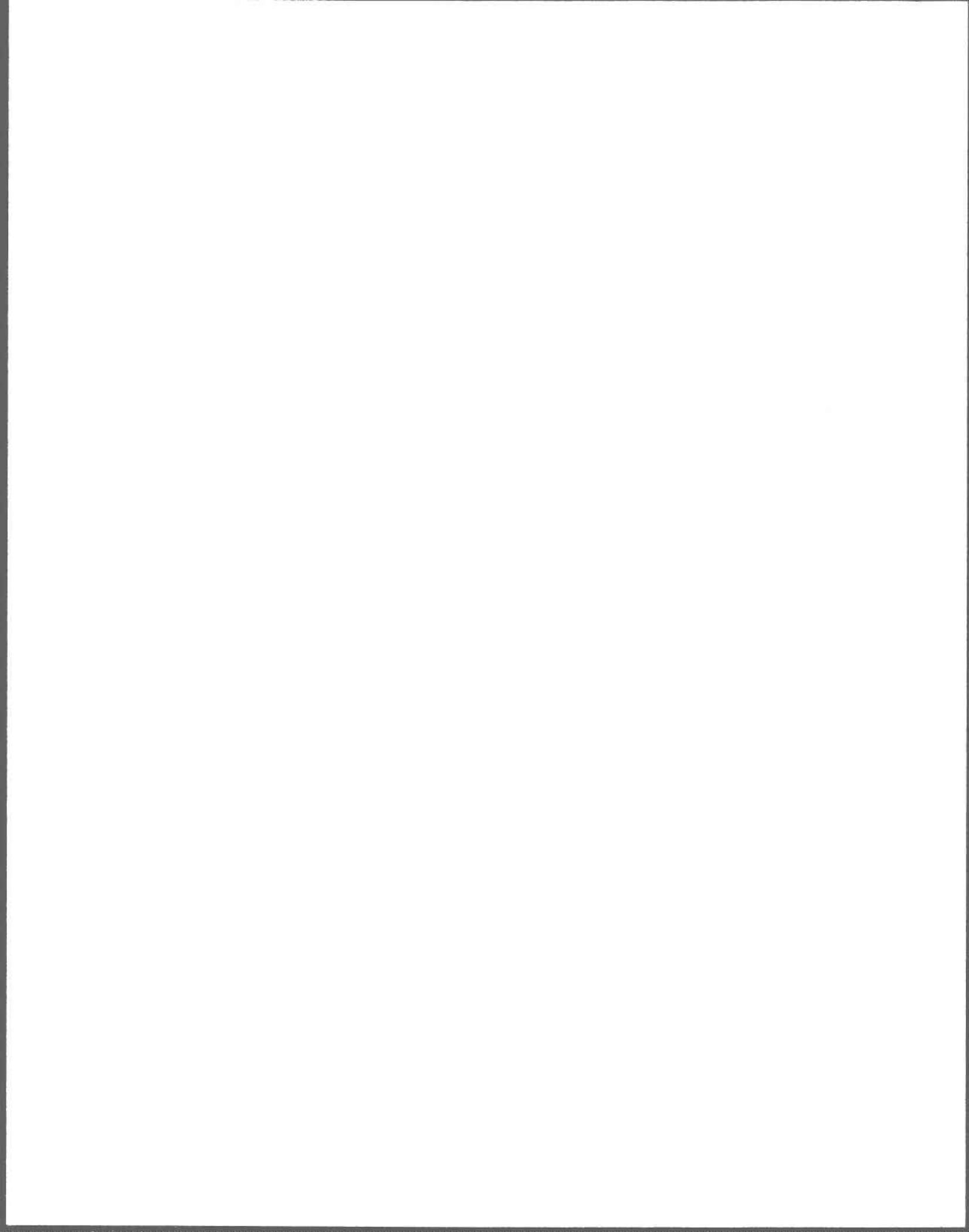
- Tillberg, J.E. et A. Kylin. 1972. Increased oxygen evolution and peaks of adenosine triphosphate in synchronized Scenedesmus caused by 3,4-dichlorophenyl-dimethylurea. In: Forti, G., M. Avron et A. Melandri (Eds.). Proceedings of the Second International Congress on Photosynthesis Research, vol. 2. W. Junk N.V. Publishers, The Hague. pp. 1393-1400.
- Tilman, D. 1977. Resource competition between planktonic algae: An experimental and theoretical study. Ecology 58: 338-348.
- Toerien, D.F., C.H. Huang, J. Radimsky, E.A. Pearson et J. Scherfig. 1971. Final report, Provisional algal assay procedures. SERL Report No. 71-6. Sanitary Engineering Research Laboratory College of Engineering and School of Public Health, University of California Berkeley. 211 p.
- Trainor, F.R. 1984. Indicator algal assays: laboratory and field approaches. In: Shubert, L.E. (Ed.). Algae as ecological indicators. Academic Press, New York, N.Y. pp. 3-47.
- Trevors, J.T., G.W. Stratton et G.M. Gadd. 1986. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. Can. J. Microbiol. 32: 447-464.
- Vallee, B.L. et D.D. Ulmer. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Ann. Rev. Biochem. 41: 92-128.
- Van Duijvendijk-Matteoli, M.A. et G.M. Desmet. 1975. On the inhibitory action of cadmium on the donor side of photosystem II in isolated chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 408: 164-169.
- Vernon, L.P. 1960. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. Anal. Chem. 32: 1144-1150.
- Vollenweider, R.A. 1974. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, IBP Handbook No. 12, London. 225 p.

- Westall, J.C., J.L. Zachary et F.M.M. Morel. 1976. MINEQL, a computer program for the calculation of the chemical equilibrium composition of aqueous systems. Massachusetts Institute of Technology, Department of Civil Engineering, Technical Report 18, Cambridge, MA. 91 p.
- Wong, P.T.S. 1987. Toxicity of cadmium to freshwater microorganisms, phytoplankton, and invertebrates. In: J.O. Nriagu and J.B. Sprague (Eds.). Cadmium in the Aquatic environment. John Wiley and Sons Inc. N.Y., pp. 117-138.
- Wong, P.T.S., G. Burnison et Y.K. Chau. 1979. Cadmium toxicity to freshwater algae. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 23: 487-490.
- Wong, P.T.S., C.I. Mayfield et Y.K. Chau. 1980. Cadmium toxicity to phytoplankton and microorganisms. In: J.O. Nriagu (Ed.). Cadmium in the environment, part 1: Ecological cycling. John Wiley & Sons Inc. New York, pp. 571-585.
- Wortman, A.T. et G.K. Bissonnette. 1988. Metabolic processes involved in repair of Escherichia coli cells damaged by exposure to acid mine water. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1901-1906.
- Yallop, M.L. 1982. Some effects of light on algal respiration and the validity of the light and dark bottle technique for measuring primary productivity. Freshwat. Biol. 12: 427-433.
- Yentsch, C.S. et D.W. Menzel. 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. Deep Sea Res. 10: 221-231.
- Young, G.R., J.A. Swader et S.W. Bingham. 1980. Kepone uptake by algae and effects on growth, photosynthesis and respiration. Virginia J. Sci. 31: 47-54.

Zevenboom, W. 1986. Ecophysiology of nutrient uptake, photosynthesis and growth. In: Platt, T. et W.K.W. Li (eds.). Photosynthetic Picoplankton. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 214: 391-422.



**ANNEXE I**



Reprinted from

Réimpression du

**Canadian  
Journal of  
Fisheries and  
Aquatic  
Sciences**

**Journal  
canadien des  
sciences  
halieutiques et  
aquatiques**

---

**Structure and function of phytoplanktonic and  
microbial communities in relation to industrial  
wastewater discharge: an ecotoxicological approach  
in a lotic system**

P. COUTURE, C. THELLEN, P. A. THOMPSON, AND  
J.-C. AUCLAIR

Volume 44 • Number 1 • 1987

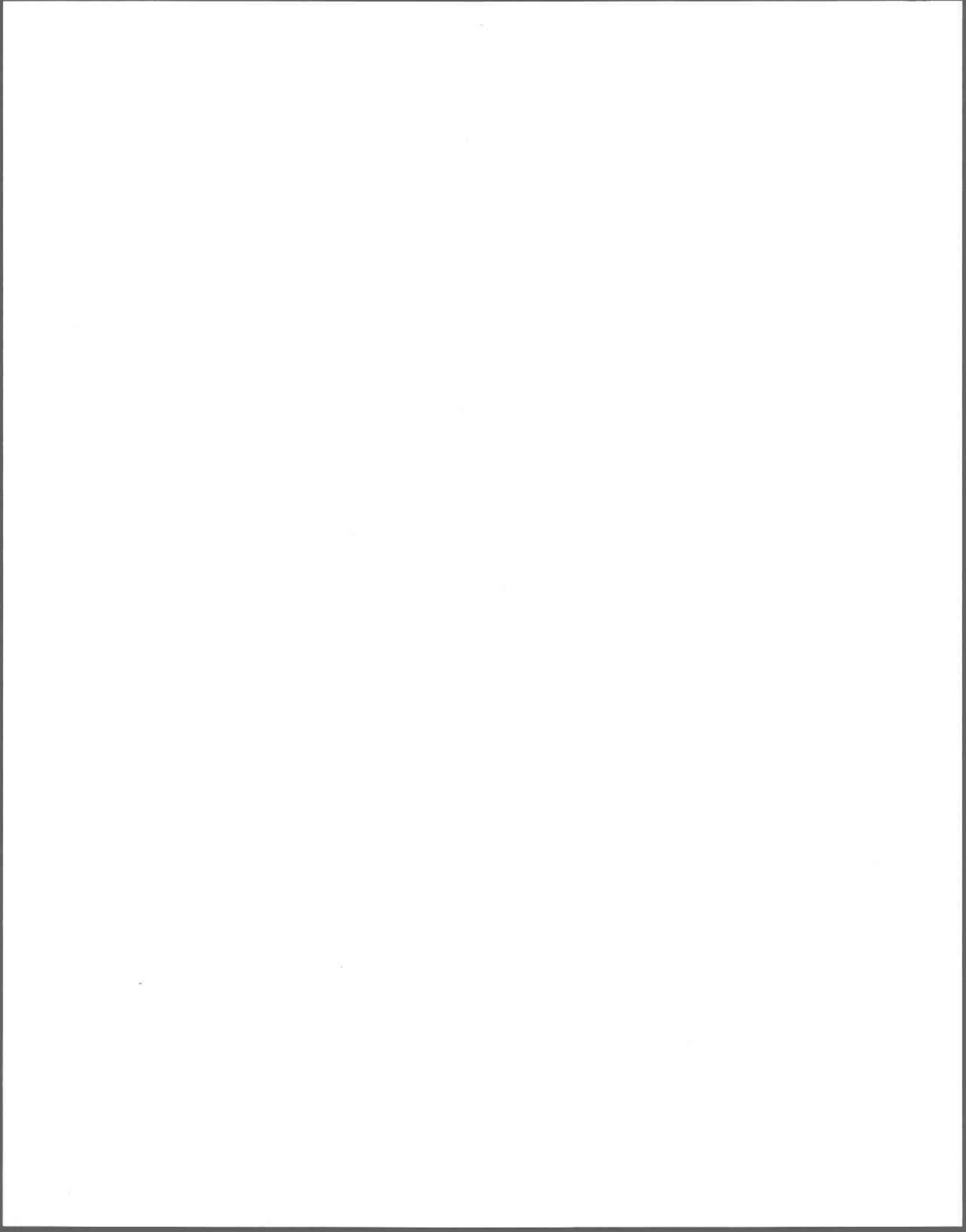
Pages 167–175

**Canada**



**Fisheries  
and Oceans**

**Pêches  
et Océans**



# Structure and Function of Phytoplanktonic and Microbial Communities in Relation to Industrial Wastewater Discharge: An Ecotoxicological Approach in a Lotic System

Pierre Couture, Claude Thellen, Patsy A. Thompson, and Jean-Christian Auclair

*Institut national de la recherche scientifique, INRS-EAU, C.P. 7500, Sainte-Foy, Qué G1V 4C7*

Couture, P., C. Thellen, P. A. Thompson, and J.-C. Auclair. 1987. Structure and function of phytoplanktonic and microbial communities in relation to industrial wastewater discharge: an ecotoxicological approach in a lotic system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 167-175.

Microbial and phytoplanktonic processes of a perturbed river system were evaluated as an ecotoxicological alternative to bioassays in hazard assessment of industrial wastewater discharge. Although phytoplankton species composition was invariable throughout the river gradient, both *P/B* and ATP/AMP ratios revealed that the community did not acclimate over the spatial scale studied. The adenylate energy charge ( $EC_A$ ) of the microbial community decreased at the station where the wastewater is discharged; however, no significant differences in  $EC_A$  values were observed downstream. Enclosure experiments allowed us to conclude that the microbial community was predominantly affected by the effluent rather than by the lotic physical gradient. In the river gradient,  $EC_A$  appears to be an insensitive metabolic indicator; however, small changes in  $EC_A$  are accompanied by much larger changes in the ATP/AMP ratios to which enzymatic activities are responding. The fact that some functional metabolic processes of the microbial community were affected while phytoplankton species composition was invariable suggests that *P/B* and ATP/AMP ratios would prove useful in the detection of insidious effects of industrial effluents at the microbial community level. This approach could also give more insight into the ecological significance of wastewater discharge for monitoring purposes.

Diverses caractéristiques structurelles et fonctionnelles des communautés phytoplanctoniques et microbiennes d'une rivière polluée sont évaluées et proposées comme une alternative au dépistage des dangers environnementaux suite aux déversements d'effluents industriels. Bien que la structure de la communauté phytoplanctonique soit demeurée semblable le long du gradient de rivière, des variations significatives des rapports *P/B* et ATP/AMP montrent le manque d'acclimation de la communauté à l'intérieur du tronçon de rivière étudié. La charge énergétique en nucléotides adénylates ( $EC_A$ ) diminue à la station qui reçoit les eaux résiduaires toxiques; cependant, aucune différence significative ne persiste au niveau des trois sections situées en aval de l'égoût industriel. Des expériences réalisées en enclos nous ont permis de discriminer les effets de l'effluent par rapport à ceux du gradient physique de conditions rencontrées dans la rivière. Dans le tronçon de la rivière, la  $EC_A$  semble un indicateur métabolique moins sensible que le rapport ATP/AMP lequel est réputé contrôler certaines activités enzymatiques. Il apparaît donc que les rapports *P/B* et ATP/AMP soient utiles pour détecter des effets insidieux au niveau de la communauté microbienne alors que des effets toxiques directs (i.e. diminution de la biomasse, modification de la structure de la communauté) ne sont pas perceptibles. L'approche utilisée permet de plus d'obtenir une information fiable des effets écotoxicologiques d'effluents dans une perspective de surveillance de la qualité des eaux résiduaires.

Received October 15, 1985

Accepted August 26, 1986

(J8493)

Reçu le 15 octobre 1985

Accepté le 26 août 1986

Short-term effects of pollutants on populations of organisms may cause changes in growth, reproduction, and/or metabolic functions. Long-term impacts may reveal major shifts in species composition and predator-prey relationships. At the microbial level of organization, the short time scale of reproduction adds another dimension to the problem: that of acclimation versus species replacement. It thus appears, as pointed out by Matthews et al. (1982), that information about both functional (metabolic) and structural (species composition, biomass) changes is necessary to the understanding of the response of an ecosystem to the impact of pollutants.

In such a context, we investigated both an anabolic indicator, the light-saturated rate of photosynthesis per unit chlorophyll

(*P/B* ratio: micrograms carbon per microgram Chl *a* per hour), and an energy balance indicator, the adenylate energy charge ratio ( $EC_A$ :  $([ATP] + 1/2 [ADP])/([ATP] + [ADP] + [AMP])$ ), for the measurement of the physiological state of a natural microbial community (Atkinson 1968). The *P/B* ratio reflects the physiological state of the phytoplanktonic community whereas  $EC_A$  is related to the whole microplanktonic community (non-photoautotrophic and photoautotrophic populations; De Souza-Lima and Romano 1983).

Despite the fact that it is difficult to predict growth rate from short-term carbon assimilation in nutrient-limited experiments (Morris 1981; Harris 1984; Trainor 1984), there is evidence that this physiological sensor is sensitive to the effects of pollutants on indigenous phytoplankton populations (Rai et al.

1981). For example, Blinn et al. (1977) have shown a negative relationship between carbon assimilation and mercury concentrations after an exposure time of 2 h to the metal ( $0.013-0.109 \text{ mg Hg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Other studies dealt with the relationship between carbon assimilation and biomass decreases. Wurtsbaugh and Horne (1982) conducted in vitro multi-parameter bioassays on lake plankton; they found in a 6-d experiment that at copper concentrations above  $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  the inhibition patterns were similar for nitrogen and carbon assimilation as well as for Chl *a*. Côté (1983) has also conducted in vitro bioassays for assessing the copper toxicity on the standing crop and the photosynthetic process of phytoplankton from the Saguenay River (Québec); he found that at higher concentrations of copper ( $50-400 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), reductions in Chl *a* were low whereas rates of primary production were much more depressed. These results led us to use the *P/B* ratio to determine if acclimation was observed following the perturbation of an indigenous phytoplankton community; there is a lack of information on the sensitivity of this physiological sensor for assessing the effects of complex industrial wastewater discharges on the physiological response (acclimatory or non-acclimatory) of a phytoplankton community within a river system. Moreover, indigenous physical variables in lotic systems present a continuous gradient of physical conditions. This gradient induces within the constituent populations a series of responses resulting in a *continuum* of biotic adjustments (Vanote et al. 1980) which render problematic the discrimination between a pollutant's toxic effect and the effect of physical conditions on the indigenous populations of a river system.

$EC_A$  is derived from the theory of adenylate control, formulated by Atkinson (1968). It is considered to be a linear measurement of the amount of energy momentarily stored in the nucleotide pool: the relative concentrations of adenosine triphosphate [ATP], adenosine diphosphate [ADP], and adenosine monophosphate [AMP] reflect the instantaneous metabolic energy available to a cell (Atkinson 1977). As reported by Fitzwater et al. (1983) and Heath (1984), the theoretical range of  $EC_A$  varies from 0.0 (all AMP) to 1.0 (all ATP); however, unstressed forms of invertebrates and microorganisms show  $EC_A$  values above about 0.8 (Atkinson 1977; Ivanovici 1980). Some studies indicate  $EC_A$  variations under altered conditions such as toxic chemicals, salinity, temperature, light, and nutrient starvation (Chapman et al. 1971; Ivanovici 1980; Fitzwater et al. 1983; Heath 1984). Walsh and Merrill (1984) have suggested the use of  $EC_A$  to determine end-points of algal toxicity tests for the detection of sublethal effects of complex wastes. These authors have expressed the need for more research to adapt  $EC_A$  as a tool for assessing the effects of exposure to complex wastes.

Our aim is to evaluate the *P/B* and  $EC_A$  ratios as in situ phytoplanktonic or microbial indicators for hazardous toxicant assessment and to test the hypothesis of the acclimatory response of a river community before and after the discharge of an industrial effluent. The hypothesis of the predominant effect of the industrial effluent over the lotic physical gradient on the microbial community is verified by the evaluation of the presence and persistence of effluent effects in enclosures.

## Study Area

The Saint-Louis River (Fig. 1) is located on the south bank of the St. Lawrence River some 50 km southeast of Montréal

(Québec). The river flow is parallel to the Beauharnois Canal in a southwest-northeast direction and empties into Lake Saint-Louis at the town of Beauharnois. Three towns, supporting agricultural activities, are located on the  $145.5\text{-km}^2$  drainage basin of the Saint-Louis River. The river flows on a bed of clay.

Certain physico-chemical characteristics of this river have been reported by Roy (1982) and Moulins (1983). Depth varies between 1.83 and 6.7 m, water transparency (Secchi) fluctuates between 0.4 and 2.5 m, and current speeds vary from  $4.6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  during low-flow periods to  $59.6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  during high-flow periods. As well as draining agricultural land, the river receives numerous industrial effluents (ferro-alloys, paper, chlorine, caustic soda, sodium chlorate, and aluminium). Cadmium, copper, chromium, iron, lead, manganese, mercury, nickel, and zinc loads constitute the main sources of pollution of the river. Moreover, the manganese, iron, and mercury concentrations remain abnormally high in the Lake Saint-Louis sediments (Roy 1982).

## Materials and Methods

### Enclosures

The experimental design consisted in exposing the upstream indigenous microbial community to various concentrations of industrial effluent and comparing the community response obtained with that of diluted controls. The experiment which lasted 22 h was carried out in situ in 12-L enclosures. A large volume of water (60 L) containing the indigenous microbial community (without grazers) was obtained by filtering (100- $\mu\text{m}$  mesh) water taken at cross-section A (Fig. 1). The collected sample was subdivided in 12-L carboys and amended to obtain the following effluent concentrations: 0, 10, 25, and 50% (v:v, effluent: river water). Since the addition of effluent diluted the initial biomass, the control was diluted with Millipore "Q" process water.  $^{14}\text{C}$  uptake was measured in separate 2.5-L bottles, filled to obtain identical effluent concentrations, and spiked with  $50 \mu\text{Ci}$  (1.85 MBq) of  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ . All enclosures were incubated directly in the river. Samples for the analyses described below were obtained at 0 (09:45 local time), 1, 2, 8, and 22 h. The dark period fell between 8 and 22h of exposure.

### River Gradient

The effects of the industrial effluent were also tested on the indigenous microbial community downstream from the effluent discharge. The experimental program was carried out over two sampling periods. Four sites (A, B, C, D) located upstream and downstream from the industrial effluent were identified. Each cross-section was made up of three stations, the first located approximately 5 m from the east bank, the second in the middle of the channel, and the third approximately 5 m from the west bank. The west bank station at site B is located directly at the outfall of the industrial effluent (Fig. 1). For each cross-section, a composite sample was prepared for the physical, chemical, and microbial characteristics of the river water. Temperature and pH were measured immediately after preparing each composite sample. Then, subsamples were prepared for chemical analyses at the laboratory using standard preservation methods (Environment Canada 1979). Physico-chemical analyses and coliform counts (total and fecal) were

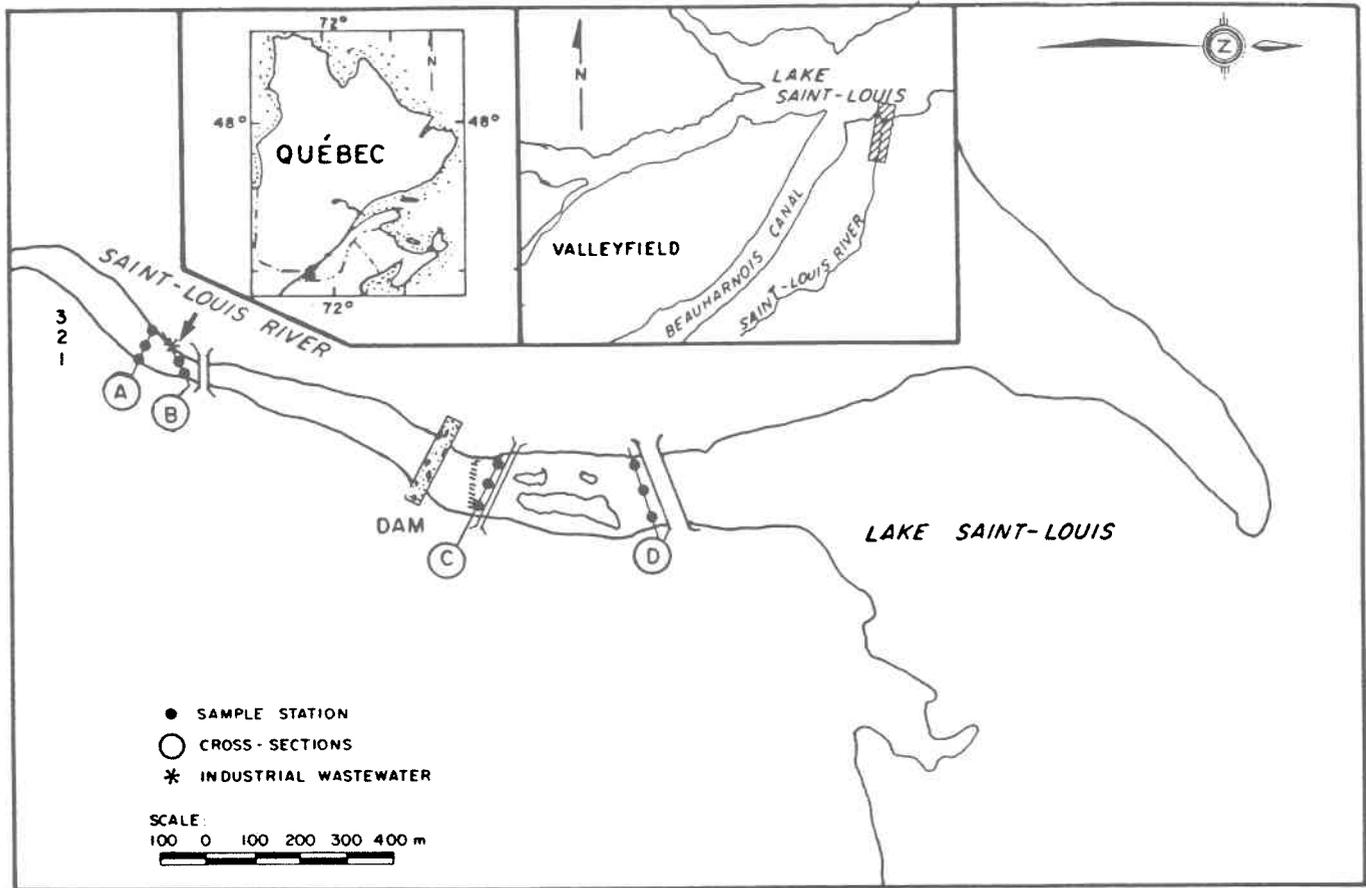


FIG. 1. Study area: identification of sampling stations.

performed according to standard procedures described in American Public Health Association et al. (1980). Phytoplankton samples were counted using Utermöhl's method after preservation in an acidic lugol solution (Vollenweider 1974).

#### Biological Parameters

Samples from the enclosure experiment and from each station were duplicated for determinations of Chl *a*, carbon assimilation, and adenylates content.

Chl *a* was determined after filtration of a 50-mL sample on a 0.4- $\mu\text{m}$  polycarbonate filter (Nuclepore) and immediate extraction by placing the filters in 90% acetone (Strickland and Parsons 1972). Samples were kept in the dark for 2–4 d at 4°C and fluorescence was measured before and after acidification on a Turner Designs filter fluorometer. Extraction of photosynthetic pigments was used instead of *in vivo* determination because *in vivo* measurements are subject to interference from humic material (Carlson and Shapiro 1981).

For the river gradient experiment,  $^{14}\text{C}$  uptake was determined with duplicate 300-mL subsamples spiked with 10  $\mu\text{Ci}$  (370 kBq) of radioactive  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  and incubated for 1 h at light saturation in the river. A 20-mL subsample was then filtered on Nuclepore 0.4- $\mu\text{m}$  membrane filters, whereas for the enclosure experiment duplicate 50-mL samples were filtered and radioactivity was determined using a model 1215 Rackbeta liquid scintillation counter (LKB Wallac). Samples were quench corrected using an hexadecane internal standard and the Sample Channels Ratio Method. The specific activity in the bottles was determined by injecting 100  $\mu\text{L}$  into ethanolamine and sub-

sequent counting in Scintiverse. Time zero blanks were corrected and  $^{12}\text{C}$  assimilation was calculated from alkalinity and pH (Vollenweider 1974).

For adenylate nucleotide determinations, duplicate 100-mL samples were immediately filtered on 0.4- $\mu\text{m}$  Nuclepore filters and immediately extracted by placing them in 4.5 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) followed by vortex mixing (40 s). Concentrated DMSO was used because of its recognized efficiency for adenylate extraction and because it is known to inhibit enzymes that hydrolyze ATP (Jakubczak and Leclerc 1980). Subsequently, 5.5 mL of a 10 mM 4-morpholinepropanesulfonic acid buffer (MOPS, pH 7.4) was added (Jakubczak and Leclerc 1980). The extracts were measured using a luminescence apparatus (LKB 1219 luminometer) and ultrapure enzymes obtained from LUMAC (St. Paul, MN). Briefly, three reagents labelled A, B, and C are utilized for determinations of ATP, ADP, and AMP, respectively. Reagent A is a 25 mM HEPES buffer containing 10 mM KCl at pH = 7.7. Reagent B is a mixture containing lyophilized phosphoenolpyruvate and pyruvate kinase which is reconstituted with 3.4 mL of reagent A. Reagent C contains the adenylate kinase in a 3.2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution; prior to use, 1.7 mL of reagent B is mixed with 40  $\mu\text{L}$  of reagent C. Finally, a fourth vial ("lumit PM") contains purified, lyophilized luciferine-luciferase extract which is reconstituted before use with 7 mL of "lumit" buffer. Nucleotide analysis was performed in duplicate as followed. In all cases, 50- $\mu\text{L}$  aliquots of the unknown was mixed with 50  $\mu\text{L}$  either reagent A (ATP), reagent B (ADP), or reagent C (AMP). Replicate samples were spiked with known amounts of nucleotide used as internal standards.

TABLE 1. Physical, chemical, and microbiological characteristics of the effluent and of river surface water.

Date (1984)	Cross-section	Temp. (°C)	pH	Solids		[P <sub>i</sub> ] (mg·L <sup>-1</sup> )	[Hg] (mg·L <sup>-1</sup> )	Coliform count (per 100 mL)	
				Total (mg·L <sup>-1</sup> )	Suspended (mg·L <sup>-1</sup> )			Fecal	Total
Sept. 26	Effluent		9.1	502	13.1	<0.01	0.0030	<3	<3
	River (A)	18.0	7.2	256	35.6	0.06	<0.0001	24 000	46 000
Sept. 27	A	14.0	8.1	255	30.7	0.12	<0.0001	24 000	46 000
	B	15.0	8.8	346	25.1	0.02	0.0010	430	930
	C	15.3	8.4	508	29.9	0.08	0.0009	930	930
	D	16.0	8.4	494	32.4	0.04	0.0007	9 300	21 000
Oct. 4	A	8.8	7.8	270	23.9	0.08	<0.0001	2 300	9 300
	B	10.1	8.7	323	16.3	0.04	0.0013	4 300	7 500
	C	11.4	8.2	293	19.6	0.06	0.0007	4 300	9 300
	D	11.6	8.0	295	21.5	0.08	0.0007	4 600	9 300
Oct. 5	A	8.9	7.9	278	16.2	0.04	<0.0001	4 300	46 000
	B	10.1	8.7	315	16.8	0.04	0.0012	2 300	23 000
	C	10.1	8.4	293	14.4	0.04	0.0006	4 300	43 000
	D	10.0	8.2	291	18.9	0.04	0.0007	4 300	24 000

TABLE 2. Taxonomic composition, relative abundance (%), and diversity of the phytoplanktonic community.

Date	Taxa	River cross-section				Enclosure experiment
		A	B	C	D	
Sept. 27	<i>Asterionella</i>	—	—	—	1	—
	<i>Cocconeis</i>	—	—	1	48	2
	<i>Cyclotella</i>	36	31	31	48	37
	<i>Gomphonema</i>	1	—	—	—	—
	<i>Gyrosigma</i>	1	—	—	—	—
	<i>Melosira</i>	9	12	5	8	7
	<i>Navicula</i>	5	2	2	4	2
	<i>Nitzschia</i>	4	—	1	1	6
	Total Bacillariophyceae	58	47	40	63	54
	Total Chlorophyceae <sup>a</sup>	38	49	52	33	46
Total Cyanophyceae	4	4	8	4	—	
H' <sup>b</sup>	0.88	0.86	0.99	0.77	0.83	
Oct. 4	<i>Cocconeis</i>	—	—	1	—	—
	<i>Cyclotella</i>	28	30	26	22	—
	<i>Gyrosigma</i>	—	—	2	—	—
	<i>Melosira</i>	8	6	17	13	—
	<i>Navicula</i>	1	4	13	4	—
	<i>Nitzschia</i>	1	—	3	2	—
	<i>Stephanodiscus</i>	—	—	1	—	—
	Total Bacillariophyceae	45	42	74	46	—
	Total Chlorophyceae	36	49	14	39	—
	Total Cyanophyceae	19	9	12	15	—
H'	1.09	0.92	0.94	1.03	—	

<sup>a</sup>See text for composition.

<sup>b</sup>H' =  $-\sum_{i=1}^s p_i \log p_i$  (Shannon-Weaver diversity index) where  $p_i$  is the proportion of the  $i$ th species in the population (Pielou 1966).

Incubation at room temperature lasted 30 min for ATP and ADP and 2 h at 30°C for AMP. Preliminary experiments (Madariaga 1986) have shown that the percent conversion AMP to ATP reaches a maximum after 2 h. In the case of the ADP determination, 100% conversion to ATP was obtained after 30 min. The preparation for the luminometric measurements involved filling of the dispenser tube with lumit

PM extract, and loading of the sample tubes in the rotary sampler of the LKB luminometer. For ATP and ADP measurements, 100 µL of the enzyme solution was dispensed, while AMP determinations required 150 µL. Light emission increased rapidly and reached a plateau after 2 s; therefore, integrated or peak measurements yielded identical values. EC<sub>50</sub> was calculated according to Atkinson's relationship described

previously. Using the procedure outline above, the detection limit for the three nucleotides was 0.25 nM for ATP and 0.5 nM for ADP and AMP; the coefficient of variation of the 95% confidence interval ( $2 \times$  standard for deviation/mean  $\times$  100) at the 5 nM level was 5.7% (ATP), 6.9% (ADP), and 13.8% (AMP). Analyses of variance were carried out and an a posteriori comparison of means examined with Sheffe's test.

## Results and Discussion

### Physical and Chemical Characteristics

The important metal contamination of this river was demonstrated by Roy (1982) where it was clear that the lead, chromium, magnesium, copper, and mercury concentrations in the aquatic vegetation exceeded the average level of those elements in the macrophytes of the St. Lawrence River. Fedida (1982) determined the heavy metal concentrations of the effluent at various times over a 4-d period; concentrations (milligrams per litre) were as follows: Fe 0.101–0.426; Cr  $\leq$  0.020–0.192; Cu  $\leq$  0.020; Ni  $\leq$  0.010–0.014; Pb  $\leq$  0.010–0.015; Cd  $\leq$  0.010; Zn  $\leq$  0.010–0.058; Co  $\leq$  0.025; Hg 0.0023–0.0064. Total solids varied between 530 and 900 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, that of dissolved solids between 28 and 85 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, pH between 6.6 and 11.3, and temperature between 11.5 and 20.0°C. The toxicity of this industrial effluent to *Catostomus commersoni* and *Daphnia magna*, two indigenous species, was clearly shown by in situ bioassays (Moulins 1983). Between the effluent outfall and the mouth of the river in Lake Saint-Louis, the observed mortalities varied respectively between 97.5 and 6.8% (*C. commersoni*) and 100 and 1.7% (*D. magna*).

Our results (Table 1) concerning the effluent are generally in agreement with those reported in the previous paragraph and clearly show its influence on temperature, pH, total solids, and total mercury observed at cross-section B. Despite effluent discharges, the Saint-Louis River remains eutrophic, since it drains numerous agricultural territories. The high inorganic phosphorus concentrations as well as an excess of coliforms in the river are indicative of this influence.

### Phytoplanktonic Community Structure

The taxonomic composition of the phytoplanktonic community reflects the eutrophic state of this river. During the three sampling days, Bacillariophyceae made up 40–74% of the community and *Cyclotella* sp. was dominant at all four cross-sections (22–48% of the community). Various Chlorophyceae (*Sphaerocystis* sp., *Tetraedon* sp., *Scenedesmus* sp., *Ankistrodesmus* sp., *Oocystis* sp., *Tetraspora* sp., *Chrysococcus* sp., *Crucigenia* sp.) constituted 14–52% of the community (Table 2). Symoens *et al.* (1981) observed eutrophic environments dominated by diatoms, where *Melosira granulata* and *Cyclotella stelligera* were the most abundant species. During the summer months, such diatoms as *Tabellaria fenestrata*, *T. flocculosa*, *Asterionella formosa*, *Melosira* sp., and *Fragilaria* sp. are also dominant in the Saguenay River, a water system highly contaminated by heavy metals (Loring 1975, 1976; Smith and Loring 1981; Côté 1983).

The effluent discharge at cross-section B only causes a slight modification of the community structure. For example, on October 4, although *Cyclotella* sp. remained dominant, the diversity index  $H'$  (Pielou 1966) varied from a value of 1.09 bitt  $\cdot$  cell<sup>-1</sup> at cross-section A to 0.92 bitt  $\cdot$  cell<sup>-1</sup> at cross-section B. Diversity increased again at cross-section D, where

$H' = 1.03$  bitt  $\cdot$  cell<sup>-1</sup> (Table 2). In September, diatoms accounted for 58% of the community at A and 63% at D, whereas in October they represented 45% of the community at A and 46% at D. The most apparent modifications appear at C which is located immediately downstream from a dam. It should be pointed out that the flow at the dam outfall is high (Moulins 1983). Current speed renders unlikely the appearance of species modifications induced by the discharge of the industrial effluent, since the distance between cross-sections A and D would be traveled in either 0.5 h during high flow or 6.6 h during low flow (Moulins 1983). Thus, in the study area, the effects of the industrial effluent would be felt for a rather short period of time, making it unlikely that new species appear or become dominant. Harris (1984) has suggested that changes in algal species occur over time scales similar to those required for physiological adaptation, presumably >12–200 h. This stated time requirement for physiological adaptation, however, is much longer than is generally accepted for cellular responses to reductions in ATP, total adenylates ( $A_T$ ), and energy charge ( $EC_A$ ) values. Atkinson (1977) has put forward a time scale of <10 min for such response.

### Functional Characteristic: P/B Ratios

The two sampling periods of October 4 and 5 revealed decreases of 70–91% between the mean  $P/B$  ratios in cross-section A ( $P/B = 0.64$ – $0.95$  and  $0.23$ – $0.48$ ) which is not influenced by the discharge and those of cross-sections B ( $P/B = 0.10$ – $0.36$  and  $0.04$ – $0.07$ ), C ( $P/B = 0.24$ – $0.28$  and  $0.03$ – $0.04$ ), and D ( $P/B = 0.14$ – $0.26$  and  $0.04$ – $0.13$ ) which are located downstream from the effluent outfall. Although  $P/B$  ratios vary widely from day to day according to variable environmental conditions, their response to the industrial effluent is, however, always highly significant (Table 3). The comparison of means examined with Sheffe's test shows that cross-section A was significantly different from cross-sections B, C, and D.

Rates of photosynthesis dropped from a mean value of 2.6  $\mu\text{g C} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  at cross-section A to mean values of 0.77, 0.83, and 0.69  $\mu\text{g C} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  at cross-section B, C, and D, respectively, with a low of 0.15  $\mu\text{g C} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  directly at the mouth of the effluent outfall. These low values are particularly significant when the Chl *a* data are considered. The industrial effluent discharge itself produced a temporary reduction in biomass at station 3B, where Chl *a* concentrations of 1.49 and 1.56  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  were observed on October 4 and 5, respectively. This transitory decrease probably results from dilution by the effluent discharge, since in comparison, Chl *a* values generally remained above 3  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  at all other stations on both sampling dates. The relative consistency of the Chl *a* values shows that the decreases in  $P/B$  ratios are related to decreases of the photosynthetic rates of the phytoplanktonic community.

The sensitivity of  $P/B$  ratios to toxic chemicals was also noted by Côté (1983) who recorded decreases >75% of the  $P/B$  ratios of Saguenay River phytoplankton assemblages submitted in vitro to high copper concentrations (>10  $\mu\text{g Cu} \cdot \text{L}^{-1}$ ). At these copper concentrations,  $P/B$  ratios never exceeded 0.1, while  $P/B$  ratios in the control never exceeded 0.4. The  $P/B$  ratios determined in the Saguenay River were lowest in May (0.1) and highest in August (2.1) (Côté 1983).

This is in agreement with Platt and Jassby (1976) who found a highly significant correlation of  $P/B$  ratios versus temperature ( $N = 52$ ;  $\alpha \leq 0.01$ ;  $r = 0.529$ ). Platt *et al.* (1980) have also determined lower  $P/B$  ratios of 0.98 and 0.64 for stations

TABLE 3. Analysis of variance of  $P/B$  (production/biomass) ratio,  $EC_A$  (adenylate energy charge), and ATP/AMP ratio data collected on the Saint-Louis River on October 4 and 5, 1984.

<i>P/B ratio</i>						
Date	Source	df	Sum of squares	Mean squares	F-statistic	Probability
Oct. 4	Effluent	3	0.784	0.261	18.1	0.001
	Residual	8	0.111	0.014		
	Total	11	0.895			
Oct. 5	Effluent	3	0.240	0.080	16.1	0.001
	Residual	8	0.039	0.005		
	Total	11	0.279			
<i>EC<sub>A</sub></i>						
Oct. 4	Effluent	3	0.013	0.004	1.8	ns
	Residual	8	0.018	0.002		
	Total	11	0.031			
Oct. 5	Effluent	3	0.018	0.006	2.6	ns
	Residual	8	0.018	0.002		
	Total	11	0.036			
<i>ATP/AMP ratio</i>						
Oct. 4	Effluent	3	1.84	0.61	2.77	0.05 < $\alpha$ < 0.10
	Residual	20	4.33	0.22		
	Total	23	6.17			
Oct. 5	Effluent	3	2.08	0.69	7.19	0.001 < $\alpha$ < 0.005
	Residual	20	1.92	0.096		
	Total	23	4.00			

located in the Arctic ( $T = 0.5$  and  $-0.5^\circ\text{C}$ ); maximum values (15.2) are attained at much higher temperature ( $\sim 19^\circ\text{C}$ ). The fact that  $P/B$  ratios remain low at all three cross-sections downstream from the effluent discharge indicates that during the time scale considered (between 0.5 and 6.6 h), the photosynthetic activity of the phytoplanktonic community does not become acclimated to the toxic effluent.

The sum of the nucleotides ( $A_T$ ) decreases as the microbial community reaches the industrial effluent discharge.  $A_T$  values of the order of 1.38–1.62 nM and 1.81–2.01 nM were observed on October 4 and 5, respectively, in cross-section A samples, in comparison with values of 0.84–1.36 nM and 0.80–1.71 nM at cross-section B (directly at the effluent outfall). At cross-sections C and D,  $A_T$  values remained lower than those measured in the cross-section A samples of October 5, while higher concentrations (1.53–2.06 nM) were observed on October 4. These variations in the nucleotide pool are probably the result of dilution by the effluent, since relatively constant Chl  $a/A_T$  ratios ( $0.0047 \pm 0.0009$ ) were observed at all cross-sections on both sampling dates, indicating that both biomass indicators show proportional variation on dilution.

#### Functional Characteristic: $EC_A$

Studies have shown that activities of a number of enzymes are related to the concentration of ATP, some to ADP or AMP while others are dependent on the ATP/AMP or the ATP/ADP ratios. For example, metabolic energy transduction is built around the maintenance of the ATP/ADP ratio (Chapman and Atkinson 1977), while it appears that a low ATP/AMP ratio

stimulates glycolysis and a high ATP/AMP ratio activates gluconeogenesis (Atkinson 1977). The cumulative effects of the adenosine phosphates on the rate of cellular metabolism are expressed in terms of the  $EC_A$  parameter (Karl 1980).

In the present study,  $EC_A$  values varied between 0.58 and 0.68 and between 0.62 and 0.64 on October 4 and 5, respectively, at the three stations above the outfall (cross-section A). These values are slightly lower than those previously suggested for nonstressed microorganisms and are indicative of a phytoplanktonic population in stationary phase (Falkowski 1977).

At the effluent discharge, a drop in  $EC_A$  values is observed. For example, during the two sampling periods, decreases averaged 12 and 16% at cross-section B. The most noticeable decrease (29%) occurred at the station closest to the effluent outfall (station 3 B) where  $EC_A$  values of 0.48 and 0.44 were measured on October 4 and 5, respectively. Further downstream (cross-sections C and D) the  $EC_A$  values remained lower than those observed at cross-section A: they were generally 10–15% lower. Although these results are in agreement with the suggestion that lower  $EC_A$  values indicate the presence of stressed microorganisms (De Souza-Lima and Romano 1983), the differences in  $EC_A$  values observed between upstream (cross-section A) and downstream stations (cross-sections B, C, and D) are not significant (Table 3). However, since an  $EC_A$  of approximately 0.5 has been suggested to be the value critical to the maintenance of viability (Falkowski 1977), the reductions observed at the cross-sections downstream from the industrial effluent discharge appear significant from a physiological standpoint.  $EC_A$  values such as 0.44 and 0.48 (station 3B),

TABLE 4. Variation of the ATP/ADP and ATP/AMP ratios of the microbial community before (cross-section A) and after (cross-sections B, C, D) the effluent discharge for the sampling period of October. Asterisks indicate outliers.

	Cross-section			
	A	B	C	D
ATP/ADP 1	3.71	5.39	3.65	4.75
	3.71	*	5.11	3.84
2	1.96	2.81	3.16	8.22
	2.33	*	4.21	*
3	4.03	3.31	4.48	6.05
	4.52	4.04	5.30	7.27
Mean ± SD	3.38 ± 1.01	3.89 ± 1.12	4.32 ± 0.83	6.03 ± 1.78
ATP/AMP 1	1.66	1.36	1.25	0.99
	2.37	1.35	1.40	1.12
2	1.80	1.66	1.33	1.31
	2.30	1.27	1.14	1.35
3	1.74	0.65	1.20	1.33
	1.70	0.83	1.18	2.05
Mean ± SD	1.93 ± 0.32	1.19 ± 0.37	1.25 ± 0.10	1.36 ± 0.37

0.51 (station 1D), 0.52 (stations 2C and 3C, station 1D), and 0.53 (station 2D) suggest that the viability of the microbial community is endangered. However, as pointed out by Karl (1980), the strict interpretation of community  $EC_A$  is difficult, since the community may be composed of active and inactive cell populations. The initial reduction in the  $EC_A$  reveals either a greater intracellular energy demand not fully compensated or, alternatively, a rapid change in the adenylate ratios by direct blockage of ATP yielding pathways such as electron-transfer phosphorylation and/or glycolysis in the microbial community. Since in most algae, photophosphorylation is the primary ATP-yielding pathway (Raven and Beardall 1981), it appears more likely that the inhibition of photosynthesis rather than of glycolysis is responsible for the reduction in  $EC_A$ .

A drop in  $EC_A$  results from the accumulation of AMP when there is a sudden increase in energy demand on the adenine nucleotide pool (Chapman and Atkinson 1977; Fitzwater et al. 1983; Heath 1984). When the  $ATP \rightarrow AMP + P_i \sim P_i$  reaction is favored over the  $ATP \rightarrow ADP + P_i$ , direct pyrophosphate cleavage is accompanied by greater energy liberation. This type of reaction is encountered in the enzymatic activation of fatty acids, in the form of esters CoA. They are an important group of activated intermediaries in the biosynthesis of lipids and some amino acids (Lehninger 1977). It is conceivable that the cell could derive the energy required to respond to stressful conditions by an analogous reaction ( $ATP \rightarrow AMP + P_i \sim P_i$ ). This will lead to a decrease in the ATP/AMP ratio. The removal of the accumulated AMP would tend to restore high energy charge values. In view of the reaction  $2ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$  catalyzed by adenylate kinase, it is obvious that the removal of AMP will cause the conversion of ADP to ATP and thus tend to increase the ATP/ADP ratio and the  $EC_A$ . Removal of AMP would be effected by its cleavage to adenine and ribose 5-phosphate, catalyzed by adenosine monophosphate nucleosidase. The rate of this enzyme reaction is known to increase sharply as the  $EC_A$  decreases from its normal value. Alternatively, AMP can be lost by excretion into the growth medium (Chapman and Atkinson 1977).

On October 5 particularly, our results at cross-section B

show a significant reduction in the ATP/AMP ratio which is concurrent with the observed drop in  $EC_A$  (Tables 3 and 4). Although the ATP/AMP ratio increases at cross-sections C and D, it is not restored to original levels over the time scale studied. Scheffe's test shows that the ATP/AMP ratios at cross-section A are significantly higher than at cross-sections B, C, and D. Downstream from the effluent discharge (cross-sections C and D) an increase in the  $EC_A$  is noted and, as can be expected, it is accompanied by a marked increase in the ATP/ADP ratio at cross-section D (Table 4).

#### Enclosure Experiment

The enclosure experiment was carried out using the phytoplanktonic community collected at cross-section A. Its composition is very similar to the one encountered during the river gradient experiment (Table 2). In the control enclosure, except for the first hours of the experiment, Chl *a* remained relatively constant and after 22 h reached a value  $4.6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . On the other hand, total adenylates ( $A_T$ ), comprising microbial and phytoplanktonic biomass, increased from 2.43 to 4.45 nM during the 22 h of the experiment. The Chl *a*/ $A_T$  ratio varied from 1.81 at time 0.1 h to 1.03 after 22 h, possibly indicating a greater increase in bacterial biomass. The influence of the industrial effluent on Chl *a* and  $A_T$  is apparent at all concentrations used. At the end of the experiment, inhibitions of 78–89% and 68–75% were observed for Chl *a* and  $A_T$  respectively.

Photosynthesis is greatly reduced at all effluent concentrations used. At the end of the experiment, carbon assimilation by the phytoplanktonic communities in 10, 25, and 50% effluent was 17, 4, and 2%, respectively, of the control. The  $P/B$  ratios of the control enclosure, which varied between 3.01 and 2.07 in the first 8 h of the experiment, are much higher than those measured at cross-section A of the Saint-Louis River. This is possible due to the absence of turbulence in the enclosure. As was the case in the river cross-section (B) receiving the effluent discharge, there is a highly significant reduction in the photosynthetic efficiency of the microbial community in the effluent-treated enclosures (Table 5). For

TABLE 5. Analysis of variance on  $P/B$  ratios,  $EC_A$ , and ATP/AMP and ATP/ADP ratios of the enclosure experiment.

Parameter	Source	df	Sum of squares	Mean square	F-statistic	Probability
$P/B$ ratio	Effluent	3	28.06	9.35	34.63	0.001
	Residual	20	5.32	0.27		
	Total	23	33.38			
$EC_A$	Effluent	3	1.40	0.47	58.75	0.001
	Residual	28	0.21	0.008		
	Total	31	1.61			
ATP/AMP ratio	Effluent	3	16.51	5.5	78.57	0.001
	Residual	28	1.83	0.07		
	Total	31	18.34			
ATP/ADP ratio	Effluent	3	175.15	58.38	24.53	0.001
	Residual	28	66.67	2.38		
	Total	31	241.82			

TABLE 6. Temporal variations of  $EC_A$  and ATP/ADP and ATP/AMP ratios of the microbial community in control and effluent-treated enclosures. Values are replicated.

	Effluent concn. (%)	Exposure time (h)					
		0.1	1	2	8	22	
$EC_A$	Control	0.61	0.64	0.65	0.62	0.66	
		0.59	0.63	0.67	0.47	0.67	
	10	0.49	0.46	0.44	0.29	0.26	
		0.50	0.48	0.45	0.36	0.24	
	25	0.43	0.28	0.23	0.10	0.07	
		0.39	0.31	0.21	0.09	0.08	
	50	0.36	0.18	0.11	0.05	<0.01	
		0.33	0.17	0.10	0.04	<0.01	
	ATP/ADP	Control	3.54	9.38	4.83	6.34	3.55
			8.47	5.86	4.19	5.26	9.13
10		4.50	7.00	2.50	1.61	1.33	
		4.39	4.23	4.81	1.11	1.47	
25		3.20	1.44	1.09	0.25	0.07	
		3.79	1.11	1.00	0.16	0.06	
50		1.55	0.42	0.20	<0.01	<0.01	
		1.61	0.46	0.15	<0.01	<0.01	
ATP/AMP		Control	1.72	1.90	2.04	1.31	2.17
			1.48	1.79	2.25	1.16	2.16
	10	0.97	0.85	0.74	0.40	0.28	
		0.98	0.90	0.79	0.40	0.27	
	25	0.63	0.36	0.21	0.04	0.01	
		0.69	0.32	0.20	0.02	0.01	
	50	0.44	0.11	0.04	<0.01	<0.01	
		0.46	0.11	0.03	<0.01	<0.01	

example,  $P/B$  ratios varied between 3.01 and 2.07 in the control enclosure in comparison with values below 0.4 in 25 and 50% effluent.

Except at 0.1 and 8 h, the  $EC_A$  of the control enclosure was maintained above 0.6 (Table 6). However, in the effluent enclosures,  $EC_A$  decreased sharply and was maintained below the critical 0.5 viability level (Falkowski 1977). In 25 and 50% effluent,  $EC_A$  was below 0.1 for the last 14 h of the experiment. The lowered  $EC_A$  values result from an increase in AMP which is reflected in lowered ATP/AMP ratios. This is in fact observed in the effluent-treated enclosures where the ATP/AMP ratios vary from 0.98 to 0.27 in 10% effluent, from 0.69 to

0.01 in 25% effluent, and from 0.44 to <0.01 in 50% effluent compared with variations from 1.48 to 2.17 in the control (Table 6).

A one-way ANOVA carried out on the adenylate ratio data revealed that the differences observed in  $EC_A$  and ATP/AMP and ATP/ADP ratios between the control and effluent-treated enclosures are highly significant (Table 5).

From those results, it is obvious that the industrial effluent is toxic for the microbial community of the Saint-Louis River. The toxicity is reflected by the observed reductions of both structural (Chl  $a$  and  $A_T$ ) and functional (photosynthesis,  $EC_A$ , and ATP/AMP ratio) characteristics of the community. In this light, the decreases in photosynthetic efficiency,  $EC_A$ , and ATP/AMP ratios observed in transects B, C, and D of the Saint-Louis River can be attributed to the discharge of effluent at cross-section B. Over the time scale studied (0.5–6.6 h in the river gradient experiment; 22 h in the enclosure experiment), acclimation to the effluent is not observed suggesting irreversible effects. Enclosure experiments allowed us to conclude that the microbial community was predominantly effected by the effluent rather than by the lotic physical gradient.

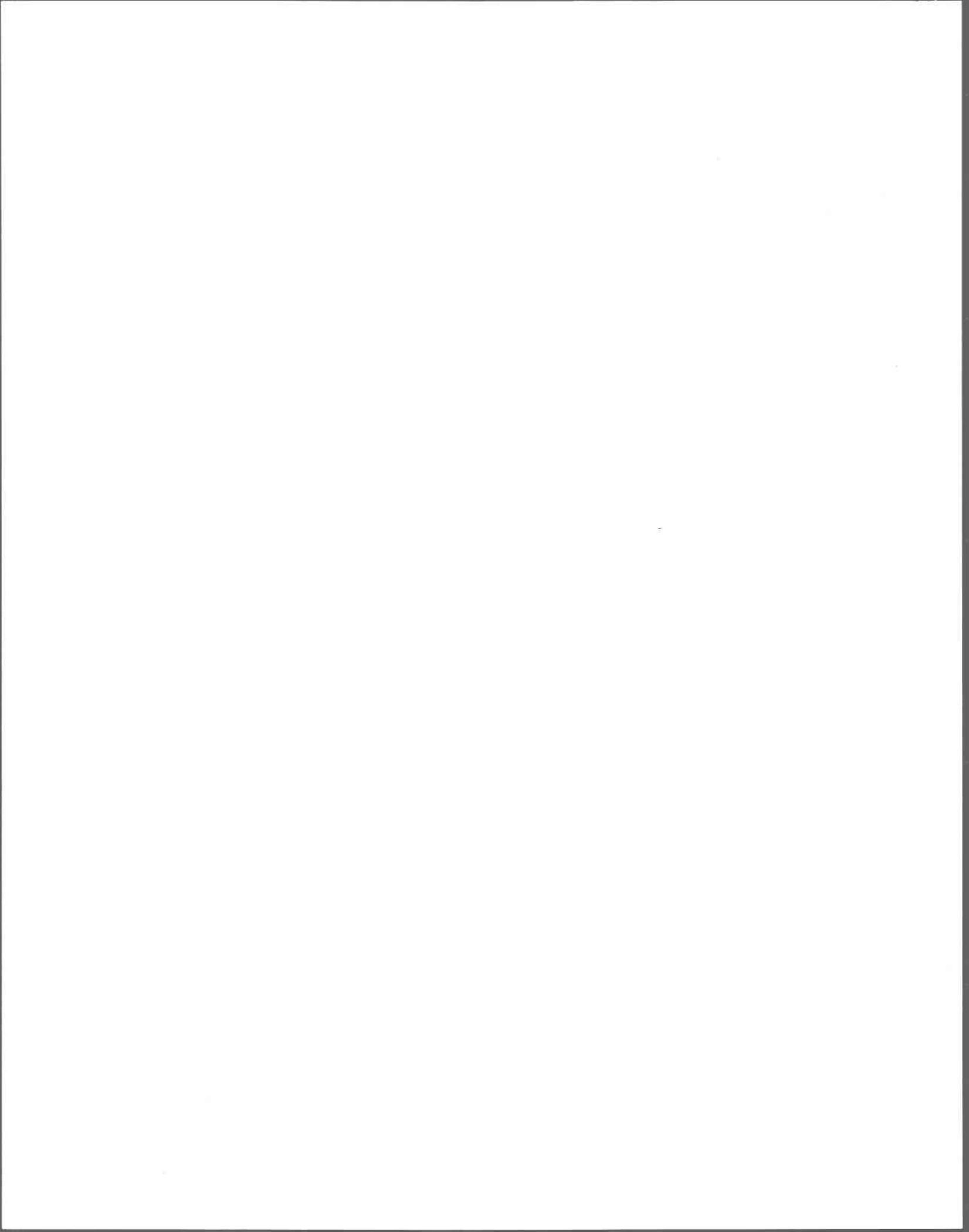
### Acknowledgments

This work was supported by Environment Canada and the Department of Supply and Services (UP-1ST83-00313) and by The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant No. A8123).

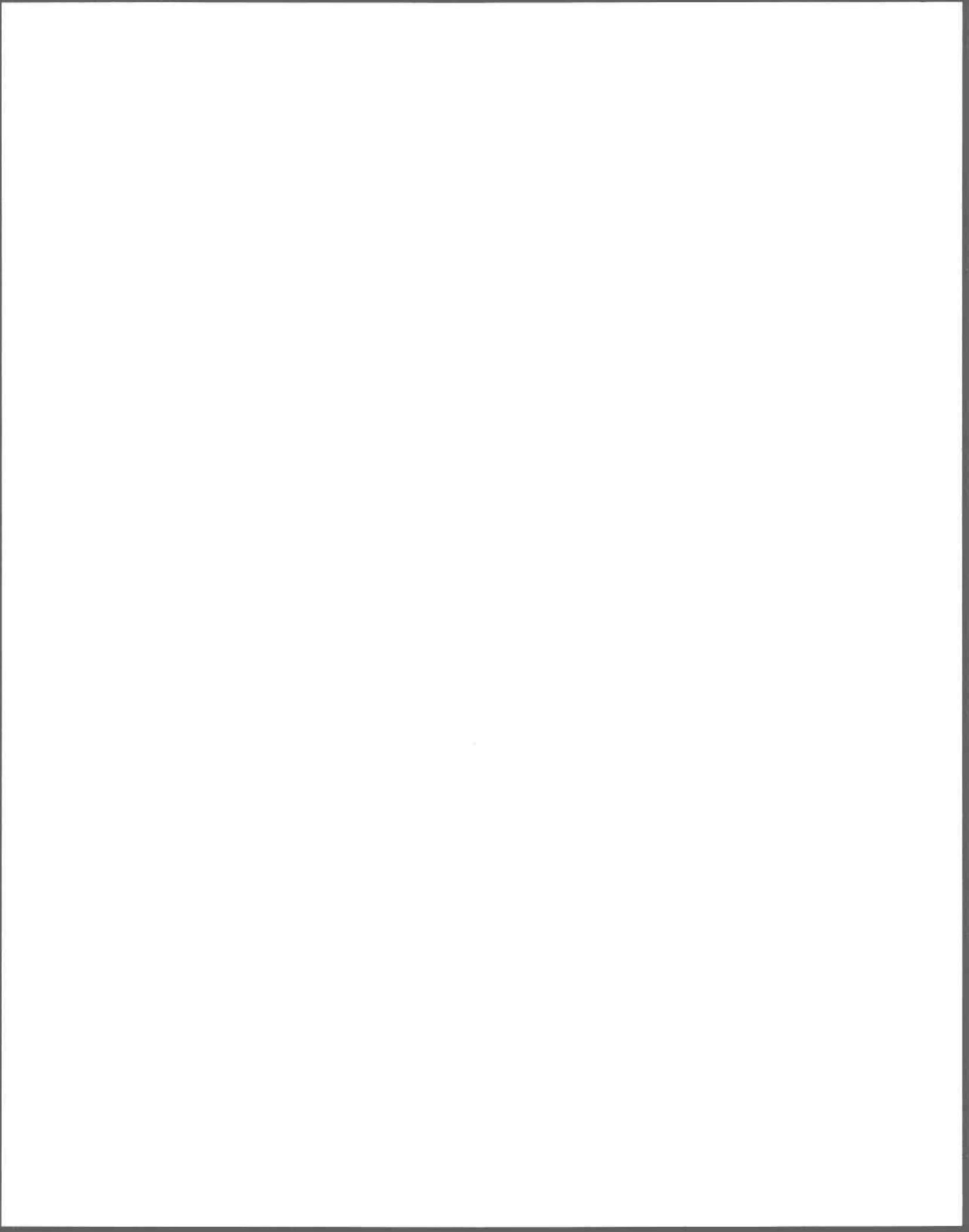
### References

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, AND WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. 1980. Standard methods for the examination of water and wastewater. 15th ed. American Public Health Association, Washington, DC. 1134 p.
- ATKINSON, D. E. 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter: interaction with feedback modifiers. *Biochem. J.* 7: 4030–4034.
- 1977. Cellular energy metabolism and its regulation. Academic Press, New York, NY. 293 p.
- BLINN, D. W., T. TOMPKINS, AND L. ZALESKI. 1977. Mercury inhibition on primary productivity using large volume plastic chambers *in situ*. *J. Phycol.* 13: 58–61.
- CARLSON, R. E., AND J. SHAPIRO. 1981. Dissolved humic substances: a major source of error in fluorometric analyses involving lake waters. *Limnol. Oceanogr.* 26: 785–790.

- CHAMPAN, A. G., AND D. E. ATKINSON. 1977. Adenine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast. *Adv. Microb. Physiol.* 15: 253-306.
- CHAMPAN, A. G., L. FALL, AND E. D. ATKINSON. 1971. Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J. Bacteriol.* 108: 1072-1082.
- CÔTÉ, R. 1983. Aspects toxiques du cuivre sur la biomasse et la productivité du phytoplancton de la rivière du Saguenay, Québec. *Hydrobiologia* 98: 85-95.
- DE SOUZA-LIMA, Y., AND J. C. ROMANO. 1983. Ecological aspects of the surface microlayer. I. ATP, ADP, AMP contents, and energy charge ratios of microplankton communities. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 70: 107-122.
- ENVIRONMENT CANADA. 1979. Analytical methods manual. Environment Canada, Ottawa, Ont. 267 p.
- FALKOWSKI, P. G. 1977. The adenylate energy charge in marine phytoplankton: the effect of temperature on the physiological state of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 27: 37-45.
- FEDIDA, E. 1982. Étude de la qualité des effluents de la fabrique de chlore, de chlorite et de soude caustique de la compagnie Stanchem-Beauharnois (Standard Chemicals Limited). *Environ. Can. Rep. No.* 4728-37/308.
- FITZWATER, S. E., G. A. KNAUER, AND J. H. MARTIN. 1983. The effects of Cu on the adenylate energy charge of open ocean. *J. Plankton Res.* 5: 935-938.
- HARRIS, G. P. 1984. Phytoplankton productivity and growth measurements: past, present and future. *J. Plankton Res.* 6: 219-237.
- HEATH, A. G. 1984. Changes in tissue adenylates and water content of bluegill, *Lepomis macrochirus*, exposed to copper. *J. Fish Biol.* 24: 299-309.
- IVANOVIC, A. M. 1980. Application of adenylate energy charge to problems of environmental assessment in aquatic organisms. *Helgol. Wiss. Meeresunters.* 33: 556-565.
- JAKUBCZAK, E., AND H. LECLERC. 1980. Mesure de l'ATP bactérien par bioluminescence: étude critique des méthodes d'extraction. *Ann. Biol. Clin.* 38: 297-304.
- KARL, D. M. 1980. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.* 44: 739-796.
- LEHNINGER, A. L. 1977. *Biochemistry, the molecular basis of cell structure and function.* 2nd ed. Worth Publishers Inc., New York, NY. 1088 p.
- LORING, D. H. 1975. Mercury in the sediments of the Gulf of St. Lawrence. *Can. J. Earth Sci.* 12: 1219-1237.
1976. The distribution and partition of zinc, copper and lead in the sediments of the Saguenay Fjord. *Can. J. Earth Sci.* 13: 960-971.
- MADARIAGA, C. 1986. Comparaison de la sensibilité de diverses sondes physiologiques en toxicologie aquatique: toxicité du Cd sur l'algue *Selenastrum capricornutum*. Mémoire de maîtrise. INRS-Eau, Ste-Foy, Qué. 123 p.
- MATTHEWS, R. A., A. L. BUIKEMA JR., J. CAIRNS JR., AND J. H. RODGERS JR. 1982. Biological monitoring. Part IIA - Receiving system functional methods, relationships and indices. *Water Res.* 16: 129-139.
- MORRIS, I. 1981. Photosynthetic products, physiological state and phytoplankton growth. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 210: 83-102.
- MOULINS, L. J. 1983. Impacts des effluents d'une usine de chlore-soude caustique sur l'environnement bio-physique du lac et de la rivière Saint-Louis. M.Sc. Thesis, Université de Montréal, Montréal, Qué. 189 p.
- PIELOU, E. C. 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *J. Theor. Biol.* 13: 131-144.
- PLATT, T., C. L. GALLEOGS, AND W. G. HARRISON. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* 38: 687-701.
- PLATT, T., AND A. JASSBY. 1976. The relationship between photosynthesis and light for natural assemblages of coastal marine phytoplankton. *J. Phycol.* 12: 421-430.
- RAI, J. C., J. P. GAUR, AND H. D. KUMAR. 1981. Phycology and heavy-metal pollution. *Biol. Rev.* 56: 99-151.
- RAVEN, J. A., AND J. BEARDALL. 1981. Respiration and photorespiration. p. 55-82. *In* T. Platt [ed.] *Physiological bases of phytoplankton ecology.* *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 210: 346 p.
- ROY, C. 1982. Bioaccumulation des métaux lourds dans les macrophytes aquatiques de la rivière et du Lac Saint-Louis. M.Sc. Thesis, Université de Montréal, Montréal, Qué. 190 p.
- SMITH, J. N., AND D. H. LORING. 1981. Geochronology for mercury pollution in the sediment of the Saguenay Fjord, Québec. *Environ. Sci. Technol.* 15: 944-951.
- STRICKLAND, J. D. H., AND T. R. PARSONS. 1972. *A practical handbook of seawater analysis.* 2nd ed. *Bull. Fish. Res. Board Can.* 167: 310 p.
- SYMOENS, J. J., S. JANSSEN, L. REMELS, AND D. VAN DE GUCHT. 1981. Algae as indicators of water quality in a lowland fen nature reserve. *Verh. Int. Ver. Limnol.* 21: 1472-1475.
- TRAINOR, F. R. 1984. Indicator algal assays: laboratory and field approaches. p. 3-47. *In* L. E. Shubert [ed.] *Algae as ecological indicators.* Academic Press, New York, NY.
- VANNOTE, R. L., G. W. MINSHALL, K. W. CUMMINGS, J. R. SEDELL, AND C. E. CUSHING. 1980. The river continuum concept. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 130-137.
- VOLLENWEIDER, R. A. 1974. *A manual on methods for measuring primary production in aquatic environment.* 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, IBP Handb. No. 12. London, Ont. 225 p.
- WALSH, G. E., AND R. G. MERRILL. 1984. Algal bioassays of industrial and energy process effluents. p. 329-360. *In* L. E. Shubert [ed.] *Algae as ecological indicators.* Academic Press, New York, NY.
- WURTSBAUGH, W. A., AND A. J. HORNE. 1982. Effects of copper on nitrogen fixation and growth of blue-green algae in natural plankton associations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 1636-1641.



**ANNEXE II**



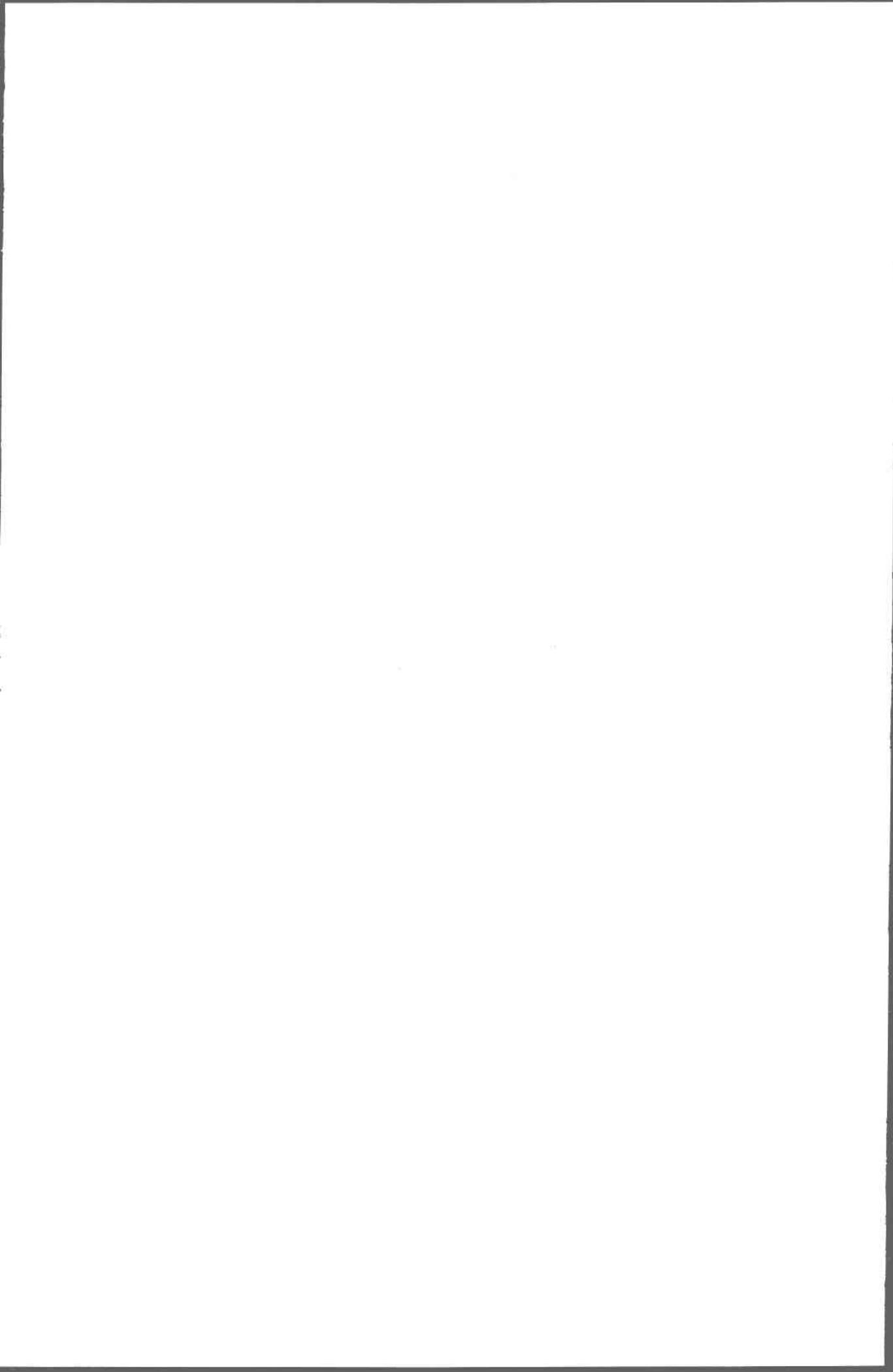
L'INRS ne détient pas les droits pour diffuser cette version de l'article. Vous pouvez le consulter à l'adresse suivante :

Thompson, P.A., Couture, P., Thellen, C. et Auclair, J.C. (1987). Structure-function relationships for monitoring cellular stress and recovery responses with *Selenastrum capricornutum*. *Aquat. Toxicol.* 10(291-305).

[http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X\(87\)90004-X](http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(87)90004-X)



ANNEXE III



L'INRS ne détient pas les droits pour diffuser cette version de l'article. Vous pouvez le consulter à l'adresse suivante :

Thompson, P.A. et Couture, P. (1990). Aspects of carbon metabolism in the recovery of *Selenastrum capricornutum* populations exposed to cadmium. *Aquat. Toxicol.* 17(1): 1-14.

[http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X\(90\)90008-D](http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(90)90008-D)