

INRS-EAU  
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE DE MAÎTRISE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'EAU

PAR

ANDRÉ VACHON

LES PLANTES AQUATIQUES COMME BIOINDICATEURS DE LA CONTAMINATION  
DU SYSTÈME SAINT-LAURENT EN MÉTAUX TOXIQUES

AVRIL 1995



## RÉSUMÉ

Les plantes aquatiques peuvent accumuler les métaux traces suite à la prise en charge non-spécifique de ceux-ci par un système qui n'excluerait pas les ions toxiques. Dans l'environnement, où les fluctuations de conditions physico-chimiques sont nombreuses, il serait à l'avantage des plantes de bénéficier d'un système pouvant réguler la disponibilité de ces métaux. Les phytochélatines (PC), une classe de peptides induite spécifiquement par les métaux et retrouvée chez plusieurs plantes terrestres, pourraient remplir ce rôle de détoxification et de maintien de l'homéostasie.

Aux cours des dernières années, les PC ont surtout été étudiées à partir d'expériences d'exposition en laboratoire avec des cultures de cellule ou des plantes entières; très souvent, ces expériences ont été réalisées à des concentrations en métal dépassant de loin celles retrouvées dans le milieu naturel. Le but de la présente étude était donc d'évaluer l'utilisation possible des PC comme indicateur biochimique précoce d'un stress induit par des concentrations en métal retrouvées dans le système Saint-Laurent, et ceci pour deux plantes aquatiques (*Vallisneria americana* et *Myriophyllum spicatum*). Outre l'analyse de macrophytes récoltés dans des lacs fluviaux du fleuve Saint-Laurent (Saint-Louis et Saint-Pierre), l'approche expérimentale a également impliqué des expériences d'exposition au Cd et Cu en laboratoire.

Les concentrations totales de Cd et de Cu ont été mesurées pour les racines et les feuilles des macrophytes. Ainsi, les valeurs obtenues dans les racines étaient souvent assez différentes de celles retrouvées dans les feuilles. La présence sur les racines de quantités variables d'oxydes de fer, dont le pouvoir de complexation des métaux est considérable, ne permettait pas une évaluation adéquate du métal réellement assimilé par ces parties. Toutefois, suite à une translocation des racines aux feuilles, il est possible d'évaluer la quantité de métal biodisponible grâce aux parties vertes. En effet, il a été constaté que les concentrations en Cd retrouvées dans les feuilles de macrophytes étaient fonction de celles de l'ion libre ( $\text{Cd}^{2+}$ ) (les concentrations de l'ion métallique libre ( $\text{M}^{z+}$ ) ont été calculées à partir d'un modèle d'équilibre d'adsorption; elles s'appliquent aux eaux interstitielles oxygènes ainsi qu'à l'eau qui se trouve juste au-dessus des sédiments). Aucune relation n'a été observée entre les quantités de métal dans les feuilles et le Cd total dans les sédiments, ce qui reflète l'influence d'autres facteurs (pH,  $[\text{Ca}^{2+}]$ , [MOD],...) sur la bioconcentration de ce métal chez les plantes aquatiques.

Le métal total chez les macrophytes a été subdivisé entre les formes insolubles et solubles. Dans le cas des vallisnéries, prélevées le long d'un gradient de contamination en métaux, les formes solubles du Cd et du Cu semblent contribuer à l'augmentation du métal total alors que cela n'a été constaté qu'avec le Cu chez les myriophylles.

Par ailleurs, la présence des PC n'a pu être observée que pour des feuilles de myriophylles exposées au laboratoire et après une étape de concentration, la lyophilisation. Par la suite, nous avons davantage caractérisé le métal soluble entre les formes cationiques-neutres et anioniques (où devaient être retrouvé le métal complexé aux PC ou à d'autres agents complexants comme des acides organiques). On constate qu'une augmentation de la forme anionique du Cd contribue à l'augmentation du métal soluble pour *Vallisneria americana*; ceci n'a pas été observé pour *Myriophyllum spicatum*. La seule contribution du Cu anionique au Cu soluble a été retrouvée pour les feuilles de vallisnéries. La présence de métal sous forme anionique pourrait être attribuable à une complexation par des acides organiques ou par d'autres ligands intracellulaires. Ces composés agiraient donc comme mécanisme de défense. Comme la forme cationique du métal soluble est prédominante chez les myriophylles, cela laisse supposer que d'autres fonctions métaboliques pourraient être perturbées puisque le métal soluble n'est pas retrouvé lié à des composés cytosoliques de charge négative; ces derniers pouvant jouer un rôle dans le contrôle intra-cellulaire des métaux.

D'après l'ensemble des résultats de cette étude (M-soluble fonction de M-total; M-anionique contribuant à l'augmentation de M-soluble), *Vallisneria americana* semblerait offrir un meilleur potentiel comme bioindicateur que *Myriophyllum spicatum* vis-à-vis du Cd. Également, les parties vertes des vallisnéries sont composées uniquement de feuilles, ce qui permet des analyses plus homogènes qu'avec les myriophylles où des différences de concentrations en métaux entre les tiges et les feuilles peuvent être retrouvées.

## REMERCIEMENTS

Je tiendrait à remercier tout d'abord mon directeur Peter G.C. Campbell pour le support ainsi que l'encadrement prodigués tout au long de ce projet.

Merci aussi à Louise St-Cyr pour m'avoir été d'une aide des plus précieuses pour mon initiation à cette aventure "macrophytologique"...

Également, les campagnes d'échantillonnage n'auraient pas été ce qu'elles ont été (c'est à dire plaisantes) sans l'apport des Yves Couillard, Patrick Goupil, René Rodrigue et Louise St-Cyr.

Un merci spécial à Sylvie St-Pierre et Michelle Geoffroy-Bordeleau pour leur gentillesse, leur très bon conseil et, occasionnellement, aspirines lors des séances de laboratoire.

Ce contexte particulièrement enrichissant au niveau humain a permis de développer de solides amitiés avec des gens pour qui le mot partage (à tous les points de vue) prend tout son sens. Nul besoin de les nommer, ils devraient se reconnaître sans aucune peine.

Enfin, cette étude n'aurait pu être réalisée sans l'aide financière du Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et du Centre Saint-Laurent.



## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
REMERCIEMENTS.....	v
TABLE DES MATIÈRES .....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xiii
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
I.1    Problématique.....	1
I.2    Évaluation des impacts causés par la pollution métallique.....	2
1.2.1    Critères de qualité pour les sédiments aquatiques.....	2
1.2.2    Bioessais sur des sédiments contaminés.....	3
1.2.3    Expériences sur le terrain.....	5
I.3    Les plantes aquatiques comme biomoniteurs .....	8
1.3.1    Bioaccumulation des métaux .....	9
1.3.2    Indicateur biochimique .....	11
I.4    Mécanismes de tolérance.....	12
1.4.1    Exclusion.....	14
1.4.2    La détoxification.....	14
1.4.3    La tolérance biochimique .....	15
1.5    Phytochélatines.....	16
1.5.1    Nomenclature .....	16
1.5.2    Biosynthèse .....	18
1.5.3    Localisation cellulaire .....	21
1.5.4    Structure des complexes PC-M.....	21
1.5.5    Fonctions .....	22
1.5.5.1    Homéostasie des métaux.....	22
1.5.5.2    Métabolisme du soufre .....	22
1.5.5.3    Détoxification des métaux et tolérance.....	23
1.6    Objectifs et hypothèses.....	24
CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	27
2.1    Études sur le terrain.....	27
2.1.1    Région d'étude.....	27

2.1.1.1	Lac Saint-Pierre.....	28
2.1.1.2	Lac Saint-Louis .....	30
2.1.2	Choix des plantes.....	31
2.1.2.1	<i>Vallisneria americana</i> .....	32
2.1.2.2	<i>Myriophyllum spicatum</i> .....	33
2.1.3	Échantillonnage .....	34
2.1.4	Expériences d'exposition .....	35
2.2	Analyse des échantillons .....	36
2.2.1	Répartition intracellulaire du cadmium et du cuivre.....	36
2.2.1.1	Extraction .....	37
2.2.1.2	Chromatographie d'échange ionique.....	38
2.2.2	Chromatographie d'exclusion.....	39
2.2.3	Dosage des métaux.....	40
2.2.3.1	Digestions acides aux micro-ondes.....	40
2.2.3.2	Analyse des métaux.....	42
2.2.4	Dosage des phytochélatines par HPLC en phase inverse .....	42
2.2.4.1	Extraction de Rauser .....	43
2.2.4.2	Extraction de Grill.....	43
2.2.4.3	HPLC en phase inverse.....	44
2.3	Traitement des données .....	45
2.3.1	Expérience d'exposition.....	45
2.3.2	Bilan en métal.....	46
2.3.3	Analyses statistiques.....	46
CHAPTITRE 3: RÉSULTATS.....		47
3.1	Études sur le terrain.....	47
3.1.1	Contamination des eaux interstitielles.....	47
3.1.2	Valeurs totales en métaux.....	51
3.1.3	Répartition intracellulaire du Cd et du Cu.....	52
3.1.3.1	Influence de l'extraction sur les métaux.....	52
3.1.3.2	Variabilité des résultats.....	56
3.1.3.3	Bilan en métaux.....	57
3.2	Plantes exposées .....	60
3.2.1	Expériences d'exposition .....	60
3.2.2	Répartition intracellulaire du Cd et du Cu.....	63

3.2.3	Chromatographie d'exclusion.....	67
3.2.4	Dosage des PC par HPLC en phase inverse.....	71
3.2.4.1	Extraction de Rauser.....	71
3.2.4.2	Extraction de Grill.....	77
CHAPITRE 4:	DISCUSSION.....	81
4.1	Caractéristiques physico-chimiques du milieu.....	81
4.1.1	Lac Saint-Louis.....	81
4.1.1.1	Eaux.....	81
4.1.1.2	Sédiments.....	82
4.1.2	Lac Saint-Pierre.....	83
4.1.2.1	Eaux.....	83
4.1.2.2	Sédiments.....	85
4.2	Métal dans les plantes entières.....	85
4.2.1	Voies d'entrée des métaux.....	85
4.2.2	Comparaisons des valeurs totales en métaux chez les plantes aquatiques.....	93
4.2.3	Différences de bioaccumulation des métaux entre <i>Vallisneria americana</i> et <i>Myriophyllum spicatum</i> .....	95
4.2.4	Comparaisons entre deux méthodes pour le dosage du métal total.....	99
4.3	Répartition intracellulaire du Cd et du Cu.....	100
4.3.1	Influence de l'extraction sur les métaux.....	100
4.3.2	Variabilité des résultats.....	101
4.3.3	Métal soluble.....	103
4.3.4	Spéciation du métal soluble.....	109
4.3.4.1	Complexes PC-M.....	109
4.3.4.2	Les PC comme indicateur biochimique.....	113
4.3.4.3	Complexes GSH-métal.....	116
4.3.4.4	Acides organiques.....	116
4.3.4.5	Spéciation du métal soluble chez <i>Vallisneria americana</i> et <i>Myriophyllum spicatum</i> .....	117
CHAPITRE 5:	CONCLUSION.....	125
5.1	Conclusions générales.....	125
5.1.1	Rapport entre les macrophytes et les sédiments.....	125
5.1.2	Rapport entre les macrophytes et le métal total bioaccumulé.....	126

5.1.3 Spéciation du métal bioaccumulé par les macrophytes .....	127
5.2 Recommandations.....	127
CHAPITRE 6: BIBLIOGRAPHIE .....	131
A. ANNEXES.....	145
A.1 HPLC d'exclusion .....	145
A.1.1 Introduction.....	145
A.1.2 Protocole expérimental.....	145
A.1.2.1 Extraction .....	145
A.1.2.2 HPLC d'exclusion .....	146
A.1.3 Résultats et discussion.....	146
A.2 Utilisation du NaBH <sub>4</sub> .....	149
A.2.1 Introduction.....	149
A.2.2 Expériences effectuées.....	149
A.3 Comparaison entre les concentrations de métal pour les poids frais et les poids secs .....	151

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1:	Valeurs calculées de l'ion libre pour le cadmium et le cuivre aux lacs Saint-Pierre (août 1990) et Saint-Louis (août 1991). .....	50
Tableau 3.2:	Concentrations totales en cadmium et en cuivre pour les feuilles et les racines de <i>Myriophyllum spicatum</i> et de <i>Vallisneria americana</i> récoltées aux lacs Saint-Louis (SL) et Saint-Pierre (SP). .....	51
Tableau 3.3:	Concentrations moyennes en métal (x), écart-types (Sx) et coefficients de variation (C.V.) pour <i>Vallisneria americana</i> de la station SL-10 .....	56
Tableau 3.4:	Concentrations moyennes en métal (x), écart-types (Sx) et coefficients de variation (C.V.) pour <i>Vallisneria americana</i> de la station SP-2 et pour <i>Myriophyllum spicatum</i> de la station SL-7 pour des mesures en triple .....	57
Tableau 3.5:	Bilan de la répartition intracellulaire du Cd et du Cu pour <i>Vallisneria americana</i> récoltées aux lacs Saint-Louis (SL) et Saint-Pierre (SP) .....	58
Tableau 3.6:	Bilan de la répartition intracellulaire du Cd et du Cu pour <i>Myriophyllum spicatum</i> récoltées aux lacs Saint-Louis (SL) et Saint-Pierre (SP).....	59
Tableau 3.7:	Tableau récapitulatif des expériences d'exposition.....	62
Tableau 3.8:	Bilan de la répartition intracellulaire du Cd pour <i>Myriophyllum spicatum</i> (plantes témoin et exposées).....	64
Tableau 3.9:	Bilan de la répartition intracellulaire du Cd et du Cu pour <i>Vallisneria americana</i> après expériences d'exposition .....	64
Tableau 3.10:	Bilan de la répartition intracellulaire de Cd et du Cu pour <i>Myriophyllum spicatum</i> , ayant subi une épuration préalable, avant et après des expériences d'exposition .....	65

Tableau 3.11: Concentrations de groupements thiol pour les différents pics obtenus après HPLC en phase inverse pour des extractions au HCl sur <i>Myriophyllum spicatum</i> (plantes témoin et exposées) . .....	74
Tableau 4.1: Corrélations (r de Spearman) entre les concentrations extractibles de métal dans les sédiments [M] <sub>E</sub> ou d'ions métalliques [M <sup>z+</sup> ] avec les concentrations totales de métal pour des macrophytes (N individus) échantillonnés dans les lacs Saint-Louis et Saint-Pierre. (*, P < 0,1).....	87

## LISTE DES FIGURES

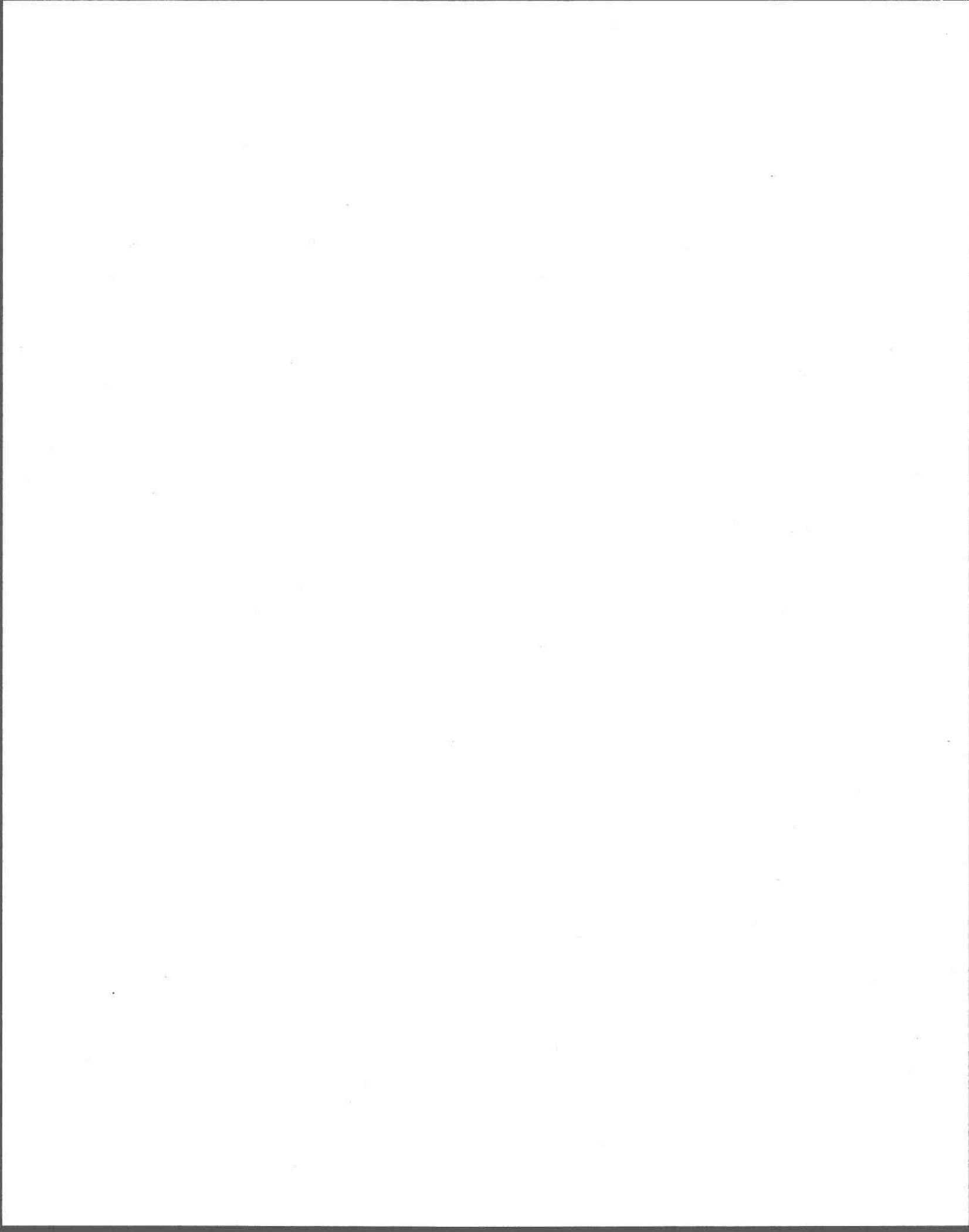
Figure 1.1:	Trois modèles de base pour la prise en charge des métaux par les plantes en fonction de la concentration des métaux dans le substrat. ....	10
Figure 1.2:	Schéma des réponses des fonctions des plantes suite à des perturbations provoquées par un stress et les événements menant au rétablissement de l'homéostasie .....	13
Figure 1.3:	Biosynthèse du glutathione (GSH) et des phytochélatines (PC) à l'échelle cellulaire. La synthèse des PC est induite par les métaux alors qu'il y a formation de polymères de GSH. ....	20
Figure 2.1:	Vue du système Saint-Laurent entre Cornwall et Québec.....	27
Figure 2.2:	Carte du lac Saint-Pierre et localisation des stations d'échantillonnage.....	29
Figure 2.3:	Carte du lac Saint-Louis et localisation des stations d'échantillonnage.....	31
Figure 2.4:	<i>Vallisneria americana</i> .....	32
Figure 2.5:	<i>Myriophyllum spicatum</i> .....	33
Figure 3.1:	Concentrations en métal pour les feuilles de <i>Myriophyllum spicatum</i> de la station SL-11 en fonction des fractions extraites avec le tampon Tris-HCl 10 mM.....	53
Figure 3.2:	Solubilité théorique du Cu et du Cd en fonction du pH selon des simulations faites avec le logiciel MINEQL pour: (A) système ouvert et (B) système fermé (sans CO <sub>2</sub> ).....	55
Figure 3.3:	Évolution temporelle du pH et des concentrations en métal dans le milieu d'exposition pour <i>Myriophyllum spicatum</i> .....	61
Figure 3.4:	Profil d'élution par chromatographie d'exclusion sur Sephadex G-50 pour des racines de <i>Myriophyllum spicatum</i> . (A) contrôle, (B) plantes exposées à 1 ppm Cu .....	68

- Figure 3.5: Profil d'élution par chromatographie d'exclusion sur Superose-12 pour des feuilles de *Myriophyllum spicatum* après chromatographie ionique. (A) contrôle, (B) plantes exposées à 2 ppm Cd ..... 70
- Figure 3.6: Profil d'élution sur HPLC en phase inverse avec dérivatisation post-colonne (réactif d'Ellman) et gradient 0 à 20% acétonitrile-TCA (0,1%) après extraction au HCl pour *Myriophyllum spicatum*. (A) racines contrôles, (B) racines exposées à 2 ppm Cd, (C) feuilles contrôles, (D) feuilles exposées à 2 ppm Cd ..... 72
- Figure 3.7: Profil d'élution sur HPLC en phase inverse avec dérivatisation post-colonne (réactif d'Ellman) et gradient 0 à 20% acétonitrile-TFA (0,1%) après chromatographie ionique sur Q-Sepharose pour les feuilles de *Myriophyllum spicatum*. (A) contrôle, (B) plantes exposées à 2 ppm Cd ..... 75
- Figure 3.8: Profil d'élution sur HPLC en phase inverse avec dérivatisation post-colonne (réactif d'Ellman) et gradient 0 à 20% acétonitrile-TFA (0,1%) après chromatographie d'exclusion sur Superose-12 pour les feuilles de *Myriophyllum spicatum*. (A) contrôle, (B) plantes exposées à 2 ppm Cd ..... 75
- Figure 3.9: Profil d'élution sur HPLC en phase inverse avec dérivatisation post-colonne (réactif d'Ellman) et gradient 0 à 20% acétonitrile-TFA (0,1%) après extraction de Grill pour les feuilles de *Myriophyllum spicatum*. (A) provenant de la serre et épurées, (B) exposées à 0,5 ppm Cd et 0,5 ppm Cu..... 78
- Figure 3.10: Profil d'élution sur HPLC en phase inverse avec dérivatisation post-colonne (réactif d'Ellman) et gradient 0 à 20% acétonitrile-TFA (0,1%) après extraction de Grill pour les racines de *Myriophyllum spicatum*. (A) provenant de la serre et épurées, (B) exposées à 0,5 ppm Cd et 0,5 ppm Cu..... 79
- Figure 3.11: Profil d'élution sur HPLC en phase inverse avec dérivatisation post-colonne (réactif d'Ellman) et gradient 0 à 20% acétonitrile-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,05%) après extraction avec le tampon Tris suivi d'une lyophilisation pour des feuilles de *Myriophyllum spicatum*. (A) contrôles, (B) exposées à 1 ppm Cu..... 80

- Figure 4.1: Concentrations extractibles de métal dans les sédiments, obtenues par la somme des fractions 1 à 3 de l'extraction séquentielle, versus les concentrations de l'ion métallique ( $M^{Z+}$ ) calculées pour l'eau interstitielle pour les stations des lacs Saint-Louis (SL) et Saint-Pierre (SP). (A) Cd; (B) Cu ..... 84
- Figure 4.2: Concentrations totales de cadmium pour des macrophytes entiers versus les concentrations de cadmium métallique ( $Cd^{2+}$ ) calculées pour l'eau interstitielle pour les stations des lacs Saint-Louis (SL) et Saint-Pierre (SP). (A) *Vallisneria americana*, (B) *Myriophyllum spicatum* ..... 89
- Figure 4.3: Concentrations totales de métal dans les feuilles versus les concentrations totales de métal dans les racines pour *Vallisneria americana* récoltées sur le terrain. (A) Cd; (B) Cu ..... 91
- Figure 4.4: Concentrations totales de métal dans les feuilles versus les concentrations totales de métal dans les racines pour *Myriophyllum spicatum* récoltées sur le terrain. (A) Cd; (B) Cu..... 92
- Figure4.5: Concentrations totales de métal dans les feuilles de *Myriophyllum spicatum* versus les concentrations totales de métal dans les feuilles de *Vallisneria americana* récoltées sur le terrain. (A) Cd , (B) Cu ..... 97
- Figure4.6: Concentrations totales de métal dans les racines de *Myriophyllum spicatum* versus les concentrations totales de métal dans les racines de *Vallisneria americana* récoltées sur le terrain. (A) Cd , (B) Cu ..... 98
- Figure 4.7: Concentrations de métal soluble versus les concentrations totales pour les feuilles de *Vallisneria americana* récoltées sur le terrain. (A) Cd, (B) Cu ..... 104
- Figure 4.8: Concentrations de métal soluble versus les concentrations totales pour les racines de *Vallisneria americana* récoltées sur le terrain. (A) Cd, (B) Cu ..... 105
- Figure 4.9: Concentrations de métal soluble versus les concentrations totales pour les feuilles de *Myriophyllum spicatum* récoltées sur le terrain. (A) Cd, (B) Cu ..... 106
- Figure 4.10: Concentrations de métal soluble versus les concentrations totales pour les racines de *Myriophyllum spicatum* récoltées sur le terrain. (A) Cd, (B) Cu ..... 107

- Figure 4.11: Concentrations de métal soluble versus les formes cationiques (+) et anioniques (-) du métal pour des feuilles de *Vallisneria americana* récoltées sur le terrain. (A) Cd, (B) Cu. .... 121
- Figure 4.12: Concentrations de métal soluble versus les formes cationiques (+) et anioniques (-) de métal pour des racines de *Vallisneria americana* récoltées sur le terrain. (A) Cd, (B) Cu. .... 122
- Figure 4.13: Concentrations de métal soluble versus les formes cationiques (+) et anioniques (-) de métal pour des feuilles de *Myriophyllum spicatum* récoltées sur le terrain. (A) Cd, (B) Cu. .... 123
- Figure 4.14: Concentrations de métal soluble versus les formes cationiques (+) et anioniques (-) de métal pour des racines de *Myriophyllum spicatum* récoltées sur le terrain. (A) Cd, (B) Cu. .... 124
- Figure A.1: Log du poids moléculaire (PM) en fonction du  $V_e/V_o$  pour les standards moléculaires: albumine bovine, albumine d'oeuf, anhydrase carbonique, MT de lapin, ribonucléase A, cytochrome C, aprotinine, vitamine B-12 et le tryptophane obtenus par HPLC d'exclusion sur colonne TSK G2000-SW; éluant: Tris-HCl 10 mM pH 7,0, NaCl 100 mM et  $\text{Na}_3\text{N}$  0,03 % à un débit de 0,5 mL/min ..... 147
- Figure A.2: Profil d'élution par HPLC d'exclusion sur colonne TSK G2000-SW; éluant: Tris-HCl 10 mM pH 7,0, NaCl 100 mM et  $\text{Na}_3\text{N}$  0,03 % à un débit de 0,5 mL/min pour *Vallisneria americana* et *Myriophyllum spicatum* exposés à 1 ppm Cu..... 148
- Figure A.3: Profil d'élution sur HPLC en phase inverse avec dérivatisation post-colonne (réactif d'Ellman) et gradient 0 à 20% acétonitrile-TFA (0,1%) pour: (A) GSSR en présence de  $\text{NaBH}_4$ ; (B) standards de Cys et GSH..... 150
- Figure A.4: Concentrations totales de Cd par g p. frais versus les concentrations totales de Cd par g p. sec pour *Vallisneria americana* récolté sur le terrain. (A) Feuilles; (B) Racines..... 152
- Figure A.5: Concentrations totales de Cu par g p. frais versus les concentrations totales de Cu par g p. sec pour *Vallisneria americana* récolté sur le terrain. (A) Feuilles; (B) Racines..... 153
- Figure A.6: Concentrations totales de Cd par g p. frais versus les concentrations totales de Cd par g p. sec pour *Myriophyllum spicatum* récolté sur le terrain. (A) Feuilles; (B) Racines..... 154

Figure A.7: Concentrations totales de Cu par g p. frais versus les concentrations totales de Cu par g p. sec pour *Myriophyllum spicatum* récolté sur le terrain. (A) Feuilles; (B) Racines..... 155



# CHAPITRE 1: INTRODUCTION

## I.1 Problématique

L'avènement de l'ère industrielle a apporté une mobilisation massive de métaux lourds qui ont été relâchés dans la biosphère. En fait, la toxicité totale annuelle de tous les métaux mobilisés excède la toxicité totale combinée de tous les déchets radioactifs et organiques générés chaque année, telle que mesurée par la quantité d'eau requise pour diluer de tels déchets aux critères standards d'eau potable (Nriagu et Pacyna 1988).

L'environnement aquatique n'est certes pas épargné et les concentrations de métaux traces qui y sont retrouvées fluctuent grandement dépendamment des perturbations naturelles ou provoquées par l'homme. Souvent les métaux traces sont retrouvés associés à des particules en suspension, lesquelles peuvent par la suite sédimenter. Donc ces augmentations d'apports anthropiques en métal sont reflétées dans les différentes couches des sédiments aquatiques. Ainsi, les sédiments superficiels ont des concentrations en métaux de beaucoup supérieures à celles retrouvées dans les sédiments anciens. Il importe alors de savoir si ces métaux ont des effets délétères sur l'écosystème environnant et de disposer de critères de qualité pour les sédiments, tout comme pour ceux existant déjà pour la colonne d'eau. De tels critères de qualité s'avéreraient très utiles pour les personnes chargées de la gestion de nos eaux, notamment si la restauration d'un cours d'eau et la récupération de son plein usage étaient envisagées (CCREM 1987; Stefan et al. 1985). Pour cela il faudrait: 1) identifier les sédiments contaminés; 2) évaluer le degré de contamination; 3) choisir parmi différentes options pour remédier au problème de contamination de ces sédiments; 4) évaluer l'efficacité des mesures de correction mises en oeuvre.

## I.2 Évaluation des impacts causés par la pollution métallique

Les approches utilisées pour définir l'impact des polluants (par les métaux ou autres contaminants) sur les écosystèmes aquatiques ont surtout fait appel aux expériences de laboratoire classiques (bioessais) et dans une moindre mesure, à l'observation des populations sur le terrain (CNRC 1985). Mais il n'y a pas encore de méthode universellement acceptée. Dans la section suivante, l'accent sera mis sur la pollution par les métaux et il sera question des approches utilisées pour définir les critères de qualité pour les sédiments aquatiques, de l'utilisation de bioessais sur les sédiments aquatiques et des études sur le terrain.

### 1.2.1 Critères de qualité pour les sédiments aquatiques

Dans ce contexte, différentes approches ont été suggérées pour évaluer le degré de contamination des sédiments:

- "approche teneur de fond" (sediment background concentration approach) (Giesy et Hoke 1990)
  - Le principe serait de déterminer le bruit de fond des sédiments en comparant la concentration du contaminant dans le sédiment à caractériser avec celle dans un sédiment non-contaminé. Bien que cette approche soit simple et rapide, elle a l'inconvénient majeur d'être peu utile pour un contaminant synthétique. De plus, il est souvent difficile de choisir un sédiment de référence approprié et l'approche ne supporte pas de bases biologiques (suppose que tout le contaminant est biodisponible et ignore la spéciation du contaminant).
  
- "approche des critères de qualité de l'eau" (water quality criteria approach) (Giesy et Hoke 1990)
  - Cette approche consisterait à comparer la concentration du contaminant dans l'eau interstitielle des sédiments avec les critères de qualité déjà

développés pour l'eau susjacente. Bien que cette approche soit simple et profite de la littérature extensive existant pour les critères de qualité développés pour la colonne d'eau, l'échantillonnage et l'analyse de l'eau interstitielle sont toutefois difficiles à cause des problèmes de contamination par les sédiments fins et les colloïdes. De plus, cette approche ignore la spéciation du contaminant dans l'eau interstitielle (notamment sa complexation avec la matière organique dissoute), suppose que l'eau est le vecteur principal d'exposition (ne tient pas compte de l'ingestion du sédiment contaminé) et suppose que la réponse (sensibilité) des organismes benthiques à des contaminants est comparable à celle des organismes qui furent utilisés pour établir les critères de qualité pour la colonne d'eau.

- "approche des équilibres de répartition" (equilibrium partitioning approach) (Di Toro et al. 1991)
- Cette méthode tiendrait compte de la répartition du contaminant qui se trouverait en équilibre avec les sédiments, l'eau interstitielle et le biota. Ces équilibres sont prévisibles à partir des propriétés chimiques et physiques du sédiment (ex.: teneurs en matière organique, Fe, Mn, pH) et du contaminant. Seule cette approche pourrait donner un aperçu de la biodisponibilité du contaminant en tenant compte implicitement de la spéciation de celui-ci dans l'eau interstitielle. Cependant, comme toutes les méthodes "chimiques", cette approche ne considère pas les contaminants non-mesurés. Aussi, elle ne tient pas compte des interactions possibles entre les différents contaminants pouvant être présents dans un même sédiment (synergie, antagonisme) et elle ne peut être utilisée pour les contaminants pour lesquels il n'y a pas de données toxicologiques.

### 1.2.2 Bioessais sur des sédiments contaminés

La plupart des bioessais effectués visent généralement à déterminer les concentrations létales et souslétales sur des organismes entiers. Ceci est généralement fait dans un milieu contrôlé, souvent pour

des temps fixes et pour des concentrations constantes qui dépassent, dans la plupart des cas, les concentrations retrouvées dans l'environnement. Ce type d'approche n'est pas sans quelques attraits puisqu'il requière relativement peu d'argent et peu de temps. Par contre, rarement est-il validé sur le terrain, ce qui rend pratiquement impossible les extrapolations du laboratoire vers l'environnement. Toutefois, ce type d'étude tend maintenant à se faire à des conditions plus près de celles retrouvées dans le milieu naturel. Voici quelques exemples d'approches employées pour les bioessais sur les sédiments contaminés et qui utilisent une approche semblable à celle développée pour les critères de qualité de l'eau (Burton 1991; Giesy et Hoke 1990).

- "bioessais avec sédiment ayant reçu des ajouts d'un contaminant (spiked sediment bioassay)
  - Un organisme test est exposé à différentes concentrations d'un contaminant dans un sédiment de référence pour établir une courbe concentration-réponse. Cette approche permet de tester différents organismes avec des contaminants individuels et des mélanges. Toutefois les différences possibles (MO, Fe, Mn, pH) entre le sédiment de référence utilisé, pour établir la courbe dose-réponse, et le sédiment naturel sont ignorées.
  
- "bioessais après dilution de sédiments" (dilution bioassay - sediments)
  - Cette approche consiste à prendre un sédiment très contaminé et à le diluer avec un sédiment "propre" puis exposer l'organisme test à ces sédiments de moins en moins contaminés pour établir une courbe concentration-réponse. Une fois cette courbe établie, on peut s'en servir pour caractériser d'autres sédiments sur la base de leur degré de contamination. En plus de tester différents organismes benthiques, cette méthode permet de maintenir un habitat normal (c'est-à-dire, exposition simultanée à des sédiments et à l'eau). Toutefois, on peut se poser les questions suivantes: comment choisir le sédiment comme diluant? Comment mélanger les sédiments sans provoquer de changements

géochimiques majeurs (réactions redox)? Pendant combien de temps faudrait-il attendre pour rétablir l'équilibre avant d'amorcer les bioessais?

- "bioessais après dilution de l'eau interstitielle" (dilution bioassay - interstitial water)
  - Cette technique consiste à prendre de l'eau interstitielle et à la diluer avec de l'eau "propre" puis exposer l'organisme test à ces eaux de moins en moins contaminées pour établir une courbe concentration-réponse. De nouveau, une fois cette courbe déterminée, on peut s'en servir pour caractériser d'autres sédiments en fonction du degré de contamination de leurs eaux interstitielles. Cette approche permet d'employer des organismes non-benthiques comme ceux employés pour déterminer les critères de qualité dans la colonne d'eau. Aussi, les dilutions sont plus faciles à réaliser que dans le cas de sédiments entiers. Par contre il est difficile d'obtenir suffisamment d'eau interstitielle pour les bioessais. Également, l'habitat benthique normal (c'est-à-dire, exposition simultanée à des sédiments et à l'eau) n'est pas maintenu.

### 1.2.3 Expériences sur le terrain

Par ailleurs, outre les approches de type "laboratoire", il existe aussi des approches sur le terrain. Cependant, il est souvent arrivé que les études sur le terrain se soient limitées à montrer une réponse immédiate et la récupération d'une population suite à une exposition aiguë à un contaminant donné, les effets chroniques étant difficilement mesurables. Ces études sont aussi très coûteuses, demandent beaucoup de temps et sont souvent insuffisantes pour donner une détection précoce d'une dégradation graduelle quelconque ou pour certifier une relation cause-effet avec un contaminant donné.

Un problème fondamental est qu'il est difficile de tenir compte des variations intrinsèques du système à protéger. Comme de petits changements subtils sur les populations, les communautés et l'écosystème ne pourraient être apparents qu'après un long temps d'exposition et comme

l'investigation, le diagnostic et les correctifs à apporter pour des problèmes d'ordre chimique prendraient encore plus de temps, l'approche traditionnelle aux études sur le terrain serait inadéquate pour prévenir des dommages environnementaux significatifs. Maintenant, les différentes approches tendent à évaluer la contamination chronique pour des concentrations en contaminants retrouvées dans l'environnement.

- "le seuil d'effets apparents" (apparent effects threshold approach) (Barrick et al. 1989)
  - Le principe est de déterminer la concentration de contaminants dans les sédiments pour laquelle des effets statistiquement significatifs sont "toujours" observés. Ce seuil est déterminé par analyse statistique de données de terrain ( $[ ]_{\text{séd}}$ ; effets biologiques). Cela nécessite toutefois une très grande banque de données avec la même espèce et les mêmes paramètres toxicologiques. Cette approche ne tient pas compte d'interactions possibles entre différents contaminants présents dans un même sédiment (synergie, antagonisme). Il y aurait aussi des ambiguïtés concernant la détermination de la concentration de contaminant dans les sédiments (concentration totale ou extractible?).
  
- "l'analyse des concentrations provoquant un effet" (screening level concentration approach) (Giesy et Hoke 1990)
  - Le principe est semblable à l'approche précédente où la distribution d'invertébrés benthiques est comparée avec la concentration du contaminant dans le sédiment. Il s'agit alors de déterminer les percentiles 95% de la distribution des animaux et de la distribution des concentrations puis, d'estimer la concentration de contaminant dans les sédiments qui est tolérée par 95% des invertébrés benthiques. En plus d'utiliser des méthodes statistiques, en se servant de données réelles provenant du terrain, cette approche ne suppose pas de relations causales. Elle exige toutefois beaucoup de données et ne tient pas compte d'interactions possibles entre différents contaminants présents dans un même sédiment (synergie, antagonisme).

Ces différentes approches pourraient servir pour la gestion des sédiments. Ainsi, il a été suggéré trois niveaux correspondant chacun à un seuil d'effet sur le milieu (Procéan 1991):

- Niveau 1 Seuil sans effet

Ce niveau correspond à la teneur de base, sans effet chronique ou aigu sur les organismes benthiques, sur la qualité de l'eau. Le milieu est considéré intègre lorsque les concentrations enregistrées ne dépassent pas ce seuil. Au-dessus, des impacts potentiels sur les organismes benthiques et sur les utilisations de l'eau sont possibles. L'approche "teneur de fond" a été sélectionnée pour évaluer ce niveau.

- Niveau 2 Seuil d'effets mineurs

Ce seuil correspond à la teneur où l'on observe des effets minimaux sur les organismes benthiques. Ainsi, si les concentrations dépassent ce niveau, un examen environnemental attentif et des mesures pour l'élimination de ce problème doivent être envisagées. L'analyse des concentrations provoquant un effet a été utilisée pour l'évaluation de ce seuil.

- Niveau 3 Seuil d'effets néfastes

Ce niveau se définit comme la teneur critique au-dessus de laquelle les dommages aux organismes benthiques sont majeurs. Cela correspond également au niveau de contamination au-delà duquel il faudrait tarir les sources de contamination et envisager la possibilité de restaurer le milieu affecté. Comme pour le niveau 2, l'analyse des concentrations provoquant un effet a été utilisée pour l'évaluation.

Un autre type d'étude pour évaluer "l'état de santé" d'un écosystème serait l'utilisation de biomarqueurs. Il s'agit de l'approche qui a été explorée chez les plantes aquatiques supérieures dans ce mémoire et qui est expliquée dans la section qui suit.

### I.3 Les plantes aquatiques comme biomoniteurs

A plusieurs endroits dans le système Saint-Laurent entre Cornwall et Québec, le degré de contamination des sédiments en métaux toxiques pourrait compromettre son plein usage (Hardy et al. 1990; Jarry et al. 1985; Sérodes 1978). Il arrive souvent, non pas par hasard, que ces sites contaminés présentent des caractéristiques (faible profondeur; vitesses de courant lentes; sédiments fins et riches en matière organique; ...) qui favorisent le développement d'herbiers.

Ainsi, les nombreux herbiers de plantes aquatiques jouent un rôle prépondérant dans la dynamique biologique du fleuve Saint-Laurent, assurant aux diverses communautés animales (poisson, sauvagine, rat musqué...) du support, de l'abri, du couvert, des sites de repos, des aires d'alimentation et de reproduction, .... (Gravel et Lévesque 1977). Les plantes aquatiques du fleuve jouent aussi un rôle dans la dynamique des contaminants qui arrivent dans le fleuve, indirectement en influençant la vitesse des courants et donc la sédimentation et la resuspension de la fraction fine des sédiments en suspension (laquelle joue un rôle clé dans le transport des contaminants), et directement, par la bioaccumulation saisonnière des contaminants. Il importe alors de bien comprendre les relations entre les plantes aquatiques et les sédiments contaminés, avant d'élaborer des stratégies de gestion pour ces sites cibles.

Donc, de par le fait que les plantes aquatiques sont omniprésentes dans le système Saint-Laurent et de leur rôle dans la dynamique des contaminants, tout semble indiquer qu'elles offriraient un potentiel intéressant en tant que biomoniteurs dans le système fluvial.

### 1.3.1 Bioaccumulation des métaux

La plupart des travaux publiés sur l'utilisation des macrophytes comme bioindicateurs de la présence dans leur milieu de métaux traces "disponibles" sont basés sur la capacité des plantes aquatiques à concentrer divers éléments (As, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn) dans leurs tissus (Aulio 1980; Franzin et McFarlane 1980; Miller et al. 1983; Mortimer 1985; Ray et White 1976). Dans cette littérature, des facteurs de concentration, c'est-à-dire  $([M] - \text{plante}) / ([M] - \text{eau})$ , allant jusqu'à  $10^3$ - $10^4$  sont retrouvés.

Ainsi, il a été suggéré quatre critères pour l'emploi des macrophytes comme indicateurs (Franzin et Mcfarlane 1980; Miller et al. 1983; Ray et White 1976); que les plantes :

- 1) soient représentatives du secteur;
- 2) soient ubiquistes et faciles à échantillonner;
- 3) soient facilement identifiables;
- 4) aient un haut degré de tolérance aux métaux ainsi qu'un facteur de concentration élevé.

Cependant, la nature de la prise en charge des métaux traces par les plantes est grandement variable selon, entre autres, les espèces de plantes retrouvées et les différents métaux. Donc les quantités de métaux pouvant être retrouvées chez les organismes visés ne sont pas nécessairement reliées à celles qui pourraient être dosées directement dans le milieu.

Baker et Walker (1990) ont proposé de classer les plantes en trois groupes selon leur façon de prendre en charge les métaux:

- 1) Accumulateur: où les plantes concentrent les métaux de leur environnement retrouvés à de hautes ou de faibles concentrations;
- 2) Indicateur: où la concentration de métal retrouvée dans les tissus de la plante reflète la concentration de métal dans l'environnement. Une relation linéaire est retrouvée;
- 3) Par exclusion: où la concentration dans les tissus de plante est maintenue basse par rapport à l'environnement et ce, jusqu'à ce que de trop hautes concentrations en métal provoquent de sérieuses perturbations pouvant mener à un transport incontrôlé de part et d'autres des parois cellulaires de la plante.

Ces trois modèles sont schématisés à la figure 1.1. Dans plusieurs cas, dans la littérature, le modèle "indicateur" a été utilisé et cela, souvent sans s'assurer s'il était ou non vraiment applicable au cas étudié.

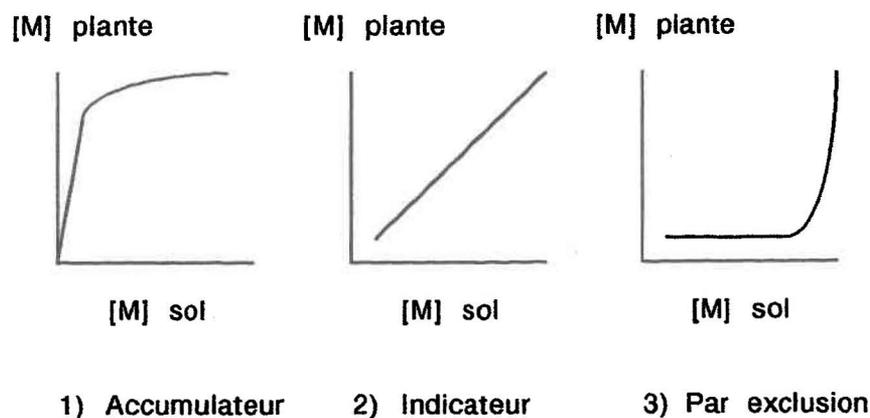


Figure 1.1: Trois modèles de base pour la prise en charge des métaux par les plantes en fonction de la concentration des métaux dans le substrat. (Adapté de Baker et Walker 1990)

Il a été question, jusqu'ici, de la bioaccumulation de métaux chez les plantes aquatiques et à leur emploi comme indicateur de la présence de métaux "biodisponibles" dans leur environnement. Considérons maintenant le destin des métaux à l'intérieur des plantes, c'est-à-dire la répartition subcellulaire des métaux bioaccumulés, et la possibilité d'employer cette répartition pour évaluer "l'état de santé" de la plante.

### 1.3.2 Indicateur biochimique

L'exposition des plantes aquatiques à des concentrations de métal sous-létales n'est pas sans provoquer d'effets chez l'organisme hôte et qui ne seraient pas nécessairement proportionnels à la quantité de métal bioaccumulée.

Une approche possible serait de contrôler chez des organismes individuels les réactions biochimiques qui se produisent après exposition à des métaux. Cela conviendrait mieux à l'évaluation de l'état des écosystèmes que les méthodes classiques basées sur le contrôle de paramètres biologiques. Le principe qui sous-tend cette approche est que tout effet toxique dans l'environnement débute par une réaction entre l'élément toxique et un récepteur biochimique dans un organisme vivant. La concentration de polluant requise pour déclencher cette réaction est souvent bien inférieure à celle provoquant une crise dans l'organisme ou une dégradation visible d'un écosystème donné. Ainsi la détection et la mesure de ces réactions chimiques pourraient fournir un outil sensible, spécifique et indicateur de stress dans l'environnement (CNRC 1985).

Afin de choisir des indicateurs biochimiques ("biomarqueurs") possibles chez les plantes aquatiques, susceptibles de répondre à une exposition sous-létale à des métaux toxiques, il convient de considérer les mécanismes de tolérance aux métaux qui peuvent exister chez les plantes.

## I.4 Mécanismes de tolérance

Dans un contexte toxicologique et évolutif, la réponse des plantes à l'exposition de métaux a reçu beaucoup d'attention, mais les événements biochimiques et génétiques impliqués dans l'acclimatation des plantes en réponse aux métaux sont moins bien compris. En fait, les plantes font face à un dilemme: pour un métabolisme optimal elles requièrent un supplément de Zn, Cu, Se et Ni comme oligoéléments nutritifs. Cependant, lorsque retrouvés en excès, ces métaux deviennent toxiques. Aussi, à cause des activités industrielles de l'homme, les plantes sont de plus en plus exposées à des métaux traces tels que Cd, Pb, Ag et Hg qui, loin d'être des oligoéléments nutritifs, sont plutôt toxiques à de très petites doses (Rausser 1990; Reddy et Prasad 1990; Steffens 1990). Les plantes doivent donc s'adapter à cette situation et cela par l'instauration de mécanismes de défense ou de tolérance. Ainsi, les processus physiologiques et les voies biochimiques menant au maintien ou à la restauration de l'homéostasie cellulaire pour des cellules soumises à un stress sont la base du génotype "tolérant au stress". La figure 1.2, adaptée de Cumming et Tomsett (1992), donne les différentes voies de bifurcation pouvant être prises par les génotypes tolérants ou sensibles à un stress et cela, suite à n'importe quel type de stress.

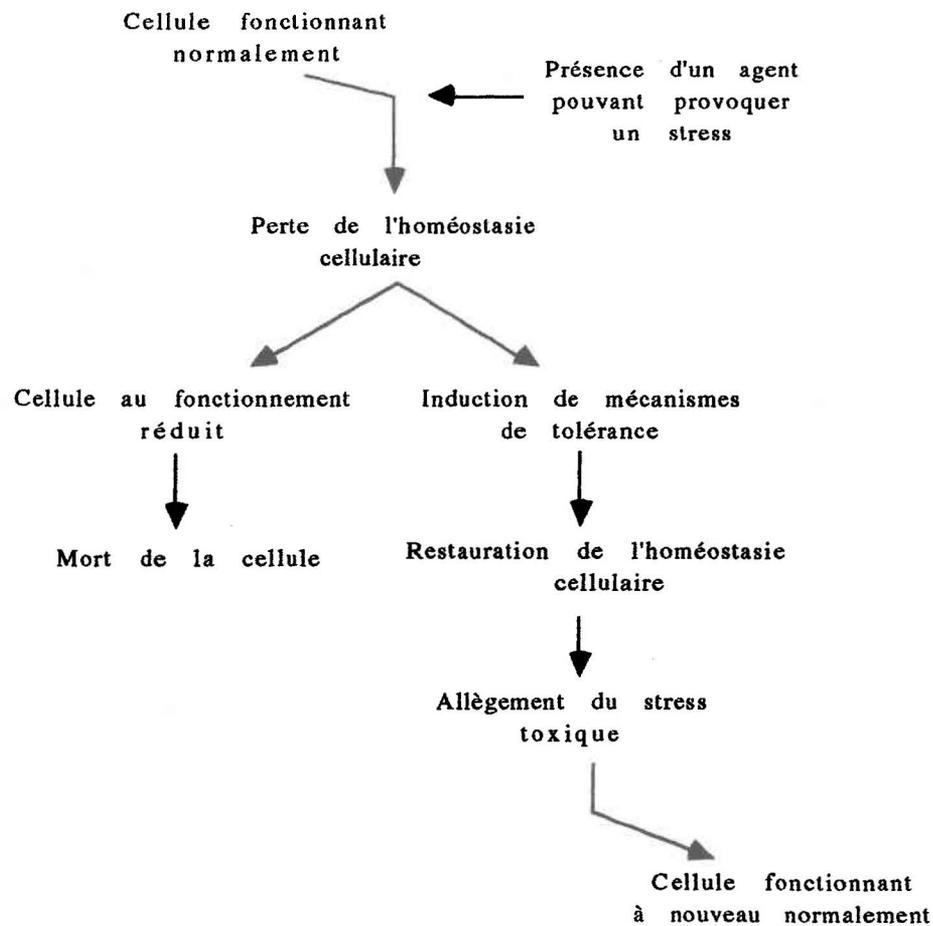


Figure 1.2: Schéma des réponses des fonctions des plantes suite à des perturbations provoquées par un stress et les événements menant au rétablissement de l'homéostasie. (Adapté de Cumming et Tomsett 1992).

Donc la transduction d'un signal (métal) en une réponse métabolique est l'étape cruciale qui déterminera de la survie d'une cellule/d'un tissu/organisme (Cumming et Tomsett 1992). Berry (1986) a suggéré que les mécanismes de tolérance aux métaux soient classés en trois catégories: l'exclusion, la détoxification et la tolérance biochimique, chacune d'elles pouvant affecter la concentration en métal dans les tissus de différentes façons.

### 1.4.1 Exclusion

L'ion peut alors rester adsorbé à l'extérieur de l'organisme ou pénétrer à l'intérieur de celui-ci. Il a été suggéré que les mécanismes qui limiteraient la prise en charge dans les racines ou ceux qui limiteraient le transport à l'interface racines/eau interstitielle ou l'interface feuilles/eau susjacentes constitueraient la stratégie d'exclusion. Par exemple, la structure et le fonctionnement de la membrane plasmique pourraient être modifiés directement par les métaux ou par la cellule en réponse à une exposition. Ainsi les différences inhérentes ou la capacité d'un génotype tolérant d'altérer sa composition membranaire, comme la sélectivité des transporteurs d'ions, les charges de surface, la composition en acides gras ou le contenu en stérol, mèneraient à différentes réponses suite à l'exposition de métaux (Cumming et Tomsett 1992).

Les organismes ne répondent pas seulement aux conditions environnementales qui prévalent mais peuvent également modifier leur microhabitat en conséquence ou en réponse à un signal extracellulaire. L'exudation de ligands organiques dans l'environnement immédiat pouvant complexer les métaux avant même qu'ils ne puissent pénétrer les barrières physiques des plantes serait une autre stratégie d'exclusion. (Cumming et Tomsett 1992).

### 1.4.2 La détoxification

Les ions métalliques peuvent traverser la membrane plasmique et doivent conséquemment être détoxifiés par un ou plusieurs mécanismes dans le cytoplasme, si les fonctions normales de la cellule sont pour continuer. Les caractéristiques qui confèrent aux métaux leur toxicité sont leur grande densité de charge ainsi que leur constante de stabilité vis-à-vis des ligands intracellulaires. Les plantes supérieures disposeraient d'un système tampon pour les métaux intracellulaires et qui serait composé de substances chélatantes pouvant servir à maintenir la disponibilité des métaux essentiels à l'intérieur de certaines limites. Ce système pourrait

également servir à réduire la présence de métaux non-essentiels et potentiellement toxiques. La capacité de ces systèmes serait variable selon la synthèse *de novo* des composés ayant un pouvoir de chélation. Apparemment les plantes synthétiseraient une variété de substances telles que les acides aminés et les dérivés d'acides aminés, l'acide citrique, l'acide malique et les phytochélatines (Verkleij et Schat 1990); ces composés pourraient séquestrer les métaux en formant des chélates, ce qui aurait pour effet de réduire la concentration de l'ion métallique libre à l'intérieur de la plante. Une telle réduction correspondrait à une baisse de la biodisponibilité du métal, c'est-à-dire à une détoxification. De plus, les phytochélatines pourraient également servir comme système de transport vers les vacuoles où le métal serait transféré à d'autres ligands comme le citrate et le malate qui s'y retrouvent en fortes concentrations. Les plantes pourraient ainsi bénéficier d'une compartimentation sous-cellulaire des métaux là où il n'y aurait pas d'activité métabolique sensible s'y produisant.

Le présent projet s'attardera plus particulièrement à vérifier le potentiel d'une de ces classes d'agents complexants, les phytochélatines, comme indicateurs biochimiques.

### 1.4.3 La tolérance biochimique

Il se pourrait que des changements dans le métabolisme, autres que ceux impliqués dans la production d'agents chélatants ou dans le processus de compartimentation, joueraient aussi un rôle dans la tolérance aux métaux (Verkleij et Schat 1990). Premièrement, il y aurait la possibilité d'éviter ou contourner les processus métaboliques sensibles aux métaux par l'activation de voies métaboliques alternatives. Deuxièmement, les activités enzymatiques sensibles aux métaux pourraient continuer à s'exprimer suite à une synthèse accrue d'enzymes. Cependant, ces deux possibilités ne sont soutenues par aucune évidence. Il y aurait aussi la possibilité de changements dans la structure des enzymes qui diminueraient la perte d'activité imposée par la présence de métal sur certains sites actifs de ceux-ci.

## 1.5 Phytochélatines

Les ions métalliques toxiques peuvent pénétrer les cellules en employant les mêmes systèmes de prise en charge que ceux utilisés pour des ions tels que Cu et Zn qui sont physiologiquement importants. Donc la présence de mécanismes internes permettant de moduler la concentration des métaux entre le niveau déficient et le niveau toxique serait d'un grand avantage (Rauser 1990). La famille de protéines appelée métallothionéine (MT) pourrait jouer ce rôle en liant les métaux grâce aux différents groupements thiol (-SH) fournis par l'acide aminé cystéine (Cys).

Les métallothionéines ont été découvertes en 1957 dans les reins de chevaux (Margoshes et Vallee 1957) alors que la description initiale d'un composé pouvant lier le cadmium chez une plante a été présentée en 1977 (Casterline et Barnett 1977). Depuis, plusieurs chercheurs ont accumulé des évidences montrant chez les plantes, les algues et certains champignons la production de macromolécules pouvant lier le cuivre et le cadmium. La nature chimique de ces chélateurs s'est avérée très différente de celle des MT retrouvées chez les mammifères. Ainsi l'existence d'une nouvelle famille de polypeptides contenant des groupements thiol et pouvant lier les métaux a été établie.

### 1.5.1 Nomenclature

Des polypeptides peuvent être désignés "métallothionéines" lorsqu'ils possèdent la plupart des caractéristiques de la MT rénale de cheval:

- faible masse moléculaire,
- haut contenu en cystéine (Cys),
- absence d'acide aminé aromatique et d'histidine (His),
- abondance de la séquence Cys-X-Cys où X est un acide aminé autre que Cys,
- un spectre d'absorption dans l'ultraviolet caractéristique de l'absence d'acide aminé aromatique et de la présence du lien métal-thiol.

La subdivision en trois classes a donc été recommandée sur la base de la structure des polypeptides, pour les différents phénotypes, concernant la liaison métal-thiol (Rauser 1990; Robinson 1990; Steffens 1990):

Classe I: polypeptides ayant la Cys disposée de façon très similaire à la métallothionéine rénale de cheval;

Classe II: polypeptides ayant la Cys disposée de façon différente de la métallothionéine de cheval;

Classe III: polypeptides, non-synthétisés par transcription d'un gène, mais formant des chélates avec les métaux.

Les polypeptides de classe III qui sont retrouvés chez les plantes possèdent la structure inhabituelle  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  ou  $n$  peut varier de 2 à 11 (phytochélatines ou PC). En comparaison, le glutathione (GSH) possède la structure  $\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$  dans lequel le lien peptidique est formé avec le groupement carboxyle  $\gamma$  de l'acide glutamique plutôt qu'avec le carboxyle  $\alpha$  utilisé dans les liens peptidiques dont la synthèse provient des ribosomes (Steffens 1990). La biosynthèse des PC est donc enzymatique et reliée au GSH. Dans certains cas, pour le glutathione, la Gly est remplacée par la  $\beta\text{-Ala}$  donnant alors l'homo-glutathione et les polypeptides qui lui sont reliés sont donc appelés homo-phytochélatines. Les PC ont été retrouvées chez 200 espèces différentes de plantes des divisions taxonomiques *Bryophyta*,

*Pteridophyta* et *Spermatophyta* (Gekeler et al. 1989; Grill et al. 1990) ainsi que chez six des dix classes existantes de la division *Phycophyta* (algue) (Gekeler et al. 1988). Elles sont donc conséquemment considérées comme ubiquistes chez le règne végétal.

### 1.5.2 Biosynthèse

Chez les mammifères, la synthèse des MT est induite pendant le développement et la différenciation normale des cellules non seulement par certains métaux traces, mais également par les corticostéroïdes et par d'autres agents et stress oxydatifs (Durnam et Palmiter 1984). Ceci peut susciter un doute à savoir si le rôle primordial des MT est bien celui de l'homéostasie des métaux traces (Karin 1985). Pour leur part, les PC sont différentes puisque les métaux lourds sont les inducteurs primaires de leur synthèse. Les Ag, Au, Bi, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, Te, Zn, W, arsenate et sélénate induisent la synthèse des PC alors qu'avec Al, Ca, Co, Cr, Cs, K, Mg, Mn, Na, Va et molybdate aucune PC ne peut être détectée (Rausser 1990). Également, le Cd est l'inducteur le plus puissant alors que le Zn, étant le plus faible, requiert de très hautes concentrations pour l'induction. En fait, un parallèle peut être établi entre les toxicités relatives de ces deux éléments.

La figure 1.3 illustre la synthèse des PC. Dans ce schéma, le métal en solution, représenté ici sous la forme d'ion libre, peut réagir avec un ligand (L) présent sur la surface de la membrane cellulaire. Cette réaction est normalement très rapide en comparaison au taux de transport à travers cette membrane, donnant ainsi un état de quasi-équilibre entre le métal dissous et le métal fixé à la surface biologique (Morel 1983). Selon Tessier et Campbell (1990), le taux de transport du métal à travers la membrane est proportionnel à la concentration de sites de fixation membranaire et, également, à la concentration de l'ion libre. Cette dernière forme serait donc meilleure pour prédire la biodisponibilité d'un métal donné que sa concentration totale.

Le GSH est synthétisé enzymatiquement en deux étapes. L'enzyme  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase combine le Glu et la Cys pour former  $\gamma$ -Glu-Cys auquel la Gly est par la suite ajoutée pour former le glutathione, sous l'influence de la glutathione synthétase (figure 1.3) (Meister et Anderson 1983; Rennenberg 1987).

Lorsque les végétaux sont exposés aux métaux traces, la phytochélatine synthase, un enzyme constitutif, catalyse le transfert du  $\gamma$ -glutamylcystéine d'un GSH à une autre molécule de GSH formant alors  $(\gamma$ -Glu-Cys)<sub>2</sub>-Gly (figure 1.3). Il en va de même pour l'addition d'un autre  $\gamma$ -glutamylcystéine du GSH aux oligomères de PC pour permettre l'allongement de la chaîne (Grill et al. 1989).

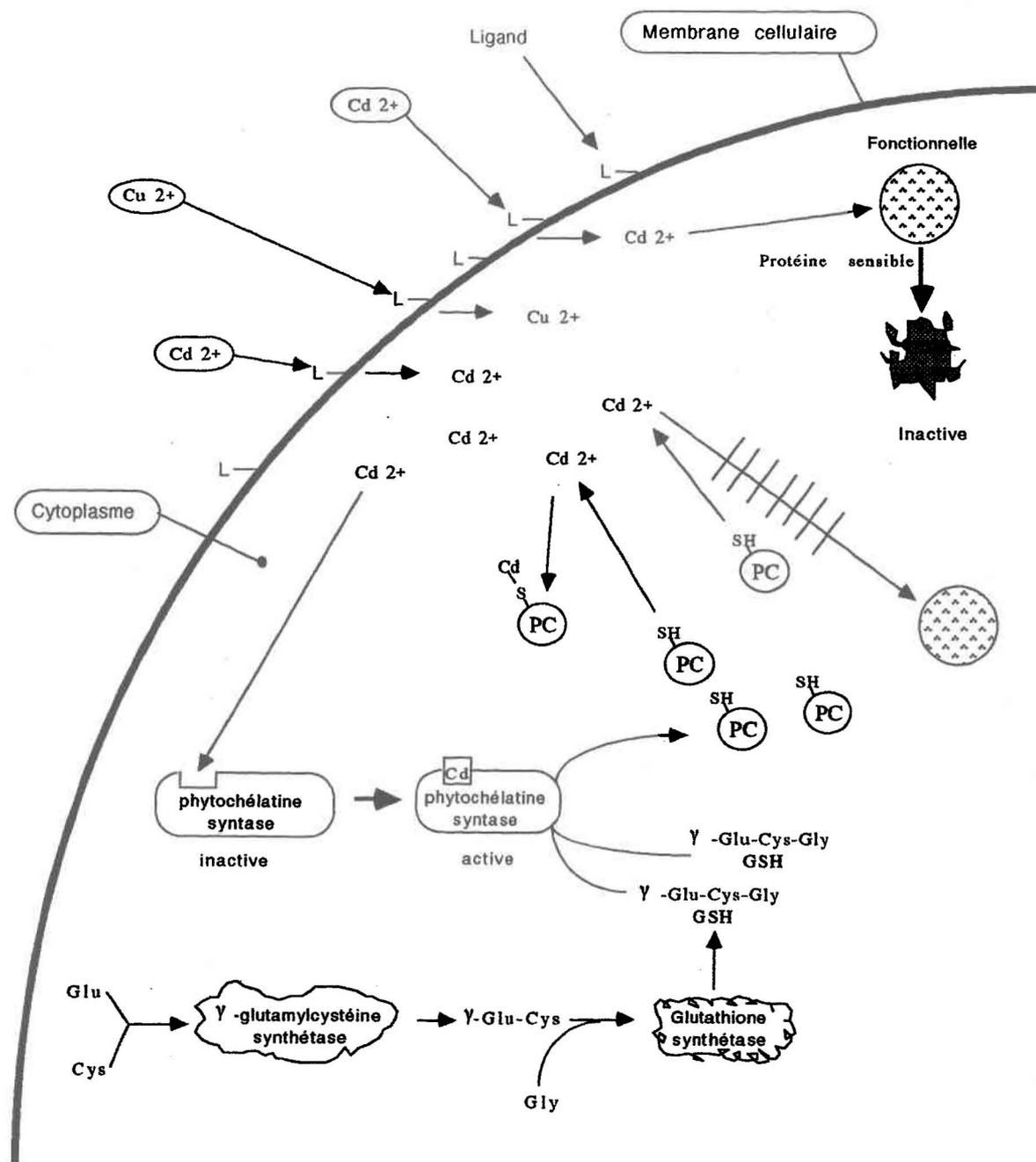


Figure 1.3: Biosynthèse du glutathione (GSH) et des phytochélatines (PC) à l'échelle cellulaire. La synthèse des PC est induite par les métaux alors qu'il y a formation de polymères de GSH (Grill et al. 1989; Meister et Anderson 1983; Rennenberg 1987)

Lorsque des cultures de cellules sont exposées à de fortes concentrations de  $\text{Cd}^{2+}$ , la quantité de PC augmente drastiquement pour ensuite donner un plateau qui sera maintenu jusqu'à ce que le milieu ne contienne plus de métaux. Par la suite le niveau de PC diminue graduellement, probablement dû à la dégradation des peptides (Steffens 1990). Il s'agit d'une boucle rétroactive dans laquelle les métaux activent la PC synthase; lorsque suffisamment de PC ont été synthétisées pour séquestrer les ions métalliques libres, l'activité enzymatique cesse.

### 1.5.3 Localisation cellulaire

Comme le GSH est surtout extravacuolaire et que les enzymes participant à la biosynthèse des PC sont localisés dans le cytoplasme, la synthèse des PC est aussi présumée être cytoplasmique (Steffens 1990). Toutefois, de récents travaux ont démontré la compartimentation vacuolaire de PC (Krotz et al. 1989; Wagner et Krotz 1989). Donc plutôt que d'être seulement un moyen statique de séquestrer les ions métalliques, les PC pourraient faire partie d'un système de transport où les métaux seraient transférés du cytoplasme aux vacuoles pour entreposage. Le pH vacuolaire varie de 3,5 à 6,0 et le Cd peut être retiré des PC à des valeurs de pH de 5 à 3,5, dépendant de la quantité de sulfure labile à l'acide associée aux PC. Ainsi, les métaux pourraient être transférés des PC à d'autres ligands comme le malate et le citrate qui peuvent se retrouver à de très hautes concentrations dans les vacuoles. Par la suite, les PC pourraient être recyclées ou dégradées.

### 1.5.4 Structure des complexes PC-M

Bien que plusieurs métaux peuvent induire les PC, le complexe PC-M a seulement été démontré pour Cd, Cu, Pb et Zn. Aussi, la liaison avec le Zn a été difficile à démontrer due à la faible affinité du ligand pour ce métal. Comme la longueur des ligands PC est hétérogène et qu'une multitude de combinaisons sont possibles entre ces ligands et les métaux, la

stoichiométrie est donnée en termes de moles de sulfhydryles plutôt qu'en moles de peptides. Le ratio Cys-SH : métal dans les complexes est de 2:1 pour le Cd, Zn et Pb et de 1:1 pour le Cu (I) (Grill 1989). Également la longueur de la chaîne des PC joue un rôle dans l'affinité que peuvent avoir les polypeptides pour lier les métaux. Pour le Cd, le pH de demi-dissociation pour  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  ou  $n= 1, 2$  et  $3$  est respectivement de 6,4 , 5,4 et 4,9, indiquant ainsi que l'affinité augmente avec la longueur de la chaîne (Steffens 1990). La présence de sulfure labile à l'acide dans les complexes PC-Cd augmenterait également la stabilité effective du complexe; le pH de demi-dissociation est de 4 avec présence du sulfure et de 5,4 sans sulfure (Reese et al. 1988). Signalons que le Cd est moins fortement lié que le Cu pour lequel un pH de 1,3 cause la demi-dissociation des complexes (Rauser 1990).

## 1.5.5 Fonctions

### 1.5.5.1 Homéostasie des métaux

Le cuivre et le zinc sont des oligoéléments nutritifs essentiels mais qui peuvent aussi interférer avec les groupements sulphydryles des protéines. La séquestration temporaire de ces métaux via les PC réduirait le contenu d'ions libres dans la cellule, permettant ainsi d'avoir un métabolisme non perturbé. Lorsque de nouveaux enzymes requérant le Cu ou le Zn seraient formés, les complexes polypeptides-métal fourniraient alors les cofacteurs nécessaires que peuvent être certains métaux traces.

### 1.5.5.2 Métabolisme du soufre

L'acidification de complexes purifiés de PC résulte en la libération de  $\text{H}_2\text{S}$  indiquant ainsi la présence de sulfure labile à l'acide (Steffens 1990). En plus de permettre une meilleur stabilité des complexes PC-métal, la présence de sulfure pourrait servir dans la réduction du sulfate alors que ce type de complexe servirait comme transporteur de soufre (Steffens et al. 1986). Cependant cette association n'a, jusqu'à maintenant, été retrouvée

qu'avec le cadmium. Il se pourrait donc qu'il s'agisse d'une aberration dans les métabolismes du soufre et des PC déclenchée par le Cd, qui est un élément non-essentiel. Il pourrait aussi s'agir d'une fonction normale mais grandement accentuée par le Cd et qui resterait à découvrir avec les éléments essentiels comme le cuivre et le zinc (Rausser 1990).

#### 1.5.5.3 Détoxification des métaux et tolérance

Le rôle des phytochélatines dans la détoxification de métaux a surtout été étudié par l'utilisation de cultures de cellules exposées à de hautes concentrations de cadmium. La synthèse de PC est un des rares exemples dans la biologie végétale où il peut être facilement démontré que la réponse à un stress (production de PC) est vraiment une réponse adaptative. Cependant jusqu'à quel point cette réponse importe-t-elle dans la tolérance des plantes lorsqu'exposées à des métaux n'est pas encore clairement déterminée. Des études utilisant le buthionine sulfoximine (BSO), un inhibiteur de la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase (impliquée dans la synthèse du GSH), ont donné les premières évidences que les PC sont nécessaires pour la détoxification des métaux lourds. Effectivement, des cellules traitées avec le BSO deviennent susceptibles à l'action des métaux lourds; une inhibition de croissance est observée pour des concentrations qui n'avaient aucun effet sur des cellules non-traitées au BSO. L'addition de GSH exogène rétablit cependant une croissance normale chez des cellules exposées au Cd et traitées au BSO. Pour ce qui est des cellules exposées au cuivre, en présence de BSO, les impacts négatifs sont moins prononcés, seulement une diminution de croissance étant observée (Steffens 1990).

Bien que les PC chélatent la majeure partie du métal pour des cellules tolérantes au Cd, il est nécessaire de reconnaître que d'autres mécanismes de complexation (comme l'utilisation du malate ou du citrate) et/ou d'amélioration physiologique pourraient être prédominants pour des plantes dont la croissance s'effectuerait dans un environnement où les concentrations de Cd disponible seraient beaucoup plus basses que celles utilisées pour les expériences d'exposition (Rausser 1990). Dans les mêmes

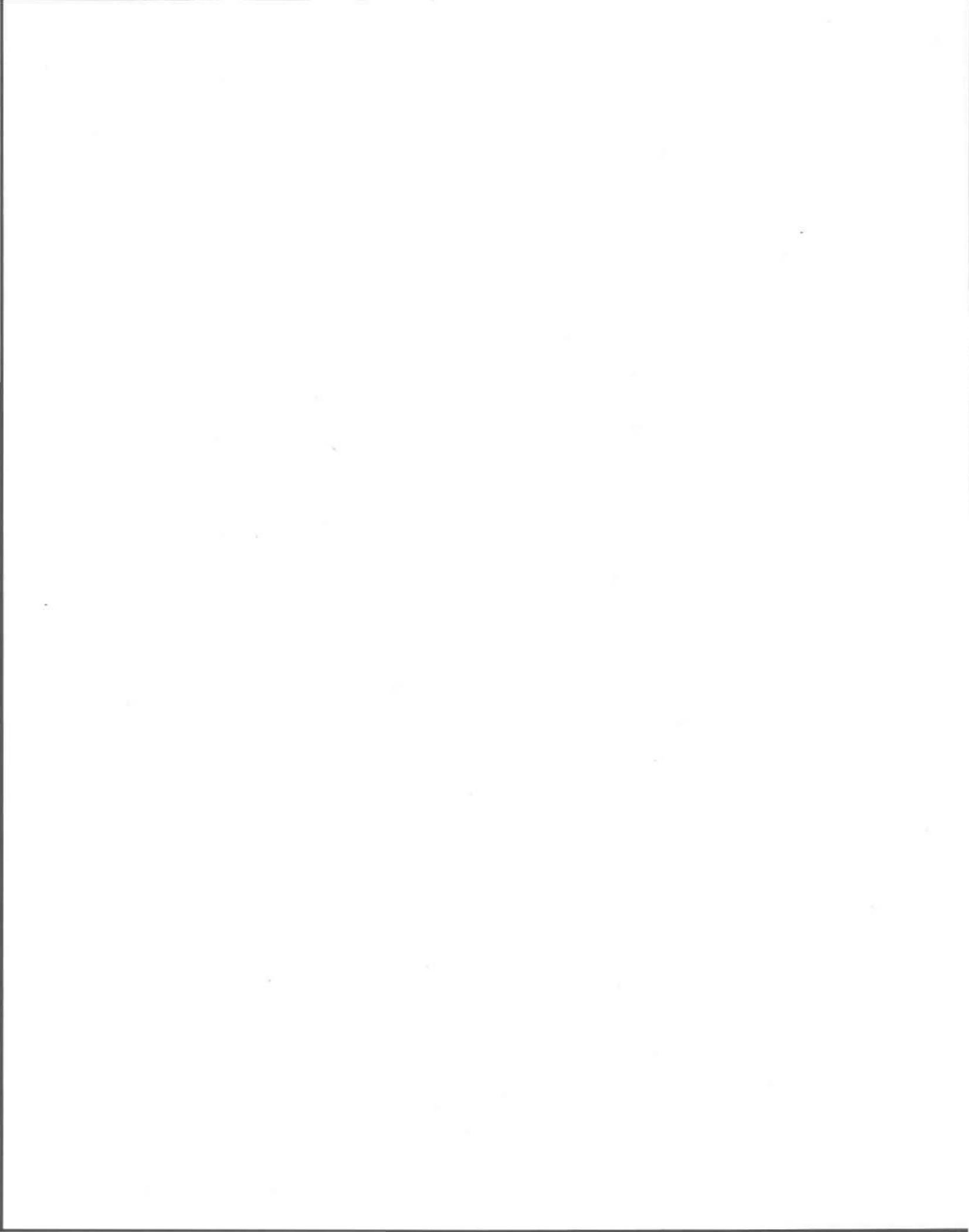
circonstances, il reste à savoir si les PC sont les agents chélatants majeurs pour d'autres métaux et à définir leur véritable rôle dans la régulation des métaux traces.

## 1.6 Objectifs et hypothèses

La majorité des études du rôle des PC dans la détoxification des métaux ont été réalisées en utilisant des cultures de cellules. L'emploi de cellules végétales en culture comporte plusieurs avantages: haute activité métabolique des cellules, exposition directe de cellules simples au métal (excluant par le fait même les problèmes de transport vasculaire retrouvés avec des plantes entières) et l'absence de microorganismes qui pourraient interférer avec les résultats (Grill et al. 1990). Cependant, bien que cette approche aide à comprendre la biochimie du processus de synthèse des PC, il se peut que les résultats ne soient pas transposables à des plantes entières. D'autres études ont été réalisées avec des plantes entières (terrestres) en culture hydroponique, mais comme pour les cultures de cellules, les concentrations de métal utilisées étaient hautes ou même très hautes. Par exemple, les plantes agricoles sont normalement exposées à de très faibles doses de métal en solution (peut-être  $\leq 0,04 \mu\text{M Cd}$  et  $\leq 25 \mu\text{M Zn}$ ) dans des sols non-pollués à modérément pollués (Wagner et al. 1984; Wagner et Yeagan 1986). D'autre part, les concentrations utilisées pour des expériences avec des cultures de cellules varient de 45 à 1000  $\mu\text{M Cd}$  et de 300 à 2000  $\mu\text{M Zn}$ . Pour les plantes en culture hydroponique, ces concentrations peuvent varier de 0,1 à 6  $\mu\text{M Cd}$  et de 2 à 150  $\mu\text{M Zn}$  (Wagner et Krotz 1989). Donc pour des raisons de facilité expérimentale, la plupart des études faites jusqu'à maintenant ont impliqué des concentrations bien au-delà de celles que les plantes peuvent rencontrer dans la nature. On peut se demander si la réponse des plantes et des cultures de cellules végétales à de hautes concentrations reflète bien ce qui se produit pour des cas de faibles expositions.

Comme peu de recherches ont été faites sur les plantes aquatiques, le premier objectif de la présente étude sera de déterminer si ces dernières peuvent synthétiser les PC. Cette partie sera faite par des expériences au laboratoire où les macrophytes seront exposés à de hautes concentrations en métal. Le second objectif sera de vérifier si des plantes aquatiques recueillies dans le milieu naturel, suivant un gradient de contamination, affichent des concentrations de phytochélatines en proportion des quantités de métaux bioaccumulés (relation dose-réponse). Il s'agit donc d'évaluer le potentiel qu'offre ces peptides chélateurs comme indicateur biochimique d'une exposition chronique et *in situ* à des métaux traces.

En plus de doser les PC et la quantité totale de métaux bioaccumulés, nous déterminerons la répartition intracellulaire des métaux entre les formes cationiques et neutres versus la forme anionique (où devraient se retrouver les PC). Une attention particulière sera portée au cuivre et au cadmium puisqu'il s'agit des métaux donnant la meilleure induction des PC et avec lesquels les polypeptides ont les plus grandes affinités. Ces mêmes métaux sont également retrouvés dans les sites d'étude et peuvent être toxiques pour les macrophytes.

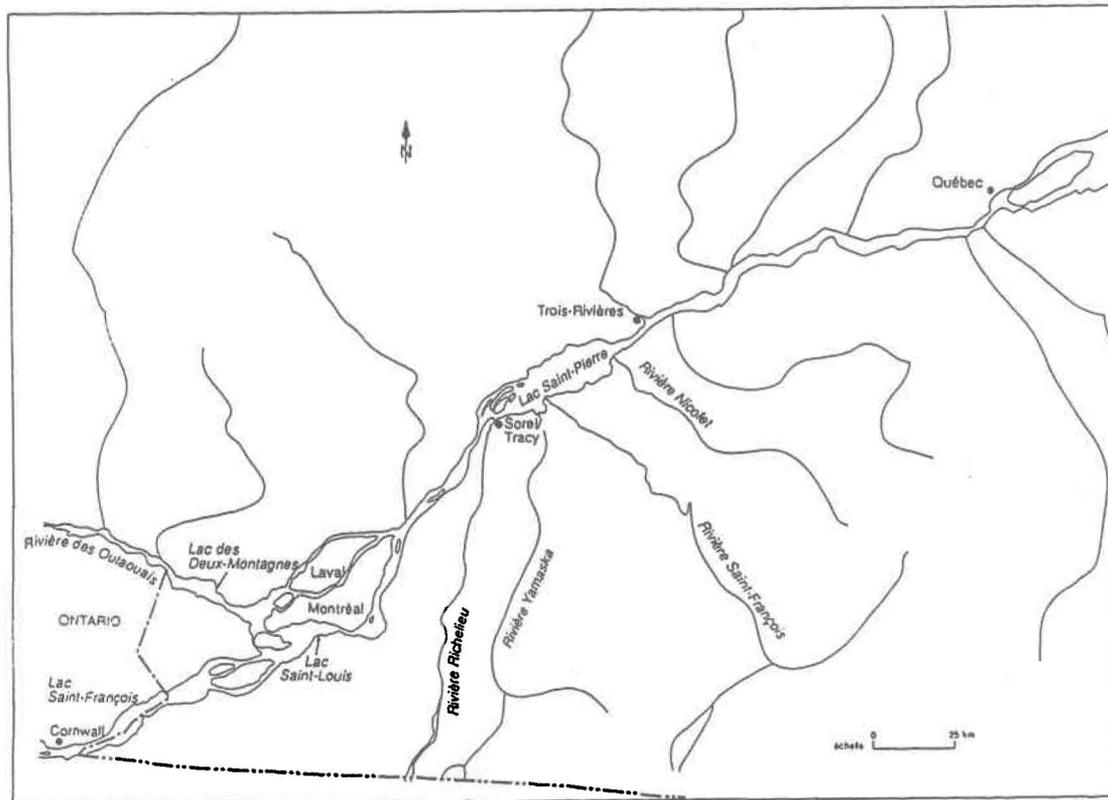


# CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 2.1 Études sur le terrain

### 2.1.1 Région d'étude

Cette étude a porté sur deux élargissements du fleuve Saint-Laurent: le lac Saint-Louis en amont de Montréal et le lac Saint-Pierre situé entre Sorel et Trois-Rivières (figure 2.1). Plusieurs métaux comme les formes extractibles du As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn ainsi que le Hg total font parties d'une liste de substances retenues pour l'évaluation routinière de la qualité des sédiments du Saint-Laurent car reconnues comme étant des contaminants majeurs dans les sédiments (Environnement Canada 1992).



Source: Jarry et al. (1992)

Figure 2.1: Vue du système Saint-Laurent entre Cornwall et Québec.

### 2.1.1.1 Lac Saint-Pierre

Dernier élargissement majeur du fleuve Saint-Laurent avant l'estuaire, le lac Saint-Pierre s'étend de Sorel à Trois-Rivières. D'une superficie totale de plus de 400 km<sup>2</sup>, son bassin de drainage inclut la région métropolitaine de Montréal ainsi que la région internationale des Grands Lacs. Ce lac reçoit aussi les eaux de plusieurs tributaires, les principaux étant les rivières Richelieu, Yamaska, Saint-François et Nicolet (figure 2.2). La contamination de ce tronçon du fleuve a été constatée alors que des teneurs élevées en métaux lourds et en contaminants organiques ont été retrouvées dans les sédiments, dans l'eau de surface, de même que dans les poissons (Hardy et al. 1990).

Le lac peut être divisé en trois secteurs: le secteur des îles de Sorel, la rive nord du lac et la rive sud. La partie vers l'amont du lac est composée d'une multitude d'îles, dont certaines artificielles et formées à partir des matériaux dragués lors du creusement de la voie maritime. La partie vers l'aval du lac, qui s'étend des embouchures des rivières Maskinongé et Yamaska jusqu'à celle de la rivière Nicolet, a une profondeur généralement inférieure à 3 m, sauf dans la voie maritime, qui passe environ au centre du lac et dont la profondeur est d'environ 11 m. La partie sud du lac constitue une zone de tir sous la juridiction de la base militaire de Nicolet (Hardy et al. 1990).

Le débit annuel moyen du fleuve est 8 800 m<sup>3</sup>/s à l'entrée du lac et de 10 000 m<sup>3</sup>/s à la sortie, près de Nicolet. Ainsi, l'apport d'eau des nombreux tributaires est importante alors qu'une augmentation du débit du fleuve de 15 % peut être observée. La vitesse du courant est de l'ordre de 1 m/s dans le chenal de la voie maritime et de moins de 0,3 m/s de part et d'autre (Environnement Canada 1981).

Pour ce qui est de la végétation aquatique, elle est constituée d'herbiers littoraux émergents dont la limite est représentée par des pointillés sur la figure 2.2. De plus, on y retrouve aussi des herbiers

submergés qui peuvent couvrir jusqu'à 50 % de la superficie du lac et dont les espèces *Vallisneria americana* et *Potamogeton richardsonii* sont celles dominantes (Lavoie et al. 1991).

Le principal apport de polluants provient des tributaires qui drainent des régions industrielles, des municipalités et des terres agricoles. Des substances polluantes de nature variée y sont ainsi rejetées. Des entreprises localisées dans la région des îles, appartenant majoritairement à l'industrie de la chimie inorganique et à celle de la métallurgie, sont responsables surtout de rejets élevés de matières en suspension et de plusieurs métaux lourds (Hardy et al. 1990).

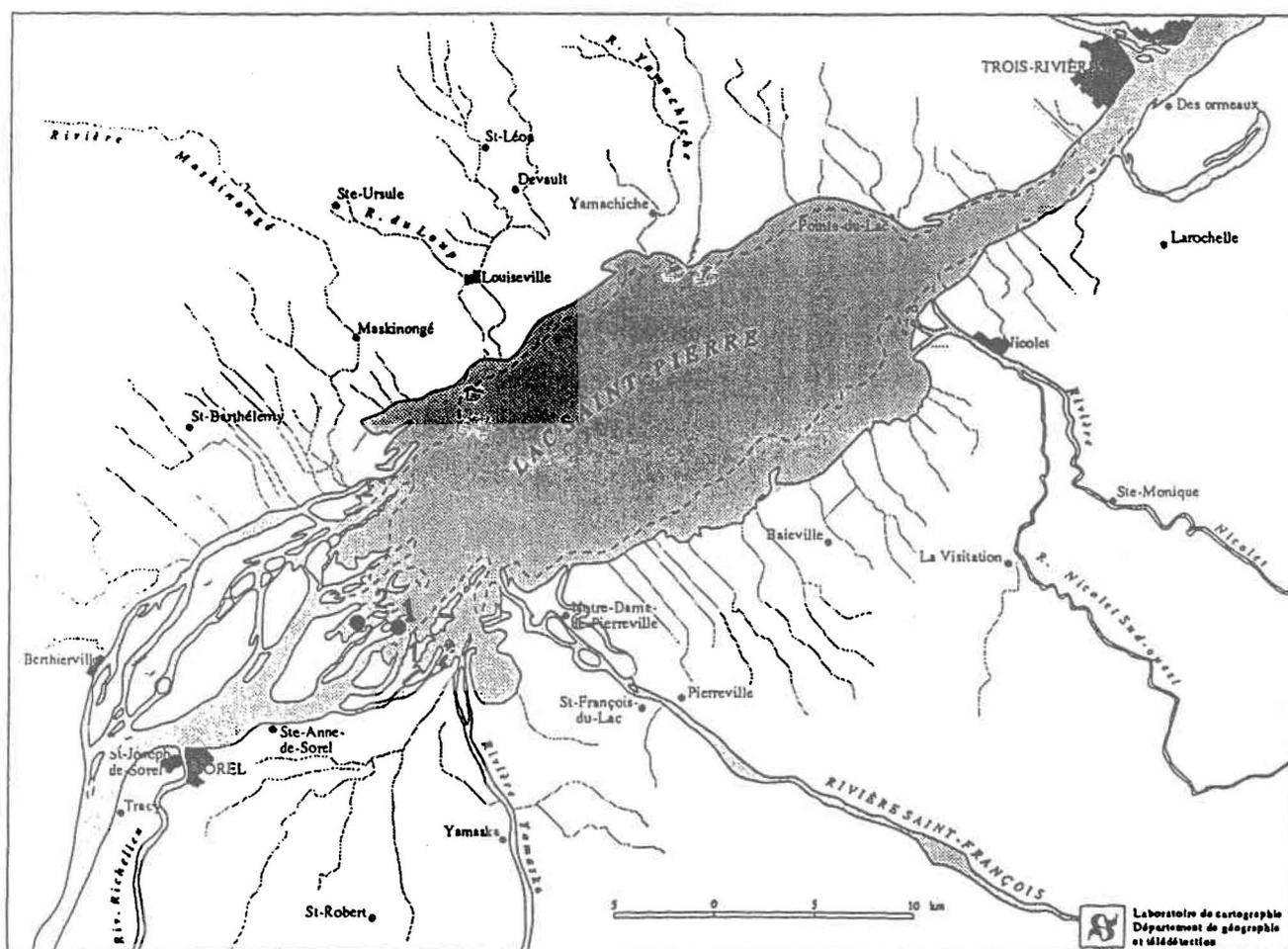


Figure 2.2: Carte du lac Saint-Pierre et localisation des stations d'échantillonnage. Les pointillés indiquent la limite des herbiers émergents.

### 2.1.1.2 Lac Saint-Louis

Le lac Saint-Louis est également un élargissement du fleuve Saint-Laurent (figure 2.3), situé au sud-ouest de l'île de Montréal et ayant une longueur de 23 km et une surface de 148 km<sup>2</sup>. La profondeur moyenne est d'environ 3 mètres alors que la profondeur maximale est de 28 mètres (Jarry et al. 1985). Ce lac reçoit de "l'eau brune", peu minéralisée, de la rivière des Outaouais via les deux côtés de l'île Perrot et de "l'eau verte", provenant des Grands Lacs et très minéralisée, en beaucoup plus grande quantité (13 fois plus) via le canal de Beauharnois et le fleuve Saint-Laurent. Ce lac se compose donc de deux masses d'eau fondamentalement distinctes ainsi que d'une masse d'eau mixte de caractéristiques intermédiaires. Les rivières Châteauguay, Saint-Louis et Saint-Jean constituent des tributaires mineurs.

*Vallisneria americana* et *Myriophyllum spicatum* semblent être les macrophytes qui dominent les herbiers du lac Saint-Louis (Dimension Environnement 1982).

Le lac Saint-Louis constitue l'un des plans d'eau les plus contaminés au Québec (Sérodes 1978). Ce lac est le site de rejets des égouts domestiques et industriels de l'ouest de l'île de Montréal et de la région de Beauharnois. Aussi, la partie sud du lac a été fortement contaminée par le mercure rejeté par l'usine de chlore-alcali située à Beauharnois (Sérodes et Talbot 1978). Des teneurs élevées en métaux lourds et en contaminants organiques ont été retrouvées non seulement dans les sédiments (Jarry et al. 1985; Sérodes 1978), mais aussi dans l'eau (Germain et Janson 1984) et les plantes aquatiques (Béland et Demers 1977).

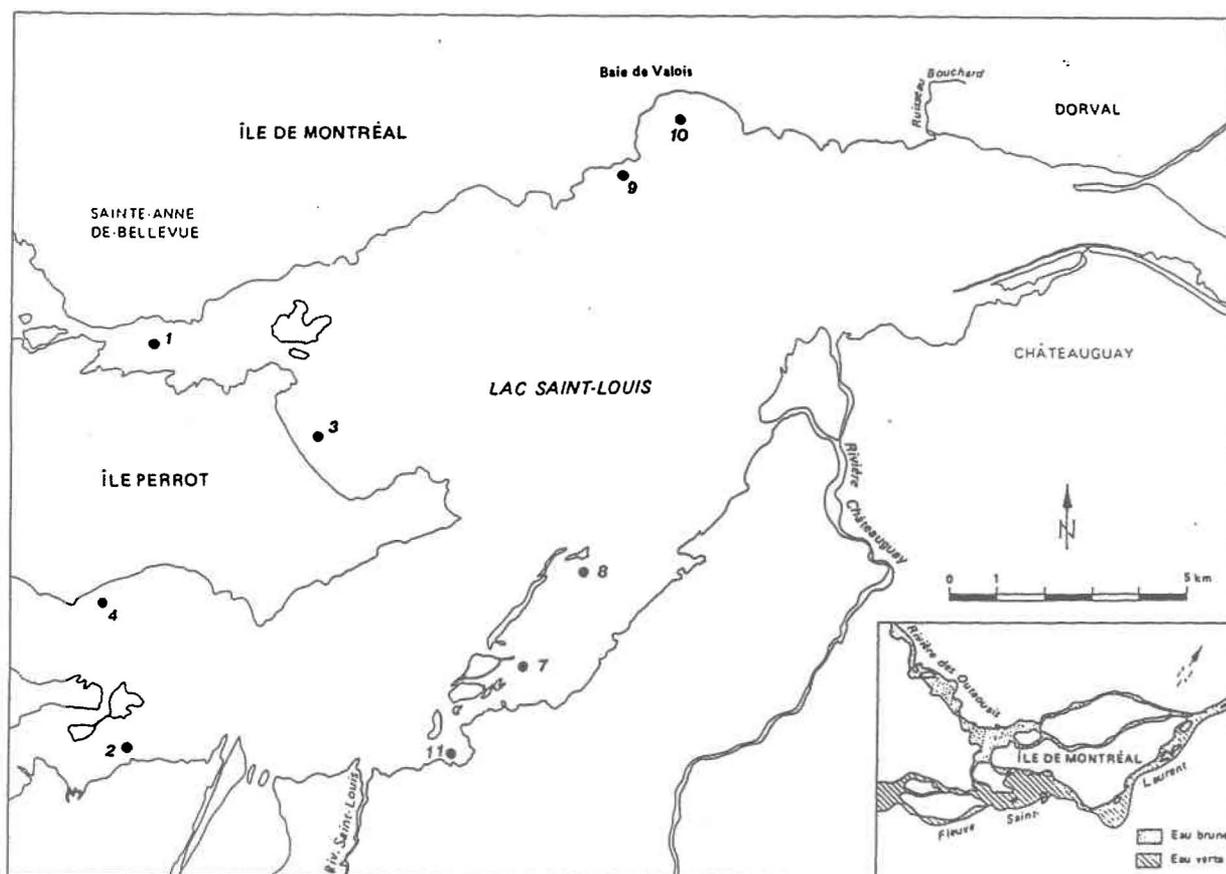


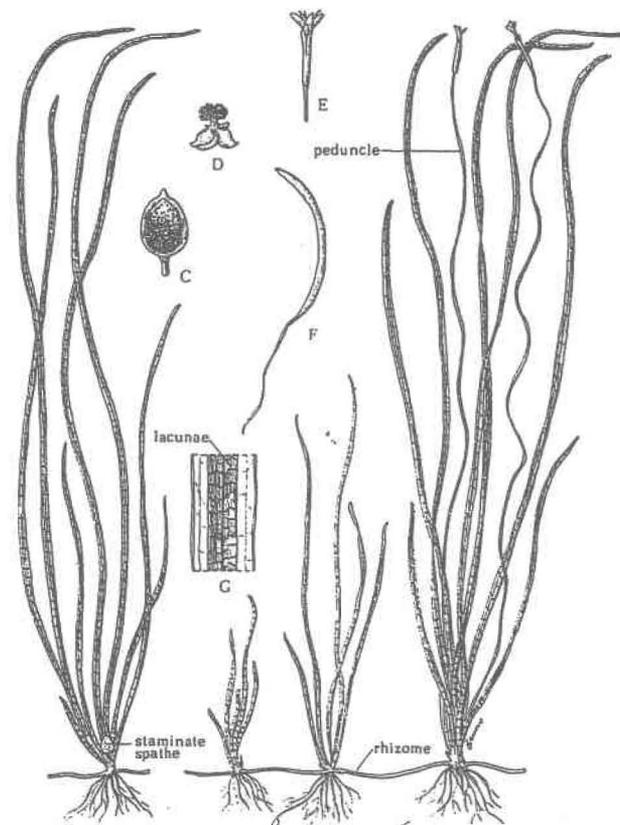
Figure 2.3: Carte du lac Saint-Louis et localisation des stations d'échantillonnage.

### 2.1.2 Choix des plantes

Tel que mentionné au chapitre I, les plantes utilisées doivent être abondantes et représentatives de la région en plus d'être faciles à identifier et à échantillonner, tolérantes aux métaux traces et posséder un facteur de concentration de métaux élevé. Pour cela, *Vallisneria americana* et *Myriophyllum spicatum* ont été choisies.

### 2.1.2.1 *Vallisneria americana*

Plante dioïque, vivace, aquatique et submergée aux feuilles basilaires, rubanées et flottantes, la vallisnérie américaine est issue de rhizomes stolonifères (figure 2.4). Elle peut être retrouvée dans les eaux douces, mortes ou courantes, que ce soit au sud du Québec (bassin de l'Ottawa) jusqu'au nord du Témiscamingue (rivière Solitaire) mais elle est surtout abondante dans la section alluviale des eaux du Saint-Laurent. La vallisnérie a une plasticité écologique qui lui permet de prospérer aussi bien sur les battures à peine recouvertes d'eau que dans des chenaux relativement profonds. Elle s'accommode également de températures très diverses, et prospère dans les rivières qui gèlent jusqu'au fond, aussi bien que dans les serres chaudes où l'eau est à 20 °C (Marie-Victorin 1964).

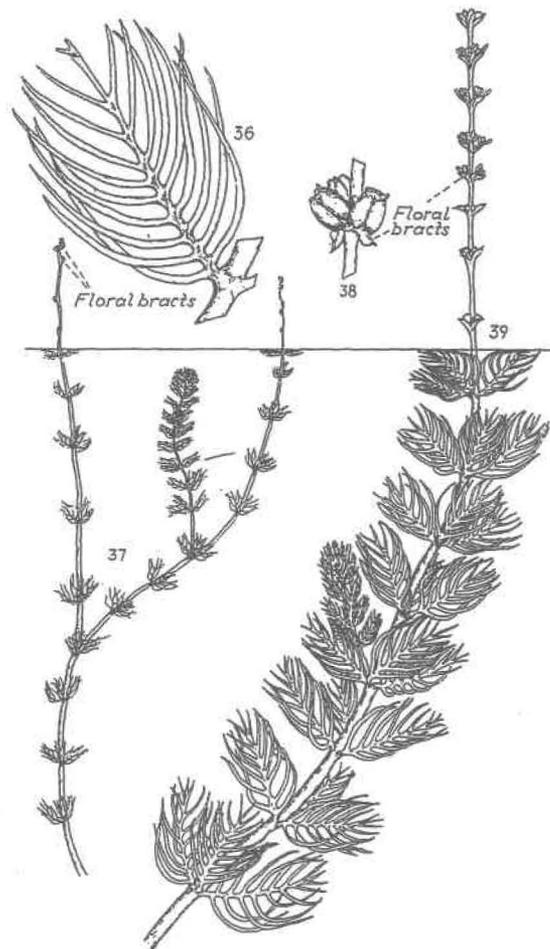


Source: Crow et Hellquist (1982)

Figure 2.4: *Vallisneria americana*

### 2.1.2.2 *Myriophyllum spicatum*

Il s'agit d'une plante aquatique herbacée aux feuilles verticillées ou alternes, généralement toutes submergées et profondément divisées en segments capillaires (figure 2.5). Très commune dans tout le Québec, elle peut être retrouvée dans des eaux tranquilles douces ou saumâtres, calcaires ou non (Marie-Victorin 1964).



Source: Fassett (1957)

Figure 2.5: *Myriophyllum spicatum*

### 2.1.3 Échantillonnage

Les stations sont représentées aux figures 2.2 et 2.3 pour les lacs Saint-Pierre et Saint-Louis. Ces stations ont été choisies d'après un gradient de concentration en métaux dans les sédiments (Amyot 1992) et aussi selon un gradient de concentration en métaux dans la végétation aquatique, tel que déterminé pour des plantes ayant été récoltées l'été précédent et dont le dosage en métaux totaux avait été fait (St-Cyr, communication personnelle, 1992).

Pour l'analyse des métaux dans les sédiments, la méthode de Tessier et al. (1979) a été utilisée afin de permettre l'estimation des concentrations en ions métalliques libres dans les eaux interstitielles. Cette procédure extrait séquentiellement les métaux liés à différentes phases géochimiques par l'emploi de réactifs de plus en plus puissants. Cette partie des travaux a été faite par Amyot (1992) qui a échantillonné le lac Saint-Pierre en août 1990 et le lac Saint-Louis en août 1991.

Pour la présente étude, l'échantillonnage de macrophytes a été réalisé en août 1992, période où le maximum de biomasse est atteint. À chaque station, des plongeurs ont récolté des plantes aquatiques entières (parties vertes et souterraines; biomasse minimale de 150 g), à l'intérieur d'un rayon de 3 mètres. Les plantes (*Myriophyllum spicatum* et *Vallisneria americana*) étaient par la suite entreposées sur glace, dans des sacs contenant l'eau du site d'échantillonnage, jusqu'au retour au laboratoire. De là, les macrophytes étaient bien lavés à l'eau désionisée et leur masse évaluée. Une congélation rapide dans l'azote liquide était alors effectuée pour être suivie d'un entreposage à -80 °C jusqu'au moment des différentes analyses. Ce procédé de congélation rapide devait empêcher une dégradation des composés biologiques (Rauser, Univ. Guelph, communication personnelle, 1992). La plupart des stations ont été analysées une seule fois en préparant et en analysant un seul échantillon composite. À quelques occasions (stations SP-2 pour *Vallisneria americana* et SL-7 pour *Myriophyllum spicatum*), l'échantillon composite a été analysé

en triple. Finalement, à la station SL-7, des plantes ont été récoltées à 3 endroits différents, toujours à l'intérieur du rayon de 3 mètres, et analysées séparément pour vérifier les variations pouvant exister à l'intérieur d'une même station.

### 2.1.4 Expériences d'exposition

Des macrophytes (*Myriophyllum spicatum* et *Vallisneria americana*) ont été récoltés en 1990 au Lac Memphremagog où la contamination en métaux traces est très faible. Ces plantes aquatiques ont été depuis conservées dans les serres du complexe scientifique dans des bacs en polypropylène (62 cm x 62 cm x 65 cm) où elles poussaient dans des sédiments littoraux pris à l'endroit où s'est fait l'échantillonnage. Les conditions retrouvées à la serre sont celles retrouvées pour une journée d'été avec une luminosité semblable à ce que donnerait le soleil, une photopériode de 14 heures et pour une température de 20 °C. Ces plantes ont été utilisées pour les expériences d'exposition.

Lors des expériences, des plantes entières (15 à 20 g poids frais) ont été exposées à diverses concentrations de cadmium et/ou de cuivre pendant quatre jours en culture hydroponique (volume de milieu d'exposition: environ 15 L). L'exposition se faisait en chambre environnementale à une température d'environ 20°C. Comme les conditions de luminosité étaient trop fortes pour les macrophytes, un voile noir était déposé sur les aquariums pendant l'exposition pour atténuer la lumière. Le milieu utilisé était celui de Hoagland et Arnon (1950), à un quart de force, mais cependant sans l'ajout de la solution d'oligoéléments nutritifs, laquelle contient entre autres du cuivre et du zinc, éléments qui pouvaient induire la synthèse des phytochélatines. La solution était constituée des macronutriments suivants:

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,25 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1,0 mM
$\text{KNO}_3$	1,5 mM
$\text{MgSO}_4$	0,5 mM

Les solutions de nitrate de cuivre (Fisher, 1000 ppm) ou de cadmium (Fisher, 1000 ppm) étaient ajoutées pour obtenir les concentrations initiales désirées et ensuite, le pH était ajusté à 6,0 par l'ajout de NaOH 1M (Fisher). Une fois l'exposition terminée, le tissu à analyser (feuille ou racine) était lavé dans une solution de  $\text{CaSO}_4$  0,5 M pendant dix minutes afin d'enlever les métaux pouvant être adsorbés à la surface des plantes. Le poids frais était ensuite mesuré et les macrophytes étaient finalement congelés dans l'azote liquide puis entreposés à  $-80^\circ\text{C}$  en attente des analyses subséquentes. Les expériences suivantes ont été effectuées pour déterminer la répartition intracellulaire des métaux (section 2.2.1):

<i>Myriophyllum spicatum</i>	2 ppm Cd 0,5 ppm Cd et 0,5 ppm Cu
<i>Vallisneria americana</i>	0,5 ppm Cd 0,5 ppm Cd et 0,5 ppm Cu

Deux expériences d'exposition pour des myriophylles, une à 1 ppm de Cu et l'autre à 2 ppm de Cd, ont fait l'objet de chromatographies d'exclusion (section 2.2.2).

## 2.2 Analyse des échantillons

### 2.2.1 Répartition intracellulaire du cadmium et du cuivre

Ce bilan a permis de déterminer sous quelles formes pouvaient être retrouvés les métaux. La fraction "soluble" comprend la forme anionique, où le métal est lié à des composés dont la charge nette est négative (comprenant les PC), et les formes cationiques ou neutres. Ces dernières englobent le métal sous forme d'ion libre ou de complexes dont la

charge globale est positive ou neutre. La fraction "non-soluble" comprend les métaux fortement liés aux éléments structuraux des macrophytes et non-extractibles par des tampons physiologiques.

### 2.2.1.1 Extraction

Avant utilisation, la verrerie et autre matériel de laboratoire avaient trempé au moins 24 heures dans une solution d'acide nitrique 15% pour être ensuite rincés abondamment à l'eau ultrapure (Milli-Q3RO/Milli-Q2 system, Millipore Corp.). Les macrophytes ont été homogénéisés avec un mortier et un pilon froid en utilisant 1 volume (mL) de Tris-HCl 10 mM de pH 8,6 contenant 1% (v/v) d'un agent surfactant, le Tween-20, par gramme de poids frais. Les tampons ont d'abord été purgés à l'azote et un jet d'azote était également dirigé vers le mortier pendant l'homogénéisation afin de favoriser au maximum un milieu réducteur. L'homogénat a été transféré dans des tubes à centrifugation en Teflon (Nalgene) puis purgé à l'azote avant d'être scellé. La centrifugation a été faite à 12 000 x g pendant 30 minutes et à une température de 4 °C.

Après centrifugation, le surnageant était recueilli, le volume noté et une portion (300 µL du surnageant acidifié avec 300 µL HNO<sub>3</sub> 15% (Aristar) et complété avec 400 µL d'eau ultrapure) était prise pour en déterminer le contenu en métal. Le reste du surnageant a été barboté avec de l'azote pendant environ 2 minutes puis conservé à 4 °C. Ensuite, le culot a été réextrait 4 fois avec 1,5 fois le volume initial de Tris-HCl 10 mM de pH 8,6 et contenant 1% (v/v) de Tween-20. A chaque nouvelle extraction, après avoir noté le volume, une portion était recueillie du surnageant pour le dosage des métaux et le reste du surnageant était barboté avec de l'azote, puis ajouté à celui conservé à 4 °C. Ces opérations devraient permettre d'isoler les formes de métaux solubles dans le cytosol des macrophytes.

Le culot a par la suite été extrait 3 fois avec du HCl 100 mM. Les volumes des surnageants étaient notés et une portion était recueillie pour le dosage des métaux. Cette étape permettait de solubiliser les métaux faiblement adsorbés et non-extractibles par le tampon Tris. Finalement, le

culot a subi une digestion acide (section 2.2.3) pour doser les métaux qui étaient plus fortement retenus.

Dans des expériences ultérieures, l'extraction au HCl a été supprimée. Seul le dosage des métaux dans le culot, après digestion acide, a été fait pour mesurer les métaux non-extractibles par le tampon Tris.

### 2.2.1.2 Chromatographie d'échange ionique

Les surnageants combinés, provenant de l'extraction utilisant le tampon Tris-HCl 10 mM de pH 8,6, ont été passés sur une résine échangeuse d'anion, Q-Sepharose (Pharmacia). Le volume de résine utilisé était d'environ 1,5 mL, retenu dans une colonne en borosilicate ayant un diamètre interne de 0,7 cm (Bio-rad). Cette étape a permis de séparer les composés chargés négativement des composés neutres ou chargés positivement, puisque ces derniers n'étaient pas retenus sur la résine et étaient, par conséquent, immédiatement élués. Les composés anioniques, dont devaient faire partie les phytochélatines, étaient, au contraire, adsorbés sur la résine.

Une fois que le surnageant avait passé sur la résine, celle-ci a été lavée 3 fois avec un petit volume (environ 5 mL) d'une solution de Tris-HCl 10 mM de pH 8,6 préalablement purgée à l'azote. Pour chacune de ces étapes de lavage, une portion était recueillie et acidifiée en prévision du dosage des métaux.

Les composés anioniques, encore adsorbés sur la résine, ont finalement été élués en utilisant un petit volume (environ 3 mL) d'une solution de 1 M KCl dans du Tris-HCl 10 mM de pH 8,6. Cette opération était répétée une seconde fois et le contenu en métal des deux extraits a été évalué. Les phytochélatines devaient alors être retrouvées dans cet extrait.

## 2.2.2 Chromatographie d'exclusion

Les macromolécules peuvent être séparées entre elles par des caractéristiques physiques telles que leur poids ou leur volume moléculaire. Cette approche a grandement été utilisée pour séparer les phytochélatines (Fujita 1985; Grill et al. 1985; Jackson et al. 1987). Deux approches ont été utilisées: a) à partir d'une extraction avec un tampon physiologique sur une plante entière; b) comme étape de purification après la chromatographie ionique (section 2.2.1.2) pour déterminer le bilan en métal.

L'extraction sur une plante entière a été faite avec des spécimens de *Myriophyllum spicatum* qui avaient été exposés à 1 ppm de Cu. Les plantes ont été broyées avec un pilon et un mortier dans de l'azote liquide. Pour 100 mg de poudre obtenu, 5 mL de tampon Tris-HCl 10 mM de pH 8,0 contenant du  $\text{NaN}_3$  0,03% et purgé à l'azote, ont été ajoutés. Un passage d'environ 10 minutes aux ultrasons a été fait puis l'homogénat a été centrifugé dans des conditions similaires à celles mentionnées dans la section 2.2.1. Le surnageant résultant a été congelé dans l'azote liquide puis lyophilisé. Les protéines ainsi obtenues pouvaient être analysées par chromatographie d'exclusion ou par HPLC en phase inverse.

Pour la chromatographie d'exclusion, un gel Sephadex G-50 (Pharmacia), dont la limite d'exclusion est de 50 000 daltons, a été utilisé. La colonne (Pharmacia) utilisée avait un diamètre de 2,5 cm, une hauteur de 55 cm et était fabriquée en polycarbonate. Le gel Sephadex G-50 a été mis à gonfler dans du tampon 10 mM Tris-HCl avec du  $\text{NaN}_3$  0,03% pendant 24 heures. Après que le remplissage de la colonne ait été effectué, le tampon a été mis à circuler pendant au moins 24 heures afin de bien assurer le tassement du gel. Ces opérations ont été faites à 4 °C et avec des tampons purgés à l'azote.

Un réservoir de tampon a été placé au haut de la colonne et sa sortie était reliée à un collecteur de fractions (LKB Broma, 2211 Superrac) via une pompe (Gilson, minipuls 2). Un volume connu de protéine a été

dissous dans 4 mL de tampon Tris-HCl 10 mM de pH 8,0 purgé à l'azote et passé sur le gel. Des fractions de 6,5 mL ont été recueillies et le débit était réglé à 78,6 mL/h.

Avant la chromatographie, 5,7  $\mu$ moles de Cu a été ajouté aux protéines dissoutes pour un temps de réaction de 15 minutes dans la glace. De cette façon, il a été possible de séparer un grand volume d'échantillon tout en suivant le profil d'élution des protéines par spectrophotométrie UV-visible (Varian, DMS 200) à une longueur d'onde de 254 nm où le lien métal-thiol est mis en évidence. Aussi, en utilisant la spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme (Varian Spectra AA-30) les fractions contenant du cuivre ont pu être identifiées.

La chromatographie d'exclusion a également servi pour la purification de protéines pour *Myriophyllum spicatum* exposée à 2 ppm de Cd. Donc, suite à la chromatographie ionique (section 2.2.1), la fraction, éluee avec le KCl et qui devait contenir les complexes peptides-Cd, a été passée sur un gel d'exclusion Superose 12 (Pharmacia) avec comme éluant du KCl 300 mM dans une solution d'HEPES 10 mM pH 8,0. Le débit était de 0,48 mL/min et des fractions de 2,7 mL furent recueillies pour doser le Cd et pour suivre le profil d'élution des protéines par spectrophotométrie UV-visible à 254 et 280 nm. La gamme de travail du Superose 12 comprend des poids moléculaires de  $10^3$  à  $3 \times 10^5$ .

## 2.2.3 Dosage des métaux

### 2.2.3.1 Digestions acides aux micro-ondes

Des parties de plante entière (racine ou feuille), ainsi que les culots restant après les différentes étapes de l'extraction pour déterminer la répartition intracellulaire des métaux (section 2.2.1), ont fait l'objet de digestions acides en prélude au dosage des métaux.

Comme pour les autres manipulations, le matériel de laboratoire avait trempé au moins 24 heures dans une solution d'acide nitrique 15%

pour être ensuite rincé abondamment à l'eau ultra-pure. Cette eau hautement purifiée pour l'usage analytique (désionisée: résistivité  $> 17$  Siemens  $\text{cm}^{-1}$ ) était générée à partir d'un système commercial pourvu de résines échangeuses d'ions, de colonnes d'adsorption au charbon et de membranes filtrantes ( $0,2 \mu\text{m}$ ). Aussi, les différentes parties des macrophytes devant être digérées ont été séchées dans une étuve à  $70^\circ\text{C}$  pendant 24 heures et le poids sec a par la suite été évalué. Selon la quantité de matière présente, des digestions acides directes ou indirectes pouvaient être faites.

La digestion acide directe a été utilisée pour les échantillons dont le poids sec total était situé entre 1,0 et 80,0 mg. Dans une bombe en Teflon, le matériel était introduit à l'aide d'une spatule en Teflon et le poids exact était noté. Un volume de 3,0 mL d'acide nitrique concentré ultrapur (Aristar) a été ajouté et une pré-digestion d'environ une heure était effectuée à la température de la pièce pour permettre à suffisamment de matériel d'être dégradé pour faciliter l'étape suivante. Ensuite, la digestion au four aux micro-ondes (700 watts,  $\approx 2$  min) a été faite pendant suffisamment de temps pour atteindre une pression  $\approx 6\ 900$  kPa. Après refroidissement, un volume de 17,0 mL d'eau ultrapure était ajouté aux échantillons digérés pour donner une matrice en  $\text{HNO}_3$  de 15%.

D'autre part, la digestion acide indirecte a été utilisée pour les échantillons dont le poids sec total était situé entre 250 et 500 mg. Le matériel à analyser a été introduit avec une spatule en Teflon dans des béchers en Teflon dont le poids exact était noté. Un volume de 10 mL d'acide nitrique concentré ultrapur (Aristar) était ajouté. Après avoir couvert les béchers, le tout était laissé à la température de la pièce pendant environ 12 heures. Par la suite, la pré-digestion à chaud a été faite sur une plaque chauffante pendant environ une heure et cela, en gardant les couvercles sur les béchers. À la fin de cette digestion, les couvercles ont été retirés afin de réduire le volume de solution par évaporation jusqu'aux environs de 5 mL. Les solutions pré-digérées ont par la suite été transférées et leur volume complété à 10 mL avec du  $\text{HNO}_3$  concentré ultrapur. Un volume de 3 mL a été prélevé de ces solutions pour être utilisé pour la

digestion au four aux micro-ondes (700 watts,  $\leq$  2 min) dans des bombes en Teflon. Finalement, de l'eau ultrapure (17 mL) était ajoutée au produit de la digestion pour obtenir une matrice en  $\text{HNO}_3$  de 15%.

Pour vérifier la qualité des valeurs obtenues lors de ces digestions, des échantillons de référence (hépatopancreas de homard TORT-1, CNRC) de poids variant entre 70 et 80 mg pour les digestions directes et de 300 à 400 mg pour les digestions indirectes a été utilisé. Le TORT-1 a été utilisé car il s'agissait de l'un des rares échantillons dont les valeurs en cadmium pouvaient y être certifiées. Pour les digestion de plantes entières, des échantillons de feuilles de citronniers (Standard Reference Material 1572, National Institute of Standards & Technology) ont également été analysés. La digestion de standards certifiés, ainsi que de blancs, a été fait pour chaque série de digestions.

### 2.2.3.2 Analyse des métaux

Pour les plantes entières, le dosage du Cd et du Cu a été fait par spectrophotométrie d'émission atomique au plasma (Thermo Jarrell Ash, Atom Scan 25; lecture séquentielle). La mesure des concentrations de Cu et de Cd pour la détermination de la répartition intracellulaire de ces métaux à été faite par spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme (Varian Spectra AA-30 équipé d'un four au graphite modèle GTA-96). Pour vérifier l'exactitude de la courbe d'étalonnage, des échantillons d'eau de référence (Standard Reference Material 1643b, National Institute of Standards & Technology; Standard Reference Material 1643c, National Institute of Standards & Technology) était utilisés.

### 2.2.4 Dosage des phytochélatines par HPLC en phase inverse

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) permet de séparer des composés selon les différentes affinités qui peuvent exister entre ces composés et le type de support (colonne) utilisé. Dans le cas de la phase inverse, les groupements utilisés sont des chaînes de 18 carbones

avec lesquelles des interactions hydrophobes sont créées avec les substances présentes dans la phase mobile (liquide). Deux méthodes d'extraction ont été testées avant de procéder à cette étape: l'une, mise au point par Rauser (1991) et l'autre, par Grill et al. (1987). Des protéines lyophilisées après l'extraction utilisant le tampon Tris pour la chromatographie d'exclusion (section 2.2.2) ont aussi été analysées par HPLC.

#### 2.2.4.1 Extraction de Rauser

Cette extraction ne comporte qu'une seule étape, une précipitation à l'acide. Ainsi du HCl 0,1 N a été additionné au tissu de plante à raison d'un ratio 1:1 (poids/volume) et le tout a été broyé, avec un pilon et un mortier, au froid. Après un transfert dans des tubes pour ultracentrifugation (Beckman, 13 X 51 mm) et un passage d'environ 15 minutes aux ultrasons, la centrifugation a été faite à 265 070 X g (Beckman, TL-100 Ultracentrifugeuse) pendant 45 minutes et à une température de 4 °C. Par la suite, le surnageant résultant pouvait être analysé par HPLC ou entreposé à -80 °C.

#### 2.2.4.2 Extraction de Grill

Cette extraction, en deux étapes, utilise un agent réducteur ( $\text{NaBH}_4$ ) suivie d'une précipitation acide. Le tissu était homogénéisé avec un pilon et un mortier dans du NaOH 1N (Fisher) contenant 1 mg/mL de  $\text{NaBH}_4$  (BDH). Le ratio tissu de plante pour le volume de solution ajouté était de 1:1 (poids/volume). Une centrifugation dans les mêmes conditions que celles mentionnées pour l'extraction de Rauser a été faite et le surnageant a subi une précipitation acide alors qu'un volume de HCl 3,6 N équivalent au 2/5 du volume de NaOH initialement utilisé fut ajouté. Le mélange a été refroidi sur glace pendant 15 minutes. Après une seconde centrifugation, le surnageant pouvait être analysé par HPLC ou congelé rapidement à l'azote liquide et conservé à -80 °C.

### 2.2.4.3 HPLC en phase inverse

Les séparations sur HPLC ont été faites avec un système Waters 600E muni d'un détecteur avec photodiodes et utilisant une colonne en phase inverse (CSC-Nucl.120A/ODS 10  $\mu\text{m}$ , 25 x 0,46 cm). Le débit était de 1,0 mL/min et la colonne a été pré-équilibrée avec une solution de 0,1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA) (Biopharm) 20 minutes avant d'injecter les échantillons à analyser. Après injection, la colonne a été développée avec un gradient linéaire de 0 à 20 % (v/v) d'acétonitrile dans une solution de 0,1 % de TFA pendant 40 minutes. Avant de faire de nouvelles injections, la colonne était rincée pendant 15 minutes avec 70 % (v/v) d'acétonitrile dans une solution de 0,1 % de TFA et à nouveau pré-équilibrée avec la solution de 0,1 % (v/v) de TFA avant une autre injection.

Une réaction colorimétrique a permis de mesurer les groupements thiol séparés par HPLC en phase inverse. L'effluent provenant de la colonne a été combiné, via dérivatisation post-colonne, avec du 3-carboxy-4-nitrophényl disulfure 1,8 mM (réactif d'Ellman) (A&C Ltd) dans une solution de  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  300 mM et de  $\text{K}_2\text{EDTA}$  15 mM, qui était ajoutée à un débit de 0,5 mL/min. Le tout était passé dans une boucle à mélanger donnant un temps de résidence de 1,6 minutes, temps suffisant pour obtenir un développement complet de la couleur. L'absorbance était mesurée à 405 nm et la cystéine (CYS) (Biopharm) et le glutathione (GSH) (Biopharm) étaient utilisés comme étalons.

Pour les myriophylles dont l'extraction a été faite avec le tampon Tris (échantillons contrôles et plantes exposées à 1 ppm de Cu pendant 4 jours) (section 2.2.2), les protéines lyophilisées qui en ont résulté ont été solubilisées dans de l'eau désionisée avant d'être analysées par HPLC. Les conditions pour le HPLC en phase inverse ont été différentes de celles mentionnées ci-dessus alors que la séparation des polypeptides se faisait dans un gradient linéaire de 0 à 20 % (v/v) d'acétonitrile dans une solution de 0,05% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  durant 20 minutes. Le débit de l'éluant était de 1 mL/min et le réactif d'Ellman était ajouté, lui aussi, à un débit de 1 mL/min.

## 2.3 Traitement des données

Le modèle mathématique MINEQL, mis au point par Westall et al. (1976) et pouvant donner la spéciation théorique des métaux, a été utilisé pour optimiser les conditions expérimentales. Ces simulations ont été faites afin d'estimer la fraction de cuivre ou de cadmium présente dans les milieux sous forme d'ion libre pour les expériences d'exposition (section 2.1.1), ou encore pour s'assurer que les métaux ne pouvaient former de précipités dans les conditions utilisées pour les extractions visant à déterminer le bilan en métal (section 2.2.1). Les conditions dans lesquelles a été utilisé ce logiciel sont décrites ci-dessous.

### 2.3.1 Expérience d'exposition

Les concentrations totales des ions majeurs ( $[Ca]_T$ ,  $[K]_T$ ,  $[Mg]_T$ ,  $[NH_4]_T$ ,  $[PO_4]_T$ ,  $[NO_3]_T$ ,  $[SO_4]_T$ ) les concentrations totales des métaux ( $[Cd]_T$ ,  $[Cu]_T$ ) et le pH ont été utilisés pour évaluer la répartition du cuivre et du cadmium parmi les différentes formes inorganiques suivantes:

aquo ion	$Cu^{2+}$	$Cd^{2+}$
hydroxo-complexes	$Cu(OH)_2$	
sulfato-complexes	$Cu(SO_4)$	$Cd(SO_4)$
phosphato-complexes	$CuHPO_4$	

Ces valeurs sont celles des éléments retrouvés dans le milieu Hoagland dilué (1:4) au tout début de l'expérience d'exposition. Elles ne tiennent pas compte, par exemple, des différentes interactions pouvant être établies lorsque des macrophytes sont retrouvées dans le milieu (adsorption) ou de l'exudation de composés organiques par ces derniers qui pourraient chélater les métaux.

### 2.3.2 Bilan en métal

Les paramètres suivants ont été utilisés pour les modélisations:  $[\text{Tris}]_T$ ,  $[\text{Cd}]_T$ ,  $[\text{Cu}]_T$ , le pH et comme les extractions ont été faites en milieu réducteur, sous l'azote, le système était considéré fermé à l'atmosphère (absence de  $\text{CO}_2$ ). Les formes de cuivre et de cadmium suivantes ont été évaluées:

aquo-complexes	$\text{Cd}^{2+}; \text{Cu}^{2+}$
complexes avec le Tris	$[\text{CuOH}(\text{Tris})_2]^+; [\text{Cu}(\text{Tris})_3]^{2+}; [\text{Cu}(\text{Tris})_4]^{2+}$

### 2.3.3 Analyses statistiques

Lorsque possible, les relations entre les différentes variables ont été comparées entre elles à l'aide de diagrammes de dispersion bidimensionnels; ces relations étaient alors évaluées par le coefficient de corrélation non-paramétrique de Spearman ( $r_s$ ) et sa probabilité associée.

# CHAPITRE 3: RÉSULTATS

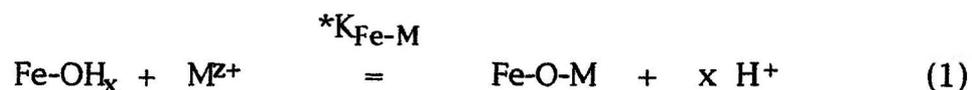
## 3.1 Études sur le terrain

### 3.1.1 Contamination des eaux interstitielles

Pour quantifier le gradient de contamination dans les lacs Saint-Louis et Saint-Pierre, les concentrations de l'ion libre ( $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$ ) en équilibre avec les sédiments ont été calculées aux différentes stations. Pour cela, il fallait connaître le pH des sédiments et les données de répartition des métaux entre les différentes phases géochimiques des sédiments. Il est ainsi possible d'estimer les concentrations d'ions libres,  $\text{M}^{z+}$ , théoriquement présentes dans les eaux interstitielles (Tessier 1992).

Le modèle géochimique alors utilisé suppose que les deux principales composantes de sorption des métaux dans les sédiments oxyques sont la matière organique et les oxyhydroxydes de fer. Les équations dérivées des concepts de complexation des métaux sur les surfaces peuvent alors être utilisées pour décrire cette sorption (Tessier et al. 1993).

L'adsorption d'un métal M sur les surfaces d'oxyhydroxydes de Fe peut être exprimée de la façon suivante:



d'où:

$$*K_{\text{Fe-M}} = \frac{\{\text{Fe-O-M}\} [\text{H}^+]^x}{\{\text{Fe-OH}_x\} [\text{M}^{z+}]} \quad (2)$$

où  $*K_{\text{Fe-M}}$  est une constante d'équilibre globale;  $[\text{H}^+]$  correspond à la concentration d'ion  $\text{H}^+$  et  $[\text{M}^{z+}]$ , à la concentration d'ions métalliques libres;  $x$  est le nombre moyen de protons relâchés par ion métallique adsorbé;

$\{\text{Fe-OH}_x\}$  représente la concentration de sites d'adsorption libres à la surface des oxyhydroxydes et  $\{\text{Fe-O-M}\}$ , la concentration de sites occupés par le métal M.

Pour de faibles densités d'adsorption ( $\{\text{Fe-O-M}\} \ll \{\text{Fe-OH}_x\}$ ), on peut poser que:

$$\{\text{Fe-OH}_x\} \approx \{\text{Fe-O}\}_T \quad (3)$$

où  $\{\text{Fe-O}\}_T$  est la concentration totale de sites sur les oxyhydroxydes de fer qui peut également être exprimée par:

$$\{\text{Fe-O}\} = N_{\text{Fe}} \{\text{Fe-ox}\} \quad (4)$$

où  $N_{\text{Fe}}$  est la densité de sites d'adsorption et  $\{\text{Fe-ox}\}$  est la concentration d'oxyhydroxydes de Fe déterminée expérimentalement. Si on considère que chaque ion libre n'occupe qu'un site d'adsorption à la fois, alors:

$$\{\text{Fe-O-M}\} = \{\text{Fe-M}\} \quad (5)$$

où  $\{\text{Fe-M}\}$  est la concentration analytique de métal M associé aux oxyhydroxydes de fer. En combinant les équations 2 à 5, on obtient:

$$K_{\text{Fe-M}} = \frac{N_{\text{Fe}} * K_{\text{Fe-M}}}{[\text{H}^+]^x} = \frac{\{\text{Fe-M}\}}{\{\text{Fe-ox}\} [\text{M}^{z+}]} \quad (6)$$

où  $K_{\text{Fe-M}}$  correspond à une constante d'équilibre conditionnelle qui est fonction du pH. À partir de cette équation, la concentration de l'ion libre  $\text{M}^{z+}$  peut être évaluée:

$$[\text{M}^{z+}] = \frac{\{\text{Fe-M}\} [\text{H}^+]^x}{(N_{\text{Fe}} * K_{\text{Fe-M}}) \{\text{Fe-ox}\}} \quad (7)$$

Dans cette équation, {Fe-M}, [H<sup>+</sup>] et {Fe-ox} sont des variables pouvant être mesurées et (N<sub>Fe</sub> \*K<sub>Fe-M</sub>) et x ont été estimées à partir de données provenant d'expériences *in situ* et rapportées dans des études antérieures (Tessier et al. 1993).

Pour le calcul de l'ion libre du Cd, la matière organique a également été considérée comme sorbant et cela peut être exprimé par l'équation suivante:

$$[M^{z+}] = \frac{\{MO-M\} [H^+]^y}{(N_{MO} *K_{MO-M}) \{MO\}} \quad (8)$$

où N<sub>MO</sub> est le nombre de moles de sites de sorption de la matière organique par mole de carbone organique et \*K<sub>MO-M</sub> correspond à une constante d'équilibre globale; y est le nombre de protons relâchés par ion métallique adsorbé sur la matière organique; {MO} et {MO-M} représentent respectivement les concentrations de matière organique et de métaux associés à la matière organique. En combinant les équations (7) et (8), on obtient:

$$[M^{z+}] = \frac{\{M\} [H^+]^{x+y}}{N_{Fe} *K_{Fe-M} \{Fe-ox\} [H^+]^y + N_{MO} *K_{MO-M} \{MO\} [H^+]^x} \quad (9)$$

où {M} correspond à la concentration totale de métal fixé aux sédiments. La variable {MO} est estimée par la concentration de carbone organique dans les sédiments. Les données géochimiques suivantes ont servi pour le calcul de l'ion libre: x = 0,82, y = 0,97, N<sub>Fe</sub> \*K<sub>Fe-M</sub> = 10<sup>-1,30</sup> et N<sub>MO</sub> \*K<sub>MO-M</sub> = 10<sup>-2,45</sup> (Tessier et al. 1993).

Les valeurs calculées en ions libres pour le cadmium et le cuivre (tableau 3.1) ont donc été utilisées pour déterminer le gradient de contamination dans les sédiments car elles seraient les formes pouvant donner le meilleur indice de métaux disponibles pour les macrophytes.

Tableau 3.1: Valeurs calculées de l'ion libre pour le cadmium et le cuivre aux lacs Saint-Pierre (août 1990) et Saint-Louis (août 1991).

Lac	Station	[Cd <sup>2+</sup> ] (mol/L)	[Cu <sup>2+</sup> ] (mol/L)
Saint-Pierre (SP)	1	5,59E-12	5,36E-10
	2	8,94E-12	2,50E-09
Saint-Louis (SL)	1	1,09E-10	5,81E-09
	2	2,59E-11	4,98E-10
	3	5,86E-12	1,80E-09
	4	2,70E-11	1,45E-08
	7	5,39E-12	6,67E-10
	8	1,04E-11	1,37E-09
	9	1,06E-11	6,87E-10
	10	5,69E-11	7,61E-09
	11	2,18E-11	7,32E-09

Sources: Amyot (1992), Amyot et al. (1994) et Flessas (1994)

Ces valeurs, calculées d'après les formules de Tessier (1992) et de Tessier et al. (1993), proviennent des études d'Amyot (1992), d'Amyot et al. (1994) et de Flessas (1994) dont les échantillonnages étaient fait aux mêmes emplacements que les nôtres. Comme les sources de contamination en cadmium peuvent être différentes de celles en cuivre, il n'est pas surprenant que les stations les plus fortement contaminées pour un métal donné (ex.: SL-1 pour le Cd) ne correspondent pas à celles étant les plus contaminées pour un autre métal (ex.: SL-4 pour le Cu).

### 3.1.2 Valeurs totales en métaux

Pour les analyses en métaux, deux échantillons certifiés (N=4) ont été testés: Citrus (Cu:  $16,4 \pm 0,63$ ) et TORT-1 (Cd:  $26,6 \pm 0,5$ ), et les valeurs obtenues étaient dans les limites de variation certifiées pour ces échantillons. Également, l'analyse de blancs de digestions n'a pas révélé de contamination en cuivre ou en cadmium alors que ces valeurs étaient plus basses que la limite de détection ( $0,08 \mu\text{g Cu/g p. sec}$  et  $0,05 \mu\text{g Cd/g p. sec}$ ). Le tableau 3.2 donne les concentrations en Cu et en Cd pour les feuilles et les racines de plantes digérées. Ces concentrations ont été déterminées par spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES) et par spectrophotométrie d'absorption atomique (AA avec fournaise au graphite) lorsque les valeurs en Cd étaient trop faibles.

Tableau 3.2: Concentrations totales en cadmium et en cuivre pour les feuilles et les racines de *Myriophyllum spicatum* et de *Vallisneria americana* récoltées aux lacs Saint-Louis (SL) et Saint-Pierre (SP).

Station	<i>Vallisneria americana</i>				<i>Myriophyllum spicatum</i>			
	Feuille		Racine		Feuille		Racine	
	[Cu] ( $\mu\text{g/g p. sec}$ )	[Cd] ( $\mu\text{g/g p. sec}$ )	[Cu] ( $\mu\text{g/g p. sec}$ )	[Cd] ( $\mu\text{g/g p. sec}$ )	[Cu] ( $\mu\text{g/g p. sec}$ )	[Cd] ( $\mu\text{g/g p. sec}$ )	[Cu] ( $\mu\text{g/g p. sec}$ )	[Cd] ( $\mu\text{g/g p. sec}$ )
SL-1	32	1,81	136	1,65				
SL-2	19	0,38	455	1,67	307	0,32	103	0,23
SL-3	22	0,34	117	1,30	57	0,23	76	0,21
SL-4	34	0,87	-- a	-- a				
SL-7	22	0,16	93	0,70	147	0,31	244	0,11
SL-8	31	0,48	285	0,70	18	0,13	38	0,16
SL-9	20	0,97	105	2,87				
SL-10	30	0,33	177	1,29	126	0,41	33	0,26
SL-11	24	0,51	223	5,34	129	0,36	141	0,39
SP-1	84	0,74	-- a	-- a				
SP-2	35	0,54	62	4,03				

(a): Quantité de matériel insuffisante pour analyse.

Exception faite de la station SP-1, les concentrations en cuivre sont à peu près constantes pour les feuilles de *Vallisneria americana*. Un meilleur gradient de contamination peut toutefois être observé avec le cadmium alors que la valeur la plus élevée est de 11 fois supérieure à la plus faible. Pour leur part, les racines des vallisnériés ont des concentrations en métal généralement plus élevées que chez les feuilles. Si des comparaisons sont faites entre les concentrations de métal retrouvées entre ces deux parties, les valeurs de Cd retrouvées chez les racines peuvent être de 1 à 10 fois supérieures par rapport aux feuilles et de 2 à 25 fois supérieures pour le Cu.

Pour les feuilles de *Myriophyllum spicatum*, les concentrations en Cu sont plus variables que celles observées pour les vallisnériés et aussi généralement plus élevées, allant jusqu'à 16 fois, pour une station donnée (SL-2). Cela ne s'applique pas pour le Cd alors que la gamme de concentration est semblable à celle retrouvée pour les feuilles des vallisnériés. Pour les racines des myriophylles, les concentrations en Cu sont parfois plus élevées pour les feuilles que pour les racines (SL-2, SL-10), parfois supérieures dans les racines (SL-7, SL-8). Par contre, les concentrations en Cd dans les racines sont dans la même gamme que pour les feuilles. Toutefois, les concentrations en Cd dans les racines des myriophylles sont de cinq à dix fois moins élevées que pour les racines des vallisnériés.

### 3.1.3 Répartition intracellulaire du Cd et du Cu

#### 3.1.3.1 Influence de l'extraction sur les métaux

Pour recueillir la fraction soluble des métaux, cinq extractions successives avec le tampon TRIS 10 mM à pH 8,6 ont été faites. Les concentrations en cadmium diminuaient à chaque extraction pour atteindre, après deux ou trois extractions, des niveaux non-détectables. Ce n'était pas le cas pour le cuivre alors que les concentrations diminuaient

après la première extraction mais restaient ensuite à peu près constantes à mesure qu'avançaient les autres extractions. Un exemple est donné à la figure 3.1 où les valeurs de métal dans les réactifs sont corrigées à partir des blancs.

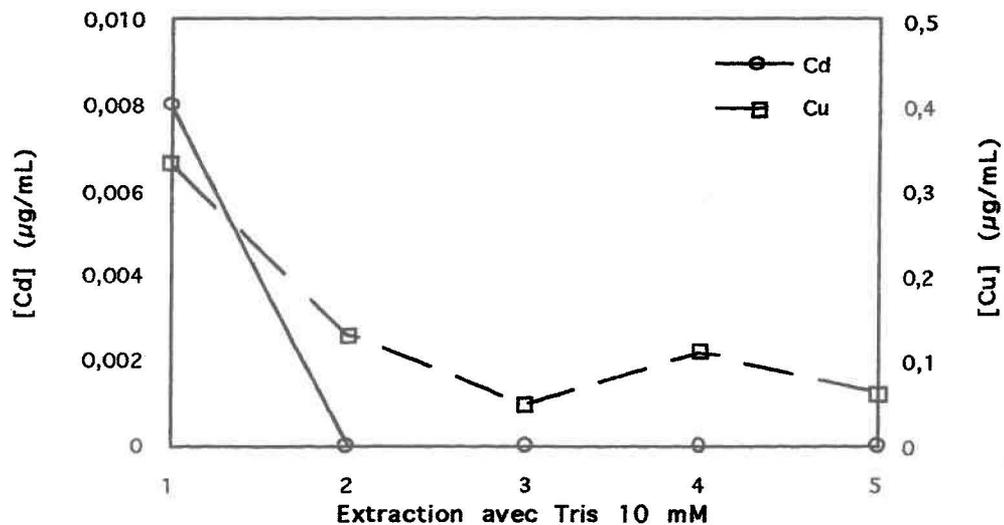


Figure 3.1: Concentrations en métal pour les feuilles de *Myriophyllum spicatum* de la station SL-11 en fonction des fractions extraites avec le tampon Tris-HCl 10 mM.

La simulation avec MINEQL a indiqué, pour les conditions mentionnées, que les extractions avec le tampon TRIS ne devraient pas occasionner la formation de précipités avec le cuivre ou le cadmium. Cette évaluation, qui ne tient pas compte de la présence d'autres ligands pouvant être fournis par les plantes, indique que 97% du Cd présent serait sous forme de  $\text{Cd}^{2+}$  et 3% sous forme de  $\text{CdOH}^+$ . Toutefois le Cu serait complexé par le TRIS sous les formes suivantes:  $[\text{CuOH}(\text{TRIS})_2]^+$  (49%);  $[\text{Cu}(\text{TRIS})_3]^{2+}$  (6%);  $[\text{Cu}(\text{TRIS})_4]^{2+}$  (45%). Ces valeurs sont obtenues en considérant le système fermé à l'atmosphère car les manipulations étaient faites sous atmosphère d'azote et avec des tubes à centrifugation fermés (figure 3.2 B). Cependant, si le système avait été ouvert, il y aurait eu une diminution du Cd soluble, avec une augmentation du pH, par formation d'un précipité avec le carbonate (otavite) (figure 3.2 A).

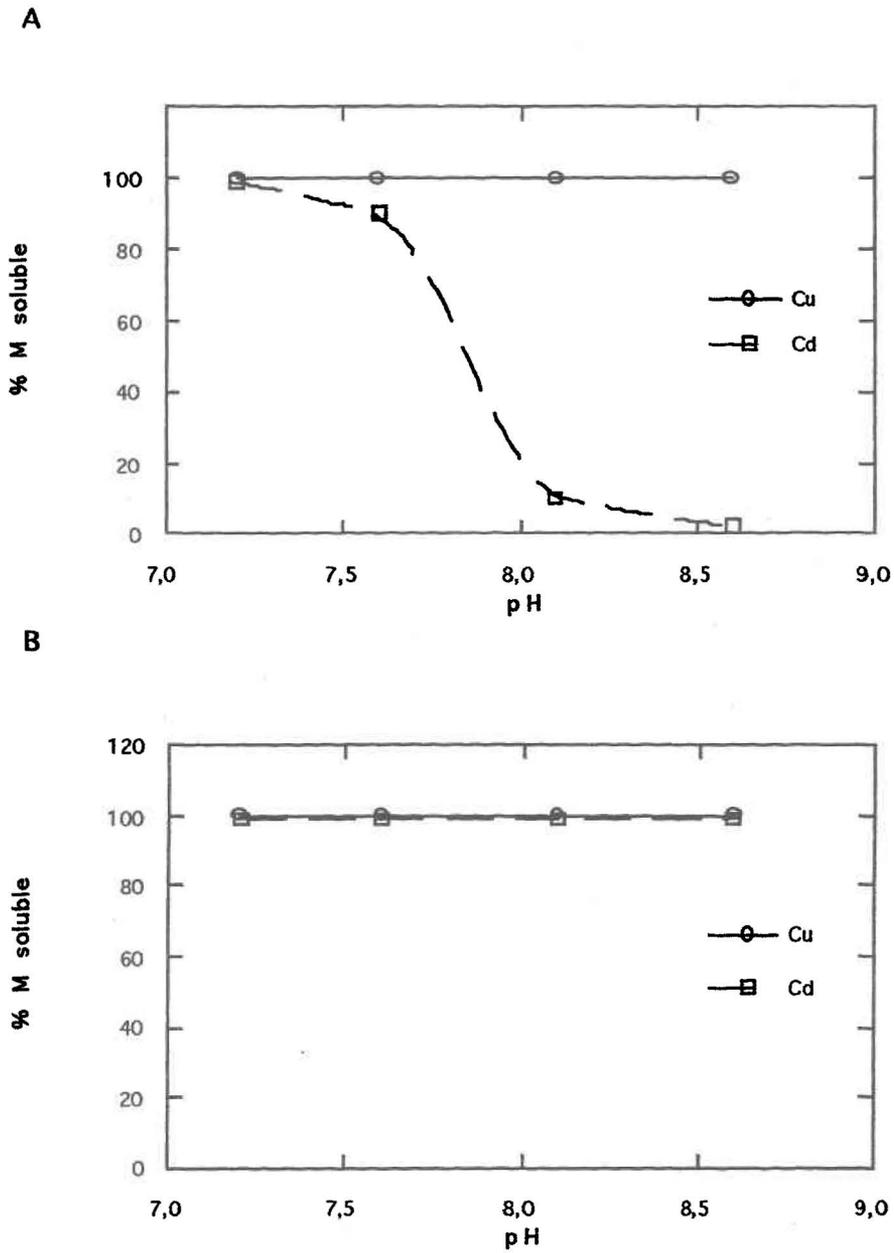


Figure 3.2: Solubilité théorique du Cu et du Cd en fonction du pH selon des simulations faites avec le logiciel MINEQL pour: (A) système ouvert et (B) système fermé (sans CO<sub>2</sub>); [Cu]: 10<sup>-6</sup> M, [Cd]: 10<sup>-8</sup> M.

### 3.1.3.2 Variabilité des résultats

La variabilité intra-station a été mesurée à la station SL-10 pour *Vallisneria americana*. Cette plante a été recueillie à trois endroits différents à l'intérieur de cette station et les sous-échantillons ainsi récoltés étaient analysés séparément (tableau 3.3). Des mesures en triple ont également été effectuées pour des échantillons composites de *Vallisneria americana* (feuilles et racines) de la station SP-2 et pour les feuilles de *Myriophyllum spicatum* de la station SL-7 (tableau 3.4). Ces résultats sont donnés pour les fractions solubles et le contenu total en Cd et Cu.

Tableau 3.3: Concentrations moyennes en métal ( $\bar{x}$ ), écart-types ( $S_x$ ) et coefficients de variation (C.V.) pour *Vallisneria americana* de la station SL-10; étude des variations intra-station.

	<i>Vallisneria americana</i> SL-10			
	Feuilles ( $\bar{x} \pm S_x$ )	C.V. Feuilles (%)	Racines ( $\bar{x} \pm S_x$ )	C.V. Racines (%)
Cd soluble ( $\mu\text{g/g p. sec}$ )	n.d.		0,093 $\pm$ 0,030	32
Cd cationique ( $\mu\text{g/g p. sec}$ )	n.d.		n.d.	
Cd anionique ( $\mu\text{g/g p. sec}$ )	n.d.		n.d.	
Cd total ( $\mu\text{g/g p. frais}$ )	n.d.		0,14 $\pm$ 0,035	26
( $\mu\text{g/g p. sec}$ )			1,6 $\pm$ 0,33	21
Cu soluble ( $\mu\text{g/g p. sec}$ )	15,5 $\pm$ 3,3	21	27,2 $\pm$ 4,9	18
Cu cationique ( $\mu\text{g/g p. sec}$ )	6,7 $\pm$ 1,9	28	21,0 $\pm$ 5,0	24
Cu anionique ( $\mu\text{g/g p. sec}$ )	4,1 $\pm$ 0,4	10	2,4 $\pm$ 0,96	40
Cu total ( $\mu\text{g/g p. frais}$ )	0,87 $\pm$ 0,37	43	4,7 $\pm$ 0,61	13
( $\mu\text{g/g p. sec}$ )	23,6 $\pm$ 7,3	31	74 $\pm$ 20	27

n.d.: non-déTECTABLE

Tableau 3.4: Concentrations moyennes en métal (x), écart-types (Sx) et coefficients de variation (C.V.) pour *Vallisneria americana* de la station SP-2 et pour *Myriophyllum spicatum* de la station SL-7 pour des mesures en triple; étude de la variabilité analytique.

	<i>Vallisneria americana</i> SP-2				<i>Myriophyllum sp.</i> SL-7	
	Feuilles (x ± Sx)	C.V. feuille (%)	Racines (x ± Sx)	C.V. racine (%)	Feuilles (x ± Sx)	C.V. feuille (%)
Cd soluble (µg/g p. sec)	0,034 ± 0,003	9	0,33 ± 0,052	16	n.d.	
Cd cationique (µg/g p. sec)	n.d.		0,23 ± 0,069	30	n.d.	
Cd anionique (µg/g p. sec)	n.d.		0,072 ± 0,012	17	n.d.	
Cd total (µg/g p. frais) (µg/g p. sec)	0,04 ± 0,00 0,97 ± 0,08	0 8	0,29 ± 0,021 6,5 ± 1,1	7 16	n.d.	
Cu soluble (µg/g p. sec)	21 ± 2,3	11	85 ± 7,1	8	27 ± 5,4	20
Cu cationique (µg/g p. sec)	0,64 ± 0,07	11	68 ± 2,54	4	16 ± 4,6	29
Cu anionique (µg/g p. sec)	18 ± 2,0	11	5,2 ± 1,6	31	2,7 ± 0,26	10
Cu total (µg/g p. frais) (µg/g p. sec)	2,2 ± 0,07 40 ± 6,6	3 16	5,7 ± 0,07 126 ± 10	1 8	4,1 ± 0,83 82 ± 7,9	20 10

n.d.: non-déTECTABLE

### 3.1.3.3 Bilan en métaux

Les tableaux 3.5 et 3.6 donnent le bilan en cuivre et en cadmium pour les macrophytes *Vallisneria americana* et *Myriophyllum spicatum* récoltés sur le terrain. À partir de ces plantes, l'extraction du métal soluble a été faite avec le tampon Tris lors de différentes centrifugations. Le résidu est considéré comme étant le culot insoluble de ces centrifugations auquel le métal pouvait être lié. L'addition du métal des fractions soluble et insoluble (résidu) donne la quantité totale de métal présente chez le macrophyte analysé. Également, le métal soluble a été subdivisé en fractions cationique et anionique (laquelle comprend les PC) suite à une chromatographie ionique. Le pourcentage de récupération est le rapport entre la quantité de métal déposée sur la résine Q-Sepharose et celle recueillie après la chromatographie ionique.

Tableau 3.5: Bilan de la répartition intracellulaire du Cd et du Cu pour *Vallisneria americana* récoltées aux lacs Saint-Louis (SL) et Saint-Pierre (SP)

	SL-1		SL-2		SL-3		SL-4	SL-7		SL-8		SL-9	SL-10			SP-1		SP-2	
	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines	
Cd-soluble / Cd-total (%)	16	10	8	4	22	5	7	28	5	33	38	18	--	6	4	2	4	5	
Cd-cationique / Cd-soluble (%)	25	-- c)	--	--	15	--	100	--	--	50	22	19	--	--	--	--	--	70	
Cd-anionique / Cd-soluble (%)	75	--	--	--	35	--	0	--	80	32	38	39	--	--	--	--	--	22	
Cd-résidu / Cd-total (%)	84	90	92	96	78	95	93	72	95	67	62	82	--	94	96	98	96	95	
Cd-total <sup>a)</sup> (µg Cd/g poids frais)	0,079	0,17	0,019	0,16	0,026	0,16	0,075	0,008	0,033	0,041	0,51	0,054	--	0,14	0,042	0,073	0,04	0,28	
(µg Cd/g poids sec)	2,5	2,3	0,66	2,9	0,95	2,0	1,3	0,48	0,85	1,4	12,8	1,5	--	1,6	1,1	0,72	0,97	6,5	
Récupération <sup>b)</sup> (%)	100	--	--	--	50	--	100	--	80	82	60	58	--	--	--	--	--	92	
Cu-soluble / Cu-total (%)	56	40	74	63	77	48	56	64	68	67	36	71	67	38	54	42	53	68	
Cu-cationique / Cu-soluble (%)	24	76	47	74	23	90	48	33	90	11	70	39	43	77	13	67	3	80	
Cu-anionique / Cu-soluble (%)	34	18	27	6	14	2	38	47	4	76	4	14	27	9	64	13	85	6	
Cu-résidu / Cu-total (%)	44	60	26	37	23	52	44	36	32	33	64	29	33	62	46	58	47	32	
Cu-total <sup>a)</sup> (µg Cu/g poids frais)	0,80	4,60	1,02	5,39	1,22	14,01	0,96	0,32	2,26	1,78	15,59	1,03	0,86	4,7	0,84	1,91	1,7	5,6	
(µg Cu/g poids sec)	25,16	63,44	35,98	95,90	44,74	175,5	17,27	18,00	57,29	59,59	391,7	28,36	23,6	73,5	20,97	18,82	39,2	126,1	
Récupération <sup>b)</sup> (%)	58	94	75	80	37	92	86	80	94	87	74	53	70	86	77	80	88	86	

a): total = M-soluble + M-résidu, exprimé par rapport au poids frais ou au poids sec

b): métal dosé avant la chromatographie ionique/métal dosé après la chromatographie ionique

c): -- indique que la concentration était en-deçà de la limite de détection

Tableau 3.6: Bilan de la répartition intracellulaire du Cd et du Cu pour *Myriophyllum spicatum* récoltées aux lacs Saint-Louis (SL) et Saint-Pierre (SP)

	SL-2		SL-3		SL-7		SL-8		SL-10		SL-11	
	Feuilles	Racines										
Cd-soluble/Cd-total (%)	33	45	52	65	12	7	--	5	5	10	11	59
Cd-cationique/Cd-soluble (%)	71	82	87	81	45	--	--	--	--	--	75	81
Cd-anionique/Cd-soluble (%)	16	-- c)	4	6	35	--	--	--	--	--	--	--
Cd-résidu/Cd-total (%)	67	55	48	35	88	93	100	95	95	90	89	41
Cd-total a) (µg Cd/g poids frais) (µg Cd/g poids sec)	0,025 0,416	0,018 0,518	0,023 0,316	0,021 0,345	0,042 0,325	0,022 0,344	0,023 0,210	0,038 0,694	0,035 0,402	0,025 0,413	0,036 0,451	0,019 0,521
Récupération b) (%)	87	82	11	87	80	--	--	--	--	--	75	81
Cu-soluble/Cu-total (%)	16	6	12	10	20	7	14	4	19	14	33	7
Cu-cationique/Cu-soluble (%)	79	72	90	68	89	89	67	75	69	41	85	61
Cu-anionique/Cu-soluble (%)	20	15	5	10	11	6	16	13	7	17	6	7
Cu-résidu/Cu-total (%)	84	94	88	90	80	93	86	96	81	86	67	93
Cu-total a) (µg Cu/g poids frais) (µg Cu/g poids sec)	7,25 120,1	2,09 59,58	2,58 34,94	2,62 43,55	7,97 61,73	7,51 116,5	3,40 31,62	3,81 68,34	5,38 86,17	3,13 51,05	2,67 33,53	3,78 101,5
Récupération b) (%)	92	87	95	78	100	95	83	88	76	58	91	68

a): total = M-soluble + M-résidu, exprimé par rapport au poids frais ou au poids sec

b): métal dosé avant la chromatographie ionique/métal dosé après la chromatographie ionique

c): -- indique que la concentration était en-deçà de la limite de détection

## 3.2 Plantes exposées

### 3.2.1 Expériences d'exposition

Lors des expériences d'exposition à des concentrations en cuivre et en cadmium de 0,5 ppm (4,4  $\mu\text{M}$  Cd; 7,9  $\mu\text{M}$  Cu), l'évaluation par MINEQL des formes suivantes de métaux retrouvés dans le milieu (pH 6,0; système ouvert à l'atmosphère) a donné:

Cadmium:	$\text{Cd}^{2+}$	93%
	$\text{CdSO}_4$	6%
Cuivre:	$\text{Cu}^{2+}$	83%
	$\text{CuHPO}_4 \text{ aq}$	11%
	$\text{CuSO}_4 \text{ aq}$	4%
	$\text{Cu(OH)}_4^{2-} \text{ aq}$	2%

Donc la forme de l'ion libre reste la forme dominante pour les deux métaux dans les conditions de l'expérience. Aussi, pour la durée de l'exposition au Cu et au Cd, des échantillons ont été prélevés du milieu d'exposition pour des mesures de pH et des métaux en solution (figure 3.3). Pour les métaux, une baisse est constatée entre les temps 0 et 1 jour alors que les mesures subséquentes sont plus constantes. Le pH varie peu. Le même type de profil a été observé pour les autres expériences d'exposition.

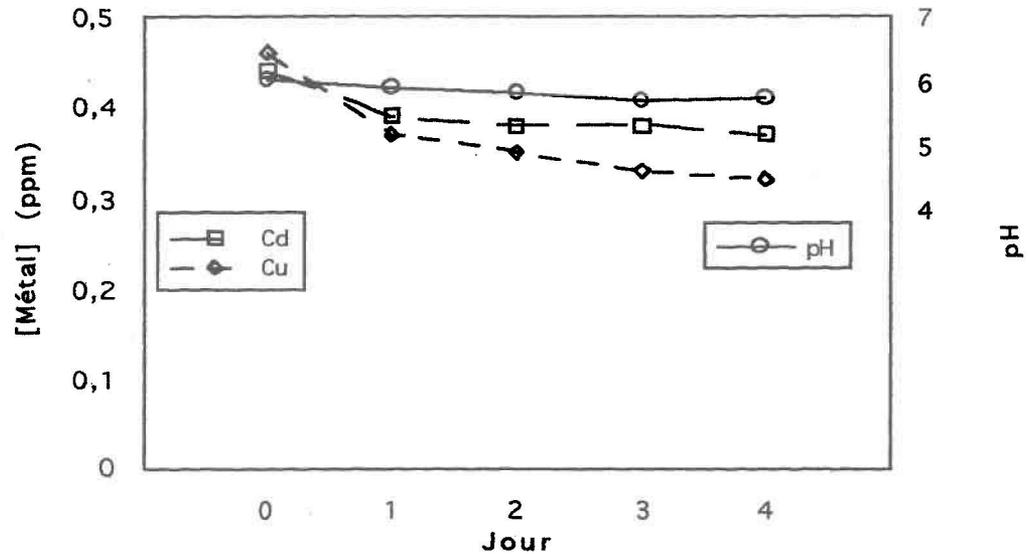


Figure 3.3: Évolution temporelle du pH et des concentrations en métal dans le milieu d'exposition pour *Myriophyllum spicatum*; concentration nominale de Cd et de Cu = 0,5 ppm.

Soulignons que le tableau 3.7 présente un résumé des différentes expériences d'exposition, des analyses qui ont été réalisées ainsi que des figures ou tableaux où les résultats sont présentés.

Tableau 3.7: Tableau récapitulatif des expériences d'exposition

Expérience d'exposition	Extraction employée	Analyses effectuées	Mention
<i>Myriophyllum spicatum</i> exposé à 1 ppm Cu, 4 j	Tris-HCl 10 mM pH 8,0 et lyophilisation du surnageant	Chromatographie d'exclusion (Sephadex G-50) avec dosage du Cu	figure 3.4
		HPLC en phase inverse	figure 3.11
<i>Myriophyllum spicatum</i> exposé à 2 ppm Cd, 4 j	HCl 0,1 N (Rauser)	HPLC en phase inverse	figure 3.6 tableau 3.11
		Répartition intracellulaire du Cd après chromatographie ionique	tableau 3.8
	Tris-HCl 10 mM pH 8,6 et digestion du culot	Chromatographie d'exclusion (Superose 12) avec dosage du Cd	figure 3.5
		HPLC en phase inverse après chromatographie ionique	figure 3.7
	HPLC en phase inverse après chromatographie d'exclusion (Superose 12)	figure 3.8	
<i>Vallisneria americana</i> exposé à 0,5 ppm Cd, 4 j	Tris-HCl 10 mM pH 8,6 et digestion du culot	Répartition intracellulaire du Cd et Cu après chromatographie ionique	tableau 3.9
<i>Vallisneria americana</i> exposé à 0,5 ppm Cd et 0,5 ppm Cu, 4 j	Tris-HCl 10 mM pH 8,6 et digestion du culot	Répartition intracellulaire du Cd et Cu après chromatographie ionique	tableau 3.9
<i>Myriophyllum spicatum</i> exposé à 0,5 ppm Cd et 0,5 ppm Cu, 4 j	Tris-HCl 10 mM pH 8,6 et digestion du culot	Répartition intracellulaire du Cd et Cu après chromatographie ionique	tableau 3.10
		NaOH 1N avec NaBH <sub>4</sub> avec précipitation acide (Grill)	HPLC en phase inverse

### 3.2.2 Répartition intracellulaire du Cd et du Cu

Les tableaux 3.8, 3.9 et 3.10 résument les résultats obtenus pour le bilan en métal pour des macrophytes exposés à de hautes concentrations en métal. Comme pour les tableaux 3.5 et 3.6, le pourcentage de récupération est le rapport entre la quantité de métal déposée sur la résine pour la chromatographie ionique et celle recueillie après. Dans le tableau 3.8 le dosage en cuivre n'a pas été fait pour *M. spicatum* car cette espèce n'avait pas été exposée à ce métal. Les concentrations retrouvées devaient donc être "normales". Cependant les plantes entreposées à la serre ont subi une forte contamination en cuivre, probablement introduite par l'eau du robinet utilisée à remplir les bacs où poussaient les macrophytes. Ce n'est qu'après avoir dosé cet élément, plus tard, chez des vallisnéries pour une expérience qui allait impliquer le cuivre (tableau 3.9), que des concentrations en cuivre, de beaucoup supérieures à celles rencontrées dans l'environnement, ont été constatées pour les plantes de la serre. Rappelons que pour des vallisnéries récoltées aux lacs Saint-Pierre et Saint-Louis ces concentrations variaient, pour des feuilles, de 20 à 80  $\mu\text{g Cu/g p. sec}$  (tableau 3.5). Donc pour les expériences subséquentes, les plantes utilisées allaient devoir avoir des teneurs en Cu "acceptables". Ainsi avant de subir une nouvelle exposition au Cd et au Cu, les myriophylles ont passé par une étape de dépuración dans le milieu nutritif pendant un mois. Ce temps a suffi pour ramener les concentrations de cuivre qui étaient respectivement pour les feuilles et les racines de 280 et de 990  $\mu\text{g Cu/g p. sec}$  à des niveaux rencontrés dans l'environnement (environ 50  $\mu\text{g Cu/g p. sec}$ ; tableau 3.10).

Tableau 3.8: Bilan de la répartition intracellulaire du Cd pour *Myriophyllum spicatum* contrôle et après exposition à 2 ppm Cd, 4 jours.

	<i>Myriophyllum spicatum</i> contrôle		<i>Myriophyllum spicatum</i> exposé à 2 ppm Cd	
	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines
Cd-soluble/Cd-total (%)	23	11	29	7
Cd-cationique/Cd-soluble (%)	n.d.	n.d.	75	73
Cd-anionique/Cd-soluble (%)	n.d.	n.d.	12	15
Cd-résidu/Cd-total (%)	77	89	71	93
Cd-total (µg Cd/g poids frais)	0,074	0,038	75	79
(µg Cd/g poids sec)	1,1	0,34	890	800
Récupération (%)			87	88

n.d.: non-déTECTABLE

Tableau 3.9: Bilan de la répartition intracellulaire du Cd et du Cu pour *Vallisneria americana* après expériences d'exposition.

	<i>Vallisneria am.</i> contrôle				<i>Vallisneria am.</i> exposé à 0,5 ppm Cd				<i>Vallisneria am.</i> exposé à 0,5 ppm Cd et 0,5 ppm Cu			
	Feuilles		Racines		Feuilles		Racines		Feuilles		Racines	
	Cd	Cu	Cd	Cu	Cd	Cu	Cd	Cu	Cd	Cu	Cd	Cu
M-soluble/M-total (%)	--a	--a	--a	--a	52	82	24	29	60	76	11	9
M-cationique/M-soluble (%)					80	16	84	74	93	52	25	78
M-anionique/M-soluble (%)					2	4	2	17	3	26	26	8
M-résidu/M-total (%)					48	18	76	71	40	24	89	91
M-total (µg M/g poids frais)	0,038	14	0,043	17	30	12	45	13	12	67	45	560
(µg M/g poids sec)	0,92	350	0,77	310	1 280	490	700	200	500	2 680	920	11 310
Récupération (%)					85	21	85	91	96	78	51	86

a): analyse du métal total seulement

Tableau 3.10: Bilan de la répartition intracellulaire de Cd et du Cu pour *Myriophyllum spicatum*, ayant subi une épuration, avant et après des expériences d'exposition.

	<i>Myriophyllum sp</i> provenant de la serre après dépuración				<i>Myriophyllum sp.</i> exposé à 0,5 ppm Cd et 0,5 ppm Cu			
	Feuilles		Racines		Feuilles		Racines	
	Cd	Cu	Cd	Cu	Cd	Cu	Cd	Cu
M-soluble/M-total (%)	11	29	13	22	13	23	6	9
M-cationique/M-soluble (%)	n.d.	74	n.d.	66	67	48	74	59
M-anionique/M-soluble (%)	n.d.	21	n.d.	14	32	44	22	17
M-résidu/M-total (%)	89	71	87	78	87	77	94	91
M-total ( $\mu\text{g M/g}$ poids frais)	0,098	4,8	0,043	5,8	24	370	29	100
( $\mu\text{g M/g}$ poids sec)	1,1	54	0,38	52	330	4 900	270	1 000
Récupération (%)		95		80	99	92	96	76

n.d.: non-délectable

Les rapports des poids humides sur les poids secs sont similaires à ceux retrouvés pour la détermination du bilan en métal pour les plantes récoltées sur le terrain (tableaux 3.5 et 3.6) à l'exception des feuilles de vallisnérias exposées à 0,5 ppm de Cd et à 0,5 ppm de Cd et de Cu (tableau 3.9). Ces rapports sont aux environs de 41 alors qu'ils variaient entre 25 et 35 pour les plantes provenant du milieu naturel.

Les macrophytes sont en mesure d'accumuler les métaux et des facteurs de concentration importants peuvent être observés après exposition. Si on fait le rapport des concentrations en métal chez les plantes ( $\mu\text{g/g p. sec}$ ) sur les concentrations en métal pour le milieu d'exposition ( $\mu\text{g/mL}$ ), on obtient, pour les myriophylles exposées à 2 ppm de Cd (tableau 3.8), des facteurs de concentration, pour ce métal, de 445 et 400 respectivement pour les feuilles et les racines. Pour le Cd chez les vallisnérias exposées à 0,5 ppm de ce métal (tableau 3.9), ces facteurs sont de 2 560 pour les feuilles et de 1 400 pour les racines. Cependant, lorsqu'exposé à 0,5 ppm de Cd et de Cu, le facteur de concentration pour le

Cd chez les feuilles diminue de plus de la moitié (1 000) alors qu'il est plus constant chez les racines (1 840). Pour le cuivre, ces facteurs sont d'environ 5 000 pour les feuilles et de 22 000 pour les racines et cela, en considérant que les plantes non-exposées à ce métal possédaient déjà des teneurs dépassant largement celles retrouvées dans l'environnement. Pour les myriophylles qui ont été épurées (tableau 3.10), ces facteurs sont pour le Cu: 9 800 et 2 000 respectivement pour les feuilles et les racines; et pour le Cd: 660 et 540 pour les feuilles et les racines.

Toutefois, la répartition du métal entre la phase soluble et le résidu après exposition change peu par rapport à la répartition observée avant l'expérience. Pour *Vallisneria americana*, la fraction soluble du métal est beaucoup moins importante pour les racines que pour les feuilles. Cela est encore plus flagrant après exposition alors qu'une forte partie du Cu, présent dans le milieu, ne semblerait pas assimilée mais demeurerait liée aux composantes structurales (insolubles) des plantes (tableau 3.9). Pour les feuilles de myriophylles, le pourcentage de métal soluble ne varie pas après exposition pour le Cd ou le Cu. Ce pourcentage décroît cependant pour les racines alors qu'il passe de 13 à 6 % pour le Cd et de 23 à 9 % pour le Cu (tableau 3.10).

Pour *Vallisneria americana*, la comparaison des pourcentages de métal sous forme anionique ou sous forme cationique avant ou après exposition serait difficile car pour la chromatographie ionique, le métal déposé sur la résine n'a pas entièrement été récupéré à sa sortie (tableau 3.9). Pour *Myriophyllum spicatum*, dont les pourcentages de récupération sont bons, la concentration de Cu soluble augmente de beaucoup après exposition et chez les feuilles, ce sont les formes anioniques qui répondent davantage passant de 21 à 44 %. Chez les racines, les deux formes, anionique et cationique, augmentent et leur importance relative demeure à peu près inchangée (tableau 3.10). Ce type de comparaison ne peut être fait pour le Cd car les valeurs pour le contrôle étaient trop faibles.

Bien qu'il y ait eu une accumulation évidente de métal, la répartition des métaux sous les différentes formes (en pourcentage) ne démontre pas de variations importantes par rapport aux bilans observés pour les plantes recueillies dans le milieu naturel où les concentrations en métal sont beaucoup plus basses (tableaux 3.5 et 3.6). Les expériences d'exposition servaient également à favoriser de la synthèse de PC pouvant être décelées par HPLC.

### 3.2.3 Chromatographie d'exclusion

La figure 3.4 donne le profil de séparation pour la chromatographie d'exclusion (Sephadex G-50) pour des racines de *Myriophyllum spicatum* exposées à 1 ppm de Cu et pour un contrôle. L'extraction a été faite avec du tampon Tris suivie d'une lyophilisation. Les protéines ainsi obtenues étaient solubilisées dans le tampon servant d'éluant et 190  $\mu\text{g}$  de Cu ont été ajoutés avant la chromatographie pour vérifier la présence de liaisons non-spécifiques pour le contrôle. Le volume mort de la colonne a été déterminé à l'aide du dextran bleu et est situé à la fraction 17.

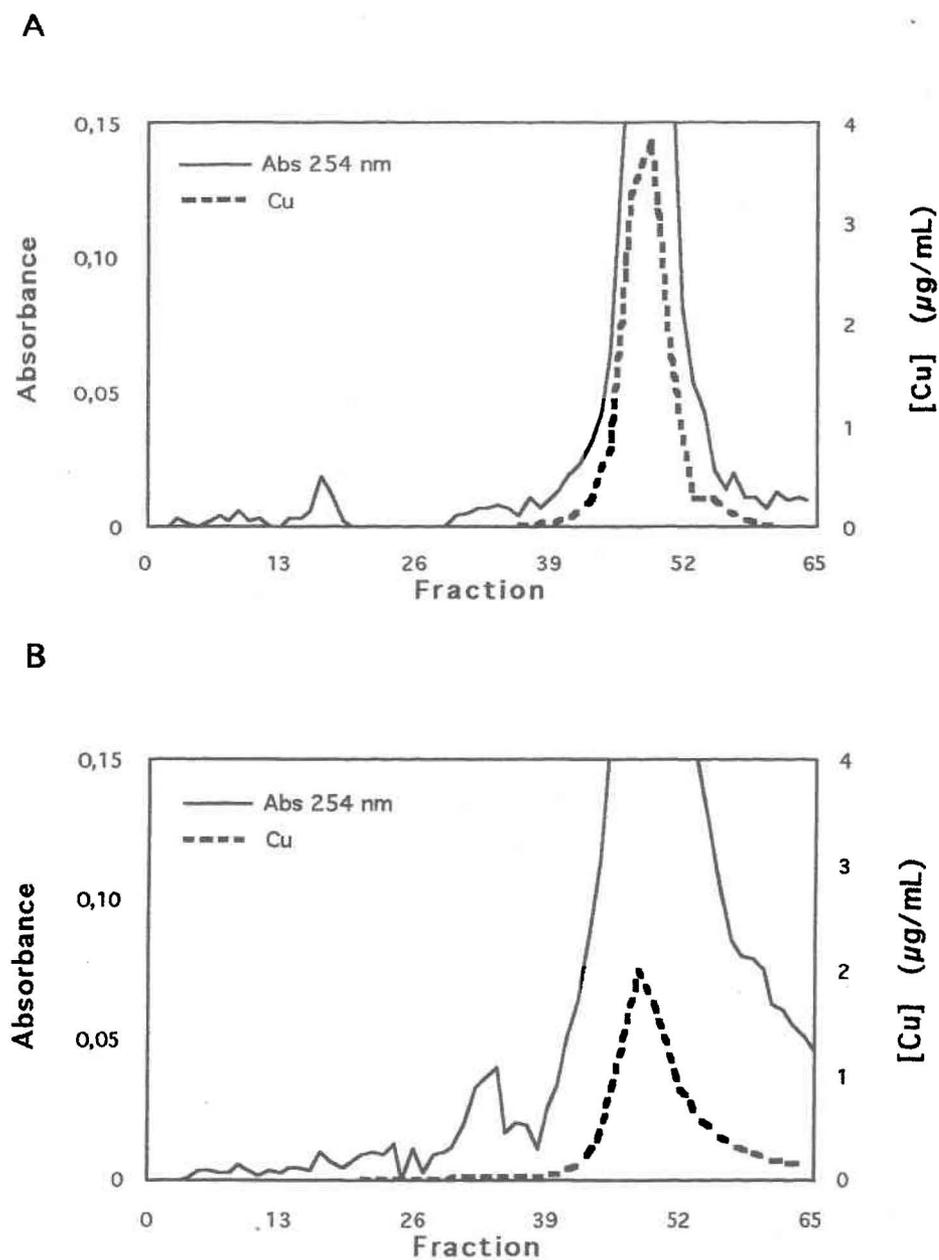


Figure 3.4: Profil d'élution par chromatographie d'exclusion sur Sephadex G-50 pour des racines de *Myriophyllum spicatum* (A) contrôle, 80 mg de protéines; (B) exposées à 1 ppm de Cu, 4 j., 134 mg de protéine. 190 µg de Cu ont été ajoutés avant la chromatographie.

Le profil entre les deux chromatogrammes est sensiblement le même alors que les fractions 42 à 56 contiennent la majeure partie du métal dans les deux cas. Le cuivre a été récupéré après la chromatographie à 72 % pour le contrôle et à 56 % pour les vallisnéries exposées. Selon l'allure de la courbe d'absorbance, il semblerait également qu'il restait encore des protéines à éluer pour les plantes exposées.... et un peu de Cu.

Pour des myriophylles exposées à 2 ppm de cadmium, ce type de chromatographie a également été utilisé après l'étape de la chromatographie ionique, servant à déterminer le bilan en métal, pour purifier davantage les polypeptides contenus dans la fraction anionique. La figure 3.5 montre le profil de séparation sur Superose 12. Le Cd n'a été dosé que pour les myriophylles exposées car il n'était pas détectable dans la phase soluble du contrôle. Les courbes d'absorbance à 254 et 280 nm sont semblables pour les spécimens exposés comme pour le contrôle. Les fractions d'intérêt obtenues par chromatographie d'exclusion peuvent être par la suite reconcentrées pour être caractérisées davantage. Cela peut être fait par lyophilisation ou, comme dans cette étude, en passant par chromatographie ionique sur Q-Sepharose les fractions comprises entre 24 et 34 des plantes exposées et des contrôles pour les analyser par HPLC en phase inverse (voir section suivante).

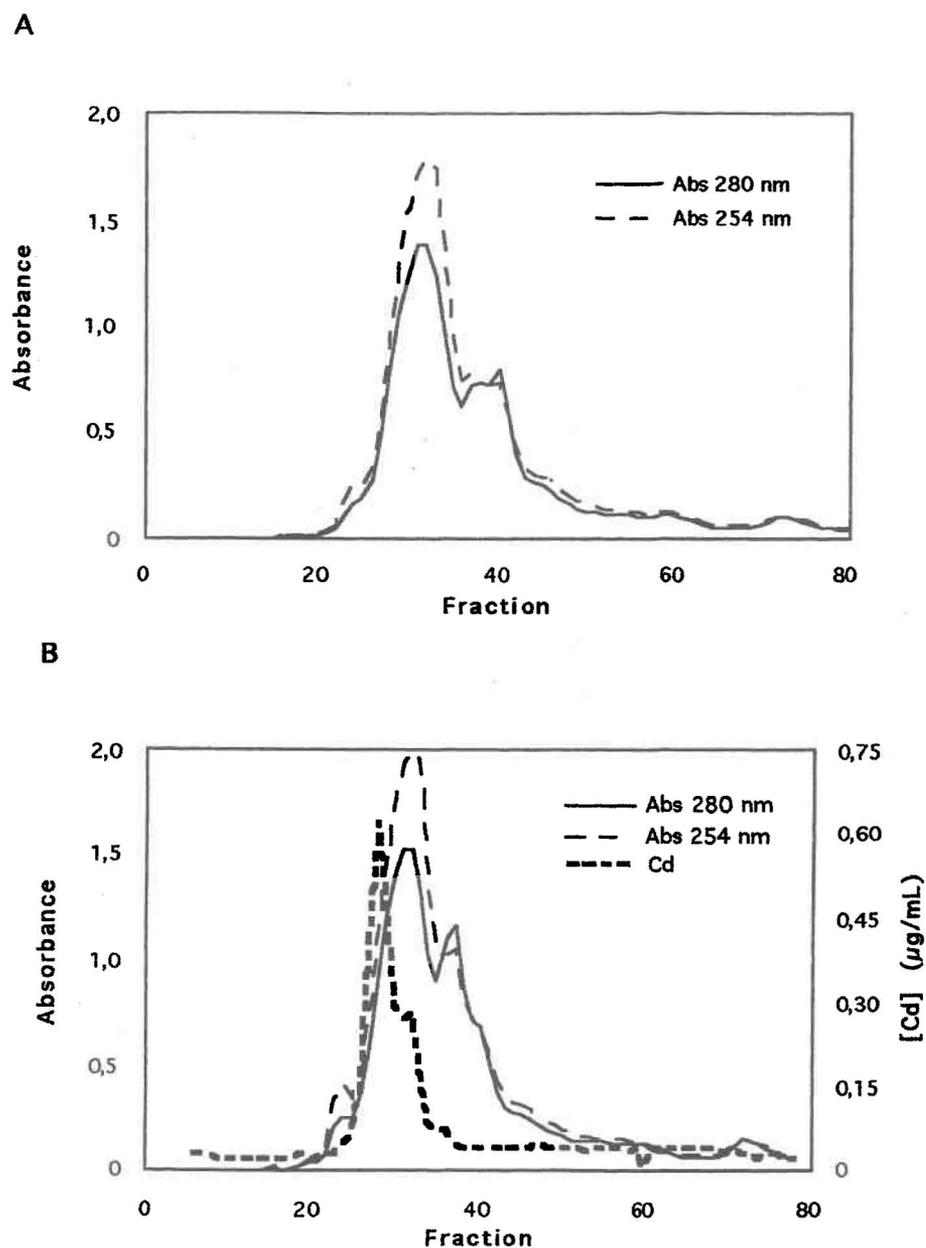


Figure 3.5: Profil d'élution par chromatographie d'exclusion sur Superose-12 pour des feuilles de *Myriophyllum spicatum* après chromatographie ionique. (A) contrôle; 4 mL de l'éluant de la chromatographie ionique pour 6,5 g p. frais; (B) exposées à 2 ppm de Cd, 4 j. ; 4 mL de l'éluant de la chromatographie ionique pour 5,7 g p. frais

### 3.2.4 Dosage des PC par HPLC en phase inverse

Deux approches ont été utilisées pour l'extraction du matériel brut avant de procéder à la séparation sur HPLC en phase inverse: l'extraction de Rauser et celle de Grill. Ces analyses au HPLC ont aussi été faites après les différentes étapes (chromatographie ionique et d'exclusion sur Superose 12) employées pour la détermination de la répartition du Cd pour des myriophylles exposées à 2 ppm de Cd (voir tableau 3.7). De plus, les protéines obtenues pour des myriophylles exposées à 1 ppm de Cu et contrôle après extraction avec le tampon Tris et lyophilisation (section 3.2.3), et utilisées pour la chromatographie d'exclusion sur Sephadex G-50, ont aussi été analysées par HPLC.

#### 3.2.4.1 Extraction de Rauser

Cette approche a été utilisée, entre autres, pour *Myriophyllum spicatum* exposée à 2 ppm de Cd. La figure 3.6 donne les chromatogrammes de HPLC pour les racines et les feuilles de myriophylles exposées et contrôles après extraction au HCl sur le matériel brut. Les temps de rétention pour les étalons Cys et GSH sont respectivement de 4,4 et 8,9 minutes.

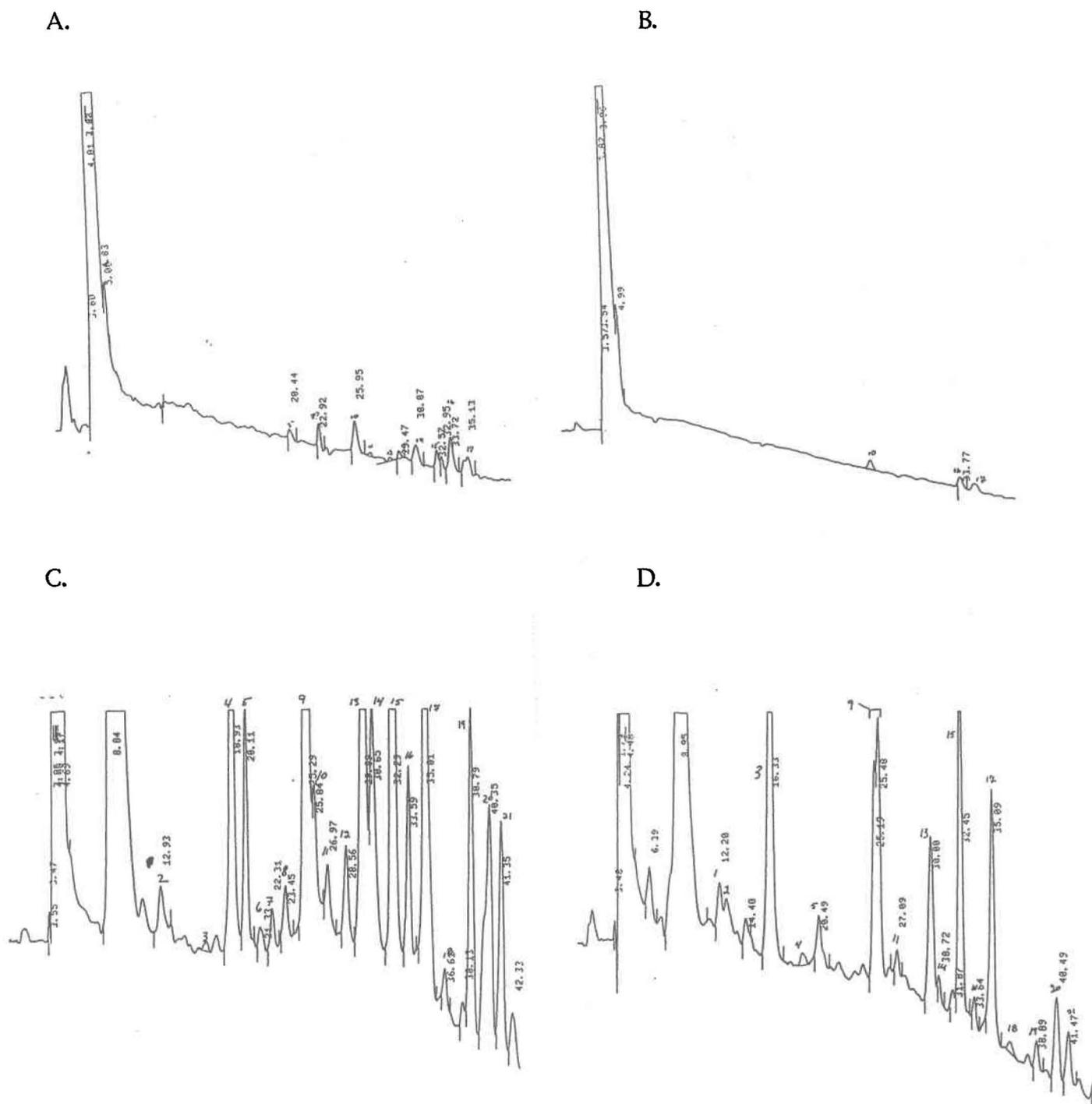


Figure 3.6: Profil d'éluion sur HPLC en phase inverse avec dérivation post-colonne (réactif d'Ellman) et gradient 0 à 20% acétonitrile-TCA (0,1%) après extraction au HCl pour *Myriophyllum spicatum*. (A) racines contrôles; (B) racines exposées à 2 ppm Cd, 4 j.; (C) feuilles contrôles; (D) feuilles exposées à 2 ppm Cd, 4 j.

Pour fins de comparaison, les principaux pics retrouvés ont été numérotés selon leur ordre d'élution et le contenu en thiol fut mesuré en utilisant le GSH comme standard (tableau 3.11). Pour les racines, seulement la cystéine de même que quelques pics de dimension mineure sont retrouvés. Vu l'absence apparente de GSH, il semble peu probable que cette partie des myriophylles soit en mesure de synthétiser des PC. La cystéine et le glutathione sont toutefois retrouvés pour les feuilles avec plusieurs autres pics et cela autant pour le contrôle que pour les feuilles exposées. Une plus grande quantité de ces "autres pics" sont observés pour le contrôle que pour les plantes exposées (4, 5, 14, 19) alors que le pic numéroté 3, presque inexistant pour le contrôle (1 nmole thiol/g p. frais), apparaît après exposition (37 nmoles thiol/g p. frais). La plupart des autres pics présents pour le contrôle, et qui le restent après l'exposition, ont cependant vu leur concentration diminuer. Également, les feuilles contrôles ont une concentration de GSH de 208 nmoles de thiol/g poids frais, qui diminue à 115 nmoles de thiol/g p. frais après exposition.

Tableau 3.11: Concentrations de groupements thiol pour les différents pics obtenus après HPLC en phase inverse pour des extractions au HCl sur *Myriophyllum spicatum* contrôle et exposée à 2 ppm Cd, 4 jours.

Pic	[thiol] (nmole/g p. frais)			
	Contrôle		Exposée	
	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles
1				7,56
2		2,27		
3		0,95		36,6
4	0,65	30,8		2,00
5		10,9		3,34
6		1,14		
7		1,72		
8	1,16	2,20		
9		45,0		26,8
10	2,68	5,32	0,76	
11	0,18	2,31		1,18
12	0,27	4,22		
13		30,3		12,7
14	1,69	16,5		1,70
15	1,00	78,9		23,0
16	2,84	8,03	0,71	
17	1,82	40,0	0,85	16,5
18		1,43		1,70
19		17,0		1,75
20		20,4		6,79
21		12,4		3,65

En plus des extractions au HCl effectuées directement sur des feuilles et des racines, le contenu en thiol a été mesuré pour suivre les différentes étapes (chromatographies ionique et d'exclusion) servant à déterminer de la répartition du Cd (section 3.2.2). Les figures 3.7 et 3.8 donnent les chromatogrammes pour les feuilles de myriophylles, contrôles et exposées, après ces étapes de purification.

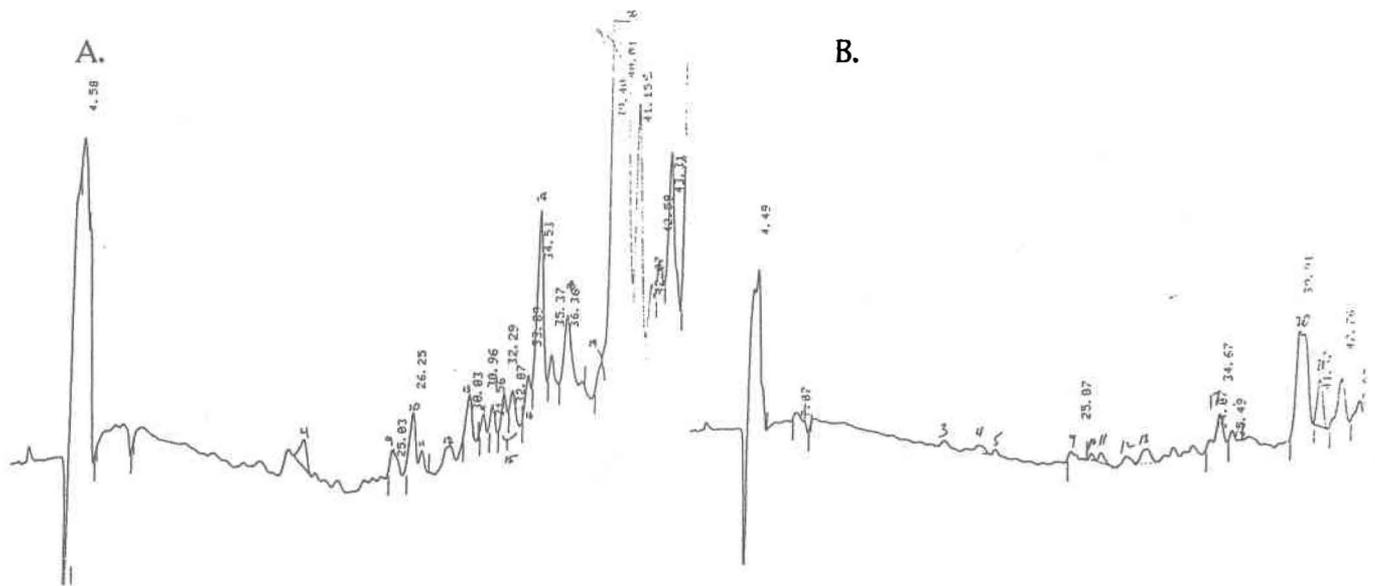


Figure 3.7: Profil d'élution sur HPLC en phase inverse avec dérivatisation post-colonne (réactif d'Ellman) et gradient 0 à 20% acétonitrile-TFA (0.1%) après chromatographie ionique sur Q-Sepharose pour les feuilles de *Myriophyllum spicatum*. (A) contrôles; (B) exposées à 2 ppm Cd, 4 j.

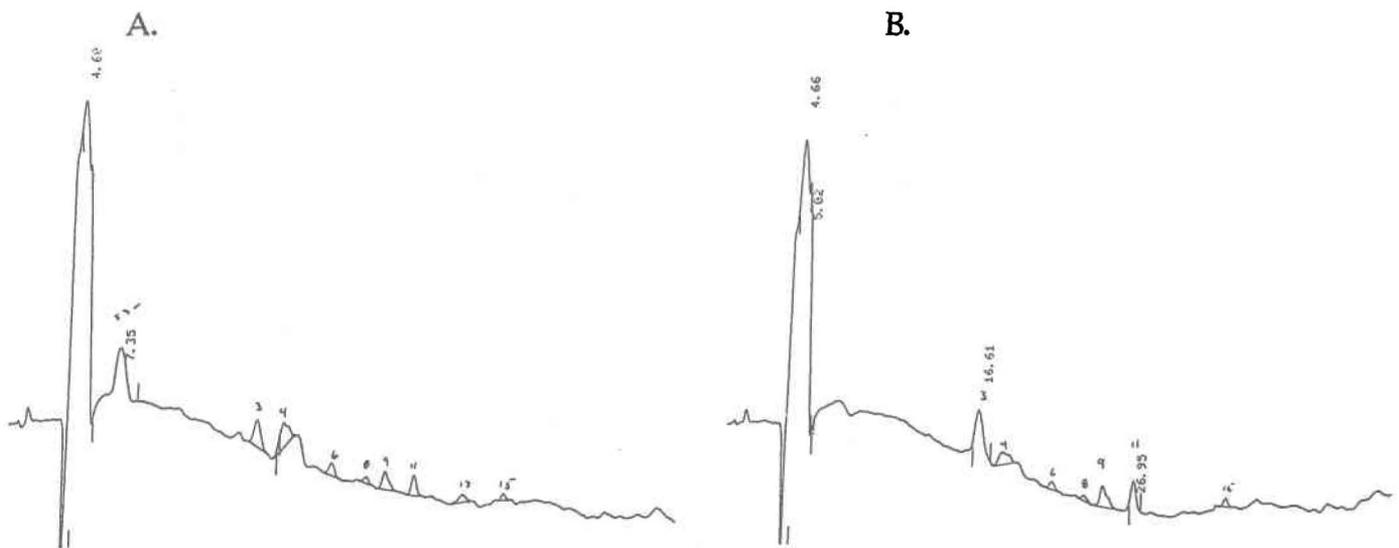


Figure 3.8: Profil d'élution sur HPLC en phase inverse avec dérivatisation post-colonne (réactif d'Ellman) et gradient 0 à 20% acétonitrile-TFA (0.1%) après chromatographie d'exclusion sur Superose-12 pour les feuilles de *Myriophyllum spicatum*. (A) contrôles; (B) exposées à 2 ppm Cd, 4 j.

Après une chromatographie ionique (figure 3.7) le pic caractéristique du GSH n'est plus présent; il en va de même pour le pic no 3 retrouvé, après extraction au HCl, essentiellement chez les feuilles de myriophylles exposées. Aussi, une forte diminution est constatée pour l'ensemble des pics et plus particulièrement pour les pics ayant de faibles temps de rétention, qui deviennent alors presque inexistantes. Contrairement aux chromatogrammes résultant de l'extraction au HCl, la ligne de base augmente pour des temps de rétention de 20 minutes et plus, endroit où apparaît également les autres pics. Plusieurs pics sont donc disparus pendant cette étape de purification.

Après une chromatographie d'exclusion sur Superose 12, les fractions d'intérêt (24 à 34, figure 3.5 B) où des protéines étaient présentes, ont été reconcentrées sur résine échangeuse d'ion avant d'être analysées par HPLC (figure 3.8). La plupart des pics obtenus après la chromatographie ionique (figure 3.7) ayant des temps de rétention de 20 minutes et plus ont pratiquement tous disparus et une stabilisation de la ligne de base est également constatée. Le pic no 3, qui était beaucoup plus important pour les myriophylles exposées (figure 3.6 D), est de nouveau présent mais semble être en concentrations égales chez le contrôle et pour les plantes exposées. De plus, la présence de l'ion sulfure, à un temps de rétention de 7,35 minutes, a été constatée pour le contrôle.

L'extraction au HCl a également été faite sur *Vallisneria americana*. Après HPLC en phase inverse seule la cystéine a été retrouvée pour les feuilles et les racines comme ce fut le cas pour les racines de *Myriophyllum spicatum*. Donc en utilisant cette extraction sur du matériel brut, le GSH, molécule nécessaire à la synthèse des PC, n'a été retrouvé que pour les feuilles de *Myriophyllum spicatum*.

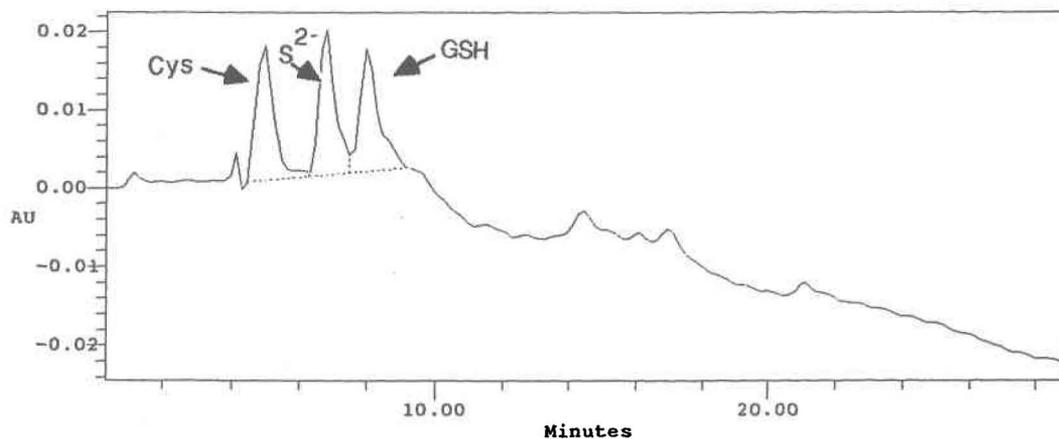
### 3.2.4.2 Extraction de Grill

En procédant par cette extraction, il a été possible d'identifier le GSH pour les feuilles et les racines des macrophytes étudiés. La présence d'un agent réducteur ( $\text{NaBH}_4$ ) semblerait permettre au GSH présent de demeurer sous forme réduite pendant l'extraction et de pouvoir être dosé. Le  $\text{NaBH}_4$  pourrait également réduire le GSH présent dans la cellule sous forme oxydée; donc la méthode analytique répondrait au GSH total (annexes, section A.2). Les concentrations en GSH pour les feuilles et les racines des vallisnéries varient entre 3 et 6 nmoles de thiol/g poids frais. Toutefois, aucun pic ressemblant aux PC n'a été retrouvé par cette méthode d'extraction.

Les figures 3.9 et 3.10 montrent les chromatogrammes pour des feuilles et des racines de *Myriophyllum spicatum* avant et après exposition à 0,5 ppm de Cu et de Cd. En plus de la cystéine (5 min) et du glutathione (7.9 min), le sulfure est également retrouvé entre ces deux éléments à un temps de rétention de 6,8 minutes. Les valeurs de GSH pour les contrôles sont respectivement de 26,5 et 4,7 nmoles/g poids frais pour les feuilles et racines des myriophylles. Toutefois le GSH a pratiquement disparu après l'exposition (figure 3.10) alors que seul la cystéine et le sulfure sont retrouvés.

Les extractions faites sur *Myriophyllum spicatum* et *Vallisneria americana* en utilisant le  $\text{NaBH}_4$  en milieu alcalin, suivies de précipitations acides, n'ont pas permis d'obtenir un produit suffisamment concentré pour détecter d'autres composés que la cystéine, le glutathione et le sulfure.

A.



B.

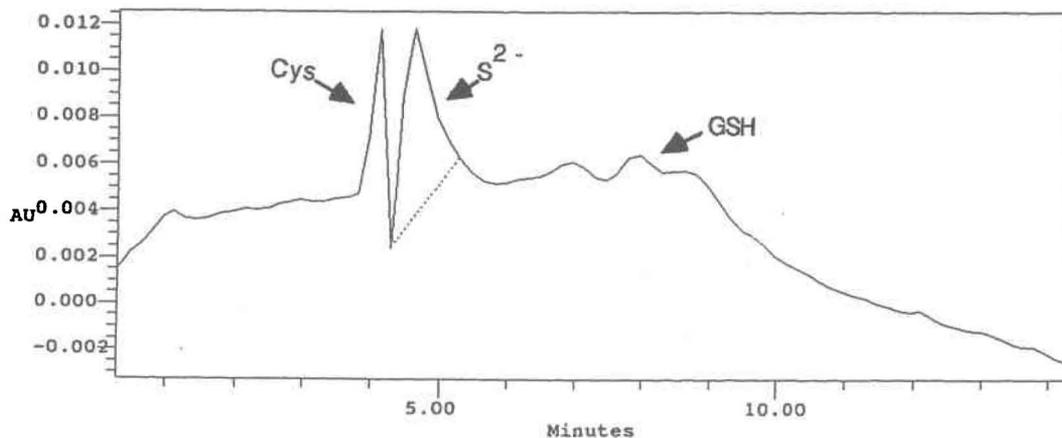
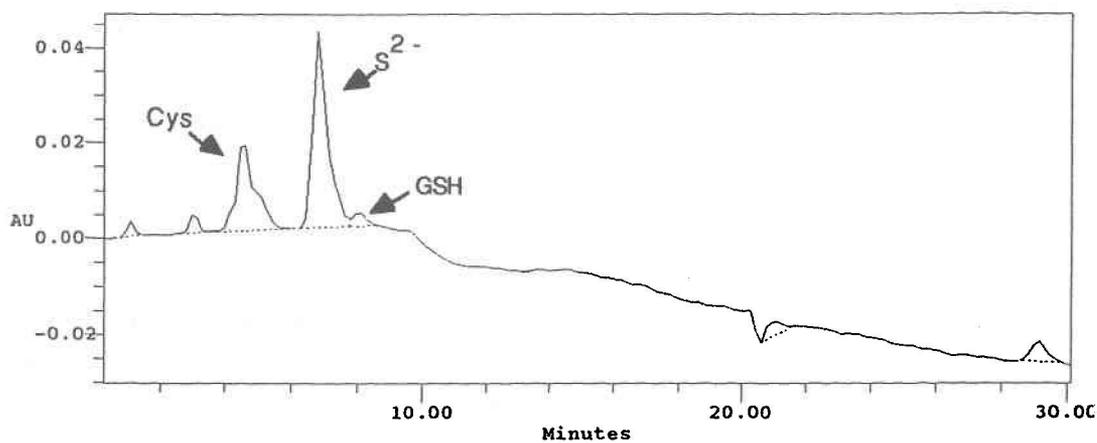


Figure 3.9: Profil d'éluion sur HPLC en phase inverse avec dérivation post-colonne (réactif d'Ellman) et gradient 0 à 20% acétonitrile-TFA (0,1%) après extraction de Grill pour les feuilles de *Myriophyllum spicatum*. (A) provenant de la serre et épurées; (B) exposées à 0,5 ppm Cd et 0,5 ppm Cu.

A.



B.

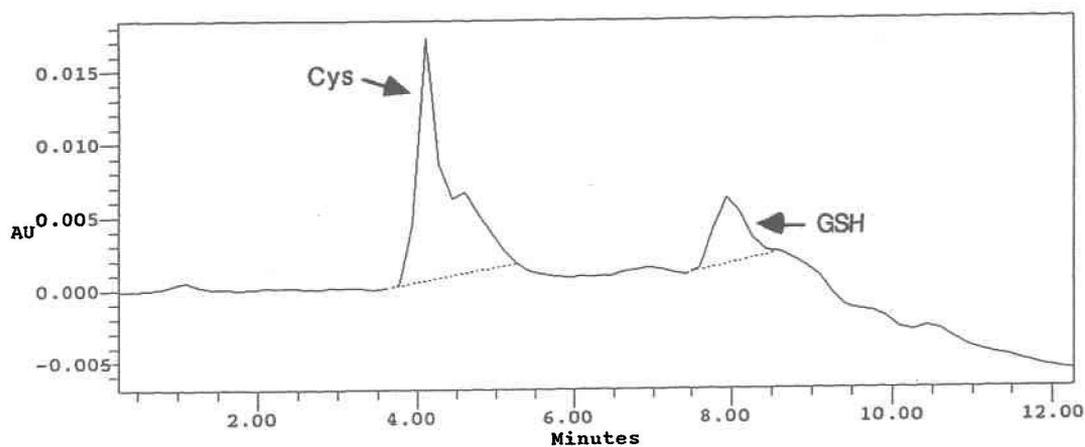


Figure 3.10: Profil d'éluion sur HPLC en phase inverse avec dérivation post-colonne (réactif d'Ellman) et gradient 0 à 20% acétonitrile-TFA (0,1%) après extraction de Grill pour les racines de *Myriophyllum spicatum*. (A) provenant de la serre et épurées; (B) exposées à 0,5 ppm Cd et 0,5 ppm Cu.

À la section 3.2.3, *Myriophyllum spicatum* a été extraite avec du tampon Tris-HCl suivie d'une lyophilisation avant chromatographie d'exclusion sur Sephadex G-50. Une partie de ces protéines lyophilisées a été solubilisée dans de l'eau puis analysée au HPLC. Des différences entre les plantes contrôles et celles exposées (figure 3.11) ont alors été notées. Sur le chromatogramme représentant le blanc, seul le pic identifié au GSH est présent, alors que pour l'extrait provenant de plantes ayant été exposées à un ppm de Cu pendant 4 jours, d'autres pics sont observés. Rappelons que les conditions utilisées pendant la chromatographie ne sont pas les mêmes que celles utilisées pour les analyses précédentes alors que l'acide phosphorique est employé au lieu d'utiliser le TFA. Le débit a été fixé à 1,5 mL/min et le réactif d'Ellman, ajouté à 0,5 mL/min. Par cette approche, il aurait été possible de concentrer suffisamment de matériel pour permettre de détecter des composés dont la synthèse est induite par les métaux.

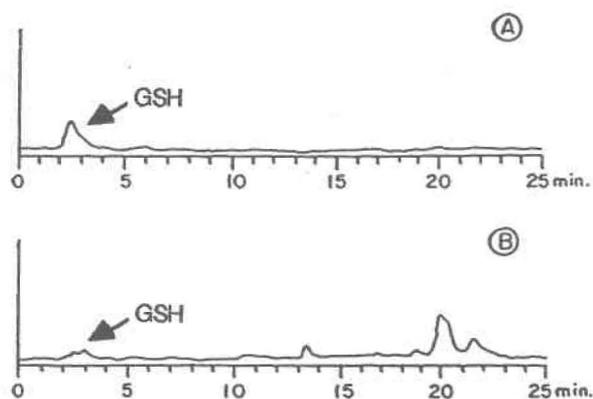


Figure 3.11: Profil d'éluion sur HPLC en phase inverse avec dérivatisation post-colonne (réactif d'Ellman) et gradient 0 à 20% acétonitrile- $\text{H}_3\text{PO}_4$  (0,05%) après extraction avec le tampon Tris suivi d'une lyophilisation pour des feuilles de *Myriophyllum spicatum*. (A) contrôles, 80 mg de protéine/mL; (B) exposées à 1 ppm de Cu, 4 j, 40 mg de protéine/mL.

## CHAPITRE 4: DISCUSSION

### 4.1 Caractéristiques physico-chimiques du milieu

Les gradients de concentration en métal déterminés par l'analyse de plantes entières (St-Cyr, communication personnelle, 1992), et selon les valeurs en ions métalliques libres calculées pour l'eau ambiante près des sédiments (Amyot 1992; Amyot et al. 1994), ont été utilisés pour choisir les stations à échantillonner. Les caractéristiques physico-chimiques qui sont énumérées dans la section suivante proviennent, en grande partie, de l'étude d'Amyot (1992) et d'Amyot et al. (1994). Pour l'emplacement des stations, il faudra se référer aux figures 2.2 et 2.3.

#### 4.1.1 Lac Saint-Louis

##### 4.1.1.1 Eaux

Pour les stations échantillonnées dans ce lac, le pH varie de 7,6 à 8,2. Les eaux provenant de la rivière des Outaouais sont brunes, peu minéralisées (conductivité  $< 100 \mu\text{Siemens/cm}$ ), ont une alcalinité basse ( $< 1 \text{ mequiv./L CaCO}_3$ ) et contiennent de hautes concentrations en acides humiques (St-Cyr et Campbell 1994). D'autre part, les eaux provenant du fleuve Saint-Laurent, dont la contribution annuelle est 13 fois plus importante que la rivière des Outaouais, sont moins colorées (eaux vertes) mais beaucoup plus minéralisées (conductivité  $> 250 \mu\text{Siemens/cm}$ ) et plus riches en carbonate (alcalinité  $> 1,5 \text{ mequiv./L CaCO}_3$ ). Selon l'influence des cours d'eau, les stations peuvent être regroupées de la façon suivante:

- 1) eaux vertes: stations 2 et 3;
- 2) rivière des Outaouais: stations 1 et 4;
- 3) rivière Saint-Louis: stations 7, 8 et 11;
- 4) Baie de Valois (zone de mélange): stations 9 et 10.

#### 4.1.1.2 Sédiments

Selon Champoux et Sloterdijk (1988) il y a une zone de faible sédimentation, au centre du lac et correspondant à l'axe principal allant du barrage de Pointe des Cascades à la région de Lachine, où la vitesse des courants est forte. Il y a également plusieurs zones où la sédimentation est plus importante et qui sont situées le long de la rive nord et au sud et à l'est des îles de la Paix. Les stations 2, 3, 9, 10 et 11 seraient donc parmi celles dont la sédimentation est faible et où l'argile représente 10% des sédiments alors que les autres stations seraient regroupées comme étant celles où la sédimentation est plus importante et où l'argile est présent en quantité plus importante constituant alors près de 50 % des sédiments. Des sédiments riches en argile et en limon devraient être *a priori* plus aptes à capter les métaux, grâce surtout à leur rapport surface/volume plus élevé, que les autres dont les contenus en sable sont plus élevés (Amyot 1992; Amyot et al. 1994).

Les zones de contamination en métaux dans le lac Saint-Louis sont plutôt dispersées et leur distribution spatiale serait probablement attribuable à la localisation des différentes sources de contamination ponctuelles. D'après l'étude d'Amyot (1992) et d'Amyot et al. (1994), les stations 2, 3 et 11 étaient généralement celles dont les teneurs en métaux étaient les plus basses. Ces emplacements correspondent également aux emplacements jugés moins contaminés par Champoux et Sloterdijk (1988). Les maximums sont variables selon les métaux pour les différentes stations étudiées (Amyot 1992; Amyot et al. 1994), les stations 7 et 8 étant celles dont les concentrations totales et maximales en Cd et Cu dans les sédiments ont été observées.

Également, lors des extractions séquentielles faites sur les sédiments (Amyot 1992; Amyot et al. 1994), la fraction 1 contenant les métaux facilement échangeables avait des teneurs faibles en métaux traces en comparaison avec les fractions contenant les métaux plus fortement retenus aux oxydes de fer et de manganèse (fraction 3). Le Cu était surtout

retrouvé dans la fraction 4 (lié à la matière organique). À partir de ces données et du pH ambiant, et à l'aide d'un modèle d'adsorption (Tessier 1992; voir section 3.11), les concentrations en ions libres ont pu être estimées (Amyot 1992; Amyot et al. 1994). Cette forme serait celle pouvant donner la meilleure indication du métal biodisponible pour les macrophytes. Les concentrations en métaux dans les sédiments, obtenues par l'addition des fractions 1 à 3, varient entre 0,05 à 16,46 mg/kg pour le Cd et entre 0,32 à 11,98 mg/kg pour le Cu (Amyot 1992; Amyot et al. 1994). Ces valeurs correspondraient à la grande majorité des métaux potentiellement biodisponibles (mais pas au métal total car la fraction 4 n'est pas comprise). D'un autre côté, les valeurs de métal total qu'on pourrait considérer comme étant celles pouvant être normalement retrouvées dans des sédiments lacustres (bruit de fond) seraient respectivement pour le Cd et le Cu de 0,4 et 45 mg/kg (Salomons et Förstner 1984). Également, le gradient de contamination des sédiments n'est pas le même selon qu'il s'agisse du métal potentiellement biodisponible, obtenu par la somme des fractions 1 à 3 de l'extraction séquentielle, ou du métal sous forme d'ion libre ( $M^{z+}$ ) présent dans l'eau interstitielle. Cela s'applique davantage au Cd où il peut être constaté, à la figure 4.1A, qu'il y a une faible relation entre le  $Cd^{2+}$  et le Cd total contenu dans les sédiments, contrairement au cas du Cu, où cette relation est plus distincte (figure 4.1B). La contamination des sédiments a aussi été corrélée avec leur contenu en eau et en matière organique (Amyot 1992; Amyot et al. 1994).

## 4.1.2 Lac Saint-Pierre

### 4.1.2.1 Eaux

Des variations plus importantes, pour le pH, ont été notées pour ce lac que pour le lac Saint-Louis alors que le pH était situé entre 6,8 et 8,5. Les stations 1 et 2, situées dans la portion des îles de Sorel, étaient parmi celles où des pH maximums étaient observés. Ces deux stations ont également des eaux fortement minéralisées (conductivité et Ca dissous élevés) et de faible couleur et turbidité.

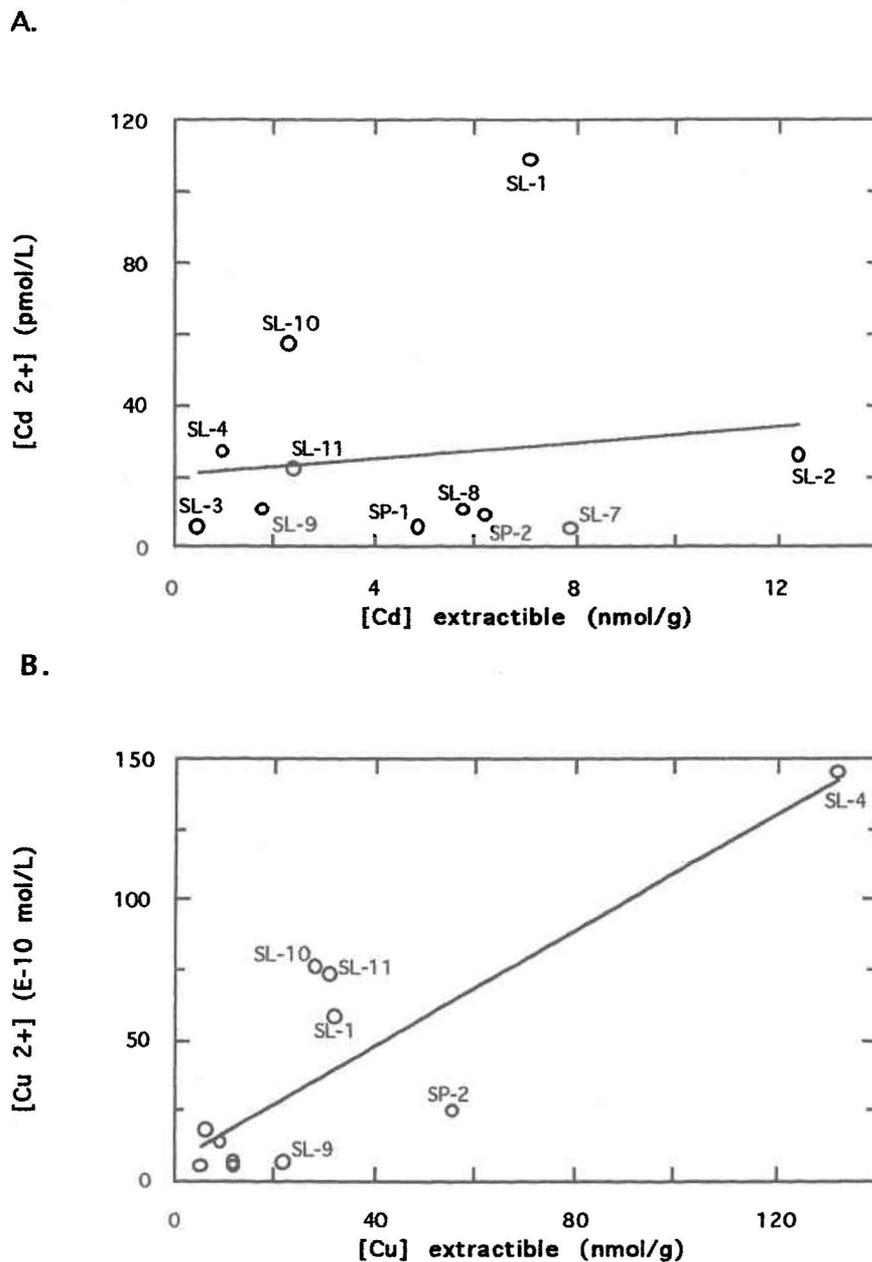


Figure 4.1: Concentrations extractibles de métal dans les sédiments obtenues par la somme des fractions 1 à 3 de l'extraction séquentielle versus les concentrations de l'ion métallique ( $M^{z+}$ ) calculées pour l'eau interstitielle pour les stations des lacs Saint-Louis (SL) et Saint-Pierre (SP). (A) Cd; (B) Cu.

#### 4.1.2.2 Sédiments

La contamination des sédiments en métaux pour les stations 1 et 2 est des plus hautes par rapport à l'ensemble du lac, due vraisemblablement à la proximité des sources ponctuelles de pollution. Ces stations ont également les sédiments dont les contenus en argile, en limon, en matière organique et en eau sont les plus élevés en comparaison au reste du lac. Cependant, pour ces deux stations les sédiments sont moins limoneux et argileux que ceux du lac Saint-Louis (Amyot 1992; Amyot et al. 1994). Pour les extractions séquentielles, la répartition des métaux dans les différentes fractions est semblable à celle notée au lac Saint-Louis (Amyot 1992; Amyot et al. 1994). Les concentrations en métaux potentiellement biodisponibles dans les sédiments, obtenues par l'addition des fractions 1 à 3, varient entre 0,03 à 1,06 mg/kg pour le Cd et entre 0,76 à 8,73 mg/kg pour le Cu (Amyot 1992; Amyot et al. 1994).

## 4.2 Métal dans les plantes entières

### 4.2.1 Voies d'entrée des métaux

Tel que mentionné à la section 3.1.2, les concentrations de métaux obtenues pour les racines et les feuilles, pour une espèce donnée, sont souvent assez différentes. Non seulement de grandes différences peuvent être notées pour la concentration d'un métal donné entre ces deux parties, mais les gradients de contamination sur le terrain diffèrent également selon qu'il est établie à partir des racines ou des feuilles. Lorsque Franzin et McFarlane (1980) et Mortimer (1985) ont proposé l'utilisation des macrophytes comme bioindicateurs, c'était sur la base que les plantes aquatiques accumulaient les métaux traces à partir de la colonne d'eau. Toutefois, le manque de corrélation entre le contenu des éléments dans les macrophytes et la colonne d'eau a compromis l'usage des plantes aquatiques comme organismes "moniteurs" de la pollution en métaux traces (Jackson et Kalff 1993). Il est maintenant reconnu que la nutrition des

macrophytes submergés et à racines dérive principalement des sédiments pour plusieurs macronutriments (Barko et Smart 1980, 1981; Jackson et Kalff 1993) et possiblement aussi pour certains éléments traces (Jackson et Kalff 1993; Pip 1990; Welsh et Denny 1980).

Si les sédiments étaient la source principale de métaux, il devrait exister des relations entre les concentrations de métaux dans les sédiments et celles dans les racines. Ces dernières concentrations devraient également refléter les concentrations en ions libres retrouvées dans les eaux interstitielles des sédiments. Toutefois, des quantités variables d'oxydes de fer sont souvent associées aux racines et il s'est avéré difficile d'enlever ces dépôts sans endommager les racines. En fait, pour des racines de vallisnéries lavées mais non traitées avec des agents réducteurs, les oxydes de fer peuvent contenir de 55 à 95 % du contenu apparent en Fe, Mn et Zn (St-Cyr, communication personnelle, 1994). Dans la présente étude, il semble peu probable que le lavage au carbonate de calcium ait été suffisant pour permettre d'enlever totalement les métaux adsorbés. Donc les valeurs déterminées pour les racines surestiment la quantité de métal "réellement assimilé".

Cependant, il pourrait ensuite y avoir translocation des éléments assimilés par les racines aux feuilles (Welsh et Denny 1980). Ainsi, dans leur étude de plantes aquatiques dans la région minière Rouyn-Noranda, Campbell et al. (1985) ont établi des corrélations entre les concentrations en métal dans les feuilles du lys d'eau (*Nuphar variegatum*) et celles dans les racines. Pour cela, il faut que les macrophytes aient un système racinaire développé permettant le transport des métaux des racines aux feuilles, que les sédiments et l'eau interstitielle soient contaminés et que l'eau susjacent soit peu contaminée. Ainsi dans la littérature, les études visant à évaluer la possibilité d'utiliser les macrophytes comme bioindicateurs de la contamination en métaux traces, grâce à leur capacité de bioconcentration, ont surtout été faites sur les parties vertes (Franzin et McFarlane 1980; Jackson et Kalff 1993; Kovacs et al. 1984; St-Cyr et Campbell 1994). Les concentrations de métal retrouvées dans les feuilles

devraient donc donner une indication de la quantité de métal disponible dans les sédiments. À cet effet, St-Cyr et Campbell (1994) ont trouvé une certaine correspondance en comparant les concentrations de métal dans les feuilles de *Vallisneria americana* avec les concentrations totales de métal dans les sédiments. Donc les "points chauds" en métaux dans le lac Saint-Louis, tels que rapportés par Champoux et Sloterdijk (1988) et Jarry et al. (1985) d'après le degré de contamination des sédiments superficiels, avaient les concentrations les plus élevées dans les parties vertes de *Vallisneria americana*. Le tableau 4.1 compare, par les coefficients de corrélation de Pearson, les concentrations totales en métal obtenues pour des plantes entières avec soit les concentrations retrouvées dans les sédiments (somme des fractions 1 à 3), soit les concentrations d'ions métalliques libres théoriquement disponibles dans l'eau interstitielle d'après les résultats d'Amyot (1992) et d'Amyot et al. (1994).

Tableau 4.1: Corrélations (r de Spearman) entre les concentrations extractibles de métal dans les sédiments  $[M]_E$  ou d'ions métalliques  $[M]^{z+}$  avec les concentrations totales de métal pour des macrophytes (N individus) échantillonnés dans les lacs Saint-Louis et Saint-Pierre. (\*,  $P < 0.1$ )

		corrélation (r de Spearman)			
		$[Cd]_T$ (plante) vs $[Cd]_E$ (sédiment)	N	$[Cd]_T$ (plante) vs $[Cd^{2+}]$ eau	N
<i>Vallisneria americana</i>	racine	-0,09	9	0,28	9
	feuille	-0,14	11	0,30	11
<i>Myriophyllum spicatum</i>	racine	-0,31	6	0,77*	6
	feuille	-0,08	6	0,71*	6
		$[Cu]_T$ (plante) vs $[Cu]_E$ (sédiment)	N	$[Cu]_T$ (plante) vs $[Cu^{2+}]$ eau	N
<i>Vallisneria americana</i>	racine	-0,45	9	0,00	9
	feuille	0,57*	11	0,36	11
<i>Myriophyllum spicatum</i>	racine	0,09	6	-0,48	6
	feuille	-0,09	6	-0,48	6

Pour les deux plantes étudiées, les relations entre les concentrations de métal dans les plantes et celles dans le milieu sédimentaire ([M]-sédiment ou  $[M^{z+}]$ -eau interstitielle) sont plus évidentes pour le Cd que pour le Cu (tableau 4.1), ce qui pourrait laisser croire que les racines jouent un rôle important dans l'assimilation de ce métal. Pour ce qui est de l'assimilation du Cu, comme aucune relation n'est apparente entre les concentrations retrouvées dans les macrophytes et celles dans les sédiments (Cu extractible ou  $Cu^{2+}$ ), il se pourrait que la colonne d'eau soit le vecteur principal pour la bioaccumulation de ce métal. Rappelons également que les données pour les sédiments ont été recueillies à des périodes différentes (août 1990 pour le lac Saint-Pierre et août 1991 pour le lac Saint-Louis) de celles pour les macrophytes (août 1992); cette différence dans le temps des échantillonnages pourrait être aussi cause de variations. La figure 4.2 met en graphique les concentrations totales de Cd retrouvées chez les vallisnéries et les myriophylles avec les concentrations d'ions métalliques libres calculées pour l'eau interstitielle. Pour *Vallisneria americana* (figure 4.2A), les valeurs "trop élevées" dans les racines aux stations SL-9, SL-11 et SP-2 empêchent l'obtention d'une relation linéaire comme celles observées pour les feuilles de vallisnéries (figure 4.2A) et pour les feuilles et racines des myriophylles (figure 4.2B).

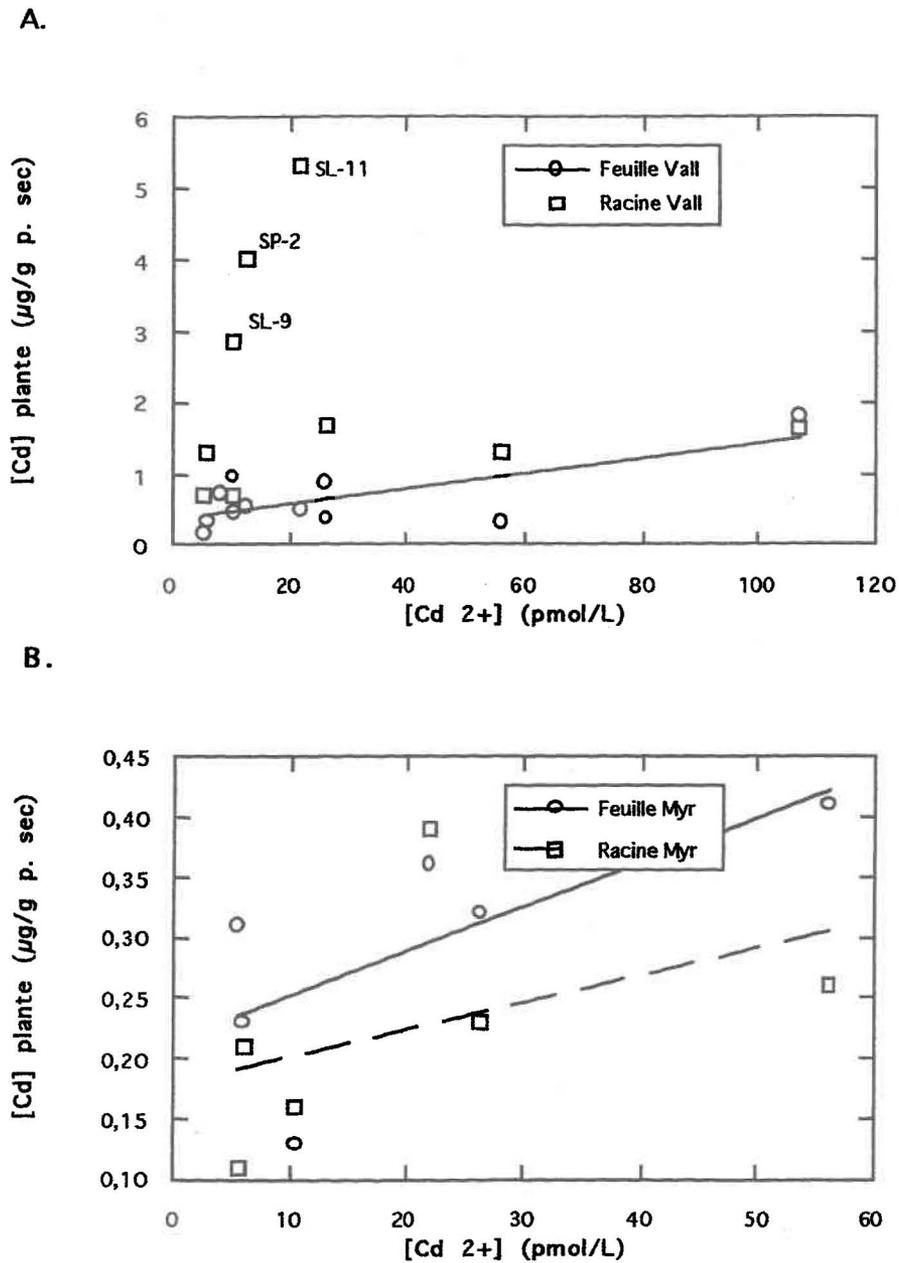


Figure 4.2: Concentrations totales de cadmium pour des macrophytes entiers versus les concentrations de cadmium libre ( $\text{Cd}^{2+}$ ) calculées pour l'eau interstitielle pour les stations des lacs Saint-Louis (SL) et Saint-Pierre (SP). (A) *Vallisneria americana*; (B) *Myriophyllum spicatum*.

Nous avons par la suite examiné les relations pouvant exister entre les quantités de métal dans les feuilles versus celles retrouvées dans les racines pour *Vallisneria americana* et *Myriophyllum spicatum* (figures 4.3 et 4.4). Pour les deux macrophytes étudiés, il n'y a pas de relation entre la contamination des feuilles et des racines. Le Cd de la station SL-11 semblerait trop concentrée dans les racines par rapport aux feuilles pour les deux macrophytes. L'observation à la station SL-1 de concentrations en Cd pour les feuilles qui sont plus élevées que celles anticipées selon les concentrations mesurées chez les racines (figure 4.3A), pourrait laisser supposer que l'eau susjacente à cette station est plus contaminée qu'ailleurs. Toutefois la présence de dépôts d'oxydes de fer ou de manganèse est probablement la cause principale de ces déviations. Surtout dans le cas de *Vallisneria americana*, il est difficile de pouvoir éliminer les métaux qui sont restés adsorbés sur ces oxydes sans nuire à l'intégrité des racines.

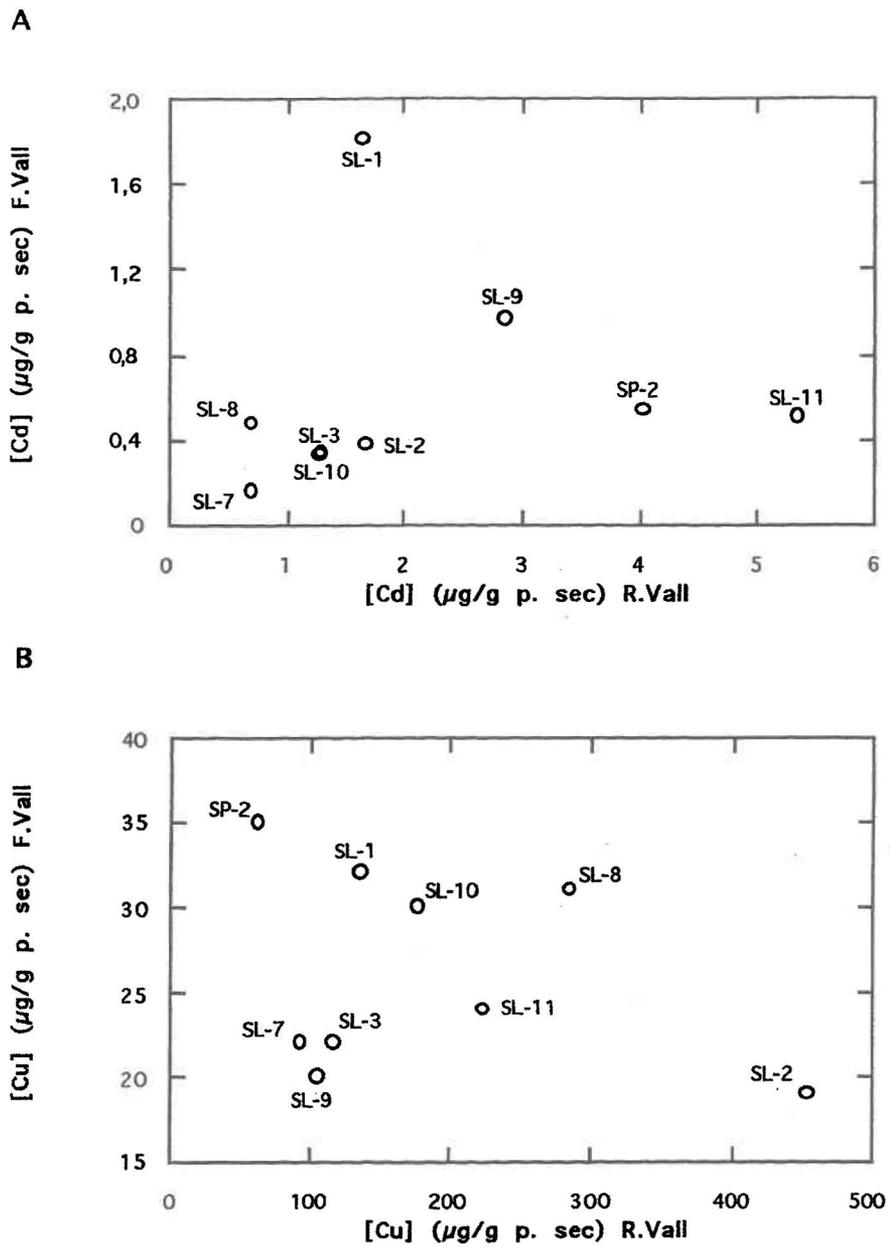


Figure 4.3: Concentrations totales de métal dans les feuilles versus les concentrations totales de métal dans les racines pour *Vallisneria americana* récolté sur le terrain. (A) Cd; (B) Cu.

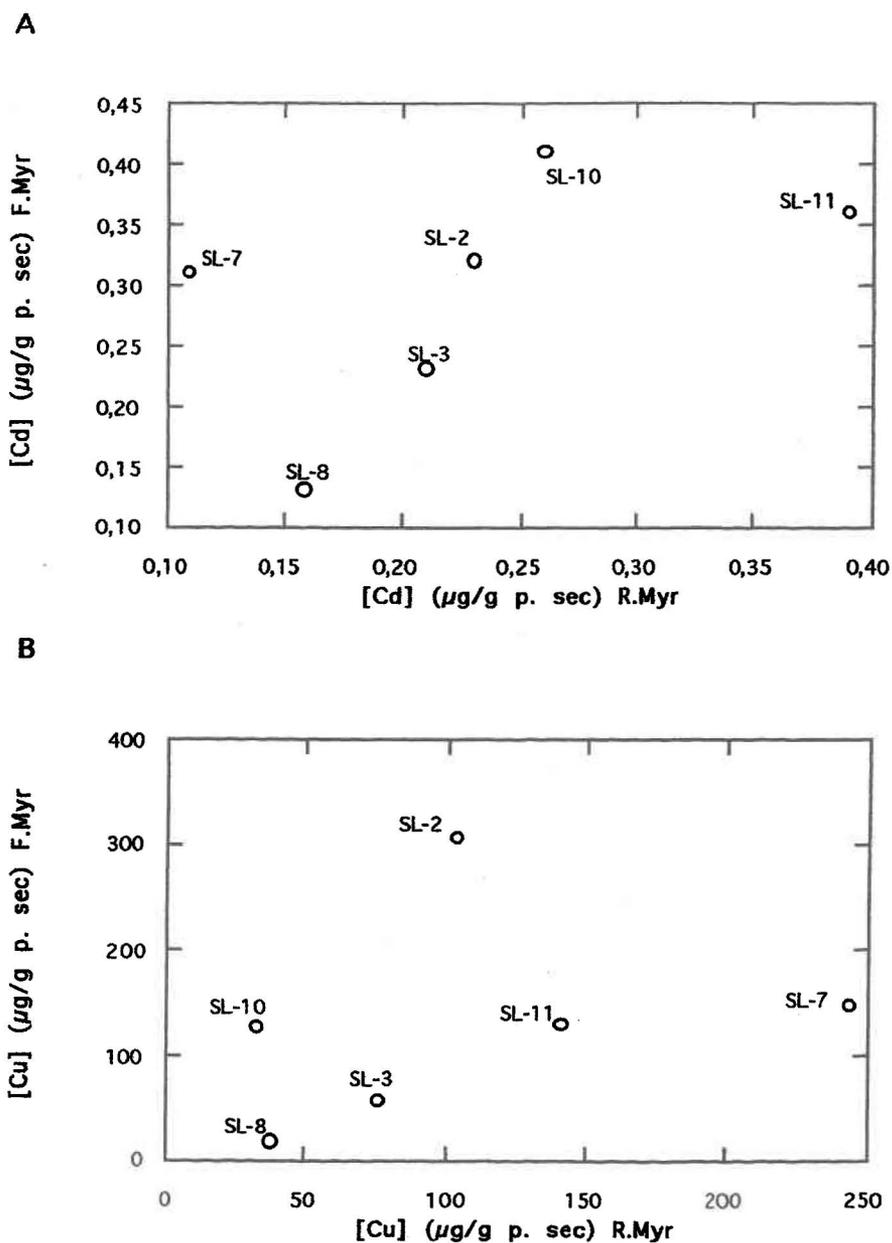


Figure 4.4: Concentrations totales de métal dans les feuilles versus les concentrations totales de métal dans les racines pour *Myriophyllum spicatum* récolté sur le terrain. (A) Cd; (B) Cu.

#### 4.2.2 Comparaisons des valeurs totales en métaux chez les plantes aquatiques

St-Cyr et Campbell (1994) avaient obtenu aux stations SL- 4, 9 et 10, leurs plus hautes concentrations en métaux dans les parties vertes des vallisnéries pour le lac Saint-Louis avec pour le Cd plus de  $1,0 \mu\text{g/g p. sec}$  et pour le Cu plus de  $20 \mu\text{g/g p. sec}$ . Ces trois stations sont sous l'influence des eaux brunes de la rivière des Outaouais, plus ou moins mélangées avec celles du fleuve Saint-Laurent. Pour l'étude actuelle, des concentrations en Cd près de  $1,0 \mu\text{g/g p. sec}$  pour les stations SL-4 et 9 ont également été obtenues, quoique celles mesurées à la station SL-10 soient plus basses. Les concentrations en Cu sont dans la même gamme pour les trois stations avec un maximum à la station SL-4 correspondant aussi à la concentration en  $\text{Cu}^{2+}$  maximale retrouvée dans les sédiments (tableau 3.1). La station 4 à l'Anse au sable, au sud des îles de la paix, se trouve dans un secteur affecté par le complexe industriel de Beauharnois, alors que les stations SL-9 et 10 près de la Baie de Valois sont probablement affectées par des égouts domestiques et industriels (Champoux et Sloterdijk 1988).

La station SL-1, également soumise aux eaux de la rivière des Outaouais, n'était pas comprise dans l'étude de St-Cyr et Campbell (1994). Cependant, elle se démarque des autres stations de ce lac par les caractéristiques physico-chimiques de l'eau telles que le pH, le Ca dissous et la conductivité, qui sont tous très bas (Amyot 1992; Amyot et al. 1994). Il s'agit également de la station où la concentration en  $\text{Cd}^{2+}$  dans les sédiments est la plus élevée (tableau 3.1). Il est intéressant de noter que les concentrations en Cd que nous avons obtenues dans les feuilles de *Vallisneria americana* sont également élevées à cette station, en conformité avec l'idée que la concentration en  $\text{Cd}^{2+}$  libre soit un bon indicateur de la biodisponibilité du cadmium (Couillard et al. 1993; Tessier et al. 1993). Pour les autres données de concentrations en cadmium obtenues dans les feuilles de vallisnéries, elles sont semblables à celles retrouvées par St-Cyr et Campbell (1994). Toutefois nos concentrations en Cu sont au-delà de 20

$\mu\text{g/g}$  p. sec pour l'ensemble des stations étudiées alors qu'il s'agissait des valeurs les plus élevées pour St-Cyr et Campbell (1994).

Des macrophytes ont également été dosés dans ce lac par Flessas (1994) qui a fait, tout comme Amyot (1992) et Amyot et al. (1994), ses échantillonnages aux mêmes stations que nous (août 1991). Le dosage total en métaux a révélé pour les feuilles de différents macrophytes que la station SL-1 avait les valeurs les plus élevées en Cd ( $2,7 \mu\text{g/g}$  p. sec); celles pour les autres stations étaient inférieures à  $1 \mu\text{g/g}$  p. sec. Un ensemble de six macrophytes avait été récoltés (pas à toutes les stations cependant) et les stations où les macrophytes étaient le plus contaminés étaient pour le Cd: SL-1 et -4 et pour le Cu: SL-2. Donc Flessas (1994) avait obtenu des concentrations en Cd pour les feuilles de vallisnéries semblables à la présente étude et des concentrations en Cu légèrement plus élevées bien que l'ordre pour le gradient de contamination soit sensiblement le même que celui obtenu par nous.

Pour le lac Saint-Pierre, seulement deux stations ont été échantillonnées; selon St-Cyr et Campbell (1994), ces stations seraient modérément contaminées par rapport aux autres stations du lac qu'ils avaient répertoriées. Ces chercheurs avaient obtenu des valeurs pour le Cd supérieures à  $1 \mu\text{g/g}$  p. sec et pour le Cu de 15 à  $20 \mu\text{g/g}$  p. sec pour *Vallisneria americana*. Toutefois, bien que nos valeurs en Cd soient inférieures à  $1 \mu\text{g/g}$  p. sec, celles en Cu sont nettement supérieures à celles obtenues par St-Cyr et Campbell (1994) pour des emplacements semblables, avec des valeurs de 84 et  $35 \mu\text{g/g}$  p. sec respectivement pour les stations SP-1 et 2. Également, St-Cyr et Campbell (1994) ont obtenu pour l'ensemble des stations du lac Saint-Pierre, des valeurs en métal pour les feuilles de vallisnéries supérieures à celles rencontrées pour le lac Saint-Louis. Les stations les plus contaminées étaient situées plus au centre du lac, près du chenal de la voie maritime et les concentrations rencontrées en cuivre avoisinaient les  $40 \mu\text{g/g}$  p. sec et étaient de plus de  $3 \mu\text{g/g}$  p. sec pour le cadmium. Pour sa part, Flessas (1994) rapporte pour les feuilles de vallisnéries de SP-1 des concentrations en Cd de  $1,3 \mu\text{g/g}$  p. sec et en Cu de

13  $\mu\text{g/g}$  p. sec et pour SP-2 des concentrations en Cd de 0,4  $\mu\text{g/g}$  p. sec et en Cu de 21  $\mu\text{g/g}$  p. sec. En plus des différents facteurs énoncés à la section 4.3.2 expliquant les facteurs de variation encourus pour ce type d'analyse, on pourrait ajouter les variations inter-annuelles pour expliquer les différences dans les résultats. En effet St-Cyr et Campbell (1994) avaient effectué leur échantillonnage en août 1990 et Flessas (1994) en août 1991 alors que la "partie terrain" de la présente étude s'est déroulée en août 1992.

Pour *Myriophyllum spicatum*, les concentrations en cadmium pour les feuilles sont légèrement plus basses que celles obtenues pour les feuilles de *Vallisneria americana*. Les différences pour les concentrations en cuivre sont plus notables car à l'exception de la station SL-8 les valeurs sont de 2 à 15 fois plus élevées pour les feuilles des myriophylles que pour celles des vallisnéries. Flessas (1994) avait obtenu des concentrations en Cd plus basses pour les myriophylles que pour les vallisnéries et des concentrations comparables en Cu pour les deux macrophytes.

#### 4.2.3 Différences de bioaccumulation des métaux entre *Vallisneria americana* et *Myriophyllum spicatum*.

Au niveau des deux espèces étudiées, il est normal de s'attendre à voir des tendances différentes pour la bioaccumulation. Les vallisnéries sont des plantes qui ont de longues et larges feuilles plates avec pratiquement pas de tiges. De plus, elles tapissent plutôt le fond ("understory"= plantes de sous-étage) alors que les myriophylles avec leurs longues tiges munies de petites feuilles ("canopy"= couverture flottante), s'élancent vers la surface. St-Cyr et Campbell (1994) ont étudié deux espèces de macrophytes pour évaluer leur potentiel comme bioindicateur grâce à leur capacité de bioconcentrer les métaux. Il s'agissait de *Vallisneria americana* et de *Potamogeton richardsonii* qui est comme *Myriophyllum spicatum* une plante "canopy". Pour l'ensemble des métaux étudiés, à l'exception du

plomb, les vallisnéries accumulent plus de métaux en  $\mu\text{g/g p. sec}$  que les potamots. Cela s'expliquerait par le fait que bien que les feuilles du potamot aient des concentrations en métal de 2 à 3 fois plus élevées que dans les tiges (Kovacs et al. 1984), la biomasse des tiges est telle que lorsque l'on fait le bilan global en métal pour les parties vertes, le résultat est inférieur à ce qui peut être obtenu pour des plantes en forme de rosettes comme la vallisnérie. On s'attendait à observer le même type de relations entre les vallisnéries et les myriophylles, sauf que les concentrations en Cu sont bien plus élevées chez cette dernière. Aussi, St-Cyr et Campbell (1994) avaient obtenu des relations entre les feuilles (ou les racines) des deux plantes, pour un métal donné et pour des stations où les deux plantes co-existaient, et cela même si les facteurs de concentration étaient différents pour chacun des macrophytes. Les figures 4.5 et 4.6 tentent d'établir, à l'aide du coefficient de corrélation de Spearman ( $r_s$ ), le même type de relation entre les vallisnéries et les myriophylles, en comparant les concentrations de métal pour les feuilles ou les racines. Seulement dans le cas du cadmium, dans les racines des deux plantes, semble-t-il y avoir une relation positive (figure 4.6A). Soulignons, cependant, que l'effectif pour l'analyse comparative (N=6) s'avère plutôt faible.

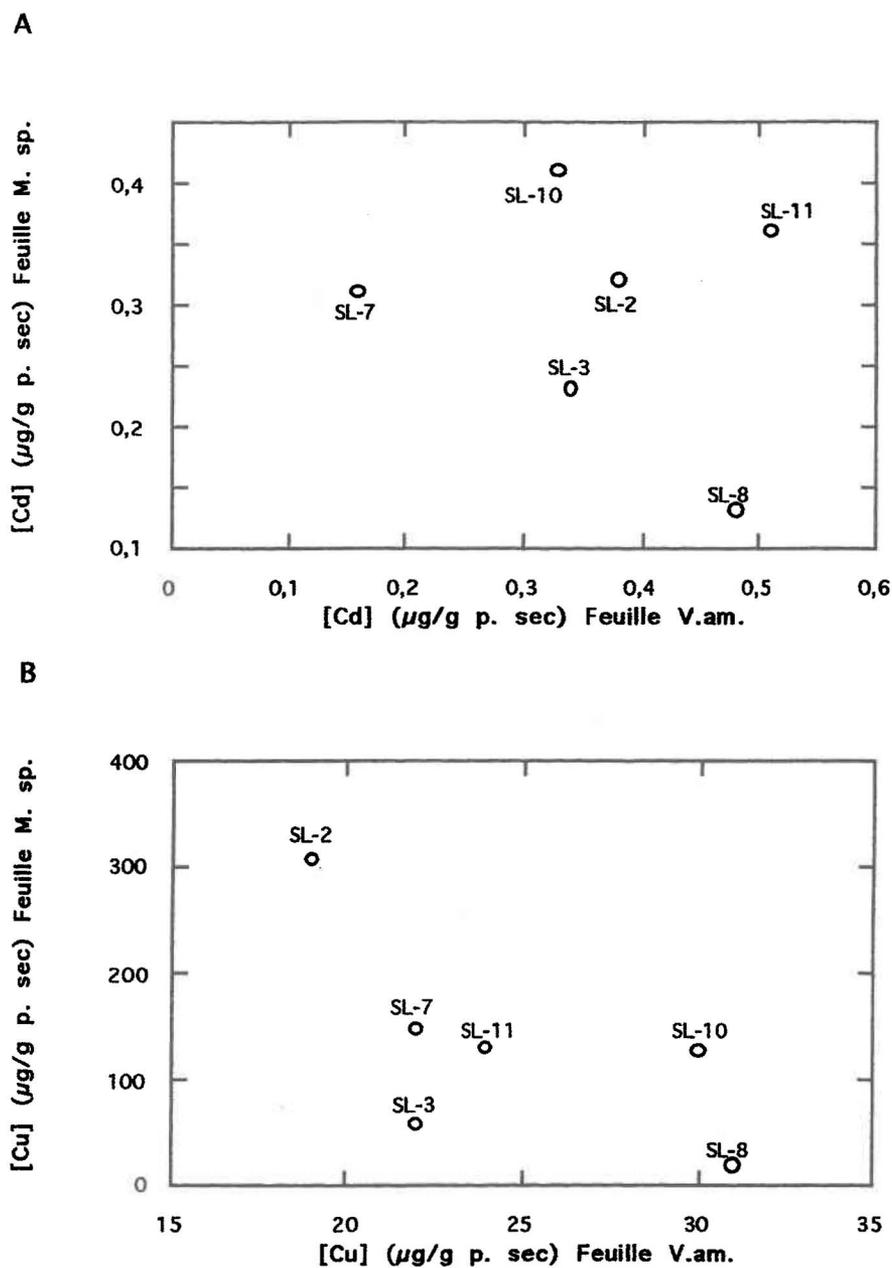


Figure 4.5: Concentrations totales de métal dans les feuilles de *Myriophyllum spicatum* versus les concentrations totales de métal dans les feuilles de *Vallisneria americana* récoltées sur le terrain. (A) Cd ( $r_s = -0,08$ ,  $N = 6$ ;  $P > 0,5$ ); (B) Cu ( $r_s = -0,75$ ,  $N = 6$ ;  $P < 0,1$ ).

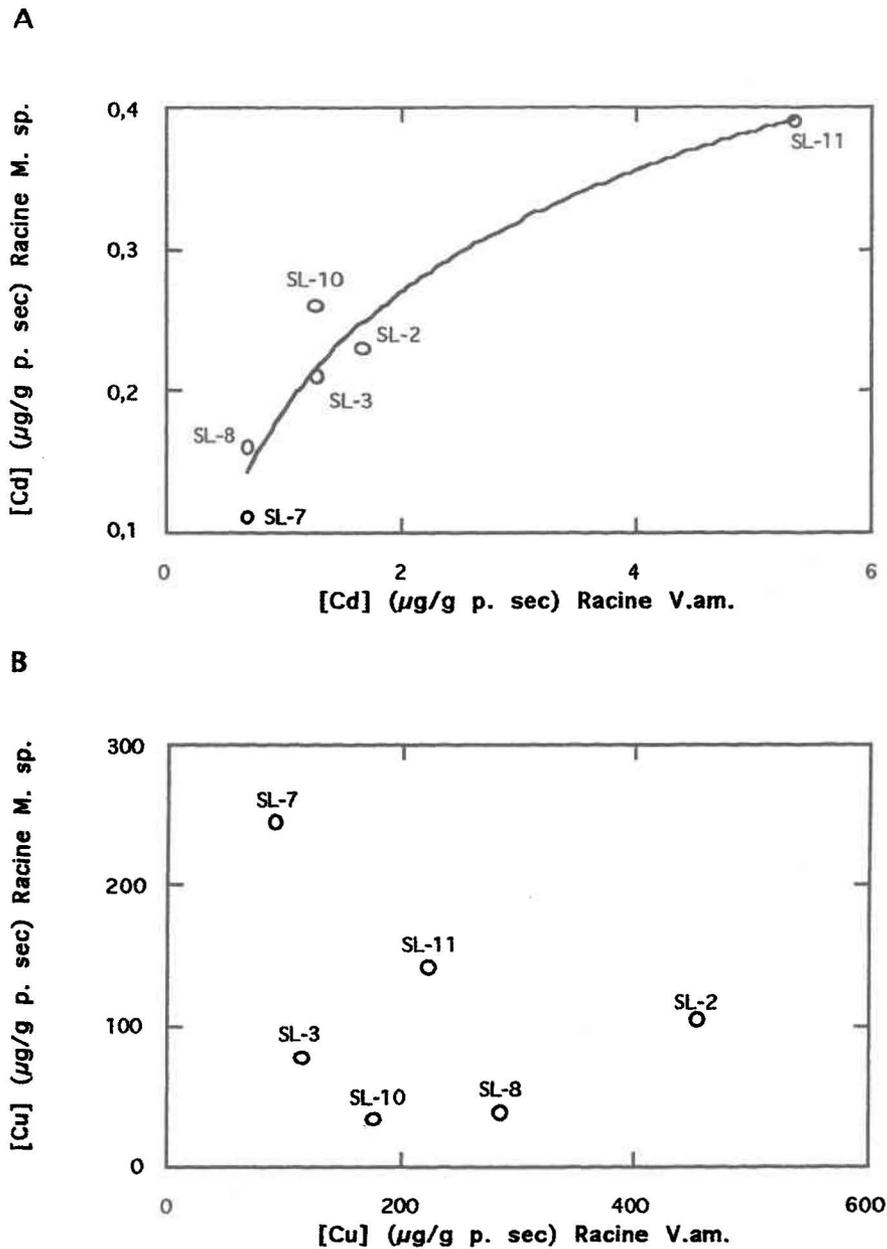


Figure 4.6: Concentrations totales de métal dans les racines de *Myriophyllum spicatum* versus les concentrations totales de métal dans les racines de *Vallisneria americana* récoltées sur le terrain. (A) Cd ( $r_s = 0,81$ ,  $N = 6$ ;  $P < 0,05$ ); (B) Cu ( $r_s = -0,25$ ,  $N = 6$ ;  $P > 0,5$ ).

Plusieurs facteurs pourraient influencer la concentration de métal bioaccumulé pour une espèce donnée et cela, pour le même site d'échantillonnage. Ces variations pourraient être dues à l'existence de microhabitats à l'intérieur d'un même site, à la récolte de spécimens d'âge différents ou de plantes présentant de légères différences dans leur stage de cycle de croissance (Campbell et al. 1985). Aussi, d'après Jackson et Kalff (1993), les tendances de bioaccumulation observées pour les macrophytes pourraient résulter de l'ensemble des plantes présentes sur le site. Les plantes "understory", comme la vallisnérie, auraient des concentrations en métaux plus hautes que les plantes "canopy", comme les myriophylles. Cependant cette dernière voit son contenu en métaux bioaccumulés plus élevé lorsqu'il y a présence de plantes "understory" dans son environnement.

#### 4.2.4 Comparaisons entre deux méthodes pour le dosage du métal total

Pour déterminer la répartition subcellulaire des métaux, il faut passer par plusieurs étapes analytiques; à la fin de cette procédure, il est possible de faire un "bilan" du métal en additionnant les quantités de métal retrouvées dans chaque "fraction", et de comparer cette valeur totale avec celle obtenue par digestion complète d'un échantillon entier. Il n'est pas surprenant de constater que les valeurs obtenues soient généralement plus élevées dans les cas de l'addition des fractions, car les risques de contamination sont plus élevés et que l'on additionne les erreurs à chaque étape. Cela est plus flagrant pour le cadmium, qui est retrouvé en très faible concentration et où il arrive que les concentrations obtenues par l'addition des fractions soient parfois le double ou le triple par rapport à l'autre méthode. Par ailleurs, les analyses faites en triple (tableau 3.4) démontrent une reproductibilité tout-à-fait acceptable, ce qui laisse croire que les répartitions relatives (% anionique; % cationique et neutre) sont valables. Il est possible que les écarts entre "la somme des fractions" et "la concentration totale" soient liés à des problèmes de normalisation (poids sec vs poids humide). Deux sous-échantillons sont analysés: celui pour la

détermination directe de la concentration "totale" du métal est séché au préalable, pesé et digéré, alors que celui employé pour la détermination de la répartition subcellulaire du métal n'est pas séché au préalable. Dans ce dernier cas, pour exprimer les valeurs de "M-anionique" et "M-cationique + neutre" sur une base de poids sec, il fallait sécher et peser le culot qui restait après extraction. Or, une analyse de la relation  $[M]_{\text{poids sec}}$  versus  $[M]_{\text{poids humide}}$  a démontré que la relation entre ces deux variables n'est pas toujours aussi linéaire que l'on aurait prévue (surtout chez *Myriophyllum spicatum*; Annexes, section A.3). Pour ce qui est de la station SL-8 les valeurs en Cd sont pour les racines de vallisnérie 18 fois plus élevées pour l'addition des fractions que pour le dosage du métal total; il s'agit là d'un cas exceptionnel témoignant d'une contamination grossière. Pour le cuivre, les valeurs sont à peu près les mêmes pour les deux techniques (section 3.1.3.2).

## 4.3 Répartition intracellulaire du Cd et du Cu

### 4.3.1 Influence de l'extraction sur les métaux

Le tampon Tris-HCl 10 mM à pH 8,6, utilisé pour recueillir la fraction soluble des métaux, a été l'objet de simulations, par le modèle mathématique MINEQL, pour évaluer la spéciation théorique des métaux lors de ces extractions. On peut constater, par exemple, que le cadmium est retrouvé sous forme d'ion métallique libre, donc pas complexé avec le Tris (section 3.1.3.1). Il est donc normale que la concentration de Cd diminue fortement après la première extraction pour atteindre des limites non-détectables pour les extractions suivantes (figure 3.1). Ainsi le Cd adsorbé à la fraction non-soluble y resterait, dû au faible pouvoir de complexation du tampon vis-à-vis de ce métal. Cependant cette évaluation considère le système comme étant fermé à l'atmosphère (sans CO<sub>2</sub>), chose dont l'évaluation est difficile et dont on semble s'être peu préoccupé dans la littérature. Donc si ces manipulations ne sont pas faites dans un milieu sans

CO<sub>2</sub>, la solubilité du Cd diminue grandement (figure 3.2) alors qu'il serait retrouvé sous forme solide et précipité. Malgré les précautions prises, on ne peut être certain que le milieu était continuellement maintenu dans un état exempt de CO<sub>2</sub>. Malgré cela, il pourrait être possible que même dans un milieu ouvert, que le métal lié à des composés biologiques solubles ne puisse être précipité. Dans ce cas les formes anioniques du métal soluble resteraient semblables à celles qui seraient obtenues en milieu fermé, alors que la forme cationique diminuerait. Toutefois, cette hypothèse serait applicable seulement si la liaison entre le métal et les composés biologiques auxquels il est lié était très stable; autrement, le précipité inorganique fera déplacer l'équilibre et ira chercher tout le Cd complexé.

Le comportement du Cu diffère de celui du Cd. Une baisse de la concentration après la première extraction est constatée pour le cuivre (figure 3.1), comme pour le Cd, mais les concentrations varient peu pour les autres extractions et n'atteignent jamais des niveaux non-détectables. Pour le Cu, que le système soit ouvert ou fermé n'a pas d'importance pour sa solubilité (figure 3.2). Ce métal est donc toujours retrouvé sous forme soluble mais complexé avec le Tris. Si ce tampon a un bon pouvoir de complexation avec le Cu, il se pourrait qu'à chaque nouvelle extraction qu'une partie de ce métal, qui serait associée à la fraction particulaire, soit "arrachée" et soit alors considérée comme faisant partie de la fraction soluble. Cela augmenterait et fausserait le contenu de la fraction cationique et du métal soluble. À l'avenir, l'utilisation d'un tampon non-chélatant comme HEPES serait préférable pour faire des extractions lorsque ce métal est concerné.

#### 4.3.2 Variabilité des résultats

Il ressort que les coefficients de variation pour les mesures faites en triple, sur des sous-échantillons provenant d'un même échantillon composite, sont généralement plus bas que pour les mesures intra-station. Ainsi, pour les valeurs totales en métal, des coefficients de variation de 10 à 20 % sont obtenus pour les mesures en triple alors qu'ils sont aux environs

de 30 % pour les mesures intra-station. Pour les analyses en triple, les différences entre les tiges et les feuilles pour *Myriophyllum spicatum* et l'âge des plantes, c'est à dire l'analyse de plantes à différents cycles de croissance pourraient, en partie, expliquer ces variations (Campbell et al. 1985). À titre d'exemple, rappelons les différences entre les rapports de poids humide sur poids sec et qui démontrent qu'il peut exister une variabilité entre les différentes plantes échantillonnées et formant l'échantillon composite.

Pour l'échantillonnage intra-station, la présence de microhabitats distinctes pourrait probablement expliquer l'augmentation des coefficients de variation. Ces derniers sont toutefois comparables à ceux déjà rapportés dans la littérature pour d'autres plantes aquatiques et qui sont de l'ordre de 10 à 30 % (Campbell et al. 1985; Gommes et Muntau 1981; Harding et Whitton 1981; St-Cyr et Campbell 1994; Welsh et Denny 1980). Les coefficients de variation pour les différentes formes de répartition des métaux (soluble, anionique et cationique) sont également de cet ordre.

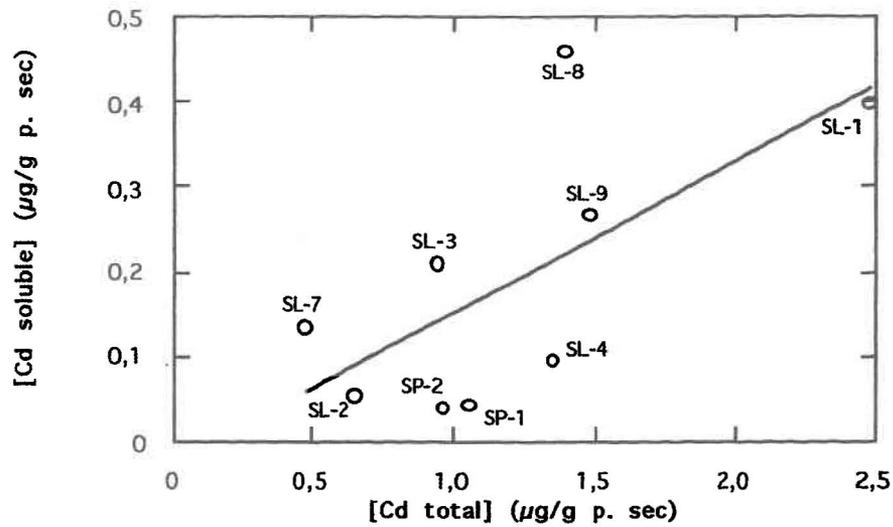
On note également que les CV avec le Cu sont plus faibles que ceux pour le Cd. Cela est probablement dû à la différence d'ordre de grandeur dans les concentrations entre ces deux métaux. Également, on s'attendrait à avoir des coefficients de variation plus élevés pour les racines que pour les feuilles, compte tenu de la contribution variables des "plaques de fer" sur les racines. De même, il y aurait moins de variations pour l'analyse des feuilles de vallisnéries que pour celle des feuilles de myriophylles. Les feuilles des vallisnéries sont plus homogènes dans leurs formes et contenu en eau que celles des myriophylles, où une bonne différence peut être notée entre les tiges, qui ont un contenu élevé en eau, et les feuilles. Donc les valeurs en métal peuvent être jusqu'à deux fois plus élevées dans les feuilles que dans les tiges (Kovacs et al. 1984). De plus, pour les analyses des parties vertes de myriophylles, les rapports feuilles-tiges n'ont pas toujours été constants.

### 4.3.3 Métal soluble

Les pourcentages de cadmium dans la fraction non-soluble sont plutôt élevés, surtout pour les racines de vallisnéries où, à part une exception, ces valeurs sont plus de 90%. Pour les myriophylles et pour les feuilles de vallisnéries les valeurs de Cd dans les résidus sont plutôt variables. Pour le cuivre, le pourcentage dans le résidu varie de 25 à 60 % pour les vallisnéries alors qu'il est au-delà de 80 % pour les myriophylles.

Les figures 4.7 à 4.10 donnent les relations entre le métal soluble et le métal total pour les différentes parties des macrophytes et pour un métal donné. Lorsqu'une relation linéaire est observée, on peut supposer que les métaux accumulés ne sont pas seulement retrouvés liés à la surface extérieure des plantes mais pourraient se retrouver sous forme soluble dans le cytosol et être ainsi susceptibles de pouvoir perturber la machinerie cellulaire. Une telle relation linéaire implique que le métal se répartit entre formes solubles et particulaires toujours de la même manière, peu importe le degré de contamination de la plante. À l'examen des résultats, on constate que les relations sont presque linéaires pour *Vallisneria americana*, et ceci pour les deux métaux. Pour ce qui est du Cd soluble dans les feuilles et les racines des myriophylles (figure 4.9 A. et 4,10 A.), il n'y aurait aucune relation avec le Cd total.

A.



B.

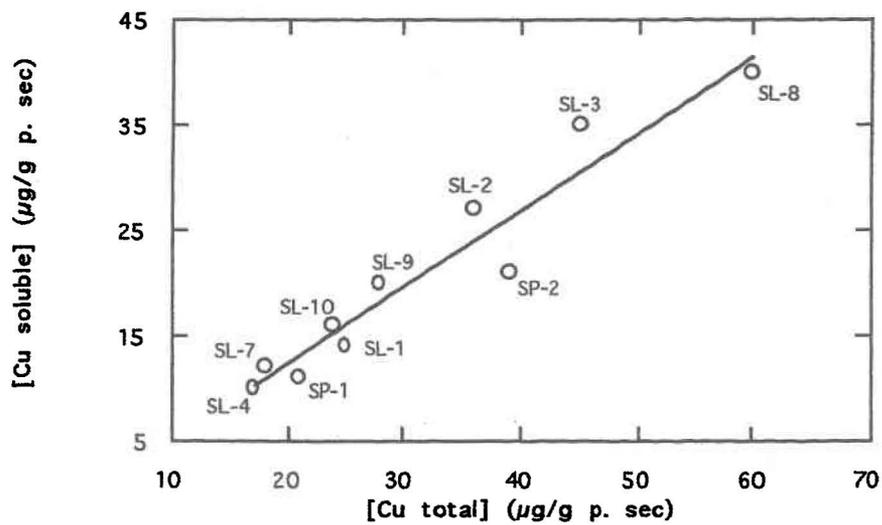
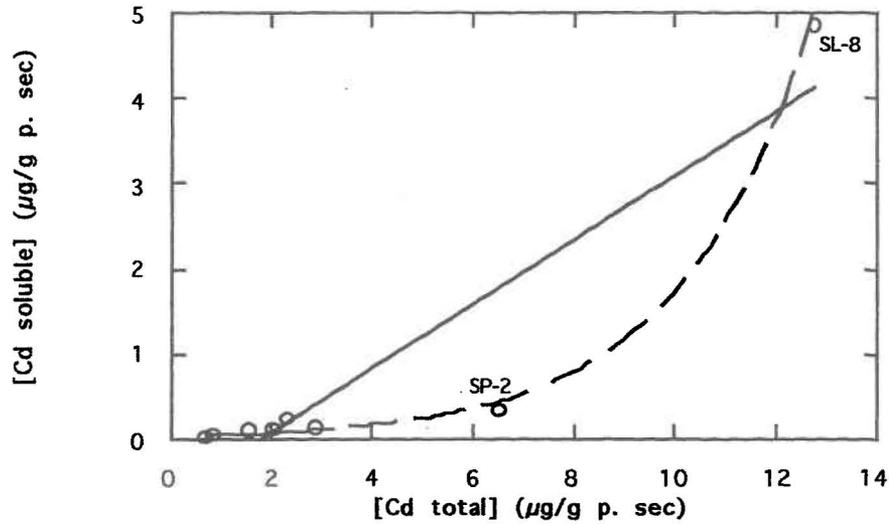


Figure 4.7: Concentrations de métal soluble versus les concentrations totales pour les feuilles de *Vallisneria americana* récoltées sur le terrain. (A) Cd; (B) Cu.

A.



B.

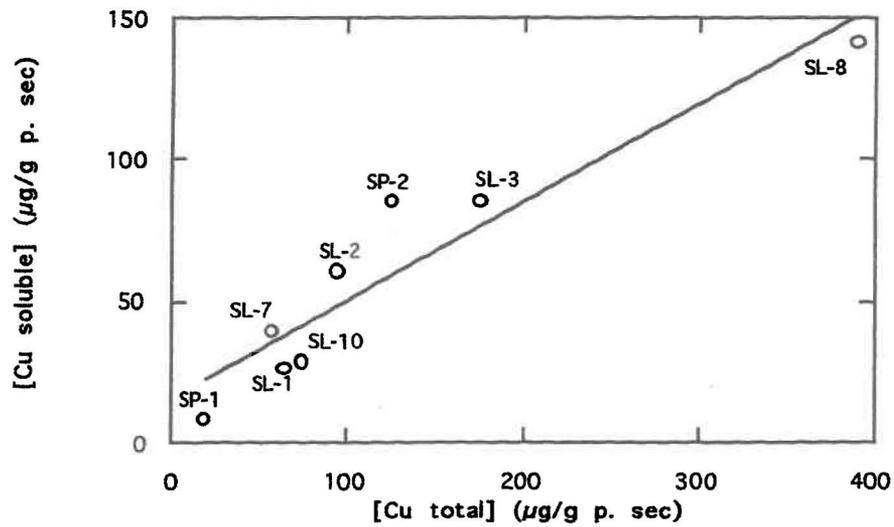


Figure 4.8: Concentrations de métal soluble versus les concentrations totales pour les racines de *Vallisneria americana* récoltées sur le terrain. (A) Cd; (B) Cu.

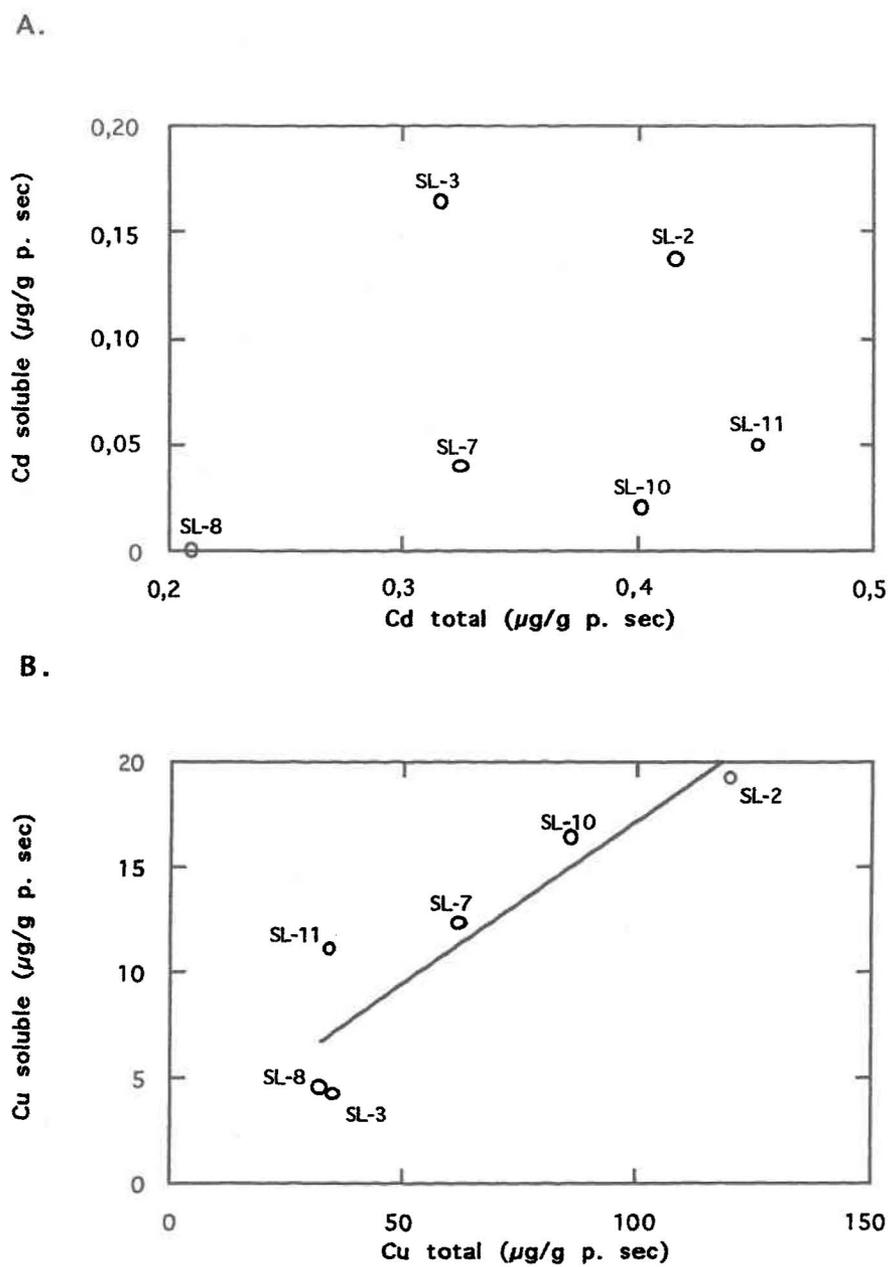
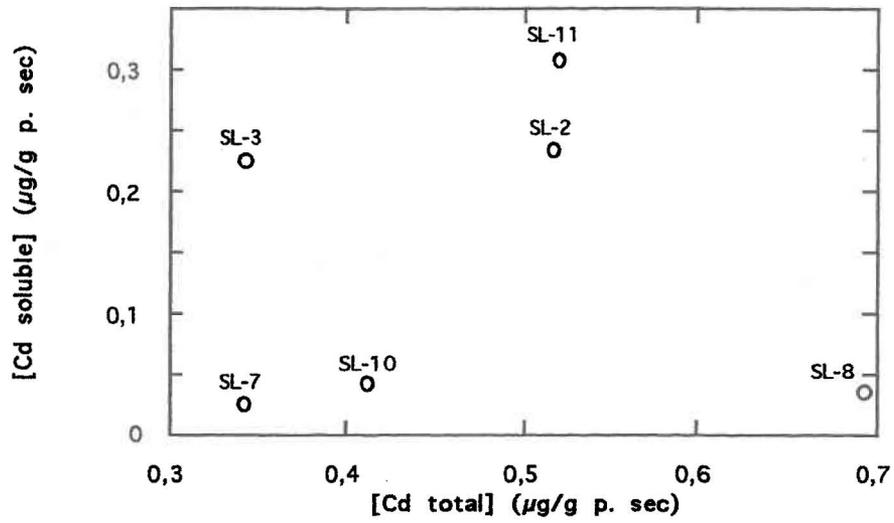


Figure 4.9: Concentrations de métal soluble versus les concentrations totales pour les feuilles de *Myriophyllum spicatum* récoltées sur le terrain. (A) Cd; (B) Cu.

A.



B.

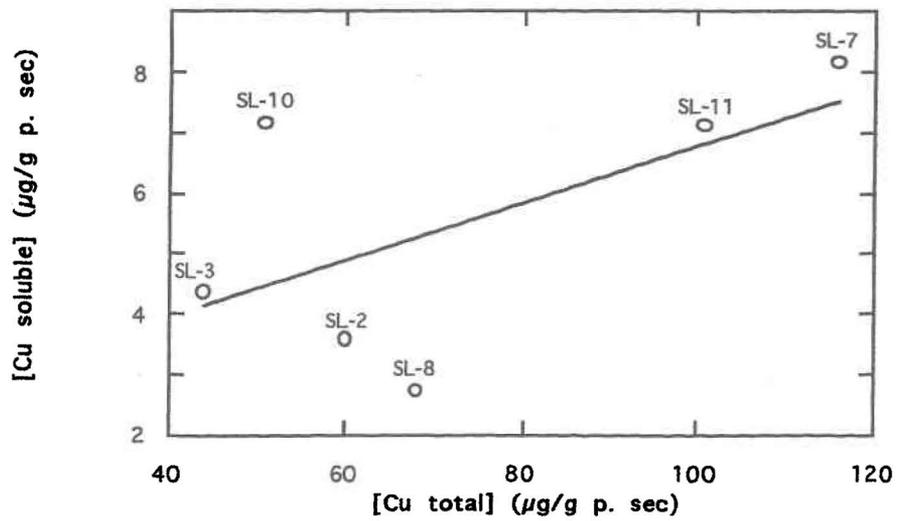


Figure 4.10: Concentrations de métal soluble versus les concentrations totales pour les racines de *Myriophyllum spicatum* récoltées sur le terrain. (A) Cd; (B) Cu.

Dans la littérature, des données assez variables sont données pour la répartition des métaux entre les phases soluble et insoluble chez les plantes. Plusieurs études ont mentionné l'importance des métaux traces liés à la membrane et/ou parois cellulaires. En fait, la plupart des métaux seraient liés à des acides polygalacturoniques sur les parois de la cellule selon l'ordre décroissant des ions métalliques suivants:  $Pb > Cr > Cu > Ca > Zn$  (Ernst et al. 1992). Ainsi plusieurs études ont associé la tolérance au zinc aux liaisons avec les parois cellulaires. Par exemple, 80 à 90% du Zn total était lié de cette façon pour la mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* provenant de cours d'eau acide (Burton et Peterson 1979). La tolérance au mercure a également été associée au même mécanisme chez *Jungermannia vulcanicola* provenant aussi de cours d'eau acide alors que le métal était associé au sulfure, apparemment responsable de la très haute concentration de Hg, et retrouvé surtout dans les parois cellulaires (Satake et Myasaka 1984; Satake et al. 1983). Toutefois, l'utilisation de l'analyse spectroscopique aux rayons-X du plomb chez les espèces aquatiques *Pohlia ludwigii*, *Pellia endivriifolia* et *Scapania undulata* a montré que la majeure partie du Pb n'était pas liée à du sulfure mais distribuée de manière homogène, probablement dans les parois cellulaires (Shaw et al. 1987).

Concernant les données sur la localisation sous-cellulaire du Cd, elles ne sont pas consistantes, probablement dues aux méthodes employées pour ce type d'analyse. Ainsi, les techniques impliquant la microscopie à transmission d'électron ou la microanalyse aux rayons-X détectent surtout les formes insolubles de Cd (Heuillet et al. 1986; Khan et al. 1984; Rauser et Ackerley 1987; Sela et al. 1988). D'autre part, les techniques d'extraction visant à faire le fractionnement des cellules pour des feuilles ou des racines ont retrouvé plus de la moitié du Cd dans la fraction soluble, mais sans être en mesure de faire la distinction entre le cytosol et les vacuoles, le reste étant distribué presque également entre les parois cellulaires et les fractions d'organites (Cataldo et al. 1981; Weigel et Jäger 1980).

### 4.3.4 Spéciation du métal soluble

#### 4.3.4.1 Complexes PC-M

##### *Gel d'exclusion*

Dans cette étude, la filtration sur gel d'exclusion Sephadex G-50 (figure 3.4) pour des vallisnéries exposées à 1 ppm de Cu et pour des plantes témoins a permis de voir une différence entre les deux. En effet les lectures d'absorbance à 254 nm indiquent l'apparition d'un nouveau pic de protéines pour les fractions 28 à 38 mais sans que celui-ci ne contienne de cuivre. Pour leur part, Grill et al. (1987), qui travaillaient avec des feuilles de *Brassica oleracea*, ont trouvé pour le contrôle que 25% du Cd ajouté avant la chromatographie, pour déterminer les liaisons non-spécifiques, était lié à du matériel de haut poids moléculaire, rapidement élué et aux environs de 20 000 Da, et qui correspondrait aux fractions 15-20 de la présente étude, alors que 65% du Cd était élué avec des composés de faible poids moléculaire (environ 1000 Da). Pour les plantes exposées à 90  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  pendant 3 semaines, ils avaient observé l'apparition d'un nouveau pic de poids moléculaire intermédiaire (10 000) qui contenait plus de 65% du Cd. Ce type de résultats a également été obtenu par Gekeler et al. (1988), alors que leurs expériences consistaient à exposer l'algue *Chlorella fusca* à 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  pendant 2 jours. Pour la présente étude, bien que, pour le chromatogramme des vallisnéries exposées, les lectures d'absorbance à 254 nm indiquent l'apparition d'un nouveau pic de protéines pour les fractions 28 à 38, celui-ci ne contient pas de cuivre.

Une autre filtration sur gel a été faite sur Superose 12 mais d'abord précédée par une chromatographie ionique (figure 3.5). Les courbes d'absorbance à 254 et 280 nm sont semblables pour les individus exposés comme pour le contrôle. Ce genre de profil est similaire à ceux obtenus par Rauser (1984) alors qu'il avait également procédé, avant la séparation par gel d'exclusion, à une chromatographie ionique pour *Agrostis gigantea* exposé à 3  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  pendant 7 jours. Également, pour

des racines de maïs exposées aux mêmes concentration de Cd, Rauser (1991) avait obtenu deux pics lors d'une autre chromatographie d'exclusion; l'un contenait 69 % du Cd soluble et était caractéristique des PC alors que l'autre était de plus faible poids moléculaire et contenait 18% du Cd soluble. Pour notre part, il n'y pas d'évidence d'induction de PC par ce type de chromatographie.

#### *HPLC en phase inverse*

Par l'extraction au HCl, selon l'approche de Rauser (1990), il n'a été possible de retrouver la molécule de base servant à la synthèse des PC, le GSH, que dans les feuilles de myriophylle. De plus, plusieurs autres pics apparaissent sur les chromatogrammes des feuilles de myriophylle contrôles ou exposées (figure 3.6). Rappelons toutefois que ces plantes utilisées pour ces expériences d'exposition provenaient de la serre et n'avaient pas subit de dépuración et avaient, pas conséquent, un haut contenu en Cu. Elles seraient donc de "mauvais contrôles". Comme ces plantes n'avaient été exposées qu'à du Cd, l'analyse du Cu n'a été fait pour des plantes provenant de la serre que plus tard et pour les expériences subséquentes, une étape de dépuración avait été effectuée. Il se pourrait donc que ces pics retrouvés pour les plantes "contrôles" représentent effectivement des composés pouvant jouer un rôle dans la chélation des métaux. De leur côté, en utilisant cette méthode d'extraction sur des racines de maïs contrôles ou exposées à 3  $\mu\text{M}$  Cd pendant 24 heures, Tukendorf et Rauser (1990) avaient obtenu seulement le GSH et la Cys pour les contrôles alors que d'autres pics (dont des PC) étaient apparus pour les plantes exposées.

Pour des profils au HPLC obtenus des extraits de feuilles de myriophylle après une chromatographie ionique (figure 3.7), le pic caractéristique du GSH n'est plus présent; il en va de même pour le pic no 3 retrouvé, après extraction au HCl, essentiellement chez les feuilles de myriophylles exposées. Aussi, une forte diminution est constatée pour l'ensemble des pics et plus particulièrement pour les pics ayant de faibles

temps de rétention, qui deviennent alors presque inexistantes. Contrairement aux chromatogrammes résultant de l'extraction au HCl, la ligne de base augmente pour des temps de rétention de 20 minutes et plus, endroit où apparaît également les autres pics. Plusieurs pics sont donc disparus pendant cette étape de purification. Il se peut que le volume de Q-Sepharose ait été insuffisant pour retenir efficacement tous les composés de charge négative sur la résine. Cette surcharge de la résine produirait l'élution des composés comme, par exemple, le GSH qui auraient des charges moins élevées que les PC (Biopharm, communication personnelle, 1994).

Le GSH étant présent à de très faibles concentrations dans les racines de myriophylles et chez les vallisnéries, il a été nécessaire d'utiliser un agent réducteur ( $\text{NaBH}_4$ ) pour retrouver ce composé (extraction de Grill). Les concentrations alors obtenues étaient inférieures à 10 nmole/g p. frais. Cependant il s'agit du GSH total qui a été dosé; cette valeur peut être plus ou moins représentative de ce qui se passe réellement dans la cellule. Toutefois, pour des expériences d'exposition à 30  $\mu\text{M}$  de Cd sur des racines de *Silene vulgaris* tolérantes ou non-tolérantes, le contenu de la forme oxydée du GSH (GSSR) pour les deux clones était de moins de 6% du GSH total (De Knecht et al. 1992). Ces concentrations sont donc plutôt faibles par rapport à celles rencontrées pour d'autres plantes dans la littérature où les concentrations en GSH sont de l'ordre du  $\mu\text{mole/g}$  p. frais. En effet, Scheller et al. (1987) avaient obtenu, pour des cultures de cellules de tomate, des concentrations variant de 0,4 à 1,2  $\mu\text{mole/g}$  p. frais et Vögeli-Lange et Wagner (1990), qui travaillaient avec des feuilles de tabac, ont observé des concentrations d'environ 0,2  $\mu\text{mole/g}$  p. frais. Seul Outridge et al. (1991) ont obtenu des concentrations en GSH plus près des nôtres (environ 50 nmole/g p. frais pour *Salvina minima*) et sans l'utilisation d'un agent réducteur. Notons également que par l'utilisation de la méthode d'extraction de Grill, les autres pics retrouvés auparavant pour les feuilles de myriophylles, de temps de rétention plus longs que le GSH, sont disparus.

Pour les vallisnéries exposées, le GSH semble être disparu, alors que pour les myriophylles, dont le contenu initial en GSH est plus élevé que chez les vallisnéries, une diminution de la moitié a été constatée après exposition (figures 3.9 et 3.10). La baisse de GSH après une exposition au Cd a souvent été mentionnée dans la littérature (Delhaize et al. 1989; De Knecht et al. 1992; Grill et al. 1987; Jackson et al. 1992; Rauser 1987; Scheller et al. 1987). Scheller et al. (1987) ont aussi démontré que le degré de diminution du GSH dépendait des concentrations en Cd et que pour de basses concentrations de ce métal, la teneur en GSH pouvait revenir à des valeurs initiales. Par exemple, pour des plantes à tabac exposées à 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  pendant une semaine, Vögeli-Lange et Wagner (1990) ont obtenu des concentrations à peu près égales en GSH pour les contrôles et les spécimens exposés.

Bien que nos concentrations en GSH ne soient que de l'ordre du nmole/g poids frais, des PC pourraient être synthétisées chez les macrophytes étudiés. Cela semble être démontré par les résultats obtenus après lyophilisation où il y a eu concentration du produit (figure 3.11). Cependant, il se pourrait qu'une perte de glutathione et autres composés se produisent lors de cette étape ce qui pourrait nuire à l'acquisition de données quantitatives (Rauser 1990).

Il existe d'autres méthodes pour le dosage des thiols, comme la dérivation avec le monobromobimane, suivie d'une séparation chromatographique, qui serait plus sensible et permettrait de doser des contenus en thiol de l'ordre du pmole (Newton et al. 1981; Steffens et al. 1986). Cependant, bien qu'efficace pour les composés rapidement élués comme le GSH, d'autres produits peuvent apparaître pour des temps de rétention un peu plus longs et qui pourraient masquer les PC (W. Rauser, communication personnelle, 1992). Aussi, des difficultés peuvent apparaître avec des pics dus aux impuretés présentes dans le solvant et dans la reproductibilité des standards utilisés pour la calibration de travail quantitatif (Rauser 1990; Vairavamurthy et Mopper 1990). De leur côté, Vairavamurthy et Mopper (1990) ont mis au point une méthode pour

déterminer les traces de thiol dans les eaux naturelles d'une sensibilité équivalente à celle utilisant le monobromobimane. Cette technique utilise une dérivation avec le 2,2'-dithiobis(5-nitropyridine) (DTNP) et ensuite avec le o-phthalaldéhyde (OPA). Cette technique serait probablement inapplicable dans notre cas puisque l'OPA réagit aussi avec le groupement  $\text{NH}_2$  des aminothiols comme la cystéine. Une concentration du produit avant la chromatographie, comme la précipitation à l'acétone (Jackson et al. 1991), aurait également pu être faite.

#### 4.3.4.2 Les PC comme indicateur biochimique.

Lors des toutes premières recherches sur les PC, il est ressorti que la majeure partie du cadmium soluble était associée à ces peptides. Par exemple, pour des cultures de cellules de *Rauvolfia serpentina* exposées à 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdSO}_4$  pendant 6 jours, il a été déterminé par filtration sur gel que 90 % du métal soluble se trouvait dans un pic intermédiaire (Grill et al. 1985) de faible poids moléculaire (environ 3,5 kDa). Les protéines contenues dans ce pic ont davantage été caractérisées sur HPLC en phase inverse pour isoler des phytochélatines de différentes longueurs. Le même groupe de recherche a démontré la présence de PC chez toutes les espèces étudiées des divisions *Phycota* (Gekeler et al. 1988), *Bryophyta*, *Pteridophyta* et *Spermatophyta* (Gekeler et al. 1989) après exposition à des concentrations élevées de Cd au laboratoire. Pour des plantes entières, comme *Brassica oleracea* (90  $\mu\text{M}$  Cd/3 semaines) ou de soya (20  $\mu\text{M}$  Cd/4 jours), ils auraient déterminé, toujours par filtration sur gel, que plus de 60 % du Cd soluble était associé aux PC (Grill et al. 1985; Grill et al. 1987).

Il y a également d'autres études où les complexes PC-M représentaient un plus faible pourcentage que ceux obtenus par l'équipe de Grill. Pour des suspensions de cellules de tabac exposées à 45  $\mu\text{M}$  Cd, les complexes Cd-peptides étaient détectés après 24 heures mais ne comptaient que pour 30 % du Cd soluble (Krotz et al. 1989). Aussi pour *Silene cucubalus* exposé au cuivre, seulement 30-35% du Cu total était complexé aux PC (Verkleij et al. 1989). Jackson et al. (1991) ont étudié un bryophyte

qui accumulait le Zn, le Cd et le Pb plus que d'autres: *Rhynchostegium riparioides*. Des expériences d'exposition à 10, 50 et 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuCl}_2$  et de  $\text{CdCl}_2$  ont été faites et pour doser les PC, ils ont dû procéder à une précipitation à l'acétone. Par la suite, une séparation chromatographique par exclusion sur HPLC a été effectuée; pour des plantes exposées à 100  $\mu\text{M}$  de Cd, 25 % du métal soluble était associé à des ligands de faible poids moléculaire. Ce pourcentage était de 53 pour les plantes exposées à 100  $\mu\text{M}$  de Cu. Ce dosage a également été effectué sur des plantes récoltées en milieu contaminé où les concentrations maximales en cuivre dans l'eau étaient de l'ordre de 0,1  $\mu\text{M}$ . Ainsi les pourcentages de métal associé aux ligands de faible poids moléculaire sur le métal total accumulé par le bryophyte n'étaient que de 0,06-0,65% pour le Cu, et de 0,24-2,1% pour le Cd. Rauser (1990) a effectué une expérience avec des cellules de tabac exposées à 45  $\mu\text{M}$  Cd pendant 12 heures. La croissance a été normale et pourtant, seulement 10 % du Cd était associé aux PC alors que 82 % pouvait être retrouvé sous forme d'ion libre ou complexé à d'autres ligands dans le cytosol. Une autre expérience faite avec des plantes de tomate exposées à 3  $\mu\text{M}$  Cd n'a permis de mesurer, dans les racines, des complexes peptides-métal qu'après 7 jours d'exposition, malgré le fait que les racines retenaient de 60 à 84 % du Cd total retrouvé dans la plante (Rauser 1986).

Souvent l'augmentation de la tolérance a été attribuée à une production élevée de PC, résultant d'une augmentation de l'activité des enzymes directement impliqués dans leur synthèse (Bennetzen et Adams 1984; Jackson et al. 1987; Steffens et al. 1986), ou d'une synthèse plus rapide de PC de chaînes plus longues qui pourraient former des complexes plus stables avec les métaux traces que les PC de chaînes plus courtes (Delhaize et al. 1989). L'incorporation accrue de sulfure dans les complexes PC-M a aussi été considéré comme un mécanisme contribuant à la tolérance (Reese et Winge 1988; Verkleij et al. 1990) car augmentant la stabilité et la quantité de métal pouvant être lié par unité de PC-SH (Steffens 1990).

Ces hypothèses ont été corroborées dans certaines études où des plantes ou des lignées de cellules tolérantes produisaient plus de PC que les

organismes sensibles (Steffens et al. 1986; Jackson et al. 1990). Une telle différence n'a toutefois pas été observée pour d'autres expériences (Delhaize et al. 1989; Huang et al. 1987; Jackson et al. 1989; Verkleij et al. 1990). Il est important de mentionner que la plupart de ces comparaisons ont été faites à de très hautes concentrations en métaux et parfois, après de longues périodes d'exposition (plusieurs semaines). À titre de comparaison, des plantes à tabac ayant eu à croître en milieu hydroponique avec  $7,6 \mu\text{M}$  Cd pendant 32 jours ont produit des feuilles dont les contenus, pour ce métal, était de 28-340 fois plus important que les teneurs retrouvées pour des plantes ayant poussé sur divers sols contaminés (Wagner et Yeagan 1986). Pour des cellules de tabac tolérantes au Cd exposées à  $200 \mu\text{M}$  Cd, les concentrations pour ce métal atteignaient, après un jour, des concentrations 14 000 fois plus importantes que pour les plantes retrouvées dans différents sols (Huang et Goldsbrough 1988). Donc, il ne pourrait être exclu que les différences apparentes (longueur des PC et incorporation de sulfure) soient dues à des effets toxiques secondaires pour des individus sensibles plutôt qu'à une tolérance différentielle. Il s'agirait donc d'une conséquence suite à une intoxication à des métaux.

Généralement, les expériences faites avec le BSO (inhibiteur de la synthèse du GSH) ont démontré qu'il y avait une augmentation de la toxicité du Cd, pour des concentrations non-phytotoxiques, en présence de cet inhibiteur de la synthèse du GSH (Huang et al. 1987; Steffens et al. 1986), mais cela ne s'appliquait pas pour le Cu et le Zn comme si le contrôle de la séquestration différait entre les métaux (Reese et Wagner 1987). Cependant l'étude de De Knecht et al. (1992) met en doute le rôle des PC dans la tolérance au Cd. Ces chercheurs ont étudié deux souches de *Silene vulgaris*, l'une tolérante au Cd et l'autre d'une sensibilité "normale". Lorsqu'exposée à une concentration élevée en Cd ( $30 \mu\text{M}$ ) en culture hydroponique, la souche sensible produisait plus de PC que la souche tolérante; si les PC jouaient un rôle important dans la tolérance, on se serait attendu au résultat inverse (tolérance accrue associée à une production élevée de PC - Steffens et al. 1986; Jackson et al. 1987). De plus, l'exposition des deux souches au BSO et au Cd inhibait la production de PC dans les

deux souches, mais ce déclin n'avait pas d'effet sur la sensibilité de la souche tolérante au Cd. Les auteurs ont conclu que les PC ne jouaient pas de rôle majeur dans la manifestation de sensibilités différentes au Cd chez les deux souches étudiées.

Il y aurait donc d'autres mécanismes de séquestration...

#### 4.3.4.3 Complexes GSH-métal

Le GSH joue un rôle important de défense contre la toxicité engendrée par le cadmium chez les animaux (Singhai et al. 1987) et ce tri-peptide est reconnu pour former des complexes avec le Zn et le Cd (Perrin et Watt 1971). En utilisant un tampon non-chélatant (HEPES), on a été en mesure de démontrer chez des cellules de foie pouvant produire des complexes Cu-metallothionéine, qu'environ 60% du Cu cytoplasmique était présent sous forme de Cu-GSH (Freedman et al. 1989). Il semblerait plausible que ce type de complexe puisse se former également chez les plantes.

#### 4.3.4.4 Acides organiques

Des corrélations entre le contenu en zinc et le contenu en acides organiques ont été constatées pour diverses plantes ou cultures de cellules (Godbold et al. 1984; Kishinami et Widholm 1986; Mathys 1977; Qureshi et al. 1986; Thurman et Rankin 1982; Van Steveninck et al. 1987; Woolhouse 1983). D'après Krotz et al. (1989), la stochiométrie acide organique-métal (Zn ou Cd) indique que le contenu endogène en acides organiques a été suffisant pour complexer le métal absorbé pour des suspensions de cellules de tabac exposées à des concentrations non-phytotoxiques de métaux (45  $\mu\text{M}$  de Cd ou 300  $\mu\text{M}$  de Zn). Donc le principal mécanisme d'accumulation serait l'entreposage de ces métaux sous forme de complexes d'acide organique dans les vacuoles.

De fait, plusieurs études indiquent que le métal accumulé dans les plantes supérieures est surtout entreposé dans les vacuoles (Heuillet et al. 1986; Kishinami et Widholm 1987; Krotz et al. 1989; Vögeli-Lange et Wagner 1990). Vögeli-Lange et Wagner (1990) ont examiné la distribution vacuolaire/extravacuolaire pour des feuilles de tabac exposées à des concentrations non-phytotoxiques de Cd ( $20 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ ). Ils ont trouvé que presque tout le métal était localisé dans les vacuoles, rendant le Cd non-disponible pour perturber les composantes biologiques actives retrouvées dans le reste de la cellule. Wang et al. (1991) ont simulé la spéciation du Cd en se basant sur les données de Krotz et al. (1989) dans les vacuoles. Les complexes solubles de Cd seraient formés de peptides contenant du soufre (comme les PC) et de certains acides organiques. Le citrate serait l'agent complexant principal, liant 60 % du Cd total (à pH 5) même si le malate est beaucoup plus abondant et même si des peptides telle que les PC sont aussi retrouvés dans les vacuoles (Krotz avait évalué que 30% du Cd était lié aux peptides). Également, s'il y a présence de chlorure, de sulfure ou de phosphate dans les vacuoles, ceux-ci seraient efficaces pour séquestrer le Cd et former la forme soluble de  $\text{Cd-Cl}^+$  ou les formes insolubles de  $\text{Cd-S}$  et de  $\text{Cd-PO}_4$ .

Pour leur part, Outridge et al. (1991) ont procédé au fractionnement du métal. Ils ont ainsi exposé une plante aquatique, *Salvinia minima*, à  $0,2 \mu\text{M}$  Cd pendant 8 jours. Au début 82-90 % du Cd soluble se trouvait sous forme cationique. Après 8 heures, la forme anionique du Cd est passée à 65% pour ensuite se maintenir entre 70 et 80 %, même si le Cd continuait à s'accumuler.

#### 4.3.4.5 Spéciation du métal soluble chez *Vallisneria americana* et *Myriophyllum spicatum*

Dans nos expériences, en procédant par l'extraction avec un tampon physiologique suivie d'une chromatographie ionique, nous avons été en mesure d'obtenir un fractionnement semblable à ceux d'Outridge et al. (1991) pour le cuivre et le cadmium. En principe, la mesure des formes cationiques et anioniques devait permettre de donner davantage

d'informations pour le métal assimilé et soluble dans le cytosol. Cependant, les pourcentages de récupération variables observés dans la présente étude rendent cette évaluation parfois difficile. Comme tout le métal déposé sur la résine pour la chromatographie ionique n'était pas récupéré à la sortie, il reste une partie du métal soluble dont la répartition, sous formes anioniques ou cationiques, demeure inconnue.

La répartition intracellulaire des métaux bioaccumulés pour les plantes provenant du terrain comme pour celles exposées en laboratoire a indiqué que les proportions de Cu cationique étaient généralement plus élevées que celles de Cu anionique, autant pour les vallisnéries que pour les myriophylles. Il en serait de même pour le Cd cationique, qui est plus élevé que le Cd anionique chez les myriophylles. Toutefois, il est parfois arrivé que le pourcentage Cd anionique ait été plus élevé que celui du Cd cationique, pour les vallisnéries récoltées sur le terrain, ce qui n'a pas été constaté pour les vallisnéries exposées au laboratoire.

Si on compare maintenant les concentrations des différentes formes solubles de métal, on constate, à la figure 4.11 A., que les formes anioniques et cationiques du Cd contribuent toutes deux à l'augmentation du Cd soluble pour les feuilles de *Vallisneria americana*. L'augmentation du Cd anionique pourrait signifier qu'il y a eu synthèse de composés pouvant chélater les métaux, ou que le Cd se lie simplement à des composés cytosoliques, qui ne joueraient pas de rôle dans la détoxification, mais dont les charges nettes seraient négatives. Il en serait de même pour les racines des vallisnéries (figure 4.12 A.).

Toutefois, pour le cuivre et les racines de *Vallisneria americana*, un comportement différent se manifeste; seul le Cu cationique contribue à l'augmentation du Cu soluble (figure 4.12 B.). Le cuivre absorbé et retenu par les racines se retrouve très majoritairement sous forme cationique. Dans le cas des feuilles de vallisnéries, les deux formes de cuivre, anioniques et cationiques, augmentent au fur et à mesure que le Cu soluble augmente

(figure 4.11 B), mais les tendances sont moins nettes que pour le Cu cationique chez les racines.

Pour *Myriophyllum spicatum*, le Cd assimilé se retrouve sous forme cationique alors que la concentration de la forme anionique demeure à peu près constante à mesure que le Cd soluble augmente et cela, pour les feuilles comme pour les racines (figure 4.13 A. et 4.14 A.). Donc le cadmium incorporé resterait soit sous forme d'ion libre ou serait associé à des composés ayant une charge nette positive. Il est à noter qu'aucune relation entre le Cd soluble et le Cd total n'a été trouvée pour ce métal chez ce macrophyte. Pour le cuivre, la majeure partie du métal accumulé serait également retrouvée sous la forme cationique (figures 4.13 B. et 4.14 B.).

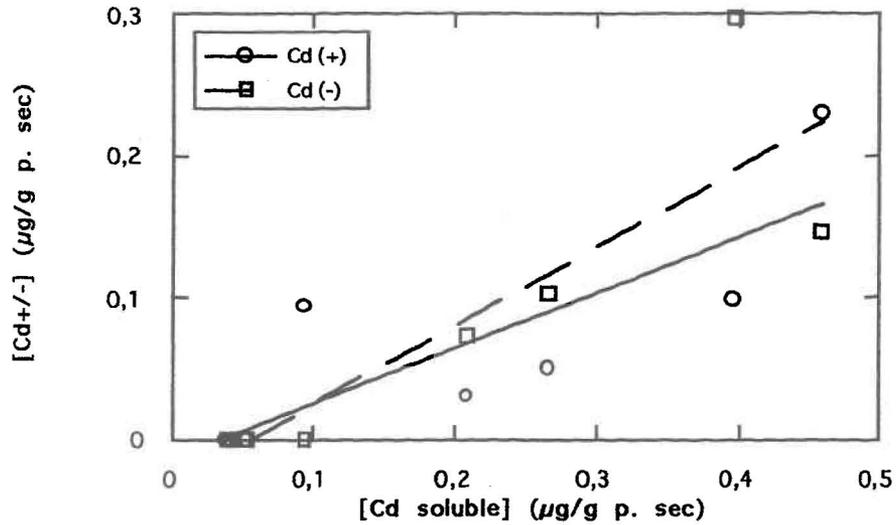
Les ratios retrouvés pour les groupements thiol-Cd sont de 2:1 pour les complexes PC-métal (Steffens 1990). En prenant le cas des feuilles de vallisnérie de la station SL-9 (tableau 3.5) où 0,03 nmole de Cd anionique a été obtenue par g poids frais, et en supposant que tout le métal est lié par des groupements thiol, on obtiendrait alors 0,06 nmole de thiol/g p. frais. Pour être détectable sur HPLC, le produit devrait être au moins concentré dix fois. Si on prend maintenant des feuilles de vallisnérie exposées à 0,5 ppm de Cd (tableau 3.9), pour la quantité de Cd anionique obtenue (2,8 nmole/g p. frais), on aurait dû obtenir 5,6 nmole de thiol/g p. frais, ce qui aurait dû être détecté par HPLC. Cela aurait cependant mobilisé alors presque tout le GSH présent dans ces parties de plante. Rappelons que pour des plantes exposées à ces concentrations de métal, presque tout le GSH avait disparu mais qu'aucun pic de PC n'était apparu.

Donc la seule évidence d'une augmentation de la forme anionique du métal avec le métal soluble serait pour le Cd chez les vallisnéries (feuilles et racines) et pour le Cu pour les feuilles de vallisnéries, les métaux accumulés chez les myriophylles se retrouvant surtout sous forme cationique. Comme la concentration de métal anionique demeure constante, chez cette dernière, on pourrait supposer que ce macrophyte n'est pas en mesure de

contrôler efficacement les métaux assimilés par une augmentation de composées anioniques qui pourraient être en mesure de séquestrer les métaux ainsi retrouvés dans le cytosol.

L'accroissement de la forme anionique est plus évidente pour le Cd que pour le Cu. Ce dernier, un élément essentiel, pourrait voir sa concentration intracellulaire contrôlée de façons différentes du Cd, qui n'est pas un élément essentiel mais plutôt toxique.

A.



B.

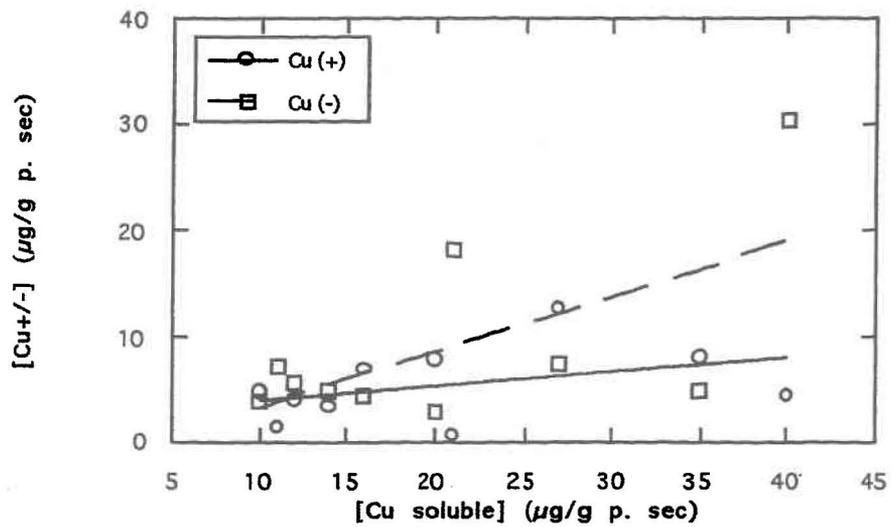


Figure 4.11: Concentrations de métal soluble versus les formes cationiques (+) et anioniques (-) du métal pour des feuilles de *Vallisneria americana* récoltées sur le terrain. (A) Cd; (B) Cu.

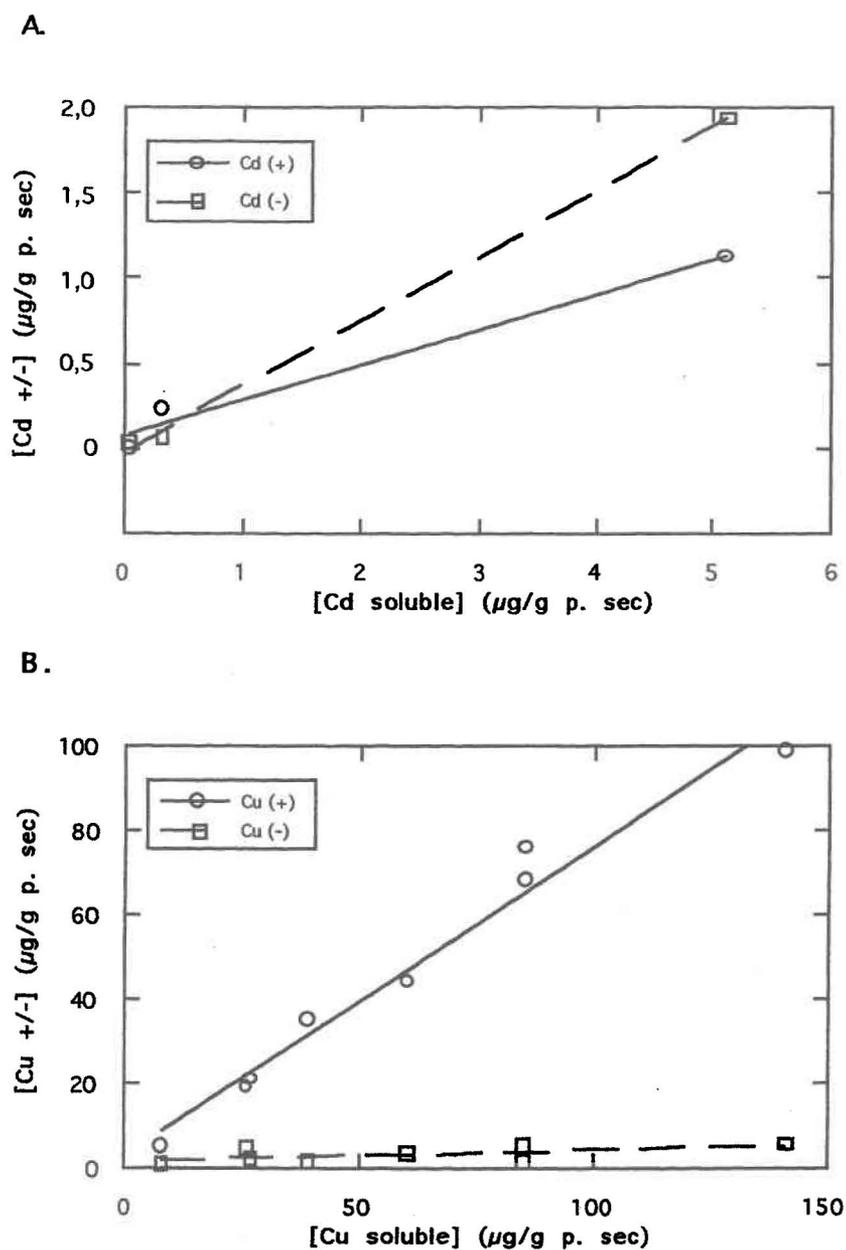
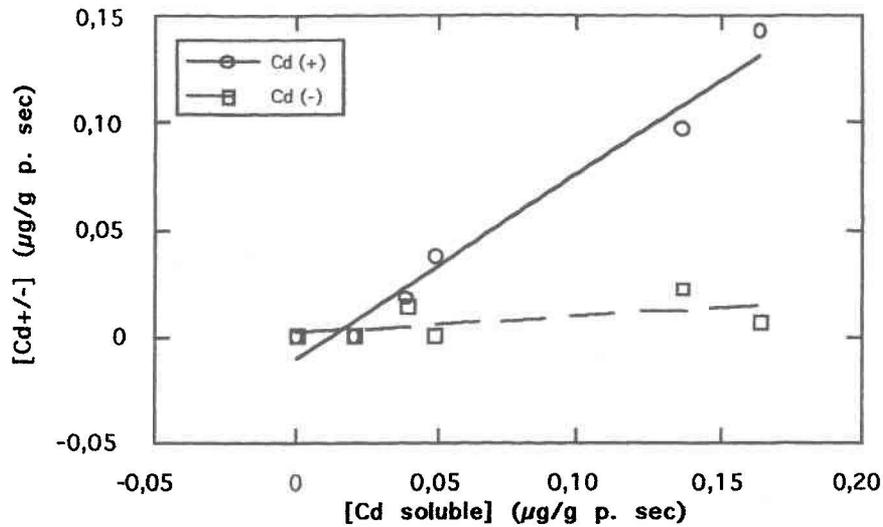


Figure 4.12: Concentrations de métal soluble versus les formes cationiques (+) et anioniques (-) de métal pour des racines de *Vallisneria americana* récoltées sur le terrain. (A) Cd; (B) Cu.

A.



B.

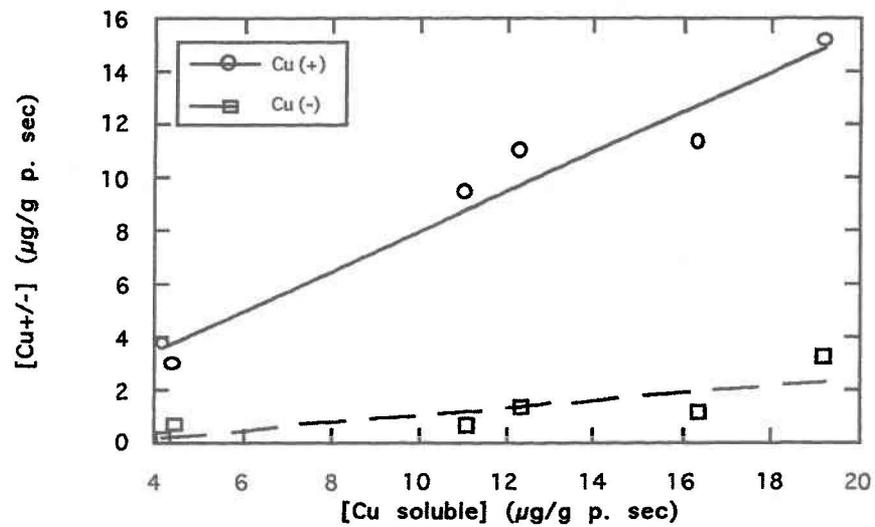
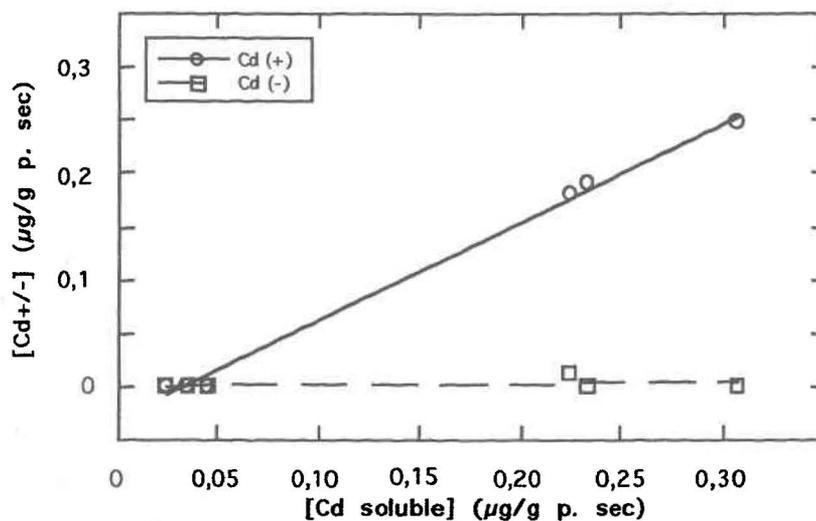


Figure 4.13: Concentrations de métal soluble versus les formes cationiques (+) et anioniques (-) de métal pour des feuilles de *Myriophyllum spicatum* récoltées sur le terrain. (A) Cd; (B) Cu.

A.



B.

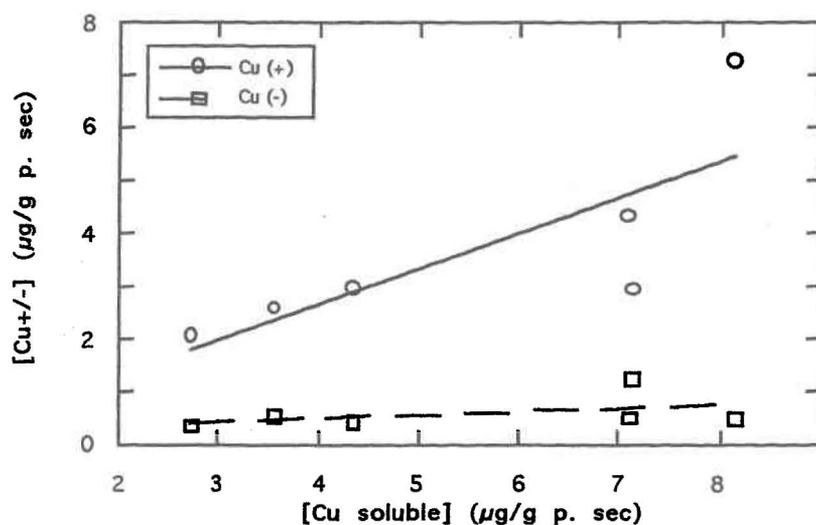


Figure 4.14: Concentrations de métal soluble versus les formes cationiques (+) et anioniques (-) de métal pour des racines de *Myriophyllum spicatum* récoltées sur le terrain. (A) Cd; (B) Cu.

## CHAPITRE 5: CONCLUSIONS

Au cours des dernières années, les phytochélatines ont représenté un sujet chaud pour ceux qui s'intéressaient à la physiologie végétale ou à la biochimie des plantes lorsque celles-ci étaient exposées à des métaux traces. Cet intérêt découlait en partie de l'observation que les phytochélatines sont induites spécifiquement par ces mêmes métaux, et non pas également par d'autres types de stress tels que thermiques ou oxydatifs, comme c'est le cas pour les métallothionéines.

Ce projet de maîtrise visait à explorer la possibilité d'utiliser ces peptides au pouvoir chélatant comme biomarqueurs précoces de l'exposition à des concentrations sous-létales de métaux, et ceci, chez des macrophytes retrouvés dans le système Saint-Laurent. Cependant, la plupart des recherches faites auparavant avaient été réalisées en laboratoire et pour des concentrations beaucoup plus importantes que celles retrouvées dans le milieu naturel. Cette étude a donc été subdivisée en deux parties principales: l'une consistait à étudier l'induction des PC pour des macrophytes exposés à de hautes concentrations en métal en laboratoire et l'autre visait à évaluer si des plantes aquatiques recueillies dans le milieu naturel avaient synthétisé des PC en proportion aux quantités de métal bioaccumulées.

### 5.1 Conclusions générales

#### 5.1.1 Rapport entre les macrophytes et les sédiments

La concentration de l'ion métallique libre ( $M^{2+}$ ) permet d'évaluer la quantité de métal potentiellement disponible aux macrophytes via leurs racines. Toutefois, les relations entre les concentrations de métal chez les plantes et celles de l'ion métallique sont relativement faibles (figure 4.2), ce qui reflète l'influence d'autres facteurs (pH,  $[Ca^{2+}]$ ,  $[MOD]$ ,...) sur la bioconcentration de métaux chez les plantes aquatiques. Il est à souligner qu'un gradient de contamination établi en utilisant l'ion libre ( $M^{2+}$ ) pourrait être différent (surtout dans le cas du Cd) de celui qui serait établi en prenant la concentration totale de métal retrouvée dans les sédiments.

La plupart des publications qui tentent de faire un parallèle entre un organisme vivant et son milieu, dans ce cas-ci, les sédiments, ont surtout été faites sur la base des concentrations totales de métal dans les sédiments.

Les plantes aquatiques sont réputées assimiler des métaux traces par leurs racines. Cependant, la présence d'oxydes de fer ou de manganèse associés aux racines de la plante complique grandement l'évaluation adéquate du métal pouvant être bioaccumulé par ces parties, à partir des sédiments. Néanmoins, en supposant une translocation du métal des racines aux feuilles, il a été possible d'établir ce type de relation (figure 4.2) pour les feuilles de vallisnérie et de myriophylle avec le  $\text{Cd}^{2+}$  présent dans les sédiments, même si ces dernières données n'ont pas été récoltées la même année.

### 5.1.2 Rapport entre les macrophytes et le métal total bioaccumulé

Des différences ont pu être constatées dans les concentrations totales de métal bioaccumulé entre deux plantes aquatiques provenant d'une même station: différence dans les ordres de grandeur des concentrations; différence dans les gradients de contamination établis, par exemple, par rapport au contenu des feuilles de vallisnérie ou des feuilles de myriophylles. Aussi, les vallisnéries ont une répartition plus uniforme des feuilles contrairement aux myriophylles où une différence, dans les contenus en eau, peut être notée entre les feuilles et les tiges. Donc l'analyse des parties vertes des myriophylles aurait dû se faire en analysant séparément les feuilles et les tiges.

De plus, les concentrations obtenues pouvaient être différentes lors du dosage du métal total selon le type de méthode employée (digestion acide ou addition des fractions pour le bilan en métal). Comme la digestion acide nécessite moins d'étapes que l'addition des fractions, elle serait préférable pour l'évaluation du métal total.

### 5.1.3 Spéciation du métal bioaccumulé par les macrophytes

On a tout d'abord essayé de trouver des PC chez les macrophytes étudiés: par chromatographie sur gel d'exclusion et par HPLC. Aucun de ces polypeptides n'a pu être identifié par gel d'exclusion et il y avait des différences dans les chromatogrammes de HPLC selon l'extraction suivie (Rauser ou Grill). La seule évidence de la présence de PC a été obtenue après extraction (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0) et lyophilisation pour concentrer le produit pour des myriophylles exposées au Cu (figure 3.11). Rappelons également que les concentrations en GSH, le précurseur des PC, étaient plutôt faibles par rapport à d'autres plantes étudiées dans la littérature.

On s'est donc tourné vers la répartition du métal assimilé et soluble. Chez les vallisnéries, des relations entre les concentrations de métal soluble et les concentrations de métal total pouvaient être observées, et ce, autant pour les feuilles que pour les racines, et pour les deux métaux étudiés. Dans le cas des myriophylles, seul le Cu soluble augmente avec le Cu total (c'est-à-dire que le Cd assimilé demeure surtout sous forme particulaire).

Si cette fraction soluble du métal est ensuite divisée entre les formes cationiques et anioniques, cette dernière correspondant à des complexes cytosoliques de charge négative, on constate alors que les formes anioniques du Cd et du Cu contribuent à l'augmentation du métal soluble pour les feuilles de vallisnéries; pour les feuilles de myriophylles, cependant, c'est la forme cationique qui prédomine. En supposant que l'augmentation de la forme anionique soit un mécanisme de défense contre les métaux, *Vallisneria americana* serait plus apte à contrôler les métaux intracellulaires que *Myriophyllum spicatum*.

## 5. 2 Recommandations

Avec les concentrations de métal retrouvées dans l'environnement, qui sont plutôt basses en comparaison avec celles utilisées dans les expériences en laboratoire, il s'avère difficile de trouver une façon

de bien mesurer l'état de santé des macrophytes (que l'on pense aux pourcentages de métaux associés aux PC pour un bryophyte récolté dans l'environnement - Jackson et al. 1991). Dans les paragraphes qui suivent, on trouvera quelques recommandations quant à des recherches à entreprendre.

- Est-ce que le métal total bioaccumulé serait un bon indice de la condition de santé des macrophytes? Si les métaux sont fixés sur les parois cellulaires ou retrouvés dans des vacuoles, ils ne pourront pas agir sur les autres composantes du cytosol. Donc, de définir la spéciation et maximiser les informations quant à la localisation du métal ainsi assimilé pourrait se révéler d'une grande importance; par exemple, en faisant des extractions tout en gardant les vacuoles intactes (Vögeli-Langé et Wagner 1990), on pourrait identifier les compartiments où sont retrouvées les formes de métal solubles. De plus, il serait préférable d'utiliser un tampon non-chélatant pour les extractions, comme HEPES, et aussi, de bien s'assurer de contrôler les conditions lors des extractions: milieu ouvert ou fermé.
- Également, dans les présentes expériences au laboratoire, les plantes ont été exposées à des concentrations de métaux trop élevées, si bien que les quantités bioaccumulées étaient trop importantes ( $[M]$ -laboratoire/ $[M]$ -terrain de plus de 300 fois pour le Cd et plus de 60 fois pour le Cu pour les feuilles de vallisnèries et de myriophylles) pour essayer de comparer ces données à celles obtenues pour les plantes de terrain. Il serait intéressant de vérifier, pour des plantes (surtout *Vallisneria americana*) exposées à de plus faibles concentrations, si l'augmentation de la forme anionique se manifeste toujours en fonction du métal bioaccumulé. Pour réaliser de telles expériences, il faudrait s'assurer que les plantes témoins soient exposées à des concentrations minimales de métaux. De plus, il faudrait améliorer la sensibilité de la technique de dosage des PC, notamment en y incorporant une étape de pré-concentration après l'extraction initiale comme par exemple l'extraction à l'acétone utilisée par Jackson et al. (1991).

- Comme il a été difficile d'identifier des PC, ces augmentations de formes anioniques de métal pourraient être dues à la présence de complexes métal-acides organiques. Il serait intéressant de caractériser ces formes anioniques.
- De même, l'augmentation marquée de formes cationiques et solubles de métaux (notamment chez *Myriophyllum spicatum*, figure 4.13-14) laisse supposer que certaines fonctions métaboliques soient affectées. Peut être y-a-t-il des enzymes qui pourraient être dosés et qui répondraient, de façon proportionnelle, à une bioaccumulation de métaux solubles et cationiques? Comme l'activité de ces autres enzymes pourrait dépendre d'autres stress, il sera cependant difficile d'établir des relations de cause à effet aussi simples qu'avec les PC.



## CHAPITRE 6: BIBLIOGRAPHIE

- Aulio, K. (1980). "Accumulation of copper in fluvial sediments and yellow water lilies (*Nuphar lutea*) at varying distances from a metal processing plant", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 25 : 713-717.
- Amyot, M. (1992). "Bioaccumulation de métaux lourds chez l'amphipode *Gammarus fasciatus* en relation avec la contamination de son milieu", Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, 178 p.
- Amyot, M., B. Pinel-Alloul et P.G.C. Campbell (1994). "Abiotic and seasonal factors influencing trace metals levels (Cd, Cu, Pb, and Zn) in the freshwater amphipod *Gammarus fasciatus* in two fluvial lakes of the St. Lawrence River", *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51 : 2003-2016.
- Baker, A.J.M. et L.W. Walker (1990). "Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants", pp. 155-177. Dans: *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, A.J. Shaw (éditeur), CRC Press, Inc, Boca Raton, FL.
- Barko, J.W. et R.M. Smart (1980). "Mobilization of sediment phosphorus by submersed freshwater macrophytes", *Freshwater Biol.*, 10 : 229-238.
- Barko, J.W. et R.M. Smart (1981). "Sediment-based nutrition of submersed macrophytes", *Aquat. Bot.*, 10 : 339-352.
- Barrick, R., H. Beller, S. Becker et T. Ginn (1989). "Use of the apparent effects threshold approach (AET) in classifying contaminated sediments", pp. 64-77. Dans: *Contaminated Marine Sediments - Assessment and Remediation*. Committee on Contaminated Marine Sediments, Marine Board, Commission on Engineering and Technical Systems, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C.
- Béland, J. et R. Demers (1978). "La teneur en substances toxiques dans les plantes aquatiques et les facteurs limitant leur croissance", Rapport technique no 8, Soumis au Comité d'étude sur le fleuve Saint-Laurent, 179p.
- Bennetzen, J.L. et T.L. Adams (1984). "Selection and characterization of cadmium resistant suspension cultures of wild tomato *Lycopersicon peruvianum*", *Plant Cell Report*, 3 : 258-261.

- Berry, W.L. (1986). "Plant factors influencing the use of plant analysis as a tool for biogeochemical prospecting", p. 13-32. Dans: Mineral Exploration: Biological Systems and Organic Matter, Vol. 5, D. Carlisle, W.L. Berry, I.R. Kaplan et J.R. Watterson (éditeurs), Prentice-Hall, NJ.
- Burton, G.A. (1991). "Assessing the toxicity of freshwater sediments", Environ. Toxicol. Chem., 10 : 1585-1627.
- Burton, M.A.S. et P.J. Peterson (1979). "Studies on zinc localization in aquatic bryophytes", Bryologist, 82 : 594-598.
- Campbell, P.G.C., A. Tessier, M. Bisson et R. Bougie (1985). "Accumulation of copper and zinc in the yellow water lily, *Nuphar variegatum*: relationships to metal partitioning in the adjacent lake sediments", Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42 : 23-32.
- Canadian Council of Resource and Environment Ministers (CCREM) (1987). Canadian Water Quality Guidelines. Prepared for the CCREM Task Force on Water Quality Guidelines, Environnement Canada, Ottawa.
- Casterline, J.L. et N.M. Barnett (1977). "Isolation and characterization of cadmium-binding components in soybean plants", Plant Physiol., 59 : 124 (Suppl.)
- Cataldo, D.A., T.R. Garland et R.E. Wildung (1981). "Cadmium distribution and chemical fate in soybean plants", Plant Physiol., 68 : 835-839.
- Champoux, L. et H. Sloterdijk (1988). "Étude de la qualité des sédiments du lac Saint-Louis (fleuve Saint-Laurent) 1984-1985", Rapport technique no 1: Géochimie et contamination. Centre Saint-Laurent, Conservation et Protection, Région du Québec, Environnement Canada, 177 p.
- CNRC (1985). "The role of biochemical indicators in the assessment of ecosystem health - their development and validation", NRCC Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality, National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario, NRCC no 24371, 119 p.
- Couillard, Y., P.G.C. Campbell et A. Tessier (1993). "Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient", Limnol. Oceanogr., 38 : 299-313.

- Crow, G.E. et C.B. Hellquist (1982). "Aquatic vascular plants of New England: Part 4 *Juncaginaceae*, *Scheuchzeriaceae*, *Butomaceae*, *Hydrocharitaceae*", Agricultural Experiment Station, Station Bulletin 520, University of New Hampshire, Durham, NH, 20 p.
- Cumming, J.R. et A. B. Tomsett (1992). "Metal tolerance in plants: signal transduction and acclimation mechanisms", pp. 329-364. Dans: *Biogeochemistry of Trace Metals*, D.C. Adriano (éditeur), Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Delhaize, E., P.J. Jackson, L.D. Lujan et N.J. Robinson (1989). "Poly( $\gamma$ -glutamylcysteinyl) glycine in *Datura innoxia* and binding of cadmium", *Plant Physiol.*, 89 : 700-706.
- De Knecht, J.A., P.L.M. Koevoets, J.A.C. Verkleij et W.H.O. Ernst (1992). "Evidence against a role for phytochelatins in naturally selected increased cadmium tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke", *New Phytol.*, 122 : 681-688.
- Dimension Environnement Ltée (1982). "Études des herbiers submergés du lac Saint-Louis et du bassin de Laprairie. (Mandat LB-3)", Projet Lachine, rapport technique, Montréal, 106 p.
- Di Toro, D.M., C.S. Zarba, D.J. Hansen, W.J. Berry, R.C. Swartz, C.E. Cowan, S. P. Pavlou, H.E. Allen, N.A. Thomas et P.R. Paquin (1991). "Technical basis for establishing sediment quality criteria for non-ionic organic chemicals using equilibrium partitioning", *Environ. Toxicol. Chem.*, 10: 1541-1583.
- Durnam, D.M. et R.D. Palmiter (1984). "Induction of metallothionein-I mRNA in cultured cells by heavy metals and iodoacetate: evidence for gratuitous inducer", *Mol. Cell Biol.*, 4 : 484-491.
- Environnement Canada (1981). "Les substances toxiques dans le fleuve Saint-Laurent. Résumé", Service de la protection de l'environnement, région du Québec, 91 p.
- Environnement Canada, Centre Saint-Laurent et Ministère de l'environnement du Québec (1992). "Critères intérimaires pour l'évaluation de la qualité des sédiments du Saint-Laurent", Rapport préparé pour le Plan d'action Saint-Laurent, 28 p.
- Ernst, W.H.O., J.A.C. Verkleij et H. Schat (1992). "Metal tolerance in plants", *Acta Bot. Neerl.*, 41 : 229-248.

- Fassett, N.C. (1957). "A manual of aquatic plants, 2<sup>e</sup> edition", The University of Wisconsin press, Madison, Wisconsin, 405 p.
- Flessas, C. (1994). "Bioaccumulation de métaux traces chez deux mollusques gastéropodes, *Bithynia tentaculata* et *Physa gyrina*, en relation avec la contamination de leur milieu", Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, 195 p.
- Franzin, W.G. et G.A. McFarlane (1980). "An analysis of the aquatic macrophyte, *Myriophyllum exalbescens*, as an indicator of metal contamination of aquatic ecosystems near a base metal smelter", Bull. Environ. Contam. Toxicol., 24 : 597-605.
- Freedman, J.H., M.R. Ciriolo et J. Peisach (1989). "The role of glutathione in copper metabolism and toxicity", J. Biol. Chem., 264 : 5598-5605.
- Fujita, M. (1985). "The presence of two Cd-binding components in the roots of water hyacinth cultivated in a Cd<sup>2+</sup>-containing medium", Plant Cell Physiol., 26 : 295-300.
- Gekeler, W., E. Grill, E.-L. Winnacker et M.H. Zenk (1988). "Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes", Arch. Microbiol., 150 : 197-202.
- Gekeler, W., E. Grill, E.-L. Winnacker et M.H. Zenk (1989). "Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins", Z. Naturforsch., 44C : 361-369.
- Germain, A. et M. Janson (1984). "Qualité des eaux du fleuve Saint-Laurent de Cornwall à Québec (1977-1981)", Environnement Canada, Direction générale des eaux intérieures (Québec), Section des relevés de qualité, 232 p.
- Giesy, J.G. et R.A. Hoke (1990). "Freshwater sediment quality criteria: toxicity bioassessment", chapitre 9, pp. 265-348. Dans: *Sediments - Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants*, R. Baudo, J.P. Giesy et H. Muntau (éditeurs), Lewis Publishers, Inc., Ann Arbor, MI.
- Godbold, D.L., W.J. Horst, J.C. Collins, D.A. Thurman et H. Marschner (1984). "Accumulation of Zn and organic acids in roots of Zn tolerant and nontolerant ecotypes of *Deschampsia caespitosa*", J. Plant Physiol., 116 : 59-69.

- Gommes, R. et H. Muntau (1981). "La composition chimique des limnophytes du lac Majeur", Mem. Ist. Ital. Idriobiol. Dott Marco Marchi, 38: 237-307.
- Gravel, Y. et L. Levesque (1977). "Localisation et cartographie de zones d'herbier du fleuve Saint-Laurent", Comité d'étude sur le fleuve Saint-Laurent, Rapport technique no 1, Ministère du Tourisme, de la Chasse et de la Pêche, Gouvernement du Québec, 160 p.
- Grill, E. (1989). "Phytochelatins in plants", pp. 283-300. Dans: *Metal Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry*, D.H. Hamer et D.R. Winge (éditeurs), Alan R. Liss, Inc, New York, NY.
- Grill, E., S. Löffler, E.-L. Winnacker et M.H. Zenk (1989). "Phytochelatins, the heavy-metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatase)", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 6838-6842.
- Grill, E., E.-L. Winnacker et M.H. Zenk (1985). "Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants", Science, 230: 674-676.
- Grill, E., E.-L. Winnacker 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.
- Grill, E., E.-L. Winnacker et M.H. Zenk (1990). "Phytochelatins, the heavy metal chelating peptides of the plant kingdom", pp. 89-95. Dans: *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants*, H. Rennenberg, C. Brunold et C.J. de Kok (éditeurs), SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands.
- Harding, J.P.C. et B.A. Whitton (1981). "Accumulation of zinc, cadmium and lead by field populations of *Lemanea*", Water Res. 15: 301-319.
- Hardy, B., L. Champoux, H. Sloterdijk et J. Bureau (1990). "Caractérisation des sédiments de fond du lac Saint-Pierre, fleuve Saint-Laurent", Centre Saint-Laurent, Conservation et Protection, Environnement Canada, 56 p.
- Heuillet, E., A. Moreau, S. Halpern, N. Jeanne et S. Puisseux-Dao (1986). "Cadmium binding to a thiol-molecule of *Dunaliella bioculata* contaminated with CdCl<sub>2</sub>; electron probe microanalysis", Biol. Cell, 58: 79-86.

- Hoagland, D. R. et D. I. Arnon (1950). "The water-culture method for growing plants without soil", Circular 347, Department of Agriculture, Ottawa, 32 p.
- Huang, B., E. Hatch et P.B. Goldsbrough (1987). "Selection and characterization of cadmium tolerant cells in tomato", *Plant Sci.*, 52 : 211-221.
- Huang, B. et P.B. Goldsbrough (1988). "Cadmium tolerance in tobacco cell culture and its relevance to temperature stress", *Plant Cell Rep.*, 7 : 119-122.
- Jackson, L.J. et J. Kalff (1993). "Patterns in metal content of submerged aquatic macrophytes: the role of plant growth form", *Freshwater Biol.*, 29 : 351-359.
- Jackson, P.J., E. Delhaize et C.R. Kuske (1992). "Biosynthesis and metabolic roles of cadystins ( $\gamma$ -EC)<sub>n</sub>G and their precursors in *Datura innoxia*", *Plant Soil*, 146 : 281-289.
- Jackson, P.J., N.J. Robinson et E. Delhaize (1989). "Cd-tolerance in plant cells: a comparison of biochemical and molecular properties of tolerant and sensitive cells", pp. 337-346. Dans: *Metal Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry*, D.H. Hamer et D.R. Winge (éditeurs), Alan R. Liss, Inc, New York, NY.
- Jackson, P.J., N.J. Robinson et B.A. Whitton (1991). "Low molecular weight metal complexes in the freshwater moss *Rhynchostegium riparioides* exposed to elevated concentrations of Zn, Cu, Cd and Pb in the laboratory and field", *Environ. Exper. Bot.*, 31 : 359-366.
- Jackson, P.J., C.J. Unkefer, J.A. Doolen, K. Watt et N.J. Robinson (1987). "Poly( $\gamma$ -glutamylcysteinyl)glycine: Its role in cadmium resistance in plants cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 6619-6623.
- Jackson, P.J., C.J. Unkefer, E. Delhaize et N.J. Robinson (1990). "Mechanism of trace metal tolerance in plants", pp. 231-255. Dans: *Environment Injury to Plants*, F. Katterman (éditeur), Academic Press, San Diego, CA.
- Jarry, V., S. Paquet et D. Du Sablon (1992). "Étude de la biomasse et de la contamination algale du lac Saint-Pierre en 1990", Centre Saint-Laurent, Conservation et Protection, Environnement Canada, 26 p.

- Jarry, V., P. Ross, L. Champoux, H. Sloterdijk, A. Mudroch, Y. Couillard et F. Lavoie (1985). "Répartition spatiale des contaminants dans les sédiments du lac Saint-Louis (fleuve Saint-Laurent)", *Can. J. Water Pollut. Res.*, 20 : 75-99.
- Karin, M. (1985). "Metallothioneins: proteins in search of function", *Cell*, 41 : 9-10.
- Khan, D.H., J.G. Duckett, B. Frankland et J.B. Kirkham (1984). "An X-ray microanalytical study of the distribution of Cd in roots of *Zea mays* L", *J. Plant Physiol.*, 115 : 19-28.
- Kishinami, I. et J. Widholm (1986). "Selection of copper and zinc resistant *Nicotiana plumbaginifolia* cell suspension cultures", *Plant Cell Physiol.*, 27 : 1263-1268.
- Kishinami, I. et J. Widholm (1987). "Characterization of Cu and Zn resistant *Nicotiana plumbaginifolia* suspension cultures", *Plant Cell Physiol.*, 28 : 203-210.
- Kovacs, M., I. Nyary et L. Toth (1984). "The microelement content of some submerged and floating aquatic plants", *Acta Bot. Hung.*, 30 : 173-185.
- Krotz, R.M., B.P. Evangelou et G.J. Wagner (1989). "Relationships between cadmium, zinc, Cd-peptide, and organic acid in tobacco suspension cells", *Plant Physiol.*, 91 : 780-787.
- Lavoie, A., F. Boivin, B.G. Bénié et J.M.M. Dubois (1991). "Cartographie quantitative des macrophytes du lac Saint-Pierre avec le capteur MEIS-II", Centre d'application et de recherches en télédétection (CARTEL), Université de Sherbrooke, rapport 91-R-19. Rapport présenté au Centre Saint-Laurent, Conservation et Protection, Environnement Canada, 41 p.
- Margoshes, M et B. L. Vallee (1957). "A cadmium protein from equine kidney cortex", *J. Am. Chem. Soc.*, 79 : 4813-4814.
- Marie-Victorin, F. (1964). "Flore Laurentienne", Ernest Rouleau (éditeur), Presses de l'Université de Montréal, Montréal, 925 p.
- Mathys, W. (1977). "The role of malate, oxalate and mustard oil glucosides in the evolution of zinc resistance in herbage plants", *Physiol. Plant*, 40 : 130-136.

- Meister, A. et M.E. Anderson (1983). "Glutathione", *Ann. Rev. Biochem.*, 52 : 711-760.
- Micallef, S., Y. Couillard, P.G.C. Campbell et A. Tessier (1992). "An evaluation of the HPLC-gel chromatographic method for analysing metallothioneins in aquatic organisms", *Talanta*, 39 : 1073-1079.
- Miller, G.E., I. Wile et G.G. Hitchin (1983). "Patterns of accumulation of selected metals in members of soft-water macrophyte flora of central Ontario lakes", *Aquat. Bot.*, 15 : 53-64.
- Morel, F.M.M. (1983). "Trace metals and microorganisms", pp. 300-309. Dans: *Principles of Aquatic Chemistry*, John Wiley & Sons (éditeurs), New York, NY.
- Mortimer, D.C. (1985). "Freshwater macrophytes as heavy metal monitors - the Ottawa River experience", *Environ. Monitor. Assess.*, 5 : 311-323.
- Nriagu, J.O. et J.M. Pacyma (1988). "Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals", *Nature*, 333 : 134-139.
- Newton, G.L., R. Dorian et R.C. Fahey (1981). "Analysis of biological thiols: derivatization with monobromomine and separation by reverse-phase high performance liquid chromatography", *Anal. Biochem.*, 114 : 383-387.
- Outridge, P.M., W.E. Rauser et T.C. Hutchinson (1991). "Changes in metal-binding peptides due to acclimation to cadmium transferred between ramets of *Salvinia minima*", *Oecologia*, 88 : 109-115.
- Perrin, D.D., et A.E. Watt (1971). "Complex formation of zinc and cadmium with glutathione", *Biochim. Biophys. Acta*, 230 : 96-104.
- Pip, E. (1990). "Cadmium, copper and lead in aquatic macrophytes in Shoal Lake (Manitoba-Ontario)", *Hydrobiologia*, 208 : 253-260.
- Procéan Inc. (1991). "Révision des critères pour l'évaluation de la qualité des sédiments du Saint-Laurent", Préparé pour le Centre Saint-Laurent, Environnement Canada.
- Qureshi, J.A., K. Hardwick et H.A. Collin (1986). "Malic acid production in callus cultures of zinc and lead tolerant and non-tolerant *Anthoxanthum odoratum*", *J. Plant Physiol.*, 122 : 477-479.

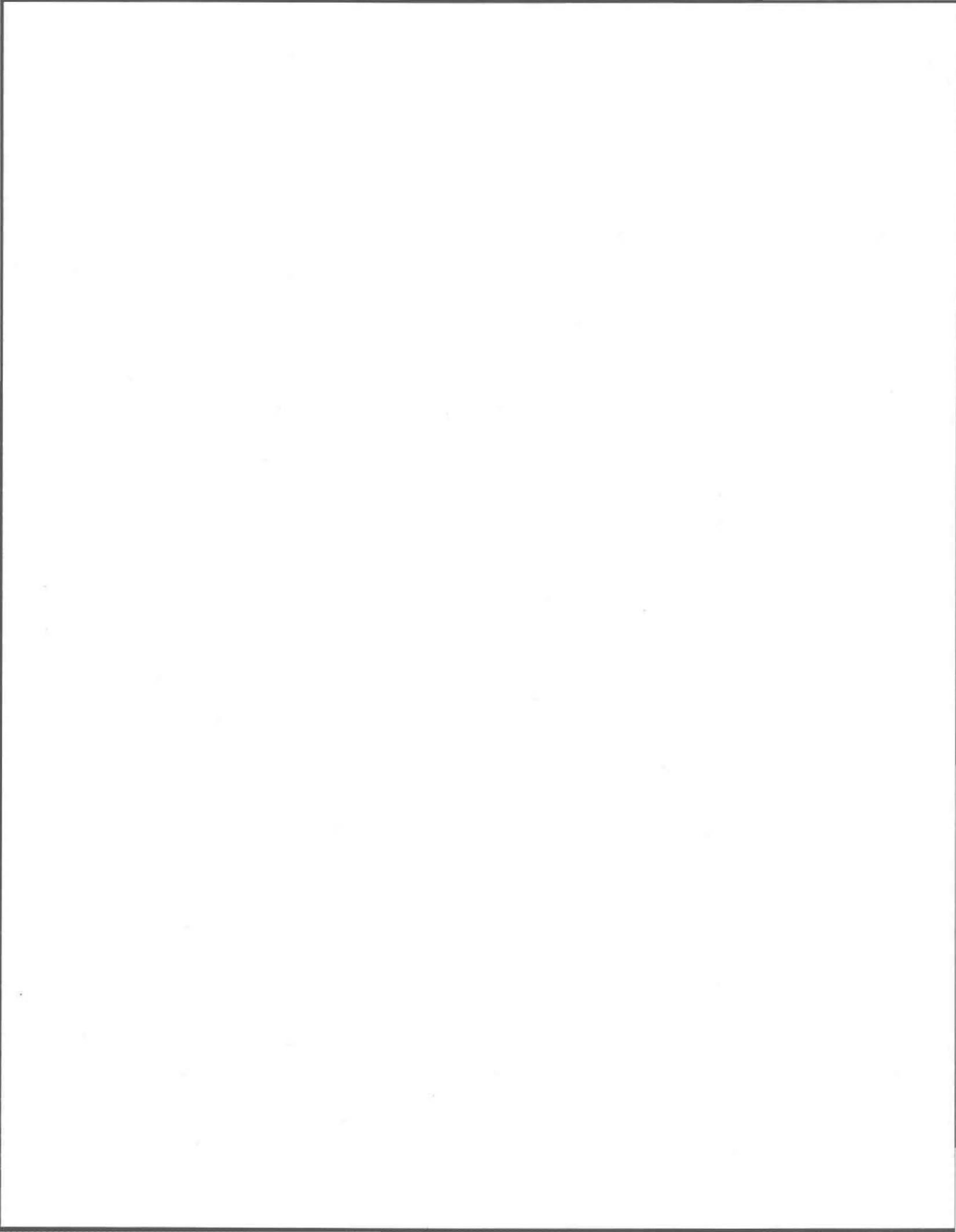
- Rausser, W.E. (1984). "Isolation and partial purification of cadmium-binding protein from roots of the grass *Agrostis gigantea*", *Plant Physiol.*, 74 : 1025-1029.
- Rausser, W.E. (1986). "The amount of cadmium associated with Cd-binding protein in roots of *Agrostis gigantea*, maize and tomato", *Plant Sci.*, 43 : 85-91.
- Rausser, W.E. (1987). "Changes in glutathione content of maize seedlings exposed to cadmium", *Plant Sci.*, 51 : 171-175.
- Rausser, W.E. (1990). "Phytochelatins", *Ann. Rev. Biochem.*, 59 : 61-84.
- Rausser, W.E. (1991). "Cadmium-binding peptides from plants", *Methods in Enzymology*, 205 : 319-333.
- Rausser, W.E. et C.A. Ackerley (1987). "Localization of cadmium in granules within differentiating and mature root cells", *Can. J. Bot.*, 65 : 643-646.
- Ray, S. et W. White (1976). "Selected aquatic plants as indicator species for heavy metal pollution", *J. Environ. Sci. Health*, A11 : 717-725.
- Reddy, G.N. et M.N.V. Prasad (1990). "Heavy metal-binding proteins/peptides: occurrence, structure, synthesis and functions. A review", *Environ. Exp. Bot.*, 30 : 251-264.
- Reese, R.N., R.K. Mehra, E.B. Tarbet et D.R. Winge (1988). "Studies on the  $\gamma$ -glutamyl Cu-binding peptide from *Schizosaccharomyces pompe*", *Biochem.*, 263 : 4186-4192.
- Reese, R.N. et G.J. Wagner (1987). "Effects of buthionine sulfoximine on Cd-binding peptide levels in suspension-cultured tobacco cells treated with Cd, Zn, or Cu", *Plant Physiol.*, 84 : 574-577.
- Reese, R.N. et D.R. Winge (1988). "Sulfide stabilization of the cadmium- $\gamma$ -glutamyl peptide complex of *Schizosaccharomyces pompe*", *J. Biol. Chem.*, 263 : 12832-12835.
- Rennenberg, H. (1987). "Aspects of glutathione function and metabolism in plants", pp. 279-292. Dans: *Plant Molecular Biology*, D. Von Wettstein et N. H. Chua (éditeurs), Plenum, New York, NY.

- Robinson, N.J. (1990). "Metal-binding polypeptides in plants", pp. 195-214. Dans: *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, A.J. Shaw (éditeur), CRC Press, Inc, Boca Raton, FL.
- Salomons, W. et U. Forstner (1984). "Interaction with particulate matter, solid speciation", pp. 24-50. Dans: *Metal in the Hydrocycle*, Springer-Verlag, Berlin, FRG.
- Satake, K. et K. Miyasaka (1984). "Evidence of high mercury accumulation in the cell wall of the liverwort *Jungermannia vulcanicola* Steph. to form particles of mercury-sulphur compound", *J. Bryol.*, 13 : 101-105.
- Satake, K., M. Soma, H. Seyama et T. Uehiro (1983). "Accumulation of mercury in the liverwort *Jungermannia vulcanicola* Steph. in an acid stream Kashiranashigawa in Japan", *Arch Hydrobiol.*, 99 : 80-92.
- Scheller, H.V., B. Huang, E. Hatch et P.B. Goldsbrough (1987). "Phytochelatin synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells", *Plant Physiol.*, 85 : 1031-1035.
- Sela, M., E. Tel-Or, E. Fritz et A. Hutterman (1988). "Localization and toxic effects of cadmium, copper, and uranium in *Azolla*", *Plant Physiol.*, 88 : 30-36.
- Serodes, J.-B. (1978). "Qualité des sédiments de fond du fleuve Saint-Laurent entre Cornwall et Montmagny", Comité d'étude sur le fleuve Saint-Laurent, Rapport technique no 15, Direction Générale des Eaux Intérieures, Environnement Canada, 467 p.
- Sérodes, J.-B., et L. Talbot (1978). "Projet de restauration du sud du lac Saint-Louis contaminé par le mercure", Bureau d'étude sur les substances toxiques, Gouvernement du Québec, PQ, 103 p.
- Shaw, J., J. Antonovics et L.E. Anderson (1987). "Inter- and intraspecific variation of mosses in tolerance to copper and zinc", *Evolution*, 41 : 1312-1325.
- Singhai R.K., M.E. Anderson et A. Meister (1987). "Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity", *FASEB J.*, 1 : 220-223.
- St-Cyr, L., et P.G.C. Campbell (1994). "Trace metals in submerged plants of the St. Lawrence River", *Can. J. Bot.*, 72 : 429-439.

- Stefan, C.E., D.I. Mount, D.J. Hansen, J.H. Gentile, G.A. Chapman et W.A. Brings (1985). "Guidelines for deriving numerical national water quality criteria for the protection of aquatic organisms and their uses". PB85-227049, NTIS, Springfield, VA, 98 p.
- Steffens, J.C., D.F. Hunt et B.G. Williams (1986). "Accumulation of non-protein metal-binding polypeptides ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl)<sub>n</sub>-glycine in selected cadmium-resistant tomato cells", *J. Biol. Chem.*, 261 : 13879-13882.
- Steffens, J.C. (1990). "The heavy metal-binding peptides of plants", *Ann. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41 : 553-575.
- Svardal, A.M., M.A. Mansoor et P.M. Ueland (1990). "Determination of reduced, oxidized, and protein-bound glutathione in human plasma with precolumn derivatization with monobromobimane and liquid chromatography", *Anal. Biochem.*, 184 : 338-346.
- Tessier, A. (1992). "Sorption of trace elements on natural particules in oxic environments", pp. 425-453. Dans: *Environmental Particles: Volume 1*, J. Buffle et H.P. van Leeuwen (éditeurs), Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Tessier, A., P.G.C. Campbell et M. Bisson (1979). "Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals", *Anal. Chem.*, 51 : 844-851.
- Tessier, A. et P.G.C. Campbell (1990). "Partitioning of trace metals in sediments and its relationship to their accumulation in benthic organisms", pp. 545-569. Dans: *Metal Speciation in the Environment*, S. Guçer, F.F. Adams, E. Izdar et D. Klockow (éditeurs), Springer-Verlag, Berlin, FRG.
- Tessier, A., Y Couillard, P.G.C. Campbell et J.-C. Auclair (1993). "Modeling Cd partitioning in oxic lake sediment and Cd concentration in the freshwater bivalve *Anodonta grandis*", *Limnol. Oceanogr.*, 38 : 1-17.
- Thurman, D.A. et J.L. Rankin (1982). "The role of organic acids in zinc tolerance in *Deschampsia caespitosa*", *New Phytol.*, 91 : 629-635.
- Tukendorf, A. et W.E. Rauser (1990). "Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium", *Plant Sci.*, 70 : 155-166.

- Vairavamurthy A. et K. Mopper (1990). "Field method for determination of traces of thiols in natural waters", *Anal. Chim. Acta*, 236 : 363-370.
- Van Steveninck, R.F.M., M.E. Van Steveninck, D.R. Fernando, W.J. Horst et H. Marschner (1987). "Deposition of zinc phytate in globular bodies in roots of *Deschampsia caespitosa* ecotypes: A detoxification mechanism?", *J. Plant Physiol.*, 131 : 247-257.
- Verkleij, J.A.C., P. Koevoets, J. van't Riet, M.C. van Rossenberg, R. Bank et W.H.O. Ernst (1989). "The role of metal-binding compounds in the copper tolerance mechanism of *Silene cucubalus*", pp. 347-357. Dans: Metal Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry, D. H. Hamer et D. R. Winge (éditeurs), Alan R. Liss, Inc, New York, NY.
- Verkleij, J.A.C., P. Koevoets, J. van't Riet, R. Bank, Y. Nijdam et W.H.O. Ernst (1990). "Poly( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl) glycines or phytochelatins and their role in cadmium tolerance of *Silene vulgaris*", *Plant Cell Environ.*, 13 : 913-921.
- Verkleij, J.A. C. et H. Schat (1990). "Mechanisms of metal tolerance in higher plants", pp. 179-193. Dans: Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects, A.J. Shaw (éditeur), CRC Press, Inc, Boca Raton, FL.
- Vögeli-Lange, R. et G.J. Wagner (1990). "Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves", *Plant Physiol.*, 92 : 1086-1093.
- Wang, J., B.P. Evangelou, M.T. Nielsen et G.J. Wagner (1991). "Computer-simulated evaluation of possible mechanisms for quenching heavy metal ion activity in plant vacuoles", *Plant Physiol.*, 97 : 1154-1160.
- Wagner, G.J., E. Nulty et M. LeFevre (1984). "Cadmium in wheat grain: Its nature and fate after ingestion", *J. Tox. Environ. Health*, 13 : 979-989.
- Wagner, G.J. et R.M. Krotz (1989). "Perspective on Cd and Zn accumulation, accommodation and tolerance in plant cells: the role of Cd-binding peptides versus other mechanisms", pp. 325-336. Dans: Metal Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry, D.H. Hamer et D.R. Winge (éditeurs), Alan R. Liss Inc, New York, NY.
- Wagner, G.J. et R.Y. Yeagan (1986). "Variation in Cd accumulation potential and tissue distribution of Cd in tobacco", *Plant Physiol.*, 82 : 274-279.

- Weigel, H.J. et H.J. Jager (1980). "Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean plants", *Plant Physiol.*, 65 : 480-482.
- Welsh, R.P.H. et P. Denny (1980). "The uptake of lead and copper by submerged aquatic macrophytes in two English lakes (U.K.)", *J. Ecol.*, 68 : 443-455.
- 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", Tech. Report No. 18, Massachusetts Institute of Technology, Dept. Civil Eng., 91 p.
- Woolhouse H.W. (1983). "Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals", pp. 245-300. Dans: *Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)*, O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond et H. Ziegler (éditeurs), Springer-Verlag, Berlin, FRG.



## A. ANNEXES

### A.1 HPLC d'exclusion

#### A.1.1 Introduction

Tout comme pour la section 3.2.3, où les essais étaient effectués en colonne à basse pression, ce type de chromatographie a été tenté sur HPLC. Un mélange de macromolécules peut alors être séparé selon le poids moléculaire des différentes protéines tout en leur permettant de conserver leur intégrité. Ce protocole est basé sur les expériences faites par Micallef et al. (1992), qui tentaient d'isoler des métallothionéines.

#### A.1.2 Protocole expérimentale

##### A.1.2.1 Extraction

Les extractions ont été faites sur *Vallisneria americana* et *Myriophyllum spicatum*, pour des plantes témoins ou exposées à 1 ppm de Cu dans des conditions telles que mentionnées à la section 2.1.4. Par la suite, les tissus à analyser ont été congelés rapidement dans l'azote liquide, lyophilisés et conservés à -40 °C en attente des analyses subséquentes. A ce moment, les plantes ont été broyées dans l'azote liquide avec un pilon et un mortier. L'homogénéisation a été faite en ajoutant environ 1 mL de tampon Tris-HCl 20 mM à pH 8,0 par gramme de matériel lyophilisé. Comme les phytochélatines sont thermorésistantes (Rauser 1984), les fractions ont été chauffées à 60 °C pendant 3 minutes. Un contrôle a également été fait pour vérifier s'il y avait une différence entre des extraits chauffés ou non. Après une sonification de 10 minutes, une centrifugation à 10 000 x g d'une durée d'une heure a été effectuée. Ces opérations ont été faites avec de la verrerie lavée à l'acide. Le surnageant ainsi récolté pouvait par la suite être analysé par HPLC d'exclusion.

### A.1.2.2 HPLC d'exclusion

Pour la séparation des protéines cytosoliques, un HPLC (Waters 600) équipé d'une colonne à gel d'exclusion (TSK G2000-SW, 30 x 0,75 cm), d'une pré-colonne (TSK 7,5 x 0,75 cm) et d'un détecteur ultraviolet (lectures faites à 254 et 280 nm) a été utilisé. Le débit a été fixé à 0,5 mL/min et l'éluant utilisé, en mode isocratique, était le Tris-HCl 10 mM à pH 7,0 contenant du NaCl 100 mM et du NaN<sub>3</sub> 0,03%.

Le système a été calibré avec les standards moléculaires suivants: albumine bovine (66 kD), albumine d'oeuf (45 kD), anhydrase carbonique (29 kD), métallothionéine de lapin (13,7 kD), ribonucléase A (13,7 kD), cytochrome C (12,4 kD), aprotinine (6,5 kD), vitamine B-12 (1,35 kD) et tryptophane (0,2 kD). Pour les analyses des standards, comme pour les extraits de plante, 100 µL d'échantillon étaient passés sur HPLC.

### A.1.3 Résultats et discussion

Par l'utilisation des standards de poids moléculaire connu, il est possible d'obtenir une relation linéaire du volume d'élution ( $V_e$ )/volume mort de la colonne ( $V_o$ ) en fonction du logarithme du poids moléculaire (PM) (figure A.1).

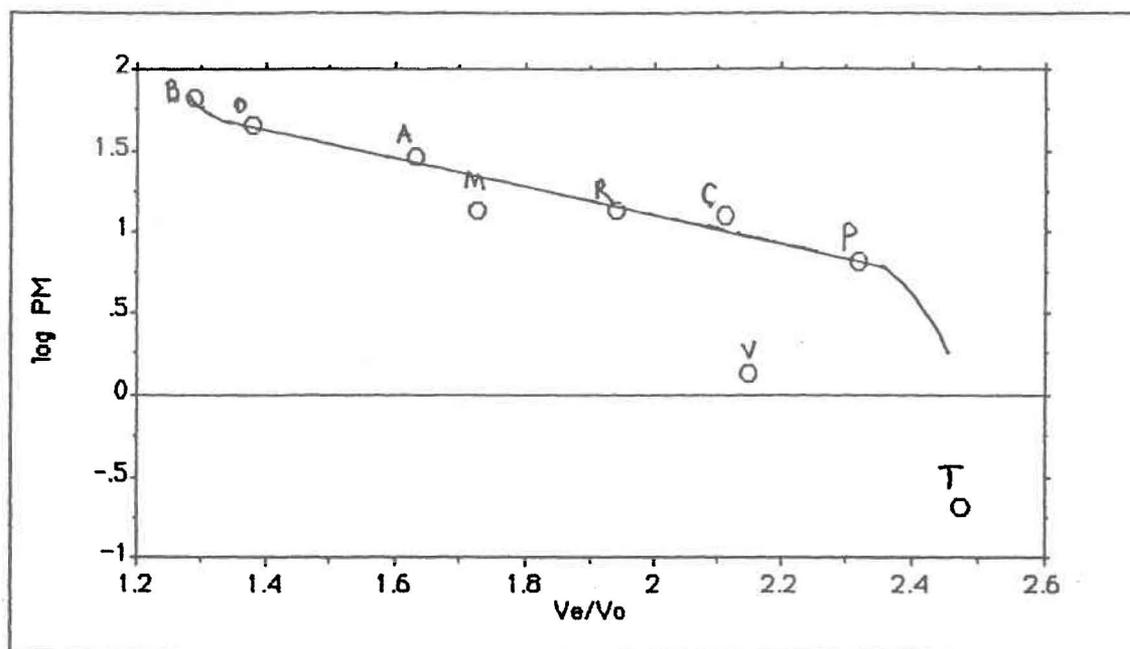


Figure A.1: Log du poids moléculaire (PM) en fonction du  $V_e/V_o$  pour les standards moléculaires: albumine bovine (B), albumine d'oeuf (O), anhydrase carbonique (A), MT de lapin (M), ribonucléase A (R), cytochrome C (C), aprotinine (P), vitamine B-12 (V) et le tryptophane (T) obtenus par HPLC d'exclusion sur colonne TSK G2000-SW; éluant: Tris-HCl 10 mM pH 7,0 contenant NaCl 100 mM et  $\text{NaN}_3$  0,03%; Débit: 0,5 mL/min.

Outre le cas de la vitamine B-12, les molécules ayant des poids moléculaires en-dessous de 5 kD sortent du domaine de linéarité. Comme les PC ont un PM d'environ 3,6 kD à des forces ioniques élevées ( $> 0,3$  M) (Steffens 1990), pour être en mesure d'évaluer efficacement leur PM, il serait préférable d'utiliser un gel où l'exclusion des molécules serait plus basse (comme pour le Sephadex G-50; section 2.2.2). De même, des standards ayant des PM davantage rapprochés de ceux des PC devraient être utilisés.

La figure A.2 donne les profils sur HPLC d'exclusion pour des macrophytes exposés à 1 ppm de Cu. L'absorbance à 254 nm est indicatrice du lien métal-thiol alors que celle à 280 nm est indicatrice de la présence d'acides aminés aromatiques (inexistant chez les PC). Aucune différence n'a été constatée entre les plantes aquatiques exposées ou non au Cu et entre les fractions chauffées à 60 °C ou non. Les valeurs entre parenthèses pour chaque chromatogramme sont données en mg de tissu lyophilisé (poids sec) par mL de tampon utilisé lors de l'extraction.

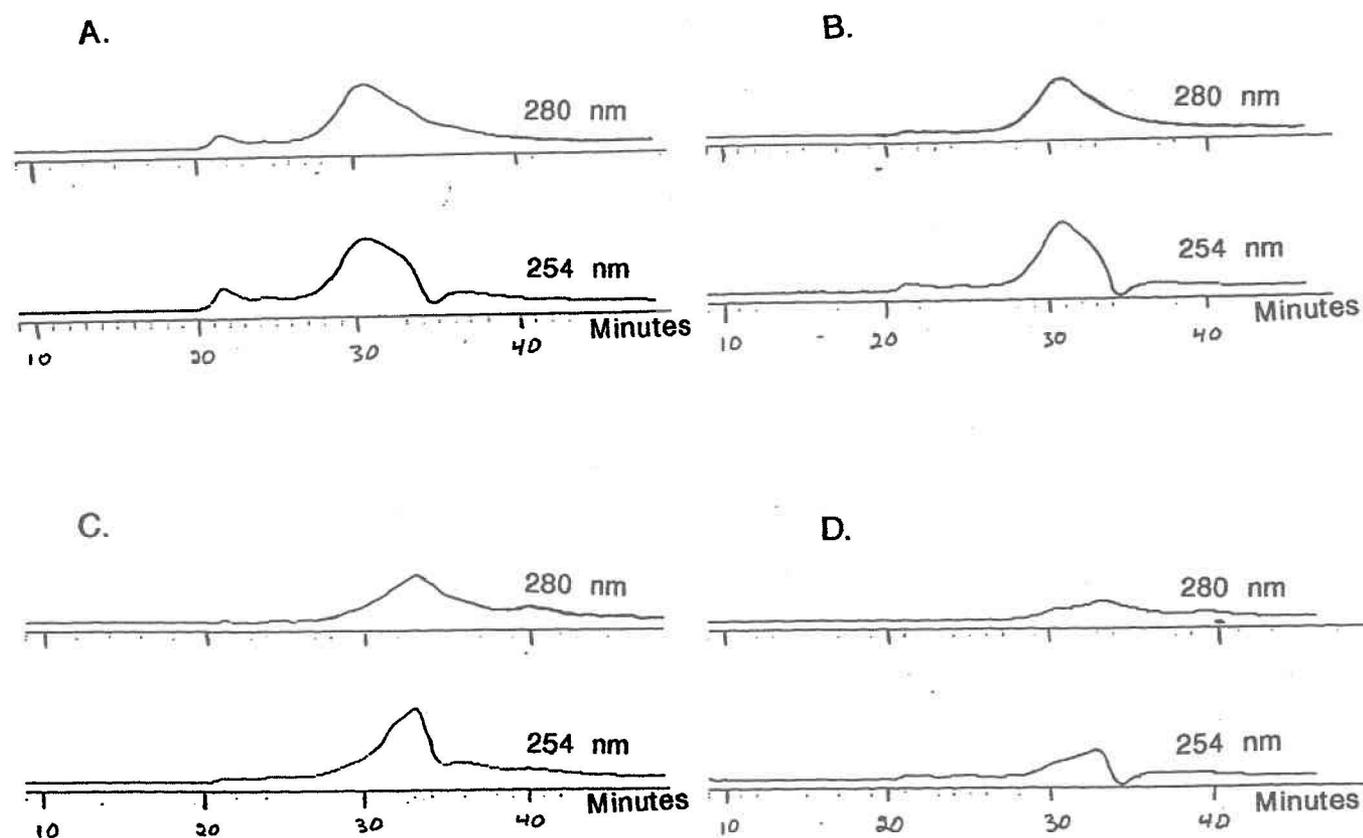


Figure A.2: Profil d'éluion par HPLC d'exclusion sur colonne TSK G2000-SW; éluant: Tris-HCl 10 mM pH 7,0, NaCl 100 mM et NaN<sub>3</sub> 0,03% à un débit de 0,5 mL/min pour des macrophytes exposés à 1 ppm Cu. Détection à 254 et 280 nm. (A) feuilles de *Vallisneria americana* (24 mg/mL); (B) racines de *Vallisneria americana* (14 mg/mL); (C) feuilles de *Myriophyllum spicatum* (9 mg/mL); (D) racines de *Myriophyllum spicatum* (3 mg/mL).

La présence de larges pics donne peu de discrimination, probablement due au domaine d'exclusion trop élevé de la colonne employée. Toutefois, comme le HPLC en phase inverse (section 2.2.4) semblait offrir beaucoup plus de discrimination, nos efforts ont davantage été orientés vers cette option.

## A.2 Utilisation du $\text{NaBH}_4$

### A.2.1 Introduction

Cet agent réducteur utilisé pour l'extraction de Grill (section 2.2.4.2) empêcherait l'oxydation du GSH. Cette petite expérience consistait à vérifier si le  $\text{NaBH}_4$  pouvait également réduire du GSH oxydé (GSSR).

### A.2.2 Expériences effectuées

Ces expériences ont été faites avec des standards et pour les mêmes conditions de HPLC en phase inverse que celles mentionnées à la section 2.2.4.3. Si une solution aqueuse de GSSR de  $1,8 \times 10^{-4}$  M est analysée de cette façon, aucun pic n'apparaît, dû à l'impossibilité des groupements thiol, qui forment des ponts disulfures, de réagir avec le réactif d'Ellman. Cependant si l'on ajoute les solutions utilisées pour l'extraction de Grill, dont le NaOH 1N contenant 1mg/mL de  $\text{NaBH}_4$  (section 2.2.4.2), dans les mêmes proportions, du GSH est alors retrouvé pour un temps de rétention de 10,5 minutes (figure A.3 A.). Ce pic est semblable à celui de GSH retrouvé lorsque des standards (Cys et GSH) sont analysés dans les mêmes conditions (figure A.3 B.). Toutefois on constate que l'aire sous la courbe ne correspond pas à la concentration qui serait obtenue sous tous le GSSR avait effectivement été réduit en GSH. Le GSSR étant présent en concentration 20 fois plus importante que le GSH, il pourrait être possible que la quantité de  $\text{NaBH}_4$  n'ait été suffisante pour tout le réduire. De plus le temps de réaction n'a été que de 5 minutes alors que Svardal et al. (1990), qui avaient trouvé en étudiant le plasma humain que le glutathione oxydé

(GSSR) était réduit en présence du  $\text{NaBH}_4$  avaient utilisé un temps de réaction de 20 minutes. Ils avaient également déterminé que la formation de GSH, à partir de sa forme oxydée, était dépendante de la concentration de  $\text{NaBH}_4$  employée, la concentration optimum qu'ils ont trouvé étant de 0,2 M comparée à la notre qui est de 2 mM. Toutefois, les extractions faites sur les plantes avaient des temps de réaction plus longs (plus d'une heure); on peut donc supposer que par l'extraction de Grill qu'une certaine partie du GSH oxydé pouvait être réduit.

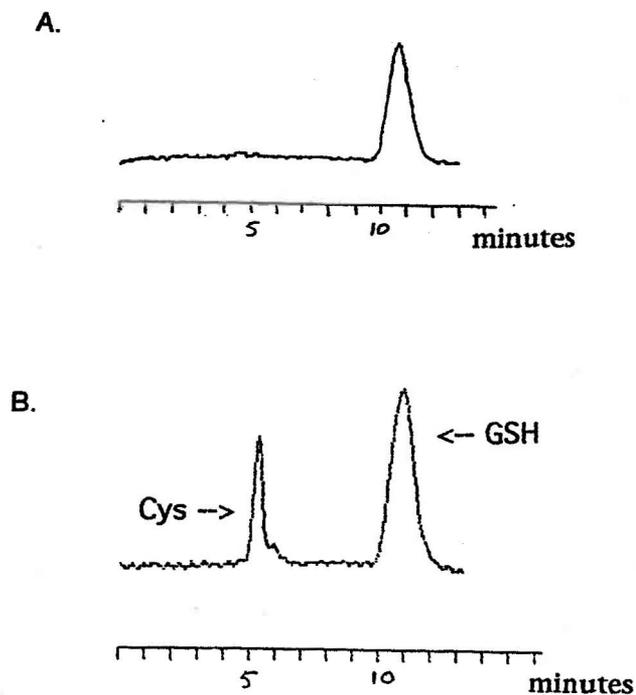


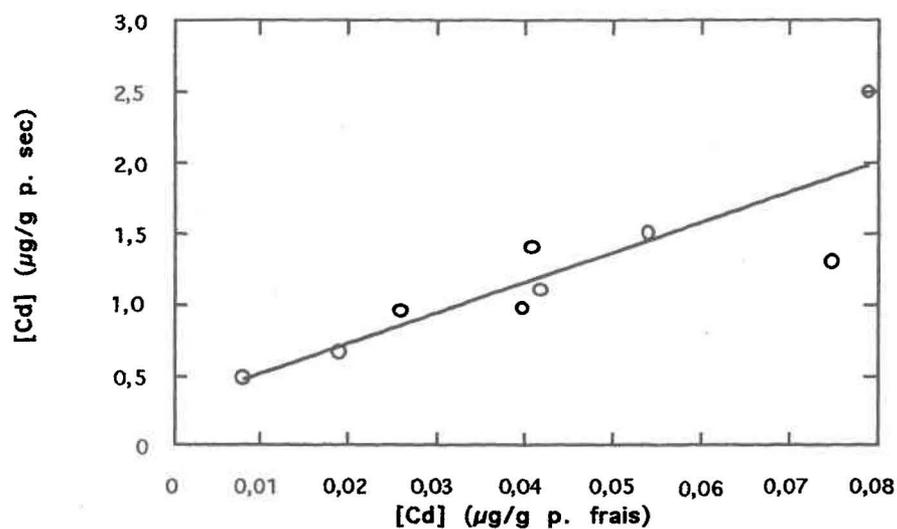
Figure A.3: Profil d'éluion sur HPLC en phase inverse avec dérivatisation post-colonne (réactif d'Ellman) et gradient 0 à 20% acétonitrile-TFA, 0,1% pour: (A) GSSR ( $1,8 \times 10^{-4}$  M) en présence de  $\text{NaBH}_4$ ; (B) standards de Cys et GSH ( $9,8 \times 10^{-6}$  M).

### A.3 Comparaison entre les concentrations de métal pour les poids frais et les poids secs

Des différences ont été notées en comparant les rapports de poids humide sur poids sec pour les deux macrophytes étudiés. Les figures suivantes mettent en graphique ces relations pour les parties vertes et souterraines de *Vallisneria americana* et de *Myriophyllum spicatum* pour le Cd et le Cu.

Des relations linéaires entre les deux variables peuvent être constatées pour les vallisnéries; les différences, plus marquantes, entre les poids humides et secs chez les myriophylles pourraient être attribuables aux contenus en eaux différents entre les tiges et les feuilles.

A.



B.

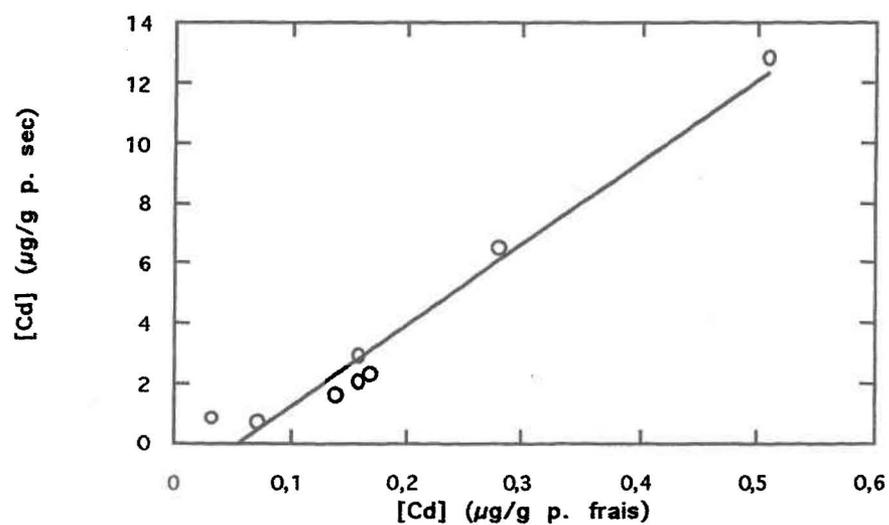
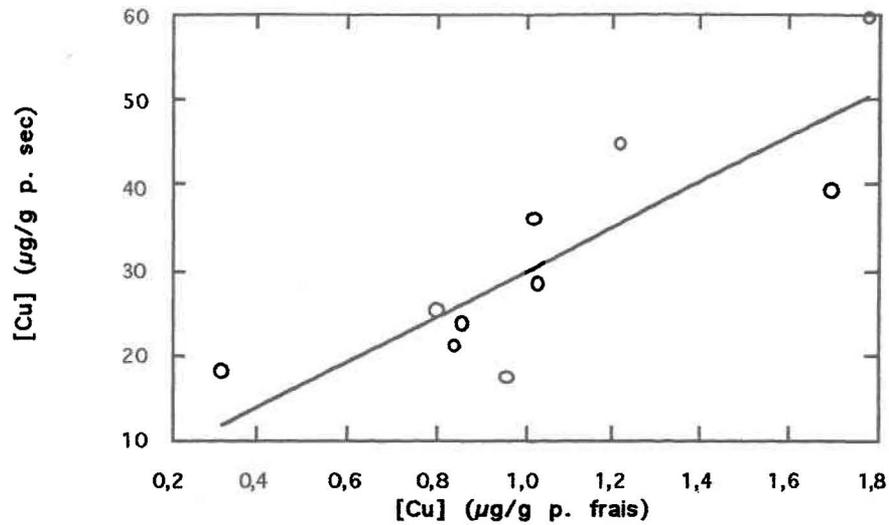


Figure A.4: Concentrations totales de Cd par g p. frais versus les concentrations totales de Cd par g p. sec pour *Vallisneria americana* récolté sur le terrain. (A) Feuilles; (B) Racines.

A.



B.

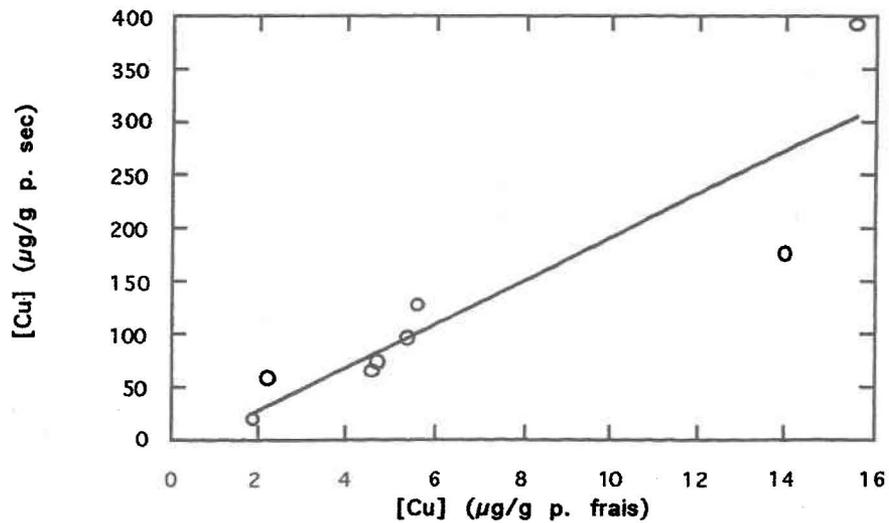
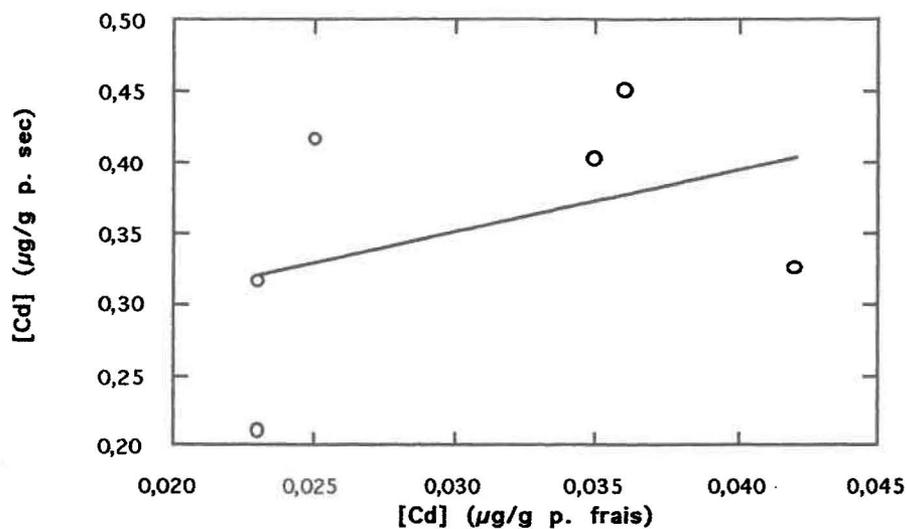


Figure A.5: Concentrations totales de Cu par g p. frais versus les concentrations totales de Cu par g p. sec pour *Vallisneria americana* récolté sur le terrain. (A) Feuilles; (B) Racines.

A.



B.

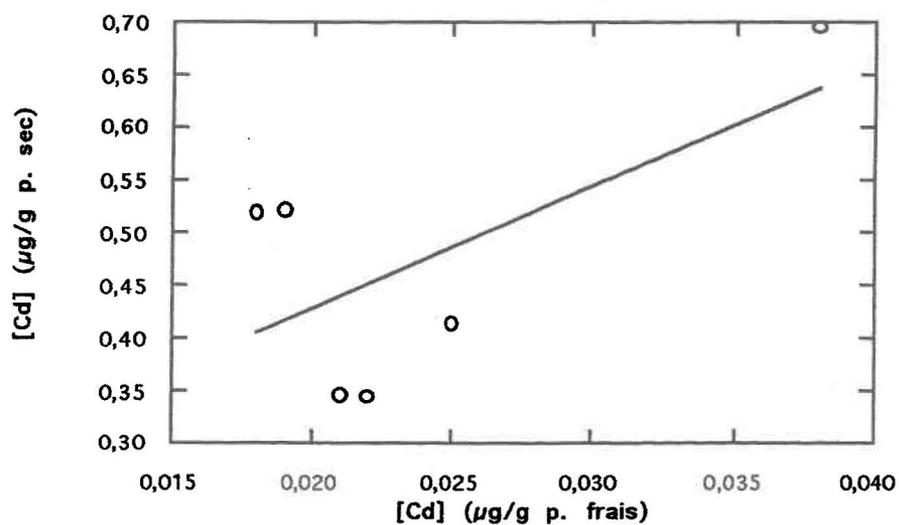
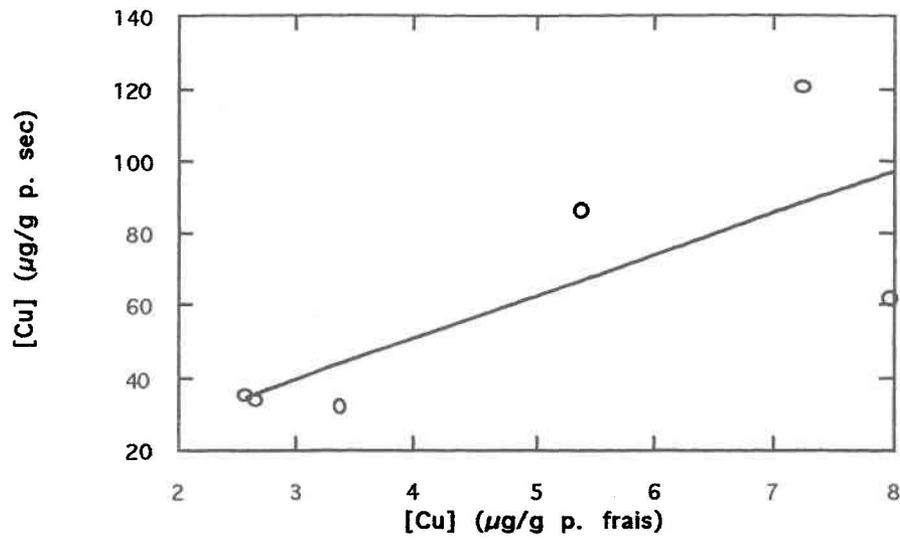


Figure A.6: Concentrations totales de Cd par g p. frais versus les concentrations totales de Cd par g p. sec pour *Myriophyllum spicatum* récolté sur le terrain. (A) Feuilles; (B) Racines.

A.



B.

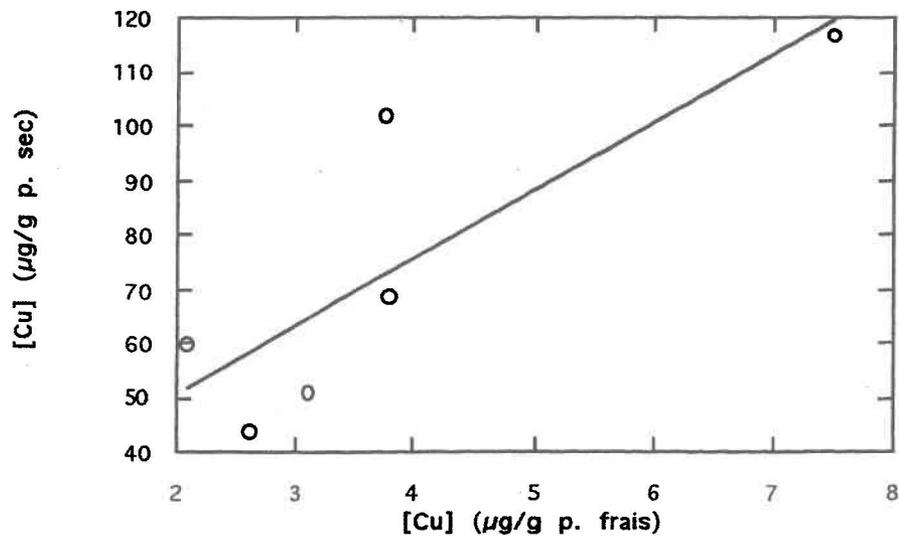


Figure A.7: Concentrations totales de Cu par g p. frais versus les concentrations totales de Cu par g p. sec pour *Myriophyllum spicatum* récolté sur le terrain. (A) Feuilles; (B) Racines.

