

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN PRODUCTIVITÉ AQUATIQUE

PAR

CHRISTIAN BASTIEN

B. Sc. en biologie

EFFETS DU CUIVRE SUR L'ULTRASTRUCTURE
DE SCENEDESMUS QUADRICAUDA ET CHLORELLA VULGARIS
EN RELATION AVEC L'ACQUISITION DE TOLÉRANCE

DÉCEMBRE 1986



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.

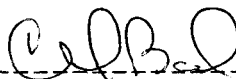
The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

RÉSUMÉ

Deux expériences furent menées en utilisant un mode de culture en lot; une première avec Scenedesmus quadricauda et une seconde avec Chlorella vulgaris. S. quadricauda s'est avérée très tolérante au cuivre tandis que C. vulgaris y est relativement plus sensible. Cette dernière espèce provenait de la rivière Saguenay.

Chez S. quadricauda, la concentration en cuivre du milieu de culture est corrélée significativement à la fréquence d'apparition des inclusions intravacuolaires ainsi qu'à leur nombre moyen par cellule, ce qui suggère leur implication dans la tolérance. Chez C. vulgaris nous observons au niveau ultrastructural, des bris membranaires et des altérations aux mitochondries. L'augmentation de la concentration en cuivre est suivie par une légère hausse dans la fréquence d'apparition des corps membranaires et des inclusions intravacuolaires de même que dans le nombre d'inclusions par cellule. Chez S. quadricauda, la formation d'inclusions semble donc jouer un rôle déterminant dans la tolérance, ce qui n'est pas le cas chez C. vulgaris.

Une troisième expérience fut menée avec S. quadricauda en utilisant le mode de culture en continue et ce, sur une durée de 50 jours à une concentration en cuivre de 250 µg.l⁻¹. Après 1,5 heure d'exposition, les effets ultrastructuraux sont évidents; le chloroplaste se rétracte et forme des lobes et les différentes structures cellulaires prennent un aspect très diffus. Les mêmes observations sont faites également après 3, 6, 12 et 24 heures d'exposition. Entre 3 et 15 jours nous observons une importante augmentation des réserves d'amidon et de lipide, des inclusions intravacuolaires, de même qu'un épaississement de la paroi. Après 22, 32 et 50 jours, les inclusions disparaissent, le cytoplasme est densément peuplé de ribosomes et le réticulum endoplasmique est évident chez la majorité des cellules. Ces observations suggèrent l'implication d'un second mécanisme de tolérance au cuivre qui, contrairement aux inclusions se manifesteraient après une exposition à long terme.



Christian Bastien



Raynald Tôté

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement le Dr. Raynald Côté pour tout le soutien logistique et financier qu'il m'a offert au cours de cette recherche ainsi que pour ses précieux conseils et sa grande disponibilité. Je remercie également, M. Denis Larrivé qui m'a grandement facilité l'accès à l'équipement de microscopie électronique ainsi que Mlle Sylvie Marceau pour ses conseils et son aide technique soutenue. Aussi, je remercie Mme Monique Dionne-Chouinard pour l'aide qu'elle m'a apportée.

Je remercie également le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada ainsi que le Programme d'aide institutionnelle à la recherche (PAIR-UQAC) pour les bourses d'étude qu'ils m'ont accordées au cours de l'année 1985-1986.

Ce travail de recherche fut réalisé grâce à l'appui financier des organismes cités plus haut (subvention CRSNG RD-209 à R. Côté) et de la Fondation de l'Université du Québec à Chicoutimi.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	vi
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	8
2.1 Conservation des souches.....	9
2.2 Conditions expérimentales.....	10
2.3 Microscopie électronique.....	12
2.4 Absorption atomique.....	13
CHAPITRE III : EFFETS DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE CUIVRE SUR L'ULTRASTRUCTURE DE <u>SCENEDES-</u> <u>MUS QUADRICAUDA ET CHLORELLA VULGARIS</u>	15
3.1 Résultats.....	16
3.1.1 Densité cellulaire de <u>S. quadricauda</u>	16
3.1.2 Ultrastructure de <u>S. quadricauda</u>	18
3.1.3 Densité cellulaire de <u>C. vulgaris</u>	25
3.1.4 Ultrastructure de <u>C. vulgaris</u>	27
3.2 Discussion.....	33
CHAPITRE IV : EFFETS D'UNE EXPOSITION A LONG TERME AU CUIVRE SUR L'ULTRASTRUCTURE DE <u>SCENEDES-</u> <u>MUS QUADRICAUDA</u>	42
4.1 Résultats.....	43
4.1.1 Courbes de croissance.....	43
4.1.2 Modifications ultrastructurales.....	45
4.2 Discussion.....	52
CHAPITRE V : CONCLUSION GÉNÉRALE.....	60
BIBLIOGRAPHIE.....	63

	page
ANNEXE I.....	71
ANNEXE II.....	72
ANNEXE III.....	73

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Variations temporelles de la densité cellulaire de <u>S. quadricauda</u> à différentes concentrations de cuivre.....	17
Figure 2 : Micrographie d'une colonie témoin de <u>S. quadricauda</u>	20
Figure 3 : Micrographie d'une cellule témoin de <u>S. quadricauda</u>	20
Figure 4 : Micrographie de la paroi cellulaire d'une cellule témoin de <u>S. quadricauda</u>	20
Figure 5 : Micrographie de l'adhésion des parois cellulaires de 2 cellules témoin de <u>S. quadricauda</u>	20
Figure 6 : Micrographie d'une cellule de <u>S. quadricauda</u> exposée à $500 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	20
Figure 7 : Micrographie de la formation d'inclusions chez <u>S. quadricauda</u> exposée à $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	22
Figure 8 : Micrographie de la formation d'inclusions chez <u>S. quadricauda</u> exposée à $1,000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	22
Figure 9 : Micrographie d'une cellule de <u>S. quadricauda</u> exposée à $1,000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	22
Figure 10 : Micrographie d'une cellule solitaire de <u>S. quadricauda</u> exposée à $1,000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	22
Figure 11 : Fréquence d'apparition et nombre moyen d'inclusions intravacuolaires chez <u>S. quadricauda</u> à différentes concentrations de cuivre.....	24
Figure 12 : Variations temporelles de la densité cellulaire de <u>C. vulgaris</u> à différentes concentrations de cuivre.....	25

	Page
Figure 13 : Micrographie d'une cellule témoin de <u>C. vulgaris</u>	29
Figure 14 : Micrographie d'une cellule de <u>C. vulgaris</u> exposée à 100 µg·l ⁻¹ de cuivre.....	29
Figure 15 : Micrographie à fort grossissement d'une cellule de <u>C. vulgaris</u> exposée à 100 µg·l ⁻¹ de cuivre.....	29
Figure 16 : Micrographie d'une cellule de <u>C. vulgaris</u> exposée à 250 µg·l ⁻¹ de cuivre.....	29
Figure 17 : Micrographie d'une mitochondrie de <u>C. vulgaris</u> exposée à 50 µg·l ⁻¹ de cuivre.....	31
Figure 18 : Micrographie d'une mitochondrie de <u>C. vulgaris</u> exposée à 50 µg·l ⁻¹ de cuivre.....	31
Figure 19 : Micrographie de la paroi cellulaire de <u>C. vulgaris</u> exposée à 100 µg·l ⁻¹ de cuivre.....	31
Figure 20 : Micrographie d'un corps membranaire chez <u>C. vulgaris</u> exposée à 50 µg·l ⁻¹ de cuivre.....	31
Figure 21 : Micrographie d'un corps membranaire chez <u>C. vulgaris</u> exposée à 100 µg·l ⁻¹ de cuivre.....	31
Figure 22 : Micrographie d'un corps membranaire chez <u>C. vulgaris</u> exposée à 50 µg·l ⁻¹ de cuivre.....	31
Figure 23 : Micrographie d'un corps membranaire qui apparaît en formation chez <u>C. vulgaris</u> exposée à 100 µg·l ⁻¹ de cuivre.....	31
Figure 24 : Fréquence d'apparition et nombre moyen d'inclusions intravacuolaires chez <u>C. vulgaris</u> à différentes concentrations de cuivre.....	32
Figure 25 : Variations temporelles de la densité cellulaire de <u>S. quadricauda</u> exposée à 250 µg·l ⁻¹ de cuivre.....	44
Figure 26 : Micrographie d'une cellule de <u>S. quadricauda</u> après 3 heures d'exposition à 250 µg·l ⁻¹ de cuivre.....	46

	Page
Figure 27 : Micrographie d'une inclusion associée au pyrênoïde chez une cellule de <u>S. quadricauda</u> après 3 heures d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	46
Figure 28 : Micrographie d'une cellule de <u>S. quadricauda</u> après 6 heures d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	46
Figure 29 : Micrographie d'une cellule de <u>S. quadricauda</u> après 5 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	46
Figure 30 : Micrographie d'une cellule de <u>S. quadricauda</u> après 72 heures d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	48
Figure 31 : Micrographie d'une cellule de <u>S. quadricauda</u> après 10 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	48
Figure 32 : Micrographie d'une cellule binucléée de <u>S. quadricauda</u> après 5 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	48
Figure 33 : Micrographie d'un noyau présentant des inclusions chez <u>S. quadricauda</u> après 5 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	48
Figure 34 : Variations temporelles des fréquences d'apparitions et des nombres moyens d'inclusions intravacuolaires chez <u>S. quadricauda</u> exposée à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	49
Figure 35 : Micrographie d'une cellule de <u>S. quadricauda</u> après 22 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	51
Figure 36 : Micrographie d'une cellule de <u>S. quadricauda</u> après 50 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.....	51
Figure 37 : Micrographie du cytoplasme et du réticulum endoplasmique de <u>S. quadricauda</u> après 50 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre...	51

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

La contamination des milieux aquatiques par les métaux traces a suscité un grand intérêt au cours des dernières années. Elle est intimement liée à l'essor industriel et plus spécifiquement à l'industrie minière et métallurgique, à la combustion des hydrocarbures fossiles, à certains procédés industriels ainsi qu'à certaines activités humaines.

Ces polluants ont une toxicité notoire sur les organismes aquatiques. De plus, ils persistent dans le milieu naturel, particulièrement au niveau des sédiments où ils peuvent être remobilisés par divers processus physico-chimiques (Forster et Whittmann, 1981). Certains ions peuvent également être bioaccumulés dans les tissus animaux (Connell Des et Miller, 1984) ou chez les plantes supérieures et les algues phytoplanctoniques (Mierle et Stokes, 1976; Leland et al., 1979; Cain et al., 1980). Compte tenu de leur forte toxicité, les ions métalliques présentent donc un risque non négligeable quant à la pérennité de certaines espèces ainsi qu'à l'équilibre des écosystèmes aquatiques.

Etant situé dans une zone fortement industrialisée, le réseau hydrographique du Saguenay-Lac St-Jean est particulièrement exposé à des effluents contaminés. D'ailleurs, les travaux de Loring (1975; 1976) ont montré que les sédiments de la rivière et du fjord du Saguenay contiennent de fortes concentrations en mercure, en plomb, en zinc et en cuivre.

De plus, Côté (1983) y a observé des concentrations en cuivre relativement élevées ($\approx 5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) dans les eaux de surface.

Le cuivre est un élément trace essentiel au métabolisme cellulaire des algues (Manatran et Smith, 1973; Sorentino, 1979) mais c'est également un des éléments les plus toxiques pour le phytoplancton (Hollibaugh et al., 1980). Sa toxicité est liée essentiellement à l'ion cuivrique libre (Sunda et Guillard, 1976; Anderson et Morel, 1978; Rueter et McCarthy, 1979; Sunda et Gillepsie, 1979) et à son affinité pour les groupements sulphhydryls (SH) des protéines ainsi qu'à son habilité à déplacer les ions cofacteurs d'enzymes et les ions faisant partie intégrante du centre actif des métalloenzymes (Passow et al., 1961). Selon Mandeli (1969), le cuivre formerait également des complexes avec les groupements carboxyles, les phosphates et les amines rendant ainsi son action peu spécifique. Les travaux de Goering et al., (1977) ont montré que la réduction de l'activité enzymatique et l'altération des protéines structurales constitueraient les principaux effets de l'affinité du cuivre pour les ligands organiques.

Plusieurs auteurs ont étudié les effets physiologiques du cuivre sur les algues. Certains travaux, notamment ceux de Steeman-Nielsen et Wium-Andersen (1971), Steeman-Nielsen et Kamp-Nielsen (1970), Steeman-Nielsen et al. (1969) et Ander-

son et Morel (1978), ont montré que le taux de fixation du carbone est affecté tandis que d'autres chercheurs (Cedeno-Maldonado et al., 1972; Shioi et al., 1978 a,b) se sont surtout intéressés à l'inhibition des mécanismes de transport des électrons dans le processus de la photosynthèse.

D'autre part, le cuivre provoque une réduction des pigments photosynthétiques (Gross et al., 1970). En agissant au niveau de la membrane plasmique, le cuivre altère le processus d'osmorégulation; la perméabilité de la cellule est augmentée ce qui entraîne une perte importante de potassium se traduisant souvent par un gonflement de la cellule (Kamp-Nielsen, 1971; McBrien et Hassal, 1965; Overnell, 1975; Riisgard, 1979; Riisgard et al., 1980). De plus, le cuivre peut inhiber l'assimilation des nitrates (Harrisson et al., 1977) ou des silicates (Goering et al., 1977). Finalement, quelques auteurs et notamment Steeman-Nielsen et Kamp-Nielsen (1970), Saifullah (1978), Mandeli (1969), Bartlett et al. (1974) et Jensen et al. (1976) ont constaté que le cuivre réduisait ou arrêtait complètement la croissance de la population, ce qui est probablement le résultat d'une inhibition de la cytokininèse comme l'ont suggéré (Kanawaza et Kanawaza, 1969).

Sur le plan ultrastructural, l'action des métaux traces se traduit par l'apparition d'aberrations morphologiques (Thomas et al., 1980). Ce phénomène a été observé tant chez

les Chlorophycées (Rosko et Rachlin, 1977) que chez les Chrysophycées (Davies, 1974) et les Bacillariophycées (Nuzzi, 1972; Berland et al., 1977; Morel et al., 1978). La toxicité des métaux traces est bien documentée au niveau de l'altération de variable de structure (dénombrement, chl- α) et de fonction (Δ -dénombrement, Δ -chl- α , P/B, CE $_A$), (Rai et al., 1981; Sorentino, 1979), de l'adsorption des métaux sur la surface cellulaire, de leur compétition à l'interface biologique, de leur prise en charge par différents organismes (Campbell et Stokes, 1985; Harrisson et al., 1986) alors que les études portant sur les modifications de l'ultrastructure sont plus rares. Smith (1983) rapporte la présence d'organites gonflées, de membranes dilatées et une vacuolation accrue du cytoplasme chez Skeletonema costatum soumise aux ions mercure, cadmium et zinc. Elle observe également des inclusions denses aux électrons contenues dans des vésicules. Selon Irmer et al., (1984), le cadmium cause une désorganisation des thylakoides chez Chlamydomonas et entraîne la formation de dépôts denses aux électrons dans la vacuole. Chez trois autres espèces de Chlorophycées, le cadmium cause des aberrations ultrastructurales et la formation de dépôts denses aux électrons dans les mitochondries (Silverberg, 1976). Sicko-Goad et Stoermer (1979) de même que Silverberg (1975) rapportent des effets analogues au sujet du plomb. Par ailleurs, Saboski (1977) a observé des anomalies de la frustule chez Nitzschia liebethrutti exposée au mercure et à

l'étain tandis que Fujita et al. (1977) ont étudié pour leur part la distribution intracellulaire du mercure chez la Diatomée Synedra ulna et ont montré que le chloroplaste et le cytoplasme sont des sites importants de l'accumulation des ions.

En ce qui concerne plus spécifiquement le cuivre, Silverberg et al. (1976) rapportent la formation de complexes intranucléaires chez une souche tolérante de Scenedesmus sp. tandis que Daniel et Chamberlain (1981) ont démontré chez Amphora venata, la localisation de l'ion dans des inclusions de polyphosphate situées dans la vacuole et la formation de granules riches en soufre, calcium et cuivre associés aux membranes. D'autre part, Sicko-Goad (1982) a démontrée des changements de volume des vacuoles chez trois (3) diatomées après deux (2), trois (3) et 24 heures d'exposition à $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.

Par ailleurs, les algues unicellulaires possèdent d'autres mécanismes potentiels de tolérance comme l'exclusion par volatilisation (Foster, 1977), la synthèse de métallothionéine (Stokes et al., 1977; Stokes, 1983), la complexation extracellulaire et la précipitation sur la face externe de la membrane plasmique (Stokes, 1979). Dans l'ensemble les mécanismes de tolérance ont été peu étudiés et ont reçu jusqu'à maintenant peu d'emphase (Rai et al., 1981).

En résumé, les observations ultrastructurales peuvent être classées en deux types: premièrement, la présence d'organites gonflés et de membranes dilatées reliée à la perte du contrôle osmotique engendré par l'ion métallique (Smith, 1983) et deuxièmement, la formation de divers types d'inclusions denses aux électrons interprétée comme un mécanisme que possède la cellule pour séquestrer le métal dans certains compartiments cellulaires et ainsi réduire son effet toxique et conférer une certaine tolérance (Daniel et Chamberlain, 1981; Silverberg et al. 1976; Silverberg, 1975).

Dans le présent travail nous voulons premièrement, déterminer les effets de différentes concentrations de cuivre sur l'ultrastructure de Chlorella vulgaris et de Scenedesmus quadricauda et deuxièmement, établir chez cette dernière espèce la séquence temporelle des modifications ultrastructurales lorsqu'elle est soumise à une dose sub létale de cuivre pendant une exposition prolongée.

Cette approche séquentielle dans le temps des modifications ultrastructurales constitue une des seules études du genre ayant trait à la toxicité des éléments traces sur le phytoplancton.

CHAPITRE II
MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Conservation des souches

Les organismes utilisés dans le cadre de cette étude sont les Chlorophycées Scenedesmus quadricauda (Turp.) Breb. classée UTEX 76, provenant de " Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin " et Chlorella vulgaris isolée de la rivière Saguenay en 1983 et identifiée en microscopies optique et électronique selon la monographie de Fott et Novakova (1969). Ces deux espèces d'algues étaient cultivées dans le milieu synthétique Woods Holes MBL (Stein, 1973), mais modifié par le retrait de l'EDTA et du TRIS et par l'ajout d'acide borique. Ce milieu de culture était préparé et autoclavé peu de temps avant son utilisation. Le pH était ajusté à $6,80 \pm 0,40$ pour S. quadricauda et à $7,00 \pm 0,30$ pour C. vulgaris. L'inoculation des espèces était effectuée dans un volume d'environ 150 ml à partir de cultures sur gélose pour S. quadricauda et de cultures liquides pour C. vulgaris. Les erlenmeyers étaient ensuite agitées sur une table rotative pendant 6-7 jours jusqu'à ce que la densité des cultures soit environ de 3×10^6 cellules ml^{-1} . Les cultures étaient réalisées dans une enceinte à température et luminosité contrôlées; la température était de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ tandis que l'éclairage artificiel provenant de lampes fluorescentes Sylvania F20T12/Cool White était de $1,45 \times 10^{11}$ quanta $\text{sec} \cdot \text{cm}^{-2}$ selon un cycle lumière:obscurité de 16:8 heures. Seules les cultures en phase exponentielle servaient

d'inoculum lors de l'expérimentation. Les cultures de S. quadricauda étaient axéniques alors que celles de C. vulgaris ne l'étaient pas. Cependant, aucun problème de contamination n'a été rencontré avec cette dernière espèce.

2.2 Conditions expérimentales

Pour les expériences 1 et 2, huit (8) erlenmeyers d'un litre contenant 750 ml de milieu de culture étaient inoculés avec S. quadricauda (Expérience 1) et huit (8) autres avec C. vulgaris (Expérience 2). La densité cellulaire de ces erlenmeyers était de l'ordre de 1×10^5 cellules \cdot ml⁻¹. Sept (7) erlenmeyers de chacune de ces séries furent ensuite inoculés respectivement avec 25, 50, 100, 250, 500, 1,000 et 2,500 μ g \cdot l⁻¹ de cuivre; le huitième erlenmeyer servant de témoin. Le cuivre provenait d'une solution mère de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) de 1,000 mg \cdot l⁻¹ dissout dans l'eau déionisée stérile. Les cultures furent menées en lot (Stein, 1973) et aérées avec de l'air comprimé préalablement filtré.

La densité cellulaire fut déterminée aux temps 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 168 heures à l'aide d'une chambre de Palmer-Maloney (Palmer et Maloney, 1954) et d'un disque de Whipple à un grossissement de 250 X. Les intervalles de confiance furent calculés selon la formule de Ricker (1937) (Annexes 1 et 2). Les valeurs de pH furent enregistrées de façon simultanée à l'aide d'un pH mètre Fisher Acumet.

Après 72 heures d'exposition au cuivre, des aliquotes de culture furent prélevées et préparées pour l'observation en microscopie électronique. Au moment de la fixation des cellules, les cultures de C. vulgaris et S. quadricauda étaient synchrones et se trouvaient en interphase. D'ailleurs, il est bien connu que les conditions photopériodiques peuvent avoir un effet de synchronisation (Eppley et al., 1971).

D'autre part, l'expérience 3 a été poursuivie sur une durée de 50 jours avec S. quadricauda en utilisant la culture en continue basée sur le principe du chemostat (Stein, 1973). Un volume de 6 litres de milieu de culture Woods Holes MBL modifié, contenu dans un ballon de 9 litres, a été contaminé avec $250 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de cuivre. Un second ballon ne contenant pas de cuivre servait de témoin. La densité cellulaire initiale était de 2×10^5 cellules $\cdot \text{ml}^{-1}$. L'alimentation en milieu de culture se faisait à l'aide de pompes péristaltiques Master-Flex de Cole-Parmer Instr. Co.. Le taux quotidien de dilution était maintenu à 0,50 tout au long de l'expérience sauf entre les temps 14 et 22 jours où il fut ralenti à 0,25 dans le ballon expérimental afin d'éviter un lessivage trop important de la culture. Le ballon témoin était demeuré au même taux de dilution.

Les échantillons pour l'observation ultrastructurale ont été prélevés aux temps 0, 1,5, 3, 6, 12, 24, 48 et 72 heures

et 5, 10, 15, 22, 32 et 50 jours. Les mesures de la densité cellulaire et du pH ont été effectuées quotidiennement. Les intervalles de confiance de ces mesures sont présentés à l'annexe 3.

2.3 Microscopie électronique

Les spécimens destinés à l'observation ultrastructurale ont été récoltés par centrifugation et les culots de cellules ont été enrobés dans l'agar pour être subséquentement traités comme des blocs de tissus (Reimann, 1980). Ces blocs ont été découpés en petits cubes et fixés au glutaraldéhyde 2% dans le tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,00 pendant 2 heures à 4 °C puis lavés 3 fois 20 minutes dans le même tampon. Ils ont ensuite été post-fixés au tétroxyde d'osmium 1% dans le même tampon pendant une heure à la température de la pièce (22 °C). Après un autre lavage de 20 minutes (dans le tampon) les blocs de spécimens ont été déshydratés dans une série d'éthanol de 30, 60, 90 et 100% à raison de 15 minutes pour chacune des 3 premières concentrations et 3 fois 20 minutes pour l'éthanol absolue. Par la suite, ils ont été infiltrés dans une résine Spurr (Spurr, 1969) selon le protocole suivant:

3:1 etOH-Spurr; 30 minutes
1:1 etOH-Spurr; 30 minutes
1:3 etOH-Spurr; 30 minutes
100% Spurr; environ 16 heures

Les enrobages ont été polymérisés sous vide à 70 °C durant une période de 8 heures.

Des sections argent ont été réalisées avec un couteau de diamant sur un ultramicrotome Reichert et montées sur des grilles de cuivre de 200 ou 300 ouvertures sans support de formvar. Elles ont été colorées à l'acétate d'uranyl en solution alcoolique pendant 20 minutes (Reimann, 1980) et au citrate de plomb pendant 6 minutes selon la méthode de Reynolds (1963). Les observations ont été réalisées sur un microscope électronique Phillips 201.

La fréquence d'apparition des inclusions intravacuolaires et leur nombre moyen par cellule ont été déterminés à partir de l'observation d'un minimum de 30 cellules par échantillon obtenu de sections provenant de 2 enrobages différents. Les intervalles de confiance sur les fréquences d'apparition et les moyennes ont été calculées selon les formules de Sherrer (1984).

2.4 Absorption atomique

La concentration de cuivre (intracellulaire ou adsorbé

à la paroi) chez S. quadricauda exposée pendant 50 jours à 250 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre et chez le témoin a été déterminée par absorption atomique (Spectrophotomètre Perkin-Elmer A.A. 5000 du Laboratoire de Géochimie analytique de l'École Polytechnique de Montréal). Les échantillons d'algues avaient été récoltés par centrifugation et déshydratés à 60 °C pendant 30 heures.

CHAPITRE III

EFFETS DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE CUIURE SUR
L'ULTRASTRUCTURE DE SCENEDESMUS QUADRICAUDA ET CHLORELLA
VULGARIS (EXPÉRIENCES 1 ET 2)

3.1 Résultats

3.1.1 Densité cellulaire de S. quadricauda

Les courbes de croissance pour l'expérience 1 avec S. quadricauda sont présentées à la figure 1. Le témoin présente une très faible augmentation au cours des premières 24 heures suivie d'une croissance quasi-logarithmique entre les jours 1 et 4. Par la suite, entre les jours 4 et 7, l'augmentation de la densité est sensiblement plus lente et la population atteint environ 3×10^6 cellules. ml^{-1} au jour 7.

Les groupes expérimentaux de 25 et 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ suivent en général un profil similaire à celui du témoin sauf pour le ballon de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ qui montre une densité relativement faible au premier jour. A partir du jour 3, ces deux (2) groupes expérimentaux semblent peu affectés par le cuivre. Ils présentent même des densités cellulaires significativement supérieures ($\alpha = 0,05$) au témoin (v.g. jour 5 pour 25 et 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; jour 6 pour 25 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ et jour 7 pour 25 et 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Les ballons traités avec 100, 250, 500, 1,000 et 2,500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, présentent une diminution de densité au cours des 12 et/ou 24 premières heures mais par la suite, la densité cellulaire des quatre (4) premiers ballons se caractérise par une augmentation dont les profils présentent une grande similitude entre eux. Cependant, cette augmentation est suivie d'une décroissance (jours 4-6) qui est d'autant plus marquée et

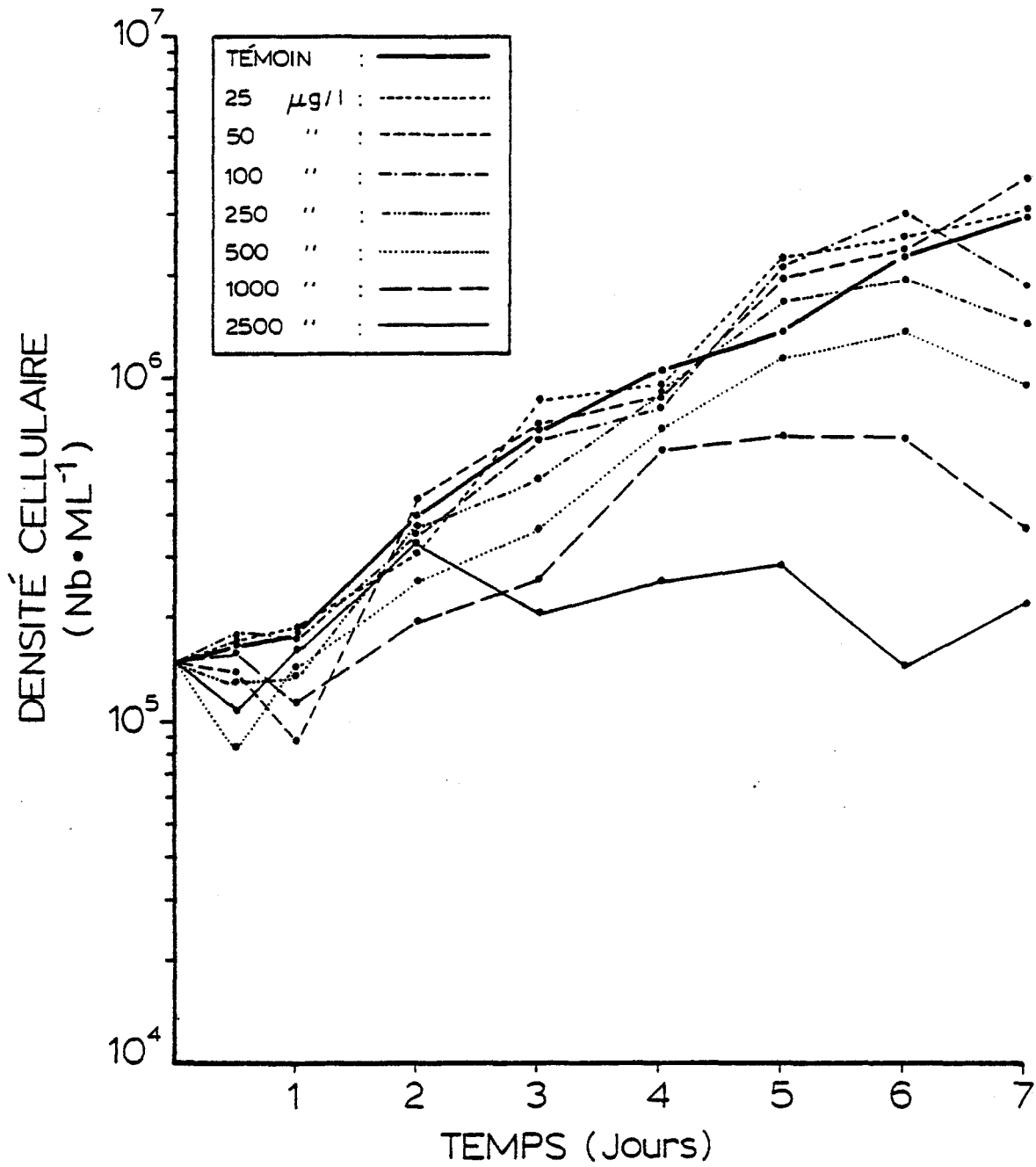


Figure 1 : Variations temporelles de la densité cellulaire de Scenedesmus quadricauda à différentes concentrations de cuivre (expérience 1).

précoce que la concentration de cuivre est élevée. Les ballons traités avec 100 et 250 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ se caractérisent également par des densités significativement supérieures à celles du témoin (v.g. jour 5 pour 100 et 250 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ et jour 6 pour 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Dans le ballon de 2,500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ la densité cellulaire diminue légèrement durant les 12 premières heures mais augmente rapidement pour atteindre une valeur maximale de 3×10^6 cellule $\cdot\text{ml}^{-1}$ après 48 heures. Par la suite, les fluctuations temporelles sont plutôt faibles jusqu'à la fin de l'expérience.

3.1.2 Ultrastructure de S. quadricauda.

Une colonie typique de S. quadricauda est formée de 4 cellules disposées en ligne et fermement accolées (figure 2). Dans certains cas la colonie totalise 8 cellules. Aussi, elle peut en contenir moins (2) ou plus (16 à 32 cellules); cependant ces cas sont beaucoup plus rares.

Chacune des cellules possède un chloroplaste (CH) unique et volumineux, en forme de croissant et qui abrite un pyrénnoïde (PY), lequel est entouré d'un anneau d'amidon (A) (figure 3). Le pyrénnoïde n'est pas traversé par des membranes du thylakoïde comme c'est le cas chez plusieurs autres Chlo-rophycoées. De plus, des masses d'amidon (A) et des globules lipidiques sont souvent présents entre les thylakoïdes lesquels sont disposés par bandes de 4 à 7 unités. L'ultra-

structure du chloroplaste et celle du pyrénnoïde ont été décrit respectivement par Weier et al. (1966) et par Bisalputra et Weier, (1964). D'autre part, le noyau (N) est de forme plus ou moins régulière et est toujours disposé à la périphérie près de la membrane plasmique. Son nucléole (NU) et la double membrane nucléaire sont également bien visibles. Des masses de chromatine sont également présentes dans le nucléoplasme et accolées à la membrane nucléaire interne.

Les mitochondries (M) sont nombreuses, de petite taille et pourvues de crêtes peu développées (figure 4). Elles apparaissent de forme ovoïde ou très allongée selon le plan de coupe et sont distribuées uniformément dans le cytoplasme. De 1 à 3 dictyosomes ont été observés lesquels sont composés de 6 sacs aplatis qui sont invariablement en étroite association avec le noyau. Le réticulum endoplasmique a été rarement observé chez les cellules en interphase mais il se présente comme une double membrane originant de la membrane nucléaire externe. La paroi cellulaire est formée de 3 couches; une couche interne (CC) qui est cellulosique et épaisse, une couche intermédiaire qui est mince, trilaminaire et caractérisée par 2 bandes denses aux électrons de part et d'autre d'une bande claire et d'une couche externe (CP) qui est pectique et ornée de petites excroissances ainsi que de 4 grandes épines aux extrémités de la colonie (figures 4 et 5). Cette dernière couche englobe d'ailleurs toute la colonie (figure 2) alors que l'adhésion entre les cellules

Figure 2 : Micrographie d'une colonie témoin de
S. quadricauda. 7,000 X
Tête de flèche: couche pectique

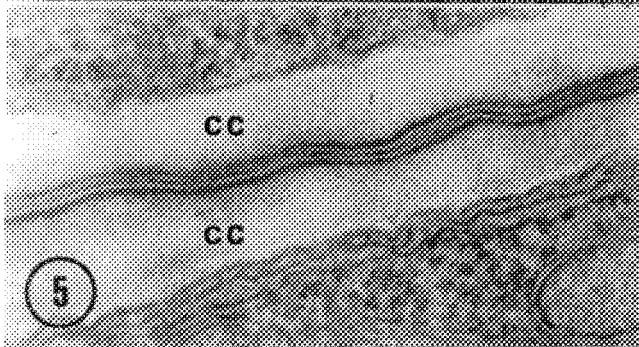
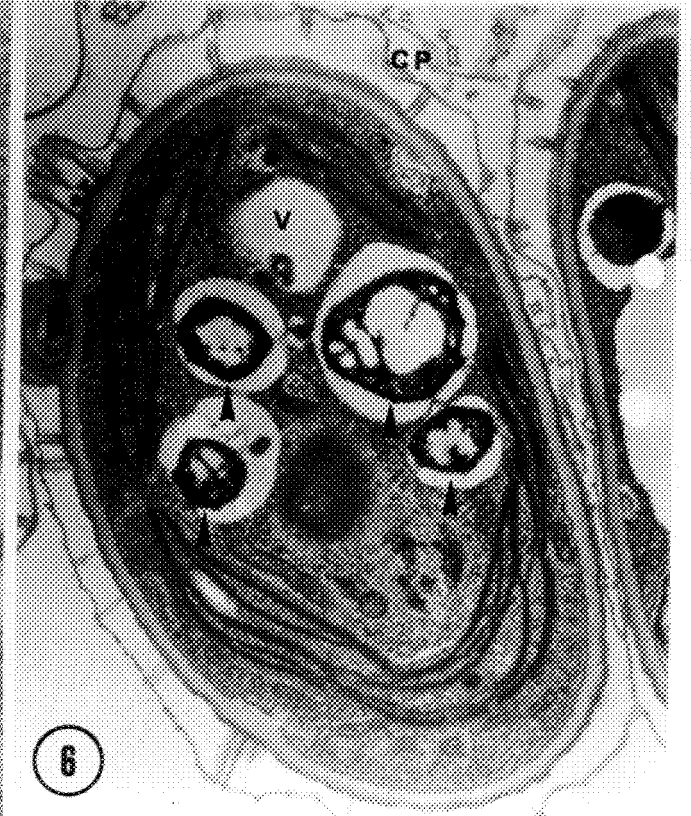
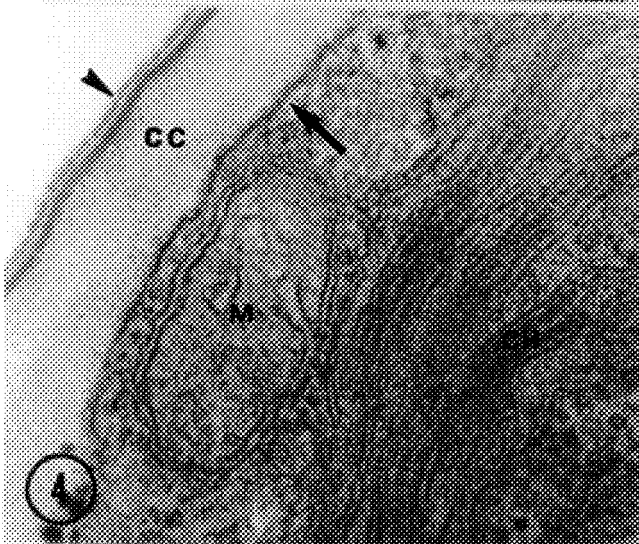
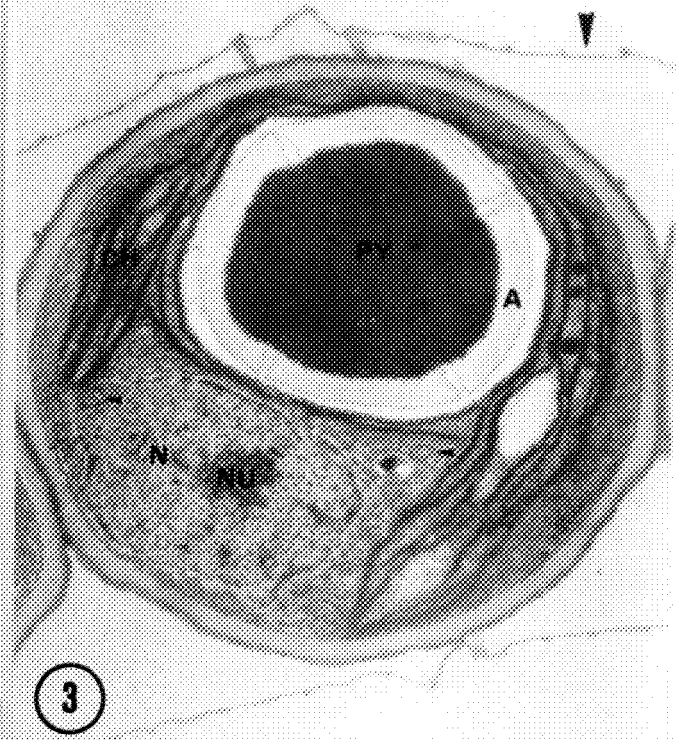
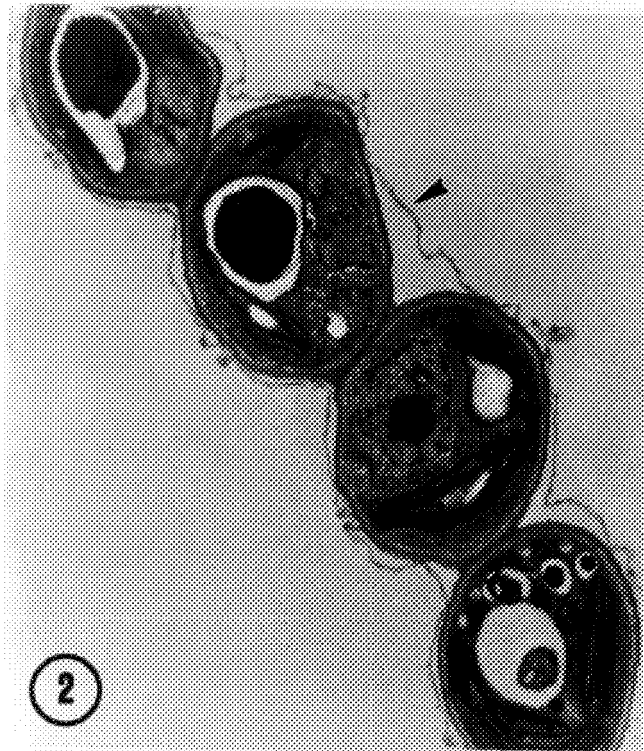
Figure 3 : Micrographie d'une cellule témoin de
S. quadricauda. 13,700 X
Grosse tête de flèche: couche pectique
Petite tête de flèche: mitochondrie

Figure 4 : Micrographie de la paroi cellulaire d'une cellule
témoin de S. quadricauda. 65,000 X
Flèche: membrane plasmique
Tête de flèche: couche trilaminaire

Figure 5 : Micrographie de l'adhésion des parois cellulaires
de 2 cellules témoin de S. quadricauda.
65,000 X

Figure 6 : Micrographie d'une cellule de S. quadricauda
exposée à $500 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.
13,700 X
Têtes de flèche: inclusions

Abréviations : A : amidon
CC : couche cellulosique
CP : couche pectique
CH : chloroplaste
M : mitochondrie
N : noyau
NU : nucléole
PY : pyrénoloïde
U : vacuole



se fait au niveau de la couche trilaminaire (figure 5). L'ultrastructure de la paroi cellulaire a été décrite en détail par Staehelin et Pickett-Heaps (1975). Enfin, la cellule présente généralement une ou plusieurs vacuoles (V) pouvant contenir à l'occasion une ou plusieurs inclusions denses aux électrons. Les vacuoles sont plus évidentes en coupe longitudinale étant souvent situées aux extrémités de la cellule qui est de forme allongée.

Les cellules exposées à des concentrations de cuivre variant entre 25 et 2,500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ont développé de façon générale de grosses inclusions denses aux électrons situées dans une ou plusieurs vacuoles (figure 6). Ces inclusions sont surtout de forme circulaire et présentent des zones claires. Chez certaines cellules, les inclusions se caractérisent par un contour irrégulier ou de forme rectangulaire. D'après nos observations, ces inclusions se forment par la coalescence d'un matériel finement granulaire qui semble provenir directement du cytoplasme environnant (figure 7).

De plus, la présence d'une substance agglutinée observée entre le tonoplaste et les inclusions (figure 8) semble être justement impliquée dans la formation des inclusions. Nous notons de nombreuses petites vacuoles contenant du matériel dense aux électrons (figure 9) et la fusion de certaines d'entre elles apparaît évidente. Chez les cellules témoins la présence de tels granules est également observée mais à un

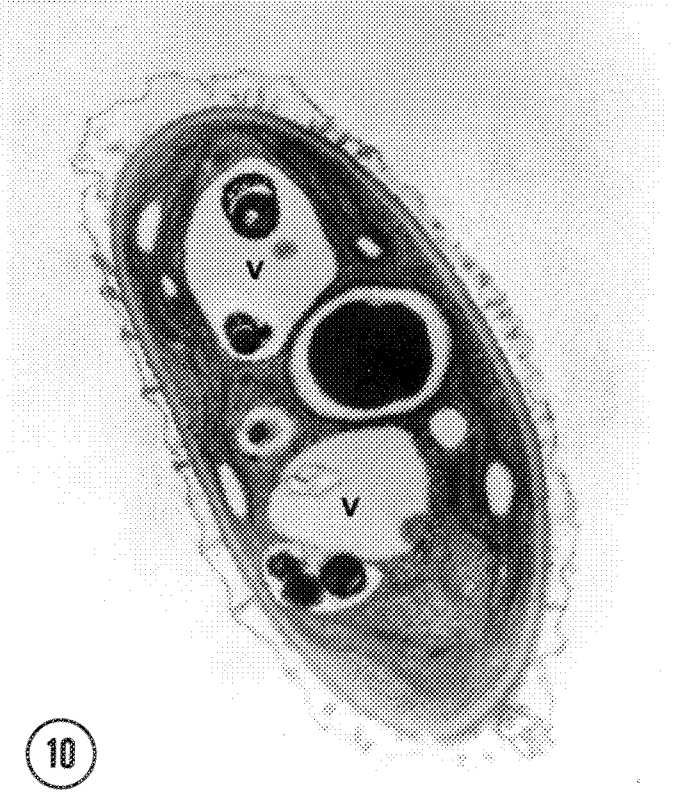
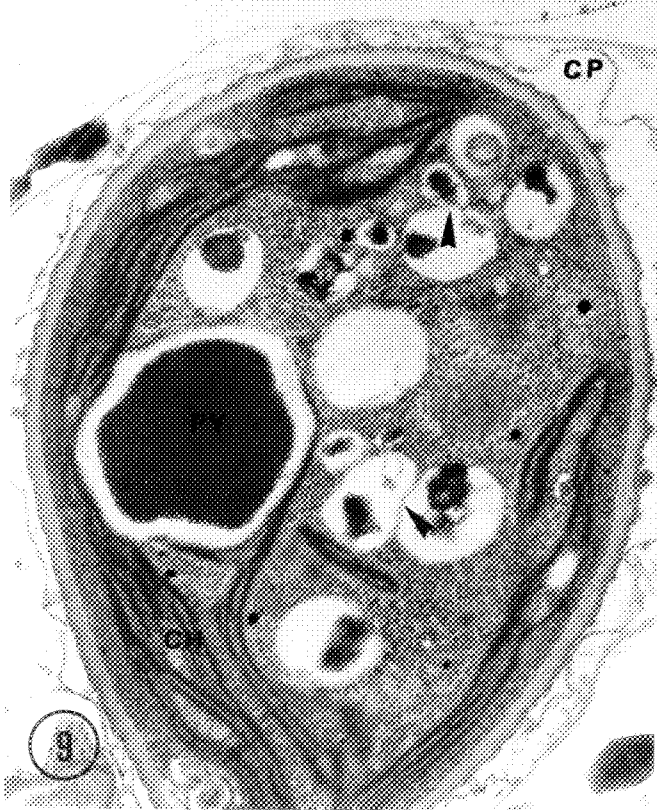
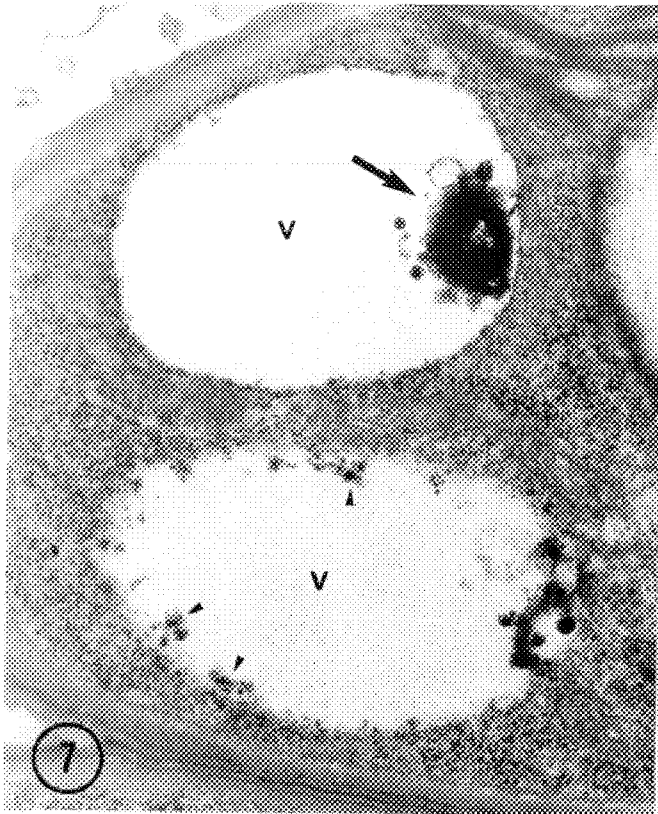
Figure 7 : Micrographie de la formation d'inclusions chez S. quadricauda exposée à $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 19,000 X
Flèche: inclusion en formation
Tête de flèche: matériel finement granulaire qui semble provenir directement du cytoplasme environnant

Figure 8 : Micrographie de la formation d'inclusions chez S. quadricauda exposée à $1,000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 19,000 X
Têtes de flèche: notez la substance agglutinée entre le tonoplaste (membrane de la vacuole) et les inclusions

Figure 9 : Micrographie d'une cellule de S. quadricauda exposée à $1,000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 10,000 X
Têtes de flèche: notez la fusion des vacuoles

Figure 10 : Micrographie d'une cellule solitaire de S. quadricauda exposée à $1,000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 10,000 X

Abréviations : CH : chloroplaste
CP : couche pectique
D : dictyosome
N : noyau
PY : pyrèneoïde
V : vacuole



degré beaucoup moindre.

Lorsque les cellules sont soumises à des concentrations de 500 à 2,500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, il y a une désorganisation des colonies et conséquemment l'apparition de nombreuses cellules solitaires. La couche pectique qui englobe la colonie se brise partiellement et se reforme ensuite chez les cellules individuelles (figure 10). Il est intéressant de mentionner que cette dislocation entraîne une augmentation de la surface cellulaire exposée au milieu environnant. Enfin, certaines cellules présentent des corps membranaires en formation ou dans une vacuole mais ces observations sont cependant rares.

La détermination de la fréquence d'apparition et du nombre moyen d'inclusions par cellules montre une grande divergence entre les ballons traités et le ballon témoin (figure 11). Chez les cellules témoins, la fréquence d'apparition est de l'ordre de 24 % alors qu'elle varie entre 60 et 97 % pour les cellules exposées au cuivre. Tous les groupes expérimentaux sont significativement différents du témoin ($\alpha=0,05$). Quant au nombre moyen d'inclusions par cellule, il n'est que de 0,3 pour le témoin tandis qu'il augmente progressivement avec la teneur en cuivre et atteint une valeur aussi élevée que 4,4 lorsque la concentration de cuivre est de 2,500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Le coefficient de corrélation (r) est de 0,87 ($\alpha=0,05$). Nous avons aussi constaté que le nombre moyen

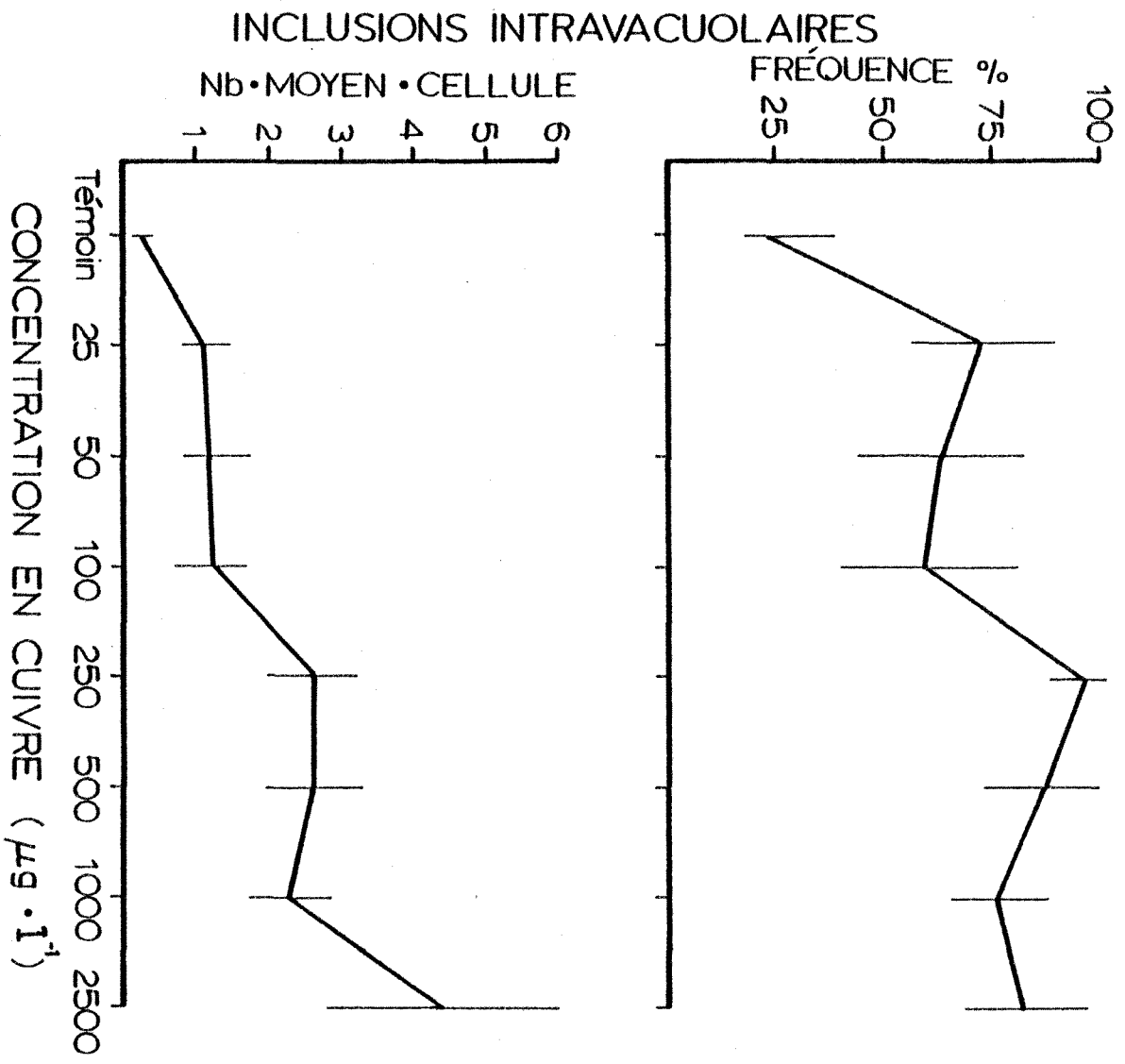


Figure 11 : Fréquence d'apparition et nombre moyen d'inclusions intravacuolaires chez *Scenedesmus quadricauda* à différentes concentrations de cuivre.

d'inclusions par cellule n'est pas significativement différent entre les trois (3) ballons traités avec 25, 50 et $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre et il en est de même pour les quatre (4) ballons traités avec 250, 500, 1,000 et $2,500 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Cependant, ces deux (2) groupes sont significativement différents entre eux.

Le cuivre ne semble pas avoir d'effets marquants sur l'ultrastructure du chloroplaste, du pyrénoloïde, du noyau, des mitochondries et des dictyosomes.

3.1.3 Densité cellulaire de C. vulgaris

La figure 12 illustre l'influence du cuivre sur les variations temporelles de la densité cellulaire de C. vulgaris lors de l'expérience 2. Le ballon témoin se caractérise par une croissance logarithmique très rapide et atteint une densité cellulaire de $3,3 \times 10^7$ cellules·ml⁻¹ après 7 jours de culture. Pour le groupe expérimental de $25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, nous observons une phase de latence au cours des premières 12 heures; par la suite la croissance de la population est dans l'ensemble aussi importante que celle du témoin. Cependant, la densité cellulaire après 6 et 7 jours est significativement plus faible ($\alpha = 0,05$) comme le démontre les intervalles de confiance (annexe 2). Chez la population exposée à $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre, la croissance est faible au cours des premières 24 heures et augmente par la suite jusqu'à la fin de l'expé-

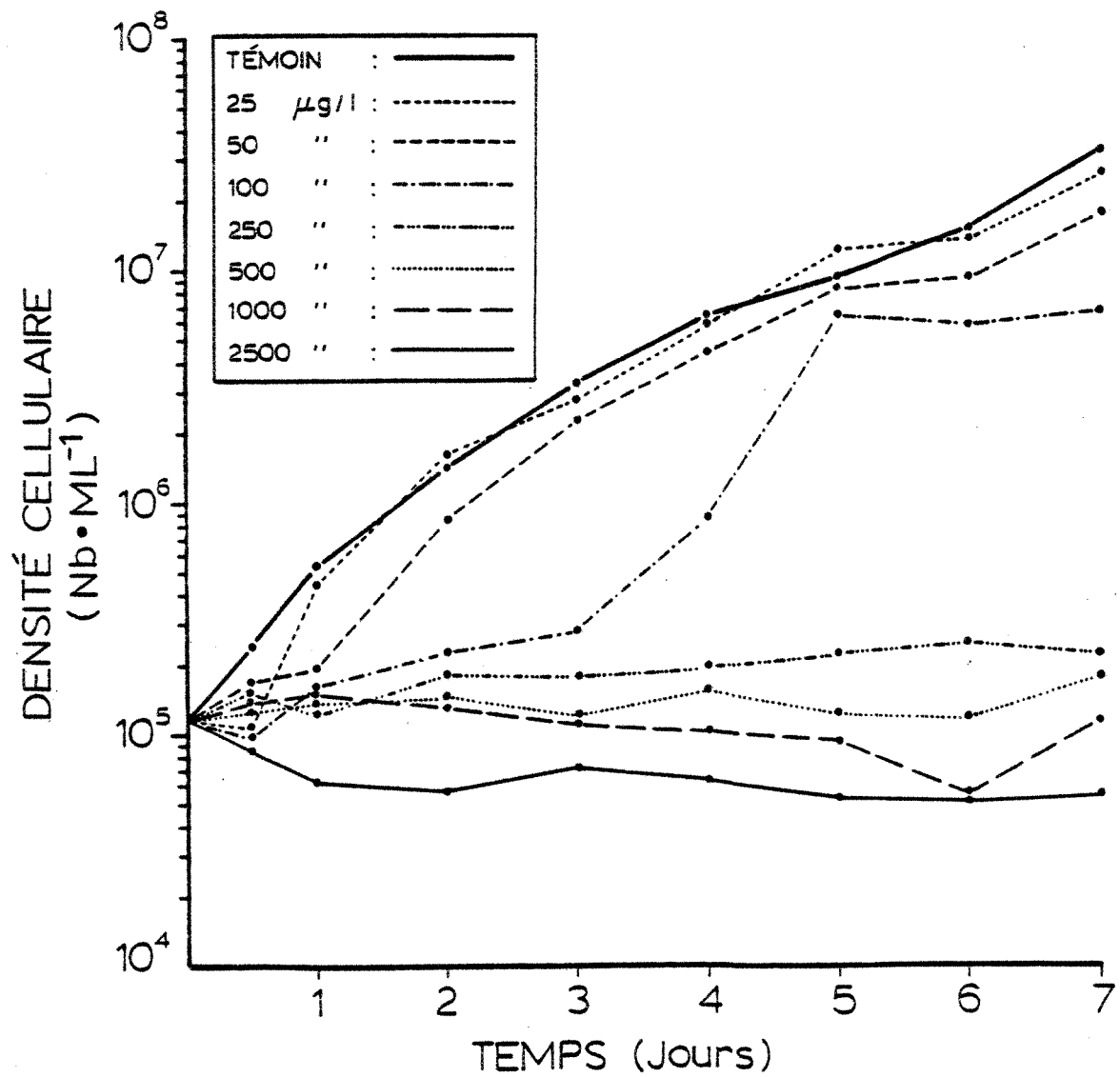


Figure 12 : Variations temporelles de la densité cellulaire de Chlorella vulgaris à différentes concentrations de cuivre (expérience 2).

rience où la densité cellulaire atteint $1,8 \times 10^7$ cellules. ml^{-1} ce qui est presque deux fois moins que pour le témoin. Avec $100 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de cuivre, la croissance est relativement faible durant les trois (3) premiers jours puis augmente rapidement jusqu'au jour 5 où elle atteint $6,8 \times 10^6$ cellules. ml^{-1} et demeure stable jusqu'au jour 7. Dans les ballons traités avec des concentrations de 250, 500, 1,000 et 2,500 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de cuivre, les taux de croissance sont très faibles et dans certains cas (v.g. ballons de 1,000 et 2,500 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de cuivre), la croissance est pratiquement nulle. Les densités sont d'autant plus faibles que la concentrations en cuivre est élevée.

3.1.4 Ultrastructure de C. vulgaris.

C. vulgaris est une cellule de forme sphérique et contenant un gros chloroplaste (CH) en forme de croissant, (figure 13). Ce dernier renferme un pyrénoloïde (PY) entouré par une anneau d'amidon et traversé par une membrane de thylakoïde. Le chloroplaste occupe environ les deux tiers du volume cellulaire et il ne laisse qu'une mince couche de cytoplasme entre sa double membrane et la membrane plasmique. Le noyau est situé toujours à la périphérie de la cellule comme chez S. quadricauda et il contient des masses de chromatine ainsi qu'un nucléole (NU) diffus. Les mitochondries apparaissent de taille et de forme variables et présentent une matrice dense et des crêtes dispersées.

Un seul dictyosome (D) fut observé et il est composé de 5 à 6 sacs aplatis en étroite association avec le noyau.

D'autre part, la paroi cellulaire de C. vulgaris ne possède pas de couche trilaminaire comme c'est le cas chez S. quadricauda et d'autres espèces du genre Chlorella. La cellule de C. vulgaris présente également une ou plusieurs vacuoles pouvant contenir une grosse inclusion dense aux électrons. Enfin, nous observons parfois de petites inclusions distribuées dans le cytoplasme et dans le noyau de même que des corps membranaires mais de façon épisodique.

Chez les cellules exposées à des concentrations de cuivre supérieures à $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, les manifestations les plus évidentes de l'intoxication par l'ion métallique sont les perturbations osmotiques associées aux altérations membranaires. Nous observons en effet une rétraction du cytoplasme à 50 et $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (figures 14-15) alors qu'à partir de $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, (figure 16) la destruction cellulaire est évidente et nous enregistrons des bris de membranes et l'accumulation d'amidon (A) chez les cellules dégénérées. Chez quelques cellules exposées à 25 et $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ nous avons remarqué que les mitochondries sont gonflées (figure 17) et certaines d'entre elles présentent des crêtes anormales ou spiralées (figure 18). Lorsque la concentration de cuivre est de $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ nous notons d'une part, l'apparition d'une couche similaire à la paroi cellulaire et située à l'extérieure de cette dernière

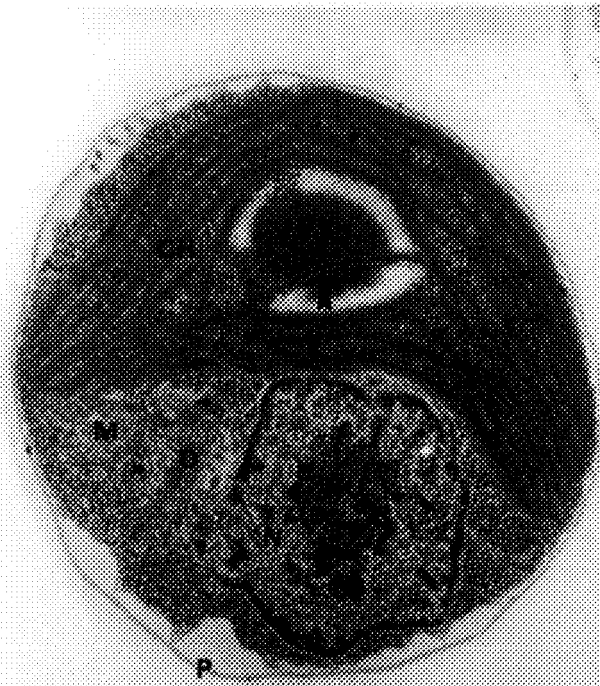
Figure 13 : Micrographie d'une cellule témoin de C. vulgaris. 19,000 X
Grosse tête de flèche: thylakoïde traversant le pyrèneoïde
Petite tête de flèche: corps membranaire

Figure 14 : Micrographie d'une cellule de C. vulgaris exposée à $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 13,700 X
Têtes de flèche: rétraction de la cellule causée par des perturbations osmotiques

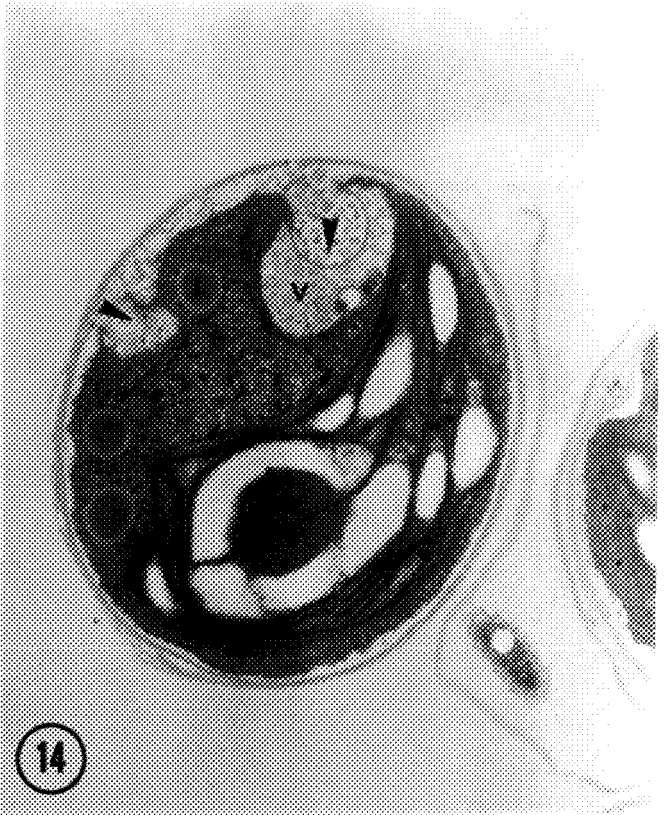
Figure 15 : Micrographie à fort grossissement d'une cellule de C. vulgaris exposée à $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 43,500 X
Flèche: membrane plasmique
Tête de flèche: tonoplaste
Notez l'évidence de problèmes osmotiques au niveau de la vacuole

Figure 16 : Micrographie d'une cellule de C. vulgaris exposée à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 13,700 X

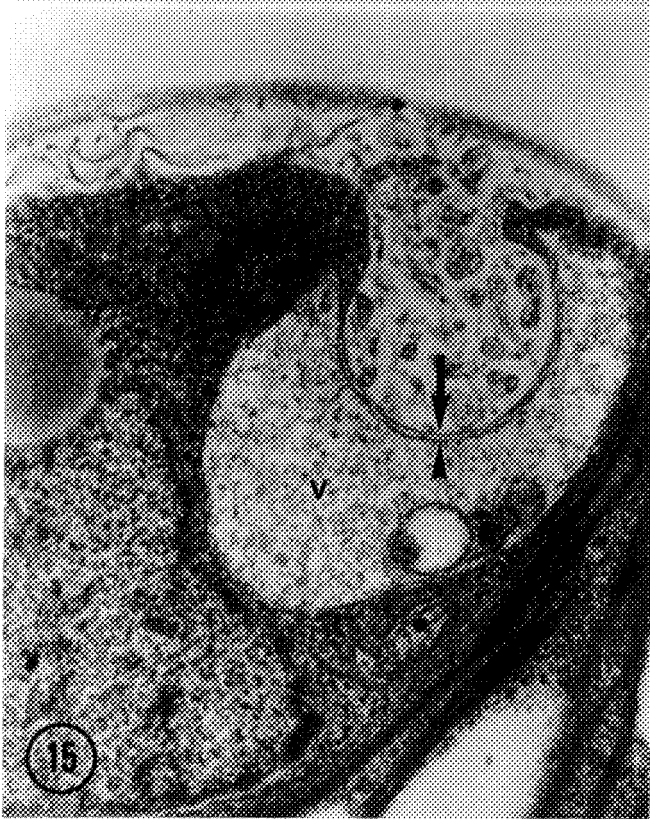
Abréviations : A : amidon
CH : chloroplaste
D : dictyosome
L : lipide
M : mitochondrie
N : noyau
NU : nucléole
P : paroi
PY : pyrèneoïde
V : vacuole



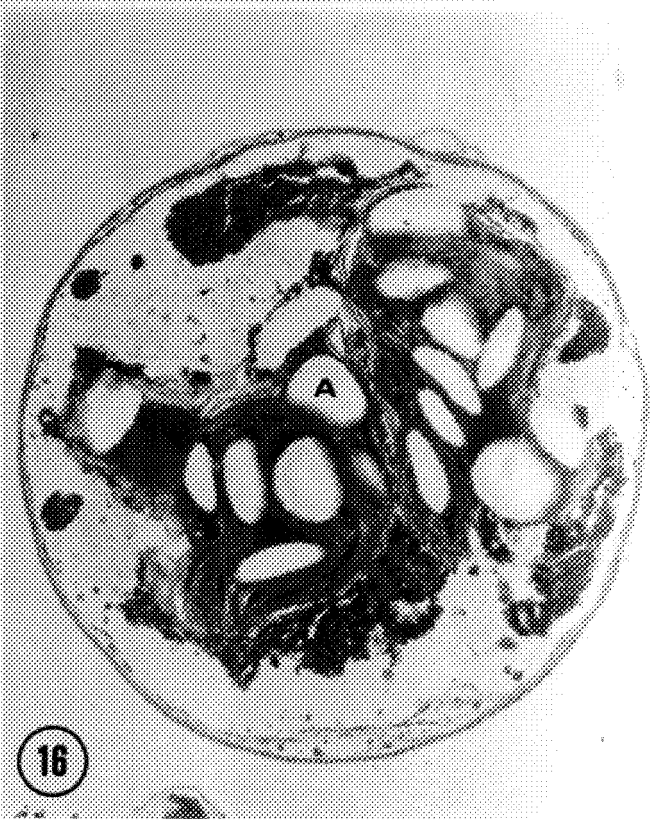
13



14



15



16

(figure 19) et d'autre part, l'augmentation des masses d'amidon dans le chloroplaste.

Par ailleurs, nous observons chez les cellules des corps membranaires (CM) mais leur présence est un peu plus fréquente chez les cellules exposées au cuivre. En général, ces structures se retrouvent dans une vacuole (figure 20) ou associées au tonoplaste (figure 21); dans certains cas, elles ont été observées dans le cytoplasme et semblaient associées aux mitochondries (figure 22) alors que d'autres observations suggèrent qu'elles dérivent directement du tonoplaste (figure 23). La fréquence d'apparition de ces structures est d'environ 1,3 % pour les cellules témoins alors que pour les groupes de 25, 50 et 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre, elle varie entre 3 et 6,5 %. Ces faibles probabilités d'apparitions ne permettent cependant pas de déterminer si les différences sont significatives.

Aussi, nous remarquons que la fréquence d'apparition des inclusions denses aux électrons et leur nombre moyen par cellule augmentent légèrement avec la concentration en cuivre (figure 24); mais les différences ne sont pas significatives sauf pour la fréquence d'apparition avec 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (v.g. 5% pour le témoin et 41% avec 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$).

Le cuivre ne présente pas d'effet évident sur l'ultrastructure du chloroplaste, du pyrénoloïde, du noyau et des dictyosomes de C. vulgaris.

Figure 17 : Micrographie d'une mitochondrie de C. vulgaris exposée à $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 28,000 X

Figure 18 : Micrographie d'une mitochondrie de C. vulgaris exposée à $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 43,500 X

Figure 19 : Micrographie de la paroi cellulaire de C. vulgaris exposée à $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 28,500 X
Tête de flèche: notez l'accumulation de substance à l'extérieur de la paroi cellulaire

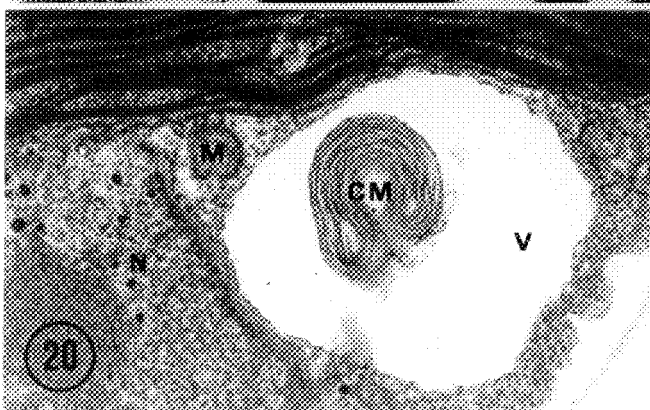
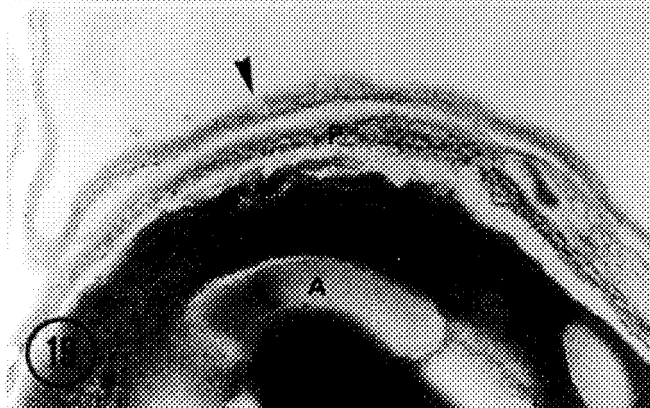
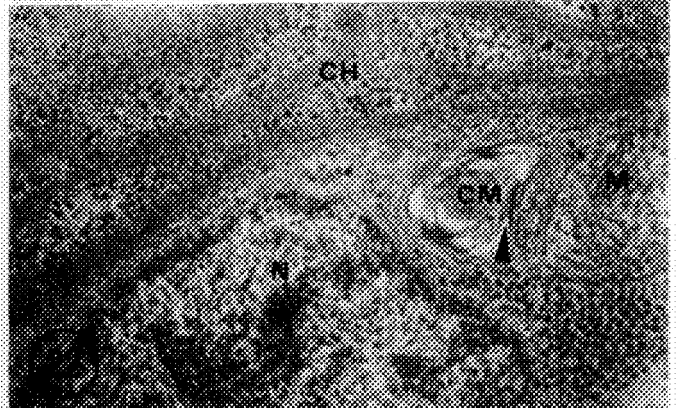
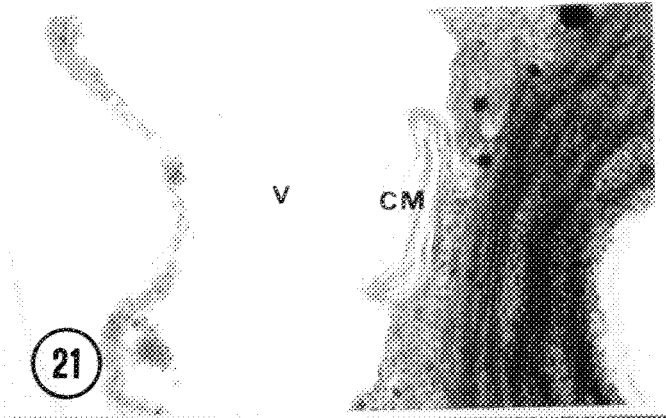
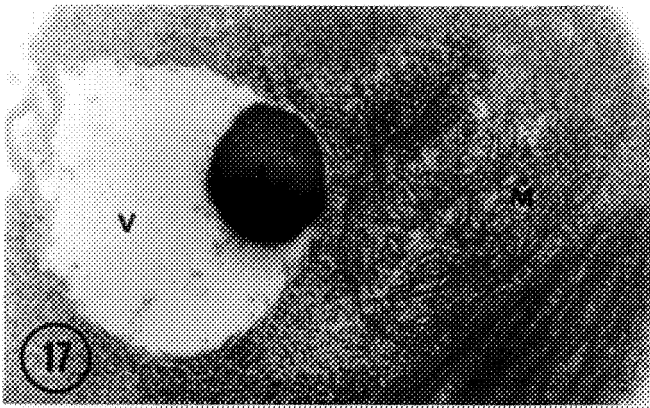
Figure 20 : Micrographie d'un corps membranaire chez C. vulgaris exposée à $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 19,000 X

Figure 21 : Micrographie d'un corps membranaire chez C. vulgaris exposée à $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 19,000 X

Figure 22 : Micrographie d'un corps membranaire chez C. vulgaris exposée à $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 28,000 X
Tête de flèche: notez l'étroit contact entre le corps membranaire et la mitochondrie

Figure 23 : Micrographie d'un corps membranaire qui apparaît en formation chez C. vulgaris exposée à $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 28,500 X

Abréviations : A : amidon
CH : chloroplaste
CM : corps membranaire
I : inclusion
M : mitochondrie
N : noyau
P : paroi
PY : pyrèneoïde
U : vacuole



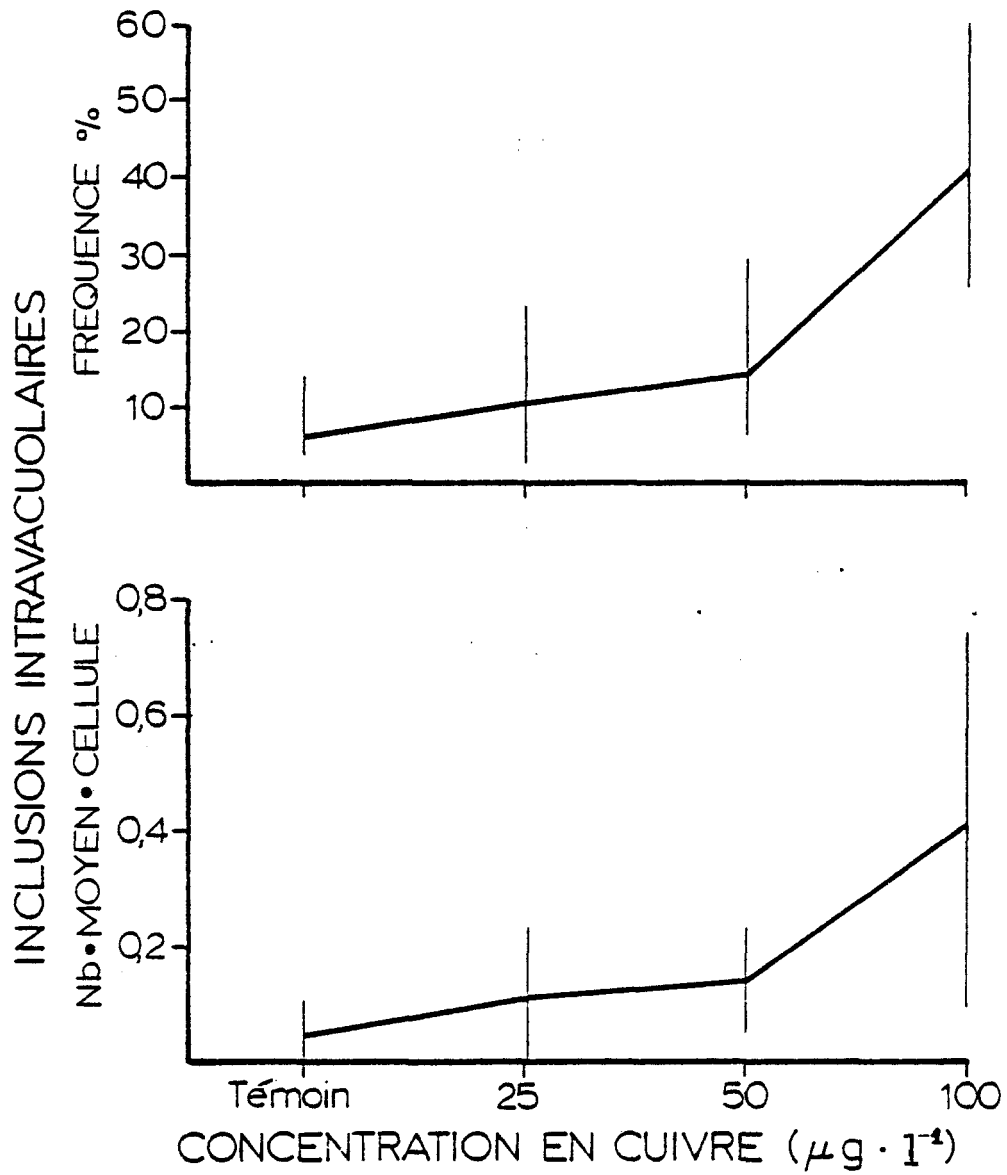


Figure 24 : Fréquence d'apparition et nombre moyen d'inclusions intravacuolaires chez Chlorella vulgaris à différentes concentrations de cuivre.

3.2 Discussion

L'action inhibitrice du cuivre sur la croissance des algues phytoplanctoniques a été abondamment étudiée et des concentrations aussi faibles que $1 \text{ à } 5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ se sont avérées capables de produire des effets néfastes chez Chlorella pyrenoidosa (Steeman-Nielsen et Kamp-Nielsen, 1970). Cependant, le degré de sensibilité des différentes espèces d'algues est très variable et certaines d'entre elles sont particulièrement résistantes. Les présents résultats démontrent que la souche utilisée de S. quadricauda est très tolérante au cuivre. En effet, à une concentration de $1,000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre, la croissance est encore relativement importante et à une concentration aussi élevée que $2,500 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre nous observons même une légère augmentation de la densité (figure 1). Il est important de rappeler que le milieu de culture utilisé était dépourvu d'agent chélateur ou d'autres complexants organiques ce qui augmente d'autant plus l'action toxique du cuivre comme l'ont démontré Sunda et Guillard (1976).

D'autre part, C. vulgaris est beaucoup plus sensible que S. quadricauda. A une concentration de $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ la croissance de C. vulgaris est nulle alors qu'à $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ la phase de latence est prolongée sur une durée de 72 heures (figure 12). De plus, le patron d'inhibition diffère sensiblement entre les deux espèces. Chez S. quadricauda nous

remarquons que la densité cellulaire diminue brusquement au cours des 24 premières heures, suivie d'une période de croissance et d'une seconde inhibition d'autant plus précoce et importante que la concentration en cuivre est élevée (figure 1). Pour C. vulgaris, l'action du cuivre se manifeste plutôt par un prolongement de la phase de latence. D'ailleurs, Albertano et al. (1980) et Albertano et Taddei (1981) ont également observé des types de réponses analogues et en ont identifiés trois (3) en relation avec les différents ions métalliques et l'importance de l'inoculum de départ. Les profils de croissance obtenus pour C. vulgaris correspondent typiquement à ceux obtenus par ces auteurs tandis que ce n'est cependant pas le cas pour S. quadricauda.

Sur le plan ultrastructural, l'intoxication par les ions métalliques fut visualisée à plusieurs reprises par divers types d'inclusions dans le noyau (Silverberg et al., 1975), dans les mitochondries (Silverberg, 1976), dans les vacuoles (Silverberg, 1975., Daniel et Chamberlain, 1981) ou encore sous forme de dépôt dans la paroi cellulaire (Silverberg, 1975). La microanalyse au rayon X a également permis d'identifier de fortes concentrations en phosphate dans ces granules et d'y associer la présence de calcium et de certains éléments traces dont le cuivre (Daniel et Chamberlain, 1981). Dans les inclusions, les phosphates sont sous forme de polyphosphates, éléments constitutifs de plusieurs microorga-

nismes, notamment les algues phytoplanctoniques.

Les polyphosphates joueraient un rôle dans le maintien de l'homéostasie en étant des régulateurs des concentrations intracellulaires en ATP et ADP, en pyro et orthophosphate. et de certains nucléosides polyphosphatés (Kuaiev, 1975). Selon Harold (1966), un des effets du cuivre serait de provoquer un déséquilibre des processus d'assimilation des éléments nutritifs résultant en une accumulation de polyphosphate. Les inclusions que nous avons observées chez S. quadricauda sont similaires aux corps de polyphosphate identifiés chez d'autres organismes (Harold, 1966; Doonan et al., 1979; Adamec et Peverly, 1979). La structure chimique de ces inclusions offrirait des sites convenables pour la liaison du cuivre et aucune réaction métabolique spécifique visant au retrait de forte concentration en ions métalliques du cytoplasme ne serait impliquée.

D'autre part, Stokes et al. (1977) ont mis en évidence dans le cytoplasme de Scenedesmus sp. une protéine de faible poids moléculaire liant spécifiquement le cuivre. Ils ont également démontré que la concentration de cette protéine augmente en fonction de la concentration en cuivre du milieu de culture. Nakajima et al. (1977), rapportent le même type de protéine chez Chlorella regularis alors que Cloutier-Mantha et Brown, (1980) suggèrent l'implication d'une métallothionéine comme agent de détoxification des ions métalliques chez Skeletonema costatum.

Les présents résultats montrent un lien très net entre l'augmentation de la concentration en cuivre et la présence d'inclusions denses aux électrons chez S. quadricauda (figure 11). Compte tenu des études citées plus haut et de la tolérance de S. quadricauda, on peut suggérer que ces inclusions impliquent la présence de cuivre et de polyphosphates et qu'elles soient directement impliquées dans la tolérance en offrant de nombreux sites de liaisons aux ions cuivriques. Nos résultats ne nous permettent pas de spéculer sur l'implication des métallothionéines dans la tolérance au cuivre.

De plus, les vacuoles apparaissent comme un site privilégié de détoxification chez cette espèce. En effet, les substances qui y sont immobilisées sous forme insoluble ne sont pas disponibles pour des sites métaboliquement actifs. Nos résultats montrent également que le matériel impliqué dans la formation des inclusions semble dérivé directement du cytoplasme et qu'il se présente sous forme de fins précipités. Cependant, il faut mentionner que Daniel et Chamberlain, (1981) ont observé de petits granules associés aux membranes chez la diatomée Amphora venata et ces auteurs suggèrent que les inclusions se forment à partir de structures membranaires.

D'autre part, la formation des inclusions se fait par pallier de concentration (figure 11). Entre le témoin et le

ballon traité avec $25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, de même qu'entre les ballons traités respectivement avec 100 et $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, le nombre d'inclusions augmente de façon nette alors qu'entre ceux de 25 et $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre, les différences sont plutôt faibles de même qu'entre ceux de 250 et $1,500 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Ce type de réponse reflète possiblement l'existence de concentrations "seuils" auxquelles les processus physiologiques ayant lieu au niveau membranaire sont modifiés de façon rapide.

D'ailleurs, il est bien connu que l'un des premiers sites d'action des ions métalliques est la membrane plasmique (Passow et al., 1961) et que le cuivre agit de façon marquée sur la perméabilité membranaire des algues unicellulaires (Riisgard et al., 1980. Riisgard, 1979., Overnell, 1975). d'autre part, il est possible que la formation d'inclusions nécessite une demande accrue en énergie, ce qui pourrait expliquer en partie la réduction de la croissance.

Il est intéressant de mentionner que Silverberg et al., (1976) rapportent la présence de complexes intranucléaires chez une souche de S. quadricauda tolérante au cuivre. Aucune observation du genre ne fut possible au cours de la présente expérience.

Par ailleurs, la dislocation des colonies qui fut observée à des concentrations supérieures à $500 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre appuie la thèse selon laquelle le cuivre provoque un déséquilibre des processus nutritifs. En effet, Shubert et

Trainor (1974) ont démontré que la présence de cellules solitaires chez les populations naturelles est associée à une déplétion du milieu en éléments nutritifs.

Chez C. vulgaris les observations ultrastructurales sont sensiblement différentes et les dommages aux structures cellulaires sont beaucoup plus évidents que chez S. quadricauda. Les perturbations osmotiques associées aux dommages membranaires de même que la présence d'organites gonflés ont été rapportées à quelques reprises dans la littérature et notamment par Smith (1983). D'autre part, des mitochondries présentant des crêtes anormales ou spiralées ont été observés par Keyhani (1973) et Silverberg (1976). Nos observations à ce sujet sont donc en accord avec celles effectuées par ces auteurs. Il est fort probable que l'activité respiratoire soit réduite chez les mitochondries présentant des anomalies structurales. Effectivement, il est connu que l'intégrité structurale de cet organite est essentiel à son rendement optimum (Lehninger, 1970). Cependant, les variations de taille et de forme chez les mitochondries des cellules témoins impose la prudence quant à l'interprétation de ce résultat.

On note par ailleurs que les inclusions denses aux électrons augmentent faiblement avec la concentration en cuivre (figure 24). Compte tenu de la sensibilité de C. vulgaris, ce mécanisme ne semble pas jouer un rôle déterminant de détouxi-

fication comme c'est le cas chez S. quadricauda. En bref, C. vulgaris isolée de la rivière Saguenay présente peu de caractéristiques d'une souche tolérante. D'ailleurs, Foster (1977) rapporte chez une souche de C. vulgaris isolée de la rivière Hayle (Angleterre) qui est contaminée par le cuivre ($120 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), une capacité de croissance à une concentration de $1,000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Il a été également démontré que cette souche possède un mécanisme d'exclusion du cuivre. De même, Ben-Bassat et Mayer (1975, 1977) ont démontré que C. pyrenoidosa peut volatiliser le mercure en produisant et en excrétant dans son environnement, un facteur réducteur qui transforme le HgCl_2 en mercure élémentaire qui est alors éliminé dans l'atmosphère. DeFilippis et Pallaghy (1976) rapportent le même genre d'observation et également avec Chlorella sp. Nos résultats portent à croire que les inclusions pourraient être impliquées à un certain degré dans la détoxification mais il s'agirait d'un mécanisme secondaire par rapport à l'exclusion. De même, la sensibilité de cette espèce lors de nos expériences suggère que le cuivre ne constitue pas un facteur de stress important dans la rivière Saguenay. En effet, selon Stokes et al. (1973) une sélection de souche tolérante s'effectue dans les milieux aquatiques contaminés par les métaux traces. A cet effet, il est important de mentionner que les fortes concentrations de matière particulaire et dissoute dans le fjord du Saguenay offre un grand pouvoir de complexation et conséquemment de détoxification (Sunby et

Loring, 1978). Il faut également mentionner que le plus grand rapport surface/volume chez C. vulgaris, de même qu'un pH plus élevé dans le milieu de culture ont pu contribuer à une plus grande toxicité du cuivre chez C. vulgaris par rapport à S. quadricauda. En effet, pour des densités cellulaires égales, la quantité de cuivre disponible par unité de volume cellulaire est plus grande chez C. vulgaris que chez S. quadricauda. De plus, à pH 7,00 (C. vulgaris) il y a moins de calcium dissout qu'à pH 6,80 (S. quadricauda) donc moins de possibilités de déplacer le cuivre à la surface des membranes que chez S. quadricauda. Ces interactions au niveau membranaire ont été étudiées par Campbell et Stokes (1985) et Harrisson et al., (1986).

D'autre part, nous observons une augmentation de la fréquence d'apparition des corps membranaires chez les cellules exposées au cuivre. Ces structures se retrouvent généralement dans une vacuole mais nous en avons observées quelques unes dans le cytoplasme. Dans certains cas, ces structures semblaient associées aux mitochondries. Il est intéressant de mentionner que Sicko-Goad et Stoermer (1979) rapportent que l'augmentation des corps membranaires est corrélée à un gonflement et à une diminution du nombre de mitochondries chez Diatoma tenue exposée au plomb. Cependant, d'autres observations suggèrent que le tonoplaste est directement impliqué dans la formation des corps membranaires (figure 23).

En résumé, le cuivre exerce un effet très net sur les caractéristiques ultrastructurales de S. quadricauda et C. vulgaris. La première espèce s'est montrée très tolérante au cuivre et la formation d'inclusions dans les vacuoles est corrélée à la concentration en cuivre ce qui indique très probablement leur implication dans la tolérance. D'autre part, la souche de Chlorella isolée de la rivière Saguenay présente une sensibilité relativement élevée au cuivre, laquelle se manifeste par des perturbations osmotiques et des altérations membranaires. Cependant, la formation d'inclusions y est présente à un degré moindre et pourrait, dans une certaine mesure, être impliquée dans la détoxification.

CHAPITRE IV

EFFETS D'UNE EXPOSITION A LONG TERME AU CUIVRE SUR L'ULTRA-
STRUCTURE DE SCENEDESMUS QUADRICAUDA
(EXPÉRIENCE 3)

4.1 Résultats

4.1.1 Courbes de croissance

L'analyse des courbes de croissance de S. quadricauda (expérience 3) illustrées à la figure 25 nous révèle que le groupe témoin présente une légère augmentation au cours des dix premiers jours et ce, malgré un taux de dilution de 0,5. Par la suite, la densité cellulaire connaît quelques fluctuations quotidiennes jusqu'à la fin de l'expérience mais la densité après 50 jours est supérieure à celle observée au début. Pour le groupe expérimental exposé à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre, le taux de croissance connaît une diminution brusque au cours des 8 premiers jours suivie d'une période de fluctuations (jours 8-15) très marquées. Durant la période comprise entre les jours 22-28, la densité cellulaire augmente de façon très marquée et atteint un niveau comparable au témoin. Le taux de croissance s'est donc avéré supérieur au témoin au cours de cette période. Enfin, entre les jours 28 et 50, la croissance augmente légèrement au début puis se stabilise au même niveau que le témoin. Entre les jours 10 et 22, le taux de dilution fut ralenti à 0,25 ce qui explique en bonne partie l'augmentation de la population entre les jours 10 et 22. Cependant, à partir du jour 22 le taux de dilution est identique au témoin.

Il faut noter que les fluctuations quotidiennes de densité cellulaire pour le témoin et le groupe expérimental

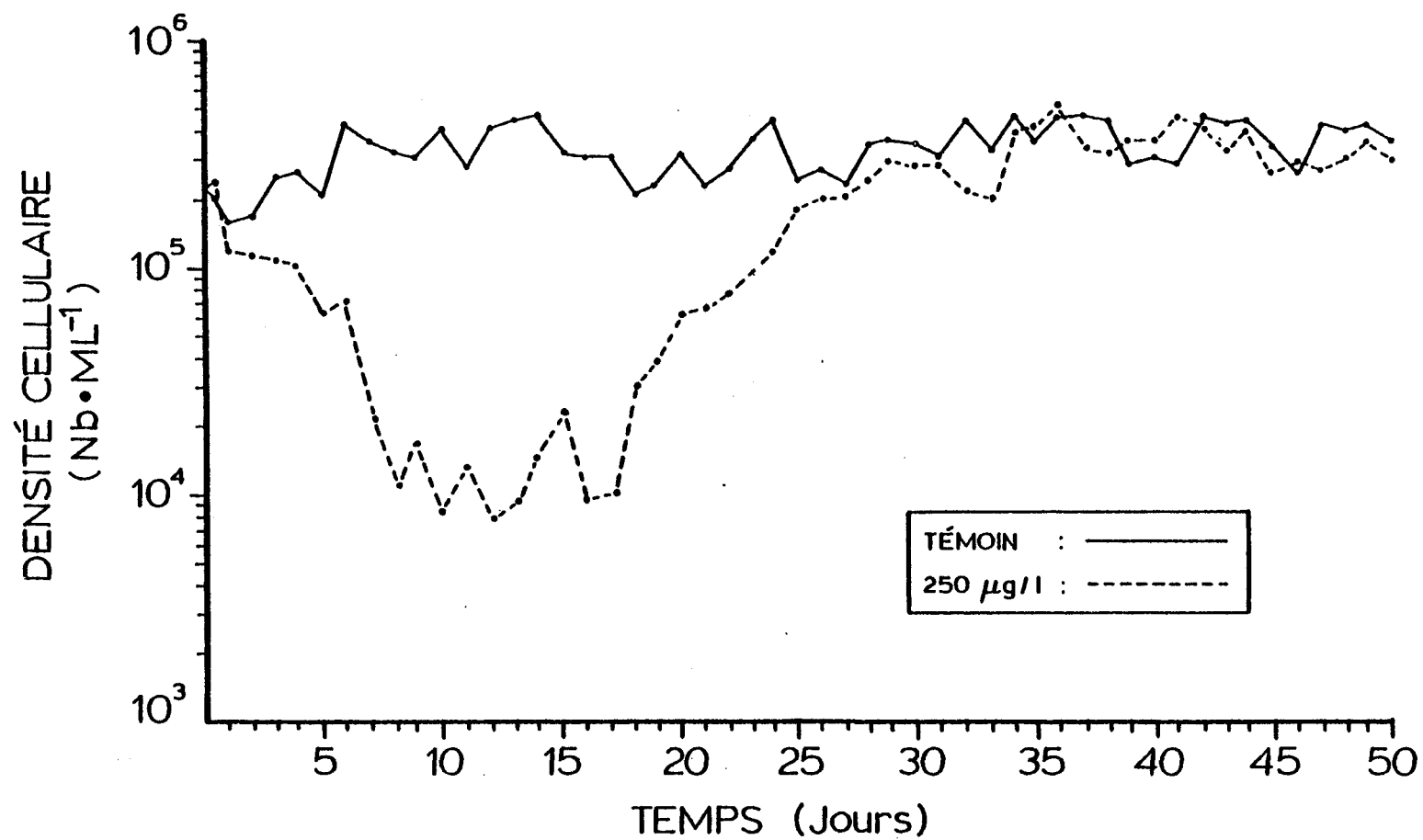


Figure 25 : Variations temporelles de la densité cellulaire de Scenedesmus quadricauda exposée à 250 µg·l⁻¹ de cuivre (expérience 3).

peuvent être reliées en partie à des problèmes d'adhésion des cellules aux parois de verre des ballons de culture ou à la congestion des tubulures permettant la sortie de milieu de culture et de cellules.

4.1.2

Modifications ultrastructurales

Après une exposition de 1,5 et 3 heures à une concentration de $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre, *S. quadricauda* présente des modifications ultrastructurales marquées. Nous observons une rétraction importante du chloroplaste qui tend à former des lobes qui se détachent de la structure principale (figure 26). Le chloroplaste apparaît alors fragmenté en plusieurs sous-unités dont la matrice est diffuse et il devient impossible de distinguer les bandes des thylakoïdes. D'autre part, le cytoplasme prend également un aspect diffus: les mitochondries deviennent indistinctes et un cas unique d'inclusions denses aux électrons fut observé en association avec le pyrénoloïde (figure 27). Les cellules présentent aussi une dissociation entre le chloroplaste et le cytoplasme environnant, de même que des bris de la paroi cellulaire. Après 3, 6 et 12 heures d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre, les effets sont encore plus marqués et plusieurs cellules apparaissent dans un état de dégénérescence avancée (figure 28). Nous remarquons également une dissociation importante

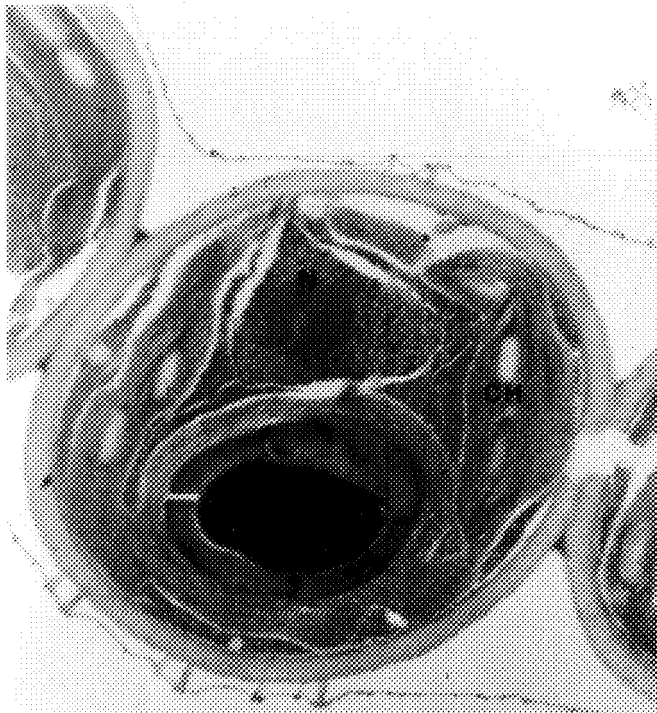
Figure 26 : Micrographie d'une cellule de S. quadricauda après 3 heures d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 10,000 X

Figure 27 : Micrographie d'une inclusion associée au pyrénéoïde chez une cellule de S. quadricauda après 3 heures d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 19,000 X
Têtes de flèche: inclusions associées au pyrénéoïde

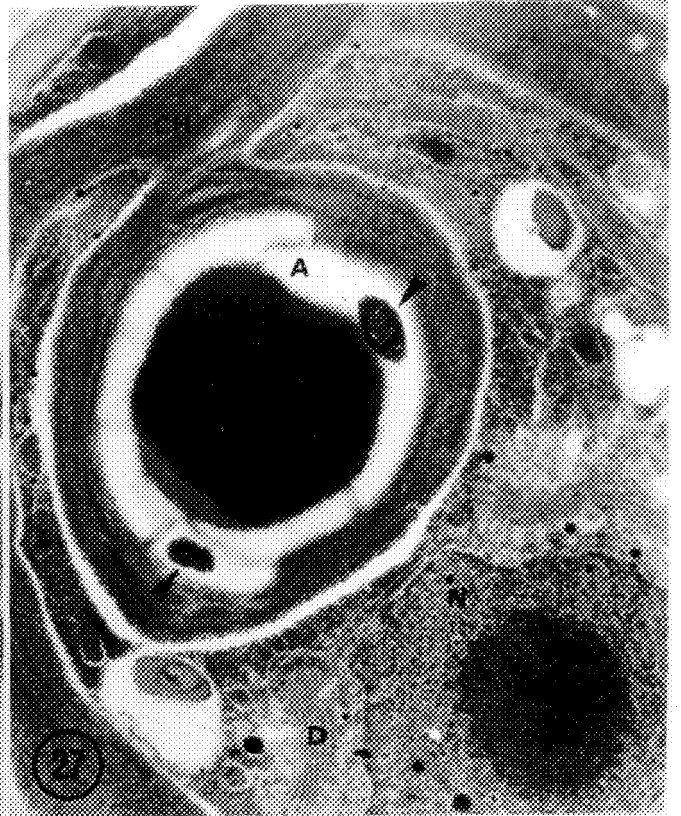
Figure 28 : Micrographie d'une cellule de S. quadricauda après 6 heures d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 7,000 X

Figure 29 : Micrographie d'une cellule de S. quadricauda après 5 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 10,000 X

Abréviations : A : amidon
CH : chloroplaste
D : dictyosome
L : lipide
N : noyau
NU : nucléole
P : paroi
PY : pyrénéoïde



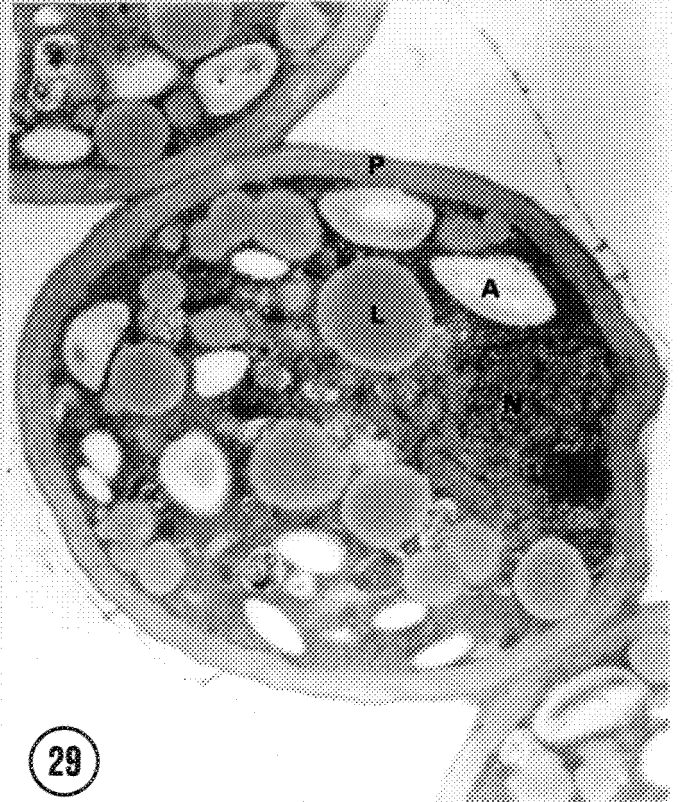
26



27



28



29

entre le cytoplasme et la paroi cellulaire, et entre le chloroplaste et le cytoplasme. Nous observons des bris de la paroi cellulaire et plusieurs cellules deviennent solitaires. De plus, quelques cellules présentent des noyaux très déformés. Après 24 heures, les mêmes effets sont enregistrés mais à un degré moindre et sont associés à un début d'accumulation d'amidon et de lipides ainsi qu'à un épaississement de la paroi cellulaire. Après 2 et 3 jours, et entre la période 5-10 jours, il y a une accumulation très importante d'amidon et de lipide laquelle masque presque totalement les différentes structures cellulaires (figure 29). Durant cette période, nous constatons également que les inclusions intravacuolaires sont très abondantes et elles se distribuent entre les masses d'amidon et les globules de lipide (figure 30).

Par ailleurs, après 10 jours d'exposition nous observons un fort épaississement de la paroi cellulaire (figure 31). Dans certains cas, plusieurs cellules sont binucléées (figure 32) tandis que d'autres se caractérisent par de petites inclusions dans le noyau et le cytoplasme (figure 33). La fréquence d'apparition des inclusions intravacuolaires qui sont distribuées entre les masses d'amidon et les globules de lipide est significativement supérieure ($\alpha=0,05$) au témoin pour les temps 72 heures, 5 jours et 15 jours alors que leur nombre moyen par cellule l'est également pour les temps 72 heures et 5, 10 et 15 jours (figure 34).

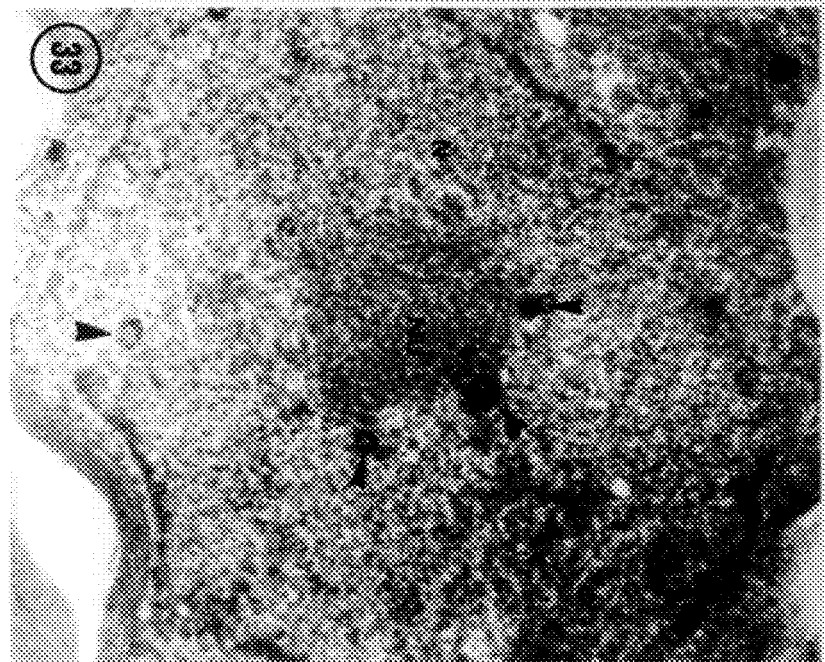
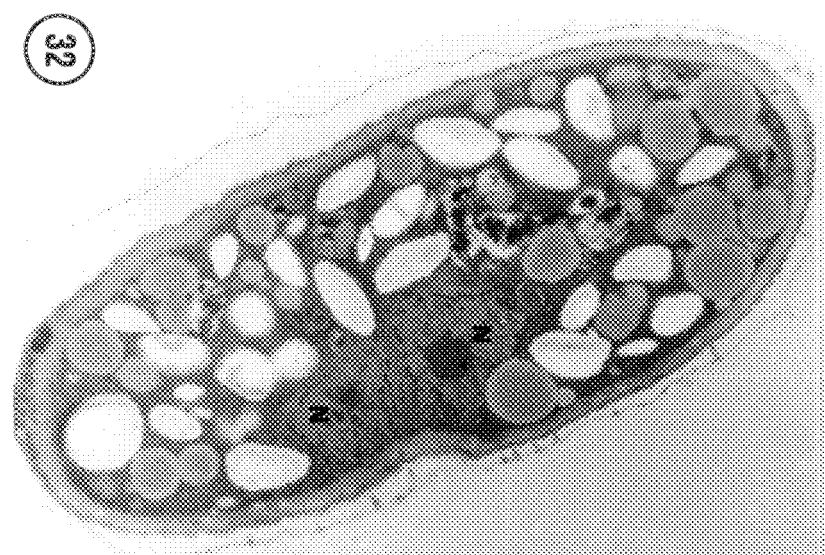
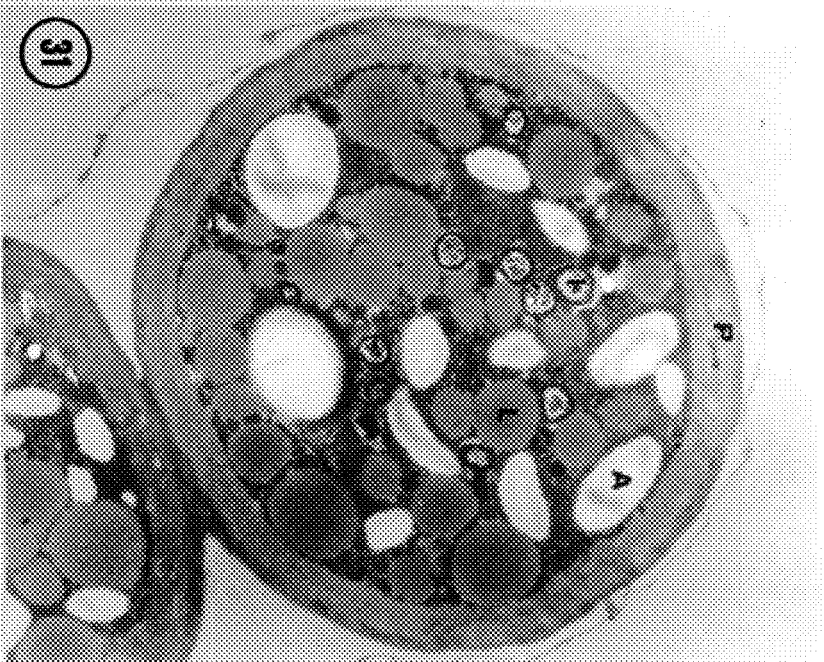
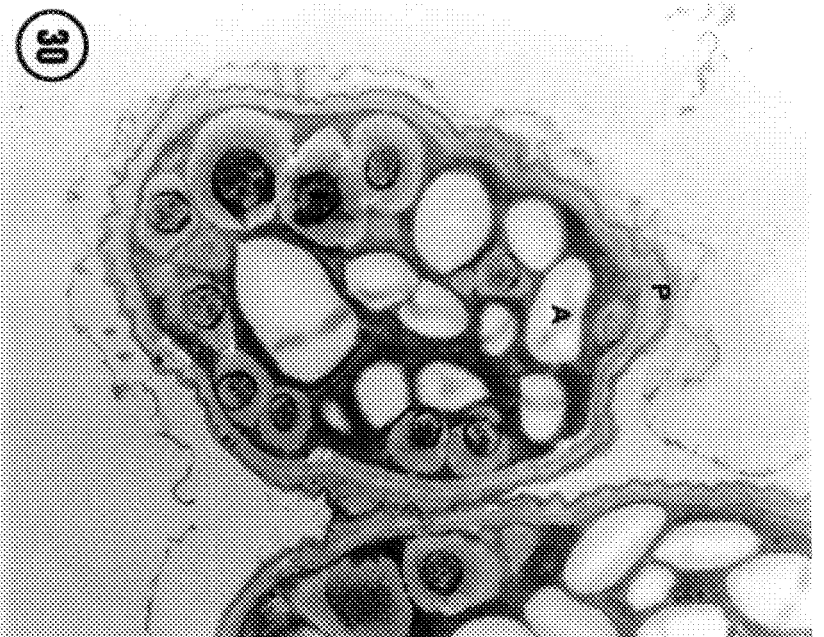
Figure 30 : Micrographie d'une cellule de S. quadricauda après 72 heures d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 7,000 X

Figure 31 : Micrographie d'une cellule de S. quadricauda après 10 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 10,000 X

Figure 32 : Micrographie d'une cellule binucléée de S. quadricauda après 5 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 7,000 X

Figure 33 : Micrographie d'un noyau présentant des inclusions chez S. quadricauda après 5 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 43,500 X
Têtes de flèche: inclusions

Abréviations : A : amidon
I : inclusion
L : lipide
N : noyau
NU : nucléole
P : paroi



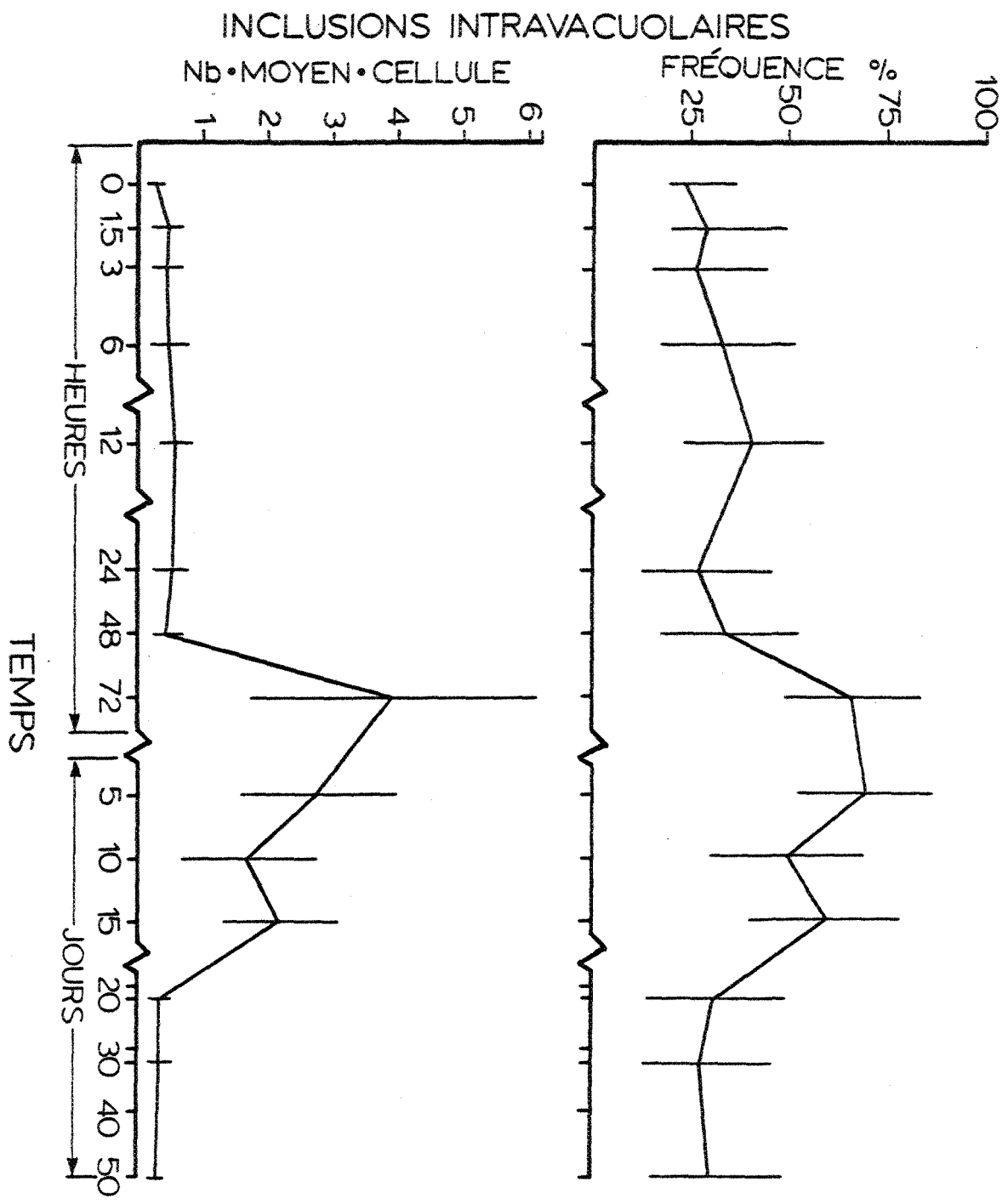


Figure 34 : Variations temporelles des fréquences d'apparitions et des nombres moyens d'inclusions intravacuolaires chez *Scenedesmus quadricauda* exposée à 250 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre.

La formation des inclusions se produit donc massivement entre 48 et 72 heures. Après une période de 15 jours, les cellules conservent sensiblement le même aspect mais à un degré moindre tandis qu'après 22 jours d'exposition nous observons un changement marqué. Les réserves d'amidon et de lipides disparaissent en grande partie et la paroi cellulaire redevient beaucoup plus mince (figure 35). Les organelles deviennent alors plus visibles mais le contour des cellules est souvent irrégulier. A partir de 32 jours d'exposition, les réserves d'amidon et de lipides diminuent encore; les structures cellulaires deviennent très nettes et les cellules présentent aussi des formes plus ou moins régulières par rapport au témoin. De plus, le réticulum endoplasmique devient visible chez un plus grand nombre de cellules. Enfin, après 50 jours d'exposition à une concentration de $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre, le réticulum endoplasmique est apparent chez la majorité des cellules; aussi de nombreux ribosomes sont visibles et le cytoplasme prend un aspect très granulaire (figure 37).

Les cellules témoins que nous avons observées aux temps 72 heures, et après 5, 15, 32 et 50 jours d'exposition n'ont montré aucune variation notable dans leur ultrastructure.

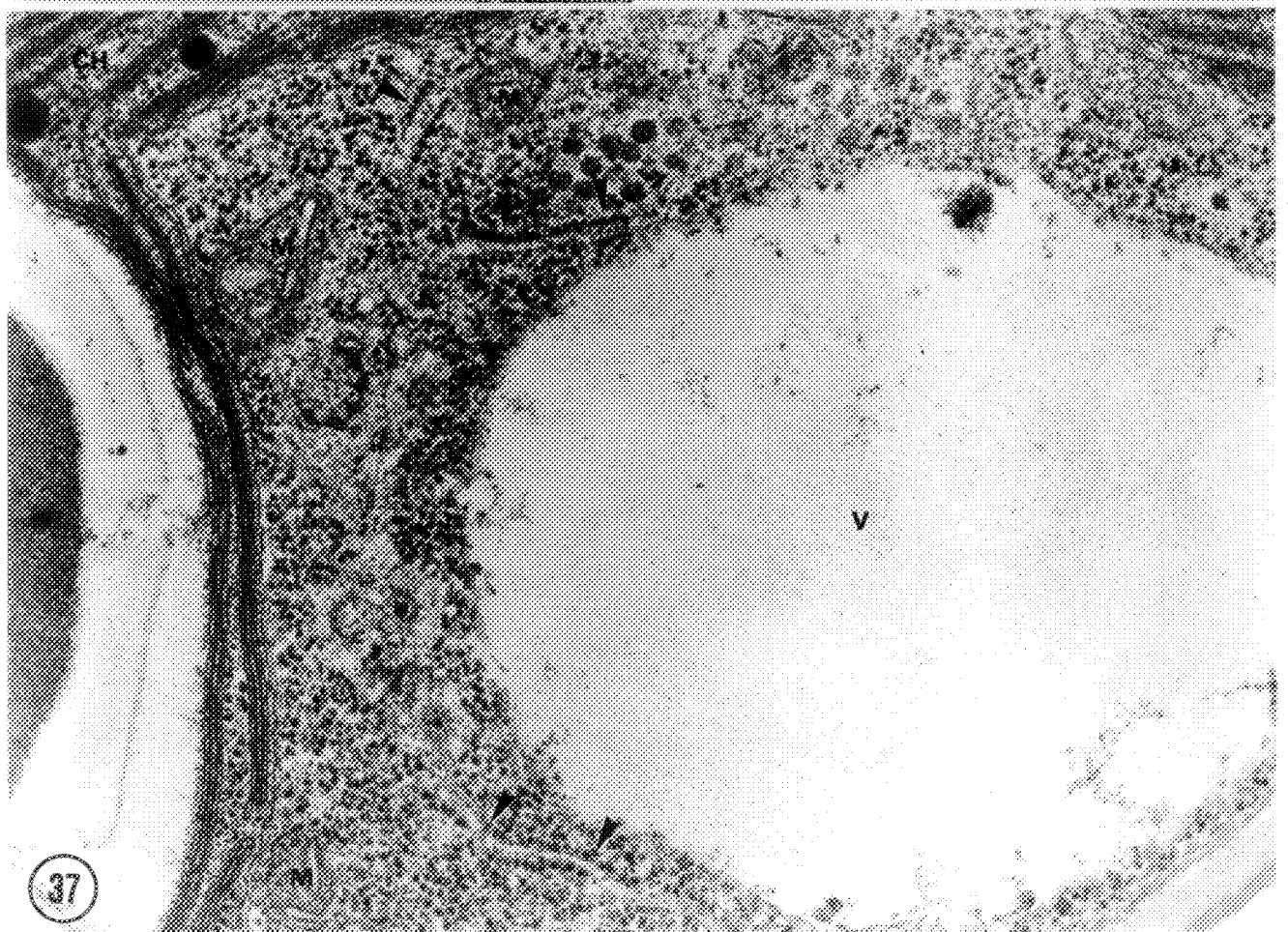
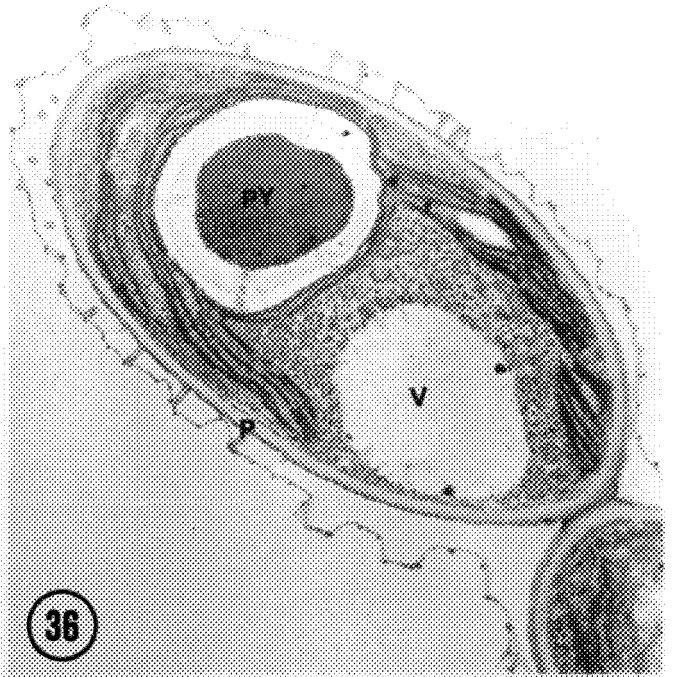
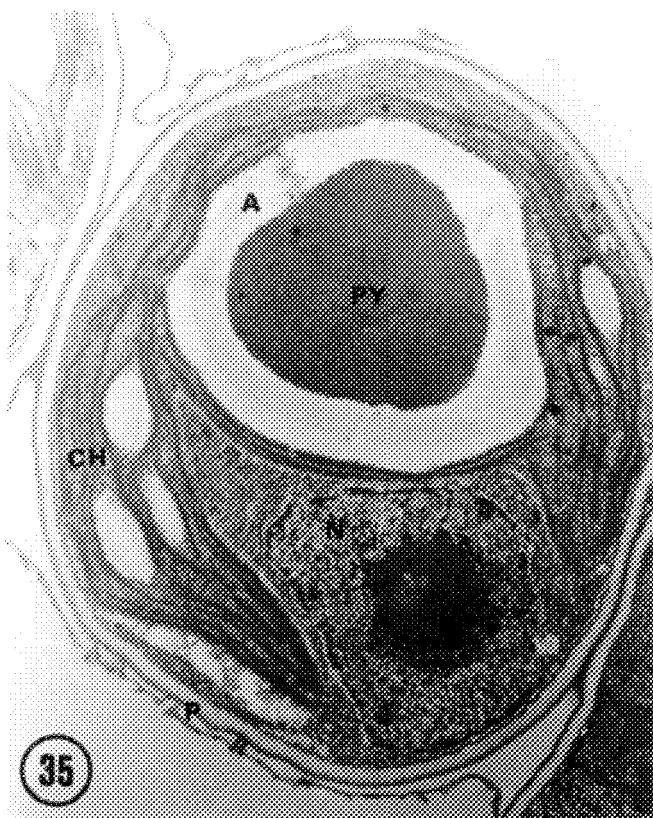
A partir d'aliquotes prélevés au temps 50 jours, nous avons déterminé par absorption atomique la concentration en

Figure 35 : Micrographie d'une cellule de S. quadricauda après 22 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 13,700 X

Figure 36 : Micrographie d'une cellule de S. quadricauda après 50 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 10,000 X

Figure 37 : Micrographie du cytoplasme et du réticulum endoplasmique de S. quadricauda après 50 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre. 28,500 X
Têtes de flèche: notez le réticulum endoplasmique et les ribosomes qui y sont attachés. Le cytoplasme contient également de nombreux ribosomes.

Abréviations : A : amidon
CH : chloroplaste
M : mitochondrie
N : noyau
P : paroi
PY : pyrénocide
U : vacuole



cuiivre pour le témoin et le groupe expérimental. L'analyse révèle une concentration de 8.2 fg (femtogramme) de cuiivre par cellule pour le témoin et de 141 fg de cuiivre par cellule pour le groupe expérimental. Le facteur de bioaccumulation est donc de 17,2. Il faut noter que le cuiivre dosé est intracellulaire ou adsorbé à la paroi de la cellule.

4.2 Discussion

L'adaptation des algues unicellulaires à des altérations de leur environnement peut s'expliquer par des ajustements physiologiques contrôlés et orientés vers l'optimisation du taux de croissance (Shuter, 1979; Hochachka et Somero, 1973). Ces modifications du métabolisme se traduisent souvent par des changements de la composition chimique de la cellule comme il a été démontré entre autre par Li (1979). Il est intéressant de noter que Shuter (1979), propose un modèle d'adaptation physiologique chez les algues unicellulaires, modèle basé sur la distribution différentielle du carbone en 4 compartiments bien distincts: le carbone associé à l'appareil photosynthétique, le carbone associé à la synthèse de macromolécules, le carbone structural et le carbone de réserve.

La distribution et l'échange de carbone entre ces différents compartiments seraient fonction des conditions environnementales. Ces quelques aspects théoriques

permettront de mieux cerner le contexte global dans lequel s'insèrent les phénomènes d'acquisition de tolérance aux métaux traces chez les algues unicellulaires, lesquels ont été étudiés par Stokes et al. (1973), Stokes (1975), Foster (1977), Davies (1976), DeFillippis et Pallaghy (1976), Ben-Bassat et Mayer (1975,1977) et Mierle et Stokes (1976). L'observation de la courbe de croissance de la population (figure 25) permet de constater que durant les 12 premières heures, il n'y a pas de diminution du taux de croissance, alors qu'entre 12 et 24 heures, la densité cellulaire diminue de façon importante. Il faut cependant noter que le témoin connaît également une chute de croissance au cours des premières 24 heures ce qui pourrait représenter un stress causé par le début de la dilution. Nos résultats montrent que les effets ultrastructuraux les plus drastiques se manifestent au cours de cette période de 24 heures et il apparaît que les cellules sont dans un état de choc toxique. A cet effet, Sandmann et Boger (1980) rapportent une décomposition des lipides par peroxydation chez Scenedesmus acutus au cours des premières 24 heures d'exposition à 50 μM de cuivre ($3,177 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Cette décomposition des lipides détectée par la production d'éthylène et d'éthane est corrélée à une diminution de la croissance et indique selon ces auteurs une sévère altération des membranes. Les effets que nous avons notés sur le chloroplaste et plus particulièrement sur les thylakoïdes au cours de cette période nous indiquent une désorganisation

importante de certaines membranes. D'autre part, après 1,5 heure d'exposition au cuivre les effets sur l'ultrastructure sont déjà bien marqués. Sicko-Goad (1982) et Sicko-Goad et Stoermer (1979), rapportent également des modifications ultrastructurales à très court terme (\approx 2-3 heures) chez différentes Diatomées exposées au cuivre et au plomb.

Par ailleurs, nous constatons qu'entre 24 et 48 heures, les cellules commencent à accumuler de l'amidon et des lipides alors qu'entre 24 heures et 4 jours, le taux de croissance ne diminue que très légèrement. Par la suite, les réserves d'amidon et de lipides deviennent très abondantes, de même que les inclusions intravacuolaires. Il est intéressant de mentionner qu'en conditions naturelles, une déplétion en éléments nutritifs est associée à une augmentation des produits de réserve sous forme d'hydrate de carbone et de lipide ainsi qu'à une diminution de la concentration en protéines (Healy, 1973). Plus précisément, l'accumulation excessive de ces réserves est corrélée à une carence en azote et à une forte intensité lumineuse (Morris, 1981). Ces observations portent à croire encore une fois que le cuivre provoque un déséquilibre du processus d'assimilation des éléments nutritifs.

D'autre part, chez certaines algues phytoplanctoniques, il existe des stades "enkistés" qui correspondent à une phase de dormance (Morris, 1980). Ces cellules sont métabolique-

ment peu actives et présentent une accumulation de produits de réserve, un épaissement de la paroi et un cytoplasme dense qui est probablement le résultat d'une déshydratation. Les observations ultrastructurales que nous avons effectuées chez S. quadricauda entre 72 heures et 15 jours (figures 29-33) associées à une diminution du taux de croissance à partir de 4 jours, suggèrent que les cellules sont métaboliquement peu actives et qu'elles réagissent à des conditions environnementales défavorables. De plus, l'accumulation des inclusions intravacuolaires est concomitante à celle des lipides et de l'amidon (entre 48 et 72 heures). Lors de l'expérience en lot avec S. quadricauda (Chapitre 3), les cellules ne présentaient pas d'accumulation de produits de réserve pour une même concentration de cuivre et un même temps d'exposition. Il apparaît donc qu'en culture en continue, la dilution cause un stress additionnel possible-ment causé par le fait que les teneurs en cuivre libre sont plus constantes en culture en continue. Ces différences de réponses entre la culture en lot et la culture en continue permettent de poser des interrogations quant à l'utilisation de la culture en lot dans les bioessais de toxicité.

Entre les jours 4 et 8, les taux de croissance chutent de façon marquée. Il est intéressant de mentionner que lors de l'expérience en lot, nous avons noté une légère chute de la croissance vers la fin de l'expérience entre les jours 5 et 7. Au cours des deux (2) expériences, nous avons remar-

qué que les effets du cuivre sur la croissance se traduisent par une première inhibition au cours des 24 premières heures et une seconde inhibition après 4 à 7 jours d'exposition. Entre les jours 10 et 22, le taux de dilution fut ralenti à 0,25 comme il a été mentionné précédemment. Il en ressort que le taux de croissance est en réalité inférieur au témoin entre les jours 10 et 17 et égal ou légèrement supérieur entre les jours 18 et 22. Après 22 jours, la croissance est légèrement supérieure au témoin puis se stabilise au même niveau que ce dernier jusqu'à la fin de l'expérience. L'aspect des cellules après 22, 32 et 50 jours d'exposition au cuivre diffère peu du témoin. Cependant, la présence de nombreux ribosomes et le développement du réticulum endoplasmique qui est plus important que chez les cellules témoins, indique probablement une activité de synthèse accrue. De même, la disparition des inclusions intravacuolaires après 15 jours d'exposition au cuivre porte à croire qu'un second type de mécanisme est impliqué dans la tolérance, lequel se manifeste par une augmentation de l'activité de synthèse après une exposition prolongée. En fonction des besoins énergétiques de la cellule on peut suggérer les hypothèses suivantes;

- 1- A court terme la cellule réagit par la séquestration du cuivre à l'intérieur des inclusions (possiblement des polyphosphates).

- 2- A moyen terme, lorsque les sites de complexation (inclusions ou autres) sont saturés, il y a un développement de l'appareil de synthèse (réticulum endoplasmique, ribosomes, etc).
- 3- A long terme, la synthèse de certaines protéines permettrait, soit l'excrétion de molécules complexantes dans le milieu extracellulaire d'où une complexation extracellulaire ou la mise en branle d'un mécanisme d'exclusion permettant le rejet du cuivre vers le milieu extracellulaire.

Enfin, le facteur de bioaccumulation du cuivre qui est de l'ordre de 17 par rapport au témoin et ce après 50 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre, peut être considéré comme négligeable. En effet, Mierle et Stokes (1976) rapportent des facteurs de bioaccumulation pour le cuivre de l'ordre de 1,000 à 2,000 chez Scenedesmus acuminatus alors que Sandmann et Boger (1980) rapportent un facteur de l'ordre de 1,000 chez Scenedesmus acutus. En ce qui concerne le cadmium, Cain et al. (1980) notent des facteurs d'accumulation variant entre 300 et 5,000 chez Scenedesmus obliquus. Il apparaît donc qu'après 50 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre, la concentration bioaccumulée ou associée à la paroi est très faible, ce qui porte à croire que S. quadricauda posséderait un mécanisme de complexation extracellulaire ou d'exclusion.

Il faut mentionner en terminant, que certains problèmes

ont été rencontrés au cours de l'expérimentation, lesquels ont nécessité le ralentissement du taux de dilution dans le ballon expérimental entre les jours 10 et 22 comme il a été cité plus haut à quelques reprises. En effet, il eut peut être été préférable d'utiliser une concentration de cuivre inférieure à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ compte tenu du fait qu'en culture en continue l'action toxique du cuivre est plus évidente. Les différences du taux de dilution entre le ballon témoin et le ballon expérimental au cours de cette période font en sorte qu'il peut être difficile de discerner les effets inhérents au cuivre de ceux pouvant être reliés à une différence du taux de dilution. Cependant, les modifications ultrastructurales les plus importantes ont été enregistrées au cours des 10 premiers jours alors que les taux de dilution étaient identiques dans les 2 ballons.

En résumé, les effets du cuivre sur l'ultrastructure se manifestent très rapidement après le début de l'exposition ($\approx 1,5$ heure) et les premières 24 heures semblent constituer une période de choc toxique. Par la suite, le taux de croissance est réduit et les cellules accumulent de grandes réserves d'amidon et de lipides, ainsi que des inclusions intravacuolaires. Ces observations suggèrent qu'il s'agit d'une réaction des cellules face à des conditions défavorables de l'environnement. Après une exposition prolongée au cuivre (22-50 jours), le taux de croissance est similaire au témoin, les inclusions ont disparu et les cellules ont un

aspect normal. Cependant, le cytoplasme est densément peuplé de ribosomes et le réticulum endoplasmique est plus développé que chez les cellules témoins. Le faible facteur de bioaccumulation après 50 jours d'exposition porte à croire que S. quadricauda possède un mécanisme de complexation extracellulaire ou d'exclusion du cuivre.

CHAPITRE U
CONCLUSION GÉNÉRALE

L'analyse des présents résultats (Chapitre 3) révèle que les caractéristiques ultrastructurales de S. quadricauda et de C. vulgaris sont très influencées par le cuivre. Cependant, le degré de sensibilité entre ces deux (2) espèces diffère passablement. Chez S. quadricauda la formation d'inclusions intravacuolaires est la manifestation la plus évidente de l'effet du cuivre et semble fort probablement impliquée dans les mécanismes de tolérance, alors que chez C. vulgaris, les bris membranaires et les perturbations osmotiques sont les observations les plus fréquentes. C. vulgaris isolée de la rivière Saguenay apparaît donc comme une souche peu tolérante au cuivre.

D'autre part, nous avons observé (Chapitre 4) que les effets du cuivre sur l'ultrastructure de S. quadricauda se manifestent très rapidement après le début de l'exposition ($\approx 1,5$ heure) et que les premières 24 heures semblent constituer une phase de choc toxique. L'accumulation importante d'amidon, de lipide et d'inclusions intravacuolaires fait suite à ces observations et est associée à un taux de croissance ralenti. Cette période apparaît comme une phase de résistance à des conditions défavorables de l'environnement. Après une exposition prolongée au cuivre, les cellules reprennent un aspect similaire aux cellules témoins et leur taux de croissance est normal. Cependant, le cytoplasme est densément peuplé de ribosomes et le réticulum endoplasmique est plus développé. Le faible taux de bioaccumulation après 50 jours d'exposition à $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cuivre suggère que

S. quadricauda possède un mécanisme de complexation extracellulaire ou d'exclusion.

L'approche de la séquence temporelle que nous avons utilisée nous semble particulièrement toute indiquée pour l'étude de mécanisme de toxicité et de tolérance. Elle permet d'obtenir une vue plus dynamique des processus en cause, ce que ne permet pas une seule observation ponctuelle.

Enfin, il serait opportun de modifier et d'améliorer le système de culture en continue (chémostat) que nous avons utilisé. En effet, certains biais ont pu s'introduire dans les résultats de densité cellulaire à cause d'un manque de constance dans le taux de dilution et des problèmes d'adhésion des cellules aux parois des ballons de culture. A ce sujet, il est primordial d'apporter beaucoup d'attention à la précision du taux de dilution et d'assurer un brassage adéquat et constant de la culture. De même, lors de culture à long terme, les tubulures se doivent d'être changées à l'occasion de façon à éviter un engorgement causé par l'aggrégation de cellules dans la lumière des tubulures.

BIBLIOGRAPHIE

- Adamec, J. et J.H. Peverly, 1979. Potassium in polyphosphate bodies of Chlorella pyrenoidosa (Chlorophyceae) as determined by X-ray microanalysis. *J. Phycol.* 15: 466-468.
- Albertano, P., R. Taddei et G. Pinto, 1980. Evaluation of toxic effects of heavy metals on unicellular algae. II- Growth curves with different concentration of heavy metals. *Delpinoa.* 21: 23-34.
- Albertano, P. et R. Taddei, 1981. Evaluation of the toxic effects of heavy metals on the unicellular algae. IV- Effects of inoculum size on inhibition type. *Delpinoa.* 22: 71-78.
- Anderson, D.M. et F.M. Morel, 1978. Copper sensitivity of Gonyaulax tamarensis. *Limnol. Oceanogr.* 23: 283-295.
- Bartlett, L., F.W. Rabe et W.H. Funk, 1974. Effects of copper, zinc and cadmium on Selenastrum capricornutum. *Water Res.* 8: 179-185.
- Ben-Bassat, D. et A.M. Mayer, 1975. Volatilization of Mercury by Algae. *Physiol. Plant.* 33: 128-132.
- Ben-Bassat, D. et A.M. Mayer, 1977. Reduction of Mercury Chloride by Chlorella: Evidence for a Reducing Factor. *Physiol. Plant.* 40: 157-162
- Berland, B.R., D.J. Bonin, O.J. Guerin-Ancey, U.I. Kapkov et D.P. Arlhac, 1977. Action des métaux lourds sur les caractéristiques de la croissance chez la Diatomée Skeletonema costatum. *Mar. Biol.* 42: 17-30.
- Bisalputra, T. et T.E. Weier, 1964. The pyrenoïde of Scenedesmus quadricauda. *Amer. J. Bot.* 51(8): 881-892.
- Cain, J.R., D.C. Paschal et C.M. Hayden, 1980. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in the colonial green algae Scenedesmus obliquus. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* 9: 9-16.
- Campbell, P.G.C. et P.M. Stokes, 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 2034-2049.

- Cedeno-Maldonado, A., J.A. Swader et R. L. Heath, 1972. The cupric ion as an inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* 50: 698-701.
- Cloutier-Mantha, L. et D.A. Brown, 1980. The Effects of Mercury Exposure on Intracellular Distribution of Mercury, Copper and Zinc in Skeletonema costatum (Grev.) Cleve *Botanica Marina.* 23: 53-58.
- Connell Des. W., et G.J. Miller, 1984. Chemistry and ecotoxicology of pollution. John Wiley and Sons. Wiley Interscience Publication. pp. 288-232
- Côté, R., 1983. Aspects toxiques du cuivre sur la biomasse et la productivité du phytoplancton de la rivière Sanguenay, Québec. *Hydrobiologia.* 98: 85-95.
- Daniel, G.F. et A.H.L. Chamberlain, 1981. Copper immobilization in fouling Diatoms . *Bot. Mar.* 24: 229-243.
- Davies, A.G., 1974. The growth kinetics of Isochrysis galbana in cultures containing sublethal concentrations of mercuric chloride. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 54: 157-169.
- Davies, A.G., 1976. An assessment of the basis of mercury tolerance in Dunaliella tertiolecta. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 56: 39-57
- DeFilippis, L.F. et C.K. Pallaghy, 1976. The effect of sublethal concentrations of mercury and zinc on Chlorella III. Development of possible mechanisms or resistance to metals. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 79: 323-335.
- Doonan, B.B., R.E. Crang, T.E. Jensen et M. Baxter, 1979. In situ X-ray energy dispersive microanalysis of polyphosphate bodies in Aureobasidium pullulans. *J. Ultrastruct. Res.* 69: 232-238.
- Eppley R.W., A.F. Carlucci, O. Holm-Hansen, D. Kiefer, J.J. McCarthy, E. Venrick et P.M. Williams, 1971. Phytoplankton growth and composition in shipboard cultures supplied with nitrate, ammonia and urea as the nitrogen source. *Limnol. Oceanogr.* 16: 715-751.
- Forster, U. et G.T.W. Whittmann, 1981. Metal pollution in the aquatic environment. 2 ed. Springer-Verlag. pp. 1

- Foster, P.L. 1977. Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green algae. *Nature*. 269: 322-323.
- Fott, B. et Novakova, M., 1969. A monograph of the genus Chlorella. The freshwater species. In: Fott, B. (ed.) *Studies in phycology*. Academia Prague.
- Fujita, M., K. Iwasaki et E. Takabatake, 1977. Intracellular distribution of mercury in freshwater Diatom Synedra cells. *Environm. Res.* 14: 1-13.
- Goering, J.J., D. Boisseau et A. Hattori, 1977. Effects of copper on silicic acid uptake by a marine phytoplakton population: controlled ecosystem pollution experiment. *Bull. Mar. Sci.* 27: 58-65.
- Gross, R.E., P. Pugno et W.M. Dugger, 1970. Observations on the mechanisms of copper damage in Chlorella. *Plant. Physiol.* 46: 183-185.
- Harold, F.M., 1966. Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism and function. *Bacteriol. Rev.* 30: 772-794.
- Harrisson, G.I., P.G.C. Campbell et A. Tessier, 1986. Effect of pH changes on zinc uptake by Chlamydomonas variabilis grown in batch culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 687-693.
- Harrisson, W.G., R.W. Eppley et E.H. Renger, 1977. Phytoplankton nitrogen metabolism, nitrogen budgets and observations on copper toxicity: controlled ecosystem pollution experiment. *Bull. Mar. Sci.* 27: 44-57.
- Healy, F.P., 1973. The inorganic nutrition of algae from an ecological viewpoint. *CRC Critical Rev. Microbiol.* 3: 69-113.
- Hochachka, P.W. et G.N. Somero, 1973. *Strategies of biochemical adaptation*. W.B. Saunders Comp.
- Hollibaugh, J.T., D.L.R. Seibert et W.H. Thomas, 1980. A comparison of the acute toxicities of ions of 10 heavy metals to phytoplankton from Saanich Inlet, B.C. Canada Est. coast. *Water Res.* 10: 93-105.
- Irmer, U., L. Dietrich, W. Irmhild et H. Schafer, 1984. Einflub der schwermetalle cadmium und mangan anf das wachstum und die ultrastruktur von Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophycées). *Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg.* 19: 23-42.

- Jensen, A., B. Rystad et S. Melson, 1976. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. II. Copper tolerance of three species in dialysis batch cultures. *J. Mar. Biol. and Ecol.* 22: 249-256.
- Kamp-Nielsen, L. 1971. The effect of deleterious concentrations of mercury on the photosynthesis and growth of Chlorella pyrenoidosa. *Physiol. Plant.* 24: 556-561.
- Kanawaza, T. et K. Kanawaza, 1969. Specific inhibitory effect of copper on cellular division in Chlorella. *Plant Cell Physiol.* 10: 495-502.
- Keyhani, E., 1973. Morphological changes in yeast cell mitochondria grown at various copper concentrations. *Exp. Cell Res.* 81: 73-78.
- Kualey, I.S., 1975. Biochemistry of inorganic polyphosphates. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 73: 131-158.
- Lehninger, A.L., 1970. *Biochimie*. Worth Publ. Inc., New-York, pp. 512.
- Leland, H.U., S.N. Luoma et J.M. Fielden, 1979. Bioaccumulation and toxicity of heavy metals and related trace elements. *J. Water Pollut. Control Fed.* 51: 1952-1616.
- Li, W.K.W., 1979. Cellular composition and physiological characteristics of the Diatom Thalassiosira weissflogii adapted to cadmium stress. *Mar. Biol.* 55: 171-180.
- Loring, D.H., 1975. Mercury in the sediments of the Gulf of St-Lawrence. *Can. J. Earth Sci.* 12: 1219-1237.
- Loring, D.H., 1976. The distribution and partition of zinc, copper and lead in the sediments of the Saguenay fjord. *Can. J. Earth Sci.* 13: 960-971.
- Manatran, S.E. et M.J. Smith, 1973. Copper micronutrient requirement for algae. *Environ. Sci. Tech.* 7: 829-833.
- Mandeli, E.F., 1969. The inhibitory effects of copper on marine phytoplankton. *Mar. Sci.*, 14: 47-57.
- McBrien, D.C.H. et K.A. Hassal, 1965. Loss of cell potassium by Chlorella vulgaris after contact with toxic amount of copper sulfate. *Physiol. Plant.*, 18: 1059-1065.

- Mierle, G. et P.M. Stokes, 1976. Heavy metal tolerance and metal accumulation by planktonic algae. In: Trace substances in environmental health. (ed. D.D. Hemphill). Univ. Missouri. Missouri., pp. 113-122.
- Morel, N.M.L., J.G. Rueter et F.M.M. Morel, 1978. Copper toxicity to Skeletonema costatum. J. Phycol. 14: 43-48.
- Morris, I. (ed.), 1980. The physiological ecology of phytoplankton. Study in Phycology. Vol. 7. Univ. California Press.
- Morris, I. 1981 Photosynthetic Products, physiological state, and phytoplankton growth. In: Platt, T. (ed). Physiological bases of phytoplankton ecology. Can. Bull. Fish. Aqua. Sci., Bull. # 210. Pêches et Océans, Ottawa.
- Nakajima, A., T. Norikoshi et T. Sakaguchi, 1977. Chemical state of copper accumulated in Chlorella regularis. J. Agric. Chem. Jap. 51: 507-511.
- Nuzzi, R., 1972. Toxicity of mercury to phytoplankton. Nature. 237: 38-39.
- Overnell, J., 1975. The effects of heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine algae Dunaliella tertiolecta and Phaeodactylum tricornutum. Mar. Biol. 29: 99-103.
- Palmer, C.M. et T.E. Maloney, 1954. A new counting slide for nanoplankton. Environ. Health Center, Ohio. Special publi. # 21. Ohio. pp. 1-6.
- Passow, H., A. Rothstein et T.W. Clarkson, 1961. The general pharmacology of the heavy metals. Pharmacol. Rev. 13: 185-224.
- Rai, L.C., J.P. Gaur et H.D. Kumar, 1981. Phycology and heavy metal pollution. Biol. Rev. 56: 99-151.
- Reimann, E.F.B., 1980. Fixation, embedding, sectioning and staining of algae for electron microscopy. In: Gantt, E. ed., Handbook of phycological methods: Developmental and cytological methods. Cambridge Univ. Press. pp. 205-303.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208-212.

- Ricker, W.E., 1937. Statistical treatment of sampling processes useful in the enumeration of plankton organisms. Arch. Hydrobiol. Plankt. 31: 68-84.
- Riisgard, H.U., 1979. Effect of copper on volume regulation in the marine flagellate Dunaliella marina. Mar. Biol. 50: 189-193.
- Riisgard, H.U., K. Norgard-Nielsen et B. Sogaard-Jensen, 1980. Further studies on volume regulation and effects of copper in relation to pH and EDTA in the naked marine flagellate Dunaliella marina. Mar. Biol. 56: 267-276.
- Rosko, J.J. et J.W. Rachlin, 1977. The effect of cadmium, copper, mercury, zinc and lead on cell division, growth and chlorophyll a content of the Chlorophyte Chlorella vulgaris. Bull. Torrey Bot. Club. 104: 226-233.
- Rueter, J.G. et J.J. McCarthy, 1979. The toxic effect of copper on Oscillatoria (Tricodesmium) theibautii. Limnol. Oceanogr. 24: 558-562.
- Saboski, E.M., 1977. Effects of mercury and tin on frustular ultrastructure of the marine Diatom Nitzschia liebetrutti. Water, Air and Soil Pollut. 8: 461-466.
- Saifullah, S.M., 1978. Inhibitory effects of copper on marine Dinoflagellates. Mar. Biol. 44: 299-308.
- Scherrer, B., 1984. Biostatistiques. Gaëtan Morin ed. Chicoutimi. pp. 349-356.
- Shioi, Y., H. Tamai et T. Sasa, 1978 a. Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 19: 203-209.
- Shioi, Y., H. Tamai et T. Sasa, 1978 b. Inhibition of photosystem II in the green algae Ankistrodesmus falcatus by copper. Physiol. Plant. 44: 434-438.
- Shubert, L.E. et F.R. Trainor, 1974. Scenedesmus morphogenesis. Colony control in dilute media. J. Phycol. 10: 28-30.
- Shuter, B., 1979. A model of physiological adaptation in unicellular algae. J. theor. Biol. 78: 519-552.
- Sicko-Goad, L. et E.F. Stoermer, 1979. A morphometric study of lead and copper effects on Diatoma tenue var. elongatum (Bacillariophyta). J. Phycol. 15: 316-321.

- Sicko-Goad, L., 1982. A morphometric analysis of algal response to low dose, short-term heavy metal exposure. *Protoplasma*. 110: 75-86.
- Silverberg, B.A., 1975. Ultrastructural localization of lead in Stigeoclonium tenue (Chlorophyceae, Ulotrichales) as demonstrated by cytochemical and X-ray microanalysis. *Phycol.* 14(4): 265-274.
- Silverberg, B.A., P.M. Stokes et L.B. Ferstenberg, 1976. Intranuclear complexes in a copper-tolerant green alga. *J. Cell Biol.* 69: 210-214.
- Silverberg, B.A., 1976, Cadmium-induced ultrastructural changes in mitochondria of freshwater green algae. *Phycologia*. 15(2): 155-159.
- Smith, M.A., 1983. The effect of heavy metals on the cytoplasmic fine structure of Skeletonema costatum (Bacillariophyta). *Protoplasma*. 116: 14-23.
- Sorrentino, C., 1979. The effects of heavy metals on phytoplankton. A review. *Phykos*. 18: 149-161.
- Spurr, A.R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultras. Res.* 26: 31-43.
- Staehelin, L.A. et J.D. Pickett-Heaps, 1975. The ultrastructure of Scenedesmus (Chlorophyceae). 1. Species with the "reticulate" or "warty" type of ornamental layer. *J. Phycol.* 11: 163-185.
- Steeman-Nielsen, E., L. Kamp-Nielsen et S. Wium-Andersen, 1969. The effect of deleterious concentrations of copper on the photosynthesis of Chlorella pyrenoidosa. *Physiol. Plant.* 22: 1121-1133.
- Steemann-Nielsen, E. et L. Kamp-Nielsen, 1970. Influence of deleterious concentrations of copper on the growth of Chlorella pyrenoidosa. *Physiol. Plant.* 23: 828-840.
- Steemann-Nielsen, E. et S. Wium-Andersen, 1971. The influence of Cu on photosynthesis and growth in Diatoms. *Physiol. Plant.* 24: 480-484.
- Stein, J.R., 1973. Handbook of phycological methods- Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge.

- Stokes, P.M., T.C. Hutchison and K. Krauter, 1973. Heavy-metal tolerance in algae isolated from contaminated lakes near Sudbury, Ontario. *Can. J. Bot.* 51: 2155-2168.
- Stokes, P., 1975. Uptake and accumulation of copper and nickel by metal tolerant strains of Scenedesmus. *Internat. Verein. Limnol.* 19: 2128-2137.
- Stokes, P.M., T. Maler et J. Riordan, 1977. A low molecular weight copper binding protein in a copper tolerant Scenedesmus. In: *Trace substances in environmental health, XI*. University of Columbia, Missouri.
- Stokes, P.M., 1979. Copper accumulation in freshwater biota. In: Nriagu, J.O., (ed). *Copper in the environment I. Ecological cycling*. Wiley and Sons. New York.
- Stokes, P.M. 1983. Responses of freshwater algae to metals. In: Rounds et Chapman (eds.), *Progress in Phycological Research*. Vol. 2. Elsevier Science Publishers, N.Y., pp. 87-112.
- Sunda, W. et R.R.L. Guillard, 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.* 34: 511-529.
- Sunda, W.G. et P.A. Gillepsie, 1979. The response of a marine bacterium to cupric ion and its use to estimate cupric ion activity. *J. Mar. Res.* 37: 761-777.
- Sundby, B. et D.H. Loring, 1978. Geochemistry of suspended matter in the Saguenay Fjord. *Can. J. Earth Sci.* 15: 1002-1011.
- Thomas, W.H., J.T. Hollibaugh et D.L.R. Seibert, 1980. Effects of heavy metals on the morphology of some marine phytoplankton. *Phycol.* 19(3): 202-209.
- Weier, T.E., T. Bisalputra et A. Harrisson, 1966. Subunits in the chloroplast membranes of Scenedesmus quadricauda. *J. Ultrastruct. Res.* 15: 38:55.

ANNEXE 1 : Intervalles de confiance à 95% des densités cellulaires pour l'expérience 1 avec Scenedesmus quadricauda (Figure 1).

($N \times 10^5$ cellules \cdot ml $^{-1}$)

		TEMPS (JOURS)							
		0.5	1	2	3	4	5	6	7
Témoïn.	sup.	1.98	2.15	4.45	7.58	11.7	14.8	23.8	31.1
	inf.	1.36	1.49	3.48	6.25	10.0	13.0	21.0	28.1
25 μ g.l $^{-1}$	sup.	2.05	2.18	3.51	9.20	9.94	23.9	28.3	32.7
	inf.	1.41	1.52	2.64	7.76	8.59	20.8	24.7	28.5
50 μ g.l $^{-1}$	sup.	1.73	1.14	4.76	8.04	9.52	20.5	25.2	40.0
	inf.	1.14	0.67	3.73	6.70	8.04	18.1	21.8	33.7
100 μ g.l $^{-1}$	sup.	2.11	2.07	3.96	7.44	8.80	23.1	32.7	19.6
	inf.	1.46	1.43	3.03	6.15	7.37	20.5	28.5	16.3
250 μ g.l $^{-1}$	sup.	1.65	1.70	4.04	5.61	9.60	17.6	20.8	15.4
	inf.	1.07	1.12	3.11	4.49	8.01	15.2	18.1	13.1
500 μ g.l $^{-1}$	sup.	1.11	1.79	3.01	4.18	7.84	13.4	14.8	10.2
	inf.	0.64	1.19	2.21	3.21	6.52	11.5	12.6	8.68
1000 μ g.l $^{-1}$	sup.	2.08	1.43	2.33	3.11	6.73	7.61	7.50	3.97
	inf.	1.44	0.90	1.63	2.31	5.56	6.30	6.79	3.04
2500 μ g.l $^{-1}$	sup.	1.44	1.75	3.17	2.44	3.00	3.71	1.78	2.72
	inf.	0.93	1.15	2.34	1.73	2.19	2.82	1.19	1.95

ANNEXE 2 : Intervalles de confiance à 95% des densités cellulaires pour l'expérience 2 avec Chlorella vulgaris (figure 12).

($N \times 10^5$ cellules \cdot ml $^{-1}$)

		TEMPS (JOURS)								
		0.5	1	2	3	4	5	6	7	
Témoïn.	sup.	2.85	6.06	16.5	34.9	66.7	97.0	166	346	
	inf.	2.05	4.97	14.4	29.9	58.1	88.4	159	328	
25 μ g.l $^{-1}$	sup.	1.39	4.84	16.8	30.1	51.4	146	144	265	
	inf.	0.97	3.89	13.9	25.3	43.3	139	139	258	
50 μ g.l $^{-1}$	sup.	1.05	2.24	8.14	27.2	47.4	94.5	102	184	
	inf.	0.67	1.68	6.73	22.6	39.4	83.4	92.6	179	
100 μ g.l $^{-1}$	sup.	0.88	1.94	2.41	3.38	9.21	71.0	49.8	59.6	
	inf.	0.54	1.42	1.74	2.58	8.07	64.2	45.2	64.5	
250 μ g.l $^{-1}$	sup.	1.96	1.46	2.14	2.04	2.27	2.61	2.74	2.59	
	inf.	1.22	1.01	1.59	1.51	1.69	2.01	2.14	1.92	
500 μ g.l $^{-1}$	sup.	1.76	1.70	1.83	1.59	1.64	1.60	3.91	2.35	
	inf.	1.17	1.10	1.33	1.12	1.18	1.14	1.79	1.72	
1000 μ g.l $^{-1}$	sup.	1.86	1.83	1.79	1.44	1.25	1.14	0.76	1.52	
	inf.	1.27	1.32	1.29	1.00	0.83	0.78	0.42	1.02	
2500 μ g.l $^{-1}$	sup.	1.15	0.80	0.64	0.93	0.87	0.59	0.64	0.59	
	inf.	0.77	0.48	0.35	0.58	0.53	0.32	0.34	0.35	

Annexe 3 : Intervalles de confiance à 95 % des densités cellulaires pour l'expérience 3 avec *Scenedesmus quadricauda* (Figure 27).

(N x 10⁵ cellules . ml⁻¹)

		TEMPS (JOURS)																
		0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Témoin.	sup.	2.63	2.05	2.05	2.94	3.04	2.69	4.97	4.42	3.33	3.67	4.52	3.33	5.10	5.00	5.51	3.59	3.71
	inf.	1.79	1.41	1.42	2.15	2.24	1.92	3.88	3.40	2.68	2.77	3.53	2.50	4.05	3.91	4.40	2.72	2.71
250 µg.l ⁻¹	sup.	2.85	1.63	1.51	1.51	1.39	0.88	0.96	0.28	0.19	.292	0.17	0.24	0.16	0.18	0.25	0.30	0.11
	inf.	2.08	1.07	0.96	0.96	0.88	0.47	0.54	0.09	0.05	.128	0.05	0.10	0.04	0.04	0.10	0.11	0.01

		TEMPS (JOURS)																
		17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
Témoin.	sup.	3.75	2.66	2.71	3.77	3.00	3.29	4.15	4.79	2.88	3.29	2.93	4.10	4.29	4.05	3.57	5.20	3.5
	inf.	2.72	1.83	2.02	2.87	2.24	2.45	3.02	3.80	2.12	2.45	2.13	3.17	3.33	2.92	2.69	4.15	2.7
250 µg.l ⁻¹	sup.	.202	0.42	.558	1.03	1.06	1.12	1.27	1.45	2.21	2.43	2.40	2.84	3.52	3.32	3.65	2.80	2.5
	inf.	.054	0.16	.276	0.45	0.48	0.63	0.83	1.01	1.67	1.73	1.70	2.07	2.64	2.48	2.75	2.03	1.7

		TEMPS (JOURS)																
		34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Témoin.	sup.	5.38	3.97	5.40	5.67	5.19	3.33	3.52	3.17	5.74	5.67	4.87	4.42	2.88	5.16	4.45	4.84	4.2
	inf.	4.32	3.09	4.31	4.55	4.10	2.50	2.65	2.31	4.62	4.55	3.85	3.43	2.34	4.07	3.53	3.81	3.3
250 µg.l ⁻¹	sup.	5.05	5.67	6.54	4.33	3.72	3.03	3.02	5.22	4.49	5.16	4.71	3.14	3.19	3.04	3.62	3.43	3.5
	inf.	3.99	4.56	5.32	3.37	2.82	2.22	2.21	4.13	3.56	4.10	3.69	2.33	2.37	2.24	2.74	2.56	2.7