

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET DE LA TOXICITÉ DU CUIVRE ET DU CADMIUM SUR LA
PHYSIOLOGIE CELLULAIRE DE L'ALGUE VERTE
OOCYSTIS POLYMORPHA

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

VENUS ESMAEILI

DÉCEMBRE 2018

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur, le professeur David Dewez, pour son aide et ses conseils, et son humeur joyeuse qui motive tous ses élèves. Merci beaucoup de m'avoir donné l'opportunité de réaliser mes études de maîtrise. Merci pour son soutien et sa responsabilité en tant que directeur au cours des deux dernières années. Son expertise et expérience dans le domaine de la toxicologie environnementale liée aux algues vertes m'ont permis d'en savoir plus sur ce domaine de recherche.

Je voudrais également remercier mes collègues du laboratoire, spécialement Vahid Ghashamsham qui m'a accompagné la plupart du temps quand j'avais vraiment besoin de son aide, et un grand merci à Mme Sonia Lachance pour sa collaboration durant toutes mes études. Enfin, je voudrais remercier mon père et ma sœur, qui m'ont encouragé émotionnellement et soutenu financièrement durant mes études.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	x
RÉSUMÉ.....	xii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
OBJECTIF.....	4
CHAPITRE I	
REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
1.1 Contamination de l'eau.....	5
1.1.1 Les métaux lourds.....	5
1.1.2 Les sources anthropiques de métaux lourds.....	6
1.2 Le cuivre.....	10
1.2.1 Le cuivre dans l'environnement.....	10
1.2.2 La toxicité du cuivre.....	10
1.3 Le cadmium.....	12
1.3.1 Le cadmium dans l'environnement.....	12
1.3.2 Le cadmium dans l'eau potable.....	13
1.3.3 La toxicité du cadmium.....	14
1.4 La technologie du traitement des eaux usées.....	15
1.4.1 L'utilisation des algues dans le traitement des eaux usées.....	17
1.4.2 Les mécanismes d'absorption des métaux lourds par les algues.....	18
CHAPITRE II	
BIOCHIMIE DES ALGUES VERTES.....	20
2.1 Algues vertes.....	20

2.1.1	Oocystis polymorpha	20
2.1.2	Applications des microalgues en biotechnologie environnementale	21
2.2	La photosynthèse	22
2.2.1	Les pigments chlorophylliens	23
2.2.2	Structure de l'appareil photosynthétique	26
2.2.3	Structure et fonction du photosystème II	29
2.2.4	La fluorescence chlorophyllienne	30
2.2.5	Émission de la fluorescence chlorophyllienne	31
2.2.6	La courbe OJIP	33
CHAPITRE III		
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		35
3.1	Préparation du matériel.....	35
3.2	Choix des espèces d'algues	35
3.3	Cultivation des cellules algales.....	36
3.3.1	Le milieu BBM	36
3.4	Analyse des données et statistiques	39
3.5	Détermination de la densité cellulaire	40
3.6	La bioaccumulation du cuivre et du cadmium.....	41
3.6.1	Le principe du ICP-OES	41
3.6.2	Estimation du cuivre et du cadmium dans la biomasse algale	44
3.6.3	Préparation de la solution d'étalonnage standard.....	45
3.7	Mesure de la fluorescence de la chlorophylle	47
3.7.1	Le fluorimètre.....	47
3.7.2	Dosage de la chlorophylle totale et des caroténoïdes.....	51
CHAPITRE IV		
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....		53
4.1	Effets inhibiteurs de CdCl ₂ et CuCl ₂ sur la croissance de <i>Oocystis polymorpha</i>	53

4.1.1 Inhibition de la croissance de la densité cellulaire.....	53
4.1.2 Changement du taux de croissance	57
4.2 L'inhibition de la photosynthèse induite par le CdCl ₂ et CuCl ₂	62
4.2.1 Détermination de la cinétique de fluorescence chlorophyllienne	62
4.2.2 Changement des paramètres de fluorescence.....	68
4.2.3 Changement de la teneur en pigments	81
4.3 Discussion générale	86
Conclusion.....	89
BIBLIOGRAPHIE	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Les sources majeures et les effets des métaux lourds sur la santé humaine	9
3.1 Composition du milieu BBM	37
3.2 Les équations et les définitions des paramètres calculés à partir de la cinétique rapide de fluorescence	50
4.1 Changement des paramètres cellulaires et biochimiques évalués lorsque les cellules algales de <i>O. polymorpha</i> ont été exposées à 150 μM de CdCl_2 et CuCl_2 durant 72 h d'exposition.....	87

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Les effets toxiques des métaux lourds rejetés dans l'environnement aqueux	8
1.2 La production de cadmium et son utilisation au Canada	13
1.3 Les différentes approches technologiques dans le traitement des eaux usées.....	16
1.4 Différents processus impliqués dans la phytoremédiation	16
1.5 Représentation schématique des différentes applications de culture des algues dans des photobioréacteurs	18
1.6 Les mécanismes de biosorption	19
2.1 Image microscopique de cellules de <i>Oocystis polymorpha</i>	21
2.2 Le processus de la photosynthèse	23
2.3 Structure des chlorophylles a et b.....	24
2.4 Les spectres d'absorption des chlorophylles a, b et des caroténoïdes	25
2.5 Structure du chloroplaste	26
2.6 Les réactions photochimiques des photosystèmes II et I, et le transport des électrons dans la membrane de thylakoïdes.	28
2.7 Représentation schématique des composantes du photosystème II. Les protéines D1 et D2 sont des protéines du centre réactionnel du photosystème II.	30
2.8 Les états d'excitation de la molécule de chlorophylle et les différentes voies de dissipation d'énergie du photosystème II	31
2.9 Représentation schématique de l'excitation et du transfert d'énergie	

(petites flèches rouges) entre les molécules de chlorophylle dans le système des antennes collectrices de lumière.	33
2.10 Courbe d'induction de la fluorescence chlorophyllienne représentant les transitions OJIP mesuré sur une échelle de temps logarithmique	34
3.1 La préparation des cultures traitées de la culture mère	39
3.2 Le compteur automatisé de cellules Countess® II FL avec ces cubes lumineux	40
3.3 La courbe d'étalonnage de la croissance des cultures d'algues pendant 72h	41
3.4 Nébuliseur de tube concentrique	42
3.5 Plasma à couplage inductif	43
3.6 Diagramme montrant l'introduction de l'échantillon dans l'ICP-OES	44
3.7 Les étapes dans la détection de la bioaccumulation du Cu et du Cd dans la biomasse algale.....	45
3.8 Courbe standard du Cd déterminée par ICP	46
3.9 Courbe standard du Cu déterminée par ICP	47
3.10 e fluorimètre Handy-PEA (http://hansatech-instruments.com)	48
3.11 inétique rapide de fluorescence mesuré sur une feuille de pois	49
3.12 Méthodologie d'extraction et de dosage de la chlorophylle totale et des caroténoïdes	52
4.1 Changement de la densité cellulaire de <i>O. polymorpha</i> traité à différents concentrations (50-150 μ M) de CdCl ₂ (A) et de CuCl ₂ (B) pendant 72 d'exposition.....	56
4.2 Changement du taux de croissance (μ) de <i>O. polymorpha</i> exposé pendant 72 h à différentes concentrations (50-150 μ M) de CdCl ₂ (A) et CuCl ₂ (B).	58

4.3	La capacité d'accumulation du Cd et du Cu dans la biomasse algale de <i>O. polymorpha</i> exposé pendant 72 heures à diverses concentrations (50-150 μ M) de CdCl ₂ (A) et CuCl ₂ (B).....	61
4.4	L'induction de la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne chez l'algue <i>O. polymorpha</i> après 24 h (A), 48 h (B) et 72h (C) de traitement au CdCl ₂	64
4.5	L'induction de la cinétique rapide de fluorescence chez l'algue <i>O. polymorpha</i> après 24 h (A), 48 h (B), et 72 h (C) de traitement au CuCl ₂	68
4.6	Changement du paramètre de fluorescence V _J lorsque les cellules algales de <i>O. polymorpha</i> ont été exposées à 50 et 150 μ M de CdCl ₂ et CuCl ₂	70
4.7	Changement du paramètre de fluorescence F _V /F _M lorsque les cellules d'algues de <i>O. polymorpha</i> ont été exposées à différentes concentrations de CdCl ₂ (A) et CuCl ₂ (B).....	74
4.8	Changement du paramètre de fluorescence ABS/RC lorsque les cellules algales de <i>O. polymorpha</i> ont été exposées à différentes concentrations de CdCl ₂ (A) et CuCl ₂ (B).....	77
4.9	Changement du paramètre PI lorsque les cellules de <i>O. polymorpha</i> ont été exposées pendant 48 h à différentes concentrations de CdCl ₂ (A) et CuCl ₂ (B).	80
4.10	Changement de la teneur en chlorophylle totale lorsque les cellules algales de <i>O. polymorpha</i> ont été exposées pendant 72 h à différentes concentrations de CdCl ₂ (A) et CuCl ₂ (B).....	83
4.11	Changement de la teneur en caroténoïdes totaux lorsque les cellules algales de <i>O. polymorpha</i> ont été exposées pendant 72 h à différentes concentrations de CdCl ₂ (A) et CuCl ₂ (B)	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ABS/RC	Absorption d'énergie lumineuse par complexe d'antennes par centre de réaction
ACN	Acétonitrile
ANOVA	Analyse de variance
ATP	Adenosine tri-phosphate
BBM	Bold Basal Medium
Chl	Chlorophylle
Chl <i>a</i>	Chlorophylle <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Chlorophylle <i>b</i>
CO ₂	Gaz carbonique ou dioxyde de carbone
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
ET	Transport d'électron
FM	Fluorescence maximum (à env. t = 1 sec)
F ₀	Fluorescence initial
FV	Variable Chl fluorescence
HNO ₃	Nitric acid

ICP-OES	Inductively coupled plasma—optical emission spectrometry
LED	Diode électro luminescente
LHC	Complexe de récolte de lumière
NADPH	Nicotinamide adénosine diphosphate (réduit)
P680	Centre de réaction de PSII
PEA	"Plant Efficiency Analyser" = appareil de mesure de fluorescence
PI	Indice photosynthétique
PQ	Plastoquinone
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
QA	Première quinone accepteur d'électrons du PSII
QB	Deuxième quinone accepteur d'électrons du PSII
R2	Coefficient de corrélation
RC	Centre réactionnel
ROS	Les espèces réactives de l'oxygène

RÉSUMÉ

Ces dernières années, la pollution des milieux aquatiques par les métaux représente un problème majeur, nécessitant une évaluation du risque de toxicité à l'aide de plusieurs espèces aquatiques. En particulier, le Cu^{2+} et le Cd^{2+} sont des éléments traces essentiels qui peuvent être toxiques à des concentrations élevées envers les organismes vivants, et leur libération dans les eaux usées représente un problème majeur au Canada concernant la qualité de l'eau. Dans le développement d'une approche d'assainissement des eaux usées, les microalgues peuvent accumuler grande capacité des métaux. Par conséquent, l'un des principaux problèmes au niveau cellulaire est l'implication des mécanismes moléculaires impliqués au cours de la bioaccumulation des métaux dans les cellules d'algue. L'objectif de ce projet est d'étudier les effets de la bioaccumulation et la toxicité du Cu^{2+} et du Cd^{2+} chez l'algue verte *O. polymorpha* exposée pendant 72 h aux différentes concentrations de CuCl_2 et de CdCl_2 . La capacité de bioaccumulation du Cu^{2+} et du Cd^{2+} dans la biomasse algale a été déterminée par spectrométrie d'émission optique à plasma (ICP-OES). Des méthodes d'analyses spectroscopiques ont été utilisées pour déterminer les effets toxiques du Cu^{2+} et du Cd^{2+} sur la division des cellules algales, le contenu des pigments et l'activité photosynthétique. Nos résultats ont montré que les deux métaux induisent une inhibition de la croissance des cellules. Une altération de la teneur totale en chlorophylles et caroténoïdes a été observée qui était liée à la concentration de Cu^{2+} et de Cd^{2+} . Le rendement le plus élevé d'accumulation de Cu^{2+} et de Cd^{2+} a été atteint lorsque les cellules algales d'*O. polymorpha* ont été exposées pendant 48 h à 150 μM de CuCl_2 et pendant 24 h à 150 μM de CdCl_2 . La capacité de tolérance d'*O. polymorpha* envers la toxicité de ces métaux est aussi discutée. Par conséquent, cette étude contribue à une meilleure compréhension de l'utilisation de l'algue verte *O. polymorpha* dans l'assainissement des eaux contaminées aux Cu^{2+} et Cd^{2+} .

MOTS-CLÉS: Bioaccumulation, Cadmium, Cuivre, *Oosystis polymorpha*, ICP-OES, La fluorescence chlorophyllienne

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les rejets de métaux lourds dans l'environnement sont associés avec le développement industriel et l'augmentation de la population dans de nombreux pays. Les métaux sont des constituants chimiques provenant de sources naturelles, mais avec forte émission anthropique provenant surtout des eaux usées industrielles. En particulier, ces effluents viennent de nombreuses activités industrielles, telles que l'exploitation minière, la corrosion des tubes d'eau, les pesticides, les déchets de rejet, la galvanoplastie, l'électrolyse, les engrais, le traitement de surface métallique, l'aérospatiale et les installations d'énergie atomique, etc. (Adriano *et al.*, 2005; Gadd, 2009). La pollution par les métaux est l'un des plus graves problèmes environnementaux dans les milieux aquatiques, les métaux lourds sont des polluants les plus couramment trouvés à des concentrations élevées dans les eaux usées industrielles (Wang *et Chen*, 2009), représentant un risque de dommages pour la santé publique. Aujourd'hui, l'un des problèmes environnementaux est le traitement des eaux usées industrielles, ce qui inclut les métaux lourds comme le plomb, le cuivre, le cadmium, le zinc, l'arsenic et le mercure. Ces métaux peuvent contaminer des eaux de surface et souterraines, et perturbant l'équilibre des écosystèmes (Eliott, 2001). En outre, les métaux deviennent toxiques à des concentrations élevées en raison de leur capacité à s'accumuler dans les organismes vivants. Les métaux peuvent provoquer diverses maladies et incapacités: Nous savons que l'homme a été de plus en plus exposé aux métaux lourds *via* la chaîne alimentaire, pouvant causer des effets perturbateurs sur le système nerveux, la circulation sanguine, le système immunitaire et la reproduction (Tchounwou *et al.*, 2012). En particulier, le cuivre est un oligoélément essentiel à la vie humaine, mais une grande quantité est toxique pour les organismes vivants. Les effets toxiques du cuivre sur la santé humaine sont connus en altérant le cerveau, le pancréas, le foie, la peau et le cœur (Davis *et al.*, 2000). Par contre, le cadmium est un métal très toxique affectant la physiologie des organismes à de faibles concentrations (Di Sanità Toppi *et Gabrielli*,

1999). La plupart des implications majeures pour la santé du Cd^{2+} chez l'homme se compose d'une atteinte hépatique, d'une dysfonction rénale et de l'hypertension (Klaassen, 2001).

Par conséquent, l'assainissement des métaux lourds contenus dans les eaux usées est essentielle à la protection de l'environnement. Plusieurs méthodes existent pour enlever les ions métalliques de la solution aqueuse. Les technologies conventionnelles physico-chimiques (échange ionique, précipitation, galvanoplastie, évaporation, procédé à membranes) sont coûteuses et enlèvent de façon incomplète les métaux produisant des boues toxiques (Tam *et* Wong, 1995). La bioremédiation des métaux lourds provenant des eaux usées par les organismes vivants peut avoir des avantages (rendement élevé, faible coût, régénération des biosorbants, récupération des métaux) et des inconvénients (inhibition de la croissance, de la division cellulaire, de l'appareil photosynthétique, et de plusieurs enzymes) (Volesky *et* Holan, 1995; Salman *et al.*, 2014).

Ces dernières années, l'utilisation des microorganismes a été choisi comme une option efficace pour le développement de procédés de traitement des eaux usées, en utilisant différents matériaux biologiques comme les algues, les bactéries, les champignons et les levures (Wang *et* Chen, 2009). L'utilisation des biosorbants pour le traitement de l'eau contenant des métaux a été largement discutée dans plusieurs études (Veglio *et* Beolchini, 1997; Demirbas, 2008; Davis *et al.*, 2003). Certains biosorbants sont considérés comme efficaces en raison de la capacité d'absorption élevée, et donc ils sont d'un grand intérêt pour la recherche et le développement (Kuyicak *et* Volesky, 1990; Rincon *et al.*, 2005; Brinza *et al.*, 2007; Khani, 2011). Les algues ont de faibles besoins en nutriments, et ils produisent une importante biomasse en comparaison aux microbes, bactéries et champignons. De plus, ils ne sécrètent pas de déchets

toxiques. Cependant, il faut connaître la capacité des cellules d'algues à bioaccumuler et à tolérer les métaux toxiques sous différentes conditions environnementales.

OBJECTIF

L'objectif principal de cette étude consiste à déterminer la capacité de bioaccumulation du cuivre et du cadmium dans les cellules d'algues vertes de *Oocystis polymorpha*. Notre hypothèse principale est que l'efficacité de la bioaccumulation de Cu^{2+} et de Cd^{2+} dépend du métal, de la concentration et de la durée d'exposition. Les objectifs spécifiques sont: 1- La détermination de la capacité de bioaccumulation lorsque les cellules algales de *O. polymorpha* sont exposées aux différentes concentrations de CuCl_2 et de CdCl_2 pendant 72 h; 2- L'évaluation des effets toxiques de Cu^{2+} et de Cd^{2+} bioaccumulée sur la division cellulaire et l'activité photosynthétique.

Ce mémoire de Maîtrise est organisé en quatre grands chapitres. Dans le premier chapitre, le contexte environnemental est défini, tel que la pollution de l'eau, le métal utilisé dans cette étude (Cu^{2+} et Cd^{2+}), la technologie de phytoremédiation pour l'assainissement de l'eau. Dans le deuxième chapitre, la théorie des algues vertes est présentée comme la cellule végétale, la sélection de l'algue verte *O. polymorpha*, les mécanismes de la photosynthèse, l'interaction des métaux au niveau cellulaire. Dans le troisième chapitre, les approches méthodologiques ont été présentées telles que la division cellulaire, l'émission de fluorescence de la chlorophylle et l'évaluation de la bioaccumulation des métaux. Enfin, les résultats obtenus sont présentés et discutés dans le quatrième chapitre.

CHAPITRE I

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Contamination de l'eau

L'eau a divers usages tels que la consommation, les activités agricoles, aquacoles et industrielles. L'utilisation de l'eau pour la consommation est inférieure à 0,007 % de l'eau totale sur terre, et moins de 1 % de toutes les eaux douces est facilement disponible pour usage humain (Vanloon *et* Duffy, 2005). Donc, la protection des ressources en eau et la lutte contre la pollution sont essentiels pour la préservation de la qualité de l'eau et notre bien-être (Mendie, 2005). Les eaux usées municipales au Canada représentent une des principales sources de pollution comportant des bactéries pathogènes, des produits chimiques, des déchets biologiques, des éléments nutritifs avec une potentialité d'endommager la santé humaine et l'environnement (Environnement Canada, 2011). Par conséquent, l'eau potable peut être contaminée par divers contaminants qui peuvent avoir des effets sur la santé humaine, comme les virus, les bactéries, les métaux lourds, les nitrates, les sels et les rejets industriels (Singh *et al.*, 2003). D'autre part, la pollution diffuse d'origine domestique et agricole peut conduire à une contamination des eaux de surface et souterraines *via* le ruissellement des métaux et des pesticides (Jain, 2004).

1.1.1 Les métaux lourds

Les métaux lourds représentent un groupe de métaux de densité supérieure à 5,0 g par cm^3 , comme par exemple le mercure (Hg), le cadmium (Cd), le plomb (Pb), l'aluminium (Al), le chrome (Cr), l'argent (Ag), l'étain (Sn). Provenant surtout des activités anthropiques, ce sont des polluants environnementaux dangereux présents dans

l'atmosphère, le sol et l'eau (Ma *et al.*, 1994; Msaky *et al.*, 1990; Fergusson, 1990). Ces métaux pénètrent dans le corps humain principalement par l'inhalation et l'ingestion (Bilos *et al.*, 2001). La consommation des métaux par l'alimentation a été signalée dans plusieurs populations humaines de nombreux pays (Singh *et al.*, 2005; Hang *et al.*, 2009). Les études écotoxicologiques sont donc devenues d'un grand intérêt pour la santé environnementale et humaine. La biodisponibilité des métaux par les organismes aquatiques est principalement déterminée par leur état d'oxydation ou de spéciation. Les métaux lourds sont connus pour interagir avec les protéines, en particulier leurs groupements carboxyles, sulfhydryles et imidazole (Chen *et al.*, 2011). Les métaux lourds peuvent donc inhiber les réactions enzymatiques, altérer la membrane cellulaire et des fonctions physiologiquement importantes situées sur la membrane (Hogan, 2010).

1.1.2 Les sources anthropiques de métaux lourds

Les métaux lourds sont des composantes essentielles de l'écosystème et existent dans l'environnement avec un large éventail d'états d'oxydation et d'espèces chimiques. La teneur en métaux lourds dans la biosphère a augmenté en raison de l'activité économique de l'homme (Baker *et al.*, 1990). Les métaux comme le zinc (Zn) et le cuivre (Cu) sont essentiels à la vie, alors que d'autres tels que le plomb (Pb) et le mercure (Hg) ne sont pas connus pour exercer une fonction biochimique bénéfique (Allan, 1997). Les métaux comme le cuivre (Cu), le cobalt (Co), le chrome (Cr), le manganèse (Mn), le fer (Fe), le magnésium (Mg), le molybdène (Mo), le nickel (Ni), le sélénium (Se) et le zinc (Zn) sont des nutriments nécessaires pour de nombreuses fonctions biochimiques et physiologiques (Genève, 1996). D'autres métaux tels que le cadmium (Cd), l'aluminium (Al), l'arsenic (As), l'antimoine (Sb) n'ont aucune fonction biologique et sont considérés comme non-essentiels (Chang *et al.*, 1996). Le tableau 1.2 montre les effets indésirables des métaux lourds sur la santé humaine (dommages cellulaires et tissulaires, maladies). La toxicité des métaux dépend de plusieurs facteurs comprenant

la dose, la voie d'exposition et les espèces chimiques, ainsi que le sexe, l'âge, la solubilité et l'état nutritionnel des individus exposés (Hani *et Anal*, 1990).

Les sources de métaux lourds dans l'environnement sont d'origine géogénique, atmosphérique, industriel, agricole, domestique et pharmaceutique (He *et al.*, 2005). La pollution de l'environnement par les métaux s'est répandue *via* les activités industrielles et minières à la fin du 19^{ème} et au début du 20^{ème} siècle (Kennish, 1996). La pollution environnementale est très importante dans les zones de sources ponctuelles, telles que les mines, fonderies, affineries et autres activités industrielles transformant les métaux (Cotte-Krief *et al.*, 2000; Bu-Olayan *et al.*, 2001; Esser *et Volpe*, 2002). Les installations industrielles ont conduit à des concentrations très élevées de métaux lourds dans l'environnement, d'ordre de 100-1000 fois supérieures à ceux de la croûte terrestre, et les organismes vivants peuvent être exposés à des niveaux encore plus élevés (Macfarlane *et Burchett*, 2001; Bradl, H., 2002; He *et al.*, 2005; Leung *et Jiao.*, 2006). Il existe aussi des sources de pollution diffuses provenant de zones agricoles par exemple (Adriano *et al.*, 2005; Gadd, 2009). Les métaux sont aussi présents dans les systèmes aquatiques par suite de l'érosion des sols et des roches et des éruptions volcaniques (González *et al.*, 2007). La figure 1.1 présente la diversité des sources anthropiques: Les eaux usées industrielles, les exploitations minières, le ruissellement urbain, le ruissellement agricole, les usines de traitement des eaux usées, les loisirs et les décharges d'ordures ménagères.

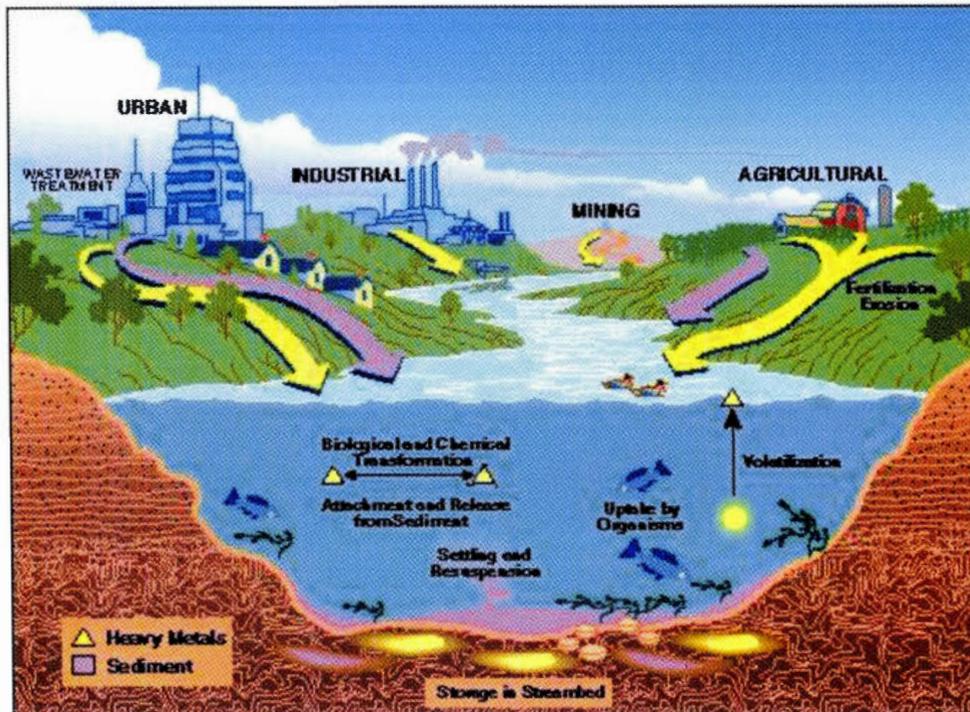


Figure 1.1 Les métaux lourds sont rejetés dans l'environnement aqueux provenant de différentes sources. Les sources typiques sont les usines de traitement des eaux usées municipales, les industries manufacturières, les mines, et les zones agricoles. Les métaux lourds sont absorbés par les organismes aquatiques causant des effets toxiques (John *et al.*, 1995)

Tableau 1.2 Les sources majeures et les effets des métaux lourds sur la santé humaine (Salman *et al.*, 2014).

Métaux lourds	Source majeure	Effet toxique
Plomb	exploitation minière, peindre, des pigments, galvanoplastie, fabrication de piles, combustion de charbon	Anémie, dommages cérébraux, anorexie, malaise, perte d'appétit, foie, rénale, dommages gastro-intestinaux, retard mental chez les enfants
Cuivre	Le placage, polissage du cuivre, peindre, opérations d'impression	Neurotoxicité, toxicité aiguë, vertiges, la diarrhée
Cadmium	Plastique, Le soudage, pesticide, les engrais, exploitation minière, raffinage	lésion rénale, bronchite, trouble gastro-intestinal, moelle osseuse, cancéreux, insuffisance pulmonaire, hypertension, maladie mentale, perte de poids
Zinc	exploitation minière, raffineries, fabrication en laiton, repulpant	Causer la fièvre des fondeurs, détresse gastro-intestinale
Mercur	Batteries, industrie du papier, industries de la peinture, exploitation minière	dommages au système nerveux, intoxication par le protoplasme, corrosif pour la peau, les yeux, les muscles, la dermatite, lésion rénale
Nickel	émaillage de porcelain, métal non ferreux, formulation de peinture, galvanoplastie	la bronchite chronique, fonction pulmonaire réduite, cancer du poumon
Arsenic	Fonte, exploitation minière, sédimentation des roches, pesticide	la bronchite, la dermatite, dépression de la moelle osseuse, hémolyse, hépatomégalie
Chrom	Textile, teinture, peintures et pigments, Fabrication d'acier	Cancérogène, mutagène, tératogénicité, nausée de douleur épigastrique, vomissement, diarrhée sévère, produisant des tumeurs pulmonaires

1.2 Le cuivre

1.2.1 Le cuivre dans l'environnement

Un des premiers métaux utilisés par l'homme est le cuivre du fait qu'on le trouve dans des gisements minéraux de beaucoup de régions du monde, et bien qu'il puisse être facilement travaillé, il a une résistance élevée à la corrosion (Angeles Cid, 1995). Le Cuivre est surtout présent dans la croûte terrestre sous forme de sulfure de cuivre (la chalcocite, Cu_2S), de sulfure de cuivre-fer (la chalcopyrite, CuFeS_2), de bonite (Cu_5FeS_4), et aussi comme des minéraux oxydés tels que les carbonates, sulfates et le cuivre des hydroxyle-silicates (Kiaune et Singhasemanon., 2011) Le cuivre se retrouve dans l'eau de surface, l'eau souterraine, l'eau potable et l'eau de mer, mais il est initialement présent sous forme de complexes ou de matière particulaire (ATSDR, 2002). En Amérique du Nord, les concentrations de cuivre dans les eaux de surface varient entre 0,0005 et 1 mg/L, la valeur médiane étant de 0,01 mg/L (ATSDR, 2002). Au Canada et aux États-Unis, les concentrations de cuivre dans l'eau potable peuvent varier de 0.005 à 30 mg/L, et la principale source provient de la corrosion des canalisations internes de cuivre (U.S. National Research Council, 2000).

1.2.2 La toxicité du cuivre

Le cuivre est un oligo-élément essentiel pour le fonctionnement des plantes, des microorganismes et des animaux en raison de son exigence pour de nombreux processus métaboliques particulières (ICA, 1995). En particulier, il est essentiel pour de nombreuses fonctions biochimiques, comme par exemple la catalyse de réactions d'oxydo-réduction dans le cytoplasme, la mitochondrie et le chloroplaste des cellules (Fargasova, 2004), ou bien comme un transporteur d'électrons durant la respiration (Yruela, 2009). Le cuivre participe aussi dans la lutte des espèces réactives de l'oxygène

comme la Cu/Zn superoxyde dismutase (SOD) qui convertit l'anion superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène (ICA, 1995).

Dans le sol, le Cu^{2+} existe sous plusieurs espèces chimiques, mais il est principalement absorbé comme un élément nutritif par les plantes sous forme de Cu^{2+} (Maksymiec, 1997). L'accumulation du Cu^{2+} peut atteindre des concentrations de 20 et 30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec (Pham *et al.*, 2013). La caractérisation primaire de toxicité du Cu^{2+} est l'inhibition de l'élongation des racines et la croissance de la plante (Tsay *et al.*, 1995). Les effets du Cu^{2+} provoquent d'autres symptômes comme la nécrose, la chlorose et la décoloration des feuilles (Yruela, 2009). Le changement rédox du Cu^+ en Cu^{2+} induit la formation d'espèces oxygénées radicalaires comme l'oxygène singulet (O^{2-}) et le radical hydroxyle (HO^{\cdot}), et ces espèces oxydatives provoquent des dommages aux macromolécules biologiques, comme l'ADN, l'ARN, les protéines, les lipides et les glucides (Lombardi *et* Sebastiani, 2005; Yurekli *et* Porgali, 2006). Il a aussi été démontré que la toxicité du Cu^{2+} induit une réduction de l'activité photosynthétique par une baisse du rendement quantique du photosystème II (Alaoui-Sosse *et al.*, 2004; Pesko *et* Kralova, 2013).

Également, les êtres humains sont exposés au cuivre par l'inhalation de particules de Cu^{2+} , l'ingestion d'eau ou de nourriture contaminée par le cuivre. Cependant, la toxicité du cuivre pour l'être humain est relativement faible par rapport aux autres métaux tels que le cadmium, le mercure, le plomb et le chrome. Les effets toxicologiques qui peuvent être induites par les ions cuivre (Cu^{2+}) peuvent provoquer des dépôts dans le cerveau, le foie, la peau, le pancréas et le myocarde (Davis *et al.*, 2000).

1.3 Le cadmium

1.3.1 Le cadmium dans l'environnement

Le cadmium (Cd^{2+}) est un métal lourd non-essentiel au vivant possédant une densité de 8.6 g/cm^3 , et c'est un métal largement utilisé dans l'industrie. La figure 1.2 présente les différentes utilisations du cadmium. Environnement Canada indique bien que l'utilisation majeure du Cd^{2+} est dans les batteries. Ce métal est aussi utilisé dans l'industrie de la galvanoplastie comme un protecteur contre la corrosion. D'autres utilisations comprennent les pigments et les stabilisants de plastique. Le cadmium évolue en environnement ses concentrations en raison de l'industriel et intérieur rejet des effluents non traités (Kaviraj *et Das*, 1995; Unlu *et al.*, 1999). Le Cd^{2+} est un métal qui arrive généralement en faibles concentrations avec d'autres éléments métalliques dans l'écosystème. Il contamine donc l'environnement à partir de multiples sources comprenant l'élimination insuffisante des déchets électroniques et des produits industriels.

Utilisations de cadmium

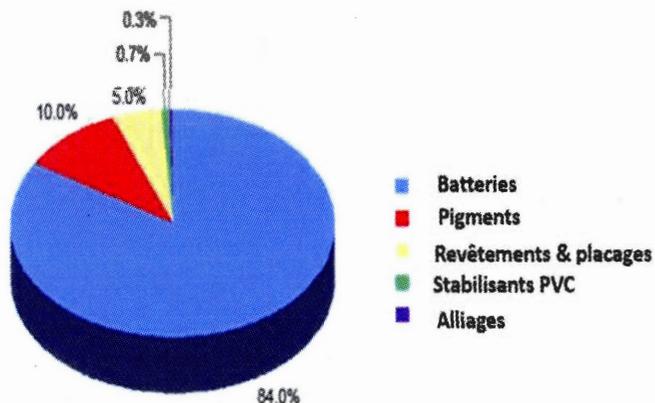


Figure 1.2 La production de cadmium et son utilisation au Canada (Environnement Canada, 2010).

1.3.2 Le cadmium dans l'eau potable

Les normes de l'eau potable pour le cadmium tel que défini par le Service de santé publique des États-Unis est de 0,01 ppm (United States Public Health Service, 1962). Il a été démontré que les concentrations de cadmium dans les eaux naturelles non polluées sont généralement inférieure à 1 µg/L (Friberg *et al.*, 1986). Les concentrations moyennes de cadmium dissous mesurées aux 110 stations du monde entier étaient < 1 µg/L, la valeur maximale mesurée étant de 100 µg/L dans le Rimao de Rio au Pérou (WHO, UNEP 1989). La contamination de l'eau potable provient principalement des tuyaux galvanisés, y compris le chauffe-eau, les soudures de raccords, les refroidisseurs d'eau et de robinets.

1.3.3 La toxicité du cadmium

À de faibles concentrations, c'est l'un des plus toxiques métal affectant l'activité physiologique des organismes, et sa propriété d'être bioaccumulée facilite la contamination du Cd^{2+} dans la chaîne alimentaire (Prasad, 1995). Les effets toxiques du Cd^{2+} sur la croissance et le métabolisme des plantes ont été investigués dans plusieurs études, et les résultats ont montré que le Cd^{2+} inhibe la croissance des plantes et perturbe le fonctionnement de la photosynthèse, le métabolisme du sucre, plusieurs activités enzymatiques et l'assimilation des sulfates (Sanità di Toppi *et Gabbrielli*, 1999; Kevrešan *et al.*, 2003; Šottníková *et al.*, 2003). Malheureusement, il a été démontré que l'alimentation humaine est la principale source d'exposition au cadmium chez les non-fumeurs de la plupart des régions du monde (Hovinga *et al.*, 1993). Une étude récente a montré que le Cd^{2+} est disponible dans presque tous les aliments, mais les concentrations peuvent varier selon le type de nourriture et le niveau de contamination de l'environnement (Saha *et al.*, 2010). Les études de toxicité du cadmium sur la santé humaine ont montré que le Cd^{2+} est connu pour causer l'emphysème, la bronchite, les troubles gastro-intestinaux, la protéinurie, l'hypertension, l'anoxémie, la perte de poids et des changements artériels préjudiciables dans les reins (WHO, 2001; K. K. Singh *et al.*, 2006). Bien qu'aucune preuve concluante n'ait été démontrée concernant l'induction d'un cancer par le cadmium, il existe suffisamment de preuves indiquant que le cadmium a des propriétés cancérogènes plus précisément pour les reins, la prostate et les poumons (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008).

1.4 La technologie du traitement des eaux usées

En raison des activités anthropiques, les contaminants organiques et les métaux peuvent se retrouver dans les eaux usées représentant un risque de toxicité pour la santé des écosystèmes aquatiques et la qualité de l'eau. La figure 1.3 présente les différentes approches technologiques physiques, chimiques et biologiques pour le traitement des eaux usées selon un ordre logique d'application. De plus, il existe plusieurs méthodes pour éliminer les contaminants des eaux de surface, des eaux souterraines et du sol, telles que: extraction et la dégradation des polluants, la stabilisation des contaminants sous une forme moins soluble ou toxique, le confinement ou bien le recyclage de la matière contaminée après l'action d'un traitement (Nathanail *et* Bardos, 2004; Scullion, 2006). Les technologies de bioremédiation représentent aussi une approche alternative d'assainissement de l'environnement en offrant un avantage sur les coûts. Il existe de nombreux organismes qui peuvent accumuler des substances toxiques dans leur biomasse à des concentrations beaucoup plus élevées que dans la matrice environnementale (Cunningham *et* Berti, 1993; Kord *et al.*, 2010). En particulier, la phytoremédiation utilise les plantes pour l'assainissement du sol contaminé aux métaux et autres polluants organiques (Cunningham *et* Berti, 1993; Rumer *et* Ryan, 1995). En sélectionnant les espèces végétales appropriées, la méthode de la phytoremédiation utilise des plantes qui ont une capacité considérable d'absorber et d'accumuler les métaux, accélérant la décontamination de l'écosystème terrestre (Mudgal *et al.*, 2010). La figure 1.4 montre les différents processus impliqués dans la phytoremédiation des contaminants.

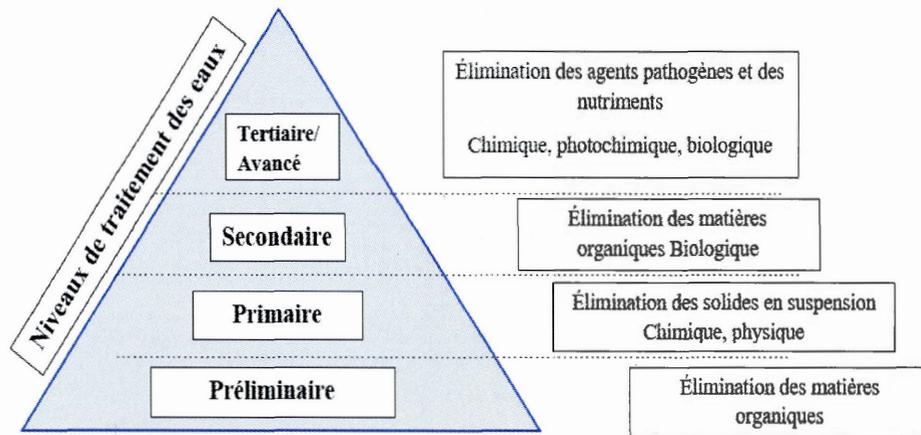


Figure 1.3 Les différentes approches technologiques dans le traitement des eaux usées (Frost *et* Sullivan, 2010).

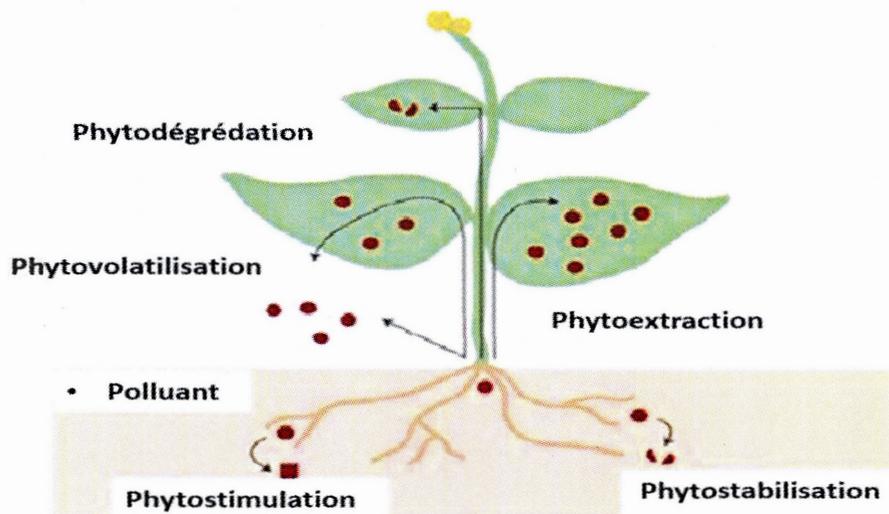


Figure 1.4 Différents processus impliqués dans la phytoremédiation (Pillon *et* Smits, 2005).

1.4.1 L'utilisation des algues dans le traitement des eaux usées

Depuis plusieurs années, l'utilisation des algues est d'un grand intérêt croissant pour la biosurveillance et la lutte pour l'eutrophisation, les polluants organiques et inorganiques (Ben Chekroun *et al.*, 2013). En particulier, les microalgues peuvent éliminer les métaux lourds de l'eau polluée, des algues ont été utilisés comme biosorbants en raison de leur grande disponibilité, leur superficie relativement élevée et leur capacité d'absorption élevée (Mehta *et Gaur*, 2005; Singh, Mehta *et Gerard.*, 2007; Yalcin *et al.*, 2008; Laib *et Leghouchi*, 2012). La figure 1.5 montre les différentes applications des cultures des algues dans des photobioréacteurs pour le traitement des eaux usées. La biomasse produite microalgues peut être utilisée pour la production de biocarburants (biodiesel) de biogaz (méthane) et d'autres sous-produits à haute valeur ajoutée.

La tolérance envers les métaux peut être conférée par leur immobilisation dans la paroi cellulaire (Baghour *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2003), ou par leur compartimentation dans les vacuoles (Vázquez *et al.*, 1994). Certaines algues ont montré une grande capacité d'accumulation cellulaire en métaux grâce à des mécanismes de tolérance comme les phytochélatines et les métallothionéines pouvant former des complexes avec les métaux et les transloquer dans la vacuole cellulaire (Suresh *et Ravishankar*, 2004; Gosavi *et al.*, 2005).

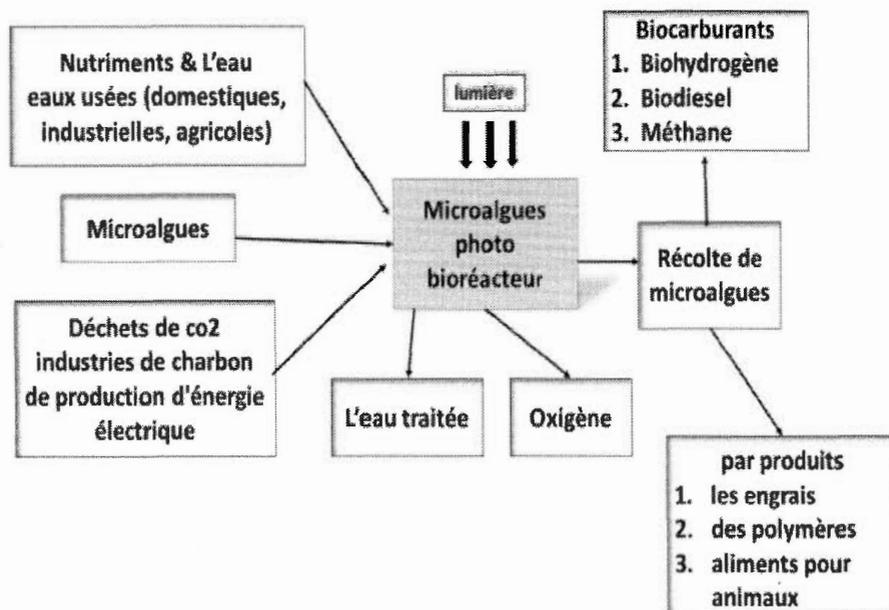


Figure 1.5 Représentation schématique des différentes applications de culture des algues dans des photobioréacteurs (Yafei, 2014).

1.4.2 Les mécanismes d'absorption des métaux lourds par les algues

Les cellules contiennent des protéines et des polysaccharides qui offrent des sites de liaison pour les métaux. L'absorption des métaux par la biomasse est un processus en deux étapes (Ahluwalia *et* Goyal, 2003): La première étape est l'interaction stœchiométrique entre les composants de la cellule et les ions métalliques; La deuxième étape est l'accumulation des métaux sur les sites de fixation. La figure 1.6 montre les mécanismes d'absorption qui sont importants (Herrero *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006): Échanges d'ions entre les protons et les ions métalliques, l'adsorption par les forces physiques, les interactions électrostatiques (Han *et al.*, 2006), la chélation, la complexation (Li *et al.*, 2006), et la microprécipitation (Gupta *et al.*, 2006). La fixation des ions métalliques à la surface de l'algue dépend de différentes conditions: Charge

ionique de l'ion métallique, l'espèce de l'algue, et la composition chimique de la solution (Crist *et al.*, 1981).

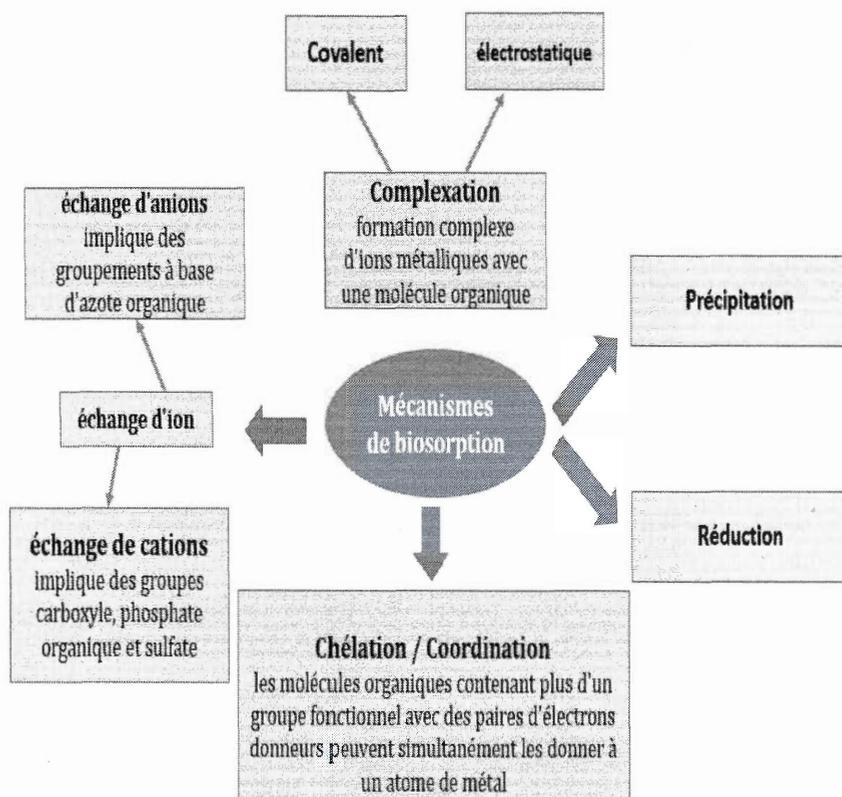


Figure 1.6 Les mécanismes de biosorption (Alluri et al,2007)

CHAPITRE II

BIOCHIMIE DES ALGUES VERTES

2.1 Algues vertes

Du groupe des chlorophycées, les algues vertes sont des organismes eucaryotes photosynthétiques caractérisés des chloroplastes contenant deux types de membranes thylakoïdes (grana et stroma) et les chlorophylles *a* et *b* (Proschold *et Leliaert*, 2007). La plupart des espèces d'algues vertes possède un noyau, une paroi cellulaire, un chloroplaste, un pyrénioïde (une région de forte densité contenant des grains d'amidon), des stigmates et des flagelles. Ces algues vertes sont largement répandues dans les environnements d'eau douce, mais certaines espèces sont également disponibles dans les habitats terrestres et les eaux marines ou saumâtres (Singh *et Shanna*, 2012).

2.1.1 *Oocystis polymorpha*

Les algues de la famille des *Oocystaceae* ont des formes plus ou moins sphériques, ellipsoïdal ou coniques, indiquées par la paroi (Hepperle *et al.*, 2000). De la famille des *Oocystaceae*, cette espèce d'algue verte se retrouve dans plusieurs plans d'eau, particulièrement dans le plancton de petits lacs et étangs (Stoyneva *et al.*, 2007). Il a été constaté que cette espèce d'algues vertes peut varier de diamètre entre 2 et 20 μm (Hepperle *et al.*, 2000). La figure 2.1 montre une image microscopique de cellules de *Oocystis polymorpha* qui a été utilisé dans cette présente étude. Par conséquent, ce rapport décrit les caractéristiques physiologiques et biochimiques de *Oocystis polymorpha*.



Figure 2.1 Image microscopique de cellules de *Oocystis polymorpha* (Hepperle *et al.*, 2000).

2.1.2 Applications des microalgues en biotechnologie environnementale

Les algues représentent un groupe essentiel d'organismes pour une utilisation biotechnologique, particulièrement dans la production de bioproduits à haute valeur ajoutée, dans les procédés et services, servant ainsi les industries alimentaires et médicinales. La cultivation des algues vertes dans des bioréacteurs offre la possibilité pour de nombreuses applications pratiques: Le traitement des eaux usées, la production de nourriture, la production de bioproduits pharmaceutiques, l'utilisation comme engrais en agriculture, le captage du CO₂ atmosphérique, la détection de polluants environnementaux, et la production de biodiesel (Barsanti *et* Gualtieri, 2006; Arora M., 2011). Comme ressources biologiques, certaines espèces de microalgues comme la spiruline sont massivement cultivées comme additifs alimentaires en raison de leur haute valeur nutritive (Arora *et al.*, 2013).

2.2 La photosynthèse

Les organismes photosynthétiques sont largement distribués sur la planète, et ils peuvent coloniser plusieurs écosystèmes terrestres et aquatiques. La photosynthèse est un processus essentiel et à la base de la croissance et du développement des organismes végétaux, en captant l'énergie lumineuse grâce aux pigments chlorophylliens (Hippler *et al.*, 2001). La figure 2.1 présente le processus global de la photosynthèse qui peut être abrégée selon l'équation suivante: $6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + \text{énergie lumineuse} \Rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2$. Les réactions photosynthétiques sont divisées en deux étapes, l'étape lumineuse et celle obscure. Durant l'étape lumineuse, les réactions photochimiques sont activées par l'énergie lumineuse dans les membranes de thylakoïdes: les pigments chlorophylliens absorbent les photons et transfèrent l'énergie d'excitation au centre réactionnel qui induit la réaction photochimique primaire et le transport des électrons photosynthétiques. Ces réactions vont permettre la synthèse de composés chimiques hautement énergétique, l'adénosine triphosphate (ATP) et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Ces molécules constituent une source d'énergie pour l'étape obscure durant laquelle le dioxyde de carbone est fixé dans le stroma du chloroplaste.

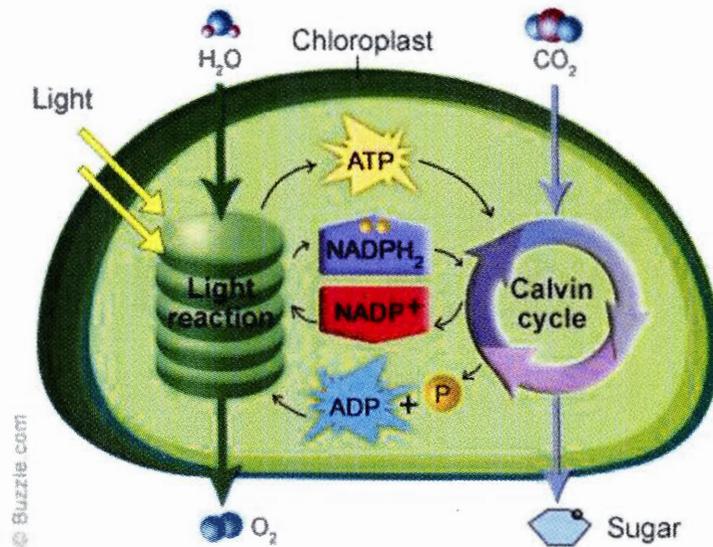


Figure 2.2 Le processus de la photosynthèse (Raghavendra, 1998)

2.2.1 Les pigments chlorophylliens

Bien qu'il existe un grand nombre de pigments photosynthétiques, seulement deux types de chlorophylles se retrouvent chez les plantes supérieures, les chlorophylles *a* et *b* (Scheer, 2004). La figure 2.2 montre la structure chimique de la molécule de chlorophylle ($C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$). Coordonné par quatre atomes d'azote, l'atome de Mg se trouve au centre du noyau porphine de la molécule de chlorophylle.

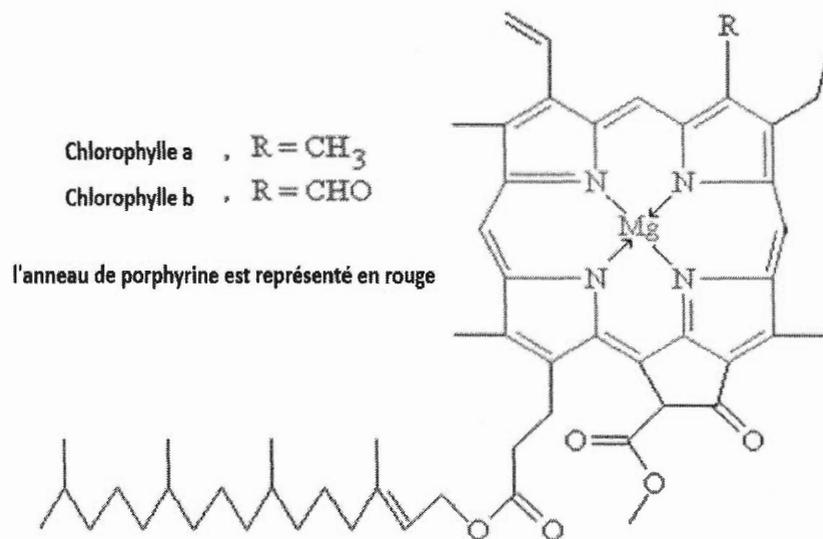


Figure 2.3 Structure des chlorophylles a et b
 (http://Commons.wikimedia.org/wiki/file:Chlorophyll_a_b).

La figure 2.3 illustre les spectres d'absorption des molécules de chlorophylles. Les chlorophylles absorbent principalement les régions bleue et rouge du spectre du visible, mais avec une différence dans les spectres d'absorption entre les chlorophylles *a* et *b*. La chlorophylle *a* possède des pics d'absorption maximum à 430 et 662 nm, tandis que la chlorophylle *b* a des pics d'absorption maximum à 455 et 644 nm (Blankenship, 2014). Par contre le spectre d'absorption des caroténoïdes est entre 400 et 500 nm, leur donnant leur couleur orange. Il existe deux groupes de caroténoïdes: Les carotènes (hydrocarbures cycliques) et les xanthophylles (hydrocarbures contenant de l'oxygène) (Lemoine *et* Schoefs, 2010). Les plus courants impliqués dans la photosynthèse sont le β -carotène, la zéaxanthine, la lutéine et la violaxanthine. Les

caroténoïdes sont des pigments complémentaires aux chlorophylles participant dans la collecte de l'énergie lumineuse, et elles participent aussi dans les mécanismes de photoprotection de la photosynthèse contre les espèces réactives de l'oxygène. En particulier, les caroténoïdes sont impliqués dans la régulation du transfert d'énergie en dissipant l'énergie excédentaire dans un processus appelé le cycle des xanthophylles (Blankenship, 2014).

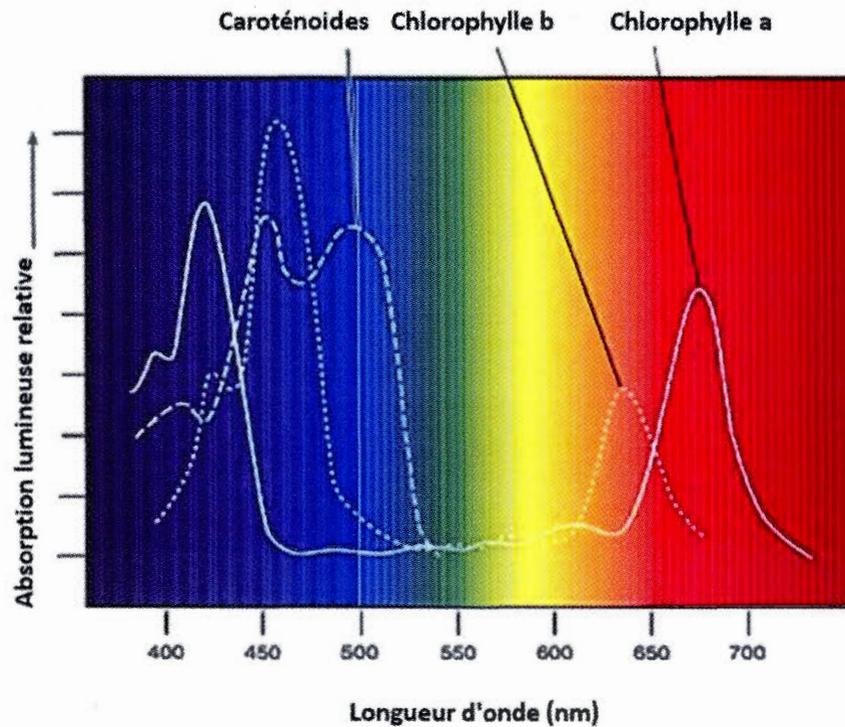


Figure 2.4 Les spectres d'absorption des chlorophylles *a*, *b* et des caroténoïdes (http://www.mhhe.com/biosci/genbio/raven6b/graphics/raven06b/other/raven06b_10.pdf).

2.2.2 Structure de l'appareil photosynthétique

2.2.2.1 Structure des chloroplastes

L'appareil photosynthétique se retrouve dans des chloroplastes des cellules végétales. La figure 2.4 montre la structure interne du chloroplaste. Cette organelle est composée d'une double membrane, d'un cytoplasme, et d'un système de membranes de thylakoïdes formant le granum relié aux lamelles du stroma. Un liquide aqueux alcalin, riche en protéines forme un environnement interne appelé le stroma. À l'intérieur du stroma, on retrouve des granules d'amidon et des plastoglobules qui sont des compartiments de lipoprotéines contenant des enzymes biosynthétiques, des caroténoïdes, des plastoquinones et du tocophérol (Austin *et al.*, 2006). De plus, le chloroplaste possède son propre système génétique permettant la synthèse de la plupart des protéines chloroplastiques (Martin *et Herrmann*, 1998; Moore *et al.*, 2010).

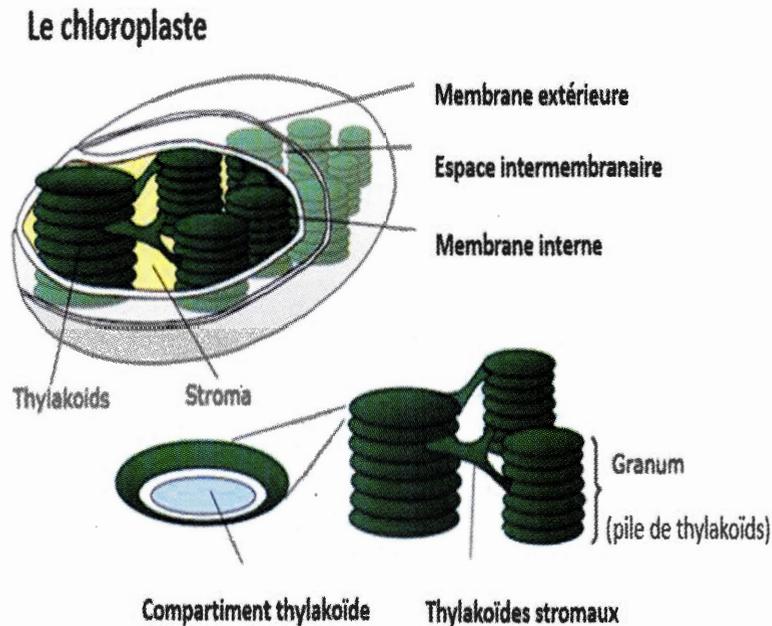


Figure 2.5 Structure du chloroplaste. "Chloroplaste mini," de Kelvin Ma (CC BY 3.0)

2.2.2.2 La membrane de thylakoïdes

La membrane thylakoïde contient tous les complexes protéiques participant dans les réactions photochimiques de la photosynthèse, et la figure 2.5 illustre l'organisation de l'appareil photosynthétique et son fonctionnement. Le photosystème II (PSII) se retrouve principalement dans les thylakoïdes du granum, alors que le photosystème I est présent dans les lamelles exposées au stroma. Des systèmes de pigments chlorophylliens forment deux types d'antennes collectrices de lumière, celles internes situées près du centre réactionnel des photosystèmes et celles périphériques se composant principalement de chlorophylles *a* et *b* (Jansson, 1994). Contrairement aux

autres complexes de protéines, le cytochrome b_6f (cyt b_6f) est distribué uniformément sur les membranes de thylakoïdes (Govindjee *et al.*, 2010).

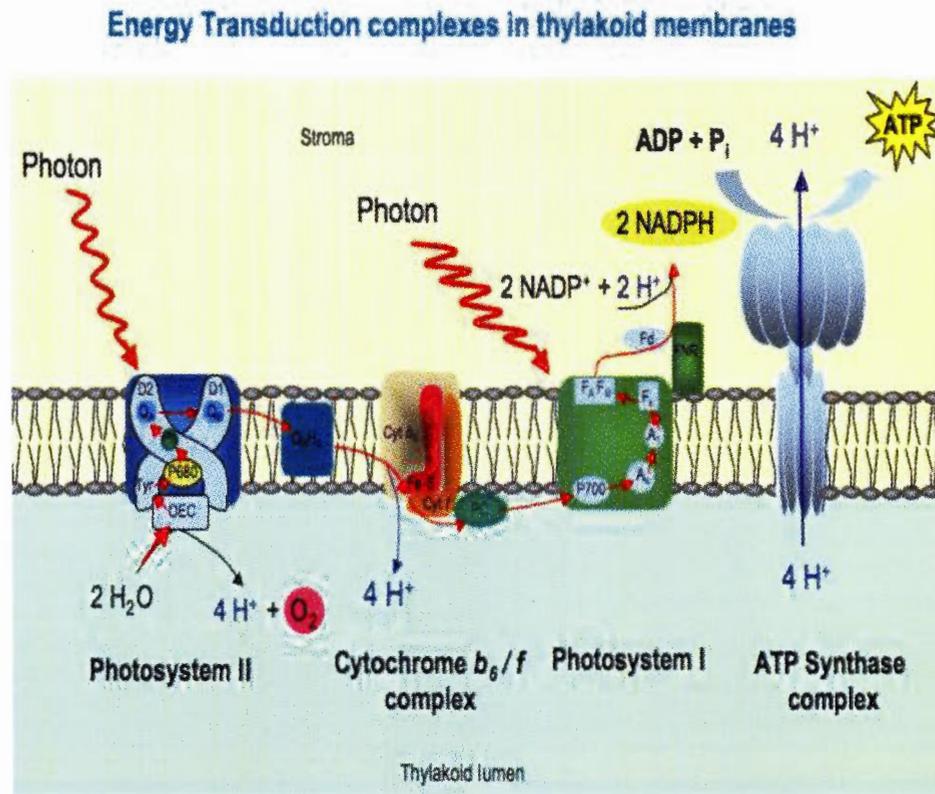


Figure 2.6 Les réactions photochimiques des photosystèmes II et I, et le transport des électrons dans la membrane de thylakoïdes. P680, le centre de réaction PSII; P700, le centre de réaction du PSI; Cyt, cytochrome; PC, plastocyanine; Fd, ferredoxine; b_6f , membrane intégrale dimérique; FNR, ferredoxine-NADP réductase. (Govindjee *et al.*, 2010).

2.2.3 Structure et fonction du photosystème II

Le photosystème II effectue les premières réactions photochimiques de la photosynthèse durant lesquelles les électrons sont transférés jusqu'au photosystème I (Lawlor, 2002; Poulson *et al.*, 1995; Kramer *et al.*, 2004). La figure 2.6 illustre l'organisation structurel et fonctionnel du photosystème II. Associé au cœur du photosystème II, de nombreux complexes de protéines (CP43 et CP47, CP29, CP26 et CP24) sont connectés à 40-50 molécules de chlorophylle et des dizaines de molécules de β -carotène (Bassi *et al.*, 1997). Le centre réactionnel du photosystème II est composé de deux protéines majeures, D1 et D2 (le poids moléculaire de 34k Da et de 32 kDa respectivement) (Heller *et al.*, 1998). Il y a aussi le P680, une paire spéciale de molécules de chlorophylle, qui est responsable de donner un électron au système de transport d'électrons transmembranaires (du thylakoïde). Les électrons sont transférés à la phéophytine, puis aux quinones A et B (Q_A et Q_B), puis à la plastoquinone (PQ) et au cytochrome b_6f , puis à la plastocyanine (PC), jusqu'au photosystème I (Rivas *et al.*, 2004; Baker *et al.*, 2008). Le complexe de dégagement d'oxygène, composé d'un tétramère de manganèse (Mn^{4+}), permet au centre réactionnel P680 de donner un électron, en effectuant la photolyse de l'eau et produisant de l'oxygène. Le bris de deux molécules d'eau est nécessaire pour fournir des électrons permettant de réduire le P680 (Diner *et Babcock*, 1996).

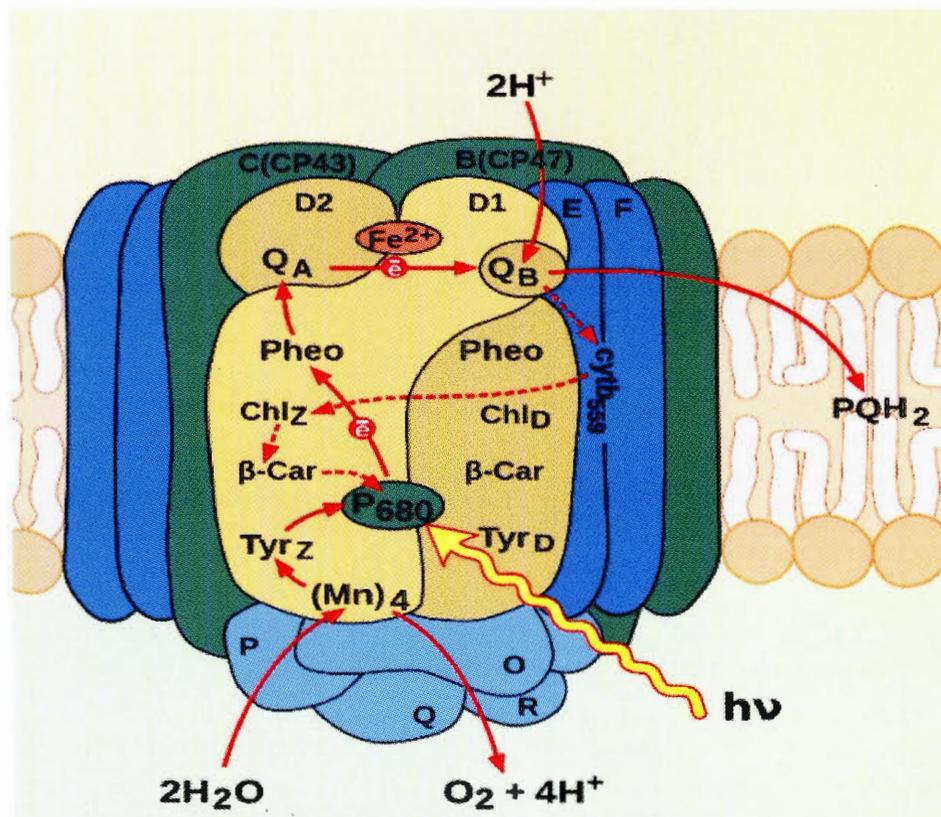


Figure 2.7 Représentation schématique des composantes du photosystème II. Les protéines D1 et D2 sont des protéines du centre réactionnel du photosystème II. Le photosystème II utilise l'énergie lumineuse pour arracher un électron de l'eau, ce qui entraîne la libération de l'oxygène et de protons. Le P680 est une paire spéciale de chlorophylles; La quinone Q_A (sur D2); La quinone Q_B (en D1); La plastoquinone (PQ); Les complexes CP43 et CP47; Le cytochrome b559 (Cyt b559) est une protéine dimérique impliquée dans la photoprotection (Ifuku *et al.*, 2011; Dau *et al.*, 2012).

2.2.4 La fluorescence chlorophyllienne

Les pigments chlorophylliens et les molécules de caroténoïdes forment les antennes collectrices de lumière qui sont associées aux photosystèmes II dans les membranes de thylakoïdes (Govindjee, 2004). Dans les antennes collectrices de lumière, l'énergie lumineuse absorbée par les pigments chlorophylliens peut être transférée au centre

réactionnel pour effectuer la réaction photochimique primaire, être dissipée sous forme de chaleur ou bien sous forme de fluorescence rouge (Strasser *et al.*, 2000, 2004). La figure 2.7 illustre les différents états d'excitation de la molécule de chlorophylle et les différentes voies de dissipation d'énergie dans les photosystèmes II.

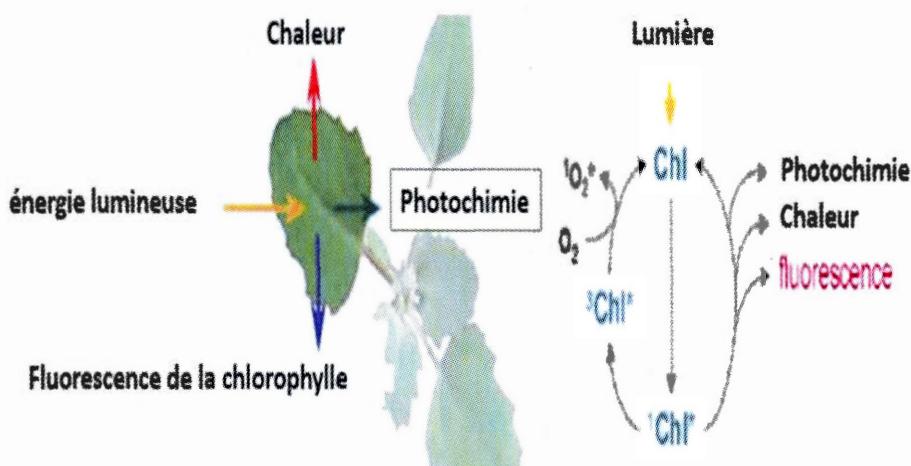


Figure 2.8 Les états d'excitation de la molécule de chlorophylle et les différentes voies de dissipation d'énergie du photosystème II (Niyogi *et al.*, 2002).

2.2.5 Émission de la fluorescence chlorophyllienne

Les réactions photochimiques du photosystème II sont bien connues: l'énergie d'excitation peut être utilisée pour la réaction photochimique primaire, être dissipée par les molécules de chlorophylles par l'émission de fluorescence et de chaleur (Lazar, 2006; Strasser *et al.*, 2004; Baker, 2008). Ainsi, l'émission de fluorescence de la chlorophylle peut être utilisé comme une méthode rapide, très sensible et non invasive (*in vivo*) pour la plante (Lazar, 2006; Govindjee *et al.*, 2010). L'induction de

la fluorescence rapide est moins d'une seconde, et l'intensité de la fluorescence passe d'un niveau initial (F_0) à un niveau d'intensité maximale (F_M) sous une lumière saturante. La Figure 2.8 présente le niveau minimal de fluorescence qui est nommé fluorescence basale (F_0), lorsque Q_A est oxydé. Lorsque le centre réactionnel est fermé, l'émission de fluorescence de la chlorophylle est maximale, qui est nommé le niveau de fluorescence maximal (F_M), quand Q_A est complètement réduit (Lazar, 1999; Govindjee *et al.*, 2004).

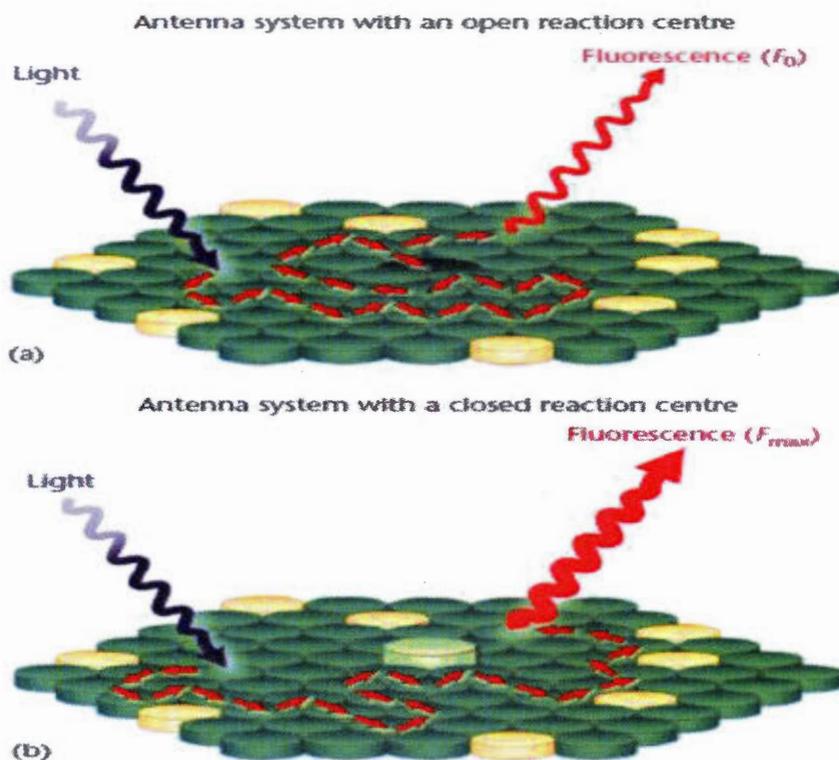


Figure 2.9 Représentation schématique de l'excitation du transfert d'énergie (petites flèches rouges) entre les molécules de chlorophylle dans le système des antennes collectrices de lumière. Les disques verts représentent les molécules de chlorophylles *a* et *b*, et les disques jaunes représentent les caroténoïdes; Le disque vert foncé représente un centre réactionnel ouvert, et le disque vert clair un centre réactionnel fermé. (a) Le centre réactionnel est ouvert et l'énergie est utilisée pour la séparation de charge, tandis que l'émission de fluorescence est minimale (F_0); (b) Le centre réactionnel est fermé et l'émission de fluorescence est maximale (F_M) (Govindjee *et al.* 2010).

2.2.6 La courbe OJIP

Lorsque la cinétique rapide de fluorescence de la chlorophylle est analysée sur une échelle de temps logarithmique, différentes transitions sont identifiées : O-J-I-P montrant les différents états d'oxydo-réduction des transporteurs des électrons du photosystème II (Popovic *et al.*, 2003; Lazar, 2006; Govindjee *et al.*, 2010). La Figure

2.9 présente la courbe OJIP avec trois phases distinctes: OJ, JI et IP. La transition JO représente la réduction de l'accepteur primaire d'électrons, la quinone Q_A ; La transition JI représente la réduction de l'accepteur secondaire d'électrons, Q_B ; La transition IP indique une réduction complète de Q_B , et le niveau de fluorescence maximum est atteint lorsque le pool de plastoquinones (PQ) est complètement réduit. À partir de cette théorie, plusieurs études écotoxicologiques ont démontrées qu'une altération du transport d'électrons par des inhibiteurs chimiques modifiait les niveaux de fluorescence aux différentes transitions (Popovic *et al.*, 2003). Par conséquent, la cinétique rapide de fluorescence de la chlorophylle permet de déterminer plusieurs paramètres indiquant les aspects structurels et fonctionnels du photosystème II (Strasser *et al.*, 2000).

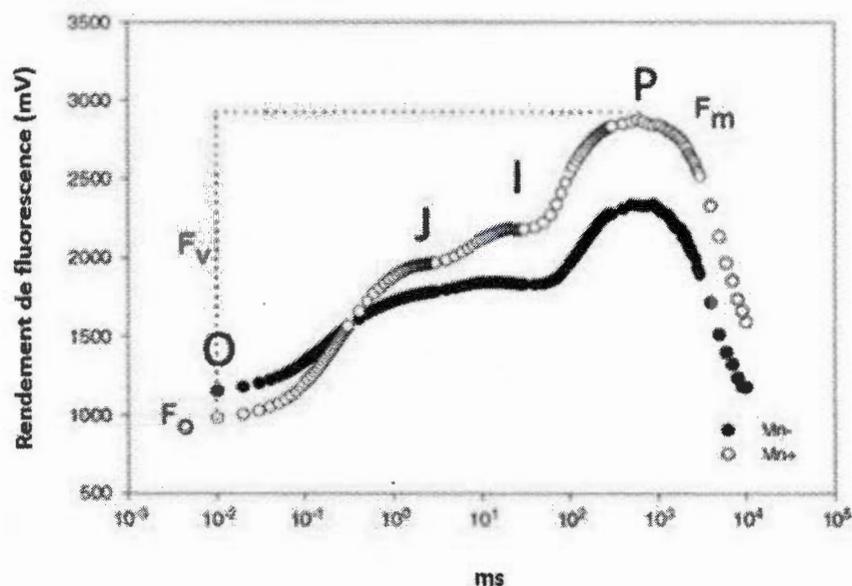


Figure 2.10 Courbe d'induction de la fluorescence chlorophyllienne représentant les transitions OJIP mesuré sur une échelle de temps logarithmique (Strasser et al, 1995).

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Préparation du matériel

Les récipients utilisés dans cette étude ont été faites de polycarbonate, de polypropylène ou de verre. Toute la verrerie a été trempée pendant au moins 24 h dans une solution d'acide nitrique à 10 % (Sigma-Aldrich) et rincer trois fois avec de l'eau Milli-Q obtenu à partir d'un système de purification de Millipore ($R \geq 18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$, $\text{TOC} \leq 2 \text{ mg/L}$, filtre $0.22 \mu\text{m}$). Tout le matériel a été stérilisé par autoclave avant leur utilisation pour les cultures d'algues ou les expériences.

3.2 Choix des espèces d'algues

Dans cette étude, tous les travaux expérimentaux ont été réalisées à partir des cultures de l'algue verte unicellulaire *Oocystis polymorpha*. Cette souche d'algue verte a été fourni par l'UTEX Culture Collection of Algae (UTEX no 1645, University of Texas at Austin). L'algue *O. polymorpha* a été choisi pour cette étude parce que cette espèce d'algue peut être facilement et rapidement cultivée dans des conditions contrôlées de laboratoire. De plus, cette espèce d'algue verte a été récemment découverte et utilisée pour des études en physiologie végétale et pourrait représenter un bon modèle de laboratoire pour les essais expérimentaux de toxicité des métaux traces (Stoyneva *et al.*, 2007).

3.3 Cultivation des cellules algales

Les cultures mère ont été maintenues sous condition stérile sur un milieu nutritif solide d'agar, et elles pouvaient être conservées pendant un maximum de 4-5 mois avant d'être transférées sur un nouveau milieu nutritif. Pour obtenir ce milieu nutritif, la solution BBM (Bold Basal Medium) a été préparée en laboratoire à partir de sels comme support de croissance pour les cellules algales. Toutes les manipulations ont été effectuées sous une hotte à flux biologique pour conserver l'état stérile, près d'une flamme de bec bunsen. Les conditions contrôlées de laboratoire étaient les suivantes: une température de 21 ± 1 °C, et une intensité lumineuse de 80 ± 10 μmol de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (tubes fluorescents blancs, Sylvania GroLux F36W).

À partir d'inoculum provenant des cultures stocks, des cultures mères d'environ 500 mL de BBM ont été préparées dans des Erlenmeyers de verre de format de 2 L. Ce ratio de volume air/liquide offre une bonne surface de contact permettant un échange gazeux pour la diffusion du CO_2 dans le milieu de culture liquide. Toutes les cultures ont été placées sur un agitateur fonctionnant à la vitesse de 80-90 tour/min. Les conditions de cultures étaient les mêmes que celles des cultures stocks.

3.3.1 Le milieu BBM

Le milieu nutritif BBM a été préparé en laboratoire selon la formulation indiquée dans le tableau 3.1. Le pH est ajusté avec une solution de NaOH à 0,5 M. Avant l'inoculation des algues, tous les milieux de culture ont été stérilisés par autoclave durant 1 heure à 120 °C. En général, ce milieu est riche en macro et micronutriments essentiels pour la croissance des cultures de microalgues, et il est donc favorable à la division cellulaire et au développement des cellules d'*O. polymorpha*.

Tableau 3.1 Composition du milieu BBM (Bold, 1949; Bischoff et Bold, 1963).

Composant	Solution de stock (g.l ⁻¹ dH ₂ O)	Quantité Utilisée à 1 litre
NaNO ₃	25,00	10 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,50	10 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,50	10 ml
K ₂ HPO ₄	7,50	10 ml
KH ₂ PO ₄	17,50	10 ml
NaCl	2,50	10 ml
Solution EDTA	Voir la recette suivante	1 ml
Solution de fer acidifié	Voir la recette suivante	1 ml
H ₃ BO ₃	11,42 g	1 ml
traces de métaux en solution	Voir la recette suivante	1 ml

Solution EDTA

Composant	Quantité Utilisée (à 1 litre)
EDTA	50,00 g
KOH	31,00 g

Solution de fer acidifié

Composant	Quantité Utilisée (à 100 ml)
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,498 g
H ₂ SO ₄ (96%)	0,1 ml

traces de métaux en solution

Composant	Quantité Utilisée (à 1 litre)
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,82 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,44 g
MoO_3	0,71 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1,57 g
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,49 g

3.3.2 Préparation des conditions expérimentales

Pour préparer les expériences, des échantillons d'algues ont été prélevés des cultures algales mères lorsqu'elles étaient dans la phase exponentielle de croissance. Sous une hotte biologique, un échantillon d'algues a été inoculé dans 25 mL de BBM (Erlenmeyers de 50 mL) dans le but d'obtenir une densité initiale de 10^6 cellules/mL. Pour les différentes conditions expérimentales, les cultures d'algues ont été exposées en trois exemplaires à des concentrations de 50 et 150 mM de $CuCl_2$ et de $CdCl_2$ durant 24, 48 et 72 heures. Ces solutions ont été préparées à partir d'une solution stock de 1 M de $CuCl_2$ et de $CdCl_2$. Les solutions ont été préparées pendant au moins 24 h avant le traitement, afin que l'équilibre chimique ait été obtenu. Au cours du traitement, les Erlenmeyers ont été agitées à 90 tour/min.

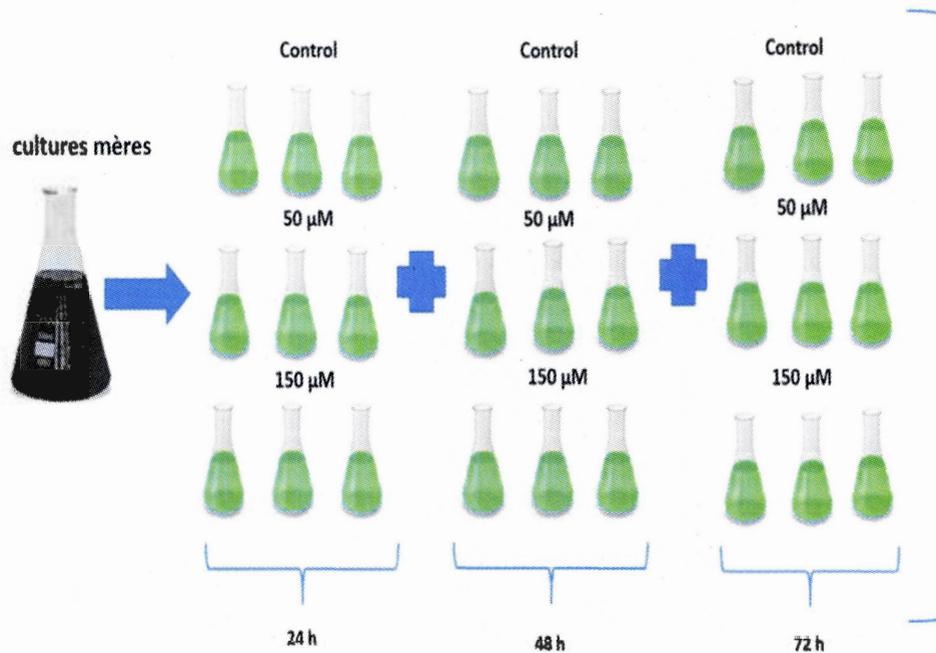


Figure 3.1 Préparation des différentes conditions de traitement à partir de la culture mère.

3.4 Analyse des données et statistiques

Chaque contrôle et chaque condition de traitement ont été effectués en 3 répétitions pour toutes les mesures de bioanalytique. Les moyennes et les écarts-types ont été estimés pour chaque traitement. Les différences significatives entre les cultures témoins et traitées ont été déterminées à l'aide d'une ANOVA à une voie suivie d'un test de Dunnett, et des valeurs de p supérieures à 0,05 ont été considérées comme significatives ($p < 0,05$).

3.5 Détermination de la densité cellulaire

La densité des cellules algales a été déterminée à l'aide d'un compteur de cellules Countess® II FL automatisé (Figure 3.2). Le principe de ce compteur de cellules est relativement simple, il permet à partir d'une prise d'image de déterminer la densité cellulaire ayant une distribution de tailles entre 0,4 et 1200 µm. Dans la lame de comptage, 10 µl de bleu de trypan a été ajouté à 10 µl de suspension d'algues (volume final de 20 µl). Pour chacune des conditions expérimentales, les mesures de densité cellulaire ont été faites en triplicata.



Figure 3.2 Le compteur automatisé de cellules Countess® II FL avec ses cubes lumineux. (Thermo Fisher scientifique)

Une courbe d'étalonnage a été déterminée pour suivre l'évolution de la densité des cellules en utilisant la variation de l'absorbance de la suspension des cellules algales. En triplicata, l'absorbance à 750 nm et la densité cellulaire ont été mesurées pendant 72 h pour des cultures de densité initiale de 270×10^3 , 850×10^3 et 1×10^6 cellules/ml. La Figure 3.3 indique la corrélation entre la variation de la densité cellulaire et le changement de l'absorbance à 750 nm. Un spectrophotomètre UV-Visible Perkin Elmer Lambda 40 a été utilisé pour mesurer l'absorbance. À 750 nm, il n'y a pas de pics d'absorption des pigments chlorophylliens (voir Fig. 2.4). Les résultats

indiquent une corrélation linéaire entre la densité cellulaire et de l'absorbance à 750 nm.

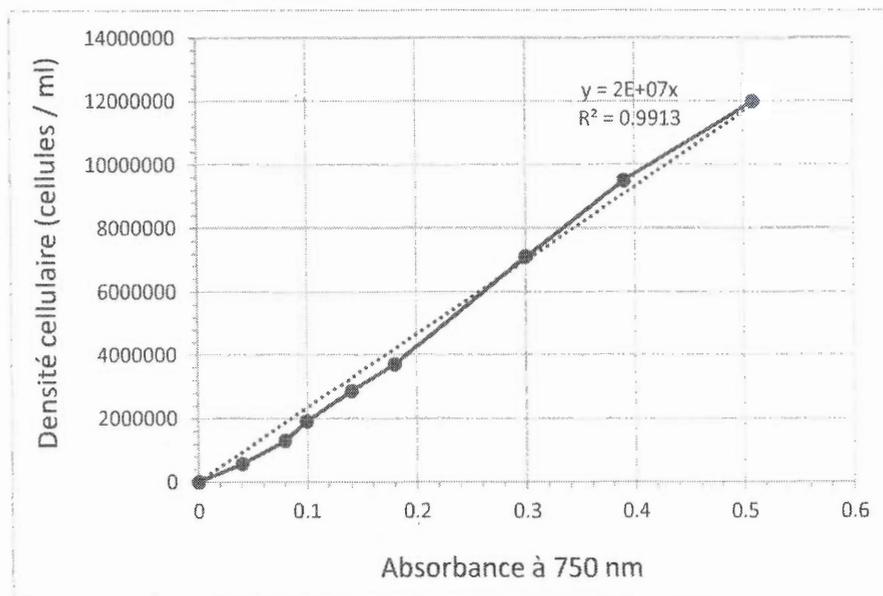


Figure 3.3 La courbe d'étalonnage de la croissance des cultures d'algues pendant 72h.

3.6 La bioaccumulation du cuivre et du cadmium

3.6.1 Le principe du ICP-OES

Les concentrations de Cd^{2+} et de Cu^{2+} dans les échantillons d'algues ont été déterminées à l'aide d'un Perkin Elmer Optima 2100 DV ICP-OES. La spectrométrie d'émission optique (ICP-OES) de plasma à couplage inductif est un instrument analytique important pour déterminer les éléments traces dans des solutions aqueuses avec des limites de détection faible (Akin *et* Nula, 2014). Les échantillons sont introduits sous forme liquide dans un nébuliseur de tube concentrique (Figure 3.4). L'aérosol d'échantillon est aspiré dans le tube capillaire par un gaz de flux d'argon de

haute pression qui coule sur l'extrémité du tube. La torche utilisée est un plasma à couplage inductif qui excite les atomes conduisant à une émission de photons et à l'ionisation (Figure 3.5). Les échantillons sont donc convertis en atomes gazeux avec un état excité pour les analyses utilisant un détecteur avec un photomultiplicateur (Figure 3.6) (Sbihi *et al.*, 2012; Benavente *et al.*, 2016).

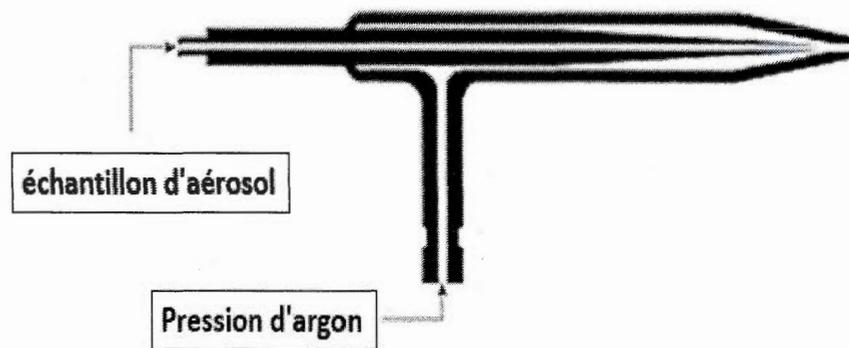


Figure 3.4 Nébuliseur de tube concentrique.

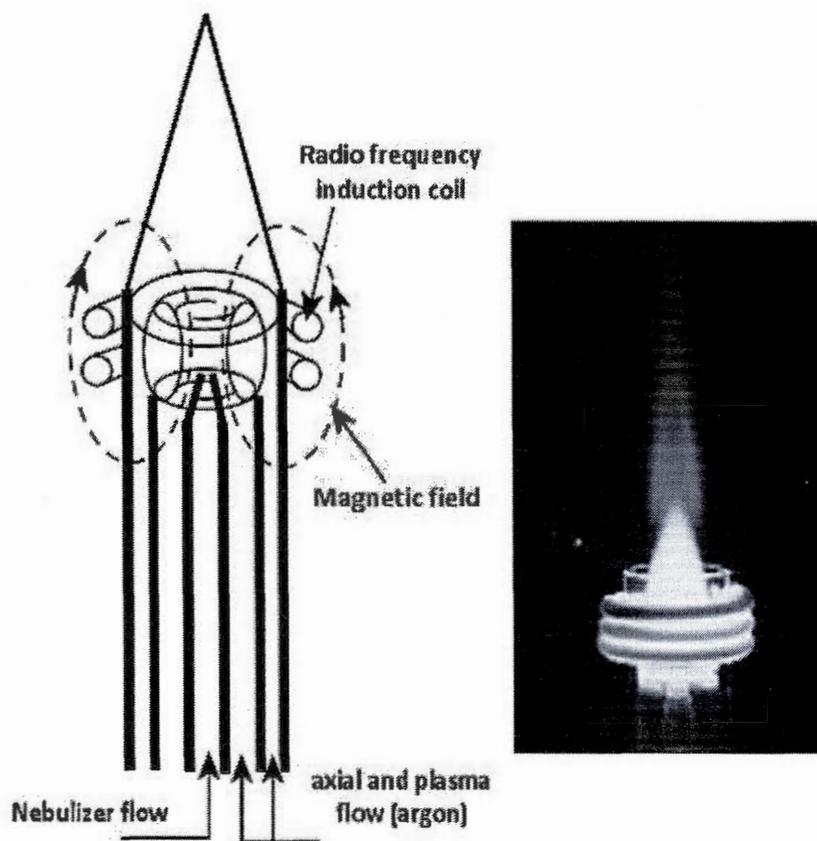


Figure 3.5 Plasma à couplage inductif.

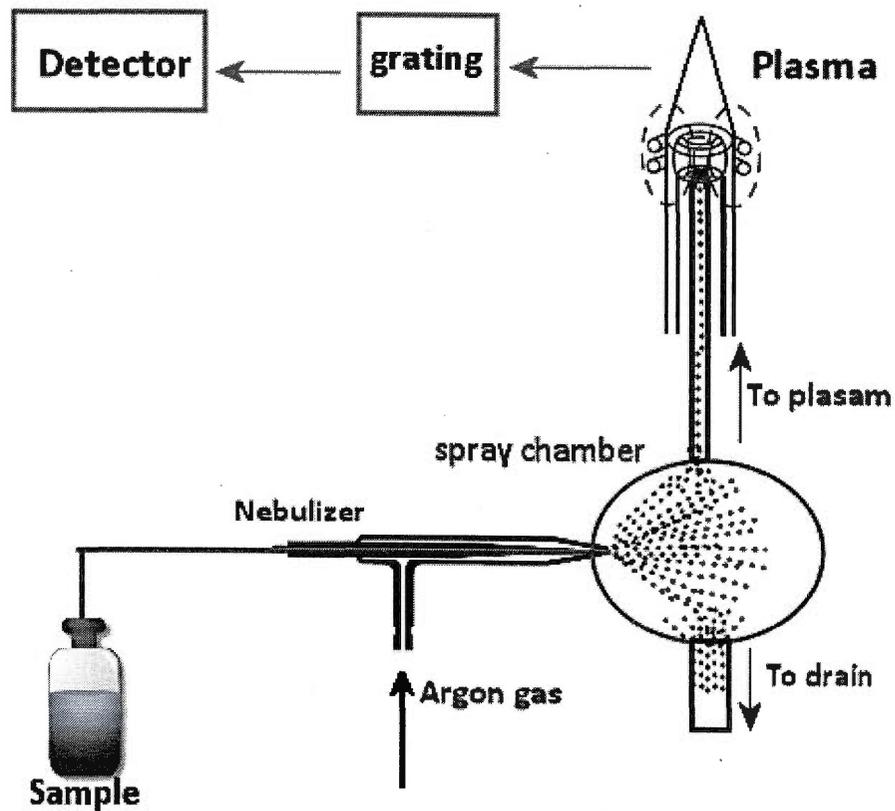


Figure 3.6 Diagramme montrant l'introduction de l'échantillon dans l'ICP-OES (<http://www.chemiasoft.com>).

3.6.2 Estimation du cuivre et du cadmium dans la biomasse algale

La biomasse algale a été recueillie sur un papier filtre de nitrate de cellulose par filtration (Millipore 0,45 microns). Ensuite, le filtre a été rincé une fois avec 5 ml de solution d'EDTA à 0,001 M (sel d'éthylène diamine tétra-acétique disodique dihydraté, Sigma-Aldrich) pour éliminer les métaux adsorbés sur les parois cellulaires des algues. Après la filtration, les filtres ont été séchés au four à 80°C pendant 24 heures. Par la

suite, chaque filtre est placé dans un tube en Pyrex de 7 ml pour la digestion. Ensuite, il a été ajouté 1 ml de 70 % HNO_3 avec 125 μl de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour digérer complètement la biomasse. La digestion a été réalisée sur une période de 12 heures à 120°C dans un bain de sable. Après la digestion, 1 mL d'acide nitrique et 8 mL d'eau ultrapure a été ajouté à la solution pour un volume final de 10 ml. La figure 3.7 illustre les différentes étapes de cette méthodologie.

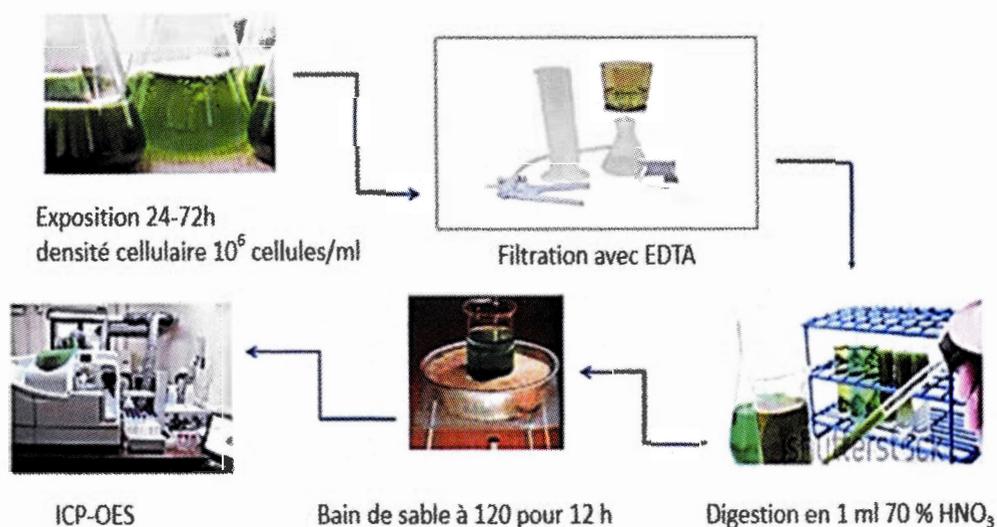


Figure 3.7 Les étapes dans la détection de la bioaccumulation du Cu^{2+} et du Cd^{2+} dans la biomasse algale.

3.6.3 Préparation de la solution d'étalonnage standard

Selon les figures 3.8 et 3.9, une courbe d'étalonnage a été utilisée pour déterminer la concentration inconnue de cuivre et de cadmium dans la solution digérée à

l'acide. L'appareil a été étalonné à l'aide de plusieurs solutions de concentration connue de CuCl_2 et de CdCl_2 . Ainsi, la concentration inconnue de cuivre et de cadmium dans chacun de nos échantillons a été estimée à partir de la courbe d'étalonnage. Dans cette étude, six solutions d'étalonnage standard ont été utilisées : 0,01, 0,1, 1, 3, 5, 10 ppm. Toutes les solutions ont été conservées à température ambiante. Le blanc est représentant de la matrice de l'échantillon, et il contient tous les réactifs utilisés dans la préparation de l'échantillon. Les Figures 2.5 et 2.6 montrent respectivement pour le Cd^{+2} et le Cu^{+2} la relation entre la variation de l'intensité de l'absorbance (Abs) en fonction des différentes concentrations des solutions étalons.

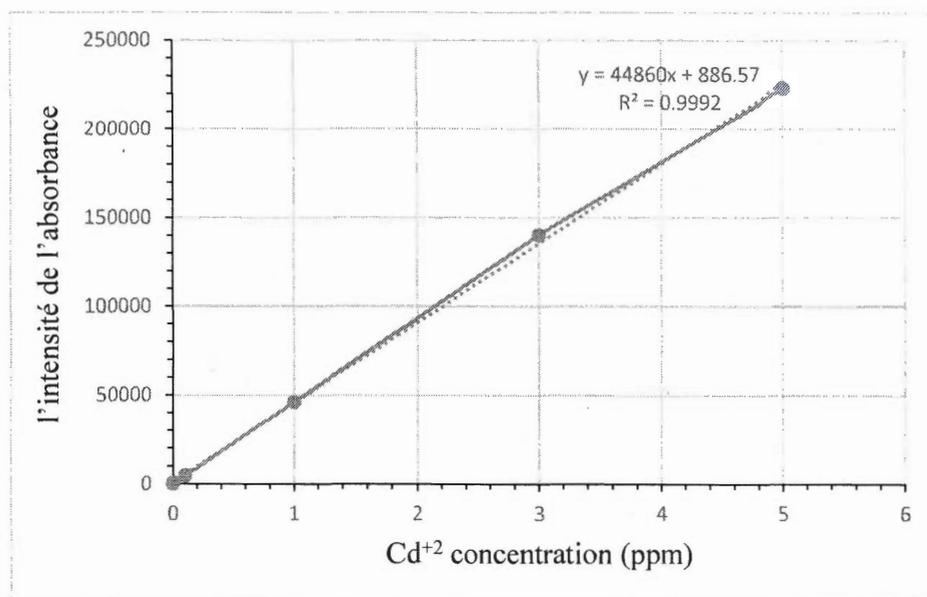


Figure 3.8 Courbe standard du Cd^{+2} déterminée par ICP.

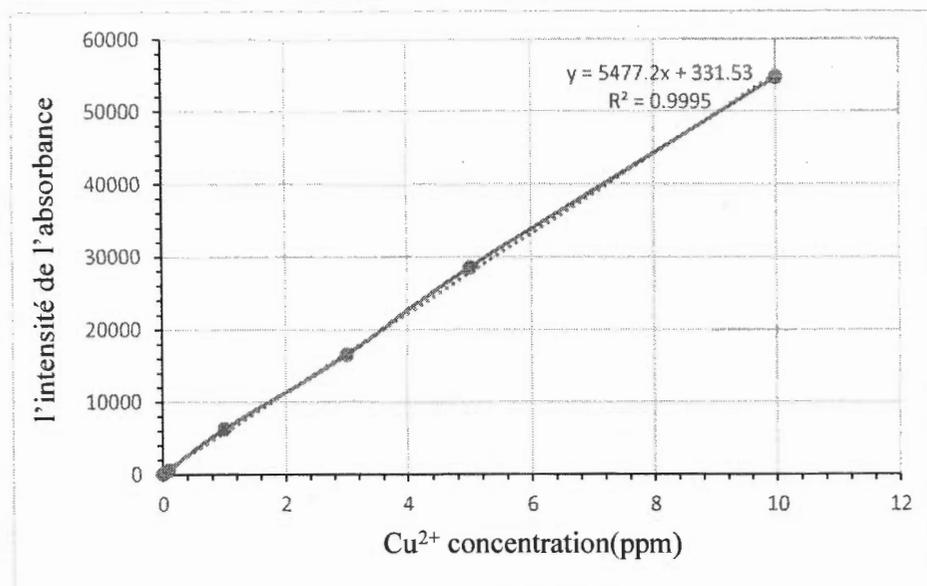


Figure 3.9 Courbe standard du Cu^{2+} déterminée par ICP.

3.7 Mesure de la fluorescence de la chlorophylle

3.7.1 Le fluorimètre

Le fluorimètre Handy-PEA (Plant Efficiency Analyseur, Hansatech Ltd, Norfolk, Angleterre) a été utilisé pour mesurer l'émission de la fluorescence chlorophyllienne (figure 3.10). Trois diodes électroluminescentes (LEDs) fournissent une luminosité saturante de haute intensité, environ de $3000 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, avec un pic à 650 nm (spectre d'une demi-largeur de 22 nm). Une impulsion lumineuse de 1 sec permet de mesurer une cinétique d'induction rapide de la fluorescence chlorophyllienne (Strasser *et al.*, 2004).



Figure 3.10 Le fluorimètre Handy-PEA (<http://hansatech-instruments.com>).

L'analyse des données de fluorescence de la chlorophylle a été effectuée en utilisant le logiciel scientifique Biolyzer. C'est un logiciel qui permet de faire une analyse de la courbe de fluorescence (Figure 3.10) et de calculer les paramètres du JIP-test. Ainsi, les paramètres de fluorescence permettent de mesurer les différentes réactions photochimiques et biophysiques d'un système photosynthétique, conduisant l'évaluation de l'état physiologique de l'organisme (Strasser, 1992) comme c'est indiqué dans le tableau 3.2.

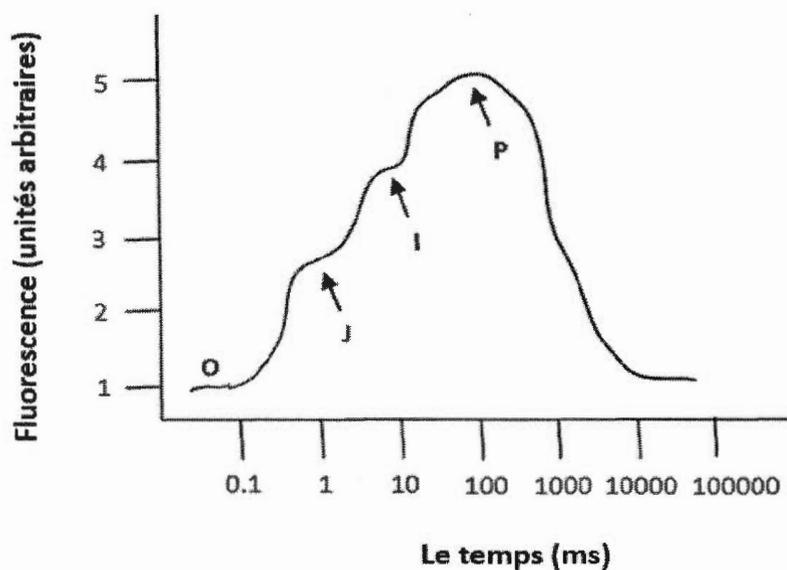


Figure 3.11 Cinétique rapide de fluorescence mesuré avec le PEA (analyseur d'efficacité des plantes) (Strasser *et al.*, 2000).

Pour obtenir des mesures reproductibles de fluorescence, un volume d'échantillon d'algue contenant 15 μg de Chl *a* était déposé sur un préfiltre de fibre de verre (Millipore #AP20 00 013) en utilisant une filtration manuelle à basse pression afin d'éviter un effet de stress physiologique sur les cellules.

Tableau 3.2 Les équations et les définitions des paramètres calculés à partir de la cinétique rapide de fluorescence (Strasser *et al.*, 1995; 2004).

paramètres	Définitions	Équations
O	Intensité de fluorescence à 20 μ s	F_0
J	Intensité de fluorescence à 2 ms	F_{2ms}
P	Intensité maximale de fluorescence	F_M
F_V	Fluorescence variable maximale	$F_V = F_M - F_0$
F_V / F_M	Rendement quantique maximal de la fluorescence	$(F_M - F_0) / F_M$
M_0	valeur approximative de la pente initiale de la courbe de fluorescence variable Chl VJ pour F_0	$[4 \times (F_{300\mu s} - F_{20\mu s}) / (F_M - F_{20\mu s})]$
V_J	Fluorescence variable Relative à la transition J	$(F_{2ms} - F_0) / (F_M - F_0)$
ABS/RC	Taille des antennes du PSII par centre réactionnel	$(M_0 / V_J) / (F_V / F_M)$
P.I.	Indice de performance de l'activité du PSII	$[1 - (F_0 - F_M) / (M_0 / V_J)] \times [(F_M - F_0) / F_0] \times [(1 - V_J) / V_J]$

3.7.2 Dosage de la chlorophylle totale et des caroténoïdes

La figure 3.12 montre la méthodologie d'extraction et de dosage de la chlorophylle totale et des caroténoïdes: 1 mL d'échantillon d'algue est centrifugé à 15000 g pendant 5 min, puis le surnageant est enlevé. Le culot est resuspendu dans 1 ml de méthanol 100 %. Les tubes sont mis dans un bain d'eau à 65 °C pendant 10 min. Les tubes sont ensuite agités pendant 20 secondes à l'aide d'un vortex, puis ils sont gardés dans l'obscurité pendant 20 min. Avant les mesures analytiques, les tubes sont centrifugés pendant 5 min, et le surnageant est prélevé pour le dosage de la chlorophylle totale et des caroténoïdes. L'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis Perkin Elmer Lambda 40, l'absorbance est mesurée à 470, 652.4, 665.2 et 750 nm. La quantité de chlorophylle totale et des caroténoïdes est déterminée selon les équations suivantes (Lichtenthaler, 1987):

$$(1) \quad Y(\text{mg/mL}) = (24,93 (A_{652.4} - A_{750}) + 1,44 (A_{665.2} - A_{750}))$$

$$(2) \quad C_a = 16,72 \times A_{665.2} - 9,16 \times A_{652.4}$$

$$(3) \quad C_b = 34,09 \times A_{652.4} - 15,28 \times A_{665.2}$$

$$(4) \quad \text{Caroténoïdes } C_{x+c} = (1000 \times A_{470} - 1,63 C_a - 104,96 C_b) / 221$$

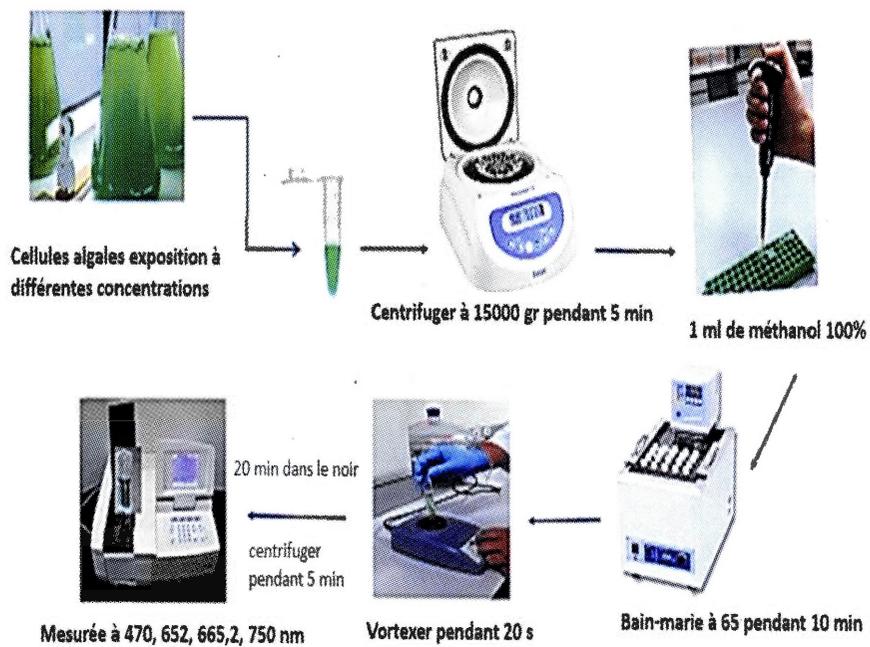


Figure 3.12 Méthodologie d'extraction et de dosage de la chlorophylle totale et des caroténoïdes.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Effets inhibiteurs de CdCl₂ et CuCl₂ sur la croissance de *Oocystis polymorpha*

4.1.1 Inhibition de la croissance de la densité cellulaire

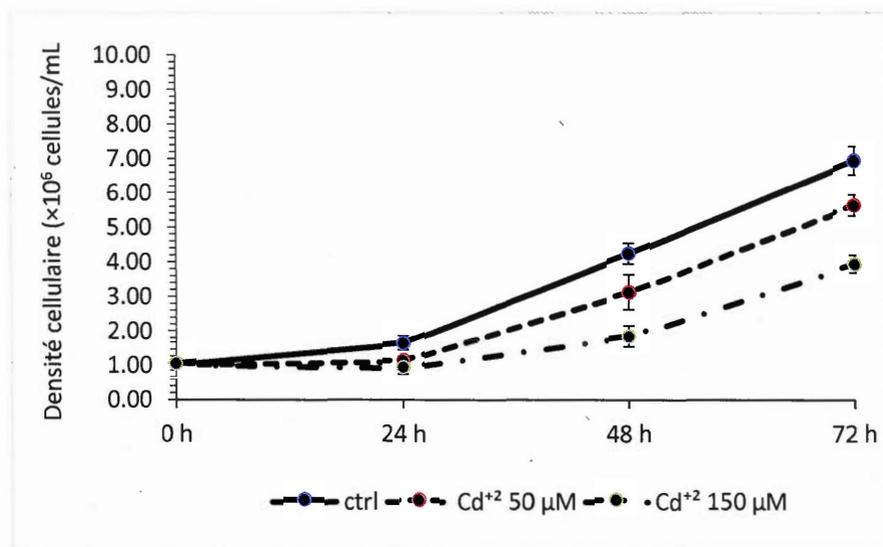
Un des objectifs de cette étude était de déterminer l'effet de diverses concentrations de CdCl₂ et CuCl₂ sur la croissance des cellules de l'algue *O. polymorpha* pendant 72 heures d'exposition, en mesurant les changements de la densité cellulaire. Il est bien connu que les algues vertes unicellulaires sont des producteurs primaires à la base de la chaîne alimentaire des écosystèmes aquatiques. De plus, les cellules algales peuvent facilement absorber et bioaccumuler des métaux traces tels que le Cd⁺² et Cu⁺². Dans ce contexte, une étude écotoxicologique a utilisé l'inhibition de la division cellulaire comme biomarqueur fiable de l'action toxique des métaux bioaccumulés sur l'état du métabolisme ou de la physiologie des cellules algales (Toress *et al.*, 1997). Par conséquent, il était important d'étudier l'effet des Cd⁺² et Cu⁺² sur la division cellulaire afin de déterminer la marge de tolérance de l'algue *O. polymorpha* à l'exposition de ces métaux. L'effet de différentes concentrations (50 et 150 µM) de CdCl₂ ou de CuCl₂ montre une diminution significative de la densité cellulaire de *O. polymorpha* en fonction de l'augmentation des concentrations en métaux (Figure 4.1). La courbe de croissance de *O. polymorpha* en l'absence de CdCl₂ et CuCl₂ représente le témoin. Les courbes de croissance des algues témoins étaient plus élevées par rapport aux courbes de croissance des concentrations testées pour les deux métaux. Pour les cellules algales traitées à 50 et 150 µM de CdCl₂ ou de CuCl₂, une diminution de 35-44 % par rapport au témoin a été observée après 24 h d'exposition. En revanche, il n'y a pas de différence significative après 24 h d'exposition entre les concentrations de 50 et 150 µM pour le

CdCl₂ ou CuCl₂. Dans ces conditions de traitement, la couleur des cellules était verte claire à verte foncée pour le témoin. Pour 150 µM de CdCl₂ ou de CuCl₂, un effet inhibiteur de 56-58 % a été remarqué sur le changement de la densité cellulaire après 48 h d'exposition par rapport au témoin. Les cellules d'algues traitées pendant 72 h à 50 et 150 µM de CdCl₂ ou de CuCl₂ avaient une baisse significative de la division cellulaire par rapport au témoin.

L'effet toxique du CdCl₂ et CuCl₂ sur la division cellulaire a été précédemment montré pour différentes espèces d'algues. Une étude antérieure a montré que la croissance de *C. reinhardtii* a été significativement inhibée lorsque les cellules étaient exposées pendant 7 jours à différentes concentrations (50-250 µM) de cuivre (II) (Yongguang *et al.*, 2016). Dans cette étude, ils ont montré que la densité cellulaire au cinquième jour est inhibée (60 %) sous une exposition à 150 µM en comparaison avec le témoin et le traitement de 50 µM de cuivre au troisième jour. En outre, la croissance des cellules d'algues a été diminuée fortement (90 %) sous une exposition à 250 µM en comparaison avec le témoin lors de la cinquième journée. Dans une autre étude, l'inhibition de la croissance de *Chlamydomonas* a été étudiée à différentes concentrations de Cd⁺² (100, 200, 400 et 800 µM) durant 12 jours (Angeles et Ricardo, 2005). Selon leurs résultats, l'inhibition de la croissance a été montrée de façon dépendante au temps et à la concentration. Selon ces données, une forte diminution de la croissance a été observée à des concentrations de 200 µM de Cd⁺². À une concentration plus élevée, la croissance des cellules a été complètement inhibée en raison de la perte de leurs flagelles dès le premier jour. Donc, selon nos résultats et ceux de travaux antérieurs, il semble qu'il y a une différence de sensibilité au Cd⁺² et Cu⁺² selon les espèces d'algues et les conditions expérimentales. Dans une autre étude, les effets du Cd⁺² ont également été observés lorsque des cellules d'algues *C. reinhardtii* ont été exposées à des concentrations de 5 et 100 µM de Cd⁺² durant 48h et 72 h d'exposition (An Aude *et al.*, 2009). Après 72 h d'exposition, les résultats de

croissance montrent que les algues exposées à 100 μM de Cd^{+2} avaient une plus faible densité cellulaire par rapport au témoin, à cause de l'effet inhibiteur sur les cellules.

(A)



(B)

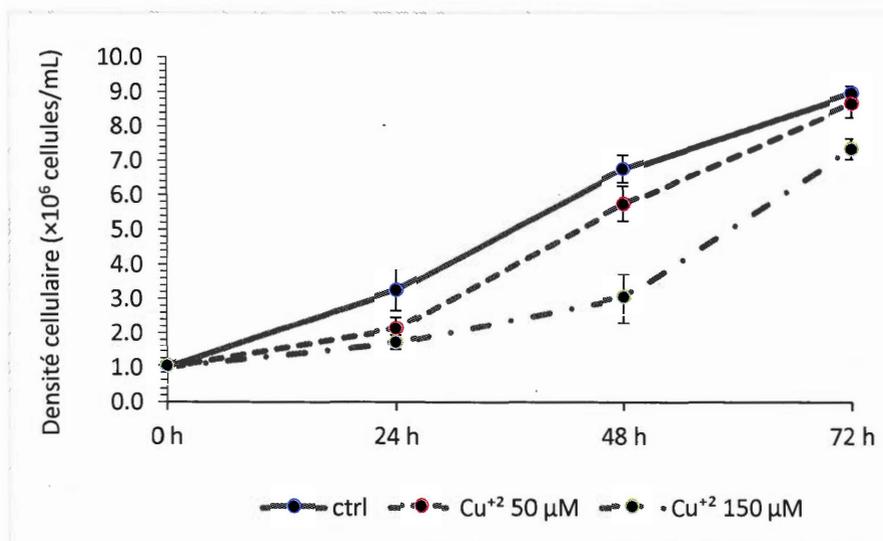


Figure 4.1 Changement de la densité cellulaire de *O. polymorpha* traité à différents concentrations (50 et 150 μM) de CdCl_2 (A) et de CuCl_2 (B) pendant 72 h d'exposition. Pour l'analyse statistique, voir la section de matériel et méthodes.

4.1.2 Changement du taux de croissance

Lorsque l'algue *O. polymorpha* a été exposé au CdCl₂ et CuCl₂ (50-150 µM) pendant 72 h, la densité des cellules algales (cellules ml⁻¹) pour chaque concentration d'essai a été déterminée chaque jour. Comme illustré à la figure 4.2 (A), nous avons observé une tendance à la baisse du taux de croissance par rapport au témoin. En outre, sous une exposition de 150 µM de Cd⁺², il y avait une forte diminution du taux de croissance basée sur la densité cellulaire à 72 h. À la figure 4.2 (B), le taux de croissance (µ) a été calculé pour le CuCl₂, et il n'y avait aucun effet significatif sur le taux de croissance de *O. polymorpha* sous une exposition de 50 µM de CuCl₂ en comparaison avec le témoin. Toutefois, pour 150 µM de CuCl₂, il y avait une légère diminution après 72 h d'exposition.

Bien que le Cu⁺² et Cd⁺² sont des métaux essentiels pour les organismes vivants, en particulier pour les activités enzymatiques. Cependant, ils peuvent être toxiques à des concentrations élevées, en causant la mort cellulaire. D'après nos résultats, nous pouvons affirmer que le taux de croissance était plus inhibé sous l'effet du Cd⁺² en comparaison avec l'effet du Cu⁺², démontrant une plus forte toxicité du Cd⁺². Dans une étude précédente, le taux de croissance (µ) de la plante *G. domingensis* exposé à différentes concentrations (100 à 300 µM) de Cd⁺² a été suivie au cours d'une période de 16 jours (Rodrigo *et al.*, 2013). Leurs résultats ont montré que la croissance des cellules dépend de la dose et du temps d'exposition. Une augmentation de la concentration de 100 à 300 µM a causé une diminution significative de 2-8 % du taux de croissance par jour. En outre, pendant 16 jours, l'exposition à des concentrations élevées de Cd⁺² (200 et 300 µM) a provoqué la mort des cellules traitées.

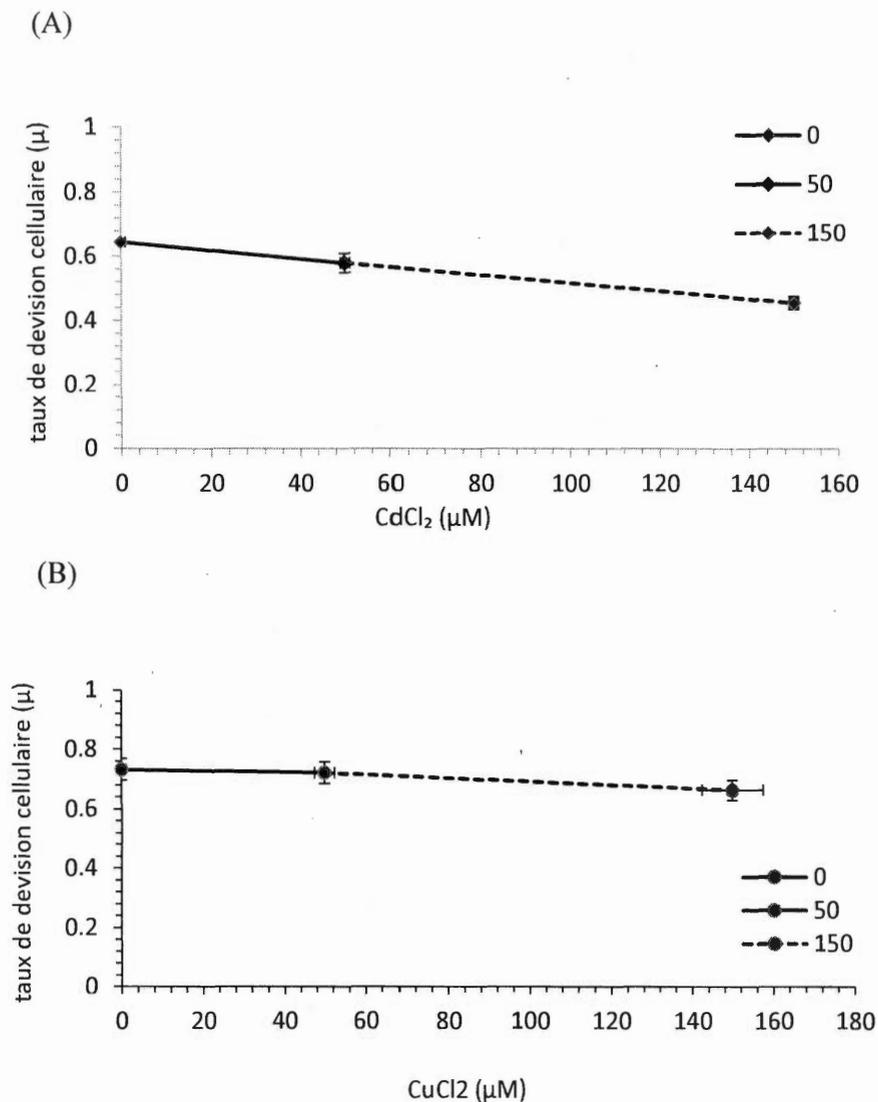


Figure 4.2 Changement du taux de croissance (μ) de *O. polymorpha* exposé pendant 72 h à différentes concentrations (50-150 μM) de CdCl_2 (A) et CuCl_2 (B). Le taux de croissance a été calculé selon l'équation : $\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$, où N_1 et N_2 représentent la densité des cellules initiales et finales, respectivement. Le t_1 et t_2 représentent les temps des mesures initiales et finales. Pour l'analyse statistique, voir la section de matériel et méthodes.

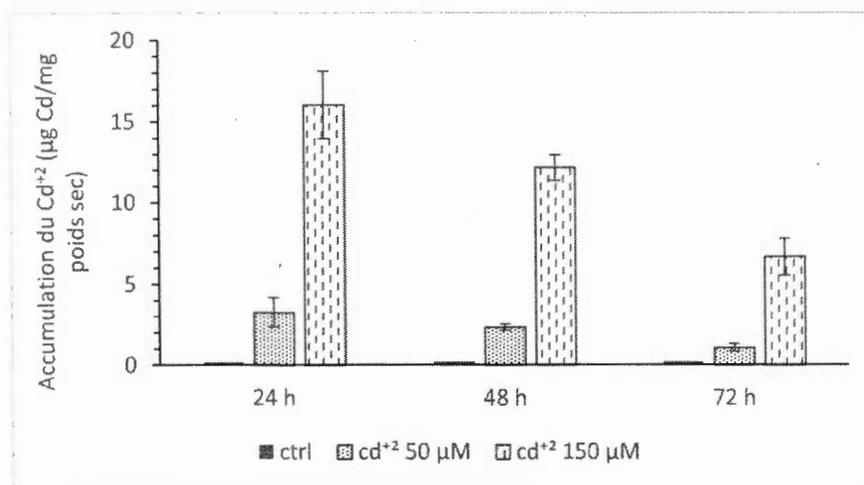
Les algues vertes sont connues pour bioaccumuler les métaux même de fortes concentrations, ce qui peut causer un effet écologique important dans le milieu aquatique (Sandau et Pluz, 1996). Dans la cellule algale, l'ensemble du processus d'absorption des métaux et l'accumulation a été exposé en deux phases : Il y a une première phase où le métal est lié à la paroi cellulaire, et une deuxième phase impliquant le transport et l'accumulation des métaux à l'intérieur de la cellule (Moreno-Garrido, Lubiân et Soares, 2000). La figure 4.3 présente la bioaccumulation du Cd^{+2} et Cu^{+2} dans la biomasse algale (ratio de la quantité du métal en $\mu\text{g} / \text{mg}$ de poids sec) lorsque les cultures algales ont été exposées aux différentes concentrations (50 et 150 μM) de CdCl_2 et CuCl_2 pendant 72 h d'exposition.

Selon les résultats obtenus (Figure 4.3 A), la bioaccumulation du Cd^{+2} dans la biomasse des algues diminue significativement en fonction du temps d'exposition sous les concentrations de 50 et 150 μM de CdCl_2 . Sous la plus forte concentration de CdCl_2 (150 μM) après 24 h, l'efficacité de bioaccumulation avait une hausse significative de 16 fois plus forte par rapport au témoin. Cependant, il y avait ensuite une tendance à la baisse de la bioaccumulation en fonction du temps d'exposition. Comme indiqué sur la figure 4.3 B, il y a une différence entre le témoin et les algues exposées à une concentration 50 μM de CuCl_2 concernant la bioaccumulation du Cu^{+2} dans la biomasse algale. Une petite accumulation de Cu^{+2} a été observée avec en moyenne 1,5 fois plus que le témoin pendant 72 h. En outre, sous une exposition à une concentration élevée de 150 μM de CuCl_2 , une efficacité d'accumulation du Cu^{+2} avec 14 fois plus élevé que le témoin a été démontrée à 48 h d'exposition par rapport à 24 h et 72 h. Par conséquent, les résultats indiquent qu'à 72 h l'efficacité d'accumulation du Cd^{+2} et Cu^{+2} diminue dans les cellules d'algues. Cela peut être sans doute attribuable à des dommages graves à la paroi cellulaire, limitant l'absorption des métaux à l'intérieur du système cellulaire. Ainsi, dans cette condition expérimentale, il est logique de

supposer que les cellules mortes ont perdu l'habileté d'absorber les métaux en solution aqueuse.

Dans une étude antérieure, l'effet du cadmium a été étudié sur *Chlamydomonas reinhardtii* et une souche acido-tolérante durant 48 h exposée à 100-600 μM de Cd^{+2} et deux conditions de pH (4 et 7). Les résultats ont démontré que la capacité maximale d'accumulation du Cd^{+2} dans la biomasse des algues ont été obtenue pour les deux souches après 24 h d'exposition à 600 μM de Cd^{+2} . Les résultats indiquent que l'efficacité de *C. reinhardtii* pour l'élimination des Cd^{+2} est déterminée par sa toxicité, qui est dépendante de la concentration en Cd^{+2} et la durée d'exposition (Al. Schmilblick, 2018). Dans une autre étude, la capacité de bioaccumulation de l'algue *Ulva rigida* a été déterminée pour le cadmium et le cuivre en solution aqueuse après une exposition à différentes concentrations (0,1, 0,3, 0,9 et 2,7 mg l^{-1}) de Cd^{+2} et Cu^{+2} pendant une période de 12 jours. Les résultats montrent que l'efficacité de la bioaccumulation est augmentée en fonction de la concentration et du temps d'exposition pour les deux métaux. Sous une exposition de 2,7 mg l^{-1} de Cd^{+2} et Cu^{+2} , l'accumulation a augmenté pour le Cd de 120 fois plus et pour le Cu de 70 fois plus par rapport aux niveaux des témoins. Ainsi, la toxicité induite par le Cd^{+2} a été plus importante que par le Cu^{+2} sur la viabilité cellulaire et le métabolisme photosynthétique (Barraza et Carballeira, 1999). En comparant nos résultats avec l'étude précédente, nous pouvons conclure que le traitement au Cd^{+2} a causé un impact important sur le métabolisme de l'algue et la capacité d'absorption en métaux de la paroi cellulaire.

(A)



(B)

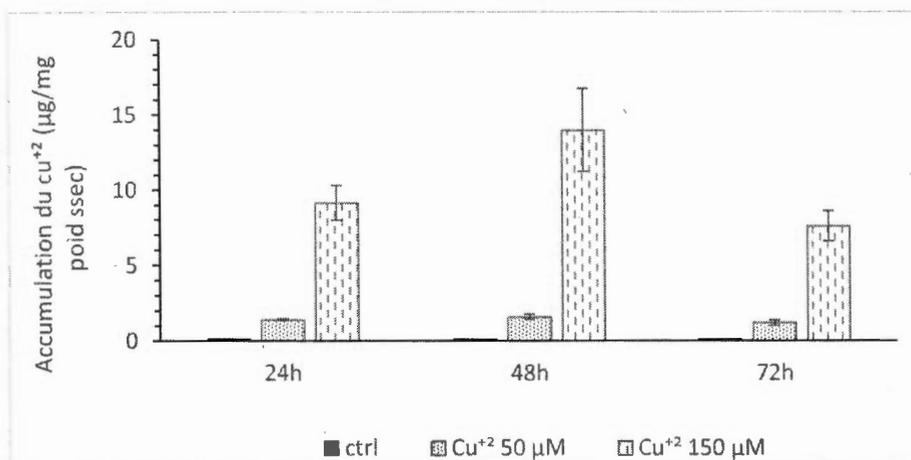


Figure 4.3 La capacité d'accumulation du Cd²⁺ et du Cu²⁺ dans la biomasse algale de *O. polymorpha* exposé pendant 72 heures à diverses concentrations (50 et 150 µM) de CdCl₂ (A) et CuCl₂ (B). Les barres d'erreur représentent les écart-types provenant de trois répliques biologiques. Pour l'analyse statistique, voir la section de matériel et méthodes.

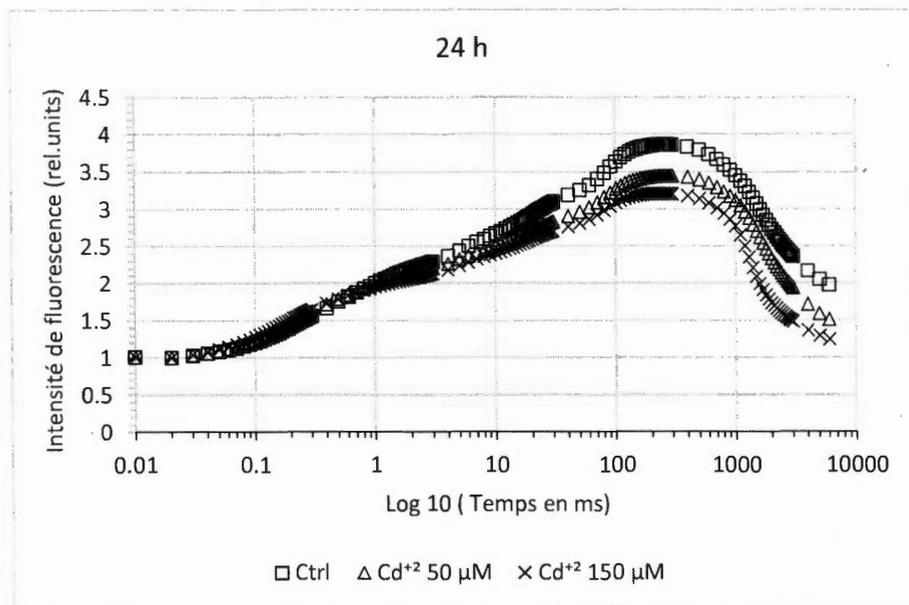
4.2 L'inhibition de la photosynthèse induite par le CdCl₂ et CuCl₂

4.2.1 Détermination de la cinétique de fluorescence chlorophyllienne

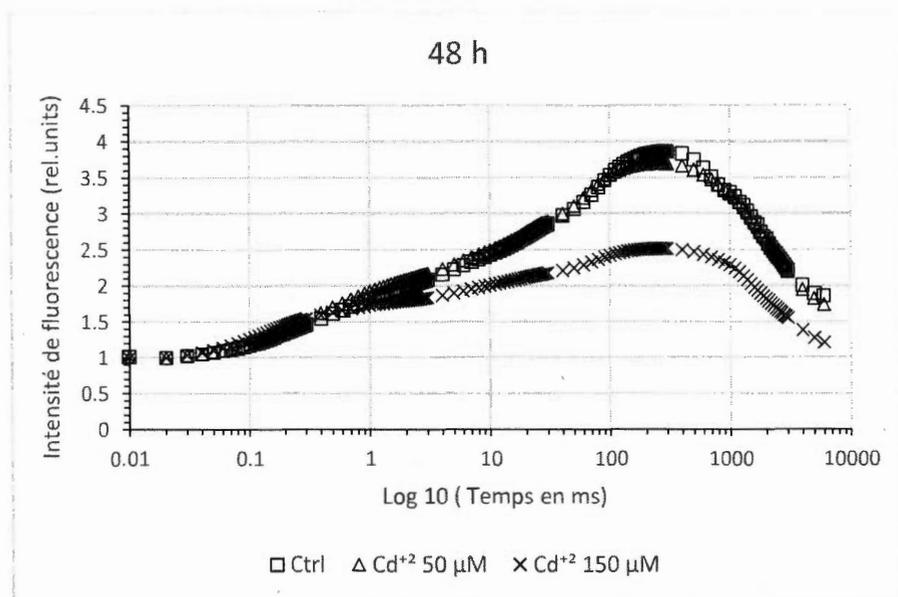
Dans cette étude, la fluorescence de la chlorophylle a été mesurée pour évaluer la toxicité du CdCl₂ et CuCl₂ sur l'activité photosynthétique des cellules de *O. polymorpha* pendant 72 h. L'effet inhibiteur de différentes concentrations de Cd⁺² sur les réactions photochimiques du PSII est présenté dans la Figure 4.4. L'altération de l'activité photosynthétique a été déterminée par la variation de l'émission de fluorescence de la chlorophylle des cellules algales. En effet, la mesure de l'émission de la fluorescence rapide OJIP est indicative de l'efficacité photochimique de la photosynthèse, et représente une méthode efficace pour déterminer l'état physiologique des cellules d'algues lorsqu'exposées à la toxicité des métaux.

Cette méthode analytique de l'induction de la fluorescence chlorophyllienne a été développée par Strasser et Strasser (1995), permettant d'informer sur le mécanisme de toxicité des polluants inhibiteurs de la photosynthèse. Il a été démontré que le changement de la fluorescence chlorophyllienne est indicateur du processus de transport des électrons provenant du photosystème II. L'analyse de la cinétique de fluorescence permet de distinguer différentes transitions nommées O, J, I et P qui sont associées à la réaction photochimique primaire du photosystème II et aux états d'oxydo-réductions des transporteurs d'électrons (Strasser, Srivastava et Tsimilli, 2004). D'après cette étude, l'émission de fluorescence de la chlorophylle peut être utilisée comme un indicateur de l'activité photosynthétique lorsque des espèces d'algues sont exposées à des stress environnementaux.

(A)



(B)



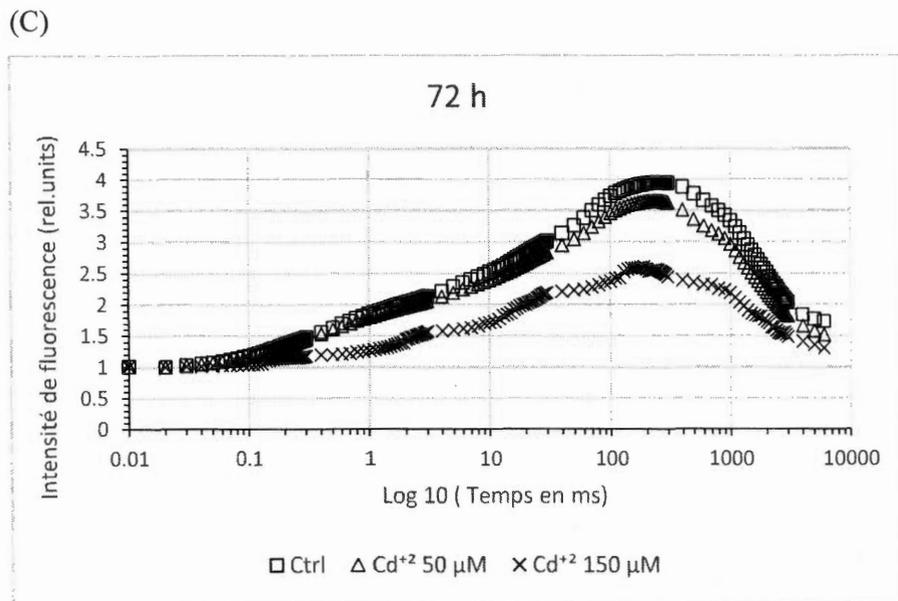


Figure 4.4 L'induction de la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne chez l'algue *O. polymorpha* après 24 h (A), 48 h (B) et 72h (C) de traitement au CdCl₂. La courbe bleue : témoin ; La courbe verte : 50 µM de CdCl₂ ; La courbe rouge : 150 µM de CdCl₂. Pour l'analyse statistique, voir la section de matériel et méthodes.

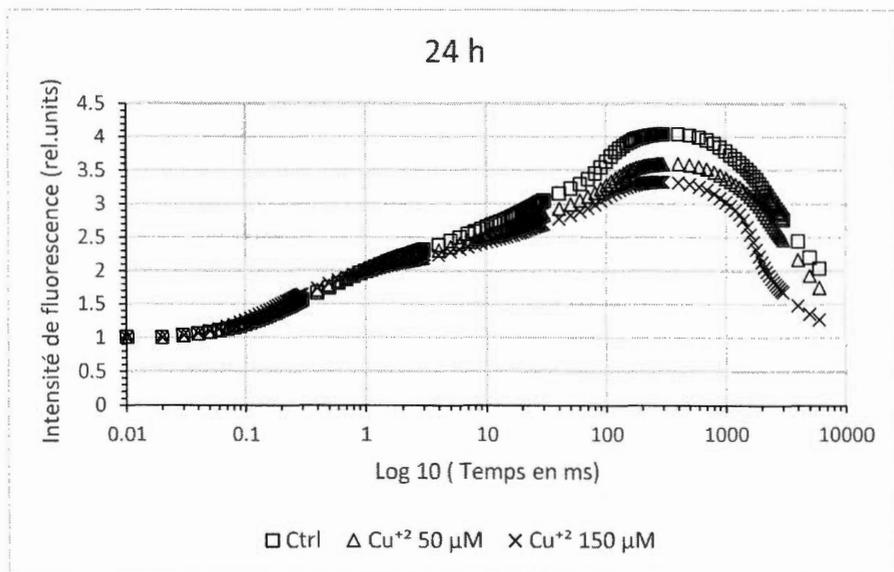
Selon la figure 4.4, les résultats montrent que l'intensité de la fluorescence chlorophyllienne diminue par rapport à la concentration de CdCl₂. À 24 h, l'effet inhibiteur du Cd sur la fluorescence de la chlorophylle a été observé pour la plus forte concentration de CdCl₂ (150 µM). Cependant, on n'a pas observé de différence significative sur l'activité photochimique du photosystème II entre la concentration de 50 µM de CdCl₂ et le témoin. Après 72 h d'exposition à 150 µM de CdCl₂, l'intensité de la fluorescence chlorophyllienne a montré une réduction plus forte qu'à 24 h et 48 h. D'autre part, le CuCl₂ cause un faible effet sur l'émission de la fluorescence chlorophyllienne comme il est indiqué dans la figure 4.5. Comparés au témoin, les résultats montrent une faible diminution de l'intensité de la fluorescence chlorophyllienne à la transition P lorsque les algues ont été exposées à une

concentration de 50 et 150 μM durant 24 h et 48 h. Cette diminution indique une petite inhibition du transport des électrons du photosystème II. À 72 h, une réduction de l'intensité de la fluorescence chlorophyllienne à la transition P a été observé seulement sous l'effet de 150 μM de CuCl_2 , qui était plus importante par rapport à 48 h. Cette observation est en accord avec les études antérieures chez les algues vertes concernant l'effet des métaux sur la réaction photochimique primaire et le transport des électrons photosynthétiques (Popovic *et al.*, 2003; Plekhanov et Yu, 2003; Miao *et al.*, 2005; Jiang et Qiran, 2009; Baumann *et al.*, 2009; Toth *et al.*, 2012 ; Samadani *et al.*, 2018). Dans une étude précédente, les effets de cinq métaux (cuivre, zinc, cadmium, chrome et plomb) ont été étudiés sur le rendement de la fluorescence chlorophyllienne lorsque sept espèces d'algues ont été exposées à de faibles concentrations (0.1, 1 et 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$) sur une période de 14 jours. Les résultats de cette étude ont montré que 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ de Cr^{+6} et Zn^{+2} a causé une diminution de la fluorescence chlorophyllienne pour toutes les espèces. Par contre, les effets de 4 et 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ de Cu^{+2} et Cd^{+2} ont causé une réduction de la fluorescence chlorophyllienne pour certaines espèces après 7 jours d'exposition. Cette réduction de la fluorescence chlorophyllienne a indiqué une altération du transfert d'énergie des antennes collectrices de lumière au centre réactionnel du photosystème II (Baumann *et al.*, 2009). Dans une autre étude, l'effet de différentes concentrations de cadmium (5, 10, 20, 40, 100, 200 μM) sur l'activité de la photosynthèse a montré une altération des réactions photochimiques du photosystème II chez la cyanobactérie *Synechocystis* PCC6803. Les résultats ont montré que l'intensité de la fluorescence chlorophyllienne a rapidement diminué de 50 % durant 15 min pour des cellules exposées jusqu'à 40 μM de Cd^{+2} . Cette étude a proposé que l'effet du Cd^{+2} a causé une inhibition du transport des électrons au côté accepteur du centre réactionnel du photosystème II (Thomas *et al.*, 2013).

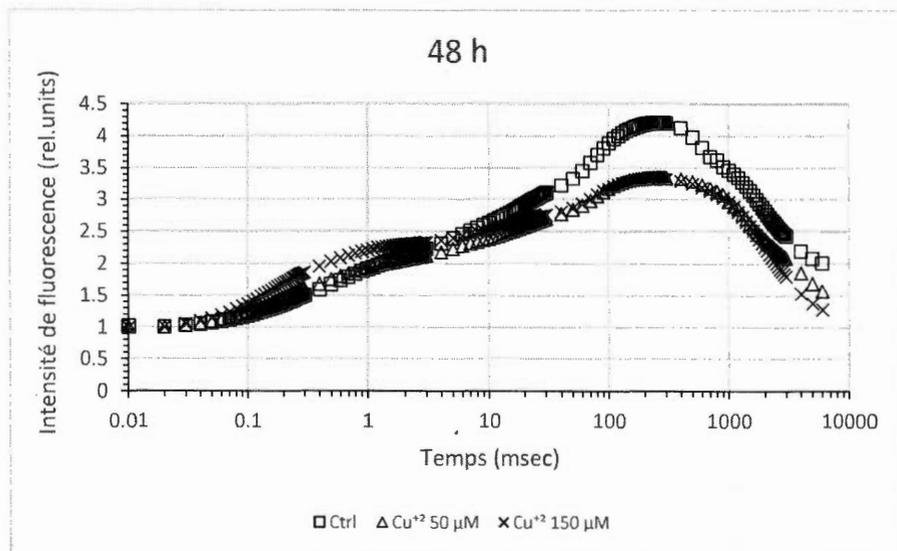
Dans mon étude, l'utilisation de la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne a permis d'effectuer une analyse de la réaction photochimique primaire du

photosystème II et de l'activité du transport des électrons photosynthétiques chez l'algue verte *O. polymorpha*. Par conséquent, les résultats obtenus concernant le changement de la fluorescence chlorophyllienne ont montré les effets toxiques du Cd^{+2} et du Cu^{+2} sur l'activité photosynthétique des cellules algales.

(A)



(B)



(C)

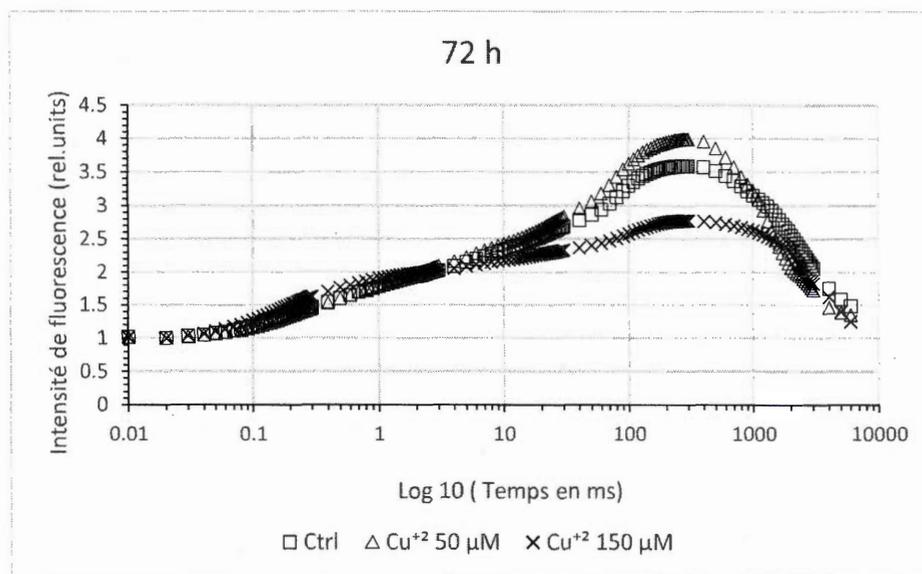


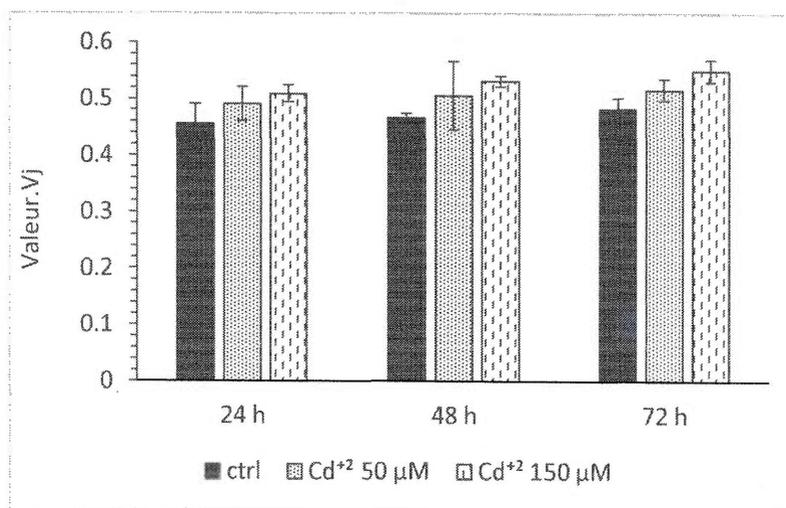
Figure 4.5 L'induction de la cinétique rapide de fluorescence chez l'algue *O. polymorpha* après 24 h (A), 48 h (B), et 72 h (C) de traitement au CuCl_2 . La courbe bleue : témoin ; La courbe verte : $50 \mu\text{M}$ de CuCl_2 ; La courbe rouge : $150 \mu\text{M}$ de CuCl_2 ; Pour l'analyse statistique, voir la section de matériel et méthodes.

4.2.2 Changement des paramètres de fluorescence

À partir de la cinétique de fluorescence chlorophyllienne, il a été possible de calculer plusieurs paramètres photosynthétiques indiquant l'état des réactions photochimiques du photosystème II (pour plus de détails, voir la section « Matériel et méthodes »). Les paramètres de fluorescence suivants ont été mesurés : La fluorescence variable relative à la transition J (V_J), l'indice de performance de l'activité du photosystème II (PI), la capacité d'absorption en énergie lumineuse des complexes collecteurs de lumière par centre réactionnel du photosystème II (ABS/RC), et le rendement quantique maximal du photosystème II (F_V/F_M). Ces paramètres de fluorescence ont été mesurés lorsque les cellules d'algues ont été exposés pendant 72 h à différentes concentrations de CdCl_2

et CuCl_2 . Les résultats obtenus ont permis de déterminer l'effet de la toxicité du Cd^{2+} et du Cu^{2+} bioaccumulés sur le changement des paramètres de fluorescence informant sur les réactions photochimiques du photosystème II.

(A)



(B)

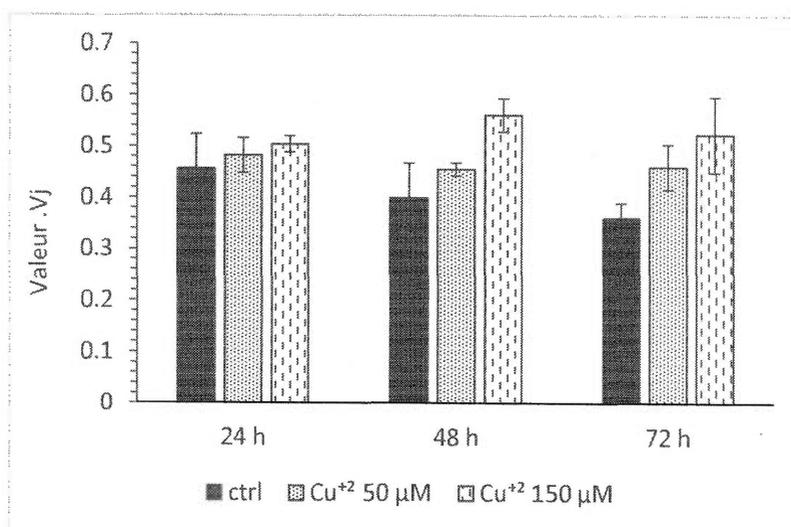


Figure 4.6 Changement du paramètre de fluorescence V_j lorsque les cellules algales de *O. polymorpha* ont été exposées à 50 et 150 μM de $CdCl_2$ et $CuCl_2$. Les barres verticales montrent les erreurs-types, pour $n = 3$. Pour l'analyse statistique, voir la section de matériel et méthodes.

La valeur relative de la fluorescence variable à la transition J, V_J est connu pour indiquer la réduction de l'accepteur primaire des électrons Q_A , et il a été calculé selon l'équation suivante : $V_J = [(F_{2ms} - F_0) / (F_M - F_0)]$. La figure 4.6 montre le changement de la valeur de V_J en fonction de la concentration d'exposition de $CdCl_2$ et $CuCl_2$ pour 24, 48 et 72 h. Selon ces résultats, la valeur de V_J a augmenté par rapport au témoin lorsque la concentration et le temps d'exposition augmentaient. Par conséquent, les changements de la valeur V_J ont été dépendantes de la concentration et du temps d'exposition lorsque les cellules ont été exposées au $CdCl_2$ et $CuCl_2$. En outre, nous avons observé une augmentation significative de la valeur de V_J , pour la plus forte concentration de $CdCl_2$ (150 μM) par rapport au témoin. Basé sur les résultats à la figure 4.6 B, à 24 h, il n'y avait pas de différence significative entre les concentrations de $CuCl_2$ (50 et 150 μM) et de témoin. Cependant, nous avons observé une forte augmentation significative de la valeur de V_J à 48 et 72 h, surtout pour la plus forte concentration de $CuCl_2$ (150 μM) par rapport au témoin. Cette augmentation de la valeur V_J suggère un blocage de la réoxydation de l'accepteur primaire des électrons Q_A , affectant le transport des électrons au-delà de Q_A . Ainsi, la bioaccumulation de Cd^{+2} et Cu^{+2} va altérer le transfert des électrons de Q_A à Q_B dans le centre réactionnel du photosystème II. Comme mentionné dans une étude précédente, l'effet inhibiteur de l'herbicide Isoproturon (0-500 μM) a été évalué sur l'algue verte *Scenedesmus obliquus* en déterminant plusieurs paramètres de fluorescence pendant 24 h d'exposition. Selon les résultats, l'étude a conclu que le rendement quantique de fluorescence à la transition J est concentration-dépendante. Une augmentation significative a été remarquée sous une haute concentration d'isoproturon par rapport au témoin. Il a été démontré que l'augmentation de la valeur de V_J est associée à la forte inhibition du transport des électrons en raison de son interaction avec la protéine D1 au centre réactionnel du photosystème II (Dewez *et al.*, 2008). Par conséquent, nos résultats ont révélé que l'augmentation de la valeur V_J est liée à l'effet inhibiteur de Cd^{+2} et Cu^{+2} sur l'activité du transport des électrons du photosystème II.

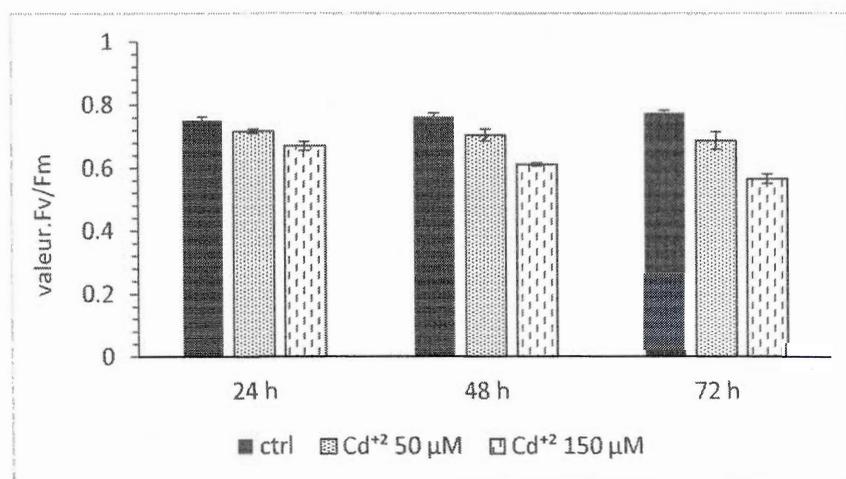
4.2.2.1 Le rendement quantique maximal du photosystème II

L'effet du CdCl_2 sur les réactions photochimiques de la photosynthèse a été déterminé par le changement du rendement quantique maximal du PSII, F_v/F_M . Les résultats sont présentés dans la figure 4.7 (A). Nous avons trouvé que la valeur de F_v/F_M a progressivement diminué lorsque les cellules algales de *O. polymorpha* ont été exposées à $150 \mu\text{M}$ de CdCl_2 pendant 72 h. Les résultats montrent une inhibition du rendement quantique maximal du PSII, indiquée par une diminution de la valeur de F_v/F_M , qui est dépendante de la durée d'exposition et de la concentration de CdCl_2 . Sous un traitement de $150 \mu\text{M}$ de Cd^{+2} , la valeur de F_v/F_M a diminué de 10, 20 et 30 % par rapport au témoin à 24, 48 et 72 h, respectivement. Dans ces conditions de traitement, cette réduction a indiqué un effet de toxicité du Cd^{+2} sur la capacité du centre réactionnel du PSII à effectuer la séparation de charge et induire le transport des électrons transmembranaires.

L'effet du CuCl_2 sur les réactions photochimiques de la photosynthèse a aussi été déterminé par le changement du paramètre F_v/F_M . Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 4.7 (B), et ils montrent que les concentrations de CuCl_2 testées (50 et $150 \mu\text{M}$) ne causèrent aucune différence significative par rapport au témoin après 24 h d'exposition. Cependant, nous avons aussi observé une baisse dans la valeur de F_v/F_M lorsque les algues étaient exposées durant 48 et 72 h aux deux concentrations de CuCl_2 . En particulier, la valeur de F_v/F_M a diminué de 15 % après 72 h d'exposition à $150 \mu\text{M}$ de CuCl_2 . Dans le passé, il a été rapporté que la toxicité des métaux peut altérer les réactions photochimiques du PSII et le complexe de dégagement de l'oxygène (Martin et Ort, 1982). Par la suite, il a été démontré que les dommages structuraux à l'appareil photosynthétique par l'impact des métaux pouvaient causer une réduction de la division cellulaire (Pienkhanov et Chemeris, 2003 ; Miao, Wang et Juneau, 2005). Dans une étude plus récente, les effets du CuCl_2 (0 , 50 , 150 et $250 \mu\text{M}$) ont été

investigués pendant 7 jours sur l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Yongguang *et al.*, 2016). Aucune différence importante n'a été observé pour le rendement photochimique maximal du PSII lorsque les cellules ont été exposées à 50 et 150 μM de CuCl_2 . Toutefois, sous le traitement de 250 μM de CuCl_2 , la valeur de F_V/F_M a significativement diminué de 28 % par rapport au témoin au troisième jour, indiquant une diminution de l'efficacité photochimique du transport des électrons photosynthétiques. Dans notre étude, nos résultats ont montré que les effets du Cd^{+2} et Cu^{+2} bioaccumulés ont causé la diminution de la valeur de F_V/F_M en altérant le fonctionnement des centres réactionnels du PSII.

(A)



(B)

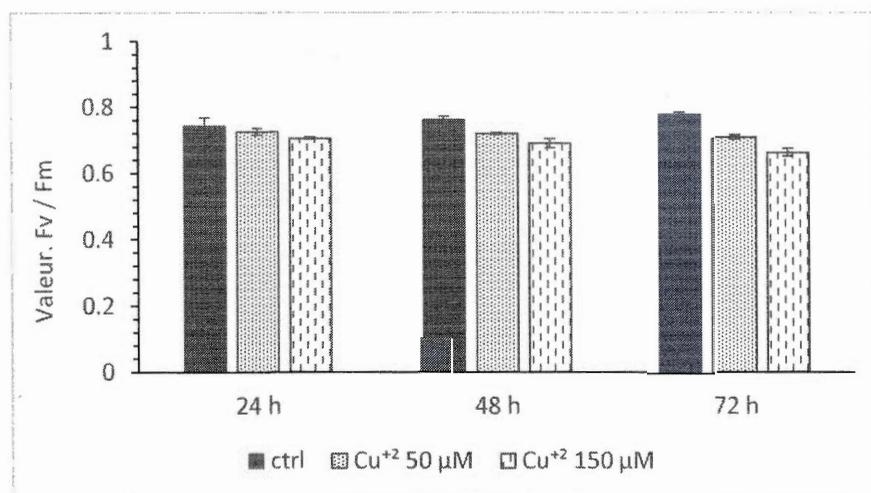


Figure 4.7 Changement du paramètre de fluorescence F_V/F_M lorsque les cellules d'algues de *O. polymorpha* ont été exposées à différentes concentrations de $CdCl_2$ (A) et $CuCl_2$ (B). Barres verticales montrent les erreurs-types, pour $n = 3$. Pour l'analyse statistique, voir la section de matériel et méthodes.

4.2.2.2 La capacité d'absorption des antennes collectrices de lumière par centre réactionnel du PSII

L'efficacité du transfert d'énergie par les antennes collectrices de lumière jusqu'au centre réactionnel du PSII, indiqué par le paramètre ABS/RC, a également été évaluée dans les mêmes conditions expérimentales. Dans notre étude, le paramètre ABS/RC a fourni une estimation de la proportion de photons absorbés par les complexes LHCII par rapport à l'état fonctionnel des centres réactionnels du PSII. Les résultats de la figure 4.8 présentent la variation du paramètre ABS/RC lorsque les cellules algales de *O. polymorpha* ont été exposées pendant 72 h à différentes concentrations de CdCl₂ et CuCl₂. Nos résultats ont montré que l'exposition aux métaux Cd⁺² et Cu⁺² cause une inhibition du transfert d'énergie par les antennes collectrices de lumière jusqu'au centre réactionnel du PSII. De plus, l'effet du Cd⁺² a induit une inhibition plus importante que celle du Cu⁺², indiquant un changement en proportion des centres réactionnels actifs/inactifs.

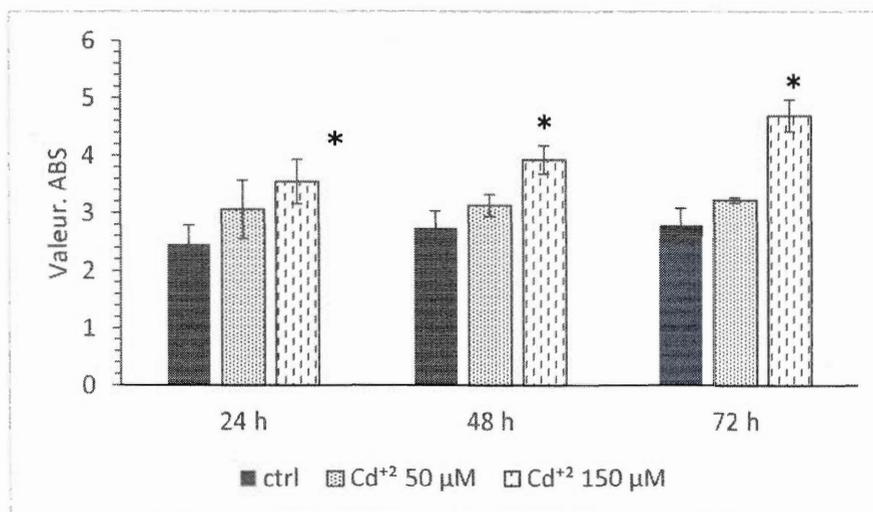
D'après la figure 4.8 (A), à tous les temps d'exposition (24-72 h), il n'y avait pas une augmentation significative de la valeur ABS entre les cellules d'algues traitées à 50 µM de CdCl₂ et les cellules témoins. Pour les cellules d'algues traitées à 150 µM de CdCl₂ durant 24- 72 h, nous avons remarqué une augmentation significative de la valeur de l'ABS/RC d'environ 30%, 43% et 73% par rapport au témoin, respectivement. Dans ces conditions, les résultats ont clairement indiqué que le Cd⁺² a induit l'inactivation de centres réactionnels du PSII dans les cellules d'algues de *O. polymorpha*.

Lorsque les cellules ont été exposées à des concentrations de 50 et 150 µM de CuCl₂, la valeur du paramètre ABS/RC a augmenté progressivement en fonction de la concentration et de la durée d'exposition (Figure 4.8 B). Après 48-72 h d'exposition à

150 μM de CuCl_2 , nous avons observé une inhibition du transfert d'énergie par les antennes collectrices de lumière jusqu'au centre réactionnel du PSII, qui a été indiquée par une augmentation de la valeur du paramètre ABS/RC par rapport au témoin. D'après ces résultats, le paramètre ABS/RC était plus affecté par les effets du Cd^{+2} par rapport au Cu^{+2} , particulièrement pour 150 μM durant 72 h d'exposition.

Dans un travail antérieur, les effets de la toxicité du Cu^{+2} (0, 2, 5, 10, 20, 40 μM) ont été examinés sur le rendement photosynthétique de *Chlorella pyrenoidosa* pendant 12 h, en utilisant la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne et le JIP-test (Jianrong et Kran, 2009). Les résultats ont montré une augmentation de la valeur du paramètre ABS/RC en fonction de la concentration de Cu^{+2} . Leur étude a montré que le transport des électrons du PSII a été inhibé par le Cu^{+2} , lorsque les cellules de *Chlorella* ont été exposées à un excès de Cu^{+2} . Les auteurs ont interprété que les ions Cu^{+2} ont induit un dommage au centre réactionnel du PSII. Par conséquent, l'augmentation des centres réactionnels inactifs du PSII est responsable de l'augmentation de la valeur du paramètre ABS/RC.

(A)



(B)

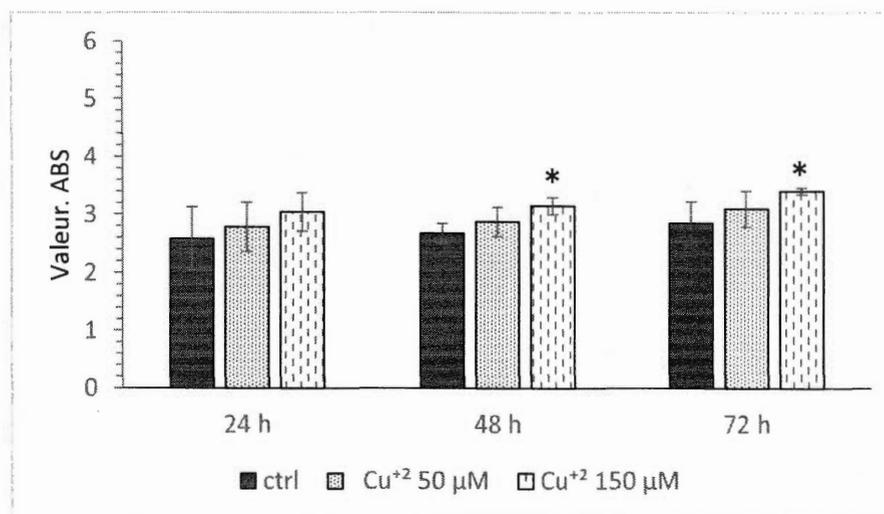


Figure 4.8 Changement du paramètre de fluorescence ABS/RC lorsque les cellules algales de *O. polymorpha* ont été exposées à différentes concentrations de CdCl₂ (A) et CuCl₂ (B). Les barres verticales montrent les erreurs-types, pour n = 3. Pour l'analyse statistique, voir la section de matériel et méthodes.

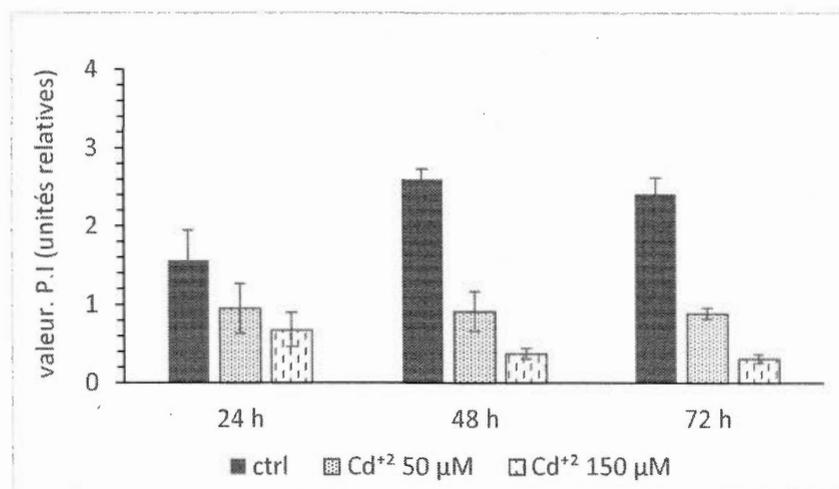
4.2.2.3 L'indice de performance de l'activité du PSII

L'indice de performance de l'activité du PSII (PI) est l'un des plus importants paramètres pour l'analyse de la cinétique de fluorescence chlorophyllienne. En effet, c'est un paramètre intégrant tous les processus photochimiques du PSII tels que l'absorption et le piégeage de l'énergie d'excitation, la réaction photochimique primaire et le processus du transport des électrons transmembranaires (pour plus de détails, voir matériel et méthodes). Dans cette étude, nous avons suivi le changement du paramètre PI lorsque des cellules d'algues de *O. polymorpha* ont été exposées pendant 72 h à différentes concentrations de CdCl₂ et CuCl₂ (Figure 4.9).

Les effets du Cd²⁺ sur la performance de l'activité du PSII sont présentés à la figure 4.9 (A). Les résultats montrent que la concentration d'exposition de 50 µM de CdCl₂ a induit une diminution de 40 % de la valeur de PI par rapport au témoin à 24 h. Cette réduction était de 65 % à 48 et 72 h. L'exposition à une concentration de 150 µM de CdCl₂ a causé une plus forte toxicité sur la performance de l'activité du PSII, avec une baisse significative de la valeur de PI de 60 % à 24 h d'exposition (par rapport au témoin). De plus, une importante réduction de 85-90 % a été déterminée à 48 et 72 h pour la concentration élevée de CdCl₂ (150 µM). Par conséquent, cet indicateur de toxicité basé sur les réactions photochimiques du PSII représente un biomarqueur sensible de l'effet des ions Cd²⁺ sur l'activité photosynthétique des cellules algales. Concernant les effets du Cu²⁺ (Figure 4.9 B), les résultats obtenus ont montré que lorsque l'algue *O. polymorpha* a été exposé aux deux concentrations de CuCl₂ (50-150 µM), la valeur de PI a progressivement diminué après 24 h d'exposition, qui a été plus importante à 48 et 72 h. Après 72 h d'exposition, l'effet de 150 µM de CuCl₂ a causé une diminution de la valeur de PI de 86 % par rapport au témoin. Par conséquent, nos résultats indiquent que les ions Cd²⁺ et Cu²⁺ induisent une inhibition de la réaction photochimique du photosystème II et du transport des électrons. Dans une étude

antérieure, l'effet du Cd^{+2} (200-600 μM) pendant 24 h d'exposition sur *Chlamydomonas reinhardtii* et la souche acido-tolérante CPCC121 a été étudié sur l'activité photochimique et le transport des électrons du PSII. Les résultats obtenus ont indiqué que l'indice de performance de l'activité du PSII (PI) chez *C. reinhardtii* a diminué de 60 % sous l'effet toxique de 200 μM d'exposition aux ions Cd^{+2} . En outre, leurs résultats sur le changement de la valeur de PI ont démontré que les ions Cd^{+2} ont conduit à l'inactivation du complexe de la photolyse de l'eau et du transport des électrons du PSII vers le PSI (Schmilblich *et al.*, 2018).

(A)



(B)

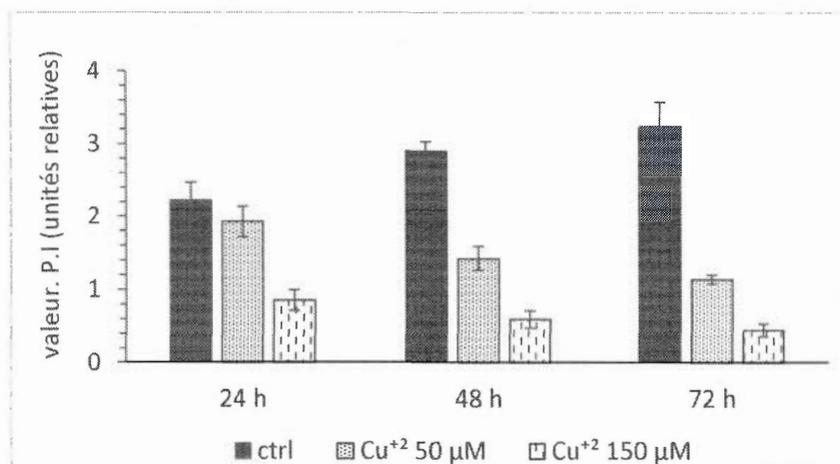


Figure 4.9 Changement du paramètre PI lorsque les cellules de *O. polymorpha* ont été exposées pendant 48 h à différentes concentrations de CdCl₂ (A) et CuCl₂ (B). Les barres verticales montrent les erreurs-types, pour n = 3. Pour l'analyse statistique, voir la section de matériel et méthodes.

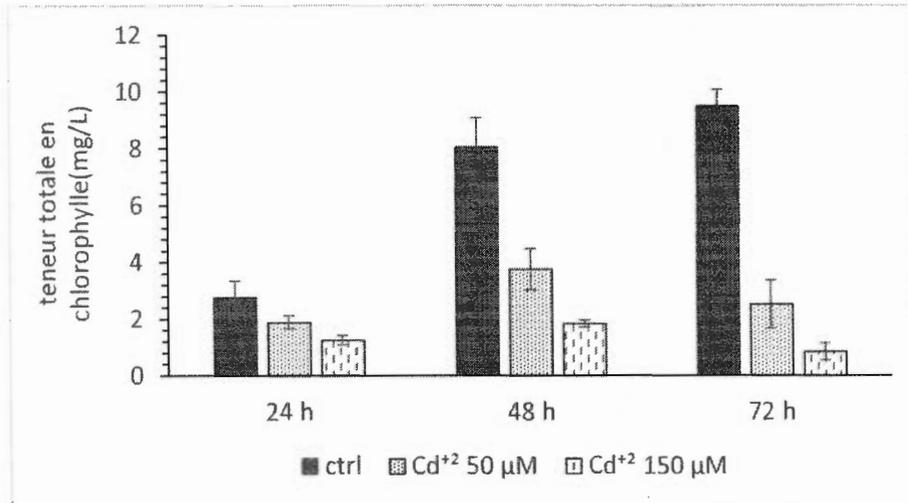
4.2.3 Changement de la teneur en pigments

4.2.3.1 Teneur en chlorophylle totale

La variation de la teneur en chlorophylle totale a été étudiée lorsque des cellules algales ont été exposées pendant 72 h à différentes concentrations de CdCl₂ et CuCl₂. Les résultats sont illustrés à la figure 4.10 (A), et ils montrent une tendance à la baisse dans la teneur en chlorophylle totale (chlorophylles *a* et *b*) pour les échantillons traités au CdCl₂ (50 et 150 µM) à 24, 48 et 72 h. Cette réduction en chlorophylle totale a été la plus importante pour les cellules traitées par rapport au témoin à 72 h d'exposition. Dans cette condition, on a observé une diminution de 75 % de la teneur en chlorophylle totale pour la concentration de 50 µM, et de 90 % pour la concentration de 150 µM. Ainsi, ces résultats indiquent que les ions Cd⁺² ont un effet inhibiteur sur la synthèse de la chlorophylle, qui a causé indirectement une altération de l'activité photosynthétique. Aussi, cela pourrait expliquer en partie les résultats concernant l'effet du Cd⁺² sur les réactions photochimiques du PSII, tel qu'indiqué par le changement du paramètre F_V/F_M pendant 72 h. En revanche, ces résultats ont montré, qu'en fonction du temps d'exposition, la chlorophylle totale était significativement diminuée pour les deux concentrations de CuCl₂ (50 et 150 µM) en comparaison avec le témoin (Figure 4.10 B). Surtout quand l'algue *O. polymorpha* a été exposée après 72 h, la teneur en chlorophylle totale a diminuée significativement pour les échantillons traités par rapport au témoin : 77 % pour 150 µM et 30 % pour 50 µM de CuCl₂. Des résultats semblables ont été trouvés dans une étude antérieure (Yongguang *et al.*, 2016). La sensibilité de l'algue verte *C. reinhardtii* a été étudiée envers la toxicité du Cu⁺², et l'effet de différentes concentrations de CuSO₄ (0, 50, 150 et 250 µM) a été évalué sur une période de 7 jours. Sous la plus forte concentration (250 µM), les résultats ont montré que la teneur en chlorophylle totale n'était pas significativement différente de la valeur du témoin lors de la première journée, alors qu'elle diminuait

significativement de 33 et 80 % au 3^{ème} et 5^{ème} jour, respectivement. Ainsi, leurs résultats ont révélé que la teneur en chlorophylle a gravement été affectée par la concentration en cuivre testée. Les effets des ions Cd^{+2} ont été étudiés à différentes concentrations de Cd^{+2} (0, 5, 20 et 32 $\mu g/L$) sur la teneur en chlorophylle de l'algue verte *Parachlorella kessleri* pendant cinq jours d'exposition. Les résultats ont montré que la plus haute concentration de Cd^{+2} (32 $\mu g/L$) a affecté la teneur en chlorophylle totale avec une réduction de 60 % par rapport au témoin (ONG *et al.*, 2009):

(A)



(B)

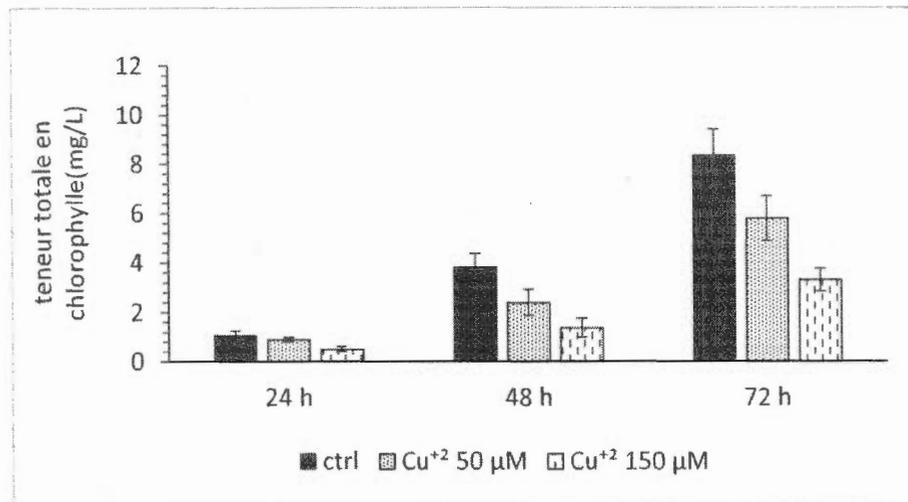


Figure 4.10 Changement de la teneur en chlorophylle totale lorsque les cellules algales de *O. polymorpha* ont été exposées pendant 72 h à différentes concentrations de CdCl_2 (A) et CuCl_2 (B). Les barres verticales montrent les erreurs-types, pour $n = 3$. Pour l'analyse statistique, voir la section de matériel et méthodes.

4.2.3.2 Les caroténoïdes totaux

Les effets du CdCl_2 (50 et 150 μM) sur la teneur en caroténoïdes totaux sont présentés à la figure 4.11 (A). Les résultats montrent que les caroténoïdes totaux des algues traitées ont diminué en relation avec la concentration testée de CdCl_2 et du temps d'exposition. La plus forte réduction a été déterminée à 72 h d'exposition. Pour les algues traitées à 50 et 150 μM de CdCl_2 , la teneur en caroténoïdes totaux a subi une réduction de 36 et 53 % par rapport au témoin, respectivement. Les effets du CuCl_2 (50 et 150 μM) sur la teneur en caroténoïdes totaux sont présentés à la figure 4.11 (B). Pour les algues traitées à 50 et 150 μM de CuCl_2 durant 72 h, la teneur en caroténoïdes totaux a subi une réduction de 50 et 70 % par rapport au témoin, respectivement. Par conséquent, les résultats indiquent que les effets du Cu^{+2} et du Cd^{+2} ont provoqué une inhibition de la biosynthèse des caroténoïdes qui va affecter indirectement le transfert d'énergie chez les photosystèmes de l'appareil photosynthétique.

Dans une étude précédente, les effets toxiques de plusieurs métaux (cobalt, cuivre, zinc et mercure) ont été déterminés chez deux espèces d'algues, *Anabaena oryzae* et *Tolypothrix tenuis* exposées sous différentes concentrations (1, 10, 100 ppm) durant 12 jours (Chakilam, 2012). En outre, les résultats ont révélé une diminution des pigments photosynthétiques pour les algues exposées à 100 ppm de Cu^{+2} par rapport au témoin. Dans une autre étude, les effets du Cd ont été investigués sur la réaction physiologique de l'algue verte *Chlorella vulgaris* (Al Jinfeng, 2016). Quand les cellules d'algues ont été exposées aux différentes concentrations de Cd^{+2} (0, 1, 3, 5, et 7 mg L^{-1}) pendant 18 jours, les caroténoïdes totaux ont été diminués par les effets des ions Cd^{+2} . En particulier, une exposition de 3 et 7 mg L^{-1} de Cd^{+2} a induit une baisse de 50 % et 72 % en caroténoïdes totaux par rapport au témoin.

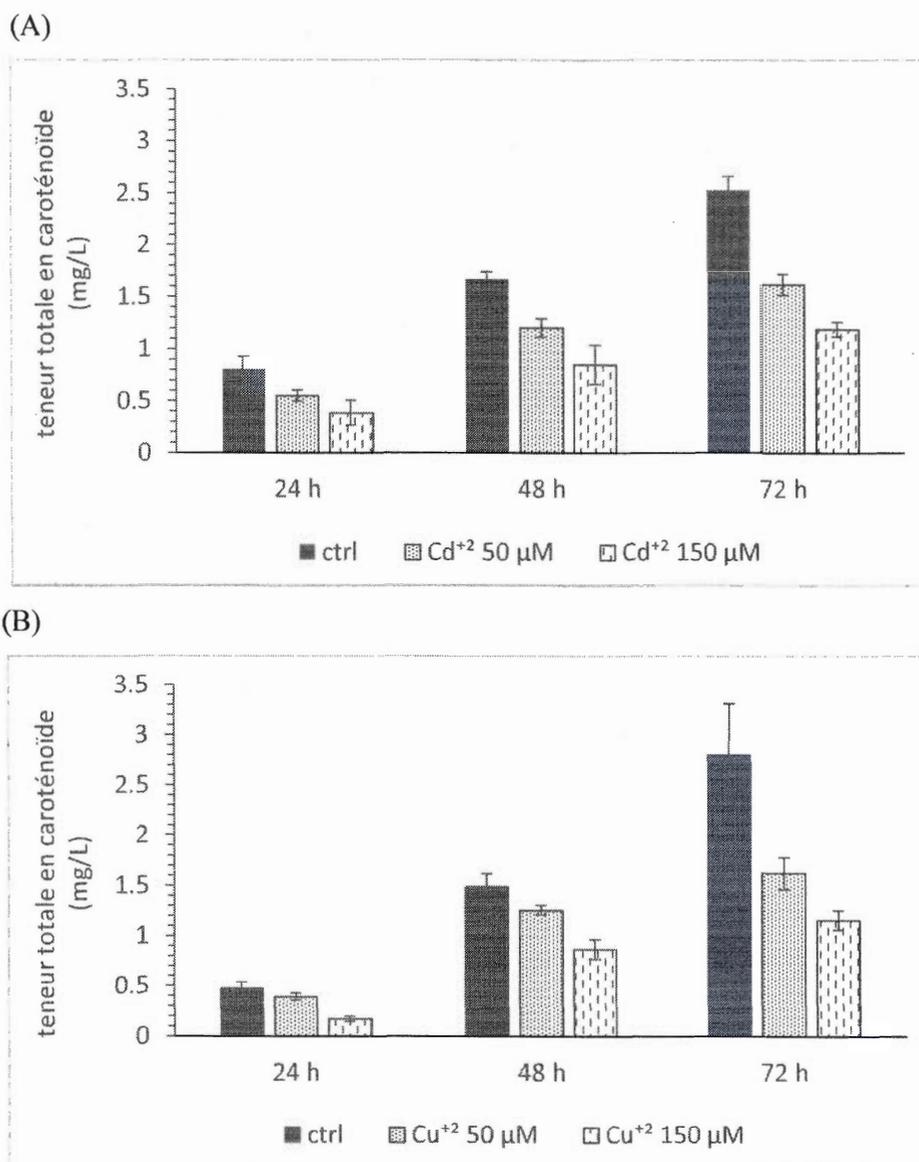


Figure 4.11 Changement de la teneur en caroténoïdes totaux lorsque les cellules algales de *O. polymorpha* ont été exposées pendant 72 h à différentes concentrations de CdCl_2 (A) et CuCl_2 (B). Les barres verticales montrent les erreurs-types, pour $n = 3$. Pour l'analyse statistique, voir la section de matériel et méthodes.

4.3 Discussion générale

Le principal objectif de ce travail de maîtrise consistait à étudier les effets de la bioaccumulation du cadmium et du cuivre sur la physiologie cellulaire de l'algue *O. polymorpha*. En particulier, plusieurs paramètres cellulaires et biochimiques ont été utilisés pour évaluer les effets toxiques des ions Cd^{2+} et Cu^{2+} , tels que le taux de croissance, la teneur en chlorophylles et caroténoïdes totaux, l'efficacité des réactions photochimiques de la photosynthèse, et l'accumulation de ces métaux dans la biomasse algale. Les résultats ont indiqué que la bioaccumulation des ions Cd^{2+} et Cu^{2+} a été la plus élevée pour les cellules algales exposées à 150 μM durant 24 h, avec une augmentation de 16 fois plus que le témoin. Par contre, à 48 h et 72 h d'exposition, la bioaccumulation de ces métaux a été de 14 et 6-8 fois plus que le témoin, respectivement. Ainsi, cette diminution de la bioaccumulation en fonction du temps d'exposition peut s'expliquer par une augmentation du degré des effets toxiques des ions Cd^{2+} et Cu^{2+} sur les cellules algales de 24 h à 72 h. En effet, les résultats obtenus ont montré que les effets toxiques des ions Cd^{2+} et Cu^{2+} étaient les plus élevées lorsque les cellules étaient exposées à 150 μM de CdCl_2 et CuCl_2 pendant 72 h d'exposition.

Un résumé, la variation des paramètres cellulaires et biochimiques est présentée dans le tableau 3.1, pour les cellules algales exposées à 150 μM de CdCl_2 ou de CuCl_2 durant 72 h. Dans cette condition, le taux de croissance a diminué significativement de 44 % et 20 % par rapport au témoin pour les cellules traitées aux ions Cd^{2+} et Cu^{2+} , respectivement. De plus, la teneur en chlorophylle totale chez les algues traitées aux Cd^{2+} et Cu^{2+} a fortement diminué de 91 % et 77 %, respectivement. Dans les mêmes conditions, la teneur en caroténoïdes totaux a été réduit de 55 % et 70 % par rapport au témoin. Ainsi, l'inhibition de la synthèse des pigments chlorophylliens est corrélée avec la détérioration de l'activité photosynthétique. En effet, l'inhibition des réactions

photochimiques de la photosynthèse a été de 88 % et 86 % pour les ions Cd^{2+} et Cu^{2+} , respectivement.

Tableau 4.1 Changement des paramètres cellulaires et biochimiques évalués lorsque les cellules algales de *O. polymorpha* ont été exposées à 150 μM de CdCl_2 ou CuCl_2 durant 72 h d'exposition. Les flèches indiquent une augmentation ou une diminution par rapport au témoin.

<u>Paramètres</u>	<u>Cu^{2+}</u>	<u>Cd^{2+}</u>
Bioaccumulation	↑ 8 ×	↑ 6 ×
Taux de croissance	↓ 20 %	↓ 44 %
Performance du PSII	↓ 86 %	↓ 88 %
Caroténoïdes totaux	↓ 70 %	↓ 55 %
Chlorophylles totaux	↓ 77 %	↓ 91 %

D'après les résultats obtenus à 72 h d'exposition, on a démontré que la bioaccumulation des ions Cd^{2+} a induit un impact toxique plus fort dans les cellules d'algues comparativement à la bioaccumulation et toxicité des ions Cu^{2+} (Tableau 3.1). En fait, une faible absorption des ions Cd^{2+} dans les cellules algales a provoqué une grande inhibition de la division cellulaire et/ou une plus forte mortalité (par nécrose cellulaire). Par contre, l'absorption des ions Cu^{2+} dans les cellules algales a provoqué une plus faible inhibition de la division cellulaire et/ou de la mortalité cellulaire. En comparaison avec l'effet des ions Cd^{2+} , seulement la réduction de la teneur en caroténoïdes totaux a été plus importante d'environ 15 % sous l'effet toxique des ions Cu^{2+} . Cette différence de toxicité entre le cuivre et le cadmium peut s'expliquer par la

spécificité de la nature chimique et du mécanisme d'action de chaque élément trace métallique. En particulier, la toxicité des Cd^{2+} est connue pour perturber la perméabilité de la membrane cellulaire causant un grave déséquilibre ionique, et provoquant une mort progressive de la cellule (Webster et Steve Gadd, 1996). Autrement, il est bien connu que les cellules d'algues ont la capacité de bioaccumulation qui est spécifique pour chaque métal en contrôlant leur absorption, leur transport et leur séquestration à l'intérieur de la cellule (Yun et Wang, 2012). Ainsi, ceci pourrait expliquer en partie la différence de la bioaccumulation entre les ions Cd^{2+} et Cu^{2+} par les cellules algales durant 24-72 h d'exposition.

Cette étude a permis de déterminer l'efficacité de la bioaccumulation de l'algue *O. polymorpha* durant 72 h d'exposition. Elle a donc été d'un grand intérêt en contribuant au développement d'une approche de phycoremédiation permettant la suppression des ions Cd^{2+} et Cu^{2+} contaminant les eaux usées. Cependant, la capacité d'absorption à bioaccumuler les métaux peut dépendre de l'espèce d'algue et des conditions environnementales (Salman *et al.*, 2014). Selon les conditions expérimentales de ce travail, la croissance et la physiologie des cellules de *O. polymorpha* ont été inhibées à des niveaux plus élevés après une exposition aux ions Cd^{2+} , affectant l'efficacité de la bioaccumulation de cellules algales. Puisque les Cd^{2+} et Cu^{2+} bioaccumulés n'étaient pas toxiques à faible concentration, une forte concentration était nécessaire pour causer un effet inhibiteur sur la physiologie des algues. Par conséquent, nos résultats sont conformes à des études antérieures pour diverses espèces d'algue verte concernant les effets des Cd^{2+} et Cu^{2+} sur la physiologie cellulaire et la capacité de tolérance envers ces métaux (Hans *et al.*, 2009; Yongguang *et al.*, 2016; Angeles et Ricardo, 2005).

CONCLUSION

La pollution des milieux aquatiques par les métaux lourds est un sérieux problème en raison du risque de toxicité des métaux pour la santé des écosystèmes et des êtres humains. Pour cette raison, le développement de la phycoremédiation représente une approche biotechnologique permettant d'éliminer les ions métalliques des eaux contaminées. Ce projet de maîtrise a permis de déterminer les avantages et les inconvénients de l'utilisation de l'algue verte *O. polymorpha* dans la bioremédiation des métaux. En fait, nos résultats ont démontré la capacité maximale des cellules algales à accumuler les ions Cd^{2+} et Cu^{2+} sur une période de 24 à 72 h d'exposition à différentes concentrations (50 et 150 μM) de CdCl_2 et CuCl_2 . La bioaccumulation maximale a été atteinte à 24 h pour le Cd^{2+} et à 48 h pour le Cu^{2+} sous la plus forte concentration d'exposition (150 μM). De plus, la caractérisation de la toxicité cellulaire induite par les effets des ions Cd^{2+} et Cu^{2+} permet d'expliquer la baisse de l'efficacité de la bioaccumulation de ces métaux dans les cellules d'algue durant 24 à 72 h.

D'après l'ensemble des réactions physiologiques des cellules d'algue exposées aux ions Cd^{2+} et Cu^{2+} , nous pouvons conclure que l'algue *O. polymorpha* était plus tolérante à l'exposition du Cu^{2+} comparativement aux Cd^{2+} pendant 24-72 h. L'analyse de plusieurs paramètres cellulaires et biochimiques a servi à la caractérisation de l'altération des processus physiologiques des cellules traitées aux CdCl_2 et CuCl_2 . Dans ces conditions expérimentales, ces paramètres peuvent être utilisés comme des biomarqueurs représentatifs de la toxicité cellulaire des ions Cd^{2+} et Cu^{2+} en utilisant l'algue verte *O. polymorpha*. Toutefois, les travaux futurs doivent se concentrer sur la détermination de l'efficacité de bioaccumulation pour d'autres métaux (ex.: Hg, As, Pb, etc.) testés seuls ou en mélange. En plus, il faudrait dépasser les limites des conditions de laboratoire et effectuer des travaux au niveau industriel à une plus grande échelle.

BIBLIOGRAPHIE

- Adriano, D. C., Bolan, N. S., Vangronsveld, J. et Wenzel, W. W. (2005). Heavy metals. In D. Hillel (Ed.): *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 175-182.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2008). Toxicological Profile for Cadmium (Draft for Public Comment). Atlanta. *Department of Health and Human Services*, 112-123.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2002). Toxicological profile for copper. U.S. *department of health and human services*, 247-259.
- Akın, H. K. et Ünlü. E. (2014). Cadmium accumulation by green algae *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. (Chlorophyta) in presence of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95, 9, 1565-1571.
- Alaoui-Sosse, B., Genet, P., Vinit-Dunand, F., Toussaint, M. L., Epron, D. et Badot, P. M. (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents, *Plant Science*, 166, 5, 1213–1218.
- Allan, R. J. G. (1997). Introduction: mining and metals in the environment. *Journal of Geochemical Exploration*, 58, 95–100.
- Alan G. L., (1995). The biological importance of copper: A literature review. The University of California. *International Copper Research Industry*, 223, 324-338.
- Alluri, H. K., Ronda, S. R., Settalluri, V. S., Singh, J. B., Suryanarayana, V. et Venkateshwar, P. (2007). Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal Removal. *African Journal of Biotechnology*, 6, 25, 2924-2931.
- Angeles Cid, C. H., Enrique, T. et Julio, A. (1995). Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology*, 31, 165-174.
- Angeles, A. A. et Ricardo, A. (2005). Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment. *The Tinto River (SW, Spain)* *Aquatic Toxicology*, 75, 316–329.
- Arora, M. (2011). Complexity and population regulation in unicellular algal cultures of *Tetraselmis indica*. Ph.D. thesis, Newcastle University, 78-92.

- Arora, M., Anil, A. C., Leliaert, F., Delany, J. et Mesbahi, E. (2013). *Tetraselmis indica*, a new species isolated from salt pans (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 48, 61–78.
- Austin, J.R., Frost, E., Vidi, P. A., Kessler, F. et Staehelin, L.A. (2006). Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell*, 18, 1693–1703.
- Baghour, M., Moreno, D. A., Villora, G., Hernández, J., Castilla, N. et Romero L. (2002). *Journal of agricultural and food chemistry*, 37, 939–952.
- Baker, A.J.M. and Walker, P.L. (1990) Ecophysiology of Metal Uptake by Tolerant Plants. In: Shaw, A.J., Ed., *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, CRC Press, Boca Raton, 155-177.
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 89-113.
- Barraza, J. E et Carballeira, A. (1999). Chlorophyll fluorescence analysis and cadmium copper bioaccumulation in *Ulva rigida* (C. Agardh) *Boletín, Instituto Espanol de Oceanografía*, 15, no 4, 395-399.
- Barsanti, L. et Gualtieri, P. (2014). *Algae - Anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, London, New York, 301-320.
- Baumann, H. A., Morrison, L. et Stengel, D.B. (2009). Metal accumulation and toxicity measured by PAM—Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1063–1075
- Ben Chekroun, Moumen, K., Rezzoum, A., Baghour, N. et Phyton, M. (2013). *International Journal of Experimental Botany*, 82, 231-264.
- Benavente-Valdes, J. R., Aguilar, C., Contreras-Esquivel, J. C., Méndez-Zavala, A. et Montañez, J. (2016). Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnology Reports*, 10, 117-125.
- Bilos, C., Colombo, J. C., Skorupka, C. N., Rodriguez Presa, M. J. (2001). Source, distribution and variability of airborne trace metals in La Plata City area, Argentina. *Environ. Pollution*, 111, 1, 149-158.

Bischoff, H. W. et Bold, H. C. (1963). Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Specie. University of Texas Publication. *Phycological Studies*, 6318, 95-118.

Blankenship, R.E. (2014). Molecular mechanisms of photosynthesis. 2nd Ed. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.

Bold, H.C. (1949). The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 76, 101 - 108.

Bradl, H. (2002). Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation. London: Academic Press, 6, 110-132.

Brinza, L., Dring, M.J. et Gavrilesco, M. (2007). Marine micro- and macro-algal species as biosorbents for heavy metals, *Environmental Engineering and Management Journal*, 6, 237-251.

Bu-Olayan, A. H., Al-Hassan, R., Thomas, B. V. et Subrahmanyam, M. N. V. (2001). Impact of trace metals and nutrient levels on phytoplankton from the Kuwait coast. *Environment International*, 26, 199–203.

Carr, D. D. et Herz, N. (1989). Concise Encyclopedia of Mineral Resources. Oxford, 43-57.

Chakilam, S.R. (2012). Metal effects on carotenoid content of cyanobacteria. *International journal of botany*, 8, 4, 192-197.

Chang, L. W., Magos, L. et Suzuki, T. (1996). Toxicology of Metals. Boca Raton. FL, USA: CRC Press, 25, 88-102.

Chen, C., Xie, Q., Wang, L., Qin, C., Xie, F., Yao, S. et Chen, J. (2011). Experimental platform to study heavy metal ion-enzyme interactions and amperometric inhibitive assay of Ag⁺ based on solution state and immobilized glucose oxidase. *Analytical chemistry*, 83, 7, 2660-2666.

Cotte-Krief, M. C., Guieu, C., Thomas, A. J. et Martin, J. M. (2000). Sources of Cd, Cu, Ni and Zn in Portuguese coastal waters. *Chemistry journal*, 71, 199–214.

Crist, R. H., Oberholser, K., Shank, K. et Nguyen, M. (1981). Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls, *Enviromental Science and Technology Journal*, 15, 1212-1217.

Cunningham, S. D. et Berti, W. R. (1993). Remediation of contaminated soils with green plants : an overview. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant Journal*, 25, 29. 207.

Dau, H., Zaharieva, I. et Haumann, M. (2012). Recent developments in research on water oxidation by photosystem II. *Bioinorganic Chemistry Biocatalysis and Biotransformation Omics*, 16, 3–10.

Davis, J. A., Volesky, B. et Vierra, R. (2000). Sargassum seaweed as biosorbent for heavy metals, *Water Research*, 34, 17, 4270-4278.

Davis, T.A., Volesky, B. et Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae, *Water Research*, 37, 4311-4330.

Demirbas, A. (2008). Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *Hazardous Materials Journal*, 157, 220-229.

Dewez, D., Didur, O., Vincent-Heroux, J. et Popovic, R. (2008). Validation of photosynthetic-fluorescence parameters as biomarkers for isoproturon toxic effect on alga *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Pollution Journal*, 151, 93-100

Diner, B. A. et Babcock, G. T. (1996). Structure, dynamics, and energy conversion efficiency in Photosystem II. Michigan State University. *oxygenic photosynthesis: the light reaction Journal*, 4, 213-47.

Elliott, J. L. (2001). Zinc and copper in the pathogenesis of amyotrophiclateral sclerosis. *Progress in Neuro-Psychopharmacological & Biological Psychiatry*, 25, 1, 169- 1185.

Environment Canada, (2011). Mercury and the Environment.
<http://www.ec.gc.ca/mercure-mercury/default.asp?lang=En&n=DB6D2996-1>.

Esser, B. K. et Volpe, A. (2002). At-sea high-resolution trace element mapping: San Diego bay and its plume in the adjacent coastal ocean. *Environmental Science and Technology*, 36, 2826–32.

Fargasova, A. (2004). Toxicity comparison of some possible toxic metals (Cd, Cu, Pb, Se, Zn) on young seedlings of *Sinapis alba* L, *Plant, Soil and Environment*, 50, 1, 33–38.

Fergusson, J. E. (1990). The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects. Oxford. *Pergamin Press*, 34, 382-399.

Friberg, L., Nordberg, G. F. et Vouk, V.B. (1986). Handbook of the toxicology of metals, Amsterdam-New York, *Elsevier*, 130–184

Frost, S. (2013). CEO 360 Degree Perspective on the Global Membrane-based Water and Wastewater Treatment, *Water and Environment*, 56-75.

Gadd, G. M. (2009). Heavy metal pollutants: environmental and biotechnological aspects. In Moselio Schaechter (Ed.): *Encyclopedia of Environmental microbiology*, Oxford: *Elsevier*, 321-334.

González, I., Águila E. et Galán, E. (2007). Partitioning, bioavailability and origin of heavy metals from the Nador Lagoon sediments (Morocco) as a basis for their management. *Environmental Geology*, 52, 1581–1593.

Gosavi, K., Sammut, J., Jankowski, J. (2004). Macroalgal biomonitors of trace metal contamination in acid sulfate soil aquaculture ponds. *Science of the Total Environment*, 324, 14- 25.

Govindjee, kern, J. F., Messinger, J., Whitmarsh, J. (2010). Photosystem II. *Encyclopedia of life sciences*, 243-248.

Govingjee. (2004). A list of photosynthesis conferences and of edited books in photosynthesis. Wiley, New York.

Gupta, V. K., Rastogi, A., Saini, V. K. et Jain, N. (2006). Biosorption of copper (II) from aqueous solutions by *Spirogyra* species. *Journal of Colloid and Interface Science*, 296, 59-63.

Han, X., Wong, Y. S., Wong, M. H. et Tam, N. F. Y. (2006). Biosorption and bioreduction of Cr(VI) by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*. *Journal of Hazardous Materials in press*, 45, 67-80.

Hang, X., Wang, H., Zhou, J., Du, C. et Chen, X. (2009). Characteristics and Accumulation of Heavy Metals in Sediments Originated from an Electroplating Pl ant. *Journal of Hazardous Materials*, 163, 922 - 930.

Hani, H. et Anal, N. (1990). The analysis of inorganic and organic pollutants in soil with special regard to their bioavailability. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 39, 2, 197-208.

- He, Z., Yang, X. E. et Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19, 125–140.
- Hepperle, D., Eberhard, H. et Lothar, K. (2000). Phylogenetic position of the *Oocystaceae* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 36, 590-595.
- Herrero, R., Cordero, B., Lodeiro, P., Rey-Castro, C. et Vicente, M. E. S. D. (2006). Interactions of cadmium (II) and protons with dead biomass of marine algae *Fucus* sp. *Marine Chemistry*, 99, 106-116.
- Hippler, M., Klein, J., Fink, A., Allinger, T. et Hoerth, P. (2001). Towards functional proteomics of membrane protein complexes: Analysis of thylakoid membranes from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant*, 28, 595–606.
- Hogan, C. M. (2010). Heavy metal. Encyclopedia of Earth. National Council for Science and the Environment. Monosson E., Cleveland C (Eds.). Washington DC.
- Hovinga, M. E., Sowers, M. et Humphrey. (1993). Environmental exposure and lifestyle predictors of lead, cadmium, PCB, and DDT levels in Great Lakes fish eaters. *Archives of Environmental and Occupational Health*, 264-277.
- Ifuku, K., Ido, K. et Sato, F. (2011). Molecular functions of PsbP and PsbQ proteins in the photosystem II supercomplex. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 104, 158–164.
- Jain, C. K., (2004). Meta; fractionation study on bed sediments of river Yamun, India. *Water Research*, 38, 548-569.
- Jamers, A., Lenjou, M., Deraedt, P., Bockstaele, Dirk. V., Blust, Ronny et Wim, d. C. (2009). Flow cytometric analysis of the cadmium exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *European Journal of Phycology*, 44, 4, 541-550
- Jiang, HP., Gao, BB., Li , WH., Zhu, M., Zheng, CF., Zheng, QS. et Wang CH. (2013). Physiological and biochemical responses of *Ulva prolifera* and *Ulva linza* to cadmium stress. *Scientific World Journal*, 3, 94–106.
- Jianrong, X. et Qiran, T. (2009). Early stage toxicity of excess copper to photosystem II of *Chlorella pyrenoidosa*–OJIP chlorophyll *a* fluorescence analysis. *Journal of Environmental Sciences*, 21, 1569–1574

Jinfeng, C., Hongchen, Q., Zhaoyang, C., Zaimin, J. et Wenke, Y. (2016). The effect of cadmium on the growth and antioxidant response for freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Springer Plus*, 5, 1290-1311.

John, R. G., Heidi, C. H., David, A. R., Ronald, C. A., Terry, I. B. et Howard, E. T. (1995). Heavy Metals in the Mississippi River. Contaminants in the Mississippi River. U.S. geological survey circular 1133, Reston, Virginia, 321-330.

Karadede, H., Unlu, E. (2000). Concentrations of some heavy metals in water, sediment and fish species from the Atatürk Dam Lake (Euphrates), Turkey. *Chemosphere*, 41, 1371-1376

Kaviraj, A., Das, B. K. (1995). Effect of potassium permanganate, cobalt chloride and vitamin B complex on the haematological parameters of cadmium treated common carp, *Cyprinus carpio*. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*, 45, 2, 73-7.

Kennish, M. J. (1996). Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution. *CRC Press*, New York, p. 535-550.

Kevresan, S., Kirsek, S., Kandrak, J., Petrovic, N. et Kelemen, D. J. (2003). Dynamics of cadmium distribution in the intercellular space and inside cells in soybean roots, stems and leaves. *Biology. Plant*, 46, 85-88.

Khani, M.H. (2011). Uranium biosorption by *Padina* sp. algae biomass: kinetics and thermodynamics, *Environmental Science and Pollution Research*, 18, 1593-1605.

Kiaune, L. et Singhasemanon, N. (2011). Pesticidal copper (I) oxide: environmental fate and aquatic toxicity. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 213, 1-26.

Klaassen, C. D. (2001). Heavy metals and Hardmen JG, Limbird LE, Gilman AG (eds). Goodman and Gilman's: The pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw Hill, New York, 1851-1875.

Kord, B., Mataji, A. et Babaie, S. (2010). Pine needles as indicator for heavy metals pollution. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 7, 79-101.

Kramer, D. M., Avenson, T. J. et Edwards, G. E. (2004). Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions. *Trends in Plant Science*, 9, 349-357.

- Krishna, K. N., Xiao-Ping, Li., Patricia, M. M. et Adam, M. G. (2002). PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Physical Sciences*, 99, 23, p. 15222-15227.
- Kuyicak, N. et Volesky, B. (1990). Biosorption by fungal biomass, Volesky, B. (editor), Biosorption of heavy metals, Florida, *CRC press*, 173-198.
- Laib, E., Leghouchi, E. (2012). Cd, Cr, Cu, Pb, and Zn concentrations in *Ulva lactuca*, *Codium fragile*, *Jania rubens*, and *Dictyota dichotoma* from Rabta Bay, Jijel (Algeria). *Environmental monitoring and assessment*, 184, 3, 1711-8.
- Lawlor, D. W. et Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 25, 275-29.
- Lazar, D. (1999). Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1412, 1-28.
- Lazar, D. (2006). The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Functional Plant Biology*, 33, 1, 9-18.
- Le Moni, J. S. (1994). The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1184, 1- 19.
- Lemoine, Y. et Schoefs, B. (2010). Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis research*, 106, 2, 155-177.
- Leung, C. M. et Jiao, J. J. (2006). Heavy metal and trace element distributions in groundwater in natural slopes and highly urbanized spaces in Mid-Levels area, Hong Kong. *Water Research*, 40, 753-765.
- Li, Z., Guo, S. Y. et Li, L. (2006). Study on the process, thermodynamical isotherm and mechanism of Cr(III) uptake by *Spirulina platensis*. *Journal of Food Engineering*, 75, 129-136.
- Lichtelthaler, H. K. (1987). Chlorophyll and carotenoids: photosynthetic membrane pigments. *Methods in Enzymology*, 148, 349-382
- Lombardi, L. et Sebastiani, L. (2005). Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants, *Plant Science*, 168, 3, 797-802.

Ma, Q. Y., Traina, S. J., Logan, T. J. (1994). Effect of aqueous Al, Cd, Fe (II), Ni and Zn on Pb immobilization by hydroxyapatite. *Environmental Science & Technology*, 28, 7, 1219-1228.

Macfarlane, G. R. et Burchett, M. D. (2001). Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the greymangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) *Marine Pollution Bulletin*, 42, 233-240.

Maksymiec, W. (1997). Effect of copper on cellular processes in higher plants, *Photosynthetica*, 34, 3, 321-342.

Martin, B. et Ort, D.R. (1985). The recovery of photosynthesis in tomato subsequent to chilling exposure. *Official Journal of the International Society of Photosynthesis Research*, 6, 2, 121-132.

Martin, M. et Herrmann, R.G. (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: How Much, What Happens, and Why? *Plant Physiol*, 118, 9-17.

Mehta, S. K., Gaur, J.P. (2005). Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Critical reviews in biotechnology*, 25, 3, 113-152.

Mendie, U. (2005). The Nature of Water. In: The Theory and Practice of Clean Water Production for Domestic and Industrial Use. *Journal of Water Resource and Protection*, 56, 1- 21.

Miao, A. J., Wang, W. X. et Juneau. P. (2005). Comparison of Cd, Cu, and Zn toxic effects on four marine phytoplankton by pulse-amplitude-modulated fluorometry. *Environmental toxicology and chemistry*, 24, 10, 2603-2611.

Moore, M.J., Soltis, P.S., Bell, C.D., Burleigh, J.G. et Soltis, D.E. (2010). Phylogenetic analysis of 83 plastid genes further resolves the early diversification of eudicots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 4623-4628.

Moreno-Garrido, I., Lubian, L.M., Soares, A. M.V. M. (2002). Influence of cellular density on determination of EC 50% in microalgal growth inhibition tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47, 2, 112-116.

Msaky, J. J. et Calvert, R. (1990). Adsorption behavior of copper and zinc in soils: influence of pH on adsorption characteristics. *Soil Science*, 150, 2, 513-522.

- Mudgal, V., Madaan, N. et Mudgal, A. (2010). Heavy metals in plants: phytoremediation: Plants used to remediate heavy metal pollution. *Agriculture and biology journal of north America*, 1, 1, 40- 46.
- National Research Council. 2000. Copper in Drinking Water. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/9782>.
- Ngo, H.T.T., Gerstmann, S. et Frank, H. (2009). Toxicity of cadmium to the green alga *Parachlorella kessleri*: Producing Cd-loaded algae for feeding experiments. *Toxicological & Environ Chemistry*, 91, 2, 279-288
- Patricia, M., Xiao-Ping, L. et Krishna, K. N. (2001) Non-Photochemical Quenching. *A Response to Excess Light Energy I. plant physiology*, 125, 4, 1558–1566.
- Paul, B. T., Clement, G. Y., Anita, K. P. et Dwayne, J. S. (2012). Heavy Metals Toxicity and the Environment. *NIH Public Access*, 101, 133–164.
- Paul-Nathanail, C. et Paul-Bardos, R. (2004). Reclamation of Contaminated Land. The University of Nottingham and Environmental Technology Ltd, 97-125.
- Pesko, M. et Kralova, K. (2013). Physiological response of *L. Brassica napus* plants to Cu (II) treatment, *Proceedings of Ecolpole*, 7, 1, 155–161.
- Pham, A. N., Guowei, X., Christopher, J. M. et David, T. (2013). Waite. Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *Journal of Catalysis*, 301, 54–64.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual review of plant biology*, 56, 15-39.
- Plekhanov, S. E. et Yu. K. (2003). Early Toxic Effects of Zinc, Cobalt, and Cadmium on Photosynthetic Activity of the Green Alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39. *Biology Bulletin*, 30, 5, 506- 511.
- Popovic, R., Dewez, D. et Juneau, P. (2003). Application of Chlorophyll fluorescence in ecotoxicology, heavy metals, herbicides and air pollutions. The Universite Of Quebec In Montreal, 5, 152-176.
- Poulson, M., Samson, G. et Whitmarsh, J. (1995). Evidence That Cytochrome b559 Protects Photosystem II against Photoinhibition. *Biochemistry*, 34, 10932-10938.
- Prasad, M.N.V. (1995). Cadmium toxicity and tolerance in vascular. *Environmental and Experimental Botany*, 35, 4, 525 545.

Proschold, T. et Frederik, L. (2007). Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics. Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. Boca Raton, FL (USA), 7, 123-153.

Raghavendra, A. S. (1998). Photosynthesis: A Comprehensive Treatise. Department of plant sciences, school of life sciences, university of Hyderabad 500046, India.

Rincon, J., Gonzalez, F., Ballester, A., Blazquez, M. L. et Munoz, J.A. (2005). Biosorption of heavy metals by chemically-activated alga *Fucus vesiculosus*, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 403-440.

Rivas, J. D. L., Baisera, M., Barber, J. (2004). Evolution of oxygenic photosynthesis: genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins. *Trends in Plant Science*, 9, 1, 18-25.

Roberto, B., Dorianna, S. et Roberta, C. (1997). Novel aspects of chlorophyll *a*/&-binding proteins. *Physiologia plantarum*, 100, 769-779.

Roberts, J. R. (1999). Metal toxicity in children. In Training Manual on Pediatric Environmental Health: Putting It into Practice. *National Institutes of Health*, 115-130.

Rodrigo, W. D., Schmidt & Zenilda, C. et Bouzon, L. (2013). Changes in ultrastructure and cytochemistry of the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales) treated with cadmium. *Protoplasma*, 250, 297-305.

Rumer, R. R. et Ryan, M. E. (1995). Barrier Containment Technologies for Environmental Remediation Applications, John Wiley & Sons, New York, 175-191.

Saha, J. K., Panwar, N. R. et Singh, M. V. (2010). Determination of lead and cadmium concentration limits in agricultural soil and municipal solid waste compost through an approach of zero tolerance to food contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*, 168, 397-406.

Salman, H. A., Ibrahim, M. I., Tarek M. M. et Abbas, H. S. (2014). Biosorption of Heavy Metals: A Review. *Journal of Chemical Science and Technology*, 3, 4, 74-102.

Samadani, M., Perreault, F., Oukarroum A. et Dewez D. (2018). Effect of cadmium accumulation on green algae *Chlamydomonas reinhardtii* and acid-tolerant *Chlamydomonas* CPCC 121. *Chemosphere*, 191, 174-182.

- Sandau, E., Sandau, P. et Pulz, O. (1996). Heavy metal sorption by microalgae. *Acta Biotechnol*, 16, 227-235.
- Sanita di Toppi, L., Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41, 105–130
- Sbihi, K., Cherifi, O., El Gharmali, A., Oudra, B. et Aziz, F. (2012). Accumulation and toxicological effects of cadmium, copper and zinc on the growth and photosynthesis of the freshwater diatom *Planothidium lanceolatum* (Brébisson) Lange-Bertalot: A laboratory study. *Journal of Materials and Environmental Science*, 3, 497-506.
- Scheer, H. (2004). Chlorophylls and carotenoids. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 1, 430-437.
- Scullion, J. (2006). Remediating polluted soils. Review. *Naturwissenschaften*, 93, 2, 51-65.
- Singh, A., Mehta, S. K., Gaur, J. P. (2007). Removal of heavy metals from aqueous solution by common freshwater filamentous algae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1115–1120
- Singh, K. K., Singh, A. K. et Hasan, S.H. (2006). Low cost bio-sorbent „wheat bran“ for the removal of cadmium from wastewater: kinetic and equilibrium studies, *Bioresource Technology*, 97, 994-1001.
- Singh, K.P., Moan, D., Singh, V.K. et Malik. A. (2005). Studies on Distribution and Fractionation of Heavy Metals in Gomti River Sediments - a Tributary of the Ganges. *India. Journal of Hydrology*, 312, 4, 14 - 17.
- Singh, R. N. et Shaishav, S. (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production- A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 2347-2353.
- Sotnikova, A., Lunackova, L., Masarovicova, E., Lux, A. et Stresko, V. (2003). Changes in the rooting and growth of willows and poplars induced by cadmium. *Biology. Plant*, 46, 129-134.
- Stoyneva, M. P., Cocquyt, C., Gartner, G. et Vyvernan, W. (2007). *Oocystis lacustris* Chod. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) in Lake Tanganyika (Africa). *Linzer biol. Beitr*, 3911, 571-632.

Strasser, J. B., Strasser, R. J. (1995). Transient fast fluorescence measuring instruments to address environmental issues: the JIP-test. In P. Mathis (eds): *Photosynthesis: from light to the biosphere*. Dordrecht: *Kluwer Academic Publishers*, 977-980

Strasser, R. J., A. Srivastava et Govindjee. 1995. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 6, 784-790.

Strasser, R. J., Srivastava, A. et Tsimilli-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In *Probing photosynthesis: Mechanism, regulation and adaptation*, eds. Mohanty, P., Yunus, M. et Pathre U. London: *Taylor and Francis*, 445-483.

Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A. (2004). Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In G. C. Papageorgiou, Govindjee (Ed.): *Chlorophyll Fluorescence: a signature of photosynthesis*, Dordrecht: *Springer*, 321-362.

Strasser, R. J. et Govindjee. (1992). On the OJIP fluorescence transients in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*, in: N. Murata (Ed.), *Research in Photosynthesis*, *Kluwer Academic Publishers*, 2, 39-42.

Structure and function of mitochondria and chloroplasts. Endosymbiosis. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chloroplast_mini.svg.

Suresh, B., Ravishankar, G. A. (2004). Phytoremediation a novel and promising approach for environmental cleanup *Critical Reviews in Biotechnology*, 24, 97-105.

Toress, E., Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C. et Abalde. J. (1997). Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin. *Aquat. Toxicol*, 39, 231-264.

Toth, T., Zsiros, O., Kis, M., Garab, G. et Kovacs, L. (2012). Cadmium exerts its toxic effects on photosynthesis via a cascade mechanism in the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. *Plant, Cell and Environment*, 35, 2075-2086.

Tsay, C. C., Wang, L. W. et Chen, Y. R. (1995). Plant response to Cu toxicity, *Taiwana*, 40, 2, 173-181.

United States Public Health Service. (1962). Public Health Service drinking water standards. Public Health Service. Washington, D. C, 956, 48-62.

Vanloon, G. W. et Duffy, S. J. (2005). The Hydrosphere. In: *Environmental Chemistry: A Global Perspective*. 2nd Ed. New York: Oxford University Press, 197-211.

Vázquez, M. D., Poschenrieder, C., Barceló, J., Baker, A. J. M., Hatton, P. et Cope, G. H. (1994). *Botanica Acta*, 45, 107- 243.

Veglio, F. et Beolchini, F. (1997). "Removal of metals by biosorption: a review," *Hydrometallurgy*, 44, 301-316.

Volesky, B. et Holan, Z. (1995). Biosorption of heavy metals, *Biotechnol. Progr*, 11, 235-250.

Webster, E. A. et Gadd, G. M. (1996). Cadmium replaces calcium in the cell wall of *Ulva lactuca*. *Biometals*, 9, 3, 241–244.

WHO. (2001). Environmental Health Criteria 221: Zinc. Geneva, Health.

WHO/FAO/IAEA. (1996). World Health Organization. Switzerland: Geneva; Trace Elements in human nutrition and health. Geneva: World Health Organization, 343-356.

World Health Organization/United Nations Environment Programme (WHO/UNEP). (1989). GEMS- Global fresh water quality. Oxford, 236-242.

Yafei, S. (2014). Carbon dioxide bio-fixation and wastewater treatment *via* algae photochemical synthesis for biofuels production. *RSC Advances*, 91, 215-228.

Yalcın, S., Erol, H., Zsoy, BO., Onbasilar, I. et Yalcın S. (2008). Effects of the usage of dried brewing yeast in the diets on the performance, egg traits and blood parameters in quails. *Animal*, 2, 1780–1785.

Yongguang, J., Yanli, Z., Zhangli, H., Anping, L. et Jiangxin, W. (2016). Towards elucidation of the toxic mechanism of copper on the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology*, 25, 1417–1425.

Yruela, I. (2009). Copper in plants: acquisition, transport and interactions, *Functional Plant Biology*, 36, 5, 409–430.

Yurekli, F. et Porgali, Z. B. (2006). The effects of excessive exposure to copper in bean plants, *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 48, 2, 7–13.