

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET DE LA COMBINAISON D'ATRAZINE ET UV-B SUR LE  
PHYTOPLANCTON

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
ANDRÉANNE GIRARD KEMP

AVRIL 2016

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.07-2011). 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.»

L'expérience, ce n'est pas ce qui arrive à quelqu'un, c'est ce que quelqu'un fait avec ce qui lui arrive.

A. Huxley, Le meilleur des mondes.

## REMERCIEMENTS

Cette incroyable expérience qu'est de réaliser une maîtrise en biologie n'aurait jamais été la même sans tous les gens formidables qui m'entourent. Je tiens donc à les remercier du fond de mon cœur.

J'offre mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche, Philippe Juneau, qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui m'a permis de mettre à terme ce projet. Je lui suis également tellement reconnaissante pour ses conseils, ses idées et son soutien. Je remercie aussi tous mes collègues de laboratoire : Francis Racine pour ses explications de concept théorique; Kui Xu pour son aide avec les appareils et les techniques de laboratoire; Marcelo Gomes pour son aide avec des techniques de laboratoire ainsi que sa bonne humeur contagieuse et ses très plaisantes séances de chants au laboratoire. Je remercie également ma grande amie Sarah Gingras Le Manac'h pour son aide lors de manipulations, son soutien et les nombreux fous rires qui ont transformé certaines journées de travail en moment inoubliable. Finalement, je remercie Thibault Chesney pour ses conseils et son humour qui ont aussi coopérés à rendre l'ambiance du laboratoire vraiment agréable.

Je remercie le professeur David Dewez pour l'accès à son laboratoire et l'utilisation de son U-HPLC. Je remercie aussi la technicienne du département de chimie, Sylvie Lemieux qui, avec son expertise, m'a permis de bien comprendre et d'utiliser rapidement cet appareil complexe.

Je remercie aussi Alice Doucet, pour l'assistance qu'elle m'a offerte lors de manipulation et ses petits rires qui ont contribué à rendre les journées de sondes bien plus agréables.

Finalement, je voudrais aussi remercier Laurent Fraser. Merci pour les merveilleux moments passer en ta compagnie, pour ton support et pour ta passion contagieuse pour la science. Je te remercie aussi pour ta motivation débordante que tu m'as transmise, pour ta confiance qui me fait me dépasser de jour en jour. Je te remercie pour tes idées géniales et, surtout, pour ton intérêt porté à mon projet qui me redonne espoir en la science dans les moments les plus difficiles. Enfin, je n'oublie pas de te remercier pour toute l'aide manuel que tu m'as offert, je te remercie donc pour ta force, tes bras et tes outils.

## TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux .....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations .....	ix
RÉSUMÉ.....	xiii
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
<b>CHAPITRE I</b> STRESS ENVIRONNEMENTAUX .....	6
1.1 Phytoplankton .....	6
1.2 Atrazine .....	6
1.3 Radiation ultraviolette.....	9
1.4 Combinaison de l'atrazine et des UV-B .....	10
1.5 Interaction de stress.....	11
1.6 Fluorescence .....	12
1.7 Protection du phytoplankton contre les stress .....	15
1.8 Sensibilité du phytoplankton .....	18
<b>CHAPITRE II</b> COMBINED EFFECT OF ATRAZINE AND UV-B ON PHYTOPLANKTON.....	20
2.1 Abstract .....	21
2.2 Résumé .....	22
2.3 Introduction .....	23
2.4 Materials and Methods.....	25

2.4.1	Cultures .....	25
2.4.2	Treatments.....	25
2.4.3	Photosynthetic activity measurements .....	27
2.4.4	Pigment analysis .....	28
2.4.5	Lipid Peroxydation.....	29
2.4.6	Statistical analysis .....	29
2.5	Results .....	31
2.6	Discussion .....	37
2.6.1	Atrazine effect.....	37
2.6.2	UV-B effect.....	39
2.6.3	UV-B and atrazine combined effect .....	41
2.7	Conclusion .....	44
2.8	Acknowledgements .....	44
2.9	Supplementary material .....	45
2.10	References.....	46
	CONCLUSION GENERALE .....	54
	LISTE DES RÉFÉRENCES .....	57

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAUX	PAGES
Table 2.1 Experimental treatments with the control (PAR light only) and the respective UV-B (Low UV-B or high UV-B intensity; Wm <sup>-2</sup> ) and atrazine (Atz; µM) doses.....	27
Table 2.2 Photosynthetic parameters of <i>M. aeruginosa</i> CPCC632, CPCC299 and <i>S. obliquus</i> CPCC5 exposed to PAR light (188 µmol photons m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ), two intensities of UV-B light (0.1 Wm <sup>-2</sup> and 0.2 Wm <sup>-2</sup> ) and atrazine (0.1µM) at 2:30PM.....	31
Table 2.3 Pigments concentration (pg/cell of <i>M. aeruginosa</i> CPCC632, CPCC299 and <i>S. obliquus</i> CPCC5 exposed to PAR light (188 µmol photons m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ), two intensity of UV-B light (0.1 Wm <sup>-2</sup> and 0.2 Wm <sup>-2</sup> ) and atrazine (0.1µM) at 2:30PM.....	35
Table 1S. Pourcentages of photosynthetic parameters of <i>M. aeruginosa</i> CPCC632, CPCC299 and <i>S. obliquus</i> CPCC5 exposed to PAR light (188 µmol photons m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ), two intensities of UV-B light (0.1 Wm <sup>-2</sup> and 0.2 Wm <sup>-2</sup> ) and atrazine (0.1µM) at 2:30PM.....	45

## LISTE DES FIGURES

FIGURE	PAGES
Figure 1.1 Schéma de l'action de l'atrazine sur la photosynthèse. La chaîne de transport des électrons est illustrée avec tous ces composants. Le mécanisme d'action de l'atrazine est indiqué par des flèches au niveau du PSII. Les flèches rouges représentent le sens du transport des électrons au sein du PSII depuis la scission de l'eau. La double barre oblique rouge représente l'arrêt du transport des électrons. La flèche en noir représente la liaison de l'atrazine et les flèches en pointillées noires, le retour d'énergie créé par l'accumulation des électrons. Dans la figure, Phe représente la phéophytine, $(Mn)_4$ est le manganèse, PQ représente la plastoquinone, Yz illustre la Tyrozine z, Atz est l'atrazine. (Modifié de David Joly, UQTR) .....	8
Figure 1.2 Voies de dissipation d'énergie. La chlorophylle (Chl) absorbe la lumière, elle passe donc de l'état fondamental à l'état excité ( $^1\text{Chl}^*$ ). Pour revenir à l'état fondamental, l'énergie peut être réémise sous forme de fluorescence (1), elle peut être utilisée pour la voie de la photochimie (2), être dissipée sous forme de chaleur (3) ou être absorbée par les molécules d'oxygène libres (4). En effet, la chlorophylle excitée ( $^1\text{Chl}^*$ ) peut produire un triplet de chlorophylle ( $^3\text{Chl}^*$ ) qui peut à son tour produire des ROS ( $^1\text{O}_2^*$ ; tirée de Müller <i>et al.</i> , 2001).....	17
Figure 2.1 Light variation ( $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) and exposure times of atrazine and UV-B within 24 hours .....	26
Figure 2.2 Photosynthesis parameters of <i>M. aeruginosa</i> CPCC299 (a), CPCC632 (b) and <i>S. obliquus</i> CPCC5 (c) exposed to PAR light ( $188 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), two intensity of UV-B light ( $0.1 \text{ W m}^{-2}$ and $0.2 \text{ W m}^{-2}$ ) and atrazine ( $0.1 \mu\text{M}$ ) at 2:30PM. The symbol * demonstrates a significant difference from the control ( $p < 0.05$ ). The symbol ** shows a significant difference from the control ( $p < 0.001$ ) and the symbol # represent a significant difference from the respective UV-B treatment (L-UV or H-UV) and from atrazine treatment. Analysis and treatment means are from ANOVA ( $n=3$ ). .....	33
Figure 2.3 Cellular MDA content ( $\times 50^6 \mu\text{m}/\text{cell}$ ) of <i>M. aeruginosa</i> CPCC632, CPCC299 and <i>S. obliquus</i> CPCC5 exposed to PAR light ( $188 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), two intensity of UV-B light ( $0.1 \text{ W m}^{-2}$ and $0.2 \text{ W m}^{-2}$ ) and atrazine ( $0.1 \mu\text{M}$ )	

at 2:30PM. The symbol \* represent a significant different difference from the control ( $p<0.05$ ). Analysis and treatment means are from ANOVA ( $n=3$ ). .....36

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<sup>1</sup> Chl, <sup>3</sup> Chl	Chlorophylle excitée sous forme de singulet et triplet
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Dioxygène excité sous forme de singulet
A <sub>615</sub>	Absorbance à 615nm
A <sub>650</sub>	Absorbance à 650nm
ABS	Absorbance
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de variance
APC	Allophycocyanine
APX	Ascorbate peroxydase
ATP	Adénosine triphosphate
Atz	Atrazine
BBM	« <i>Bold basal medium</i> »
CAT	Catalase
CFC	Chlorofluorocarbone
Chl	Chlorophylle
CPCC	Centre de culture phycologique du Canada « <i>Canadian Phycological culture center</i> »
D1	Protéine D1
D2	Protéine D2
DCMU	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (Diuron)

$DI_0$	« Effective dissipation »
$ET_0$	Probabilité de transport d'électron
$F'_M$ l'état	Niveau de fluorescence maximale, à adapté à la lumière (centres réactionnels fermés)
$F'_o$	Niveau de fluorescence minimale, à l'état adapté à la lumière
$F_{50\mu s}$	Fluorescence à 50 $\mu$ s
$F_{300\mu s}$	Fluorescence à 300 $\mu$ s
$F_{2ms}$	Fluorescence à 2 ms
$F_M$	Rendement de fluorescence maximale lorsque les centres réactionnels des PSII sont fermés (quinones réduites)
$F_o$	Rendement de fluorescence minimal lorsque les centres réactionnels des PSII sont ouverts (quinones oxydées)
$F_0/\text{cell}$	Fluorescence minimale par cellule
$F_t$	Fluorescence à une intensité lumineuse définie
GR	Glutathion réductase
$H_2O_2$	Peroxyde d'hydrogène
$H_2O$	Eau
HUFA	« Highly unsaturated fatty acid »
H-UV	Forte dose d'ultraviolet « High UV »
LHC	Complexe collecteur de lumière du PSII « light harvesting complex »
L-UV	Faible dose d'ultraviolet « Low UV »
$M_0$	Ratio de photosystème II fermé

Mn	Atome de manganèse
MCPA	2-methyl-4chlorophenoxyacetic acid
MDA	Malondialdéhyde
NPQ	« <i>Non-photochemical quenching</i> »
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radicaux superoxyde
OH <sup>-</sup>	Radicaux hydroxyde
PAM	« <i>Pulse-Amplitude-Modulated fluorescence</i> »
PAR	« <i>Photosynthetic active radiation</i> »
PC	Phycocyanine
PEA	« <i>Plant Efficiency Analyzer</i> »
PQ	Plastoquinone oxydée
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
Q <sub>A</sub>	Quinone A, accepteur primaire d'électron du PSII
Q <sub>B</sub>	Quinone B, accepteur secondaire d'électron du PSII
qP	Quenching photochimique
RC	Centre réactionnel
ROS	Espèce d'oxygène réactive ( <i>Reactive oxygen species</i> )
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
SOD	Superoxyde dismutase
TR <sub>0</sub>	« <i>Maximal trapping rate</i> »

UV	Ultra violet
UV-A	Ultra violet A
UV-B	Ultra violet B
UV-C	Ultra violet C
$V_j$	Taux de centre réactionnel fermé
W	Watt
$Y_z$	Tyrosine z
$\Phi'_M$	Efficacité photochimique opérationnelle du PSII, à l'état stationnaire de transport des électrons.
$\Phi_M$ ou $F_v/F_M$	Efficacité photochimique maximale du PSII, à l'état adapté à la noirceur

## RÉSUMÉ

Le phytoplancton forme la base de la chaîne alimentaire de beaucoup d'écosystèmes et fournit un énorme apport d'oxygène à notre planète. Cependant, l'épandage d'herbicides dans les champs et les radiations UV-B sont des stress environnementaux qui peuvent grandement affecter ces organismes. L'atrazine, l'herbicide le plus retrouvé dans les eaux de surfaces et sous-terraines, nuit à la photosynthèse en provoquant une accumulation d'électrons au niveau de la protéine D1. Depuis la réduction de la couche d'ozone, l'intensité des rayons ultraviolets atteignant la surface de la Terre a été augmentée. En plus de produire des espèces d'oxygènes réactives (ROS) comme l'atrazine, ces rayons détruisent directement la protéine D1 et les pigments protecteurs de caroténoïdes. En observant comment ces deux stress interagissent au niveau de la photosynthèse, il a été possible d'évaluer l'effet de la combinaison des UV-B et de l'atrazine sur ces organismes. De plus, en mesurant cet effet sur plusieurs types de phytoplancton, il a été possible de comparer leur résistance. En chambre de croissance contrôlée, une algue verte, *Scenedesmus obliquus* (CPCC5), et de deux souches d'une cyanobactérie, *Microcystis aeruginosa* (CPCC632 et CPCC299), ont été exposé à  $0,1\mu\text{M}$  d'atrazine ainsi qu'à 3h d'UV-B ( $0,1 \text{ Wm}^{-2}$  ou  $0,2\text{Wm}^{-2}$ ). Des mesures de photosynthèses ont été faites à l'aide de la fluorométrie (PAM et PEA) puis un dosage de la peroxydation des lipides et des pigments photosynthétiques a été effectué. Premièrement, cette combinaison de stress a démontré un effet synergique de la combinaison UV-B et atrazine au niveau de la photosynthèse chez *S. obliquus*. Cet effet serait dû à la dégradation des caroténoïdes servant à la protection contre les stress oxydatifs et à la dissipation de l'excès d'énergie lumineuse. Étonnamment, une différence de sensibilité a aussi été remarquée entre les deux souches de *M. aeruginosa* suggérant une différence mécanistique au sein de la même espèce. Au final, ces résultats démontrent que les études futures de protection de la vie aquatique devraient tenir compte de l'effet synergique des UV-B sur les différents pesticides retrouvés.

Mots clés : Algues, cyanobactéries, photosynthèse, herbicides, atrazine, ultraviolet, combinaison de stress.

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Pour beaucoup d'écosystèmes, le phytoplancton constitue le premier maillon de la chaîne alimentaire. Les algues et les cyanobactéries sont indispensables au bon maintien de ces chaînes trophiques. En plus de leur importance alimentaire, l'ensemble des organismes constituants le phytoplancton fournit environ 70% de l'apport en oxygène à la planète ce qui en fait d'importants producteurs (Fenical, 1983). La plupart des organismes de la terre dépendent donc du bon maintien des populations de phytoplancton pour survivre. La préservation de ces populations ne doit absolument pas être négligée. Malheureusement, une grande partie de ces organismes est sensible aux différents stress environnementaux (Neale *et al.*, 1998 ; Cloern, 1999 ; Rost et Wolf-Gladrow, 2008). Ainsi, lorsque ces organismes subissent des stress, cela peut alors se répercuter sur tous les autres se trouvant dans la chaîne. L'étude de l'impact des stress environnementaux sur ces organismes devient alors très pertinente.

Depuis le début de l'agriculture, l'humain a essayé diverses stratégies afin de minimiser les pertes agroalimentaires. L'utilisation d'herbicides est devenue le moyen le plus populaire pour augmenter le rendement des récoltes. En plus, au Canada, les herbicides sont plus utilisés que les insecticides (statistique Canada, 2008) en agriculture. En éliminant les plantes compétitrices à l'aide de ces produits, la croissance et le développement des cultures sont maximisés. Malgré que ces produits semblent être avantageux pour les récoltes, ils présentent énormément de points négatifs. Ils se retrouvent dans les cours d'eau avoisinant les terrains agricoles par ruissellement des eaux de pluie et par l'irrigation des sols (Warren *et al.*, 2003). Ainsi, les eaux de surfaces et souterraines se retrouvent contaminées et des organismes non ciblés, tel que le phytoplancton, risquent d'être affectés négativement (Lambert, 1984 ; Chen *et al.*, 2007; Cain *et al.*, 2008). L'atrazine est l'herbicide mis à l'étude au cours de cette recherche puisque son utilisation engendre

d'importants impacts sur l'environnement et sur les organismes s'y retrouvant (Graymore *et al.*, 2001). Au niveau du phytoplancton, cet herbicide aura comme effet d'inhiber leur photosynthèse et ainsi de réduire de beaucoup leur abondance dans les cours d'eau. En plus de l'abondance de phytoplanctons qui peut varier dû aux stress environnementaux, la qualité nutritive du phytoplancton qui se retrouve dans les cours peut aussi être bouleversé. En effet, certaines espèces plus tolérantes et de moins bonne qualité nutritive peuvent devenir dominantes et ainsi avoir des répercussions sur les organismes qui s'en nourrissent. Heureusement, cet herbicide ainsi que tous ceux provenant de la même famille sont désormais interdits par l'Union européenne (Chèvre et Erkman, 2011). Par contre, l'atrazine reste l'un des herbicides les plus utilisés dans le monde (Hayes *et al.*, 2010). On le retrouve, entre autres, aux États-Unis (Hayes *et al.*, 2010) et au Canada (santé Canada, 2013) à des concentrations allant jusqu'à 100 µg/L dans les cours d'eau (DeLorenzo, 2001).

L'activité humaine des dernières décennies n'a pas seulement eu des répercussions au niveau terrestre. Pendant plusieurs années, des substances nocives affectant la couche d'ozone ont été rejetées en grande quantité dans environnement. Les hydrocarbures halogénés (halon), utilisés comme retardateur de flamme (McCulloch, 1999), les chlorofluorocarbures (CFC) utilisés comme substance réfrigérante (Hodnebrog *et al.*, 2013) et les tétrachlorures de carbone, retrouvés par exemple dans les produits nettoyants domestiques (santé Canada, 2010) sont des exemples de ces gaz pouvant détruire la couche d'ozone. Cette couche est extrêmement importante puisqu'elle sert à la protection contre les rayons ultraviolets (UV) provenant du soleil. Depuis une vingtaine d'années maintenant, une augmentation de ces rayons pouvant avoir divers effets sur les organismes photosynthétiques a été observée (Organisation météorologique mondiale, 2011). La production d'oxygène réactif et la destruction des pigments de chlorophylle sont des exemples d'effets qui résultent, tout comme pour l'atrazine, en une diminution de la

photosynthèse (Xiong, 2001; He et Häder, 2002 et Chen *et al.*, 2012 ). Des lois ont alors été mises en vigueur afin de réduire au maximum la destruction de cette couche (Secrétariat de l'ozone, 2006). Par contre, malgré l'interdiction de l'émission de la majorité des gaz détruisant l'ozone, il s'avère que ceux-ci ont une durée de vie très longue dans la stratosphère (Madronich *et al.*, 1998). Donc, les effets nocifs que ces gaz provoquent sur l'environnement se feront ressentir pour plusieurs années encore (McKenzie *et al.*, 2003).

En général, les rayons ultraviolets ont des effets négatifs au niveau de la photosynthèse et de la croissance d'organismes photosynthétique (Holzinger and Lütz, 2006; Fernanada Pessoa, 2012 ; Jansen *et al.*, 2012; Zlatev *et al.*, 2012). Par contre, les radiations ultraviolettes se divisent en trois groupes correspondant à des gammes de longueurs d'onde précises: les UV-A, les UV-B et les UV-C, et chacun de ces groupes affectent différemment les organismes vivants (Fernanda Pessoa, 2012). Ainsi, les UV-A, qui correspondent aux longueurs d'onde entre 320 et 390 nm, sont les plus présents à la surface de notre planète, mais sont aussi les moins nocifs pour les organismes. Les UV-B qui correspondent aux longueurs d'onde entre 280 et 320nm sont beaucoup plus dangereux et sont habituellement absorbés en grande quantité par la couche d'ozone (Lucas *et al.*, 2006). Par contre, depuis la détérioration de celle-ci, ce type de radiation augmente considérablement à la surface terrestre (Frederick, 1993). C'est pourquoi il s'agit de la classe d'UV dont l'amplification est la plus redoutée. Finalement, les UV-C, qui se situe entre les longueurs d'onde de 150 à 280 nm sur le spectre de la lumière sont extrêmement dangereux (Lucas *et al.*, 2006). Par contre, vu leur très basse longueur d'onde, ils sont très facilement absorbés par la couche d'ozone (Holzinger et Lütz, 2006) et même une très mince couche d'ozone les empêche de pénétrer la stratosphère. Pour cette raison, ils ne sont pratiquement pas présents à la surface terrestre et présentent ainsi un danger moindre pour les organismes. Les UV-B sont alors les types de radiation les plus pertinentes à

étudier puisque ce sont ces rayons dont l'intensité augmente à cause de la détérioration de la couche d'ozone.

Les herbicides et les radiations ultraviolettes possèdent des effets puissants sur les végétaux. Les algues et les cyanobactéries dulcicoles sont affectées par les herbicides épandus dans les champs agricoles (Lambert, 1984 ; Cain *et al.*, 2008) et par les rayons UV (Holzinger and Lütz, 2006; Fernanda Pessoa, 2012). Beaucoup d'études se sont penchées d'une part sur les effets des radiations ultraviolettes (Vass *et al.*, 2005 ; Holzinger et Lütz, 2006; Xu et Gao, 2010; Fernanda Pessoa, 2012 ; Jansen *et al.*, 2012) et d'autre part sur les effets de l'atrazine sur le phytoplancton (Fairchild *et al.*, 1998; De Lorenzo, 2001; Graymore *et al.*, 2001; Fedtke et Duke, 2005 ; Ramakrishnan *et al.*, 2010; Chalifour et Juneau, 2011). Par contre, aucune étude n'a été faite sur leurs effets combinés. Quelques études existent sur la combinaison d'UV et d'herbicides comme le paraquat, le glyphosate, le DCMU, le MCPA et le simetryn (Kasai et Arts, 1997 ; Wang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012). En revanche, aucun de ces chercheurs ne se sont penché sur la combinaison atrazine et UV-B. Malgré que l'effet du DCMU et du simetryn soit similaire à celui de l'atrazine, ces herbicides ne sont pas couramment utilisés au Canada. Ils ne se retrouvent donc pas ou très peu dans nos cours d'eau. L'étude de ces herbicides se trouve, par ce fait, moins pertinente que celle de l'atrazine.

Le but premier de ce projet de maîtrise est d'étudier l'effet de la combinaison de l'atrazine et des rayons UV-B sur des organismes phytoplanctoniques. Afin d'y parvenir, il faudra atteindre deux objectifs distincts : 1) découvrir comment ces deux stress interagiront entre eux au niveau de la photosynthèse: 2) observer si une espèce ou une souche de phytoplancton est plus résistante qu'une autre à cette combinaison de stress. Afin d'élaborer sur le sujet, il faudra tout d'abord définir et expliquer quelques concepts de base. Premièrement, le phytoplancton, le rayonnement ultraviolet et l'atrazine seront présentés. Ensuite, les effets physiologiques de ces

deux stress environnementaux sur les organismes phytoplanctoniques seront développés. Les effets physiologiques connus et attendus de leurs combinaisons seront aussi élaborés suivis d'une revue sur la protection du phytoplancton contre les stress. Puis, notre vision de la synergie ainsi que les détails sur les paramètres photosynthétiques étudiés seront expliqués. Finalement, les diverses expériences effectuées seront présentées sous forme d'un article scientifique.

## CHAPITRE I

### STRESS ENVIRONNEMENTAUX

#### 1.1 Phytoplancton

Le phytoplancton constitue les micro-organismes photosynthétiques vivant dans les cours d'eau tels que les algues vertes et les cyanobactéries. Ils constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire pour beaucoup de réseaux trophiques d'où leur énorme importance. Les cyanobactéries sont des organismes procaryotes, qui comme les végétaux font de la photosynthèse (Raven *et al.* 2003). Par contre, lorsqu'elles sont présentes en trop grande quantité, elles peuvent devenir extrêmement nuisibles pour les organismes partageant leurs habitats. En effet, ces bactéries ont la possibilité de produire des toxines qui peuvent être neurotoxiques, comme les anatoxines, ou hépatotoxiques, comme les microcystines et les nodularines (Codd *et al.*, 1989). Ces toxines se retrouvent dans les cours d'eau et peuvent devenir problématiques pour les organismes qui y vivent ou qui s'y abreuvent (Weier, 1982). Or, toutes les cyanobactéries ne sont pas toxiques. En effet, il existe dans la même espèce, des souches pouvant produire ces toxines et d'autres ne pouvant pas (Ferrão-Filho *et al.*, 2000). Toutefois, les raisons pour lesquelles des souches toxiques deviennent dominantes dans certains milieux ne sont pas encore totalement comprises. Cela serait dû à des facteurs environnementaux par exemple, la chaleur ou la lumière, ou à des facteurs chimiques comme la présence de fer ou de zinc dans l'eau (Oberholster *et al.*, 2004).

#### 1.2 Atrazine

Comme mentionné plus haut, l'atrazine est l'un des herbicides les plus utilisés et il est retrouvé dans les eaux de surface et sous-terraines à travers le monde. L'atrazine ( $C_8H_{14}ClN_5$ ) ou 2-chloro-4-(éthylamine)-6-(isopropylamine)-s-triazine fait partie de la famille chimique des triazines et est le composé actif de nombreuses formulations commerciales d'herbicides tels que l'Aatrex, Atranex, Atrataf, Atratol

et plusieurs autres (Fiches Internationales de Sécurité Chimique, 1999). Toutes ces substances phytosanitaires sont maintenant interdites par l'Union européenne (Chèvre et Erkman, 2011). Cependant, elles sont couramment utilisées aux États-Unis et au Canada et on les retrouve dans les eaux de surfaces à travers le monde (Hayes *et al.*, 2010). En dépit de son utilisation intensive, l'atrazine est généralement considérée comme étant sans danger en raison de sa demi-vie plutôt faible ainsi que par sa bioaccumulation et sa bioamplification négligeable (Hayes *et al.*, 2010).

Par contre, certains effets nocifs chez différents organismes vivants lui ont été associés, notamment celui de perturbateur endocrinien chez les amphibiens (Hayes *et al.*, 2002). Au niveau végétal, l'atrazine nuit à la photosynthèse en faisant compétition avec  $Q_B$ , une molécule acheminant les électrons de la protéine D1 aux plastoquinones. Pour ce faire, cet herbicide se lie au site de liaison  $Q_B$  sur la protéine D1 du photosystème II (PSII ; Jansen *et al.*, 1993). En bloquant ainsi le site de liaison, l'atrazine provoque une accumulation d'électrons au niveau de la protéine D1 qui transfère leur énergie à des molécules d'oxygène dissoutes. Cet oxygène excité se transforme alors en singulet d'oxygène : une des formes extrêmement réactive de l'oxygène (*reactive oxygen species* ; ROS;  $^1O_2$ ) qui détruit la protéine D1 (fig.1.1). En inhibant la chaîne de transport des électrons, l'atrazine empêche la création d'ATP ainsi que le transport d' $H^+$  dans le lumen. Ainsi, le cycle des xanthophylles, une des lignes de défense chez les algues vertes contre les ROS, n'est pas actif puisque le changement de pH n'a pas lieu dans le lumen. Le PSII n'étant plus protégé par les xanthophylles est détruit et peu à peu l'appareil photosynthétique devient non fonctionnel (Fedtke et Duke, 2005).

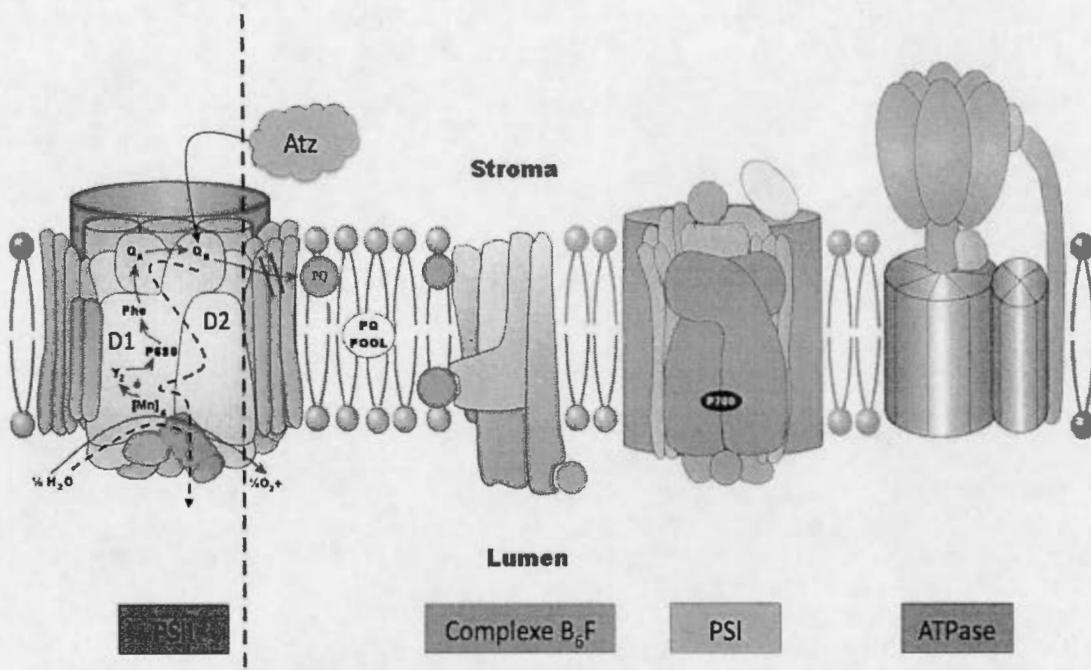


Figure 1.1 Schéma de l'action de l'atrazine sur la photosynthèse. La chaîne de transport des électrons est illustrée avec tous ces composants. Le mécanisme d'action de l'atrazine est indiqué par des flèches au niveau du PSII. Les flèches rouges représentent le sens du transport des électrons au sein du PSII depuis la scission de l'eau. La double barre oblique rouge représente l'arrêt du transport des électrons. La flèche en noir représente la liaison de l'atrazine et les flèches en pointillées noires, le retour d'énergie créé par l'accumulation des électrons. Dans la figure, Phe représente la phéophytine,  $(\text{Mn})_4$  est le manganèse, PQ représente la plastoquinone, Yz illustre la Tyrosine z, Atz est l'atrazine. (Modifié de David Joly, UQTR)

Tous ces événements engendreront une diminution du bon fonctionnement des cellules végétales pouvant mener à la mort de l'organisme photosynthétique. L'atrazine se trouve donc à avoir énormément d'effets négatifs sur la physiologie du phytoplancton dans les cours d'eau contaminés (Denoyelles *et al.*, 1982). En conséquence, la croissance et la reproduction de ces organismes se trouveront à être extrêmement réduites, rendant leur accessibilité plus difficile pour tous les animaux qui s'en nourrissent.

### 1.3 Radiation ultraviolette

Avec la dégradation de la couche d'ozone, l'intensité des UV-B a augmenté à la surface de la Terre. Cette augmentation est inquiétante puisque les UV-B ne présenteraient que des effets négatifs sur les organismes photosynthétiques. De plus, il est connu que ces rayons ont d'autant plus d'effets lorsqu'ils agissent sur des organismes déjà faibles ou stressés (Jansen et al., 2012). Une énorme augmentation d'apoptose et la formation de ROS ( $O_2^-$ ,  $O^-$ ,  $OH^-$  et  $H_2O_2$ ) ont été observées en conséquence à ce type d'exposition chez les plantes supérieures et chez les cyanobactéries. Ces dommages peuvent par la suite mener à des problèmes au niveau fonctionnel et structurel des protéines, des lipides et de nombreux autres composés cellulaires (Panagopoulos et al., 1990; Foyer et al., 1994; Smirnoff, 1998; Mahdavian, 2008 et He et Häder, 2002). En plus des dommages qu'ils peuvent causer à l'ADN (Vincent et Roy, 1993 ; Karentz et al., 1991a et He et Häder, 2002), ces rayons ont pour effet de réduire la quantité de chlorophylle chez les cyanobactéries et les plantes (Suresh et al., 1998 et Juneau et al., 1997) et de caroténoïdes (xanthophylles et lutéine) chez les algues (Bishof et al., 2002). En raison de cette diminution de caroténoïdes, les organismes montrent une diminution de protection contre une forte lumière PAR (Demmig-Adams, 1990). Les UV-B ont aussi comme conséquence d'inhiber la transcription de gènes photosynthétiques et de diminuer l'intégrité générale des chloroplastes résultants en l'inhibition de la photosynthèse (Friso et al., 1994; Vass et al., 1999). Ensuite, les UV-B détruisent les acides gras insaturés en présence d'oxygène, ils diminuent le contenu en plastoquinone des thylakoides exposés et ils inactivent les ATP synthase (Vass et al, 2005).

De plus, il est connu que les rayons UV-B dégradent les protéines D1 et D2 servant à la photoprotection (Xiong et al., 1997 ; Bouchard et al., 2006), ce qui a comme conséquence une diminution du dégagement d'oxygène et du taux de

transport des électrons. Au final, le rendement de l'activité du PSII se trouve à en être affecté (Bischof *et al.*, 1998b; Dring *et al.* 1996; Hanelt *et al.* 1997; Bischof *et al.* 1998a).

Finalement, les UV en général peuvent détruire les chaînes linéaires de tétrapyrrole qui sont contenues dans les phycobiliprotéines, des pigments photosynthétiques qui sont propres aux cyanobactéries (Vass *et al.*, 2005).

#### 1.4 Combinaison de l'atrazine et des UV-B

Dans la nature, les organismes subissent des stress de toutes sortes et ces perturbations ne surviennent que très rarement, voire jamais, seules. C'est là que l'étude de la combinaison de stress devient intéressante. En sachant que la radiation UV-B ainsi que l'atrazine affectent différemment la photosynthèse et la croissance des végétaux, il est possible de se questionner sur l'effet de leur combinaison sur des organismes. Également, connaissant que les rayons ultraviolets peuvent agir à différents endroits sur un organisme photosynthétique et que l'atrazine inhibe la chaîne de transport d'électrons aussi à un de ces endroits (protéine D1), il devient pertinent de se demander si l'effet de la combinaison de ces deux facteurs est synergique, additif ou même antagoniste. Beaucoup d'études se sont penchées sur les effets individuels des radiations UV-B ainsi que sur ceux de l'atrazine. Par contre, aucune étude n'a été faite sur leurs effets combinés. Des rares études faites sur la combinaison d'UV-B et herbicides (Kasai et Arts, 1997 ; He et Hader, 2002; Wang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012), seulement deux ont étudié les effets au niveau de la photosynthèse (Wang *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2012) et aucune n'a utilisé l'atrazine comme herbicide agricole. Finalement, Chen *et al.* (2012) ont utilisé des intensités lumineuses qui n'étaient pas représentatives de ce que l'on peut retrouver dans l'environnement lorsqu'il y a présence d'UV ( $40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Normalement, l'intensité de lumière PAR retrouvée en plein jour sous une journée ensoleillée se situe autour de  $1500 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  (De Lange et Lürling, 2003). Chez les plantes supérieures, l'utilisation

d'une luminosité plus faible peut avoir comme conséquence d'augmenter leur sensibilité face aux UV (Poulson *et al.*, 2006; Majer and Hideg, 2012).

### 1.5 Interaction de stress

La combinaison de stress environnementaux suscite beaucoup de questions puisque la réponse qu'elle engendre peut être extrêmement variable (Thompson, 1996). Lorsque plusieurs perturbations surviennent en même temps, la réponse physiologique des organismes face à ces évènements peut varier en fonction de différents facteurs. Par exemple, elle variera en fonction des stress qui sont imposés à l'organisme, en fonction des conditions environnementales dans lequel les stress sont appliqués et en fonction des organismes qui les subissent (Thompson, 1996; Fischer *et al.*, 2010). Afin caractériser cette réponse, on la différencie selon trois types : additivité, synergisme ou antagonisme (Tammes, 1964 ; Thompson, 1996 et Wang *et al.*, 2007). Par ailleurs, si l'effet engendré par une combinaison de stress est équivalent à l'addition des effets causés par chacun des stress isolés, on dit de cette réponse qu'elle est additive. Une réponse comme celle-ci implique que les deux facteurs de stress ont des mécanismes d'action indépendants l'un de l'autre. C'est-à-dire que l'action d'une des perturbations n'affectera pas celle de l'autre et les effets de chacune seront tout simplement additionnés (Newman et Unger, 2003). Par contre, si l'effet toxique produit par une combinaison est supérieur à l'addition des effets provoqués par chacun des stress seuls, on dit de cet effet qu'il est synergique. Contrairement à un effet additif, ce type de réponse implique que les mécanismes d'actions des stresseurs sont dépendants l'un de l'autre de sorte que l'action d'un des stress aura un rôle à jouer sur le mécanisme d'action de l'autre stress et aura ainsi comme effet d'augmenter l'autre effet (Newman et Unger, 2003). Toutefois, si après une exposition à une combinaison de stress, l'effet engendré est inférieur à l'addition des effets des deux stress seuls, on dit qu'il s'agit d'une réponse antagoniste. Encore une fois, ici, les mécanismes d'action sont dépendants l'un de l'autre. En effet, cette

réponse implique que le mécanisme d'action d'un des stress interagis avec le mécanisme d'action de l'autre de sorte à inhiber son effet (Newman et Unger, 2003).

### 1.6 Fluorescence

Dépendamment d'où ils se trouvent et du moment de la journée, les organismes photosynthétiques sont exposés à des intensités lumineuses qui peuvent varier considérablement. Les stress environnementaux comme les radiations ultraviolettes provenant du soleil et l'exposition aux herbicides peuvent affecter les réactions de transformation d'énergie lumineuse en énergie chimique (He et Häder, 2002 ; Fedtke et Duke, 2005 et Jansen *et al.*, 2012). La lumière, lorsqu'elle se trouve en trop grande quantité ou lorsqu'elle est exposée sur des organismes déjà stressés, peut devenir néfaste pour ces organismes (Müller *et al.*, 2001). Afin de résoudre ce problème, les organismes photosynthétiques utilisent différentes façons de dissiper le surplus d'énergie. Un phénomène extrêmement important découlant d'une surcharge d'énergie est la fluorescence. Il s'agit tout simplement d'une émission lumineuse provoquée lors de l'absorption d'un photon (Krause et Weis, 1991) La fluorescence émise par un organisme photosynthétique varie d'après le fonctionnement de son appareil photosynthétique (Krause et Weis, 1991; Krause et Jahns, 2003; Ralph *et al.*, 2007). En effet, si un blocage de la chaîne de transport des électrons a lieu la proportion d'énergie absorbée par cette voie photochimique sera diminuée et celle réémise sous forme de fluorescence et de chaleur sera augmentée. Ainsi, la fluorescence devient une façon efficace de mesurer la photosynthèse chez les organismes photosynthétiques (Schreiber *et al.*, 1994; Krause et Weis, 1991; Marwood *et al.*, 2000; Schreiber *et al.*, 2002; Juneau *et al.*, 2007). À l'aide d'un fluorimètre, en mesurant le maximum d'énergie pouvant être transmis au PSII lors d'un fort flash de lumière, il est possible de déterminer la fluorescence maximale émise par le PSII et, par la suite, la diminution de fluorescence lors d'une exposition à une lumière normale (Kautsky et Hirsh, 1931; Schreiber *et al.*, 1986; Genty *et al.*, 1989). Cette diminution de fluorescence est appelée *quenching* photosynthétique. Ce

*quenching* s'explique par deux phénomènes. Premièrement, par le transport d'électrons dans la chaîne (*Quenching photochimique* : qP). Deuxièmement, par tous les mécanismes de protection mis en branle pour éviter l'accumulation des électrons au niveau du PSII et qui ne sont pas directement liés au transport photosynthétique d'électrons (*Quenching non-photochimique*; NPQ; Schreiber *et al.*, 1986). Le qP, le NPQ ainsi que plusieurs autres paramètres peuvent être mesurés à l'aide de fluorimètres.

À l'aide de la cinétique de fluorescence rapide (PEA : *Plant efficiency analyser* ; Hansatech, Instruments Ltd, UK), les paramètres suivants peuvent être mesurés:

La taille des antennes collectrices par centre réactionnel actif est calculée avec l'absorption d'énergie lumineuse par les antennes collectrices de lumière (ABS) distribuée par centre réactionnel du PSII actif (RC), ABS/RC (Force *et al.*, 2003):

$$\text{ABS/RC} = (M_o / V_J) / (1 - (F_0 / F_M))$$

où:

$M_o$  = Vitesse initiale de l'induction de la fluorescence variable.

$$(4 * (F_{300\mu s} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})).$$

$V_J$  = taux de réduction de  $Q_A$ .

$$(F_{2ms} - F_{50\mu s} / F_M - F_{50\mu s})$$

$F_M$  = Fluorescence maximale; fluorescence après un flash de lumière saturante ( $3000 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

$F_0$  = Fluorescence minimale; fluorescence au noir.

Le taux de dissipation d'énergie sous forme de chaleur est calculé grâce à la proportion d'énergie lumineuse absorbée par centre réactionnel du PSII actif n'étant

pas utilisé dans la chaîne de transport des électrons, mais dissipée par la chaleur ( $DI_o$ ),  $DI_o / RC$  (Strasser *et al.*, 2000):

$$DI_o / RC = ABS/RC - (M_o / V_j)$$

Le taux de transport d'électrons est obtenu à l'aide du taux de transport d'électrons ( $ET_o$ ) par centre réactionnel actif (Force *et al.*, 2003) :

$$ET_o/RC = (M_o/V_j) * (1-V_j)$$

Grâce à la fluorescence chlorophyllienne modulée par *Water-PAM* (*Water-Pulse-Amplitude-Modulated*; Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Allemagne) PAM), les paramètres suivants peuvent être calculés:

Les dommages persistants au PSII sont mesurés grâce à l'efficacité photochimique maximale du PSII (Kitajima et Butler, 1975) :

$$\Phi_M = (F_M - F_0) / F_M$$

où:

$F_M$  = Fluorescence maximale; fluorescence d'un échantillon illuminé après un flash de lumière saturante ( $3000 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

$F_0$  = Fluorescence minimale; fluorescence au noir.

La photoinhibition et les dommages additionnels au PSII sont évalués grâce à l'efficacité photochimique opérationnelle du PSII (Genty *et al.*, 1989) :

$$\Phi'_M = (F'_M - F_t) / F'_M$$

où:

$F_t$  = Fluorescence à un temps défini.

$F'_M$  = Fluorescence maximale d'un échantillon illuminé après un flash de lumière saturante.

Les mécanismes utilisés pour contrer une accumulation d'énergie au niveau du PSII (NPQ; *quenching non-photochimique*) autre que la photochimie sont mesurés (Bilger and Björkman, 1990):

$$\text{NPQ} = (F_M - F'_M) / F'_M.$$

### 1.7 Protection du phytoplancton contre les stress

Les organismes qui dépendent de l'énergie du soleil pour survivre ont développé certains mécanismes afin de se protéger contre un excès d'énergie causé soit par un stress lumineux (UV-B ou forte intensité de PAR) ou soit par tout autre stress environnementaux comme une exposition aux herbicides. Pour échapper à un surplus d'énergie, le phytoplancton possède plusieurs moyens, soit la fuite, les systèmes de protection et les mécanismes de réparation. La fuite peut être effectuée par des algues possédant des flagelles, par exemple, ou par les cyanobactéries possédant des vacuoles faisant en sorte qu'elles peuvent se déplacer dans les colonnes d'eau et ainsi éviter les radiations ultraviolettes (Kruschel et Castenholz, 1998). Ensuite, les systèmes de protection peuvent être représentés sous forme de barrière physique comme certains dinoflagellés, par exemple, qui développe une paroi cellulaire à multiples épaisseurs les protégeant contre les UV (Banaszak and Trench, 2001). Certains organismes formeront des composés les protégeant contre les radiations tels que des composés d'acides aminés, des enzymes antioxydantes, des caroténoïdes et plusieurs autres (Karentz *et al.*, 1991b ; Salguero *et al.*, 2003 ; Sinha et Häder, 2007 ; Rijstebil, 2003). Les enzymes antioxydantes vont protéger l'appareil photosynthétique contre les molécules réactives d'oxygène. Par exemple: la superoxyde dismutase (SOD) permet de réduire l'ion superoxyde en peroxyde

d'hydrogène (Wolfe-Simon *et al.*, 2005), la catalase (CAT) réduit le peroxyde d'hydrogène en eau et en O<sub>2</sub> (Pinto *et al.*, 2003), l'ascorilate peroxydase (APX) permet de réduire le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O (Pinto *et al.*, 2003) et la glutathion réductase (GR) permet de transformer le glutathion disulfide en glutathion sulfhydryl (Rao *et al.*, 1996). Les caroténoïdes, quant à eux, peuvent absorber non seulement les radiations UV, mais aussi l'énergie des oxygènes réactifs et la réémettre sous forme de chaleur (Vincent et Roy, 1993; Stahl et Sies, 2002).

D'autres mécanismes de protection des appareils photosynthétiques existent. Avant de les expliquer, il faut se rappeler que la photosynthèse consiste en un transport d'électrons entre le photosystème II et le photosystème I. Chaque photosystème est formé de plusieurs molécules pigmentaires constituant le complexe antennaire et d'un centre réactionnel. Ces pigments sont en majorité chlorophylliens et sont excités par l'absorption de photons de lumière. La chlorophylle comme tous les autres types de pigments, absorbe les photons provenant d'une certaine longueur d'onde. L'énergie des photons est transférée aux électrons que contiennent les pigments (Raven *et al.* 2002; Taiz et Zeiger, 2010). Ce transfert d'énergie fait passer le pigment de l'état fondamental à l'état d'excitation et crée une énergie de résonnance qui peut être dissipée de différentes façons. Elle peut être dissipée par la voie de la photochimie, c'est à dire envoyée dans la chaîne de transport des électrons. Elle peut être dissipée sous forme de chaleur ou absorbée par les molécules d'oxygènes (formation de ROS) ou alors, elle peut être dissipée sous forme de fluorescence (Müller *et al.*, 2001; figure 1.2).

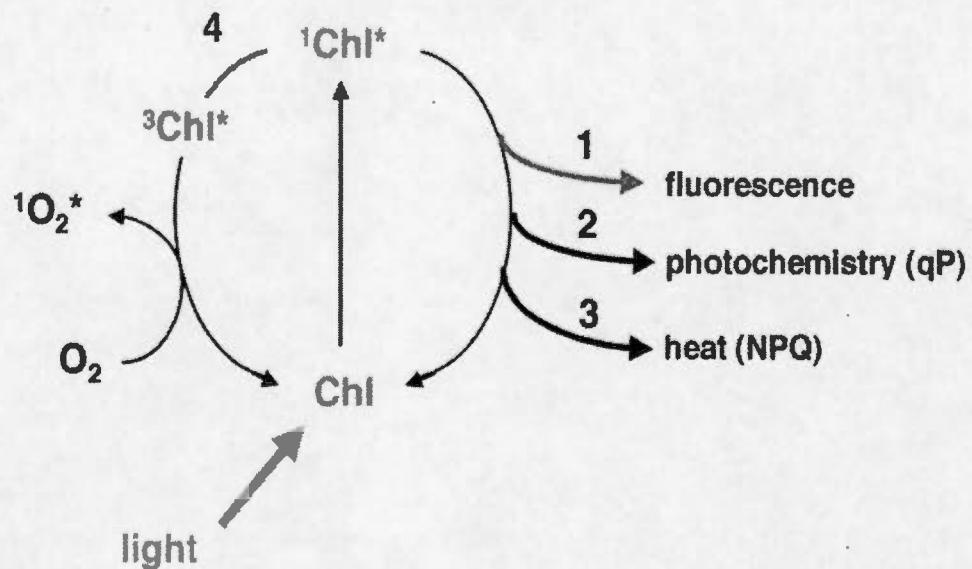


Figure 1.2 Voies de dissipation d'énergie. La chlorophylle (Chl) absorbe la lumière, elle passe donc de l'état fondamental à l'état excité ( $^1\text{Chl}^*$ ). Pour revenir à l'état fondamental, l'énergie peut être réémise sous forme de fluorescence (1), elle peut être utilisée pour la voie de la photochimie (2), être dissipée sous forme de chaleur (3) ou être absorbée par les molécules d'oxygène libres (4). En effet, la chlorophylle excitée ( $^1\text{Chl}^*$ ) peut produire un triplet de chlorophylle ( $^3\text{Chl}^*$ ) qui peut à son tour produire des ROS ( $^1\text{O}_2^*$ ; tirée de Müller *et al.*, 2001).

Les mécanismes de protection constituant le NPQ sont aussi différents moyens que la cellule utilise afin de dissiper un surplus d'énergie. Le NPQ varie entre les différents types de phytoplanctons. Chez les algues vertes, le NPQ comprend le cycle des xanthophylles, l'état de transition et la photoinhibition ((Müller *et al.*, 2001 and Schreiber *et al.*, 1986)). Le cycle des xanthophylles consiste en un changement de conformation de pigments caroténoïdes. Lorsqu'il y a augmentation d'électrons dans la chaîne de transport des électrons, de plus en plus de protons sont transférés vers le lumen changeant ainsi son pH. Le changement de pH entraîne la transformation de la violaxantine en anthéinoxanthine et éventuellement en zéaxanthine. Ce changement de

conformation empêche le transfert d'énergie à la protéine D1 ralentissant ainsi le transport des électrons (Farber *et al.*, 1997). Le second mécanisme de protection, l'état de transition, consiste au déplacement des antennes collectrices de lumière (LHC). Les LHC sont des pigments pouvant voyager d'un photosystème à l'autre. Ainsi, lorsqu'une accumulation d'énergie survient au niveau du PSII, des antennes peuvent transférer une quantité de cette énergie au PSI afin de la répartir plus également entre les deux photosystèmes (Allen, 1992; Gal *et al.*, 1997; Wollman, 2001). Le mécanisme de protection qu'est la photoinhibition correspond à l'absorption d'énergie par la protéine D1 (*D1 protein turn over*; Xiong *et al.*, 1997). Cela prévient alors que d'autres molécules soient endommagées par cette énergie et que des molécules réactives d'oxygène soient produites. Cette protéine, qui sera alors endommagée, sera dégradée par une protéase puis remplacée par une protéine nouvellement synthétisée (Prasil *et al.*, 1992 ; Rintamäki *et al.*, 1994; Leitsch *et al.*, 1994; Schnettger *et al.*, 1994).

Chez les cyanobactéries, les composants du NPQ sont légèrement différents. Mis à part l'état de transition et la photoinhibition qui existe aussi chez ces organismes, ceux-ci ne possèdent pas de cycles des xanthophylles (Hager et Holocher, 1994 ; Hirschberg et Chamovitz, 1994). Par contre, ils possèdent tout de même de la zéaxanthine, un type de xanthophylle avec lequel ils arrivent à dissiper les surplus d'énergie (Hirschberg et Chamovitz, 1994). Chez les algues vertes, le premier mécanisme du NPQ qui est activé lors d'un excès d'énergie est le cycle des xanthophylles (Bilger et Björkman, 1990; Niyogi *et al.*, 1998) alors que, chez les cyanobactéries, l'état de transition est celui qui est sollicité le premier (Joshua *et al.*, 2005 ; Bailey et Grossman, 2008).

## 1.8 Sensibilité du phytoplancton

Toutes les espèces de phytoplancton ne sont pas également sensibles aux stress environnementaux. En effet, certaines espèces sont extrêmement sensibles et sont

utilisées comme biomarqueur d'un environnement pollué (Torres *et al.*, 2008). D'autres sont au contraire beaucoup plus résistantes et peuvent donc devenir dominantes dans un environnement stressé. Par exemple, il a été démontré que certaines chlorophytes et baccilariphyses sont plus résistantes à l'atrazine et aux changements de lumière (Deblois *et al.*, 2013). Alors que certaines cyanobactéries peuvent être plus résistantes aux changements de température (Chalifour et Juneau, 2011) ou encore, plus résistantes aux UV-B (Campbell *et al.*, 1998) que d'autres espèces. Si des organismes comme les cyanobactéries deviennent dominantes dans un milieu, cela peut poser problème. En effet, il est connu que certaines souches peuvent être toxiques et ainsi avoir des répercussions sur les autres organismes vivants dans ces mêmes milieux (Demott *et al.*, 1991 ; Christoffersen, 1996 ; Ferrão-Filho *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2002). De plus, les cyanobactéries, qu'elles soient toxiques ou non, constituent une nourriture de moins bonne qualité pour les animaux se nourrissant de phytoplanctons. En effet, leur constitution en acide gras hautement saturé (HUFA : *highly unsaturated fatty acid*) est moins importante que pour les algues vertes par exemple (Demott et Müller-Navarra, 1997). Étant moins nutritive, elles peuvent nuire à la santé des animaux qui s'en nourrissent, pouvant aussi engendrer un débalancement des populations de ces écosystèmes.

## CHAPITRE II

### COMBINED EFFECT OF ATRAZINE AND UV-B ON PHYTOPLANKTON.

ANDRÉANNE GIRARD KEMP, MARCELO PEDROSA GOMES AND PHILIPPE JUNEAU\*.

Department of Biological Sciences, TOXEN, Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms Laboratory, Université du Québec à Montréal, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada

\*Author for correspondence

To be submitted to Aquatic Toxicology.

Contributions: Pour ce chapitre, Andréanne Girard Kemp a élaboré le plan d'expérience avec l'aide de Philippe Juneau. Elle a réalisé les bioessais en laboratoire et l'analyses des résultats. Marcelo Pedrosa Gomes a participé à certains bioessais. La rédaction a été effectuée par Andréanne Girard Kemp et Philippe Juneau.

## 2.1 Abstract

The use of pesticides such as atrazine and the increase of ultraviolet radiation (UV-B) due to the depletion of the ozone layer are environmental stresses that can affect organisms such as phytoplankton. Since environmental stresses never act alone, it is important to study the effects engendered by their combination. To better understand how the combination of UV-B and atrazine affects the health of primary producers, photosynthesis of green algae and two strains of cyanobacteria were measured. In growth chamber, *Scenedesmus obliquus* (CPCC5) and *Microcystis aeruginosa* (CPCC632 and CPCC299) were submitted to  $0.1\mu\text{M}$  of atrazine and to 3 hours of UV-B ( $0.1\text{Wm}^{-2}$  or  $0.2\text{Wm}^{-2}$ ) exposure. Photosynthetic parameters were studied to assess the combined effects of the stress factors in the phytoplankton health. For *M. aeruginosa* CPCC299, the decrease in photosynthesis caused by atrazine (33%) was amplified by 30% by a UV-B exposure and for *S. obliquus*, it was amplified by 67%. The synergistic effect observed in *S. obliquus* is caused by the increase of reactive oxygen species (ROS) and the degradation of carotenoids pigments. In addition, the different effects found between species can be explained by the differences in their photoprotective pigments (carotenoids) content. Our results reinforce the importance of considering environmental factors such as UV-B in toxicological studies involving pesticides.

**Key words:** algae, cyanobacteria, UV-B, herbicide, photosynthesis, photoinhibition, non-photochemical quenching, PSII quantum yield, heat-dissipation.

## 2.2 Résumé

L'épandage de pesticides dans les champs et l'augmentation de rayon ultraviolet à la surface de la Terre dû à la détérioration de la couche d'ozone sont des stress environnementaux qui peuvent affecter certains organismes comme le phytoplancton. Puisque les stress environnementaux ne surviennent jamais un à un, il est très important d'étudier les impacts qu'engendre leur combinaison. Afin de mieux comprendre comment cette combinaison affecte la santé de ces producteurs primaires, la photosynthèse d'une algue verte et de deux souches de cyanobactéries a été mesurée. En chambre de croissance contrôlée, *Scenedesmus obliquus* et *Microcystis aeruginosa* (CPCC632 et CPCC299) ont été exposé à  $0,1\mu\text{M}$  d'atrazine ainsi qu'à 3h/jour d'UVB ( $0,15 \text{ Wm}^{-2}$  ou  $0,4\text{Wm}^{-2}$ ). Plusieurs paramètres ont été étudiés pour évaluer l'effet combiné de ces stress environnementaux sur la santé de ces organismes. Pour *M. aeruginosa* CPCC299, la diminution de la photosynthèse cause par l'atrazine (33%) a été amplifiée de 30% par une exposition aux UV-B alors que pour *S. obliquus*, elle a été amplifiée de 67%. Cet effet synergique observe chez *S. obliquus* est causé par l'augmentation d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et la dégradation de pigments de caroténoïdes. De plus, les différents effets remarqués entre les espèces peuvent être expliqués par leur différence de contenu de pigments photoprotecteur (caroténoïdes). Nos résultats démontrent l'importance de prendre en considération les facteurs environnementaux tels que les UV-B lors d'étude toxicologique impliquant des pesticides.

Mots clés: algues, cyanobactéries, UV-B, herbicide, photosynthèse, photoinhibition, quenching non photochimique, rendement photosynthétique du PSII, dissipation de chaleur.

### 2.3 Introduction

Phytoplankton is very important for aquatic ecosystems since it provides food for many organisms and is responsible for about 70% of the global oxygen production (Fenical, 1983). However, it is also very sensitive to anthropogenic and environmental stressors, such as herbicides and light (Neale *et al.*, 1998; Cloern, 1999 and Rost and Wolf-Gladrow, 2008). Among the herbicides, atrazine is widely used in agriculture around the world (Graymore *et al.*, 2001), is the most frequently detected pesticides in aquatic ecosystems (Sullivan *et al.*, 2009; Giroux, 2010). This herbicide blocks the electron transport chain at the Q<sub>B</sub> binding site on the D1 protein of photosystem II (Fedtke and Duke, 2005), causing an accumulation of energy at the PSII reaction center. This excess of energy is then dissipated by fluorescence, heat emission (Müller *et al.*, 2001 and Schreiber *et al.*, 1986). Excess energy can be transferred to oxygen molecules resulting in the generation of reactive oxygen species (ROS). ROS can have some deleterious effect on the cell, such as, pigment degradation, lipid peroxidation and inhibition of the photodamage's repair processes (Nishiyama *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2007 and Krieger-Liszakay *et al.*, 2008). For green algae, those deleterious effects can decrease the photosynthetic electron transport and, consequently, the pH gradient formation across the thylakoid membranes. This disturbance on the pH leads to the non-induction of the xanthophyll cycle, which is a protective mechanism against light stress (Demmig-Adams, 1990 ; Müller *et al.*, 2001).

Anthropogenic activities have been shown to cause the depletion of the atmospheric ozone layer, resulting in a significant increase in the UV-B radiation reaching Earth's surface (Frederick, 1993). Like atrazine, UV-B radiation also induces the formation of ROS in phytoplankton (Panagopoulos *et al.*, 1990; Foyer *et al.*, 1994; Smirnoff, 1998; He and Häder, 2002, and Mahdavian, 2008), which can provoke lipid peroxidation and structural and functional damage to several proteins

and other cell components (Panagopoulos *et al.*, 1990; Foyer *et al.*, 1994; Smirnoff, 1998; Mahdavian, 2008 and He and Häder, 2002). In green algae and cyanobacteria, UV-B also directly degrades chlorophyll and carotenoids (Suresh *et al.* 1998 and Bischof *et al.*, 2002). Furthermore, UV-B radiation affects the D1 and D2 proteins of the PSII leading to a decrease in oxygen evolution and electron transport (Xiong *et al.*, 1997 and Bouchard *et al.*, 2006).

Since both atrazine and UV-B radiation are environmental stresses that can affect phytoplankton photosynthesis through their inhibitory effects on D1 protein, one can advance that a combination of these stressors would have an additive effect. However, UV-B also interacts with photoprotective pigments and enzymes. Most of the time UV-B are known to degrade carotenoids (Bishof *et al.*, 2002), which could lead to an amplification of atrazine toxicity and then to a synergistic toxic effect. On the other hand, it was also demonstrated that UV radiation could enhance the production of photosynthetic pigments such as chlorophyll a and carotenoid (Yakovleva and Titlyanov, 2001), which could lead to the diminution of the atrazine toxicity. Only a few studies have investigated the combined effects of herbicide and UV-B on photosynthesis (Wang *et al.*, 2007 and Chen *et al.*, 2012) and none of them used atrazine, although its frequent utilization. Understanding the combined mode of action of these two stressors on phytoplankton may help to better understand the species dynamic in natural aquatic environments of agricultural areas.

The main goal of this study is to determine how atrazine and UV-B affect the photosynthesis of a toxic and a non-toxic strain of cyanobacteria and green algae. This study also aims to evaluate the phytoplankton sensitivity variation by evaluating photosynthetic performances.

## 2.4 Materials and Methods

### 2.4.1 Cultures

The green alga *Scenedesmus obliquus* (CPCC5), the toxic and the non-toxic strains of cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* (CPCC299 and CPCC632) were grown at 24°C in Erlenmeyer flasks containing fresh Bold basal medium (BBM). The cultures were adapted for at least 10 generations to a pattern of several light intensities changing over the day (Fig. 2.1). The light was provided by a combination of fluorescent tubes (Philips F72T8/TL841/HO, USA) and incandescent bulbs (DuraMax, Philips Electronics LTD, Canada). Light intensity and quality was measured by the *HR4000 High-Resolution Spectrometer* (Ocean optics Inc., USA) and analyzed with *Spectra Suite* software (Ocean optics Inc., USA).

### 2.4.2 Treatments

For each UV-B or atrazine treatments, when adapted cultures reached  $5 \times 10^5$  cell/ml, they were divided into nine beakers that were placed on a turning plate in a growth chamber (MTR30, Conviron, Manitoba, Canada) (under the same light conditions than described previously) for further treatments. Cellular concentrations were obtained using a Multisizer 3 Coulter Counter particle analyzer (Beckman Coulter Inc., USA). The plate rotates at one turn per hour so every replicate were exposed to the exactly same light intensity/quality.

Cultures were exposed to six different treatments (Table 2.1). Atrazine concentration and UV-B doses were chosen based on what can be found in natural environment (Solomon *et al.*, 1996; Giroux, 2010, West *et al.*, 2003 and Arts and Rai, 1997). The atrazine solution was obtained from the dilution of the commercial Aatrex 480 liquid herbicide (Syngenta, Plattsburgh, Canada) in distilled water. The UV-B radiation was provided by UV-B Broadband TL tubes (Philips TL20W/12, USA) and Mylar polyester film (DuPont Teijin Films<sup>TM</sup>) used to remove UV-C radiations. For

treatments with atrazine, the herbicide was added at 10:30 AM and for the UV-B treatment, the lamps were activated from 11:30 AM to 2:30 PM (Fig. 2.1).

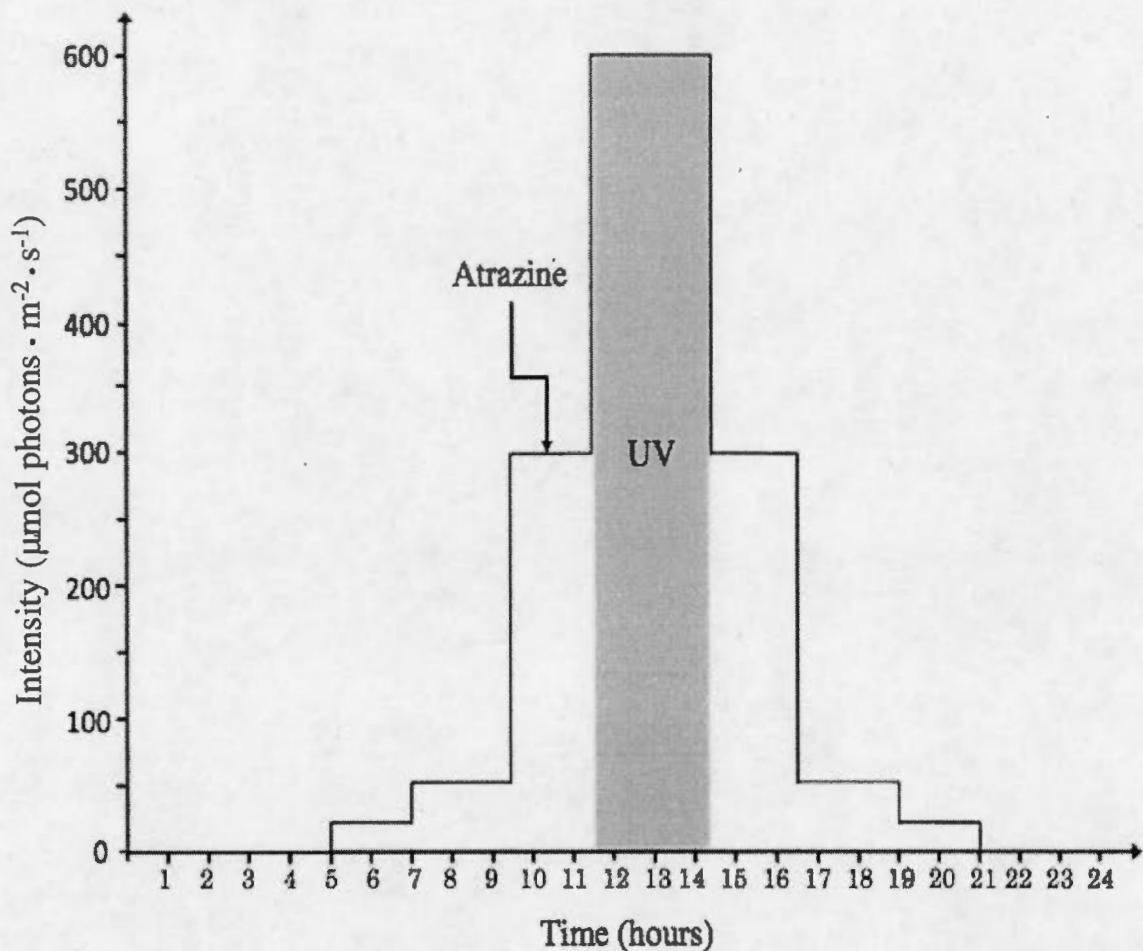


Figure 2.1 Light variation ( $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) and exposure times of atrazine and UV-B within 24 hours.

Table 2.1 Experimental treatments with the control (PAR light only) and the respective UV-B (Low UV-B or high UV-B intensity;  $\text{Wm}^{-2}$ ) and atrazine (Atz;  $\mu\text{M}$ ) doses.

		UV-B		
		0 $\text{Wm}^{-2}$	0.1 $\text{Wm}^{-2}$	0.2 $\text{Wm}^{-2}$
Atrazine	0 $\mu\text{M}$	PAR	L-UV	H-UV
	0.1 $\mu\text{M}$	Atz	L-UV + Atz	H-UV + Atz

#### 2.4.3 Photosynthetic activity measurements

At 2:30 PM, a beaker from each replicate culture was removed from the growth chamber for fluorescence measurements (Pulse Amplitude Modulated; PAM and Plant Efficiency Analyzer; PEA). Before every PAM and PEA measurements, the samples were dark adapted for 15 min to reoxidize completely the PSII electron acceptors. A light curve was obtained with the Water-PAM fluorometer (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) and the following parameters were calculated. Photodamage was estimated by the maximum PSII quantum yield,  $\Phi_M = (F_M - F_0)/F_M$ , where  $F_M$  is the maximum fluorescence after a saturating flash ( $3000 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) and using  $10 \mu\text{M}$  of diuron (DCMU) to assure the reduction of all PSII centers (Campbell *et al.*, 1998) and where  $F_0$  is the minimal fluorescence, i.e. fluorescence in the dark (Kitajima and Butler, 1975). The alteration of the PSII-PSI electron transport was evaluated by the operational PSII quantum yield,  $\Phi'_M = (F'_M - F_s)/F'_M$ , where  $F_s$  is the fluorescence at steady state of electron transport measured at experimental irradiance and  $F'_M$  is the maximum fluorescence of illuminated cells obtained by a saturating flash (Genty *et al.*, 1989). The non-photochemical quenching (NPQ) a protective mechanism to cope with an excess of energy, was also measured ( $\text{NPQ} = (F_M - F'_M)/F'_M$ ; Bilger and Björkman, 1990). PEA fluorometer (Hansatech Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK) was used to measure the effective antenna size of active RC,  $\text{ABS}/\text{RC} = (\text{TR}_0/\text{RC})/(\text{TR}_0/\text{ABS})$ ,  $\text{TR}_0/\text{RC} = M_0/V_j$ , where  $M_0$  is the ratio of closed PSII and  $V_j$  is the closed reaction center rate, and  $\text{TR}_0/\text{ABS} = (F_M$

$-\text{F50}\mu\text{s})/\text{F}_M$ , where  $\text{F50}\mu\text{s}$  is the fluorescence at  $50\mu\text{s}$ . PEA was also used to evaluate the electron transport in active RC,  $\text{ET}_0/\text{RC} = (\text{M}_0/\text{V}_j) \cdot (1 - \text{V}_j)$ , and the effective dissipation in active RC,  $\text{DI}_0/\text{RC} = ((\text{ABS}/\text{RC}) - (\text{TR}_0/\text{RC}))$ ; Forces *et al.* 2003).

#### 2.4.4 Pigment analysis

For pigment determination, cultures were filtered on membrane filters ( $0.8\mu\text{m}$ , Xingya Purifying Materials Factory, Shanghai, China) and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Chlorophyll *a* and *b*,  $\beta$ -carotene and zeaxanthin were extracted from frozen filters by adding 1ml of acetone and sonicated (Fisher Scientific Sonic Dismembrator, level 4) six times for 30 seconds in ice cold water. The extracts were centrifugated at 15000g for 20 minutes. The supernatant was collect for U-HPLC analysis. U-HPLC analysis were done using an Agilent 1290 infinity LC with a C-18 reverse phase column (2.1 X 100mm,  $1.8\mu\text{m}$ ) with the EZchrom software according to García-Plazaola and Becerril (1999) with the following adjustment for the use of an U-HPLC. The mobile phase consisted of two components: solvent A, acetonitrile:methanol:water (84:9:7); and solvent B, methanol:ethyl acetate (68:32). The pigments were eluted using a linear gradient from 100% A to 100% B of 6 min, followed by an isocratic elution with 100% B of 4 min. This was followed by a 0.33 min linear gradient from 100% B to 100% A and an isocratic elution with 100% A for a further 7 min to allow the column to re-equilibrate with solvent A prior to the next injection. The solvent flow rate was 0.5 mL/min, the pressure was around 150 bars and the injection volume was 5  $\mu\text{L}$ . For overnight storage, the column was rinsed with 100% acetonitrile. Finally, the peaks were detected and integrated at 445 nm. Pigments concentrations were calculated from peak areas of authentic external standards (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and spike recovery tests were conducted to assure the efficiency of the extraction method. More specifically, tissue spikes of the Chlorophyll *a*,  $\beta$ -carotene and zeaxanthin standards were recovered at 98%, 95%, and 90 %, respectively. Pigment concentrations were normalized to the number of cells.

For the two strains of cyanobacteria, the concentration of phycocyanin (PC) and allophycocyanin (APC) were also measured. Filters were homogenized in 0.1M phosphate buffer pH 6.8 and frozen and tawed four times for extraction. The extract was then centrifuged at 6000g for 10 minutes and the absorbance of the supernatant was measured at 565 nm, 615 nm and 650 nm. The PC and APC concentration was calculated using the following equations: PC ( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $163.2 A_{615} - 117.1 A_{650}$ , and APC ( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $165.6 A_{650} - 16.4 A_{615}$  (Lüder *et al*, 2001). Pigment concentrations were normalized to the number of cells.

#### 2.4.5 Lipid Peroxydation

To assess the extent of oxidative stress, lipid peroxydation was measured after harvesting phytoplankton on filters as described for the pigment determination. Malondialdehyde (MDA), the product of lipid peroxydation, was determined and adapted from a colorimetric method (Heath and Packer, 1968). Briefly, frozen filters were homogenized in 1 ml of phosphate buffer (50mM) containing 0.67% trichloroacetic acid. The extraction was performed by a 3 minutes (3 x 1 minute) sonication followed by an incubation at 95°C for 30 min. The reaction was stopped by putting the samples in a bucket of ice cold water. The samples were centrifuged at 15000 g for 20 min and the supernatant was read at 532nm with a correction at 600nm for nonspecific absorption. Finally, the MDA concentrations were normalized by the cells number.

#### 2.4.6 Statistical analysis

JMP 5.1 statistical software (SAS institute, USA) was the program used to perform statistical tests. One-way analysis of variance (ANOVA) and Student *t*-test were used to compare treatments. Significant differences were accepted when  $p < 0.05$ . A synergistic effect was considered when the combined effect was significantly higher than the addition of the two stresses effect alone. One-way analysis of variance

(ANOVA) was also performed to compare the effects with significant differences accepted when  $p<0.05$ .

## 2.5 Results

The atrazine treatment had no significant effect on  $F_0/\text{cell}$  for the two strains of cyanobacteria. On the other hand, it induced an increase of 76% for *S. obliquus*. Atrazine caused a decrease of 10% and 16% in the maximal PSII quantum yield ( $\phi_M$ ) for *M. aeruginosa* CPCC299 and *M. aeruginosa* CPCC632 respectively. It decreased also the operational PSII quantum yield ( $\phi'_M$ ) of the three species (Table 2.2). The NPQ was diminished by 34% and 35% for *M. aeruginosa* CPCC299 and *S. obliquus* respectively (Table 1S).

Table 2.2 Photosynthetic parameters of *M. aeruginosa* CPCC632, CPCC299 and *S. obliquus* CPCC5 exposed to PAR light (188  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), two intensities of UV-B light (0.1  $\text{Wm}^{-2}$  and 0.2  $\text{Wm}^{-2}$ ) and atrazine (0.1  $\mu\text{M}$ ) at 2:30PM.

Species	Parameters	PAR	Atz	L-UV	L-UV + Atz	H-UV	H-UV + Atz
<i>M. aeruginosa</i>	$F_0 \times 10^4/\text{cell}$	3.65 (0.18)	4.08 (0.30)	4.50 (0.26)*	4.87 (0.31)*	4.72 (0.42)*	5.17 (0.30)*
CPCC299	$\phi_M$	0.546 (0.019)	0.489 (0.002)*	0.458 (0.042)*	0.414 (0.010)*	0.336 (0.026)*	0.354 (0.029)*
	$\phi'_M$	0.312 (0.34)	0.209 (0.006)*	0.252 (0.038)*	0.160 (0.010)*	0.194 (0.029)*	0.121 (0.023)**
	NPQ	0.246 (0.033)	0.163 (0.010)*	0.209 (0.023)*	0.127 (0.014)**	0.151 (0.013)*	0.146 (0.018)*
<i>M. aeruginosa</i>	$F_0 \times 10^4/\text{cell}$	3.58 (0.41)	4.42 (0.14)	8.05 (0.69)*	6.30 (0.43)**	5.19 (0.19)*	5.93 (0.77)**
CPCC632	$\phi_M$	0.609 (0.008)	0.547 (0.026)*	0.458 (0.012)*	0.398 (0.007)**	0.268 (0.008)*	0.352 (0.022)**
	$\phi'_M$	0.391 (0.006)	0.289 (0.007)*	0.267 (0.026)*	0.142 (0.026)**	0.056 (0.008)*	0.044 (0.038)*
	NPQ	0.260 (0.037)	0.207 (0.042)	0.202 (0.074)	0.134 (0.032)*	0.122 (0.018)*	0.168 (0.012)*
<i>S. obliquus</i> CPCC5	$F_0 \times 10^4/\text{cell}$	3.17 (0.19)	5.58 (0.78)*	6.80 (0.65)*	6.98 (0.44)*	4.37 (0.34)*	7.49 (0.33)**
	$\phi_M$	0.717 (0.006)	0.702 (0.005)	0.472 (0.013)*	0.397 (0.035)**	0.531 (0.053)*	0.260 (0.015)**
	$\phi'_M$	0.481 (0.013)	0.409 (0.010)*	0.291 (0.008)*	0.201 (0.028)**	0.307 (0.057)*	0.089 (0.012)**
	NPQ	0.772 (0.014)	0.502 (0.034)*	0.519 (0.151)*	0.237 (0.084)**	0.490 (0.095)*	0.117 (0.059)**

The symbol \* represents significant difference ( $p < 0.05$ ) from the control (PAR), the symbol \*\* represents significant difference from the control (PAR), the atrazine treatment (Atz) and the respective UV-B treatment (L-UV or H-UV). Analysis and treatment means are from ANOVA ( $n=3$ ).

The L-UV treatment caused an increase of the  $F_0/\text{cell}$  for the three studied species. We also noticed an increase of the  $F_0/\text{cell}$  of all species for the H-UV treatment (Table 2.2). A decrease in the  $\phi_M$  and the  $\phi'_M$  was detected for both high and low UV-B intensities for the three species (Table 2.2). The L-UV treatment caused a decrease of the NPQ for *M. aeruginosa* CPCC299 (15%) and *S. obliquus* (32%), while the H-UV treatment caused a decrease of the NPQ for the three species (Table 1S).

The addition of a low dose of UV-B to the atrazine treatment caused an increase in the  $F_0/\text{cell}$  compared to the control for all species (Table 2.2). This treatment induced a decrease of the photosynthetic activity and the NPQ compared to the control for all species (Table 2.2) Compared to the effect induced by the UV-B treatment alone, the combination of UV-B and atrazine induced a more important decrease only for the NPQ of *M. aeruginosa* CPCC299 (NPQ-L-UV + Atz: 48%; NPQ-L-UV: 15%), for the photosynthetic activity of *M. aeruginosa* CPCC632 (Table 1S) and for the NPQ and the photosynthetic activity of *S. obliquus* (Table 1S).

The addition of a high dose of UV-B to the atrazine treatment caused an increase of the  $F_0/\text{cell}$  compared to the control for all species and this increase was always significantly stronger than the one caused by UV-B alone (CPCC299: 41%; CPCC632: 66% and CPCC5: 136%; Table 1S). Moreover, this treatment caused a decrease in the  $\phi_M$ ,  $\phi'_M$  and NPQ compared to the control for the three studied phytoplankton (Table 2.2). Finally, the decrease is greater than the one generated by UV-B alone only for the operational PSII quantum yield of *M. aeruginosa* CPCC299 parameters ( $\phi'_M$ -H-UV + Atz: 61% and  $\phi'_M$ -H-UV: 38%) and for the three studied parameters of *S. obliquus* (Table 1S).

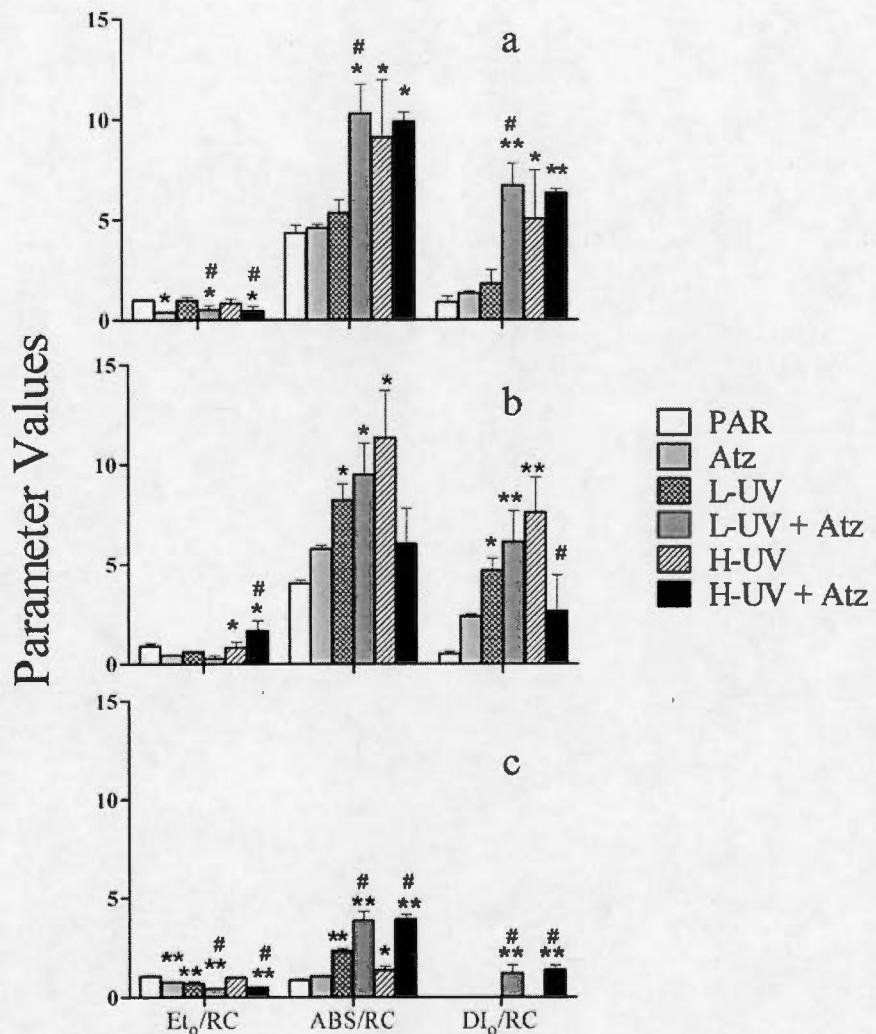


Figure 2.2 Photosynthesis parameters of *M. aeruginosa* CPCC299 (a), CPCC632 (b) and *S. obliquus* CPCC5 (c) exposed to PAR light ( $188 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), two intensity of UV-B light ( $0.1 \text{ Wm}^{-2}$  and  $0.2 \text{ Wm}^{-2}$ ) and atrazine ( $0.1 \mu\text{M}$ ) at 2:30PM. The symbol \* demonstrates a significant difference from the control ( $p<0.05$ ). The symbol \*\* shows a significant difference from the control ( $p< 0.001$ ) and the symbol # represent a significant difference from the respective UV-B treatment (L-UV or H-UV) and from atrazine treatment. Analysis and treatment means are from ANOVA ( $n=3$ ).

The atrazine treatment induced a significant decrease of the  $Et_0/RC$  for the toxic strain of *M. aeruginosa* (61%) and for *S. obliquus* (27%), but did not affect the  $Et_0/RC$  for the non-toxic strain of *M. aeruginosa*. The atrazine treatment also increased significantly the  $DI_0/RC$  (17%) for the green alga.

The L-UV treatment caused no significant effect for *M. aeruginosa* CPCC299, but it induced an increase of the ABS/RC (104%) and the  $DI_0/RC$  (840%) for *M. aeruginosa* CPCC632. For *S. obliquus*, a low dose of UV-B decreased the  $ET_0/RC$  (32%) and increased the ABS/RC (170%), the  $TR_0/RC$  (14%) and the  $DI_0/RC$  (81%). On the other hand, the H-UV treatment increased the ABS/RC (CPCC299: 110%; CPCC632: 181% and CPCC5: 57%) and the  $DI_0/RC$  (CPCC299: 473%; CPCC632: 1418% and CPCC5: 33%) for the three studied phytoplankton.

The combination of a low UV-B dose to an atrazine treatment decreased the  $ET_0/RC$  (48%) and increased the ABS/RC (138%) and the  $DI_0/RC$  (663%) for *M. aeruginosa* CPCC299, but for *M. aeruginosa* CPCC632, it only increased the ABS/RC (135%) and the  $DI_0/RC$  (1124%). The green alga showed a decrease in the  $ET_0/RC$  (57%) and an increase in the ABS/RC (350%), the  $TR_0/RC$  (19%) and the  $DI_0/RC$  (33%). Moreover, the effect caused by the combination of the two stresses was more important than the one caused by an exposure of L-UV alone. The addition of a high dose of UV-B to an atrazine treatment caused a decrease in the  $ET_0/RC$  (52%) and an increase in the ABS/RC (128%) and the  $DI_0/RC$  (619%) for the toxic strain of cyanobacteria. On the other hand, this treatment caused an increase in the  $ET_0/RC$  (86%) and the  $DI_0/RC$  (426%) for the non-toxic strain of cyanobacteria. Finally, *S. obliquus* showed a decrease in the  $ET_0/RC$  (54%) and an increase in the ABS/RC (357%), the  $TR_0/RC$  (15%) and the  $DI_0/RC$  (199%). Also, the effect caused by the two stresses together was more important than the one caused by the UV-B treatment alone for *M. aeruginosa* CPCC632 and for *S. obliquus*.

**Table 2.3** Pigments concentration (pg/cell) of *M. aeruginosa* CPCC632, CPCC299 and *S. obliquus* CPCC5 exposed to PAR light (188  $\mu\text{mol}$  photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), two intensity of UV-B light (0.1  $\text{W m}^{-2}$  and 0.2  $\text{W m}^{-2}$ ) and atrazine (0.1  $\mu\text{M}$ ) at 2:30PM.

Species	Pigments	PAR	Atz	L-UV	L-UV + Atz	H-UV	H-UV + Atz
<i>M. aeruginosa</i> CPCC299	Zeaxanthin	4.50 (0.05)	7.73 (0.47)*	5.92 (1.10)*	6.33 (0.24)*	6.51 (0.81)*	5.96 (0.80)*
	Chl <i>a</i>	75.53 (4.12)	26.38 (7.53)*	60.51 (11.05)	103.13 (33.31)	115.01 (37.71)	11.12 (1.82)*
	Chl <i>b</i>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	Chl <i>b</i> / Chl <i>a</i>	0.71 (0.16)	0.21 (0.17)*	0.57 (0.15)	0.80 (0.25)	0.84 (0.21)	0.05 (0.01)*
	$\beta$ - Carotene	0.06 (0.04)	1.29 (0.14)	0.37 (0.39)	0.27 (0.26)	3.07 (2.21)*	1.38 (0.14)*
	PC/APC	1.76 (0.26)	1.40 (0.16)	1.51 (0.06)	1.20 (0.26)*	1.33 (0.29)*	1.16 (0.05)*
<i>M. aeruginosa</i> CPCC632	Zeaxanthin	6.27 (0.09)	11.03 (2.18)*	6.15 (0.70)	5.41 (0.10)	8.49 (0.95)*	14.33 (2.53)*
	Chl <i>a</i>	63.82 (11.91)	18.01 (9.88)*	19.47 (5.78)*	71.20 (23.25)	17.31 (2.71)*	16.64 (5.42)*
	Chl <i>b</i>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	Chl <i>b</i> / Chl <i>a</i>	0.84 (0.50)	0.13 (0.06)*	0.06 (0.03)*	0.49 (0.19)	0.14 (0.06)*	0.12 (0.05)*
	$\beta$ - Carotene	0.27 (0.30)	1.63 (0.28)*	0.69 (0.05)	0.17 (0.11)	2.48 (0.41)*	1.57 (0.02)*
	PC/APC	1.72 (0.09)	1.53 (0.12)	1.52 (0.03)	1.37 (0.09)*	1.36 (0.25)*	1.39 (0.02)*
<i>S. obliquus</i> CPCC5	Zeaxanthin	7.68 (1.72)	9.03 (2.71)	22.05 (6.13)	13.59 (7.64)	7.75 (1.62)	13.31 (13.12)
	Chl <i>a</i>	496.12 (75.90)	792.8 (237.4)	679.7 (174.4)	706.6 (94.00)	936.7 (415.3)	457.72 (150.5)
	Chl <i>b</i>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	Chl <i>b</i> / Chl <i>a</i>	1.51 (0.58)	2.26 (0.44)	1.50 (0.63)	3.13 (2.16)	3.02 (0.73)	2.72 (0.29)
	$\beta$ - Carotene	0.79 (0.76)	0.07 (0.05)*	0.11 (0.09)*	u.	u.	0.08 (0.09)*

The symbol \* shows significant difference ( $P<0.05$ ) from the control and u. means undetectable. Analysis and treatment means are from ANOVA ( $n=3$ ). For zeaxanthin, chlorophyll *a* and  $\beta$ - Carotene a factor  $10^3$  is added. The annotation n.d. was written for results that the quantity of pigment could not be calculated because of a delay in the external standard delivery.

For the two strains of cyanobacteria, the zeaxanthin was increased with the higher doses of UV-B treatments (CPCC299-H-UV :34%; CPCC632-H-UV :55%; CPCC299-H-UV + Atz :64%; CPCC632-H-UV + Atz :189%) but for *S. obliquus*, there were no significant changes between the treatments for this pigment. For *M. aeruginosa* CPCC 299, the chlorophyll *a* and *b* contents were decreased for the atrazine treatment and the H-UVB + atrazine treatment. For *M. aeruginosa* CPCC 632, the chlorophyll *a* and *b* contents were decreased for the majority of the treatments while there was no significant change in chlorophyll content for *S. obliquus*. Surprisingly, the  $\beta$ -carotene content was increased for the two cyanobacteria with the stronger doses of UV-B (CPCC299-H-UV: 301%; CPCC632-

H-UV: 907%; CPCC299-H-UV + Atz : 150%; CPCC632-H-UV + Atz: 607%) while it was decreased at every treatment for *S. obliquus*. For both the strains of cyanobacteria, the ratio PC/APC decreases under high stress condition. In fact, the combination of L-UV and atrazine causes the ratio to decrease of 32% for *M. aeruginosa* CPCC299 and of 20% for *M. aeruginosa* CPCC632. An exposition of H-UV caused a decreased of 24% and of 20% for both *M. aeruginosa* CPCC299 and *M. aeruginosa* CPCC632 respectively. Moreover, the addition of atrazine to this UV-B intensity caused a diminution in the ratio of 34% and of 19% respectively.

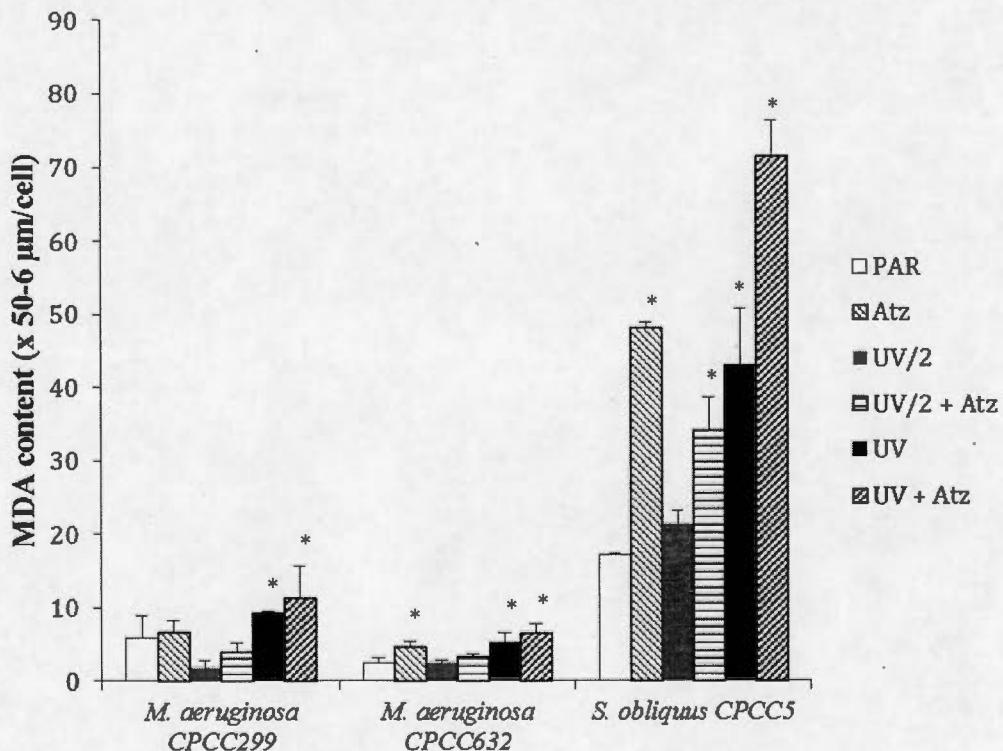


Figure 2.3 Cellular MDA content ( $\times 50^{-6} \mu\text{m}/\text{cell}$ ) of *M. aeruginosa* CPCC632, CPCC299 and *S. obliquus* CPCC5 exposed to PAR light ( $188 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), two intensity of UV-B light ( $0.1 \text{ Wm}^{-2}$  and  $0.2 \text{ Wm}^{-2}$ ) and atrazine ( $0.1 \mu\text{M}$ ) at 2:30PM. The symbol \* represent a significant different difference from the control ( $p<0.05$ ). Analysis and treatment means are from ANOVA ( $n=3$ ).

1.8.1

For *M. aeruginosa*, the MDA content was significantly increased for the H-UV treatment and the combination H-UV with atrazine (Figure 2.3). The non-toxic strain of *M. aeruginosa* seems also to increase its MDA content in presence of atrazine alone. For the green alga, the MDA content was increased for all treatments except the low dose of UV-B.

## 2.6 Discussion

### 2.6.1 Atrazine effect

Despite the maximum concentration of 1.8 µg/L (0.0084µM) established by Canada for the protection of aquatic life (CCME, 1999), atrazine is often present in rivers at concentrations higher than 20 µg/L (0.092 µM; Solomon *et al.*, 1996; Giroux, 2010) and can reach 100µg/L (0.46µM; DeLorenzo, 2001). It was previously shown that a concentration as low as 0.1µM can have a deleterious effect on photosynthesis of phytoplankton (Chalifour and Juneau, 2011; Ralph 2000).

Our photosynthetic results further support these observations. In accordance with previous studies (Chalifour and Juneau, 2011; Deblois *et al.*, 2013), we noticed a decreased in the maximal PSII quantum yield of the two *M. aeruginosa* strains (although not significantly for 632). The electron transport rate in active reaction centers ( $E_t/RC$ ) was also affected by the presence of atrazine. This effect on the PSII electron transport rate may be explained by the mode of action of atrazine, which interacts with the  $Q_B$  binding site on the D1 protein (Fedtke and Duke, 2005). A blockage of the electron transport leads to an accumulation of energy at the PSII level that needs to be dissipated (Müller *et al.*, 2001 and Schreiber *et al.*, 1986). One of the efficient energy dissipation pathways is heat dissipation and as we found in our experiment,  $DI/RC$  increased for all strains in presence of atrazine. It seems however that heat dissipation was not sufficient to dissipate excess energy and some production of Reactive Oxygen Species occurred (as seen by the lipid peroxidation damages observed; Table 4). The observed effects on the PSII photochemical activity

may therefore be explained by the electron transport blockage and the increased presence of ROS. Higher ROS production was previously demonstrated when *Chlorella vulgaris* was exposed to atrazine (Qian *et al.*, 2008), and was shown to increase MDA level and alter gene transcription, subcellular structure, and physiological state. This ROS production may lead to the destruction of various proteins such as D1 and therefore induces photoinhibition (Vass *et al.*, 1992; Xiong *et al.*, 1997; Allakhverdiev and Murata, 2004; Nishiyama *et al.*, 2004 and Murata *et al.*, 2007).

The effects on the PSII photochemical activity are also reflected in a drop in the operational quantum yield ( $\phi'_M$ ; Table 2.2). For *S. obliquus* this decrease causes the reduction of pH gradient across the thylakoid membrane and therefore a decrease in the xanthophyll cycle activity, which is the main component of NPQ. Eventually, the reduction of NPQ leads to a decreased on the PSII photochemical activity. On the other hand, cyanobacteria do not have xanthophyll cycle then the main component of NPQ become state transition (Bailey and Grossman, 2008). State transition is the movement of light harvesting complexes from photosystem II to photosystem I to equilibrate energy (Bonaventura and Myers, 1969 and Wollman, 2001) between them in order to prevent photoinhibition (Keren and Ohad, 1998) and it is regulated by the quinone reduction (Mullineaux and Allen, 1992). Here, the electron transport chain was blocked by atrazine leading to the quinones oxidation, the inhibition of the state transition and the reduction of the NPQ. A decrease in NPQ after an atrazine exposure was expected. Indeed, similar results were obtained in previous studies (Deblois *et al.*, 2013; Chalifour and Juneau, 2011).

Finally, it was showed by our results that atrazine increased the  $F_0/\text{cell}$  of *S. obliquus* while the chlorophyll content decreased. Since the antenna size of the reaction centers (ABS/RC) was not significantly affected, we may hypothesize that this treatment has also an effect on the number of reaction centers, due to the induction of oxidative stress, showed by the MDA results.

### 2.6.2 UV-B effect

As a consequence of the ozone layer depletion, UV-B radiation was shown to increase at the earth surface and doses as high as  $1.62 \text{ Wm}^{-2}$  was observed in America (Gleason and Wellington, 1995) but it can reach  $2.1 \text{ Wm}^{-2}$  in other countries (Cruce et al. 2012). These doses of UV-B can cause several damages to phytoplankton (Holzinger and Lütz, 2006 and Fernanda Pessoa, 2012). One of the main observed damage could be the direct photodegradation of the PSII D1 protein (Xiong et al., 1997 and Bouchard et al., 2006). It was previously shown that UV radiation induced the direct degradation of the D1 protein in higher plants (Panagopoulos et al., 1990; Foyer et al., 1994; Smirnoff, 1998; Mahdavian, 2008) as well as in cyanobacteria (He et Häder, 2002). This phenomenon is known to induce a decrease of the PSII activity (Walter and Horton, 1993), as demonstrated by our results where we observed a decrease of the maximal PSII quantum yield ( $\Phi_M$ ). This decrease in PSII activity leads to an accumulation of energy at this level. This energy will be caught by soluble oxygen molecules and will generate ROS. Here, the presence of ROS was, in fact, detected by the increased of MDA (Fig 2.3).

Our results showed also that, at both doses, UV-B treatments increased the  $F_0/\text{cell}$  of all species and the chlorophyll content was either decreased for *M. aeruginosa* CPCC632 or not significantly changing. Indeed, one of the consequences of an UV-B exposure is the chlorophyll degradation (Xue et al., 2005). However, as it was showed by previous studies (Sfichi et al., 2004; Albert et al., 2008), the antenna size of the reaction centers (ABS/RC) was increased by the two UV-B treatments, definitely explaining the rise in fluorescence emission ( $F_0/\text{cell}$ ).

Since heat dissipation helps the cell to cope with an accumulation of energy at the PSII (Schreiber et al., 1986; Schreiber et al., 1994; Krause et Weis, 1991; Juneau et al., 2007; Marwood et al., 2000 and Schreiber et al., 2002), it would explain the rise of this parameter ( $DI_0/\text{RC}$ ) for *M. Aeruginosa* CPCC 632 at both doses. Moreover, some pigments found in the light harvesting complexes, or

phycobilisomes, also participate in the excess energy dissipation. Indeed, pigments like carotenoids protect the photosynthetic apparatus by absorbing the excess of light energy or by acting like antioxidant molecules (Hirschberg and Chamovitz, 1994 and Salguero *et al.*, 2003). The effect of UV-B on carotenoids pigments can be very variable. Most of the time, carotenoids are degraded by UV-B radiation (Bishof *et al.*, 2002) but it was also showed that for some species, UV radiation could increase production of photosynthetic pigments (Yakovleva and Titlyanov, 2001). Here, zeaxanthin and  $\beta$ -carotene contents were increased for *M. aeruginosa* while they were degraded for *S. obliquus*. Based on the photosynthetic activity results, although the carotenoid content was increased for *M. aeruginosa*, it was not enough to protect the photoinhibition caused by the two UV-B treatments ( $0.1\text{Wm}^{-2}$  and  $0.2\text{Wm}^{-2}$ ). In cyanobacteria, other pigments, like allophycocyanin (APC) and phycocyanin (PC) and orange carotenoid protein (OCP), exist to protect the photosynthetic apparatus against a UV-B stress. Allophycocyanin and phycocyanin transfer the excitation energy to the chlorophylls antenna of PSII and PSI (Kirilovsky, 2007). Here, a decrease of the PC/APC ratio was observed for the higher doses of UV-B explaining the increase of photoinhibition despite the increase of carotenoid content. Moreover, according to Kirilovsky (2007), OCP may acts as the thermal dissipator of the excess absorbed energy in cyanobacteria. During this experiment, OCP were not dosed but we may hypothesize that by degrading those pigments, UV-B decreases protection against light stress. However, it would be interesting to measure OCP content after a UV-B exposure to confirm our hypothesis.

ASB/RC can be influenced by the pigment content and the number of PSII reaction centers (Force *et al.*, 2003). We demonstrated here that the presence of UV-B radiation increases the antenna size (ABS/RC) at low and high doses. The unchanged chlorophyll content between treatments combined to the increase in ABS/RC suggests a decrease in the numbers of reaction centers, which is also suggested by the decrease in  $\phi_M$ . Furthermore, it is known that the ROS production

and the damage to the D1 protein may lead to the reduction of the operational photosynthetic rate ( $\phi'_M$ ) of phytoplankton (Vass *et al.*, 1992; Xiong *et al.*, 1997; Allakhverdiev and Murata, 2004; Nishiyama *et al.*, 2004 and Murata *et al.*, 2007). Since UV-B directly degrades D1 protein, it was expected to see, as for the atrazine, a decrease in electron transport rate showed by the decrease of  $\phi'_M$  in all studied species. Consequently, this decrease causes the reduction of NPQ due to non-activation of the xanthophyll cycle for green algae and the state transition for cyanobacteria.

### 2.6.3 UV-B and atrazine combined effect

According to our study, a three-hour UV-B treatment ( $0.1\text{Wm}^{-2}$  and  $0.2\text{Wm}^{-2}$ ) in combination to a  $0.1\mu\text{M}$  atrazine treatment has a drastic effect on the photosynthetic activity and energy dissipation processes of the studied species. Indeed,  $E_t/\text{RC}$  was highly inhibited while the  $\text{ABS}/\text{RC}$  and the  $\text{DI}_t/\text{RC}$  were highly stimulated due to the electron transport chain blockage by atrazine and D1 protein degradation by UV-B radiation. However, for *M. aeruginosa* CPCC632 exposed to the highest dose of UV-B radiation, we observed unexpected results. The electron transport rate ( $E_t/\text{RC}$ ) was increased while the rise of the effective antenna size ( $\text{ABS}/\text{RC}$ ) and of the effective dissipation ( $\text{DI}_t/\text{RC}$ ) was not significant. These results suggest that the differences in the toxicity of the cyanobacteria may influence the effect of environmental factors as it was previously demonstrated for light intensity (Deblois *et al.*, 2013), but further research is needed to elucidate the mechanisms involved.

In presence of atrazine and for both doses of UV-B radiation the minimal fluorescence ( $F_0/\text{cell}$ ) was increased whereas the  $\phi_M$  and the  $\phi'_M$  were reduced for the studied species. As explained previously a decrease in the  $\phi_M$  and the  $\phi'_M$  was also expected because of the degradation of D1 proteins and pigments by UV-B and the blockage of the electron transport chain by atrazine. For the same reasons as

explained earlier, a decrease in NPQ was also expected after an exposure of both UV-B and atrazine. However, the combination of these factors on *Scenedesmus obliquus* had a more important effect than their individual effect. Indeed, the atrazine causes a blockage of the electron transport chain, which leads to an energy accumulation at the PSII. In addition, UV-B radiations are known to degrade DI protein and also lead to an energy accumulation at the PSII (Xiong *et al.*, 1997 ; Bouchard *et al.*, 2006). Moreover, UV-B radiations have several other effects on the photosynthetic apparatus. As shown in our study, UV-B can degrade chlorophyll, which should decrease the fluorescence per cell and the maximal PSII quantum yield. Surprisingly, the minimal fluorescence per cell is always higher for the treated samples compared to the control. As explained earlier, if the size of antenna (ABS/RC) is increasing it will affect the fluorescence emission explaining the increase of the  $F_0/\text{cell}$ . It is also known that UV-B can also degrade other pigments like carotenoids (Bischof *et al.*, 2002), which are protective pigments against photodamages and ROS. He and Hader (2002) showed that UV-B could generate ROS directly, which is in accordance with our MDA results (Fig 2.3). Thus, the synergistic effect that was found here on *Scenedesmus obliquus* can easily be explained by an enhancement of the atrazine effect caused by the degradation of protective pigments (table 2.3) against oxidative stress by UV-B radiation.

Cyanobacterial allophycocyanin and phycocyanin transfer the excitation energy to the chlorophylls antenna of PSII and PSI (Kirilovsky, 2007). Moreover, it was found that phycocyanin tends to bleach more rapidly than allophycocyanin (Sinha *et al.* 1995) and that UV-B also decrease more rapidly the content of phycocyanin than other biliproteins like allophycocyanin (Rinalducci *et al.* 2006). Recently, it was suggested that NPQ in cyanobacteria may be mediated by phycobilisomes (Kirilovsky, 2007). Thus, the decrease in the ratio PC/APC that was found in our study in presence of atrazine and UV-B can explain the decrease of NPQ found for the two strains of cyanobacteria.

For *Microcystis aeruginosa* CPCC299, we found that the operational PSII quantum yield ( $\phi'_M$ ) was more affected by the combination of stress than the maximal PSII quantum yield ( $\phi_M$ ). Indeed, when exposed to UV-B and atrazine, the ROS production would be higher under light because of the accumulation of energy that the stresses generate. This is why the PSII photosynthetic activity would be more affected at light than in the dark. It is also known that UV-B radiation can reduce RuBisCo activity (Strid *et al.* 1994), and, therefore, induce a decrease of carbon fixation. Consequently, when exposed to light, a blockage of the electron transport chain will occur (decrease of  $\phi'_M$ ), but in the dark this effect will not be shown (as seen by the unchanged  $\phi_M$ ).

Different effects were expected between species (*Microcystis aeruginosa* vs *Scenedesmus obliquus*) given that one is a cyanobacteria while the other is a green alga. However, it is interesting to see important differences of effect between the toxic and non-toxic strain of cyanobacteria. According to our photosynthetic results ( $\phi_M$  and  $\phi'_M$ ), the toxic strain (*Microcystis aeruginosa* CPCC299) was less affected by all treatments by UV-B whereas it is the opposite for the atrazine treatment. Those results may suggest the involvement of microcystins in the protection against environmental factors, but further studies need to be done.

## 2.7 Conclusion

Although environmental stresses occur simultaneously in natural environment, very few studies were done in the past to study their interactions. Mode of action of atrazine and UV-B radiations alone are well known (Jansen *et al.*, 2012; Delorenzo *et al.*, 2001), but to our knowledge the interaction of these two stresses has never been investigated on different phytoplankton species. We demonstrated that the combination of environmental doses of UV-B and atrazine had a greater effect on some species of phytoplankton than the exposure of these stresses alone. As the toxic strain of cyanobacteria proved to be less affected, these results are somewhat alarming, given the enormous environmental impact they can generate. We also showed that toxic strain of cyanobacteria had a different response to environmental stresses than the non-toxic ones suggesting a mechanistic difference between the two strains of the same species. We strongly recommended that future studies for aquatic life protection consider the effect that UV-B can have on many pesticides found in watercourses.

## 2.8 Acknowledgements

The authors would like to thank David Dewez to allow them to use his U-HPLC. This research would not have been possible without the financial support provided by Natural science engineering research council of Canada.

## 2.9 Supplementary material

**Table 1S.** Percentages of photosynthetic parameters of *M. aeruginosa* CPCC632, CPCC299 and *S. obliquus* CPCC5 exposed to PAR light ( $188 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), two intensities of UV-B light ( $0.1 \text{ Wm}^{-2}$  and  $0.2 \text{ Wm}^{-2}$ ) and atrazine ( $0.1 \mu\text{M}$ ) at 2:30PM.

Species	Parameters	PAR	Atz	L-UV	L-UV + Atz	H-UV	H-UV + Atz
<i>M. aeruginosa</i>	$F_0 \times 10^4/\text{cell}$	100	111.8 (3.46)	123.5 (7.65)*	133.7 (5.93)*	129.8 (15.9)*	142.1 (14.15)*
CPCC299	$\phi_M$	100	89.66 (3.21)*	83.8 (5.43)*	76.9 (0.93)*	61.5 (4.14)*	64.9 (4.81)*
	$\phi'_M$	100	67.5 (7.68)*	81.0 (10.4)*	51.4 (4.37)*	62.1 (6.72)*	38.4 (3.53)**
	NPQ	100	66.4 (4.82)*	85.7 (14.1)*	52.3 (8.15)**	62.3 (10.,)*	59.5 (0.77)*
<i>M. aeruginosa</i>	$F_0 \times 10^4/\text{cell}$	100	124.5 (13.0)	228.2 (45.3)*	177.9 (25.38)**	145.9 (14.9)*	165.4 (3.40)**
CPCC632	$\phi_M$	100	89.8 (4.06)*	75*.3 (1.36)	65.3 (1.57)**	44.1 (0.84)*	57.8 (2.96)**
	$\phi'_M$	100	73.9 (1.07)*	68.3 (7.17)*	36.3 (6.90)**	14.3 (2.21)*	11.1 (9.67)*
	NPQ	100	79.7 (10.5)	76.17 (20.9)	51.02 (5.01)*	46.9 (1.88)*	65.4 (9.11)*
<i>S. obliquus</i> CPCC5	$F_0 \times 10^4/\text{cell}$	100	143.1 (4.71)*	153.3 (12.93)*	154.6 (10.17)*	127.2 (7.84)*	158.1 (6.32)**
	$\phi_M$	100	97.9 (18.17)	65.8 (32.2)*	55.4 (12.2)**	74.2 (7.91)*	36.3 (12.9)**
	$\phi'_M$	100	85.1 (0.99)*	60.5 (2.29)*	41.8 (4.81)**	63.6 (10.1)*	18.6 (2.57)**
	NPQ	100	65.1 (4.47)*	67.4 (20.64)*	30.7 (10.7)**	63.5 (12.3)*	15.1 (7.65)**

The symbol \* represents significant difference ( $p < 0.05$ ) from the control (PAR), the symbol \*\* represents significant difference from the control (PAR), the atrazine treatment (Atz) and the respective UV-B treatment (L-UV or H-UV). Analysis and treatment means are from ANOVA ( $n=3$ ).

## 2.10 References

- Arts, M., & Rai, H. (1997). Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on the production of lipid, polysaccharide and protein in three freshwater algal species. *Freshwater Biology*, 38(3), 597–610.
- Albert, K. R., Mikkelsen, T. N., & Ro-Poulsen, H. (2008). Ambient UV-B radiation decreases photosynthesis in high arctic *Vaccinium uliginosum*. *Physiologia Plantarum*, 133(2), 199–210.
- Allakhverdiev, S. I., & Murata, N. (2004). Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage-repair cycle of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1657, 23–32.
- Allen JF (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1098(3), 275-335.
- Bailey, S., & Grossman, A. (2008). Photoprotection in cyanobacteria: Regulation of light harvesting. *Photochemistry and Photobiology*, 84(6), 1410–1420.
- Bilger, W., Björkman, O., (1990). Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25, 173–185.
- Bischof, K., Krabs, G., Wiencke, C., et Hanelt, D. (2002). Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophyll cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca*L. *Planta* 215(3), 502–509.
- Bonaventura C, Myers J (1969) Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 189(3),366-383.
- Bouchard, J. N., Roy, S., et Campbell, D. A. (2006). Symposium-in-Print : UV Effects on Aquatic and Coastal Ecosystems UVB Effects on the Photosystem II-D1 Protein of Phytoplankton and Natural Phytoplankton Communities. *Photochemistry and photobiology* 82(2), 936–951.
- Campbell, D., Hurry, V., Clarke, a K., Gustafsson, P., & Oquist, G. (1998). Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and

- acclimation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 62(3), 667–683.
- CCME. (1999). Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: atrazine. In: Canadian Environmental Quality Guidelines. Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg, Canada, 4 pp.
- Chalifour, A. et Juneau, P. (2011). Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to the herbicide atrazine. *Aquatic Toxicology*, 103(1), 9–17.
- Chen, Z., Juneau, P. et Qiu, B. (2007). Effects of three pesticides on the growth, photosynthesis and photoinhibition of the edible cyanobacterium Ge-Xian-Mi (*Nostoc*). *Aquatic Toxicology*, 81(3), 256–265.
- Chen, L., Xie, M., Bi, Y., Wang, G., Deng, S. et Liu, Y. (2012). The combined effects of UV-B radiation and herbicides on photosynthesis, antioxidant enzymes and DNA damage in two bloom-forming cyanobacteria. *Ecotoxicology and environmental safety*, 80, 224–30.
- Cloern, J. E. (1999). The relative importance of light and nutrient limitation of phytoplankton growth: a simple index of coastal ecosystem sensitivity to nutrient enrichment. *Aquatic ecology*, 33(1), 3–15.
- Cruces, E., Huovinen, P., & Gómez, I. (2012). Interactive effects of UV radiation and enhanced temperature on photosynthesis, phlorotannin induction and antioxidant activities of two sub-Antarctic brown algae. *Marine Biology*, 160(1), 1–13.
- Deblois, C. P., Dufresne, K., & Juneau, P. (2013). Response to variable light intensity in photoacclimated algae and cyanobacteria exposed to atrazine. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 126, 77–84.
- Delorenzo, M. E., Scott, G. I., & Ross, P. E. (2001). Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms : A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), 84–98.
- Demmig-Adams, B. (1990). Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1020(1), 1–24.

- Fedtke, C. et Duke, S. O. (2005). Herbicides. Dans Hock, B. et Elstner, E. F. (Ed.) *Plant toxicology (4<sup>e</sup> édition)* (p.247-330). New York, NY : Marcel Dekker.
- Fenical, W. (1983). Marine plants: A unique and unexplored resource. Dans Banta, H. D. (Ass. Dir.) *Plants: The Potentials for Extracting Protein, Medicines, and Other Useful Chemicals* (p.147-153). Washington, D.C.: U.S. Congress, Office of Technology Assessment.
- Fernanda Pessoa, M. (2012). Harmful effects of UV radiation in Algae and aquatic macrophytes—A review. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(6).
- Force, L., Critchley, C., & Rensen, J. J. S. Van. (2003). New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynthesis Research*, 78, 17–33.
- Foyer, C. H., M. Lelandais et K. J. Kunert. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiologia plantarum* 92(4), 696–717. Gal A., Zer H. et Ohad, I. (1997). Redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. News and views. *Physiologia Plantarum*, 100(4), 869-885.
- Frederick, J. E. (1993). Ultraviolet sunlight reaching the Earth's surface: A review of recent research. *Photochemistry and Photobiology*, 57(1), 175–178.
- García-Plazaola, J. I., & Becerril, J. M. (1999). A rapid high-performance liquid chromatography method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: Simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochemical Analysis*, 10(6), 307–313.
- Genty, B., Briantais, J. M. et Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 990 (1), 87-92.
- Giroux, I., (2010). Présence de pesticides dans l'eau au Québec – Bilan dans quatre cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2005, 2006 et 2007 et dans des réseaux de distribution d'eau potable. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement, 78 p.
- Gleason, D. F., & Wellington, G. M. (1995). Variation in UVB sensitivity of planula larvae of the coral *Agaricia agaricites* along a depth gradient. *Marine Biology*, 123(4), 693–703.

- Graymore, M., Stagnitti, F. et Allinson, G. (2001). Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment international*, 26(7), 483-495.
- Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T. et Gallipeau, S. (2010). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 107(10), 4612–4617.
- He, Y. Y. et Häder, D. P. (2002). Involvement of reactive oxygen species in the UV-B damage to the cyanobacterium *Anabaena* sp. *Journal of photochemistry and photobiology, B : Biology*, 66(1), 73–80.
- Heath, R.L, Parker. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189- 198.
- Hirschberg, J., & Chamovitz, D. (1994). Carotenoids in cyanobacteria. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, 559–5579.
- Holzinger, A. et Lütz, C. (2006). Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron*, 37(3), 190–207.
- Jansen, A. K., M., Hideg, É., & J. C. Lidon, F. (2012). UV-B radiation: “When does the stressor cause stress?” *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(6).
- Juneau P., Qiu B. et Deblois C.P. (2007). Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review. *Toxicological and Environ Chemistry* 89 (4):609-625
- Keren, N., & Ohad, I. (1998). State Transition and Photoinhibition. In *Trends in biochemical sciences* (pp. 569–590).
- Kitajima, M., Butler, W.L., (1975). Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta*, 376, 105–115.
- Kirilovsky, D. (2007). Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism. *Photosynthesis Research*, 93(1-3), 7–16.
- Krause, G. et Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Biology*, 42(1), 313-349.

- Krieger-Liszka, A., Fufezan, C., & Trebst, A. (2008). Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research*, 98, 551–564.
- Lüder, U. H., Knoetzel, J., & Wiencke, C. (2001). Acclimation of photosynthesis and pigments to seasonally changing light conditions in the endemic antarctic red macroalga *Palmaria decipiens*. *Polar Biology*, 24(8), 598–603.
- Mahdavian, K., K. M. Kalantari, M. Ghorbanli et M. Torkzade. (2008). The effects of salicylic acid on pigment contents in ultraviolet radiation stressed pepper plants. *Biologia plantarum* 52(1), 170-172.
- Marwood, C. A., Smith, R. E., Furgal, J. A., Charlton, M. N., Solomon, K. R. et Greenberg, B. M. (2000). Photoinhibition of natural phytoplankton assemblages in Lake Erie exposed to solar ultraviolet radiation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(2), 371-379.
- Müller, P., Li, X. P. et Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125(4), 1558-1566.
- Mullineaux, C. W., & Allen, J. F. (1990). State 1-State 2 transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between Photosystems I and II. *Photosynthesis Research*, 23(3), 297–311.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., & Allakhverdiev, S. I. (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767, 414–421.
- Neale, P. J., Cullen, J. J., et Davis, R. F. (1998). Inhibition of marine photosynthesis by ultraviolet radiation: Variable sensitivity of phytoplankton in the Weddell-Scotia Confluence during the austral spring. *Limnology and Oceanography*, 43(3), 433-448.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., Yamamoto, H., Hayashi, H., & Murata, N. (2004). Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry*, 43, 11321–11330.
- Nishiyama, Y., Yamamoto, H., Allakhverdiev, S. I., Inaba, M., Yokota, A., & Murata, N. (2001). Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *EMBO Journal*, 20(20), 5587–5594.

- Panagopoulos, L., J. F. Bornman et L. O. Bjorn. (1990). Effects of ultraviolet radiation and visible light on growth, fluorescence induction, ultra weak luminescence and peroxidase activity in sugar beet plants. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 8(2),73-87.
- Qian, H., Sheng, G. D., Liu, W., Yingcong, L., Liu, Z., & Zhengwei, F. (2008). Inhibitory effects of atrazine on Chlorella vulgaris as assessed by real-time polymerase chain reaction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(1), 182–187.
- Ralph, P. J. (2000). Herbicide toxicity of Halophila ovalis assessed by chlorophyll a fluorescence. *Aquatic Botany*, 66(2), 141–152.
- Rinalducci, S., Hideg, É., Vass, I., & Zolla, L. (2006). Effect of moderate UV-B irradiation on Synechocystis PCC 6803 biliproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(4), 1105–1112.
- Rost, B., Zondervan, I. et Wolf-Gladrow, D. (2008). Sensitivity of phytoplankton to future changes in ocean carbonate chemistry: current knowledge, contradictions and research directions. *Marine ecology progress series*, 373, 227-237.
- Salguero, A., de la Morena, B., Vigara, J., Vega, J. M., Vilchez, C., & León, R. (2003). Carotenoids as protective response against oxidative damage in Dunaliella bardawil. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 249–253.
- Schreiber, U., Bilger, W. et Neubauer, C. (1994). Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. Dans Schulze (E.d.), *Ecophysiology of photosynthesis* (p.49-70). Berlin : Springer.
- Schreiber, U., Müllerm J. F., Haugg, A. et Gademann, R. (2002). New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynthesis Research*, 74(3), 317-330.
- Schreiber, U., Schliwa, U. et Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*, 10(1), 51-62.
- Sfichi, L., Ioannidis, N., & Kotzabasis, K. (2004). Thylakoid-associated polyamines adjust the UV-B sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of light-harvesting complex II changes. *Photochemistry and Photobiology*, 80(3), 499–506.

- Sinha, R. P., Kumar, H. D., Kumar, A., & Häder, D.-P. (1995). Effects of UV-B irradiation on growth, survival, pigmentation and nitrogen metabolism enzymes in cyanobacteria. *Acta Protozoologica*, 34, 187–192.
- Smirnoff, N. (1998). Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* 9(2), 214–219.
- Stahl, W. et Sies, H. (2002). Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 15(5), 291–296.
- Solomon, K. R., Baker, D. B., Richards, R. P., Dixon, K. R., Klaine, S. J., La Point, T. W., Kendall, R. J., Weiskopf, C. P., Giddings, J. M., Giesy, J. P., Hall, L. W. & Marty Williams, W. (1996). Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15(1):31–76
- Strid, A., W. S. Chow and J. M. Anderson. (1994). UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynth. Res.* 39:475–489.
- Sullivan, D.J., Vecchia, A.V., Lorenz, D.L., Gilliom, R.J., Martin, J.D., (2009). Trends in pesticide concentrations in corn-belt streams, 1996–2006: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2009-5132. 75 p.
- Suresh Babu, G., Joshi, P.C., et Viswanathan, P.N. (1998). UVB-Induced reduction in biomass and overall productivity of cyanobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244(1), 138–142.
- Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, a, Aro, E., & Andersson, B. (1992). Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(February), 1408–1412.
- Walters, R. G., & Horton, P. (1993). Theoretical assessment of alternative mechanisms for non-photochemical quenching of PS II fluorescence in barley leaves. *Photosynthesis Research*, 36, 119–139.
- Wang, S., Duan, L., Li, J., Tian, X. et Li, Z. (2007). UV-B radiation increases paraquat tolerance of two broad-leaved and two grass weeds in relation to changes in herbicide absorption and photosynthesis. *Weed Research*, 47(2), 122–128.
- West, L. J. a, Li, K., Greenberg, B. M., Mierle, G., & Smith, R. E. H. (2003). Combined effects of copper and ultraviolet radiation on a microscopic green alga

- in natural soft lake waters of varying dissolved organic carbon content. *Aquatic Toxicology Amsterdam Netherlands*, 64(1), 39–52.
- Wollman FA. (2001). State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *The EMBO journal* 20 (14):3623-3630.
- Xiong, F., Komenda, J., Kopecký, J. et Nedbal, L. (1997). Strategies of ultraviolet-B protection in microscopic algae. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 378-388.
- Xue, L., Zhang, Y., Zhang, T., An, L., & Wang, X. (2005). Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on algae and cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 31(2), 79–89.
- Yakovleva, I. M. and E. A. Titlyanov. (2001). Effect of high visible and UV irradiance on subtidal *Chondrus crispus*: stress, photoinhibition and protective mechanisms. *Aquatic Botany*. 71:47-61.

## CONCLUSION GENERALE

L'industrialisation de notre société a engendré d'énormes changements au niveau de l'environnement. L'utilisation d'insecticides et d'herbicides ainsi que la destruction de la couche d'ozone en sont deux exemples. Plus notre société grandira, plus ces changements seront importants et nombreux. Le nombre important de stress environnementaux auxquelles sont exposés les écosystèmes implique nécessairement qu'ils peuvent interagir entre eux. L'étude de la combinaison de stress environnementaux sur les organismes devient donc primordiale afin d'avoir un pouvoir de prédiction et ainsi, de nous aider à mieux gérer ces nombreux changements à venir.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de la combinaison de l'atrazine, un herbicide utilisé de façon importante dans le monde, et de la radiation UV-B qui a été augmentée à la surface de la terre ces dernières années, sur les organismes phytoplanctoniques. En évaluant comment ces stress agissent sur la photosynthèse de ces organismes et en comparant la résistance de certaines espèces il a été possible de déterminer comment ces stress environnementaux pouvait débalancer les écosystèmes dans lesquels ils vivent.

Tout d'abord, les résultats obtenus lors de cette étude ont permis de voir que trois heures de radiation UV-B combiné à  $0,1\mu M$  d'atrazine engendre un important effet négatif au niveau de la photosynthèse et ce, chez les trois phytoplanctons étudiés. Puisque la photosynthèse constitue la base de leur physiologie, l'inhibition de celle-ci chez le phytoplancton peut mener non seulement à la détérioration de leur communauté, mais aussi à la réduction de leur qualité nutritive pour tous les autres organismes qui s'en nourrissent. De plus, la comparaison des résultats des différents paramètres photosynthétiques a démontré une énorme différence physiologique entre

les trois phytoplanctons. Une différence entre l’algue verte et la cyanobactérie était naturellement attendue. Par contre, des résultats surprenants entre les deux souches de la même espèce de cyanobactéries a été dénoté, suggérant alors une différence mécanistique entre les souches toxiques et non toxiques de cyanobactéries provenant de la même espèce.

Pour *S. obliquus*, un effet synergique au niveau de la photosynthèse a été démontré. Cet effet serait dû à la dégradation des pigments de caroténoïdes servant à la protection contre les stress oxydatives et les excès d’énergie lumineuse. L’effet de l’atrazine aurait donc été amplifié en raison de la dégradation des mécanismes de protection du à l’exposition aux UV-B. Une diminution du NPQ chez *S. obliquus* liée à la diminution du transport des électrons a aussi été observée ainsi que l’absence de pigments de  $\beta$ -carotène et une diminution de zéaxanthine. D’un autre côté, la diminution du NPQ observé chez *M. aeruginosa* serait davantage liée à la diminution du ratio PC/APC menant à une réduction de l’état de transition.

Avec ces résultats, il est possible d’avancer que *S. obliquus* serait plus sensible que *M. aeruginosa* puisqu’aucun effet synergique n’a été démontré chez cette dernière. De plus, il a été possible de remarquer une plus grande sensibilité chez la souche non toxique de *M. aeruginosa*. Sachant que les cyanobactéries constituent une nourriture de moins bonne qualité que les algues vertes pour les différents organismes qui s’en nourrissent, il est décevant d’observer que celles-ci sont plus susceptibles de résister à de tel stress environnementaux. De plus, la résistance de la souche toxique comparativement à celle non toxique est d’autant plus inquiétante vu les nombreux problèmes de fleurs de cyanobactéries ces dernières années. Considérant les résultats surprenants obtenus lors de cette étude, nous recommandons que les futures recherches au niveau de la protection de la vie aquatique prennent en compte l’effet

que peut avoir les radiations UV-B sur les différents pesticides retrouvées dans les cours d'eau.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Allen, J. F. (1992). Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1098(3), 275-335.
- Anderson, D. M., Glibert, P. M., et Burkholder, J. M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25(4), 704-726.
- Bailey, S., & Grossman, A. (2008). Photoprotection in cyanobacteria: Regulation of light harvesting. *Photochemistry and Photobiology*, 84(6), 1410–1420.
- Banaszak, A. T. et Trench, R. K. (2001). Ultraviolet sunscreens in dinoflagellates. *Protist*, 152(2), 93-101.
- Bilger, W., & Björkman, O. (1990). Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research*, 25(3), 173–185.
- Bischof, K., Hanelt, D., Tug, H., Karsten, U., Brower, P.E.M., et Wiencke, C. (1998a). Acclimation of brown algal photosynthesis to ultraviolet radiation in Arctic coastal waters. (Spitzbergen, Norway). *Polar Biology* 20 (6), 388–395.
- Bischof, K., Hanelt, D., et Wiencke, C. (1998b). UV-radiation can affect depth-zonation of Antarctic macroalgae. *Marine Biology* 131(4), 597–605.
- Bischof, K., Krabs, G., Wiencke, C., et Hanelt, D. (2002). Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophyll cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca*L. *Planta* 215(3), 502–509.
- Bouchard, J. N., Roy, S., et Campbell, D. A. (2006). Symposium-in-Print : UV Effects on Aquatic and Coastal Ecosystems UVB Effects on the Photosystem II-D1 Protein of Phytoplankton and Natural Phytoplankton Communities. *Photochemistry and photobiology* 82(2), 936–951.
- Cain, M. L., Bowman, W. D. et Hacker, S. D. (2008). *Ecology*. Sunderland : Sinauer associates. 621p.

- Campbell, D., Eriksson, M. J., Öquist, G., Gustafsson, P. et Clarke, A. K. (1998). The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 95(1), 364-369.
- Chalifour, A. et Juneau, P. (2011). Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to the herbicide atrazine. *Aquatic Toxicology*, 103(1), 9-17.
- Chen, Z., Juneau, P. et Qiu, B. (2007). Effects of three pesticides on the growth, photosynthesis and photoinhibition of the edible cyanobacterium Ge-Xian-Mi (*Nostoc*). *Aquatic Toxicology*, 81(3), 256–265.
- Chen, L., Xie, M., Bi, Y., Wang, G., Deng, S. et Liu, Y. (2012). The combined effects of UV-B radiation and herbicides on photosynthesis, antioxidant enzymes and DNA damage in two bloom-forming cyanobacteria. *Ecotoxicology and environmental safety*, 80, 224–30.
- Chèvre, N. et Erkman, S. (2011). Alerte aux micropolluants : pesticides, biocides, détergents, médicaments et autres substances chimiques dans l'environnement. Lausanne : Presses polytechniques et universitaires romandes. 84 p.
- Cloern, J. E. (1999). The relative importance of light and nutrient limitation of phytoplankton growth: a simple index of coastal ecosystem sensitivity to nutrient enrichment. *Aquatic ecology*, 33(1), 3-15.
- Codd GA, Bell SG et Brooks, WP. (1989). Cyanobacterial toxins in water. *Water Science & Technology*, 21(3), 1-13.
- Deblois, C. P., Dufresne, K. et Juneau, P. (2013). Response to variable light intensity in photoacclimated algae and cyanobacteria exposed to atrazine. *Aquatic toxicology*, 126, 77–84.
- DeLange, H. J. et Lürling, M. (2003). Effects of UV-B irradiated algae on zooplankton grazing. *Hydrobiologia*, 491(1-3), 133-144.
- Delorenzo, M. E., Scott, G. I. et Ross, P. E. (2001). Toxicity of Pesticides to Aquatic Microorganisms: A Review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), 84-98.

- Denoyelles, F., Kettle, W. D., et Sinn, D. E. (1982). The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States. *Ecology*, 63(5), 1285–1293.
- Demmig-Adams, B. (1990). Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1020(1), 1–24.
- Demott, W. et Müller-Navarra, D. (1997). The importance of highly unsaturated fatty acids in zooplankton nutrition: evidence from experiments with *Daphnia*, a cyanobacterium and lipid emulsions. *Freshwater Biology*, 38(3), 649–664.
- Demott, W. R., Zhang, Q.-X., et Carmichael, W. W. (1991). Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, 36(7), 1346–1357.
- Dring, J.M., Wagner, A., Boeskov, J., et Luning, K. (1996). Sensitivity of intertidal and subtidal red algae to UVA and UVB radiation, as monitored by chlorophyll fluorescence measurements: Influence of collection depth and season, and length of irradiation. *European Journal Phycology* 31(4), 293–302.
- Fairchild, J. F., Ruessler, D. S. et Carlson, A. R. (1998). Comparative Sensitivity of five Species of Macrophytes and six Species of Algae to Atrazine, Metribuzin, Alachlor and Metolachlor. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(9), 1830–1834.
- Farber, a., Young, a. J., Ruban, a. V., Horton, P., & Jahns, P. (1997). Dynamics of Xanthophyll-Cycle Activity in Different Antenna Subcomplexes in the Photosynthetic Membranes of Higher Plants (The Relationship between Zeaxanthin Conversion and Nonphotochemical Fluorescence Quenching). *Plant Physiology*, 115(4), 1609–1618.
- Fedtke, C. et Duke, S. O. (2005). Herbicides. Dans Hock, B. et Elstner, E. F. (Ed.) *Plant toxicology (4<sup>e</sup> édition)* (p.247-330). New York, NY : Marcel Dekker.
- Fenical, W. (1983). Marine plants: A unique and unexplored resource. Dans Banta, H. D. (Ass. Dir.) *Plants: The Potentials for Extracting Protein, Medicines, and Other Useful Chemicals* (p.147-153). Washington, D.C.: U.S. Congress, Office of Technology Assessment.
- Fernanda Pessoa, M. (2012). Harmful effects of UV radiation in Algae and aquatic macrophytes—A review. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(6).

Ferrão-Filho A. S., Azevedo, S. M. F. O. et Demott W. R. (2000). Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biology*, 45, 1–19.

Fiche de sécurité du Programme International sur la Sécurité des Substances Chimiques (1999). ATRAZINE [archive], consultée le 15 septembre 2013.

Fischer, B. B., Rüfenacht, K., Dannenhauer, K., Wiesendanger, M., & Eggen, R. I. L. (2010). Multiple stressor effects of high light irradiance and photosynthetic herbicides on growth and survival of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29 (10), 2211–2219.

Force L., Critchley C., van Rensen J. (2003) New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynthesis Research* 78 (1), 17–33.

Foyer, C. H., M. Lelandais et K. J. Kunert. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiologia plantarum* 92(4), 696–717. Gal A., Zer H. et Ohad, I. (1997). Redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. News and views. *Physiologia Plantarum*, 100(4), 869–885.

Frederick, J. E. (1993). Yearly review ultraviolet sunlight reaching the Earth's surface : A Review of recent research. *Photochemistry and Photobiology*, 57(1), 175–178.

Friso, G., R. Barbato, G. M. Giacometti et J. Barber. (1994). Degradation of the D2 protein due to UV-B irradiation of the reaction center of photosystem II. *FEBS Letter* 339(3), 217–221.

Gal, A., Zer H., et Ohad I. (1997). Redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. News and views. *Physiologia Plantarum* 100(40), 869–885.

Genty, B., Briantais, J. M. et Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 990 (1), 87–92.

Graymore, M., Stagnitti, F. et Allinson, G. (2001). Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment international*, 26(7), 483–495.

- Hager, A., et Holocher, K. (1994). Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta*, 192(4), 581–589.
- Hanelt, D., Wiencke, C., et Nultsch, W. (1997). Influence of UV radiation on the photosynthesis of Arctic macroalgae in the field. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology* 38 (1), 40–47.
- Hayes, T. B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A. et Vonk, A. (2002). Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 99(8), 5476–5480.
- Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T. et Gallipeau, S. (2010). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 107(10), 4612–4617.
- He, Y. Y. et Häder, D. P. (2002). Involvement of reactive oxygen species in the UV-B damage to the cyanobacterium *Anabaena sp*. *Journal of photochemistry and photobiology, B : Biology*, 66(1), 73–80.
- Hirschberg, J., et Chamovitz, D. (1994). Carotenoids in cyanobacteria. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, 559–5579.
- Hodnebrog, O., Etminan, M., Fuglestvedt, J. S., Marston, G., Myhre, G., Nielsen, C. J., Shine, K. P. et Wallington, T. J. (2013). Global Warming Potentials and Radiative Efficiencies of Halocarbons and Related Compounds: A Comprehensive Review. *Reviews of Geophysics*, 51(2), 300-378.
- Holzinger, A. et Lütz, C. (2006). Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron*, 37(3), 190–207.
- Jansen, M. A., Depka, B., Trebst, A., et Edelman, M. (1993). Engagement of specific sites in the plastoquinone niche regulates degradation of the D1 protein in photosystem II. *Journal of Biological Chemistry*, 268(28), 21246-21252.
- Jansen, M. A. K., Hideg, É., et Lidon, F. J. C. (2012). UV-B radiation: “When does the stressor cause stress?” *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(6).

- Joshua, S., Bailey, S., Mann, N. H., & Mullineaux, C. W. (2005). Involvement of phycobilisome diffusion in energy quenching in cyanobacteria. *Plant Physiology*, 138(3), 1577–1585.
- Juneau P., Qiu B. et Deblois C.P. (2007). Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review. *Toxicological and Environ Chemistry* 89 (4):609-625
- Karentz, D., Cleaver, J. E., et Mitchell, D. L. (1991a). Cell survival characteristics and molecular responses of antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *Journal of Phycology*, 27(3), 326-341.
- Karentz, D., McEuen, F. S., Land, M. C., et Dunlap, W. C. (1991b). Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Marine Biology*, 108(1), 157-166.
- Kasai, F. et Arts M. T. (1997). The interactive effects of UV-B radiation and a herbicide on uptake and allocation of carbon in two strains of the green alga *Scenedesmus*. *Aquatic Ecology*, 31(3), 261–272.
- Kautsky, H. et Hirsch, A. (1931). Neue versuche zur kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften*, 19(48), 964-964.
- Kitajima M, Butler W (1975) Fluorescence *quenching* in photosystem II of chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 376 (1):116-125
- Krause, G. et Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Biology*, 42(1), 313-349.
- Kruschel, C., et Castenholz, R. W. (1998). The effect of solar UV and visible irradiance on the vertical movements of cyanobacteria in microbial mats of hypersaline waters, *FEMS microbiology ecology* 27(1), 53–72.
- Lambert, M. R. K. (1984). Amphibians and Reptiles. Dans Cloudsley-Thompson J. L. (Ed.), *Sahara Desert Key Environments* (p.205-227). Londre : Pergamon Press.
- Leitsch, J., Schnettger, B., Critchley, C., et Krause, G. H. (1994). Two mechanisms of recovery from photoinhibition in vivo: reactivation of photosystem II related and unrelated to D1-protein turnover. *Planta*, 194(1), 15-21.

- Lucas, R., McMichael, T., Smith, W. et Armstrong, B. (2006). *Solar ultraviolet radiation*. Global burden of disease from solar ultraviolet radiation. Environmental Burden of Disease Series No 13. Genève. 17 p.
- Madronich, S., McKenzie, R. L., Björn, L. O. et Caldwell, M. M. (1998). Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 46(1-3), 5-19
- Mahdavian, K., K. M. Kalantari, M. Ghorbanli et M. Torkzade. (2008). The effects of salicylic acid on pigment contents in ultraviolet radiation stressed pepper plants. *Biologia plantarum* 52(1), 170-172.
- Majer, P. et Hideg, É. (2012). Existing antioxidant levels are more important in acclimation to supplemental UV-B irradiation than inducible ones: Studies with high light pretreated tobacco leaves. *Emirate journal of Food and Agriculture*, 24(6), 598-606.
- Marwood, C. A., Smith, R. E., Furgal, J. A., Charlton, M. N., Solomon, K. R. et Greenberg, B. M. (2000). Photoinhibition of natural phytoplankton assemblages in Lake Erie exposed to solar ultraviolet radiation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(2), 371-379.
- McCulloch, A. (1999). CFC and Halon replacements in the environment. *Journal of Fluorine Chemistry*, 100(1-2), 163–173.
- McKenzie, R. L., Björn, L. O., Bais, A., et Ilyasd, M. (2003). Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2(1), 5-15.
- Müller, P., Li, X. P. et Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125(4), 1558-1566.
- Neale, P. J., Cullen, J. J., et Davis, R. F. (1998). Inhibition of marine photosynthesis by ultraviolet radiation: Variable sensitivity of phytoplankton in the Weddell-Scotia Confluence during the austral spring. *Limnology and Oceanography*, 43(3), 433-448.
- Newman, M.C., Unger, M. A. (2003). Fundamentals of ecotoxicology. 2sd Edition. Lewis Publishers: New-York.

- Niyogi, K. K., Grossman, A. R., & Björkman, O. (1998). Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *The Plant Cell*, 10(7), 1121–1134.
- Oberholster, P. J., Botha, A. M., et Grobbelaar, J. U. (2004). Microcystis aeruginosa: source of toxic microcystins in drinking water. *African Journal of Biotechnology*, 3(3).
- Organisation Météorologique Mondiale. (2011). *Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2010*, Global Ozone Research and Monitoring Project – Rapport No 52. Genève. 516 p.
- Panagopoulos, L., J. F. Bornman et L. O. Bjorn. (1990). Effects of ultraviolet radiation and visible light on growth, fluorescence induction, ultra weak luminescence and peroxidase activity in sugar beet plants. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 8(2),73-87.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T., Leitao, M. A., Okamoto, O. K., Morse, D. et Colepicolo, P. (2003). Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Algae1. *Journal of Phycology*, 39(6), 1008-1018.
- Poulson, M. E., Boeger, M. R. T. et Donahue, R. A. (2006). Response of photosynthesis to high light and drought for *Arabidopsis thaliana* grown under a UV-B enhanced light regime. *Photosynthesis Research*, 90(1), 79-90.
- Prasil, O., Adir, N. et Ohad, I. (1992). Dynamics of photosystem II: Mechanism of photoinhibition and recovery processes. Dans Barber, J. (Ed.) *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology* (p.295-348). Amsterdam, NLD : Elsevier Scientific Publishers.
- Ralph P, Smith R, Macinnis-Ng C, Seery C (2007) Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: Review. *Toxicological and Environ Chemistry*, 89(4), 589-607.
- Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R. et Sethunathan, N. (2010). The Impacts of Environmental Pollutants on Microalgae and Cyanobacteria. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 40(8), 37–41.
- Rao, M. V, Paliyath, G., et Ormrod, D. P. (1996). Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology*, 110(1), 125–36.

- Raven, P. H., Evert, R. F. et Eichhorn, S. E. (2003). *Biologie végétale*. Paris : De Boeck Supérieur. p.115-130.
- Rijstenbil, J. (2003). Effects of UVB radiation and salt stress on growth, pigments and antioxidative defence of the marine diatom *Cylindrotheca closterium*. *Marine Ecology Progress Series* 254, 37–48.
- Rintamäki, E., Salo, R. et Aro, E. M. (1994). Rapid turnover of the D1 reaction-center protein of photosystem II as a protection mechanism against photoinhibition in a moss, *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. *Planta*, 193(4), 520-529.
- Rost, B., Zondervan, I. et Wolf-Gladrow, D. (2008). Sensitivity of phytoplankton to future changes in ocean carbonate chemistry: current knowledge, contradictions and research directions. *Marine ecology progress series*, 373, 227-237.
- Santé Canada (2013). Deuxième rapport sur la Biosurveillance Humaine des Substances Chimiques de l'Environnement au Canada : Résultats de l'Enquête canadienne sur les mesures de la santé Cycle 2 (2009 à 2011). Ottawa, ON : Ministère de la Santé.
- Salguero, A., de la Morena, B., Vigara, J., Vega, J. M., Vilchez, C., et León, R. (2003). Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 249–253.
- Schnettger, B., Critchley, C., Santore, U. J., Graf, M. et Krause, G. H. (1994). Relationship between photoinhibition of photosynthesis, D1 protein turnover and chloroplast structure: effects of protein synthesis inhibitors. *Plant, Cell & Environment*, 17(1), 55-64.
- Schreiber, U., Bilger, W. et Neubauer, C. (1994). Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. Dans Schulze (E.d.), *Ecophysiology of photosynthesis* (p.49-70). Berlin : Springer.
- Schreiber, U., Müllerm J. F., Haugg, A. et Gademann, R. (2002). New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynthesis Research*, 74(3), 317-330.
- Schreiber, U., Schliwa, U. et Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*, 10(1), 51-62.

- Secrétariat de l'ozone. 2006. Manuel du protocole de Montréal relatif à des substances qui appauvrisent la couche d'ozone. Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE), 7ième édition, Nairobi, Kenya
- Sinha, R. P., et Häder, D.-P. (2007). UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Science*, 174(3), 278–289.
- Smirnoff, N. (1998). Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* 9(2), 214–219.
- Stahl, W. et Sies, H. (2002). Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 15(5), 291–296.
- Stahl, W., et Sies, H. (2002). Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 15(5), 291–296.
- Statistique Canada (2008). L'activité humaine et l'environnement: statistique annuelles. Ottawa, ON : Ministre de l'Industrie
- Strasser R, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation:445–483
- Suresh Babu, G., Joshi, P.C., et Viswanathan, P.N. (1998). UVB-Induced reduction in biomass and overall productivity of cyanobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244(1), 138–142.
- Taiz, L. et Zeiger, E. (2010). *Plant physiology*, 5<sup>e</sup> édition, Sunderland : Sinauer Associates, 782p.
- Tammes, P. M. L. (1964). Isoboles, a graphic representation of synergism in pesticides. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 70(3), 73–80.
- Thompson, H. M. (1996). Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. *Ecotoxicology*, 5(2), 59–81.
- Torres, M. A., Barros, M. P., Campos, S. C., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R. T. et Colepicolo, P. (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 71(1), 1–15.

- Vass, I., D. Kirilovsky et A.-L. Etienne. (1999). UV-B Radiation-induced donor- and acceptor- side modifications of photosystem II in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 38(39), 12786–12794.
- Vass, I., Szilárd, A. et Sicora, C. (2005). Adverse Effects of UV-B Light on the Structure and Function of the Photosynthetic Apparatus. Dans Pessarakli, M. *Handbook of Photosynthesis (2<sup>e</sup> édition)* (p.827-844). Boca Raton, FL : CRC Press.
- Vincent, W. F., et Roy, S. (1993). Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: damage, protection, and recovery. *Environmental Reviews*, 1(1), 1-12.
- Wang, S., Duan, L., Li, J., Tian, X. et Li, Z. (2007). UV-B radiation increases paraquat tolerance of two broad-leaved and two grass weeds in relation to changes in herbicide absorption and photosynthesis. *Weed Research*, 47(2), 122–128.
- Warren, N., Allan, I. J., Carter, J. E., House, W. A. et Parker, A. (2003). Pesticides and Other Micro-organic Contaminants in Freshwater Sedimentary Environments - A Review. *Applied Geochemistry*, 18(2), 159-194.
- Weier TE, Stocking RC, Barbour MG et Rost, TL. (1982). Botany. Introduction to Plant Biology. 6th Edition. John Wiley and Sons, New York, pp. 720.
- Wolfe-Simon, F., Grzebyk, D., Schofield, O. et Falkowski, P. G. (2005). The Role and Evolution of Superoxide Dismutases in Algae1. *Journal of phycology*, 41(3), 453-465.
- Wollman, F. A. (2001). State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 20(14), 3623-3630.
- Xiong, F., Komenda, J., Kopecký, J. et Nedbal, L. (1997). Strategies of ultraviolet-B protection in microscopic algae. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 378-388.
- Xiong, F., 2001. Evidence that UV-B tolerance of the photosynthetic apparatus in microalgae is related to the D1-turnover mediated repair cycle in vivo. *J. Plant Physiol.* 158, 285–294.
- Xu, J., et Gao, K. (2010). UV-A enhanced growth and UV-B induced positive effects in the recovery of photochemical yield in *Gracilaria lemaneiformis*

- (Rhodophyta). *Journal of photochemistry and photobiology B : Biology*, 100(3), 117–22.
- Zlatev, Z. S., Lidon, F. J. C., et Kaimakanova, M. (2012). Plant physiological responses to UV-B radiation. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(6), 481-501.