

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAITRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR  
ÉDITH SAINT-PIERRE  
B.Sc. en Biologie

MISE EN ÉVIDENCE D'UN MÉCANISME DE TOLÉRANCE  
CHEZ *SCENEDESMUS QUADRICAUDA*  
SUITE À UNE INTOXICATION À LONG TERME AU CUIVRE

DÉCEMBRE 1992



### **Mise en garde/Advice**

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

*À Joseph, mon père...*

## RÉSUMÉ

Lors d'une expérience à long terme, nous avons utilisé une technique de culture continue, pour mettre en évidence la présence de protéines complexantes chez l'algue unicellulaire *Scenedesmus quadricauda*, suite à une intoxication continuelle avec  $250 \mu\text{g}$  de cuivre  $\cdot \text{L}^{-1}$ .

Six (6) échantillonnages ont été réalisés. L'ouverture des cellules a été faite en utilisant un traitement aux ultrasons. Par la suite, les homogénats obtenus ont été ultracentrifugés, puis les surnageants, contenant les protéines solubles, ont été récoltés et lyophilisés.

Après la remise en solution des protéines lyophilisées, celles-ci ont été appliquées sur une colonne chromatographique de perméation sur gel. La séparation des composantes peptidiques s'est effectuée selon la masse moléculaire. Le contenu en cuivre des différentes fractions chromatographiques a été mesuré par absorption atomique.

Les résultats obtenus démontrent que les cellules du ballon expérimental possèdent un peptide de faible masse moléculaire, comprise entre 2 100 et 800 daltons, à laquelle la majorité du cuivre retrouvée est associé, ce qui n'est pas le cas des cellules du ballon témoin. Les valeurs de masses moléculaires inférieures à 1,5 kDa ont été extrapolées à partir des courbes d'étalonnage, la valeur de 1,5 kDa étant la limite inférieure du domaine d'exclusion du gel utilisé.

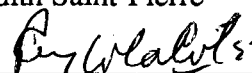
Ce phénomène de complexation est observé après seulement 12 heures d'intoxication chez les cellules du ballon expérimental.

La complexation semble diminuer en fonction du temps suite à la contamination des cellules du ballon expérimental. Les quantités de cuivre associées à des peptides de faible masse moléculaire diminuent, ce qui laisse supposer que la présence de protéines complexantes diminue elle aussi.

La morphologie des cellules de *Scenedesmus quadricauda* est affectée par la présence de cuivre en concentration supraoptimale. Après une quinzaine de jours de culture, les cellules du ballon expérimental présentaient des dimensions réduites, un aspect recroquevillé et un nombre plus élevé de cœnobiums contenant deux (2) ou une seule cellule comparativement à ce qui a été observé dans le ballon témoin.



Edith Saint-Pierre



Raynald Côté

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement toute l'équipe qui a supervisé ce travail et permis sa réalisation.

Tout d'abord, je remercie Monsieur Raynald Côté, directeur de recherche, pour son support intellectuel et moral et ses précieux conseils. Je remercie également Monsieur Clément Richard, co-directeur, qui a su apporter ses précieuses connaissances afin d'enrichir le déroulement et la réalisation de cette recherche. Je remercie du fond du coeur Monsieur Denis Bussières, co-directeur, pour le support qu'il m'a fourni lors de la réalisation des analyses chromatographiques. Ses conseils judicieux et sa très grande disponibilité ont été des plus appréciés. Merci à ces trois personnes de m'avoir fait confiance.

Je remercie également Monsieur Pierre Marsot de l'INRS-Océanologie qui a accepté de juger ce travail.

Je ne voudrais pas passer sous silence l'aide et l'assistance précieuses qui m'ont été fournies par Monsieur François Richard lors du déroulement de l'expérience. Il a de plus permis d'optimiser l'ouverture de cellules de *Scenedesmus quadricauda* en perfectionnant la technique du traitement aux ultrasons.

Je remercie aussi Monsieur Stéphan Simard qui m'a facilité la tâche lors des analyses par absorption atomique. Son aide a été des plus appréciées.

Je ne voudrais pas oublier non plus l'aide, les conseils et les encouragements prodigués par l'ensemble des gens du département des sciences fondamentales de l'Université du Québec   Chicoutimi, particulièrement Madame Myriam Sol  et Messieurs Rémy Larouche, Jean-Marc Gauthier, Denis Walsh et André Barrette. Je vous remercie tous de votre précieuse collaboration.

En terminant, je remercie le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) qui m'a octroyé une bourse d'études supérieures de deuxième cycle me permettant de réaliser cette recherche.

## TABLE DES MATIÈRES

	Page
RÉSUMÉ.....	iv
REMERCIEMENTS.....	v
TABLE DES MATIÈRES .....	vi
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX .....	x
CHAPITRE I. INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	5
2.1 Culture des algues .....	6
2.2 Conditions expérimentales .....	10
2.3 Traitement des échantillons .....	11
2.3.1 Préparation des échantillons .....	11
2.3.2 Traitement aux ultrasons (homogénéisation) .....	11
2.3.3 Vérification microscopique de l'ouverture des cellules .....	12
2.3.4 Ultracentrifugation des homogénats cellulaires .....	12
2.4 Chromatographie des échantillons .....	15
2.4.1 Montage de la colonne chromatographique .....	15
2.4.2 Étalonnage des colonnes chromatographiques .....	17
2.4.3 Application des échantillons sur les colonnes chromatographiques .....	20
2.5 Spectroscopie d'absorption atomique .....	21
2.5.1 Appareil utilisé .....	21
2.5.2 Courbes d'étalonnage du spectrophotomètre d'absorption atomique .....	21
CHAPITRE III. RÉSULTATS .....	23
3.1 Variations temporelles de la densité cellulaire .....	24
3.2 Variations temporelles du pH .....	26
3.3 Microphotographies des cellules du ballon témoin et du ballon expérimental après 732 heures .....	26
3.4 Chromatogrammes des protéines extraites .....	30
3.4.1 Après 12 heures .....	30
3.4.2 Après 84 heures .....	32
3.4.3 Après 156 heures .....	34
3.4.4 Après 324 heures .....	34
3.4.5 Après 516 heures .....	37
3.4.6 Après 732 heures .....	39

	Page
3.5 Corrélation entre la quantité de cuivre retrouvée dans les fraction chromatographiques et le temps d'échantillonnage .....	39
CHAPITRE IV. DISCUSSION .....	44
4.1 Variations temporelles de la densité cellulaire .....	45
4.2 Variations temporelles du pH .....	46
4.3 Microphotographies des cellules du ballon témoin et du ballon expérimental après 732 heures .....	48
4.4 Chromatogrammes des protéines extraites .....	49
4.4.1 Après 12 heures .....	53
4.4.2 Après 84 heures .....	54
4.4.3 Après 156 heures .....	56
4.4.4 Après 324 heures .....	57
4.4.5 Après 516 heures .....	58
4.4.6 Après 732 heures .....	60
4.5 Corrélation entre la quantité de cuivre retrouvée dans les fractions chromatographiques et le temps d'échantillonnage.....	61
4.6 Perspectives de recherche .....	63
CHAPITRE V. CONCLUSION .....	66
RÉFÉRENCES .....	69

## LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.	Microphotographie de <i>Scenedesmus quadricauda</i> n'ayant subi aucun traitement aux ultrasons. Grossissement 100x ..... 13
Figure 2.	Microphotographie de <i>Scenedesmus quadricauda</i> ayant subi un traitement aux ultrasons. Grossissement 100x ..... 14
Figure 3.	Profils d'élution des protéines étalons ..... 18
Figure 4.	Étalonnage des colonnes chromatographiques en fonction des logarithmes des masses moléculaires et des volumes d'élution (en numéros de fraction) des protéines étalons ..... 19
Figure 5.	Courbes d'étalonnage du spectrophotomètre d'absorption atomique en fonction de l'absorbance et de la concentration en cuivre ..... 22
Figure 6.	Variations temporelles de la densité cellulaire des ballons témoin et expérimental en fonction du temps ..... 25
Figure 7.	Variations temporelles du pH des ballons témoin et expérimental en fonction du temps ..... 27
Figure 8.	Microphotographie de <i>Scenedesmus quadricauda</i> provenant du ballon témoin après 732 heures. Grossissement 100x ..... 28
Figure 9.	Microphotographie de <i>Scenedesmus quadricauda</i> provenant du ballon expérimental après 732 heures. Grossissement 100x ..... 29
Figure 10.	Profils d'élution des protéines extraites avec le Cu associé aux fractions chromatographiques après 12 heures ..... 31
Figure 11.	Profils d'élution des protéines extraites avec le Cu associé aux fractions chromatographiques après 84 heures ..... 33
Figure 12.	Profils d'élution des protéines extraites avec le Cu associé aux fractions chromatographiques après 156 heures ..... 35
Figure 13.	Profils d'élution des protéines extraites avec le Cu associé aux fractions chromatographiques après 324 heures ..... 36
Figure 14.	Profils d'élution des protéines extraites avec le Cu associé aux fractions chromatographiques après 516 heures ..... 38



	Page
Figure 15. Profils d'élution des protéines extraites avec le Cu associé aux fractions chromatographiques après 732 heures .....	40
Figure 16. Quantité totale de cuivre retrouvée pour l'ensemble des fractions 35 à 45 en fonction du temps .....	43

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1. Composition du milieu de culture Woods Hole MBL modifié .....	8

CHAPITRE I  
INTRODUCTION

Les écosystèmes terrestres et aquatiques sont de plus en plus soumis à différents stress environnementaux provoqués par l'apport de substances anthropogéniques de toute nature. Parmi celles-ci, les métaux lourds sont considérés comme les polluants les plus nocifs pour les organismes.

Dans les milieux aquatiques soumis aux pressions de ces agents abiotiques, la croissance du phytoplancton est liée à l'efficacité de certains mécanismes physiologiques permettant aux cellules de s'ajuster afin de maintenir un taux maximal de croissance (Harris, 1984). Or, les études en écotoxicologie nous permettent d'évaluer la toxicité relative de divers polluants et d'étudier divers ajustements physiologiques, biochimiques et/ou ultrastructuraux qu'utilisent les cellules phytoplanctoniques et par conséquent de connaître comment le cuivre agit sur le taux de croissance.

Le cuivre est considéré comme un oligoélément essentiel à la croissance et au bon fonctionnement des réactions métaboliques (Salisbury et Ross, 1985; Grill *et al.*, 1988). À dose supraoptimale, il demeure cependant un des métaux lourds les plus toxiques pour le phytoplancton car il affecte les organismes en engendrant des modifications physiologiques, morphologiques et métaboliques (Bastien, 1986; Bastien et Côté, 1989a; Fernandes et Henriques, 1991).

Considérant le rôle fondamental que jouent les organismes du phytoplancton au sein de l'écosystème, l'effet des métaux lourds aura des conséquences sur l'ensemble de la productivité biologique de l'écosystème.

Plusieurs travaux (*e.g.* Stokes *et al.*, 1973; Raven et Beardall, 1981; Foy et Smith, 1980) ont montré que les métaux lourds déclenchent divers mécanismes de tolérance chez les cellules phytoplanctoniques. Plusieurs mécanismes se présentent comme des stratégies afin de minimiser l'effet du polluant sur la biochimie de la cellule. Bastien et Côté (1989a,b) ont mis en évidence, chez *Scenedesmus quadricauda*, que la concentration en cuivre est corrélée significativement à la fréquence d'apparition des inclusions intravacuolaires ainsi qu'à leur nombre moyen par cellule. D'autres chercheurs (*e.g.* Foster, 1977; Stokes, 1979) ont montré que les cellules utilisent l'exclusion par volatilisation, la complexation extracellulaire ou encore la précipitation sur la face externe de la membrane pour contrer les effets nocifs des métaux lourds.

Certaines études en écotoxicologie ont révélé que les cellules du phytoplancton sont capables de synthétiser des protéines complexantes (Stokes *et al.*, 1977; Nagano *et al.*, 1984; Gekeler *et al.*, 1988; Baunemann et Höfner, 1991). Ce mécanisme a un rôle sensiblement identique à celui des métallothionéines retrouvées chez les Mammifères (Kägi et Vallee, 1960), les Crustacés (Engel et Brouwer, 1984; 1987; Brouwer *et al.*, 1989) et les Mollusques (Engel et Brouwer, 1984).

Chez les Végétaux, les protéines complexant les métaux lourds sont appelées phytochélatines, métallothionéines de classe III, phytométallothionéines ou encore poly(gamma-glutamylcystéinyl)glycine (Robinson, 1989).

Les recherches actuelles ont permis de démontrer la présence de ces protéines complexantes chez plusieurs espèces phytoplanctoniques soumises au stress d'ions métalliques durant une période de temps relativement courte (quelques heures à quelques jours) en utilisant des cultures cellulaires en lot (Stokes *et al.*, 1977; Nagamo *et al.*, 1984; Gekeler *et al.*; 1988, Marquis, 1989). Les techniques de culture en lot sont généralement faites en utilisant un milieu confiné, ce qui ne permet pas un renouvellement constant du milieu de culture. L'ajout de milieu frais se fait par dilution des cultures, ce qui n'est pas le cas des cultures continues, où l'approvisionnement en milieu nutritif est constant.

Lors d'expériences d'une durée de 50 jours, Bastien et Côté (1989b) ont montré que le cytoplasme des cellules de *Scenedesmus quadricauda* soumises à une concentration de 250  $\mu\text{g}$  de cuivre  $\cdot \text{L}^{-1}$  devenait densément peuplé de ribosomes. Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes de tolérance associés à la synthèse de protéines capables ou bien de complexer l'ion métallique, ou bien d'être impliquées d'une autre manière dans ce mécanisme de tolérance.

C'est dans cette perspective que se situe ce projet de recherche dont l'objectif est de mettre en évidence la présence de protéines complexantes chez *Scenedesmus quadricauda* suite à une exposition à long terme au cuivre.

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 2.1 Culture des algues

L'organisme utilisé dans le cadre de cette étude est l'algue cœnobiotique *Scenedesmus quadricauda* (TURP.) BREB, classée UTEX 76 et provenant de "Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin". Lewis (1990) justifie son utilisation dans certains tests de toxicité. Ici, à l'Université du Québec à Chicoutimi, cette espèce a servi lors de diverses études toxicologiques, notamment, avec le cuivre (Bastien et Côté, 1989a,b). L'espèce *S. quadricauda* n'a pas fait l'objet d'études visant à mettre en évidence des protéines complexantes de type métallothionéine, contrairement à *S. subspicatus* (Baunemann et Höfner, 1991) et à *S. acutiformis* (Stokes *et al.*, 1977; Gekeler *et al.*, 1988; Robinson, 1989).

L'espèce utilisée a été cultivée selon le principe du chemostat (Stein, 1973), ce qui permet de maintenir viables des cellules durant une longue période de temps car la quantité d'éléments nutritifs dans le milieu est maintenue à un taux optimal. Compte tenu de la durée de l'expérience et des volumes de cultures utilisés, les cultures n'ont pas été réalisées sous conditions axéniques.

Deux (2) ballons de 12 L en verre contenant chacun huit (8) L de milieu nutritif ont servi à l'expérimentation; le ballon témoin a permis la comparaison avec le ballon expérimental. L'ensemble de la vaisselle utilisée a été préalablement lavée à l'acide nitrique



(HNO<sub>3</sub>, 10-15%) par un trempage de 24 heures puis par un triple rinçage à l'eau ultra-pure (Milli-Q reagent water system de Millipore) avant son utilisation. Des pompes péristaltiques Masterflex 1-100 rpm, couplées à deux (2) têtes de pompe Masterflex 7014-21 avec un contrôle Masterflex (Cole Parmer Instruments Co.), ont servi à l'approvisionnement en milieu nutritif. Le taux de dilution a été fixé à 0,25-jour<sup>-1</sup> pour le ballon témoin, et ce, pour toute la durée de l'expérience. Le taux de dilution a été calculé en prenant le volume de milieu nutritif frais ajouté par jour divisé par le volume total de la culture. Au début de l'expérience, le taux de dilution était le même pour le ballon expérimental, mais nous avons dû le ramener à 0,10-jour<sup>-1</sup> à partir du jour 19 pour le ballon expérimental. Ce réajustement a été nécessaire afin de ne pas lessiver la culture de ces cellules.

Le milieu de culture utilisé était le Woods Hole MBL, modifié par le retrait du tampon Tris et de l'EDTA et par l'ajout d'acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) (Stein, 1973) (tableau 1). Les solutions-mères et les solutions vitaminées, servant à la préparation du milieu de culture, ont été faites avec de l'eau ultra-pure. Les solutions-mères d'éléments minéraux ont été acidifiées afin de permettre une meilleure conservation des divers éléments en solution. Le pH des milieux nutritifs a été ajusté à  $6,80 \pm 0,40$  (pH-mètre Fisher Accumet, modèle 630). Les milieux nutritifs ont été stérilisés, avant l'ajout des solutions vitaminées, à 0,75 kPa de pression à une température de 121°C et ce, pendant 20 minutes. Ils ont été, par la suite, entreposés en chambre froide à une température constante de 4°C. Le milieu de culture servant à l'approvisionnement du ballon expérimental contenait en plus 250 µg de cuivre-L<sup>-1</sup>. Ce cuivre en excès provenait d'une solution-mère de sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>). Elle a été préparée de la même façon que toutes les autres solutions-mères.

**Tableau 1. Composition du milieu de culture Woods Hole MBL modifié (Stein, 1979).**

<u>Solutions-mères de microéléments</u>		<u>Solutions-mères de macroéléments</u>	
<u>Éléments</u>	<u>nombre de g.L<sup>-1</sup></u>	<u>Éléments</u>	<u>nombre de g.L<sup>-1</sup></u>
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3,15	CaCl <sub>2</sub>	36,76
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,01	MgSO <sub>4</sub>	36,97
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,022	NaHCO <sub>3</sub>	12,60
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,01	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,71
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,18	NaNO <sub>3</sub>	85,01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,006		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0568		

Prendre 1 ml par L de milieu de culture de chacune de ces solutions (solutions-mères de macro et microéléments).

Solutions vitaminées

<u>Vitamines</u>	<u>*nombre de mg.L<sup>-1</sup></u>
Biotine	0,0005
Thiamine HCl	0,100
Cyanocobalamine	0,0005

---

\* concentration finale dans le milieu de culture

Les cultures-mères ont été inoculées à partir de cellules de *Scenedesmus quadricauda* en tube gélosé dans des ballons de 250 ml contenant environ 25 ml de milieu nutritif Woods Hole MBL modifié tel que décrit plus haut. Trois (3) ballons ont été inoculés, puis placés en chambre de croissance sur une table rotative à 100 rpm (Junior Orbit Shaker, Lab-line Instruments Inc.), avec une photopériode de 16:8 (lampes fluorescentes de type Cool White de 40 W, Sylvania), à une température maximale de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  et une température minimale de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  (thermomètre Taylor, Sybron Co.). Lorsque les cultures sont devenues relativement concentrées, des ajouts de milieu nutritif ont été faits afin de ne pas épuiser les nutriments du milieu au fur et à mesure que la concentration cellulaire des ballons augmentait. Par la suite, le contenu des trois (3) ballons a servi à l'inoculation d'un ballon de six (6) L contenant environ 3,500 L de milieu Woods Hole MBL modifié. Cette opération a été effectuée 12 jours après l'inoculation. Le ballon a été relié à un approvisionnement en air comprimé et à une pierre à air afin d'assurer une aération adéquate de la culture. L'air était filtré avec un filtre de type 4225-T avec des pores de  $0,20 \mu\text{m}$  (Acrodisc chemically resistant, Gelman Sciences). La croissance des cellules s'est poursuivie pendant 15 jours, avec entre-temps, quelques prélèvements d'un certain volume de culture et ajouts de milieu nutritif frais. Après cette période, la culture a été transférée dans un ballon de 12 L. Environ 500 ml de culture ont été prélevés, puis remplacés par quatre (4) L de milieu frais. La croissance de la culture a été poursuivie durant une autre période de 15 jours et après quoi, nous avons procédé à l'inoculation du ballon témoin et du ballon expérimental.

La densité cellulaire de notre culture-mère était de  $6,17 \times 10^5$  cœnobiums·ml<sup>-1</sup>; elle a été établie par comptage cellulaire à l'aide d'une lame Palmer-Maloney (Palmer et Maloney, 1954) et d'un microscope optique muni d'un disque de Whipple (Dailux, Leitz) à un

grossissement de 250x. Tous les comptages cellulaires ont été réalisés à quatre (4) reprises et chaque comptage comprenait 20 champs délimités par le disque de Whipple.

Un volume de 3,500 L de la culture-mère a été filtré sous vide (système de filtration Millipore, filtres 0,80  $\mu\text{m}$  de type AA avec une pompe à vide General Electric) et a été placé dans le ballon témoin contenant huit (8) L de milieu Woods Hole MBL modifié. Un volume identique de la culture-mère a servi à l'inoculation du ballon expérimental. Celui-ci contenait aussi huit (8) L de milieu Woods Hole MBL modifié avec, en plus, 250  $\mu\text{g}$  de cuivre $\cdot\text{L}^{-1}$ . La concentration cellulaire initiale de ces deux (2) ballons était de  $2,7 \times 10^5$  cœnobiums $\cdot\text{ml}^{-1}$ . L'aération des cultures a été assurée par le même système que celui décrit précédemment.

## 2.2 Conditions expérimentales

Les ballons (témoin et expérimental) ont été placés dans une chambre de croissance où la température et la lumière étaient contrôlées (photopériode de 16:8). L'expérience s'est déroulée durant une période de 30 jours et demi (732 heures). Des mesures journalières de température et de pH ont été notées. La température a varié entre 22°C et 26°C. L'utilisation d'un système de culture continue, employant des pompes péristaltiques, a facilité la récolte des échantillons pour les comptages cellulaires et la mesure du pH. Les prélèvements quotidiens ont toujours été effectués à la même heure de la photopériode. Un contenant propre recueillait le surplus déversé par les pompes péristaltiques pour chacun des ballons.

Des aliquotes de 250 ml ont été prélevées après 12, 84, 156, 324, 516 et 732 heures. La méthode utilisée pour la récolte de ces échantillons a été la même que celle employée pour la récolte des échantillons quotidiens pour les comptages cellulaires et la mesure de pH.

## 2.3 Traitement des échantillons

### 2.3.1 Préparation des échantillons

Nous avons effectué un comptage cellulaire de tous nos échantillons. Connaissant la densité cellulaire, une aliquote était filtrée sur un système Millipore (filtre de 0,80  $\mu\text{m}$  de type AA) et rincée avec un tampon Tris-HCl 0,01 M de pH 8,6 contenant 10 mM de 2-mercaptoéthanol et 0,02% d'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ). Selon Minkel *et al.* (1980), le 2-mercaptoéthanol prévient l'oxydation des thiols, tandis que l'azoture de sodium est un agent antibactérien (Pharmacia LKB Biotechnology, 1991). L'aliquote filtrée a été ensuite remise en suspension dans un volume de 30 ml de ce même tampon Tris-HCl. Cet échantillon a subi par la suite un traitement aux ultrasons. Pour chaque échantillon témoin ou expérimental, deux (2) aliquotes de 30 ml ont été traitées aux ultrasons. La densité cellulaire de nos aliquotes était de  $1 \times 10^6$  cœnobiums·ml<sup>-1</sup>.

### 2.3.2 Traitement aux ultrasons (homogénéisation des échantillons)

L'appareil utilisé était un Sonifier, modèle 350 (Branson Sonic Power Company) muni d'une sonde de 1,73 cm de diamètre. L'échantillon à traiter a été relié à une cellule réfrigérante qui maintenait la température de l'échantillon à 4°C. Les ultrasons, grâce au phénomène de cavitation (Suslick, 1989), sont reconnus comme étant efficaces dans l'ouverture de certains types cellulaires, particulièrement chez les cellules de microorganismes (Hughes *et al.*, 1971). Certains chercheurs, dont Giordano et Leuzzi (1976), ont réussi à ouvrir des cellules de *Scenedesmus quadricauda* en utilisant les traitements aux ultrasons. Nous avons donc réalisé différents pré-tests afin d'optimiser notre technique d'ouverture. Le

traitement qui s'est avéré le plus efficace est celui qui correspond à une durée de cinq (5) minutes en mode continu en utilisant une puissance de dix (10), échelle propre à l'appareil.

### 2.3.3 Vérification microscopique de l'ouverture des cellules

Afin de vérifier si les cellules de *Scenedesmus quadricauda* ont bel et bien été ouvertes, suite aux traitements aux ultrasons, nous avons réalisé des examens microscopiques de nos homogénats. La figure 1 présente des cellules normales de *S. quadricauda* (sans aucun traitement ultrasonique), alors que la figure 2 illustre des cellules de *S. quadricauda* ayant subi un traitement aux ultrasons. Ces photos ont été prises à l'aide d'un microscope optique Zeiss, modèle 47 30 28 (Zeiss West Germany) couplé à un appareil photographique Minolta SRT100, 35 mm (Minolta Camera Co. Ltd.). Le film à diapositives utilisé était un Ektachrome 160 au tungstène ET 135-24, 35 mm (Kodak Canada Ltd). La sensibilité de l'appareil a été fixée à 150 ASA avec une vitesse d'obturation de 60.

### 2.3.4 Ultracentrifugation des homogénats cellulaires

Les échantillons homogénéisés ont subi par la suite une ultracentrifugation (ultracentrifugeuse Beckman, modèle L2-75B, munie d'un rotor de type SW 27) de 90 minutes à une force de 100 000g et à une température de 4°C afin de sédimenter les débris cellulaires (membranes, ribosomes, etc.) et les cellules non-ouvertes.

Les surnageants obtenus ont été récoltés et placés dans des contenants pour la lyophilisation. Le lyophilisateur (Labconco, modèle Lyph-lock 6) était réglé à une pression de 10 µm de Hg et à une température de -55°C. La lyophilisation complète nécessitait une

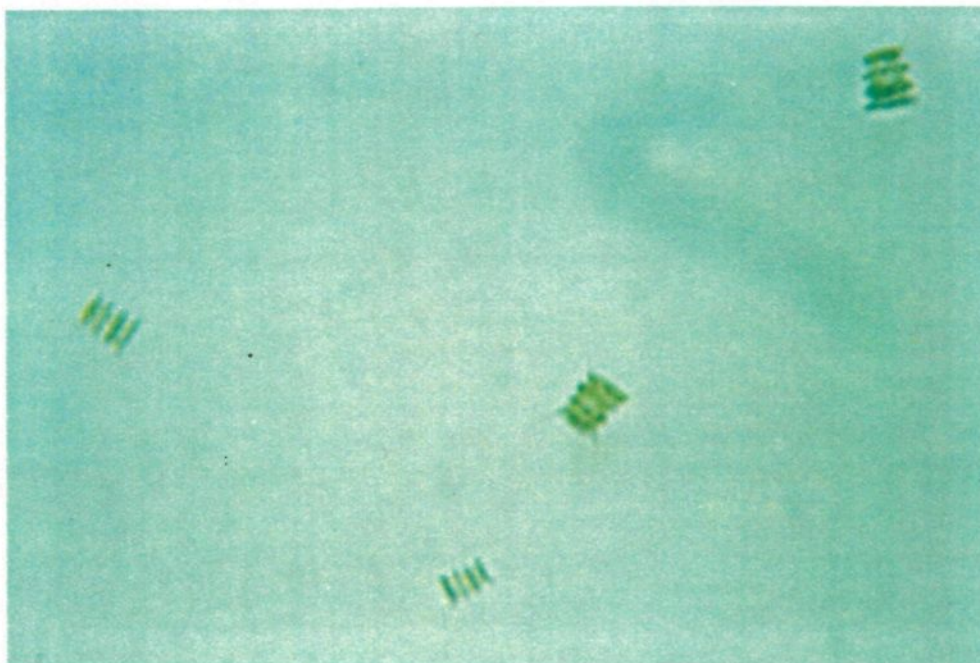


Figure 1. Microphotographie de *Scenedesmus quadricauda* n'ayant subi aucun traitement aux ultrasons. Grossissement 100x.

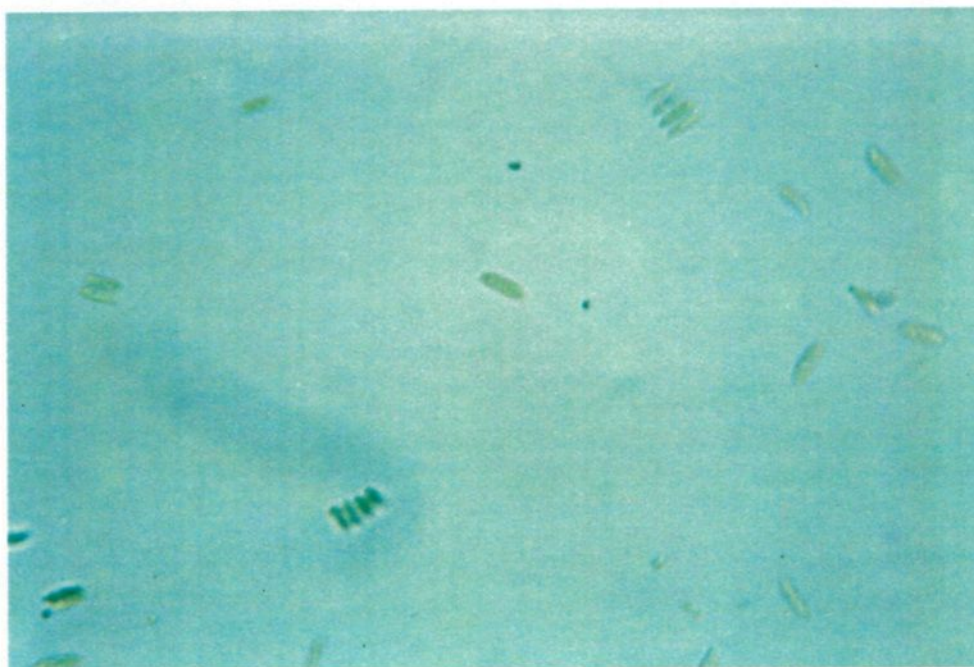


Figure 2. Microphotographie de *Scenedesmus quadricauda* ayant subi un traitement aux ultrasons. Grossissement 100x.



durée de 24 heures et plus. Les échantillons lyophilisés ont été déposés dans des contenants propres puis placés dans un dessiccateur au congélateur à  $-22^{\circ}\text{C}$ . Après dégel à  $4^{\circ}\text{C}$ , les échantillons ont été appliqués sur la colonne de chromatographie par perméation sur gel (CPG). Il est à noter que l'ensemble des traitements que nous avons faits subir aux échantillons témoins et expérimentaux a été réalisé au fur et à mesure de leur récolte tout au long de l'expérience.

## 2.4 Chromatographie des échantillons

La chromatographie par perméation sur gel (CPG) permet la séparation d'un échantillon donné selon la masse moléculaire de ses constituants (Alberts *et al.*, 1983; Pharmacia LKB Biotechnology, 1991). Les protéines complexantes que nous cherchons à mettre en évidence sont solubles et contenues dans le cytoplasme des cellules (Kägi et Kojima, 1987); nous avons utilisé le traitement aux ultrasons pour les libérer du cytoplasme.

### 2.4.1 Montage de la colonne chromatographique

Nous avons utilisé une colonne chromatographique Pharmacia (Pharmacia Fine Chemicals) en verre, modèle C16/70, d'un diamètre de 16 mm et d'une longueur de 70 cm. Un gel de type Séphadex G-75, ayant comme limites d'exclusion les masses moléculaires se situant entre 1,5 et 30 kDa, a servi au remplissage de la colonne.

Le gel a été mis à gonfler 24 heures à l'avance dans un tampon Tris-HCl 0,01 M contenant 0,02% d'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) et il a été dégazé avant son utilisation. Le remplissage de la colonne a été effectué à l'aide d'une pipette Pasteur. Le tassement du gel

dans la colonne a été rendu possible en faisant circuler du tampon Tris-HCl. Une pompe péristaltique Masterflex 1-100 rpm, couplée à une tête de pompe Masterflex 7013-20, permettait la circulation du tampon dans la colonne. Le débit de la pompe a été calibré de manière à obtenir une vitesse d'élution d'environ 25 ml·h<sup>-1</sup>. Ce débit a été mesuré avec précision à chacune des chromatographies afin de permettre l'intégration des chromatogrammes obtenus, c'est-à-dire la transformation du temps en volume puis en masse moléculaire nominale.

Un détecteur photométrique, réglé à une longueur d'onde de 280 nm, a permis de suivre l'absorbance UV de la colonne (Ultraviolet analyser, modèle UA-4, ISCO).

Un enregistreur BBC Goerz Metrawatt (modèle SE 120) traçait sur papier, à une vitesse de cinq (5) mm·min<sup>-1</sup>, les signaux captés par le détecteur photométrique.

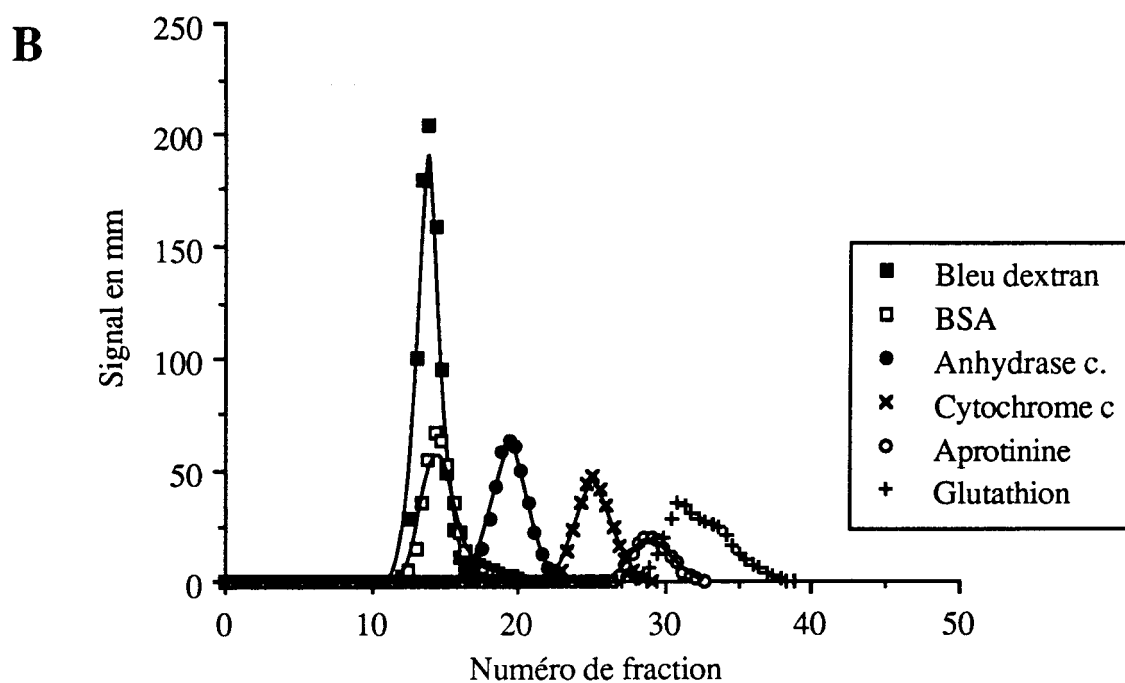
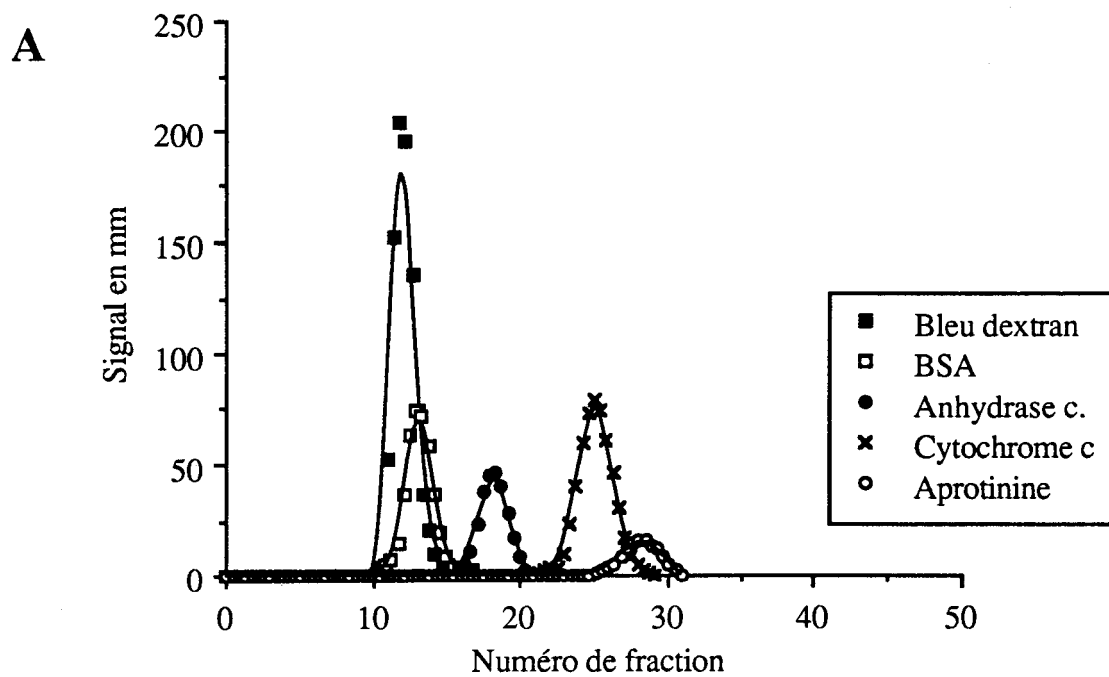
Un collecteur de fractions Gilson (Micro fractionator Gilson) a récolté des volumes de 4,0 ml dans des éprouvettes lavées à l'acide nitrique. Ces fractions chromatographiques ont été par la suite placées dans des contenants de verre propres et rangées au réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'analyse de leur contenu en cuivre par spectroscopie d'absorption atomique.

À cause d'un certain nombre de problèmes techniques, nous avons dû effectuer le montage d'une deuxième colonne chromatographique, ce qui a impliqué un nouvel étalonnage avec les protéines étalons. C'est pourquoi nous présentons, plus loin dans cette section, deux (2) profils d'élution des protéines étalons et deux (2) étalonnages.

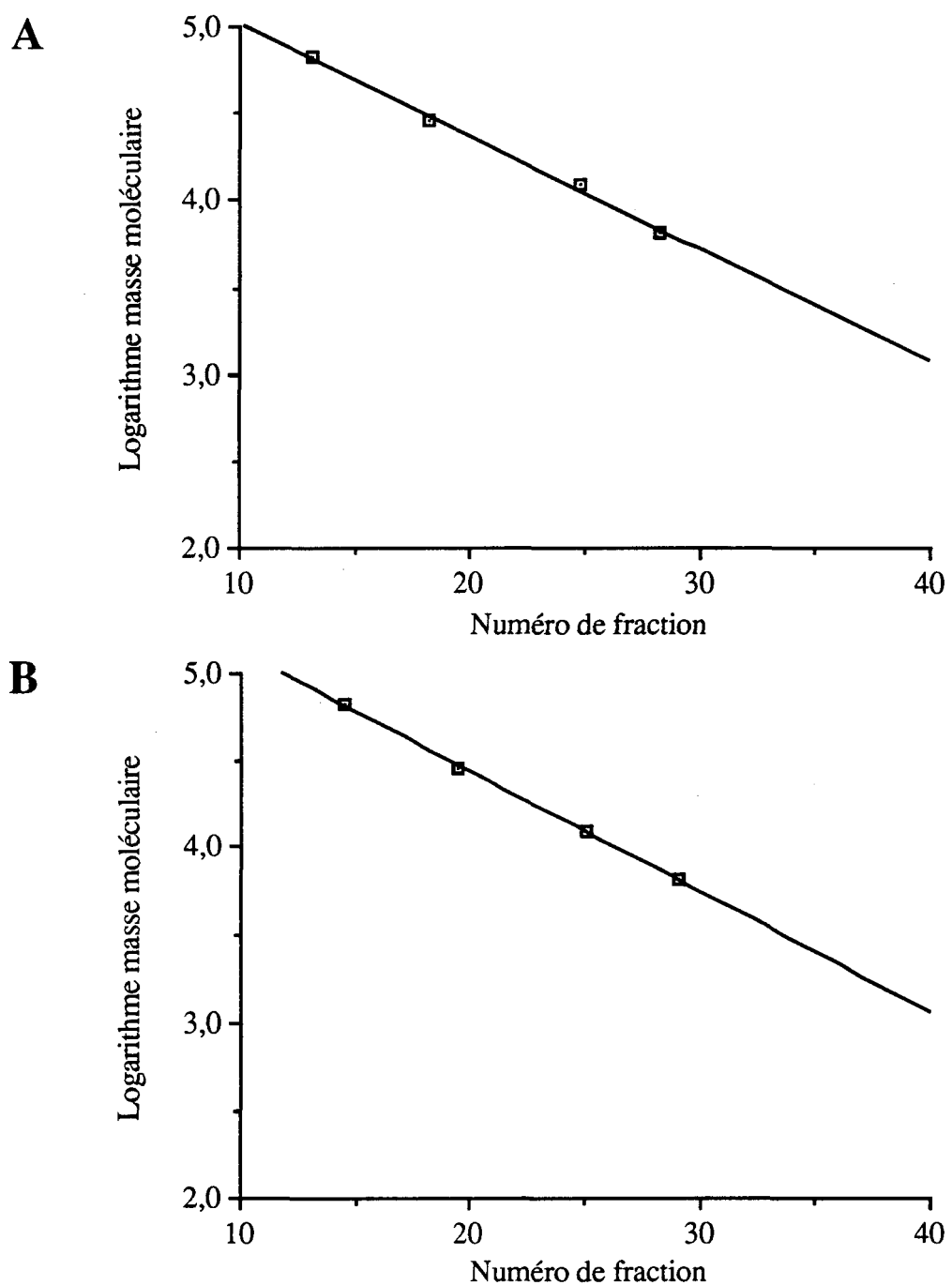
#### 2.4.2 Étalonnage des colonnes chromatographiques

Pour l'étalonnage des colonnes chromatographiques, nous avons utilisé dans un premier temps, du bleu Dextran (M. M. de 2 000 000 Da) afin de favoriser le tassement du gel et vérifier l'homogénéité de celui-ci. Ensuite, l'albumine sérique bovine (BSA, M. M. de 66 000 Da), l'anhydrase carbonique (M. M. de 29 000 Da), le cytochrome c (M. M. de 12 400 Da) ainsi que de l'aprotinine (M. M. de 6 500 Da) ont servi pour l'étalonnage de la première et de la deuxième colonne chromatographique. Le glutathion réduit (M. M. de 307,3 Da), peptide reconnu pour être un précurseur des phytochélatines (Wagner, 1984; Delhaize *et al.*, 1989) a, en plus, été appliqué sur la deuxième colonne. Puisque sa masse moléculaire n'entre pas dans les limites d'exclusion de la colonne chromatographique, nous ne l'avons pas utilisé pour l'étalonnage de la deuxième colonne. Toutes les protéines utilisées pour l'étalonnage provenaient de chez Sigma (Sigma Chemical Co.).

Le passage des protéines étalons dans la colonne chromatographique a été déterminé par la lecture de l'absorbance des fractions à 280 nm avec le détecteur UV. Ensuite, le tracé a été analysé afin de permettre la réalisation de la courbe d'étalonnage de la colonne chromatographique d'après les masses moléculaires nominales et les volumes d'élution (en numéro de fraction) des protéines étalons. Les profils d'élution réalisés avec les protéines étalons que nous avons injectées dans chacune des deux (2) colonnes chromatographiques sont représentés à la figure 3. Les deux (2) courbes d'étalonnage sont présentées à la figure 4.



**Figure 3. Profils d'élution des protéines étalons. En A, premier profil d'élution des protéines étalons; en B, deuxième profil d'élution des protéines étalons.**



**Figure 4.** Étalonnage des colonnes chromatographiques en fonction des logarithmes des masses moléculaires et des volumes d'élution (en numéros de fraction) des protéines étalons. En A, première courbe de calibration,  $R^2=0,996$ ; en B, deuxième courbe de calibration,  $R^2=0,999$ .

### 2.4.3 Application des échantillons sur les colonnes chromatographiques

Les protéines lyophilisées ont été passées au mortier afin de favoriser leur remise en solution à environ cinq (5) mg·ml<sup>-1</sup> dans un tampon Tris-HCl 0,01M de pH 8,6 contenant 10mM de 2-mercaptoéthanol et 0,02% d'azoture de sodium. Comme il semblait rester quelques particules non dissoutes, nous avons procédé à une centrifugation pendant 30 minutes à la température de la pièce (centrifugeuse modèle CL, International Equipment Co). Le surnageant a été récupéré puis appliqué sur la colonne. Puisque la colonne chromatographique possédait une boucle d'injection, nous avons évalué le volume d'échantillon qu'elle pouvait contenir une fois remplie. C'est ce volume d'échantillon, 5,22 ml, que nous avons injecté dans la colonne, et ce, pour tous les échantillons.

L'intégration des tracés obtenus a été réalisée de la même manière que lors de l'intégration des tracés relatifs aux protéines étalons pour la confection des profils d'élution des protéines étalons.

Les chromatographies relatives aux échantillons témoins et expérimentaux des temps de récolte 12 et 84 heures, ainsi que la chromatographie de l'échantillon témoin de l'heure 156 ont été réalisées avec la première colonne chromatographique. Les autres chromatographies (c'est-à-dire l'échantillon expérimental de l'heure 156 et les échantillons témoins et expérimentaux des heures 324, 516 et 732) ont été effectuées sur la deuxième colonne chromatographique.

## 2.5 Spectroscopie d'absorption atomique

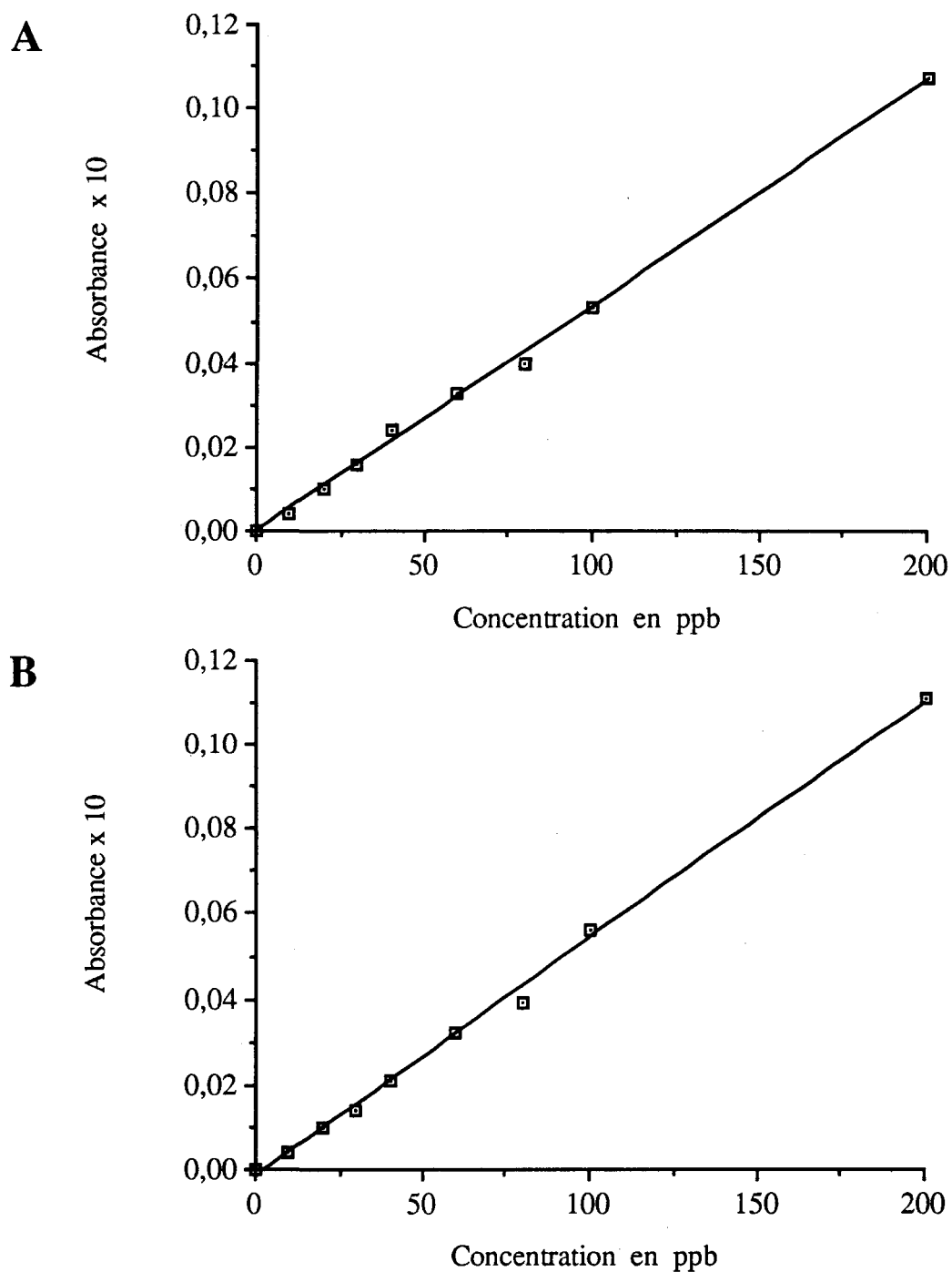
### 2.5.1 Appareil utilisé

Les analyses du contenu en cuivre des fractions chromatographiques recueillies ont été réalisées avec un spectrophotomètre d'absorption atomique (Perkin-Elmer, modèle 603). Une flamme air-acétylène alimentait l'appareil. Les mesures ont été effectuées en absorbance avec un facteur d'expansion de dix (10). Le mode continu a été choisi avec une vitesse d'acquisition des données de 0,5 seconde et un temps d'intégration de dix (10) secondes.

### 2.5.2 Courbes d'étalonnage du spectrophotomètre d'absorption atomique

Une solution-mère de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) a servi à la préparation de solutions étalons aux concentrations suivantes: 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 et 200 ppb de cuivre. Elles ont été utilisées lors de l'étalonnage de l'appareil, rendant possible la transformation de nos données mesurées en absorbance, en concentrations de cuivre (en ppb).

Puisque nous avons effectué nos mesures en deux (2) étapes, cela implique la réalisation de deux (2) courbes d'étalonnage (figure 5). C'est à partir de ces droites de corrélation que nous avons calculé la concentration de cuivre de nos différentes fractions chromatographiques.



**Figure 5.** Courbes d'étalonnage du spectrophotomètre d'absorption atomique en fonction de l'absorbance et de la concentration en cuivre. En A, première courbe d'étalonnage, coefficient de corrélation  $R^2=0,998$ ; en B, deuxième courbe d'étalonnage, coefficient de corrélation  $R^2=0,997$ .



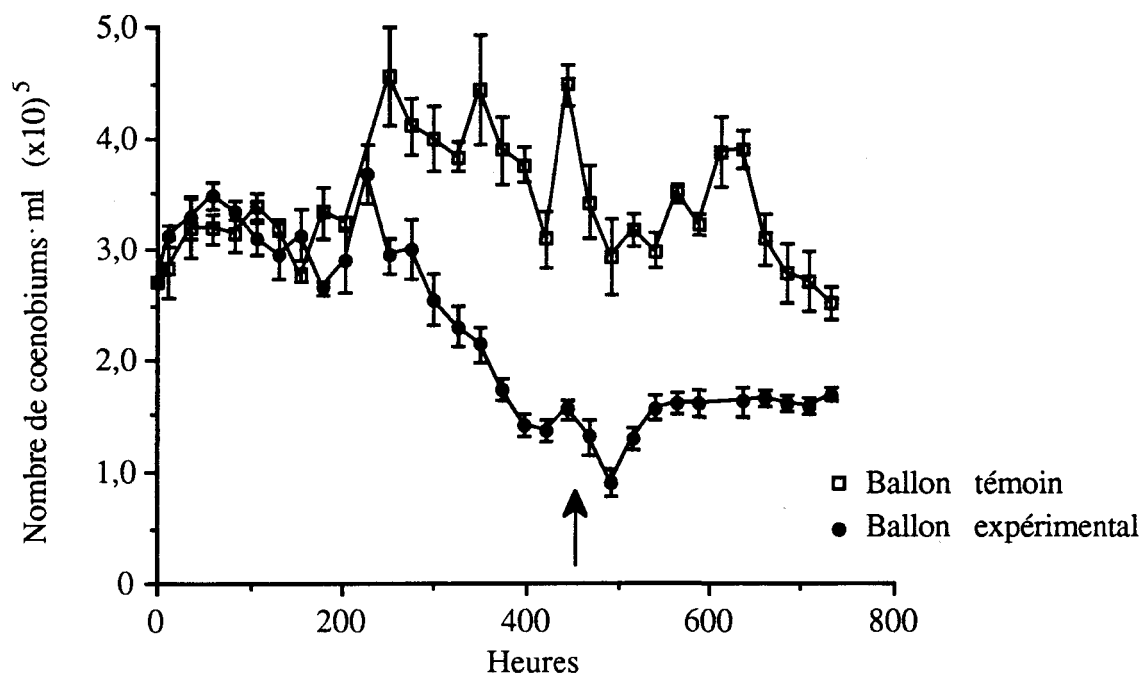
## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

### 3.1 Variations temporelles de densité cellulaire

La densité cellulaire des ballons témoin et expérimental a été mesurée quotidiennement pendant les 30 jours et demi qu'a duré l'expérience (732 heures). Les moyennes des quatre (4) comptages cellulaires ainsi que les écarts-types calculés sur ces moyennes apparaissent à la figure 6 pour le ballon témoin et le ballon expérimental.

La densité cellulaire des ballons témoin et expérimental est identique au début et elle demeure semblable pendant les 200 premières heures de l'expérience. Par la suite, nous observons une augmentation dans chacun des ballons. Cette augmentation est cependant soutenue dans le ballon témoin, tandis que dans le ballon expérimental, nous remarquons, après une brève augmentation, une diminution constante de la densité cellulaire jusqu'au moment où nous avons ramené le taux de dilution de ce ballon à  $0,10\text{-jour}^{-1}$  (c'est-à-dire à la 456<sup>ième</sup> heure). Suite à ce réajustement, il semble que la densité a continué à diminuer pendant quelques heures, pour finalement se rétablir et demeurer presque constante jusqu'à la fin de l'expérience. À partir de la 275<sup>ième</sup> heure, la densité cellulaire du ballon témoin est assez variable; elle se caractérise par des diminutions et des augmentations brusques.



**Figure 6.** Variations temporelle de la densité cellulaire des ballons témoin et expérimental en fonction du temps. La flèche indique le moment où le taux de dilution du ballon expérimental a été ramené à  $0,10 \cdot \text{jour}^{-1}$ . Ballon expérimental contaminé avec  $250 \mu\text{g}$  de cuivre  $\cdot \text{L}^{-1}$ .

### 3.2 Variations temporelles du pH

Dans le ballon témoin, les valeurs de pH présentent diverses fluctuations et le pH varie entre 6,0 et 9,4 tout au long de l'expérience (figure 7). En général, le pH du ballon témoin est généralement plus élevé que celui du ballon expérimental. À l'exception des premières heures de l'expérience, le ballon témoin demeure à un pH alcalin durant toute l'expérience.

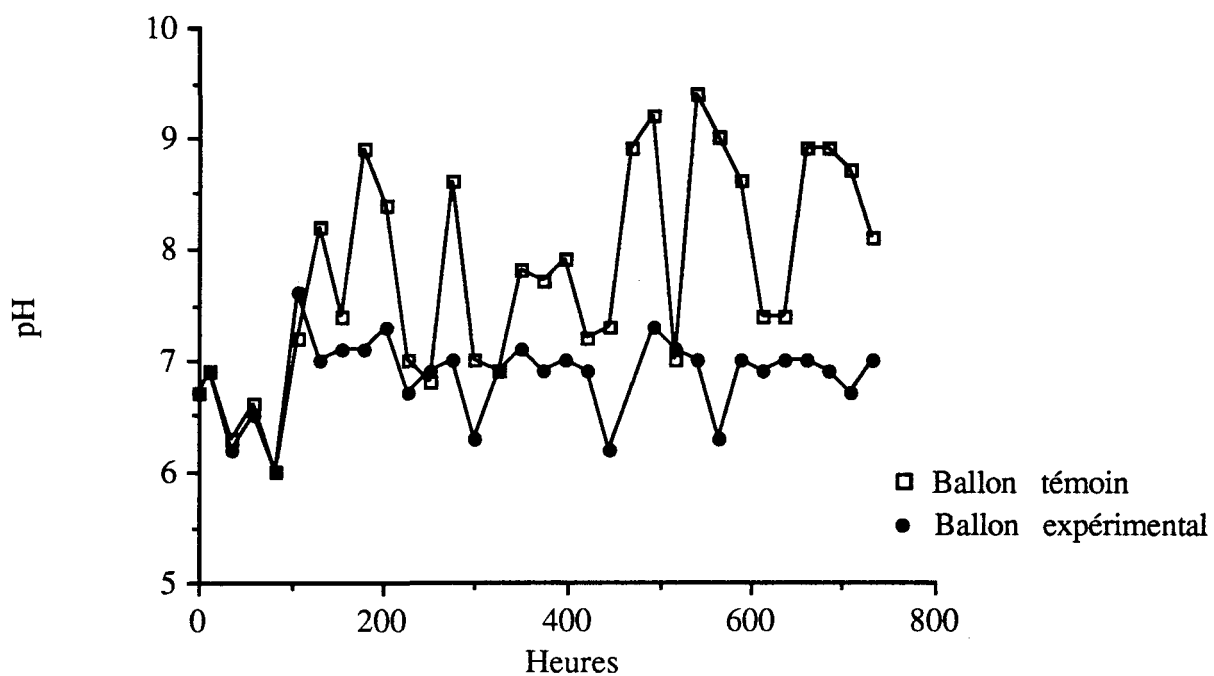
Dans le ballon expérimental, les valeurs de pH varient entre 6,0 et de 7,6 ce qui constitue un écart moins grand que celui noté pour le ballon témoin.

### 3.3 Microphotographies des cellules du ballon témoin et du ballon expérimental après 732 heures

Les figures 8 et 9 présentent respectivement des microphotographies de *S. quadricauda* provenant du ballon témoin et du ballon expérimental à la fin de l'expérience.

Les cellules du ballon témoin montrent une morphologie identique à celle que nous pouvions observer tout au long de l'expérience. Une coloration verte les caractérise et la presque totalité des cœnobiums examinés au microscope, lors des comptages cellulaires journaliers, contiennent quatre (4) cellules.

Dans le ballon expérimental, la morphologie générale des cellules est quelque peu différente de celle des cellules du ballon témoin. En effet, les cellules contaminées au cuivre sont de dimensions plus restreintes et certaines semblent recroquevillées sur elles-mêmes, ce qui n'est pas le cas des cellules récoltées à partir du ballon témoin. De plus, les cœnobiums



**Figure 7. Variations temporelles du pH des ballons témoin et expérimental en fonction du temps. Ballon expérimental contaminé avec  $250 \mu\text{g}$  de cuivre $\cdot\text{L}^{-1}$ .**

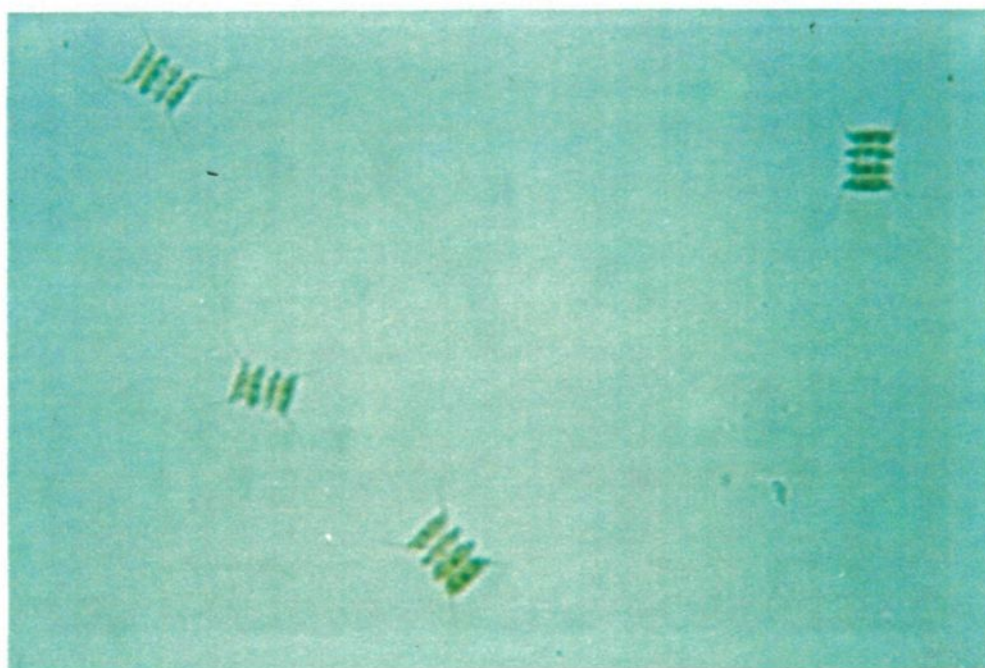


Figure 8. Microphotographie de *Scenedesmus quadricauda* provenant du ballon témoin après 732 heures. Grossissement 100x.



Figure 9. Microphotographie de *Scenedesmus quadricauda* provenant du ballon expérimental après 732 heures. Grossissement 100x.

contenant deux (2) cellules sont plus nombreux. La coloration verte, qui est caractéristique des cellules du ballon témoin, devient de moins en moins accentuée chez les cellules du ballon expérimental. Ces premiers signes de détérioration des cellules du ballon expérimental ont commencé vers la 360<sup>ième</sup> heure (15<sup>ième</sup> jour de l'expérience).

### 3.4 Chromatogrammes des protéines extraites

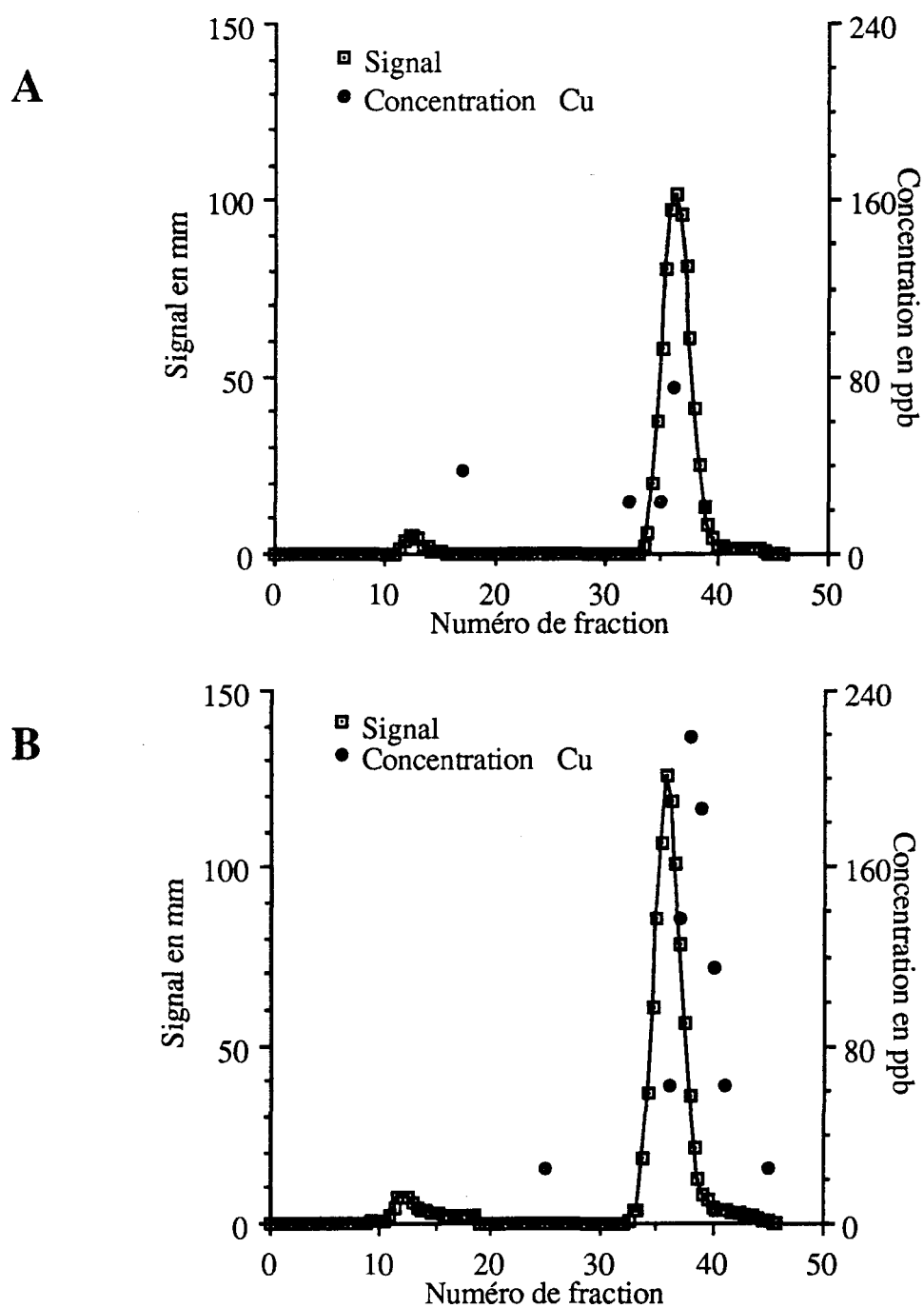
Les chromatogrammes des protéines extraites des cellules des ballons témoin et expérimental sont présentés aux figures 10 à 15. Chaque figure présente deux (2) chromatogrammes. Le premier (en A) a été réalisé à partir des protéines extraites des cellules du ballon témoin, tandis que le second (en B) a été réalisé à partir des protéines extraites des cellules du ballon expérimental intoxiquées avec  $250 \mu\text{g de cuivre}\cdot\text{L}^{-1}$  (250 ppb). Chacune de ces figures montre aussi la quantité de cuivre associé aux différentes fractions chromatographiques qui a été retrouvée lors de l'analyse par absorption atomique. De plus, chaque figure correspond à un (1) des six (6) échantillonnages que nous avons effectués en fonction du temps suite à la contamination au cuivre de nos cellules du ballon expérimental.

Tous les tracés obtenus présentent deux (2) pics correspondant aux limites supérieure et inférieure d'exclusion de la colonne chromatographique.

#### 3.4.1 Après 12 heures

Les profils d'élution des protéines extraites après 12 heures chez les cellules du ballon témoin et chez les cellules intoxiquées du ballon expérimental sont présentés à la figure 10. Les deux (2) tracés sont sensiblement identiques et relativement superposables, bien que le





**Figure 10.** Profils d'élution des protéines extraites avec le Cu associé aux fractions chromatographiques après 12 heures. En A, chromatogramme des protéines extraites des cellules du ballon témoin; en B, chromatogramme des protéines extraites des cellules intoxiquées avec  $250 \mu\text{g de cuivre}\cdot\text{L}^{-1}$ .

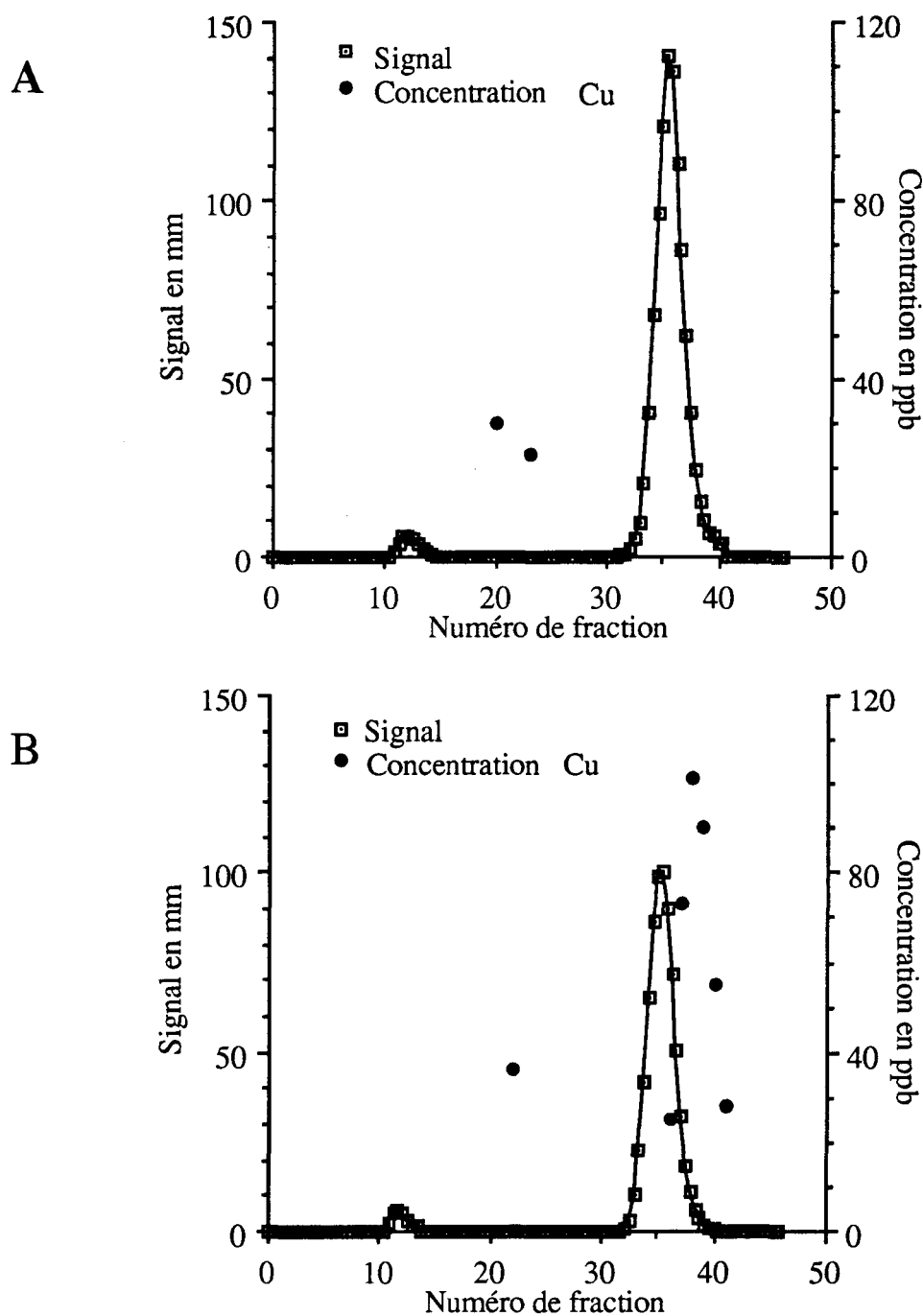
premier pic (le pic d'exclusion contenant des protéines de masse moléculaire plus élevée que la limite supérieure de séparation du gel) semble légèrement plus étendu chez les protéines extraites des cellules contaminées que chez les cellules du ballon témoin. La hauteur du signal est un peu moins élevée chez les cellules du ballon témoin que chez les cellules intoxiquées du ballon expérimental.

Au niveau des teneurs en cuivre retrouvées lors de l'analyse des fractions chromatographiques, il apparaît évident que les quantités mesurées sont plus importantes chez les cellules intoxiquées que chez les cellules du ballon témoin. De plus, chez les cellules intoxiquées, les fortes quantités de cuivre, 62 ppb et plus, se retrouvent exclusivement dans les fractions 36 à 41.

#### 3.4.2 Après 84 heures

Les deux (2) tracés (figure 11) sont, à prime abord, relativement identiques et superposables, bien que la hauteur du signal chez les cellules du ballon témoin soit légèrement plus élevée que celle des cellules du ballon expérimental.

Les protéines extraites des cellules du ballon témoin ne présentent que deux (2) fractions chromatographiques où le cuivre a été retrouvé, les fractions 20 et 23 avec respectivement 30 et 23 ppb de cuivre. Chez les cellules intoxiquées du ballon expérimental, les teneurs retrouvées sont plus importantes et concentrées au niveau des fractions 36 à 41 (la seule exception, la fraction 22 avec 36 ppb de cuivre).



**Figure 11. Profils d'élution des protéines extraites avec le Cu associé aux fractions chromatographiques après 84 heures. En A, chromatogramme des protéines extraites des cellules du ballon témoin; en B, chromatogramme des protéines extraites des cellules intoxiquées avec 250  $\mu\text{g}$  de cuivre- $\text{L}^{-1}$ .**

### 3.4.3 Après 156 heures

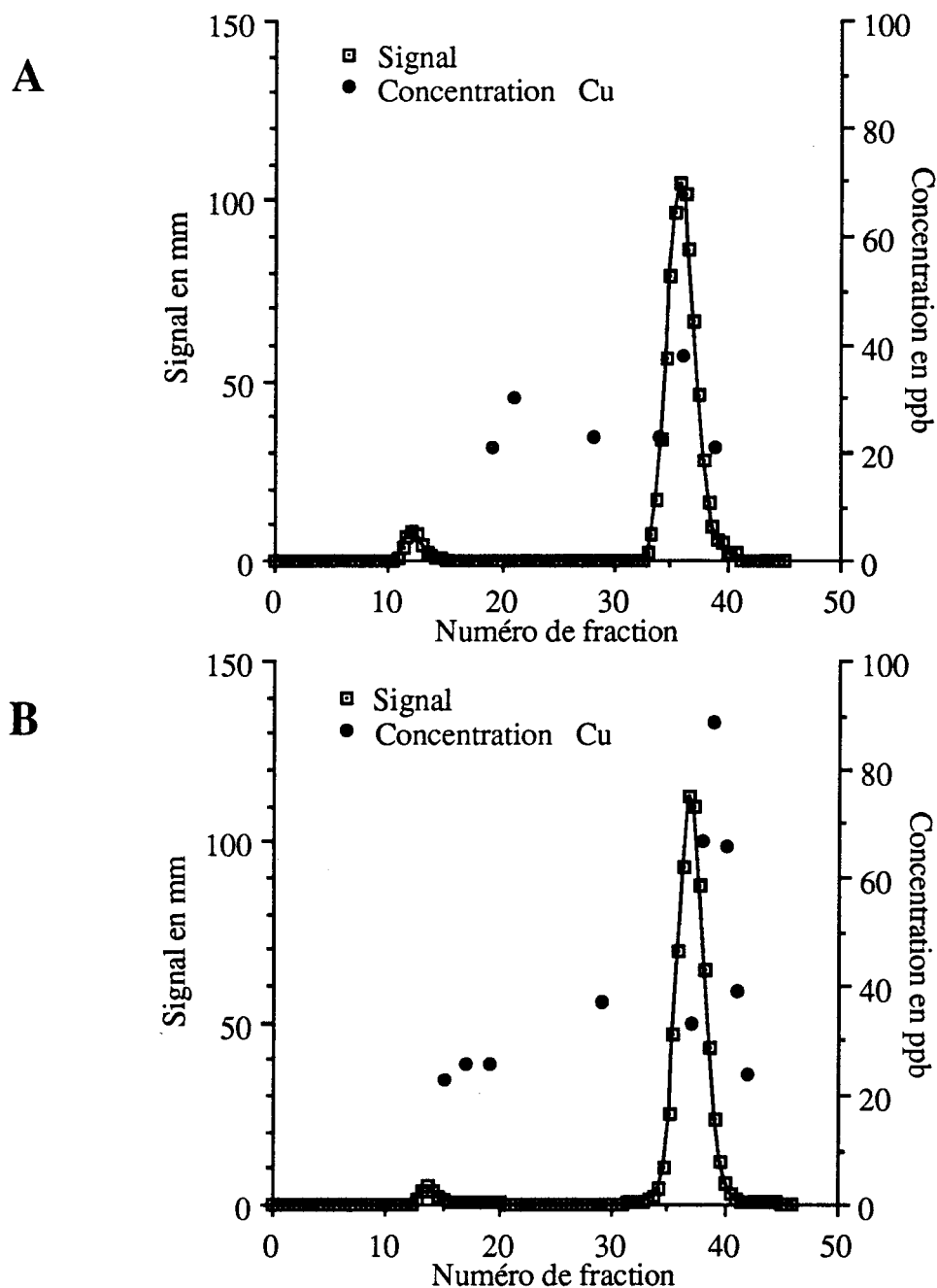
Les chromatogrammes réalisés à partir des protéines extraites des cellules du ballon témoin et expérimental après 156 heures sont présentés à la figure 12. Au niveau des profils, les deux (2) chromatogrammes apparaissent quasiment identiques, et sont, de ce fait, superposables.

Six (6) fractions chromatographiques des cellules du ballon témoin contiennent du cuivre, dans des quantités variant entre 21 et 38 ppb. La distribution du cuivre ne semble pas restreinte à un ensemble de fractions en particulier. Chez les cellules intoxiquées, la distribution du cuivre semble être plus regroupée et la concentration plus importante dans les fractions 37 à 42, bien que du cuivre ait été retrouvé dans quelques autres fractions, c'est-à-dire dans les fractions numéro 15, 17, 19 et 29.

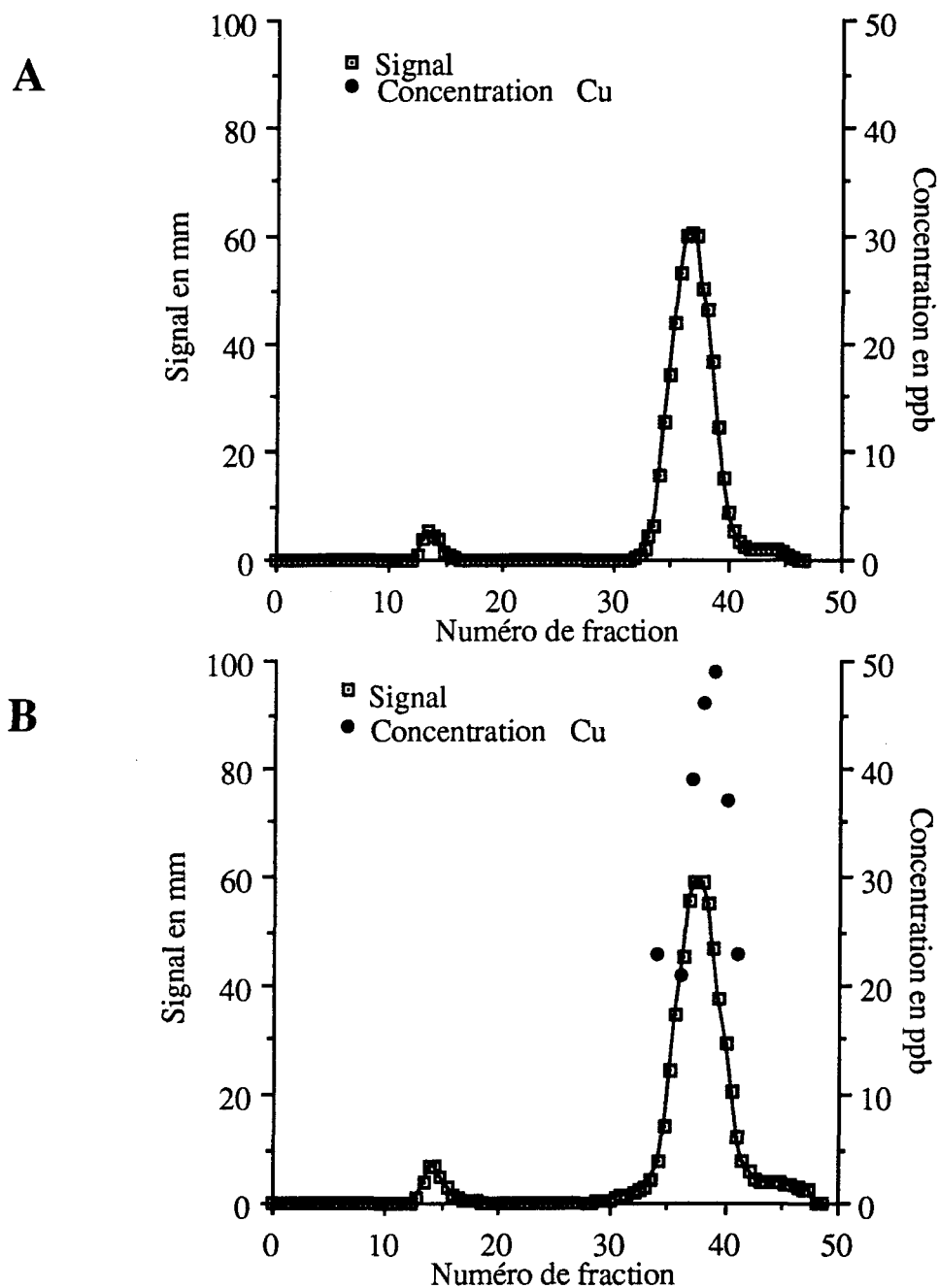
### 3.4.4 Après 324 heures

La figure 13 présente les profils d'élution des protéines extraites des cellules du ballon témoin et du ballon expérimental après 324 heures. Les deux (2) tracés obtenus sont très semblables et superposables, tant au niveau des temps de sortie, en numéros de fraction, que de la hauteur des signaux enregistrés lors des chromatographies.

Au niveau du contenu en cuivre des différentes fractions chromatographiques, nous constatons que les protéines des cellules du ballon témoin ne contiennent pas de cuivre, à tout le moins, en quantité détectable.



**Figure 12.** Profils d'élution des protéines extraites avec le Cu associé aux fractions chromatographiques après 156 heures. En A, chromatogramme des protéines extraites des cellules du ballon témoin; en B, chromatogramme des protéines extraites des cellules intoxiquées avec  $250 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de cuivre.



**Figure 13. Profils d'élution des protéines extraites avec le Cu associé aux fractions chromatographiques après 324 heures. En A, chromatogramme des protéines extraites des cellules du ballon témoin; en B, chromatogramme des protéines extraites des cellules intoxiquées avec  $250 \mu\text{g de cuivre}\cdot\text{L}^{-1}$ .**

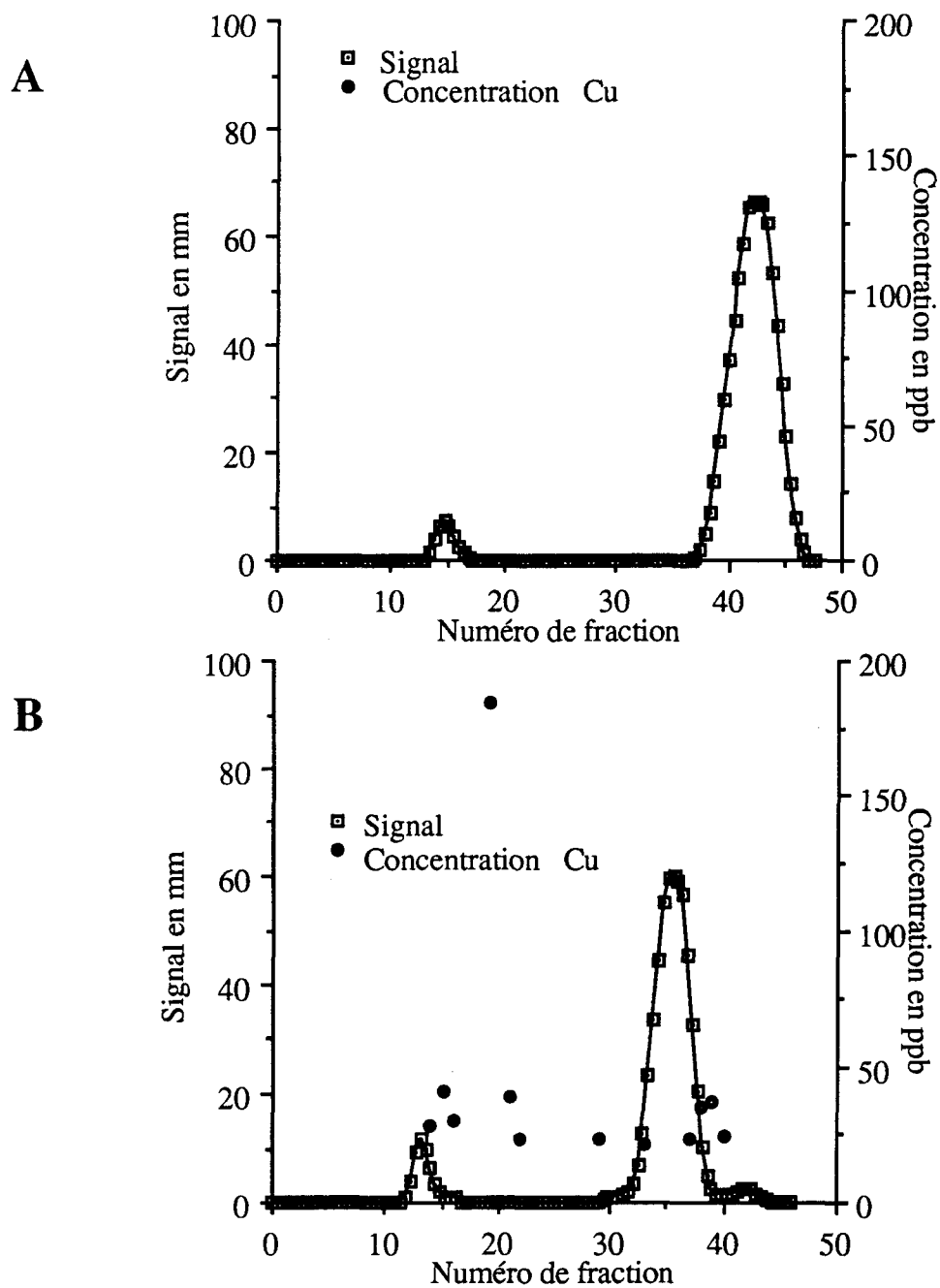
Par contre, pour les protéines extraites des cellules du ballon expérimental, nous retrouvons la presque totalité du cuivre distribuée dans un ensemble limité de fractions, les fractions 36 à 41. La seule exception est la fraction 34 qui contient une teneur en cuivre évaluée à 23 ppb.

#### 3.4.5 Après 516 heures

Les chromatogrammes obtenus à partir des protéines extraites des cellules du ballon témoin et celles du ballon expérimental après 516 heures sont présentés à la figure 14. Contrairement à l'ensemble des paires de chromatogrammes que nous avons analysés précédemment, les tracés enregistrés lors de la 516<sup>ième</sup> heure ne sont pas superposables quant à leur temps de rétention (en numéro de fraction). En effet, les temps de sortie des deux (2) pics du chromatogramme des cellules du ballon témoin sont décalés vers la droite du tracé par rapport aux pics enregistrés lors de la chromatographie des protéines extraites des cellules du ballon expérimental. La hauteur du signal enregistré est cependant très comparable pour les deux (2) conditions de culture.

Aucune fraction chromatographique des protéines extraites des cellules du ballon témoin ne contenait une quantité détectable de cuivre.

Pour les protéines extraites des cellules contaminées, nous retrouvons une certaine quantité de cuivre dans trois (3) ensembles de fractions, que l'on peut regrouper comme suit: les fractions 37 à 40, les fractions 21 et 22 ainsi que les fractions 14 à 16. La plus longue séquence de fractions contenant du cuivre est celle s'étendant entre les fractions 37 à 40



**Figure 14.** Profils d'élution des protéines extraites avec le Cu associé aux fractions chromatographiques après 516 heures. En A, chromatogramme des protéines extraites des cellules du ballon témoin; en B, chromatogramme des protéines extraites des cellules intoxiquées avec  $250 \mu\text{g}$  de cuivre $\cdot\text{L}^{-1}$ .



(séquence de 4 fractions). De plus, quelques fractions isolées contiennent, elles aussi, des quantités détectables de cuivre (fractions 19, 29 et 33).

#### 3.4.6 Après 732 heures

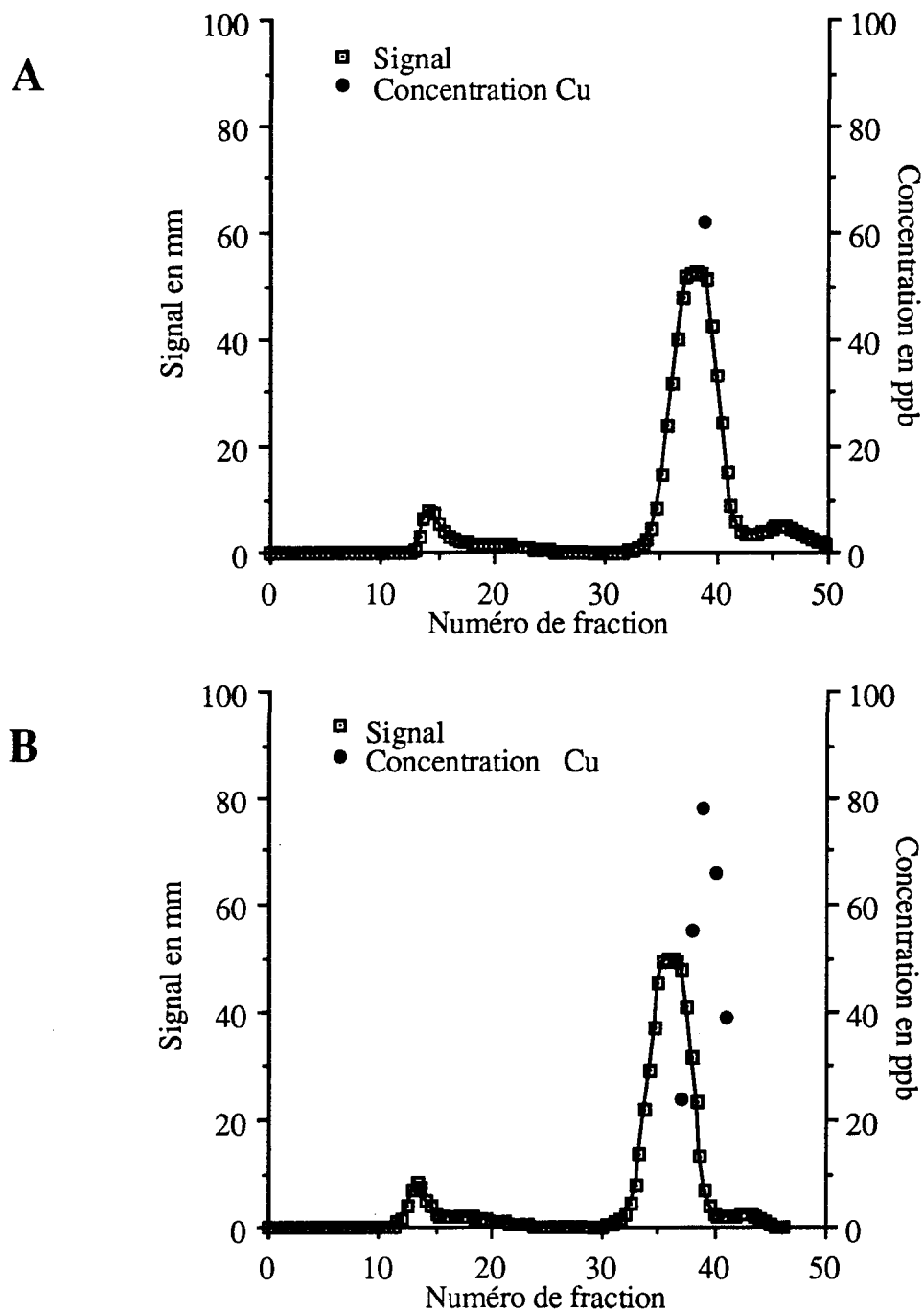
Les deux (2) tracés de la figure 15 apparaissent comme étant relativement bien superposables l'un par rapport à l'autre; les différents temps de sortie sont donc quasiment les mêmes pour les deux (2) chromatographies. De plus, la hauteur des signaux enregistrés est comparable dans les deux (2) cas.

Une seule fraction provenant de la chromatographie des protéines extraites des cellules du ballon témoin contient du cuivre; il s'agit de la fraction 39, laquelle contient 62 ppb de cuivre.

Avec les protéines extraites des cellules contaminées du ballon expérimental, une séquence de fractions contenant du cuivre est retrouvée: elle s'étend de la fraction 37 à la fraction 41.

### 3.5 Corrélation entre la quantité de cuivre retrouvée dans les fractions chromatographiques et le temps

Nous avons tenté de vérifier s'il pouvait exister une corrélation entre la quantité de cuivre retrouvée dans les fractions chromatographiques et le temps d'échantillonnage, c'est-à-dire le temps suite à la contamination continue de notre ballon expérimental avec  $250 \mu\text{g}$  de cuivre·L<sup>-1</sup>.



**Figure 15.** Profils d'élution des protéines extraites avec le Cu associé aux fractions chromatographiques après 732 heures. En A, chromatogramme des protéines extraites des cellules du ballon témoin; en B, chromatogramme des protéines extraites des cellules intoxiquées avec  $250 \mu\text{g de cuivre}\cdot\text{L}^{-1}$ .

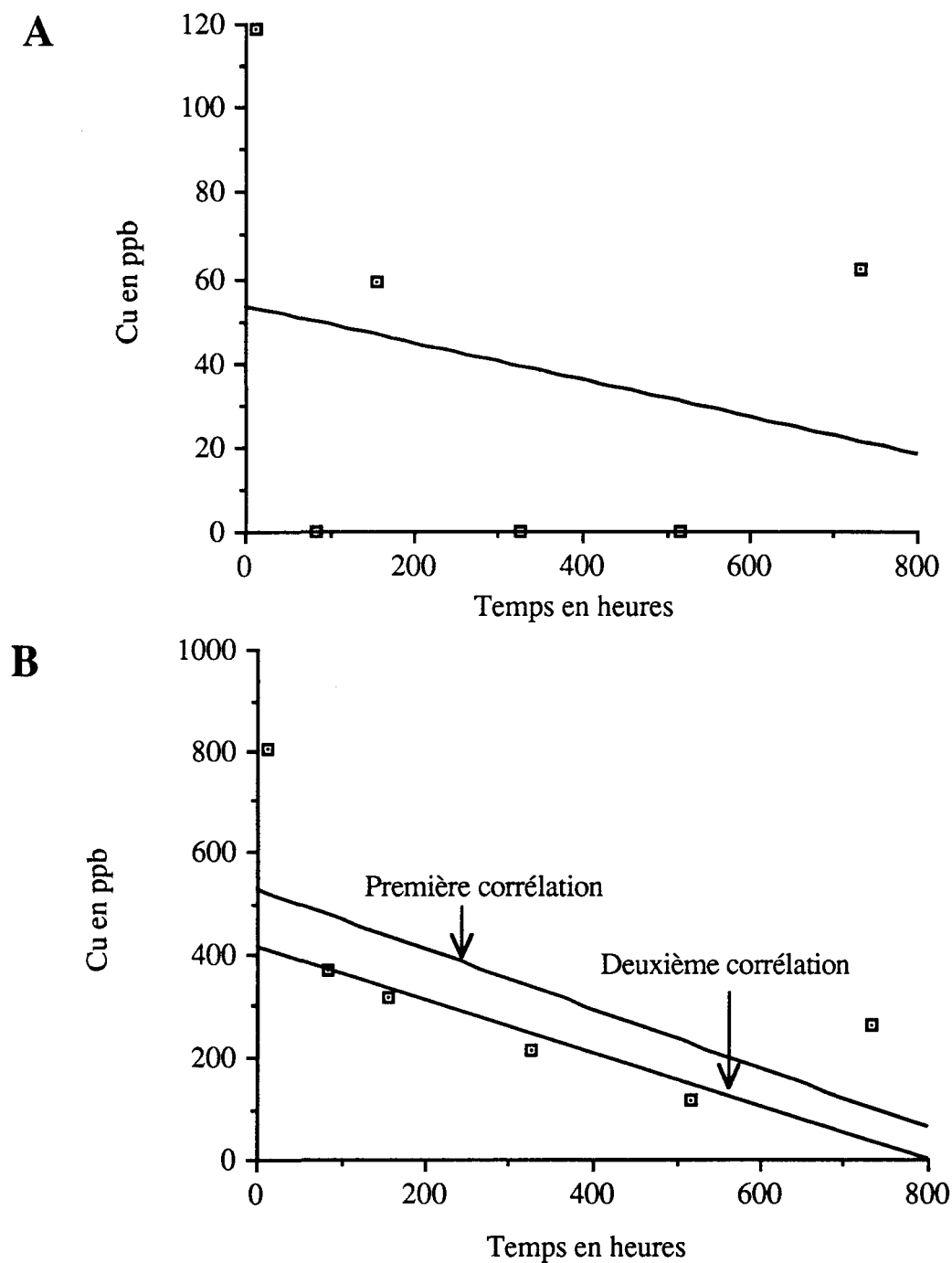
À prime abord, lorsque nous regardons l'ensemble des figures 10 à 15, nous constatons qu'en général, les plus grandes quantités de cuivre retrouvées le sont lors de la première série de mesures, c'est-à-dire après 12 heures et ce, pour les protéines extraites des cellules contaminées du ballon expérimental. De façon générale, les quantités de cuivre mesurées dans les protéines extraites des cellules du ballon témoin sont toujours plus faibles que celles mesurées à partir des protéines extraites des cellules contaminées du ballon expérimental. Après une période de 324 et 516 heures, aucune quantité de cuivre n'a été détectée chez les protéines extraites des cellules du ballon témoin.

À l'aide des deux (2) courbes d'étalonnage que nous avons réalisées pour les deux (2) colonnes chromatographiques que nous avons montées, nous avons évalué les masses moléculaires des protéines contenues dans les fractions chromatographiques 35 et 45, ceci afin de restreindre nos calculs aux fractions chromatographiques où les phytochélatines sont susceptibles de se retrouver. Selon Kagī et Kojima (1987), les phytochélatines sont des structures oligomériques composées de deux (2) ou plusieurs chaînes pesant entre 500 et 2 000 daltons, selon leur provenance. D'après l'étalonnage de nos colonnes chromatographiques, les fractions 35 à 45 comprennent des molécules de masse moléculaire comprise entre 2 500 et 500 daltons. C'est d'ailleurs dans cet ensemble de fractions que nous retrouvons les plus grandes quantités de cuivre chez les protéines extraites des cellules du ballon expérimental. Il est à noter que nous avons procédé par extrapolation des courbes d'étalonnage pour obtenir les masses moléculaires situées en dehors des limites d'exclusion du gel.

Ainsi, si nous additionnons toutes les valeurs de cuivre retrouvées dans les fractions 35 à 45 et que nous traçons cette valeur totale en fonction du temps d'échantillonnage, nous pouvons obtenir une corrélation et un coefficient  $R^2$  qui nous informe sur la qualité de cette relation.

Il apparaît que pour les protéines extraites des cellules du ballon témoin, la quantité totale de cuivre retrouvée dans l'ensemble des fractions 35 à 45 n'est pas corrélée en fonction du temps de récolte des cellules (figure 16A). La quantité totale de cuivre retrouvée n'est donc pas ou peu reliée avec le temps d'échantillonnage de nos cellules témoins.

Cependant, lorsque nous considérons les valeurs relatives aux protéines extraites des cellules du ballon expérimental, le coefficient de corrélation obtenu (0,447) est sensiblement plus élevé et le lien entre les 2 variables devient par le fait même plus significatif (figure 16B, première corrélation). De plus, si nous refaisons le même exercice pour les quatre (4) points centraux (pour les temps d'échantillonnage 84, 156, 324 et 516<sup>ième</sup> heure), nous obtenons une valeur aussi élevée que 0,997 (figure 16B, deuxième corrélation)



**Figure 16.** Quantité totale de cuivre retrouvée pour l'ensemble des fractions chromatographiques 35 à 45 en fonction du temps. En A, dans les protéines extraites des cellules du ballon témoin,  $R^2 = 0,063$ . En B, dans les protéines extraites des cellules du ballon expérimental, premier  $R^2 = 0,447$ ; deuxième  $R^2 = 0,997$ .

#### 4.1 Variations temporelles de la densité cellulaire

À la figure 6, nous constatons, suite à l'inoculation de nos deux (2) ballons, que la concentration cellulaire a légèrement augmenté durant les 100 premières heures de l'expérience. Il semble que le ballon expérimental n'ait pas subi une période de latence ou de diminution de sa densité cellulaire, ce qui est parfois observé lors de l'inoculation de cultures en milieu contaminé. Ainsi, Bastien et Côté (1989b) ont observé une diminution de la densité cellulaire de *S. quadricauda* suite à son inoculation dans un milieu contenant 250 µg de cuivre·L<sup>-1</sup>. L'utilisation de cultures continues par ces auteurs, permet davantage la comparaison avec les résultats que nous obtenons, puisque nous avons employé la même technique. Cependant, il semble que dans notre cas, les cellules contaminées n'ont pas réussi à s'adapter à cette concentration de cuivre. Nous avons dû maintenir le taux de dilution de notre ballon expérimental plus bas que celui du ballon témoin à partir de la 456<sup>ième</sup> heure de l'expérience. Une légère augmentation de la densité cellulaire du ballon expérimental est observée deux (2) jours après ce réajustement du débit, puis la densité semble se maintenir jusqu'à la fin de l'expérience. Ceci nous a permis de maintenir une concentration cellulaire assez importante afin d'obtenir une quantité suffisante de cellules lors des différents échantillonnages.

Il faut noter que la connaissance de la densité cellulaire était pour nous une indication de la condition physiologique de nos cultures. Le but de cette étude n'étant pas de démontrer l'effet du cuivre sur la densité cellulaire de cultures de *S. quadricauda* exposée à  $250 \mu\text{g}$  de cuivre $\cdot\text{L}^{-1}$ , il faut donc accepter cette information comme étant additionnelle et complémentaire.

La densité cellulaire du ballon témoin subit de grandes fluctuations temporelles à partir de la 250<sup>ième</sup> heure environ; une partie de ces fluctuations, de même que celles observées pour le ballon expérimental, peuvent être attribuables à un colmatage par des cellules sur l'ensemble de la tubulure utilisée et à une adhésion des cellules sur les parois des ballons de culture. Bastien (1986) précise que l'utilisation de cultures continues constitue un stress additionnel qui vient amplifier l'effet du cuivre dans le ballon expérimental.

#### 4.2 Variations temporelles du pH

La mesure quotidienne des valeurs de pH dans chacun de nos ballons constitue une donnée complémentaire que nous avons jugée bon de connaître. En effet, une baisse ou une augmentation drastique du pH aurait peut-être pu expliquer les variations de la densité cellulaire de nos ballons. À la suite d'une comparaison visuelle des courbes des figures 6 et 7, aucun lien ne peut être fait en ce sens. Ainsi, la diminution de la densité cellulaire de notre ballon expérimental est continue entre la 276<sup>ième</sup> heure et la 420<sup>ième</sup> heure et ne peut pas être reliée à des fluctuations majeures du pH.

La biodisponibilité et la toxicité d'un métal en solution sont grandement affectées par le pH (Wong, 1987) et l'assimilation du cuivre par les algues dans un milieu aqueux est hautement dépendante du pH (Fernandes et Henriques, 1991). Selon ces deux (2) derniers auteurs, l'assimilation du cuivre augmente de façon marquée avec une augmentation des valeurs de pH entre 4 et 7. De plus, une augmentation de l'acidité décroît l'assimilation des métaux et, par conséquent, les effets des métaux sur la cellule (Schenck *et al.*, 1988).

Les valeurs de pH notées pour le ballon témoin (figure 7) démontrent de grandes fluctuations, principalement en milieu basique. Généralement, le pH du ballon témoin est basique, et par ce fait, rend le cuivre du milieu de culture plus difficilement accessible aux algues. En effet, à un pH plus grand que 7, l'assimilation du cuivre diminue (Fernandes et Henriques, 1991). Cette diminution de l'assimilation serait attribuable à la libération de matériel organique capable de complexer le cuivre (Fernandes et Henriques, 1991).

Le pH du ballon expérimental connaît aussi quelques fluctuations, mais à une échelle plus réduite. Le pH se maintient autour du point de neutralité, ce qui est recommandé avec l'utilisation du milieu Woods Hole MBL (Stein, 1973). De plus, l'utilisation d'un milieu de culture sans agent chélateur augmente l'action toxique du cuivre (Sunda et Guillard, 1976). Marquis (1989) note que les valeurs de pH de cultures en lots, contaminées avec du cadmium, se maintiennent généralement entre 6,0 et 7,0.



Bien que la majorité des cœnobiums du ballon expérimental contenaient quatre (4) cellules, plusieurs n'en contenaient qu'une (1) ou deux (2). Nous savons que la présence de cellules solitaires chez les populations naturelles est souvent associée à une diminution marquée du milieu en éléments nutritifs (Shubert et Trainor, 1974). Dans le présent cas, la technique de culture utilisée, par un apport constant de milieu, devrait permettre aux éléments nutritifs d'être à des niveaux adéquats pour favoriser la croissance. Ainsi, les cellules solitaires ou pairées que nous avons observées seraient, non pas le résultat d'un manque d'éléments nutritifs, mais le résultat de l'effet toxique du cuivre.

#### 4.4 Chromatogrammes des protéines extraites

La plupart des expériences visant à mettre en évidence la synthèse de protéines complexantes chez différentes espèces végétales, appelées aussi phytochélatines (Grill *et al.*, 1985a), phytométallothionéines (Fowler *et al.*, 1987), poly( $\gamma$ -glutamylcystéinyl)glycine ou ( $\gamma$ EC)<sub>n</sub>G (Robinson, 1989), utilisent des techniques de culture en lot, ce qui restreint la durée de ces expérimentations. Aussi, dans la plupart des cas, les cultures cellulaires sont soumises à une intoxication à un métal lourd quelconque (souvent le cadmium) et la récolte des échantillons pour leur analyse est faite après quelques jours de croissance (Grill *et al.*, 1985b et 1987; Gekeler *et al.*, 1989). Pour apporter une nouvelle approche dans ce domaine de recherche, nous avons effectué six (6) échantillonnages en fonction du temps suite à la contamination des cellules du ballon expérimental en utilisant une technique de culture continue.

L'ensemble des chromatogrammes que nous avons réalisés, ainsi que les teneurs en cuivre des différentes fractions chromatographiques que nous avons mesurées, constituent les résultats les plus intéressants (figures 10 à 15).

Au niveau des signaux enregistrés lors du passage des protéines dans le détecteur photométrique, nous notons de légères variations de la hauteur du signal d'un chromatogramme à l'autre. La remise en solution dans le tampon Tris-HCl des protéines lyophilisées a nécessité une centrifugation afin d'éliminer les débris non-remis en solution. Ainsi, d'un échantillon à l'autre, la quantité totale de protéines contenues dans la boucle d'injection de la colonne chromatographique a pu varier, ce qui expliquerait les différences dans la hauteur des signaux enregistrés, et ce, pour l'ensemble des chromatogrammes réalisés. Nous savons que la hauteur du signal est une indication de la quantité de protéines présentes; cependant, cette donnée ne peut être prise en considération pour l'évaluation de la quantité totale de protéines.

La présence d'un pic isolé correspondant à des protéines complexant le cuivre chez les échantillons expérimentaux n'a pas été notée. Nous croyons que l'utilisation d'un gel pouvant séparer des masses moléculaires plus petites aurait peut-être pu permettre cette distinction.

Par contre, les mesures de la teneur en cuivre de nos fractions chromatographiques indiquent clairement que les protéines extraites des cellules du ballon témoin contiennent des quantités beaucoup plus faibles de cuivre que celles provenant des protéines extraites des cellules du ballon expérimental. Cependant, comme le cuivre est un élément en trace seulement dans le milieu de culture, il est normal de ne pas le détecter en grande quantité dans

les protéines extraites des cellules du ballon témoin. Une certaine constance est observée dans la localisation du cuivre détecté dans les protéines extraites des cellules du ballon expérimental. Les quantités les plus importantes de cuivre que nous avons retrouvées et qui étaient associées aux protéines extraites des algues du ballon expérimental, sont concentrées au niveau des fractions 36 à 42.

Aucune constance dans la localisation du cuivre mesuré dans les fractions chromatographiques des protéines extraites des cellules du ballon témoin n'a pu être observée. Cette présence de cuivre dans les fractions chromatographiques des protéines extraites des cellules du ballon témoin peut être expliquée de différentes façons.

Premièrement, le milieu de culture du ballon témoin contient aussi du cuivre. Certains auteurs (Grill *et al.*, 1988; Robinson, 1989; Grill, 1989) ont parlé du rôle joué par les protéines complexantes dans l'homéostasie des ions métalliques. Certains auteurs (*e.g.* Tomsett et Thurman, 1988), traitant de la tolérance des plantes aux ions métalliques, insistent aussi sur le fait que, tout comme chez les animaux supérieurs, les protéines complexant les métaux lourds, ont une fonction dans la régulation de la disponibilité des métaux dans les processus cellulaires. Les métallothionéines ne seraient pas qu'un simple système de détoxification mais seraient aussi impliquées dans le contrôle du métabolisme cellulaire normal et dans les adaptations cellulaires au stress (Karin, 1985). Il serait donc possible que le cuivre détecté dans les fractions chromatographiques des protéines extraites des cellules du ballon témoin ait été associé à des complexes protéiniques différents et/ou semblables à ceux des cellules du ballon expérimental.

Deuxièmement, il ne faudrait pas sous-estimer la possibilité que nos échantillons provenant du ballon témoin ou du ballon expérimental, aient pu subir une certaine contamination. Cela expliquerait, en partie, la présence de cuivre retrouvé de façon isolée dans les fractions chromatographiques des protéines extraites des algues provenant du ballon témoin.

Certains auteurs ont déjà noté que lors de l'extraction et de la purification des composés liant les métaux lourds (phytochélatines), il est possible que certains de ces composés subissent des réactions d'oxydo-réduction (Verkleij *et al.*, 1989; Verkleij, 1990), ce qui a pour effet possible, d'entraîner la perte de l'ion métallique, phénomène plus fréquent avec les composés liant le cuivre. L'utilisation du 2-mercaptoéthanol lors de l'ouverture des cellules et de la remise en suspension de nos protéines lyophilisées visait à contrer cet inconvénient.

Nos résultats montrent que le cuivre se retrouve dans les fractions 36 à 42 des fractions chromatographiques des protéines extraites des cellules provenant du ballon expérimental. Nous savons que ces fractions correspondent à des masses moléculaires comprises entre 2 100 et 800 daltons d'après l'étalonnage de nos colonnes chromatographiques, les masses moléculaires inférieures à 1,5 kDa ont été estimées par extrapolation. Ces masses moléculaires semblent assez faibles, par rapport à ce que d'autres chercheurs ont réussi à extraire à partir de différentes espèces phytoplanctoniques. Ainsi, avec *Scenedesmus acutiformis*, Stokes (1977) a évalué la masse moléculaire d'une protéine liant le cuivre à 10 000 daltons. Pour leur part, Nagano et ses collaborateurs (1984) ont estimé la masse moléculaire d'une protéine isolée à partir de cultures de *Chlorella ellipsoidea*, suite à une intoxication au cadmium, à 9 000 daltons. Par contre, Wagner

(1984) a démontré, chez *Brassica capitata* qui est une plante supérieure, la présence de protéines liant le cadmium de masse moléculaire d'environ 2 000 daltons, et ce, sous conditions dénaturantes. Chez une autre plante supérieure, *Datura innoxia*, la masse moléculaire du complexe peptidique a été évaluée à 776 daltons, toujours sous conditions dénaturantes (Robinson *et al.*, 1987).

Ainsi, les masses moléculaires obtenues pour les protéines que nous avons isolées sont tout de même concordantes avec plusieurs auteurs. Le cuivre présent dans les fractions chromatographiques constitue la meilleure indication que nous possédons pour justifier la présence de protéines complexantes chez *Scenedesmus quadricauda* suite à une intoxication au cuivre.

Les constatations que nous venons de faire s'adressent à l'ensemble des chromatogrammes ainsi qu'aux mesures d'absorption atomique que nous avons réalisés. Avant de discuter l'ensemble des résultats que nous avons obtenus dans une perspective temporelle, nous allons nous attarder à chacun des différents temps d'échantillonnage que nous avons effectué.

#### 4.4.1 Après 12 heures

D'après les résultats obtenus (figure 10), les cellules provenant du ballon expérimental possèdent une protéine (peptide) de masse moléculaire comprise entre 2 100 et 1000 daltons à laquelle la majorité du cuivre est associée (fractions 36 à 41). Bien que les cellules provenant du ballon témoin n'aient pu accumuler autant de cuivre que celles du ballon expérimental, puisque celui-ci était disponible en moins grande quantité, il n'est pas possible

d'établir une séquence de fractions où le cuivre serait concentré, comme c'est le cas pour les protéines provenant des cellules du ballon expérimental.

Une accumulation de peptides de type  $(\gamma\text{EC})_n\text{G}$  apparaît rapidement chez les cellules de *Schizosaccharomyces pombe* suivant l'exposition à des concentrations élevées de métal (Grill *et al.*, 1986a). Robinson et Thurman (1986) notent la présence d'un complexe liant le cuivre dans les racines de *Mimulus guttatus* cinq (5) heures après l'exposition au métal lourd. Chez des cultures cellulaires de plantes supérieures, la présence de  $(\gamma\text{EC})_n\text{G}$  est détectée cinq (5) minutes après une exposition au cadmium (Robinson, 1989). Il est donc probable et possible que les protéines que nous avons extraites des cellules du ballon expérimental soient des protéines complexantes de type  $(\gamma\text{EC})_n\text{G}$ , puisque la majorité du cuivre retrouvée y était associée. La synthèse de phytochélatines serait donc un mécanisme rapidement mis en oeuvre pour contrer les effets nocifs du cuivre présent en quantité supraoptimale dans le ballon expérimental. Étant des métabolites secondaires (Robinson, 1989), les  $(\gamma\text{EC})_n\text{G}$  ne seraient pas des substances induites par l'expression d'un gène quelconque (Grill *et al.*, 1985b, 1986b et 1987; Gekeler *et al.*, 1988), mais seraient le résultat de la polymérisation enzymatique d'un précurseur peptidique, possiblement le glutathion (Gekeler *et al.*, 1988). Les phytochélatines peuvent être vues comme étant des polymères linéaires de la portion  $\gamma\text{-Glu-Cys}$  du glutathion (Grill *et al.*, 1985a).

#### 4.4.2 Après 84 heures

Deux (2) fractions chromatographiques renferment des teneurs en cuivre détectables chez les protéines extraites des cellules provenant du ballon témoin (figure 11). Une séquence de six (6) fractions, les fractions 36 à 41, contenant du cuivre est retrouvée chez les

protéines extraites des cellules du ballon expérimental, exactement la même séquence que pour les protéines extraites des cellules du ballon expérimental après 12 heures. Les quantités de cuivre mesurées à partir des protéines provenant des cellules du ballon expérimental sont plus importantes que dans le cas des protéines extraites des cellules du ballon témoin. Les cellules du ballon expérimental possèdent des peptides de masse moléculaire comprise entre 2 100 et 1000 daltons auxquels la majorité du cuivre détecté était associée, ce qui laisse supposer que ces protéines lient le cuivre.

Si nous comparons les teneurs en cuivre mesurées après 84 heures avec celles mesurées après 12 heures d'intoxication, nous observons une diminution dans la quantité de cuivre. Nous pouvons supposer que la quantité de phytochélatines serait, elle aussi, plus faible après 84 heures d'intoxication qu'après 12 heures. Chez des cultures cellulaires de *Datura innoxia* intoxiquées au cadmium, la concentration de  $(\gamma\text{EC})_n\text{G}$  augmente en fonction du temps pour une période de 48 heures (Delhaize *et al.*, 1989). Il faut noter que notre deuxième échantillonnage a eu lieu 84 heures après le début de l'exposition de nos cellules au cuivre. Grill et ses collaborateurs (1985b) ont remarqué que la quantité du complexe phytochélatine-cadmium semble avoir atteint une concentration maximale après environ 48 heures d'exposition pour demeurer par la suite relativement constante, puis baisser légèrement après 96 heures. Il est donc possible que, dans notre cas, nous ayons mesuré, lors de notre premier échantillonnage, la quantité maximale de cuivre associée aux phytochélatines et que notre deuxième échantillonnage montre déjà une baisse de la présence du complexe protéine-métal lourd. Gupta et Goldsbrough (1990) ont obtenu une concentration maximale de phytochélatines quatre (4) jours après l'inoculation de cultures cellulaires en lot de *Lycopersicon esculentum* dans un milieu contenant du cadmium. Par la suite, la concentration en phytochélatines a diminué pour devenir nulle après 12 jours (288

heures). Ces auteurs notent que la quantité maximale de cadmium détectée dans les cellules a, elle aussi, atteint son maximum après quatre (4) jours de culture. Par la suite, tout comme pour la concentration en phytochélatines, la concentration intracellulaire en cadmium a continué à diminuer.

#### 4.4.3 Après 156 heures

Les mesures d'absorption atomique effectuées à partir des fractions chromatographiques des protéines extraites des cellules du ballon témoin présentent des teneurs en cuivre généralement plus faibles que celles provenant des protéines extraites des cellules du ballon expérimental (figure 12). Il n'existe pas non plus de séquence de plusieurs fractions contenant des teneurs élevées en cuivre, comme c'est le cas pour les fractions provenant des cellules du ballon expérimental, c'est-à-dire la séquence s'étendant des fractions 37 à 42. La masse moléculaire des protéines appartenant à cette séquence de fractions varie entre 1 800 et 800 daltons.

Il est fort probable que nos échantillons témoin et expérimentaux aient été légèrement contaminés, ce qui expliquerait les teneurs de cuivre retrouvées dans quelques fractions isolées.

Nous constatons, après 156 heures d'intoxication, que les teneurs en cuivre mesurées à partir des fractions chromatographiques des protéines extraites des cellules du ballon expérimental sont moins élevées que celles mesurées après 84 heures d'intoxication. Aussi, est-il possible de supposer que la quantité de protéines liant le cuivre a diminué par rapport au précédent échantillonnage, puisque les teneurs en cuivre retrouvées sont moins importantes



qu'après 84 heures d'intoxication? Comme nous l'avons mentionné précédemment, les travaux de Gupta et Goldsbrough (1990) démontrent que la quantité totale de phytochélatines, exprimées en mmol de  $\gamma$ -Glu-Cys par kg de cellules, diminue en fonction du temps après avoir atteint un maximum de concentration quatre (4) jours après l'inoculation en milieu contaminé. Douze (12) jours après l'inoculation, ils n'ont enregistré aucune concentration détectable de  $\gamma$ -Glu-Cys. D'après ces résultats, il est donc probable qu'effectivement, la concentration en phytochélatines de nos cellules contaminées ait diminué par rapport à notre deuxième temps d'échantillonnage.

#### 4.4.4 Après 324 heures

Chez les protéines extraites des cellules du ballon témoin, aucune concentration en cuivre n'a été détectée (figure 13). Par contre, une séquence de plusieurs fractions, les fractions 36 à 41, contenaient du cuivre chez les protéines extraites des cellules du ballon expérimental. Ces fractions, les mêmes que pour les temps d'échantillonnage 12 et 84 heures, renferment des protéines de masses moléculaires comprises entre 2 100 et 1 000 daltons. Ainsi, il semble que le cuivre présent dans les fractions chromatographiques était associé à des peptides de faible masse moléculaire, peptides pouvant être des phytochélatines.

Nous remarquons que les quantités de cuivre retrouvées diminuent encore une fois par rapport au dernier temps d'échantillonnage qui a eu lieu 156 heures après le début de l'intoxication. Nous présumons que la synthèse de protéines complexantes a diminué elle aussi, ce qui expliquerait les plus faibles teneurs en cuivre.

#### 4.4.5 Après 516 heures

La figure 14 présente les tracés obtenus pour les chromatographies et les mesures de teneurs en cuivre des échantillons témoin et expérimental après 516 heures d'intoxication.

Au niveau des tracés chromatographiques, nous constatons un décalage entre le tracé obtenu à partir des protéines extraites des cellules du ballon témoin et celui obtenu à partir des protéines extraites des cellules du ballon expérimental. Il apparaît que ces deux (2) tracés sont non-superposables, contrairement à toutes les autres paires de tracés que nous avons obtenues. Il est probable qu'un problème d'intégration au niveau du temps des tracés soit à l'origine de ce fait. Il est possible, en effet, qu'une variation ou une évaluation inadéquate du débit de la pompe péristaltique ait engendré les résultats que nous obtenons. Il apparaît que le deuxième pic du tracé chromatographique réalisé à partir des protéines extraites des cellules du ballon expérimental ait été décalé d'environ 10% par rapport à celui réalisé à partir des protéines extraites des cellules du ballon témoin. Si nous ramenons ce dernier pic à la fraction 42, nous constatons que l'ensemble du chromatogramme devient superposable. Cela semble bel et bien indiquer que nous avons eu des problèmes de stabilité au niveau du débit d'éluant. Une baisse de tension pourrait avoir modifié à notre insu, le débit de la pompe péristaltique, ce qui a entraîné les conséquences que nous connaissons.

Aucune teneur en cuivre n'a été détectée chez les protéines extraites des cellules du ballon témoin. Par contre, chez les protéines extraites des cellules du ballon expérimental, nous retrouvons, en plus de la séquence s'étendant de la fraction 37 à 40, une nouvelle séquence de fractions, celle-là s'étendant de la fraction 14 à la fraction 16. Ce dernier ensemble de fractions contient des protéines de masse moléculaire comprise entre 70 kDa et

51 kDa, ces masses moléculaires sont donc situées au-delà des limites d'exclusion du gel. De plus, quelques autres fractions isolées contiennent de faibles teneurs en cuivre.

La masse moléculaire des protéines présentes dans la séquence de fractions 37 à 40 varie entre 1800 et 1100 daltons. Ces peptides de faible masse moléculaire pourraient bien être du type  $(\gamma\text{EC})_n\text{G}$ .

Nous remarquons aussi que les quantités de cuivre associées à la séquence de fractions 37 à 40 sont plus faibles que celles retrouvées lors du précédent échantillonnage, celui de l'heure 324, où les fractions 36 à 41 comprenaient la majorité du cuivre détecté. Il est possible que la présence de protéines complexantes ait diminué par rapport au dernier échantillonnage, ce qui expliquerait les moins grandes teneurs en cuivre détecté.

Les fractions 14 à 16 comprennent des peptides de masse moléculaire supérieure à la limite d'exclusion du gel. Il semble évident que ces protéines ne puissent être des phytochélatines, en raison de leur masse moléculaire très élevée. Rauser (1987) parle d'une masse moléculaire de 3000 daltons (sous conditions dénaturantes) pour une protéine liant le cadmium extraite de plants de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Comme nous l'avons déjà mentionné, d'autres auteurs (*e.g.* Wagner, 1984; Nagano *et al.*, 1984 et Stokes *et al.*, 1977) obtiennent des masses moléculaires faibles, c'est-à-dire comprises entre 2000 et 10000 daltons, pour des peptides de type complexant.

À la lumière de ces constatations, il demeure donc très improbable que les fractions 14 à 16 contiennent des peptides de type phytométallothionéine, et ce, dû au fait que les masses moléculaires ne correspondent pas à celles des peptides connus comme liant les métaux

lourds chez les Végétaux. Une contamination de notre échantillon expérimental serait possiblement à l'origine de la présence de cuivre dans les différentes fractions chromatographiques n'appartenant pas à la séquence des fractions 37 à 42.

#### 4.4.6 Après 732 heures

Le chromatogramme des protéines extraites des cellules provenant du ballon témoin nous montre, à la figure 15, qu'une seule fraction contient du cuivre (fraction 39). Par contre, une séquence s'étendant de la fraction 37 à 41 contient du cuivre chez les protéines extraites des cellules du ballon expérimental. Les protéines contenues dans l'ensemble de ces fractions possèdent des masses moléculaires comprises entre 1 800 et 950 daltons, ce qui pourrait bien correspondre à la masse moléculaire de peptides de type phytochélatine.

La présence d'une seule fraction contenant du cuivre chez les protéines extraites des cellules du ballon témoin pourrait s'expliquer par une contamination imprévue au niveau de la fraction 39. Par contre, la masse moléculaire associée à cette fraction est de 1 300 daltons, ce qui pourrait correspondre à un peptide de type phytochélatine. La présence de phytochélatines dans notre échantillon témoin serait associée à la régulation de la disponibilité des métaux traces essentiels, ces protéines jouant aussi un rôle dans l'homéostasie des ions métalliques (Grill, 1989).

Au niveau des teneurs en cuivre retrouvées dans les fractions 37 à 41, nous constatons une légère augmentation de celles-ci par rapport aux teneurs mesurées dans la séquence de fractions de l'échantillon expérimental de l'heure 516, séquence qui s'étendait des fractions 37 à 40. Si nous supposons que la quantité de cuivre détectée est

proportionnelle à la quantité de peptides chélateurs présents dans le cytoplasme de nos cellules intoxiquées, nous croyons que la présence de phytochélatine serait légèrement plus importante après 732 heures d'intoxication qu'après 516 heures. Cette constatation ne peut être reliée à aucune donnée provenant de la littérature. Gupta et Goldsbrough (1990) mentionnent qu'une diminution de la quantité de peptides chélateurs, en fonction du temps, est observée à partir de la quatrième journée suivant l'intoxication, et ce, pour le reste de l'expérience d'une durée de 12 jours. Aussi, avons-nous pris l'initiative de voir s'il pouvait exister une relation entre la quantité de cuivre retrouvée, et par le fait même de la présence de peptides chélateurs, et le temps d'échantillonnage.

#### 4.5 Corrélation entre la quantité de cuivre retrouvée dans les fractions chromatographiques et le temps d'échantillonnage

Il s'agit ici de vérifier s'il existe un lien entre la quantité totale de cuivre retrouvée dans l'ensemble des fractions chromatographiques 35 à 45 et le temps d'échantillonnage, et ce, tant pour les fractions chromatographiques provenant des protéines extraites des cellules du ballon témoin que pour celles provenant des protéines extraites des cellules du ballon expérimental. Une de nos variables est dépendante, la quantité totale de cuivre retrouvée, et l'autre est indépendante, le temps d'échantillonnage.

La figure 16A montre la corrélation obtenue pour les cellules provenant du ballon témoin. Avec un coefficient de corrélation  $R^2$  de 0,063, il apparaît évident qu'il n'existe pas de lien entre le temps d'échantillonnage et la quantité totale de cuivre retrouvée dans les fractions 35 à 45.

Le coefficient  $R^2$  obtenu avec les cellules provenant du ballon expérimental est de 0,447 (figure 16B). Il s'agit d'un coefficient indiquant un degré de liaison très moyen (Scherrer, 1984). Nous remarquons aussi qu'après 84 heures d'intoxication, les quantités de cuivre contenues dans les fractions 35 à 45 sont deux (2) fois moins importantes que celles retrouvées pour l'heure 12. Si nous regardons au niveau des quatre (4) temps centraux d'échantillonnage, le coefficient de corrélation atteint une valeur de 0,997, indiquant une relation presque parfaite. Il semble donc évident que la quantité totale de cuivre retrouvée diminue en fonction du temps d'échantillonnage, et ce, pour les cellules provenant du ballon expérimental. Nous prenons pour acquis que la quantité de cuivre dans le ballon expérimental a toujours été de  $250 \mu\text{g de cuivre.L}^{-1}$ , puisque l'approvisionnement en milieu de culture de notre ballon expérimental se faisait en continu avec un milieu auquel nous avons ajouté cette quantité de contaminant. Le surplus de cuivre dans notre milieu de culture a, de ce fait, toujours été au-delà des besoins physiologiques de base de nos cellules. Ainsi, la diminution de la quantité de cuivre retrouvée dans nos fractions chromatographiques ne peut être attribuable à une diminution de celle-ci dans notre ballon expérimental.

Aussi, pouvons-nous émettre l'hypothèse suivante: la synthèse de protéines complexantes de type phytochélatines est un mécanisme de tolérance de première ligne chez *Scenedesmus quadricauda*. En effet, puisque que les quantités de cuivre complexé à des protéines de faible masse moléculaire diminuent en fonction du temps d'échantillonnage, nous pouvons supposer que la quantité de protéines complexantes diminue elle aussi en fonction du temps, suite à la contamination continue de notre culture. Nous savons que la synthèse de protéines complexantes est un mécanisme de tolérance mis en place rapidement suite à une contamination aux métaux lourds (Robinson, 1989). De ce fait, il doit s'agir d'un mécanisme de première ligne servant à palier les effets nocifs produits par une concentration

supraoptimale de métal lourd. Les concentrations maximales de  $(\gamma\text{EC})_n\text{G}$  étant atteintes quatre (4) jours après le début de l'intoxication (Gupta et Goldsbrough, 1990), les cellules doivent posséder d'autres mécanismes physiologiques pour palier aux effets nocifs des métaux lourds, mécanismes demandant un temps de réponse plus long que quelques heures et/ou quelques jours. Nos résultats appuient donc ceux obtenus par Gupta et Goldsbrough (1990). De plus, ces chercheurs ont démontré qu'à mesure que les quantités de phytochélatines diminuent, les teneurs intracellulaires en cadmium diminuent elles aussi. Ainsi, la diminution des teneurs en cuivre que nous avons mesurées en fonction du temps suite à la contamination, peut être reliée à une diminution de la présence de protéines de type phytochélatine.

#### 4.6 Perspectives de recherche

Plusieurs autres recherches devront être faites pour parvenir à élucider les mécanismes qui engendrent la tolérance des cellules phytoplanctoniques aux métaux lourds. Parmi ceux-ci, la synthèse de protéines complexantes semble être un mécanisme retrouvé chez l'ensemble des cellules végétales (Gekeler *et al.*, 1989).

Cependant, pour bien cerner les problèmes engendrés par la contamination chronique des écosystèmes aquatiques, il est impératif de poursuivre en laboratoire des études à long terme afin de mieux reproduire les conditions retrouvées en milieu naturel. De plus, des échantillonnages effectués à partir de populations naturelles soumises à des concentrations élevées de métaux lourds pourraient apporter des connaissances inédites sur la présence de protéines complexantes chez ces organismes.

Ainsi, selon les résultats que nous avons obtenus, il apparaît évident que la synthèse de protéines complexantes ne peut expliquer à elle seule l'adaptabilité des espèces phytoplanctoniques à peupler des milieux pollués. Les autres mécanismes de tolérance aux métaux lourds, tels que les inclusions intravacuolaires ou encore l'exclusion par volatilisation, doivent aussi jouer un rôle dans le phénomène d'adaptation des cellules phytoplanctoniques.

Un échantillonnage plus serré au niveau du temps aurait peut-être permis de mieux comprendre l'évolution du phénomène de complexation du cuivre avec des protéines de faible masse moléculaire. Il faut noter cependant qu'un nombre élevé d'échantillonnages augmente la possibilité de lessivage des cultures. L'utilisation de techniques chromatographiques permettant une meilleure séparation des protéines extraites aurait permis de pousser plus loin l'analyse du contenu de nos échantillons en protéines. L'emploi d'un gel plus performant au niveau des limites d'exclusion ou encore d'une autre technique chromatographique, telle que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) serait recommandé. Il aurait alors été possible de quantifier les protéines présentes et de les analyser en vue de connaître leur composition en acides aminés. La séquence de ces acides aminés nous donnerait toute l'information nécessaire pour les comparer aux métallothionéines et aux phytochélatines déjà connues.

Il n'en demeure pas moins que les présents résultats ouvrent la porte à des perspectives de recherches futures. L'utilisation de techniques de culture reproduisant le plus fidèlement possible les conditions retrouvées en milieu naturel, comme les techniques de culture continue, facilitera la compréhension des phénomènes observés à l'échelle des



écosystèmes naturels. Il faut que les connaissances acquises en laboratoire soient applicables au niveau du milieu naturel.

CHAPITRE V  
CONCLUSION

Les cellules de *Scenedesmus quadricauda* possèdent des peptides de masse moléculaire faible, comprise entre 2 100 et 800 daltons, auxquels la majorité du cuivre détecté est lié suite à une intoxication à long terme avec 250  $\mu\text{g}$  de cuivre $\cdot\text{L}^{-1}$ . Les valeurs de masses moléculaires inférieures à 1,5 kDa, sont extrapolées à partir des courbes d'étalonnage que nous avons réalisées. La séquence de fractions chromatographiques dans laquelle la majorité du cuivre est retrouvée chez les cellules du ballon expérimental est presque toujours la même, ce qui vient confirmer l'hypothèse que les cellules intoxiquées possèdent bel et bien un peptide de faible masse moléculaire liant le cuivre.

Il semble que la complexation du cuivre à une protéine de masse moléculaire faible soit un phénomène rapide. Déjà, 12 heures après l'intoxication des cellules de *Scenedesmus quadricauda*, des quantités importantes de cuivre sont retrouvées dans les fractions chromatographiques correspondant à des peptides de masse moléculaire comprise entre 2 100 et 1 000 daltons. Les quantités de cuivre retrouvées après 12 heures d'intoxication sont les plus importantes que nous avons mesurées parmi les six (6) échantillonnages que nous avons effectués. Il est donc possible de supposer que la présence de protéines complexantes soit à son maximum elle aussi, par rapport aux autres échantillonnages que nous avons réalisés. De par ce fait, la synthèse de protéines complexantes de type phytochélatine semble être un mécanisme rapidement mis en place afin de palier aux effets nocifs d'une concentration supraoptimale de cuivre chez les cellules de *Scenedesmus quadricauda*.

La diminution des quantités de cuivre retrouvées en fonction du temps d'échantillonnage semble indiquer que le phénomène de complexation diminue lui aussi. Aussi, en reliant la présence de cuivre à celle de peptides complexants, nous pouvons conclure que ces derniers voient leur concentration diminuer en fonction du temps. La mise en place d'autres mécanismes physiologiques, permettant la tolérance au cuivre, doit s'effectuer pendant cette période de temps.

Nos résultats démontrent que la morphologie des cellules de *Scenedesmus quadricauda* est affectée par la présence de cuivre. Les cellules contaminées au cuivre sont de dimensions plus restreintes, avec une abondance de cellules isolées et de cœnobiums ne contenant que deux (2) cellules. De plus, les cellules sont souvent recroquevillées sur elles-mêmes, ce qui les fait paraître de dimensions réduites.

L'utilisation de culture continue nous a permis de prolonger la durée de l'expérience sur une période de 30 jours et demi (732 heures). En effectuant différents échantillonnages échelonnés durant toute cette période, nous avons été en mesure de voir l'évolution du phénomène de complexation. Des expériences utilisant des cultures en lot ne permettent pas cette approche temporelle. Il est à espérer que, dans l'avenir, les expériences pour expliquer les phénomènes naturels, soient de nature à être plus représentatives de ce qui se passe effectivement dans l'environnement.

## RÉFÉRENCES

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & J. D. Watson. 1983. Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc. New-York. 1146 pp.
- Bastien, C. 1986. Effets du cuivre sur l'ultrastructure de *Scenedesmus quadricauda* et *Chlorella vulgaris* en relation avec l'acquisition de tolérance. Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi comme exigence partielle de la Maîtrise en Productivité aquatique. 66 pp.
- Bastien, C. & R. Côté. 1989a. Effets du cuivre sur l'ultrastructure de *Scenedesmus quadricauda* et *Chlorella vulgaris*. Int. Revue ges. Hydrobiol., 74: 51-71.
- Bastien, C. & R. Côté. 1989b. Variations temporelles de l'ultrastructure de *Scenedesmus quadricauda* exposée au cuivre lors d'une expérience à long terme. Int. Revue ges. Hydrobiol., 74: 207-219.
- Baunemann, R. & W. Höfner. 1991. Influence of Cd, Cu, Ni and Zn on the synthesis of metalloproteins by *Scenedesmus subspicatus*. Z. Pflanzenernähr. Bodenk., 154: 81-85.
- Bisalputra, T. & T. E. Weier. 1963. The cell wall of *Scenedesmus quadricauda*. Amer. Jour. Bot., 50: 1011-1019.
- Brouwer, M., D. R. Winge & W. R. Gray. 1989. Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the American lobster *Homarus americanus*. Journal of Inorganic Biochemistry, 35: 289-303.
- Delhaize, E., P. J. Jackson, L. D. Lujan & N. J. Robinson. 1989. Poly( $\gamma$ -glutamylcysteinyl)glycine synthesis in *Datura innoxia* and binding with cadmium. Plant Physiol., 89: 700-706.
- Engel, D. W. & M. Brouwer. 1984. Trace metal-binding proteins in marine Molluscs and Crustaceans. Marine Environmental Research, 13: 177-194.
- Engel, D. W. & M. Brouwer. 1987. Metal regulation and molting in the Blue crab, *Callinectes sapidus*: metallothionein function in metal metabolism. Biol. Bull., 173: 239-251.
- Fernandes, J. C. & F. S. Henriques. 1991. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. The Botanical Review, 57: 247-273.
- Foster, P. L. 1977. Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in green algae. Nature, 269: 322-323.

- Fowler, B. A., C. E. Hildebrand, Y. Kojima & M. Webb. 1987. Nomenclature of metallothionein. *In* *Experientia Supplementum*, vol. 52, Metallothionein II, pp. 19-22. Kägi, J. H. R. & Y. Kojima eds. Birkhäuser Verlag Basel. Boston. 755 pp.
- Foy, R. H. & R. V. Smith. 1980. The role of carbohydrate accumulation in the growth of planktonic *Oscillatoria* species. *Br. Phycol. J.*, 15: 139-150.
- Gekeler, W., E. Grill, E.-L. Winnacker & 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 & M. H. Zenk. 1989. Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins. *Z. Naturforsch.*, 44c: 361-369.
- Giordano, R. & U. Leuzzi. 1976. Effects of ultrasound on unicellular algae. *J. Acoust. Soc. Am.*, 60: 275-278.
- Grill, E., E.-L. Winnacker & M. H. Zenk. 1985a. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Sciences*, 230: 674-676.
- Grill, E., M. H. Zenk & E.-L. Winnacker. 1985b. Induction of heavy metal-sequestering phytochelatin by cadmium in cell cultures of *Rauvolfia serpentina*. *Naturwissenschaften*, 72: 432-433.
- Grill, E., E.-L. Winnacker & M. H. Zenk. 1986a. Synthesis of seven different homologous phytochelatins in metal-exposed *Schizosaccharomyces pombe* cells. *FEBS Lett.*, 197: 115-120.
- Grill, E., W. Gekeler, E.-L. Winnacker & M. H. Zenk. 1986b. Homo-phytochelatins are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing Fabales. *FEBS Lett.*, 205: 47-50.
- Grill, E., E.-L. Winnacker & 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., J. Thumann, E.-L. Winnacker & M. H. Zenk. 1988. Induction of heavy-metal binding phytochelatins by inoculation of cell cultures in standard media. *Plant Cell Reports*, 7: 375-378.
- Grill, E. 1989. Phytochelatins in plants. *In* *Metal ion homeostasis: molecular biology and chemistry*, pp. 283-300. Hamer, D. H. & D. R. Winge eds. Alan R. Liss, inc. New-York. 490 pp.
- Gupta, S. C. & P. B. Goldsbrough. 1990. Phytochelatin accumulation and stress tolerance in tomato cells exposed to cadmium. *Plant Cell Reports*, 9: 466-469.
- Harris, G. P. 1984. Phytoplankton productivity and growth measurements: past, present and future. *J. Plankton Res.*, 6: 219-237.

- Hughes, D. E., J. W. T. Wimpenny & D. Lloyd. 1971. The Disintegration of Microorganisms. *In* Methods in Microbiology, vol. 5B, pp. 1-54. Norris, J. R. & D. W. Ribbons eds. Academic Press. London.
- Kägi, J. H. R. & B. L. Vallee. 1960. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *Journal of Biological Chemistry*, 235: 3460-3465.
- Kägi, J. H. R. & Y. Kojima. 1987. Chemistry and Biochemistry of Metallothioneins. *In* Experientia Supplementum, vol. 52, Metallothionein II, pp. 25-61. Kägi, J. H. R. & Y. Kojima eds. Birkhäuser Verlag Basel. Boston. 755 pp.
- Karin, M. 1985. Metallothioneins: proteins in search of function. *Cell*, 41: 9-10.
- Kuwabara, J. S. & H. V. Leland. 1986. Adaptation of *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae) to copper. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5: 197-203.
- Lewis, M. A. 1990. Are laboratory-derived toxicity data for freshwater algae worth the effort? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9: 1279-1284.
- Marquis, H. 1989. Mise en évidence d'un mécanisme de résistance suite à une intoxication au cadmium chez *Selenastrum capricornutum*. Mémoire de Maîtrise présenté à l'Institut national de la recherche scientifique, INRS-Eau. 85 pp.
- Minkel, D. T., K. Poulsen, S. Wielgus, C. F. Shaw & D. H. Petering. 1980. On the sensitivity of metallothioneins to oxidation during isolation. *Biochem. J.*, 191: 475-485.
- Nagano, T., M. Miwa, Y. Suketa & S. Okada. 1984. Isolation, physicochemical properties, and amino acid composition of a cadmium-binding protein from cadmium-treated *Chlorella ellipsoidea*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 21: 61-71.
- Palmer, C. M. & T. E. Maloney. 1954. A new counting slide for nanoplankton. *American Society of Limnology and Oceanography*, Special publi. no.21, pp. 1-6. Environmental Health Center. Cincinnati, Ohio.
- Pharmacia LKB Biotechnology. 1991. Gel Filtration - Principles and Methods. Uppsala, Sweden. 102 pp.
- Rauser, W. E. 1987. The cd-binding protein from tomato compared to those of other vascular plants. *In* Experientia Supplementum, vol. 52, Metallothionein II, pp. 301-308. Kägi, J. H. R. & Y. Kojima eds. Birkhäuser Verlag Basel. Boston. 755 pp.
- Raven, J. A. & J. Beardall. 1981. Respiration and photorespiration. *In* Physiological Bases of phytoplankton Ecology. Platt, T. ed. *Can. Bull. fish. Aquat. Sci.*, 210: 55-82.
- Robinson, N. J. & D. A. Thurman. 1986. Isolation of a copper complex and its rate of appearance in roots of *Mimulus guttatus*. *Planta*, 169: 192-197.

- Robinson, N. J., K. Barton, C. M. Naranjo, L. O. Sillerud, J. Trehwella, K. Watt & P. J. Jackson. 1987. Characterization of metal binding peptides from cadmium resistant plant cells. *In* *Experientia Supplementum*, vol. 52, Metallothionein II, pp. 323-327. Kägi, J. H. R. & Y. Kojima eds. Birkhäuser Verlag Basel. Boston. 755 pp.
- Robinson, N. J. 1989. Algal metallothioneins: secondary metabolites and proteins. *Journal of Applied Phycology*, 1: 5-18.
- Salisbury, F. B. & C. W. Ross. 1985. *Plant Physiology*, third edition. Wadsworth Publishing Company. Belmont, California. 540 pp.
- Schenck, R. C., A. Tessier & P. G. C. Campbell. 1988. The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. *Limnol. Ocean.*, 33: 538-550.
- Scherrer, B. 1984. *Biostatistique*. G. Morin éd. Boucherville. Québec. 850 pp.
- Shubert, L. E. & F. R. Trainor. 1974. *Scenedesmus* morphogenesis. Colony control in dilute media. *J. Phycol.*, 10: 28-30.
- Stauber, J. L. & T. M. Florence. 1986. Reversibility of copper-thiol binding in *Nitzschia closterium* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Aquatic Toxicology*, 8: 223-229.
- Stein, J. R. 1973. *Handbook of Phycological Methods - Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press. Cambridge. 448 pp.
- Stokes, P. M., T. C. Hutchinson & K. Krauter. 1973. Heavy-metal tolerance in algae isolated from contaminated lakes near Sudbury, Ontario. *Can. J. Bot.*, 51: 2155-168.
- Stokes, P. M., T. Maler & J. Riordan. 1977. A low molecular weight copper binding protein in a copper tolerant *Scenedesmus*. *In* *Trace Substances in Environmental Health*, XI, pp.147-155. Hemphill, D. D. ed. University of Columbia, Missouri. 485 pp.
- Stokes, P. M. 1979. Copper accumulation in freshwater biota. *In* *Copper in the Environment I. Ecological Cycling*. Nriagu, J. O. ed. Wiley and Sons. New-York.
- Sunda, W. & R. R. L. Guillard. 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.*, 37: 511-529.
- Suslick, K. 1989. Les effets chimiques des ultrasons. *Pour la Science*, 138: 88-94.
- Tomsett, A. B. & D. A. Thurman. 1988. Molecular biology of metal tolerances of plants. *Plant, Cell and Environment*, 11: 383-394.
- Verkleij, J. A. C., P. Koevoets, J. van 't Riet, M. C. van Rossenberg, R. Bank & W. H. O. Ernst. 1989. The role of metal-binding compounds in the copper tolerance mechanism of *Silene cucubalus*. *In* *Metal ion homeostasis: molecular biology and chemistry*, pp. 347-357. Hamer, D. H. & D. R. Winge eds. Alan R. Liss, inc. New-York. 490 pp.



- Verkleij, J. A. C., P. Koevoets, J. van 't Riet, R. Bank, Y. Nijdam & W. H. O. Ernst. 1990. Poly( $\gamma$ -glutamylcysteinyl)glycines or phytochelatins and their role in cadmium tolerance of *Silene vulgaris*. *Plant, Cell and Environment*, 13: 913-921.
- Wagner, G. J. 1984. Characterization of a cadmium-binding complex of cabbage leaves. *Plant Physiol.*, 76: 797-805.
- Wong, P. T. S. 1987. Toxicity of cadmium to freshwater microorganisms, phytoplankton, and invertebrates. *In* Cadmium in the aquatic environment, pp. 117-138. Nriagu, J. O. & J. B. Sprague eds. John Wiley & Sons. N. Y.