



**HAL**  
open science

# Aspects de la toxicité et de la biosorption du cadmium chez l'algue *Chlorella vulgaris*

Jean-François Férard

► **To cite this version:**

Jean-François Férard. Aspects de la toxicité et de la biosorption du cadmium chez l'algue *Chlorella vulgaris*. Sciences de l'environnement. Université Paul Verlaine - Metz, 1986. Français. NNT : 1986METZ006S . tel-01775698

**HAL Id: tel-01775698**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775698>**

Submitted on 24 Apr 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE METZ

CENTRE DES SCIENCES

DE L'ENVIRONNEMENT

# THESE D'ETAT

PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR es SCIENCES

PAR

Jean-Francois FERARD

ASSISTANT DE TOXICOLOGIE À L'UNIVERSITÉ DE METZ

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	1986 0125
Cote	S/M3 86/6
Loc	Magasin

Aspects de la toxicite et de la biosorption  
du cadmium chez l'algue Chlorella vulgaris

EXAMINATEURS : M. BODART, PROFESSEUR  
M. DIVE, MAÎTRE DE RECHERCHE À L'INSERM  
M. JOUANY, PROFESSEUR (RAPPORTEUR)  
M. PELT, PROFESSEUR (RAPPORTEUR)  
M. PERSOONE, PROFESSEUR  
M. RAMADE, PROFESSEUR  
MELLE VASSEUR, PROFESSEUR (RAPPORTEUR)



	<u>Pages</u>
II.2 - Résultats	87
II.2.1 - Croissance des chlorelles en milieu non intoxiqué	87
II.2.2 - Effets toxiques du cadmium entre J4 et J6	87
II.2.3 - Observations au microscope électronique de l'effet du cadmium	87
II.2.4 - Effets du cadmium ajouté avant l'inoculum algal. Etude de différents paramètres.	91
II.3 - Discussion	93
CHAPITRE III - BIOSORPTION DU CADMIUM PAR LES CHLORELLES - DIFFERENCIATION DE L'ADSORPTION ET DE L'ABSORPTION.	104
III.1 - Matériel et méthodes	105
III.1.1 - Le matériel biologique	105
III.1.2 - Préparation de la verrerie	105
III.1.3 - Réactifs	105
III.1.4 - Protocole d'étude utilisé	106
III.1.5 - Déterminations analytiques	111
III.2 - Résultats	112
III.2.1 - Etude de l'adsorption et de l'absorption en fonction du temps	112
III.2.2 - Etude de la capacité de désorption de différentes solutions molaires d'EDTA	112
III.2.3 - Effet du milieu d'incubation utilisé	114
III.2.4 - Effet du potassium	116
III.2.5 - Etude de l'adsorption et de l'absorption en fonction de concentrations croissantes de cadmium introduit.	116
III.2.6 - Effet de l'âge des cellules	119
III.3 - Discussion	121
CHAPITRE IV - ACTION DU CADMIUM SUR L'ATPase PLASMALEMNIQUE DE <u>CHLORELLA VULGARIS</u>	125
IV.1 - Matériel et méthode	126
IV.1.1 - Obtention des fractions plasmalemniques	126
IV.1.2 - Dosage de l'ATPase K <sup>+</sup> stimulée	130
IV.1.3 - Dosage des protéines	140
IV.1.4 - Dosage du cadmium par électrode spécifique	147
IV.1.5 - Effets du cadmium sur l'ATPase K <sup>+</sup> stimulée en fonction de différents paramètres : pH, Mg <sup>++</sup> , K <sup>+</sup>	153
IV.1.6 - Détermination de la CI50 du cadmium sur l'ATPase K <sup>+</sup> stimulée	156
IV.2 - Résultats	157
IV.2.1 - Examen comparé des fractions plasmalemniques brute et purifiée (fraction I).	157
IV.2.2 - Etude de l'activité ATPasique K <sup>+</sup> stimulée (fraction II)	159
IV.2.3 - Mesures des concentrations de cadmium libre	166
IV.3 - Discussion	173

CONCLUSION		179
ANNEXE I	- RESUME DES DIVERSES CORRECTIONS REALISEES	181
ANNEXE II	- CORRECTION DUE AU VOLUME RESIDUEL	184
ANNEXE III	- CORRECTION DUE AU CADMIUM RESIDUEL APRES LAVAGE A L'EDTA	186
ANNEXE IV	- CORRECTION DES SERIES ESSAI ET REMOIN PAR UTILISATION D'UNE REFERENCE COMMUNE.	190
ANNEXE V	- DETAIL DE CALCUL DES INCERTITUDES CONCERNANT LE CADMIUM ADSORBE ET ABSORBE	191
ANNEXE VI	- SENSIBILITE ET REPRODUCTIBILITE DES DETERMINATIONS ANALYTIQUES DU CADMIUM	195
ANNEXE VII	- REPRODUCTIBILITE DES GAMMES D'ETALONNAGE POUR LE DOSAGE DU PHOSPHORE INORGANIQUE.	199
ANNEXE VIII	- REPRODUCTIBILITE DES GAMMES D'ETALONNAGE POUR LE DOSAGE DES PROTEINES (n = 26).	200

AVANT - PROPOS

*Ce travail de recherche a fait l'objet d'un contrat avec le Ministère de l'Environnement (83037 Milieux Physiques).*

*Avant de présenter notre travail, nous tenons à remercier ceux qui ont aidé à sa réalisation.*

*Mademoiselle Paule VASSEUR a été l'instigatrice de ce travail. Ses profondes connaissances, ses conseils avisés et ses encouragements nous ont permis de mener à bien cette étude. Nous tenons à lui exprimer, ici, notre sincère gratitude et le témoignage de notre amitié.*

*Monsieur Jean-Michel JOUANY qui, en nous accueillant il y a quelques années dans son laboratoire, nous a initié à la recherche. Sa présence dans notre jury nous honore et nous lui sommes profondément reconnaissants de l'attention avec laquelle il continue à suivre nos travaux.*

*Nous sommes également sensible à la présence, dans notre jury, de Monsieur Jean-Marie PELT qui a accepté de juger ce travail. Que la bienveillance qu'il a toujours manifestée à notre égard trouve, dans ces quelques lignes, l'expression de notre profonde gratitude.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à Messieurs les Professeurs M. BODART, G. PERSOONE et F. RAMADE, ainsi qu'à Monsieur D. DIVE, qui nous font l'honneur d'accepter de siéger dans notre jury.*

*Notre reconnaissance va également à Monsieur J.C. BLOCK qui a suivi avec attention et bienveillance le déroulement de notre travail. L'aide matérielle qu'il nous a apportée et ses encouragements constants nous ont été d'un extraordinaire soutien.*

*Nous tenons également à remercier Monsieur G. FERARD qui, par le suivi d'une partie de ce travail, nous a apporté une aide précieuse. Nous souhaitons que ce travail soit digne de son attention.*

Pour leur gentillesse et l'amitié avec lesquelles elles ont participé à ce travail, nous voudrions remercier également Madame C. RAST, Madame D. LELANDAIS, Madame M. GRUNFELDER et tout particulièrement Mademoiselle M. GOERGEN et Monsieur K. ANGUJD..

Nous ne voudrions pas oublier dans nos remerciements Mademoiselle C. RETEUNA et Monsieur M. JANIN pour la part qu'ils ont pris dans la mise au point des méthodologies utilisées dans ce mémoire.

Nous remercions également tous nos camarades de laboratoire pour l'ambiance de travail, efficace et sérieuse, qu'ils ont su tous créer, facilitant ainsi la réalisation de ce travail.

Il nous faut remercier Messieurs les Professeurs GRIGNON et KILBERTUS pour la partie consacrée à la microscopie électronique, Monsieur LARBAIGT de l'Agence RMC de Lyon et Monsieur COLIN de l'IRH de Nancy pour leur aide documentaire.

## INTRODUCTION

Le cadmium, isolé en 1818 par STROHMEYER, était déjà utilisé dans l'antiquité en bijouterie (points de soudure) car il abaisse la température de l'or en fusion. Au XIXe siècle, on le retrouve sur la palette des peintres, de VAN GOGH en particulier, et il est vraisemblable que le "champ de blé aux corbeaux" lui doit ses oranges lumineux et tourmentés. Plus récemment, la toile "Up cadmium" de K. NOLAND témoigne de l'utilisation du cadmium dans la production de pigments.

Utilisé au cours des siècles précédents, dans le domaine des arts, le cadmium tient, de nos jours, une place de premier plan dans certaines technologies de pointe : aéronautique, électronique, télécommunications, matériel militaire etc...

Au service des arts et de la technologie, le cadmium n'en constitue pas moins un sujet de préoccupation pour les hygiénistes et les toxicologues. On lui doit l'un des premiers accidents lié aux problèmes des pollutions, consécutifs au développement industriel intense des pays développés au cours du XXe siècle : la maladie d'Itai-Itai au Japon. Cette maladie, assimilée à une ostéomalacie a frappé plus de 200 personnes. Elle illustre le caractère bioaccumulateur du cadmium, ses capacités de transmission dans les chaînes trophiques via la nourriture et le risque de déséquilibre des écosystèmes qui peut en résulter, compte-tenu de sa toxicité élevée. La menace est d'autant plus sérieuse que le cadmium est un métal très largement dispersé dans l'environnement et que son taux de recyclage est faible. Ceci explique que ce dérivé soit parmi les toxiques les plus étudiés actuellement sur le plan cellulaire.

Nombre de ces recherches concernent les organismes animaux et beaucoup sont orientées vers l'étude de la synthèse de métallothionéine induite par l'intoxication cadmique.

Nous nous sommes, pour notre part, intéressés à l'action du cadmium sur les algues unicellulaires, Chlorella vulgaris. Les algues, organismes représentatifs des producteurs primaires, constituent un maillon essentiel des écosystèmes hydriques. ELles sont capables de fixer et de concentrer les métaux présents dans les eaux. Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence la toxicité du cadmium sur la croissance des populations algales et axé plus spécifiquement notre recherche sur les facteurs qui influencent l'adsorption et l'absorption du cadmium chez la chlorelle, ainsi que son impact sur un système de transport actif de la membrane plasmique algale. La compréhension de ces phénomènes, en dehors de leur intérêt au plan fondamental, peut s'avérer utile dans le cadre du traitement des pollutions et des récentes perspectives offertes par l'utilisation des algues dans l'épuration des eaux usées domestiques et industrielles.

CHAPITRE I



DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

### I.1 - Le cadmium dans l'environnement.

La présence de cadmium dans l'environnement est due à des phénomènes naturels et anthropiques.

L'origine naturelle du cadmium dans la biosphère provient surtout de l'activité volcanique, mais aussi des feux de forêts, des poussières soulevées par les vents, des embruns marins, de la végétation et évidemment de l'érosion (éolienne ou aquatique). Le cadmium est, en effet, présent dans la croûte terrestre à la concentration de 0,18 ppm. Ce métal n'existe pas à l'état pur dans la nature mais le plus souvent dans des minerais de zinc. Les minerais de zinc cadmifères constituent d'ailleurs la principale source industrielle de cadmium.

#### I.1.1. - Production et consommation.

La production du cadmium est liée à celle du zinc (95 %) et, dans une moindre mesure, à celle du plomb et du cuivre (5 %). Pour une tonne de zinc produite, on obtient 3,4 kg de cadmium. La quantité de cadmium produite a considérablement augmenté au cours de XXème siècle : de quelques dizaines de tonnes par an, la production annuelle mondiale est de l'ordre de 13.000 à 14.000 tonnes par an (pays à économie dirigée non compris) et elle ne varie plus guère depuis quelques années.

Les principales utilisations du cadmium sont résumées dans le Tableau I. Les projections faites à partir de divers indicateurs économiques, montrent que, si la demande globale de cadmium sera peu modifiée dans le futur, les utilisations, par contre, vont changer. Les secteurs capables d'accroître leurs besoins en cadmium, sont les fabrications de batteries (cadmium-nickel) et de pigments (HISCOCK, 1983). D'autres utilisations, encore peu importantes, seront liées au développement des "nouvelles sources d'énergie". Il en est ainsi, par exemple, du sulfure de cadmium qui entre dans la composition des cellules photovoltaïques et des barres de cadmium (métal) utilisées dans le contrôle des réacteurs nucléaires par suite de leur grande capacité d'absorption des neutrons.

Usage final	Pourcentages d'utilisation du cadmium			
	R.F.A. + G.B.	U. S. A.	J A P O N	T O T A L
Cadmiage	35	51	1	39
Fabrication de colorants	38	13	35	25
Fabrication de piles (Cd-Ni)	11	22	42	21
Fabrication de plastiques	13	11	7	12
Fabrication d'alliages	3	3	9	4

Tableau I : Pourcentages d'utilisation du cadmium en 1979, par secteurs d'activité industrielle pour 3 pays industrialisés représentant 75 % de la consommation mondiale (d'après HISCOCK, 1983).

### I.1.2. - Sources de cadmium dans l'environnement.

L'identification qualitative des sources ne pose guère de problèmes. Certaines données quantitatives sont beaucoup plus difficiles à obtenir et nécessitent de faire un certain nombre d'estimations (activité volcanique par exemple). Ceci explique que, même à une échelle locale ou régionale, il est difficile de dresser un bilan exact des flux de cadmium vers l'environnement (air, eaux, sols). Ce type de bilan a, néanmoins, été dressé à l'échelle de la Communauté Européenne par type d'activité anthropique.

Le tableau II permet d'observer que, pour ce qui est de l'Europe, plus de 3.000 tonnes de cadmium sont rejetées dans l'environnement : 88 % de ce tonnage contamine le sol, tandis que seulement 8 % et 4 % se retrouvent respectivement dans l'eau et dans l'air (mais, les apports de cadmium aux écosystèmes aquatiques sont incomplets et, pour cette raison, sous-estimés). Les principales sources de contamination sont la production de fer et d'acier pour l'air (26 %), les déchets municipaux pour le sol (47 %) et la fabrication de produits contenant du cadmium pour les écosystèmes aquatiques (40 %).

L'industrie proprement dite du cadmium (production de zinc et de cadmium, production de matériaux contenant du cadmium) contribue à moins de 14 % de l'apport total. Toutefois, les produits finis de cette industrie (pigments, stabilisateurs, piles) vont constituer, à terme, une grande partie du cadmium contenu dans les décharges municipales.

En définitive, la quantité annuelle qui atteint l'environnement (3415 tonnes) représente à peu près 70 % de la quantité produite en Europe et 50 % de la quantité consommée. Quant aux sources de contamination, elles sont multiples. Les rejets aquatiques des petites entreprises de cadmiage sont difficiles à maîtriser, de plus, de nombreuses utilisations sont dispersives, c'est-à-dire qu'elles se prêtent mal à un recyclage. FULKERSON et al. (1973) ont ainsi employé le terme de "dissipated element" pour résumer le sort du cadmium dans l'environnement, où moins de 10 % sont recyclés (principalement dans la fabrication des piles).

Sources	Compartiments		
	AIR	SOL	EAU
Activité volcanique	20	ND	ND
Production de métaux non ferreux			
zinc et cadmium	20	200	50
cuivre	6	15	ND
plomb	7	40	20
Production de matériaux contenant du cadmium	3	90	108
Production de fer et d'acier	34	349	ND
Combustion			
charbon et lignite	8	390	ND
fuel	0,5	14,5	/
Ordures municipales	31	1434	ND
Boues	2	130	33
Engrais phosphatés	/	346	62
<b>TOTAUX</b>	<b>13 1,5</b>	<b>3008,5</b>	<b>273 *</b>
<b>POURCENTAGES</b>	<b>4</b>	<b>88</b>	<b>8 *</b>

Tableau II : Apports annuels (en tonnes) par type d'activité par les différents compartiments de l'environnement "européen" d'après HUTTON, 1983)

\* Quantité totale et pourcentage sous-estimés. ND = non déterminé.

I.1.3. - Concentrations trouvées dans l'environnement.

Les concentrations, habituellement observées dans différents milieux non contaminés, sont rassemblées dans le tableau III.

Compartiment	Domaine de concentrations
Air	0,1 - 5 ng/m <sup>3</sup>
Eaux douces	0,05 - 2 µg/l
Eaux de mers	
. zones côtières	> 0,05 µg/l
. pleine mer	0,01 - 0,1 µg/l
Sols	0,01 - 1 mg/Kg

Tableau III : Concentrations observées dans les différents compartiments non contaminés de l'environnement (d'après KORTE, 1983).

I.1.3.1. - Concentrations de cadmium trouvées dans l'air :

Le cadmium dans l'air ambiant se présente, principalement, sous forme d'oxyde de cadmium CdO ou associé à des particules.

Les concentrations moyennes annuelles, dans les zones rurales, sont plus faibles que dans les zones habitées : aux Etats-Unis, en 1969, les valeurs allaient de 6 à 36 ng/m<sup>3</sup> dans les plus grandes villes. En Europe, les concentrations urbaines sont à peu près identiques (2 à 50 ng/m<sup>3</sup>). La valeur extrême de 352 ng/m<sup>3</sup> a été trouvée dans le district de la ville de Kisako, au Japon. La proximité d'industries polluantes est déterminante : à 100 mètres d'une usine suédoise, on trouve 600 ng Cd/m<sup>3</sup>, tandis qu'à 300 mètres, on n'en trouve plus que la moitié (FRIBERG et al., 1976).

Le cadmium, présent dans l'air, peut être mesuré indirectement par l'analyse des mousses et des feuilles de végétaux (RÜHLING et TYLER, 1973). A cet égard, la contamination par les automobiles près des autoroutes, est significative et diminue exponentiellement avec la distance (MANKOVSKA, 1977).

I.1.3.2. - Concentrations de cadmium trouvées dans les écosystèmes aquatiques :

Dans l'environnement aquatique, le cadmium peut exister sous diverses formes :

- 1) adsorbé sur des particules en suspension
- 2) lié aux sédiments
- 3) fixé par les organismes aquatiques
- 4) en solution.

Dans les eaux naturelles, l'adsorption sur les matières en suspension augmente avec le pH, mais diminue avec la force ionique (c'est à dire, avec la salinité). Ce dernier effet va créer une différence dans le comportement du cadmium entre le milieu dulçaquicole et le milieu marin.

(1) Dans les eaux douces, la quantité de cadmium en solution dépend de la présence de matières en suspension, qui constituent les sites de fixation préférentiels du métal (CHEN et al., 1974, KUBOTA et al., 1974).

Les principales espèces dissoutes du cadmium sont les ions Cd ou les complexes avec les acides humiques (Tableau IV).

Principales espèces dissoutes du cadmium	Références		
	GARDINER (1974)	LONG et ANGINO (1977)	MANTOURA <u>et al.</u> (1978)
Cd <sup>++</sup>	52,8	90	90
Cd CH <sup>+</sup>	3,7	5	4
Cd CO <sub>3</sub>	11,5	1	/
Cd-humus	22,1	/	3

Tableau IV : Pourcentages calculés des différentes espèces dissoutes du cadmium en eaux douces (les données de GARDINER sont les moyennes de 11 échantillons différents).

Les concentrations de cadmium total retrouvées dans les eaux douces sont extrêmement variables. En principe, elles vont de 0,05 à 2 µg/l (cf. Tableau III), mais certaines données de la littérature trop élevées doivent être prises avec circonspection dans la mesure où les auteurs n'ont pas suffisamment prêté attention aux problèmes de contamination. LAXEN (1984) estime que le seuil de base est de 0,5 µg/l et qu'une concentration supérieure révèle, soit une erreur de dosage, soit une source de pollution.

Des concentrations importantes de cadmium peuvent se retrouver dans certains "cours d'eau" à proximité des lieux de production de zinc et de cadmium, puisque la concentration dans les effluents industriels peut atteindre 1000 mg/l.

Les sédiments des rivières constituent un modèle d'étude intéressant. L'augmentation des teneurs en cadmium peut être reliée à l'augmentation décennale de la production de métal au cours de la période 1900-1970 (figure 1). Pour aucun autre métal, l'enrichissement n'a été aussi élevé dans les sédiments du Rhin inférieur entre 1959 et 1970 (SALOMONS et al., 1982).

(2) Dans les estuaires, la spéciation du cadmium dépend de la salinité (figure 2).

(3) Dans l'eau de mer, l'adsorption du cadmium sur les particules est négligeable (SIMPSON, 1981) et le cadmium existe principalement sous forme dissoute. Les seuls composés inorganiques susceptibles de jouer un rôle, sont les hydroxydes de manganèse (VAN DER WEIJDEN, 1976).

Le cadmium dans l'eau de mer se trouve essentiellement sous forme de chlorocomplexes  $Cd Cl^+$  et  $Cd Cl_2$ , alors que le cadmium libre ne représente qu'environ 2 % du total (Tableau V).

En pleine mer, les concentrations "normales" sont généralement basses, de l'ordre de 0,01 à 0,10 µg Cd/l (cf. Tableau III), plus faibles dans l'Océan Atlantique que dans l'Océan Pacifique. Mais les régions les plus exposées sont, évidemment, les estuaires et les baies très enclavées et plus généralement des zones situées près des côtes. Les teneurs moyennes varient de 0,73 à 3,08 µg/l près des côtes françaises, toutefois une valeur extrême de 29 µg/l a été atteinte à Dunkerque (PREVOT, 1979).

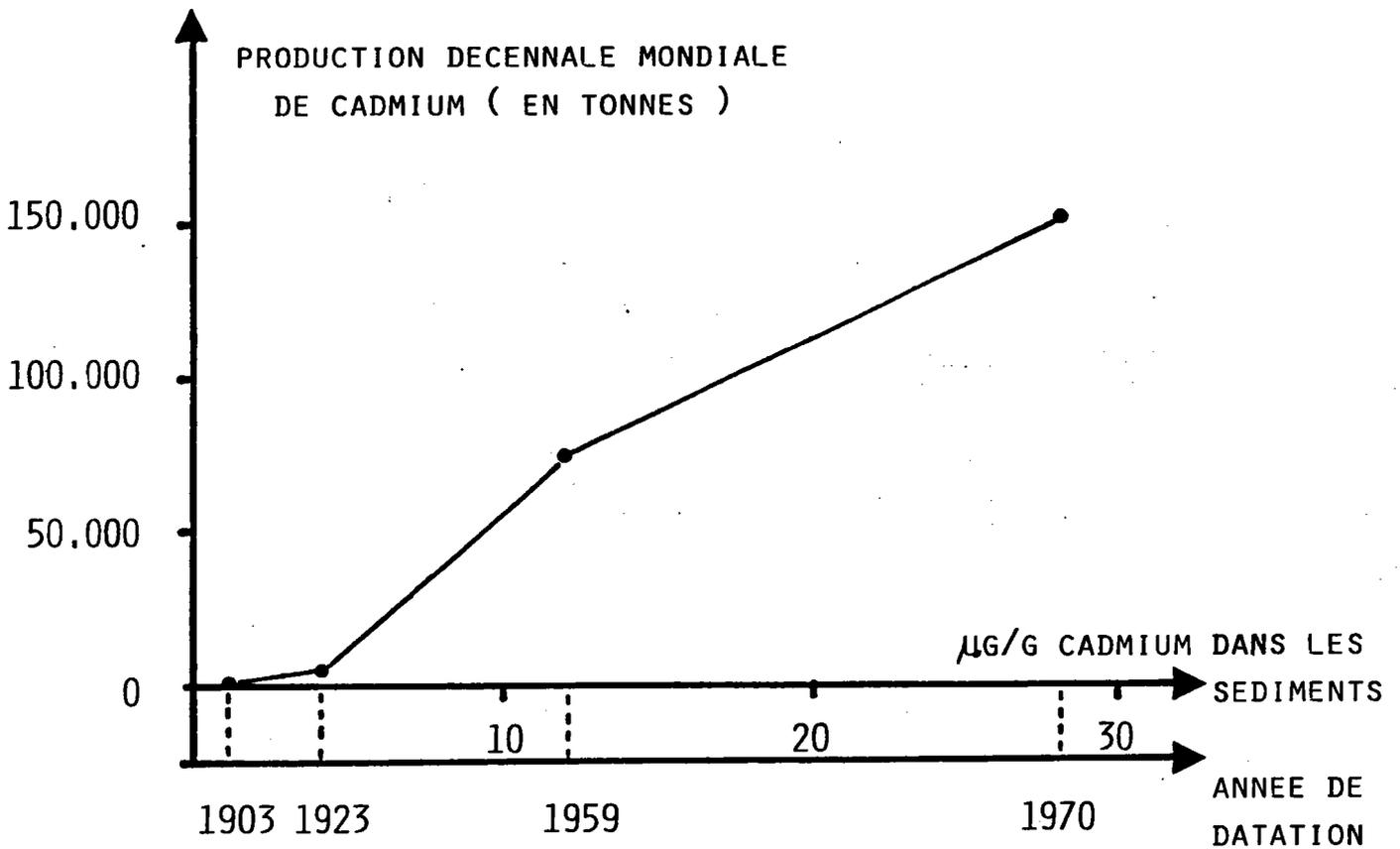


FIG. 1: RELATION ENTRE LA PRODUCTION MONDIALE DE CADMIUM ET LA TENEUR DES SEDIMENTS DU RHIN INFERIEUR ( D'APRES CEE 1981 ET SALOMONS ET AL., 1982 ).

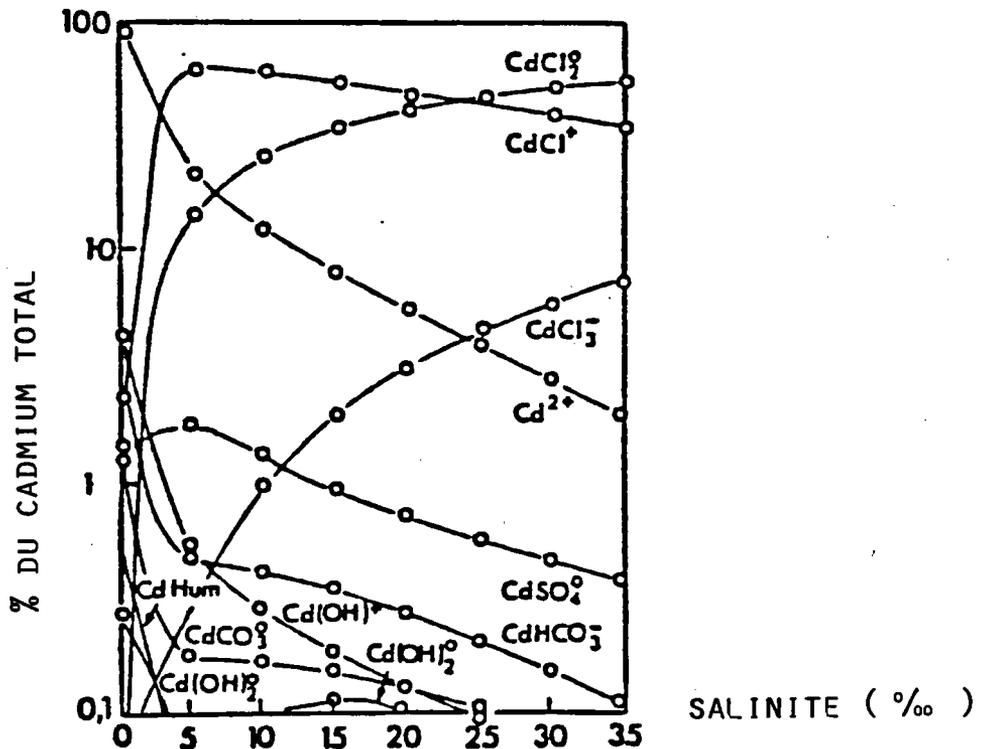


FIG. 2: SPECIATION DU CADMIUM EN FONCTION DE LA SALINITE ( D'APRES SIMPSON W.R., 1981 ).

Principales espèces dissoutes du cadmium	ZIRINO et YAMAMOTO (1972)	DYRSSEN et WEDBORG (1974)	SIBLEY et MORGAN (1977)	LONG et ANGINO (1977)
Cd <sup>++</sup>	2,6	1,8	2,6	2
Cd chlorocomplexes	95,8	94,6	96,3	96
autres	1,6	3,6	1,1	2

Tableau V : Pourcentages des espèces dissoutes du cadmium en eaux de mer.

Il faut aussi noter que le cadmium déversé dans les mers provient autant de l'atmosphère que des rivières (PRESTON, 1978) et que son temps de résidence, c'est-à-dire le temps au bout duquel le cadmium est éliminé par sédimentation, est de  $1,75 \cdot 10^5$  années (SIMPSON, 1981).

(4) L'étude de la fixation du cadmium par les organismes présents dans les écosystèmes aquatiques nécessite de grandes précautions quant à la méthodologie et à l'interprétation des résultats (BUTLER, 1973).

Les microorganismes et le plancton représentent une surface très importante capable de fixer le cadmium. Il est difficile de déterminer la teneur en cadmium d'une espèce, voire d'une catégorie d'organismes du fait de l'impossibilité de prélever spécifiquement ceux-ci dans l'environnement.

Les concentrations retrouvées dans le plancton de certains lacs italiens ne sont pas systématiquement fonction de la taille des organismes (Tableau VI).

Concentrations de cadmium	Plancton < 76 µm	Plancton < 126 µm	Lieu	Référence
min. - max.	6,4 - 16	6,5 - 39	Lac Majeur	BAUDO <u>et al.</u> (1981)
moyenne	8,3	7,1	Lac Mergozzo	

Tableau VI : Concentrations de cadmium en µg/g de matière sèche dans le plancton de deux lacs italiens, prélevé à l'aide de filet de mailles différentes.

En milieu marin, le plancton prélevé près des côtes, se caractérise par des concentrations maximales supérieures à celles observées en pleine mer (Tableau VII)

Phytoplancton	Zooplancton	Lieu	Référence
0,4 - 6,5	0,8 - 9,6	Baie de Monterey (Californie)	MARTIN et KNAUER (1973)
1,0 - 2,2	1,9 - 3,5	Pacifique Est	

Tableau VII : Concentrations de cadmium en  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche dans le phytoplancton et le zooplancton prélevés près des côtes (Baie de Monterey) et en pleine mer (Pacifique est).

Quant aux algues et macrophytes, WHITTON (1984) a parfaitement résumé les avantages potentiels de leur utilisation comme indicateur biologique quantitatif.

En eaux douces, les algues filamenteuses en particulier les Cladophora ont été très étudiées pour diverses raisons (taille, abondance, ubiquité, prélèvement spécifique). Les concentrations retrouvées chez C. glomerata provenant de diverses rivières bavaroises varient de 0,05 à 22,93  $\mu\text{g Cd/g}$  (FORSTNER et WITTMANN, 1983). Les macrophytes du Lac Majeur ont des teneurs variant de 0,20 à 9,60  $\mu\text{g Cd/g}$  de matière sèche : en particulier Nymphaea et Ceratophyllum se caractérisent par des teneurs moyennes respectives de 0,33 et 3,93  $\mu\text{g Cd/g}$  (GOMMES et MUNTAU, 1981).

Les algues marines telles que Fucus vesiculosus prélevées à différents endroits du "Sound", entre le Suède et la Danemark, ont des concentrations moyennes variant de 1,9 à 3,9  $\mu\text{g Cd/g}$  de matière sèche (PHILLIPS, 1979). une autre espèce de Fucus (F. serratus), prélevée dans les eaux supposées non polluées d'Angleterre, se caractérise par une concentration moyenne de 0,3  $\mu\text{g Cd/g}$  de matière sèche, mais dans les eaux contaminées, celle-ci peut atteindre 53  $\mu\text{g Cd/g}$  (LEATHERLAND et BURTON, 1974)

Pour les crustacés et mollusques, des différentes nettes existent entre certains groupes taxonomiques, tant en eaux douces qu'en eaux de mer (tableau VIII) et les concentrations peuvent quelquefois dépasser 10 µg Cd/g.

Milieu	Organismes testés	Concentrations de cadmium observées (moyenne)	Référence
eaux douces	<u>Unio mancus</u> (bivalve)	15,70	GOMMES et MONTAU, 1976
	<u>Viviparus ater</u> (gastropode)	0,75	
eaux marines	Euphosiacés	1,57	HAMANAKA et MISHIMA, 1981
	Copepodes	9,19	
	Amphipodes	21,44	

Tableau VIII : Concentration de cadmium (en µg/g de matière sèche) dans certains mollusques d'eaux douces (Lac Majeur) et divers types de crustacés marins (Pacifique Nord).

Les animaux marins prélevés près des côtes et dans les estuaires se caractérisent par des concentrations également très élevées. Cette accumulation importante résulte d'une part, de la contamination élevée de ces zones soumises aux rejets industriels et, d'autre part, de la moindre salinité des estuaires qui favorise l'accumulation. Par exemple, la concentration de cadmium chez Mytilus edulis prélevé dans les sites non pollués des eaux scandinaves augmente de 0,5 à 5,3 µg Cd/g de matière sèche lorsque la salinité diminue de 30 à 6 ‰ (PHILLIPS, 1977, 1978).

Dans les régions très exposées comme le canal de Bristol (G.B.) ou la baie de Tasmanie (N.Z.), des concentrations extrêmes ont été retrouvées chez les mollusques, 1120 µg Cd/g de matière sèche chez Nucella lapillus semble être le maximum observé (STENNER et NICKLESS, 1974).

D'une manière générale les poissons, qu'ils soient pélagiques ou benthiques, vivant dans les eaux douces ou dans les eaux marines, se caractérisent par des concentrations 5 à 20 fois plus basses que celles de leurs proies (pas de biomagnification apparente). Dans un lac contaminé (Lac Palestine, Indiana), les concentrations de cadmium moyennes varient de 0,10 à 0,21  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche, le maximum trouvé dans un poisson étant de 0,44  $\mu\text{g Cd/g}$  (MURPHY et al., 1978). Les concentrations de poissons marins provenant du Pacifique Nord, observées par HAMANAKA et MISHIMA (1981), sont du même ordre de grandeur.

I.1.3.3. - Concentrations de cadmium trouvées dans les écosystèmes terrestres :

Le sol constitue un milieu très complexe, car très hétérogène, où le cadmium peut être soit en solution dans l'eau intersticielle, soit fixé sur des particules principalement composées de colloïdes (argiles, matières humiques), ou d'hydroxydes de fer, de manganèse et d'aluminium. Le cadmium peut être également présent sous forme de précipités inorganiques insolubles (sulfure, phosphate, carbonate). Par contre, il existe de grandes incertitudes quant à l'importance de la complexation du cadmium par la matière organique du sol donnant lieu à des complexes organométalliques insolubles. Le facteur le plus important qui va influencer sur le comportement du cadmium est le pH (CHANEY et HORNIC, 1978). La diminution du pH s'accompagne d'une augmentation de la solubilité du cadmium. Les phénomènes de sorption vont évidemment jouer sur la distribution du cadmium entre la phase dissoute et la phase liée.

Les concentrations moyennes de cadmium dans le sol varient de 0,01 à 1 mg/Kg. Certains sols riches en phosphorites (utilisées pour la fabrication d'engrais phosphatés) peuvent en contenir jusqu'à 500 mg/Kg.

Quelques concentrations très élevées ont été observées non loin de certains sites industriels, supérieures à 540 mg/Kg près d'une mine de plomb et de zinc (DAVIES et ROBERTS, 1975) et supérieures à 1700 mg/Kg aux alentours d'une fonderie de zinc (BUCHAUER, 1973).

Les teneurs en cadmium de divers végétaux recueillis sur des sols supposés "non pollués" sont inférieures à 1 µg Cd/g de matière sèche et souvent plus faibles que 0,1 µg Cd/g., mis à part les champignons et certains légumes comme les épinards et le cresson (PETERSON et ALLOWAY, 1979). A cet égard, les concentrations de cadmium de 200 échantillons de légumes différents sont compris entre 0,01 et 0,22 µg Cd/g de matière sèche avec une moyenne de 0,04 (THOMAS et al., 1972), ce qui est comparable à celle d'échantillons de riz prélevés dans 22 pays : 0,029 µg Cd/g (PETERSON et ALLOWAY, 1979). Les concentrations de cadmium retrouvées aux alentours des sites contaminés sont généralement supérieures à celles observées dans les sites "supposés" indemnes de pollution : tout particulièrement, les lichens multiplient leur teneur par un coefficient allant de 225 à 720 (PETERSON et ALLOWAY, 1979).

Parmi les plantes susceptibles de jouer un rôle de vecteur, le riz a fait l'objet de nombreux contrôles et dans certains sites pollués du Japon, la concentration moyenne est de 1,41 µg Cd/g de matière sèche soit environ 50 fois plus que la concentration normale (0,029 µg/g). Les concentrations retrouvées dans des échantillons de blé suédois provenant du même endroit ont doublé entre 1916 et 1972 (KJELLSTROM et al., 1975) ce qui témoigne de l'imprégnation des écosystèmes terrestres.

#### I.1.3.4 - Prévisions des concentrations de cadmium dans l'environnement

L'utilisation de modèles permet de prévoir l'évolution des concentrations dans l'air, le sol et les sédiments fluviaux et lacustres (figure 3), en fonction des concentrations de cadmium passées et actuelles, des apports, des flux d'un compartiment à l'autre. Ainsi en tenant compte de l'évolution future de la consommation mondiale et des normes susceptibles d'être adoptées, le modèle de VAN ENK (1983) prévoit une stabilisation des concentrations de cadmium dans l'environnement.

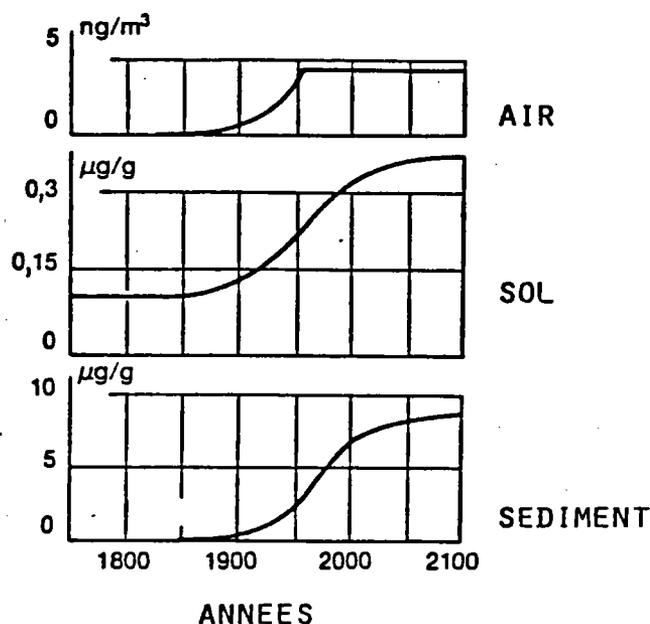


Figure 3 : Prévisions de l'évolution des concentrations de cadmium dans l'air, le sol et les sédiments (d'après VAN ENK, 1983).

#### I.1.4 - Normes actuelles.

##### I.1.4.1. - Air (milieu professionnel)

Le groupe d'étude de l'OMS (1979) recommande de rester en dessous des valeurs de :

- 20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  pour une exposition à long terme
- 250  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  pour une exposition à court terme.

Actuellement, les concentrations maximales admissibles aux Etats-Unis (qui s'appliquent généralement à tout le monde occidental), distinguent les fumées d'oxyde de cadmium qui ne doivent pas dépasser 50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  en valeur instantanée, et les poussières de métal et de sels de cadmium qui ne doivent pas dépasser cette même valeur de 50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , mais en valeur moyenne.

##### I.1.4.2. - Eaux

Il faut rappeler que le cadmium fait partie de la liste "noire" établie par la CEE (1976) dans sa directive cadre et de la liste des 129 polluants prioritaires établie par l'EPA (1979).

Secteur industriel (1)	Unité de mesure	Valeurs limites à respecter à partir de	
		1 <sup>er</sup> janvier 1986	1 <sup>er</sup> janvier 1989 (2)
1. Extraction du zinc, raffinage du plomb et du zinc, industrie des métaux non ferreux et du cadmium métallique	Milligrammes de cadmium par litre rejeté	0,3 (3)	0,2 (3)
2. Fabrication des composés de cadmium	Milligrammes de cadmium par litre rejeté	0,5 (3)	0,2 (3)
	Grammes de cadmium rejeté par kilogramme de cadmium traité	0,5 (4)	(5)
3. Fabrication de pigments	Milligrammes de cadmium par litre rejeté	0,5 (3)	0,2 (3)
	Grammes de cadmium rejeté par kilogramme de cadmium traité	0,3 (4)	(5)
4. Fabrication des stabilisants	Milligrammes de cadmium par litre rejeté	0,5 (3)	0,2 (3)
	Grammes de cadmium rejeté par kilogramme de cadmium traité	0,5 (4)	(5)
5. Fabrication des batteries primaires et secondaires	Milligrammes de cadmium par litre rejeté	0,5 (3)	0,2 (3)
	Grammes de cadmium rejeté par kilogramme de cadmium traité	1,5 (4)	(5)
6. Électrodéposition (6)	Milligrammes de cadmium par litre rejeté (7)	0,5 (3)	0,2 (3)
	Grammes de cadmium rejeté par kilogramme de cadmium traité	0,3 (4)	(5)
7. Fabrication de l'acide phosphorique et/ou d'engrais phosphatés à partir de roche phosphatée (7)		—	—

- (1) Pour les secteurs industriels qui ne sont pas mentionnés dans le présent tableau, les valeurs limites sont fixées en cas de besoin par le Conseil à un stade ultérieur. Entre-temps les États membres fixent de manière autonome, conformément à la directive 76/464/CEE, des normes d'émission pour les rejets de cadmium. Ces normes doivent tenir compte des meilleurs moyens techniques disponibles et ne doivent pas être moins strictes que la valeur limite la plus comparable contenue dans la présente annexe.
- (2) Sur la base de l'expérience acquise lors de l'application de la présente directive, la Commission présente au Conseil, en application de l'article 5 paragraphe 3, en temps utile, des propositions ayant pour but de fixer des valeurs limites plus restrictives en vue de leur entrée en vigueur pour 1992.
- (3) Concentration moyenne mensuelle en cadmium total pondéré selon le débit de l'effluent.
- (4) Moyenne mensuelle.
- (5) Il est pour le moment impossible de fixer les valeurs limites exprimées en poids. Le Conseil fixe ces valeurs le cas échéant comme le prévoit l'article 5 paragraphe 3 de la présente directive. Si le Conseil ne fixe pas de valeurs limites, les valeurs exprimées en poids figurant dans la colonne « 1<sup>er</sup> janvier 1986 » sont maintenues.
- (6) Les États membres peuvent suspendre jusqu'au 1<sup>er</sup> janvier 1989 l'application des valeurs limites pour les établissements ne rejetant pas plus de 10 kg de cadmium par an et dont l'ensemble des cuves d'électrodéposition représente un volume inférieur à 1,5 m<sup>3</sup>, lorsque la situation technique ou administrative rend cette mesure absolument nécessaire.
- (7) Au stade actuel, il n'existe pas de méthodes techniques valables sur le plan économique qui permettent d'extraire systématiquement le cadmium des rejets résultant de la production d'acide phosphorique et/ou d'engrais phosphatés à partir de roche phosphatée. Aucune valeur limite n'a donc été fixée pour ces rejets. L'absence de ces valeurs limites ne dégage pas les États membres de leur obligation, au titre de la directive 76/464/CEE, de fixer des normes d'émission pour ces rejets.

Tableau IX : Valeurs limites et délais fixés pour le respect de ces valeurs (CEE, 1983).

(1) Rejets industriels et eaux superficielles.

Il existe, au niveau européen, une directive concernant les valeurs limites et les objectifs de qualité pour les rejets de cadmium (CEE, 1983) qui est, en principe, exécutoire le 1er janvier 1986. Cette directive s'applique aux eaux de surface intérieures, d'estuaires, territoriales et côtières, mais pas aux eaux souterraines qui font l'objet d'une directive séparée (CEE, 1980a). Elle impose aux Etats membres d'interdire tout déversement direct de cadmium et de prendre les mesures appropriées qu'ils jugent nécessaires en vue d'éviter tout rejet indirect (après cheminement dans le sol ou le sous-sol) de cadmium. Les valeurs limites pour chaque type d'industrie sont données dans le tableau IX en termes de concentration (et en termes de quantité de cadmium rejeté par quantité de cadmium traité pour les secteurs industriels utilisateurs de cadmium).

Il est à noter que les rejets résultant de la fabrication d'acide phosphorique et d'engrais phosphatés à partir de roche phosphatée ne font pas l'objet de valeur limite, car il n'existe pas actuellement de méthodes techniques économiquement valables qui permettent d'éliminer le cadmium des rejets alors que ce type d'industrie est responsable de 23 % de la contamination aquatique (cf. tableau II). Il faut également noter que la contamination par l'industrie des métaux ferreux est insuffisamment connue (HUTTON, 1983) et qu'un effort devrait être entrepris dans ce domaine.

Pour ce qui est des eaux superficielles, les objectifs de qualité sont présentés dans le tableau X. Ceux-ci prévoient un taux maximal de 0,5 µg/l en milieu marin et 1 µg/l en milieu dulçaquicole et saumâtre lorsque les eaux ne sont pas affectées par les rejets. Dans le cas contraire, ces seuils sont 5 fois supérieurs.

En ce qui concerne les Etats-Unis, les valeurs limites proposées par l'E.P.A. pour le secteur industriel concernent seulement les rejets des fabrications de pigments et de sels de cadmium. La moyenne autorisée est de 0,15 mg par litre d'effluent et le maximum est fixé à 0,47 mg/l, après précipitation à la chaux avec clarification suivie de filtration (EPA, 1983).

Objectifs de qualité (1)	Eaux affectées par des rejets (2) (3)	Eaux non affectées par des rejets	Sédiments et organismes vivants
[Cd] totale dans les eaux intérieures de surface ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	5	1	voir (4)
[Cd] en solution dans les eaux des estuaires ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	5	1	voir (4)
[Cd] en solution dans les eaux de mer terri- toriales et dans les eaux côtières inté- rieures ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	2,5	0,5	voir (4)

(1) lorsque plusieurs objectifs de qualité sont appliqués aux eaux d'une région, la qualité des eaux doit être suffisante pour respecter chacun de ces objectifs.

(2) Ces concentrations doivent être mesurées suffisamment proche du point de rejet et constituent les exigences minimales nécessaires pour protéger la vie aquatique.

Ces concentrations se rapportent à la moyenne arithmétique des résultats obtenus pendant une année.

(3) Dans le cas des eaux utilisées pour la production d'eau potable, la teneur en cadmium doit répondre aux exigences de la directive 75/440/CEE (CEE, 1975), soit  $5 \mu\text{g}/\text{l}$  dans 95 % des échantillons prélevés.

(4) Les concentrations de cadmium dans les sédiments et/ou mollusques et crustacés, si possible de l'espèce Mytilus edulis, ne doit pas augmenter de manière significative avec le temps.

Tableau X - Objectifs de qualité (CEE, 1983).

L'EPA a également publié des critères de qualité pour la protection de la vie aquatique marine et dulçaquicole (EPA, 1984), dont l'originalité est de considérer les concentrations de cadmium dissous.

- en milieu dulçaquicole, les valeurs autorisées sont fonction de la dureté de l'eau : soit 0,69 µg/l et 10 µg/l pour des duretés respectives de 20 et 200 mg/l de CaCO<sub>3</sub> (valeur maximale en µg/l = exp (1,16 (Log Dureté) - 3,841)
- en milieu marin, les seuils sont les suivants :
  - 12 µg/l = concentration moyenne sur 30 jours
  - 38 µg/l = concentration maximale à ne pas dépasser.De plus, des concentrations comprises entre 12 et 38 µg/l ne sont pas admises pendant plus de 4 jours sur 30.

## (2) eaux de boissons

La CEE (1980b) et l'OMS (1984) recommandent une valeur de 5 µg/l (exprimée en cadmium total) tandis qu'aux Etats-Unis (EPA, 1975) la norme est de 10 µg/l.

### I.1.4.3. - Boues de station d'épuration :

La teneur en cadmium des boues ne doit pas dépasser 40 mg/Kg de matière sèche selon la norme AFNOR (1985). La quantité maximale d'application de ces boues est calculé en fonction de la teneur en éléments-traces, et celà pour une période de 10 ans. En outre, les boues ne doivent pas être épandues sur des sols dont la teneur excède 2 mg Cd/Kg de terre sèche.

Aux Etats-Unis, l'addition annuelle de métal provenant de boues ne doit pas être supérieure à 17 mg/m<sup>2</sup> (EPA, 1977).

## I.2 - Propriétés physico-chimiques et bioréactivité du cadmium

### I.2.1 Généralités

Le cadmium (Cd) est l'élément chimique de numéro atomique 48 et de poids atomique 112,41, dont il existe 8 isotopes naturels d'abondance variable.

Ce métal divalent (de configuration électronique 2,8,18,18,2) est un métal mou, blanc-argenté teinté légèrement de bleu et de densité 8,65 (à 20° C). Le point de fusion est de 321°C tandis que le point d'ébullition est de 767 ± 2°C. Il bout en émettant des vapeurs oranges.

C'est un métal de transition appartenant au groupe II b, comprenant également le zinc et le mercure. Il a beaucoup plus de points communs avec le zinc qu'avec le mercure, mais il est plus fusible et plus volatil que le zinc car sa pression de vapeur est plus élevée.

Il est insoluble dans l'eau et les solvants organiques, mais se dissout dans l'acide nitrique dilué. Dans l'acide chlorydrique ou sulfurique, la dissolution se fait lentement. Il est facilement attaqué par les acides faibles, y compris les acides organiques.

La plupart des sels de cadmium sont très solubles dans l'eau et en particulier le chlorure (1400 g/l à 20°C), le nitrate (1090 g/l à 0° C) et le sulfate (755 g/l à 0° C). Par contre, l'oxyde et le carbonate sont insolubles. Avec l'anhydride sulfureux ou le sulfure de sodium, le cadmium précipite pour donner un sulfate de cadmium insoluble, jaune, ce qui en fait un représentant des métaux lourds.

### I.2.2. - Bioréactivité du cadmium

La classification de NIEBOER et RICHARDSON (1980) permet de différencier les métaux doux, durs et intermédiaires (figure 4) en fonction de leur réactivité en milieu organique, critère qui explique aussi leur comportement dans les systèmes biologiques.

INDICE DE COVALENCE

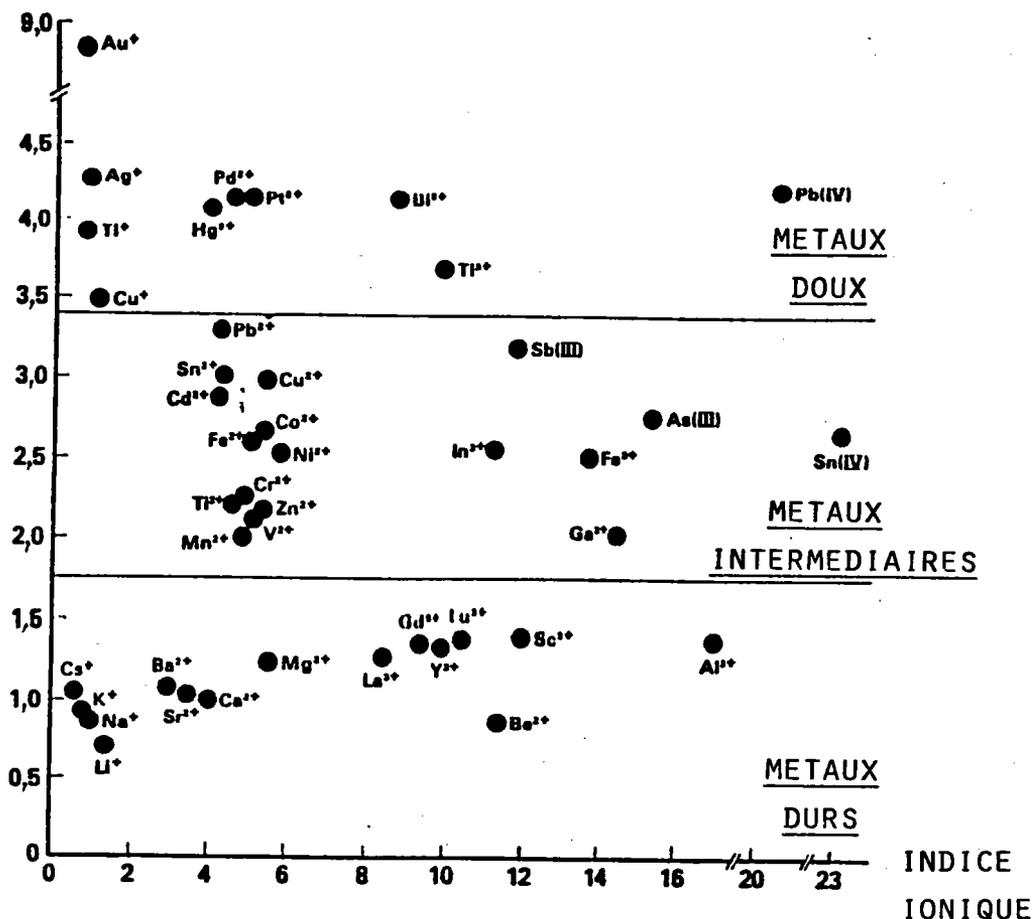


FIG. 4: CLASSIFICATION DE NIEBOER ET RICHARDSON ( 1980 ).

Ligands préférentiels des métaux durs	Ligands préférentiels des métaux intermédiaires	Ligands préférentiels des métaux doux
$F^-$ , $O^{2-}$ , $OH^-$ , $H_2O$ $CO_3^{2-}$ , $SO_4^{2-}$ , $ROSO_3^-$ , $NO_3^-$ $HPO_4^{2-}$ , $-O-P(=O)(O^-)-etc.$ $ROH$ , $RCO^-$ , $-C(=O)-$ , $ROR$	$Cl^-$ , $Br^-$ , $N_3^-$ , $NO_2^-$ $SO_3^{2-}$ , $NH_3$ , $N_2$ , $RNH_2$ $R_2NH$ , $R_3N$ , $=N-$ , $-CO-N-R$ $O_2$ , $O_2^-$ , $O_2^{2-}$	$H^-$ , $I^-$ , $R^-$ , $CN^-$ $CO$ , $S^{2-}$ , $RS^-$ , $R_2S$ , $R_3As$

TABLEAU XI : Affinité des différents types de ligands susceptibles de se retrouver dans les systèmes biologiques ( d'après NIEBOER et RICHARDSON, 1980 ).

Plus le métal est doux, plus il a tendance à former des liaisons covalentes ; par contre, plus le métal est dur, plus il a tendance à former des liaisons ioniques.

Le tableau XI rassemble différents types de ligands retrouvés dans les systèmes biologiques et les classe en trois catégories en fonction de l'affinité des métaux pour ces ligands. Les ions intermédiaires, comme le cadmium, sont capables de former des complexes stables avec toutes les catégories de ligands mais avec une préférence pour les ligands situés dans la colonne du milieu du tableau XI .

Considéré traditionnellement comme un ion accepteur (puisque déficient en électrons), l'ion cadmium est un métal intermédiaire avec, toutefois, un caractère doux relativement marqué, ce qui d'ailleurs l'a fait classer précédemment dans cette catégorie (PEARSON, 1968 ; JACOBSON et TURNER, 1980). Ce caractère est concrétisé par la grande affinité du cadmium pour le soufre qui a été exploitée à des fins analytiques (dosage par la dithizone à pH alcalin ; extraction à l'aide de l'APDC \*).

### I.3 - Biosorption du cadmium par les algues

#### 1.3.1. - Terminologie

Le mot anglais "uptake" s'avère difficilement traduisible en français. COSSA (1976) utilise le terme d'accumulation, mais emploie de préférence le terme de sorption. SOEDER et al. (1978) utilisent également le terme anglais de "sorption" pour englober les phénomènes d'adsorption et d'absorption. TSEZOS et VOLESKY (1982) notent que la biosorption caractérise la capacité de la biomasse à retenir les ions.

En s'inspirant de cette dernière définition, nous utiliserons le terme de biosorption pour définir l'ensemble des phénomènes d'adsorption et d'absorption, de fixation et d'accumulation du cadmium sur ou dans le matériel algal.

\* APDC : sel d'ammonium de l'acide pyrrolidino dithiocarboxylique - 1.

### 1.3.2. - Critères d'évaluation de la biosorption

Divers types de données figurent dans la littérature :

1) Tout d'abord, le coefficient d'accumulation (CA), qui exprime la concentration de métal biosorbé par l'algue, c'est-à-dire la quantité de métal retrouvé dans ou sur la biomasse algale en fonction d'un paramètre représentatif du poids, du nombre ou du volume d'algues, ou encore en fonction de la quantité de protéines. Le plus souvent, le CA est exprimé en  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche algale (= ppm) :

$$\text{CA} = \frac{\text{quantité de métal biosorbé } (\mu\text{g})}{\text{poids de matière sèche algale (g)}}$$

2) Le coefficient d'accumulation peut être rapporté à la concentration introduite, ou mieux mesurée effectivement après un certain temps d'incubation. Ce rapport de 2 concentrations est généralement appelé facteur de concentration (FC).

$$\text{FC} = \frac{\text{concentration de métal dans la phase algale}}{\text{concentration de métal dans la phase aqueuse } [\text{Me}]_s} = \frac{\text{CA}}{[\text{Me}]_s}$$

3) Plusieurs facteurs de concentration peuvent être mesurés à différentes concentrations de métal. La relation qui existe entre la quantité de métal biosorbé et la concentration de métal dans la phase aqueuse peut être alors décrite à l'aide d'une ou de plusieurs équations empruntées à la notion d'adsorption proprement dite. Il existe plusieurs types d'isotherme d'adsorption, les plus connus étant ceux de LANGMUIR (1918) et de FREUNDLICH (1926).

L'isotherme de FREUNDLICH obéit à une loi empirique qui considère que tous les sites de fixation ne sont pas équivalents, c'est-à-dire que la surface est hétérogène. L'équation obtenue est du type :

$$\text{Me} = a. [\text{Me}]_s^n \quad (1)$$

- Me représente la quantité de métal fixé par les algues à l'instant t (exprimée, par exemple, en moles/g de matière sèche)
- $[Me]_s$  représente la concentration de métal en solution au même instant t (exprimée, par exemple, en moles/l)
- a et n sont des constantes sans signification biologique.

L'équation (1) se linéarise en coordonnées log-log (fig. 5). L'isotherme de FREUNDLICH s'applique, en général, bien pour les faibles concentrations de métal en solution.

Pour les plus fortes concentrations, lorsque le matériel biologique approche de la saturation, l'isotherme de LANGMUIR traduit mieux les phénomènes de biosorption, selon l'équation suivante :

$$\frac{K \cdot [Me]_s \cdot b}{1 + K [Me]_s} = Me \quad (2)$$

Par réarrangement de l'équation (2), on obtient l'équation (3) qui permet de linéariser l'isotherme en portant  $[Me]_s / Me$  en fonction de  $[Me]_s$  et de calculer les deux constantes K et b :

$$\frac{[Me]_s}{Me} = \frac{1}{K \cdot b} + \frac{[Me]_s}{b} \quad (3)$$

- $[Me]_s$  et Me ont les mêmes significations que précédemment.
- K est une constante (l/moles),
- b est une constante qui exprime la quantité maximale de métal susceptible de se biosorber ( moles/g de matière sèche).  $b/2$  représente la constante de demi-saturation.

En théorie, l'utilisation de cet isotherme implique, en particulier, que chaque site de fixation ait la même probabilité d'adsorber l'ion considéré, c'est-à-dire que la surface soit uniforme et qu'il n'y ait pas d'interaction entre les ions fixés, situation rarement rencontrée dans la réalité.

Toutefois, même si ces conditions ne sont pas respectées, l'équation de LANGMUIR est suffisamment "robuste" pour s'appliquer encore. En effet, la chaleur d'adsorption (qui constitue le facteur le plus important de la constante  $b$ ) diminue lorsque la saturation approche. Mais, par ailleurs, l'interaction des ions déjà fixés avec les ions en train de se fixer augmente la chaleur d'adsorption. Donc, ces deux phénomènes vont avoir tendance à se compenser de telle sorte que  $b$  va rester constant (BRUNAUER et al., 1967)

Dans le cas où un seul type de sites d'adsorption prédomine, la variation de  $b$  sera faible, si bien que l'équation de LANGMUIR permettra encore d'évaluer la capacité de fixation (TILLER et al., 1969).

Pratiquement, l'isotherme de LANGMUIR s'applique bien pour les concentrations pour lesquelles on s'approche de la saturation (fig. 5)

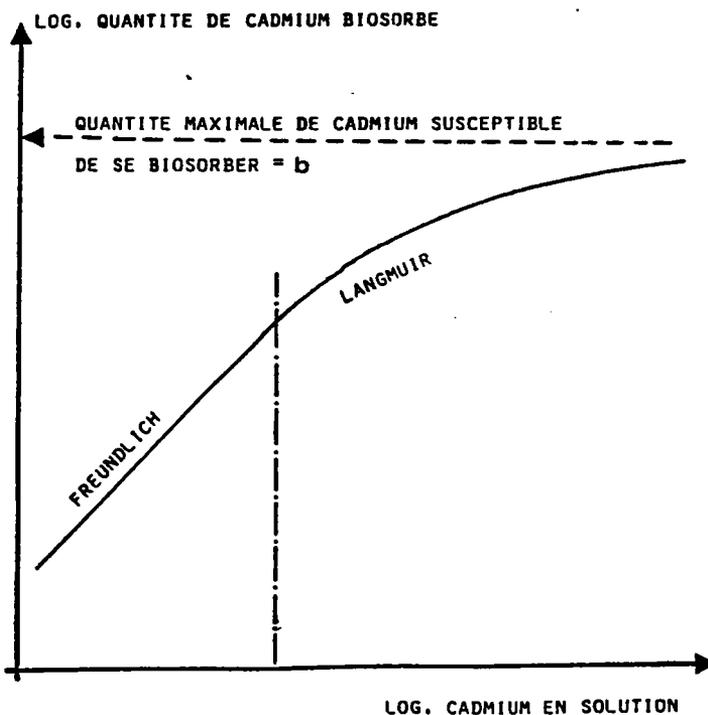


FIG. 5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CONTINUTE DES ISOTHERMES DE FREUNDLICH ET DE LANGMUIR.

### I.3.3. - Influence de différents facteurs sur la biosorption du cadmium.

#### I.3.3.1. - Le pH :

A pH 3, la biosorption est nulle chez Chlorella regularis, mais elle s'accroît de pH 4 à pH 7 de façon linéaire (SAKAGUCHI et al., 1979). L'augmentation de la biosorption a également été observée sur Scenedesmus obliquus entre pH 5,5 et 7,5 (STARY et al., 1983), ainsi que sur Chlorella fusca entre pH 4 et 9 (GEISWEID et URBACH, 1983).

Selon les espèces, le maximum de biosorption observé correspond à un pH de :

- 7 pour Chlorella regularis (SAKAGUCHI et al., 1979),
- 8 pour Chlorella ellipsoidea (GIPPS et COLLIER, 1980),
- 9 pour Chlorella fusca (GEISWEID et URBACH, 1983).

#### I.3.3.2. - La température :

La diminution de la température provoque généralement la diminution de la biosorption du cadmium. Ainsi, la quantité de cadmium biosorbé est respectivement de 42,5 25 et 5 pmoles Cd/h/10<sup>6</sup> cellules pour 31, 21 et 4°C chez Chlorella pyrenoidosa (HART et al., 1979).

Par contre, SAKAGUCHI et al. (1979) observent que les coefficients d'accumulation ne varient pratiquement par entre 0 et 30° C.

#### I.3.3.3. - La lumière

La biosorption est plus faible à l'obscurité qu'à la lumière (CONWAY et WILLIAMS, 1979). Ainsi, pour Chlorella pyrenoidosa, elle diminue de 20,5 % (HART et al., 1979). La différence est encore plus marquée pour Porphyra umbilicalis où après 1 heure, la biosorption à l'obscurité est trois fois plus faible, (MAC LEAN et WILLIAMSON, 1977).

I.3.3.4. - Influence des concentrations de cadmium introduites.

De façon générale, la quantité de cadmium biosorbé est proportionnelle à la concentration de métal introduite dans le milieu (HART et SCAIFE, 1977 ; GIPPS et COLLIER, 1980) jusqu'à une concentration qui varie selon les espèces testées : 0,1 mg/l pour Chlorella ellipsoidea (fig. 6 a) et 1 mg/l pour Chlorella regularis (fig. 6 b). Pour les concentrations plus élevées les courbes prennent une allure michaelienne, ce qui indique que le matériel algal utilisé est saturable. A cet égard, la constante de demi-saturation est égale à 336 µg Cd/l pour Chlorella pyrenoidosa (HART et al., 1979). Sur trois algues différentes, la biosorption obéit à un isotherme de FREUNDLICH en deçà de  $10^{-6}$  M de cadmium retrouvé dans le surnageant, et à un isotherme de LANGMUIR au delà (GEISWEID et URBACH, 1983).

Si les coefficients d'accumulation tendent généralement vers une limite lorsque la concentration de métal introduite augmente (limite qui correspond au coefficient d'accumulation maximal, c'est-à-dire à la constante b de l'isotherme de LANGMUIR), c'est, par contre, pour les faibles concentrations que les facteurs de concentration maximaux sont observés (tableau XII).

Concentrations de cadmium (mole/litre)	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
F.C.	3900	1900	960	380	86

Tableau XII : Diminution des facteurs de concentration observés chez Chlorella fusca lorsque la concentration de cadmium retrouvé dans le milieu augmente (d'après GEISWEID et URBACH, 1983).

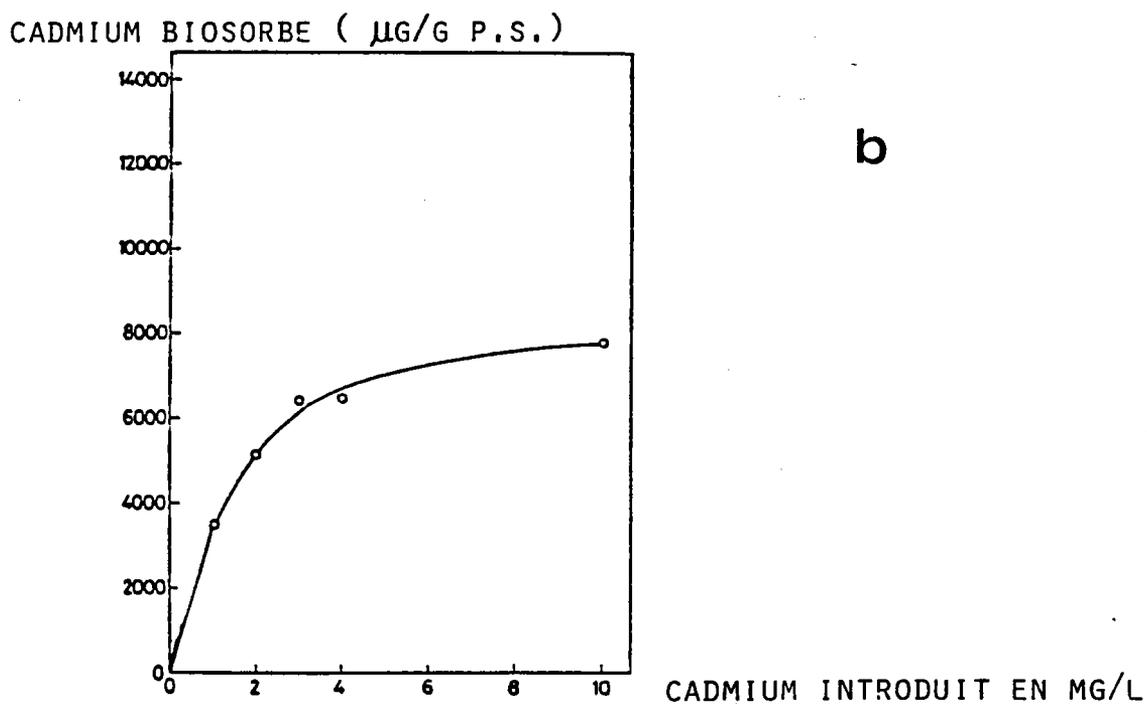
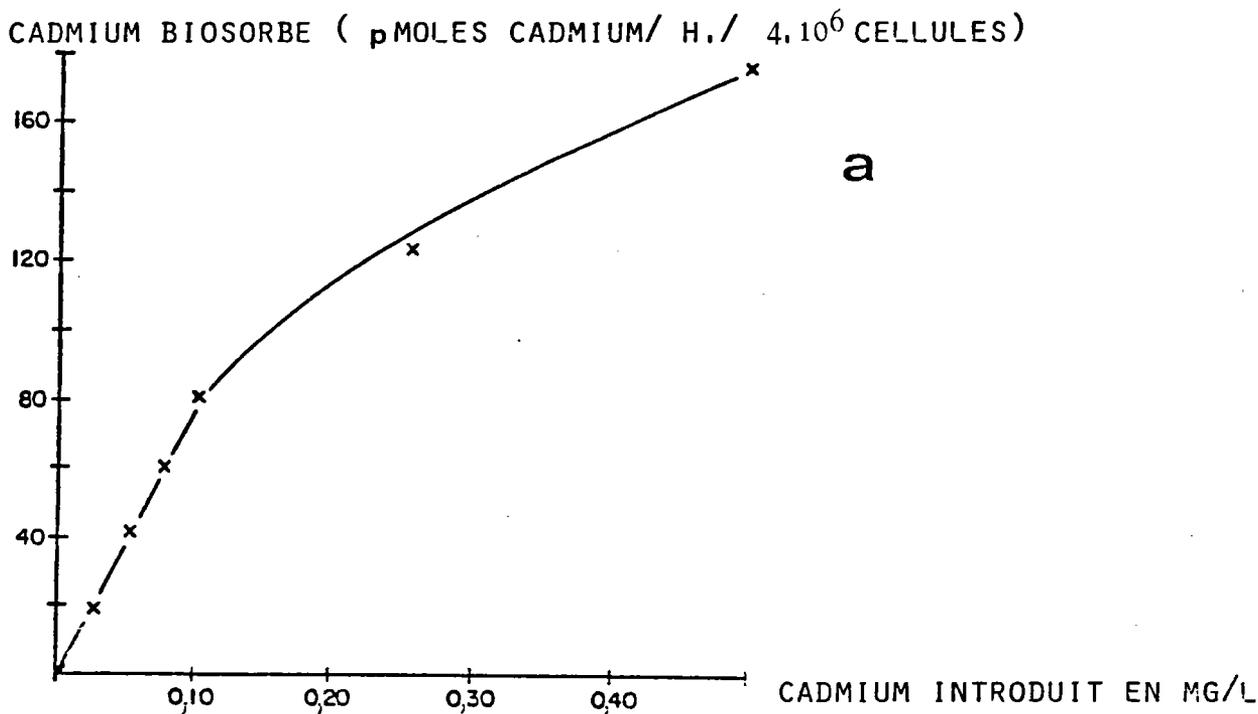


FIG. 6: BIOSORPTION DU CADMIUM EN FONCTION DU CADMIUM INTRODUIT  
( a ) POUR CHLORELLA ELLIPSOIDEA ( HART ET AL., 1979 )  
( b ) POUR CHLORELLA REGULARIS ( SAKAGUCHI ET AL., 1979 ).

I.3.3.5 - Influence des cations présents dans le milieu.

Les différents effets observés sont rassemblés dans le tableau XIII. Les variations des concentrations de molybdène et de cuivre n'ont aucun effet sur la biosorption du cadmium, tandis que l'augmentation des quantités de fer, de nickel et de sodium diminue la quantité de métal biosorbé.

Les actions du calcium, du magnésium, du cobalt, du zinc, du manganèse et du potassium sont plus controversées. En ce qui concerne ce dernier cation, GEISWEID et URBACH (1983), contrairement à SAKAGUCHI et al. (1979), ont montré que le potassium réduisait la biosorption du cadmium et que cette réduction n'était pas un effet de l'augmentation de la force ionique.

Références	s.e *	Cations diminuant la fixation	algues utilisées
KINKADE et ERDMAN (1975)		<u>Ca</u> , <u>Mg</u>	<u>Nitella flexilis</u>
HART et SCAIFE (1977)	<u>Ca</u> , <u>Mg</u> , <u>Mo</u>	<u>Mn</u> , Fe + EDTA	<u>Chlorella</u>
MANG et TROMBALLA (1978)	<u>Cu</u> , <u>Zn</u> , <u>Co</u>	<u>Zn</u>	<u>pyrenoidosa</u>
HART <u>et al.</u> (1979)	<u>Co</u> , <u>Zn</u>	<u>Mn</u> , Fe + NTA	<u>Chlorella</u>
			<u>pyrenoidosa</u>
SAKAGUCHI <u>et al</u> (1979)	<u>K</u>	Na, <u>Mg</u> , <u>Ca</u> , <u>Mn</u>	<u>Chlorella</u>
		<u>Co</u> , Ni, <u>Zn</u>	<u>regularis</u>
GIPPS et COLLER (1982)	<u>Mn</u>	<u>Ca</u> , Fe, <u>Zn</u>	<u>Chlorella</u>
			<u>pyrenoidosa</u>
GEISWEID et URBACH (1983)		<u>K</u>	<u>Chlorella fusca</u>

Tableau XIII : Effets de divers cations sur la biosorption du cadmium. Les traits désignent les cas où l'action des cations est controversée  
\* s.e = sans effet.

I.3.3.6 - Influence des anions présents dans le milieu :

Selon GEISWEID et URBACH (1983), la biosorption du cadmium ne serait pas influencée par la présence d'anions chlorures et sulfates. Elle serait du même ordre de grandeur, sous forme chlorure ou iodure que sous forme de sulfate, carbonate ou acétate (NAGANO et al., 1976).

Par contre, la biosorption diminue en présence de phosphates inorganiques (MOTOHASHI et TSUCHIDA, 1974). Il est probable que dans ce cas, la formation de phosphate de cadmium sous forme colloïdale limite le phénomène de biosorption (GIPPS et COLLIER, 1980).

I.3.3.7. - Influence des agents chélatants

(1) La chélation d'un ion métallique modifie son comportement. Par exemple, le cadmium chélaté par l'EDTA se biosorbe faiblement chez Phaeodactylum tricornutum (COSSA, 1976). Le même phénomène a été observé par NAGANO et al. (1976) et par JENNETT et al. (1982).

L'utilisation de citrate à la place d'EDTA dans le milieu de culture de Chlamydomonas reinhardii augmente la biosorption du cadmium d'un facteur 10 (IRMER, 1984). Ce fait doit être rapproché de la valeur des logarithmes des constantes de stabilité qui sont respectivement pour le citrate et pour l'EDTA de 3,75 et de 16,46 (MARTELL et SMITH, 1974, 1977).

(2) Les acides humiques diminuent la biosorption du cadmium ainsi que l'on montré GJESSING (1981) et SEDLACEK et al. (1983) dont les résultats sont résumés dans le tableau XIV.

concentration d'acides humiques (mg carbone/l)	pourcentage de Cd retenu
0	> 80
1,6	40 - 55
8,1	< 20

Tableau XIV : Effet de la concentration d'acides humiques sur la biosorption du cadmium chez Selenastrum capricornutum (d'après SEDLACEK et al., 1983).

I.3.3.8. - Influence de l'espèce algale testée :

Le matériel biologique par sa nature, sa structure et son métabolisme est un facteur prépondérant des phénomènes de biosorption, au même titre que les paramètres physico-chimiques précédents. Il est difficile, cependant, d'estimer l'importance exacte de ce facteur et de comparer les facteurs de concentration (= FC) et les coefficients d'accumulation (= CA) des différentes espèces à partir des données de la littérature dans la mesure où les conditions expérimentales utilisées par les auteurs ne sont pas comparables. Néanmoins, les FC rapportés dans la littérature varient de 134 à 32000. Quant aux CA, les valeurs minimales et maximales sont respectivement de 1,5 et de 53000 mg/Kg de matière sèche.

Le tableau XV fournit les données correspondant à des études regroupant plusieurs espèces algales appartenant ou non à la même classe taxonomique. Les FC des 4 Scenedesmus étudiés, sont relativement proches les uns des autres. Par contre, les FC des Chlamydomonas et des chlorelles varient respectivement d'un facteur 2,8 et 5,1 d'une étude à l'autre. Les différences enregistrées peuvent s'expliquer, en partie par le fait que la valeur des FC varie énormément selon la concentration de métal introduite (cf tableau XII).

Enfin le mode d'expression de la biosorption peut avoir son importance :

Sur 3 algues de tailles différentes, les coefficients d'accumulation maximaux sont très variables, lorsque exprimés en cadmium biosorbé par cellule, mais deviennent très proches les uns des autres lorsque exprimés en cadmium biosorbé par volume de paroi algale (GEISWEID et URBACH, 1983).

I.3.3.9 - Influence de la concentration algale utilisée :

Comme le montre la figure 7, les quantités de cadmium biosorbé par cellule chez Chlorella regularis diminue lorsque la concentration algale, c'est-à-dire la D.O. (à 680 nm) augmente, tandis que parallèlement, la quantité totale de cadmium fixé augmente légèrement (SAKAGUCHI et al., 1979).

Algues testées	Appartenance taxonomique	Concentrations testées (en mg/l)	CA (en mg/Kg de matière sèche)	FC	Références
Navicula pelliculosa	Bacillariophycées	0,365	1330	3640	JENNETT <u>et al.</u> , 1982
Chlamydomonas sp.	Chlorophycées	"	2010	5480	
Chlorella pyrenoidosa		"	6100	16700	
Scenedesmus obliquus		"	990	2700	
Ulothrix fimbriata	Cyanophycées	"	4180	11400	
Nostoc 586		"	420	1140	
Oscillatoria sp.		"	420	1160	
Asterionella formosa	Bacillariophycées	$1,9 \cdot 10^{-3}$	12,5	6580	CONWAY et WILLIAMS 1979
Fragilaria crotonensis		$4,1 \cdot 10^{-3}$	35	8537	
		$8,8 \cdot 10^{-3}$	85	9660	
		$1,8 \cdot 10^{-3}$	12	6667	
		$4,5 \cdot 10^{-3}$	35	7778	
		$8,5 \cdot 10^{-3}$	80	9412	
Chlorella regularis	Chlorophycées	1	3308	3308	SAKAGUCHI <u>et al.</u> , 1979
Chlamydomonas angulosa		"	1981	1981	
Chlamydomonas reinhardii		"	3539	3539	
Scenedesmus bijuga		"	2663	2663	
Scenedesmus chlorelloides		"	1847	1847	
Scenedesmus obliquus		"	2456	2456	

Tableau XV : Coefficient d'accumulation = CA et facteurs de concentration = FC d'algues appartenant à différents groupes taxonomiques.

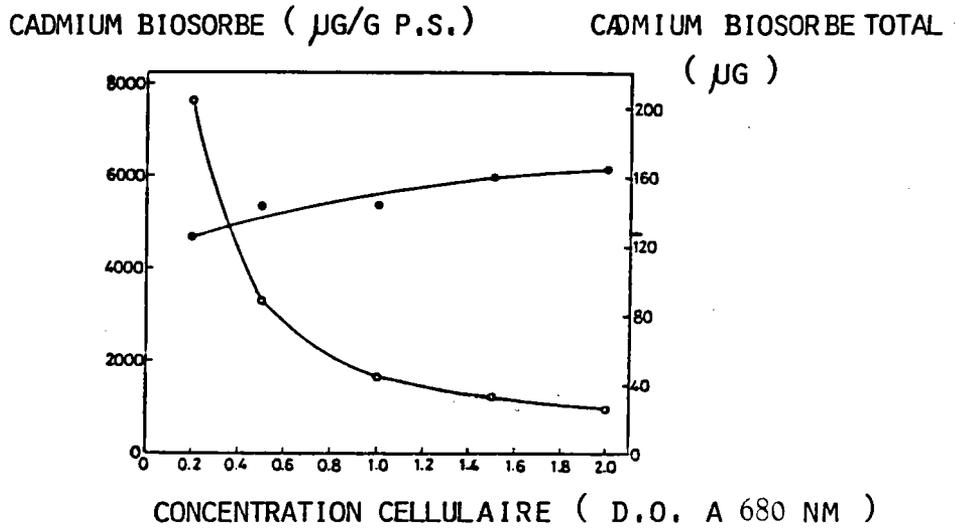


FIG. 7: VARIATIONS DE LA BIOSORPTION DU CADMIUM EN FONCTION DE LA CONCENTRATION ALGALE UTILISEE ( ROND VIDE = Cd BIOSORBE PAR POIDS DE MATIERE SECHE ; ROND PLEIN = Cd BIOSORBE TOTAL ) D'APRES SAKAGUCHI ET AL., 1979.

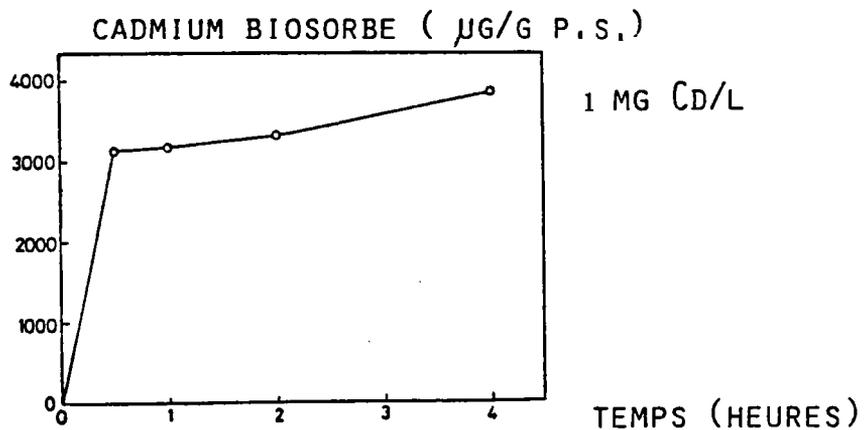


FIG. 8: BIOSORPTION DU CADMIUM EN FONCTION DU TEMPS DE CONTACT D'APRES SAKAGUCHI ET AL., 1979.

#### I.3.3.10 - Influence du cycle cellulaire :

(1) La biosorption du cadmium varie également en fonction des différentes phases de croissance de Phaeodactylum tricornutum (COSSA, 1976) : elle croît d'abord très faiblement (phase de latence) augmente brutalement (phase exponentielle de croissance) passe par un maximum et décroît ensuite lors de la phase stationnaire. L'augmentation observée résulterait d'un accroissement de la compétition cadmium-zinc au cours du cycle cellulaire. Quant à la diminution constatée lors de la phase stationnaire, elle serait due à l'excrétion de matières organiques (acides aminés et protéines) qui désorberait alors le cadmium adsorbé sur la surface cellulaire.

(2) La quantité de cadmium biosorbé par cellule augmente d'un facteur 2 au cours de la phase lumineuse (14h) avec des cultures synchrones d'Ankistrodesmus braunii (GEISWEID et URBACH, 1983), alors que, dans le même temps, le volume et la surface augmentent respectivement d'un facteur 6,8 et 3,4. En conséquence, l'augmentation de la biosorption n'est pas proportionnelle à l'augmentation de volume ou de surface. Les auteurs en concluent que la différence observée est probablement due à une différence d'épaisseur des parois des jeunes cellules par rapport aux plus âgées.

#### I.3.3.11 - Effets du temps de contact :

De nombreux auteurs constatent que le cadmium est biosorbé par les algues de façon très rapide (MAC LEAN et al., 1972 ; KINKADE et ERDMAN, 1975). Il faut 30 minutes pour saturer la plus grande partie des sites de fixation chez Chlorella regularis (Figure 8).

Le phénomène est encore plus rapide chez Chroococcus paris puisque 90 % du métal est biosorbé après 1 minute (LES et WALKER, 1984). Dans certains cas (Figure 8), les données expérimentales sont trop espacées pour fournir avec précision le temps minimal, au bout duquel la biosorption est quasiment constante.

En général, la cinétique est michaelienne et l'on distingue une phase rapide et une seconde phase beaucoup plus lente (GEISWEID et URBACH, 1983). De sorte que pour des temps d'exposition très courts, le phénomène peut sembler linéaire (HART et al., 1979).

Le caractère diphasique de la cinétique de biosorption semble général et a également été observé pour d'autres métaux tels que le zinc, le plomb, le cobalt (MATZKU et BRODA, 1970 ; FINDENEGG et al., 1971 ; DAVIES, 1973 ; SCHULZ-BALDES et LEWIN, 1976 ; BATES et al., 1982). La phase initiale rapide, considérée comme réversible, ne nécessite aucune dépense énergétique, tandis que la seconde phase est plus complexe car le métal peut emprunter différentes formes de transport (DAVIES, 1978). Par conséquent, plus la durée de contamination est courte, plus l'adsorption apparaîtra comme le phénomène essentiel tandis que l'absorption ne se manifestera qu'à plus long terme (GIPPS et COLLIER, 1980).

## I.4 - Adsorption du cadmium par les algues.

### I.4.1. - Bases théoriques de l'adsorption

L'adsorption (ou fixation) peut être spécifique ou non spécifique (NORVELL, 1980). La spécificité se définissant comme la capacité que possèdent certaines surfaces à adsorber certains cations métalliques, même si ces surfaces portent une charge positive nette : il faut alors faire intervenir d'autres forces d'adsorption que la simple attraction électrostatique (KINNIBURGH, 1983).

L'adsorption non spécifique est surtout un phénomène de surface. Elle comprend également les interactions de Van der Waals et peut être résumée sous le terme de physisorption (DANIELS, 1980).

L'adsorption spécifique est un phénomène qui se produit dans toute l'épaisseur de la paroi algale. Son intensité relève des caractéristiques du métal et de la surface. Parmi celles-ci, il faut citer :

- la tendance de métal à former des liaisons ioniques ou covalentes (cf. § 1.2.2.).
- la géométrie des sites d'adsorption et la taille de l'ion,
- le degré d'hydratation du métal et de la surface algale,
- la structure et la composition de la paroi algale.

### 1.4.2. - Les mécanismes d'adsorption

Il existe trois types d'adsorption :

- l'adsorption physique ou physisorption,
- l'échange d'ions,
- l'adsorption chimique (par liaison coordinative).\*

\* Liaison de coordination = variété de liaison de covalence dans laquelle les deux électrons proviennent du même atome (p. 35, FLORKIN et SCHOFFENIELS, 1967).

Chez les algues, la part respective de ces mécanismes dans l'adsorption n'a pas été étudiée, d'autant qu'il est déjà difficile de quantifier le phénomène d'adsorption proprement dit. Cependant les forces de Van der Waals pourraient contribuer à moins de 10 % du cadmium adsorbé (GEISWEID et URBACH, 1983).

De nombreux auteurs pensent que la paroi algale, du fait de sa composition, se comporte surtout comme une résine échangeuse d'ions (DAINTY et HOPE, 1959 ; PERCIVAL et Mc DOWELL, 1967 ; VAN CUTSEM et GILLET, 1981 ; RITCHIE et LARKUM, 1982) et par conséquent affecte la diffusion des ions du milieu extérieur vers la membrane plasmique.

Les groupements susceptibles de porter des charges négatives peuvent provenir des groupements carboxyliques et sulfatés des polysaccharides (CRIST et al., 1981). Ces mêmes auteurs soulignent que les possibilités d'interaction des métaux avec la paroi algale ne sont pas dues seulement à des phénomènes d'échanges d'ions puisque les mêmes groupements carboxyliques, les noyaux imidazoles et les liaisons peptidiques des protéines peuvent former des liaisons de coordination.

#### I.4.3. - Structure et composition des parois algales

Compte tenu de la diversité de structure et de composition des parois algales, nous avons limité cette synthèse bibliographique à l'étude des parois des chlorelles, utilisées dans notre travail expérimental.

Selon SASSEN et al. (1970), les parois des cellules de Chlorella fusca var vacuolata, souche 211/8b (anciennement Chlorella pyrenoidosa), sont formées de deux couches (figure 9) :

- une couche externe (épaisseur 20 nm environ) constituée de matériel sans fibrille (STAEHELIN, 1966), qui contient des lipides et selon les souches de la sporopollenine (ATKINSON et al., 1972). Elle comporte, sur sa face interne, des particules d'un diamètre de 8 à 11 nm qui pourraient être, soit des complexes enzymatiques catalysant la polymérisation des microfibrilles polysaccharidiques, soit des chaînes osidiques enroulées (SASSEN et al., 1970).

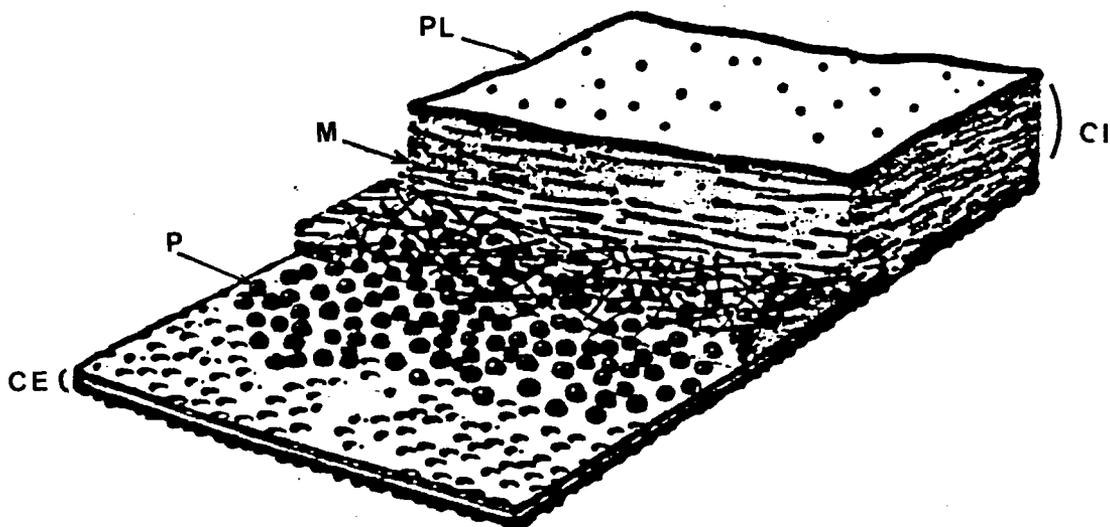


FIG. 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PAROI DES CHLORELLES (D'APRES SÄSSEN ET AL., 1970) - CI= COUCHE INTERNE ; CE= COUCHE EXTERNE ; PL= PLASMALEMME ; M= MICROFIBRILLE P= PARTICULE.

Protéines	Glucosamines	Acides uroniques	Sucres neutres	Résidus non identifiés	Souches algales
3,9	/	4,1	74	18	<u>C. vulgaris</u> K. **
4,5	6,3	18	24	47	<u>C. vulgaris</u> 211/8 I *
3,9	15	24	44	13	<u>C. vulgaris</u> 211/11 f *
1,7	0	14	54	30	<u>C. saccharophila</u> 211/1a *
11	0	6,9	68	14	<u>C. fusca</u> 211/8c *

Tableau XVI : Composition de plusieurs souches de chlorelles d'après BLUMREISINGER et al. (1983). Les résultats correspondent à des pourcentages du poids sec de parois isolées d'après la technique de LOOS et MEINDL (1982) sur des algues récoltées après 2-3 jours de culture.

\*\* souche provenant de N. SAUER (Institut de Botanique de Regensburg)

\* souche provenant de l'algothèque de GÖTTINGEN.

- une couche interne d'épaisseur variable (quelques nm à 100 nm). Elle est constituée d'un réseau de microfibrilles polysaccharidiques en liaison avec les particules précédemment décrites de la couche externe d'une part et avec le plasmalemme\* d'autre part. Les mailles de ce réseau insèrent les constituants de la matrice composée de protéines, d'acides-amino, de lipides et d'hémicelluloses (= polysaccharides extraits en solution aqueuse à pH alcalin).

D'après les études de diffraction aux rayons X, les microfibrilles ne sont pas constituées de cellulose ni du  $\beta$ -1,4 - mannane (LOOS et MEINDL, 1982) détectés respectivement chez Oocystis (ROBINSON et WHITE, 1972) et chez certains représentants des caulerpales et des dasycladales (IRIKI et MIWA 1960 ; FREI et PRESTON, 1961). En fait, la nature de l'hétéropolyoside constitutif permet de distinguer deux types de chlorelles.

Un premier groupe renferme surtout du rhamnose et du galactose, le second contenant principalement du mannose et du glucose (LOOS et MEINDL, 1982 ; BLUMREISINGER et al., 1983). Les proportions respectives des deux types d'unités monomères changent en fonction des conditions de culture (REZANKA et al., 1983) et du cycle cellulaire (LOOS et MEINDL, 1982).

La composition globale des parois de différentes souches de chlorelles est donnée dans le tableau XVI. Les sucres neutres représentent les constituants majeurs de la paroi tandis que la teneur en protéines et en acides uroniques y est moindre. Dans certains cas, il y a présence de glucosamine, détectée également par TAKEDA et HIROKAWA (1978). Ce composé pourrait être présent dans les parois sous forme de chitosane (MIHARA, 1961) plutôt que sous forme de chitine (CONTE et PORE, 1973). La glucosamine n'a, par contre, pas été retrouvée chez Chlorella fusca, souche 211/8b (LOOS et MEINDL, 1982)

\* Plasmalemme = membrane plasmique des algues.

Les acides uroniques sont principalement représentés par de l'acide glucuronique (LOOS et MEINDL, 1982).

Quant aux protéines, la proline et l'hydroxyproline ne sont pas retrouvées dans les acides aminés constitutifs (LOOS et MEINDL, 1982) ; l'hydroxyproline a, par contre, été détectée chez d'autres espèces algales, e.g. Chlamydomonas (HOMER et ROBERTS, 1979).

Les lipides constituent jusqu'à 10 % du poids sec (ATKINSON et al., 1972).

La composition des parois des chlorelles varie en fonction du cycle cellulaire, de façon importante pour les sucres neutres (Tableau XVII).

Composition	Temps de culture avant dosage (heures)	
	16	24
Sucres neutres	76,5	49,7
Acides uroniques	3,4	2,3
Protéines	7,2	11,7
Résidus non identifiés	12,9	36,3

Tableau XVII : Variation de composition de Chlorella fusca 211/8b récoltées à deux temps différents (d'après LOOS et MEINDL, 1982).

#### I.4.4. - Méthodes d'évaluation de l'adsorption du cadmium par les algues.

Il existe plusieurs techniques de quantification de l'adsorption que l'on peut séparer en deux groupes :

- la première approche consiste à diminuer, voire à annuler complètement l'absorption pour quantifier simplement la biosorption totale puisque par définition :

$$\text{Biosorption} = \text{Adsorption} + \text{Absorption}$$

- les autres méthodes évaluent plus spécifiquement l'adsorption en cherchant à quantifier réellement le cadmium adsorbé sur les structures, c'est-à-dire, la paroi.

##### I.4.4.1. - Diminution ou annulation de l'adsorption du cadmium.

Les différentes techniques utilisées dans la littérature sont l'utilisation de cellules mortes ou d'inhibiteurs métaboliques.

Lorsque les algues sont tuées par addition de  $\text{HgCl}_2$  ( 25 mg/l), Asterionella formosa et Fragilaria crotonensis fixent respectivement 10 fois et 3 fois moins de cadmium que les cellules vivantes (CONWAY et WILLIAMS, 1979). Ces mêmes auteurs signalent que lorsque ces deux algues sont tuées par le froid (azote liquide), la différence est beaucoup moins nette.

Des cellules de chlorelles traitées par la chaleur (5 minutes à 100°C dans de l'eau distillée) fixent, par contre, deux fois plus de cadmium que les cellules vivantes (SAKAGUCHI et al., 1979).

L'addition d'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) et de 2,4 dinitrophénol (DNP) ne fait pas varier la biosorption du cadmium chez les chlorelles (SAKAGUCHI et al., 1979). Par contre, chez Porphyra umbilicalis, la cycloheximide diminue le taux de biosorption de cadmium qui cesse pratiquement, 30 heures après l'addition de cet inhibiteur de la synthèse protéique (MAC LEAN et WILLIAMSON, 1977).

L'inconvénient de ces divers traitements est qu'ils semblent donner des résultats différents. De plus, ils ne garantissent pas une annulation totale de la composante "absorption" de la biosorption. En outre, les traitements par le mercure ou la chaleur peuvent modifier la physico-chimie des sites de fixation. Quant à la cycloheximide, elle semble se caractériser par un temps de réponse trop long. Les inhibiteurs métaboliques peuvent complexer tout, ou partie, du cadmium ajouté dans le milieu d'essai, c'est en particulier le cas du DNP (BAUDA et al., 1986). De plus, de par son mode d'action, le DNP perméabilise les membranes aux ions (RIEMERSMA, 1968 ; LEE, 1979).

#### I.4.4.2. - Quantification de cadmium adsorbé sur la paroi.

Plusieurs méthodes ont été utilisées dans la littérature : isolement de la paroi avant ou après intoxication, désorption du cadmium adsorbé.

(1) L'utilisation de parois isolées préalablement à l'incubation, soulève quelques critiques dans la mesure où les deux côtés de la paroi algale ne sont pas quantitativement, ni qualitativement identiques (SASSEN et al., 1970). De plus, les phénomènes de diffusion peuvent être différents dans la mesure où les compartiments successifs, membrane plasmique puis cytoplasme ne sont plus présents.

(2) Après intoxication de Ankistrodesmus braunii, la fraction 27.000 g (paroi + membrane) contient entre 29 et 34 % du cadmium biosorbé total (LAUBE et al., 1980). Toutefois, l'inconvénient de ce type de manipulation est la difficulté à isoler une fraction vraiment pure tout en restant quantitatif, c'est-à-dire tout en évitant les pertes. Il faut également prendre garde aux possibilités de désorption, voire de migration, du cadmium au cours de la rupture des cellules.

(3) Une dernière approche consiste à quantifier le cadmium adsorbé en le désorbant. Des complexants, tels que la cystéine \* ou l'EDTA \*\*, caractérisés par des constantes de stabilité très élevées ont été utilisés.

Des cellules de Phaeodactylum tricornutum préalablement incubées avec du cadmium et mises en contact avec de la cystéine pendant 1 heure relarguent dans le milieu 96,5 à 98,3 % du cadmium initialement lié (COSSA, 1976). Cet auteur en conclut que "le cadmium non désorbé par la cystéine, correspond probablement à la quantité retenue par absorption à l'intérieur de la cellule".

L'EDTA désorbe plus de 71 % (au premier lavage) et environ 88 % (après 3 lavages) du cadmium préalablement adsorbé (SAKAGUCHI et al., 1979). Ces auteurs en déduisent que l'ion cadmium interagit avec des ligands de la surface cellulaire qui sont aisément substituables par l'EDTA. Ces ligands seraient en majorité des groupements acides (GEISWEID et URBACH, 1983).

Il faut encore signaler que l'EDTA a été utilisé pour quantifier la fraction adsorbée d'autres métaux que le cadmium : le fer (DAVIES, 1970), le plomb (SCHULZ-BALDES et LEWIN, 1976) et le zinc (BATES et al., 1982).

#### I.5. - Absorption du cadmium par les algues

##### I.5.1. - Bases théoriques de l'absorption

Le terme de transport représente le passage d'une substance d'une phase aqueuse à une autre à travers une phase hydrophobe, tandis que le terme d'absorption fournit une information supplémentaire quant à l'orientation du processus de transport puisqu'il indique une pénétration dans un système, par exemple une cellule algale. Quant à l'accumulation, elle traduit une plus forte concentration de métal dans la cellule que dans le milieu extérieur.

Plusieurs mécanismes participent au phénomène d'absorption (JAIN et WAGNER, 1980 ; LUOMA, 1983).

$$* \log K = 9,9 \text{ pour } K = \frac{[ML_2]}{[M] \cdot [L]^2} \text{ (SILLEN et MARTELL, 1971)}$$

$$** \log K = 16,5 \text{ pour } K = \frac{[ML]}{[M] \cdot [L]} \text{ (MARTELL et SMITH, 1974)}$$

I.5.1.1. - La diffusion simple (= diffusion passive).

Un métal en solution dans deux phases aqueuses, séparées par une phase lipidique, aux concentrations respectives  $C_1$  et  $C_2$  telles que  $C_1$  supérieur à  $C_2$ , peut diffuser à travers une phase apolaire, à condition que le métal (ou certaines de ses formes) soit soluble dans les lipides, c'est-à-dire apolaire ou de faible polarité. Cette diffusion obéit à la première loi de FICK qui indique que le flux d'un soluté (F) est proportionnel à la différence de concentration de part et d'autre de la membrane ( $\Delta C = C_1 - C_2$ ) :

$$F = \frac{\Delta nM}{\Delta t} \cdot \frac{1}{S} = P \cdot \Delta C$$

avec  $\frac{\Delta nM}{\Delta t}$  = nombre de molécules de M qui traversent par unité de temps ( $\Delta t$ ) la surface de la membrane.

S = surface de la membrane.

$\Delta C$  = gradient de concentration de M sur l'épaisseur de la membrane

P = coefficient de perméabilité à travers la membrane (cm/s.)

La quantité diffusée dans ce cas n'implique aucune dépense d'énergie et il en résulte un transfert du composé dans la direction de son gradient de concentration, avec obtention d'un équilibre de concentration.

Les espèces métalliques polaires peuvent également traverser les membranes non polaires grâce aux pores aqueux (CRANE, 1979), mais ceux-ci n'ont pas été observés chez les algues.

I.5.1.2. - La diffusion facilitée (= transport passif).

Certains métaux (= substrats) peuvent traverser une membrane grâce à des protéines intrinsèques ou extrinsèques de la membrane plasmique qui assurent leurs transports. Ces transporteurs sont en nombre fini et réagissent avec leur ligands de manière réversible. Les caractéristiques de la diffusion facilitée sont les suivantes :

- elle nécessite un gradient de concentration, aucune autre source d'énergie libre n'est nécessaire.
- pour les concentrations élevées de substrat, la vitesse de pénétration atteint un plateau (= V max.)
- pour les concentrations faibles de substrat, la vitesse de pénétration est plus élevée que celle attendue pour une diffusion simple.
- le transporteur présente une spécificité élevée vis-à-vis du substrat.
- ce transport peut être inhibé de façon compétitive, incompétitive ou non compétitive. Dans tous les cas, la vitesse de pénétration du substrat est réduite.

I.5.1.3. - Transport actif.

De part et d'autre des membranes biologiques, existent des différences de concentration. Le cas du potassium en est une des illustrations classiques : la concentration intracellulaire étant plus de 16 fois supérieure à celle du milieu extracellulaire chez la chlorelle (BARBER, 1968).

Le potassium est connu pour faire l'objet d'un transport actif, donc contre un gradient de concentration. Un tel transport nécessite un apport énergétique fourni par l'hydrolyse de l'ATP, ceci explique le nom d'ATPases donné aux complexes enzymatiques, qui assurent spécifiquement le transport du potassium et qui sont susceptibles d'être saturés ou inhibés.

#### I.5.1.4. - Les ATPases

(1) Dans le règne animal, SCHUURMANN-STEKHOVEN et BONTING (1981) ont distingué 4 grandes classes d'ATPases, localisées dans les membranes et ayant une fonction de transport.

- L'ATPase  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  activée (ou stimulée) se retrouve dans toutes les membranes plasmiques. Ceci est si vrai que cette enzyme constitue un marqueur enzymatique de cette structure. La propriété caractéristique des ATPases animales  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  stimulée est leur inhibition spécifique par l'ouabaine.
- L'ATPase  $\text{Ca}^{++} - \text{Mg}^{++}$  activée (ou stimulée) est localisée dans le reticulum sarcoplasmique et le sarcolemme des cellules musculaires, ainsi que dans la membrane plasmique du globule rouge. Elle a également été signalée dans les plaquettes sanguines, les cellules placentaires et nerveuses ainsi que celles provenant du tubule rénal et des glandes salivaires.
- L'ATPase anion - "sensible", dont la fonction de transport n'est pas certaine, est présente dans les mitochondries de nombreux tissus (foie, rein, coeur, pancréas, muqueuse gastrique, glande salivaire, érythrocytes). Elle a également été mise en évidence dans certaines fractions microsomiales et plasmiques.
- Dans la muqueuse gastrique, une ATPase ( $\text{H}^+ - \text{K}^+$ ) a été individualisée. Elle permet, en présence d'ATP et de magnésium de sécréter des protons en échange d'ions  $\text{K}^+$ .

Toutes ces ATPases présentent la propriété de catalyser l'hydrolyse de l'ATP en ADP et en phosphore inorganique. L'énergie libre dégagée par cette réaction permet le transport des ions contre un gradient électrochimique à travers la membrane où sont localisées ces enzymes.

(2) Dans le règne végétal, la translocation de protons vers l'extérieur constitue le phénomène de transport principal et cela aux dépens de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP (POOLE, 1978). Cet efflux de protons est généralement contre-balancé par un flux entrant de potassium qui peut se faire de façon couplée (fig. 10a) ou non couplée (fig. 10b) à la sortie des protons.

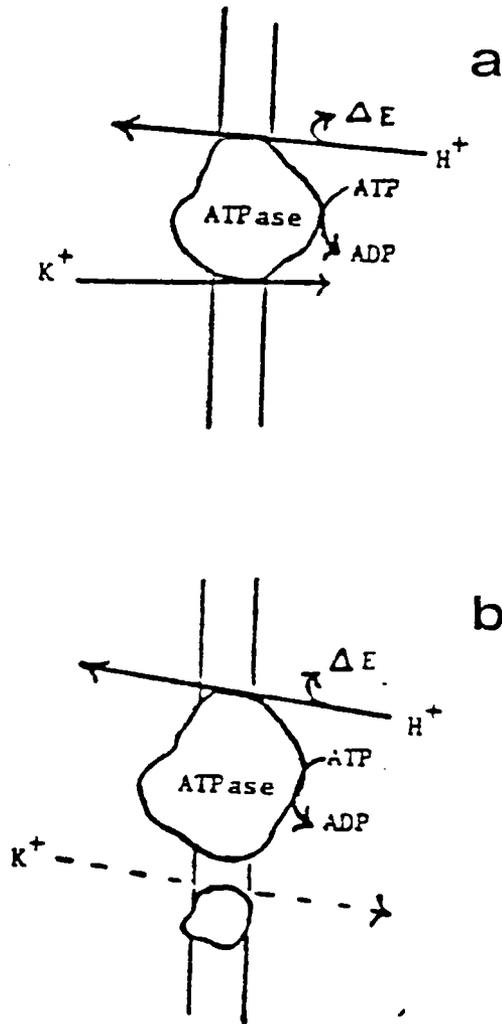


FIG. 10: MECANISMES DE FONCTIONNEMENT DE L'ATPase VEGETALE  
(**a**): EFFLUX DE  $H^+$  COUPLE DIRECTEMENT A L'ENTREE DE  $K^+$   
(**b**): EFFLUX DE  $H^+$  PROVOQUANT UNE ENTREE "ELECTROPHORETIC" DE  $K^+$

D'APRES GLASS ET SIDDIQI (1981).

C'est donc une ATPase  $H^+ - K^+$  activée que nombre d'auteurs ont appelé, par souci de simplification, une ATPase  $K^+$  activée, puisque l'activité mesurée est, en fait, une augmentation de l'activité ATPasique due à l'addition de potassium dans le milieu.

Les principales caractéristiques de cette enzyme ont été récemment rassemblées (LEONARD, 1984). Elles sont fournies dans le tableau XVIII, où l'on observe que le véritable substrat de l'enzyme n'est pas l'ATP mais le complexe ATP-Mg, ce qui explique que la réaction nécessite du magnésium et que l'ATPase  $K^+$  stimulée est quelquefois appelée, dans la littérature, ATPase  $Mg^{++}$  dépendante -  $K^+$  stimulée.

Le pH optimal se situe entre 6 et 6,5 (en présence de potassium 50 mM) et la température optimale entre 38 et 40°C. Il n'existe aucun inhibiteur spécifique connu (au contraire de l'ouabaine pour l'ATPase  $Na^+ K^+$  activée). Toutefois, cette enzyme est sensible à toute une série de composés qui agissent également, à des degrés variables, sur les ATPases d'origine animale.

Cette ATPase  $K^+$  stimulée a été observée dans le plasmalemme de nombreuses espèces végétales et sur différents tissus végétaux. Cette enzyme est très répandue chez les végétaux, du moins chez les plantes glycophytes, car les plantes halophytes possèdent généralement une ATPase  $Na^+ - K^+$  activée (LAUCHLI, 1976). Par ailleurs il existe, également, des ATPases plasmalemmiques  $Ca^{++} - Mg^{++}$  activées (KUIPER, 1982) ou anions stimulées (HENDRIX et PIERCE, 1980).

Il existe également chez les végétaux, des ATPases qui sont magnésium dépendantes mais non stimulées par le potassium. par exemple dans le tonoplaste (DUPONT et al., 1982) ainsi que dans le chloroplaste (SHAHAK, 1982).

### (3) Les ATPases algales.

Si les ATPases animales et végétales ont été fort étudiées, les ATPases algales l'ont été, par contre, beaucoup moins. Quelques articles, relativement anciens, traitent des flux passifs ou actifs du potassium et du sodium chez plusieurs algues marines ou dulçaquicoles, dont la chlorelle (BARBER, 1968 ; BARBER et SHIEH, 1972).

Propriétés	Commentaires
Substrat	ATP complexé avec le magnésium (Km compris entre 0,1 et 1 mM de ATP-Mg ; Km légèrement diminué en présence de K <sup>+</sup> )
Cations nécessaires	1) Mg <sup>++</sup> car intervient comme co-substrat avec l'ATP 2) Augmentation de la V max. dans l'ordre suivant K <sup>+</sup> = NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> > Rb <sup>+</sup> ≫ Na <sup>+</sup> > Cs <sup>+</sup> > Li <sup>+</sup>
pH optimal	de 7 à 7,5 sans K <sup>+</sup> de 6 à 6,5 en présence de 50 mM de K <sup>+</sup>
Température optimale	38 à 40°C (réduction importante de la stimulation par le K <sup>+</sup> en dessous de 30°C).
Inhibiteurs	Pas d'inhibiteur spécifique connu - sensible au D.E.S., DCCD, Vanadate, agents thioloprives et au Ca <sup>++</sup> insensible à l'oubaïne, oligomycine, azoture et molybdate.
Structure	Complexe lipoprotéique transmembranaire de P.M. supérieur à 500.000 daltons comprenant au moins 1 sous-unité catalytique (probablement 2) de P.M. égal à 100.000 daltons et plusieurs sous-unités régulatrices.
Mécanisme	La (les) sous-unité(s) catalytique(s) sont phosphorylés par l'ATP et leur dephosphorylation est stimulée par le potassium. La phosphorylation induit des changements conformationnels probablement médiés par un échange électrogénique H <sup>+</sup> - K <sup>+</sup>

Tableau XVIII : Résumé des caractéristiques de l'ATPase (H<sup>+</sup> - K<sup>+</sup>) de la fraction plasmalemmique provenant de racines de cellules végétales ( d'après LEONARD, 1984).

Des activités ATPasiques ont été observées sur une fraction plasmalemmique, chez Dunaliella tertiolecta (JOKELA, 1969) et chez Boergesenia forbesii (MIZUTA et SUDA, 1978). L'ATPase de Dunaliella tertiolecta, isolée par JOKELA (1969) possède curieusement deux maximums d'activités (pH 6 et  $\text{pH} \geq 7,5$ ) ; elle est dépendante du magnésium ; elle est plus stimulée par la présence de potassium (25 mM) que de sodium (25 mM) et n'est pas inhibée par l'ouabaine à pH 7,5.

L'ATPase de Boergesenia forbesii possède un maximum d'activité à pH 8,6, elle est dépendante du magnésium (3 mM) et est activée par le mélange : sodium (30 mM) et potassium (10 mM). Elle est inhibée par quelques sels métalliques dont le cadmium (voir § I.6.4.), mais l'ajout d'ouabaine ne diminue pas son activité.

#### (4) - Dosage de l'ATPase $\text{K}^+$ stimulée.

L'activité ATPasique  $\text{K}^+$  stimulée peut être évaluée soit en dosant directement un des produits de la réaction, à savoir le phosphore inorganique ( $\text{P}_i$ ) formé, soit en couplant l'ADP produit au cours de l'hydrolyse aux réactions catalysées successivement par la pyruvate kinase et la lactate deshydrogénase. Ce type de dosage a d'ailleurs été automatisé par FERARD et al., (1975).

#### I.5.2. - Méthodes de mesure de l'absorption du cadmium.

D'une façon générale, l'absorption des métaux peut être passive sans une quelconque intervention d'un transporteur (BRYAN, 1979) ou se faire par diffusion facilitée (LUOMA, 1983). En ce qui concerne plus précisément l'absorption du cadmium par les chlorelles, la diffusion et le transport actif interviendraient (MANG et TROMBALLA, 1978).

La quantité de cadmium absorbé peut être évaluée par quelques techniques déjà utilisées pour quantifier l'adsorption du cadmium. La rupture des cellules suivi d'une centrifugation différentielle permet d'observer que 69 % du cadmium biosorbé se trouve dans la fraction correspondant au cytoplasme de Ankistrodesmus braunii, (LAUBE et al., 1980), c'est-à-dire qu'une majorité a été absorbée. Par désorption, la quantité de cadmium absorbé représente 2,5 % du cadmium biosorbé chez Phaedactylum tricormutum (COSSA, 1976). Ce dernier chiffre paraît plus en accord avec les données fournies par les cinétiques de fixation du cadmium (cf. § I.3.3.11).

### I.5.3. - Accumulation intracellulaire du cadmium

A notre connaissance, aucun auteur ne présente une étude de l'ensemble de la distribution du cadmium au niveau intracellulaire. Seuls quelques travaux mettent en évidence une accumulation du cadmium au niveau d'un organite particulier. Ainsi, des granules denses intramitochondriaux caractérisés par une forte teneur en cadmium, ont été observés chez plusieurs algues d'eaux douces (SILVERBERG, 1976). Une étude autoradiographique de Porphyra umbilicalis suggère une accumulation du cadmium au niveau du noyau (MAC LEAN et WILLIAMSON, 1977). Chez la chlorelle, 10 à 15 % du cadmium absorbé est retrouvé au niveau des mitochondries et des microsomes, tandis que plus de 50 % est retrouvé dans le surnageant après centrifugation à 105.000 g (NAGANO et al., 1977). Dans cette fraction dite "cytoplasmique", le cadmium se retrouve combiné à une protéine cytosoluble de faible poids moléculaire. Cette métallothionéine a été isolée par HART et BERTRAM (1980) et par NAGANO et al. (1982a) sur deux souches différentes de chlorelles.

Cette protéine (PM 8500) serait similaire aux métallothionéines trouvées chez les mammifères sinon qu'elle se caractérise par un comportement anionique plus prononcé par chromatographie d'échange d'ions (NAGANO et al. 1982b). Chez Euglena gracilis, une telle métallothionéine a également été observée (GINGRICH et al., 1984). La synthèse de cette molécule serait à l'origine des mécanismes de résistance observés chez la chlorelle (HART et BERTRAM, 1980) et chez Euglena gracilis (BONALY et al., 1978).

## I.6. - Effets toxiques du cadmium

### I.6.1. - Rôle biologique du cadmium :

La plupart des auteurs s'accordent à penser que le cadmium n'est ni nécessaire, ni utile aux processus physiologiques et biochimiques et qu'il est extrêmement toxique pour les organismes vivants.

Toutefois sur les algues, un effet bénéfique du cadmium a été observé par quelques auteurs. 100 µg Cd/l augmente la croissance de Chlorella ellipsoidea (NAGANO et al., 1976). Aux faibles concentrations, le cadmium augmente le taux de division (BERLAND et al., 1977). A 660 µg/l, le cadmium augmente légèrement la numération cellulaire, le taux de chlorophylle et le poids sec (LUE-KIM et al., 1980).

### I.6.2. - Effets toxiques du cadmium sur les algues :

L'ensemble des études réalisées sur ce sujet se caractérise par la diversité des conditions de culture (lumière, température, nature du milieu...) des espèces algales utilisées et des critères biologiques retenus pour évaluer la toxicité. Il en résulte que les données de toxicité de la littérature ne sont pas toutes comparables entre elles.

#### I.6.2.1. - Effets sur la composition phytoplanctonique.

Dans une série d'expérimentations où le devenir et l'effet du cadmium ont été étudiés dans un environnement marin semi-naturel (CEPEX), aucune différence dans la composition phytoplanctonique (où Chaetoceros sp. était prédominant) ou dans la biomasse n'a été observée à la concentration de 1,3 µg Cd/l par rapport à celle du témoin où la concentration était 20 fois inférieure (KREMLING et al., 1978).

#### I.6.2.2. - Effets sur la croissance algale.

Différents critères peuvent être utilisés pour mesurer la croissance (BERLAND et al., 1977 ; JOUANY, 1982).

Afin de donner un ordre de grandeur, les seuils de sensibilité \* vis-à-vis du cadmium des algues marines varient de moins de 1 µg/l pour Dunaliella bioculata (PENEDA-SARAIVA, 1975) à 660 µg/l pour Cricosphaera (Hymenomonas) carterae (STILLWELL et CORUM, 1982). Pour les algues d'eaux douces, ce seuil est plus élevé : de 20 µg/l pour Asterionella formosa (CONWAY et WILLIAMS, 1979) à 20 mg/l pour Chlorella regularis (SAKAGUCHI et al., 1979). 18 algues marines, testées dans les mêmes conditions, se caractérisent par des seuils de toxicité \* compris entre 25 et 50 µg/l tandis que les seuils algicides \*\* varient de 50 à 1000 µg/l (BERLAND et al., 1976).

En milieu dulçaquicole, la  $CI_{50}$  \*\*\* du cadmium mesurée après 4 jours, est de 105 µg/l pour Chlorella saccharophila, 476 µg/l pour Nitzschia closterium, alors qu'elle est de 3088 µg/l pour Navicula incerta (RACHLIN et al., 1982 a).

Il est difficile de comparer les résultats obtenus d'un auteur à l'autre dans la mesure où la toxicité est très influencée par les paramètres physico-chimiques du milieu. Ainsi, la toxicité du cadmium diminue lorsque le pH, la dureté et le calcium augmentent, ou en présence de métaux et de complexants (Tableau XIX). Concernant plus spécialement le zinc, il y a une interaction négative entre le zinc et le cadmium lorsque Coelastrum proboscideum est soumis à une photopériode tandis qu'en illumination continue, l'interaction est positive (MULLER et PAYER, 1980).

L'action du cadmium sur la croissance se manifeste, en fait, de différentes façons : augmentation de la phase de latence (WONG et al., 1979 ; BRAUWERS, 1982), diminution du taux de croissance et de la biomasse atteinte (BONALY et al., 1978 ; FENNIKOH et al., 1978 ; STRATTON et CORKE, 1979).

\* Seuil de sensibilité (= seuil de toxicité) : concentration testée la plus basse pour laquelle on peut détecter un effet.

\*\* Seuil algicide = concentration testée pour laquelle il y a début de mortalité.

\*\*\*  $CI_{50}$  : Concentration inhibitrice de 50 % de la croissance.

Facteurs	Algues utilisées	Augmentation des Facteurs provoque :		Références
		augmentation de la toxicité	diminution de la toxicité	
pH	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> <i>Coelastrum proboscideum</i> <i>Nostoc calcicola</i>		x x x	HART et SCAIFE (1977) MÜLLER et PAYER (1979) SINGH et PANDEY (1981)
Dureté totale	<i>Clamydomonas sp.</i> <i>Euglena sp.</i>		x	FENNIKOH <u>et al.</u> (1978)
Calcium	<i>Hormidium vulgare</i> <i>Coelastrum proboscideum</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i>		x x x (modéré)	SAY et WHITTON (1977) HORNUNG <u>et al.</u> (1981) GIPPS et COLLER (1982)
Fer (3+)	<i>Chlorella sp.</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i>		x x	PAKALNE <u>et al.</u> (1970) ; UPITIS <u>et al.</u> (1973) GIPPS et COLLER (1982)
Manganese	<i>Chlorella</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	x	x	PAKALNE <u>et al.</u> (1970) ; UPITIS <u>et al.</u> (1973) GIPPS et COLLER (1982)
Nickel	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>		x	DEVI-PRASAD et DEVI-PRASAD (1982)
Plomb	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>		x	DEVI-PRASAD et DEVI-PRASAD (1982)
Selenium	<i>Chlorella vulgaris</i>		x	HUTCHINSON et STOKES (1975)
Zinc	<i>Chlorella sp.</i> <i>Euglena gracilis</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i> <i>Chlorella, Euglena gracilis</i>	x	x x x	PAKALNE <u>et al.</u> (1970) ; UPITIS <u>et al.</u> (1973) NAKANO <u>et al.</u> (1978) GIPPS et COLLER (1982) GINGRICH <u>et al.</u> (1984)
Nitrates	<i>Thalassiosira fluviatilis</i>		x	LI (1978)
Chlorures	<i>Coelastrum proboscideum</i>		x	HORNUNG <u>et al.</u> (1981)
Glutamine	<i>Nostoc calcicola</i>		x	SINGH et PANDEY (1981)
Cystéine	<i>Nostoc calcicola</i>		x	SINGH et PANDEY (1981)
Carraghénanes	<i>Eucheuma striatum</i> <i>Eucheuma spinosum</i>		x x	VEROY <u>et al.</u> (1980)
EDTA	<i>Chlorella sp.</i> <i>Nostoc calcicola</i>		x x	PAKALNE <u>et al.</u> (1970) ; UPITIS <u>et al.</u> (1973) SINGH et PANDEY (1981)
Ac. humiques	<i>Selenastrum capricornutum</i>		x	SEDLACEK <u>et al.</u> (1983)
Densité cellulaire	<i>Chlorella sp.</i>		x	PAKALNE <u>et al.</u> (1970) ; UPITIS <u>et al.</u> (1973)

Tableau XIX : Effets de quelques facteurs physiques et chimiques sur la toxicité du cadmium vis-à-vis des algues.

Le cadmium inhibe l'autosporulation des chlorelles (ROSKO et RACHLIN, 1977). Cette inhibition serait due chez Chlamydomonas reinhardii et Chlorella fusca à la diminution de l'activité des autolysines responsables de l'hydrolyse des parois (IRMER, 1984).

L'effet du cadmium sur la division cellulaire est démontré par l'apparition de cellules multinucléées, par exemple chez les euglènes (FALCHUK et al., 1975). Ce fait pourrait s'expliquer par l'interaction du cadmium avec les groupes thiols des protéines de fuseau cellulaire, observée par FOWLER et al. (1982) sur des cellules de testicules du rat. Par ailleurs, le cadmium réagit avec les bases des acides nucléiques (EICHORN et SHIN, 1968 ; IZATT et al., 1971). Par suite, les liaisons hydrogènes sont rompues ou ne peuvent se former, ce qui explique la diminution de stabilité du DNA (SISSOEFF et al. 1976) et les changements conformationnels de certains t-RNA (HIATT et JACOBSON, 1980).

#### I.6.2.3. - Effets sur la photosynthèse.

Le cadmium provoque une inhibition de la photosynthèse. Chez Chlorella pyrenoidosa, il diminue la fixation de CO<sub>2</sub> et la production d'O<sub>2</sub> (HART et SCAIFE, 1977). La fixation de CO<sub>2</sub> est également inhibée chez Anabaena inaequalis (STRATTON et CORKE, 1979), de même que la production d'O<sub>2</sub> chez Chlamydomonas reinhardii (OVERNELL, 1975). Par ailleurs, BURNISON et al. (1975) ont montré que 20 µg Cd/l permettait de diminuer la production primaire de Scenedesmus quadricauda de 70 %, tandis qu'il faut 100 µg/l pour avoir le même effet pour Chlorella pyrenoidosa et qu'il faut ajouter jusqu'à 1000 µg/l dans le cas d'Ankistrodesmus falcatus et de Chlorella vulgaris.

Chez les végétaux supérieurs, in vivo, le cadmium provoque une fermeture des stomates (BAZZAZ et al., 1974 ; LAMOREAUX et CHANEY, 1978). Des travaux récents montrent que l'inhibition du cadmium sur les chloroplastes isolés intacts ou sur des fractions thylakoïdiennes n'est pas principalement due à une action au niveau des réactions photosynthétiques se déroulant dans la membrane thylakoïdienne, ni à un découplage de la photophosphorylation, mais qu'elle se situe au niveau du cycle de CALVIN (WEIGEL, 1985a).

En fait, il semble que in vitro, sur des chloroplastes isolés de plantes supérieures, le cadmium inhibe la fixation de CO<sub>2</sub> en agissant sur différentes réactions associées à la régénération du ribulose 1,5 diphosphate dans le cycle de CALVIN et en particulier sur la ribulose - 5 - phosphate kinase (WEIGEL, 1985 b).

Le cadmium diminue également l'activité de l'anhydrase carbonique (ASENCIO et CEDENO-MALDONADO, 1979), ce qui pourrait être dû à la substitution du zinc par le cadmium (COLEMAN, 1967) déjà notée pour des enzymes extraits d'autres organismes que les algues comme par exemple l'alcool deshydrogenase (EKLUND et al., 1976) ou la carboxypeptidase A (VALLEE et ULMER, 1972).

La diminution de production de NADPH (évoquée par DE FILIPPIS et al., 1981a) et d'ATP synthétique ne sont pas en cause dans la diminution de la fixation de CO<sub>2</sub> observée en présence de cadmium (WEIGEL, 1985b).

Chez les algues les taux d'ATP diminuent sous l'action de cadmium chez Euglena gracilis, alors que ceux d'ADP augmentent (DE FILIPPIS et al., 1981b).

Le contenu pigmentaire (Chlorophylle a et carotène) est diminué chez Asterionella formosa (CONWAY, 1978). Le contenu en chlorophylle a et b de Chlorella pyrenoidosa devient significativement plus faible à partir de 1mg/l de cadmium ajouté, et cela après 24 heures de contact ; après ce délai, le taux de synthèse chlorophyllienne n'est pas significativement diminué (BRAUWERS, 1982). En outre, le cadmium augmente significativement la surface des thylakoïdes (RACHLIN et al., 1982 b), bien que SILVERBERG (1976) ne note aucune modification morphologique.

#### I.6.2.4. - Utilisation des nutriments.

En présence de 0,4 µg Cd/l, il y a augmentation de pénétration de phosphore inorganique (= Pi), ce qui pourrait indiquer une perte de régulation de la perméase responsable du transport du Pi chez Fragilaria crotonensis (CONWAY et WILLIAMS, 1979). Le phosphore qui entre dans la cellule, se dépose sous forme de grain de polyphosphates que l'on retrouve dans les vacuoles.

Le cadmium augmente le volume de ces grains chez Plectonema boryanum (RACHLIN et al., 1982 b). Le phosphore peut également se combiner avec le cadmium qui, lui aussi, pénètre dans la cellule pour donner un phosphate de cadmium insoluble (HAMPP et al., 1976).

Par contre, l'assimilation des phosphates, de l'ammonium et des nitrates est inhibée chez Selenastrum capricornutum : entre pH 5 et pH 8 les  $CI_{50}$  relatives à ces diverses assimilations sont, de plus en plus faibles et c'est l'assimilation des nitrates (à pH 8) qui est la plus touchée (PETERSON et HEALEY, 1985).

#### I.6.2.5. - Effets morphologiques et physiologiques divers

Le mouvement des cellules d'Euglena gracilis est particulièrement affecté (DE FILIPPIS et al., 1981c). De même, la calcification est inhibée chez Cricosphaera (Hymenomonas) carterae (STILLWELL et CORUM, 1982).

Des effets extrêmement variés peuvent être notés : chez Anabaena inaequalis il y a élongation des filaments, augmentation de la fréquence des hétérocystes, lyse et perte de matériel cellulaire (STRATTON et CORKE, 1979). A cet égard, 0,1 mM de  $CdCl_2$  (soit 11,2 mg Cd/l) provoque une perte de potassium de l'ordre de 20 % pour la chlorelle, que ce soit à l'obscurité ou à la lumière (DE FILIPPIS, 1979). Le métabolisme des nitrates est perturbé chez Thalassiosira fluviatilis (LI, 1978). Pour mémoire, citons les dérèglements du métabolisme des acides aminés soufrés observés chez les mammifères (VALLEE et ULMER, 1972).

Morphologiquement, SILVERGERG (1976) trouve une modification de la structure mitochondriale, corrélée avec la présence de cadmium dans les mitochondries. Le cadmium provoque la coalescence des lipides cellulaires chez Plectonema boryanum (RACHLIN et al., 1982 b).

SOYER et PREVOT (1981) trouvent chez Prorocentrum micans trois altérations ultrastructurales : augmentation de la vacuolisation, augmentation du nombre des lysosomes et, là aussi, de graves modifications mitochondriales.

La vacuolisation du cytoplasme a, également, été observée chez plusieurs algues vertes en même temps que des changements importants de la structure de la membrane cellulaire (BURNISON et al., 1975). Il faut rapprocher ce fait d'autres constatations observées sur d'autres organismes que les algues où la substitution du calcium par le cadmium destabiliserait la membrane et conduirait à sa rupture (NORRIS et KELLY, 1977 ; STACEY et KLAASSEN, 1981). Le calcium et le cadmium se caractérisent par des diamètres ioniques (non hydratés) très proches.

#### I.6.2.6. - Spéciation du cadmium et effets toxiques.

La toxicité est essentiellement due à l'espèce ionique libre. Ceci a été démontré, dans le cas du cuivre, où la toxicité de ce métal sur plusieurs espèces d'algues est directement reliée à l'activité \* de l'ion libre  $\text{Cu}^{++}$  plutôt qu'à la concentration totale de cuivre (SUNDA et GUILLARD, 1976 ; ANDERSON et MOREL, 1978 ; SRNA et al., 1980). L'augmentation des acides humiques diminue la toxicité du cadmium vis-à-vis du phytoplancton (GJESSING, 1980 ; SEDLACEK et al., 1983). Dans une eau d'un lac très riche en acide humique, la  $\text{CI}_{50}$  relative à la fixation du carbone, pour Selenastrum capricornutum, varie de 81 à 169  $\mu\text{g}/\text{l}$  de cadmium total. Par contre, en terme de cadmium libre, la  $\text{CI}_{50}$  est comprise entre 34 et 45  $\mu\text{g}/\text{l}$  de  $\text{Cd}^{++}$  (LAEGREID et al., 1983).

Le pH influe également sur la toxicité du métal, soit directement car les espèces chimiques dissoutes vont varier qualitativement et quantitativement en fonction du pH (figure 11), soit indirectement par compétition des ions  $\text{H}^+$  avec les métaux au niveau des sites de liaison (PETERSON et al., 1984). Ces deux effets sont en principe antagonistes, puisque si la concentration d'ions libres augmente avec la diminution du pH, la compétition avec les protons augmente également (PETERSON et HEALEY, 1985). Pratiquement, l'augmentation du pH diminue généralement la toxicité. (cf. Tableau XIX).

\* L'activité d'un ion (A) est égale au produit du coefficient d'activité ( $\gamma$ ) par la concentration (C).

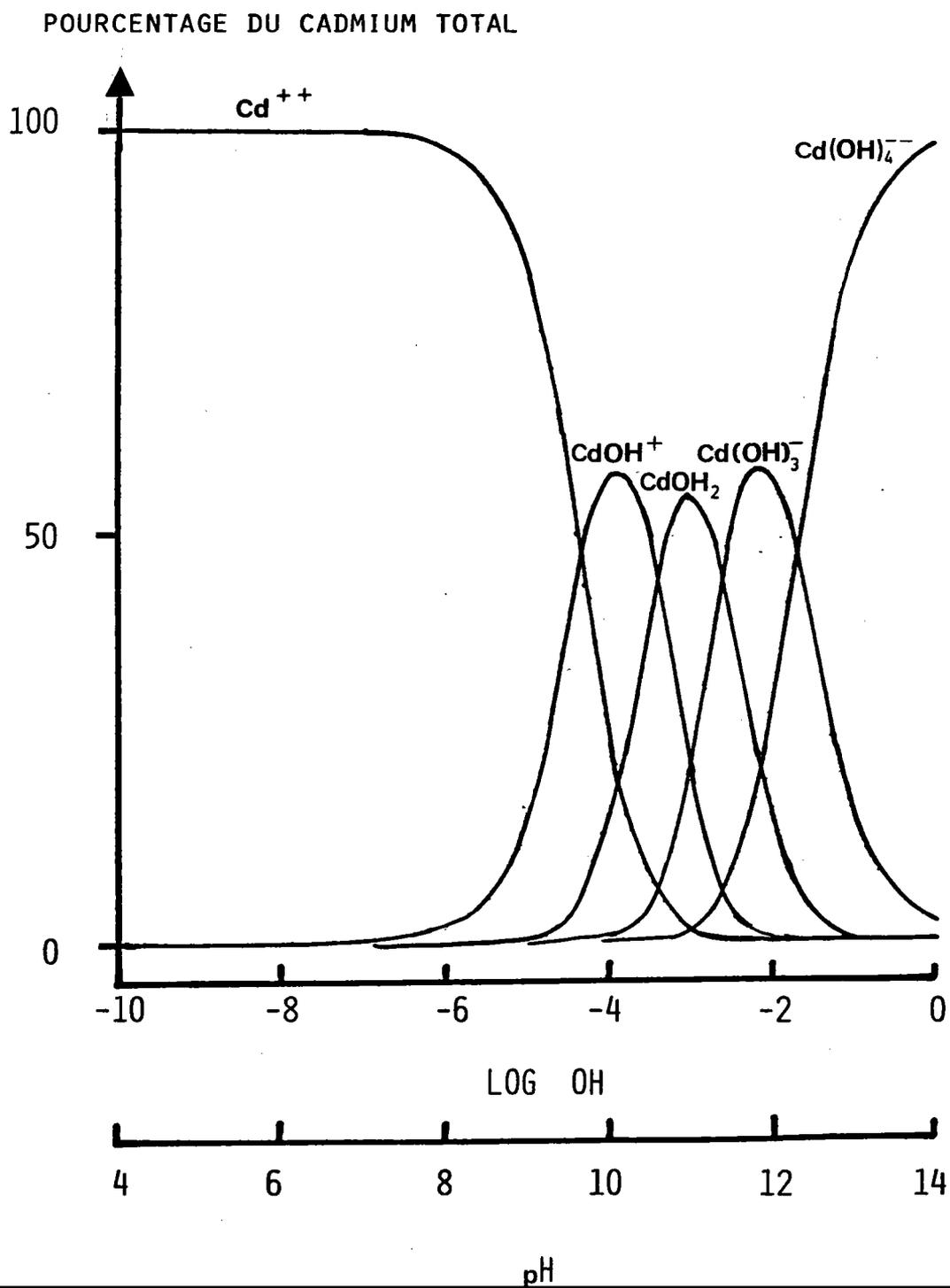


FIG. 11: SPECIATION DU CADMIUM EN FONCTION DU pH (D'APRES HAHNE ET KROONTJE, 1973).

### I.6.3. - Effets toxiques du cadmium sur les ATPases

Remarquons, tout d'abord, que les travaux consacrés à l'action du cadmium sur les ATPases sont rares, les études sur les ATPases d'origine animale étant plus nombreuses que celles portant sur les ATPases d'origine végétale.

#### I.6.3.1. - Action sur les ATPases animales.

Dans le règne animal, l'action du cadmium a été testée surtout sur les activités des ATPases magnésium dépendantes activées ou non par le sodium et le potassium. L'ajout d'ouabaine permet de différencier l'activité ATPasique totale (magnésium dépendante plus sodium-potassium activée) et l'activité ATPasique magnésium dépendante, la différence des deux activités fournissant l'activité ATPasique sodium potassium activée.

L'examen de ces quelques données bibliographiques montre qu'in vitro l'activité ATPasique magnésium dépendante sodium-potassium activée est généralement plus sensible à l'action du cadmium que l'activité ATPasique magnésium dépendante.

L'effet du cadmium a été étudié sur différents tissus animaux. : rein de rat (RIFKIN, 1965), cortex cervical et rein de lapin et de cobaye (BADER et al., 1970), macrophages alvéolaires pulmonaires de mouton (MUSTAFA et CROSS, 1971), foie de rat (ABE et ITOKAWA, 1973), bordure en brosse de rat (SUGAWARA et SUGAWARA, 1975), épiderme de peau de grenouille (TAKADA et HAYASHI, 1978), branchie de crabe (TUCKER et MATTE, 1980). Tous ces auteurs ont observé in vitro une inhibition plus ou moins élevée. Le tableau XX regroupe quelques pourcentages d'inhibition choisis de façon à être proches de 50 %. Tous ces pourcentages ont été calculés par rapport aux témoins correspondants.

La comparaison de l'effet inhibiteur in vivo et in vitro a été réalisée chez le rat sur des bordures en brosse du duodenum (SUGAWARA et SUGAWARA, 1975), et sur des homogénats de foie de rat (ABE et ITOKAWA, 1973). Dans les deux cas, les auteurs notent des effets in vivo à peu près identiques à ceux observés in vitro (cf. Tableau XX). L'effet inhibiteur du cadmium a également été observé in vivo par CHETTY et al. (1980).

AUTEURS	Sel de cadmium testé	Concentration(s) molaire(s) de cadmium (M)	Pourcentage d'inhibition observé		Animaux	Tissus
			Activité ATPasique Mg <sup>++</sup> dépendante et Na <sup>+</sup> - K <sup>+</sup> activée	Activité ATPasique Mg <sup>++</sup> dépendante		
BADER <u>et al.</u> (1970)	CdCl <sub>2</sub>	60.10 <sup>-6</sup>	54		lapin - cobaye	cortex cervical
ABE et ITOKAWA (1973)	CdCl <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-4</sup>	19,0 57,5	0 0	rat	foie
SUGAWARA et SUGAWARA (1975)	CdCl <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-4</sup>	/ /	0 50	rat	intestin
TAGADA et HAYASHI (1978)	CdCl <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-4</sup>	26,1 87,0	12,2 16,2	grenouille	épiderme
TUCKER et MATTE (1980)	Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,8.10 <sup>-5</sup> 0,9.10 <sup>-4</sup>	9,1 33	4,1 6,8	crabe	branchie

Tableau XX : Pourcentages d'inhibition observés in vitro pour certaines concentrations molaires de cadmium.

### I.6.3.2. - Action sur les ATPases végétales.

Dans le règne végétal, l'ATPase magnésium dépendante provenant d'une fraction d'homogénat d'épiderme de feuilles de tabac a une activité nulle lorsque l'on remplace le magnésium par le cadmium (KASAMO, 1979). Un travail récent montre que le cadmium inhibe selon un mécanisme complexe l'ATPase provenant de betterave à sucre (LINDBERG et WINGSTRAND, 1985) : à fortes concentrations (supérieures à 100  $\mu\text{M}$ ) le cadmium inhibe l'ATPase de manière compétitive en formant, probablement, un complexe avec l'ATP, tandis que pour des concentrations inférieures à 100  $\mu\text{M}$  l'activation spécifique du potassium est inhibée ; l'inhibition est incompétitive lorsque la concentration en potassium est inférieure à 5 mM ; elle est compétitive lorsque cette concentration est plus élevée (supérieure ou égale à 10 mM).

### I.6.3.3. - Action sur les ATPases algales.

Nous n'avons trouvé trace, dans la littérature, que d'une seule étude mentionnant l'action inhibitrice du cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) sur une ATPase plasmalemmique : à  $10^{-3}$  M, l'activité ATPasique (magnésium dépendante) sodium-potassium stimulée de Boergesenia forbesii est inhibée de 71,7 % (MIZUTA et SUDA, 1978).

### BUTS DU TRAVAIL

Les données bibliographiques qui précèdent, soulignent le caractère bioaccumulateur du cadmium dans les organismes vivants, et en particulier dans les algues. Si les capacités de biosorption du cadmium par les algues ont pu être estimées globalement, on connaît mal, par contre, les mécanismes de cette biosorption et la répartition cellulaire de ce métal. Nous avons tenté, dans ce travail, d'élucider le rôle joué par la paroi chez Chlorella vulgaris, et en particulier la part de cadmium retenue par cette structure ou capable de pénétrer à l'intérieur de la cellule. A cet effet, nous avons déterminé les isothermes d'adsorption du métal par la paroi et mesuré son absorption intracellulaire.

La toxicité du cadmium apparaît par ailleurs, extrêmement complexe, se traduisant par des altérations morphologiques et des perturbations physiologiques encore mal élucidées au plan cellulaire. Nous nous sommes intéressés à son action toxique sur la première structure cellulaire rencontrée, à savoir la membrane plasmique, une fois que le métal aura franchi la barrière formée par la paroi. La membrane plasmique joue évidemment un rôle essentiel dans les phénomènes de transport de nutriments. Nous avons étudié plus spécifiquement le système enzymatique impliqué dans les phénomènes de transport actif, l'ATPase  $K^+$  stimulée, au demeurant très peu étudiée au niveau algal. Le seul précédent connu est constitué par les travaux de MIZUTA et SUDA (1978) sur une ATPase  $Na^+ K^+$  stimulée.

Nous avons d'abord mis au point la technique d'isolement et de purification de la fraction plasmalemmique de Chlorella vulgaris. Nous avons étudié les facteurs influençant l'activité ATPasique  $K^+$  stimulée et déterminé l'impact du cadmium sur cette activité en fonction de ces différents facteurs. Nous nous sommes attachés à quantifier la complexation de cadmium au sein des milieux testés.

C H A P I T R E   I I



ACTION DU CADMIUM SUR LA CROISSANCE ALGALE

CHAPITRE II : ACTION DU CADMIUM SUR LA CROISSANCE ALGALE

II.1 - Matériel et méthodes.

II.1.1. - Le matériel biologique

Le matériel que nous avons utilisé est l'algue Chlorella vulgaris B., souche 211/11b du Centre de culture d'algues et de protozoaires de Cambridge. Cette souche provient de la collection de Delft et pourrait avoir été isolée par BEIJERINCK lui-même (FOTT et NOVAKOVA, 1969).

La chlorelle est un eucaryote unicellulaire chlorophyllien de la classe des chlorophycées, dont on peut rappeler la place dans la systématique :

E : chlorophytes - Cl : chlorophycées -  
s/cl : chlorophycidés - O : chlorococcales  
F : oocystacées - G : Chlorella

Le genre Chlorella comprend 10 espèces (KESSLER, 1978) :

- C. fusca
- C. homosphaera
- C. kessleri
- C. sorokiniana
- C. zofingiensis
- C. protothecoides
- C. saccharophila
- C. luteoviridis
- C. vulgaris
- C. minutissima

Ces 10 espèces, représentant plus de 80 souches différentes, sont caractérisées par des propriétés physiologiques et biochimiques très différentes (KESSLER, 1980).

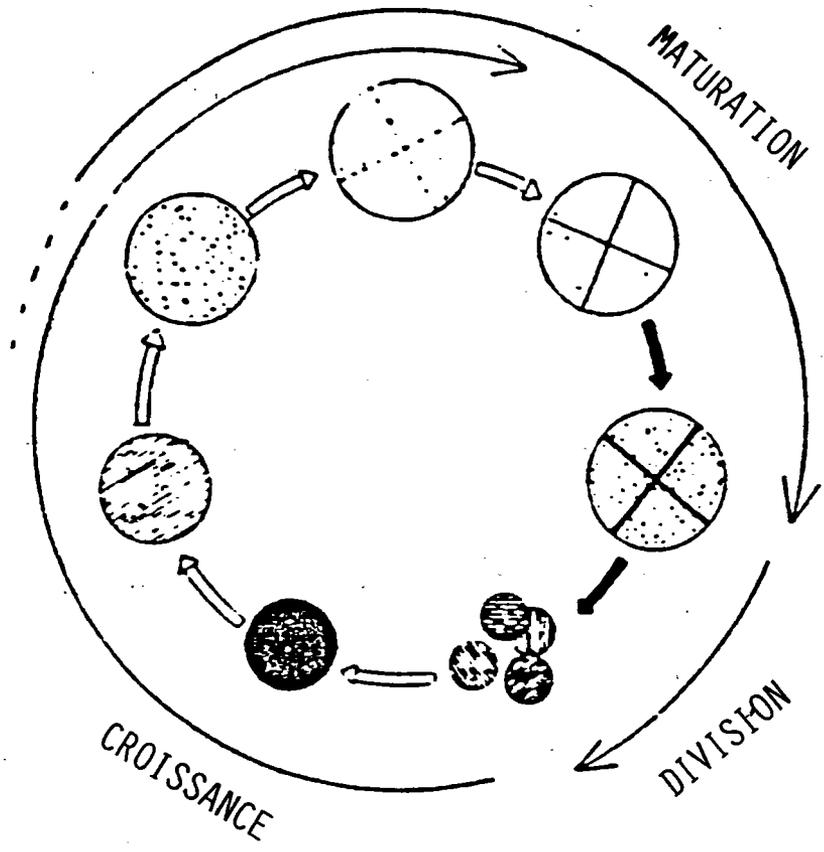


FIG. 12 : SCHEMA DU CYCLE DE VIE DE LA CHLORELLE ( D'APRES MATUZIAK ET AL., 1965 ).

Du point de vue écologique, la chlorelle est caractérisée par son ubiquité. Les chlorelles se retrouvent dans tous les habitats aquatiques mais aussi dans les déchets, sur les filtres biologiques, sur les rochers humides ainsi que dans l'air (FOTT et NOVAKOVA, 1969). Elle a été retrouvée dans différents écosystèmes aquatiques, mais elle n'y constitue pas la population dominante (FINDENEKG, 1972 ; MATONICKIN et PAVLETIC 1975 ; PLANAS, 1975).

Le fait que les chlorelles peuvent être isolées de milieux très variés, indique que ces algues n'ont pas d'exigences nutritionnelles très strictes en ce qui concerne les nutriments principaux ou les substances de croissance.

#### II.1.1.1. - Rappels morphologiques et physiologiques.

Chlorella vulgaris est une algue unicellulaire, solitaire, non flagellée de forme ellipsoïdale ou sphérique : les jeunes cellules ou autospores sont ellipsoïdales, tandis que les cellules mères sont quasiment sphériques. A l'état adulte, les différentes souches de C. vulgaris ont une taille variant de 2 à 10  $\mu\text{m}$ .

La reproduction se fait par autosporelation (figure 12). L'apparition de 2 à 4 autospores est la plus fréquente. Au départ, elles ont toutes la même taille : 2 à 3,8  $\mu\text{m}$  pour le grand axe ; 1,5 à 2,5  $\mu\text{m}$  pour le petit axe de l'ellipsoïde (FOTT et NOVAKOVA, 1969).

La planche A permet d'observer un certain nombre de caractéristiques de cette souche. La forme est ellipsoïdale (car il s'agit vraisemblablement d'une cellule jeune) dont les diamètres du grand et du petit axes sont respectivement égaux à 4,2 et à 2,8  $\mu\text{m}$ . La paroi algale (P) est mince, environ 50 nm. La planche présentée ne permet pas d'observer les deux couches mentionnées par SASSEN et al (1970), mais il est possible de discerner, par endroit, quelques structures fibrillaires.

Le chloroplaste (C) est unique et remplit une grande partie du volume cellulaire. Il a une forme de coupe avec une ouverture irrégulière. A l'état adulte, il remplit jusqu'au 3/4 de la périphérie cellulaire.

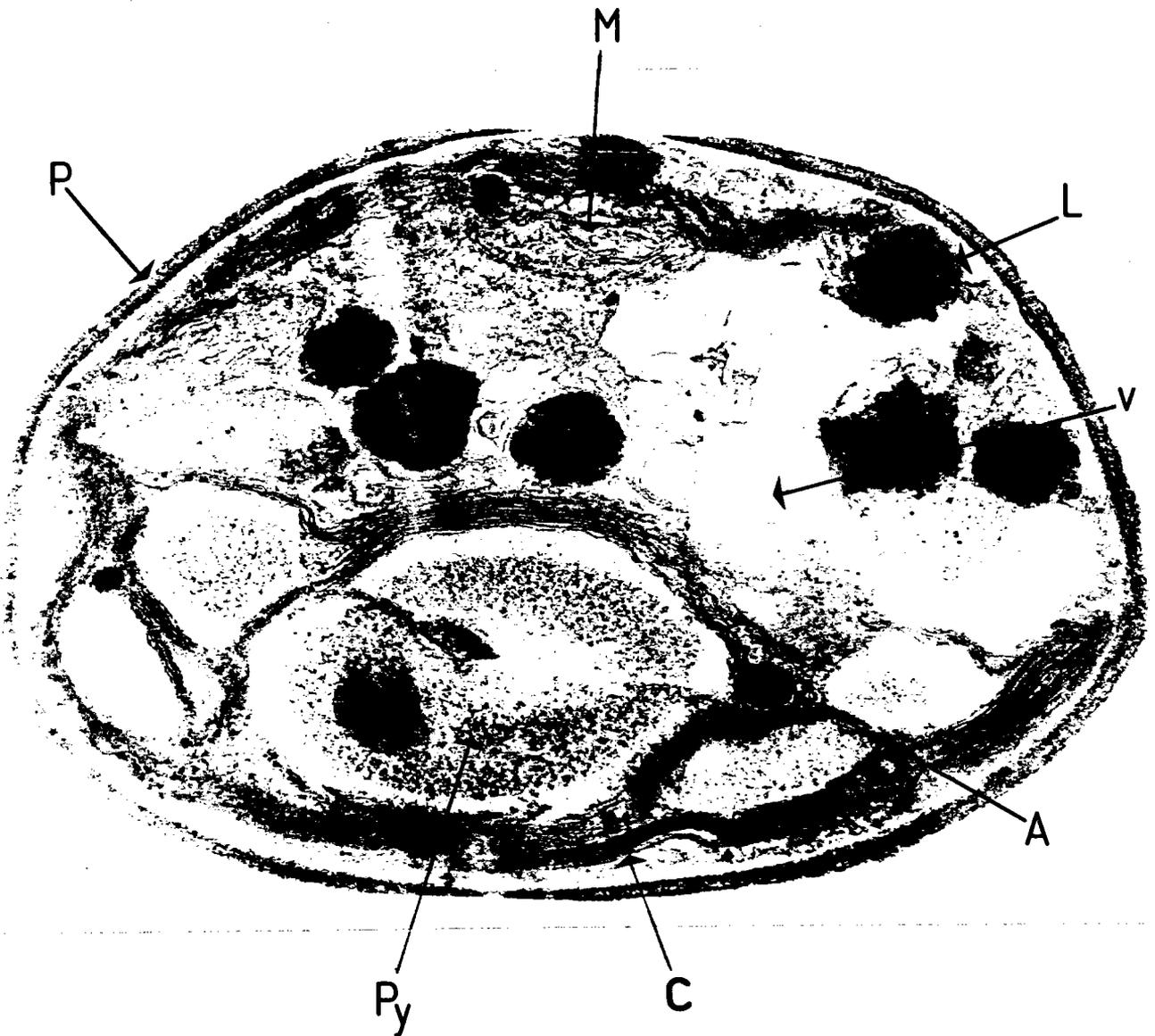


PLANCHE A : CELLULE DE CHLORELLA VULGARIS, SOUCHE 211/11b (x 40.000)

P = PAROI ALGALE ; C = CHLOROPLASTE ; Py = PYRENOIDE ;  
A = GRAIN D'AMIDON ; M = MITOCHONDRIE ; V = VACUOLE ;  
L = GRANULE LIPIDIQUE.

Le pyrénioïde (Py) est bien distinct, sphérique ou légèrement ellipsoïdal, et de taille importante. Il est entouré de quelques grains d'amidon (A), généralement de 2 à 5.

Quelques mitochondries (M) sont également visibles, de même que quelques vacuoles (V) et des granules lipidiques (L). Le noyau n'est pas observé.

L'espèce Chlorella vulgaris B., comprenant 17 souches, possèdent les caractéristiques physiologiques et biochimiques suivantes (KESSLER, 1976) : le pH minimum de croissance est de 4 ; la concentration maximale de NaCl pour la croissance est de 3 % ; cette espèce n'est pas thermophile ; elle est dépourvue d'activité hydrogénasique et incapable de former des caroténoïdes secondaires en absence d'azote ou de liquéfier la gélatine. En anaérobiose, le produit de fermentation formé à partir du glucose est le lactose. Cette espèce est capable de réduire les nitrates, mais ne nécessite pas de thiamine.

La souche 211/11b proprement dite est capable de pousser dans une eau de mer enrichie mais le poids sec obtenu diminue d'environ 60 % (KESSLER, 1980). Cette souche peut utiliser comme source d'azote, de l'acide glutamique, de l'acide nicotinique, de la nicotinamide, mais plus ou moins bien la purine et pas du tout la glutamine (KESSLER et CZYGAN, 1970). L'acétate (en plus du glucose) peut être utilisé comme source de carbone mais pas le lactose, tandis que l'utilisation du saccharose, du galactose et du fructose donne des résultats mitigés (KESSLER, 1972).

En anaérobiose, on ne remarque pas de formation d'acide acétique, d'acide formique ni de glycerol (VINYAKUMAR et KESSLER, 1975). Le pourcentage de paires GC du DNA est de 62,3 % (HELLMANN et KESSLER, 1974). Il n'y a pas production d'enzymes extracellulaires capables de dégrader l'amidon (KESSLER, 1978).

#### II.1.1.2. - Composition et préparation des milieux de culture.

(1) Le milieu de culture choisi est celui de LEFEVRE-CZARDA, modifié par incorporation d'oligo-éléments (Oligo L.C.), retenu par la norme AFNOR (1980). Le tableau XXI donne la composition de ce milieu et la référence des réactifs utilisés.

Composés	Références		Concentrations	
			mg/l	mM
<u>. SOLUTIONS DE BASE :</u>				
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	MERCK	2121	40	169
K NO <sub>3</sub>	MERCK	5063	100	1000
Mg SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	MERCK	5886	30	122
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MERCK	5099	40	230
<u>. OLIGO-ELEMENTS I :</u>				
Cu SO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	PROLABO	2317423	0,015	6,0.10 <sup>-5</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	MERCK	1182	0,030	2,4.10 <sup>-5</sup>
Zn SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	MERCK	8883	0,030	10,4.10 <sup>-5</sup>
Co Cl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	MERCK	2539	0,030	12,6.10 <sup>-5</sup>
Mn (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	MERCK	5940	0,030	12,0.10 <sup>-5</sup>
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> , H <sub>2</sub> O	MERCK	244	0,030	14,3.10 <sup>-5</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	MERCK	165	0,030	48,5.10 <sup>-5</sup>
<u>. OLIGO-ELEMENTS II :</u>				
Citrate de Fer [(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )Fe]	FLUKA	44941	0,8125	332.10 <sup>-5</sup>
Fe SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	MERCK	3965	0,3125	112.10 <sup>-5</sup>
Fe Cl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O	MERCK	3943	0,3125	116.10 <sup>-5</sup>

Tableau XXI : Composition du milieu Oligo L.C.

L'eau utilisée pour la confection du milieu est une eau déminéralisée sur résines mélangées puis monodistillée. La conductivité est d'environ 1  $\mu$ S/cm. Après quoi cette eau est filtrée sur membrane filtrante millipore 0,22  $\mu$ m.

Le milieu de culture est préparé à l'aide de 6 solutions de base, comme mentionné dans la norme AFNOR (1980), en respectant l'ordre successif d'introduction des solutions.

Le pH final avant stérilisation est de 7,1. Après autoclavage à 125°C pendant 20 minutes, le pH descend légèrement à 7,05. Aucune correction de pH n'est réalisée puisque la valeur du pH se trouve entre 7 et 7,2 (AFNOR, 1980).

(2) La verrerie utilisée pour les cultures de chlorelles est nettoyée selon le protocole de MILLER et al. (1978), par lavages successifs à l'aide de détergent sans phosphate (EXTRAN MA 03, MERCK 7550) et d'acide chlorhydrique 10 % (en volume). Un rinçage final minutieux est effectué par lavage à l'eau déminéralisée (3x) et à l'eau monodistillée (3x). La verrerie est ensuite séchée dans un four PASTEUR à 105°C.

(3) L'inoculum représente toujours 10 % du volume final. L'ensemencement est effectué stérilement de façon à obtenir une culture monoxénique (enceinte stérilisée aux U.V. , à proximité d'une flamme, pipette stérile à usage unique).

Bien que la plupart des publications revendiquent une monoxénie absolue, celle-ci est mise en doute par certains auteurs. En particulier, certaines bactéries se fixeraient dans ou sur la paroi et ne se multiplieraient pas ou peu tant que la cellule algale ne se lyserait pas (BODART, comm. pers.).

La "monoxénie" des cultures de Chlorella vulgaris est contrôlée par ensemencement sur milieu solide composé de milieu oligo L.C. additionné de 10 à 15 % de gélose (Institut Pasteur, 64477). Les boîtes de Pétri sont conservées quelques jours dans des conditions de température et de photopériode identiques à celles des cultures.

(4) Le repiquage des cultures mères se fait de façon hebdomadaire en début de photopériode par ensemencement d'un inoculum algal représentant 10 % du volume final de milieu préalablement stérilisé et placé dans un erlenmeyer bouché à l'aide de coton cardé.

### II.1.1.3. - Conditions de culture

Les cultures algales sont réalisées dans une chambre thermostatée à une température de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Elles reçoivent un flux lumineux de 1500 lux ( $= 2,25 \cdot 10^{-8}$  joule  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) au niveau de la plaque supportant les erlenmeyers. Cet éclairage est assuré par des tubes fluorescents GRO-LUX (Sylvania, F 40 T 12/GRO). La photopériode est de 16 heures de lumière pour 8 heures d'obscurité.

Les cultures sont agitées de façon continue à l'aide d'un agitateur dit "va et vient" réglé à 150 oscillations par minute.

### II.1.2. - Méthodes d'évaluation de la croissance

#### II.1.2.1. - L'opacimétrie

La densité optique des cultures est mesurée in situ, à l'aide d'un spectrophotomètre PERKIN-ELMER 295 E, à la longueur d'onde de 665 nm. Le blanc est constitué par un erlenmeyer modifié ne contenant que du milieu oligo-L.C. Une modification des erlens de culture permet de faire cette mesure directement sans avoir à prélever un aliquot de culture et de compromettre leur stérilité. Cette mesure est caractérisée par une bonne répétabilité (Tableau XXII). Ceci étant, nous avons choisi de faire une seule mesure opacimétrique par échantillon.

N° des cultures	Moyenne des D.O.	Ecart-type	coefficient de variation (en %)
1	95,82	2,42	2,5
2	176,54	2,76	1,6
3	289,04	1,88	0,6
4	429,48	5,19	1,2
5	646,02	10,57	1,6

Tableau XXII : Répétabilité de la méthode opacimétrique. La même culture étant mesurée successivement 5 fois de suite. Le coefficient de variation est égal à  $\frac{\text{écart type} \times 100}{\text{moyenne}}$

Nous avons également vérifié qu'il existait une relation linéaire entre la D.O. et la dilution d'une culture algale concentrée. La figure 13 permet d'observer une telle relation entre 0,083 et 1,130 de D.O.

#### II.1.2.2. - La numération au compteur Coulter

Cet appareil a été utilisé pour le comptage de diverses espèces algales (EL-SAYED et LEE, 1963 ; ILMAVIRTA, 1974). Il est recommandé par MILLER et al. (1978) et par l'OCDE (1983).

Pour une utilisation optimale de cet appareil, il faut que, non seulement, la suspension algale soit très homogène et que les algues ne soient pas en amas (caractéristiques également valables pour l'opacimétrie) mais aussi que la forme soit la plus sphérique possible.

La chlorelle est donc une algue qui se prête relativement bien à la numération au compteur coulter. Sa faible taille nous a conduit à utiliser un orifice de 100  $\mu\text{m}$  et nous avons réalisé nos dilutions dans un électrolyte standard et dépoussiéré, préconisé par Coultronics (Isoton II).

La dilution la plus couramment utilisée est de 1/500, soit une prise d'essai de 50  $\mu\text{l}$  de culture dans 25 ml d'électrolyte. Nous avons essentiellement travaillé sur un volume de liquide aspiré de 0,5 ml. Un minimum de 3 comptage successifs est réalisé pour chaque échantillon algal.

Un "blanc" (avec de l'isoton II seul) est réalisé avant tout comptage et il en est tenu compte dans les calculs.

L'appareil utilisé est un modèle ZB<sub>1</sub>. Les réglages choisis, à savoir 1/8 pour l'atténuateur (=A), 1/4 pour le courant d'ouverture (=I) et 10 pour le seuil inférieur (=t) permettent de détecter toutes les particules dont le diamètre est supérieur à 1,80  $\mu\text{m}$ . Il est certain que dans ces conditions, les plus petites autospores (ellipsoïdales) qui peuvent passer dans le microorifice dans le sens de leur grand axe ne sont pas détectées, compte-tenu que le diamètre minimum du petit axe est de 1,5  $\mu\text{m}$ . Or, le calcul théorique montre que, dans les conditions choisies, il faudrait utiliser un seuil inférieur, compris entre 5 et 6 pour espérer détecter les plus petites autospores.

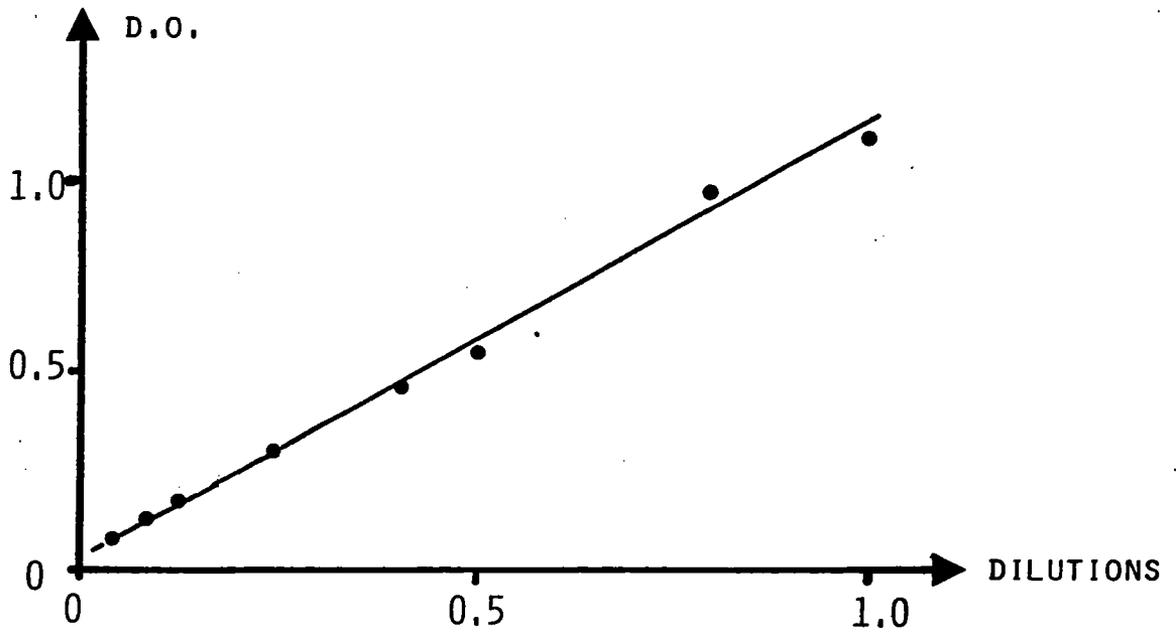


FIG. 13 : RELATION ENTRE LA D.O. ET LES DILUTIONS D'UNE MEME CULTURE.

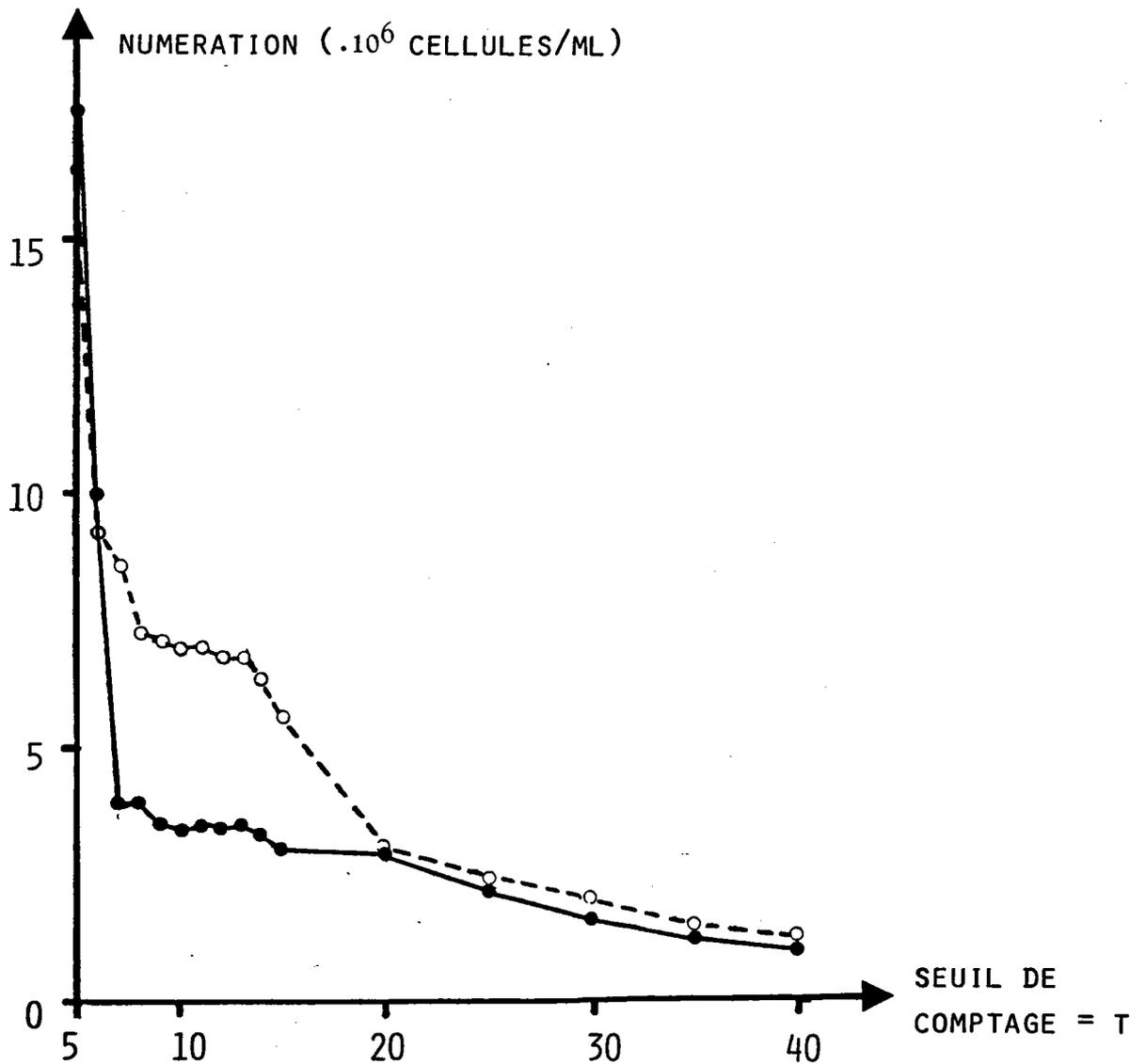


FIG. 14 : NUMERATION AU COMPTEUR COULTER EN FONCTION DU SEUIL UTILISE.

Un tel seuil est malheureusement inutilisable techniquement, car dans ce cas, le caractère aléatoire et l'importance des bruits de fond et des parasites viennent altérer la précision des comptages.

Néanmoins, nous avons fait varier le seuil autour de la valeur choisie (= 10) pour vérifier l'obtention d'un plateau autour de cette valeur, et cela sur différentes cultures. La fig. 14 est un exemple des courbes obtenues.

Nous avons également vérifié qu'il existait une relation linéaire entre la numération et la dilution d'une culture algale concentrée. La fig. 15 permet d'observer cette relation entre 1886 cellules (numération minimale) et 36086 (numération maximale).

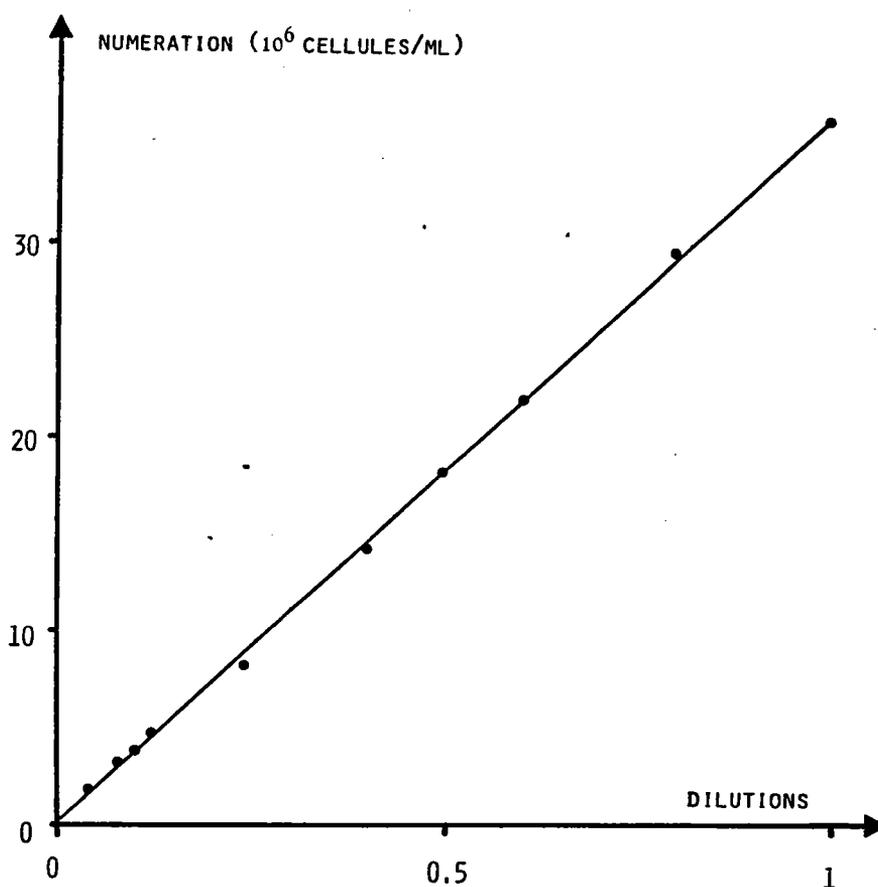


FIG. 15: RELATION ENTRE LA NUMERATION AU COMPTEUR COULTER ET LES DILUTIONS D'UNE MEME CULTURE.

La répétabilité de la mesure dont on peut rappeler qu'elle inclut le prélèvement d'une partie aliquote (50 µl en général), la dilution de celle-ci, puis la numération proprement dite a été testée sur plusieurs cultures dont la population est plus ou moins forte (Tableau XXIII)

Cultures n°	Numération moyenne (.10 <sup>6</sup> cellules)	écart-type	coefficient de variation (en %)
1	6,00	0,06	1,2
2	12,12	0,15	1,2
3	18,82	0,15	0,8
4	26,48	0,61	2,3
5	36,42	0,59	1,6

Tableau XXIII : Répétabilité de la méthode de numération au compteur Coulter (au moins 5 répétitions par culture). Les mesures sont brutes (blanc non déduit).

La répétabilité de cette méthode ainsi testée est satisfaisante, compte-tenu que le coefficient de variation est inférieure à 2,3 %. Il faut remarquer que les coefficients de variation obtenus sont du même ordre de grandeur que ceux observés précédemment pour la méthode opacimétrique.

### II.1.3 - Méthodes d'évaluation de la toxicité du cadmium.

#### II.1.3.1. - Critères d'évaluation de la croissance :

- (1) L'opacimétrie et la numération ont été développés dans le paragraphe précédent.
- (2) Le volume moyen cellulaire est mesuré grâce à un compteur de particules équipé d'un analyseur de tailles à 100 canaux.

#### II.1.3.2. - Paramètres biochimiques.

- (1) Le dosage de l'ATP a été réalisé par bioluminescence après extraction au DMSO, en utilisant la méthode luciférine-luciférase, mise au point par Mc ELROY et SELIGER (1963).
- (2) Le dosage de la chlorophylle a été réalisé par spectrophotométrie après extraction au méthanol.

L'ensemble de ces 3 dernières techniques est détaillé plus longuement dans la publication ci-jointe figurant dans le paragraphe "RESULTATS".

II.1.4. - Méthodologie d'intoxication des cultures en vue de leur examen microscopique.

10 ml d'une culture mère de 7 jours ( $T \% = 27 \% ; D.O. = 0,569$ ) sontensemencés dans 90 ml de milieu de culture 4 replicats sont effectués simultanément. Les valeurs de transmission sont relevées au début et après 4 jours de culture en absence de toxique. Au 4ème jour de culture, 11 ml de solution témoin ou intoxiquée sont ajoutés à l'aide d'une seringue équipée d'un filtre 0,2  $\mu\text{m}$  (MILLIPORE, SLGS, OS). Les concentrations suivantes de cadmium sous forme nitrate (MERCK) ont été testées : 0 - 2,5 - 5 et 12,5 mg/l. La rétention du cadmium par les filtres MILLEX a été prise en compte et déterminée par dosage par absorption atomique. Le tableau XXIV résume les pourcentages de rétention observés et les concentrations effectives de cadmium dans les différents erlenmeyers.

Concentrations voulues en mg/l (sans rétention)	Pourcentage de rétention de cadmium (%)	Concentrations effectives de cadmium en mg/l
0	/	0
2,5	12,5	2,2
5	12,2	4,4
12,5	17,2	10,4

Tableau XXIV : Calcul des concentrations effectives de cadmium en tenant compte du cadmium retenu par les filtres MILLIPORE.

Après 48 heures de culture en présence de cadmium, les chlorelles sont récoltées par centrifugation à 2300 g pendant 10 minutes.

II.1.5. - Préparation des échantillons algals en vue de leur examen microscopique

Sur les culots ainsi préparés, la technique de préparation (HAYAT, 1970) peut se résumer de la façon suivante : Ajout aux culots de 5 ml d'oxyde d'osmium à 2 % dans une solution phosphate (pH 7,5).

L'ensemble est laissé 1h30 sous vide avant d'être à nouveau centrifugé à 2300 g pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé puis le culot est une fois rincé à l'eau avant d'être inclus dans une gélose à 4 % (DIFCO, 0140-01) pendant quelques minutes. Les culots sont alors coupés en petits morceaux répartis dans des tubes où ils vont subir plusieurs bains de deshydratation dont la durée est de quinze minutes, dans de l'éthanol à concentration croissante (10°, 20°, 40°, 60°, 80°, 95°). 3 bains d'1/2 heure sont ensuite effectués dans de l'éthanol absolu. Après quoi, le matériel subit toute une série de bains successifs pour éliminer l'éthanol puis l'oxyde de propylène (Tableau XXV).

Les coupes sont ensuite réalisées sur un ultramicrotome LKB et examinées à l'aide d'un microscope électronique SIEMENS 101.

Composition des bains	durée des bains
2/3 ethanol absolu 1/3 oxyde de propylène	15 min.
1/3 ethanol absolu 2/3 oxyde de propylène	15 min.
oxyde de propylène	5 min.
idem	30 min.
idem	30 min.
idem	30 min.
2/3 oxyde de propylène 1/3 résine *	12 heures
1/3 oxyde de propylène	10 heures
résine *	12 heures

Tableau XXV : résumé de différentes étapes d'inclusion du matériel algal.

\* La résine est une résine à base d'EPON (44,7 %) de deux durcisseurs DDSA (30,5 %) et MNA (23,1 %) et d'un accélérateur DMP 30 (1,7 %).

## II.2. - Résultats

### II.2.1. - Croissance des chlorelles en milieu non intoxiqué.

Les courbes de croissance obtenues à l'aide des mesures D.O. et de numération sont représentées sur la figure 16. Les deux paramètres sont étroitement corrélés (figure 17), tout au moins jusqu'au 8ème jour de culture, moment à partir duquel la D.O. croît plus vite que la numération. Cette observation peut s'expliquer par l'augmentation du volume des cellules présentes dans le milieu.

Ces résultats permettent d'observer que dans les conditions de culture utilisées, le taux de croissance est maximal entre le 1er et le 2ème jour et qu'il diminue ensuite.

### II.2.2. - Effets toxiques du cadmium entre J4 et J6.

Les résultats opacimétriques exprimés en D.O. sont présentés sur le tableau XXVI.

Concentrations de cadmium testées	Densité optiques			Variation de D.O. entre J4 et J6
	J0	J4	J6	
0	71	398	420	+ 22
2,2	61	417	409	- 8
4,4	57	423	369	- 54
10,4	61	438	301	- 137

Tableau XXVI : Résultats de D.O. des cultures algales intoxiquées.

La D.O. diminue entre J4 et J6 et cela proportionnellement à la concentration de cadmium ajoutée dans les différents milieux. Ces 4 cultures algales ont ensuite fait l'objet de l'étude microscopique qui suit.

### II.2.3. - Observations au microscope électronique de l'effet du cadmium.

La planche B1 concerne les algues témoins avec un cytoplasme qui dans l'ensemble est relativement dense aux électrons. On reconnaît la paroi (P), le chloroplaste (C), le pyrenoïde (Py), des grains d'amidon (A), des mitochondries (M) et des réserves lipidiques (L).

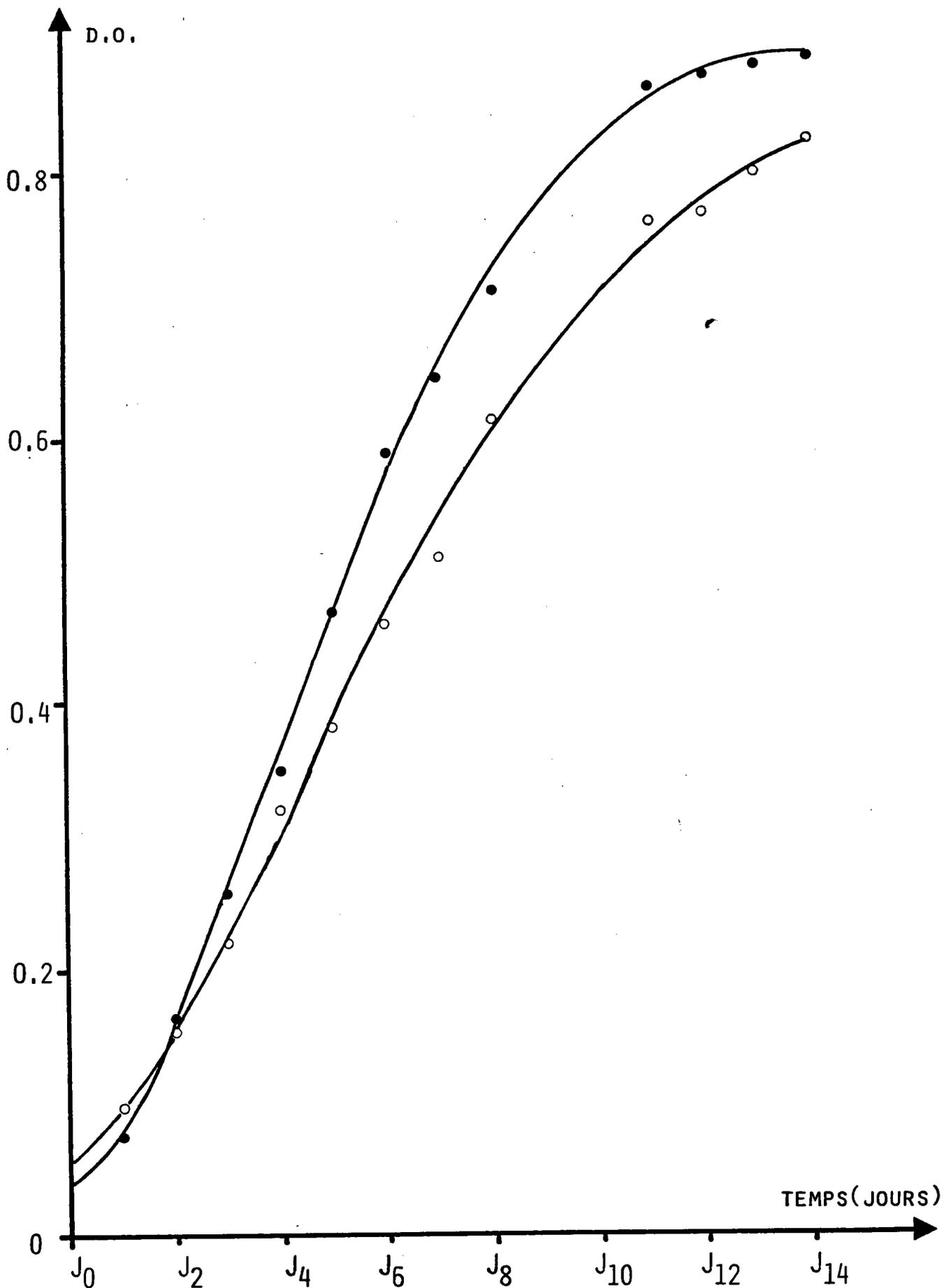


FIG. 16: EVOLUTION COMPAREE DE LA NUMERATION (●) ET DE LA D.O. (○) D'UNE CULTURE DE CHLORELLES.

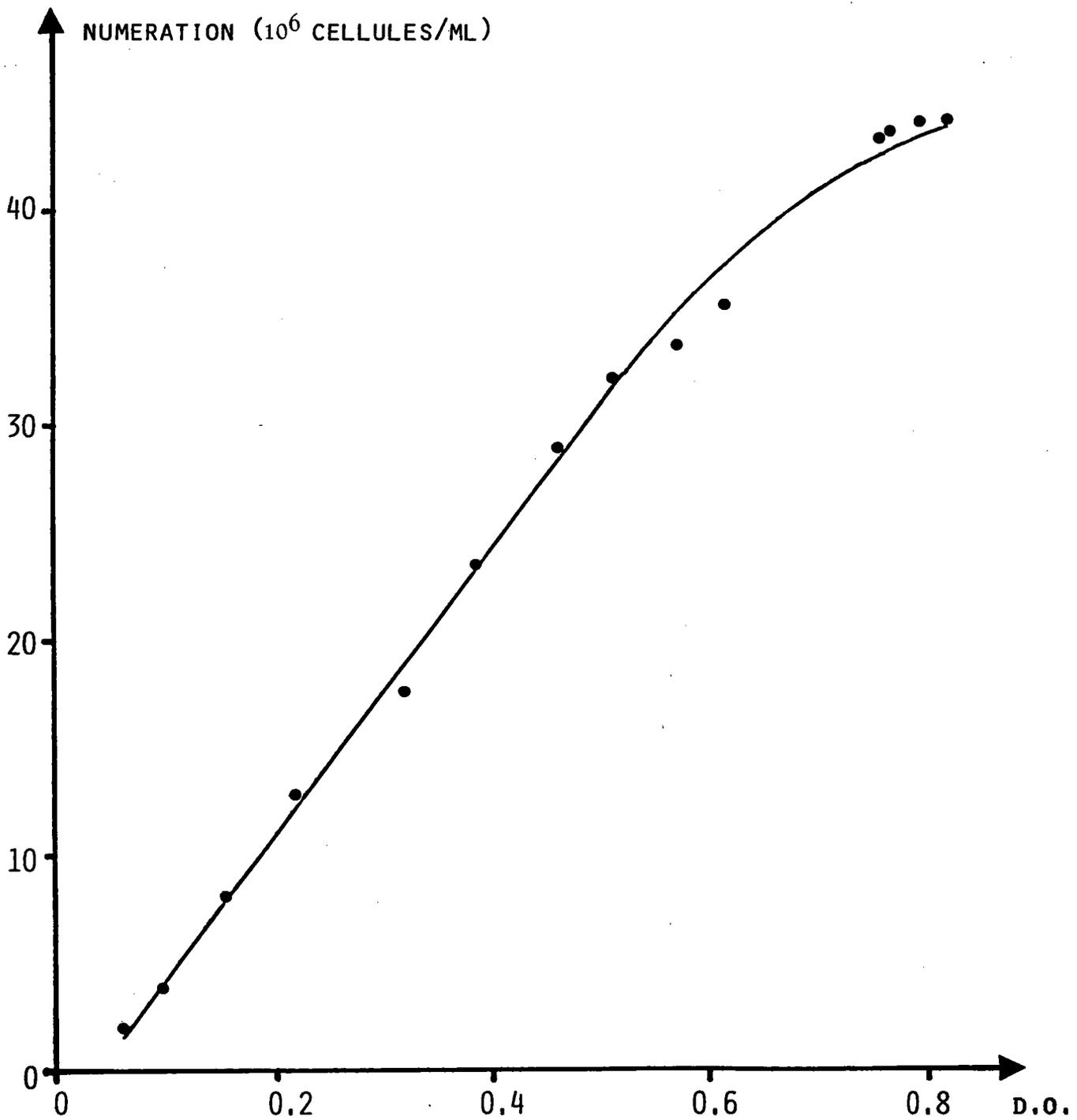


FIG. 17: RELATION ENTRE LA NUMERATION ET LA D.O. AU COURS DE LA CROISSANCE D'UNE CULTURE DE CHLORELLES.

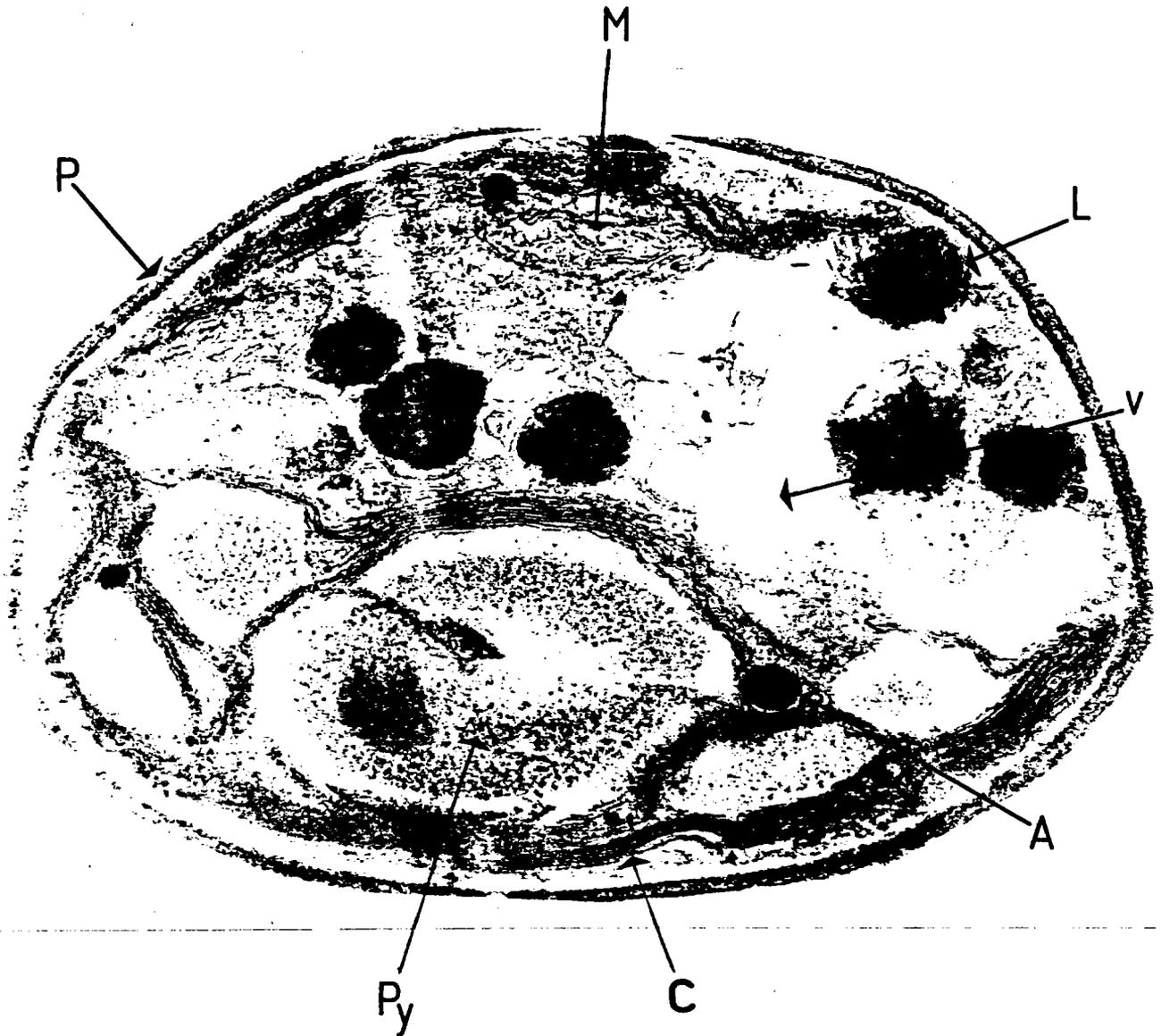


PLANCHE B1 : CELLULE TEMOIN DE CHLORELLA VULGARIS (x 40.000).

P = PAROI ALGALE ; C = CHLOROPLASTE ; Py = PYRENOIDE ;  
A = GRAIN. D'AMIDON ; M = MITOCHONDRIE ; V = VACUOLE ;  
L = GRANULE LIPIDIQUE.

La planche B2 correspond à des chlorelles cultivées en présence de 2,2 mg/l de cadmium. Les lamelles chloroplastiques sont plus nettes et plus espacées que précédemment. Le fait le plus marquant est l'apparition de nombreuses vésicules qui occupent plus du tiers de la cellule.

La planche B3 représente des chlorelles cultivées en présence de 4,4 mg/l de cadmium. Les parois ne sont plus nettes et tendent à disparaître ainsi que la plupart des organites intracellulaires. Les lamelles photosynthétiques sont encore visibles mais commencent, elles aussi, à se désorganiser. L'intérieur de la cellule est à moitié vacuolisé. Il y a incontestablement, à cette concentration, une profonde altération de toutes les structures internes. A 10,4 mg/l de cadmium (planche B4), les effets sont comparables à ceux observés à 4,4 mg/l.

#### II.2.4. - Effets du cadmium ajouté avant l'inoculum algal. Etude de différents paramètres.

La publication qui suit rassemble les CI50 obtenues à l'aide de différents paramètres : opacimétrie, numération, volume moyen cellulaire, dosage d'ATP et de chlorophylle a. La méthodologie d'intoxication des cultures correspond à celle développée dans la norme AFNOR (1980).

Les principaux résultats de ce travail peuvent se résumer de la façon suivante :

Les CI50 varient selon les paramètres choisis de 0,60 à 1,85 mg/l de cadmium introduit. Ces données ont été obtenues en tenant compte de la valeur de chaque paramètre au début de l'expérience, c'est-à-dire en tenant compte de l'inoculum.

La non prise en compte de l'inoculum dans les calculs de la CI50 entraîne une augmentation de la CI50 d'un facteur 2,7, 1,9 ou 1,1 respectivement pour les paramètres transmission, densité optique et numération cellulaire.

Les deux paramètres opacimétriques - transmission et densité optique - ne fournissent pas la même CI50. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les échelles des deux paramètres ne sont pas identiques : l'une est linéaire, l'autre est logarithmique.

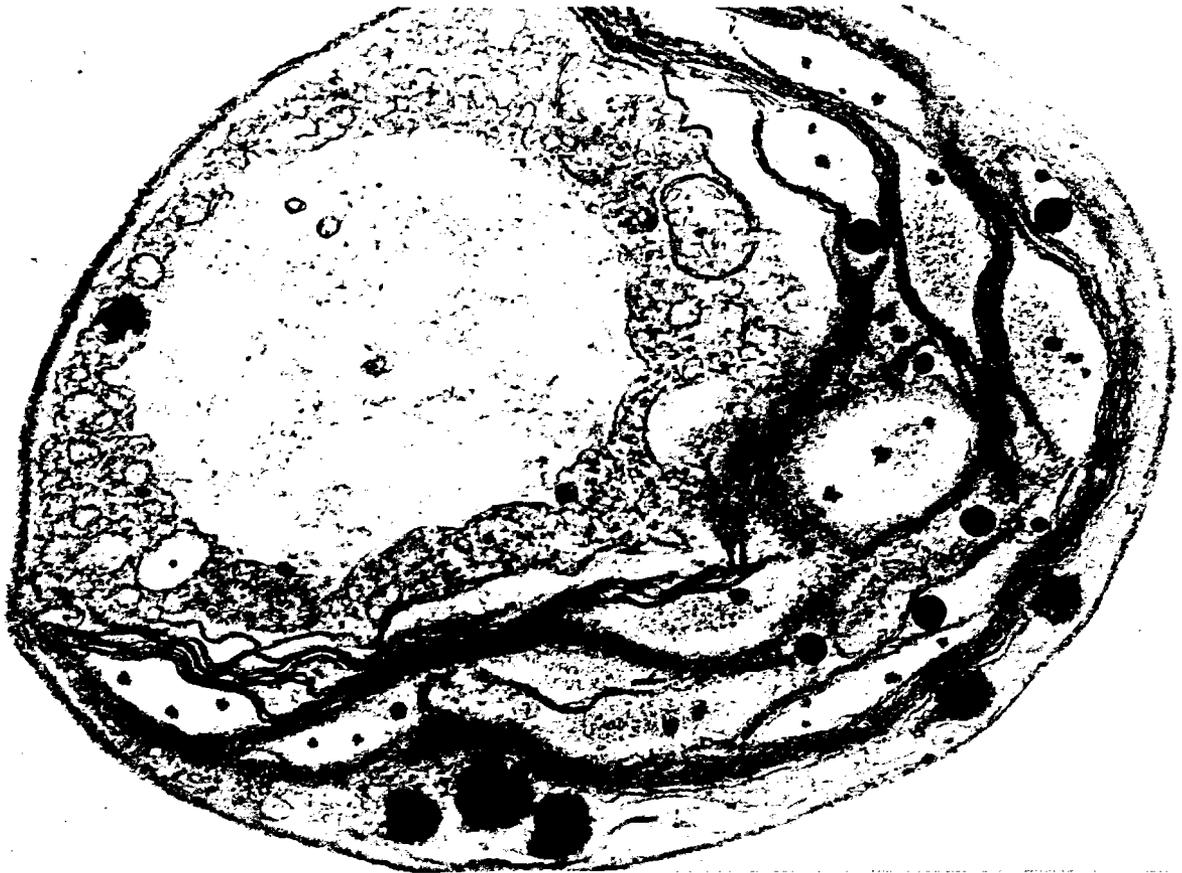


PLANCHE B2 : CELLULE CULTIVEE EN PRESENCE DE 2,2 mg/l.

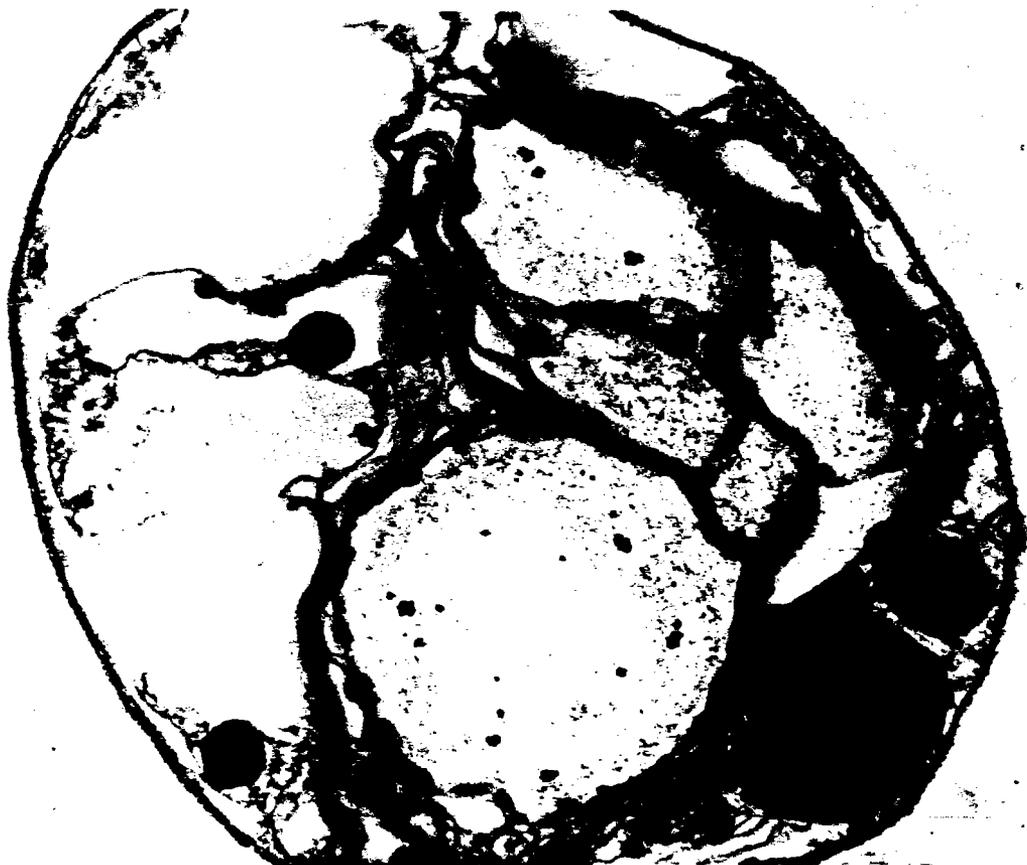


PLANCHE B3 : CELLULE CULTIVEE EN PRESENCE DE 4,4 mg/l.

Le volume moyen cellulaire augmente lorsque la concentration en cadmium augmente.

L'expression des paramètres biochimiques par unité de volume cellulaire, constitue une meilleure solution que lorsqu'ils sont rapportés à la cellule ou à la biomasse. En effet, la numération et le volume moyen cellulaire ne sont pas identiques selon que les concentrations testées sont de 0 ou de 3 mg/l.

### II.3. - Discussion

L'examen des coupes au microscope électronique permet d'observer une action toxique certaine du cadmium sur les cellules algales. Cette action est progressive dans la mesure où elle est sensible à 2,2 mg/l, mais devient plus importante à 4,4 et à 10,4 mg/l. Ces deux dernières concentrations entraînent des effets comparables au niveau des coupes. Les résultats de D.O. correspondant à ces mêmes algues corroborent ces données qualitatives.

Par rapport à l'action du cadmium sur un dinoflagellé Prorocentrum micans (PREVOT, 1979), la chlorelle se caractérise par la même tendance à la vacuolisation et par des effets plus sensibles au niveau des lamelles chloroplastiques.

La toxicité du cadmium est relativement importante puisqu'une concentration de 0,66 mg/l inhibe 50 % de la croissance algale exprimée par la numération cellulaire. La D.O. et la chlorophylle a constituent des paramètres moins sensibles : les CI50 du cadmium exprimées à l'aide de ces deux paramètres sont respectivement de 1,10 et de 1,40 mg/l. Ces résultats sont du même ordre de grandeur que ceux trouvés par BRAUWERS (1982) chez Chlorella pyrenoidosa qui trouvent une CI50 de 3,2 mg/l en utilisant la D.O. et de 2,1 mg/l avec le paramètre chlorophylle a + b (exprimé en mg/l).

Parallèlement, le cadmium induit une augmentation du volume moyen cellulaire. Cette action a également été constatée chez Chlorella ellipsoidea (LUE-KIM et al., 1980). Elle correspond aux effets connus de l'inhibition du cadmium sur la division cellulaire.

Lorsque l'ATP est exprimée en mg/l de culture, nous avons enregistré une CI50 égale à 1,5 mg/l. D'autres travaux du laboratoire utilisant une technique d'intoxication différente (intoxication pendant 4 ou 24 heures sur des cultures plus âgées prises 24 à 72 heures après ensemencement) ont permis d'observer des CI50 plus élevées : de l'ordre de 3,5 et de 3,3 mg/l pour une intoxication de, respectivement 6 et 24 heures (VASSEUR et al., 1981). Il est vraisemblable que, non seulement le temps d'exposition mais, également, les conditions expérimentales, expliquent cette différence.

## Cadmium IC<sub>50</sub> Determinations on *Chlorella vulgaris* Involving Different Parameters<sup>1</sup>

R. TRUHAUT,\* J. F. FERARD,† AND J. M. JOUANY†

\*Laboratoire de toxicologie, Faculté de pharmacie de Paris V, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris,  
and †Laboratoire de toxicologie, UER d'Ecologie, Université de Metz,  
1 rue des Recollets, 57000 Metz, France.

Received May 15, 1979

The ecotoxicity of cadmium nitrate has been tested, at the basic trophic level, on a chlorophyceae alga, *Chlorella vulgaris*. Several parameters of growth, under strictly defined conditions, have been selected: opacimetry at 665 nm, cell count biomass volume estimation (Coulter counter), and ATP and chlorophyll levels. Dose-response curves have been established and correspond to the percentage of inhibition of culture growth as a function of Cd<sup>2+</sup> concentration in the medium up to 3 mg/liter. The 50% inhibition of culture growth is defined as the Cd<sup>2+</sup> concentration (IC<sub>50</sub>) inducing a 50% reduction of the number of cells compared to the control. So, it is clearly pointed out that the size of the inoculum is of great importance. The IC<sub>50</sub> determinations by cell count give lower values than by other methods; on the contrary, opacimetry gives higher values. These differences are not surprising with regard to the meanings of the various criteria. Therefore, both the selected parameters and the calculation method can greatly modify the IC<sub>50</sub> values. Anyway, for routine purposes, opacimetry is a rapid and sufficiently satisfactory screening procedure, but other parameters have to be taken in account in second steps.

Studies of the actions of chemical substances on representative species of fauna and flora form a great part of ecotoxicological research. In this respect, it is important to consider the producers, the first level of food chains. Several algae species have been used for ecotoxicological testing (*Ankistrodesmus falcatus*, *Chlamydomonas variabilis*, *Chlorella homosphaera*, *C. pyrenoidosa*, *C. vulgaris*, *Euglena gracilis*, *Microcystis aeruginosa*, *Nitzschia palea*, *Scenedesmus quadricauda*, *Selenastrum capricornutum*, etc.) and freshwater chlorophyceae are very often selected.

Algistatic activities of compounds are the most frequently determined as an expression of the toxic effects by way of the IC<sub>50</sub>. It seemed to us of some interest to compare the various criteria generally used, on chlorella (*Chlorella vulgaris*), in order to appreciate their relative accuracy and to try to define an eventually standardized, simple and reliable test.

### 1. MATERIAL AND METHODS

#### 1.1. Material

The biological material used is a unicellular alga, *Chlorella vulgaris*, chlorophyceae, strain 211/11b, obtained from the Algae and Protozoa Center of Cambridge. This alga is grown in Lefevre-Czarda medium modified by addition of trace elements (trace L.C.). The strain is maintained by weekly subcultures to avoid depletion of nutrients in the medium and aging of the culture. Growth occurs

<sup>1</sup> Paper presented at the international symposium, "Testing of Chemical Substances for Ecotoxicological Evaluation," May 15-17, 1979, Munich-Neuherberg.

in 250-ml Erlenmeyers containing 190 ml of trace L.C. After sterilization and axenic seeding with 10 ml of a basic culture, the cotton-stoppered Erlenmeyers are placed on a gyratory shaker fixed at 150 rpm under 1500 lx and a 16/8 photoperiod.

Testing experiments are achieved on 125-ml special Erlenmeyers, with a lateral tube allowing an opacimetric measurement *in situ*. In every flask, 45 ml of liquid is added: either control medium or medium containing toxicant. After sterilization, an axenic inoculation is done with 5 ml of a 7-day preculture containing about  $14 \times 10^6$  algae/ml (OD = 0.4–655 nm). The toxicant—Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O—is added to the culture medium at different concentrations: 0, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 mg/liter. Growth is realized under the conditions described previously. Three replicates are done for each concentration. The cultures are stopped 5 days later and several measurements are taken.

1.2. Methods

1.2.1. Measurement of cultures growth. The first method uses opacimetry *in situ* by way of the special Erlenmeyer device. The light transmission reading is undergone at 665 nm.

The second method is a cell count using the particulate Coulter counter, Model ZB<sub>C</sub>, with a multichannel size analyzer, C1000. The determination requires a 50-μl aliquot part diluted 500 times. Three successive counts are taken on each aliquot part. Then the 100-channel size analyzer gives the size histogram of particulates accumulated on the three successively realized counts. These data allow evaluation of the mean cellular volume and thereby calculation of the volume relative to biomass: 10 classes of 10 channels are selected on the C1000 and the median is defined for each class. The apparatus gives the number of cells in each class ( $x_i$ ); this number is multiplied by the volume of each median channel ( $v_i$ ). The mean cellular volume is obtained as

$$\bar{V} = \frac{\sum x_i \cdot v_i}{\sum x_i}$$

TABLE I  
CALCULATION OF IC<sub>50</sub> BY OPACIMETRY

Cadmium concentration in medium (mg/l)	Transmission					Optical density				
	Inoculum included		Inoculum excluded			Inoculum included			Inoculum excluded	
	T%	100% - T%	% Inhibition	85% - T%	% Inhibition	OD	0.372 - 0	% Inhibition	0.372 - 0.071	% Inhibition
0	42.50	57.50	0	42.50	0	0.372	0.372	0	0.301	0
0.1	44.25	55.75	3.0	40.75	4.1	0.354	0.354	4.8	0.283	6.0
0.5	54.75	45.25	21.3	30.25	28.8	0.262	0.262	29.6	0.191	36.5
1.0	58.50	41.50	27.9	26.50	37.6	0.233	0.233	37.4	0.162	46.2
1.5	63.50	36.50	36.5	21.50	49.4	0.197	0.197	47.0	0.126	58.1
2.0	65.50	34.50	40.0	19.50	54.1	0.184	0.184	50.5	0.113	62.4
3.0	68.00	32.00	44.3	17.00	60.0	0.167	0.167	55.1	0.096	68.1
IC <sub>50</sub> (mg/l)	—	—	4.70	—	1.75	—	—	2.10	—	1.10

**1.2.2. Culture levels of ATP and chlorophyll.** After DMSO extraction, the ATP is determined enzymatically with a Dupont apparatus (Luminescence Biometer 760). In contact with magnesium ions and ATP, luciferine is oxidized by atmospheric oxygen and the catalytic action of luciferase; during this reaction photons are liberated and the light intensity produced is proportional to the amount of ATP. One milliliter of each algal culture is used for measurement.

The amount of chlorophyll *a* is estimated after filtration on a 0.45- $\mu$ m Millipore membrane and methanolic extraction in the dark at 4°C. Methanol is used because it is much more efficient than ketone (Steeman-Nielsen, 1961). The OD of extracts is measured at 665 nm with a Perkin-Elmer 124 D spectrophotometer. The concentration is calculated according to Odum *et al.* (1958),

$$C_a = 13.4 \text{ OD}_{665},$$

where  $C_a$  is the concentration (mg/liter, of chlorophyll *a* in the methanolic extract.

**1.2.3. Cadmium determinations.** Ten milliliters of algal culture is filtered as before on a Millipore membrane and washed twice with bidistilled water. The filter is mineralized according to the technique of Boudene *et al.* (1976). Determinations are done by atomic absorption (Perkin-Elmer 305 B) with a deuterium lamp and HGA 76 furnace. An automatic injection system, AS 1, insures good reproducibility. The operating conditions are summarized in the following.

Wavelength (nm)	228.8
Slit setting (nm)	1
Argon pressure (bars)	3
<hr/>	
Primary phase: Drying	100°C for 30 sec
Secondary phase: Matrix destruction	350°C for 20 sec
Tertiary phase: Atomization	1800°C for 10 sec

## 2. RESULTS

### 2.1. Measurements of Cultures Growth

**2.1.1. Opacimetry.** Transmission percentages ( $T\%$ ) are measured for each sample. The mean values for different concentrations of cadmium in the medium and for conversion in optical density are given in Table 1. One has now to consider the method of calculation of the IC<sub>50</sub>. The percentage of inhibition is calculated in such a way that the IC<sub>50</sub> is "the concentration inhibiting 50% of the growth compared to control." But it is also necessary to take into account the light absorption of the inoculum, that is, the percentage of transmission measured at the beginning of the test. Under our experimental conditions, that is not negligible ( $T = 85\%$ ; OD = 0.071).

In Table 1 the basic data ( $T\%$  and OD), whether the percentage of inhibition calculated is taken into account, or not, the opacimetry values of the control at Day 0 are given. The values are then plotted on semilogarithmic coordinates against the corresponding cadmium concentration in the medium. Determination of the IC<sub>50</sub> is done graphically: Figs. 1a and b show the curves. When the inoculum is not taken into account, the IC<sub>50</sub> is estimated at 4.7 mg/liter ( $T\%$ ) and at 2.1 mg/liter (OD); in the other case the calculated values are much lower: 1.75 mg/liter ( $T\%$ ) and 1.1 mg/liter (OD).

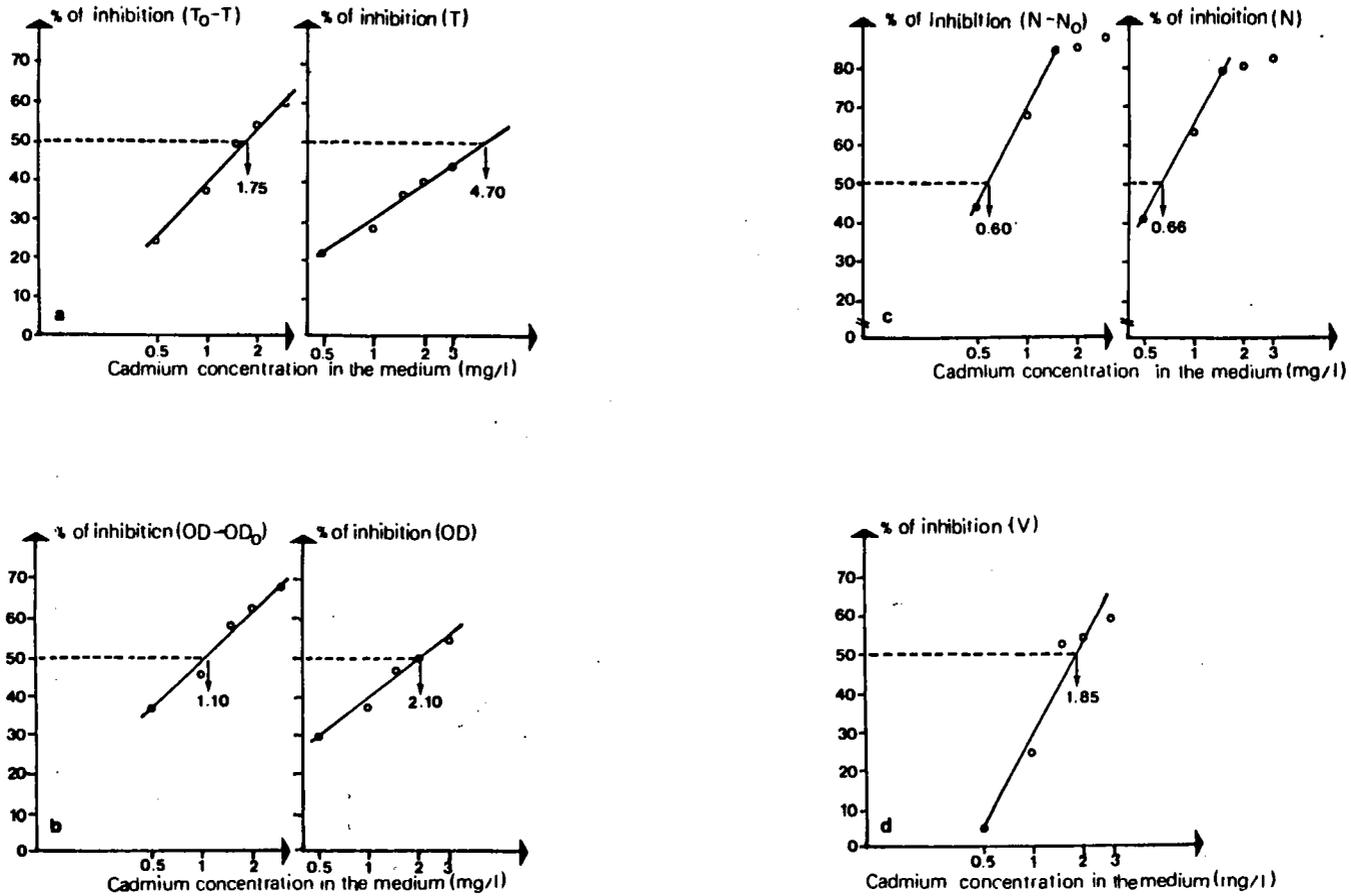


FIG. 1. IC<sub>50</sub> determinations according to different parameters. Opacimetry: (a) transmission and (b) optical density. (c) Cell count. (d) Volume relative to biomass.

TABLE 2  
CALCULATION OF IC<sub>50</sub> BY CELL COUNT

Cadmium concentration in medium (mg/l)	Inoculum included		Inoculum excluded	
	Number of cells ( $\times 10^{-6}$ /ml)	% Inhibition	Number of cells ( $\times 10^{-6}$ /ml)	% Inhibition
0	20.15	0	18.97	0
0.1	16.86	16.3	15.68	17.4
0.5	11.77	41.6	10.59	44.2
1.0	7.32	63.7	6.14	67.7
1.5	4.24	79.0	3.06	83.9
2.0	4.02	80.1	2.84	85.0
3.0	3.59	82.2	2.41	87.3
IC <sub>50</sub> (mg/l) graphically determined		0.66		0.60

2.1.2. *Cell count with the Coulter counter.* According to the observations made for previous IC<sub>50</sub> determinations, the percentages of inhibition are again determined, excluding or including the cell count of the control at Day 0 (Table 2). Figure 1c shows the IC<sub>50</sub> graphic determinations obtained by two different methods of calculation: 0.66 mg/liter when inoculum is included, and 0.60 mg/liter in the opposite case.

The size analyzer C1000 gives the size histogram of the algae in culture, thereby providing a mean estimate of the volume relative to biomass (Table 3). Figure 1d represents the IC<sub>50</sub> graphic determination by variations of this volume and is evaluated at 1.85 mg/liter.

## 2.2. ATP and Chlorophyll *a* Culture Contents

The mean values of ATP and chlorophyll *a* levels in algae are expressed in micrograms per milliliter. Values of inoculum at Day 0 are taken into account and

TABLE 3  
CALCULATION OF IC<sub>50</sub> BY VOLUME OF THE BIOMASS

Cadmium concentration in medium (mg/l)	Mean cellular volume ( $\mu\text{m}^3$ )	Volume of the biomass ( $\times 10^3 \text{ mm}^3/\text{ml}$ )	Percentage inhibition
0	16.0	303.5	0
0.1	18.9	296.4	2.3
0.5	27.2	288.0	5.1
1.0	37.5	230.3	24.1
1.5	47.2	144.4	52.4
2.0	49.1	139.4	54.1
3.0	52.3	126.4	58.4
IC <sub>50</sub> (mg/l)			1.85

TABLE 4  
CALCULATION OF IC<sub>50</sub> BY ATP AND CHLOROPHYLL LEVELS

Cadmium concentration in medium (mg/l)	ATP (μg/ml)	Percentage inhibition	Chlorophyll (μg/ml)	Percentage inhibition
0	0.295	0	3.18	0
0.1	0.235	20.3	3.07	3.4
0.5	0.200	32.2	2.64	16.9
1.0	0.167	45.1	2.29	27.9
1.5	0.144	51.2	1.38	56.5
2.0	0.133	54.9	0.98	69.2
3.0	0.123	58.3	0.64	79.9
IC <sub>50</sub> (mg/l) graphically determined		1.5		1.4

the inhibition percentages are calculated with respect to the control (Table 4). The IC<sub>50</sub>, always determined graphically, are estimated at 1.5 mg/liter according to ATP level and 1.4 according to chlorophyll *a* level (Fig. 2).

2.3. Cadmium Determinations

The cadmium concentrations in chlorellae are expressed in micrograms per gram of dry material (Table 5). Concentration factors corresponding to each concentration of cadmium in the medium may be calculated as follows:

$$F_c = \frac{\text{cadmium concentration in the weight unit of dry tissue}}{\text{cadmium concentration in the same unit of water}}$$

These concentration factors are of the same order of magnitude in the selected cadmium concentrations in the medium.

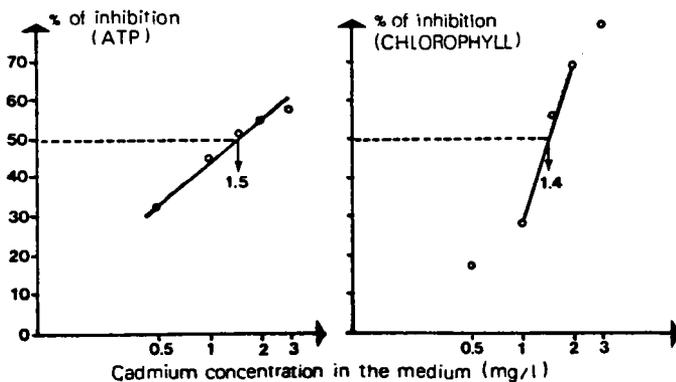


FIG. 2. Graphic determinations of IC<sub>50</sub> with respect to ATP and Chlorophyll concentrations.

TABLE 5  
CADMIUM CONCENTRATION IN ALGAL TISSUE

Cadmium concentration in medium (mg/l)	Cadmium concentration in chlorellae (µg/g dry material)	Concentration factor
0	3	—
0.1	495	4950
0.5	2,990	5980
1.0	6,940	6940
1.5	12,470	8315
2.0	15,150	7575
3.0	20,020	6675

### 3. DISCUSSION AND CONCLUSION

This series of experiments shows that some discrepancy exists in the cadmium IC<sub>50</sub> determinations, on *Chlorella vulgaris* taken as an example. With respect either to the parameters chosen for the measurements or to the methods of calculation (Table 6).

Very important variations are observed with opacimetry depending on whether the inoculum on the first day is taken in account or not. This is not true for the cell count with the Coulter apparatus. In fact, in this last case, "the weight" of the correction due to the count on the first day is small (about 6%); on the contrary the "weight" of this correction is important for opacimetric determinations (35% for T%, 19% for OD).

The first biological parameter considered, i.e., opacimetry, is easy to measure and fast using the modified Erlenmeyers. It is interesting to note that the IC<sub>50</sub> calculated from the same basic data, but expressed either in transmission or in optical density, varies from 1.10 to 1.75 mg/liter. These variations can be easily explained because the scale of transmission is linear and also because the optical density scale is logarithmic.

TABLE 6  
COMPARISON OF DIFFERENT IC<sub>50</sub> CALCULATED

Parameter used	Inoculum	
	Included	Excluded
Opacimetry		
Transmission	4.70	1.75
Optical density	2.10	1.10
Cell count	0.66	0.60
Volume of the biomass	—	1.85
ATP level	—	1.50
Chlorophyll level	—	1.40

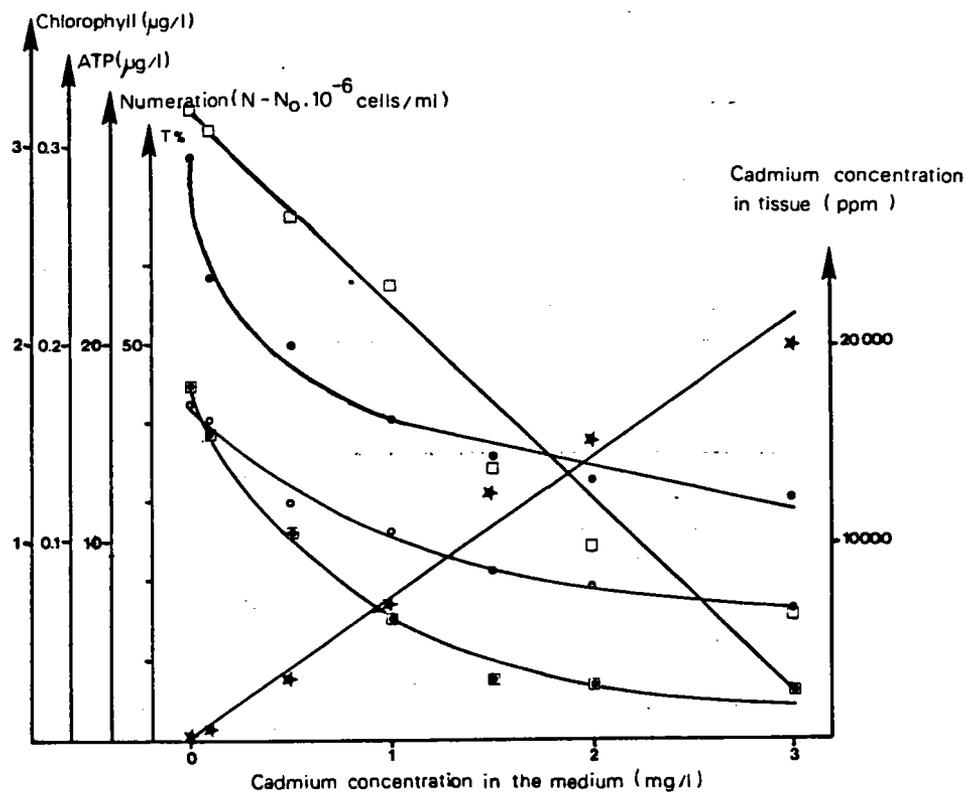


FIG. 3. Evolution of studied parameters.

The cell count gives, compared to opacimetry, IC<sub>50</sub> values surprisingly much lower. Looking at Figure 3, one may see that the count is strongly affected, much more than the transmission; also a good correlation exists between these two parameters in control algal cultures ( $r^2 = 0.982$ ).

The mean cellular volume in the cultures increases in populations with increasing concentration of cadmium ions in the medium, which is in good agreement with the

TABLE 7  
DETERMINATION OF QUANTITIES OF ATP AND CHLOROPHYLL  
ACCORDING TO DIFFERENT EXPRESSIONS

Cadmium concentration in medium (mg/l)	ATP			Chlorophyll		
	µg/ml	µg/10 <sup>9</sup> cells	µg/mm <sup>3</sup>	µg/ml	µg/10 <sup>9</sup> cells	µg/mm <sup>3</sup>
0	0.295	15.6	0.98	3.18	167.6	10.5
0.1	0.235	15.0	0.79	3.07	195.8	10.4
0.5	0.200	18.9	0.69	2.64	249.3	9.2
1.0	0.162	26.4	0.70	2.29	373.0	9.9
1.5	0.144	47.1	1.00	1.38	451.0	9.6
2.0	0.133	46.8	0.95	0.98	345.1	7.1
3.0	0.123	51.0	0.98	0.64	265.6	5.1

inhibiting effect of the metal on cell division and subsequent increasing predominance of larger cells (Ferard *et al.*, 1977). This determination not only is valuable for estimation of the volume relative to the biomass, but also gives useful data for interpretation of the ATP and chlorophyll *a* levels in the algae.

The IC<sub>50</sub> calculation based on the ATP concentration per milliliter of cultures took into account the inoculum values at the beginning of the test. However, if these results are compared to cell counts, one may see that the ATP quantities contained in the same number of algae, i.e., 10<sup>9</sup> cells, vary and increase with increasing cadmium concentration in the medium. This fact is highly surprising according to the literature (Younes *et al.*, 1975; Silverberg, 1976). But it is evident that the ATP level in a cell is, in part, a function of its volume. Table 7 shows the steps in the calculations used to estimate the mean quantities of ATP contained per cubic millimeter of alga. These ATP levels per volume unit became quite the same in each case and look then independent of the cadmium concentration in the medium at the chosen concentration, even close to the IC<sub>50</sub>.

The same kind of calculations can be done for chlorophyll *a*. When this pigment was estimated in micrograms per number of cells, its concentration also increased when cadmium concentration in the medium increased to 1.5 mg/liter. If the chlorophyll is estimated as micrograms per cubic millimeter of alga, the levels are quite constant. For two higher concentrations (2 and 3 mg/liter), the chlorophyll levels in the alga decrease, and also the ATP levels remain normal.

Returning to IC<sub>50</sub> determination, Table 6 shows that close values are obtained using opacimetry in transmission (1.75 mg/liter), volume of the biomass (1.85 mg/liter), ATP level (1.5 mg/liter), and chlorophyll *a* level (1.4 mg/liter). It would be fair to choose the simplest method (opacimetry). However (Fig. 3), measurement of chlorophyll, a biological parameter, and cadmium concentration in the tissues, an analytical parameter, are two criteria which vary linearly, but in opposite directions according to increasing concentration of cadmium in the medium; this is not the case for the other biological parameters. The chlorophyll determination seems to show better the bioaccumulation of chlorellae.

## REFERENCES

- BOUDENE, C., *et al.* (1976). Etude des taux de plomb dans l'air et dans la population en France. *Arch. Hig. Rada i Toxikol.* **26**, 179-189.
- FERARD, J. F., *et al.* (1977). Intérêt du COULTER COUNTER pour l'étude des effets toxiques au niveau de la chlorelle: exemple du cadmium et du benzène. Congress of French Association of Limnology, Metz, May 1977.
- ODUM, H. T., *et al.* (1958). The chlorophyll "A" of communities. *Pub. Inst. Mar. Sci.* **5**, 65.
- SILVERBERG, B. A. (1976). Cadmium-induced ultrastructural changes in mitochondria of freshwater green algae. *Phycologia* **15**(2), 155-159.
- STEEMAN-NIELSEN, E. (1961). Chlorophyll concentration and rate of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. *Physiol. Plant.* **14**, 868-876.
- YOUNES, A., *et al.* (1975). Effet du cadmium sur le métabolisme énergétique des mitochondries de coeur de rat. In *Report of the Congress on Contamination of Biological Chains, Toulouse*, Collection "Environment-Research" of the Life Quality Ministry, No. 1, pp. 119-122.

C H A P I T R E     I I I



BIOSORPTION DU CADMIUM PAR LES CHLORELLES  
DIFFERENCIATION DE L'ADSORPTION ET DE L'ABSORPTION

CHAPITRE III  
BIOSORPTION DU CADMIUM PAR LES CHLORELLES  
DIFFERENCIATION DE L'ADSORPTION ET DE L'ABSORPTION

III.1 - MATERIEL ET METHODES

III.1.1 - Le matériel biologique

Les essais sont réalisés sur des cultures algales en début de phase exponentielle de croissance menées dans des conditions expérimentales décrites précédemment (cf. chapitre II).

- a) les cultures sont âgées de 50 heures afin d'obtenir une biomasse suffisante pour les essais.
- b) Dans le cas où l'influence de l'âge des cellules est étudié, les cultures sont alors âgées de 47 ou de 53 heures, de façon à utiliser des cellules avant ou après division cellulaire.

Les solutions algales sont ajustées avant expérimentation à  $5,43 \pm 0,57 \cdot 10^6$  cellules/ml, avec du milieu oligo L.C. et à un pH de  $7,00 \pm 0,05$  par injection de  $\text{CO}_2$  gazeux.

III.1.2. Préparation de la verrerie.

L'ensemble de la verrerie utilisée est rincé successivement avec une solution d'acide chlorhydrique à 10 % et avec de l'eau distillée, puis séché (cf. § II.1.1.2).

Les tubes en polyéthylène utilisés pour les expérimentations (LABO EXPRESS SERVICE 062) sont lavés à l'eau distillée puis séchés avant d'être utilisés. Le reste du matériel est constitué de matériel à usage unique.

III.1.3. Réactifs

- (1) Les réactifs sont de qualité analytique reconnue
- (2) La solution stock de cadmium est une solution de nitrate de cadmium commerciale (FLUKA, 20895) à  $1\text{g Cd}^{++}/\text{l}$  ( $\pm 0,3\%$ ) ajustée à pH 1,5 avec de l'acide nitrique (0,036 N). Cette solution est utilisée à la fois pour les expérimentations et les dosages.

### III.1.4 - Protocole d'étude utilisé.

#### III.1.4.1. Principe :

Le principe de la méthode repose sur l'utilisation d'un chélatant : l'EDTA. Le cadmium désorbé par l'EDTA est alors assimilé au cadmium adsorbé sur ou dans la paroi algale, tandis que le cadmium non désorbé après lavage à l'EDTA est assimilé au cadmium absorbé.

#### III.1.4.2. Mode opératoire

La méthodologie employée est résumée sur la figure 18. Elle est inspirée de la technique utilisée par BATES et al. (1982) que nous avons légèrement modifiée. Des parties aliquotes (10 ml) de la solution algale de départ sont introduites dans les tubes de polyéthylène (contenance 20 ml) ; au moins 3 répétitions sont réalisées.

Un second groupe de tubes (avec le même nombre de répétitions) reçoit, quant à lui, 10 ml de milieu oligo L.C.. Ce groupe a pour but de prendre en compte l'adsorption du cadmium sur les parois des tubes.

Les 2 groupes de tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 2300 g. Les surnageants sont soigneusement éliminés. Cette étape d'élimination du milieu de culture est nécessaire pour éviter la présence d'agents chélatants éventuels produits par les algues. (SWALLOW et al., 1978 ; VAN DEN BERG et al., 1979). Les 2 groupes de tubes-essais (contenant les culots algals) et témoins (sans culots algals) sont placés dans un bain thermostaté à  $20 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ . 10 ml de solution d'oligo L.C. contenant du nitrate de cadmium, à la concentration voulue, sont introduits dans chaque tube. Lors de cette addition, les culots sont agités sur un agitateur giratoire de façon à ce que les algues se remettent en suspension. Après 10 minutes (ou pour certaines expérimentations, 120 minutes) les tubes sont à nouveau centrifugés pendant 10 minutes à 2300 g.

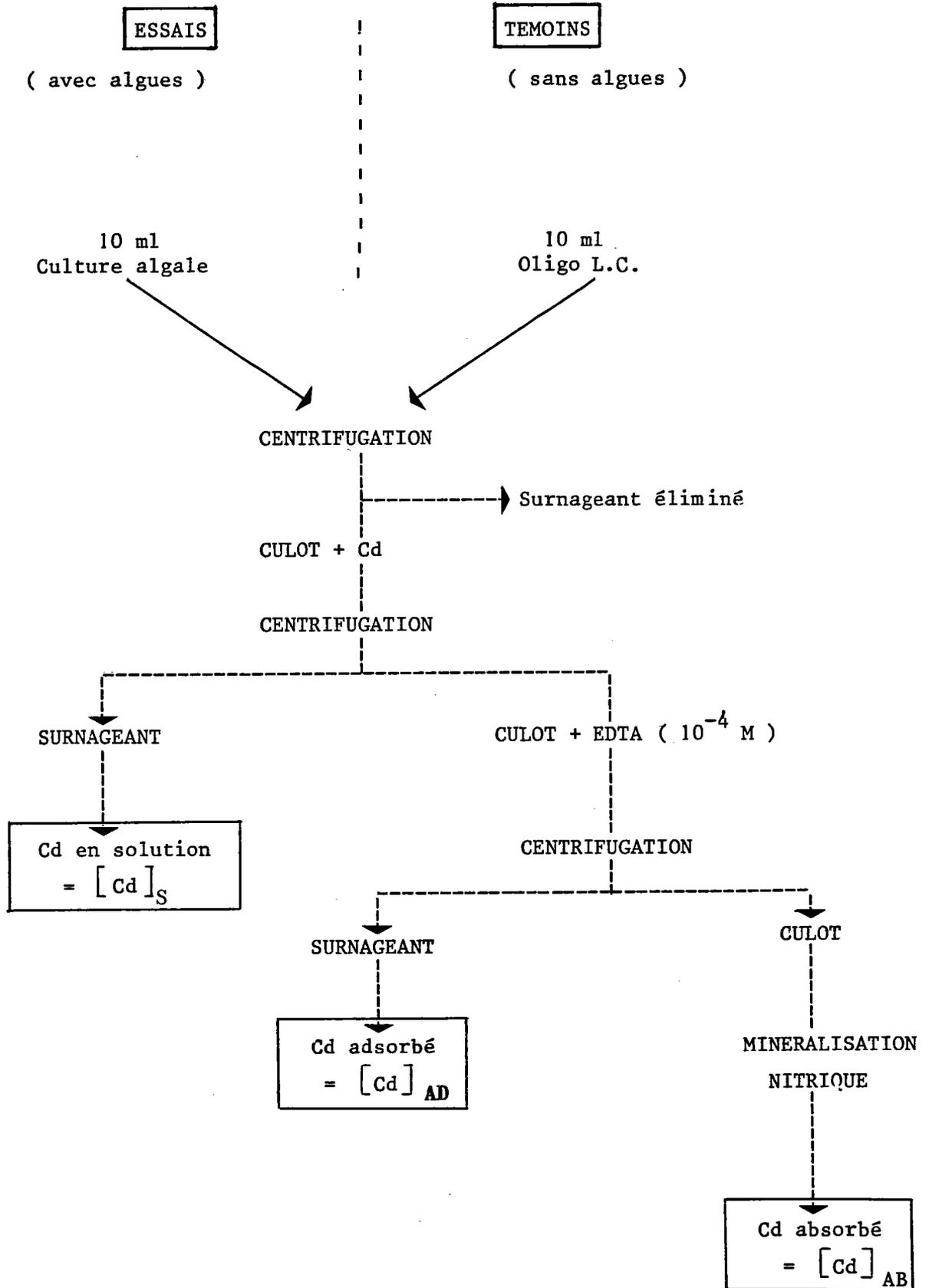


FIG. 18 : SCHÉMA DU MODE OPÉRATOIRE CORRESPONDANT À LA MÉTHODE PAR DÉSORPTION UTILISÉE.

Après quoi, 1 ml de chaque surnageant est prélevé aux fins d'analyse dont le résultat fournira la concentration de cadmium restant en solution, soit  $[Cd]_S$  (fig. 18).

Après détermination des surnageants restant, les culots sont ensuite remis en suspension par ajout de 10 ml de solution d'oligo L.C. contenant  $10^{-4}$  M (ou  $10^{-3}$  M) d'EDTA disodique (MERCK 8418). L'action de l'EDTA est étudiée dans les mêmes conditions de temps (10 minutes) et de température (20°C) que le contact avec le cadmium. Après centrifugation, 1 ml est à nouveau prélevé dans chaque surnageant pour analyse, ce qui va permettre de déterminer la concentration de cadmium extraite par l'EDTA, soit  $[Cd]_{AD}$  (fig. 18). Dans une expérimentation, ce lavage à l'EDTA a été répété une seconde fois.

Après avoir éliminé le surnageant de chaque tube, les culots algals sont minéralisés et dosés pour fournir la concentration de cadmium restant après extraction par l'EDTA, soit  $[Cd]_{AB}$  (fig. 18).

L'intérêt d'un tel protocole où toutes les opérations se font dans le même tube, est de permettre la réalisation de séries d'essai importantes, tout en limitant les contaminations, particulièrement à redouter dans le cas du cadmium.

III.1.4.3. Corrections (voir Annexes I, II, III et IV).

III.1.4.4. Calculs des quantités de cadmium adsorbé, absorbé et biosorbé.

(1) Les différentes corrections étant réalisées, la quantité de cadmium adsorbé est obtenue par la différence ( $[Cd]_{AD}$  essai -  $[Cd]_{AD}$  témoin) ramenée au volume de 10 ml. Si, par exemple :

$$\begin{aligned} [Cd]_{AD} \text{ essai corrigé} &= 143,44 \\ [Cd]_{AD} \text{ témoin corrigé} &= 1,84 \end{aligned}$$

Le calcul est le suivant :

$$\frac{143,44 - 1,84}{100} = 1,416 \mu\text{g Cd.}$$

Un tel calcul permet ainsi de tenir compte des quantités de cadmium adsorbé par les parois du tube ( $\approx 1,3$  % dans ce cas par rapport au cadmium adsorbé par les algues).

Il suffit ensuite de calculer le nombre de nanomoles correspondantes (soit 12,6) et de diviser par le poids sec correspondant à 10 ml de solution algale introduite au début de l'expérimentation (0,570 mg). Dans l'exemple traité, la quantité de cadmium adsorbé trouvée est de 22,10 nmoles Cd par mg de matière sèche.

(2) La quantité de cadmium absorbé est calculée de façon identique, en utilisant la formule suivante :  $[Cd]_{AB}$  essai -  $[Cd]_{AB}$  témoin.

soit avec  $[Cd]_{AB}$  essai corrigé : 2,31  
 $[Cd]_{AB}$  témoin corrigé : 0,39

$$\frac{2,31 - 0,39}{100} = 0,0192 \mu\text{g Cd}$$
$$= 0,17 \text{ nmoles pour } 0,570 \text{ mg de matière sèche.}$$

La quantité de cadmium adsorbée est donc égale à 0,30 nmoles Cd par mg de matière sèche.

3) La quantité de cadmium biosorbé est simplement calculée en faisant la somme du cadmium adsorbé et absorbé.

4) Le calcul des incertitudes sur les concentrations de cadmium adsorbé, absorbé et biosorbé est détaillé dans l'Annexe V.

Nous ne rappellerons ici, que les résultats finaux, de l'expérience présentée, à savoir :

$$[Cd] \text{ adsorbé} = 22,10 \pm 3,51 \text{ nmoles Cd/mg P.S.}$$
$$\text{C.V.} = 15,9 \%$$

$$[Cd] \text{ absorbé} = 0,30 \pm 0,07 \text{ nmoles Cd/mg P.S.}$$
$$\text{C.V.} = 24,9 \%$$

$$[Cd] \text{ biosorbé} = 22,40 \pm 3,51 \text{ nmoles Cd/mg P.S.}$$
$$\text{C.V.} = 15,7 \%$$

Sans vouloir empiéter sur la discussion, les coefficients de variation obtenus situés entre 15 et 25 % restent du domaine de l'acceptable, compte-tenu de toutes les corrections et calculs réalisés (cf. Annexe V).

#### III.1.4.5. Calculs des concentrations de cadmium restant en solution.

La concentration de cadmium restant en solution est calculée à partir de moyenne normalisée (voir Annexe V). L'incertitude sur le résultats exprimé en mole/l est la suivante :

$$7,60 \pm 0,36 \mu\text{M} - \text{C.V.} = 4,7 \%$$

#### III.1.4.6. Modifications apportées à la méthodologie de BATES et al.,(1982).

En ce qui concerne les conditions opératoires, nous avons réalisé nos expérimentations sous une luminosité ambiante (au lieu de l'obscurité) de façon à se situer dans des conditions de luminosité moyenne (environ 500 lux). Les milieux d'intoxication (Cd) et de désorption (EDTA) ont été réalisés dans le même milieu (oligo L.C.) de façon à éviter tous problèmes de choc osmotique.

Par comparaison à la méthodologie utilisée par BATES et al. (1982), la correction de liquide résiduel est plus faible : 5,44  $\mu\text{l}$  au lieu de 38  $\mu\text{l}$  (cf. Annexe II). De plus, il n'y a nul besoin de correction pour la perte de cellules au cours de l'élimination des surnageants et celà du fait de la technique utilisée (vitesse de centrifugation plus élevée : 2300 g au lieu de 500 g).

Nous avons introduit une correction supplémentaire correspondant au cadmium résiduel après lavage à l'EDTA, ainsi que l'utilisation de tubes témoins de façon à tenir compte de l'adsorption du cadmium sur les parois des tubes.

### III.1.5 - Déterminations analytiques

(1) Le cadmium est dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme (PERKIN ELMER 405 B équipé d'un four HGA-76, d'un passeur automatique AS 1 et d'une lampe à deutérium pour correction non spécifique). Les échantillons correspondant aux différents surnageants sont placés dans des tubes de polypropylène (LABO EXPRESS SERVICE ; TC 1,5) et dosés directement sans minéralisation préalable dans les 24 heures. Les concentrations de cadmium sont déterminées par comparaison à une gamme étalon.

Les échantillons d'algues, minéralisés, sont analysés le jour J + 2. Les tubes contenant les culots algals sont placés à 65°C pendant un minimum de 12 heures. 0,2 ml d'acide nitrique suprapur (MERCK, 441) sont ajoutés aux résidus secs. Les tubes sont bouchés et placés pendant 12 heures à la même température dans un dispositif spécial qui permet d'éviter le départ du bouchon et de maintenir les tubes fermés durant toute la minéralisation. Après refroidissement, les résidus de minéralisation sont complétés avant le dosage à 10 ml par ajout de 9,8 ml d'eau distillée.

Ces minéralisats sont dosés par la méthode des ajouts. Le résultat d'un témoin (au moins) minéralisé dans les mêmes conditions, et contenant 0,2 ml d'acide nitrique, est retranché des valeurs obtenues. La sensibilité et la reproductibilité des déterminations analytiques sont fournies en Annexe VI.

(2) Les numérations cellulaires et les volumes moyens cellulaires sont déterminés selon des techniques précédemment exposées (TRUHAUT et al., 1980)

(3) Le poids de matière sèche est mesuré à l'aide d'une balance METTLER modèle H51. 50 ml de solution algale sont filtrés sur un filtre MILLIPORE (HAWP - 47 mm de diamètre - 0,45 um) pré-seché et pré-pesé. Puis le filtre est séché à 65°C pendant 24 heures avant d'être à nouveau pesé.

### III.2. RESULTATS

#### III.2.1. Etude de l'adsorption et de l'absorption en fonction du temps.

Nous avons étudié, pour une concentration de cadmium introduit égale à 100 µg/l, soit 0,89 µM, deux modalités correspondant au temps d'incubation des algues en présence de cadmium : 10 minutes (condition standard) et 120 minutes.

La figure 19 illustre l'augmentation de diverses variables en fonction du temps. Il y a une augmentation des différentes composantes de la biosorption mesurée entre 10 et 120 minutes. Toutefois, les augmentations de 9 % pour la biosorption, de 8,3 % pour l'adsorption et de 53 % pour l'absorption ne sont pas significatives \* au seuil de 5 %, compte-tenu de la variabilité des résultats.

Il s'avère donc qu'après 10 minutes d'incubation, le phénomène d'adsorption ait quasiment atteint son équilibre et qu'il ne varie plus guère. Par contre, l'augmentation de 53 % de l'absorption entre 10 et 120 minutes, bien qu'elle ne soit pas significative, semble indiquer que ce processus n'atteint pas son équilibre durant les deux heures d'expérimentation.

#### III.2.2. Etude de la capacité de désorption de différentes solutions molaires d'EDTA.

Nous avons volontairement utilisé pour cette expérience, une concentration de cadmium très élevée, à savoir 100 mg/l (0,89 mM), afin de vérifier expérimentalement si les capacités de désorption de l'EDTA 0,1.mM étaient suffisantes.

Nous avons testé deux solutions d'EDTA, l'une à 0,1 mM et l'autre à 1 mM, et ce, afin de voir si les capacités de désorption des deux solutions étaient différentes. Les valeurs de  $[Cd]_{AD}$  et de  $[Cd]_{AB}$  retrouvées sont tout-à-fait comparables et il n'y a pas de différence significative entre les deux modalités (Tableau XXVII).

\* en comparant le t calculé (avec la moyenne des 2 variances) par la formule qui suit au t trouvé dans la table de t :

$$t = \frac{\text{moyenne 1} - \text{moyenne 2}}{\sqrt{\frac{\text{variance commune}}{n} + \frac{\text{variance commune}}{n'}}$$

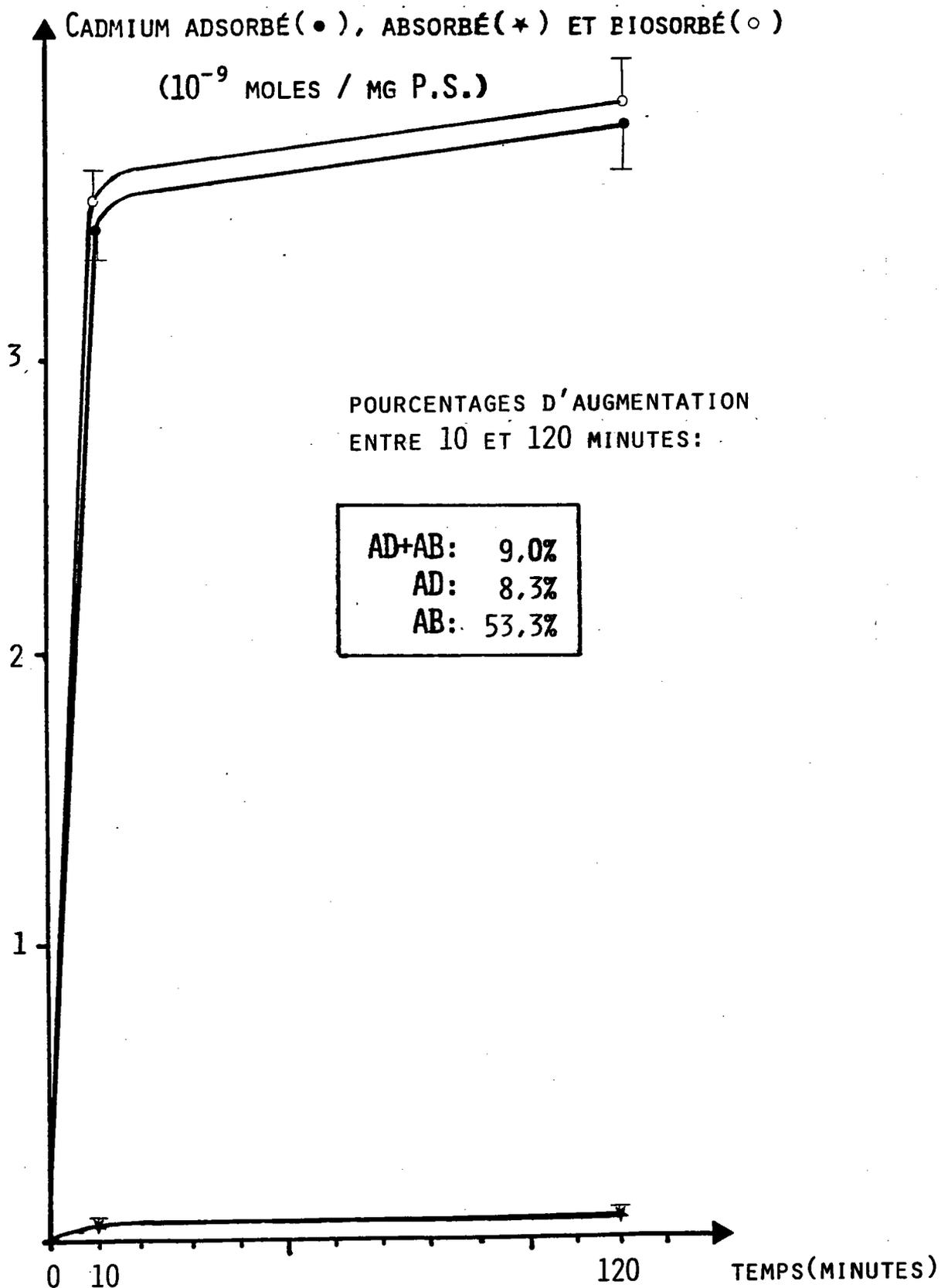


FIG. 19: EVOLUTION DE L'ADSORPTION, DE L'ABSORPTION ET DE LA BIOSORPTION DU CADMIUM ENTRE 10 ET 120 MINUTES. LES TRAITES REPRESENTENT 1 ECART-TYPE.

Molarité de la solution d'EDTA utilisée	Cd adsorbé ± écart-type (nmoles/mg P.S.)	Cd absorbé ± écart-type (nmoles/mg P.S.)
10 <sup>-3</sup>	205,86 ± 31,25	2,32 ± 0,98
10 <sup>-4</sup>	199,84 ± 29,99	2,47 ± 0,61

Tableau XXVII : Comparaison de la capacité de désorption de deux solutions d'EDTA de molarité différente (intoxication à 100 mg/l ; P.S. = 372 µg pour 10 ml de solution algale).

Dans les expérimentations qui suivent, nous avons préféré utiliser l'EDTA 0,1 mM, d'autant que les solutions de cadmium testées sont au moins 10 fois moins concentrées.

### III.2.3. Effet du milieu d'incubation utilisé :

L'effet du milieu d'incubation a été testé à deux concentrations 10 µg/l (89 nM) et 10 mg/l (89 µM) de cadmium, à pH non ajusté.

A 10 µg/l, lorsque l'on remplace le milieu oligo L.C. par de l'eau distillée, l'adsorption et l'absorption augmentent simultanément. L'adsorption est multipliée par un facteur 2, tandis que l'absorption est multipliée par un facteur 4 (fig. 20). Dans les deux cas, la différence est significative au seuil de 5 %.

A 10 mg/l, il y a aussi une augmentation significative (α = 5 %) de l'adsorption et l'absorption, mais moindre que précédemment, de l'ordre de 1,30 dans les deux cas (fig. 20).

Ces résultats montrent qu'il y a compétition avec un ou plusieurs oligo-éléments majeurs entrant dans la composition du milieu oligo L.C., à savoir le magnésium, le calcium ou le potassium, compétition dont les effets sont plus marqués à 10 µg/l qu'à 10 mg/l.

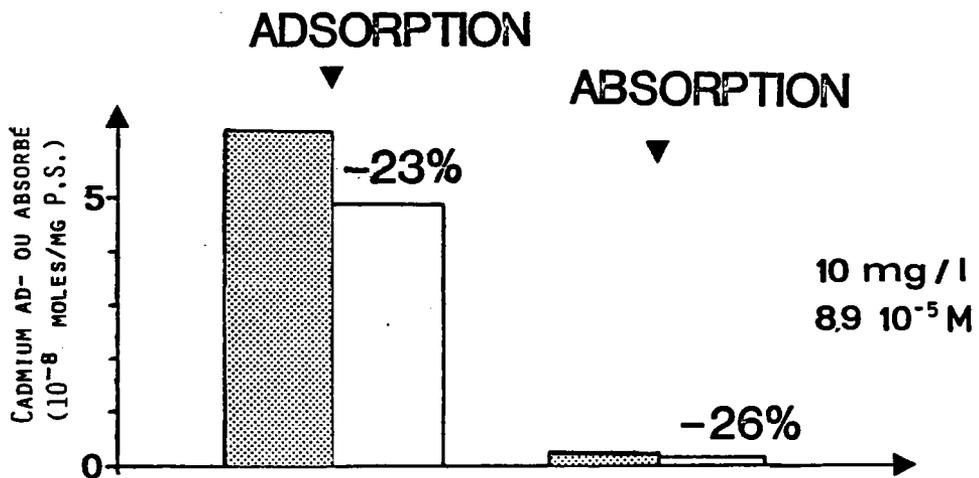
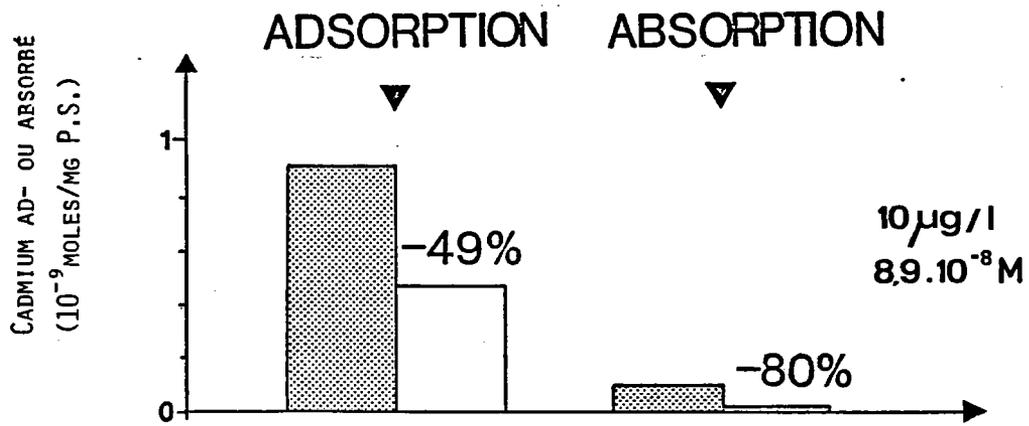


FIG. 20 : DIFFERENCES OBSERVEES ENTRE DEUX MILIEUX D'INCUBATION DIFFERENTS A 10 µg/L ET 10 mg/L.



EAU DISTILLÉE



OLIGO L.C.

### III.2.4. Effet du potassium

Afin de tester la part respective des métaux monovalents et divalents dans cette compétition, le potassium a été ajouté au milieu oligo L.C. sous forme nitrate et à une concentration de 2,90 mM. L'effet de l'addition de potassium a été testé à 10 µg/l (89 nM) et 10 mg/l (89 µM) de cadmium.

Pour les deux concentrations envisagées, il n'y a pas de différence significative au seuil de 5 % entre les milieux avec ou sans potassium, que ce soit pour le cadmium adsorbé ou absorbé (Tableau XXVIII).

milieu test		Cadmium adsorbé ± écart-type (nmoles/mg P.S.)	Cadmium absorbé ± écart-type (nmoles/mg P.S.)
Cd <sup>++</sup>	K <sup>+</sup> mM		
10 µg/l 89 nM	0	0,449 ± 0,052	0,0206 ± 0,0064
	2,9	0,478 ± 0,049	0,0136 ± 0,0046
10 mg/l 89 µM	0	47,71 ± 5,07	2,23 ± 0,37
	2,9	43,72 ± 4,12	2,07 ± 0,31

Tableau XXVIII : Adsorption et absorption du cadmium avec ou sans potassium à deux concentrations différentes.

### III.2.5. - Etude de l'adsorption et de l'absorption en fonction de concentrations croissantes de cadmium introduit.

Nous avons étudié les deux paramètres - adsorption et absorption - dans deux conditions différentes de pH : pH non ajusté et pH ajusté. Dans le premier cas, le pH des solutions de cadmium diminue lorsque leurs concentrations en cadmium augmentent. Dans le second cas, le pH a été régulé à 7 par l'addition de potasse : par exemple, pour les plus fortes concentrations de cadmium testé (10 mg/l), la concentration de potassium dans le milieu était de 2,88 mM. Les résultats de l'expérience précédente montre qu'à cette concentration le potassium n'a pas d'effet significatif.

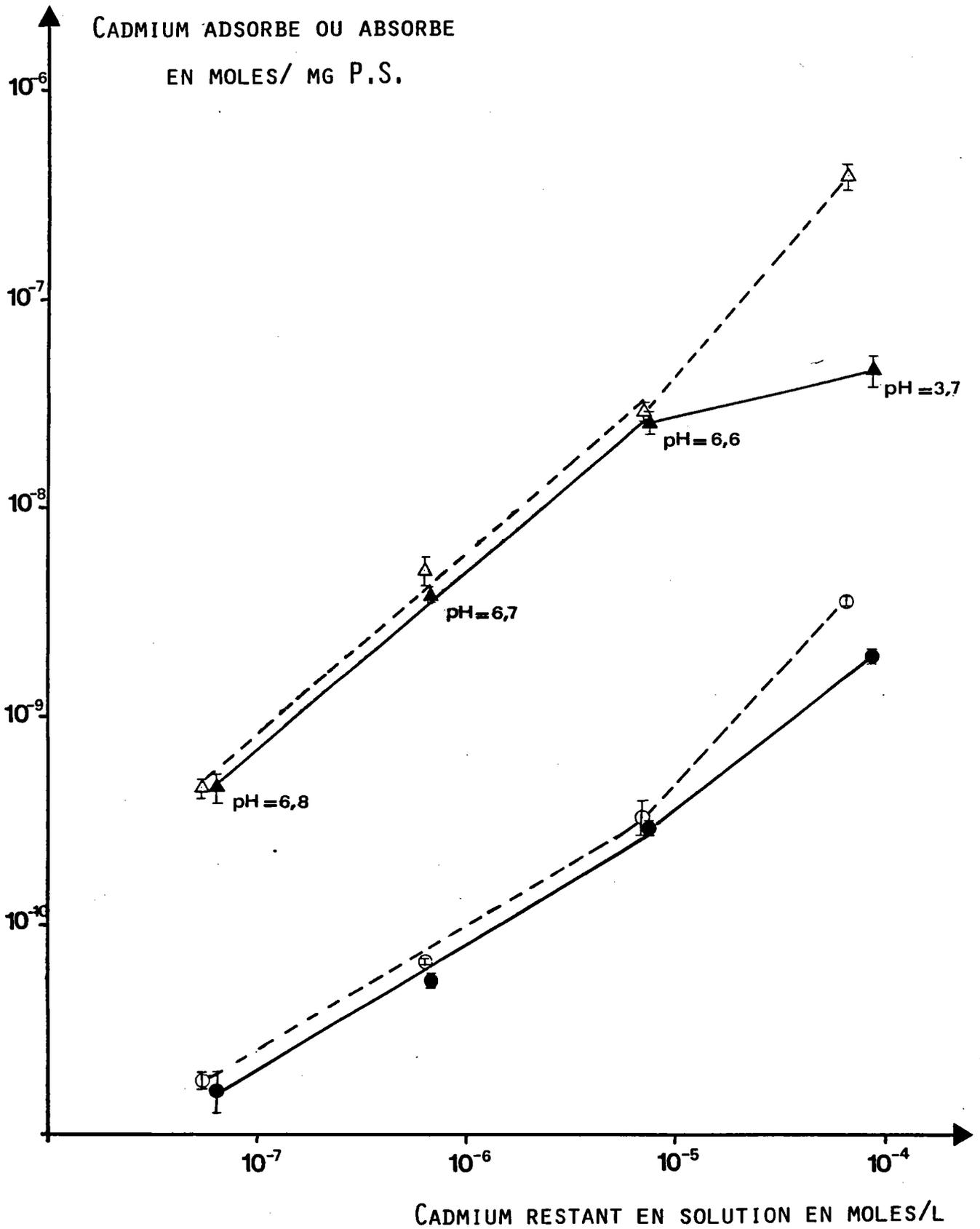


FIG. 21 : ADSORPTION ET ABSORPTION DU CADMIUM A PLUSIEURS  
CONCENTRATIONS AVEC ET SANS AJUSTEMENT DE pH  
( LES BARRES REPRESENTENT 1 ECART-TYPE ).

Chacune des concentrations testées (0,01 - 0,1 - 1 et 10 mg/l) a fait l'objet d'au moins 3 expérimentations différentes et les résultats moyens sont rassemblés sur la figure 21.

On distingue, dans les deux cas, deux zones selon que la concentration de cadmium retrouvée dans le surnageant  $[Cd]_S$  est inférieure ou supérieure à  $7,5 \mu M$  :

(1) pour une concentration de cadmium  $[Cd]_S$  inférieure à  $7,5 \mu M$ , l'adsorption suit un isotherme de FREUNDLICH linéaire en coordonnées log-log. La pente des droites est identique, que le pH soit ajusté ou non (tableau XXIX). Si la droite correspondant au pH ajusté est située au-dessus de celle correspondant au pH non ajusté, la différence entre les deux n'apparaît pas significative au seuil de 5 %.

	pH ajusté (= 7)	pH non ajusté
Cadmium adsorbé	$\log a = - 3,080$ $n = 0,857$ $r = 0,9967$	$\log a = - 3,268$ $n = 0,840$ $r = 0,9996$

Tableau XXIX : données des isothermes de FREUNDLICH (pour des concentrations introduites de cadmium allant de 89 nM à  $8,9 \mu M$ ).

Quant à l'absorption, les mêmes constatations restent valables : les pentes sont toutefois plus faibles que celles relatives à l'adsorption. La part respective de l'absorption diminue donc quand les concentrations introduites augmentent.

(2) Pour une concentration de cadmium  $[Cd]_S$  supérieure à  $7,5 \mu M$ , la pente des droites varie selon que le pH est ajusté ou non pour les deux phénomènes mesurés. Les différences sont significatives au seuil de 5 % pour les points correspondants à la plus forte concentration testée, 10 mg/l.

(a) L'adsorption tend vers une limite quand le pH n'est pas ajusté. Il y a saturation progressive des sites de fixation. L'équation de l'isotherme de LANGMUIR ajustée aux trois derniers points permet de déterminer que dans ces conditions on ne peut fixer plus de 51 nmoles Cd/mg de matière sèche.

A pH 7, la pente de la droite du même ordre de grandeur (voire légèrement supérieure) à celle de l'isotherme de FREUNDLICH précédemment déterminé, est nettement plus importante que lorsque le pH n'est pas ajusté, ce qui indique un changement de la capacité d'adsorption de la paroi algale en fonction du pH.

(b) L'absorption se trouve être légèrement augmentée lorsque  $[Cd]_s$  dépasse  $7,5 \mu M$ , on ne constate pas ici d'effet de saturation pour l'absorption à pH non ajusté.

### III.2.6. Effet de l'âge des cellules

Deux populations algales ont été testées. La culture 1 prélevée après 47 heures de culture se caractérise par une numération (avant dilution) de  $7,62 \cdot 10^6$  cellules/ml, tandis que la numération de la seconde culture arrêtée après 53 heures est de  $11,82 \cdot 10^6$  cellules/ml. Comparativement aux cellules de la culture 1, les cellules de la culture 2 sont plus petites comme l'indique leur volume moyen cellulaire et leur poids sec (tableau XXX). La variation de ces 3 paramètres indique qu'une partie de la population s'est divisée.

Le tableau XXX permet d'observer que l'adsorption augmente de 13 % et l'absorption diminue de 31 % avec des cellules de la culture 2, plus petites. Mais il faut rester prudent dans l'interprétation de ces résultats, compte-tenu qu'ils ne sont pas significativement différents au seuil de 5 %.

CELLULES EXPERIMENTEES	CULTURE 1	CULTURE 2
Volume cellulaire moyen (en $\mu\text{m}^3$ )	18,21	15,84
Poids sec (en pg)	8,18	7,13
ADSORPTION	100 %	113 %
ABSORPTION	100 %	69 %

**TABEAU XXX : Adsorption et Absorption de cellules avant (culture 1) et après division (culture 2).**

### III.3. DISCUSSION

(1) La méthode d'évaluation de l'adsorption et de l'absorption utilisée dans ce travail suppose que l'EDTA désorbe et chélate tout le cadmium adsorbé et non le cadmium absorbé. A cet égard, nous n'avons pas la preuve que l'EDTA ne puisse pas se complexer avec du cadmium déjà absorbé. Encore faudrait-il que le complexe EDTA-Cadmium puisse franchir vers l'extérieur le plasmalemma algal et cela en 10 minutes. Compte-tenu que le cadmium chélaté par l'EDTA est très faiblement et très lentement accumulé par les cellules au cours de leur croissance (COSSA, 1976), il est peu vraisemblable qu'en l'espace de 10 minutes, le cadmium désorbe ou complexe du cadmium déjà absorbé.

Quant à désorber tout le cadmium adsorbé, le calcul montre qu'en présence de 10 ml d'EDTA 0,1 mM, se trouve dans le milieu 1  $\mu$ moles d'EDTA qui peut complexer les ions divalents présents normalement dans le milieu oligo L.C. à savoir 1,69 mmoles de calcium et 1,22 mmoles de magnésium, ainsi que des quantités infimes de cuivre, zinc, cobalt, manganèse et fer (cf. Tableau XXI, chap. II). Le fer, en particulier, qui a une constante de stabilité très élevée, mais qui est en très faible quantité, ne va pas gêner la désorption du cadmium aux doses utilisées. Il en est de même pour les autres métaux qui ont des constantes d'association plus faibles que celles du cadmium. En fait, nous observons que l'EDTA désorbe entre 96 et 99 % du cadmium biosorbé et qu'en décuplant la quantité d'EDTA il n'y a pas de variation significative des quantités de cadmium adsorbé et absorbé (cf. Tableau XXVII). Le pourcentage de cadmium désorbé par l'EDTA est, de plus, comparable à celui obtenu par COSSA (1976) à l'aide de cystéine 2 mM, soit entre 96,5 et 98,3 %.

La technique utilisée constitue, actuellement, la moins mauvaise méthode de quantification de l'adsorption et de l'absorption. Elle a, de plus, l'avantage de quantifier les deux phénomènes et non pas de faire la différence entre la biosorption et l'adsorption pour obtenir l'absorption. Ce faisant, elle a l'inconvénient d'obtenir des résultats dont les coefficients de variation sont généralement compris entre 10 et 30 % compte-tenu des corrections utilisées et des variances qui s'additionnent à chaque correction.

(2) Le phénomène d'adsorption est quantitativement le plus important car l'absorption ne représente qu'un faible pourcentage de la quantité adsorbée (1 à 4 % selon les conditions expérimentales). L'adsorption est un phénomène rapide, moins de 10 minutes suffisent à saturer plus de 90 % des sites disponibles.

C'est un phénomène de surface caractérisé par un isotherme de FREUNDLICH au dessous de  $7,5 \mu\text{M}$  de cadmium restant en solution et par un isotherme de LANGMUIR au-dessus, à pH non régulé, ce qui confirme les résultats obtenus par GEISWEID et URBACH (1983), bien que ces auteurs aient trouvé dans des conditions expérimentales différentes un seuil de  $1 \mu\text{M}$  entre les deux types d'isotherme.

(3) Les caractéristiques de l'adsorption et de la biosorption sont très proches les unes des autres (Tableau XXXI). Ceci s'explique par la faible ampleur de l'adsorption.

	Isotherme de FREUNDLICH ( $< 7,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ )		Isotherme de LANGMUIR ( $> 7,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ )	
Caractéristiques	log a (ordonnée à l'origine)	n (pente)	b (mole/mg P.S.)	k (1/mole)
Cd adsorbé	- 3,27	0,840	$5,1 \cdot 10^{-8}$	$1,26 \cdot 10^5$
Cd biosorbé	- 3,29	0,835	$5,3 \cdot 10^{-8}$	$1,21 \cdot 10^5$

Tableau XXXI : Caractéristiques des isothermes relatifs à l'adsorption et à la biosorption du cadmium.

(4) Dans les conditions de l'expérimentation, la quantité maximale de cadmium susceptible de se biosorber est donc  $53 \text{ nmoles/mg P.S.}$  Si l'on veut comparer ce résultat à celui obtenu par GEISWEID et URBACH (1983), il est nécessaire d'exprimer ce résultat en moles/cellule. En prenant une numération moyenne de  $5,43 \cdot 10^6$  cellules/ml et un poids sec moyen de  $0,504 \text{ mg}$  pour  $10 \text{ ml}$  de solution algale, la biosorption est de  $0,49 \text{ fmoles Cd/cellule}$ , valeur inférieure à celle observée par GEISWEID et URBACH (1983), à savoir  $1 \text{ fmoles Cd/cellule}$ .

Toutefois, avant de conclure à une plus grande capacité de biosorption de la souche 202-7c utilisée par ces auteurs, il convient de signaler que le milieu d'incubation était constitué d'eau distillée. Or, nous avons pu observer que cette condition augmentait fortement l'adsorption et l'absorption, bien que cette augmentation soit moindre pour les fortes concentrations (10 mg/l) que pour les faibles (10 µg/l).

Quoiqu'il en soit, la quantité maximale de cadmium biosorbé (équivalent au CA mentionné dans le chapitre I) par la souche 211-11b que nous avons utilisée est de 6000 mg/Kg P.S. Cette donnée est très proche des 6100 mg/Kg P.S. observées par JENNETT et al., (1982), figurant dans le tableau XV (chapitre I). Par rapport aux autres espèces répertoriées dans ce même tableau les chlorelles semblent donc constituer un matériel excessivement performant du point de vue de la biosorption.

(5) Les résultats obtenus peuvent être également comparés aux données de la publication placée au chapitre II. Les concentrations de cadmium trouvées dans les algues après 5 jours de culture, sont beaucoup plus élevées, de l'ordre de 20.000 ppm pour 3 mg/l de cadmium introduit. Il est vraisemblable que les facteurs qui jouent dans l'augmentation des concentrations observées sont non seulement le temps qui peut jouer sur l'augmentation de l'absorption (fig. 19) mais surtout le pH des solutions qui tend à augmenter même si la croissance des cultures est fortement inhibée. Ainsi, lorsque le pH est ajusté à 7, la fig. 21 montre que le cadmium introduit pendant 10 minutes à une concentration de 10 mg/l (89 µM) provoque une augmentation importante de l'adsorption. Il est vraisemblable qu'il y a une compétition entre les protons et le cadmium signalée récemment par PETERSON et al. (1984). Toutefois, ceci ne permet pas d'expliquer l'augmentation de pente observée entre 1 et 10 mg/l. Ce phénomène pouvait être dû à une modification de la structure de la paroi algale entraînant une libération de sites de fixation préalablement cachés ou occupés.

(6) Quant aux autres données observées par GEISWEID et URBACH (1983), ils trouvent pour l'isotherme de FREUNDLICH, une pente (0,75) légèrement inférieure à celle que nous avons déterminée (0,835). Il en est de même pour la constante K de l'isotherme de LANGMUIR ( $5.10^4$  par rapport à  $1,2.10^5$ ).

(7) L'absorption suit une équation de type  $y = ax$  (cf. fig. 21) mais avec une pente plus faible que l'isotherme de FREUNDLICH déterminé pour l'adsorption. Pour les 3 concentrations testées (0,01, 0,1 et 1 mg/l), il existe une relation linéaire entre l'adsorption et l'absorption, dont l'équation est à pH non régulé :

$$y = - 1,2236 + 94,3464 x$$

Dans les conditions où le pH n'est pas ajusté l'absorption représente entre 1,1 et 3,5 % de l'adsorption. Il n'est donc pas étonnant que certains auteurs n'aient pas observé de différence entre la biosorption mesurée avec ou sans inhibiteurs métaboliques (SAKAGUCHI et al., 1979).

(8) Les deux phénomènes mesurés dans cette étude - adsorption et absorption - dépendent du nombre de paramètres (nature du milieu, âge des cellules...) En particulier, le cadmium biosorbé (ainsi que ses composantes) dépend de la concentration de métal introduite, ce qui explique que les coefficients d'accumulation ou les facteurs de concentrations (BITTEL et LACOURLY, 1970) souvent utilisés dans la littérature soient très variables (GEISWEID et URBACH, 1983) et qu'aucun de ces deux paramètres n'est vraiment satisfaisant. Le critère traduisant le mieux les capacités de fixation du matériel biologique utilisé est, en fait, la capacité maximale de biosorption du métal déterminée dans des conditions bien précises à l'aide d'isotherme de LANGMUIR.

C H A P I T R E    I V



ACTION DU CADMIUM SUR L'ATPase PLASMALEMMIQUE  
DE CHLORELLA VULGARIS

CHAPITRE IV  
ACTION DU CADMIUM SUR L'ATPase PLASMALEMMIQUE DE  
CHLORELLA VULGARIS

IV.1. - MATERIEL ET METHODES

IV.1.1. - Obtention des fractions plasmalemmiques

IV.1.1.1. - Cultures algales

L'obtention d'une fraction plasmalemmique en quantité suffisante nécessite de réaliser des cultures de masse. Celles-ci sont effectuées en erlenmeyer de 5 litres contenant, au départ, 2,7 l. de milieu nutritif stérile, auquel sont ajoutés 0,3 l. d'inoculum.

Ces cultures sont maintenues dans une enceinte thermostatée à une température de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Elles reçoivent un flux lumineux de 7000 lux ( $= 1,58 \cdot 10^{-4}$  joule  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) mesuré au niveau du support sur lequel repose l'erlenmeyer. La photopériode est de 16 heures de lumière et de 8 heures d'obscurité. L'agitation et l'oxygénation de ces cultures sont réalisées par bullage d'air (figure 22) l'entrée et la sortie d'air sont équipées d'un filtre  $0,22 \mu\text{m}$ .

IV.1.1.2. - Récolte des algues.

Après 7 jours de culture, les cultures algales sont centrifugées à 2700 g pendant 10 minutes à température ambiante (centrifugeuse JOUAN G82 N). Les culots sont repris à l'aide d'un tampon TRIS \* (BOEHRINGER 708968) 15 mM ajusté à pH 7,5 (à l'aide d'HCl) et centrifugés à nouveau dans les mêmes conditions que précédemment.

\* TRIS = tris (hydroxyméthyl) aminométhane.

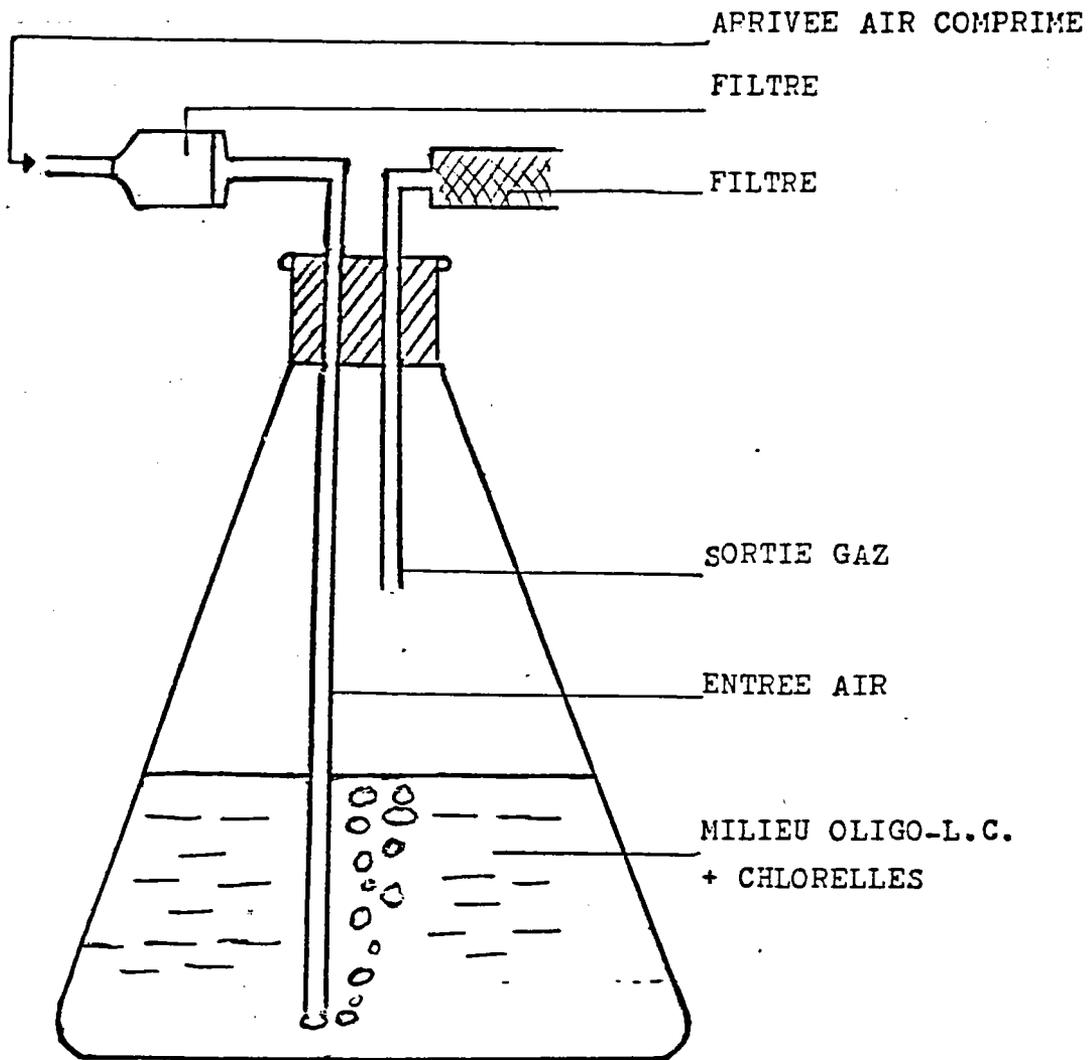


FIG. 22 : Schéma du dispositif utilisé pour les cultures de masse.

#### IV.1.1.3. - Broyage des algues

Le culot algal obtenu après lavage au tampon TRIS est repris dans un volume minimum de milieu de broyage, refroidi à 4°C, constitué de :

- TRIS 15 mM (pH 7,5)
- Saccharose 0,5 M (MERCK 7653)
- 1,4 Dithiothréitol 2,5 mM (MERCK 11474)

Le broyage (ainsi que les étapes ultérieures) est effectué à basse température ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ) afin de protéger les enzymes contre l'action des protéases.

Les chlorelles sont cassées à l'aide d'un potter en teflon fixé sur un appareil HEIDOLPH, réglé à 1200 tours par minute. Le potter étant placé dans de la glace, 100 aller-retours sont réalisés par culot, et 30 secondes séparent chaque série de 5 aller-retours afin d'éviter tout échauffement du milieu.

Il n'a malheureusement pas été possible d'estimer le pourcentage de cellules cassées.

#### IV.1.1.4. - Fractionnement par centrifugation différentielle.

L'homogénat (H) obtenu après broyage est centrifugé une première fois à 1000 g pendant 5 minutes afin d'éliminer les cellules intactes, les noyaux et les gros débris cellulaires. Le surnageant ( $S_1$ ) est alors récupéré puis centrifugé à 9000 g pendant 15 minutes. Le surnageant obtenu ( $S_2$ ) subit une 2ème centrifugation pendant 30 minutes à une vitesse de 140.000 g. Le culot renfermant la fraction plasmalemmique est remis en suspension dans un volume minimum de milieu composé de :

- TRIS 15 mM (pH 7,5)
- Saccharose 0,5 M

Toutes ces centrifugations sont réalisées à l'aide d'une ultracentrifugeuse KONTRON (T.G.A. 50) équipée d'un rotor THT 50.38 dans des tubes en polycarbonate épais (KONTRON 919990200) à une température  $\leq 4^{\circ}\text{C}$ .

IV.1.1.5. - Obtention des fractions plasmalemmiques purifiées sur gradient de saccharose discontinu.

Le gradient est réalisé en disposant dans un tube à centrifuger 14 ml de saccharose 45 % dans du TRIS 1 mM (pH 7,5) puis 4 ml de saccharose 35 % réalisé dans le même tampon (ces deux solutions sont refroidies à 4°C). La fraction plasmalemmique ( $\approx$  2 ml) est disposée au sommet de ce gradient et mis à centrifuger à 140.000 g pendant 2 heures à une température  $\leq$  4°C.

La fraction plasmalemmique purifiée est récupérée à l'interface des deux concentrations en saccharose, elle est testée immédiatement ou conservée au congélateur. Elle peut être conservée ainsi pendant au moins 5 semaines sans qu'il y ait de diminution significative de l'activité, ainsi que vous avons pu le contrôler (cf. § IV.1.2.3.).

IV.1.1.6. - Préparation des échantillons en vue de leur examen au microscope électronique.

Une partie aliquote de chacun des culots algals (bruts et purifiés) est traitée selon la méthodologie développée par LUFT (1961) que l'on peut résumer de la façon suivante, toutes les opérations se déroulant à une température  $\leq$  4°C.

Les culots sont resuspendus dans un tampon, refroidi à 4°C, de cacodylate 0,1 M (MERCK 820670) contenant 2,5 % de glutaraldéhyde et ajusté à pH 7,2. La fixation dure 1 heure, puis les échantillons sont recueillis par centrifugation à 140.000 g pendant 30 minutes pour la fraction brute et pendant 120 minutes pour la fraction purifiée.

Les échantillons sont ensuite rincés deux fois par mise en suspension puis centrifugation dans le même tampon cacodylate précédemment utilisé. Après quoi, ils sont placés dans 1 ml d'acide osmique à 1 % dans le même tampon que précédemment pendant 1 heure.

Les échantillons subissent ensuite une déshydratation dans une série de solutions d'éthanol à concentration croissante avant d'être inclus dans la résine.

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome (coupes de 800 à 1000 Å d'épaisseur) puis colorées à l'acétate d'uranyle et au nitrate de plomb. L'observation a été effectuée au microscope électronique SIEMENS 102.

#### IV.1.2. - Dosage de l'ATPase K<sup>+</sup> stimulée

##### IV.1.2.1. - Principe

L'activité de l'ATPase K<sup>+</sup> stimulée est évaluée en dosant le phosphore inorganique (Pi) formé, suite à l'hydrolyse de l'ATP (en ADP et Pi), en présence de magnésium et de potassium. Le dosage du Pi formé se fait par la méthode de BAGINSKY et al. (1967).

##### IV.1.2.2. - Protocole.

(1) Réactifs utilisés :

- MgCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O, 70 mM (MERCK 5833)
- KCl, 1 M (MERCK 4396)
- TRIS 50 mM (BOEHRINGER 708968) ajusté au pH désiré (à l'aide d'HCl).
- ATP disodique 15 mM (BOEHRINGER, 519979) converti en ATP-Tris au pH désiré selon la méthode de HODGES et LEONARD (1974) que l'on peut résumer de la façon suivante : une résine échangeuse d'ions DOWEX 50-W (FLUKA 44514) est ajoutée à la solution d'ATP Na<sub>2</sub> jusqu'à obtenir un pH voisin de 2. Lorsque l'ajout de résine ne provoque plus de variation sensible de la valeur du pH la résine (qui a capté les ions Na<sup>+</sup>) est éliminée par filtration sur membrane MILLIPORE HAWP 0,45 µm. Le filtrat soigneusement récupéré est ensuite ajusté au pH désiré par l'addition de quelques cristaux de TRIS. Cette préparation doit se faire extemporanément.
- Acide ascorbique 4 % (MERCK 127) préparée extemporanément dans du TCA 20 % (MERCK 9415) (solution refroidie à 4°C).
- Heptamolybdate d'ammonium 1 % (MERCK 1180).
- Arsénite-Citrate à 2 % préparé de la façon suivante : Diluer d'abord le métaarsénite de sodium (MERCK 6287) à 2 % dans la moitié du volume final d'eau distillée. Ajouter le citrate trisodique (MERCK 6448) à 2 %. Ajouter l'acide acétique (PROLABO 20 104 298) à 2 % et compléter au volume final avec de l'eau distillée. L'ordre d'addition des réactifs est à respecter si l'on veut obtenir une solution limpide.
- Dihydrogénophosphate de potassium 20 mM solution mère (PROLABO 26 926 298).
- Dihydrogénophosphate de potassium 0,4 mM solution fille (ibid.)
- fraction phasmalemmique fraîche ou congelée.

(2) Mode opératoire.

Le dosage enzymatique a pour but de comparer la quantité de Pi formé en présence de magnésium mais en absence de potassium, à celle produit en présence de magnésium et de potassium (tableau XXXII). La différence entre les deux quantités de Pi présentes dans les 2 milieux permet d'évaluer l'activité de l'ATPase  $K^+$  stimulée.

Les essais enzymatiques sont conduits de telle sorte que l'apparition du produit formé (Pi) est linéaire en fonction du temps d'incubation (Fig. 23) et de la quantité de protéines, c'est-à-dire de fraction introduite (Fig. 24).

Après arrêt de la réaction enzymatique par ajout de TCA - ascorbate le milieu est centrifugé 5 minutes à 2300 g (toutefois, pour des fractions cellulaires pauvres en protéines, cette étape peut être facultative). 1 ml, soit la moitié de chaque tube est repris et déposé dans un autre tube auquel 1 ml d'heptamolybdate et 2 ml d'arsénite-citrate sont ajoutés.

Parallèlement un blanc et un tube étalon sont réalisés selon le tableau suivant :

Tubes	Blanc	Etalon
Solution $KH_2 PO_4$ 0,4 mM (en $\mu$ l)	0	1000
$H_2O$ (en $\mu$ l)	1000	0

Comme pour les tubes contenant la fraction enzymatique, 1 ml de milieu TCA ascorbate est ajouté, puis après 5 minutes (temps de centrifugation utilisé pour les échantillons), 1 ml de milieu est repris auquel les réactifs heptamolybdate et arsénite-citrate sont ajoutés comme précédemment.

	milieu avec Mg <sup>++</sup>	Milieu avec Mg <sup>++</sup> + K <sup>+</sup>
MgCl <sub>2</sub> , 70 mM (en µl)	50	50
KCl 1M (en µl)	0	50
TRIS 50 mM pH = 6,5 (en µl)	450	450
eau (en µl)	200	150
fraction enzymatique à analyser (en µl)	100	100
pré-incubation à 37°C pendant 13 minutes		
ATP-TRIS 15 mM pH 6,5 (en µl)	200	200
incubation à 37°C pendant 1 heure		
TCA - Ascorbate (en ml)	1	1
centrifugation pendant 5 minutes à 2300g		
Surnageants (ml)	1	1
Heptamolybdate (ml)	1	1
Arsénite-Citrate (ml)	2	2
attendre 15 minutes et lire à 847 nm contre le blanc de la gamme d'étalonnage réalisé parallèlement.		
D.O.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
⇒ Activité ATPasique = f (X <sub>2</sub> - X <sub>1</sub> )		

Tableau XXXII: Schéma du dosage de l'activité ATPasique

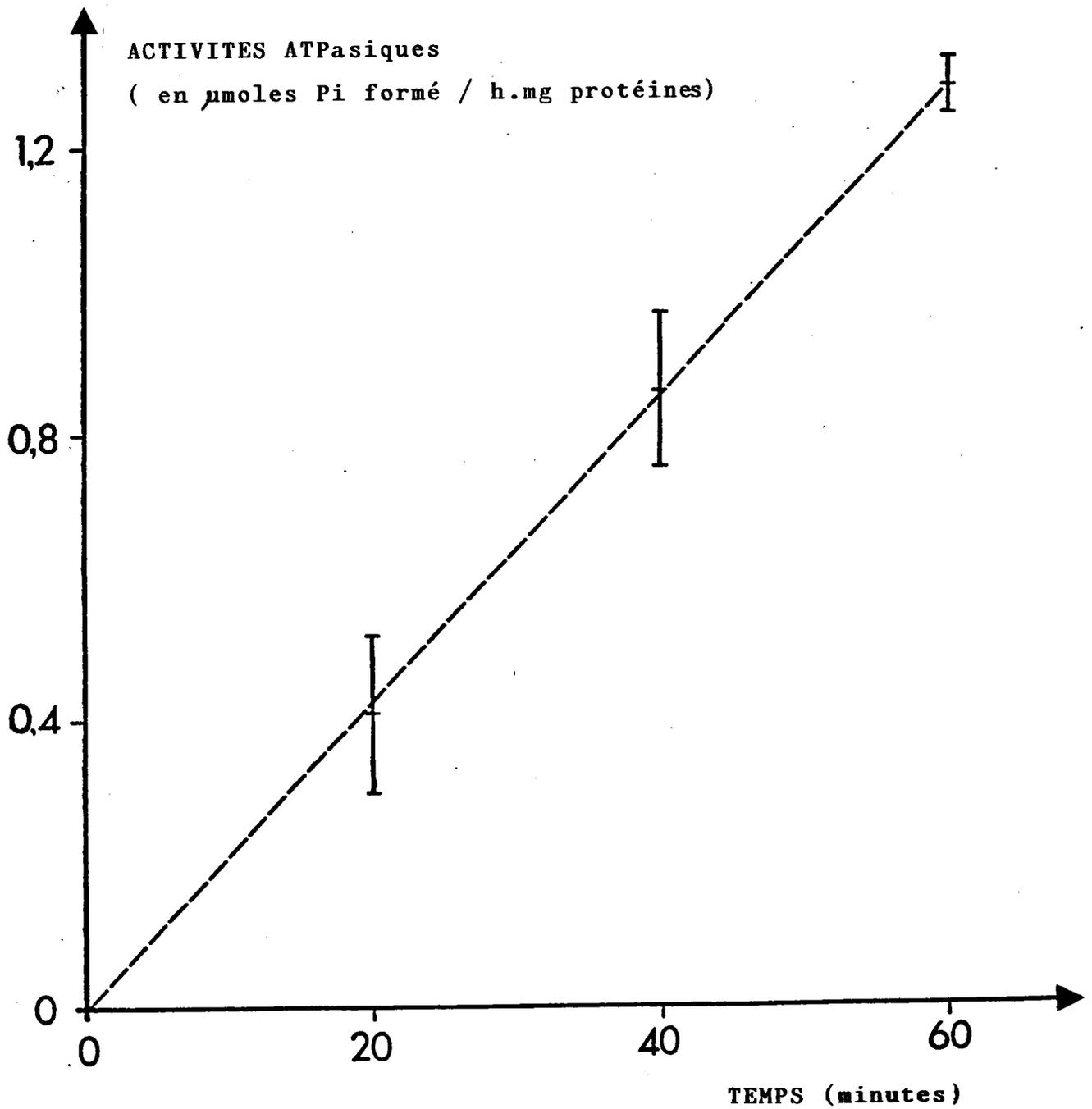


FIG. 23 : ACTIVITES ATPASIQUES EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION.

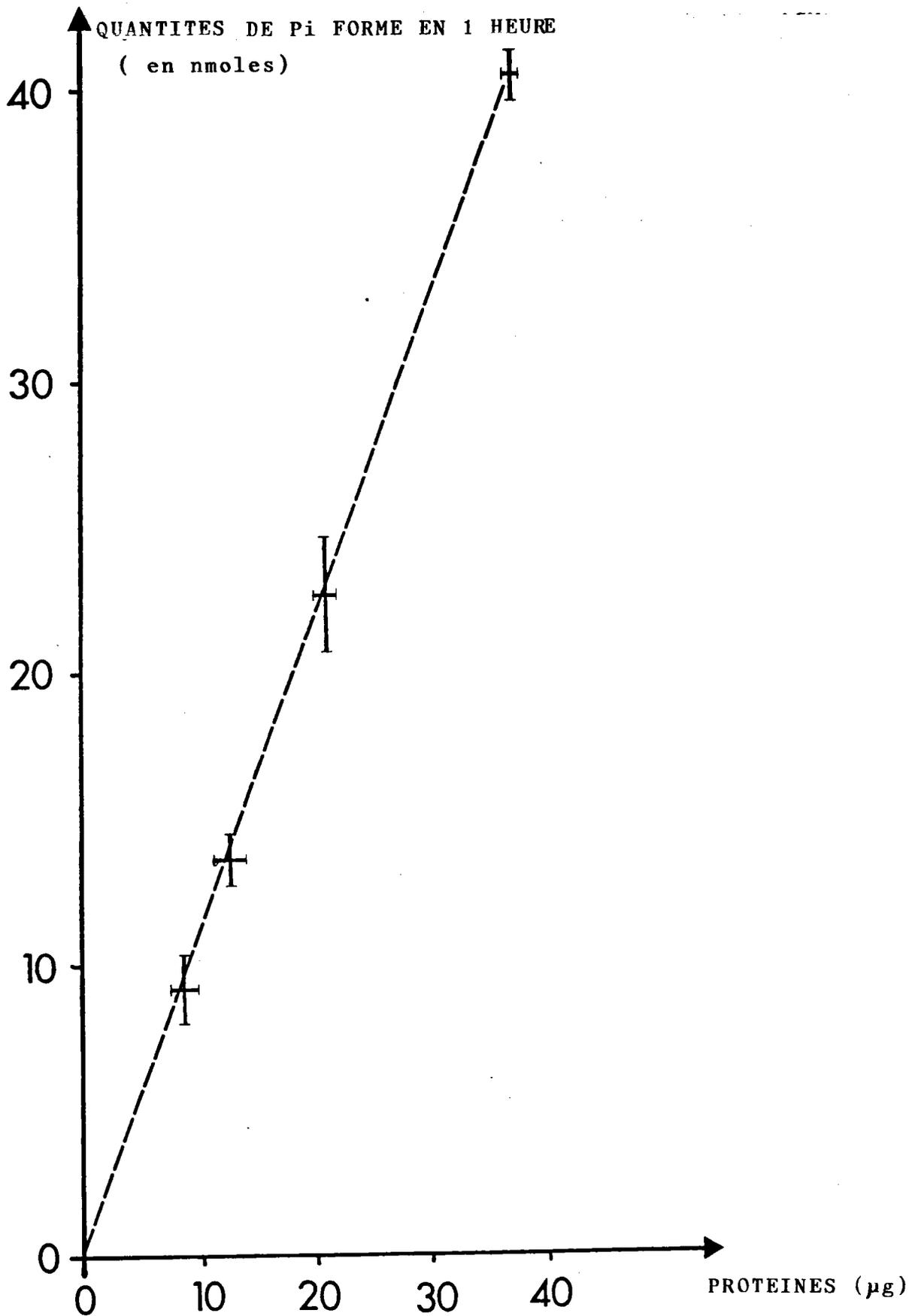


FIG. 24: QUANTITES DE P<sub>i</sub> FORME EN FONCTION DE LA QUANTITE DE PROTEINES.

Il faut attendre 15 minutes avant que la couleur bleue ne soit stable. La lecture de la densité optique s'effectue à 847 nm (spectrophotomètre UVIKON 810/820 KONTRON), ce qui correspond au maximum d'absorption (fig. 25).

#### IV.1.2.3. Validité de la technique expérimentale.

##### (1) Linéarité de la gamme d'étalonnage à la longueur d'onde choisie.

A 847 nm, la linéarité est respectée et obéit à la loi de Beer-Lambert jusqu'à au moins une absorbance de 1,25, comme le montre la figure 26 suivante (qui regroupe les données moyennes de 8 gammes d'étalonnage réalisées à des jours différents et avec des solutions de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  différentes et dont les résultats bruts figurent en annexe n° VII).

(2) La répétabilité des mesures a été étudiée pour différents niveaux d'activité ATPasique (tableau XXXII bis). Le coefficient de variation est très élevé (26,6 %) pour les faibles activités observées, mais est compris entre 5 et 10 % pour les activités supérieures à 13 nmoles de Pi libéré. Cette variation est du même ordre que celle trouvée par SALL et al. (1975) utilisant la même technique de dosage.

##### (3) Contrôle de la stabilité de l'activité ATPasique

Cinq aliquots d'un même échantillon ont été analysés à plusieurs jours d'intervalle sur cinq semaines. Les résultats ont été exprimés en activités spécifiques (voir paragraphe suivant).

Il n'y a pas de diminution de l'activité spécifique en fonction du temps de congélation (tableau XXXIII).

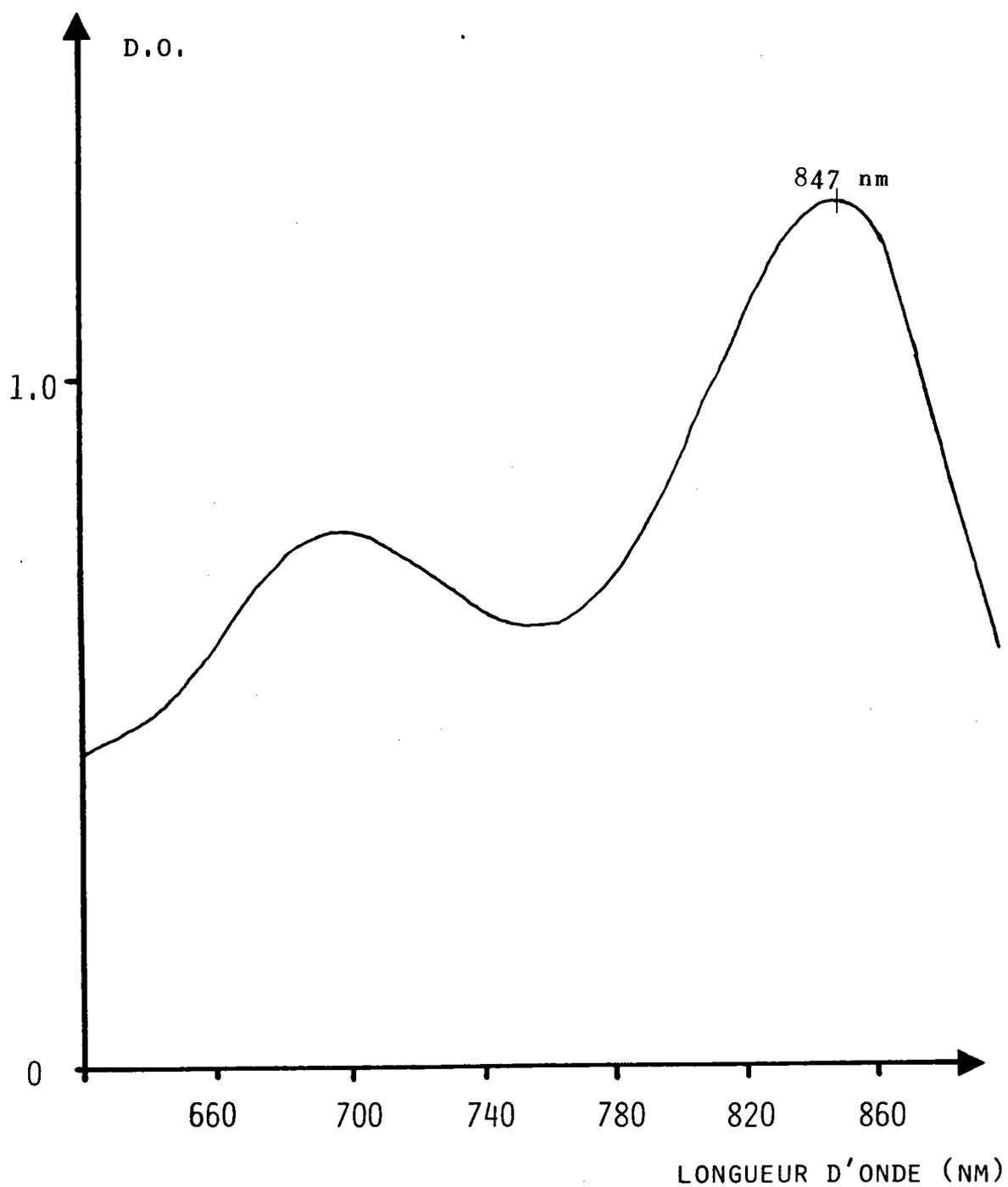


FIG. 25: SPECTRE D'ABSORPTION DU COMPLEXE COLORE OBTENU.

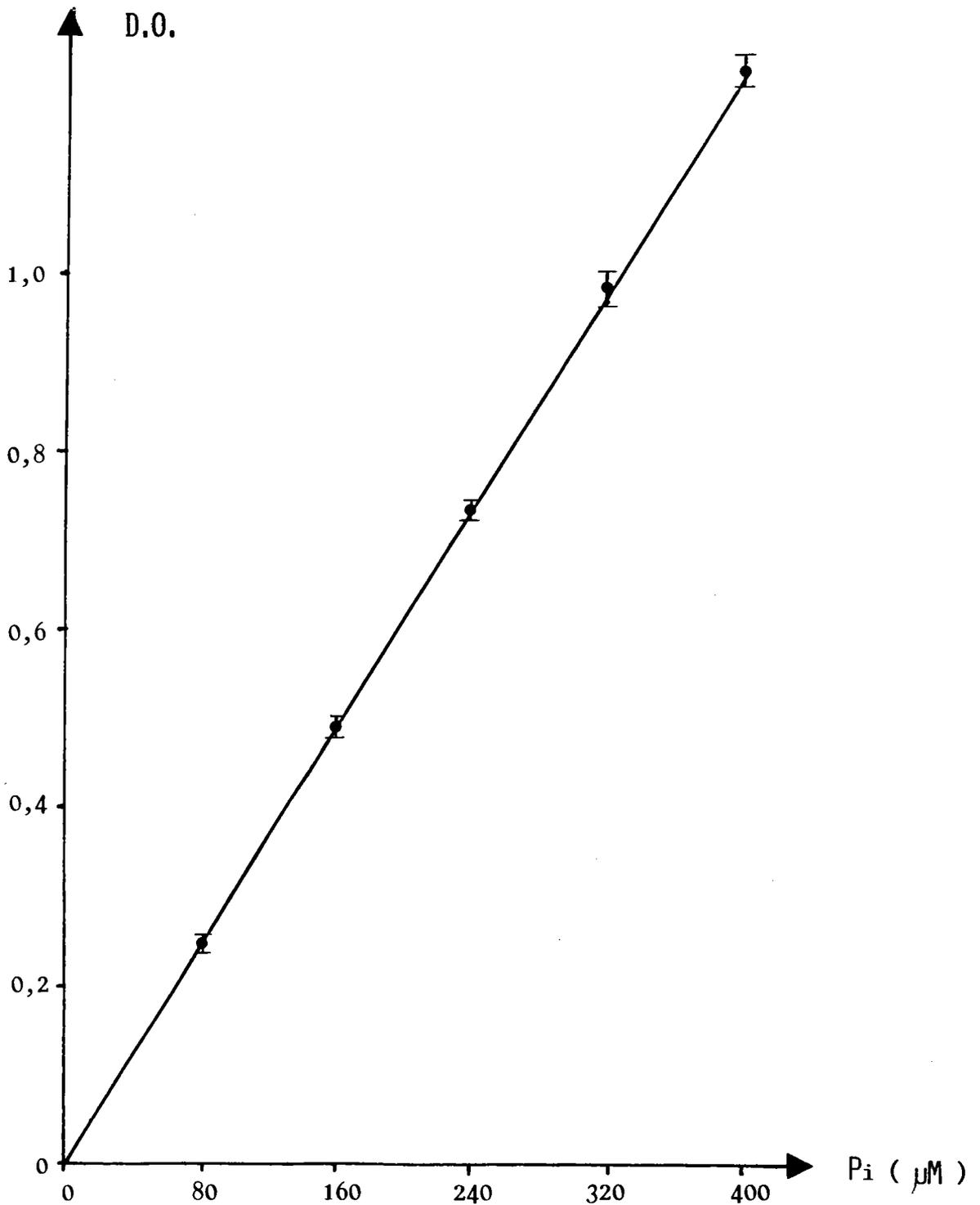


FIG. 26 : GAMME MOYENNE POUR LE DOSAGE DU PHOSPHORE  
INORGANIQUE (  $Y = -1,03 + 3080,06.X$  ;  
 $R = 1,000$  ).

Valeurs observées ( en nmoles de Pi libéré )	Moyenne	Ecart-type	C.V. ( en % )
0,21 0,22 0,33	0,25	0,07	26,6
6,62 7,62 8,94	7,73	1,16	15,1
11,59 12,91 13,91	12,80	1,16	9,1
12,58 12,91 14,24	13,24	0,88	6,6
29,47 33,11 34,17	32,45	2,71	8,4
35,80 37,77 39,74	37,77	1,97	5,2

Tableau XXXII bis : Répétabilité de quelques mesures d'activités ATPasiques en fonction de la valeur moyenne de ces activités.

Jours de l'expérimentation	Valeurs observées en $\mu$ moles de Pi libéré/mg protéines-heure	Moyenne	écart-type	coefficient de variation (en %)
J 0	1,10			
J 1	1,32			
J 5	0,86	1,08	0,17	15,3
J 26	1,03			
J 36	1,11			

Tableau XXXIII : Influence du temps de conservation sur l'activité ATPasique d'une fraction plasmalemmique.

Compte-tenu qu'interviennent dans le calcul de cette activité spécifique deux incertitudes portant sur les déterminations respectives de l'activité spécifique et de la quantité de protéines (voir paragraphe suivant), la reproductibilité est acceptable puisque le coefficient de variation est de 15,3 %.

Par ailleurs, l'étude d'interférences potentielles, susceptible d'expliquer ce coefficient de variation élevé, n'ont pas été étudiées dans le cadre de ce travail.

#### IV.1.2.4. Calcul des activités ATPasiques, des activités spécifiques et des écarts-types correspondants.

Les activités ATPasiques spécifiques sont calculées par le rapport de l'activité ATPasique à la quantité de protéines pour un même volume de fraction testée.

Chaque terme de ce rapport est caractérisé par un écart-type calculé sur au moins 3 déterminations. En supposant que l'activité ATPasique et la concentration de protéines sont deux variables indépendantes, l'estimation de l'écart-type du rapport ( $\sigma$ ) est donné par la formule suivante (EL-SHAARAWI, comm. pers.)

$$\sigma = \sqrt{A.S.^2 \left[ \frac{(S_1/\sqrt{n_1})^2}{(\bar{x}_1)^2} + \frac{(S_2/\sqrt{n_2})^2}{(\bar{x}_2)^2} \right]}$$

avec A.S. = Activité spécifique (= rapport de l'activité ATPasique à la quantité de protéine).

S1 = écart-type de l'activité ATPasique

S2 = écart-type de la concentration de protéines

$\bar{x}_1$  = activité ATPasique moyenne

$\bar{x}_2$  = concentration de protéines moyenne

n1 = nombre de mesures pour le calcul de  $\bar{x}_1$

n2 = nombre de mesures pour le calcul de  $\bar{x}_2$

#### IV.1.3. - Dosage des protéines

##### IV.1.3.1. - Principe

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de BRADFORD (1976) améliorée par SPECTOR (1978).

Le principe de cette méthode repose sur l'utilisation d'un colorant, le bleu de coomassie qui passe du brun orangé au bleu en présence de protéines. La couleur bleue résulte de l'interaction des groupements anioniques du colorant avec les groupements aminés des protéines sous forme  $NH_3^+$  (FAZEKAS de St. GROTH et al., 1963).

#### IV.1.3.2. Protocole

##### (1) Réactifs :

- Le réactif au bleu de coomassie (SIGMA B 1131) est préparé par dilution de 100 mg dans 50 ml d'éthanol à 96 % suivie d'une addition de 100 ml d'acide phosphorique 85 % (MERCK 573). On complète ensuite à 1 litre avec de l'eau distillée (SPECTOR, 1978).

Le réactif ainsi préparé est filtré successivement sur membranes MILLIPORE HAWP de 1,2  $\mu\text{m}$  puis de 0,45  $\mu\text{m}$  afin d'éviter le colmatage de la membrane de plus faible porosité. Le réactif, conservé à température ambiante, à l'abri de la lumière, est changé tous les 15 jours.

La seule modification apportée à la technique de SPECTOR concerne l'homogénéisation au Polytron, préconisée par l'auteur pour aider à la dissolution du colorant dans l'éthanol, opération que nous n'avons pas réalisée.

- fraction plasmalemmique fraîche ou congelée

- Solution standard d'albumine bovine (= BSA) à 1,01 g/l (BIOMERIEUX 62441).

##### (2) Mode opératoire

La fraction à doser, déjà diluée ou non, est pipetée sous un volume de 50 ou de 100  $\mu\text{l}$  (selon la quantité de protéines présente) auquel on ajoute respectivement 950 ou 900  $\mu\text{l}$  d'eau distillée. Ces différentes dilutions sont nécessaires afin de ne pas dépasser 30  $\mu\text{g}$  de protéines dans le tube. A ce mélange, 5 ml de réactif de bleu de coomassie sont ajoutés. La réaction colorée se développe en 5 minutes puis l'absorbance est mesurée à 595 nm sur un spectrophotomètre UVIKON 810/820 (KONTRON).

La concentration en protéines est déterminée par rapport à une gamme étalon réalisée parallèlement à partir d'une solution à 30 mg/l de BSA.

#### IV.1.3.3. Validité de la technique expérimentale

##### (1) Linéarité de la gamme d'étalonnage :

La fig. 27 représente les moyennes et les écarts-types observés sur 26 gammes d'étalonnage réalisées dans les mêmes conditions à des jours différents, avec différents réactifs de bleu de coomassie et avec différentes solutions filles de BSA (le protocole détaillé et les différents résultats sont donnés en annexe n° VIII). Les points ne s'alignent pas parfaitement sur une droite passant par l'origine. Par contre, la relation linéaire est nettement meilleure pour des quantités de protéines comprises entre 12 et 30 µg. Les points correspondants s'alignent selon une droite de coordonnées  $y = 39,884 + 11,131 x$  ( $r = 0,999$ ). Il en résulte que pour nos essais, nous nous sommes toujours placés dans des conditions telles que la quantité de protéines dosée soit comprise entre 12 et 30 µg. Dans ces conditions, la reproductibilité est acceptable puisque les coefficients de variation sont inférieurs à 10 % (en deçà de 12 µg, le coefficient de variation atteint 15 %). Pratiquement une gamme d'étalonnage a toujours été réalisée pour chaque série d'essais.

(2) Les essais de répétabilité montrent que le coefficient de variation est toujours inférieur à 10 % et le plus souvent compris entre 0,8 et 2,5 % (tableau XXXIV).

##### (3) Contrôle de la stabilité de la quantité de protéines :

Cinq aliquots d'un même échantillon ont été analysés à plusieurs jours d'intervalle sur cinq semaines. Il n'y a pas de diminution de la quantité de protéines en fonction du temps de congélation (tableau XXXV).

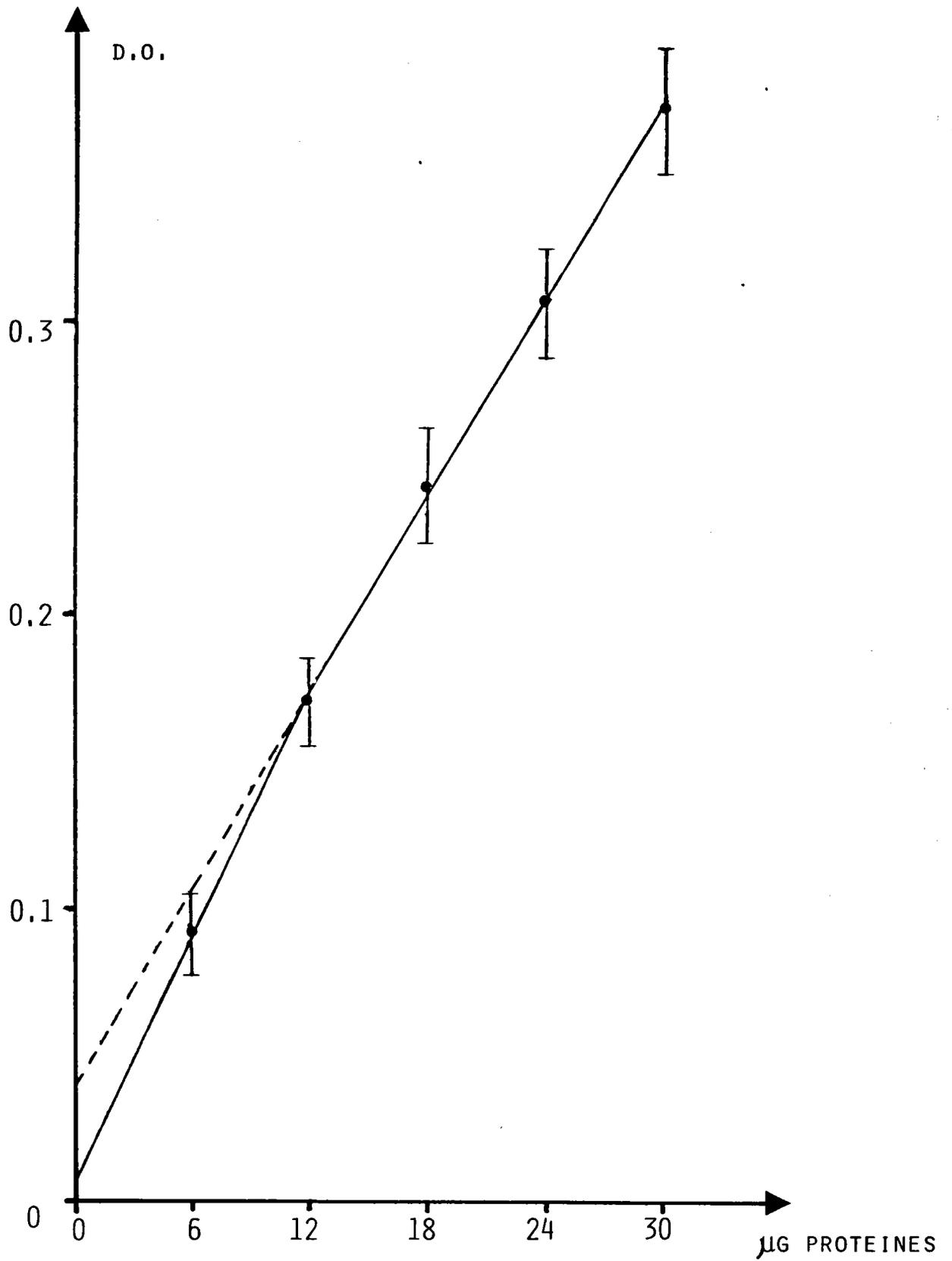


FIG. 27 : GAMME MOYENNE POUR LE DOSAGE DES PROTEINES

Valeurs observées en $\mu\text{g}$ protéines/ 100 $\mu\text{l}$ )	Moyenne	Ecart-type	coefficient de variation ( en % )
15,92 16,08 15,83	15,94	0,13	0,79
34,70 35,26 35,64	35,20	0,47	1,34
38,50 39,66 40,00	39,39	0,79	2,00
22,13 22,84 23,11	22,69	0,51	2,23
35,82 36,92 37,58	36,77	0,89	2,42
42,10 43,94 43,94	43,33	1,06	2,45
17,68 18,30 19,91	18,63	1,15	6,18
17,27 19,34 20,82	19,14	1,78	9,32

Tableau XXXIV : Essais de répétabilité du dosage de protéines.

Jours de l'expérimentation	Valeurs observées ( en $\mu\text{g}$ protéines pour 100 $\mu\text{l}$ de fraction )	Moyenne	Ecart-type	C.V. ( en % )
J 0	36,83	38,02	1,00	2,64
J 1	37,26			
J 5	38,28			
J 26	38,32			
J 36	39,39			

Tableau XXXV : Reproductibilité du dosage des protéines d'une fraction plasmalemmique testée à cinq jours différents.

La reproductibilité apparaît très acceptable puisque le coefficient de variation observé (2,6 %) n'est que légèrement supérieur aux coefficients de variation observés le plus généralement lors des essais de répétabilité.

#### (4) Etude des interférences.

Les interférences de l'EDTA, du TRIS (BRADFORD, 1976), du DTT (SPECTOR, 1978) et des chlorophylles (EZE et DUMBROFF, 1982) signalées par les précédents auteurs nous ont incités à quantifier leur importance dans nos conditions expérimentales. Ces interférences ont été déterminées pour des quantités de protéines allant de 6 à 30  $\mu\text{g}$ .

Les résultats obtenus, présentés sur les figures 28, 29 et 30 montrent que ces substances interfèrent pour des quantités de protéines inférieures à 12  $\mu\text{g}$ . En particulier, pour 6  $\mu\text{g}$  de protéines, on enregistre une erreur par excès de 20 à 25 %.

Ces interférences ont été négligées dans la suite de nos essais où les milieux analysés présentent des teneurs en protéines de 12 à 30  $\mu\text{g}$ .

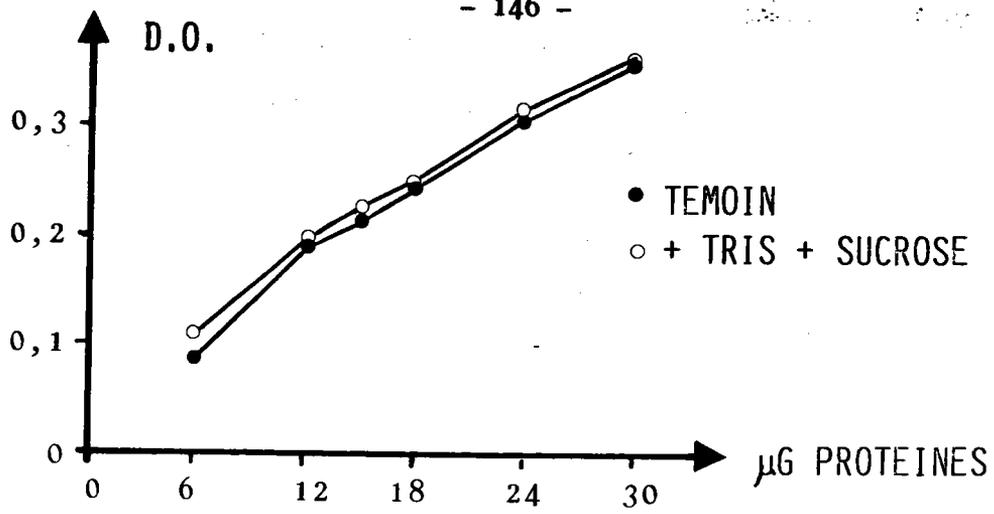


FIG. 28 : ETUDE DE L'INTERFERENCE DU TRIS + SUCROSE

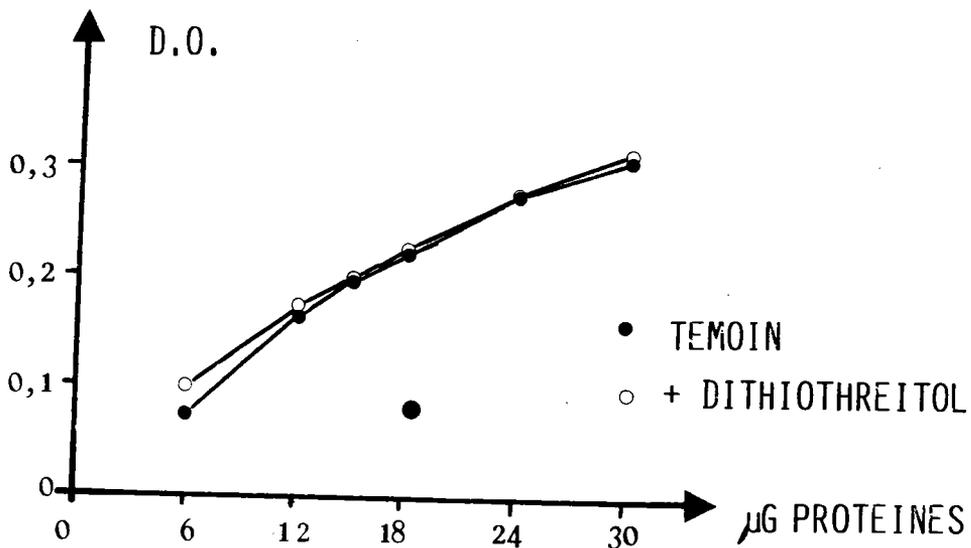


FIG. 29 : ETUDE DE L'INTERFERENCE DU DITHIOTHREITOL

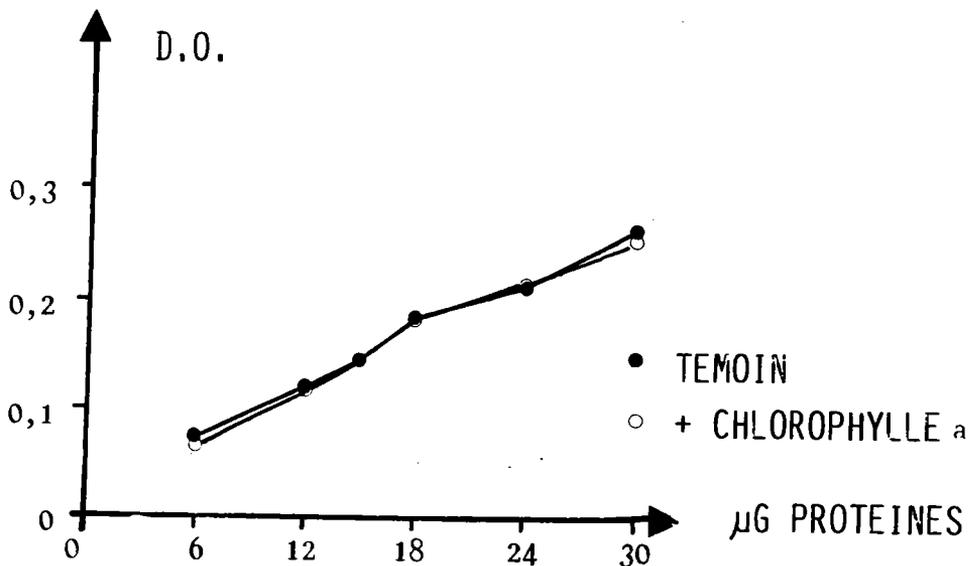


FIG. 30 : ETUDE DE L'INTERFERENCE DE LA CHLOROPHYLLE a

IV.1.3.4. Validité de la périodicité du changement des solutions de bleu de coomassie (tous les 15 jours) :

Nous avons vérifié qu'un temps de conservation de 15 jours à l'obscurité n'altérerait pas la qualité du réactif au bleu de coomassie.

Une même fraction algale a été testée simultanément avec 2 réactifs, l'un préparé le jour même, l'autre 15 jours auparavant. Les quantités de protéines trouvées dans les deux cas sont comparables (différence non significative au seuil de 5 %) :

- 17,500  $\pm$  0,523  $\mu$ g de protéines avec le réactif fraîchement préparé.
- 17,399  $\pm$  0,177  $\mu$ g de protéines avec le réactif vieux de 15 jours.

IV.1.4. - Dosage du cadmium par électrode spécifique.

IV.1.4.1. - Principe

La mise en contact d'une solution de cadmium avec l'électrode spécifique (ORION 94/48) génère un potentiel mesuré à l'aide d'un ionomètre digital (ORION 901). Le potentiel mesuré est proportionnel au logarithme de l'activité \* de l'ion libre selon l'équation (1) ci-dessous :

$$E = E_0 + \frac{2,3 R.T}{2 F} \log (A) \quad (1)$$

- avec E = potentiel mesuré  
E<sub>0</sub> = potentiel de référence  
R = constante des gaz parfaits ,  
F = constante de Faraday  
T = température en ° K  
A = activité ionique du cadmium  
S =  $\frac{2,3 R.T}{2 F}$

\* L'activité d'un ion libre (A) est liée à la concentration (C) du cation par l'intermédiaire du coefficient d'activité ( $\gamma$ ) selon la relation :

$$A = \gamma . C$$

$\gamma$  dépend de la force ionique.

#### IV.1.4.2. - Protocole

##### (1) Réactifs utilisés :

- Nitrate de cadmium (MERCK 2019) à 1 g Cd<sup>++</sup>/l.

L'emploi de solution étalon commerciale, telle que la solution FLUKA (20895), n'a pas été retenue du fait de la trop forte acidité de cette solution.

- Solution de KCl, MgCl<sub>2</sub>, TRIS, ATP-TRIS identiques à celles utilisées pour le dosage de l'ATPase K<sup>+</sup> stimulée.

- Fraction plasmalemmique congelée.

- NaNO<sub>3</sub> 5 M (MERCK 6537). Cette solution permet d'ajuster la force ionique à une valeur d'au moins 0,1 M.

##### (2) Mode opératoire

Une gamme d'étalonnage est établie pour des concentrations en cadmium de 1 à 100 mg/l (8,9 à 890 µM) (concentrations en progression géométrique de raison 10). Les solutions étalons sont réalisées dans de l'eau distillée avec ajout de 2 % de solution d'ajusteur de force ionique pour que les coefficients d'activité de ces étalons soient très proches les uns des autres

Chaque lecture sur l'appareil se fait après un temps de contact de 5 minutes, à température constante (37°C) et sous agitation. Il est préférable de réaliser les gammes en commençant par les concentrations les plus faibles.

Pour les essais, l'appareil est recalibré avec la gamme d'étalonnage entre chaque série de mesures. La base de l'électrode est nettoyée toutes les deux heures dans le cas de séries importantes, à l'aide d'un papier spécial (ORION 94-82-01).

IV.1.4.3. - Mode de calcul des concentrations de cadmium libre dans les essais réalisés.

L'équation (1) peut s'écrire sous la forme (2)

$$(1) \quad E = E_0 + S \log C + S \log \gamma \quad (2)$$

Afin de tenir compte des différences de force ionique des milieux testés, l'équation (2) peut être écrite successivement pour un étalon de la gamme (équation 3) et pour un échantillon inconnu de force ionique différente (équation 4).

$$E_1 = E_0 + S \log C_1 + S \log \gamma_1 \quad (3)$$

$$E_2 = E_0 + S \log C_2 + S \log \gamma_2 \quad (4)$$

En combinant (3) et (4), on arrive à :

$$E_1 - S \log C_1 - S \log \gamma_1 = E_2 - S \log C_2 - S \log \gamma_2 \quad (5)$$

S est une constante obtenue par linéarisation des mesures de potentiel des solutions étalons :

$$(5) \quad S \log C_2 = (E_2 - E_1) + S (\log C_1 + \log \gamma_1 - \log \gamma_2)$$

$$\log C_2 = \frac{(E_2 - E_1)}{S} + \log \left( \frac{C_1 \cdot \gamma_1}{\gamma_2} \right) \quad (6)$$

avec :

- $E_1$  = le potentiel (recalculé après linéarisation des potentiels des 3 étalons) d'un étalon.
- $C_1$  = la concentration de cet étalon.
- $\gamma_1$  = le coefficient d'activité (connu) correspondant à cet étalon.
- $E_2$  = le potentiel lu sur l'appareil de mesure pour l'essai inconnu.
- $\gamma_2$  = le coefficient d'activité correspondant à l'essai inconnu déterminé d'après KIELLAND (1937)
- $C_2$  = la concentration cherchée.

La formule (6) permet de tenir compte des variations de force ionique d'un échantillon à l'autre. Quant aux variations de pH inter-échantillons, nous n'en avons pas tenu compte puisque le potentiel est constant jusqu'à pH 7,4 (GARDINER, 1974). Or, nos échantillons (ainsi que la gamme) se caractérisent par des valeurs inférieures à pH 7,4.

#### IV.1.4.4. Validité de la technique expérimentale.

##### (1) Linéarité de la gamme d'étalonnage.

GARDINER (1974) avait déjà observé que en-dessous de 1 mg/l, la relation entre le potentiel et la concentration n'est plus linéaire. C'est pourquoi nous nous sommes placés au-dessus de 1 mg/l.

Un exemple de gamme d'étalonnage réalisée à 20°C avec 3 concentrations (1,10 et 100 mg/l) de nitrate de cadmium est présenté sur la figure 31. La pente est de 29,2, ce qui est très proche du coefficient théorique de 29,1 (à 20°C). A 37°C, les coefficients obtenus sont voisins de 31.

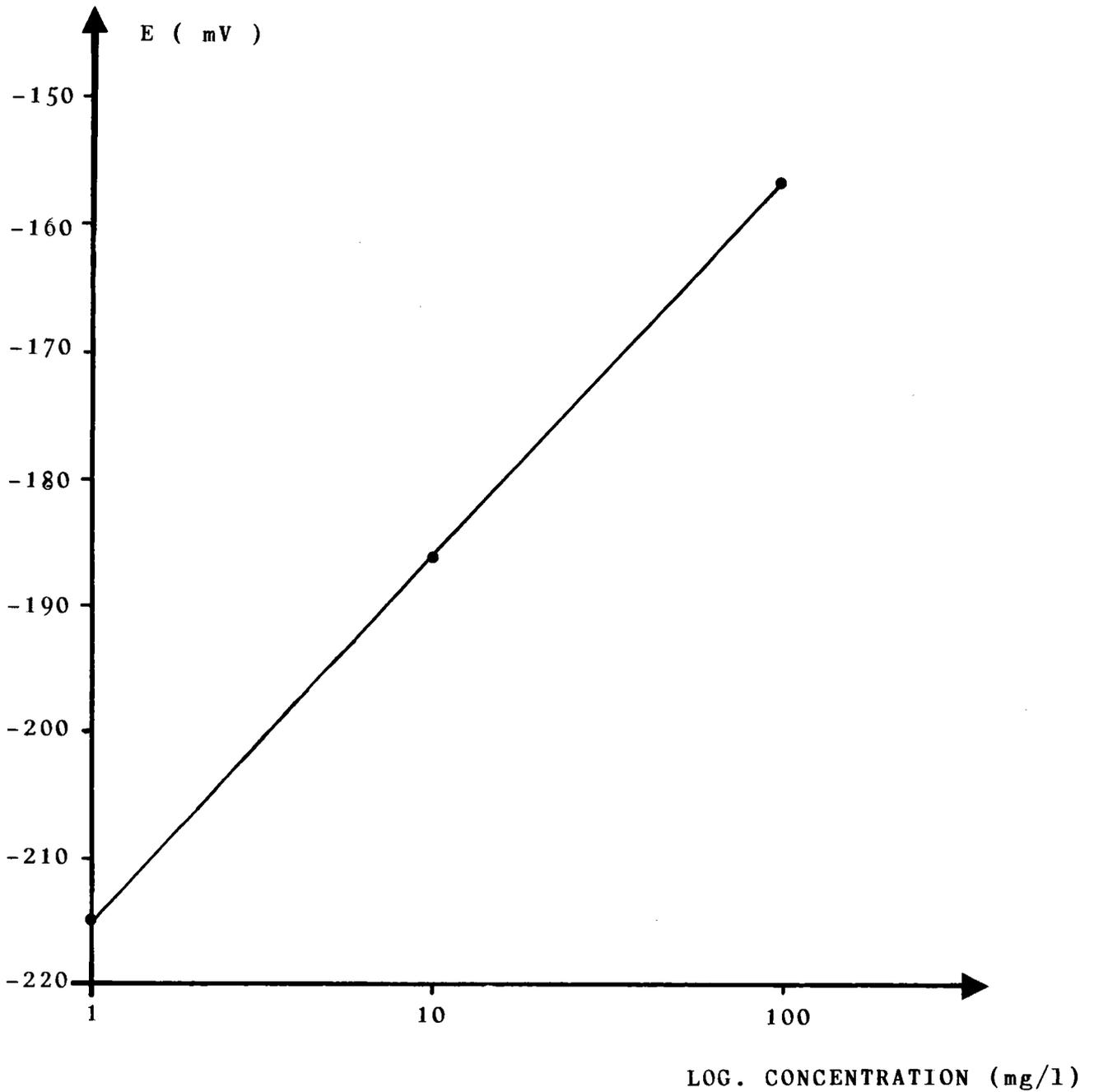


FIG. 31 : EXEMPLE DE GAMME D'ETALONNAGE REALISEE PAR  
IONOMETRIE ENTRE 1 ET 100 ppm DE CADMIUM  
 $Y = -215.1 + 29.2.X$  ;  $R = 1.00$

(2) Précision de la mesure.

(a) La **répétabilité** des mesures de cadmium libre a été évaluée sur 10 échantillons différents analysés deux fois. La répétabilité estimée par l'écart à la moyenne est relativement bonne, puisque celui-ci exprimé en pourcentage est généralement inférieur à 5 %. (tableau XXXVI).

Essai N°	Concentrations de cadmium libre calculées (en ppm)		moyenne	écart à la moyenne	
	1ère valeur	2ème valeur		valeur absolue	en %
1	3,18	3,03	3,11	0,08	2,6
2	2,93	2,69	2,81	0,12	4,3
3	7,86	7,62	7,74	0,12	1,6
4	7,44	7,04	7,24	0,20	2,8
5	6,84	6,42	6,63	0,21	3,2
6	3,15	2,71	2,93	0,22	7,5
7	2,07	1,61	1,84	0,23	12,5
8	22,00	21,51	21,76	0,25	1,1
9	5,45	4,45	4,95	0,50	10,1
10	27,83	25,45	26,64	1,19	4,5

Tableau XXXVI : Répétabilité des dosages de cadmium de 10 échantillons analysés le même jour.

b) La **reproductibilité** des mesures faites sur deux échantillons testés dans des conditions d'étalonnages différents est relativement bonne, puisque le coefficient de variation n'excède pas 6 % (tableau XXXVII). Cette valeur est de même ordre que celle trouvée par LAEGREID et al. (1983).

Essai N°	Concentrations de cadmium libre calculées (en ppm)	écart-type	coefficient de variation (en %)	nombre de mesures
1	11,18	0,68	6,0	5
2	13,84	0,47	3,4	3

Tableau XXXVII : Reproductibilité des mesures de cadmium effectuées dans des conditions d'étalonnages différents.

(c) En ce qui concerne les interférences, l'électrode ne répond pas aux anions et à la plupart des cations, à l'exception des ions cuivre, mercure et argent. Le fer et le plomb sous forme ionique peuvent également affecter la réponse s'ils sont présents à des concentrations supérieures à celle du cadmium.

IV.1.5. - Effets du cadmium sur l'ATPase  $K^+$  stimulée en fonction de différents paramètres : pH,  $Mg^{++}$ ,  $K^+$ .

IV.1.5.1. - Solution de cadmium utilisée.

Nous avons utilisé la même solution de cadmium (MERCK 2019) à  $1g\ Cd^{++}/l$  que celle décrite dans le paragraphe précédent (cf. IV.1.4.2.).

IV.1.5.2. - Description du plan factoriel utilisé.

La variation simultanée de 4 paramètres a été étudiée grâce à un plan factoriel. Chaque paramètre ou variable explicative pouvant prendre deux modalités, le plan factoriel comprend  $2^4$ , soit 16 essais.

Les modalités prises par les différentes variables explicatives sont regroupées dans le tableau suivant :

N° des variables explicatives	Variable testée	Modalités	
		1ère	2ème
1	cadmium	0	0,44 mM
2	potassium	50 mM	100 mM
3	magnésium	3,5 mM	7 mM
4	pH	6,5	7,0

Concernant le choix des modalités, celles-ci ne doivent être ni trop rapprochées, ni trop espacées de telle sorte que la modélisation puisse bien rendre compte du phénomène biologique (VAILLANT, comm. pers.).

En ce qui concerne la variable - cadmium - nous avons utilisé une concentration suffisamment élevée (0,44 mM, 50 mg/l) afin de mettre en évidence un effet pour les différentes conditions testées. Le choix des concentrations de potassium, de magnésium et des valeurs de pH a été largement guidé par la littérature.

La préparation des différents milieux d'incubation est décrite dans le tableau XXXVII bis.

#### IV.1.5.3. Méthodes d'analyse statistique des résultats (VAILLANT, comm. pers.)

Essai n°		Ajout en µl des solutions de :					
		Cd (8,9 mM)	K (1 M)	Mg (70 mM)	TRIS pH 6,5 50 mM	TRIS pH 7,0 50 mM	eau distillée
1	a	/	/	50	450	/	200
	b	/	50	50	450	/	150
2	a	/	/	50	/	450	200
	b	/	50	50	/	450	150
3	a	/	/	100	450	/	150
	b	/	50	100	450	/	100
4	a	/	/	100	/	450	150
	b	/	50	100	/	450	100
5	a	/	/	50	450	/	200
	b	/	100	50	450	/	100
6	a	/	/	50	/	450	200
	b	/	100	50	/	450	100
7	a	/	/	100	450	/	150
	b	/	100	100	450	/	50
8	a	/	/	100	/	450	150
	b	/	100	100	/	450	50
9	a	50	/	50	450	/	150
	b	50	50	50	450	/	100
10	a	50	/	50	/	450	150
	b	50	50	50	/	450	100
11	a	50	/	100	450	/	100
	b	50	50	100	450	/	50
12	a	50	/	100	/	450	100
	b	50	50	100	/	450	50
13	a	50	/	50	450	/	150
	b	50	100	50	450	/	50
14	a	50	/	50	/	450	150
	b	50	100	50	/	450	50
15	a	50	/	100	450	/	100
	b	50	100	100	450	/	/
16	a	50	/	100	/	450	100
	b	50	100	100	/	450	/

Tableau XXXVII bis : Mode de préparation des différents milieux analysés.

Le but poursuivi est de modéliser la réponse expérimentale à l'aide d'une régression multiple pour obtenir une équation de la forme :

$$\hat{y} = b_0 + b_i \cdot x_i + b_j \cdot x_j + b_{ij} \cdot x_i \cdot x_j \quad (7)$$

où

$\hat{y}$  = valeur calculée à partir du modèle

$x_i, x_j, \dots$  = variables explicatives ou paramètres contrôlés  
(cadmium, potassium, magnésium, pH).

$b_i, b_j, b_{ij}, \dots$  = coefficient de régression calculé

$x_i \cdot x_j$  = interaction entre les deux variables  $x_i$  et  $x_j$

Le calcul du modèle a été réalisé sur microordinateur APPLE IIe grâce à un programme de calcul mis au point par BOIS (1984). Du fait de l'orthogonalité entre variables explicatives assurée par le plan factoriel, les coefficients  $b_i$  peuvent être rangés par ordre de leur contribution à la régression calculée. L'évaluation de la significativité des diverses variables explicatives (et éventuellement de leurs interactions), se fait par un test t de Student.

#### IV.1.6. - Détermination de la CI50 du cadmium sur l'ATPase K<sup>+</sup> stimulée

A partir de la solution de nitrate de cadmium à 1g Cd/l, différentes solutions cadmiques sont réalisées afin de tester les concentrations suivantes :

50 - 5 - 1 mg/l

500 - 50 µg/l

et cela parallèlement à un témoin cadmium. 3 répétitions sont effectuées pour chaque concentration. Les conditions opératoires sont: pH = 6,5  
magnésium = 3,5 mM ; potassium = 50 mM.

## IV.2. - RESULTATS

### IV.2.1 - Examen comparé des fractions plasmalemmiques brute et purifiée (fraction I).

Les planches C et D, correspondant respectivement aux fractions brutes et purifiées observées au même grossissement (x 40.000), montrent l'intérêt d'une étape de purification, après laquelle il ne subsiste plus que quelques impuretés et petits débris d'organites cellulaires. La plupart des vésicules présentes dans cette fraction, ont un diamètre compris entre 0,1 et 0,5  $\mu\text{m}$ .

Pour cette comparaison, les activités ont été testées dans les conditions suivantes  $\text{Mg}^{++} = 3,5 \text{ mM}$ ,  $\text{K}^+ = 50 \text{ mM}$ , pH TRIS = 7,00.

Les résultats des dosages montrent un facteur d'environ 12 entre l'activité spécifique de la fraction purifiée et celle de la fraction brute (tableau XXXVIII).

fractions utilisées	Activité spécifique moyenne ( $\mu\text{moles Pi formées/heure.}$ mg protéines).	écart-type
fraction brute	0,24	0,02
fraction purifiée	2,80	0,30

Tableau XXXVIII : Activités ATPasiques comparées des fractions brute et purifiée.

Ces résultats confirment les observations effectuées au microscope électronique.

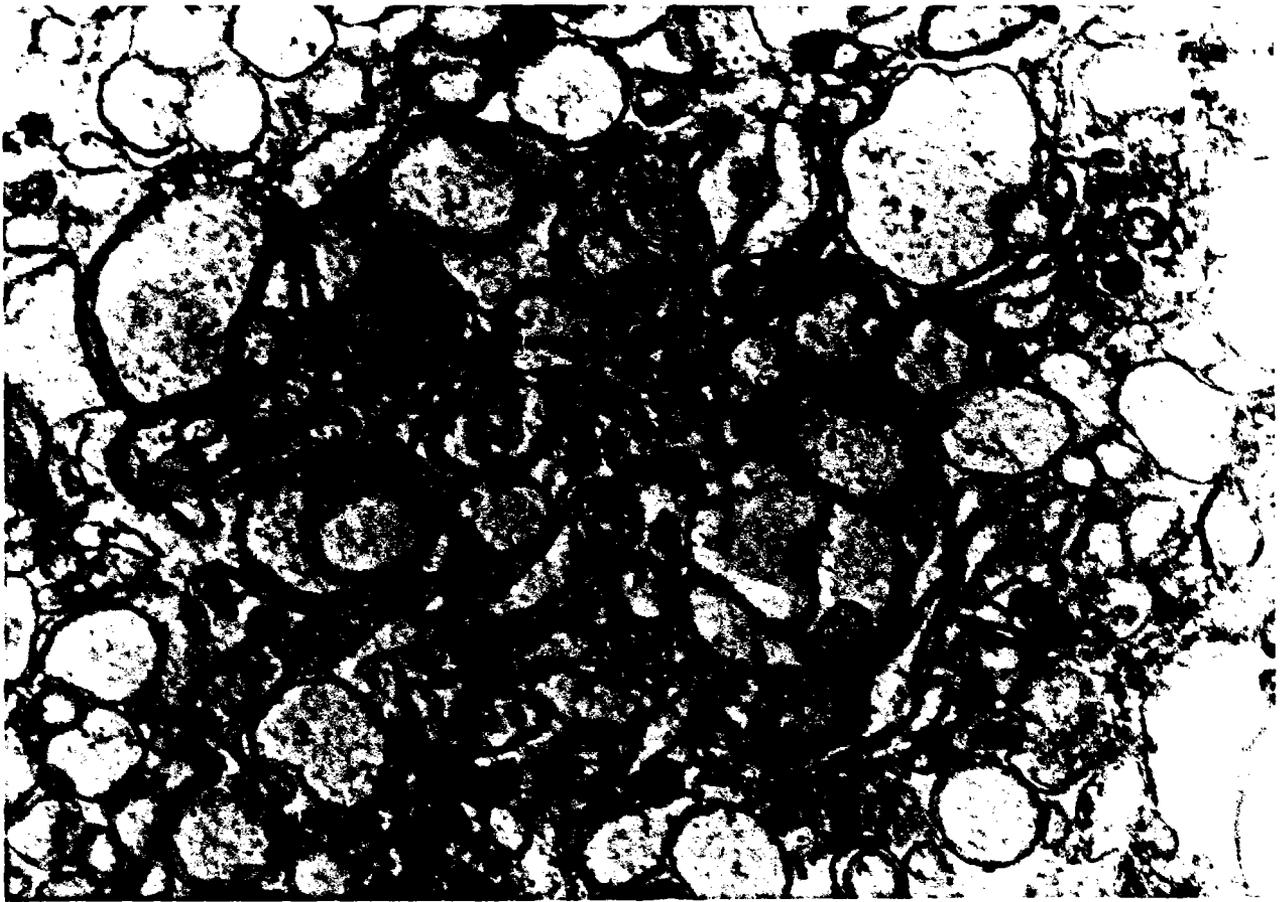


PLANCHE C : FRACTION PLASMALEMMIQUE BRUTE (x 40.000)

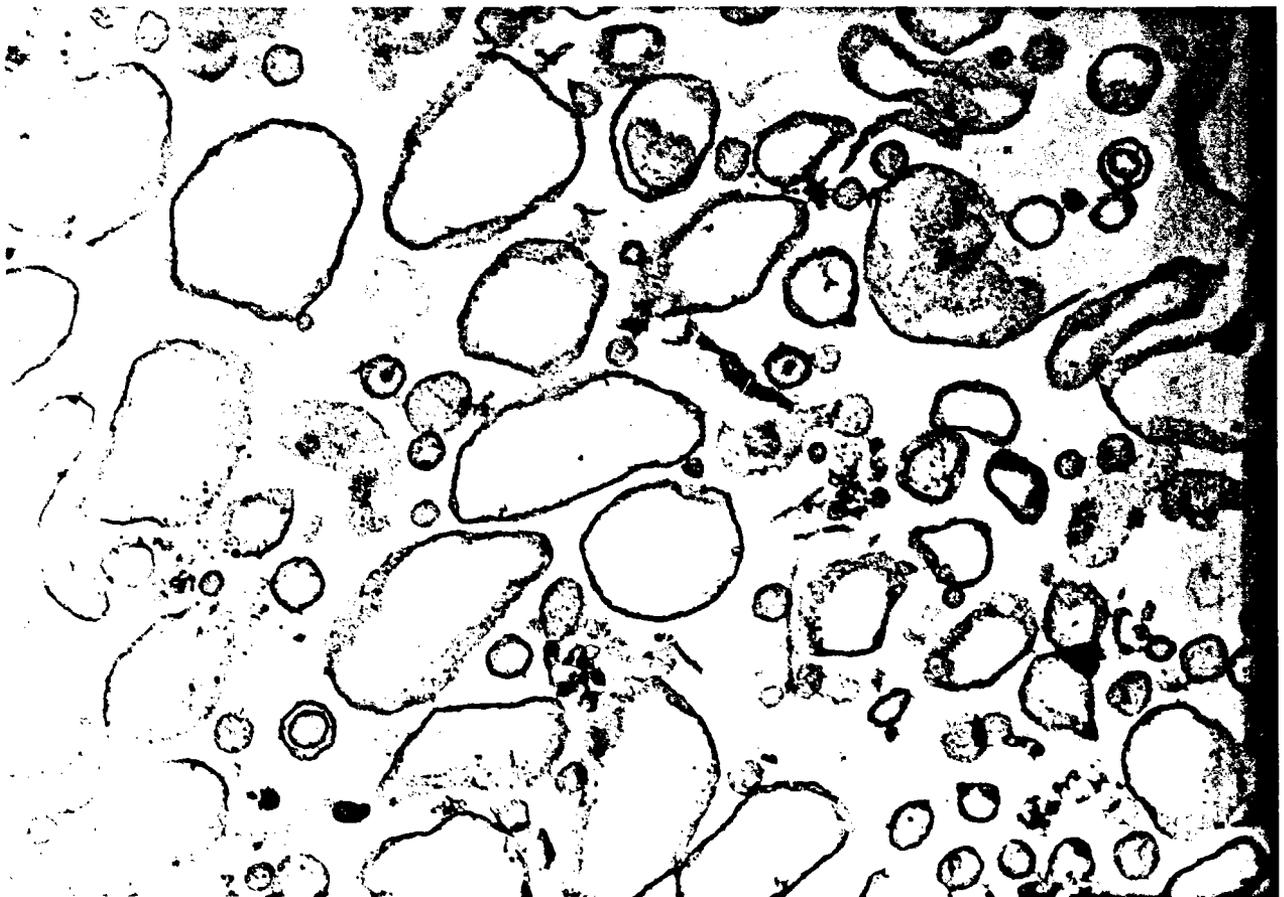


PLANCHE D : FRACTION PLASMALEMMIQUE PURIFIEE (x 40.000).

#### IV.2.2 - Etude de l'activité ATPasique $K^+$ stimulée (fraction II).

Les résultats du plan factoriel sont rassemblés dans le tableau XXXIX, où sont portées les valeurs des 4 paramètres testés. Ces essais n'ont pu être répétés que deux fois sur la même fraction (= fraction II), la quantité de fraction plasmalemme étant limitée.

Préalablement à toute exploitation de ces résultats, il faut remarquer que dans certains essais (n° 8 et n° 11) les différences de quantités de  $P_i$  formées sont négatives. Dans ces cas, l'activité ATPasique  $K^+$  stimulée est nulle et, en outre, l'addition de  $K^+$  dans les essais 8b et 11b inhibe l'activité phosphatasique  $Mg^{++}$  dépendante (ou éventuellement d'autres phosphatases présentes dans le milieu).

##### IV.2.2.1. - Importance relative des facteurs potassium, magnésium, pH sur l'activité ATPasique.

L'influence relative des facteurs potassium, magnésium et pH sur l'activité ATPasique peut être évaluée à l'aide des résultats des 16 essais du plan factoriel réalisé en l'absence de cadmium (tableau XXXIX). Ces résultats sont représentés par les graphes a et b de la figure 32. Ils montrent clairement les faits suivants :

- (1) l'augmentation de la concentration de magnésium (de 3,5 à 7 mM) provoque une diminution de l'activité mesurée quelles que soient les valeurs de  $K^+$  et de pH.
- (2) le pH de 6,5 semble dans tous les cas plus favorable à l'activité de l'ATPase qu'un pH de 7.
- (3) il en est de même du potassium dont l'effet de stimulation sur l'activité ATPasique est nettement plus faible à 100 mM qu'à 50 mM. Pour un pH de 7 et une concentration de 7 mM de magnésium, la concentration de 100 mM de potassium inhibe même l'activité ATPasique au lieu de la stimuler, comme en témoigne la valeur négative de l'activité enregistrée dans ces conditions.

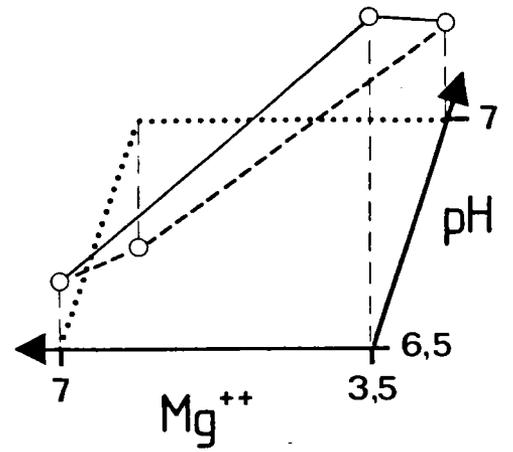
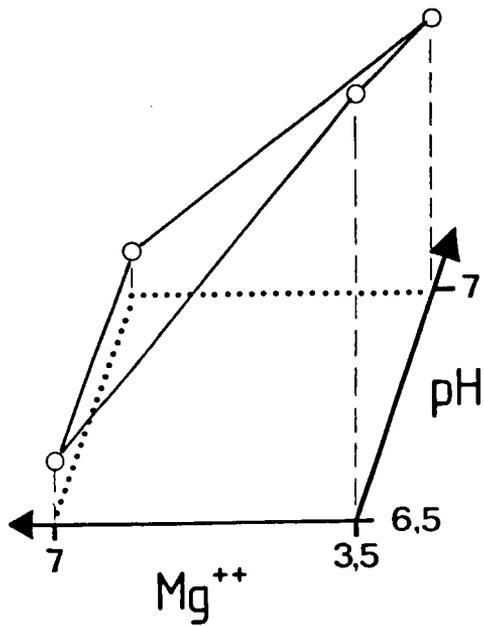
Modalités des variables				Activités ATPasiques (en $\mu$ moles Pi formées/h. mg protéines)		moyenne	écart à la moyenne
Cd mM	K <sup>+</sup> mM	Mg <sup>++</sup> mM	pH	essai n° 1	essai n° 2		
0	50	3,5	6,5	1,173	1,097	1,135	0,038
0	50	3,5	7	0,612	0,821	0,717	0,105
0	50	7	6,5	0,117	0,240	0,178	0,061
0	50	7	7	0,080	0,129	0,105	0,025
0	100	3,5	6,5	0,889	0,858	0,874	0,016
0	100	3,5	7	0,226	0,295	0,261	0,034
0	100	7	6,5	0,153	0,231	0,192	0,039
0	100	7	7	- 0,284	- 0,369	- 0,327	0,029
0,44	50	3,5	6,5	0,248	0,341	0,294	0,046
0,44	50	3,5	7	0,648	0,839	0,744	0,095
0,44	50	7	6,5	- 0,029	- 0,120	- 0,074	0,046
0,44	50	7	7	0,306	0,267	0,287	0,020
0,44	100	3,5	6,5	0,357	0,360	0,359	0,002
0,44	100	3,5	7	0,284	0,369	0,327	0,085
0,44	100	7	6,5	0,051	0,101	0,076	0,025
0,44	100	7	7	0,219	0,323	0,271	0,052

Tableau XXXIX : Activités ATPasiques des essais correspondant au plan factoriel.

50 mM K<sup>+</sup>

100 mM K<sup>+</sup>

0 mM Cd



0,44 mM Cd

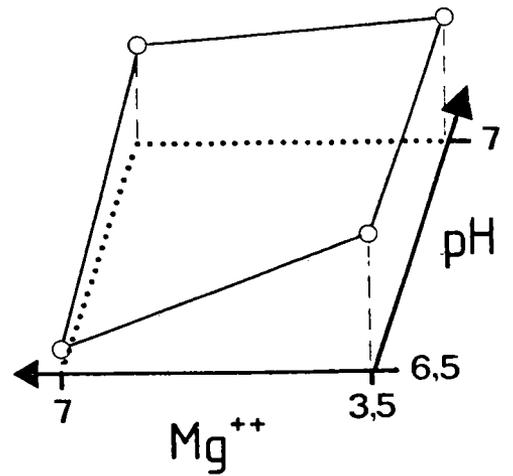
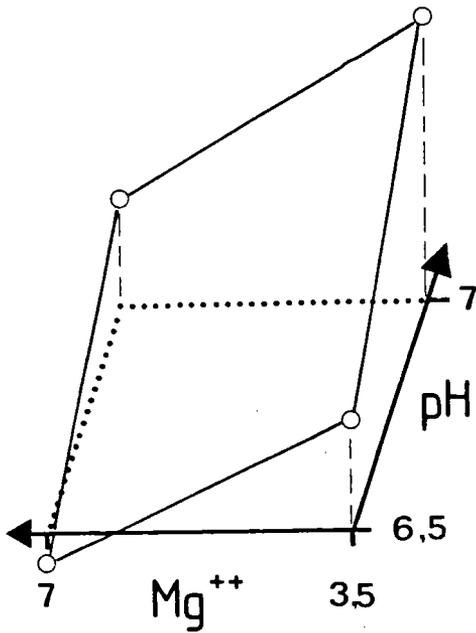


FIG. 32 : ACTIVITES ATPASIQUES DES DIVERS MILIEUX TESTES.

L'analyse de ces résultats par régression multiple permet de modéliser la valeur par l'activité ATPasique  $K^+$  stimulée par l'équation suivante :

$$\hat{Y}_1 = 0,392 - 0,355 [Mg_{(t)}^{++}] - 0,203 [pH_{(t)}] - 0,142 [K_{(t)}^+] - 0,080 [pH_{(t)} \cdot K_{(t)}^+] \quad (8)$$

avec  $[Mg_{(t)}^{++}]$  = concentration de magnésium transformée  
(égale à - 1 ou + 1)

$[pH_{(t)}]$  = valeur du pH transformé  
(égale à - 1 ou + 1)

$[K_{(t)}^+]$  = concentration de potassium transformée  
(égale à - 1 ou + 1)

et un écart-type des répétitions de 0,073.

Cette équation confirme statistiquement les résultats de l'interprétation graphique. Les facteurs magnésium, pH, potassium, ainsi que l'interaction entre le pH et le potassium sont tous significatifs au seuil de 5 % et affectés d'un signe négatif, ce qui signifie que l'augmentation :

- des concentrations en magnésium de 3,5 à 7 mM
  - des concentrations en potassium de 50 à 100 mM,
  - du pH qui passe de 6,5 à 7,
- diminuent l'activité ATPasique  $K^+$  stimulée.

L'interaction pH-potassium (affectée du signe négatif) traduit le fait que la diminution d'activité à pH 7 est d'autant plus importante que la concentration en potassium est plus élevée (et inversement).

En définitive, il apparaît que les meilleures conditions opératoires pour obtenir la plus forte activité spécifique sont les suivantes :

- potassium : 50 mM
- magnésium : 3,5 mM
- pH : 6,5

VI.2.2.2. - Importance relative des facteurs potassium, magnésium, pH sur l'activité ATPasique en présence de cadmium.

L'examen de la figure 32 et la comparaison des graphes a et c d'une part, b et d d'autre part montrent que le cadmium présente deux types d'effet.

- inhibiteur à pH 6,5
- stimulant à pH 7

L'action inhibitrice du cadmium est d'autant plus importante que l'activité de l'enzyme est élevée : en présence de 3,5 mM en magnésium, de 50 mM en potassium et à un pH de 6,5, l'activité moyenne observée passe de 1,135 à 0,294 unités enzymatiques \*, ce qui correspond à une inhibition de l'ordre de 74 % (tableau XL).

De la même façon, la stimulation de l'activité ATPasique à pH 7, est plus forte quand les activités en l'absence de cadmium sont plus faibles (tableau XL). C'est en particulier le cas où, en présence de 7 mM de magnésium et de 100 mM de potassium (valeurs négatives de = 0,327 U.E.) le cadmium provoque la stimulation la plus importante ( > 271 %).

L'interprétation statistique des 32 résultats de l'ensemble du plan factoriel (tableau XXXIX) permet de modéliser l'action du cadmium sur l'activité ATPasique en fonction des différents facteurs magnésium, potassium et pH :

$$\begin{aligned} \hat{Y}_2 = & 0,339 - 0,250 [Mg_{(t)}^{++}] + 0,162 [Cd_{(t)}^{++} \cdot pH_{(t)}] + 0,105 [Cd_{(t)}^{++}/Mg_{(t)}^{++}] \\ & - 0,085 [K_{(t)}^+] - 0,080 [K_{(t)}^+ \cdot pH_{(t)}] + 0,057 [Cd_{(t)}^{++} \cdot K_{(t)}^+] \\ & - 0,053 [Cd_{(t)}^{++}] + 0,049 [K_{(t)}^+ \cdot Mg_{(t)}^{++}] \end{aligned} \quad (9)$$

avec un écart-type des répétitions de 0,071 - L'indice (t) signifie comme pour l'équation précédente ( $\hat{Y}_1$ ), que les variables sont transformées (égales à - 1 ou + 1).

L'équation (9) souligne à nouveau et de manière significative (5 %) l'influence négative des concentrations élevées en magnésium (7mM) et en potassium (100 mM), ainsi que du cadmium (0,44 mM).

\* L'unité enzymatique choisie arbitrairement, correspond à 1  $\mu$ mole de Pi formé en une heure par mg protéines.

modalité des variables			Activités ATPasiques K <sup>+</sup> stimulée (umole P <sub>i</sub> /h.mg protéines)			% d'inhibition	% d'activation
K <sup>+</sup> (mM)	Mg <sup>++</sup> (mM)	pH	Cd 0 mM	Cd = 0,44mM	variation Δ		
50	3,5	6,5	1,135	0,294	- 0,841	74,1	
50	3,5	7	0,717	0,744	+ 0,027		3,8
50	7	6,5	0,178	- 0,074	- 0,252	100 (141,6*)	
50	7	7	0,105	0,287	+ 0,182		173,3
100	3,5	6,5	0,874	0,359	- 0,515	58,9	
100	3,5	7	0,261	0,327	+ 0,066		25,3
100	7	6,5	0,192	0,076	- 0,116	60,4	
100	7	7	- 0,327	0,271	+ 0,598		> 271

Tableau XL: Variation de l'activité ATPasique K<sup>+</sup> - stimulée en absence et en présence de cadmium. Les pourcentages d'inhibition sont calculés par rapport à la valeur Cdo correspondant à chaque condition.

\* : pourcentage réellement calculé avec valeurs négatives (non pris en compte, une inhibition enzymatique ne pouvant pas être supérieure à 100 %).

(1) Les termes d'interactions positifs du cadmium avec le pH, le magnésium et le potassium traduisent l'effet de stimulation du cadmium sur l'activité ATPasique quand le pH, le magnésium et le potassium sont élevés (respectivement 7, 7 mM et 100 mM). Au contraire, quand les valeurs de ces paramètres sont faibles (respectivement 6,5, 3,5 mM et 50 mM) les termes d'interaction - affectés alors d'un signe négatif - viennent s'ajouter à l'inhibition enzymatique induite par le métal. L'action du cadmium est donc moins perceptible lorsque les concentrations des autres cations (magnésium et potassium) augmentent, ceci témoigne vraisemblablement de l'existence de deux compétitions respectivement avec le magnésium et avec le potassium ; ce qui ne semble pas le cas pour les protons.

(2) L'interaction négative entre le pH et le potassium est toujours observable comme précédemment (cf. § IV.2.2..1.)

(3) L'interaction du potassium avec le magnésium (positive) signifie que l'effet inhibiteur dû à l'augmentation du magnésium (7 mM) diminue lorsque la concentration de potassium augmente (100 mM), ce qui témoigne, là également, d'une compétition entre ces deux cations.

(4) Le pH intervient toujours de manière interactive avec le potassium et le cadmium.

En résumé, le cadmium inhibe l'ATPase  $K^+$  stimulée à pH 6,5 et l'active à pH 7,0 (Tableau XL).

#### IV.2.2.3. - Détermination de la CI50 du cadmium vis à vis de l'ATPase $K^+$ stimulée ( fraction III ).

Le tableau XLI rassemble les pourcentages d'inhibition observés en fonction des concentrations de cadmium introduites. La CI50 déterminée dans ces conditions est située entre 1 et 5 mg/l. L'interpolation entre ces deux valeurs fournit une CI50 de l'ordre de 4,5 mg/l (en cadmium introduit) pour une quantité de protéines introduite dans les milieux de 39,4  $\mu$ g.

Concentration de cadmium introduite (en mg/l)	pourcentages d'inhibition observés
0	0
0,005	2,1
0,5	7,8
1	7
5	55,2
50	65,3

Tableau XLI : Pourcentages d'inhibition de l'activité ATPasique-K<sup>+</sup> stimulée.

IV.2.3. - Mesures des concentrations de cadmium libre.

Les dosages ont été réalisés sur les milieux d'incubation n° 9 à 16 du plan factoriel précédent ; chaque milieu d'incubation étant testé en absence de potassium (a) et en présence de potassium (b).

Le tableau XLII rassemble les différentes concentrations de cadmium libre obtenues avant ajout d'ATP-TRIS (Cd 1), après ajout d'ATP-TRIS (Cd 2) et après ajout de fraction plasmalemmique (Cd 3) ; ces trois concentrations de cadmium étant mesurées dans des volumes différents :

- 7 ml pour Cd 1
- 9 ml pour Cd 2
- 10 ml pour Cd 3.

IV.2.3.1. - Complexation du cadmium par la solution minérale tamponnée (TRIS, KCl, MgCl<sub>2</sub>).

Dans le tableau XLII, les concentrations de cadmium libre dans la solution minérale tamponnée (soit Cd1) sont très inférieures à la concentration initialement introduite (71,43 mg/l = 0,64 mM). Dès le départ, le cadmium est donc, en grande partie, complexé par le TRIS et les chlorures présents dans le milieu d'incubation.

N° des milieux d'incubation	9		10		11		12		13		14		15		16		
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	
K <sup>+</sup> (mM)	0	50	0	50	0	50	0	50	0	100	0	100	0	100	0	100	
Hg <sup>++</sup> (mM)	3,5	3,5	3,5	3,5	7	7	7	7	3,5	3,5	3,5	3,5	7	7	7	7	
pH	6,5	6,5	7	7	6,5	6,5	7	7	6,5	6,5	7	7	6,5	6,5	7	7	
Cd <sub>1</sub>	ppm	27,43	14,53	26,64	16,28	25,77	14,87	21,76	18,74	27,43	10,60	26,64	11,63	25,77	12,46	21,76	11,75
	µM	244	129	237	145	229	132	194	167	244	94	237	103	229	111	194	105
Cd <sub>2</sub>	ppm	2,93	2,47	2,81	2,76	6,63	5,66	7,24	6,40	2,93	2,93	2,81	2,46	6,63	5,08	7,24	5,59
	µM	26	22	25	25	59	50	64	57	26	26	25	22	59	45	64	50
* Q1 (µmoles)	1,47	0,71	1,43	0,79	1,07	0,47	0,77	0,65	1,47	0,42	1,43	0,53	1,07	0,37	0,77	0,28	
Cd <sub>3</sub>	ppm	1,84	1,87	3,11	2,83	4,94	4,96	7,74	7,31	1,84	1,86	3,11	2,39	4,94	4,71	7,74	5,93
	µM	16	17	28	25	44	44	69	65	16	17	28	21	44	42	69	53
* Q2 (µmoles)	0,07	0,05	- 0,05	- 0,05	0,09	0,01	- 0,11	- 0,14	0,07	0,07	- 0,05	- 0,05	0,09	- 0,01	- 0,11	- 0,08	

Tableau XLII : Résultats séquentiels des dosages ionométriques réalisés sur les milieux d'incubation correspondant aux essais 9 à 10 du plan factoriel (réalisés en présence de cadmium).

\* : Q1 et Q2 seront appelés pour la suite de l'exposé et pour clarifier celui-ci, respectivement la quantité de cadmium complexée par le substrat (pour Q1) et la quantité de cadmium complexée ( $> 0$ ) ou libérée ( $< 0$ ) par l'enzyme (pour Q2) et cela bien que vous n'ayons pas étudié une possible redistribution du cadmium au sein des milieux.

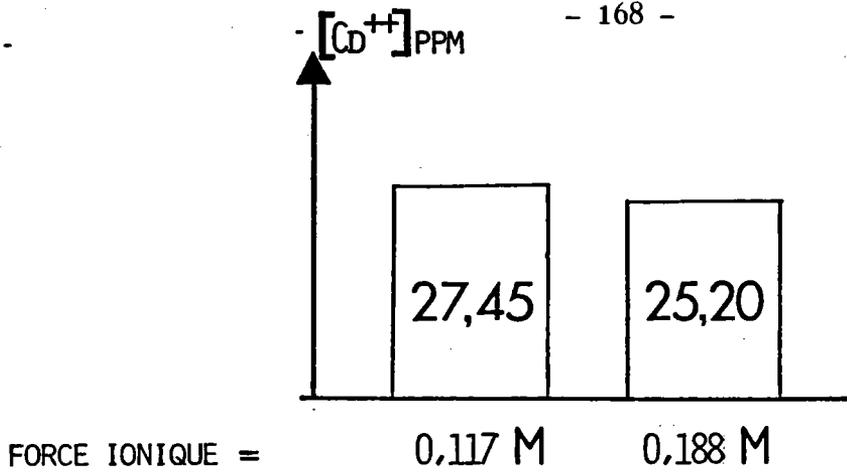


FIG. 33A : EFFET DE LA VARIATION DE LA FORCE IONIQUE SUR LA CONCENTRATION DE CADMIUM LIBRE

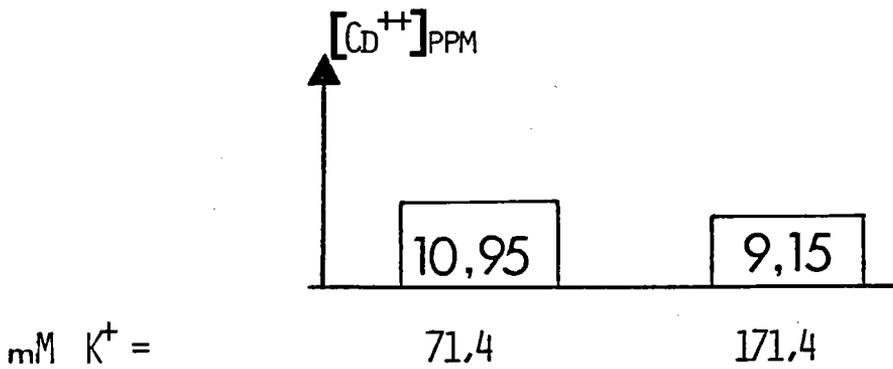


FIG. 33B : EFFET DE LA VARIATION DE LA CONCENTRATION EN POTASSIUM SUR LA CONCENTRATION DE CADMIUM LIBRE

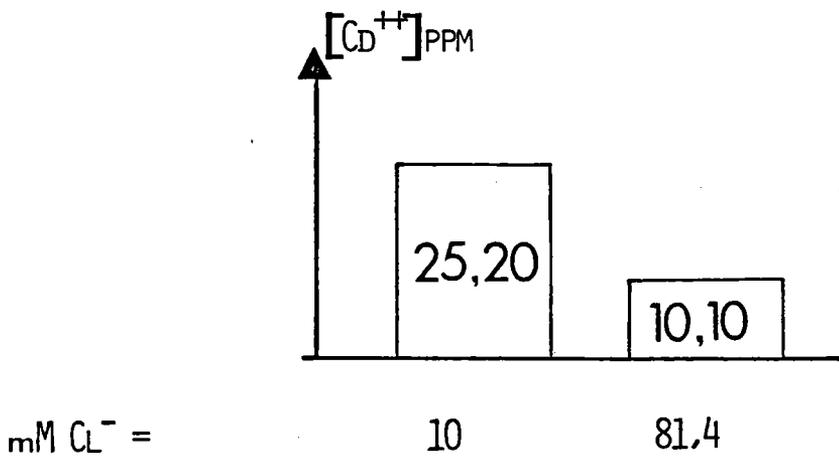


FIG. 33C : EFFET DE LA VARIATION DE LA CONCENTRATION EN CHLORURES SUR LA CONCENTRATION DE CADMIUM LIBRE.

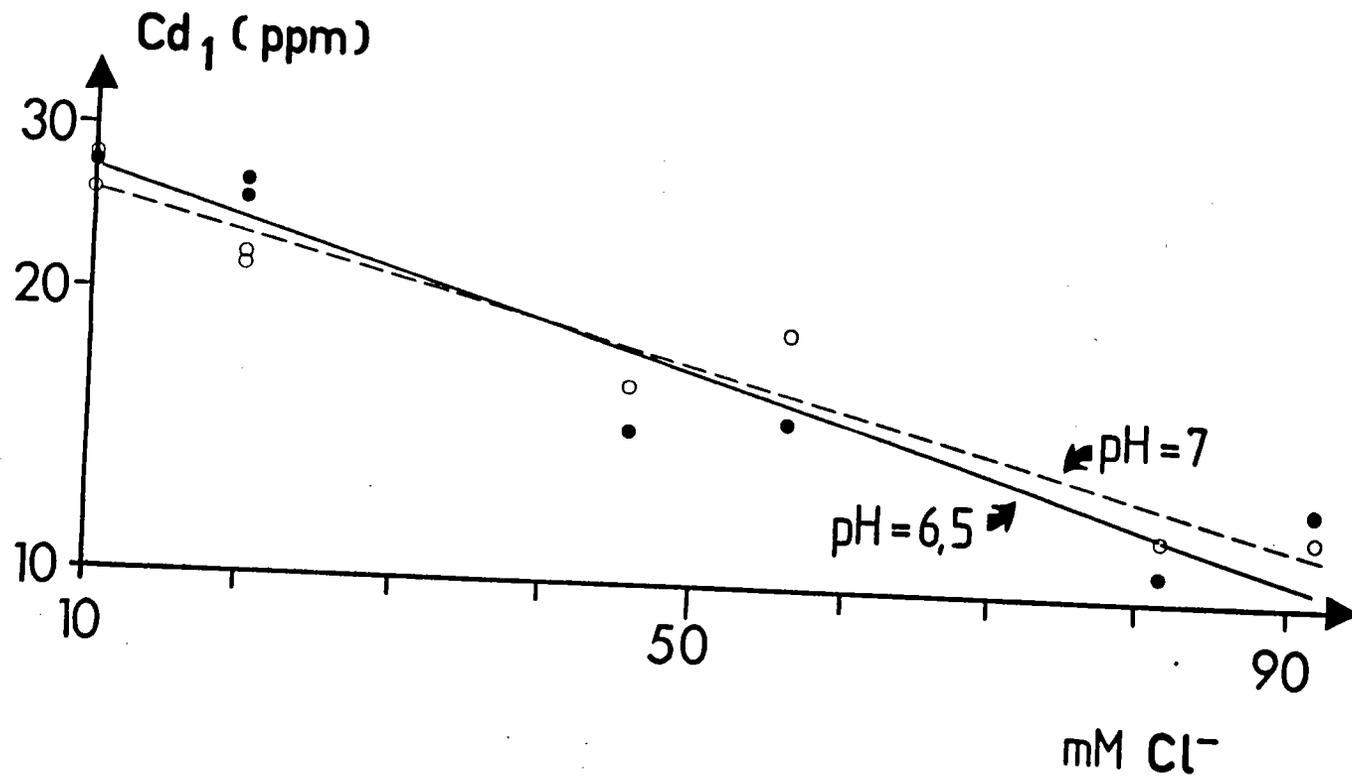


FIG. 34 : CORRELATION ENTRE LA CONCENTRATION DE CADMIUM LIBRE AVANT AJOUT DE SUBSTRAT ( $C_{D1}$ ) ET LA MOLARITE EN CHLORURES DES MILIEUX TESTES.

Selon les milieux testés, les pourcentages de cadmium complexé varient de 61 à 85 % et se montrent toujours inférieurs dans les milieux sans potassium (a) à ceux des milieux avec potassium (b). Cette variation des concentrations de cadmium entre les tubes (tableau XLII) nous a invité à rechercher l'influence de la force ionique (Figure 33 a), des concentrations en potassium (figure 33 b) et en chlorures (figure 33 c) sur la complexation du cadmium en solution à pH 6,5

Pour 71,43 mg/l de cadmium introduit (0,64 mM), lorsque la force ionique passe de 0,117 à 0,188 M (domaine de variation de la force ionique des échantillons testés), il n'y a pas de diminution notable de la concentration de cadmium libre (figure 33a). Il ne est de même lorsque la concentration de potassium varie de 71,4 à 171,4 mM, qui représentent respectivement le minimum et le maximum des teneurs en potassium des essais réalisés (figure 33b).

Par contre, l'augmentation des chlorures de 10 à 81,4 mM provoque une diminution d'environ 15 mg/l de cadmium libre. Les différentes valeurs de Cd 1 du tableau XLII ont été corrélées avec les concentrations respectives en chlorures (figure 34). Les droites obtenues sur papier semi-logarithmique se caractérisent par des coefficients de corrélation (r) respectivement égaux à 0,955 pour pH 6,5 et à 0,965 pour pH 7.

#### IV.2.3.2. - Complexation du cadmium après ajout d'ATP-TRIS (Cd2).

Les concentrations de cadmium libre (Cd2) sont fortement diminuées après ajout d'ATP-TRIS, et ce, d'autant plus que la concentration en magnésium est faible (3,5 mM). Ceci exprime une compétition entre le cadmium et le magnésium vis-à-vis de l'ATP. Elle peut être reliée à l'interaction positive cadmium-magnésium observée précédemment dans le plan factoriel.

De plus, les quantités de cadmium complexé après ajout d'ATP-TRIS (Q1) sont linéairement corrélées à la concentration de cadmium présente dans le milieu avant ajout (Cd1). On obtient, ainsi, deux droites  $Cd = f(Q1)$  pour les deux concentrations de magnésium testées (fig. 35).

IV.2.3.3. - Complexation du cadmium après ajout de fraction plasmalemmique (Cd3).

Les concentrations de cadmium libre après ajout de fraction plasmalemmique (Cd3) révèlent la même typologie que celles trouvées après ajout d' ATP-TRIS : elles sont, environ, deux fois plus élevées lorsque la concentration en magnésium double. Les quantités de cadmium fixées après ajout de fraction (Q2) sont relativement faibles à pH 6,5. A pH 7, il n'y a pas de complexation de cadmium libre c'est-à-dire diminution mais, au contraire, augmentation de la quantité du cadmium libre dans le milieu.

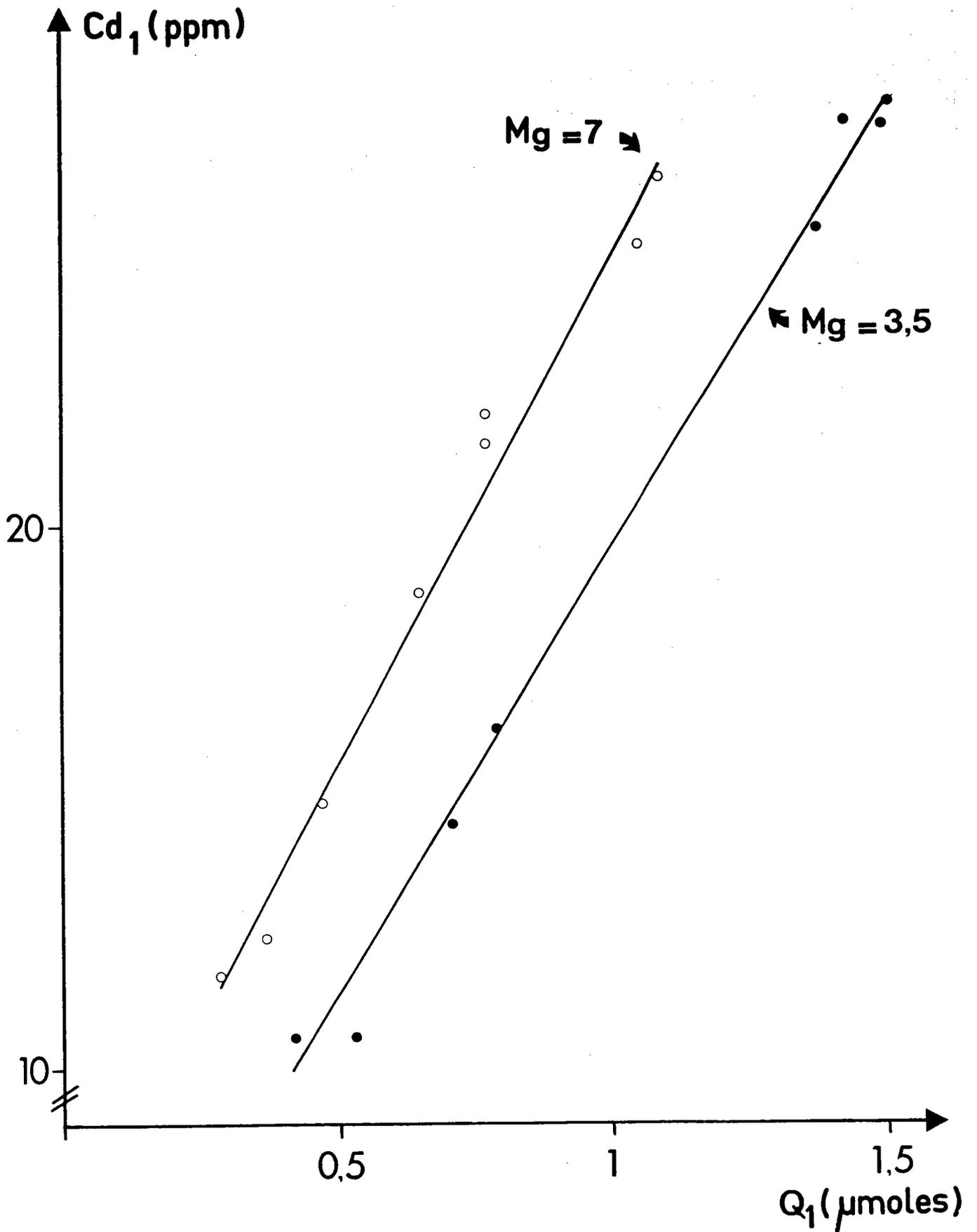


FIG. 35: CORRELATION ENTRE LA CONCENTRATION DE CADMIUM LIBRE AVANT AJOUT DE SUBSTRAT ( $Cd_1$ ) ET LA QUANTITE DE CADMIUM FIXE PAR LE SUBSTRAT ( $Q_1$ ).

IV.3. - DISCUSSION.

(1) Les activités ATPasiques observées varient de 1,10 à 1,17  $\mu$ moles de Pi formé par heure et par mg protéines (tableau XXXIX) dans les conditions opératoires qui fournissent une activité maximale ( $K^+ = 50$  mM,  $Mg^{++} = 3,5$  mM, pH = 6,5). Elles se situent dans la fourchette des résultats existant dans la littérature sur les ATPases algales, mais sont inférieures à celles trouvées, par ailleurs, chez certains végétaux supérieurs (Tableau XLIII).

	Organismes	Activités ATPasiques ( $\mu$ moles Pi/h. mg protéines)	Références
PLANTES SUPERIEURES	Tabac	1225,2 - 1321,2	KASAMO (1982)
	Maïs	72	SCALLA <u>et al.</u> (1983)
	Avoine	45,1	LEONARD et HODGES (1973)
	Betterave rouge	25,7	BRISKIN et POOLE (1983)
	Choux fleur	13,6	POMEROY et Mc MURCHIE (1982)
	Pin	3,5	HELLERGREEN <u>et al.</u> (1983)
ALGUES	<u>Boergesenia</u> <u>forbesii</u>	5 *	MIZUTA ET SUDA (1978)
	<u>Dunaliella</u> <u>tertiolecta</u>	0,26 - 0,27	JOKELA (1969)

Tableau XLIII : Activités ATPasiques  $K^+$  stimulées de certaines espèces végétales.

\* Activité  $Na^+ - K^+$  stimulée.

(2) L'activité enzymatique étant dépendante de la structure de l'enzyme, on peut avancer l'hypothèse que les facteurs testés (magnésium, potassium, pH) entraînent directement ou indirectement, des variations conformationnelles de l'enzyme récepteur, conduisant à un nouvel état d'équilibre thermodynamique avec le milieu et influant ainsi l'activité observée (YON, 1969).

(3) Le magnésium joue un rôle primordial que ce soit en absence ou en présence de cadmium. Pour des fractions provenant de plantes supérieures le complexe Mg-ATP est le véritable substrat et le magnésium libre diminue fortement, au delà d'une concentration optimale, l'activité des ATPases  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  stimulée de racines de betterave à sucre (LINDBERG et al., 1974) et  $\text{K}^+$  stimulée de racines d'avoine (BALKE et HODGES, 1975). Nous avons montré que pour l'ATPase plasmalemmique provenant de chlorelle, l'augmentation de la concentration de magnésium provoquait également une diminution de l'activité enzymatique. Cette diminution est plus importante que celle observée chez Boergesenia forbesii (21,2 %) pour la même variation de la concentration de magnésium (MIZUTA et SUDA, 1978). Il serait utile de tester, par la suite, d'autres concentrations de magnésium, que 3,5 et 7 mM, afin de préciser le seuil des concentrations inhibitrices ainsi que le maximum d'activité.

(4) L'augmentation du pH de 6,5 à 7 a pour effet de diminuer l'activité ATPasique  $\text{K}^+$  stimulée, ce qui avait déjà été observé sur des fractions provenant de plantes supérieures (LEONARD et HOTCHKISS, 1976 ; BRISKIN et POOLE, 1983).

En présence de cadmium, l'écart entre les deux modalités de pH testées qui pouvait, à priori, sembler faible (0,5 unités pH) s'est révélé être, en fait, suffisamment large pour provoquer une inversion d'effets. Il y a inhibition de l'enzyme à pH 6,5 et activation à pH 7 et, à notre connaissance, de tels effets du pH n'ont jamais été observés dans la littérature.

(5) Quant au potassium, il diminue l'activité enzymatique aux fortes concentrations (100 mM). Toutefois, son influence est de moindre importance que celle du magnésium et du pH. Nous avons recherché si cette inhibition résultait de l'effet intrinsèque du potassium ou de l'augmentation de la force ionique induite par l'addition de KCl, mais aucune corrélation n'a été observée entre la force ionique des milieux et l'activité enzymatique.

(6) La résolution du plan factoriel a montré que les interactions du cadmium avec le pH, le magnésium et le potassium étaient positives et significatives : la première étant plus importante que les deux autres. Il est vraisemblable que le cadmium, comme les autres variables étudiées, joue sur la structure enzymatique.

(7) Les pourcentages d'inhibition observés (pour 50 mg/l de cadmium introduit), dans les conditions où l'activité enzymatique est optimale, varient légèrement d'un fractionnement à l'autre : 74,1 % pour la fraction II (tableau XL) et 65,3 % pour la fraction III (tableau XLI). Cette reproductibilité est très acceptable, si l'on considère l'ensemble des opérations de broyage de centrifugation qui permettent d'obtenir les fractions enzymatiques et peuvent jouer sur son degré de pureté et d'activité. De plus, ces résultats sont du même ordre de grandeur que celui observé (71,7 %) sur l'ATPase  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  stimulée de Boergesenia forbesii pour une concentration de cadmium introduite égale à 1 mM (MIZUTA et SUDA, 1978).

(8) Pour que les pourcentages d'inhibition calculés soient valables, il était nécessaire de vérifier que les conditions étaient identiques dans les milieux appariés (a et b), et cela au chlorure de potassium près puisque l'activité ATPasique est mesurée par différence entre un tube avec KCl (tube b) et un tube sans KCl (tube a).

Si les concentrations de cadmium libre avant ajout de substrat et d'enzyme (Cd 1) sont différentes par suite d'une concentration plus élevée en chlorures apportés par le KCl qui modifient la spéciation du cadmium (Fig. 34), ces différences s'estompent au fur et à mesure que l'on ajoute le substrat (Cd2) et la fraction plasmalemmique (Cd3). Il en résulte que les concentrations de cadmium après ajout de fraction (Cd3) sont comparables, même si elles restent très légèrement supérieures dans les tubes a que dans les tubes b, ce qui confirme la validité des pourcentages d'inhibition obtenus.

(9) Dans les conditions où l'activité ATPasique est maximale, la CI50 relative à l'inhibition de cette activité est de 4,5 mg/l de cadmium introduit. Exprimé de cette façon, l'enzyme testée n'apparaît pas très sensible. Or, nos observations montrent que les quantités de cadmium libre, dans le milieu d'incubation où l'activité ATPasique est maximale 9b, varient de la façon suivante :

- 4,480  $\mu$ moles de cadmium introduit (0,64 mM pour 7 ml).
- 0,905  $\mu$ moles avant ajout de substrat (129  $\mu$ M pour 7 ml)
- 0,198  $\mu$ moles après ajout de substrat (22  $\mu$ M pour 9 ml).
- 0,166  $\mu$ moles après ajout d'enzyme. (17  $\mu$ M pour 10 ml).

Ces données montrent que le cadmium se fixe à la fois sur le substrat et sur l'enzyme.

En ce qui concerne le cadmium fixé sur le substrat, aucune corrélation n'existe entre les variations d'activité observées  $\Delta$  (cf. tableau XL), et les quantités de cadmium Q1 fixé par le substrat. L'hypothèse formulée par LINDBERG et WINGSTRAND (1985) expliquant les inhibitions causées par le cadmium par la seule fixation sur le substrat en compétition avec le magnésium (cf. figure 35), ne semble pas vérifiée dans notre cas.

Après ajout de la fraction enzymatique, on constate que :

- à pH 6,5, il se produit une diminution des concentrations de cadmium libre et simultanément une inhibition de l'activité enzymatique (cf. tableau XL).
- à pH 7,0, au contraire, l'addition de la fraction s'accompagne d'une augmentation des concentrations de cadmium libre et parallèlement d'une augmentation de l'activité ATPasique. En d'autres termes l'hydrolyse de l'ATP s'accompagne d'une augmentation du cadmium libre dans le milieu. Dans ces conditions, on peut penser que le cadmium libéré était préalablement complexé à l'ATP et que suite à l'hydrolyse du substrat en ADP + Pi, le complexe Cd-ATP est dissocié.

Cette corrélation entre les variations de l'activité ATPasique observée (cf tableau XL), et les quantités Q2 de cadmium complexé (ph 6,5) ou libéré (pH 7,0) est reportée sur la fig. 36.

Compte-tenu des remarques précédentes (et en supposant qu'aucune redistribution n'intervienne entre les complexes formés) l'inhibition observée dans ce cas, pour une quantité de protéines égale à 39,2 µg, soit 74,1 % (Tableau XL) est vraisemblablement due à la quantité Q2 de cadmium fixé sur l'enzyme, 0,03 µmoles (Tableau XLII). Il s'avère donc que dans les conditions de l'essai, moins de 1/100 du cadmium introduit s'avère être réellement actif, ce qui signifie également que l'enzyme testée est relativement sensible au cadmium

(10) Il est difficile d'expliquer la stimulation d'activité enzymatique induite par le cadmium. Toutefois une telle stimulation a déjà été observée sur une ATPase magnésium dépendante provenant de branchies de homard (TUCKER, 1979), et de nombreuses autres enzymes sont activées entre  $10^{-3}$  et  $10^{-6}$  M de cadmium (VALLEE et ULMER, 1972).

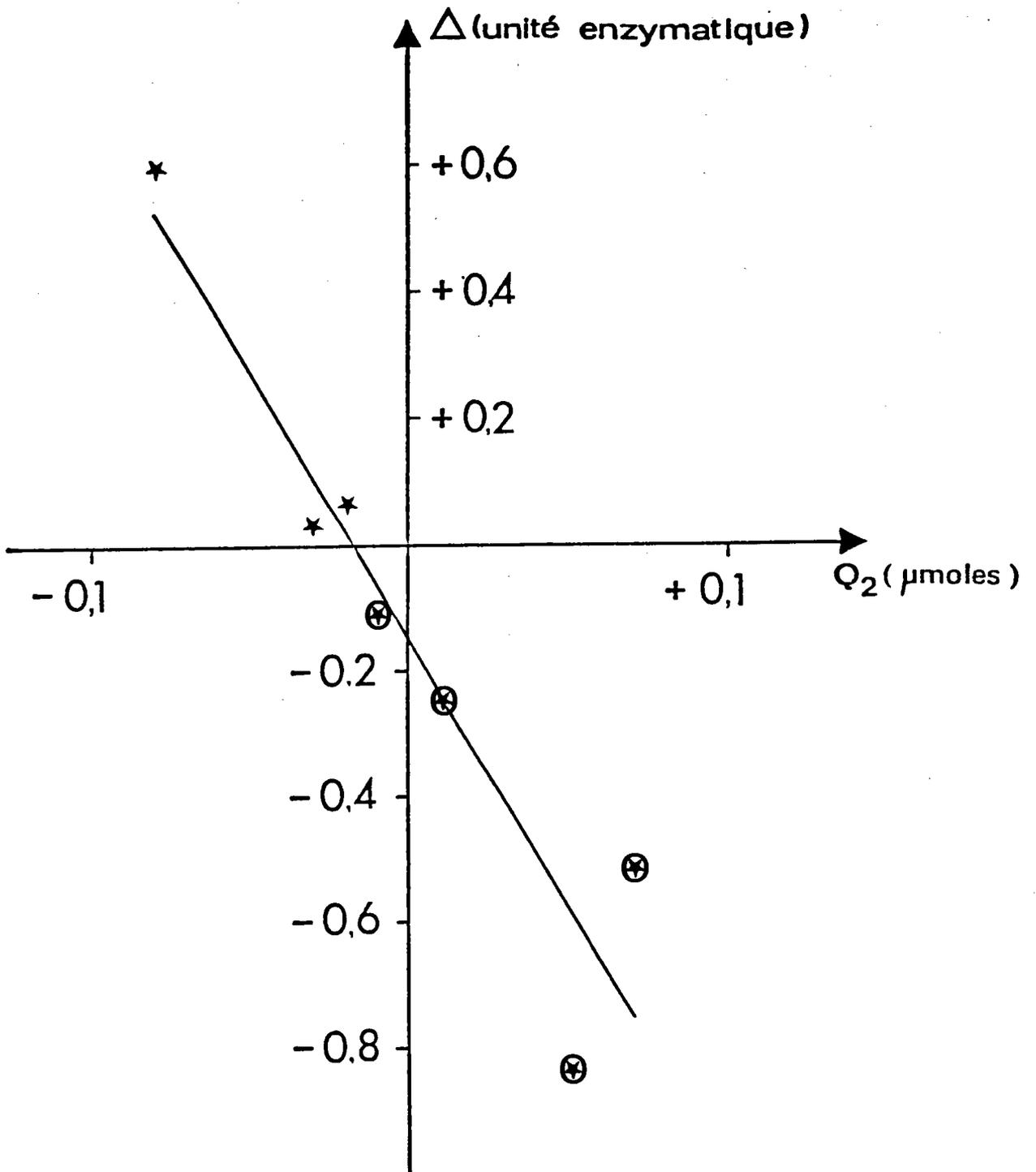


FIG. 36 : CORRELATION ENTRE LA VARIATION DE L'ACTIVITE ATPASIQUE DUE AU CADMIUM ( $\Delta$ ) ET LA QUANTITE DE CADMIUM FIXE OU LIBERE ( $Q_2$ ).

LES RONDS AUTOUR DES ETOILES REPRESENTENT LES CONDITIONS CORRESPONDANT A pH = 6.5

### CONCLUSION

Les manifestations toxiques du cadmium sont multiples, témoignant de son effet sur de nombreuses structures cellulaires. Nous avons montré qu'il y avait une vacuolisation importante du contenu cellulaire à 4,4 mg/l de cadmium introduit. Toutefois, la manifestation la plus évidente et la plus facilement perceptible est constituée par les perturbations de la croissance algale. A cet égard, les paramètres classiques d'évaluation de cette croissance tels que la numération et la D.O. sont plus sensibles que d'autres paramètres comme le contenu en ATP ou en chlorophylle a : les CI50 correspondantes sont comprises entre 0,60 et 1,85 mg/l de cadmium introduit selon le paramètre utilisé. Si on considère un paramètre biochimique, à savoir l'activité de l'ATPase  $K^+$  stimulée testée in vitro, la CI50 est de l'ordre de 4,5 mg/l de métal introduit.

Les CI50 présentées ci-dessus sont exprimées en terme de cadmium total introduit, or tout le métal n'est pas réellement toxique et biodisponible. En effet, l'ajout d'un cation à un milieu complexe est suivi de son interaction avec des constituants abiotiques de ce milieu dont résulteront des changements de spéciation, des phénomènes de complexation ou de précipitation, capables de modifier sa biodisponibilité et par voie de conséquence sa toxicité pour les cellules ou organismes vivants. Nous avons montré que le cadmium pouvait être complexé par les chlorures et le TRIS dans les milieux d'incubation de l'enzyme et qu'une faible partie restait libre dans le milieu.

Certaines cellules disposent de structure "piège" capable de séquestrer le toxique et de s'opposer à sa pénétration intracellulaire. La paroi des chlorelles répond à cette fonction puisque plus de 95 % du cadmium retenu par les algues est adsorbé sur cette structure pariétale tandis que moins de 5 % du métal est réellement absorbé.

Nous avons pu montrer que l'adsorption du cadmium sur Chlorella vulgaris est un phénomène extrêmement rapide qui s'effectue selon un isotherme de Freundlich pour les concentrations inférieures à 7,5  $\mu M$  et un isotherme de Langmuir pour les concentrations supérieures à cette valeur. Pour ces dernières, un pH acide semble protéger davantage la cellule qu'un pH neutre, indiquant une compétition entre les ions  $H^+$  et les ions  $Cd^{++}$  au niveau de la paroi.

L'ampleur de l'adsorption est telle que l'utilisation des algues dans l'épuration des eaux est tout à fait digne d'intérêt et loin d'être utopique : la capacité maximale d'adsorption (à pH non régulé) est ainsi de  $5,1 \cdot 10^{-8}$  moles de cadmium/mg P.S..

Il reste à savoir si le cadmium, une fois fixé, n'est plus biodisponible ou susceptible de modifier la pénétration dans la cellule de nutriments. Il serait également nécessaire de connaître la part que les différents groupements carboxyles, hydroxyles, imidozoles, thiols, sulfatés et les liaisons peptidiques prennent respectivement dans cette adsorption.

La quantité de Cd absorbé est très faible (moins de 5 %) ; elle est cependant suffisante pour provoquer de graves altérations physiologiques. Ainsi, une fois franchie cette barrière inerte que constitue la paroi, le cadmium rencontre la membrane plasmalemmique dont il peut perturber les fonctions. Nous avons mis en évidence l'inhibition importante de l'ATPase  $K^+$  stimulée provoquée par le cadmium dans certaines conditions opératoires. L'activité ATPasique est stimulée à pH 7,0 et inhibée à pH 6,5 lorsque son activité est optimale. Dans ce dernier cas, l'enzyme est très sensible au cadmium si on considère que seul le cadmium fixé sur la fraction plasmalemmique est actif et que la toxicité ne doit pas s'estimer par la concentration de cadmium qui reste libre dans le milieu. En tout état de cause, l'ATPase plasmalemmique est la première structure active altérée par le cadmium et la fonction de cette enzyme est suffisamment importante pour expliquer une partie de la toxicité du cadmium. Néanmoins, le plasmalemme n'est pas une barrière infranchissable, d'autres structures cibles situées à l'intérieur de la cellule peuvent être touchées : le noyau, la mitochondrie, le chloroplaste...

La cellule n'oppose pas que des défenses passives vis-à-vis des toxiques et peut développer des mécanismes de défense, face à l'agression. L'exemple d'une réponse active à l'intoxication cadmique est représenté par la synthèse de métallothionéines. Ces protéines, piège intracellulaire du cadmium, fixent le métal au niveau de leurs groupements thiols, neutralisent sa toxicité et assurent sa protection cellulaire. Dans le contexte de l'utilisation des algues dans l'épuration des effluents complexes, il serait intéressant d'étudier la synthèse de ces substances et les limites de protection assurées par ces métallothionéines.

ANNEXE I

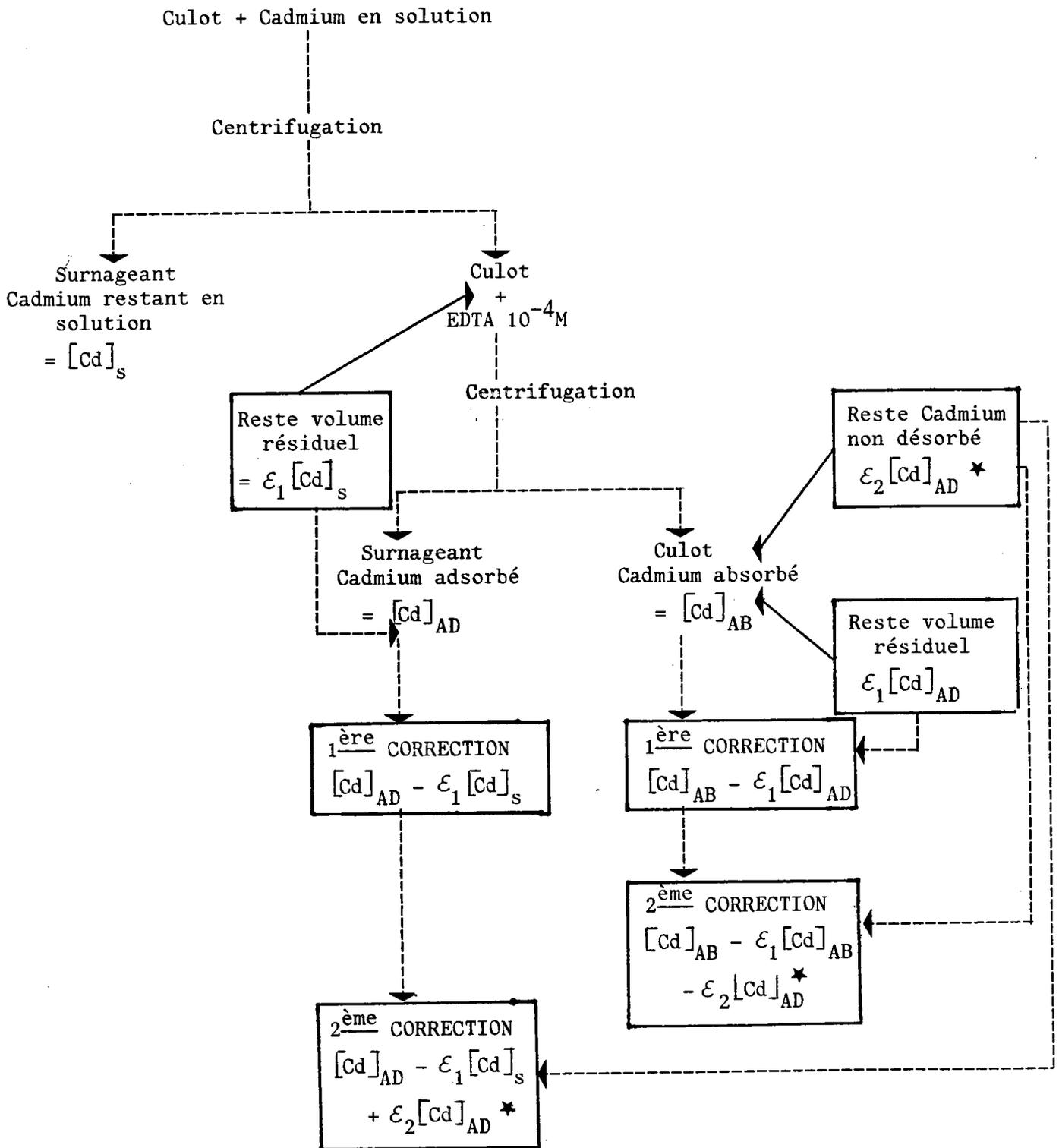
RESUME DES DIVERSES CORRECTIONS REALISEES

Les résultats bruts obtenus ont subi diverses corrections portant sur les points suivants :

- correction due au volume résiduel de surnageant non éliminé lors du renversement du tube ( $\epsilon_1$ ) restant au contact du culot ou sur les parois du tube (voir détails en Annexe II).
- correction due au cadmium résiduel après un seul lavage à l'EDTA  $10^{-4}$  M ( $\epsilon_2$  et  $\epsilon'_2$ ) (voir détails en Annexe III).
- correction des séries (essai et témoin) par utilisation d'une référence commune (voir détails en Annexe IV).

Ces différentes corrections  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_2$  et  $\epsilon'_2$  sont résumées sur la figure 37. La correction de volume résiduel ( $\epsilon_1$ ) intervient à deux niveaux puisque sa non prise en compte entraîne une erreur par excès sur les déterminations de  $[Cd]$  et de  $[Cd]$ . La seconde correction, relative au cadmium résiduel, intervient également à deux endroits mais n'est pas affectée du même signe selon le type de détermination de cadmium considéré. Cette correction n'est pas identique selon que l'on s'adresse à un essai ( $\epsilon_2$ ) ou à un témoin ( $\epsilon'_2$ ).

A titre d'exemple, le tableau XLIV détaille les différentes corrections ainsi réalisées avec des résultats provenant d'une expérimentation réalisée avec une solution à 1 mg Cd/l.



\* ou  $\epsilon_2' [Cd]_{AD}$  pour les témoins

FIGURE 37 : RÉSUMÉ DES DIFFÉRENTES CORRECTIONS UTILISÉES.

Type de l'expérimentation et concentrations de cadmium déterminées	Moyennes brutes	Calcul de la moyenne corrigée	Moyennes corrigées	Sommes	Moyennes normalisées (% à base 100)
essai	[ Cd ] <sub>s</sub>	pas de correction	861,83	1008,87	854,25
	[ Cd ] <sub>AD</sub>	$143,17 - (861,83 \cdot 5,44 \cdot 10^{-4}) + (0,01055 \cdot 143,17^{1,0575})$	144,71		143,44
	[ Cd ] <sub>AB</sub>	$4,42 - (143,17 \cdot 5,44 \cdot 10^{-4}) - (0,01055 \cdot 143,17^{1,0575})$	2,33		2,31
témoin	[ Cd ] <sub>s</sub>	pas de correction	1129,62	1132,14	997,77
	[ Cd ] <sub>AD</sub>	$2,68 - (1129,62 \cdot 5,44 \cdot 10^{-4}) + (0,00574 \cdot 2,68^{1,0591})$	2,08		1,84
	[ Cd ] <sub>AB</sub>	$0,46 - (2,68 \cdot 5,44 \cdot 10^{-4})^* - (0,00574 \cdot 2,68^{1,0591})$	0,44		0,39

Tableau XLIV: Exemple de calcul des valeurs corrigées (en µg/l) pour une expérimentation réalisée à 1 mg Cd/l (\* valeur négligeable car inférieure à 0,01).

ANNEXE II

CORRECTION DUE AU VOLUME RESIDUEL

1) Le volume résiduel a été évalué par pesée à l'aide d'une balance METTLER H51 (précision 0,01 mg) pour diverses concentrations de cadmium placées dans les mêmes tubes que ceux utilisés pour les expérimentations. 10 ml de solution cadmique sont placés dans ces tubes ne contenant pas d'algues. Tel qu'indiqué précédemment les tubes sont laissés 10 minutes à 20°C puis après centrifugation, le surnageant est éliminé par reversement. Immédiatement après, le tube est pesé une première fois puis essuyé soigneusement pour être à nouveau pesé. La différence entre ces deux pesées successives fournit le poids d'eau résiduel.

4 concentrations différentes de cadmium ont été testées 2 par 2 à deux jours différents. 7 tubes ont été réalisés pour chaque condition.

2) Les résultats sont rassemblés dans le tableau XLV

Date de l'essai	Jour X		Jour Y	
	10	100	1000	10000
Concentrations testées en µg/l				
Différence de poids en mg	2,34	2,30	6,27	3,91
	3,30	3,61	6,80	4,04
	3,31	3,66	6,94	5,40
	3,66	3,73	7,11	7,16
	3,91	3,91	8,73	7,50
	4,34	4,20	9,47	8,74
	4,64	4,40	9,68	9,70
Moyenne	3,64	3,69	7,86	6,64
Ecart-type	0,76	0,68	1,40	2,25

Tableau XLV: Détails des pesées des volumes résiduels à différentes concentrations de cadmium et à 2 jours différents.

L'analyse de ces résultats montre qu'il existe une nette différence entre les résultats du Jour X et du Jour Y. Cette différence pourrait être due aux concentrations de cadmium qui sont différentes d'un jour à l'autre, mais plus vraisemblablement à la façon d'éliminer le surnageant (le geste utilisé pouvant légèrement varier d'un jour à l'autre).

3) Compte-tenu des résultats du tableau XLV, nous avons choisi de prendre la moyenne de ces 4 groupes de données soit  $5,46 \pm 2,3$  mg.

L'écart-type relativement fort trouvé s'expliquant par le caractère empirique de l'élimination du surnageant.

Ce poids correspond en fait à un volume résiduel de  $5,44 \mu\text{l}$  puisque la densité du milieu oligo L.C. se révèle être égale à 1,003. Il convient donc de multiplier les concentrations trouvées dans les surnageants par  $5,44 \cdot 10^{-4}$  pour obtenir la correction voulue (=  $\mathcal{E} 1$ ).

Le calcul montre que pour des concentrations inférieures à  $18,38 \mu\text{g/l}$ , cette correction est négligeable.

4) Il faut remarquer que cette valeur moyenne n'est qu'une estimation du volume résiduel, car nous avons supposé que ce volume étant identique avec ou sans algues. De ce fait, nous avons négligé l'eau intersticielle qui adhère au matériel biologique (ANDERSEN et FARM, 1983) et sans doute sous-estimé cette correction en présence d'algues. En effet, il n'est pas possible d'évaluer le volume résiduel en présence d'algues du fait de la méthode employée.

Ceci étant, la technique utilisée se caractérise par un très faible volume résiduel et surtout par aucune perte de matériel algal compte-tenu du temps et de la vitesse de centrifugation utilisée (10 minutes à 2300 g).

Comparativement, les autres techniques d'élimination du surnageant sont tout aussi empiriques. Par exemple, l'aspiration à l'aide d'une pipette Pasteur ne garantit aucunement que le volume résiduel soit répétitif et surtout cette façon de faire génère des pertes de matériel algal dont il faut ensuite tenir compte (BATES et al., 1982).

ANNEXE III :  
CORRECTION DUE AU CADMIUM RESIDUEL APRES LAVAGE A L'EDTA.

(1) La quantité de cadmium résiduelle après lavage à l'EDTA  $10^{-4}$  M a été évaluée en dosant les concentrations de cadmium retrouvées au 1er et au 2ème lavage pour 4 concentrations de cadmium (10 et 100  $\mu\text{g/l}$ , 1 et 10  $\text{mg/l}$ ).

(2) Les résultats bruts, sans correction du volume résiduel, sont rassemblés dans le tableau XLVI.

Il apparaît que les concentrations de cadmium retrouvées au second lavage dans les essais sont, en pourcentage, supérieures à celles retrouvées dans les témoins.

Les pourcentages sont, en moyenne, pour les essais inférieurs à 1,5 % et pour les témoins inférieurs à 0,75 %.

(3) Les données du tableau XLVI ont été ajustées sur une droite et sur une fonction puissance. C'est ce dernier type d'ajustement qui s'est révélé le meilleur dans les deux cas (essais et témoins). Les fonctions moyennes obtenues ont été les suivantes :

$$\begin{aligned} - \text{ pour les essais} & : y = 0,01055 \times 1,0575^x \quad (r = 0,9969) \\ - \text{ pour les témoins} & : y = 0,00574 \times 1,0591^x \quad (r = 0,9981) \end{aligned}$$

Les droites d'ajustement tracées en coordonnées log-log sont quasiment parallèles (figure 38), du fait que les deux exposants sont pratiquement identiques.

Il s'avère donc que, comme l'avait laissé supposer les pourcentages observés, les concentrations de cadmium résiduelles seront environ deux fois plus fortes dans les essais que dans les témoins. Cette différence est évidemment due à la présence des algues dans le cas de l'essai, ce qui modifie les équilibres après 10 minutes d'incubation.

Les corrections seront donc différentes selon que l'on s'adresse à un essai ( $\mathcal{E}_2$ ) ou à un témoin ( $\mathcal{E}'_2$ ) : elles seront calculées selon les équations fournies ci-dessus.

Concentrations de cadmium réalisées		TYPE DE L'EXPERIMENTATION							
		Essai				Témoin			
		Lavage à l'EDTA 10 <sup>-4</sup> M		Pourcentages observés	Moyenne et écart type	Lavage à l'EDTA 10 <sup>-4</sup> M		Pourcentages observés	Moyenne et écart type
1 <sup>er</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>er</sup>	2 <sup>nd</sup>						
µg/l	µM								
10	0,089	2,08	0,02	0,96		1,56	0,01	0,64	
		2,01	0,02	1,00	1,00	1,68	0,01	0,60	0,60
		1,90	0,02	1,05	±0,05	1,82	0,01	0,55	±0,05
100	0,890	22,46	0,43	1,91		8,42	0,05	0,59	
		19,54	0,25	1,28	1,49	11,20	0,08	0,71	0,66
		19,35	0,25	1,29	±0,36	8,93	0,06	0,67	±0,06
1000	8,897	138,60	2,08	1,50		26,16	0,17	0,65	
		130,36	1,89	1,45	1,51	26,86	0,19	0,71	0,68
		139,83	2,19	1,57	±0,06	21,93	0,15	0,68	±0,03
10000	88,968	242,21	3,11	1,28		62,85	0,37	0,59	
		232,63	3,16	1,36	1,26	53,94	0,45	0,83	0,75
		295,32	3,40	1,15	±0,11	60,22	0,50	0,83	±0,14

Tableau XLVI : Concentrations de cadmium retrouvées (en µg/l) après un ou deux lavages à l'EDTA dans les conditions essai (avec algues) et témoin (sans algue).

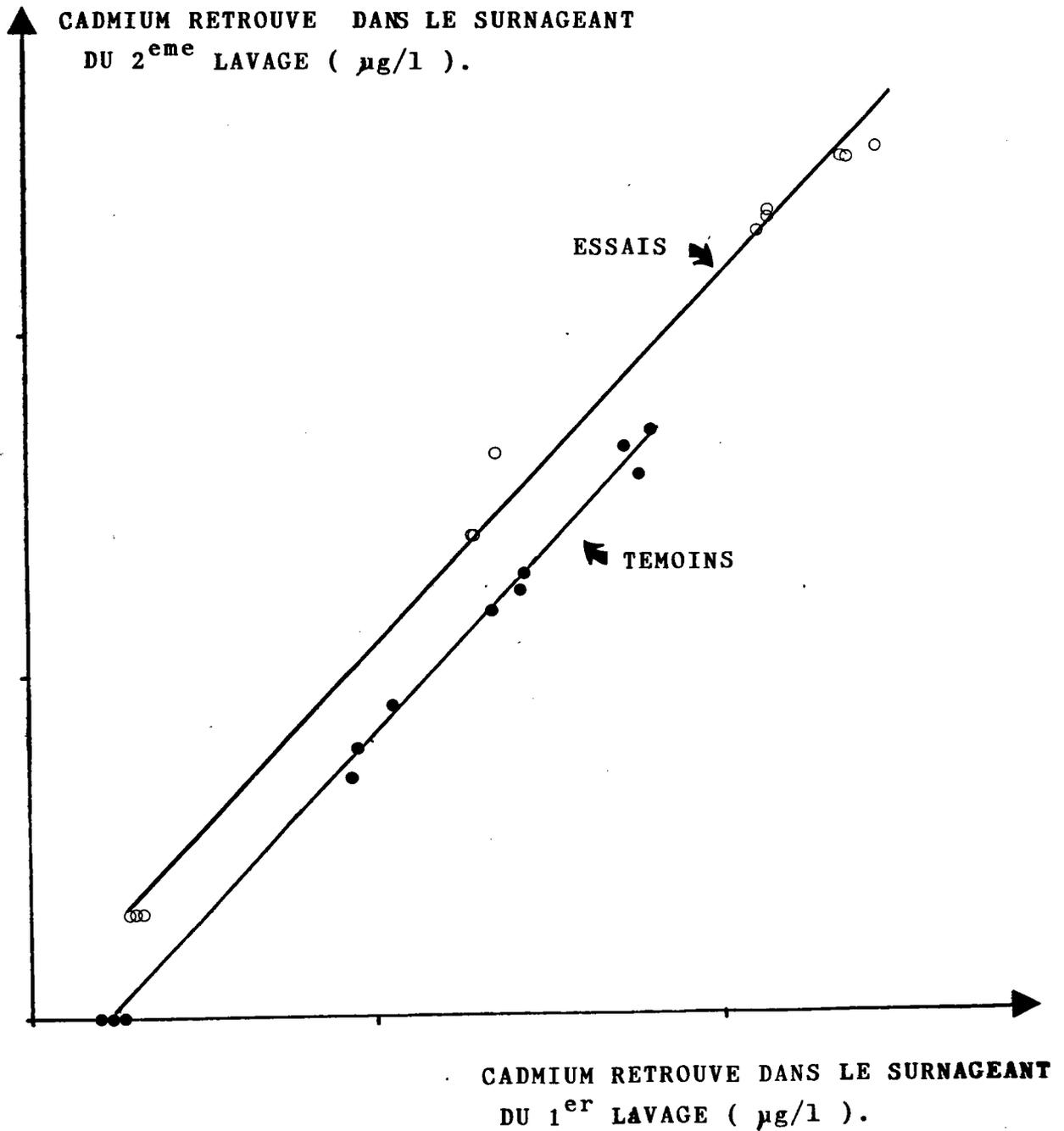


FIGURE 38 : CORRELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS DE CADMIUM  
RETROUVEES AU 1<sup>er</sup> ET AU 2<sup>ème</sup> LAVAGES A L'EDTA.

(4) Les concentrations observées au 2ème lavage auraient pu s'expliquer par le volume résiduel de solution d'EDTA après élimination, si les deux corrections avaient été du même ordre de grandeur. Or, la correction du volume résiduel est plus de dix fois inférieure puisqu'elle ne représente que 0,0544 %.

Afin de simplifier le protocole déjà imposant, nous nous sommes contentés d'un seul lavage et nous en avons tenu compte par le calcul des quantités non désorbées.

D'après la figure 38, en deçà d'une certaine concentration il n'y a plus de correction nécessaire. Ces concentrations sont pour les essais et les témoins respectivement égales à 0,96 et 1,69  $\mu\text{g Cd/l}$ .

ANNEXE IV  
CORRECTION DES SERIES ESSAI ET TEMOIN  
PAR UTILISATION D'UNE REFERENCE COMMUNE.

Pour chaque série, nous obtenons 3 résultats corrigés :

- [ Cd<sub>s</sub> ]
- [ Cd ]<sup>AD</sup>
- [ Cd ]<sub>AB</sub>

La somme de ces concentrations doit normalement fournir la concentration de cadmium introduit au départ compte-tenu que nous sommes restés dans le même volume (10 ml) et dans le même tube. Or, chaque résultat s'accompagne d'une erreur et la sommation de ces trois résultats entraîne la sommation des erreurs. Il n'est donc pas surprenant que les sommes des 3 résultats essais et des 3 résultats témoins soient différentes. Nous avons donc choisi de corriger ces résultats et de les normaliser par rapport à la base 100 constituée à chaque fois par la somme correspondante des 3 résultats obtenus. Ce faisant, nous estimons que l'erreur peut provenir aussi bien de l'une des 3 déterminations analytiques effectuées et qu'il est préférable d'imputer indifféremment cette erreur à ces 3 données.

ANNEXE V :

DETAIL DE CALCUL DES INCERTITUDES CONCERNANT LE CADMIUM ADSORBE ET ABSORBE

(Dans le cas d'une addition d'une solution à 1 mg Cd/l).

(1) Le calcul des variances des différents résultats intermédiaires repose sur les faits suivants :

a - La variance de la distribution d'une somme (X) de deux variables indépendantes  $y_A$  et  $y_B$  est égale à : la somme des variances de chaque population (BOX et al., 1978).

$$\text{Var} (X) = \text{VAR} (y_A + y_B) = \text{Var} (y_A) + \text{Var} (y_B)$$

b - De la même façon, la variance de la distribution d'une différence (X) de deux variables indépendantes  $y_A$  et  $y_B$  est égale à la somme des variances de chaque population (BOX et al., 1978).

$$\text{Var} (X) = \text{Var} (y_A - y_B) = \text{Var} (y_A) + \text{Var} (y_B)$$

c - La variance de la distribution d'un produit d'une variable par un facteur constant est égal au produit du carré du facteur par la variance de la population.

$$\text{Var} (aX) = a^2 \text{Var} (X)$$

d - La variance de la distribution d'une variable élevée à la puissance d'un terme constant a été assimilé au cas précédent, soit :

$$\text{Var} (X^n) = \text{Var} (a'X) = a'^2 \text{Var} (X)$$

ce qui nécessite de calculer  $a'$  pour tout X fourni et ce qui signifie que dans ce cas, la variation de la moyenne X n'est plus proportionnelle à celle de l'écart-type.

	Déterminations analytiques (µg/l)					
	e s s a i			t é m o i n		
	[Cd] <sub>s</sub>	[Cd] <sub>AD</sub>	[Cd] <sub>AB</sub>	[Cd] <sub>s</sub>	[Cd] <sub>AD</sub>	[Cd] <sub>AB</sub>
Moyennes brutes	861,83	143,17	4,42	1129,62	2,68	0,46
Ecart-types	41,0173	22,6863	0,3602	44,2429	0,1905	0,0400
C.V. (%)	4,8	15,8	8,1	3,9	7,1	8,7
Variances	1682,4172	514,6696	0,1297	1957,4334	0,0363	0,0016
Moyennes corrigées		144,71	2,33		2,08	0,44
Ecart-types	idem	22,6889	0,4809	idem	0,1921	0,0400
C.V. (%)		15,7	20,6		9,2	9,1
Variances		514,7876	0,2313		0,0369	0,0016
Moyennes normalisées	854,25	143,44	2,31	997,77	1,84	0,39
Ecart-types	40,6567	22,4891	0,4768	39,0790	0,1697	0,0353
C.V. (%)	4,8	15,7	20,6	3,9	9,2	9,1
Variances	1652,9636	505,7596	0,2273	1527,1677	0,0288	0,0012

Tableau XLVII : Variances, écart-types et coefficients de variation calculés des différentes moyennes correspondant aux 6 déterminations analytiques effectuées (pour une concentrations de cadmium introduite de 1 mg/l).  
C.V. = coefficient de variation

2) L'exemple choisi correspond à une expérience au cours de laquelle une concentration de 1 mg Cd/l a été introduite dans les tubes. Les variances de ces résultats bruts (tableau XLVII) constituent un cas représentatif des autres expériences réalisées, si ce n'est la valeur élevée de la variance relative à  $[Cd]_{AD}$  essai conduisant à un coefficient de variation de 15,8 %. En effet, les coefficients de variations des résultats bruts sont généralement inférieurs à 10 % (Tableau XLVII).

Les variances des moyennes brutes, corrigées puis normalisées dans le cas de l'expérience ici développée, sont rassemblées dans le tableau XLVII, avec les moyennes, écarts-types et coefficients de variation correspondants.

Deux remarques peuvent être faites au sujet de ce tableau : tout d'abord la seule variance qui augmente fortement est celle correspondant à  $[Cd]_{AB}$  de l'essai. Ceci est dû au terme correctif (cf. Annexe III)

$$(0,01055. 143,17^{1,0575})$$

qui se caractérise par une variance élevée par rapport à la variance de la moyenne brute. La deuxième remarque porte sur le fait que la diminution des variances des moyennes normalisées des témoins est plus élevée que celle des essais compte-tenu que le facteur multiplicatif est différent : 0,9825 dans le cas des essais ; 0,7802 dans le cas des témoins.

(3) Le détail des calculs des quantités de cadmium adsorbé et absorbé et de leurs variances respectives est donné par le tableau XLVIII (où le poids de matière sèche est assimilé à une constante).

(4) La quantité calculée se caractérise ainsi par les écarts-types et coefficients de variation suivants :

$$[Cd] \text{ adsorbé} = 22,10 \pm 3,51 \text{ nmoles Cd/mg P.S.}$$
$$C.V. = 15,9 \%$$

$$[Cd] \text{ absorbé} = 0,30 \pm 0,07 \text{ nmoles Cd/mg P.S.}$$
$$C.V. = 24,9 \%$$

$$[Cd] \text{ biosorbé} = 22,40 \pm 3,51 \text{ nmoles Cd/mg P.S.}$$
$$C.V. = 15,7 \%$$

Le coefficient de variation relatif au cadmium absorbé apparaît plus élevé que celui correspondant au cadmium adsorbé car le calcul montre que le coefficient de variation de  $[Cd]$  de l'essai normalisé atteint déjà plus de 20 %, ce qui est dû <sup>AB</sup> au terme correctif correspondant au cadmium résiduel (cf. § (2) ci-dessus).

	en µg pour 10 ml de solution algale	en nanomoles pour 10 ml de solution algale	en nanomoles par mg de matière sèche
Quantité de cadmium adsorbé	$\frac{143,44 - 1,84}{100} = 1,416$	$1,416 \times \frac{1000}{112,4} = 12,60$	$12,60/0,57 = 22,10$
Variance	$0,5058 \cdot 10^{-1}$	4,0035	12,3223
Quantité de cadmium absorbé	$\frac{2,31 - 0,39}{100} = 0,0192$	$0,0192 \times \frac{1000}{112,4} = 0,17$	$0,17/0,57 = 0,30$
Variance	$0,2285 \cdot 10^{-4}$	$0,1809 \cdot 10^{-2}$	$0,5567 \cdot 10^{-2}$
Quantité de cadmium biosorbé	/	/	22,40
Variance	/	/	12,3228

Tableau XLVIII: Calcul des quantités de cadmium adsorbé, absorbé et biosorbé et de leurs variances.

ANNEXE VI  
SENSIBILITE ET REPRODUCTIBILITE  
DES DETERMINATIONS ANALYTIQUES DU CADMIUM.

(1) La spectrophotométrie d'absorption atomique avec four permet d'obtenir une grande sensibilité, principal avantage de cette méthode. La limite de détection du cadmium est de 0,1 ng/ml, (PERRY et al. 1975). Des valeurs aussi basses sont obtenues en utilisant l'opération GAZ-STOP : pendant les quelques secondes de la phase d'atomisation, le courant d'argon est arrêté, ce qui favorise la stabilisation de la vapeur atomique dans le faisceau lumineux, en augmentant le nombre d'atomes susceptibles d'être excités ; l'absorbance mesurée est donc plus grande et la sensibilité meilleure. Le système d'injection automatique, AS 1, a permis d'obtenir une reproductibilité très satisfaisante des pics d'absorption. La figure 39 présente les différents pics d'un enregistrement direct de différents étalons à 1 µg Cd/l en solution dans du milieu oligo L.C.

La figure 40 représente l'enregistrement d'une gamme d'étalonnage montante entre 0 et 2 µg/l, ainsi que le graphe correspondant (où les écarts-types n'ont pas été portés puisqu'il y a seulement deux répétitions par étalon). Pour la préparation de la gamme, les solutions diluées sont préparées extemporainement dans des tubes en polypropylène (LABO EXPRESS SERVICE TC 1,5) de telle sorte que les erreurs dues à l'adsorption et à la contamination soient minimisées (SPERLING et al., 1977).

Dans la pratique, les concentrations de cadmium sont déterminées après régression linéaire des hauteurs de pics moyennes fournies par les gammes montantes et descendantes analysées au début et à la fin de chaque série.

La répétabilité du dosage du cadmium dans des essais en solution dans le milieu oligo L.C., ou dans le mélange milieu oligo L.C. - EDTA  $10^{-4}$  M, ou encore dans des essais minéralisés, est fourni dans le tableau XLIX pour quelques échantillons.

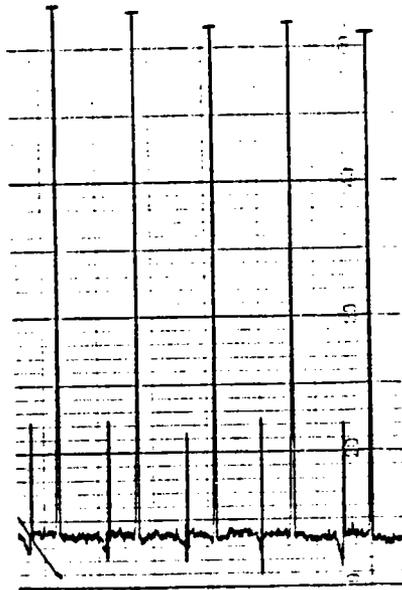


FIG. 39 : RÉPÉTABILITÉ DU DOSAGE D'UNE SOLUTION DE 1 µg Cd/L EN SOLUTION DANS DU MILIEU OLIGO L.C.

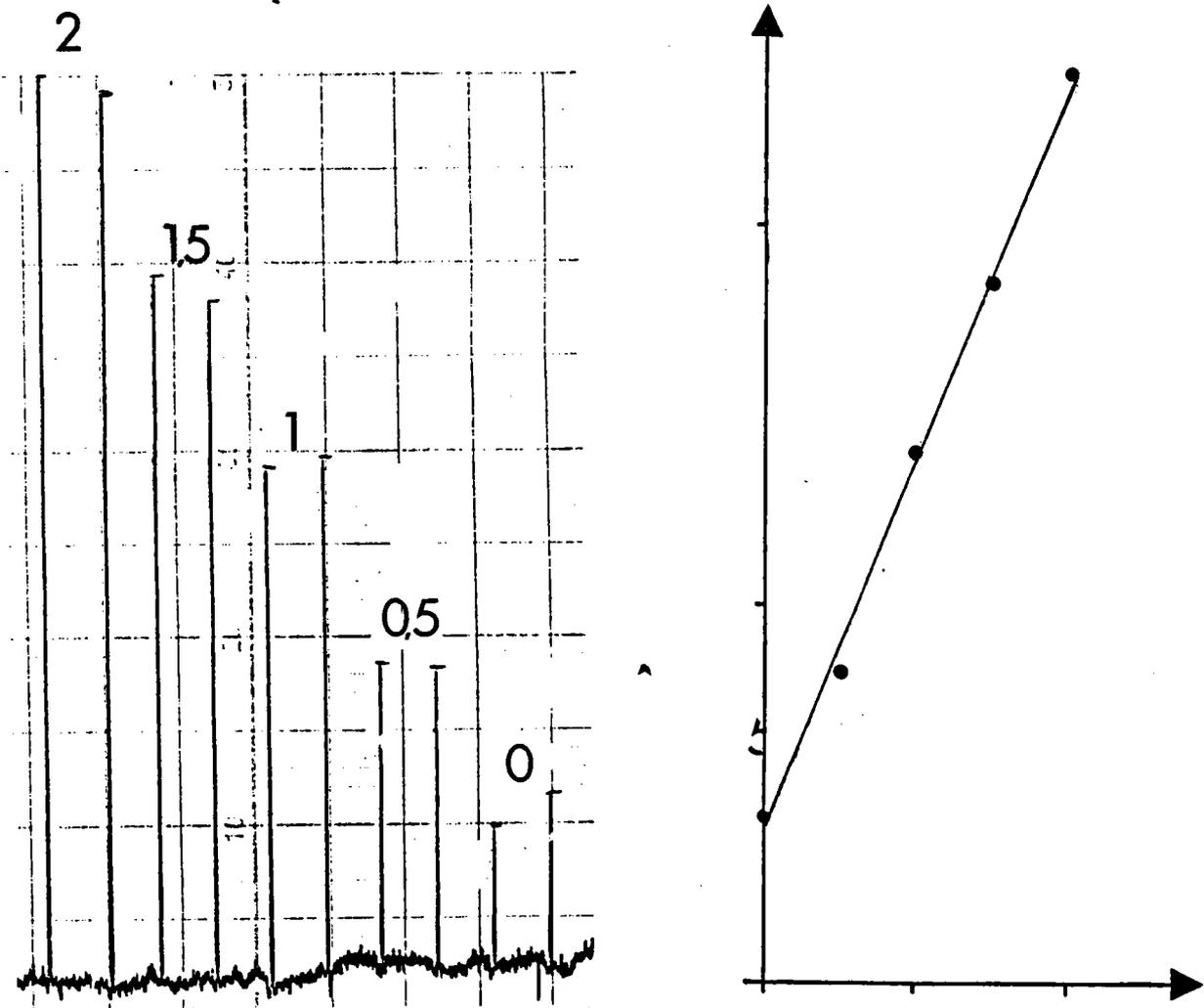


FIG. 40 : ENREGISTREMENT D'UNE GAMME D'ÉTALONNAGE MONTANTE ENTRE 0 ET 2 µg/L DANS DU MILIEU OLIGO L.C. (À GAUCHE). TRACÉ DE LA DROITE D'ÉTALONNAGE CORRESPONDANTE (À DROITE).

	moyenne	écart-type	C.V. (%)
Echantillons dans le milieu oligo L.C.	7,67	0,18	2,4
	71,11	0,51	0,7
	861,83	41,02	4,8
	10906,67	423,95	3,9
Echantillons dans le milieu oligo L.C. + EDTA	3,88	0,16	4,0
	28,54	0,98	3,4
	143,17	22,69	15,8
	213,90	13,91	6,5
Echantillons minéralisés (HNO <sub>3</sub> .10 %)	0,47	0,03	6,9
	0,90	0,10	11,1
	2,33	0,18	7,7
	4,42	0,36	8,1

Tableau XLIX : Répétabilité des dosages de cadmium dans différentes conditions de milieu et pour différentes concentrations. (n  $\geq$  3).

Ces résultats montrent que les dosages du cadmium en solution dans le milieu oligo L.C. se caractérisent par des coefficients de variation inférieurs à 5 %, tandis que pour des échantillons en présence d'EDTA  $10^{-4}$  M ou minéralisés les coefficients de variation sont plus élevés tout en restant généralement inférieurs à 10 %.

Les coefficients de variation observés pour les échantillons en présence de milieu oligo L.C. correspondent à celui observé (2,8 %) par GUILLAUMIN (1974) sur un échantillon d'eaux naturelles répété 10 fois.

En ce qui concerne les coefficients de variation correspondant aux échantillons minéralisés, ils sont du même ordre de grandeur que ceux calculés par BRIX et al. (1983) sur des minéralisats d'algues prélevés dans les milieux naturels et qui vont de 6,1 à 9,7 %.

ANNEXE n° VII

REPRODUCTIBILITE DES GAMMES D'ETALONNAGE  
POUR LE DOSAGE DU PHOSPHORE INORGANIQUE.

N° des tubes	0	1	2	3	4	5
Solution de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,4 mM (en $\mu\text{l}$ ) <sup>2</sup>	0	200	400	600	800	1000
$\text{H}_2\text{O}$ (en $\mu\text{l}$ )	1000	800	600	400	200	0
Quantités de Pi introduite dans les tubes ( $\mu\text{moles}$ )	0	0,08	0,16	0,24	0,32	0,40
Numéro des séries réalisées						
1		232	472	718	945	1207
2		244	496	745	988	1240
3		262	503	755	1000	1250
4		242	506	747	1014	1264
5		267	494	735	1010	1230
6		240	475	726	971	1217
7		239	491	729	982	1197
8		246	479	734	976	1250
Moyenne $\bar{x}$		246,50	489,50	736,13	985,88	1231,88
Ecart type $\sigma$		11,93	12,80	12,19	22,36	23,35
Coefficient de variation =		4,8	2,6	1,7	2,3	1,9

Tableau L : Méthodologie et résultats de 8 gammes d'étalonnage reproduites à des jours différents.

ANNEXE n° VIII:

REPRODUCTIBILITE DES GAMMES D'ETALONNAGE  
POUR LE DOSAGE DES PROTEINES (n = 26).

N° des tubes	0	1	2	3	4	5
Solution de BSA à 30 mg/l (en µl)	0	200	400	600	800	1000
Eau distillée (en µl)	1000	800	600	400	200	0
Bleu de Coomassie (en µl)	5	5	5	5	5	5
Quantité de protéines introduite dans le tube (en µg)	0	6	12	18	24	30
Moyenne	/	91,48	170,77	244,41	306,72	372,62
Ecart-type	/	13,70	15,56	20,82	18,49	21,68
Coefficient de variation	/	15,0	9,1	8,5	6,0	5,8

Tableau LI : Méthodologie et résultats de 26 gammes d'étalonnage reproduites à des jours différents.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- ABE T. et Y. ITOKAWA, 1973,  
Experimental cadmium poisoning - III Effect of cadmium on  
Na-K-Mg-dependent ATPase, Mg-dependent ATPase and transketolase,  
Jap. J. Hyg., 28, 243-247.
- AFNOR, 1980,  
Essais des eaux - Détermination de l'inhibition de croissance de  
Scenedesmus subspicatus par une substance,  
Norme expérimentale T 90-304, 6 p..
- AFNOR, 1985,  
Matières fertilisantes - Boues des ouvrages de traitement des eaux usées  
urbaines - Dénominations et spécifications,  
Norme NF U 44-041, 11 p..
- ANDERSEN F.O. et P. FAMME, 1983,  
A method for determination of fresh weight of aquatic organisms,  
J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 66, 89-92.
- ANDERSON D.M. et F.M.M. MOREL, 1978,  
Copper sensitivity of Gonyaulax taramensis,  
Limnol. Oceanog., 23, 283-295.
- ASENCIO C.I. et A. CENEDO-MALDONARO, 1979,  
Effects of cadmium on carbonic anhydrase and activities dependent on  
electron transport of isolated chloroplasts,  
J. Agr. Univ. P.R., 62, 189-195
- ATKINSON A.W. Jr, B.E.S. GUNNING et P.C.L. JOHN, 1972,  
Sporopollenin in the cell wall of Chlorella and other algae : ultrastruc-  
ture, chemistry, and incorporation of <sup>14</sup>C-acetate, studied in synchronous  
cultures,  
Planta, 107, 1-32.
- BABICH H. et G. STOTZKY, 1978,  
Effects of cadmium on the biota : influence of environmental factors,  
in Advances in Applied Microbiology, 23, 55-117, PERLMAN D. (ed.),  
Academic Press, New York.
- BADER H., A.B. WILKES et D.H. JEAN, 1970,  
The effect of hydroxylamine, mercaptans, divalent metals and chelators on  
(Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>) ATPase - A possible control mechanism,  
Biochim. Biophys. Acta, 583-593.
- BAGINSKY E.S., P.P. FOA et B. ZAR, 1967,  
Determination of phosphate : study of labile organic phosphate interference  
Clin. Chim. Acta, 15, 155-158.
- BALKE N.E. et T.K. HODGES, 1975,  
Plasma membrane adenosine triphosphatase of oat roots - Activation and  
inhibition by Mg<sup>++</sup> and ATP,  
Plant Physiol., 55, 83-86.
- BARBER J., 1968,  
Measurement of the membrane potential and evidence for active transport of  
ions in Chlorella pyrenoidosa,  
Biochim. Biophys. Acta, 150, 618-625.

- BARBER J. et Y.J. SHIEH, 1972,  
Net and steady-state cation fluxes in Chlorella pyrenoidosa,  
J. Exp. Bot., 23, 627-636.
- BATES S.S., A. TESSIER, P.G.C. CAMPBELL et J. BUFFLE, 1982,  
Zinc adsorption and transport by Chlamydomonas variabilis and Scenedesmus subspicatus (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture,  
J. Phycol., 18, 521-529.
- BAUDA P., P. GARSOT et J.C. BLOCK, 1986,  
Cadmium uptake by Pseudomonas fluorescens cells,  
accepté dans Tox. Assess. Bull..
- BAUDO R., R. de BERNARDI, E. SOLDARINI, B. LOCHT et H. MUTAU, 1981,  
Spatial and temporal variations of metal concentrations in plankton of Lago Maggiore and Lago Mergozzo,  
Mem. 1st Ital. Idrobiol., 38, 79-100.
- BAZZAZ M.B. et R. GOVINDJEE, 1974,  
Effects of cadmium nitrate on spectral characteristics and light reactions of chloroplasts,  
Environ. Lett., 6, 1-12.
- BERLAND B.R., D.J. BONIN, O.J. GUERIN-ANCEY, V.I. KAPKOV et D.P. ARLHAC, 1977,  
Action de métaux lourds à des doses sublétales sur les caractéristiques de la croissance chez la diatomée Skeletonema costatum,  
Mar. Biol., 42, 17-30.
- BERLAND B.R., D.J. BONIN, V.I. KAPKOV, S.Y. MAESTRINI et D.P. ARLHAC, 1976,  
Action toxique de quatre métaux lourds sur la croissance d'algues unicellulaires marines,  
C.R. Acad. Sc. Paris, D, 282, 633-636.
- BITTEL R. et G. LACOURLY, 1970,  
Méthodes d'approche pour l'évaluation des niveaux de pollution chimique des milieux marins et des chaînes alimentaires marines,  
in "F.A.O. Technical conference on marine pollution and its effects on living resources and fishing", 1-7,  
Rome, 9-18 décembre 1970, F.A.O. (ed.), Rapport FIR MP/70/E-51.
- BLUMREISINGER M., D. MEINDL et E. LOOS, 1983,  
Cell wall composition of chlorococcal algae,  
Phytochem., 22, 1603-1604.
- BOIS F., 1984,  
Influence de paramètres physico-chimiques du milieu sur la toxicité des produits chimiques : cas du zinc et du pentachlorophénol,  
D.E.A. de Toxicologie, Université de Metz, C.S.E., 76 p..
- BONALY J., A. BARIAUD, A. DELCOURT et J.C. MESTRE, 1978,  
Les effets des ions Cd<sup>++</sup> sur les cellules d'Euglena gracilis L. : cytotoxicité et acquisition d'une résistance,  
C.R. Acad. Sc. Paris, D, 287, 463-466.
- BOX G.E.P., W.G. HUNTER et J.S. HUNTER, 1978,  
Statistics for experimenters - An introduction to design, data analysis, and model building,  
John Wiley & Sons, New York, 643 p..

BRADFORD M.M., 1974,

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,  
*Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

BRAUWERS C., 1982,

Comparaison de la toxicité du Zn et du Cd chez Chlorella pyrenoidosa,  
*Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, 115, 78-90.

BRISKIN D.P. et R.J. POOLE, 1983,

Characterization of K<sup>+</sup>-stimulated adenosine triphosphatase associated with the plasma membrane of red beet,  
*Plant Physiol.*, 71, 350-355.

BRIX H., J.E. LYNGBY et H.H. SCHIERUP, 1983,

The reproducibility in the determination of heavy metals in marine plant material - An interlaboratory calibration,  
*Mar. Chem.*, 12, 69-85.

BRUNAUER S., R.S. MIKHAIL et E.E. BODOR, 1967,

Pore structure analysis without a pore shape model,  
*J. Coll. Interf. Sci.*, 24, 451-453.

BRYAN G.W., 1979,

Bioaccumulation of marine pollutants,  
*Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 286, 483-505.

BUCHAUER M., 1973,

Contamination of soil and vegetation near a zinc smelter by zinc, cadmium, copper and lead,  
*Environ. Sci. Technol.*, 7, 131-135.

BURNISON G., P.T.S. WONG, Y.K. CHAU et B. SILVERBERG, 1975,

Toxicity of cadmium to freshwater algae,  
*Proc. Can. Fed. Biol. Soc.*, 18, n° 182.

BUTLER P.A., 1973,

Biological problem in estuarine monitoring - Methodology for monitoring the marine environment,  
Rapport EPA-600/4-74-004, 12 p..

C.E.E., 1975,

Directive du conseil concernant la qualité requise des eaux superficielles destinées à la production d'eau alimentaire dans les Etats Membres (75/440/CBE),  
*J. O. Comm. Eur.*, L194, 26-31.

C.E.E., 1976,

Directive du conseil concernant la pollution causée par certaines substances dangereuses déversées dans le milieu aquatique de la communauté (76/464/CBE),  
*J. O. Comm. Eur.*, L129, 23-29.

C.E.E., 1980 a,

Directive du conseil concernant la protection des eaux souterraines contre la pollution causée par certaines substances dangereuses (80/68/CBE),  
*J. O. Comm. Eur.*, L20, 43-48.

- C.E.E., 1980 b,  
Directive du conseil relative à la qualité des eaux destinées à la  
consommation humaine (80/778/CEE),  
J. O. Comm. Eur., L229, 11-29.
- C.E.E., 1981,  
Ecotoxicology of cadmium,  
Rapport EUR 7499 EN, 108 p..
- C.E.E., 1983,  
Directive du conseil concernant les valeurs limites et les objectifs de  
qualité pour les rejets de cadmium (83/515/CEE),  
J. O. Comm. Eur., L291, 1-8.
- CHANEY R.L. et S.B. HORNICK, 1978,  
Accumulation and effects of cadmium on crops,  
in Proceedings " 1st Int. Cadmium Confer.", 125-140,  
San Fransisco, Jan. 1977, Metals Bulletin Ltd, London.
- CHEN K.Y., T.K.J. YOUNG et N. ROHATGI, 1974,  
Trace metals in waste-water effluents,  
J.W.P.C.F., 46, 2663-2675.
- CHETTY K.N., L. DRUMMOND et D. DESAIAH, 1980,  
Effect of cadmium on ATPase activities in rats fed on iron-deficient and  
sufficient diets,  
J. Environ. Sci. Hlth. B., 15, 379-393.
- COLEMAN J.E., 1967,  
Metal ion dependent binding of sulfonamide to carbonic anhydrase,  
Nature, 214, 193-194.
- CONTE M.V. et R.S. PORE, 1973,  
Taxonomic implications of Prototheca and Chlorella cell wall polysaccharide  
characterization,  
Arch. Mikrobiol., 92, 227-233.
- CONWAY H.L., 1978,  
Sorption of arsenic and cadmium and their effects on growth, micronutrient  
utilization, and photosynthetic pigment composition of Asterionella formosa  
J. Fish. Res. Board Can., 35, 286-294.
- CONWAY H.L. et S.C. WILLIAMS, 1979,  
Sorption of cadmium and its effect on growth and the utilization of  
inorganic carbon and phosphorus of two freshwater diatoms,  
J. Fish. Res. Board Can., 36, 579-586.
- COSSA D., 1976,  
Sorption du cadmium par une population de la diatomée Phaeodactylum  
tricornutum en culture,  
Mar. Biol., 34, 163-167.
- CRANE R.K., 1979,  
Intestinal structure and function related to toxicology,  
Environ. Hlth. Persp., 33, 3-8.
- CRIST R.H., K. OBERHOLSER, N. SHANK et M. NGUYEN, 1981,  
Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls,  
Environ. Sci. Technol., 15, 1212-1217.

- DAINTY J. et A.B. HOPE, 1959,  
Ionic relations of cells of Chara australis - I Ion exchange in the cell wall,  
Austr. J. Biol. Sci., 12, 395-411.
- DANIELS S.L., 1980,  
Mechanisms involved in sorption of microorganisms to solid surfaces,  
in Adsorption of microorganisms to surfaces, chap.2, BITTON G. et K.C. MARSHALL (eds.), John Wiley and Sons, New York.
- DAVIES A.G., 1970;  
Iron chelation and the growth of marine phytoplankton - I Growth Kinetics and chlorophyll production in cultures of the euryphaline flagellate Dunaliella tertiolecta under iron limiting conditions,  
J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 50, 65-86.
- DAVIES A.G., 1973,  
The kinetics of and a preliminary model for the uptake of radio-zinc by Phaeodactylum tricornutum in culture,  
in Proceedings of a symposium "Radioactive contamination of the marine environment", 403-420,  
Seattle, 1972, International Atomic Energy Agency, Vienne.
- DAVIES A.G., 1978,  
Pollution studies with marine plankton - II Heavy metals,  
Adv. Mar. Biol., 15, 381-508.
- DAVIES B.E. et L.J. ROBERTS, 1975,  
cités par PETERSON P.J. et B.J. ALLOWAY, 1979.
- DE FILIPPIS L.F., 1979,  
The effect of heavy metal compounds on the permeability of Clorella cells,  
Z. Pflanzenphysiol., 92, 39-49.
- DE FILIPPIS L.F., R. HAMPP et H. ZIEGLER, 1981 a,  
The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on Euglena - II. Respiration, photosynthesis and photochemical activities,  
Arch. Microbiol., 128, 407-411.
- DE FILIPPIS L.F., R. HAMPP et H. ZIEGLER, 1981 b,  
The effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on Euglena - Adenylates and energy charge,  
Z. Pflanzenphysiol., 103, 1-7.
- DE FILIPPIS L.F., R. HAMPP et H. ZIEGLER, 1981 c,  
The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on Euglena - Growth and pigments,  
Z. Pflanzenphysiol., 101, 37-47.
- DEVI PRASAD P.V. et P.S. DEVI PRASAD, 1982,  
Effect of cadmium, lead and nickel on three freshwater green algae,  
Wat. Air Soil Poll., 17, 263-268.
- DUPONT F.M., D.L. GIORGI et R.M. SPANSWICK, 1982,  
Characterization of a proton-translocating ATPase in microsomal vesicles from corn roots,  
Plant Physiol., 70, 1694-1699.

- DYRSSEN D. et M. WEDBORG, 1974,  
Equilibrium calculations of the speciation of elements in seawater,  
in *The sea, ideas and observations on progress in the study of the sea*, 5,  
GOLDBERG E.D. (ed.), Wiley Interscience, New York.
- EICHHORN G.L. et Y.A. SHIN, 1968,  
Interaction of metal ions with nucleic acids and related compounds - XII  
The relative effect of various metal ions on DNA helicity,  
*J. Amer. Chem. Soc.*, 90, 7323-7328.
- EKLUND H. et al., 1976,  
cités par JACOBSON K.B. et J.E. TURNER, 1980.
- EL-SAYED S.Z. et B.D. LEE, 1963,  
Evaluation of an automatic technique for counting unicellular organisms,  
*J. Mar. Res.*, 21, 59-73.
- E.P.A., 1975,  
National interim primary drinking water regulation,  
*Fed. Regist.*, 40, 59566-59588.
- E.P.A., 1977,  
Municipal sludge management, environmental factors,  
EPA 430/9-77-004. Tech. Bull. MCD-28, Washington, DC.
- E.P.A., 1979,  
Identification of conventional pollutants,  
*Fed. Regist.*, 44, 44501-44503.
- E.P.A., 1983,  
Inorganic chemicals manufacturing point source category - Effluent  
limitations guidelines pretreatment standards, and new source performance  
standards,  
*Fed. Regist.*, 48, 49408-49436.
- E.P.A., 1984,  
Water quality criteria : request for comments,  
*Fed. Regist.*, 49, 4551-4554.
- EZE J.M.O. et E.B. DUMBROFF, 1982,  
A comparison of the Bradford and Lowry methods for the analysis of protein  
in chlorophyllous tissue,  
*Can. J. Bot.*, 60, 1046-1049.
- FALCHUK K.E., D.W. FAWCETT et B.L. VALLEE, 1975,  
Competitive antagonism of cadmium and zinc in the morphology and cell  
division of *Euglena gracilis*,  
*J. Submicr. Cytol.*, 7, 139-152.
- FAZEKAS DE ST GROTH S., R.G. WEBSTER et A. DATYNER, 1963,  
Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on  
electrophoretic strips,  
*Biochim. Biophys. Acta*, 71, 377-391.
- FENNIKOH K.B., H.I. HIRSHFIELD et T.J. KNEIP, 1978,  
Cadmium toxicity in planktonic organisms of a freshwater food web,  
*Environ. Res.*, 15, 357-367.

- FERARD G., I. SALL et P. METAIS, 1975,  
Studies on intestinal adenosine triphosphatases - I Application of a  
semiautomated method to the rat intestinal brush borders,  
*Enzyme*, 19, 38-47.
- FINDENEGG I., 1972,  
Das phytoplankton des reither sees (Tyrol, Osterreich) in jahre 1971,  
*Med. Ver. Innsbruck*, 59, 15-24.
- FINDENEGG G.R., H. PASCHINGER et E. BRODA, 1971,  
Untersuchungen der lichtabhängigkeit der aufnahme von rubidium, zink,  
kobalt, blei und cer durch *Chlorella* nach einer fluBmethode,  
*Planta*, 18, 683-699.
- FLORKIN M. et E. SCHOFFENIELS, 1967,  
*Biochimie et biologie moleculaire*,  
in *Biochimie et biologie moleculaire*, Desver, 578p..
- FORSTNER U. et G.T.W. WITTMANN, 1983,  
Metal pollution in the aquatic environment,  
Springer-Verlag, Berlin, 2ème édition, 486 p..
- FOTT B. et M. NOVAKOVA, 1969,  
A monograph of the genus *Chlorella* - The freshwater species,  
in *Studies in phycology*, 10-74, FOTT B. (ed.),  
E. Schweitzerbartsche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- FOWLER A.J., D.N. SINGH et C. DWIVEDI, 1982,  
Effect of cadmium on meiosis,  
*Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 29, 412-415.
- FREI E. et R.D. PRESTON, 1961,  
Variants in the structural polysaccharides of algal cell walls,  
*Nature*, 192, 939-943.
- FREUNDLICH H., 1926,  
cité par PARFITT G.D. et C.H. ROCHESTER, 1983.
- FRIBERG L., M. PISCATOR, G.F. NORDBERG et T. KJELLSTROM, 1976,  
Cadmium in the environment,  
CRC Press, Cleveland, 2ème édition, 248 p..
- FULKERSON W., H.E. GOELLER, J.S. GAILAR et E.D. COPENHAVER, 1973,  
Cadmium, the dissipated element,  
Rapport ORNL NSF-EP-21, Oak Ridge National Laboratory.
- GARDINER J., 1974,  
Chemistry of cadmium in natural water - I Study of cadmium complex  
formation using the cadmium specific-ion electrode,  
*Water Res.*, 8, 23-30.
- GEISWEID H.J. et W. URBACH, 1983,  
Sorption of cadmium by the green microalgae *Chlorella vulgaris*,  
*Ankistrodesmus braunii* and *Eremosphaera viridis*,  
*Z. Pflanzenphysiol.*, 109, 127-141.
- GINGRICH D.J., D.H. PETERING et C.F. SHAW III, 1984,  
Zinc and cadmium metabolism in *Euglena gracilis* : metal distribution in  
normal and zinc-deficient cells,  
*Mar. Environ. Res.*, 14, 89-102.

- GIPPS J.F. et B.A.W. COLLER, 1980,  
Effect of physical and culture conditions on uptake of cadmium by Chlorella pyrenoidosa,  
Aust. J. Mar. Freshw. Res., 31, 747-755.
- GIPPS J.F. et B.A.W. COLLER, 1982,  
Effect of some nutrient cations on uptake of cadmium by Chlorella pyrenoidosa,  
Aust. J. Mar. Freshw. Res., 33, 979-987.
- GJESSING E.T., 1981,  
The effect of aquatic humus on the biological availability of cadmium,  
Arch. Hydrobiol., 91, 144-149.
- GLASS A.D.M. et M.Y. SIDDIQI, 1981,  
Potassium-hydrogen ion exchange across barley roots : an introduction to chemiosmotic principles of solute transport,  
J. Biol. Educ., 15, 289-293.
- GOMMES R. et H. MUNTAU, 1976,  
cités par RAVERA.
- GUILLAUMIN J.C., 1974,  
Determination of trace metals in power plant effluents,  
Atom. Abs. Newslett., 13, 135-139.
- HAHNE H.C.H. et W. KROONTJE, 1973,  
Significance of pH and chloride concentration on behavior of heavy metal pollutants : mercury (II), cadmium (II), zinc (II), and lead (II),  
J. Environ. Qual., 2, 444-450.
- HAMANAKA T. et S. MISHIMA, 1981,  
Cadmium and zinc concentrations in marine organisms in the Northern North Pacific Ocean,  
Res. Inst. N. Pac. Fish., Hokkaido Univ., volume spécial, 191-206.
- HAMPP R., K. BEULICH et H. ZIEGLER, 1976,  
Effects of zinc and cadmium on photosynthetic CO<sub>2</sub>-fixation and Hill activity of isolated spinach chloroplasts,  
Z. Pflanzenphysiol., 77, 336-344.
- HART B.A. et P.E. BERTRAM, 1980,  
A cadmium-binding protein in a cadmium tolerant strain of Chlorella pyrenoidosa,  
Environ. Exp. Bot., 20, 175-180.
- HART B.A., P.E. BERTRAM et B.D. SCAIFE, 1979,  
Cadmium transport by Chlorella pyrenoidosa,  
Environ. Res., 18, 327-355.
- HART B.A. et B.D. SCAIFE, 1977,  
Toxicity and bioaccumulation of cadmium in Chlorella pyrenoidosa,  
Environ. Res., 14, 401-413.
- HAYAT M.A., 1970,  
Principles and techniques of electron microscopy : biological applications,  
1,  
Von Nostrand Rheinhold Company, New York, 409 p..

HELLERGREEN J., S. WIDELL, T. LUNDBORG et A. KYLIN, 1983,  
Frosthardiness development in Pinus sylvestris : the involvement of K<sup>+</sup>-  
stimulated Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase from purified plasma membranes of pine,  
Physiol. Plant, 58, 7-12.

HELLMANN V. et E. KESSLER, 1974,  
Physiologische und biochemische beitrage zur taxonomie der gattung  
Chlorella - VIII Die basenzusammensetzung der DNS,  
Arch. Microbiol., 95, 311-318.

HENDRIX D.L. et W.S. PIERCE, 1980,  
Preliminary characterization of an anion-stimulated ATPase from Pisum  
plasma membrane,  
Plant Sci. Lett., 18, 365-373.

HIATT V.S. et K.B. JACOBSON, 1980,  
Interaction of metal ions with tRNA : effects of cadmium, zinc, and  
magnesium ions on chromatographic behaviour of tyrosine and leucine tRNA  
species,  
Toxicol. Appl. Pharmacol., 56, 116-126.

HISCOCK S.A., 1983,  
Trends in uses of cadmium (1970-1979),  
Ecotoxicol. Environ. Safety, 7, 25-32.

HODGES T.K. et R.T. LEONARD, 1974;  
Purification of a plasma membrane-bound adenosine triphosphatase from plant  
roots,  
in Methods in Enzymology, 32, 392-406, COLOWICK S.P. et N.O. KAPLAN (eds.),  
Academic Press, New York.

HOMER R.B. et K. ROBERTS, 1979,  
Glycoprotein conformation in plant cell walls - Circular dichroism reveals  
a polyproline II structure,  
Planta, 146, 217-222.

HORNUNG U., H.V. WITSCH et F. MENKE, 1981,  
Cadmium repression of the growth of Coelastrum proboscideum BOHLIN  
(Chlorococcales) and some counteracting factors,  
Arch. Hydrobiol., Suppl.60, 298-312.

HUTCHINSON T.C. et P.M. STOKES, 1975,  
Heavy metal toxicity and algal bioassays,  
in Water Quality Paramaters, ASTM STP 573, 320-343, American Society for  
Testing and Materials (ed.), Philadelphia.

HUTTON M., 1983,  
Sources of cadmium in the environment,  
Ecotoxicol. Environ. Safety, 7, 9-24.

ILMAVIRTA V., 1974,  
Electronic particle counting applied in phytoplankton studies in three  
southern Finnish lakes,  
Ann. Bot. Fenn., 11, 105-111.

IRIKI Y. et T. MIWA, 1960,  
Chemical nature of the cell wall of the green algae, Codium, Acetabularia  
and Halicoryne,  
Nature, 185, 178-179.

IRMER U., 1984,

Die wirkung der schwermetalle cadmium und mangan auf einzellige  
sußwassergrünalgen im durchflußsystem,  
Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg, 19, 5-21.

IZATT R.M., J.T. CHRISTENSEN et J.H. RYTTING, 1971,

Sites and thermodynamic quantities associated with proton and metal ion  
interaction with ribonucleic acid, desoxyribonucleic acid and their  
constituent bases, nucleosides and nucleotides,  
Chem. Rev., 71, 439-482.

JACOBSON K.B. et J.E. TURNER, 1980,

The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and  
nucleic acids,  
Toxicol., 16, 1-37.

JAIN M.K. et R.C. WAGNER, 1980,

Introduction to biological membranes,  
John Wiley & Sons, New York, 382 p..

JENNETT J.C., J.E. SMITH et J.M. HASSETT, 1982,

Factors influencing metal accumulation by algae,  
Rapport EPA-600/2-82-100, 124 p..

JOKELA A.C.C.T., 1969,

Outer membrane of Dunaliella tertiolecta : isolation and properties,  
Ph.D. in Marine Biology, University of California, San Diego, 109 p..

JOUANY J.M., 1982,

Les tests d'écotoxicité aigüe chez les algues et les macrophytes,  
in "Les tests de toxicité aigüe en milieu aquatique", 106, 169-181,  
LECLERC H. et D. DIVE (eds.), INSERM.

KASAMO K., 1979,

Characterization of membrane-bound Mg<sup>2+</sup>-activated ATPase isolated from  
lower epidermis of tobacco leaves,  
Plant Cell Physiol., 20, 281-292.

KESSLER E., 1972,

Physiologische und biochemische beitrage zur taxonomie der gattung  
Chlorella - VI Verwertung organischer kohlenstoffverbindungen,  
Arch. Mikrobiol., 85, 153-158.

KESSLER E., 1976,

Comparative physiology, biochemistry, and the taxonomy of Chlorella  
(Chlorophyceae),  
Plant Syst. Evol., 125, 129-138.

KESSLER E., 1978,

Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus  
Chlorella - XII Starch hydrolysis and Key for the identification of 13  
species,  
Arch. Microbiol., 119, 13-16.

KESSLER E., 1980,

Mass culture of Chlorella strains under conditions of high salinity,  
acidity, and temperature,  
Arch. Hydrobiol., Suppl.60, 80-86.

- KESSLER E. et F.C. CZYGAN, 1970,  
Physiologische und biochemische beitrage zur taxonomie der gattung  
Chlorella - IV Verwertung organischer stickstoffverbindungen,  
Arch. Mikrobiol., 70, 211-216.
- KIELLAND J., 1937,  
Individual activity coefficients of ions in aqueous solutions,  
J. Amer. Chem. Soc., 59, 1675-1678.
- KINKADE M.L. et H.E. ERDMAN, 1975,  
The influence of hardness components ( $Ca^{++}$  and  $Mg^{++}$ ) in water on the uptake  
and concentration of cadmium in a simulated freshwater ecosystem,  
Environ. Res., 10, 308-313.
- KINNIBURGH D.G., 1983,  
The  $H^+/M^{++}$  exchange stoichiometry of calcium and zinc adsorption by  
ferrihydrite,  
J. Soil Sci., 34, 759-768.
- KJELLSTROM T., B. LIND, L. LINNMAN et C.G. ELINDER, 1975,  
Variation of cadmium concentration in wheat and barley in Sweden,  
Arch. Environ. Hlth., 30, 321-328.
- KORTE F., 1983,  
Ecotoxicology of cadmium : general overview,  
Ecotoxicol. Environ. Safety, 7, 3-8.
- KREMLING K., J. PIUZE, K. VON BROCKEL et C.S. WONG, 1978,  
Studies on the pathways and effects of cadmium in controlled ecosystem  
enclosures,  
Mar. Biol., 48, 1-10.
- KUBOTA J., E.L. MILLS et R.T. OGLESEY, 1974,  
Lead, cadmium, zinc, copper, and cobalt in streams and lake waters of  
Cayuga Basin, New York,  
Environ. Sci. Technol., 8, 243-248.
- KUIPER D., 1982,  
Genetic differentiation in Plantago major :  $Ca^{++}$ - and  $Mg^{++}$ -stimulated  
ATPases from roots and their role in phenotypic adaptation,  
Physiol. Plant., 56, 436-443.
- LAEGREID M., J. ALSTAD, D. KLAVENESS et H.M. SELP, 1983,  
Seasonal variation of cadmium toxicity toward the alga Selenastrum  
capricornutum Printz in two lakes with different humus content,  
Environ. Sci. Technol., 17, 357-361.
- LAMOREAUX R.J. et W.R. CHANEY, 1978,  
The effect of cadmium on net photosynthesis, transpiration, and dark  
respiration of excised silver maple leaves,  
Physiol. Plant., 43, 231-236.
- LANGMUIR I., 1918,  
cité par LYKLEMA J., 1983.
- LAUBE V.M., C.N. MCKENKIE et D.J. KUSHNER, 1980,  
Strategies of response to copper, cadmium, and lead by a blue-green and a  
green alga,  
Can. J. Microbiol., 26, 1300-1311.

- LAUCHLI A., 1976,  
Genotypic variation in transport,  
in *Transports in plants II*, B, 372-393, LUTTGE U. et M.G. PITMAN (eds.),  
Encyclop. Plant Physiol., Springer Verlag.
- LAXEN D.P.H., 1984,  
Cadmium in freshwaters : concentrations and chemistry,  
*Freshwat. Biol.*, 14, 587-595.
- LEATHERLAND T.M. et J.D. BURTON, 1974,  
The occurrence of some trace metals in coastal organisms with particular  
reference to the solent region,  
*J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 54, 457-468.
- LEE R.B., 1979,  
The release of nitrite from barley roots in response to metabolic  
inhibitors, uncoupling agents and anoxia,  
*J. Exp. Bot.*, 30, 119-134.
- LEONARD R.T., 1984,  
Membrane-associated ATPases and nutrient absorption by roots,  
in *Advances in Plant Nutrition*, 1, 209-240,  
TINKER P.B. et A. LAUCHLI (eds.), Praeger Publishers, New York.
- LEONARD R.T. et T.K. HODGES, 1973,  
Characterization of plasma membrane-associated adenosine triphosphatase  
activity of oat roots,  
*Plant Physiol.*, 52, 6-12.
- LEONARD R.T. et C.W. HOTCHKISS, 1976,  
Cation-stimulated adenosine triphosphatase activity and cation transport in  
corn roots,  
*Plant Physiol.*, 58, 331-335.
- LES A. et R.W. WALKER, 1984,  
Toxicity and binding of copper, zinc, and cadmium by the blue-green alga  
*Chroococcus parisi*,  
*Wat. Air Soil Poll.*, 23, 129-139.
- LI W.K.W., 1978,  
Kinetic analysis of interactive effects of cadmium and nitrate on growth of  
*Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae),  
*J. Phycol.*, 14, 454-460.
- LINDBERG S., G. HANSSON et A. KYLIN, 1974,  
Kinetic studies of a ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{++}$ ) ATPase in sugar beet roots - I  
Mg dependence,  
*Physiol. Plant*, 32, 103-107.
- LINDBERG S. et G. WINGSTRAND, 1985,  
Mechanism of  $\text{Cd}^{++}$  inhibition of ( $\text{K}^+ + \text{Mg}^{++}$ ) ATPase activity and  $\text{K}^+$  ( $\text{Rb}_{86}^+$ )  
uptake join roots of sugar beet (*Beta vulgaris*),  
*Physiol. Plant.*, 63, 181-186.
- LONG D.T. et E.E. ANGINO, 1977,  
Chemical speciation of Cd, Cu, Pb and Zn in mixed freshwater, seawater and  
brine solution,  
*Geochim. Cosmochim. Acta*, 41, 1183-1191.

- LOOS E. et D. MEINDL, 1982,  
Composition of the cell wall of Chlorella fusca,  
*Planta*, 156, 270-273.
- LUE-KIM H., P.C. WOZNIAC et R.A. FLETCHER, 1980,  
Cadmium toxicity on synchronous populations of Chlorella ellipsoidea,  
*Can. J. Bot.*, 58, 1780-1788.
- LUFT J.H., 1961,  
Improvements in epoxy resin embedding methods,  
*J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 409-414.
- LUOMA S.N., 1983,  
Bioavailability of trace metals to aquatic organisms - A review,  
*Sci. Tot. Environ.*, 28, 1-22.
- LYKLEMA J., 1983,  
Adsorption of small ions,  
in Adsorption from solution at the solid/liquid interface, 223-246,  
PARFITT G.D. et C.H. ROCHESTER (eds.), Academic Press, London.
- MAC LEAN F.I. et al., 1972,  
cités par BABICH H. et G. STOTZKY, 1978.
- MANG S. et H.W. TROMBALLA, 1978,  
Aufnahme von cadmium durch Chlorella fusca,  
*Z. Pflanzenphysiol.*, 90, 293-302.
- MANKOVSKA B., 1977,  
The content of lead, cadmium, and chlorine in forest trees caused by the  
traffic of motor vehicles,  
*Biologia*, 32, 477-489.
- MANTOURA R.F.C., A. DICKSON et J.P. RILEY, 1978,  
The complexation of metals with humic materials in natural waters,  
*Estuar. Coast. Mar. Sci.*, 6, 387-408.
- MARTELL A.E. et R.M. SMITH, 1974,  
Critical stability constants - 1 : Acides aminés,  
Plenum Press, New York, 469 p..
- MARTELL A.E. et R.M. SMITH, 1977,  
Critical stability constants - 3 : Other organic substances,  
Plenum Press, New York, 495 p..
- MARTIN J.H. et G.A. KNAUER, 1973,  
The elemental composition of plankton,  
*Geochim. Cosmochim. Acta*, 37, 1639-1653.
- MATONICKIN I. et Z. PAVLETIC, 1975,  
Influence des ruisseaux d'alimentation sur la composition et la structure  
du benthos dans les lacs accumulateurs du Karst yougoslave,  
*Verh. Int. Verein. Limnol.*, 19, 1907-1920.
- MATUZIAC K., R. CHROST et A. KRZYWICKA, 1971,  
Bacterial microflora in Chlorella vulgaris culture,  
*Acta Microbiol. Pol. B*, 3, 189-193.

MATZKU S. et E. BRODA, 1976,  
Die zinkaufnahme in das innere von Chlorella,  
Planta, 92, 29-40.

McELROY W.D. et H.H. SELIGER, 1963,  
The chemistry of light emission,  
Adv. Enzymol., 25, 119-127.

McLEAN M.W. et F.B. WILLIAMSON, 1977,  
Cadmium accumulation by the marine red alga Porphyra umbilicalis,  
Physiol. Plant., 41, 268-272.

MIHARA S., 1961,  
Change in glucosamine content of Chlorella cells during the course of their  
life cycle,  
Plant Cell Physiol., 2, 25-29.

MILLER W.E., J.C. GREENE et T. SHIROYAMA, 1978,  
The Selenastrum capricornutum Printz algal assay bottle test,  
Rapport EPA-600/9-78-018, 125 p..

MIZUTA S. et S. SUDA, 1978,  
Characteristics of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>) ATPase in Boergesenia forbesii,  
Bot. Mag., 91, 57-68.

MOTOHASHI K; et T. TSUCHIDA, 1974,  
Uptake of cadmium by pure cultured diatom, Skeletomona forbesii,  
Bull. Plankt. Soc. Jap., 21, 55-59.

MULLER K.W et H.D. PAYER, 1979,  
The influence of pH on the cadmium-repressed growth of the alga Coelastrum  
proboscideum,  
Physiol. Plant., 45, 415-418.

MULLER K.W. et H.D. PAYER, 1980,  
The influence of zinc and light conditions on the cadmium-repressed growth  
of the green alga Coelastrum proboscideum,  
Physiol. Plant., 50, 265-268.

MURPHY B.R., G.J. ATCHISON et A.W. McINTOSH, 1978,  
Cadmium and zinc content of fish from an industrially contaminated lake,  
J. Fish. Biol., 13, 327-335.

MUSTAFA M.G. et CROSS C.E., 1971,  
Pulmonary alveolar macrophage - Oxidative metabolism of isolated cells and  
mitochondria and effect of cadmium ion on electron- and energy-transfert  
reactions,  
Biochem., 10, 4176-4185.

NAGANO T., T. NAGAI, H. UKISHIMA, T. UNNO, S. HATTORI et T. HONMA, 1976,  
Concentration of heavy metals in Chlorella - Part 3. Intake of cadmium  
compounds in Chlorella,  
Shizuoka-ken Eisei Kenkyusho Hokoku, 19, 65-68.

NAGANO T., S. HATTORI, T. NAGAI, Y. UKISHIMA, C. UNNO et T. HOONA, 1977,  
Accumulation of heavy metals by Chlorella ellipsoidea (C-27),  
Eisei Kagaku, 23, 1-6.

- NAKANO Y., K. OKAMOTO, S. TODA et K. FUWA, 1978,  
Toxic effects of cadmium on Euglena gracilis grown in zinc deficient and zinc sufficient media,  
Agric. Biol. Chem., 42, 901-907.
- NAGANO T., Y. WATANABE, K. HIDA, Y. SUKETA et S. OKADA, 1982 a,  
Production of cadmium-binding protein in Chlorella ellipsoidea,  
Eisei Kagasu, 28, 83-88.
- NAGANO T., Y. WATANABE, K. HIDA, Y. SUKETA et S. OKADA, 1982 b,  
Property of cadmium-binding protein in Chlorella ellipsoidea,  
Eisei Kagaku, 28, 114-117.
- NIEBOER E. et D.H.S. RICHARDSON, 1980,  
The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions,  
Environ. Pollut., B 1, 3-26.
- NORRIS P.R. et D.P. KELLY, 1977,  
Accumulation of cadmium and cobalt by Saccharomyces cerevisiae,  
J. Gen. Microbiol., 99, 317-324.
- NORVELL W.A., 1980,  
Surface reactions of heavy metals with clays, oxides, and humic substances,  
in Agrochemicals in soils, 315-336, BANIN A. et U. KAFFAKI (eds.), Pergamon Press, Oxford.
- O.C.D.E., 1983,  
Algues, test d'inhibition de croissance,  
in Lignes directrices de l'O.C.D.E. pour les essais des produits chimiques,  
201, O.C.D.E., Paris.
- O.M.S., 1979,  
Environmental health criteria for cadmium,  
Interim report, O.M.S., Genève.
- O.M.S., 1984,  
Guidelines for drinking-water quality - 1, recommendations,  
O.M.S. (ed.), Genève, 130 p..
- OVERNELL J., 1975,  
The effect of some heavy metal ions on photosynthesis in a freshwater alga,  
Pest. Biochem. Physiol., 5, 19-26.
- PAKALNE D.S., A.F. NOLLENDORF et V.V. UPITIS, 1970,  
Little investigated trace elements in Chlorella culture medium,  
Izv. aKad. Nauk. Latv. SSR, 11, 16-24.
- PARFITT G.D. et C.H. ROCHESTER, 1983,  
Adsorption of small molecules,  
in Adsorption from solution at the solid/liquid interface, 3-47,  
PARFITT G.D. et C.H. ROCHESTER (eds.), Academic Press, London.
- PEARSON R.G., 1968,  
Hard and soft acids and bases - HSAB, Part II : underlying theories,  
J. Chem. Educ., 45, 643-648.
- PENEDA-SARAIVA M.C., 1975,  
L'utilisation d'une algue nanoplantonique comme organisme-test et molysmologie marine - Quelques reponses de Dunaliella bioculata Butcher 1959 à l'irradiation gamma et à la contamination par le chrome et le

- PERCIVAL E. et R.H. McDOWELL, 1967,  
Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides,  
Academic Press, London, 219 p..
- PERCIVAL E. et R.H. McDOWELL, 1981,  
Algal walls - Composition and biosynthesis,  
in Plant carbohydrates - II Extracellular carbohydrates, 277-316,  
TANNER W. et F.A. LOEWUS (eds.), Springer Verlag, Berlin.
- PERRY E.F., S.R. KOIRTYOHANN et H.M. PERRY, 1975,  
Determination of cadmium in blood and urine by graphite furnace atomic  
absorption spectrophotometry,  
J. Clin. Chem., 21, 626-629.
- PETERSON H.G. et F.P. HEALEY, 1985,  
Comparative pH dependent metal inhibition of nutrient uptake by Scenedesmus  
quadricauda (Chlorophyceae),  
J. Phycol., 21, 217-222.
- PETERSON H.G., F.P. HEALEY et R. WAGEMANN, 1984,  
Metal toxicity to algae : a highly pH dependent phenomenon,  
Can. J. Fish. Aquat. Sci., 41, 974-979.
- PETERSON P.J. et B.J. ALLOWAY, 1979,  
Cadmium in soils and vegetation,  
in The chemistry, biochemistry and biology of cadmium, chap.2,  
WEBB M. (ed.), Elsevier, Amsterdam.
- PHILLIPS D.J.H., 1977,  
The common mussel Mytilus edulis as an indicator of trace metals in  
Scandinavian waters - I Zinc and cadmium,  
Mar. Biol., 43, 283-291.
- PHILLIPS D.J.H., 1978,  
The use of biological indicator organisms to quantitate organochlorine  
pollutants in aquatic environments - A review,  
Environ. Pollut., 16, 165-227.
- PHILLIPS D.J.H., 1979,  
Trace metals in the common mussel, Mytilus edulis (L.), and in the alga  
Fucus vesiculosus (L.) from the region of the Sound (Oresund),  
Environ. Pollut., 18, 31-43.
- PLANAS D., 1975,  
Distribution and productivity of the phytoplankton in Spanish reservoirs,  
Verh. Int. Verein. Limnol., 19, 1860-1870.
- POMEROY M.K. et E.J. McMURCHIE, 1982,  
A comparison of the properties of ATPase associated with wheat and  
cauliflower plasma membranes,  
Plant Physiol., 69, 1241-1246.
- POOLE R.J., 1978,  
Energy coupling for membrane transport,  
Ann. Rev. Plant Physiol., 29, 437-460.
- PRESTON A., 1978,  
Inputs of pollutants to the Oslo Commission areas,  
Rapport I.C.E.S. n°77, 57 p..

- PREVOT P., 1979,  
Action d'un métal lourd, le cadmium, sur un dinoflagellé marin libre :  
Prorocentrum micans E.,  
Thèse de 3ème cycle en Océanographie, Université P. et M. Curie, Paris VI,  
121 p..
- RACHLIN J.W., B. WARKENTINE et T.E. JENSEN, 1982 a,  
The growth responses of Chlorella saccharophila, Navicula incerta and  
Nitzschia closterium to selected concentrations of cadmium,  
Bull. Torr. Bot. Club, 109, 129-135.
- RACHLIN J.W., T.E. JENSEN, M. BAXTER et V. JANI, 1982 b,  
Utilization of morphometric analysis in evaluating the response of  
Plectonema boryanum (Cyanophyceae) to exposure to eight heavy metals,  
Arch. Environ. Contam. Toxicol., 11, 323-334.
- RAI L.C., J.P. GAUR et H.D. KUMAR, 1981,  
Phycology and heavy-metal pollution,  
Biol. Rev., 56, 99-151.
- RAVERA O., 1984,  
Cadmium in freshwater ecosystems,  
Experientia, 40, 2-14.
- RESANKA T., V. PRIKRYLOVA, S.V. YAROLSKY et M. PODOJIL, 1983,  
Monosaccharides of the green fresh-water alga Chlorella kessleri,  
Folia Microbiol., 28, 287-291.
- RIEMERSMA J.C., 1968,  
Effects of sodium azide and 2,4-dinitrophenol on phosphorylation reactions  
and ion fluxes in Saccharomyces cerevisiae,  
Biochim. Biophys. Acta, 153, 80-87.
- RIFKIN R.J., 1965,  
In vitro inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Mg<sup>++</sup> ATPases by mono, di and trivalent  
cations,  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 120, 802-804.
- RITCHIE R.J. et A.W.D. LARKUM, 1982,  
Cation exchange properties of the cell walls of Enteromorpha intestinalis  
(L.) Link. (Ulvales, Chlorophyta),  
J. Exp. Bot., 33, 125-139.
- ROBINSON D.G. et R.K. WHITE, 1972,  
The fine structure of Oocystis apiculata W. West with particular reference  
to the wall,  
Br. Phycol. J., 7, 109-118.
- 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. Torr. Bot. Club, 104, 226-233.
- RUHLING A. et G. TYLER, 1973,  
Heavy metal pollution and decomposition of spruce needle litter,  
Oikos, 24, 402-416.
- SAKAGUCHI T., T. TSUJI, A. NAKAJIMA et T. HORIKOSHI, 1979,  
Accumulation of cadmium by green microalgae,

- SALL I., G. FERARD et P. METAIS, 1975,  
L'adénosine triphosphatase ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) dépendante de l'intestin grele :  
déterminations et propriétés chez le rat,  
*Ann. Biol. Clin.*, 33, 81-87.
- SALOMONS W. et U. FORSTNER, 1984,  
Metals in the hydrocycle,  
Springer Verlag, Berlin, 349 p..
- SALOMONS W., W. van DIEL, H. KERDIJK et R. BOXMA, 1982,  
cités par SALOMONS W. et U. FORSTNER, 1984.
- SASSEN A., A. VAN EYDEN-EMONS, A. LAMERS et F. WANKA, 1970,  
Cell wall formation in *Chlorella pyrenoidosa* : a freeze-etching study,  
*Cytobiol.*, 4, 373-382.
- SAY P.J. et B.A. WHITTON, 1977,  
Influence of zinc on lotic plants - II Environmental effects on toxicity  
of zinc to *Hormidium rivulare*,  
*Freshwat. Biol.*, 7, 377-384.
- SCALLA R., A. AMORY, J. RIGAUD et A. GOFFEAU, 1983,  
Phosphorylated intermediate of a transport ATPase and activity of protein  
Kinase in membrane from corn roots,  
*Eur. J. Biochem.*, 132, 525-530.
- SCHULZ-BALDES M. et R.A. LEWIN, 1976,  
Lead uptake in two marine phytoplankton organisms,  
*Biol. Bull.*, 150, 118-127.
- SCHUURMANS STEKHOVEN F. et S.L. BONTING, 1981,  
Transport adenosine triphosphatases : properties and functions,  
*Physiol. Rev.*, 61, 1-76.
- SEDLACEK J., T. KAELLQVIST et E. GJESSING, 1983,  
Effect of aquatic humus on uptake and toxicity of cadmium to *Selenastrum*  
*capricornutum* Printz,  
in *Aquatic and terrestrial humic materials*, 495-516, CHRISTMAN R.F. et  
E.T. GJESSING (eds.), Ann Arbor Science, Ann Arbor.
- SHAHAK Y., 1982,  
Activation and deactivation of  $\text{H}^+$ -ATPase in intact chloroplasts,  
*Plant Physiol.*, 70, 87-91.
- SIBLEY T.M. et J.J. MORGAN, 1977,  
cités par FORSTNER U. et G.T.W. WITTMANN.
- SILLEN L.G. et A.E. MARTELL, 1971,  
Stability constants of metal ion complexes,  
*Suppl. 1, Chem. Soc. Lond. Spec. Publ.*, 25, 754 p..
- SILVERBERG B.A., 1976,  
Cadmium-induced ultrastructural changes in mitochondria of freshwater green  
algae,  
*Phycologia*, 15, 155-159.
- SIMPSON W.R., 1981,  
A critical review of cadmium in the marine environment,  
*Prog. Oceanog.*, 10, 1-70.

SINGH S.P. et A.K. PANDEY, 1981,  
cités par RAI L.C. et al., 1981.

SISSOEFF I., J. GRISVARD et E. GUILLE, 1976,  
Presence of divalent cations bound reiterative DNA sequences in higher  
plant and animal tissues,  
in Progress in Differentiation Research, 197-204, MULLER-BERAT N. (ed.),  
North Holland Publishing Company, Amsterdam.

SOEDER C.J., H.D. PAYER, K.H. RUNKEL, J. BEINE et E. BRIELE, 1978,  
Sorption and concentration of toxic minerals by mass cultures of  
Chlorococcales,  
Mitt. Int. Verein. Limnol., 21, 575-584.

SOYER M.O. et P. PREVOT, 1981,  
Ultrastructural damage by cadmium in a marine dinoflagellate, Prorocentrum  
micans,  
J. Protozool., 28, 308-313.

SPECTROR T., 1978,  
Refinement of the coomaassie blue method of protein quantitation - A simple  
and linear spectrophotometric assay for 0,5 to 50 µg of protein,  
Anal. Biochem., 86, 142-146.

SRNA R.F., K.S. GARRETT, S.M. MILLER et A.B. THUM, 1980,  
Copper complexation capacity of marine water samples from southern  
California,  
Environ. Sci. Technol., 14, 1482-1486.

STACEY N.H. et C.D. KLAASSEN, 1981,  
Interaction of metal ions with cadmium-induced cellular toxicity,  
J. Toxicol. Environ. Hlth., 7, 149-158.

STAEHELIN A., 1966,  
Die ultrastruktur der zellwand und des chloroplasten von Chlorella,  
Z. Zellforsch., 74, 325-350.

STARY J., B. HAVLIK, K. KRATZER, J. PRASILOVA et J. HANUSOVA, 1983,  
Cumulation of zinc, cadmium and mercury on the alga Scenedesmus obliquus,  
Acta Hydrochim. Hydrobiol., 11, 401-409.

STENNER R.D. et G. NICKLESS, 1974,  
cités par FORSTNER U. et G.T.W. WITTMANN, 1983.

STILLWELL E.F. et K.E. CORUM, 1982,  
Effects of cadmium and low magnesium on cell division and calcification in  
the marine coccolithophorid Cricosphaera (Hymenomonas) carterae,  
Mar. Biol., 66, 227-230.

STRATTON G.W. et C.T. CORKE, 1979,  
The effect of mercuric, cadmium and nickel ion combinations on a blue-green  
alga,  
Chemosphere, 10, 731-740.

SUGAWARA N. et C. SUGAWARA, 1975,  
Effect of cadmium, in vivo and in vitro, on intestinal brush border ALPase  
and ATPase,  
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 14, 653-656.

- 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.
- SWALLOW K.C., J.C. WESTALL, D.M. McKNIGHT, N.M.L. MOREL et F.M.M. MOREL,  
1978,  
Potentiometric determination of copper complexation by phytoplankton  
exudates,  
Limnol. Oceanog., 23, 538-542.
- TAKADA M. et H. HAYASHI, 1978,  
Effects of cadmium ion on the Na, K-ATPase of microsomes obtained from frog  
skin,  
Jap. J. Physiol., 28, 473-483.
- TAKEDA H. et T. HIROKAWA, 1978,  
Studies on the cell wall of Chlorella - I Quantitative changes in cell  
wall polysaccharides during the cell cycle of Chlorella ellipsoidea,  
Plant Cell Physiol., 19, 591-598.
- THOMAS B., J.A. ROUGHAN et E.D. WATTERS, 1972,  
Lead and cadmium content of some vegetable foodstuffs,  
J. Sci. Food Agric., 23, 1493-1498.
- TILLER K.G., J.L. HONEYSETT et E.G. HALLSWORTH, 1969,  
Isotopically exchangeable form of native and applied cobalt in soils,  
Aust. J. Soil Res., 7, 43-56.
- TRUHAUT R., J.F. FERARD et J.M. JOUANY, 1980,  
Cadmium IC 50 determinations on Chlorella vulgaris involving different  
parameters,  
Ecotox. Environ. Saf., 4, 215-223.
- TSEZOS M. et B. VOLESKY, 1982,  
The mechanism of uranium biosorption by Rhizopus arrhizus,  
Biotechnol. Bioeng., 24, 385-401.
- TUCKER R.K., 1979,  
Effects of in vivo cadmium exposure on ATPases in gill of the lobster,  
Homarus americanus,  
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 23, 33-35.
- TUCKER R.K. et A. MATTE, 1980,  
In vitro effects of cadmium and lead on ATPases in the gill of the rock  
crab, Cancer irroratus,  
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 24, 847-852.
- UPITIS V.V., D.S. PAKALNE et A.F. NOLLENDORF, 1973,  
The dosage of trace elements in the nutrient medium as a factor in  
increasing the resistance of Chlorella to unfavorable conditions of  
culturing,  
Mikrobiologiya, 42, 854-858.
- VALLEE B.L. et D.D. ULMER, 1972,  
Biochemical effects of mercury, cadmium and lead,  
Ann. Rev., Biochem., 41, 91-128.

- VAN CUTSEM P. et C. GILLET, 1981,  
A thermodynamic study of  $\text{Cu}^{++}$ - $\text{Zn}^{++}$  ion exchange in the Nitella flexilis  
cell wall,  
Plant and Soil, 62, 367-375.
- VAN DEN BERG C.M.G., P.T.S. WONG et Y.K. CHAU, 1979,  
Measurement of complexing materials excreted from algae and their ability  
to ameliorate copper toxicity,  
J. Fish. Res. Board Can., 36, 901-805.
- VAN DER WEIJDEN C.H., 1976,  
Experiments on the uptake of Zn and Cd by manganese oxides,  
Mar. Chem., 4, 377-387.
- VAN ENK R.H., 1983,  
Forecast of cadmium impact on the environment using environmental models,  
Ecotoxicol. Environ. Saf., 7, 96-105.
- VASSEUR P., J.M. JOUANY et J.F. FERARD, 1982,  
Interet du dosage de l'ATP en tant que critère d'écotoxicité aigue chez les  
algues,  
in "Les tests de toxicité aigue en milieu aquatique", 106, 207-226,  
LECLERC H. et D. DIVE (eds.), INSERM.
- VEROY R.L., N. MONTANO, M.L.B. DE GUZMAN, E.C. LASERNA et G.J.B. GAJIPE,  
1980,  
Studies on the binding of heavy metals to algal polysaccharides from  
Philippine sea weeds - I Carageenan and the binding of lead and cadmium,  
Bot. Mar., 23, 59-62.
- VINAYAKUMAR M. et E. KESSLER, 1975,  
Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus  
Chlorella - X Products of glucose fermentation,  
Arch. Microbiol., 103, 13-19.
- WEIGEL H.J., 1985 a,  
The effect of Cd on photosynthetic reactions of mesophyll protoplasts,  
Physiol. Plant., 63, 192-200.
- WEIGEL H.J., 1985 b,  
Inhibition of photosynthetic reactions of isolated intact chloroplasts by  
cadmium,  
J. Plant Physiol., 119, 179-189.
- WHITTON B.A., 1984,  
Algae as monitors of heavy metals,  
in Algae as ecological indicators, 257-280, SCHUBERT L.E. (ed.), Academic  
Press, Londres.
- WONG P.T.S., G. BURNISON et Y.K. CHAU, 1979,  
Cadmium toxicity to freshwater algae,  
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 23, 487-490.
- YON J., 1969,  
Structure et dynamique conformationnelle des protéines,  
Hermann, Paris, 320 p., Collection Méthodes.
- ZIRINO A. et S. YAMAMOTO, 1972,  
A pH-dependent model for the chemical speciation of copper, zinc, cadmium,  
and lead in seawater,  
Limnol. Oceanogr., 17, 661-671.