



**HAL**  
open science

# Caractérisation chimique des exsudats du dinoflagellé marin toxique *Alexandrium catenella* et de la diatomée marine *Skeletonema costatum* et étude de la réponse protéomique d'*Alexandrium catenella* en conditions de stress métalliques

Faouzi Herzi

## ► To cite this version:

Faouzi Herzi. Caractérisation chimique des exsudats du dinoflagellé marin toxique *Alexandrium catenella* et de la diatomée marine *Skeletonema costatum* et étude de la réponse protéomique d'*Alexandrium catenella* en conditions de stress métalliques. Sciences agricoles. Université de Toulon; Faculté des sciences de Bizerte (Tunisie), 2013. Français. NNT : 2013TOUL0014 . tel-00993362

**HAL Id: tel-00993362**

**<https://theses.hal.science/tel-00993362v1>**

Submitted on 20 May 2014

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

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



# THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

**Faouzi HERZI**

Laboratoire  
Cytologie Végétale  
Phytoplanktonologie

Pour l'obtention du grade de

**Docteur en Sciences Biologiques**

De l'Université de Carthage (Tunisie) et de l'Université de Toulon (France)

**Caractérisation chimique des exsudats du dinoflagellé marin toxique  
*Alexandrium catenella* et de la diatomée marine *Skeletonema costatum* et  
étude de la réponse protéomique d'*Alexandrium catenella* en conditions de  
stress métalliques**

**Soutenue le 9 Décembre 2013 devant le jury composé de :**

<b>Martine BERTRAND</b> (Maître de Conférences HDR, Cnam-Intechmer)	Rapporteur
<b>Ons DALY-YAHIA- KÉFI</b> (Maître de Conférences HDR, INAT)	Rapporteur
<b>Néjib DALY-YAHIA</b> (Professeur des Universités, Université de Carthage)	Examineur
<b>Yves LUCAS</b> (Professeur des Universités, Université de Toulon)	Examineur
<b>Olivier PRINGAULT</b> (Directeur de Recherche IRD, ECOSYM UMR 5119)	Examineur
<b>Najoua TRIGUI EL MENIF</b> (Professeur des Universités, Université de Carthage)	Examineur
<b>Natacha JEAN</b> (Maître de Conférences, Université de Toulon)	Co-directrice de thèse
<b>Stéphane MOUNIER</b> (Maître de Conférences HDR, Université de Toulon)	Directeur de thèse
<b>Asma SAKKA HLAILI</b> (Professeur des Universités, Université de Carthage)	Directrice de thèse

## *Avant-Propos*

Cette thèse a été co-dirigée par une partie tunisienne et par une partie française. En Tunisie, M<sup>me</sup> Asma SAKKA HLAILI a assuré l'encadrement de la thèse au Laboratoire de Cytologie Végétale et de Phytoplanctonologie de Bizerte (LCVP), à la Faculté des Sciences de Bizerte de l'Université de Carthage. En France, M<sup>me</sup> Natacha JEAN et M<sup>r</sup> Stéphane MOUNIER ont assuré l'encadrement de la thèse au laboratoire PROcessus de Transferts et d'Echanges dans l'Environnement (PROTEE, EA 3819) de l'Université de Toulon.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du programme d'échanges euro-méditerranéens ARCUS CERES (Région PACA, MAE). Les données obtenues au cours cette étude ont fait l'objet de :

1) **Deux articles parus** en 2013, et **deux articles acceptés avec major revisions** dans des revues scientifiques internationales impactées :

- ▶ **Faouzi HERZI**, Asma SAKKA HLAILI, Christophe LE POUPON, Hassine HADJ MABROUK, Stéphane MOUNIER, **2013**. Characterization of exudates released by the marine diatom *Skeletonema costatum* exposed to copper stress: a 3D-fluorescence spectroscopy approach. *Biomaterials* (IF: 3,284) **26**: 773-781.
- ▶ **Faouzi HERZI**, Natacha JEAN, Huiyu ZHAO, Stéphane MOUNIER, Hassine HADJ MABROUK, Asma SAKKA HLAILI, **2013**. Copper and cadmium effects on growth and extracellular exudation of the marine toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*: 3D-fluorescence spectroscopy approach. *Chemosphere* (IF: 3,137) **93**: 1230-1239.
- ▶ **Faouzi HERZI**, Natacha JEAN, Asma SAKKA HLAILI, Stéphane MOUNIER. Three-dimensional (3D) fluorescence spectroscopy of the fluorescent dissolved organic matter released by the marine toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* exposed to metal stress by zinc or lead. *Accepté avec Major Revisions dans Journal of Phycology* (IF: 2,239).
- ▶ **Faouzi HERZI**, Stéphane MOUNIER, Christophe LE POUPON, Asma SAKKA HLAILI, Natacha JEAN. Characterization of polysaccharides released by the marine toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* grown under metal stress. *Accepté avec Major Revisions dans Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (IF: 1,05).

## 2) Quatre communications présentées dans des congrès internationaux :

- ▶ Estelle DUMONT, **Faouzi HERZI**, Asma SAKKA HLAILI, Thierry BALLIAU, Stéphane MOUNIER, Natacha JEAN, **2013**. Proteome modifications of the toxic marine dinoflagellate *Alexandrium catenella* under metallic stress conditions. **40<sup>ème</sup> Congrès CIESM**, Marseille, France, 28 octobre - 1<sup>er</sup> novembre 2013.
- ▶ **Faouzi HERZI**, Asma SAKKA HLAILI, Estelle DUMONT, Thierry BALLIAU, Stéphane MOUNIER, Natacha JEAN, **2012**. Does the protein expression from the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* take a part in its occurrence in metal perturbed coastal marine ecosystems? **50<sup>ème</sup> Congrès international ECSA**, Venise, Italie, 3-7 juin 2012.
- ▶ **Faouzi HERZI**, Stéphane MOUNIER, Natacha JEAN, Hassine HADJ MABROUK, Asma SAKKA HLAILI, **2012**. Caractérisation des exsudats d'un dinoflagellé toxique (*Alexandrium catenella*) en présence des éléments traces métalliques (cuivre, zinc, plomb et cadmium). **1<sup>er</sup> Workshop « Lagunes de Thau et Bizerte, entre pressions environnementales et gestion durable »**, Institut de Recherche pour le Développement (IRD) & Institut National des Sciences de la Mer (INSTM), Bizerte, Tunisie, 3-4 mai 2012.
- ▶ **Faouzi HERZI**, Natacha JEAN, Stéphane MOUNIER, Asma SAKKA HLAILI, **2011**. Étude de la réponse protéomique du dinoflagellé toxique *Alexandrium catenella* soumis à un stress métallique. **Congrès franco-tunisien des Sciences de la Mer, Association Tunisienne des Sciences de la Mer, Association Française d'Ichtyologie**. Mahdia, Tunisie, 26-29 novembre 2011.

## 3) Une communication présentée dans un congrès national :

- ▶ **Faouzi HERZI**, Asma SAKKA HLAILI, Estelle DUMONT, Thierry BALLIAU, Stéphane MOUNIER, Natacha JEAN, **2012**. L'expression protéique du phytoplancton toxique *Alexandrium catenella* peut-elle contribuer à sa présence dans les écosystèmes marins côtiers perturbés par des contaminants métalliques ? **4<sup>èmes</sup> Doctoriades Euro-méditerranéennes**. 29-30 novembre 2012.

D'autres données feront l'objet de trois prochaines publications concernant la réponse protéomique d'*Alexandrium catenella* (protéomes soluble et membranaire) en conditions de stress métalliques.

## *Remerciements*

Je tiens à remercier ici les personnes qui ont partagé avec moi cette aventure, et tous ceux qui m'ont prodigué leur soutien, leur aide, leurs conseils et qui m'ont conservé leur amitié.

D'abord, je remercie mes directeurs de thèse Asma SAKKA HLAILI, Professeur à la Faculté des Sciences de Bizerte, Stéphane MOUNIER et Natacha JEAN, respectivement Maître de Conférences HDR, et Maître de Conférences, à l'Université de Toulon, pour avoir accepté de diriger ce travail de thèse. Qu'ils trouvent ici l'assurance de ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance.

Asma SAKKA HLAILI, pour m'avoir initié et transmis sa passion pour les disciplines étudiant le phytoplancton, et orienté, grâce à ses conseils en écologie marine. Ses connaissances en phytoplanctonologie et ses précieux commentaires m'ont permis d'avancer sur mon sujet et d'aboutir en suivant le bon chemin. Son enthousiasme, ses qualités humaines et son humour m'ont donné le courage d'aimer la recherche.

Stéphane MOUNIER qui m'a guidé et orienté durant ces années de recherche. Je le remercie pour son encadrement, son soutien et pour la confiance qu'il m'a témoignée. J'ai au terme de ce travail beaucoup apprécié ses conseils pertinents, ses idées intéressantes, son humour et ses qualités humaines.

Natacha JEAN, qui m'a guidé durant ces années de thèse. Je la remercie pour ses idées très intéressantes, ses conseils judicieux, son esprit critique et sa pensée réaliste qui m'ont appris à réfléchir, ainsi que par son efficacité au travail durant toutes ces années. Grâce à son attitude minutieuse et précise, j'ai appris à bien manipuler. Son caractère sérieux et son enthousiasme m'ont encouragé et ont ainsi assuré l'avancement du travail.

Mes sincères remerciements vont à Ons DALY-YAHIA-KÉFI et à Martine BERTRAND, respectivement Maîtres de conférences HDR à l'Institut National Agronomique de Tunisie et au Cnam-Intechmer Cherbourg, pour avoir accepté d'être rapportrices de ce travail. Qu'elles trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour les précieux commentaires apportés.

Je suis très honoré qu'Olivier PRINGAULT, Directeur de Recherche à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) au laboratoire ECOSYSM UMR 5119, Mohamed-Néjib DALY-YAHIA, Professeur à la Faculté des Sciences de Bizerte de l'Université de Carthage, et Yves LUCAS, Président du jury de thèse, Professeur des Universités à l'Université de Toulon, aient accepté d'examiner mon manuscrit de thèse.

Mes sincères remerciements vont à Hassine HADJ MABROUK, Professeur des Universités à la Faculté des Sciences de Bizerte de l'Université de Carthage, et au Professeur Yves LUCAS, pour m'avoir accueilli dans leurs Laboratoires respectifs LCVP et PROTEE EA 3819.

J'adresse aussi des remerciements particuliers à tous mes collègues des Laboratoires PROTEE et LCVP, qui ont largement contribué à ma stabilité. Un grand merci pour leur enthousiasme et leur solidarité. Merci à l'ensemble des membres des équipes EBMA et CAPTE ainsi qu'au personnel de l'Université de Toulon pour avoir directement et indirectement contribué à l'élaboration de ce travail.

Enfin, je suis extrêmement reconnaissant à ma famille qui n'a cessé de me soutenir en dépit des diverses circonstances.

# SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE -----	1
<b>CHAPITRE I. ÉTAT DE L'ART</b> -----	<b>6</b>
I. PHYTOPLANCTON -----	7
1. Taxonomie du phytoplancton -----	7
1.1- Diatomées -----	7
1.2- Dinophycées -----	10
1.3- Flagellés -----	11
2. Production primaire du phytoplancton -----	11
3. Écologie du phytoplancton -----	12
4. Phytoplancton nuisible -----	13
II. CULTURES PHYTOPLANCTONIQUES -----	16
1. Espèces cultivées, techniques d'isolement cellulaire et méthodes de culture -----	16
2. Cinétiques de croissance des cultures phytoplanctoniques -----	17
III. MATIÈRE ORGANIQUE -----	19
1. Matière organique naturelle (MON) -----	19
2. Matière organique exsudée par le phytoplancton -----	21
2.1- Importance de l'exsudation du phytoplancton en milieu marin -----	21
2.2- Composition de la MO exsudée par le phytoplancton -----	22
2.3- Contrôle de la MO exsudée par le phytoplancton -----	23
3. Propriétés spectroscopiques de la matière organique -----	23
IV. ÉLÉMENTS TRACES MÉTALLIQUES (ETMs) -----	25
1. Définition et répartition des ETMs -----	25
2. ETMs dans le milieu marin -----	27
3. ETMs et phytoplancton -----	30
3.1- Absorption des ETMs par le phytoplancton -----	30
3.2- Effet des ETMs sur le phytoplancton -----	31
3.3- Mécanismes de défense mis en place par le phytoplancton contre la contamination métallique -----	33
<b>CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> -----	<b>35</b>
PARTIE I : ISOLEMENT ET CULTURE DES MICROALGUES -----	36
I. ISOLEMENT DES CELLULES PHYTOPLANCTONIQUES -----	36
1. Site d'isolement de <i>Skeletonema costatum</i> : la petite rade de Toulon -----	36
1.1- Réseau hydrique -----	36
1.2- Courantologie -----	37
1.3- Niveau de contamination chimique -----	37
2. Prélèvement de l'eau et isolement des cellules -----	38
II. CULTURES PHYTOPLANCTONIQUES -----	38
1. Procédure -----	38
2. Suivi des cinétiques de croissance des cultures phytoplanctoniques -----	42

PARTIE II : EXPÉRIENCES DE CONTAMINATIONS MÉTALLIQUES -----	43
I. CONTAMINATION MÉTALLIQUE DES CULTURES DE <i>Skeletonema costatum</i> -----	43
1. Préparation des solutions contaminantes -----	43
2. Procédure expérimentale -----	43
3. Analyses -----	44
3.1- Analyses des pigments chlorophylliens -----	44
3.2- Analyse du carbone organique dissous (COD) -----	45
3.3- Analyse des carbohydrates -----	45
3.4- Caractérisation des exopolysaccharides (EPS) -----	45
3.5- Analyse de la fluorescence 3D -----	47
II. CONTAMINATION MÉTALLIQUE DES CULTURES D' <i>Alexandrium catenella</i> -----	47
1. Préparation des solutions contaminantes -----	47
2. Procédure expérimentale -----	48
3. Analyses du COD, de la FDOM et des EPS -----	49
4. Extraction et dosage des protéines -----	49
4.1- Centrifugation des échantillons -----	49
4.2- Extraction et dosage des protéines solubles -----	49
5. Electrophorèse 2D -----	50
5.1- Première étape : Réhydratation active -----	50
5.2- Deuxième étape : IsoElectroFocalisation (IEF) -----	52
5.3- Préparation des gels de polyacrylamide -----	53
5.4- Troisième étape : Équilibration -----	54
5.5- Quatrième étape : Sodium DodécylSulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS - PAGE) -----	55
5.6- Cinquième étape : Coloration des gels et acquisition des images des gels 2D -----	56
5.7- Calcul du taux d'expression des protéines-sélection des protéines d'intérêt -----	57
<b>CHAPITRE III. RÉPONSE DE <i>Skeletonema costatum</i> A LA CONTAMINATION PAR LE CUIVRE :</b>	
<b>CROISSANCE, PIGMENTS ET EXSUDATION CARBONÉE -----</b>	<b>58</b>
A. RESULTATS -----	59
I. EFFET DU CUIVRE SUR <i>Skeletonema costatum</i> -----	59
1. Effet du cuivre sur la croissance -----	59
2. Effet du cuivre sur l'évolution des teneurs en pigments -----	60
II. EFFET DU CUIVRE SUR L'EXSUDATION DE BIOMOLÉCULES PAR <i>Skeletonema costatum</i> -----	63
1. Effet du cuivre sur le COD libéré au cours de la croissance de <i>Skeletonema costatum</i> -----	63
2. Effet du cuivre sur les carbohydrates libérés au cours de la croissance de <i>Skeletonema costatum</i> -----	65
3. Effet du cuivre sur la composition des exsudats polysaccharidiques (EPS) libérés au cours de la croissance de <i>Skeletonema costatum</i> -----	67
4. Molécules fluorescentes libérées au cours de la croissance de <i>Skeletonema costatum</i> -----	69
III. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES DES DIFFÉRENTES VARIABLES ESTIMÉES DANS LES TROIS TRAITEMENTS -----	72
1. Projection des variables -----	73

1.1- Projection sur l'axe F1-----	74
1.2. Projection sur l'axe F2-----	74
B. DISCUSSION-----	75
I. EFFET DU STRESS MÉTALLIQUE SUR LA CROISSANCE ET LES TENEURS EN PIGMENTS DE <i>Skeletonema costatum</i> -----	75
II. EFFET DU STRESS MÉTALLIQUE SUR L'EXSUDATION DE BIOMOLÉCULES PAR <i>Skeletonema</i> <i>costatum</i> -----	78
III. EXSUDATION DES MOLÉCULES FLUORESCENTES PAR <i>Skeletonema costatum</i> SOUS LE STRESS MÉTALLIQUE-----	80
C. CONCLUSION-----	81
<b>CHAPITRE IV. RÉPONSE D'<i>Alexandrium catenella</i> À LA CONTAMINATION PAR LE CUIVRE, LE ZINC, LE CADMIUM ET LE PLOMB : CROISSANCE ET EXSUDATION CARBONÉE</b> -----	82
A. RÉSULTATS-----	83
I. EFFET DES ETMs (cuivre, zinc, cadmium ou plomb) SUR LA CROISSANCE D' <i>Alexandrium catenella</i> ----	83
1. Effet du cuivre-----	83
2. Effet du zinc-----	86
3. Effet du cadmium-----	87
4. Effet du plomb-----	87
5. Comparaison de l'effet des ETMs sur la croissance d' <i>Alexandrium catenella</i> -----	88
II. EFFET DES ETMs (cuivre, zinc, plomb ou cadmium) SUR L'ENKYSTEMENT D' <i>Alexandrium. catenella</i> -	89
III. EFFET DES ETMs (cuivre, zinc, plomb ou cadmium) SUR L'EXSUDATION DU COD PAR <i>Alexandrium</i> <i>catenella</i> -----	90
1. Effet du cuivre-----	90
2. Effet du zinc-----	90
3. Effet du cadmium-----	92
4. Effet du plomb-----	92
IV. EFFET DES ETMs (cuivre, zinc, plomb ou cadmium) SUR L'EXSUDATION DES MOLÉCULES FLUORESCENTES PAR <i>Alexandrium catenella</i> -----	93
1. Contribution de la fluorescence en l'absence de contamination-----	94
2. Contribution de la fluorescence en réponse à la contamination par le cuivre-----	94
3. Contribution de la fluorescence en réponse à la contamination par le zinc-----	98
4. Contribution de la fluorescence en réponse à la contamination par le plomb-----	101
5. Contribution de la fluorescence en réponse à la contamination par le cadmium-----	103
6. Contribution de la fluorescence en réponse à la contamination par le cuivre et le cadmium-----	106
7. Contribution de la fluorescence en réponse à la contamination par le zinc et le plomb-----	106
V. MONOSURES EXSUDÉS PAR <i>Alexandrium catenella</i> EN RÉPONSE A LA CONTAMINATION PAR LES ETMs-----	107
1. Caractérisation des monosucres exsudés par <i>Alexandrium catenella</i> -----	107
2. Evolution des contributions des monosucres exsudés par <i>Alexandrium catenella</i> en fonctions des concentrations en ETMs-----	109

2.1- Cuivre-----	109
2.2- Plomb-----	109
2.3- Zinc -----	109
2.4- Cadmium -----	109
VI. ANALYSES EN COMPOSANTES PRINCIPALES DES DIFFÉRENTES VARIABLES ESTIMÉES SOUS LES CONTAMINATIONS AVEC LES DIFFÉRENTS ETMs-----	111
1. Cas de la contamination par le cuivre -----	112
1.1- Projection sur l'axe F1-----	112
1.2- Projection sur l'axe F2-----	112
2. Cas de la contamination par le zinc-----	113
2.1- Projection sur l'axe F1-----	113
2.2- Projection sur l'axe F2-----	113
3. Cas de la contamination par le plomb -----	114
3.1- Projection sur l'axe F1-----	114
3.2- Projection sur l'axe F2-----	114
4. Cas de la contamination par le cadmium-----	115
4.1- Projection sur l'axe F1-----	115
4.2- Projection sur l'axe F2-----	115
VII. COMPARAISON DE L'EXSUDATION PAR <i>Skeletonema costatum</i> et <i>Alexandrium catenella</i> -----	116
B. DISCUSSION -----	117
I. EFFET DES DIFFÉRENTS STRESS MÉTALLIQUE SUR LA CROISSANCE D' <i>Alexandrium catenella</i> ---	117
II. EXSUDATION DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS PAR <i>Alexandrium catenella</i> EN RÉPONSE AUX DIFFÉRENTS STRESS MÉTALLIQUES-----	120
III. COMPOSITION ET CONCENTRATIONS DES MOLÉCULES EXSUDÉES PAR <i>Alexandrium catenella</i> EN RÉPONSE AUX DIFFÉRENTS STRESS MÉTALLIQUES -----	122
IV. MOLÉCULES FLUORESCENTES EXSUDÉES PAR <i>Alexandrium catenella</i> EN RÉPONSE AUX DIFFÉRENTS STRESS MÉTALLIQUES -----	123
C. CONCLUSION -----	124
<b>CHAPITRE V. IMPACT DES ÉLÉMENTS TRACES MÉTALLIQUES SUR LE PROTÉOME</b>	
<b>D'<i>Alexandrium catenella</i></b> -----	126
A. RÉSULTATS -----	127
I. IMPACT DU PLOMB SUR LE PROTÉOME D' <i>Alexandrium catenella</i> -----	127
1. Impact de la contamination par le plomb 6 $\mu\text{M}$ -----	127
1.1- Profils d'expression protéique -----	127
1.2- Identification putative des protéines d'intérêt-----	134
1.3- Catégories fonctionnelles des protéines d'intérêt-----	137
1.4- Taux d'expression des protéines analysées par LC-MS/MS-----	138
2. Impact de la contamination par le plomb 12 $\mu\text{M}$ -----	139
2.1- Profils d'expression protéique -----	139
2.2- Identification putative des protéines d'intérêt-----	145

2.3- Catégories fonctionnelles des protéines d'intérêt-----	146
2.4- Taux d'expression des protéines analysées par LC-MS/MS-----	147
3. Impact de la contamination par le plomb 18 $\mu\text{M}$ -----	148
3.1- Profils d'expression protéique -----	148
3.2- Identification putative des protéines d'intérêt-----	153
3.3- Catégories fonctionnelles des protéines d'intérêt-----	154
3.4- Taux d'expression des protéines analysées par LC-MS/MS-----	155
4. Comparaison de l'impact du plomb aux concentrations testées-----	156
4.1- Comparaison des profils d'expression protéique -----	156
4.2- Protéines d'intérêt exprimées en commun -----	157
4.3- Expression des protéines d'intérêt en fonction du niveau de contamination -----	158
II. IMPACT DU ZINC SUR LE PROTÉOME D' <i>Alexandrium catenella</i> -----	165
1. Impact de la contamination par le zinc 6 $\mu\text{M}$ -----	165
1.1- Profils d'expression protéique -----	165
1.2- Identification putative des protéines d'intérêt-----	171
1.3- Catégories fonctionnelles des protéines d'intérêt-----	172
1.4- Taux d'expression des protéines analysées par LC-MS/MS-----	173
2. Impact de la contamination par le zinc 12 $\mu\text{M}$ -----	174
2.1- Profils d'expression protéique -----	174
2.2- Identification putative des protéines d'intérêt-----	180
2.3- Catégories fonctionnelles des protéines d'intérêt-----	181
2.4- Taux d'expression des protéines analysées par LC-MS/MS-----	182
3. Impact de la contamination par le zinc 18 $\mu\text{M}$ -----	183
3.1- Profils d'expression protéique -----	183
3.2- Identification putative des protéines d'intérêt-----	189
3.3- Catégories fonctionnelles des protéines d'intérêt-----	190
3.4- Taux d'expression des protéines analysées par LC-MS/MS-----	191
4. Comparaison de l'impact du zinc aux concentrations testées -----	192
4.1- Comparaison des profils d'expression protéique -----	192
4.2- Protéines d'intérêt exprimées en commun -----	193
4.3- Expression des protéines d'intérêt en fonction du niveau de contamination -----	194
III. COMPARAISON DE L'IMPACT DU PLOMB ET DU ZINC SUR LE PROTÉOME D' <i>Alexandrium catenella</i> -----	201
1. Comparaison des profils d'expression protéique-----	201
2. Protéines d'intérêt exprimées en commun-----	202
2.1- Protéines exprimées en commun à la concentration contaminante 6 $\mu\text{M}$ -----	202
2.2- Protéines exprimées en commun à la concentration contaminante 12 $\mu\text{M}$ -----	203
2.3- Protéines exprimées en commun à la concentration contaminante 18 $\mu\text{M}$ -----	204
3. Comparaison de l'impact du plomb et du zinc sur l'expression protéique -----	205
3.1- Impact du plomb et du zinc sur la sur-expression des protéines-----	205

3.2- Impact du plomb et du zinc sur la sous-expression et la disparition des protéines -----	206
4. Comparaison de l'impact du plomb et du zinc sur les catégories fonctionnelles assignées aux protéines d'intérêt -----	209
B. DISCUSSION-----	211
I. PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LA RÉPONSE AU STRESS OXYDATIF -----	211
1. Superoxyde dismutase -----	211
2. Sous-unités $\alpha$ et $\beta$ du protéasome-----	217
II. PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LA PHOTOSYNTÈSE -----	220
1. Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase -----	220
2. Complexe péridinine chlorophylle - protéine -----	224
3. Ferrédoxine – NADP réductase -----	227
III. PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LE MÉTABOLISME DES CARBOHYDRATES -----	230
1. Triosephosphate isomérase -----	230
2. Ribose 5-phosphate isomérase -----	234
3. Matate déshydrogénase -----	238
IV. PROTÉINE IMPLIQUÉE DANS LA PHOTORESPIRATION ET LE MÉTABOLISME DU PHOSPHORE	241
V. PROTÉINES IMPLIQUÉE DANS LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE -----	245
VI. PROTÉINE IMPLIQUÉE DANS LE SIGNAL CELLULAIRE ET L'ACTIVATION DES PROTÉINES KINASES -----	250
VII. PROTÉINES CHAPERONNES -----	253
VIII. PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LA BIOLUMINESCENCE D' <i>Alexandrium catenella</i> -----	257
CONCLUSION GÉNÉRALE et PERSPECTIVES -----	259
BIBLIOGRAPHIE -----	263
LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ABRÉVIATIONS -----	282
ANNEXES -----	288

*INTRODUCTION*  
*GÉNÉRALE*

Les écosystèmes marins côtiers constituent des zones d'interfaces entre la terre, l'océan et l'atmosphère. Bien qu'ils ne représentent qu'une faible surface (70% de la surface océanique), ces écosystèmes sont très productifs, contribuant entre 14 et 30% à la production primaire des océans (Mantoura *et al.*, 1991), et sont soumis à une importante pression anthropique. Le compartiment phytoplanctonique joue un rôle important dans le fonctionnement des écosystèmes marins côtiers. En effet, à côté de sa position de principal producteur primaire des océans, il est en général à la base des réseaux trophiques. Le phytoplancton, est constitué de microorganismes unicellulaires autotrophes, capables de réaliser la photosynthèse et de produire tous les constituants cellulaires en utilisant l'énergie lumineuse et des nutriments inorganiques. La matière organique produite est alors rapidement transmise aux échelons supérieurs de la chaîne alimentaire. La croissance du phytoplancton peut être limitée par des facteurs physiques tels que la lumière, la température, la turbidité, et par des facteurs nutritionnels d'origine naturelle ou anthropique (Bougis, 1974). Concernant les facteurs nutritionnels, les écosystèmes côtiers y sont particulièrement sensibles, en raison des apports significatifs en engrais, pesticides et métaux traces *via* les cours d'eaux, et les rejets urbains et industriels.

Dans les écosystèmes marins côtiers, la diatomée *Skeletonema costatum* occupe une place clé dans le réseau trophique. Ainsi, elle montre une domination annuelle sur l'ensemble de la biomasse phytoplanctonique, dans plusieurs écosystèmes tels que : Banyuls-sur-Mer (Jacques, 1968), le Golfe de Marseille (Travers, 1971) ou encore la petite rade de Toulon (Jamet *et al.*, 2005; Rossi et Jamet, 2008). Dans ces milieux eutrophisés par les apports anthropiques, *Skeletonema costatum* se développe sporadiquement pendant les saisons automnale et printanière, faisant parfois l'objet de « blooms » phytoplanctoniques avec des abondances dépassant  $10^6$  cellules  $L^{-1}$ . Dans la communauté phytoplanctonique, les microalgues nuisibles telles qu'*Alexandrium catenella* sont responsables d'efflorescences algales massives, appelées Harmful Algal Blooms ou « HABs » impliquées dans le phénomène de marées rouges. L'intoxication paralysante par consommation de fruits de mer (IPFM) (en anglais « PSP » : Paralytic Shellfish Poisoning) est provoquée par des dinoflagellés produisant la toxine paralysante saxitoxine qui appartiennent aux genres *Alexandrium*, *Gonyaulax*, *Gymnodinium* et *Pyrodinium*.

Afin de se protéger des contaminants métalliques, le phytoplancton développe des mécanismes de défense se traduisant par l'activation de pompes ATP-dépendantes, permettant de maintenir un niveau intracellulaire de concentration métallique par rapport au niveau extracellulaire. S'ajoutant à cela, l'exsudation de protéines, polysaccharides et acides

humiques, ayant de fortes capacités de complexation vis-à-vis des métaux libres, pourrait permettre de limiter l'effet toxique des métaux dans les cellules.

La rade de Toulon (France, Méditerranée occidentale) est un écosystème privilégié pour les études *in situ* étant donné ses caractéristiques morphométriques et la pression anthropique qu'elle subit. De nombreux travaux ont été effectués dans la petite rade, certains portant sur la densité et de la biodiversité planctoniques (Jamet et Ferec-Corbel, 1996; Jamet *et al.*, 2001; Jamet *et al.*, 2005), d'autres analysant la taxonomie du zooplancton en fonction des paramètres saisonniers (Jamet et Ferec-Corbel, 1996). Des études ont aussi concerné la caractérisation de l'activité phosphatasique du zooplancton (Bogé *et al.*, 2002; Jean *et al.*, 2003; Bogé *et al.*, 2006), et la production du diméthylsulfoniopropionate (DMSP) par le phytoplancton de la rade de Toulon (Despiau *et al.*, 2002; Jean *et al.*, 2005). La petite rade de Toulon a également été utilisée comme site atelier au cours du contrat du Baie (SIAT, 2002), qui a mis en évidence l'impact de la pollution par les métaux lourds dans cet écosystème. En outre, un travail de thèse récemment effectué (Rossi et Jamet, 2008) a permis de comparer la structure et l'évolution des communautés planctoniques de la petite et de la grande rade, avec une approche quantitative et qualitative, tenant compte de l'évolution des teneurs en éléments traces métalliques dans l'eau. Dans la petite rade de Toulon, les concentrations de cuivre dans la colonne d'eau ont varié entre 0,62 et 2,82  $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ , alors que les teneurs en plomb ont fluctué entre 0,16 et 19,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Dans les organismes phytoplanctoniques, les concentrations en cuivre exprimées en  $\text{g gC}^{-1}$  ont varié entre  $2,69 \cdot 10^{-4} \text{ g gC}^{-1}$  et  $3,92 \cdot 10^{-2} \text{ g gC}^{-1}$ , tandis que les teneurs en plomb ont atteint au maximum  $3,83 \cdot 10^{-3} \text{ g gC}^{-1}$  (Rossi et Jamet, 2008).

Des études précédentes ont montré la prédominance des dinoflagellés, et des blooms du dinoflagellé toxique *Alexandrium*, dans des écosystèmes marins côtiers contaminés par les éléments traces métalliques (ETMs) (Jean *et al.*, 2005, 2006, 2012; Tessier *et al.*, 2011). Ces études suggèrent qu'*Alexandrium* serait résistant aux ETMs. Afin de vérifier ce postulat pour l'espèce *Alexandrium catenella* mais aussi pour la diatomée *Skeletonema costatum*, nous avons caractérisé la matière organique dissoute (MOD) exsudée par ces deux espèces, en utilisant la technique de spectroscopie de fluorescence 3D, analysé les exsudats polysaccharidiques contenus dans la MOD, et étudié les protéomes d'*Alexandrium catenella* grâce à la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle (2D). Les techniques innovantes de spectroscopie de fluorescence 3D et d'électrophorèse 2D sont appliquées de façon inédite aux espèces phytoplanctoniques étudiées afin d'évaluer leurs réponses aux stress métalliques.

La diatomée centrale *Skeletonema costatum* a été choisie dans cette étude, car elle est présente de façon permanente, et durant une longue période de l'année, dans un écosystème

côtier connu pour sa pollution métallique : la petite rade de Toulon (Jamet *et al.*, 1996, 2001; Rossi et Jamet, 2008). Elle est largement étudiée dans les tests de toxicité, principalement envers le cuivre (Erickson, 1972; Morel *et al.*, 1978; Mandelli, 1969; Steeman-Nielson et Wium-Anderson, 1970; Sunda *et al.*, 1976). Ainsi, cette espèce, a été isolée au niveau de la petite rade de Toulon, puis maintenue en culture.

Quant à *Alexandrium catenella*, cette microalgue a un potentiel toxique (Vila *et al.*, 2001; Turki et Balti, 2005; Frehi, 2007), et est impliquée dans les « HABs » caractérisant les milieux perturbés par les rejets anthropiques, contaminés par les métaux traces, comme la petite rade de Toulon (Jean *et al.*, 2006; Tessier *et al.*, 2011). Cette espèce a été isolée à partir de kystes présents dans les sédiments d'une lagune anthropisée, la lagune de Thau, par le Laboratoire d'Écologie des Systèmes Marins Côtiers (ECOSYM UMR 5119, Université de Montpellier 2, CNRS, IFREMER et IRD). Ce laboratoire nous a plus particulièrement fourni la souche ACT03 d'*Alexandrium catenella* que nous avons ensuite maintenue en culture.

Ainsi, les objectifs spécifiques de la présente étude sont :

- 1- Evaluer l'impact de la pollution métallique sur *Skeletonema costatum* et *Alexandrium catenella* à l'échelle physiologique, en quantifiant les densités et les taux de croissance des cellules mises en cultures.
- 2- Caractériser les produits d'excrétion ou exsudats de ces deux espèces phytoplanctoniques marines soumises à des stress métalliques, afin de comprendre leurs réponses face aux stress, et l'implication des exsudats dans la spéciation métallique et donc dans la biodisponibilité et la toxicité des métaux vis-à-vis des cellules.
- 3 - Etudier les protéomes exprimés par *Alexandrium catenella*, cultivée en conditions de stress métalliques, de façon à identifier les protéines de stress exprimées par cette espèce dans de telles conditions. Les protéines de stress dûment identifiées, permettront de définir le potentiel de tolérance d'*Alexandrium catenella* vis-à-vis des ETMs.

Pour répondre à ces objectifs, deux campagnes d'échantillonnage ont été menées en juin et juillet 2009, dans la petite rade de Toulon, au niveau de la station « port de Toulon » à 3 m de profondeur, afin de déterminer l'environnement physico-chimique du site d'étude et de prélever les souches à étudier (*Skeletonema costatum*). Au laboratoire, des cultures *in vitro* de la diatomée *Skeletonema costatum* et du dinoflagellé toxique *Alexandrium catenella* ont été réalisées en conditions normales et en conditions contaminantes (sans et avec ETMs). Différentes expérimentations portant sur la croissance, les protéomes, les analyses de COD, de carbohydrates, de polysaccharides exsudés, et de fluorescence de la MOD ont été réalisées à partir des cultures obtenues. *S. costatum* a été choisie car c'est une espèce présente dans les

milieux côtiers méditerranéens, et *A. catenella* car c'est une espèce produisant des toxines particulièrement sensible aux apports anthropiques et permettant une étude des protéomes grâce à l'absence de frustule.

Le travail de thèse ici présenté s'articule autour de cinq chapitres :

Le premier chapitre présente la problématique générale, faisant état des données historiques sur le phytoplancton, ses réponses cellulaires à la pollution métallique, ainsi que des mécanismes de défense qu'il peut mettre en place en conditions de stress métalliques.

Le deuxième chapitre décrit les différentes techniques utilisées au cours de cette étude. S'ensuivent les troisième, quatrième et cinquième chapitres, consacrés à la présentation des principaux résultats puis à leurs discussions.

Le troisième chapitre est réservé à l'étude de l'effet de la contamination par le cuivre sur la diatomée *Skeletonema costatum* mise en culture. Dans cette partie, sont présentés les effets des concentrations croissantes en cuivre sur les cinétiques de croissance, l'exsudation du COD, des carbohydrates, des polysaccharides (composition en monosucres) et de la matière organique fluorescente (FDOM).

Le quatrième chapitre est consacré à l'étude de l'impact des ETMs (cuivre, zinc, plomb et cadmium) sur la croissance et la cinétique de libération des molécules extracellulaires par *Alexandrium catenella* en conditions normales et contaminantes, par spectroscopie de fluorescence 3D et par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Le cinquième chapitre a examiné l'étude de la réponse protéomique d'*Alexandrium catenella* soumise à différents stress métalliques. La mise en évidence de protéines de stress exprimées par cette espèce a été réalisée par comparaisons des gels électrophorétiques 2D obtenus dans des conditions de référence et des conditions contaminantes. L'identification des protéines impliquées dans la réponse au stress a ensuite été effectuée grâce à la technique de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

Enfin, le mémoire de thèse se termine par une conclusion générale, incluant une synthèse de l'essentiel des résultats obtenus, aboutissant à leurs perspectives.

*CHAPITRE I*

*ÉTAT DE L'ART*

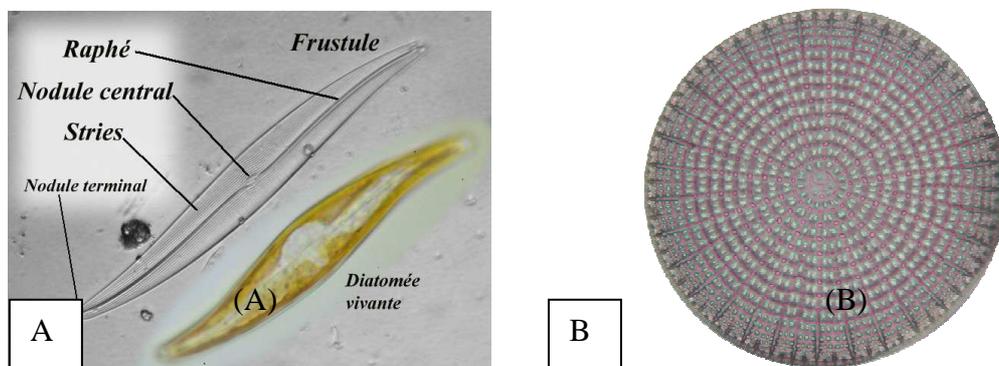
# I. PHYTOPLANCTON

## 1. Taxonomie du phytoplancton

Du point de vue taxonomique, le phytoplancton montre une grande diversité (Bougis, 1974). Toutefois, la classe prédominante parmi le phytoplancton marin est celle des diatomées, suivie par la classe des dinophycées. Les autres classes phytoplanctoniques (chlorophycées, cryptophycées, prasinophycées, euglénophycées,...) sont incluses dans le groupe des flagellés.

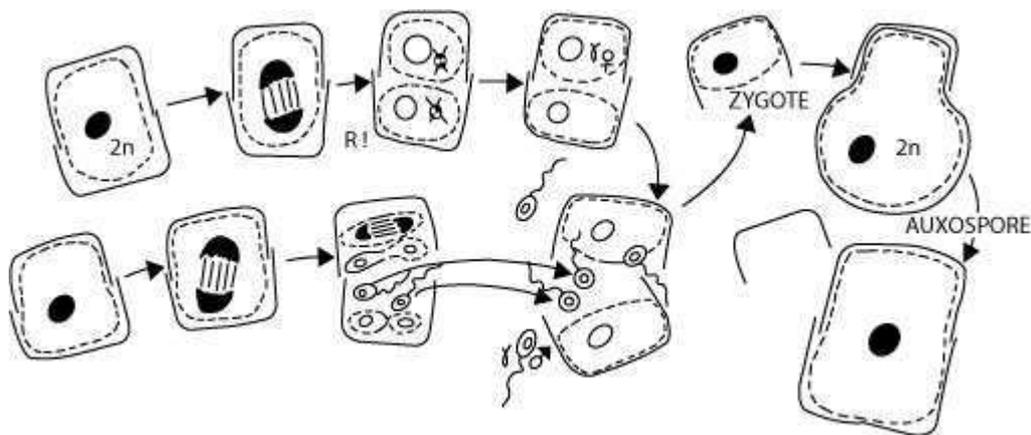
### 1.1- Diatomées

Les diatomées, ou bacillariophycées, sont des microalgues (2 – 200  $\mu\text{m}$ ) possédant un exosquelette appelé frustule, à base de silice biogène (ou opale,  $\text{SiO}_2$ ,  $n\text{H}_2\text{O}$ ) et de pectine. Celui-ci est composé de deux valves (l'hypovalve ou valve inférieure, et l'épivalve ou valve supérieure) qui s'emboîtent l'une dans l'autre (à la façon d'une boîte de Pétri). Chez les diatomées pennées, les valves sont allongées, de symétrie bilatérale par rapport à une fente, le raphé, de part et d'autre de laquelle se trouvent des tubercules ornementaux (Figure 1A). Chez les diatomées centrales, ayant une symétrie radiale, les tubercules d'ornementation sont disposés en stries rayonnantes (Figure 1B).



Les diatomées peuvent être solitaires ou se développer en colonies (surtout en chaînes), libres ou fixées. La formation de colonies peut contribuer à diminuer la vitesse de sédimentation, notamment pour les espèces formant des colonies en chaînes spiralées (Peperzak *et al.*, 2003).

Ces microalgues se reproduisent par multiplication végétative, assurée par une succession de divisions cellulaires, aboutissant à une diminution de la taille moyenne des cellules. Lorsque les cellules atteignent leur largeur minimale, un processus de reproduction sexuée se déclenche, appelé auxosporulation, qui engendre une auxospore donnant naissance à une cellule initiale de grande taille (Figure 2).

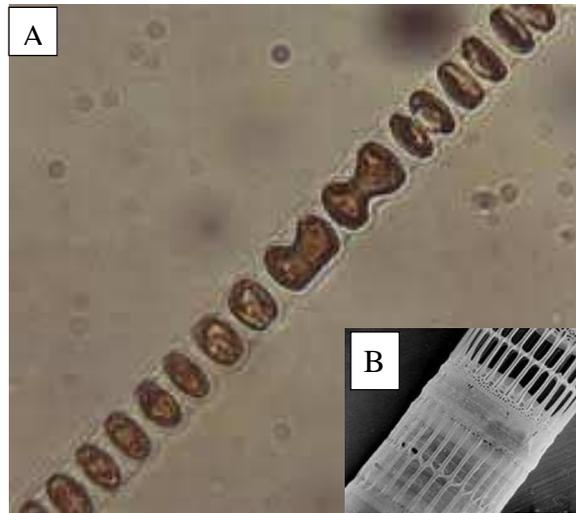


**Figure 2.** Reproduction sexuée (ou auxosporulation) chez les diatomées centrales. Les cellules algales sont réunies en file par emboîtement des digitations terminant les expansions externes ([http://www.afd-ld.org/~fdp\\_bio/content.php?page=cara\\_plantes&skin=modi](http://www.afd-ld.org/~fdp_bio/content.php?page=cara_plantes&skin=modi))

Les diatomées sont constituées d'environ 100 000 espèces, répandues dans tous les milieux aquatiques, que ce soit en eau douce, en eau saumâtre ou bien en eau salée. Ces microalgues, surtout abondantes dans les écosystèmes eutrophes, préfèrent les fortes températures et les intensités lumineuses élevées. Par conséquent, elles sont souvent responsables des « blooms » printaniers observés dans les écosystèmes tempérés (Rousseau *et al.*, 1994).

Les diatomées sont les microorganismes les plus utilisés en maricultures. Ainsi, parmi les espèces les plus largement utilisées en conchyliculture, se trouve la diatomée centrale *Skeletonema costatum* (Chrétiennot-Dinet *et al.*, 1985) (Figure 3). Les valves de *Skeletonema costatum* sont plus ou moins bombées et discoïdes, avec un diamètre compris entre 10 et 20  $\mu\text{m}$ . Cette diatomée est considérée comme commune et abondante parmi les communautés phytoplanctoniques pélagiques, et est souvent observée dans les estuaires, où elle présente une forte biomasse (Rincé *et al.*, 1999). Toutefois, elle est aussi particulièrement abondante dans les milieux marins côtiers, où elle constitue un maillon important des chaînes trophiques à

mollusques. Elle est un aliment incontournable du nourrissage des bivalves adultes en raison de sa teneur en silice (Barillé *et al.*, 2000).



**Figure 3.** *Skeletonema costatum* (www.ndu.ac.jp)

(A) Chaîne de cellules en vue cingulaire (Microscope photonique  $\times 100$ )

(B) Détail des expansions externes (Microscope électronique à balayage)  
(<http://www.ndu.ac.jp/~t-nagumo/005SkeletonemaC.html>)

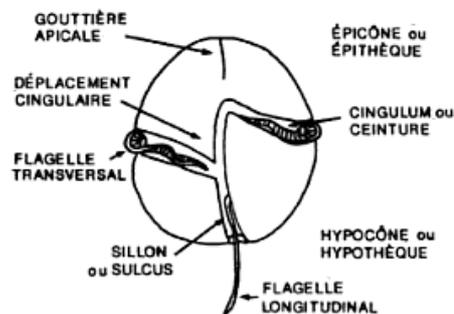
Sur les côtes françaises, la diatomée *Skeletonema costatum* occupe une place clé dans le réseau trophique pélagique. Elle montre une domination annuelle sur l'ensemble de la biomasse phytoplanctonique, dans plusieurs écosystèmes de ces côtes, tels que : Banyuls-sur-Mer (Jacques, 1968), le Golfe de Marseille (Travers, 1971) ou encore la petite rade de Toulon (Jamet *et al.*, 2005; Rossi et Jamet, 2008). Dans ces milieux perturbés par les apports anthropiques, *Skeletonema costatum* se développe sporadiquement pendant les saisons automnale et printanière, faisant l'objet des « blooms » phytoplanctoniques avec des abondances dépassant  $10^6$  cellules  $L^{-1}$ . Sur les côtes tunisiennes, *Skeletonema costatum* est observée pendant toute l'année, montrant de fortes abondances. Par exemple, dans la lagune de Bizerte, de nombreuses études mesurant l'abondance et la biomasse des diatomées, (Grami *et al.*, 2008; Sakka Hlaili *et al.*, 2008), ont enregistré de fortes biomasses carbonées (204 - 231  $mg\ C\ m^{-3}$ ). Les biomasses élevées, associées à ce groupe phytoplanctonique, ont été attribuées à des diatomées pennales parmi lesquelles figure *Skeletonema costatum* (Daly-Yahia-Kéfi *et al.*, 2005). D'autres recherches menées dans la baie de Tunis ont montré de fortes abondances estivales de *Skeletonema costatum*, révélant que cette particularité constituait une caractéristique commune avec plusieurs écosystèmes marins méditerranéens, comme la lagune de Mar Menor en Espagne (Daly-Yahia-Kéfi *et al.*, 2005). De plus, une étude récente

conduite dans la lagune de Bizerte a confirmé la présence de *Skeletonema costatum* associée à d'autres dinoflagellés potentiellement toxiques, au sein de la communauté phytoplanctonique (Bouchouicha *et al.*, 2012).

## 1.2- Dinophycées

Les dinophycées, ou dinoflagellés, regroupent près de 1 300 espèces. Les cellules (10 - 200  $\mu\text{m}$ ) peuvent être solitaires ou regroupées en colonies. La paroi cellulaire, appelée thèque, peut être fine et peu ornementée chez les dinoflagellés dits « nus », ou au contraire, épaisse, renforcée par des plaques internes de cellulose, chez les dinoflagellés dits « cuirassés » ou « armés ». Ces plaques sont variables par leurs nombres, leurs contours, leurs dimensions et leurs ornements (pores, épines, cornes, crêtes, ailettes, collerettes,...)

Les dinoflagellés ont deux flagelles à disposition orthogonale, un flagelle transversal, aplati, situé dans un sillon équatorial (cingulum), et un flagelle longitudinal, logé dans un sillon vertical (sulcus) (Figure 4).



**Figure 4.** Morphologie d'un dinoflagellé (Bérard-Therriault *et al.*, 1999)

Les dinoflagellés possèdent un noyau particulier, appelé « dinocaryon », à l'intérieur duquel l'ADN n'est pas associé à des histones, comme c'est le cas chez les autres eucaryotes, mais complexé à une protéine particulière, ayant pour conséquence la condensation permanente des chromosomes, même pendant l'interphase. Ces microalgues sont très diversifiées, en particulier par leurs comportements alimentaires. Certaines sont photosynthétiques strictes, d'autres sont mixotrophes, d'autres encore sont hétérotrophes strictes.

Les dinoflagellés se reproduisent surtout par multiplication végétative (bipartition). La reproduction sexuée, qui n'existe que chez certaines espèces, donne un zygote qui s'enkyste (kyste calcaire), et peut sédimenter et subsister longtemps, enfoui dans les sédiments. La

prolifération de certains dinoflagellés, responsables des phénomènes des marées rouges, est souvent liée à une remise en suspension des kystes, et au développement subséquent des cellules végétatives.

### **1.3- Flagellés**

Les microalgues porteuses de flagelles forment le groupe des flagellés qui renferme plusieurs classes : les prymnésiofycées, les chlorofycées, les prasinofycées, les cryptofycées, les raphidofycées, les euglénofycées, les chrysophycées et les dictyochofycées. Les flagellés se reproduisent, le plus souvent, par bipartition longitudinale et sont capables d'enkystement. La reproduction sexuée, quand elle existe, s'effectue grâce à des gamètes flagellés peu dissemblables entre eux (isogamie).

## **2. Production primaire du phytoplancton**

Le phytoplancton est à la base de la production primaire en milieu marin, processus majeur dans le cycle biogéochimique du carbone dans l'océan (Tian *et al.*, 2001). La fixation du carbone inorganique par le phytoplancton dans les eaux de surface, sa transformation en carbone organique, puis son transport vers les eaux profondes, sont des processus constituant une « pompe biologique » qui régule la quantité atmosphérique de CO<sub>2</sub>. La production primaire peut être très importante lorsque le phytoplancton forme des efflorescences ou « blooms » qui présentent une variabilité saisonnière et géographique. Généralement, les zones côtières sont caractérisées par des taux élevés de production primaire (de 100 à 150 g C m<sup>-2</sup> an<sup>-1</sup>), dûs essentiellement aux blooms de phytoplancton de grande taille (diatomées > 20 µm) (Zeitzschel, 1978 ; Grami *et al.*, 2008). Cette classe phytoplanctonique est alors caractérisée par des taux de croissance, d'assimilation des nutriments et de production très élevés (Malone et Neale, 1981).

Le développement phytoplanctonique, dans la colonne d'eau, est contrôlé par des facteurs physico-chimiques tels que : la luminosité, les nutriments, la turbidité et la température de l'eau (Riper, 1979; Folkowski et Owens, 1980; Glover *et al.*, 1987; Neale et Richardson, 1987), mais aussi par des facteurs biotiques tels que le broutage par le zooplancton. Les consommateurs zooplanctoniques assurent le transfert de la production primaire vers les échelons supérieurs à travers différentes structures ou réseaux trophiques (Legendre et Rassoulzadegan, 1996a; Sakka *et al.*, 2002; Grami *et al.*, 2008). La structure trophique est intimement liée à la taille des brouteurs (microzooplancton, mésozooplancton,

...) qui, à son tour, dépend de la taille des producteurs. En effet, les microorganismes composant le phytoplancton couvrent un large spectre de taille, allant du picophytoplancton (< 2 µm) au microphytoplancton (20 – 200 µm), en passant par le nanophytoplancton (2 – 20 µm).

### 3. Écologie du phytoplancton

Le développement du phytoplancton est contrôlé par un ensemble de facteurs abiotiques, parmi lesquels figurent la lumière, la salinité, la température et les sels nutritifs.

La lumière est un facteur crucial agissant sur la production phytoplanctonique. En effet, la lumière agit qualitativement et quantitativement sur le métabolisme phytoplanctonique (Glover *et al.*, 1987). Ainsi, l'élévation de la luminosité entraîne une efflorescence de microalgues aboutissant à un maximum de biomasse et de production primaire. En revanche, en hiver, malgré la disponibilité des nutriments, la production phytoplanctonique reste limitée par un faible éclaircissement. Par ailleurs, une exposition des cellules à une lumière saturante, réduit progressivement le taux photosynthétique (Vollenweider et Nauwerk, 1961; Harris et Piccinin, 1977) et peut même l'inhiber (Neale et Richardson, 1987). De plus, les radiations U.V. (280 – 400 nm) diminuent la photosynthèse (Holm-Hansen *et al.*, 1993; Vincent et Roy, 1993) et peuvent réduire le taux de production phytoplanctonique (Smith *et al.*, 1980).

La salinité, en agissant sur la biomasse chlorophyllienne (Revelante et Gilmartin, 1976) et le taux de croissance du phytoplancton (Yin *et al.*, 2000), peut affecter le taux de production phytoplanctonique. Par ailleurs, les variations spatiale ou saisonnière de la salinité, peuvent induire des changements dans la composition spécifique des communautés microalgales (Chien, 1992; Daly-Yahia-Kéfi, 1998; Videau *et al.*, 1998).

La température est aussi un paramètre important puisqu'elle peut agir sur la biomasse chlorophyllienne en affectant directement le taux de croissance phytoplanctonique (Levasseur et Thierrault, 1987). Les faibles températures sont accompagnées d'une nette baisse de croissance phytoplanctonique (Verity, 1981; Iriarte et Purdie, 1993). En outre, en agissant sur l'assimilation des nutriments, la température peut aussi affecter, indirectement, la production phytoplanctonique (Baird *et al.*, 2001).

Les sels nutritifs constituent un facteur déterminant pour la croissance, la dynamique et la structuration des communautés microalgales (Sakka *et al.*, 1999; Chikhaoui, 2003). Dans les eaux côtières de la Méditerranée, le phosphore est un élément nutritif plus limitant que l'azote pour le développement phytoplanctonique (Chikhaoui *et al.*, 2008).

En Méditerranée occidentale, l'apport en composés azotés par les eaux du Rhône, explique une biomasse importante dans la mer d'Alboran et le golfe du Lion (Antoine *et al.*, 1995; Moutin et Raimbault, 2002). En revanche, en Méditerranée orientale, les apports d'origine atmosphérique constituent la principale source d'éléments nutritifs (Guerzoni *et al.*, 1999; Ridame, 2001). Le bassin oriental est donc considéré comme ultra-oligotrophe (Yacobi *et al.*, 1995), présentant une production primaire très faible (2,04 g de C m<sup>-2</sup> an<sup>-1</sup>) (Sournia, 1973), limitée principalement par le phosphate (Krom *et al.*, 1991; Zohary et Robarts, 1998). La Méditerranée est caractérisée par deux gradients d'oligotrophie : un gradient ouest – est, et un gradient nord – sud, le nord étant moins oligotrophe que le sud (Sournia, 1973; Morel et André, 1991; Antoine *et al.*, 1995). Dans certaines lagunes méditerranéennes, telles que la lagune de Thau, la biomasse phytoplanctonique est élevée (Souchu *et al.*, 2001). Cette biomasse est alors attribuée aux cellules phytoplanctoniques de plus grande taille (> 20 µm) telles que les diatomées, tandis que le picophytoplancton (0,2 à 2 µm) contribue à 25% de la production primaire totale (Vaquer *et al.*, 1996).

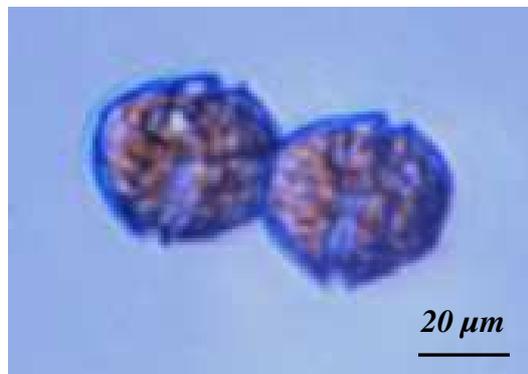
#### **4. Phytoplancton nuisible**

Le phytoplancton nuisible est impliqué dans des efflorescences algales massives, dénommées « Harmful Algal Blooms » (« HABS »), se traduisant par un phénomène d'eaux colorées aussi appelées marées rouges (Smayda, 1997a). Certaines espèces contribuant aux « HABS » peuvent ne pas être toxiques, mais nocives, induisant des effets indésirables succédant à leur mortalité, tels que l'anoxie du milieu liée à la présence d'une quantité importante de matière organique, laquelle est dégradée par des bactéries en conditions aérobies. D'autres espèces responsables de « HABS », sont productrices de phycotoxines causant la mortalité des animaux marins (mollusques, poissons, oiseaux, ...), *via* leur ingestion directe de microalgues toxiques (Shimizu, 1998; Yassumoto et Murata, 1984). Ainsi, la consommation de mollusques et de poissons contaminés par ces phycotoxines peut induire des intoxications chez l'être humain, qui, dans certains cas, s'avèrent mortelles (Hallegraeff, 1993). La fréquence, ainsi que la distribution des « HABS », a montré une augmentation dans les écosystèmes marins côtiers au cours des dernières décennies (Hallegraeff, 1993; Sellner *et al.*, 2003). Bien que cela n'ait pas encore été démontré, l'eutrophisation forcée par les apports anthropiques pourrait en partie expliquer l'expansion de ce phénomène (Hallegraeff, 1993; Sellner *et al.*, 2003; Glibert *et al.*, 2005).

Les espèces impliquées dans les « HABs » appartiennent, pour 75%, à la classe des dinoflagellés (Smayda, 1997b) particulièrement abondants dans les écosystèmes marins côtiers eutrophes (Walker, 1984). Plusieurs syndromes liés aux dinoflagellés toxiques ont été répertoriés à ce jour (Lilly *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 2005) :

- ▶ L'intoxication diarrhéique par consommation de fruits de mer (IDFM) (en anglais «DSP» : Diarrhetic Shellfish Poisoning), causée par des dinoflagellés appartenant aux genres *Dinophysis* et *Prorocentrum*. La principale toxine diarrhéique est l'acide okadaïque.
- ▶ L'intoxication paralysante par consommation de fruits de mer (IPFM) (en anglais « PSP » : Paralytic Shellfish Poisoning), provoquée par des dinoflagellés appartenant aux genres *Alexandrium*, *Gonyaulax*, *Gymnodinium* et *Pyrodinium*. La toxine paralysante est la saxitoxine.
- ▶ L'intoxication neurologique par consommation de fruits de mer (INFM) (en anglais « NSP » : Neurologic Shellfish Poisoning), induite par les brevéttoxines synthétisées par le dinoflagellé *Gymnodinium breve*.
- ▶ La ciguatéra, intoxication entraînant des troubles gastro-intestinaux et neurologiques liés à la consommation de poissons (ICP) (en anglais « CFP »: Ciguatera Fish Poisoning) contaminés par des dinoflagellés du genre *Gambierdiscus*. Les toxines responsables de ce syndrome sont les ciguatoxines et les maïtotoxines.

Parmi les différents syndromes sus- cités, le syndrome IPFM semble être le plus connu et aussi l'un des plus dangereux puisqu'il peut être fatal. Ce syndrome est le plus souvent causé par des espèces appartenant au genre *Alexandrium*, telles qu'*Alexandrium catenella* (Figure 5), *Alexandrium fundyense*, *Alexandrium minutum*, *Alexandrium tamarense* et *Alexandrium taylori*. Par conséquent, ce genre a suscité l'intérêt des scientifiques qui ont exploré les paramètres biologiques et écologiques caractérisant ce genre, ainsi que sa biologie, son écologie, sa toxicité, ses interactions avec les autres organismes, sa capacité d'enkystement et les facteurs de déclenchement de ses blooms. Ainsi, Laabir *et al.* (2004) ont montré que la prolifération d'*Alexandrium* est susceptible d'une part d'interrompre l'expansion d'autres communautés algales, et d'autre part, de limiter la fécondité et la viabilité des crustacés qui les consomment. D'autres investigations ont porté sur la toxicité de cette microalgue, son enkystement, et son effet sur le tractus digestif de l'huître *Crassostrea gigas* (Genovesi *et al.*, 2007 ; Masseret *et al.*, 2009).



**Figure 5.** *Alexandrium catenella* (chaîne de deux cellules) observée au microscope inversé ( $\times 100$ )

Les « blooms » d'*Alexandrium* ont été signalés dans diverses eaux marines telles que l'ouest de l'océan Pacifique (Scholin et Anderson, 1994), les eaux côtières du Chili (Cordova et Muller, 2002), du Japon, de la Chine, de la Corée du Sud (Adachi *et al.*, 1996; Yeung *et al.*, 2002), de la Nouvelle-Zélande (Mac Kenzie *et al.*, 2004), et dans d'autres écosystèmes particuliers comme le fjord de Shetland (Ecosse) (Touzet *et al.*, 2010). Les espèces d'*Alexandrium* sont aussi rencontrées dans de nombreux écosystèmes côtiers de la Méditerranée du Nord (Vila *et al.*, 2001; Penna *et al.*, 2005) et Sud (Daly Yahia, 2001; Turki et Balti, 2005; Frehi *et al.*, 2007; Armi *et al.*, 2011).

Sur les côtes françaises, l'occurrence d'*Alexandrium* a été rapportée dans plusieurs écosystèmes dont l'étang de Thau (Abadie *et al.*, 1999; Lilly *et al.*, 2002). Dans cet écosystème particulier, *Alexandrium* se développe sporadiquement, et croît principalement aux périodes printanière et automnale. Les efflorescences de ce dinoflagellé conduisent souvent à la fermeture des fermes aquacoles et à l'interruption de l'élevage conchylicole. Ainsi, en novembre 1988, suite à une prolifération d'*Alexandrium*, l'interdiction momentanée de la commercialisation des coquillages de Thau a dû être appliquée. Lors de cet événement, les bivalves ont bioaccumulé jusqu'à 852  $\mu\text{g}$  d'équivalent-saxitoxine par 100 g de chair, une valeur qui a dépassé de loin le seuil de salubrité des coquillages selon la norme européenne (80  $\mu\text{g}$  d'équivalent saxitoxine pour 100 g de chair totale). Dans la petite rade de Toulon, la présence d'*Alexandrium* a aussi été relevée (Jean *et al.*, 2005, 2006). Dans cet écosystème, où la contamination par les ETMs est très importante (Tessier *et al.*, 2011), les dinoflagellés dominant souvent les autres groupes présents dans les communautés phytoplanctoniques (Jean *et al.*, 2005) et le genre *Alexandrium* pourrait être le principal responsable des « blooms » phytoplanctoniques à certaines périodes de l'année (Jean *et al.*, 2006). Ceci suggère que ce dinoflagellé nuisible pourrait être tolérant à la pollution, plus particulièrement aux contaminants métalliques.

Sur les côtes tunisiennes, le genre *Alexandrium* a été identifié et répertorié dans plusieurs régions, comme la baie et le lac de Tunis (Daly Yahia, 2001, Armi *et al.*, 2011). Des blooms de ce dinoflagellé nuisible ont coïncidé avec des mortalités massives de poissons (Romdhane *et al.*, 1998). Dans la lagune de Bizerte, une étude récente a montré que les efflorescences d'*Alexandrium* étaient sporadiques, bien que ces microalgues y aient atteint des densités très élevées ( $> 10^5$  cellules L<sup>-1</sup>), contribuant jusqu'à 61% du phytoplancton nuisible présent (Bouchouicha Smida *et al.*, 2012).

## II. CULTURES PHYTOPLANCTONNIQUES

### 1. Espèces cultivées, techniques d'isolement cellulaire et méthodes de culture

Plusieurs espèces de microalgues appartenant aux bacillariophycées, prasinophycées, cyanophycées et cryptophycées, sont cultivées pour des fins économiques, principalement pour le nourrissage d'organismes commercialisés, à savoir des larves de décapodes, de copépodes, de rotifères et de mollusques bivalves (Chrétiennot-Dinet *et al.*, 1986). Néanmoins, certaines espèces de diatomées telles que *Skeletonema costatum* et *Thalassiosira pseudonana* sont les plus fréquemment utilisées en mariculture (Chrétiennot-Dinet *et al.*, 1986; Coutteau et Sorgeloos, 1992).

Il existe six différentes techniques d'isolement cellulaire : isolement à pipette pasteur ou à pipette capillaire, isolement par électrodéposition en rayures ou par électrodéposition en jet, isolement sur gel d'agar-agar (Robert, 1994). Le choix de la technique adéquate dépend de la taille des cellules à isoler, mais la technique d'isolement à pipette capillaire semble être la technique la plus fréquemment utilisée.

Il existe différentes méthodes de culture : cultures en batch, cultures en mode continu et cultures en mode semi-continu (Guillard et Ryther, 1962). Les premières consistent en une inoculation de cellules isolées dans un milieu de culture fraîchement préparé, tel que le milieu f/2 (Guillard et Ryther, 1962; Ifremer, 2007). Puis, lorsque la population atteint son maximum de densité cellulaire, les microalgues sont transférées dans un volume plus grand de culture, contenant du milieu frais et enrichi, et ainsi de suite, jusqu'à l'obtention de grands volumes de culture (centaines de litres) (Ifremer, 2007). Les cultures en mode continu nécessitent l'apport régulier de milieu frais aux flacons de culture tandis que l'excès de culture est continuellement pompé. Ce système permet d'obtenir des populations dont la densité cellulaire et les caractéristiques biochimiques sont constantes (Sciandra *et al.*, 2003). La

technique de culture en mode semi-continu est la technique la plus simple. Un inoculum contenant les cellules phytoplanctoniques à cultiver est injecté dans un récipient contenant tous les éléments nutritifs nécessaires à leur multiplication, et donc à la croissance de la population phytoplanctonique. Après cette inoculation initiale, il n'y a plus d'échange d'éléments nutritifs et de biomasse avec l'extérieur, le milieu étant clos. C'est pourquoi, par analogie au fait que la culture continue est un système ouvert, on peut également appeler une culture en batch, une culture fermée (Ifremer, 2007).

Au laboratoire, les microalgues se développent dans des chambres de culture thermostatées, avec une température, un éclairage et une photopériode, contrôlés. En France, les premiers essais de cultures continues ont été menés dans le cadre de la conchyliculture par Riva et Lelong (1981). Ces chercheurs ont mis des espèces phytoplanctoniques dans un bassin en béton de 35 m<sup>3</sup> recevant une eau de mer enrichie par deux engrais agricoles azotés et phosphorés, en respectant le rapport de Redfield (*i.e.* N : P = 16 : 1). La variabilité saisonnière constatée était importante, et le nanoplancton montrait une nette dominance par rapport aux diatomées et aux dinoflagellés. En outre, Baud (1990) a développé une technique qui consistait à produire des diatomées en masse, en utilisant des eaux salées souterraines, riches en CO<sub>2</sub>, en sels nutritifs et en métaux, notamment en silice et en fer. Dans d'autres régions, comme aux Etats-Unis (Massachusetts), une technique intermédiaire a été développée dans les années 1980, pour la culture commerciale du bivalve *Mercenaria mercenaria* (Clam) en nurserie (Walsh *et al.*, 1985, 1989). Cette technique consistait à réaliser une culture continue de *Thalassiosira pseudonana* et de *Skeletonema monzelei* dans des bassins de 40 m<sup>3</sup> contenant une eau salée souterraine enrichie en macro- et micronutriments du milieu f/2 (Guillard et Ryther, 1962).

## **2. Cinétiques de croissance des cultures phytoplanctoniques**

La croissance des cellules phytoplanctoniques mises en culture présente quatre phases essentielles :

► Une phase de latence (1), pendant laquelle la croissance des cellules est lente. La durée de cette phase dépend des volumes respectifs d'inoculum et de milieu de culture, et surtout de l'acclimatation de la culture mère aux nouvelles conditions dans le récipient de culture (Ifremer, 2007). Cette phase serait davantage un artefact de transfert plutôt qu'une étape inhérente à la croissance (Figure 6).

► Une phase exponentielle (2), justement définie par le caractère exponentiel de la croissance. L'augmentation du nombre de cellules (dN) par unité de temps (dt) est alors proportionnelle au nombre de cellules présentes à l'instant t (Figure 6). Le facteur de proportion est appelé taux de croissance instantané ( $\mu$ ) et s'exprime selon la formule (1) (Landry et Hassett, 1982) :

$$\mu = \text{Ln} (N_t/N_0) / \Delta t \quad (1)$$

Avec : Ln = logarithme népérien

$N_0$  = biomasse au temps  $t_0$

$N_t$  = biomasse au temps  $t > t_0$

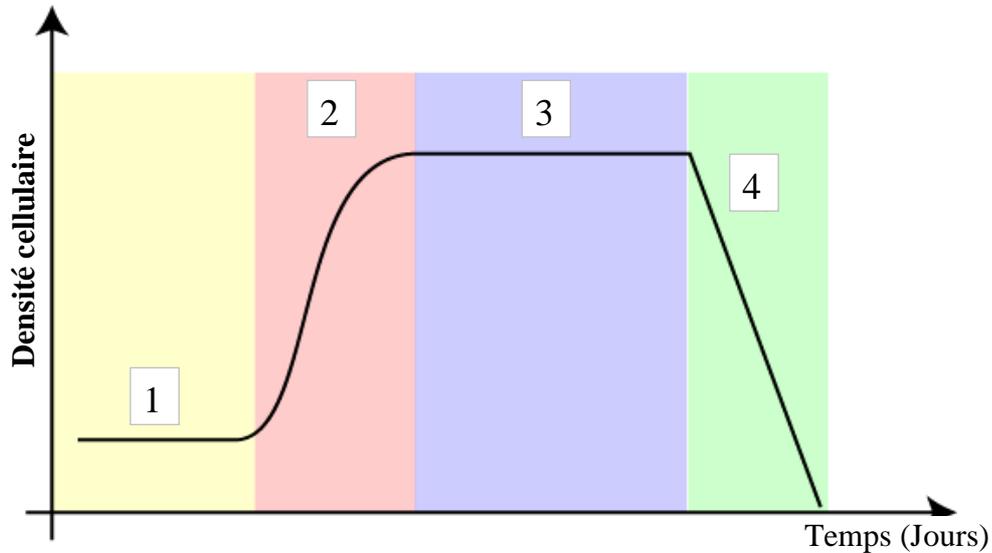
$\Delta t$  = intervalle de temps  $t - t_0$

Le taux de croissance est souvent exprimé en nombre de dédoublements par unité de temps. Si par exemple, le temps est exprimé en jours, le taux de croissance sera alors converti en nombre de dédoublements par jour, appelé K, calculé selon la formule (2) :

$$K = \mu / \text{Ln} 2 \quad (2)$$

► Une phase stationnaire (3) qui perdure jusqu'à ce qu'un élément, dit « limitant » (le plus souvent un élément nutritif comme l'azote ou le phosphore), dont la concentration est plus faible par rapport aux besoins du phytoplancton, atteigne une valeur qui ne peut plus satisfaire la demande des cellules (Figure 6). A ce stade, le taux de croissance  $\mu$  décroît jusqu'à zéro, et la culture entre en phase stationnaire : la biomasse et/ou le nombre de cellules n'augmente(nt) plus. D'autres causes, comme la diminution de la lumière disponible due à l'auto-ombrage des cellules devenues très abondantes, peuvent aussi être à l'origine d'un fléchissement du taux de croissance, sans toutefois l'annuler (Ifremer, 2007).

► Une phase de déclin (4), aussi appelée phase de sénescence, se traduisant par la mort des cellules, lesquelles ne trouvent plus dans le milieu de culture les éléments nécessaires à leur survie. Elles libèrent alors leurs constituants cellulaires, et si le milieu n'est pas stérile, celui-ci se transforme rapidement en bouillon de culture pour les bactéries hétérotrophes, et en particulier les *vibrio*, bien armés pour digérer les macromolécules (Ifremer, 2007).



- (1) : Phase de latence
- (2) : Phase exponentielle
- (3) : Phase stationnaire
- (4) : Phase de déclin

**Figure 6.** Cinétique de croissance des cellules phytoplanctoniques mises en culture

### III. MATIÈRE ORGANIQUE

#### 1. Matière organique naturelle (MON)

La matière organique naturelle (MON) est ubiquiste, présente dans tous les milieux terrestres (Mac Carty, 2001), les milieux aquatiques, les eaux de surface (Violleau, 1999), les eaux souterraines (Artinger *et al.*, 2000), et dans les eaux de décharges (Kang *et al.*, 2002). Sa composition chimique varie en fonction du milieu dont elle provient. La MON joue un rôle fondamental dans les processus biogéochimiques, en particulier dans le cycle du carbone, et dans la mobilité des polluants au sein des eaux de décharges. La MON provient de la dégradation et de la condensation des molécules en provenance de la matière biologique vivante (Hatcher et Spiker, 1988; Hedges, 1988 ; De Souza, 1992). Dans les milieux aquatiques, la MON interagit avec les cations et contribue au transport des métaux lorsqu'ils y sont associés. Une fois complexés à la MON, les métaux deviennent généralement moins toxiques (Vasconcelos *et al.*, 2002). Cela diminue aussi leur possibilité d'être assimilés par les organismes vivants. Dans les océans, la MON se trouve à 89% sous forme dissoute (matière organique dissoute, MOD), alors que 9% sont constitués de matière organique particulaire (matière organique associée aux particules et détritiques, MOP). La masse carbonée attribuée au

phytoplancton contribue pour 2% à la MON, et celle attribuée au zooplancton et aux bactéries, contribue pour moins de 1% (Duursma et Dawson, 1981).

La MON contient des biopolymères (Crooe *et al.*, 2003) et des géopolymères (William et Druffel, 1987) qui subissent des réactions de dégradation, de condensation, des précipitations et des associations. Les géopolymères renferment les acides humiques qui peuvent se dégrader en particules plus petites, comme les acides fulviques, ceux-ci étant aussi capables de se polymériser en particules plus grosses. Dans les sols, les deux types d'acides peuvent se transformer en humine, par dégradation ou polymérisation. Les biopolymères tels que les polysaccharides sont des polymères exclusivement issus des organismes vivants.

Afin de comprendre les processus de transfert de la MON dans l'environnement, il est nécessaire de caractériser celle-ci au niveau de sa composition chimique, de sa structure et de ses propriétés (Weber, 1988). En effet, du point de vue chimique, la MON peut contenir une proportion importante de carbone, jusqu'à 50%, pour ce qui concerne les sols (Senesi, 1990; Xue et Jaffé, 2009). La MON possède également, dans son squelette carboné, des fonctions quinones et thiols qui lui confèrent des propriétés de complexation vis-à-vis des métaux. La MON a des propriétés de fluorescence permettant d'obtenir des informations sur la structure et les propriétés générales des macromolécules. La fluorescence est l'une des techniques les plus sensibles permettant de caractériser la MOD à partir d'un échantillon aqueux de faible volume, sans nécessité de concentration ou d'extraction. La fluorescence tridimensionnelle (3D) met en évidence la signature des acides aminés et des acides fulviques (Sierra *et al.*, 2005). L'analyse de cette signature a montré que, à concentrations égales, les intensités de fluorescence des acides fulviques sont plus importantes que celles des acides humiques. Cette analyse a également montré que parmi les molécules de masses molaires importantes, la probabilité de désactivation des états excités par extinction interne est plus grande, ce qui diminue l'intensité de fluorescence, et déplace les maxima vers les grandes longueurs d'onde. Par conséquent, une forte intensité de fluorescence est généralement associée à des composés de faibles masses moléculaires, faiblement condensés, et présentant des degrés aromatiques faibles (Sierra *et al.*, 2005).

## 2. Matière organique exsudée par le phytoplancton

### 2.1- Importance de l'exsudation du phytoplancton en milieu marin

Dans la zone euphotique du milieu marin, une fraction importante de carbone fixé par le phytoplancton (production primaire) est libérée sous forme de MOD (exsudation phytoplanctonique), puis recyclée *via* la boucle microbienne faisant intervenir les protozoaires et les bactéries (Azam *et al.*, 1983, 1994). L'exsudation des microalgues est prononcée surtout lors de leurs efflorescences, ce qui pourrait conduire à la formation d'agrégats sous forme de neiges marines (Passow *et al.*, 1994, 1995). Cette hypothèse a été confirmée par Logan *et al.* (1994) qui ont observé que les diatomées libéraient davantage de substances dissoutes pendant leur efflorescence.

Les molécules exsudées par le phytoplancton contribuent activement au pool de COD dans les océans (Wiebe et Smith, 1977; Lancelot, 1979 ; Jensen, 1983; Cole *et al.*, 1988; Le boulanger *et al.*, 1997; Sakka *et al.*, 2002). En effet, on estime que 5 à 30% du COD de l'eau de mer provient de l'exsudation phytoplanctonique (Mague *et al.*, 1980; Fogg, 1983; Lancelot et Billen, 1985; Biddanda et Benner, 1997). Dans les couches supérieures de la colonne d'eau, où l'activité phytoplanctonique est importante, la spéciation des métaux traces peut être contrôlée par la complexation avec les ligands organiques excrétés par les micro-organismes (Bruland *et al.*, 1991).

Dans certains bassins océaniques, les polysaccharides constituent la majeure partie de la MOD des eaux de surface (Benner *et al.*, 1992; McCarthy *et al.*, 1993, 1996; Aluwihare *et al.*, 1997), puis les concentrations de polysaccharides déclinent rapidement avec la profondeur (McCarthy *et al.*, 1996). Ces carbohydrates comprennent des sucres, des acides uroniques (Mopper *et al.*, 1995) et des aldoses (McCarthy *et al.*, 1996; Borch et Kirchman, 1997; Skoog et Benner, 1997). Plusieurs travaux ont montré que l'exsudation phytoplanctonique constitue la principale source de carbohydrates dissous dans les écosystèmes marins (Romankevich, 1984), des corrélations existant entre la biomasse phytoplanctonique et la concentration des carbohydrates dans les eaux de surfaces de certaines régions océaniques (Pakulski et Benner, 1994; Børsheim *et al.*, 1999; Fajon *et al.*, 1999).

Excepté le phytoplancton, d'autres organismes (notamment les copépodes et les euphausiacés) excrètent des substances dissoutes qui alimentent le pool de COD dans les écosystèmes aquatiques (Passow, 2002). Ces organismes peuvent produire de grandes quantités de polysaccharides extracellulaires, ou substances expolysaccharidiques (Hoagland *et al.*, 1993; Myklestad, 1995; Stoderegger et Herndl, 1998). Ces substances peuvent

s'agréger entre elles par coagulation, pour former des particules organiques détritiques de nature polysaccharidique, communément appelée exopolysaccharides (EPS) (Passow, 2002). Les bactéries sont aussi capables de produire des EPS au sein d'agglomérats ou de biofilms participant à la réserve de MOD, et conduisant à l'enrichissement du réseau trophique (Passow, 2002). Les EPS constituent une matière propice à la prolifération des bactéries, des ciliés et des flagellés, et constituent une source de nutriments pour le zooplancton (Passow, 2002). Les particules exsudées, d'aspect gélatineux, permettent l'agrégation du phytoplancton, il s'ensuit alors une sédimentation, et donc l'exportation du carbone, de la surface vers les couches profondes de la colonne d'eau (Passow *et al.*, 1995). De cette façon, les complexes EPS - matière organique rendent cette source de carbone plus accessible aux grands consommateurs du réseau trophique, faisant ainsi le lien entre le réseau trophique classique et le réseau microbien (Azam *et al.*, 1994). Les particules polysaccharidiques jouent donc un rôle crucial dans la dynamique de la matière organique (MO).

## **2.2- Composition de la MO exsudée par le phytoplancton**

La majeure partie de la matière organique exsudée (80 - 90%) est constituée de molécules de haut poids moléculaire comme les polysaccharides (Myklestad, 1995). Ces substances sont des polymères majoritairement composés d'oses neutres (glucose, galactose, fucose, rhamnose,...), et d'acides uroniques (acide glucuronique, galacturonique) (Biersmith *et al.*, 1997). Les polysaccharides sont activement libérés, et en grandes quantités, durant la croissance du phytoplancton (Antia *et al.*, 1963; Guillard et Hellebust, 1971; Eberlein *et al.*, 1983; Biddanda et Benner, 1997), mais aussi durant son broutage par le zooplancton (Dagg, 1974; Lampert, 1978; Strom *et al.*, 1997). La composition chimique des polysaccharides exsudés est généralement spécifique aux espèces qui les produisent (Myklestad, 1995). Par exemple, les diatomées *Chaetoceros affinis* et *Chaetoceros curvisetus* produisent des résidus de rhamnose, de fucose et de galactose, qui présentent une grande différence de structure (Mykestad, 1995).

Outre des polysaccharides, les exsudats phytoplanctoniques contiennent des protéines, des acides nucléiques, des lipides, et d'autres composés polymériques (Hellebust, 1974; Wingender *et al.*, 1999). Toutefois, les protéines exsudées ne représentent qu'une faible fraction (0,2 – 6,9%) de l'ensemble des substances libérées par le phytoplancton (Hellebust, 1974). Par exemple, il a été montré que l'exsudation des acides aminés constitue seulement 7% du total des molécules libérées par *Skeletonema costatum* (Hellebust, 1974). Certaines espèces produisent des lipides, c'est le cas de la chrysophycée d'eau douce *Ochromonas*

*danica* (Billmire et Aaronson, 1976). Par ailleurs, d'autres espèces sont capables de libérer des vitamines, comme la vitamine B12 (Droop, 1968), la thiamine et la biotine, dans un milieu de culture (Carlucci et Bowes, 1970). D'autres auteurs ont rapporté une libération d'inhibiteurs de croissance et de toxines létales pour les poissons, par des espèces de prymnésiophytes, telles que *Prymnesium parvum* et *Chrysochromulina polylepis* (Dundas et Skjoldal, 1991).

### **2.3- Contrôle de la MO exsudée par le phytoplancton**

La production du COD par le phytoplancton est très variable selon les espèces, et dépend fortement du taux de croissance et de l'état physiologique des cellules (Baines et Pace, 1991; Jackson, 1993; Hansell et Carlson, 1998). Par ailleurs, l'exsudation du COD dépend de plusieurs facteurs environnementaux, tels que la lumière, la température, le pH, la salinité (Passow, 2002), et plus particulièrement de la biodisponibilité des nutriments (Penna *et al.*, 1999; Alcoverro *et al.*, 2000; Staats *et al.*, 2000). En effet, il a été montré qu'une limitation nutritive des microalgues par l'azote et le phosphore, favorisait la libération de carbohydrates. De plus, une augmentation du ratio N : P par rapport au ratio classique de Redfield (*i.e.* 16 : 1) pourrait induire une augmentation de l'excrétion des polysaccharides par le phytoplancton.

La présence de contaminants dans le milieu a aussi une influence sur la libération des molécules organiques dissoutes par le phytoplancton. En effet, le phytoplancton des écosystèmes soumis à de fortes pressions anthropiques polluantes (comme les lagunes et les rades), est capable de sécréter des ligands organiques et inorganiques ayant diverses compositions chimiques (Gonzalez et Davila, 1995).

## **3. Propriétés spectroscopiques de la matière organique**

Dans les eaux naturelles, une fraction très importante de la MO est colorée, c'est-à-dire qu'elle absorbe une partie du spectre lumineux (Harvey et Boran, 1981). Suite à cette absorption, la MO émet un signal de fluorescence représenté par une bande (Dienert, 1910). Cette émission de fluorescence, dont les composés humiques sont les principaux responsables (Ewald *et al.*, 1983), peut concerner 70% de la MOD (Laane et Koole, 1982; Parlanti *et al.*, 2000; Ischii *et al.*, 2012). La spectroscopie de fluorescence reste une méthode globale, car elle ne permet pas une identification moléculaire précise des constituants de la MOD. En revanche, elle présente l'avantage de ne nécessiter aucun traitement préalable de l'échantillon, et d'aboutir à des informations globales sur les caractéristiques moléculaires et les

concentrations relatives des composés fluorescents. L'analyse d'un échantillon par fluorescence permet d'obtenir des spectres 3D, appelés matrices d'excitation – émission (EEMs) différant par l'intensité et la position des maxima de fluorescence, lesquels varient en fonction de l'origine de l'échantillon étudié. Ces données semi-quantitatives et qualitatives permettent de caractériser la fluorescence d'un échantillon. La position des maxima de fluorescence est liée à la nature et à la structure des fluorophores, tandis que l'intensité de fluorescence est liée à leurs concentrations dans l'échantillon. Les composés humiques et protéiniques sont les deux principaux composants fluorescents (Mopper et Schultz, 1993). En biologie, l'utilisation de la fluorescence a permis d'estimer l'activité biologique au sein d'un milieu, *via* l'observation chronologique de la formation des composés fluorescents (Parlanti *et al.*, 2000). Ainsi, pour un échantillon phytoplanctonique donné, l'apparition de la bande de type  $\alpha$  sur le spectre de fluorescence est reliée à une activité biologique, et notamment à des exsudats phytoplanctoniques. Cette même bande peut également expliquer le stade ultime de la dégradation de la MOD ayant subi de nombreuses transformations. Par ailleurs, certains travaux ont montré que le phytoplancton ne représente pas une source directe de composés humiques (De Grandpré *et al.*, 1996; Hoge *et al.*, 1998; Rochelle-Newall et Fisher, 2002). Dans la littérature, l'observation des éléments fluorescents a été réalisée à partir d'environnements différents, tels que les eaux de rivière (Mounier *et al.*, 1999; Del Castillo *et al.*, 1999; Baker, 2001; Nagao *et al.*, 2003), les eaux d'estuaires (Matthewes *et al.*, 1996; Jaffé *et al.*, 2004), l'eau interstitielle des sédiments (Burdige, 2004), les eaux polluées (Baker et Genty, 1999, Baker 2002), et les eaux de mer (Coble, 1996; Baker et Spencer, 2004; Kowalczyk *et al.*, 2005). Dans le but de mieux observer les composants fluorescents, des traitements PARAFAC (Bro, 1997) sont appliqués à l'analyse de la MO dans les estuaires (Stedmon *et al.*, 2003; Stedmon et Markager, 2005; Luciani *et al.*, 2008), dans les eaux marines (Murphy *et al.*, 2008), dans les eaux douces (Cory Mcknight, 2005; Holbrook *et al.*, 2006) et dans les extraits de sols (Banaitis *et al.*, 2006).

Outre ses propriétés fluorescentes, la MO possède aussi une grande affinité d'adsorption vis-à-vis des métaux. Ainsi, les fonctions thiols (-SH) et quinones (-C=O) qu'elle contient, sont impliquées dans la captation des métaux en cas de contamination métallique. Ces fonctions forment ainsi des ligands ayant la propriété de modifier la forme des métaux, mais aussi leur biodisponibilité dans le milieu (Gonzales-Davila, 1995; Gouvêa *et al.*, 2005).

## IV. ÉLÉMENTS TRACES MÉTALLIQUES (ETMs)

### 1. Définition et répartition des ETMs

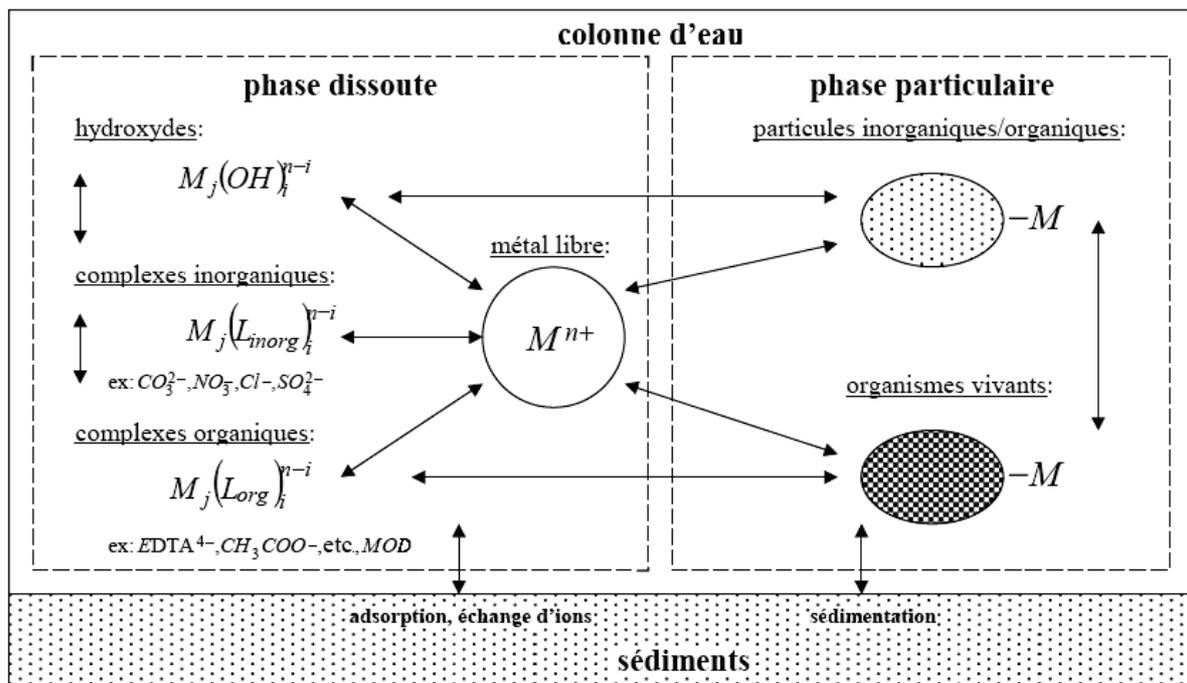
Par définition, un métal est un élément chimique, le plus souvent issu d'un minerai, doté d'un état chimique particulier. Il possède des propriétés de conduction de chaleur et d'électricité, a des caractéristiques de dureté et de malléabilité, et se combine aisément avec d'autres éléments pour former des alliages utilisés par l'homme. Si les métaux sont souvent indispensables au déroulement des processus biologiques (oligo-éléments), nombre d'entre eux peuvent s'avérer toxiques ou dangereux pour diverses formes de vie, lorsque leurs concentrations dépassent un seuil, lui-même fonction de l'état chimique (spéciation) de l'élément considéré. C'est le cas par exemple du fer (Fe), du cuivre (Cu), du zinc (Zn), du nickel (Ni), du cobalt (Co), du vanadium (V), du sélénium (Se), du molybdène (Mo), du manganèse (Mn), du chrome (Cr) et du titane (Ti) (Miquel, 2001). D'autres métaux tels que le mercure (Hg), le plomb (Pb), le cadmium (Cd) et l'antimoine (Sb) ne sont pas nécessaires à la vie; leur présence à partir de très faibles concentrations est généralement préjudiciable (Chiffolleau *et al.*, 2001).

L'appellation "éléments traces métalliques" (ETMs), ou par extension, "éléments traces" (Miquel, 2001), est communément utilisée pour désigner les éléments métalliques présents en très faibles concentrations (traces) dans l'environnement. A l'état naturel, les ETMs sont des micropolluants capables d'entraîner des nuisances. Leur toxicité se développe par bioaccumulation le long de la chaîne alimentaire.

Les ETMs sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, par nature (sources naturelles), ou parce que certaines activités anthropiques favorisent leur dispersion (source anthropique). Les concentrations en ETMs dans la phase aqueuse sont moindres par rapport à celles existant dans la phase solide. Ainsi, la sédimentation des dépôts métalliques particuliers au fond des lits des cours d'eau ou des zones côtières conduit potentiellement à une accumulation dans les sédiments.

Les métaux (cationiques) s'associent préférentiellement aux aluminosilicates (anioniques). Les métaux dissous dans l'eau, provenant principalement des activités anthropogéniques, ont tendance à s'adsorber sur la surface des particules en suspension comme les particules d'argiles et certains débris d'organismes morts, lesquels sont dispersés dans la colonne d'eau. Ainsi adsorbés, ces métaux peuvent être remis en suspension en cas de changements des paramètres physico-chimiques du milieu, notamment de l'agitation de la

colonne d'eau (Windom, 1989). En Méditerranée, les ETMs sont plus concentrés dans les couches supérieures que dans les couches inférieures de la colonne d'eau, où ils sont présents en quantités relativement stables. Ces profils particuliers observés en Méditerranée ont été interprétés comme un état non stationnaire, les apports superficiels étant plus forts que les transferts verticaux occasionnés par l'activité biologique et les mouvements hydrologiques (RNO, 1974 – 2004). La distribution d'un métal donné entre ses différentes formes chimiques dans le milieu, correspond au processus de spéciation métallique (Le Faucheur *et al.*, 2005). De plus, la répartition des ETMs dans la colonne d'eau est aussi déterminée par les possibles interactions existant entre les cations métalliques, la phase particulaire, et la phase dissoute, ainsi que l'indique la Figure 7 (Buffle, 1988).



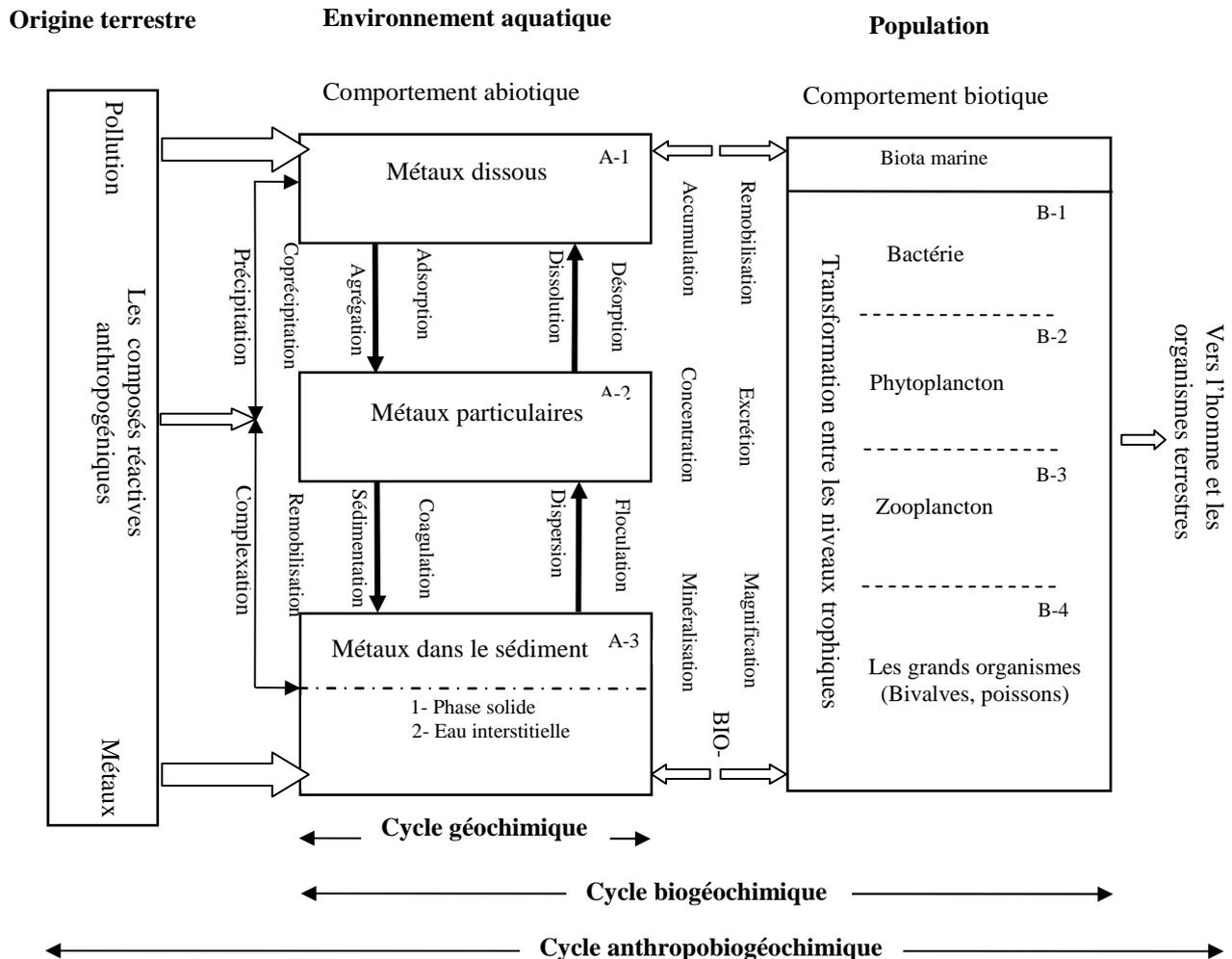
**Figure 7.** Spéciation des différentes espèces physico-chimiques dans le milieu marin (Buffle, 1988)

## 2. ETMs dans le milieu marin

Dans certains écosystèmes marins perturbés par les apports anthropiques, comme la Baie de Bizerte, les concentrations en ETMs sont élevées dans les sédiments ( $0,45 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ ,  $31,51 \mu\text{g Cu g}^{-1}$ ,  $37,09 \mu\text{g Pb g}^{-1}$  et  $161,59 \mu\text{g Zn g}^{-1}$ ) ainsi que dans la colonne d'eau ( $0,20 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ ,  $3,70 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ ,  $2,80 \mu\text{g Pb L}^{-1}$  et  $11,00 \mu\text{g Zn L}^{-1}$ ) (Tarhouni, 2012). Dans d'autres écosystèmes marins perturbés comme la petite rade de Toulon, les teneurs en ETMs mesurées dans les organismes atteignent aussi des niveaux importants ( $2,69 \times 10^{-4} \text{ g gC}^{-1}$  à  $3,92 \times 10^{-2} \text{ g gC}^{-1}$  Cu,  $3,83 \times 10^{-3} \text{ g gC}^{-1}$  Pb) (Rossi et Jamet, 2008). Ces éléments sont engagés dans des réactions biochimiques, et contribuent à l'équilibre du milieu marin. Toutefois, les apports accrus des contaminants métalliques résultant des activités anthropiques, peuvent modifier la composition de l'eau de mer, laquelle peut devenir toxique pour la faune et la flore marines.

Les activités humaines modifient très significativement la répartition des ETMs, et des formes chimiques sous lesquelles ils sont présents dans l'environnement (Miquel, 2001). Les activités industrielles ou automobiles rejettent des fines particules dans l'atmosphère, lesquelles peuvent ensuite être rejetées dans les milieux aquatiques. Les métaux peuvent diffuser directement à travers la surface de l'eau grâce à la surface d'échange entre l'atmosphère et la colonne d'eau (Ridame *et al.*, 1999), comme ils peuvent aussi bien être mélangés avec les eaux de ruissellement. Ces eaux contiennent les métaux provenant des phénomènes de corrosion des surfaces en contact avec les eaux de ruissellement. Les métaux peuvent aussi être acheminés vers la mer *via* les cours d'eaux et les égouts, pour s'accumuler par la suite en grande partie dans les sédiments, et se bioaccumuler dans les organismes marins.

Dans les milieux aquatiques, les ETMs se répartissent entre trois compartiments abiotiques, notés **A-1**, **A-2** et **A-3**, présentés sur la Figure 8.



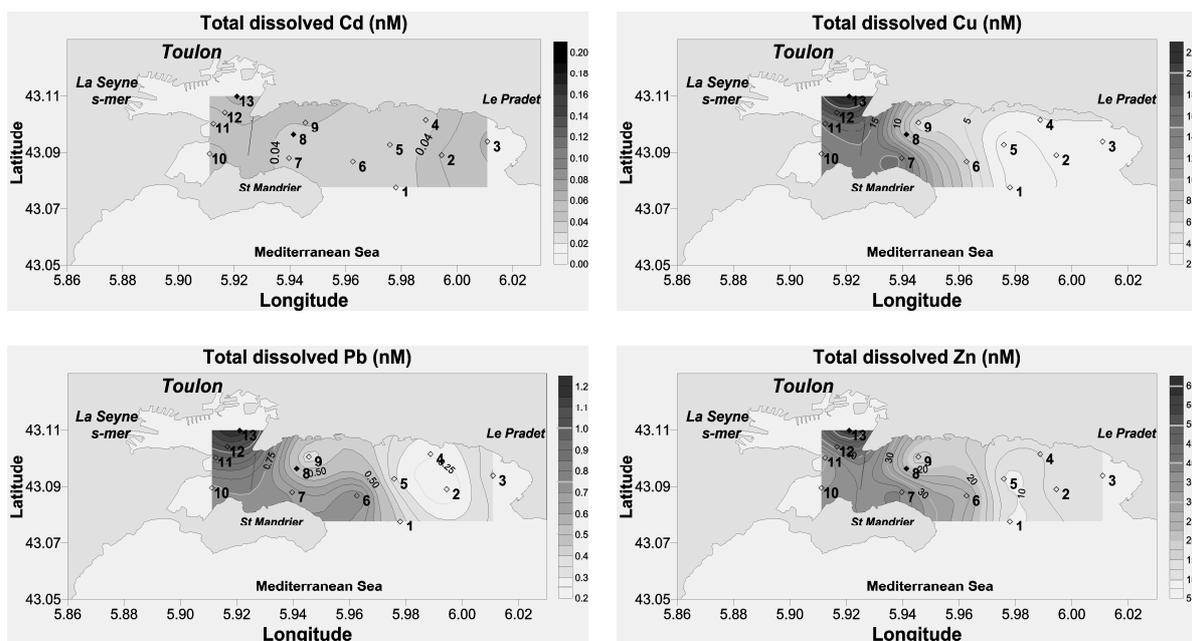
**Figure 8.** Cycle des éléments traces métalliques dans les milieux aquatiques (Branica, 1990)

L'abondance relative des ETMs dans chacun de ces compartiments est gouvernée par leurs caractéristiques physico-chimiques, leurs natures chimiques et leurs états d'équilibre. La complexité des échanges au sein des écosystèmes aquatiques peut, plus ou moins rapidement, conduire à des changements dans la répartition des éléments métalliques selon les variations, des caractéristiques physico-chimiques du milieu, ou des concentrations en métaux de l'un des compartiments.

Plusieurs écosystèmes côtiers méditerranéens subissent l'impact de la pollution par les contaminants métalliques. C'est le cas de la lagune de Bizerte, qui est localisée au nord-est de la Tunisie. Dans cette lagune, les ETMs ont une origine naturelle, en provenance des terres agricoles environnantes, *via* les eaux de ruissellement et les oueds, mais aussi une origine

industrielle, surtout due aux rejets d'une usine sidérurgique située à proximité. Selon Srarfi *et al.* (2010), les sédiments fins (particules < 63  $\mu\text{m}$ ) du centre de la lagune constituent une matrice très riche en métaux traces, tandis qu'au niveau des bordures de la lagune, les métaux sont très abondants dans les sédiments grossiers. Yoshiba *et al.* (2004) ont distingué 11 éléments traces au niveau des sédiments de cet écosystème, à savoir : Sb, As, Ba, Cd, Cu, Pb, Mo, Se, Ag, Ti, U et Zn. Une étude récente a montré que les eaux lagunaires contenaient des concentrations faibles (de 0,01 à 11  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) en Cd, Cu, Pb, Zn, Mg et Fe, mais des teneurs assez élevées dans les sédiments sous-jacents (Fe : 6896,39  $\mu\text{g g}^{-1}$ , Zn : 161,59  $\mu\text{g g}^{-1}$ , Mn : 161,59  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (Tarhouni, 2012).

De façon similaire à la lagune de Bizerte, une pollution par des contaminants métalliques a aussi été détectée dans la petite rade de Toulon. Dans cet écosystème, les ETMs proviennent des cours d'eau (Le Las et L'Eygoutier) qui se jettent dans la rade, et des rejets anthropiques dûs aux activités des ports commercial, militaire et touristique. En outre, le déversement des eaux de ruissellement provenant de l'agglomération toulonnaise contribue largement à la contamination des eaux de la petite rade par les métaux traces (Rossi et Jamet, 2008; Tessier *et al.*, 2011). Des teneurs en ETMs plus élevées étaient mesurées dans la petite rade de Toulon, semi-fermée (Cu : 13,5 - 23,8 nM; Pb : 0,73 - 1,24 nM; Zn : 27,8 - 58,7 nM), comparativement à la grande rade de Toulon, ouverte sur le large (Cu : 2,2 - 15,6 nM; Pb : 0,19 - 0,78 nM; Zn : 9,0 - 38,8 nM) (Jean *et al.*, 2012) (Figure 9).



**Figure 9.** Concentrations des métaux dissous (cadmium, cuivre, plomb et zinc) dans la rade de Toulon (Jean *et al.*, 2012)

Les métaux présents sous forme dissoute peuvent rapidement changer de forme en cas de variation de pH ou de conditions rédox. Ce phénomène s'observe au niveau des zones de convergence des cours d'eau. Dans les milieux aquatiques, les métaux sont présents sous une forme inorganique, associée aux anions majeurs (carbonates, chlorures et hydroxydes) (complexation inorganique), ou sous forme organique associée à la MOD composée de ligands complexant les ions métalliques (complexation organique). Les paramètres de complexation, pour le cuivre, le zinc, le plomb et le cadmium, sont étroitement corrélés à la quantité de COD et à la quantité de MOD (Town et Filella, 2000a, 2000b).

### **3. ETMs et phytoplancton**

#### **3.1- Absorption des ETMs par le phytoplancton**

À faibles teneurs, certains ETMs (Mg, Fe, Mn, Zn, Co, Cu et Mo) sont nécessaires au métabolisme cellulaire des êtres vivants. Ils agissent, par exemple, comme co-facteurs dans le maintien de l'activité enzymatique, et au cours des réactions biochimiques vitales pour les cellules. Concernant le phytoplancton, l'absorption d'un métal par une cellule phytoplanctonique se fait au niveau de sa paroi, et implique les étapes suivantes : en premier lieu, le transport du métal depuis la solution vers la surface de la membrane cellulaire, puis, sa fixation sur les sites de transport, et enfin, l'assimilation du métal par la cellule lors du passage au travers de la membrane lipidique (Hudson, 1998). Trois mécanismes principaux assurent le transport des métaux au travers des membranes biologiques (Figure 10) :

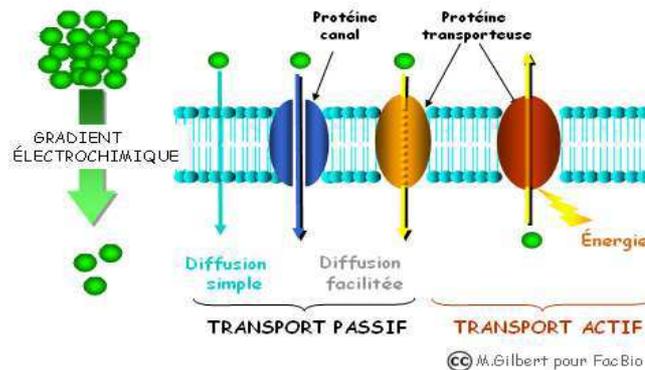
► La diffusion simple

► La diffusion facilitée par les composants de la membrane cellulaire, qui peuvent être des canaux ioniques intégrés dans la membrane, ou des ligands extracellulaires. Ces derniers sont des molécules liposolubles tels que des complexes avec les lipides, ou des citrates, qui favorisent le passage des métaux au travers des membranes cellulaires (Errécalde et Campbell, 2000)

► Le transport actif, gouverné par un gradient de potentiel au travers de la membrane cellulaire

L'interaction entre les ETMs et le phytoplancton est régie par la physico-chimie du milieu, lequel pourra avoir un effet sur la répartition entre les différentes formes chimiques métalliques, et leur assimilation par les producteurs primaires (Greene et Darnall, 1988; Crist *et al.*, 1990, 1992).

#### LES 4 TYPES DE TRANSPORTS MEMBRANAIRES



**Figure 10.** Mécanismes de transports membranaires

([http://www.facbio.com/content/index.php?option=com\\_content&task=view&id=18&Itemid=34](http://www.facbio.com/content/index.php?option=com_content&task=view&id=18&Itemid=34))

### 3.2- Effets des ETMs sur le phytoplancton

A fortes concentrations, certains métaux comme le zinc et le cuivre, deviennent nuisibles pour le phytoplancton, alors que d'autres sont toujours toxiques, comme le plomb et le cadmium (Ling *et al.*, 2009; Poirier *et al.*, 2009). Il a été montré que la spéciation gouvernait la toxicité du métal. En effet, un métal sous forme cationique, donc libre (ex :  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) est plus réactif avec les espèces neutres, car il est biodisponible et, donc, rapidement assimilé par les organismes vivants chez lesquels il peut induire des effets néfastes (Vasconcelos et Leal, 2001).

Les effets des contaminants métalliques sur le phytoplancton ont largement été étudiés lors d'expérimentations impliquant des espèces microalgales maintenues en cultures en présence de métaux. Dans ce contexte, les ETMs ont montré divers effets au niveau cellulaire, les métaux pouvant affecter la croissance, la photosynthèse, la respiration, l'assimilation des nutriments, et pouvant même induire la mort cellulaire. C'est ainsi que l'augmentation des teneurs de dix métaux (Cu, Zn, Ni, Cr, Pb, Cd, Hg, As, Sb et Se) inhibait la croissance de la diatomée *Thalassiosira aestivalis* mise en culture (Thomas *et al.*, 1978). D'autres auteurs ont mis en évidence l'effet inhibiteur du cadmium sur la croissance de la diatomée *Chaetoceros tenuissimus* (Desai *et al.*, 2006). Ces auteurs ont observé qu'en présence d'une concentration de  $10 \text{ mg Cd L}^{-1}$ , 65% des cellules de cette espèce ont été endommagées, et 50% des cellules étaient apoptiques au bout de 8 jours de contamination. Concernant les dinoflagellés, Lage *et al.* (1994) ont aussi rapporté une inhibition de croissance de l'espèce *Amphidinium carterae*

par le cuivre à faibles concentrations. Tripathi et Gaur (2006) ont signalé que le cuivre et le zinc induisaient une inhibition de la photosynthèse accompagnée d'une diminution de la croissance et de la consommation de nitrates chez l'espèce *Scenedesmus* sp. De même, Goering *et al.* (1970), en cultivant des espèces de diatomées en présence de fortes teneurs en cuivre, ont observé une baisse de l'assimilation du silicium par ces microalgues. En outre, Herzi *et al.* (2013b) ont rapporté que *Skeletonema costatum* cultivée en présence de cuivre, diminuait sa production de Chl *a*, caroténoïdes et phéopigments.

Certaines espèces comme *Nitzschia delicatissima* et *Chaetoceros* spp. disparaissaient des communautés phytoplanctoniques lorsqu'elles étaient exposées à de fortes concentrations de cuivre, cadmium, plomb et mercure (Thomas *et al.*, 1980). Leur disparition était en faveur de la prédominance d'autres espèces comme *Skeletonema costatum* et *Thalassiosira* spp. De même, Lorenzo *et al.* (2007) ont mentionné que *Skeletonema costatum* était une espèce dominante en présence de différentes concentrations métalliques. Ceci suggère que les espèces phytoplanctoniques ont des degrés de tolérance différents vis-à-vis des métaux. Effectivement, Brand *et al.* (1986), en examinant le taux de croissance de 38 espèces phytoplanctoniques cultivées en conditions de stress métallique, ont montré que *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana* et *Thalassiosira oceanica* étaient tolérantes au cuivre. Par ailleurs, cette étude montrait que les coccolithophoridés étaient plus tolérants au cuivre que les diatomées. Néanmoins, quelques dinoflagellés et un certain nombre de cyanobactéries restaient sensibles aux métaux. De façon similaire, Mandelli (1969) a classé les dinoflagellés comme étant des organismes plus sensibles au cuivre que les diatomées.

La tolérance des microalgues aux ETMs ne varie pas seulement entre les espèces et les classes phytoplanctoniques, mais aussi en fonction de leur milieu de vie. En effet, Gavis *et al.* (1981) ont conclu que les espèces vivant dans des environnements néritiques étaient plus tolérantes que les espèces des eaux océaniques. De même, Murphy et Belostoch (1980) ont montré que les espèces provenant des environnements néritiques étaient moins sensibles aux polluants métalliques que celles originaires des environnements océaniques.

### 3.3- Mécanismes de défense mise en place par le phytoplancton contre la contamination métallique

Certaines espèces de microalgues sont capables de survivre dans des milieux où les concentrations en métaux traces sont très élevées (Pawlik-Skowronska, 2001). Cette résistance dépend de nombreux facteurs comme la nature du métal, les conditions du milieu et la capacité des microalgues à se « défendre ». Les mécanismes de défense employés par le phytoplancton, pour faire face aux contaminants métalliques, sont principalement :

- ➡ Le développement des pompes ATP-dépendantes qui assurent une faible concentration en métaux dans le milieu intracellulaire (Gonzalez-Davila *et al.*, 1995),
- ➡ Un changement intracellulaire du degré d'oxydation des métaux (Gouvêa *et al.*, 2005), ce qui conduit à des formes métalliques moins toxiques (Pawlik-Skowronska, 2001),
- ➡ La complexation entre les ions métalliques et les ligands intracellulaires tels que les acides gras, les polypeptides et les aminoacides, ce qui permet de diminuer la toxicité (Gonzalez – Davila *et al.*, 1995),
- ➡ Une précipitation des complexes métalliques à la surface des cellules, ou la libération d'exsudats ayant de fortes propriétés complexantes, permettant de modifier la biodisponibilité des métaux (Gouvêa *et al.*, 2005).

La stratégie de défense impliquant l'excrétion des molécules extracellulaires par le phytoplancton est très étudiée, puisqu'elle joue un rôle important dans la spéciation des ETMs dans l'eau de mer (Gonzalez – Davila *et al.*, 1995; Pawlik-Skowronska, 2001 ; Herzi *et al.*, 2013a, b). Sunda et Hunstman (1998) ont rapporté que les exsudats produits par le phytoplancton, en se complexant avec les métaux, pourraient modifier la chimie des ETMs et contribuer ainsi à la détoxification métallique (Rauser, 1995 ; Morelli et Scarano, 2001; Le Faucheur *et al.*, 2005). C'est ainsi que la chlorophycée *Chlamydomonas reinhardtii* peut, en culture, excréter des phyto-chélateurs qui augmentent la complexation des métaux (Xue *et al.*, 1988; Sunda et Guillard, 1976; Gouvêa *et al.*, 2005).

Comme mentionné précédemment, la majeure partie des exsudats est composée de matière organique de haut poids moléculaire à l'instar des polysaccharides. Ces molécules sont exsudées d'une manière plus importante en cas de stress métallique (Pistocchi *et al.*, 1997), et sont de différentes natures (Gonzalez-Davila, *et al.*, 1995). Elles peuvent modifier la biodisponibilité des ETMs, et par conséquent leur toxicité (Vasconcelos *et al.*, 2001). En effet, des microalgues exposées à différents métaux (tels que le cadmium, le cuivre, le mercure et le zinc) sont capables de produire des métallothionéines (Engel, 1987; Viarengo *et al.*, 1989), protéines riches en soufre et en cystéine, ayant un faible poids moléculaire (Fowler

*et al.*, 1987). Les métallothionéines ont la capacité de fixer des ions métalliques grâce à des interactions non covalentes (Cosson, 1992; Stillman, 1995), en utilisant des groupements thiols. Ces protéines ont alors un rôle de détoxification et de stockage des ETMs ainsi que de régulation du métabolisme des métaux essentiels, en réponse à des modifications physiologiques (Piscator *et al.*, 1964).

Le phytoplancton utilise plusieurs stratégies de défense, soit directement à travers la synthèse de molécules intracellulaires ayant des capacités complexantes pour les métaux, ou indirectement, à travers l'exsudation dans l'espace extracellulaire de la MOD, en réponse au stress métallique (Nagata, 2000). Cette MOD, constituée principalement de carbohydrates et d'acides aminés, est susceptible de former des complexes avec les métaux. De plus, les acides aminés qu'elle contient possèdent une grande affinité de complexation vis-à-vis des ions métalliques libres (Biddanda et Benner, 1997). Plusieurs acides aminés peuvent agir comme des ligands *via* leurs groupes  $\alpha$  – aminés et  $\alpha$  – carboxylés. Ce type de liaison est fortement dépendant des constantes de stabilité stoichiométrique ainsi que des conditions de cultures (Lorenzo *et al.*, 2007). Dans les systèmes naturels, les constantes sont faibles par rapport aux cultures *in vivo*, en raison de la complexation des acides aminés avec d'autres cations présents dans le milieu (Lorenzo *et al.*, 2007). Les acides aminés histidines et cystéines, exsudés par le phytoplancton, possèdent une grande affinité pour les cations métalliques libres, grâce à leurs groupes imidazoles et thiols (Buffle, 1988). Ainsi, ils sont considérés comme les acides aminés les plus complexants vis-à-vis des métaux (Farkas et Sóvágó, 2002). Les acides humiques et fulviques exsudés *in situ*, en réponse à une contamination métallique, possèdent également des pouvoirs complexants très élevés pour les métaux (Midorikawa et Tanoue, 1998). D'autres analyses *in situ* traitées par la technique de fluorescence 3D ont montré une complexation ligand-métal, mise en évidence par l'apparition des pics fluorescents correspondant à des exsudats phytoplanctoniques. Les pics T correspondaient au COD exsudé par les cellules, alors que les pics M témoignaient de la présence des produits de dégradation de la matière phytogénique. Les pics M sont associés à la bande de fluorescence notée  $\beta$ , observée à des longueurs d'ondes comprises entre 330 et 370 nm en excitation, et entre 420 et 480 nm en émission. Cette bande est attribuée aux substances humiques et fulviques. Les pics T sont associés à la bande de fluorescence notée  $\delta$ , observée à des longueurs d'ondes comprises entre 270 et 280 nm en excitation, et entre 320 et 350 nm en émission. Cette bande est attribuée aux protéines, aux phénols et aux acides aminés type tryptophanes (Lorenzo *et al.*, 2007; Parlanti *et al.*, 2000).

*CHAPITRE II*

*MATÉRIELS ET MÉTHODES*

## **\*\* PARTIE I \*\***

### **ISOLEMENT ET CULTURE DES MICROALGUES**

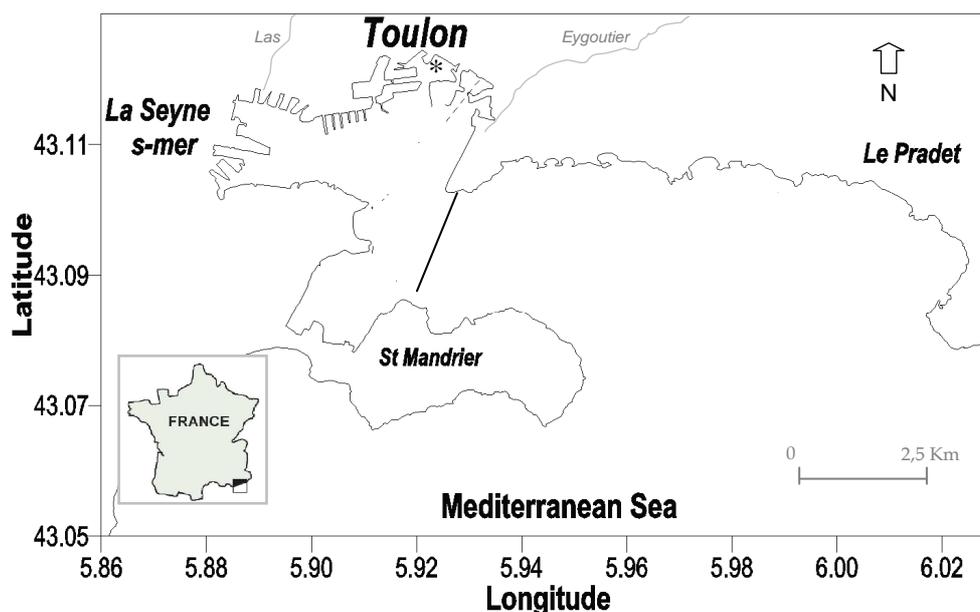
#### **I. ISOLEMENT DES CELLULES PHYTOPLANCTONNIQUES**

##### **1. Site d'isolement de *Skeletonema costatum* : la petite rade de Toulon**

La petite rade de Toulon est un écosystème côtier situé au Sud-Est de la France. Cet écosystème communique avec la Méditerranée *via* la grande rade de Toulon (Figure 11). La petite rade compte quatre principaux bassins versants, dont le plus important est le bassin versant du Las Rivière Neuve, avec 6 000 ha. La petite rade est semi-fermée, avec une surface de 11 km<sup>2</sup>, un volume de 108 millions de litres et un temps de résidence de l'eau estimé entre 3 et 6 jours (Richard et Jamet, 2001). Sa profondeur moyenne est de l'ordre de 14 m. Le fond de la petite rade est constitué pour plus de 40% de sable fin, susceptible d'être remis en suspension par une mer agitée ainsi que par le trafic maritime.

##### **1.1- Réseau hydrique**

La petite rade de Toulon reçoit les rejets anthropiques, provenant de deux cours d'eau : le Las et l'Eygoutier. La rivière Las charrie essentiellement une pollution organique due à l'urbanisation importante des communes alentours (Toulon et Le Revest-les-Eaux). L'Eygoutier, pour sa part est entouré à la fois par des zones urbaines, industrielles et agricoles, draine divers types de pollutions liés à ces activités.



**Figure 11.** Petite rade de Toulon : Localisation de la station d'isolement de *Skeletonema costatum* (\*)

## 1.2- Courantologie

Les études portant sur la courantologie de la petite rade de Toulon sont rares. Toutefois, Jouan *et al.* (2001) ont pu mettre en évidence les grandes affinités entre les courants et les régimes des vents principaux. Du côté Est, dans la grande rade, la circulation vers le Sud-Ouest augmente le long du littoral. L'eau entre dans la grande rade à travers la digue de la passe, avec une vitesse d'environ  $40 \text{ cm s}^{-1}$ . Lorsque cette eau rencontre la côte, un mouvement d'upwelling prend naissance. Du côté Ouest de la grande rade, les vents engendrent des courants orientés dans le sens Est / Sud-Est. Cela entraîne une sortie massive des masses d'eau de la petite rade, par la grande rade. La compensation est faite par la montée des masses d'eau profonde, provoquant un upwelling sur les côtes Ouest de la petite rade. Les eaux montantes apportent les éléments nutritifs nécessaires pour la croissance et le développement du phytoplancton. La structure hydrologique des masses d'eau dépend fortement des saisons. Les caractéristiques hydrodynamiques dans la petite rade de Toulon font intervenir la combinaison de plusieurs facteurs tels que la circulation générale au large, les épisodes météorologiques (vents, pluies), les marées, les courants locaux, la structure hydrologique et la morphologie littorale.

## 1.3- Niveau de contamination chimique

La proximité de la petite rade de Toulon, avec les ports commercial et militaire, ainsi qu'avec l'agglomération toulonnaise, l'expose à une pollution importante. L'étude réalisée par le SIAT en 2002 a révélé une pollution métallique considérable, par le cuivre et par le plomb ( $2,82 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ ,  $19 \mu\text{g Pb L}^{-1}$ ). Une telle pollution a des conséquences sur les organismes sensibles qu'abrite cet écosystème. Certains organismes sont considérés comme des biomarqueurs, ou espèces sentinelles, permettant la surveillance de la qualité du milieu. Ce sont généralement des espèces qui mènent une vie sédentaire, comme les moules (*Mytilus galloprovincialis*), qui bioaccumulent d'importantes concentrations de composés xénobiotiques tels que le zinc, le mercure, le plomb et certains polychlorures de biphényles (PCBs). La pollution dans la petite rade de Toulon n'a toutefois pas empêché le développement de certaines espèces phytoplanctoniques toxiques comme *Alexandrium minutum* et *Dinophysis* sp., mais a entraîné la disparition de la macrophyte *Posidonia oceanica* (Joanny *et al.*, 1993). Certaines espèces marines majoritaires dans la petite rade pourraient donc s'être adaptées contrairement à d'autres, aux pollutions présentes dans cet écosystème.

## 2. Prélèvement de l'eau et isolement des cellules

Des échantillons d'eau (10 L) ont été prélevés au niveau de la station « port de Toulon » en juin et juillet 2009, à 3 m de profondeur (maximum de la concentration en Chlorophylle *a*) à l'aide d'une bouteille Niskin. L'eau a été conservée à l'obscurité et au frais (4°C), jusqu'au retour au laboratoire. Les échantillons d'eau ont ensuite été filtrés par filtration inverse afin d'isoler les cellules de *Skeletonema costatum*.

Pour *S. costatum*, les microalgues ont été isolées grâce à la technique d'isolement cellulaire à pipette capillaire (Robert, 1994). Un échantillon d'eau de mer (10 mL) a été mis dans une boîte de pétri, puis observé au microscope inversé. Tout en observant cet échantillon, une goutte d'eau renfermant la, ou les cellule(s), de *Skeletonema costatum*, a été aspirée au travers de la pipette capillaire, et déposée dans une autre boîte de pétri. Cette goutte étant susceptible de contenir plusieurs cellules d'espèces différentes, un autre isolement a ensuite été effectué. Cette opération a été répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une goutte ne renfermant qu'un seul type de cellules, correspondant à *Skeletonema costatum*. Les cellules de *Skeletonema costatum* isolées ont été immédiatement mises en culture dans un petit volume (50 mL) de milieu f/2.

Pour *A. catenella*, la procédure d'isolement et de culture des souches françaises ou tunisiennes n'a pas pu aboutir malgré de nombreux essais. L'étude a été donc menée sur une souche pure provenant de la lagune de Thau (ACT03) en partant des cellules kystes. Le milieu de culture utilisé est également un milieu f/2.

## II. CULTURES PHYTOPLANCTONIQUES

### 1. Procédure

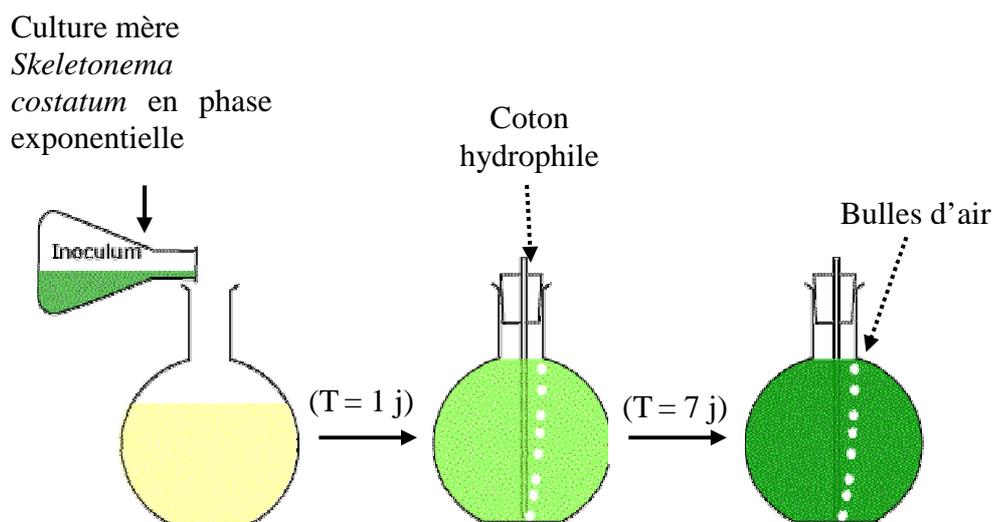
Les cellules de *Skeletonema costatum* et d'*Alexandrium catenella* ont été mises en cultures fermées sur milieu f/2 (Guillard et Ryther, 1962). Ce milieu a été préparé à partir d'eau de mer naturelle prélevée à la plage de l'Almanarre (presqu'île de Giens, milieu non pollué). Cette eau a d'abord été filtrée sur des membranes en nylon de 0,22 µm de porosité (pour éliminer toutes les particules), puis autoclavée, et enfin amendée par des solutions stocks spécifiques à l'espèce cultivée (Tableaux I et II). La préparation des solutions stocks ainsi que toutes les manipulations des cultures ont été réalisées en conditions stériles, sous une hotte à flux laminaire. Le matériel utilisé pour réaliser les cultures ainsi que leur repiquage, a

été soigneusement lavé avec une solution d'acide nitrique 10%, puis du détergent, puis rincé à l'eau milliQ.

Les cultures ont été maintenues dans un incubateur sous une luminosité de 135  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , à une température de 20°C et une photopériode de 12 h. Les cultures ont été maintenues par repiquage bimensuel d'un inoculum de la culture mère diluée dans un volume de milieu f/2 neuf. Les analyses prévues pour les deux espèces étant différentes, les protocoles de cultures sont légèrement différents. Pour *Skeletonema costatum*, une quantité importante était nécessaire pour obtenir suffisamment de matière organique et d'exsudats et 1 mL de la culture mère en phase exponentielle (4<sup>ème</sup> jour) a été dilué dans 200 mL de milieu f/2 neuf (Figure 12) alors que pour *Alexandrium catenella*, 5 mL de la culture mère en milieu de phase exponentielle (15<sup>ème</sup> jour de croissance) ont été dilués dans 35 mL de milieu f/2 neuf était suffisant (Figure 13).

**Tableau I.** Composition du milieu utilisé pour cultiver la diatomée *Skeletonema costatum* (modifié d'après Guillard et Ryther, 1962)

Solutions stocks (g L <sup>-1</sup> )	Volume ajouté par litre (mL)	Concentration finale
NaNO <sub>3</sub>	100	882 $\mu\text{mol N L}^{-1}$
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	100	36 $\mu\text{mol P L}^{-1}$
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	100	327 $\mu\text{mol Si L}^{-1}$
Fe-EDTA :		
*FeCl <sub>3</sub> ,6H <sub>2</sub> O	270 10 <sup>-3</sup>	10 $\mu\text{mol Fe L}^{-1}$
*Na <sub>2</sub> EDTA	170 10 <sup>-3</sup>	
CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O	9,8 10 <sup>-3</sup>	2,5 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$
ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	22 10 <sup>-3</sup>	5 $\mu\text{g Zn L}^{-1}$
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	10 10 <sup>-3</sup>	2,5 $\mu\text{g Co L}^{-1}$
MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	180 10 <sup>-3</sup>	50 $\mu\text{g Mn L}^{-1}$
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	6,3 10 <sup>-3</sup>	6,3 $\mu\text{g Mo L}^{-1}$
Vitamine B12	0,5	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$
Biotine	2,5 10 <sup>-3</sup>	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$
Thiamine	0,5	0,1 $\text{mgL}^{-1}$

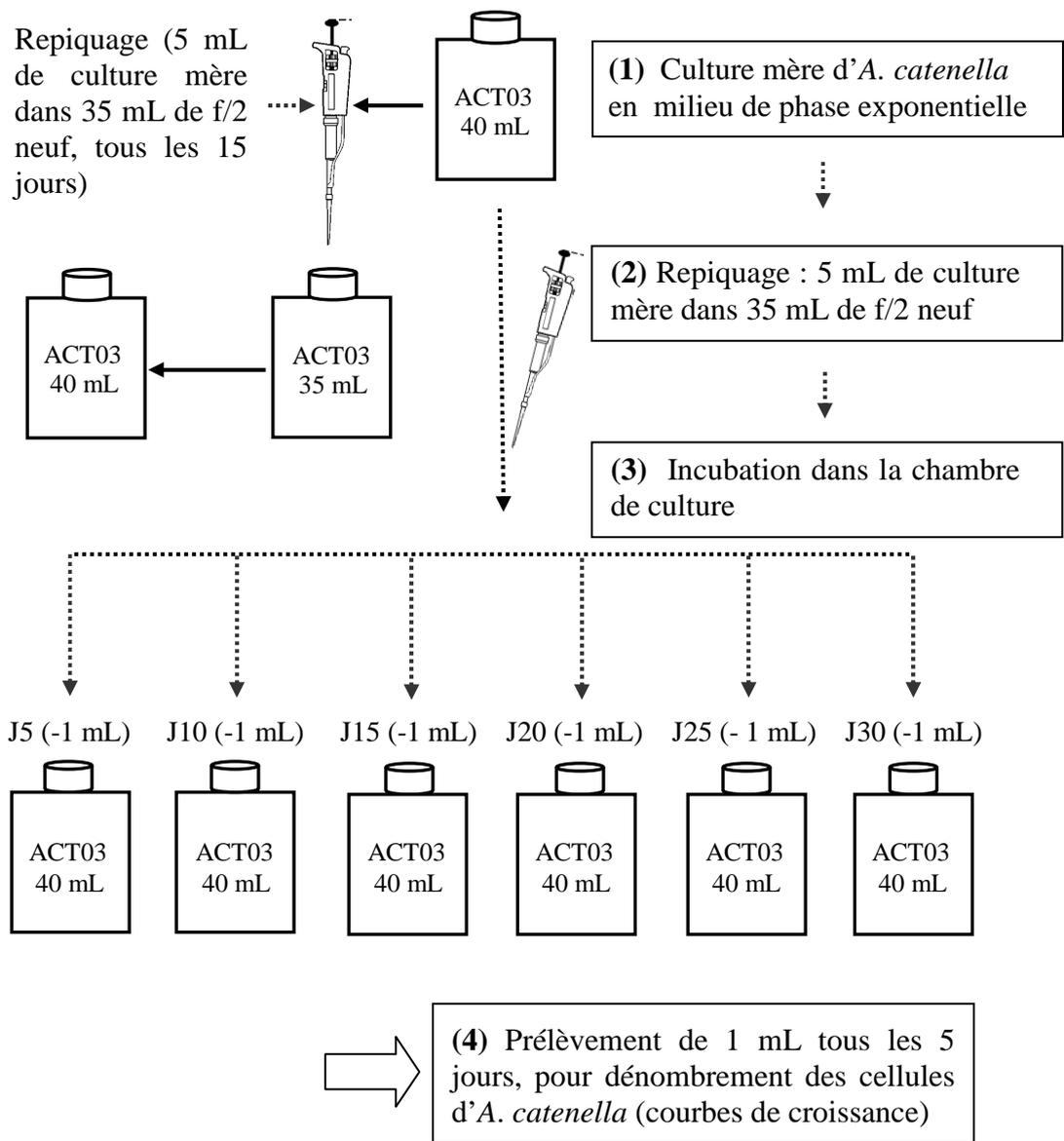


Repiquage de *S. costatum*    Croissance de *S. costatum*    *S. costatum* après 7 jours

**Figure 12.** Repiquage et mise en culture de *Skeletonema costatum*

**Tableau II.** Composition du milieu utilisé pour cultiver le dinoflagellé *Alexandrium catenella* (modifié d'après Guillard et Ryther, 1962)

Solution stock (g L <sup>-1</sup> )	Quantité ajouté pour 1 litre	Concentration finale (µM)	
NaNO <sub>3</sub>	46,76	1,00 mL	549
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3,06	1,00 mL	22,4
<b>Fe-EDTA</b>		<b>1,00 mL</b>	
* FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,77		6,55
* Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	2,44		6,56
<b>Solution de métaux traces</b>		<b>1,00 mL</b>	
* Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	3,09		8,093
* ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,07		0,254
* CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02		0,569
* MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,54		2,420
* Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,48	1,00 mL	0,00612
* Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,17	1,00 mL	0,001
* NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,49	1,00 mL	0,00627
<b>Solution de vitamines</b>		<b>1,00 mL</b>	
* Vitamine B12	0,10		0,296
* Biotine	1,00	1,00 mL	0,00485
* Thiamine,HCl	2,00	1,00 mL	0,00148



**Figure 13.** Protocole expérimental utilisé pour la culture du dinoflagellé toxique *Alexandrium catenella* ACT03

## 2. Suivi des cinétiques de croissance des cultures phytoplanctoniques

Les cinétiques de croissance de *Skeletonema costatum* et d'*Alexandrium catenella* ont été établies en suivant l'évolution temporelle des densités cellulaires au moyen d'un microscope inversé (Leica, DMI 4000 B) et d'une cellule de Malassez (100×).

Le taux de croissance, a été calculé selon le modèle de Landry et Hassett (1982) :

$$N_t = N_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

Avec:

$N_0$  : Densité cellulaire (cellules  $L^{-1}$ ) initiale ( $t = 0$ )

$N_t$  : Densité cellulaire (cellules  $L^{-1}$ ) au temps  $t$

$\mu$  : Taux de croissance nette ( $J^{-1}$ ) (Taux de croissance brute – Taux de mortalité)

$t$  : Temps

Puis, l'équation (1) a été transformée, comme suit :

$$\ln(N_t / N_0) = \mu t \quad (2)$$

L'équation (2) est celle d'une régression linéaire de  $\ln(N_t / N_0)$  en fonction du temps, de la forme :  $y = ax$ . La pente ( $a$ ) de cette régression représente le taux de croissance net,  $\mu$ .

A partir du taux de croissance  $\mu$ , le taux de dédoublement  $K$  ( $J^{-1}$ ) et le temps de division de la population ( $T$  en  $J$ ) ont été respectivement calculés, sur la base des équations (3) et (4):

$$K = \mu / \ln 2 \quad (3)$$

$$T = 1 / K \quad (4)$$

## **\*\* PARTIE II \*\***

### **EXPÉRIENCES DE CONTAMINATIONS MÉTALLIQUES**

#### **I. CONTAMINATION MÉTALLIQUE DES CULTURES DE *Skeletonema costatum***

L'effet du cuivre sur la croissance et l'exsudation des molécules extracellulaires chez *Skeletonema costatum* a été examiné grâce à des expériences de contamination des cultures de cette diatomée.

##### **1. Préparation des solutions contaminantes**

Pour étudier la réponse de *Skeletonema costatum* au stress métallique, deux concentrations finales en cuivre (Cu 1 =  $2,02 \times 10^{-8}$  M et Cu 2 =  $1,10 \times 10^{-6}$  M) ont été préparées à partir des solutions stocks (Tableau I), en utilisant de l'eau milliQ préalablement filtrée sur 0,22  $\mu$ M, puis autoclavée. Ces concentrations ont été choisies suite à des études préliminaires montrant que pour Cu 1, une production importante de carbone organique dissous se produisait sans détérioration importante de la courbe de croissance tandis que pour la concentration Cu 2, la densité cellulaire de la phase stationnaire diminuait d'environ 50%.

##### **2. Procédure expérimentale**

Les repiquages de *Skeletonema costatum* provenant de la phase exponentielle (4<sup>ème</sup> jour) ont été faits dans des milieux de cultures contaminées par des concentrations de  $2,02 \times 10^{-8}$  Cu M (traitement Cu 1) et  $1,10 \times 10^{-6}$  Cu M (traitement Cu 2), avec addition d'EDTA ( $10 \times 10^{-6}$  M). En outre, des cultures non contaminées ont servi de témoin (T). Pour prendre en compte la concentration en cuivre libre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) dans le milieu f/2, la spéciation des métaux a été calculée par MINEQL+ dans les traitements T, Cu 1 et Cu 2 prédisant des concentrations de cuivre libre de  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$  et  $10^{-8}$  M, respectivement. Le calcul de la spéciation est effectué en tenant compte de la concentration des espèces chimiques présentes dans l'eau de mer et des constantes d'équilibres de formation des espèces complexes (Schecher et McAvoy, 1992).

Tous les traitements ont été réalisés en triplicats, et ont été incubés pendant 7 jours dans les conditions précédemment décrites pour les cultures de *Skeletonema costatum*. Chaque jour

d'incubation, des sous-échantillons de chaque condition ont été prélevés, afin de déterminer la densités cellulaires de *Skeletonema costatum*, les concentrations en pigments (chlorophylle *a*, phéopigments et caroténoïdes), en COD et en carbohydrates. La fluorescence des molécules exsudées, ainsi que la composition en monosucres des exopolysaccharides (EPS) libérés ont été journalièrement déterminées.

### 3. Analyses

#### 3.1- Analyses des pigments chlorophylliens

Les teneurs en Chl *a*, phéopigments et caroténoïdes ont été déterminés par spectrophotométrie (Richards et Thompson, 1952; Lorenzen, 1967). Des sous-échantillons (24 mL) de cultures ont été prélevés tous les jours au cours de la croissance afin de doser les pigments chlorophylliens. Les sous-échantillons ont été filtrés sur des filtres en fibres de verre (Whatman GF/F). Puis, les filtres ont été mis dans des tubes à essai, auxquels 10 mL d'acétone (90% V/V) ont été ajoutés, puis vortexés et laissés pendant 24 h à 4°C pour extraire les pigments. Après centrifugation à 1861,47 g pendant 15 min, le surnageant de chaque tube a été prélevé afin d'être caractériser par spectrophotométrie. Les absorbances de l'extrait acétonique ont ainsi été mesurées avant et après acidification par 100 µL de HCl à 20%, aux longueurs d'onde 480, 510, 665 et 750 nm.

Les absorbances nettes ont été calculées selon les formules suivantes (Richards et Thompson, 1952; Lorenzen, 1967) :

$$A_{480} = DO_{480} - DO_{750}$$

$$A_{510} = DO_{510} - DO_{750}$$

$$A_{665} = DO_{665} - DO_{750}$$

$$A_{665 \text{ ac}} = DO_{665 \text{ ac}} - DO_{750 \text{ ac}}$$

$$A_{665 \text{ ac}} < A_{665}$$

Avec :

**DO<sub>480</sub>, DO<sub>510</sub>, DO<sub>665</sub> et DO<sub>750</sub>** : Absorbances à 480, 510, 665 et à 750 nm de l'extrait avant acidification

**DO<sub>665ac</sub> et DO<sub>750ac</sub>** : Absorbances à 665 et à 750 nm de l'extrait après acidification

Les teneurs des pigments ont ensuite été calculées selon les formules suivantes :

$$\text{Chlorophylle } a \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = (26,7 \times (A_{665} - A_{665 \text{ ac}}) \times v) / (V \times L)$$

$$\text{Phéopigments (mg mL}^{-1}\text{)} = (26,7 \times (1,7 \times A_{665 \text{ ac}} - A_{665}) \times v) / (V \times L)$$

$$\text{Caroténoïdes (mg mL}^{-1}\text{)} = (7,6 \times (A_{480} - 1,49 \times A_{510}) \times v) / (V \times L)$$

Avec :

v, volume de l'acétone contenant l'extrait (mL)

V, volume du sous-échantillon filtré (mL)

L, largeur de la cuve spectrophotométrique (cm)

### 3.2- Analyse du carbone organique dissous (COD)

Des sous-échantillons (18 mL) de cultures ont été prélevés tous les jours au cours de la croissance afin de doser le COD. Les sous-échantillons ont d'abord été filtrés sur des filtres GF/F préalablement brûlés à 450°C, puis les filtrats obtenus ont été conservés à 4°C en présence d'azide de sodium  $\text{NaN}_3$  (1 N). La concentration en COD a été déterminée grâce à un analyseur de carbone organique total (TOC- $\text{V}_{\text{CSH}}$ , Shimadzu), relié à un injecteur automatique d'échantillon (ASI-V, Shimadzu). L'analyseur de carbone organique total (COT) utilise la méthode d'oxydation catalytique à haute température avec la détection IR de  $\text{CO}_2$  (Benner et Strom, 1993), calibré par de l'hydrogénophthalate de potassium (Fisher Scientific, Analytical Reagent Grade).

### 3.3- Analyse des carbohydrates

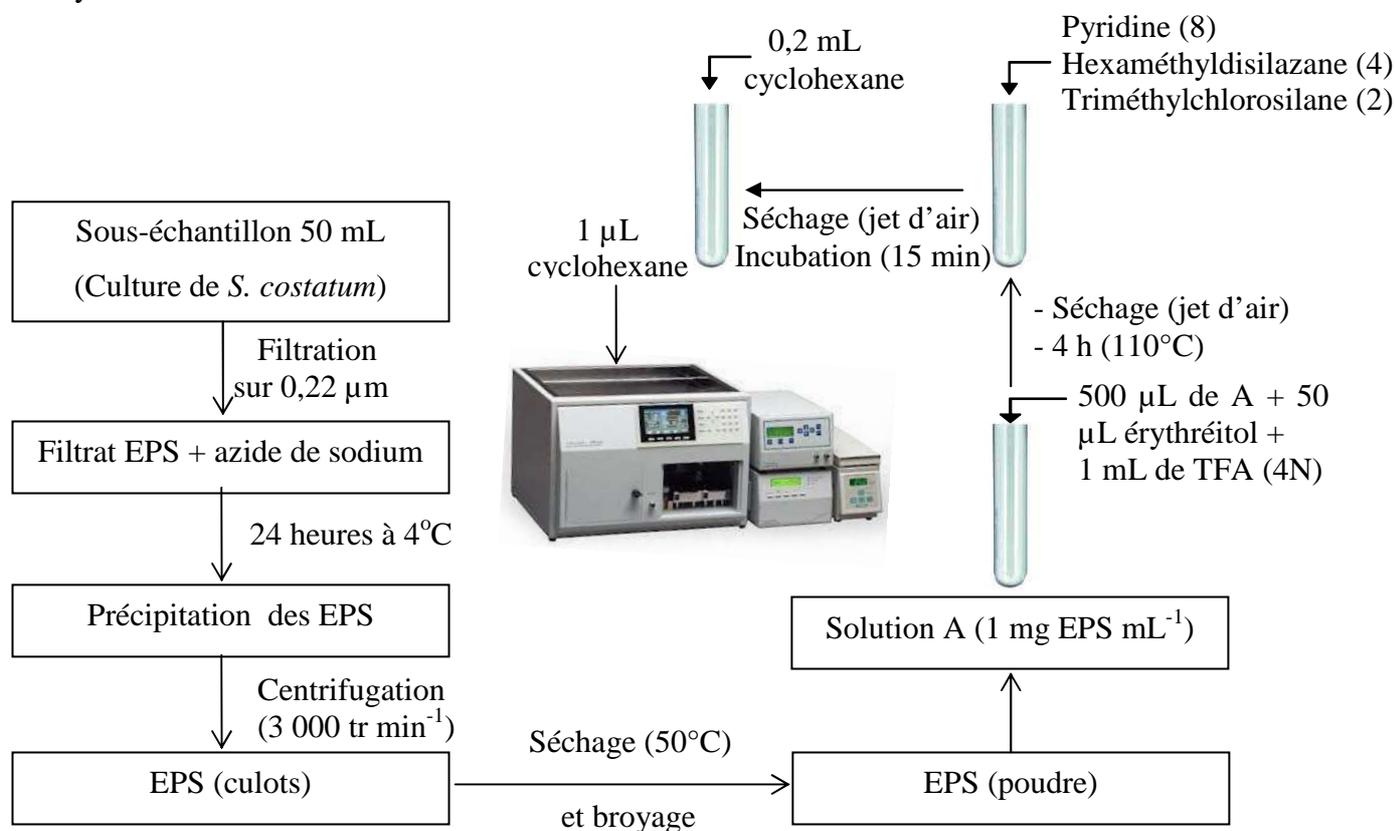
Des sous-échantillons (2 mL) de cultures ont été prélevés tous les jours au cours de la croissance afin de doser les carbohydrates. Les sous-échantillons ont été mélangés à 50  $\mu\text{L}$  de phénol (80%). Le mélange obtenu a été vortexé, puis acidifié avec 5 mL d'acide sulfurique concentré. Puis, le mélange était laissé à incuber à 25°C pendant 10 min. La concentration en carbohydrates a été déterminée par spectroscopie UV-visible, à 485 nm, après calibration. Le D-Glucose (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a été utilisé comme standard. Les concentrations de carbohydrates étaient exprimées en mmol C (Dubois *et al.*, 1956).

### 3.4- Caractérisation des exopolysaccharides (EPS)

Des sous-échantillons (50 mL) de cultures ont été prélevés tous les jours au cours de la croissance afin de doser les EPS. Les sous-échantillons ont d'abord été filtrés sur des filtres en polycarbonate (Nuclepore), puis les filtrats ont été conservés à 4°C en présence d'azide de

sodium  $\text{NaN}_3$  (1 N) (Figure 14). Au moment de l'analyse, un volume de 150 mL d'éthanol a été ajouté aux 50 mL d'échantillon provoquant la précipitation des EPS. Une centrifugation à 1861,47 g pendant 15 min a permis de récupérer les EPS (culot). Après séchage et broyage, les EPS ont été transformés en poudre. Afin d'analyser la composition en monosucres des EPS, une solution A de 1 mg EPS  $\text{mL}^{-1}$  a été préparée (1 mg d'EPS en poudre a été dissous dans 1 mL d'eau milliQ). Dans une deuxième étape, 500  $\mu\text{L}$  de l'échantillon préconcentré étaient injectés dans un tube à hémolyse, auxquels 50  $\mu\text{L}$  d'érythréitol et 1 mL de TFA (acide trifluoroacétique) 4 N ont été ajoutés. Le mélange obtenu a ensuite été placé pendant 4 h dans une étuve à 110°C (permettant l'hydrolyse totale des polysaccharides), puis a été séché sous jet d'air. Une fois sec, 8 gouttes de pyridine, 4 gouttes d'hexaméthylsilazane et 2 gouttes de triméthylchlorosilane ont été ajoutées. La pyridine de formule chimique  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$  et le triméthylchlorosilane sont utilisés comme catalyseurs. L'hexaméthylsilazane a pour rôle le conditionnement de la colonne de chromatographie.

Le tube était ensuite incubé pendant 15 min à température ambiante, puis séché de nouveau. Par la suite, 0,2 mL de cyclohexane ont été ajoutés au mélange. Puis, 1  $\mu\text{L}$  du mélange a été prélevé et injecté dans le chromatographe en phase gazeuse (CPG) afin d'être analysé.



**Figure 14.** Etapes expérimentales d'extraction et de caractérisation des exopolysaccharides

### 3.5- Analyse de la fluorescence 3D

Des sous-échantillons (4 mL) de cultures ont été prélevés tous les jours au cours de la croissance afin d'analyser les matrices d'excitation-émission (EEMs). La fluorescence des filtrats obtenus a été analysée en utilisant un spectrofluoromètre (Hitachi F4500) équipé d'une lampe d'excitation en Xenon (Xc152HUS, USHIO). Les ondes d'excitation et d'émission étaient fixées entre 200 nm et 600 nm, avec un laps d'intervalle de 5 min. La vitesse du scanner était de l'ordre de 2 400 nm min<sup>-1</sup>. La réponse était fixée à 0,1 s<sup>-1</sup>. Avant chaque mesure, l'échantillon était mis à buller en présence d'azote (N<sub>2</sub>), pendant 10 min, dans le but d'éliminer l'oxygène dissous, considéré comme quencher.

## II. CONTAMINATION MÉTALLIQUE DES CULTURES D'*Alexandrium catenella*

Les effets des ETMs cuivre, zinc, plomb ou cadmium sur la croissance, l'exsudation des molécules extracellulaires et les protéomes d'*Alexandrium catenella* ont été examinés.

### 1. Préparation des solutions contaminantes

Pour chaque métal testé, neuf solutions de concentrations différentes (3, 6, 12, 16, 18, 25, 60, 100 et 200 µM) ont été préparées à partir de solutions stocks (Tableau III), en utilisant de l'eau milliQ préalablement filtrée sur 0,22 µm, puis autoclavée. Trois concentrations supplémentaires de cadmium (0,5, 1 et 9 µM) ont aussi été ajoutées pour couvrir la forte dynamique de la toxicité du cadmium pour les faibles concentrations.

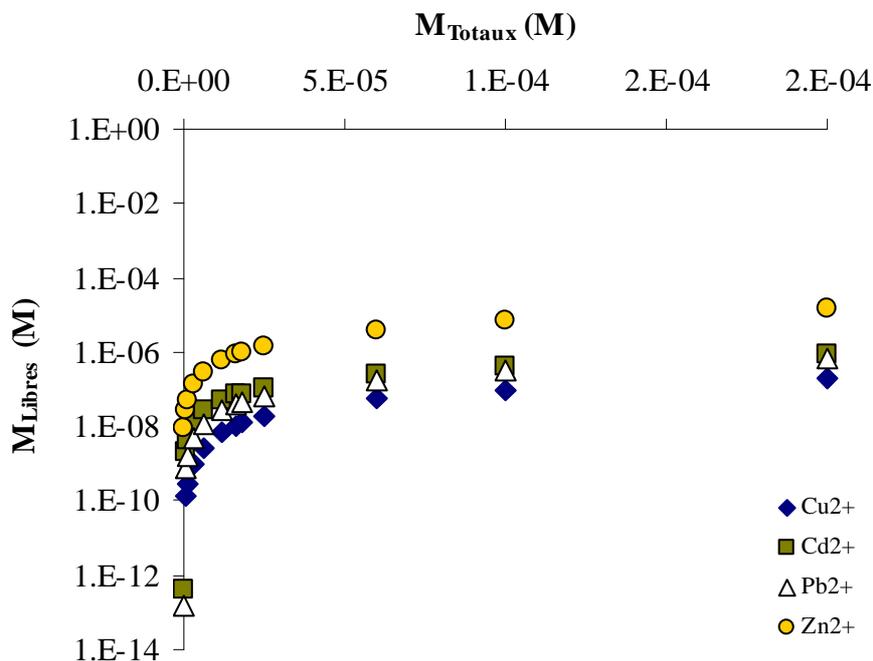
**Tableau III.** Préparation des solutions de métaux utilisées pour tester la réponse d'*Alexandrium catenella* aux stress métalliques

Métaux	Masse molaire (g mol <sup>-1</sup> )	Masse de métaux ajoutés (mg dans 100 mL)									
		Solutions métalliques contaminantes (µM)									
		3	6	12	16	18	25	60	100	200	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249,6	0,07	0,15	0,76	0,40	0,45	0,62	1,50	2,50	5,00	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	287,6	0,07	0,14	0,27	0,37	0,42	0,58	1,39	4,66	2,33	
3CdSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	769,5	0,08	0,15	0,31	0,41	0,46	0,64	1,54	2,56	5,13	
PbSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	379,3	0,11	0,23	0,45	0,61	0,68	0,95	2,28	3,79	7,59	

## 2. Procédure expérimentale

Les inoculum d'*Alexandrium catenella* prélevés en fin de phase exponentielle (21 jours) ont été introduits dans des milieux de cultures contaminés en cuivre, zinc, plomb ou cadmium, à des concentrations finales de 0,5, 1, 3, 6, 12, 16, 18, 25, 60, 100 ou 200  $\mu\text{M}$ . Des cultures témoins, sans métal dans le milieu de culture, ont aussi été réalisées. Un suivi de croissance des cultures obtenues a été effectué, en déterminant la densité cellulaire de l'espèce tous les 5 jours d'incubation, pendant 30 jours. De plus, tous les cinq jours d'incubation, des échantillons de culture ont été prélevés afin de déterminer les concentrations en COD et la fluorescence des molécules exsudées. Les EPS exsudés dans le milieu de culture ont été caractérisés en fin de phase exponentielle-début de phase stationnaire.

Comme pour *S. costatum*, les concentrations en métal libre de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  ou  $\text{Cd}^{2+}$  dans le milieu de culture ont été calculée à l'aide du logiciel de spéciation MINEQL et de la composition chimique du milieu f/2 (Figure 15). Tous les traitements (témoin et contaminés) ont été réalisés en triplicats, les concentrations totales en métaux étant supposées constantes au cours de la culture.



**Figure 15.** Concentrations (en M) des métaux totaux ( $M_{\text{Total}}$ ) et libres ( $M_{\text{Libre}}$ ) dans les milieux de cultures contaminés par le cuivre, le zinc, le plomb ou le cadmium

### 3. Analyses du COD, de la FDOM et des EPS

Les méthodes d'analyse du COD, de la fluorescence et des EPS sont celles décrites précédemment pour les expériences de contamination de *Skeletonema costatum*. Toutefois, contrairement à *Skeletonema costatum*, les analyses d'EPS exsudés n'ont pas été réalisées tout au long de la croissance d'*Alexandrium catenella*, mais seulement en fin de phase exponentielle – début de phase stationnaire de la croissance (jour 20 en conditions témoins).

### 4. Extraction et dosage des protéines

#### 4.1- Centrifugation des échantillons

Des volumes (entre 1 et 2 L) de culture d'*Alexandrium catenella* (contenant  $9 \times 10^6$  cellules) en fin de phase exponentielle-début de phase stationnaire (jour 20 en conditions témoins), ont été centrifugés pendant 15 min à 1 500 g. Après centrifugation, les culots cellulaires ont été collectés puis rassemblés.

Les culots cellulaires obtenus ont été rincés deux fois dans de l'eau de mer filtrée sur 0,22  $\mu\text{m}$  et autoclavée, puis centrifugés à 15 000 g pendant 10 min. Les culots cellulaires ainsi rincés ont été conservés à  $-30^\circ\text{C}$ .

#### 4.2- Extraction et dosage des protéines solubles

Afin de réaliser l'électrophorèse 2D des protéines solubles des cultures d'*Alexandrium catenella*, il est indispensable d'extraire des protéines des cellules. L'extraction des protéines a été réalisée d'après la méthode de Chan *et al.* (2005). Pour cela,  $4 \times 10^6$  cellules de culot cellulaire ont été mélangées avec 1 mL de Tris (40 mM, pH 8,7) et 1,2  $\mu\text{L}$  d'endonucléase pour chaque. L'endonucléase permet d'éliminer les acides nucléiques présents dans l'extrait, lesquels pourraient apparaître sous la forme de spots sur les gels 2D. Cette méthode était complétée par une extraction physique consistant en l'ultrasonication de la suspension cellulaire précédemment obtenue, à une fréquence sonore de 20 kHz, pendant 3 min avec des cycles 10'' on, 10'' off, dans un bain de glace pour limiter la dénaturation des protéines due à l'échauffement. Il en résulte la lyse cellulaire, puis la libération des protéines solubles, à l'extérieur des cellules. Puis, une centrifugation du lysat obtenu a été effectuée à 15 000 g pendant 30 min. Le culot a été récupéré et conservé pour l'analyse ultérieure des protéines membranaires. Le surnageant représentait l'extrait de protéines solubles à caractériser. Celui-ci a été concentré par ultrafiltration dans un tube Vivaspin 15 R, seuil de coupure 10 kDa, à 1 500 g, jusqu'à obtenir un volume d'extrait de 150 mL. Ce volume a ensuite été dilué avec

400  $\mu\text{L}$  de solution de réhydratation, de composition : urée (7 M), thiourée (2 M), CHAPS (1%), triton X-100 (3%), DTT (1 %), ampholytes (0,2 %) et bleu de bromophénol (0,002%).

Le dosage des protéines de l'extrait a été réalisé à l'aide du kit Reagent Compatible Detergent Compatible Protein Assay (RCDC Protein Assay, Bio-Rad).

Ce kit est un test colorimétrique basé sur le dosage de Lowry *et al.* (1951). Les gammes d'étalonnages ont été réalisées à partir d'une solution mère de Sérum d'Albumine Bovine (BSA) de concentration connue ( $6 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ), en utilisant la solution d'extraction (solution Tris 40 mM, pH 8,7) comme solution de dilution. Le dosage des protéines de l'extrait était effectué en duplicats.

## 5. Electrophorèse 2D

L'électrophorèse 2D est une technique de séparation des protéines en fonction de leurs points isoélectriques et de leurs poids moléculaires.

### 5.1- Première étape : Réhydratation active

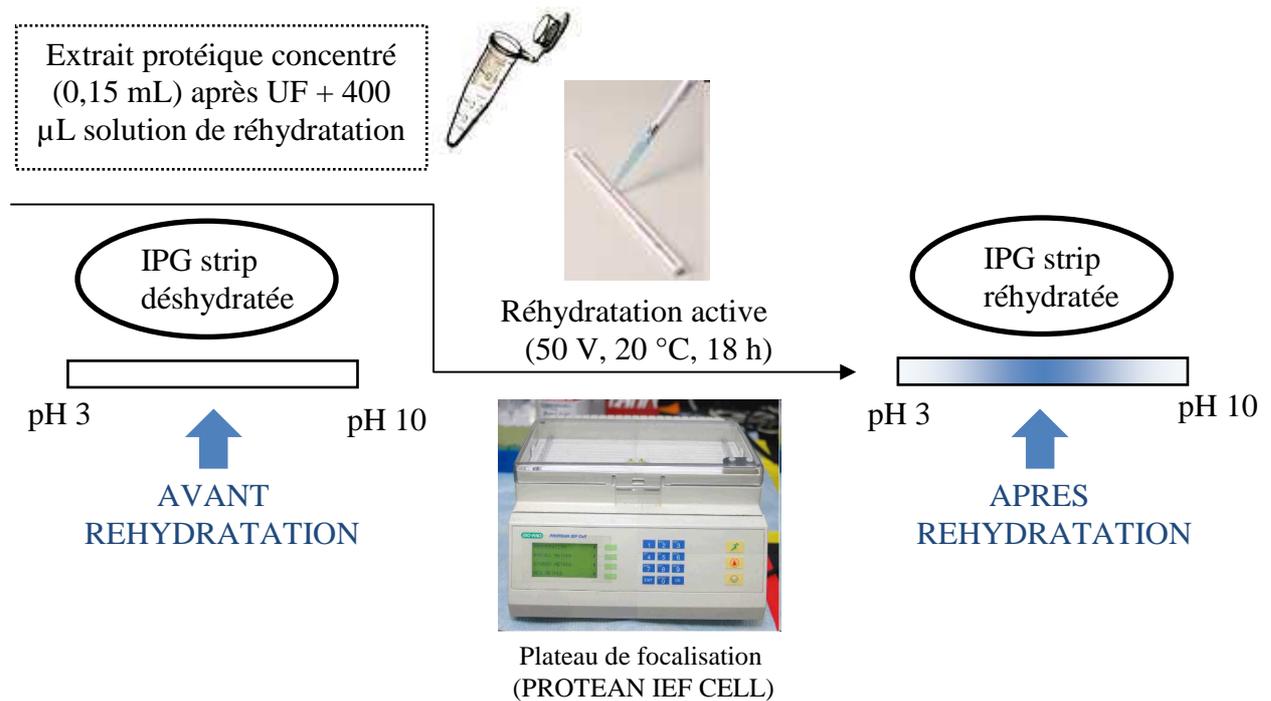
La première étape de l'électrophorèse 2D consiste en une imprégnation des protéines le long d'un gel spécifique contenant un gradient de pH. Ce gel est disposé sur une bandelette en plastique, l'ensemble gel et bandelette constituant une « IPG strip » (Immobilized pH Gradient Strip). Les IPG strips étant initialement déshydratées, il est nécessaire de réaliser leur réhydratation juste avant l'isoélectrofocalisation (IEF). Pendant la réhydratation, les protéines de l'extrait pénètrent dans le gel. Il existe deux modes de réhydratation : la réhydratation passive et la réhydratation active.

- La réhydratation passive consiste à laisser le gel de l'IPG strip s'imprégner passivement (sans tension) de l'extrait protéique
- La réhydratation active se déroule sous l'effet d'une tension permettant aux protéines de mieux pénétrer dans le gel de l'IPG strip. Dans le cadre de cette étude, la réhydratation active a été choisie. L'appareil utilisé pour cette réhydratation est la PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad) (Figure 16).

La quantité de protéines à mettre en contact avec une strip dépend du type de coloration utilisée. Pour une coloration de bleu de Coomassie, il faut déposer entre 200 et 400  $\mu\text{g}$  de protéines pour une strip de 17 cm. La coloration à l'argent est plus sensible, et ne nécessite qu'entre 50 et 80  $\mu\text{g}$  de protéines pour une strip de 17 cm. Le volume de l'extrait à déposer est

déterminé grâce aux résultats du dosage protéique précédemment décrit. Le volume d'extrait nécessaire pour une réhydratation active optimale est de 350  $\mu$ L.

La première étape de la réhydratation active a consisté à déposer 350  $\mu$ L de l'extrait dans le canal du plateau de focalisation, en partant à 1 cm de l'extrémité du canal jusqu'au milieu de la strip, puis à faire la même chose à partir de l'autre extrémité. La deuxième étape de la réhydratation active consiste à retirer la partie adhésive de la strip (pH 3 – 10), puis à l'imprégner avec l'extrait selon la technique d'imprégnation en « U », en positionnant la strip dans le canal du plateau de focalisation, côté gel vers le bas (indications « + » et « pH 3 - 10 » à gauche du plateau et partie biseautée du canal à droite). Après 15 min d'imprégnation, la strip était recouverte avec 2 mL d'huile minérale (l'huile minérale permet d'éviter l'évaporation de l'extrait protéique et la précipitation de l'urée pendant la réhydratation). Enfin, le plateau de focalisation était fermé puis placé dans le PROTEAN IEF Cell pendant 18 h, à 20°C et sous une tension de 50 V, comme indiqué sur la figure 15.

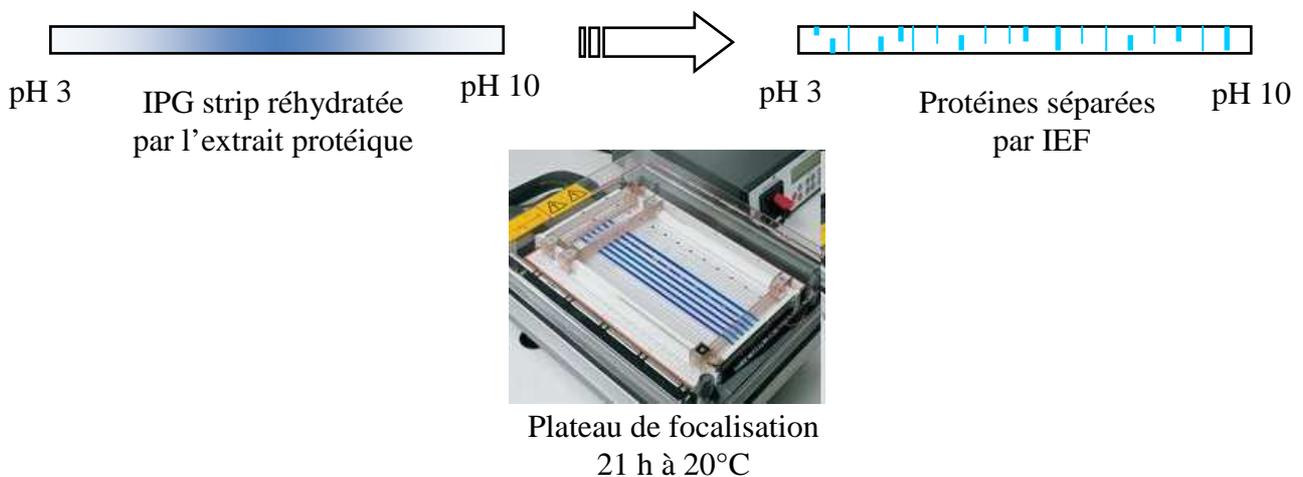


**Figure 16.** Protocole expérimental de la réhydratation active

## 5.2- Deuxième étape : IsoElectroFocalisation (IEF)

La deuxième étape de l'électrophorèse 2D consiste en une séparation horizontale des protéines le long du gradient de pH de l'IPG strip. Les protéines sont des macromolécules dotées de charges électriques qui varient en fonction du pH du milieu dans lequel elles se situent. En effet, il existe un pH pour lequel les protéines possèdent une charge nulle, ce pH correspond au point isoélectrique et noté  $pH_i$  ou  $pI$ . Lorsque les protéines se trouvent à un pH supérieur à leur  $pH_i$ , elles sont chargées positivement, et négativement, quand le pH du milieu dans lequel elles se trouvent est inférieur à leur  $pH_i$ .

L'IEF s'est déroulée dans le même plateau de focalisation que celui utilisé pour la réhydratation active selon le protocole d'O'Farrell (1975) (Figure 17). Au début de l'IEF, un papier buvard imbibé de 10  $\mu$ L d'eau nanopure est inséré sous les extrémités de chaque strip. Les papiers buvards permettent de piéger les ions présents dans l'extrait, lesquels pourraient migrer en même temps que les protéines et perturber la migration de celles-ci. L'IEF est programmée pour une durée de 21 heures, à 20°C, sous un courant constant de 50  $\mu$ A par IPG strip.

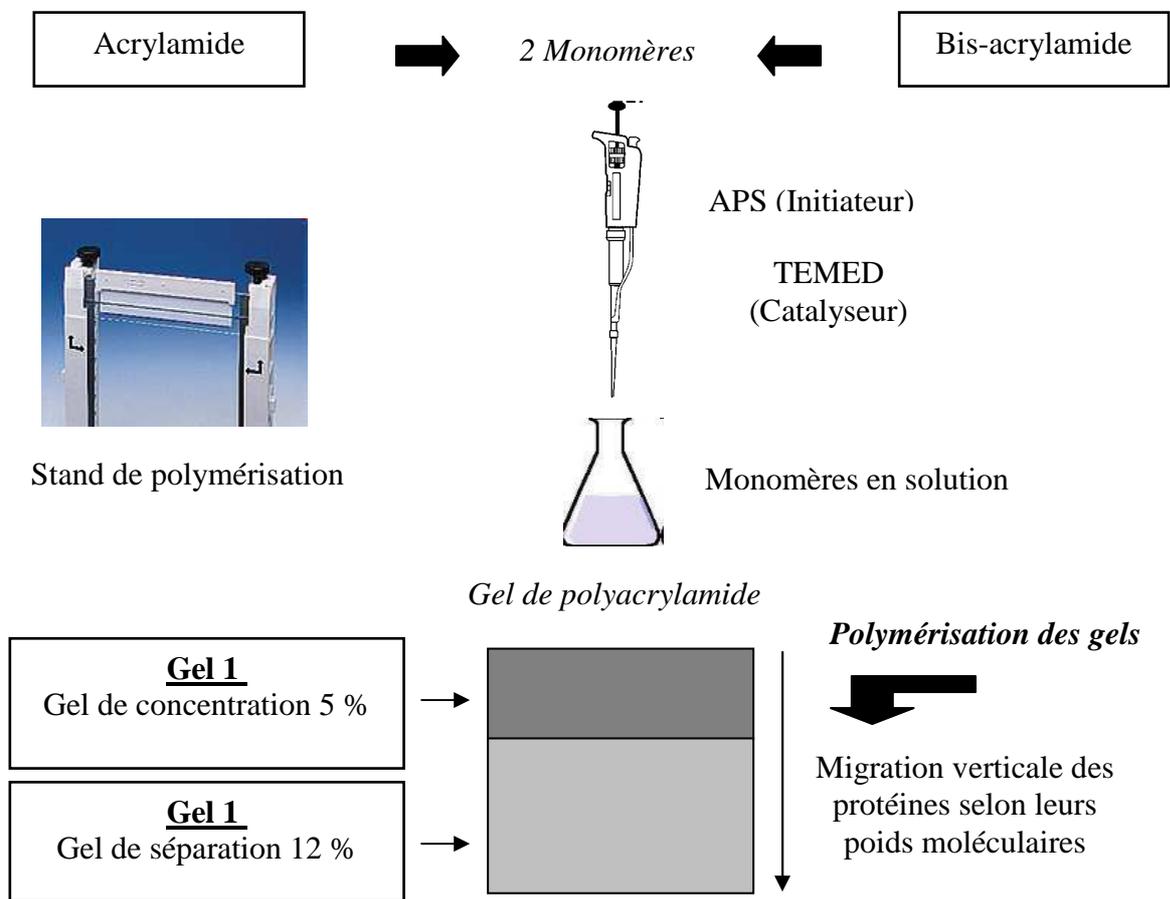


**Figure 17.** Protocole expérimental d'isoélectrofocalisation (d'après O' Farrell, 1975)

### 5.3- Préparation des gels de polyacrylamide

Les gels de polyacrylamide utilisés dans l'étude étaient discontinus, constitués d'un gel de séparation à 12% et d'un gel de concentration à 5%, mesurant 17 cm de côté sur 1 mm d'épaisseur. Les volumes des constituants de la solution monomère permettant de réaliser ces gels sont indiqués dans le tableau IV.

Les solutions monomères d'acrylamide / bis-acrylamide 1 et 2 étaient dégazées dans un erlenmeyer relié à une pompe à vide, afin d'éliminer toutes les bulles d'air. Après ce dégazage, l'APS (initiateur de la polymérisation) et le TEMED (catalyseur de la polymérisation) étaient ajoutés aux solutions monomères, avant chaque polymérisation. Puis, les solutions obtenues étaient injectées entre des plaques de verre, puis laissées à polymériser (Figure 18).



**Figure 18.** Protocole de préparation des gels discontinus de polyacrylamide utilisés pour la séparation verticale des protéines

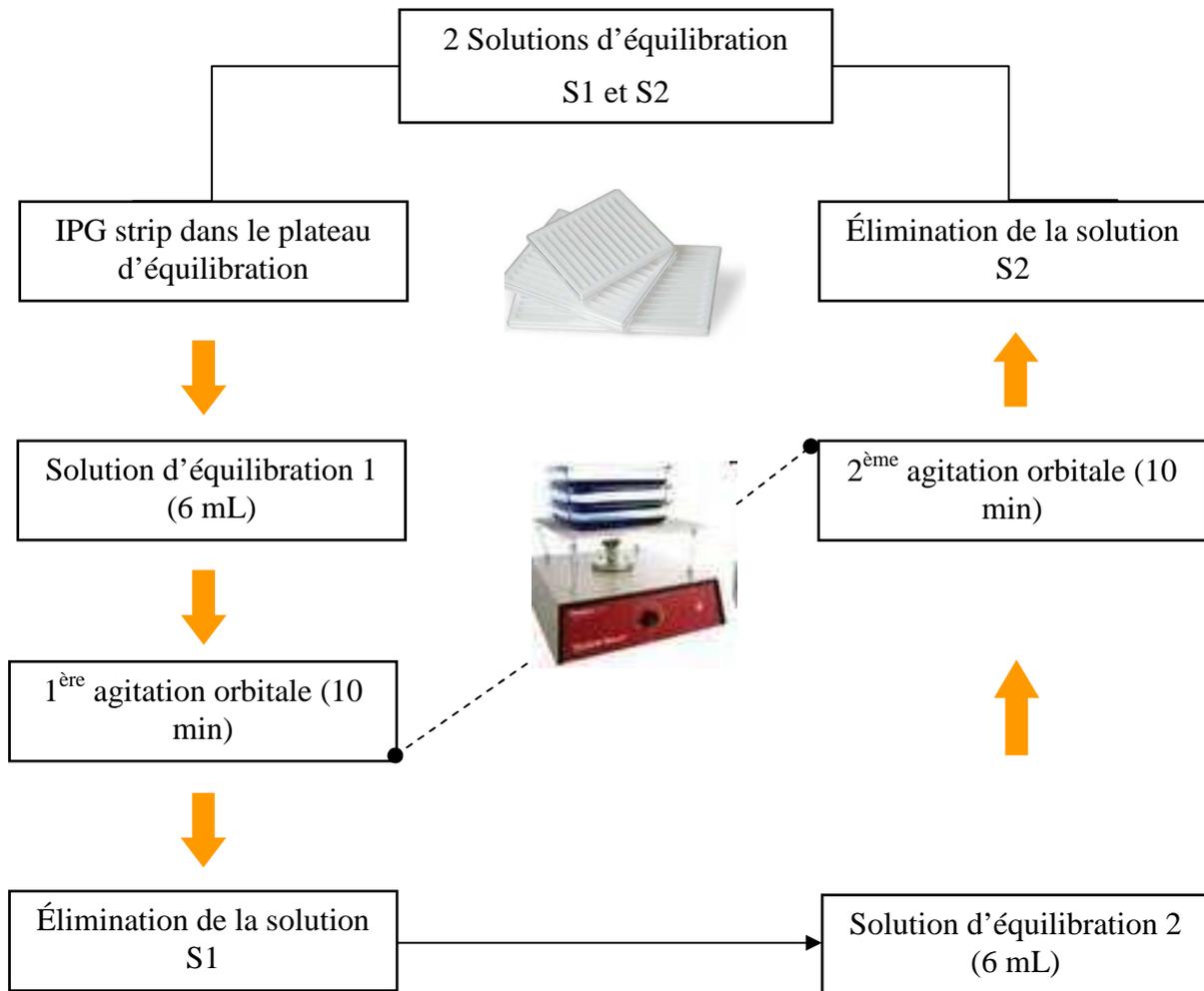
**Tableau IV.** Composition élémentaire d'un gel 2D discontinu de polyacrylamide / Bis-acrylamide

<i>Gel 1 :</i> gel de concentration (5%)		<i>Gel 2 :</i> gel de séparation (12%)	
	1 Gel 5%		1 Gel 12%
Eau mQ	3,184 mL	Eau mQ	10,733 mL
Tris-HCl pH 6,8 0,5M	5,000 mL	Tris-HCl pH 8,8 1,5M	8,000 mL
SDS 10%	0,100 mL	SDS 10%	0,320 mL
Acrylamide/ Bis (30%T, 2,67%C)	1,664 mL	Acrylamide/ Bis (30%T, 2,67%C)	12,787 mL
APS 10%	68,8 µL	APS 10%	220,0 µL
TEMED	6,8 µL	TEMED	22,0 µL
Volume total	10 mL	Volume total	32 mL

#### 5.4- Troisième étape : Equilibration

La troisième étape de l'électrophorèse 2D est appelée équilibration. Cette étape est précédée d'une dénaturation des protéines de l'extrait par le sodium dodécyl sulfate (SDS). Le SDS un détergent et tensioactif anionique fort, qui se fixe sur les protéines et permet l'acquisition d'une charge globale négative identique pour toutes les protéines. L'équilibration consiste à réduire les protéines par du dithiothréitol (DTT), puis à les alkyler par de l'iodoacétamide. L'équilibration se déroule en présence de deux solutions S1 et S2, contenant respectivement le DTT et l'iodoacétamide.

Dans le cadre de cette étude, les IPG strips étaient placées dans les canaux d'un plateau d'équilibration, puis recouvertes avec 6 mL de solution S1. Les strips étaient soumises à une première agitation orbitale pendant 10 min, suivie d'une élimination de la solution S1. Puis, 6 mL de solution S2 ont été ajoutés sur les strips, qui étaient soumises à une 2<sup>ème</sup> agitation orbitale pendant 10 min, suivie de l'élimination de la solution S2 (Figure 19).

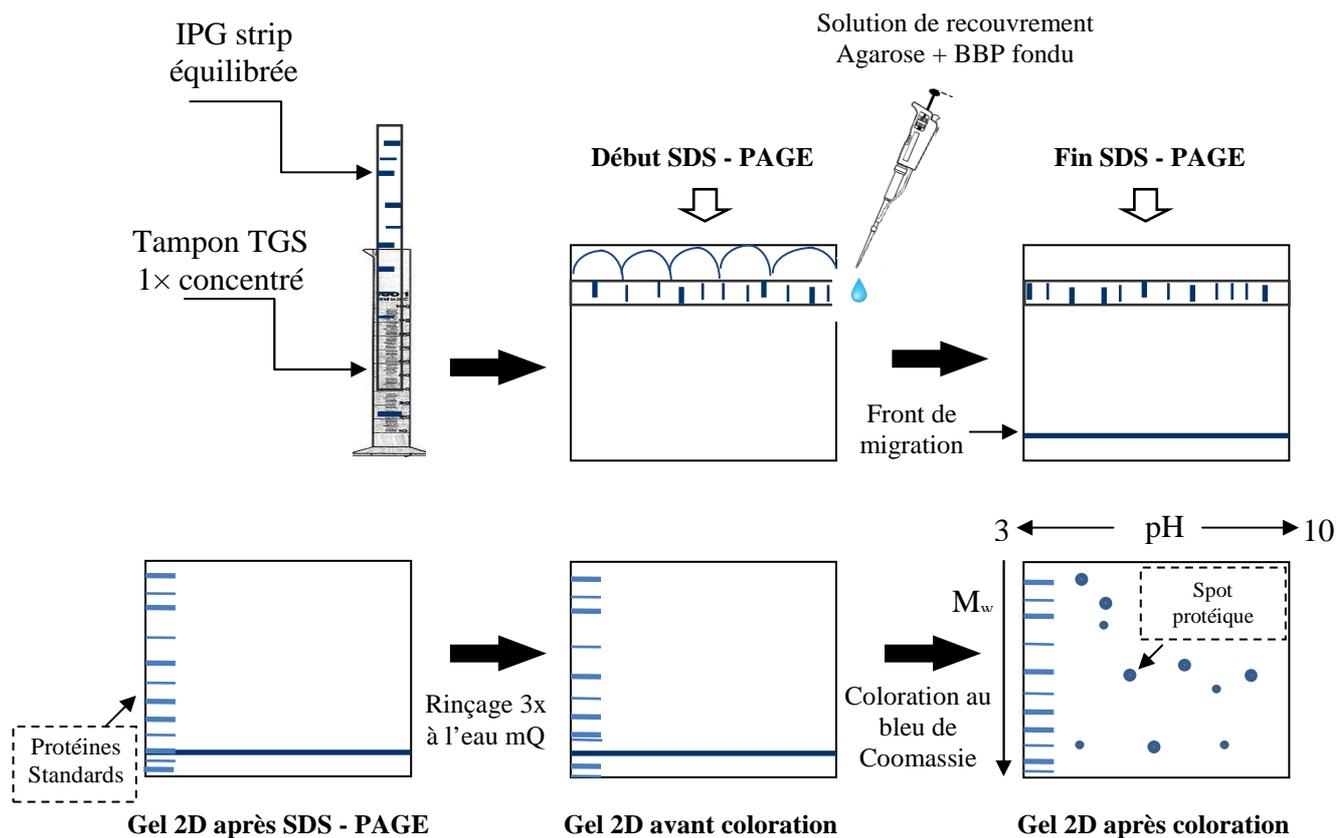


**Figure 19.** Protocole expérimental de l'équilibration

### 5.5- Quatrième étape : Sodium Dodécyl sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS – PAGE)

La quatrième étape de l'électrophorèse 2D est appelée Sodium Dodécyl Sulfate -Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS – PAGE). Cette étape consiste en une séparation verticale des protéines selon leurs poids moléculaires, à l'intérieur du gel réticulé de polyacrylamide selon le protocole de Laemmli (1970).

Le début de la SDS - PAGE était marqué par l'introduction de l'IPG strip, préalablement équilibrée, dans une solution tampon Tris-Glycine-SDS 1 × concentrée (TGS). Puis, une solution de recouvrement à base d'agarose fondu et de Bleu de bromophénol (BBP) était injectée sur la plaque de verre la plus haute, au moyen d'une micropipette. L'IPG strip était ensuite insérée entre les deux plaques de verre contenant le gel de polyacrylamide polymérisé. La fin de la SDS - PAGE était marquée par le déplacement du front de migration en bas du gel (Figure 20).



**Figure 20.** Protocole expérimental de la SDS - PAGE (d'après Laemmli, 1970)

La SDS-PAGE était programmée à ampérage constant, avec deux étapes : étape 1, ampérage = 20 mA par gel pendant 1 heure, étape 2, ampérage = 30 mA par gel pendant 5 heures (ou jusqu'à ce que le front de migration ait atteint le bas du gel).

### 5.6- Cinquième étape : Coloration des gels et acquisition des images des gels 2D

Les gels obtenus après SDS-PAGE étaient rincés 3 fois dans 150 mL d'eau milliQ sous agitation orbitale, pendant 5 min. Puis, ils étaient disposés dans une boîte de coloration contenant 150 mL de Bleu de Coomassie Imperial Protein Stain (Thermoscientific) et mis sous agitation orbitale pour coloration, pendant 1 h 30. Puis, les gels colorés étaient décolorés en présence de 150 mL d'eau milliQ. Cette étape de décoloration était répétée jusqu'à ce que les gels 2D soient transparents, permettant de visualiser les spots protéiques colorés en bleu.

Les images des gels 2D étaient acquises en scannant ceux-ci au moyen d'un densitomètre GS-800 (Bio-Rad). Les images obtenues étaient ensuite analysées grâce au logiciel Quantity one (Bio-Rad), puis au logiciel de traitement d'image PD-Quest (Bio-Rad).

### **5.7- Calcul du taux d'expression des protéines – sélection des protéines d'intérêt**

Le taux d'expression des protéines permet d'estimer l'intensité de la modification du protéome en réponse à la contamination métallique.

Le taux de sur – expression d'une protéine donnée a été calculé comme le rapport de l'intensité normalisée du spot correspondant, sur- exprimé en conditions contaminantes, sur l'intensité normalisée de ce même spot exprimé en conditions témoin.

Le taux de sous – expression d'une protéine donnée a été calculé comme le rapport de l'intensité normalisée du spot correspondant exprimé en conditions Témoin, sur l'intensité normalisée de ce spot sous - exprimé en conditions contaminantes. Il a été considéré que l'impact de la contamination métallique sur l'expression d'une protéine donnée, était d'autant plus important que le taux d'expression de cette protéine était élevé en valeur absolue.

Les protéines d'intérêt ont été sélectionnées sur la base du calcul de leur taux d'expression, considérant que ce taux devait être supérieur ou égal à 2, en valeur absolue, pour que la protéine considérée soit sélectionnée comme protéine sur – exprimée ou sous -exprimée en conditions contaminantes (Bae *et al.*, 2003).

*CHAPITRE III*

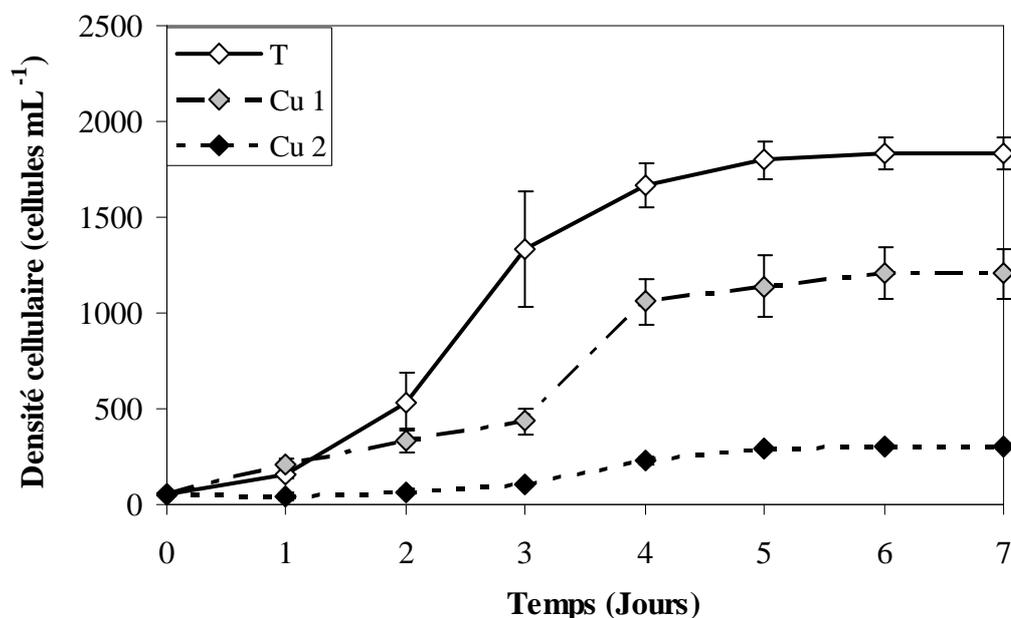
*RÉPONSE DE *Skeletonema costatum*  
À LA CONTAMINATION PAR LE  
CUIVRE : CROISSANCE, PIGMENTS  
ET EXSUDATION CARBONÉE*

# A- RESULTATS

## I. EFFET DU CUIVRE SUR *Skeletonema costatum*

### 1. Effet du cuivre sur la croissance

Après contamination par le cuivre, une diminution marquée de la croissance de *Skeletonema costatum* était observée (Figure 21). L'inhibition la plus prononcée était observée suite au traitement Cu 2 ( $1,10 \times 10^{-6}$  M). En fin d'incubation, les densités cellulaires dans les cultures témoins ( $1\ 840$  cellules  $\text{mL}^{-1}$ ) étaient supérieures de 1,5 à 5 fois à celles enregistrées suite aux traitements Cu 1 ( $2,02 \times 10^{-8}$  M) ( $1\ 205$  cellules  $\text{mL}^{-1}$ ) et Cu 2 ( $300$  cellules  $\text{mL}^{-1}$ ). L'effet toxique du cuivre sur la croissance de *Skeletonema costatum* se traduisait par un allongement de la phase de latence (T : 0,95 J, Cu 1 : 1,96 J, Cu 2 : 2,12 J). Durant la phase exponentielle, les cellules des cultures témoins ont rapidement proliféré, leur densité augmentant de 540 à  $1\ 840$  cellules  $\text{mL}^{-1}$ , alors que dans les cultures traitées par Cu 1, la densité cellulaire passait de 400 à  $1\ 205$  cellules  $\text{mL}^{-1}$ . Concernant les cultures traitées par Cu 2, leur densité en fin de phase exponentielle était faible ( $300$  cellules  $\text{mL}^{-1}$ ), ne représentant que 34% de la densité cellulaire des cultures témoins au même stade de croissance.



**Figure 21.** Cinétiques de croissance de *Skeletonema costatum* lors des traitements témoins (T), et contaminés par le cuivre  $2,02 \times 10^{-8}$  M (Cu 1) et  $1,10 \times 10^{-6}$  M (Cu 2) (Densité cellulaire moyenne  $\pm$  écart type, n = 3)

Les taux de croissance ( $\mu$ ) et de dédoublement (K) les plus élevés atteignaient dans les conditions témoins ( $\mu$  : 1,05 J<sup>-1</sup> ; K : 1,51 J<sup>-1</sup>), le double des valeurs enregistrées suite aux traitements Cu 1 ( $\mu$  : 0,51 J<sup>-1</sup> ; K : 0,73 J<sup>-1</sup>) et Cu 2 ( $\mu$  : 0,47 J<sup>-1</sup> ; K : 0,67 J<sup>-1</sup>) (Tableau V). En revanche, le temps de dédoublement (T) était plus long en présence de contamination (Cu 1 : 1,96 J, Cu 2 : 2,12 J) que dans les conditions témoins (T : 0,95 J) (Tableau V).

**Tableau V.** Taux de croissance ( $\mu$ ), taux de dédoublement (K) et temps de dédoublement (T), observés chez *Skeletonema costatum* en réponse aux traitements témoin (T), et contaminés par le cuivre  $2,02 \times 10^{-8}$  M (Cu 1) et  $1,10 \times 10^{-6}$  M (Cu 2). Chaque résultat est la moyenne de valeurs obtenues en triplicat

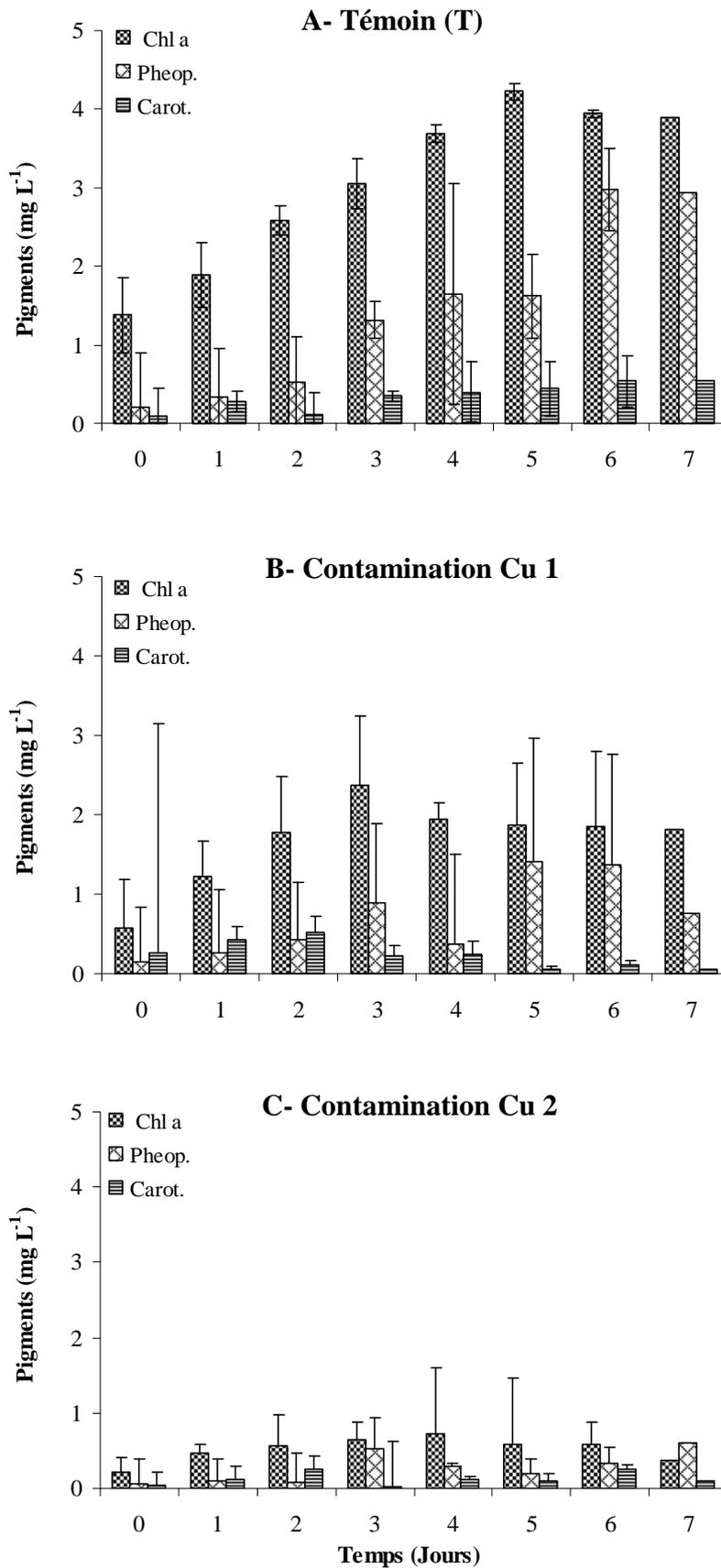
	Traitement T	Traitement Cu 1	Traitement Cu 2
$\mu$ (J <sup>-1</sup> )	1,05 ± 0,30	0,51 ± 0,43	0,47 ± 0,54
K (J <sup>-1</sup> )	1,51 ± 0,45	0,73 ± 0,23	0,67 ± 0,60
T (J)	0,95 ± 0,21	1,96 ± 0,76	2,12 ± 0,67

## 2. Effet du cuivre sur l'évolution des teneurs en pigments

Dans les cultures témoins, les concentrations en chlorophylle *a* (Chl *a*) ont montré une augmentation de 1,88 à 4,20 mg L<sup>-1</sup> au cours de la phase exponentielle de croissance de *Skeletonema costatum* (jusqu'au jour 5) (Figure 22A). Puis, les teneurs sont restées stables autour de 4 mg L<sup>-1</sup> jusqu'à la fin de la croissance. De même, les teneurs en caroténoïdes ont augmenté graduellement (jusqu'au jour 6), puis, elles se sont stabilisées autour de 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Concernant les phéopigments, leurs concentrations étaient beaucoup plus élevées en fin de croissance (3 mg L<sup>-1</sup>) qu'au début de celle-ci (0,4 mg L<sup>-1</sup>). L'accumulation des phéopigments en phase stationnaire suggère le stade ultime de dégradation cellulaire correspondant à la fin de croissance.

Dans les cultures contaminées par le cuivre  $2,02 \times 10^{-8}$  M (Cu 1), les concentrations en Chl *a* étaient significativement plus faibles ( $P < 0,05$ ) par rapport aux cultures témoins (Figure 22B). En effet, les teneurs maximales n'étaient que de 2,4 mg L<sup>-1</sup> durant la phase exponentielle. En fin de croissance, les concentrations étaient encore plus faibles (1,8 mg L<sup>-1</sup>). Les teneurs en caroténoïdes (entre 0,04 et 0,06 mg L<sup>-1</sup>) et en phéopigments (entre 0,2 et 1,4 mg L<sup>-1</sup>) étaient plus faibles que celles mesurées dans les conditions témoins ( $P < 0,05$ ).

Dans les cultures contaminées par le cuivre  $1,10 \times 10^{-6}$  M (Cu 2), les teneurs en Chl *a* montraient des valeurs plus faibles ( $P < 0,05$ ) par rapport aux autres traitements (T et Cu 1), avec des valeurs inférieures à  $0,7 \text{ mg L}^{-1}$  durant toute la croissance (Figure 22 C). De façon similaire, les teneurs en phéopigments ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) et en caroténoïdes ( $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) étaient significativement plus faibles ( $P < 0,05$ ) que les teneurs du témoin ( $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ ).

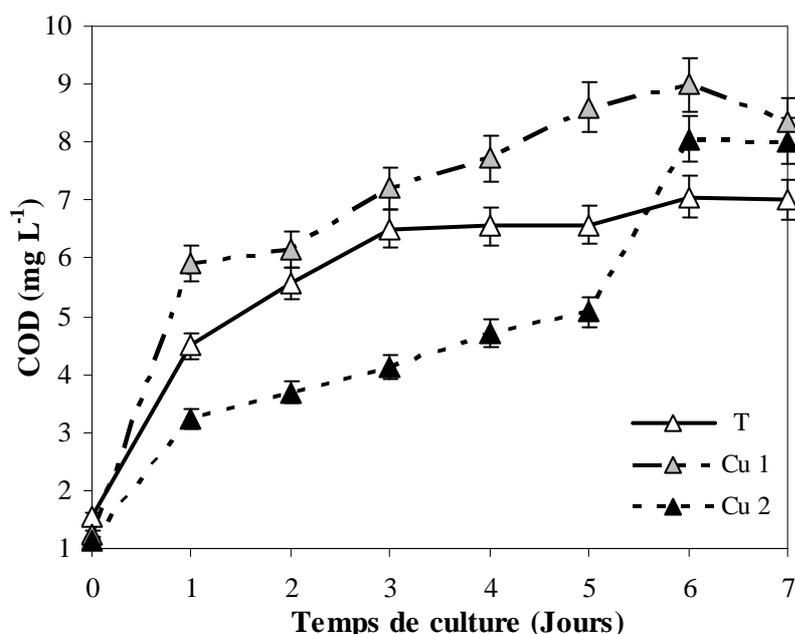


**Figure 22.** Evolution des concentrations en chlorophylle *a* (Chl *a*), phéopigments (Pheop.) et caroténoïdes (Carot.) au cours de la croissance de *Skeletonema costatum* dans les conditions témoins T (A), et contaminées Cu 1 (B) ( $2,02 \times 10^{-8}$  M) et Cu 2 (C) ( $1,10 \times 10^{-6}$  M) (Moyenne  $\pm$  écart-type, n = 3)

## II. EFFET DU CUIVRE SUR L'EXSUDATION DE BIOMOLÉCULES PAR *Skeletonema costatum*

### 1. Effet du cuivre sur le COD libéré au cours de la croissance de *Skeletonema costatum*

L'évolution des concentrations en COD libéré par *Skeletonema costatum* au cours de sa croissance, différait en fonction des traitements (T, Cu 1 et Cu 2) (Figure 23). Dans les conditions témoins, les concentrations en COD ont augmenté de 4,5 à 7,0 mg L<sup>-1</sup> pendant la phase exponentielle (jours 1 à 5). Ce résultat suggérait un lien étroit entre la libération du COD et la croissance de *Skeletonema costatum*, comme l'indique la Figure 23. En fin de croissance, une augmentation de la concentration en COD (7,1 mg L<sup>-1</sup>) a été observée, qui pourrait être liée à la lyse cellulaire.



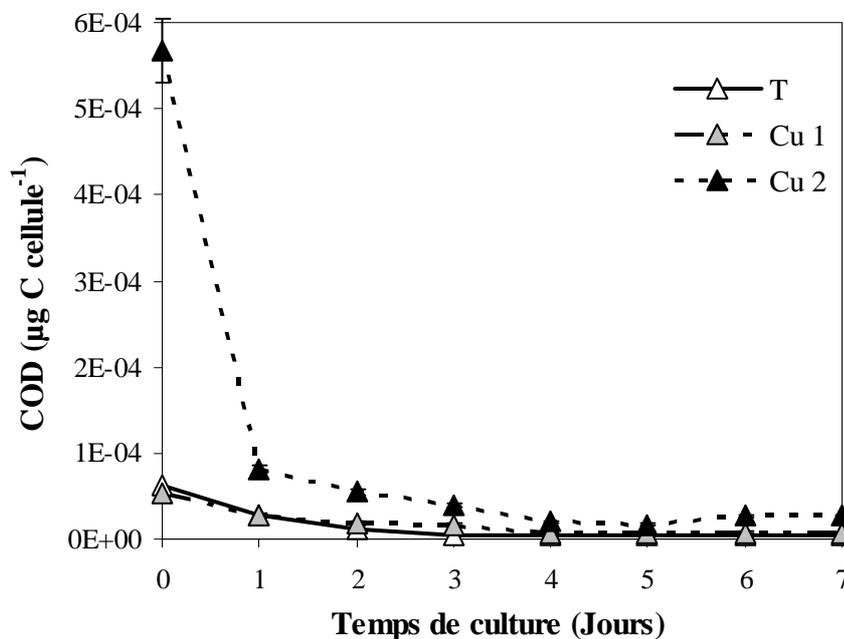
**Figure 23.** Evolution des concentrations en COD dans les conditions témoin (T) et contaminées Cu 1 ( $2,02 \times 10^{-8}$  M) et Cu 2 ( $1,10 \times 10^{-6}$  M) (Moyenne  $\pm$  écart type, n = 3)

Dans les cultures faiblement contaminées par le cuivre (Cu 1), le COD a montré une évolution similaire à celle des cultures témoins au cours de la croissance, suggérant une libération plus importante des molécules carbonées en cas de stress cuivrique (Figure 23). Néanmoins, les concentrations pour Cu 1 étaient plus élevées (de 5,9 à 9,0 mg L<sup>-1</sup>).

Dans les cultures fortement contaminées par le cuivre (Cu 2), la libération du COD pendant la phase exponentielle était beaucoup moins importante (3,2 – 4,7 mg L<sup>-1</sup>) ( $P < 0,05$ )

que pour les autres traitements (T et Cu 1) (Figure 23). Toutefois, au cours de la phase stationnaire (à partir du jour 5), l'exsudation du COD augmentait fortement passant de 5,1 à 8,1 mg L<sup>-1</sup>, pour être supérieure à celles du témoin.

La Figure 24 présente l'évolution des teneurs en COD exsudé par cellule (COD/Cellule) au cours des différents traitements. Les valeurs les plus élevées ont été observées en tout début de croissance, puis ont diminué de manière drastique jusqu'à la fin du cycle vital. Ceci suggère que les cellules produisaient beaucoup plus de COD pendant leur croissance, puis la cinétique de libération du COD ralentissait considérablement. On remarque des rapports COD/Cellule particulièrement élevés en réponse à la plus forte contamination par le cuivre (Cu 2).



**Figure 24.** Evolution du rapport COD/Cellule au cours de la croissance de *Skeletonema costatum* en conditions témoins (T) et contaminées Cu 1 ( $2,02 \times 10^{-8}$  M) et Cu 2 ( $1,10 \times 10^{-6}$  M) (Moyenne  $\pm$  écart type, n = 3)

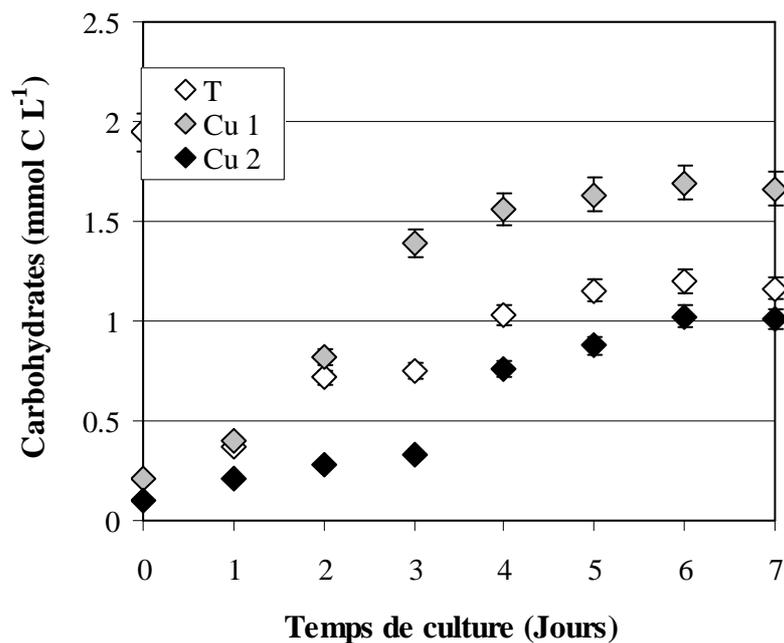
## **2. Effet du cuivre sur les carbohydrates libérés au cours de la croissance de *Skeletonema costatum***

La libération des carbohydrates dans les cultures témoins montrait des variations similaires à celles observées pour les cinétiques de croissance (Figure 25). Le maximum de concentration ( $1,2 \text{ mmol C L}^{-1}$ ) est observé pendant la phase stationnaire de la croissance.

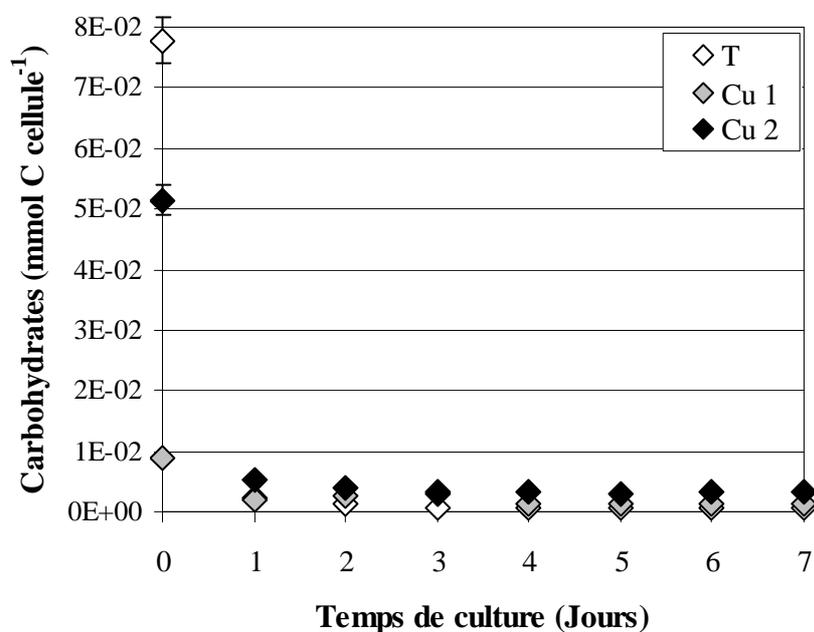
Les teneurs en carbohydrates dans les cultures faiblement contaminées par le cuivre (Cu 1), sont largement supérieures à celles du témoin, à partir du 3<sup>ème</sup> jour. Ces teneurs ont atteint un maximum ( $1,7 \text{ mmol C L}^{-1}$ ) durant la phase stationnaire, comme cela était observé dans les conditions témoins.

En présence de la plus forte contamination (Cu 2), les teneurs en carbohydrates ont évolué de façon identique que dans les conditions témoins (Figure 25). Néanmoins, la libération des carbohydrates était moins importante que dans les conditions témoins.

Pendant les trois premiers jours de croissance, le rapport Carbohydrates / cellule a montré une diminution dans les traitements témoins (de  $2 \times 10^{-3}$  à  $5 \times 10^{-4} \text{ mmol C cellule}^{-1}$ ) et Cu 2 (de  $5 \times 10^{-3}$  à  $3 \times 10^{-3} \text{ mmol C cellule}^{-1}$ ) (Figure 26), mais les valeurs étaient beaucoup plus élevées dans le traitement fortement contaminé. Dans les conditions Cu 1 et Cu 2, comme cela était observé pour le rapport COD/Cellule, les valeurs maximales étaient enregistrées en tout début de croissance. En présence d'une plus faible contamination Cu 1, ce rapport a augmenté jusqu'au jour 3 (de  $2 \times 10^{-3}$  à  $3 \times 10^{-3} \text{ mmol C cellule}^{-1}$ ), puis il a chuté, atteignant des valeurs proches de celles du témoin (autour de  $1 \times 10^{-3} \text{ mmol C cellule}^{-1}$ ).



**Figure 25.** Evolution des concentrations en carbohydrates au cours de la croissance de *Skeletonema costatum* en conditions témoins T et contaminées par le cuivre Cu 1 ( $2,02 \times 10^{-8}$  M) et Cu 2 ( $1,10 \times 10^{-6}$  M) (Moyenne  $\pm$  écart type, n = 3)



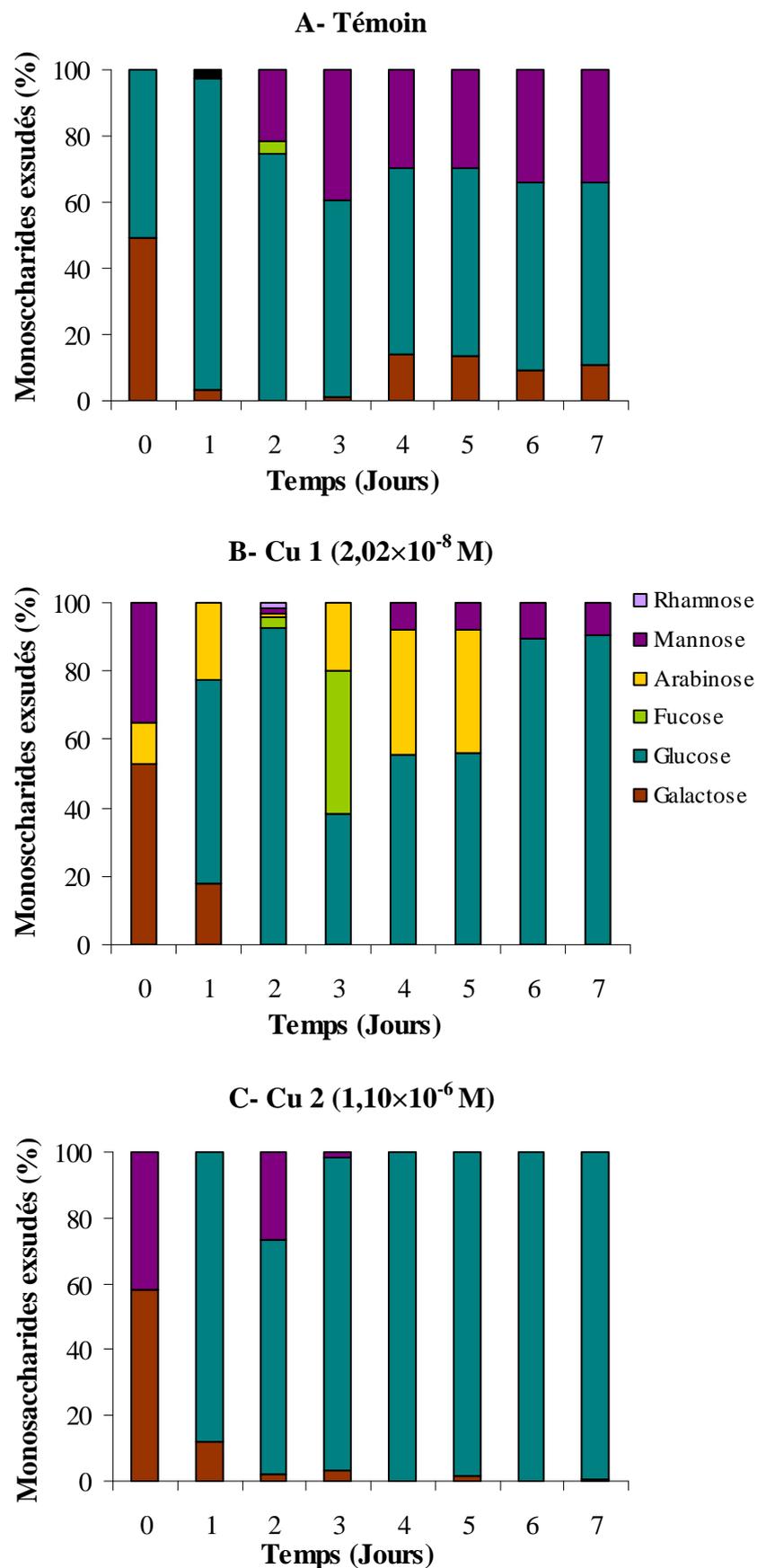
**Figure 26.** Evolution du rapport Carbohydrates / cellule dans les cultures de *Skeletonema costatum* en conditions témoins (T) et contaminées par le cuivre Cu 1 ( $2,02 \times 10^{-8}$  M) et Cu 2 ( $1,10 \times 10^{-6}$  M) (Moyenne  $\pm$  écart type, n = 3)

### **3. Effet du cuivre sur la composition des exsudats polysaccharidiques (EPS) libérés au cours de la croissance de *Skeletonema costatum***

L'analyse chromatographique des EPS exsudés a révélé des compositions en monosucres très différentes en fonction des traitements (Figure 27). Dans les cultures témoins, le glucose a été le monosaccharide le plus exsudé, puisqu'il a formé de 54 à 93% des monosucres totaux libérés pendant la période de croissance (Figure 27A). Le mannose et le galactose étaient respectivement les deuxième et troisième principaux monosaccharides libérés durant la croissance, contribuant entre 14 et 49% aux monosucres totaux. D'autres monosucres, comme le fucose et l'arabinose, ont également été produits, mais leurs contributions étaient nettement plus faibles.

En réponse à la contamination par Cu 1, les EPS exsudés étaient aussi majoritairement constitués de glucose (38 – 92%) et de galactose (17 – 52%) (Figure 27B). Pendant la phase stationnaire de croissance de *Skeletonema costatum* (jours 2, 3 et 6), le glucose a même contribué, à lui seul, à 80% des EPS libérés. Cependant, l'arabinose exsudé (12 – 36%) était plus abondant qu'en conditions témoins, surtout pendant les 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jours de croissance.

Dans les cultures contaminées par Cu 2, les cellules ont principalement produit des EPS à base de glucose (70 – 98%), durant presque toute la croissance, à un taux beaucoup important qu'en conditions témoins (Figure 27C). Le galactose (18%) et le mannose (49%) ont été exsudés seulement durant les premiers jours de croissance.



**Figure 27.** Composition en monosucres des polysaccharides exsudés pendant la croissance de *Skeletonema costatum* soumise aux conditions témoins (A) et contaminées (B et C)

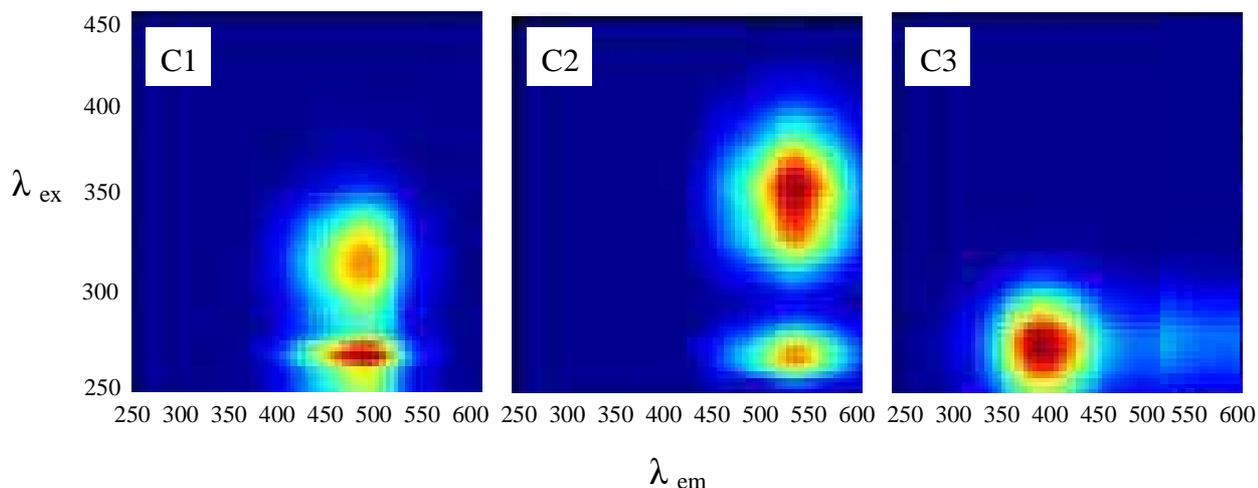
#### **4. Molécules fluorescentes libérées au cours de la croissance de *Skeletonema costatum***

Les analyses par spectroscopie de fluorescence 3D ont permis d'obtenir des spectres de fluorescence entre 250 – 600 nm d'émission, et 250 – 450 nm d'excitation tout au long de la croissance de *Skeletonema costatum*. Ces spectres sont traités par PARAFAC, afin d'extraire les composants fluorescents indépendants, présents dans la matière organique. Les résultats obtenus montrent que de nombreuses molécules, ayant des propriétés chimiques différentes, étaient libérées dans les cultures de *Skeletonema costatum*. Parmi ces molécules, la présence d'acides aminés (tyrosine, phénylalanine, tryptophane), ou d'acides humiques et fulviques était particulièrement remarquée. Suite au traitement PARAFAC, trois composantes ont été distinguées (Figure 28).

La composante C1 est définie par une réponse dans les domaines suivants :  $\lambda_{em}$  : 450 - 525 nm et  $\lambda_{ex}$  : 275 / 325 nm. Ces derniers sont reliés à la matière organique fulvique et humique (Coble, 1996). Cette matière organique pourrait provenir de la lyse des cellules mortes de *Skeletonema costatum*, en fin de phase stationnaire de la culture.

La composante C2 est définie par une réponse dans les domaines suivants :  $\lambda_{em}$  : 500 - 575 nm et  $\lambda_{ex}$  : 250 – 350 nm. Ces derniers correspondraient également à des substances humiques et fulviques nettement plus aromatiques et conjugués.

La composante C3 est définie par une réponse dans les domaines suivants :  $\lambda_{em}$  : 350 - 420 nm et  $\lambda_{ex}$  : 250 – 300 nm. Ces derniers étaient par contre typiquement d'origine protéique. Dans cette composante, un seul fluorophore protéique apparaissait, proche de la réponse du tryptophane.



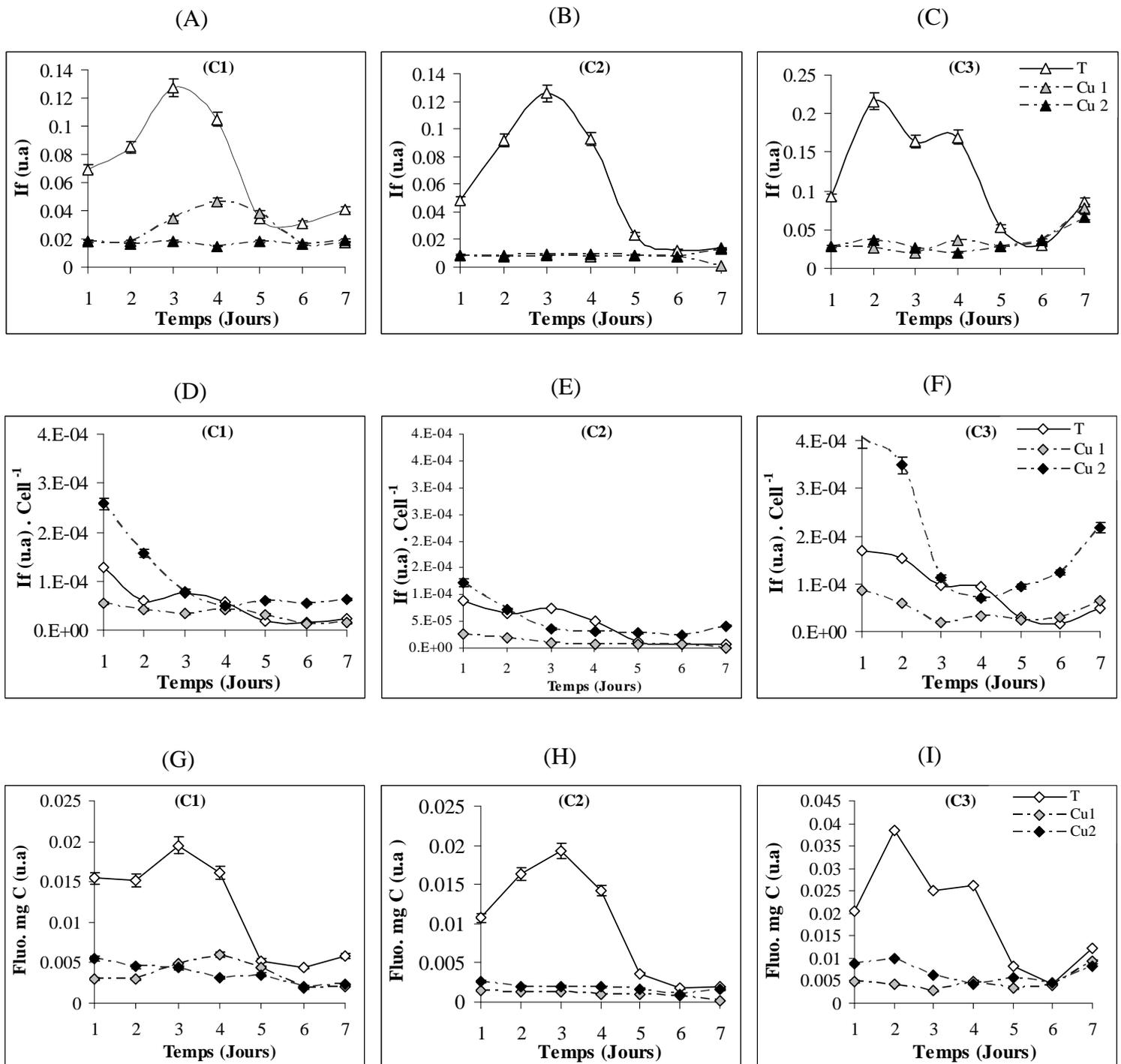
**Figure 28.** Contribution des trois composantes fluorescentes C1, C2 et C3, caractérisant la matière organique exsudée dans les cultures témoins et contaminées Cu 1 et Cu 2. En abscisse, sont représentées les longueurs d'onde d'émission ( $\lambda_{em}$ ), et en ordonnées, les longueurs d'onde d'excitation ( $\lambda_{ex}$ )

La Figure 29 montre l'évolution temporelle de l'intensité de fluorescence des composantes C1, C2 et C3, au cours de la croissance de *Skeletonema costatum* en conditions témoins et contaminées. La contribution de la fluorescence a été plus élevée dans les cultures témoin que dans les cultures soumises à la contamination cuivrique (Figure 29A, B et C). De plus, l'évolution temporelle de la contribution de la fluorescence de chaque composante (C1, C2 et C3) a été différente de celle de la contribution spécifique exprimée soit en intensité de fluorescence par cellule, soit en intensité de fluorescence par carbone (Figure 29D, E, F, G, H et I).

Ainsi, dans les cultures contaminées par Cu 1, une contribution modérée de la composante C1 a été observée lors de la phase exponentielle. Ceci n'a pas été observé pour la contribution spécifique par cellule (Figure 29D), mais a été décelé pour la contribution spécifique par carbone (Figure 29G). Cela pourrait signifier que le matériel fluorescent ne proviendrait pas des cellules elles-mêmes (par de proportionnalité), mais plutôt de l'excrétion par les cellules de carbone plus fluorescent.

Dans les cultures contaminées par Cu 2, la contribution des composantes C1 et C3 restait faible par rapport aux traitements témoins et Cu 1. Nous pouvons également observer une décroissance exponentielle au niveau de la contribution spécifique par cellule, signifiant que la production de molécules fluorescentes est contrôlée par la densité cellulaire, elle-même contrôlée par les teneurs en  $\text{Cu}^{2+}$  dans le milieu de culture. De plus, la contribution spécifique par cellule de la composante C3 a été importante en début et en fin de croissance de

*Skeletonema costatum*, et correspondait au domaine protéique (Figure 29 F et I). Son évolution temporelle montrait une augmentation en fin de croissance (jour 7), quelles que soient les conditions, qui pourraient résulter d'une forte sénescence cellulaire.



**Figure 29.** Evolution temporelle de l'intensité de fluorescence (If en u.a : unité arbitraire) (A, B et C), de l'intensité de fluorescence par cellule (D, E et F) et de l'intensité de fluorescence par mg de C (G, H et I), des trois composantes fluorescentes (C1, C2 et C3) détectées dans la matière organique exsudée en réponse aux différents traitements (T, Cu 1 et Cu 2)

### III. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES DES DIFFÉRENTES VARIABLES ESTIMÉES DANS LES TROIS TRAITEMENTS

Les résultats précédemment obtenus ont montré que la croissance de *Skeletonema costatum*, et sa libération de molécules extracellulaires, dépendaient fortement de la concentration en métal et de la phase de croissance. Afin de mieux déterminer les paramètres responsables des variations qualitatives et quantitatives des molécules exsudées, une ACP a été réalisée. Les variables considérées dans cette ACP sont reportées dans le Tableau VI.

**Tableau VI.** Variables considérées pour le traitement ACP

<b>Variables</b>	<b>Symboles ACP</b>
Abondance phytoplanctonique	Abon.
Chlorophylle <i>a</i>	Chl <i>a</i>
Phéopigments	Phéop.
Caroténoïdes	Carot.
Carbohydrates	Carboh.
Carbone organique dissous	COD
Glucose	Glu
Galactose	Gal
Mannose	Man
Composant 1	C1
Composant 2	C2
Composant 3	C3
Concentration	CC
COD/Cellule	COD/Cell
Carbohydrate/Cellule	Carboh/Cell

## 1. Projection des variables

Les deux premiers axes F1 et F2 totalisaient respectivement 48,9% et 19,3% de la variance, soit un pourcentage cumulé de 68,24%. Ce résultat peut être considéré comme satisfaisant étant donné le nombre de variables traitées (Tableau VII).

**Tableau VII.** Variables considérées avec leurs coordonnées (COOR) et leurs contributions relatives (CTR) sur les axes factoriels F1 et F2

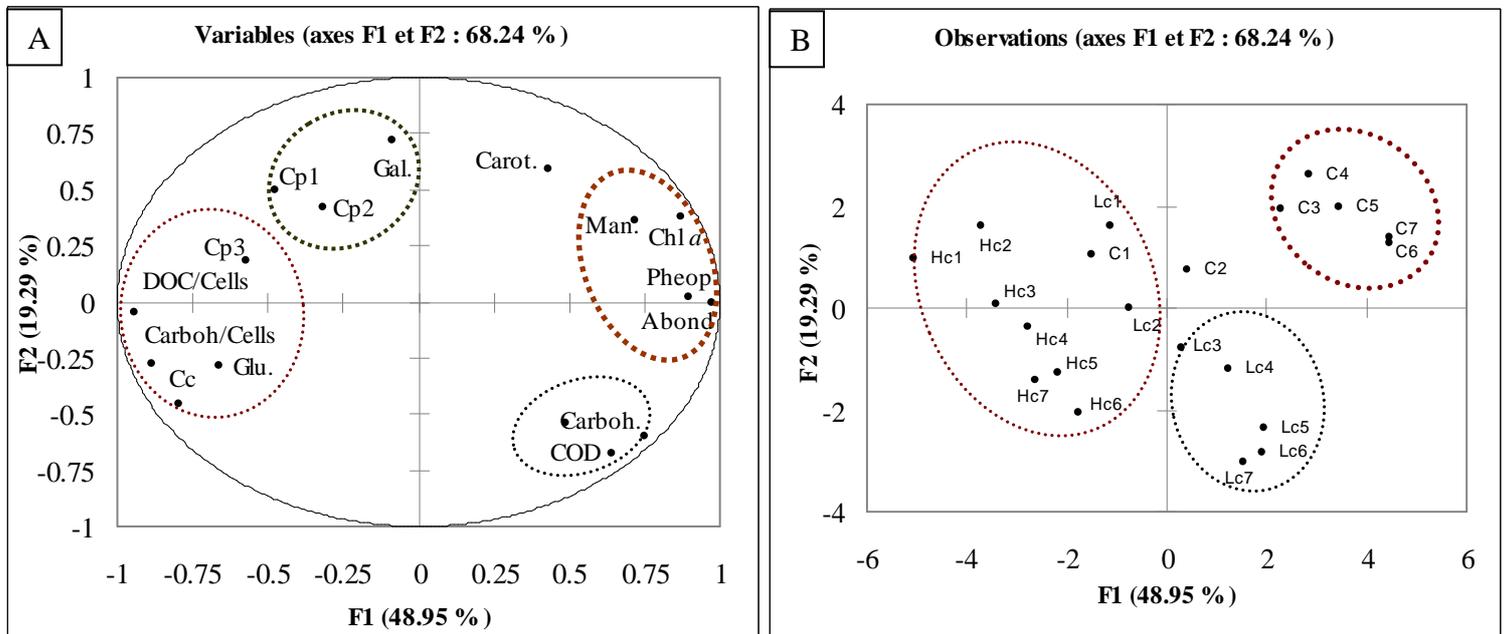
Variables	Pourcentage de la variance expliquée par chacun des axes de l'ACP		Axe F1 (48,95%)		Axe F2 (19,29%)	
	COOR F1	CTR F1	COOR F2	CTR F2		
Abon.	0,97	12,04	-0,00	0,01		
Chl <i>a</i>	0,87	9,78	0,37	4,65		
Phéop.	0,89	10,27	0,01	0,01		
Carot.	0,43	2,38	0,59	11,35		
Carboh.	0,47	7,14	-0,60	11,69		
COD	0,64	5,23	-0,67	14,90		
Glu	-0,66	5,56	-0,28	2,58		
Gal	-0,08	0,09	0,72	16,92		
Man	0,01	6,65	0,35	4,17		
C1	-0,04	2,90	0,49	8,02		
C2	-0,31	1,28	0,42	5,73		
C3	-0,97	4,15	0,18	1,13		
CC	-0,79	8,12	0,45	6,69		
DOC/Cell	-0,94	11,41	-0,04	0,06		
Carboh/Cell	-0,98	9,96	-0,27	2,44		

### 1.1- Projection sur l'axe F1

Le maximum de variables se projetait sur ce premier axe, extrayant plus d'inertie (48,95%). A son pôle positif, les variables ayant une influence directe en présence de cuivre étaient présentes. Parmi elles, se trouvait l'abondance cellulaire (CTR = 12,04), la Chl *a* (CTR = 9,78) et les phéopigments (CTR = 10,27). Il est à noter que, sur cet axe, du côté positif de celui-ci, se projetaient les faibles concentrations en cuivre (cultures témoin), et de côté négatif, les fortes concentrations, représentant les cultures contaminées par Cu 2. Le pôle négatif était défini par COD/Cell (CTR = 11,41), Carboh/Cell (CTR = 9,96), glucose (CTR = 5,56) et la composante fluorescente C3 (CTR = 4,15) (Tableau VII, Figure 30).

### 1.2- Projection sur l'axe F2

Cet axe, extrayant 19,29% de la variance totale, est défini positivement par le galactose (CTR = 16,92), les composantes fluorescentes C1 (CTR = 8,02), C2 (CTR = 7,73), et les caroténoïdes (CTR = 11,35). Sur son pôle négatif, étaient présents le COD (CTR = 14,90) et les carbohydrates (CTR = 11,96). Il est à noter que, sur cet axe, se projetait les faibles concentrations en cuivre, représentant les cultures contaminées par Cu 1.



**Figure 30.** Projection des variables considérées (A) et concentrations relatives (B), sur les axes F1 (en traits discontinus rouges) et F2 (en traits discontinus verts), H, L et C correspondant respectivement aux concentrations Cu1, Cu 2 et au témoin, l'indice correspondant au jour de culture)

## B- DISCUSSION

### I. EFFET DU STRESS MÉTALLIQUE SUR LA CROISSANCE ET LES TENEURS EN PIGMENTS DE *Skeletonema costatum*

Les résultats relatifs à la croissance de *Skeletonema costatum* ont montré une variabilité importante de l'évolution des densités cellulaires en fonction de la contamination en cuivre. Dans les cultures témoin, la densité cellulaire atteinte en phase exponentielle ( $1,8 \times 10^6$  cellules  $L^{-1}$ ) était significativement supérieure à celle observée dans les cultures contaminées par Cu 1 ( $1,2 \times 10^6$  cellules  $L^{-1}$ ) et par Cu 2 ( $300 \times 10^3$  cellules  $L^{-1}$ ) (Figure 21). Le taux de croissance cellulaire ( $\mu$ ) observé dans les cultures témoins ( $1,05 J^{-1}$ ) a diminué de moitié après contamination par Cu 1 ( $0,51 J^{-1}$ ) et par Cu 2 ( $0,47 J^{-1}$ ) (Tableau V). En comparant les cinétiques de croissance de *Skeletonema costatum* suite aux différents traitements (T, Cu 1 et Cu 2), il apparaît que le cuivre induisait une prolongation de la phase d'adaptation pour les traitements Cu 1 et Cu 2. La phase exponentielle apparaissait plus tardivement, et était moins importante en termes de densité cellulaire que dans les conditions témoins (Figure 21). Cela suggère que les cellules se divisent lentement en réponse à la contamination. Le même résultat a été rapporté dans d'autres travaux sur *Skeletonema costatum* (Rueter *et al.*, 1978; Anderson *et al.*, 1978). Ces travaux soulignaient que la durée de la phase de latence était fonction de la concentration en cuivre. Toutefois, ils ont montré que la croissance de *Skeletonema costatum* était non seulement influencée par la concentration en cuivre, mais également par la concentration en silicates dans le milieu de culture, laquelle pourrait jouer un rôle vis-à-vis de la toxicité du cuivre puisque les silicates peuvent fixer le cuivre en formant des silicates de cuivre. D'autres études utilisant l'EDTA comme agent chélatant pour le cuivre, ont conclu que le cuivre avait moins d'effet sur la croissance de cette espèce (Mandelli, 1969; Khan et Saifullah, 1989). Dans l'étude ici présentée, la concentration de cuivre inhibitrice de la croissance ( $2,02 \times 10^{-8}$  M) était légèrement supérieure à celle obtenue par Mandelli (1969) et Khan et Saifullah (1986). De façon similaire, Jensen *et al.* (1976) ont montré une tolérance de cette espèce aux faibles teneurs en cuivre ( $1,6 \times 10^{-7}$  M). Le niveau de cuivre mentionné par ces auteurs était proche de la concentration utilisée dans le milieu témoin de cette étude ( $3 \times 10^{-8}$  M). Par ailleurs, Berland *et al.* (1977) ont mis en évidence une forte tolérance de cette espèce vis-à-vis du cuivre (inhibition à  $1,6 \times 10^{-6}$  M). Toutefois, Morel *et al.* (1978) ont conclu que le niveau d'inhibition était de  $6 \times 10^{-6}$  M Cu, en présence de  $5 \times 10^{-6}$  M d'EDTA. En revanche, dans la présente étude, l'inhibition de croissance était obtenue à  $2,02 \times 10^{-8}$  M, en

présence de  $10 \times 10^{-6}$  M d'EDTA. Concernant la forte réduction de croissance obtenue dans les cultures contaminées par Cu 2, il est probable que celle-ci soit liée à l'augmentation des teneurs en cuivre libre dans le milieu de culture, d'une part, et à la diminution de la biodisponibilité des éléments nutritifs assimilés par les microalgues, d'autre part.

L'effet toxique du cuivre, qui s'est traduit par une diminution de la croissance dans les cultures contaminées par Cu 1 et Cu 2, pourrait aussi s'expliquer par les concentrations métalliques utilisées dans cette étude ( $2,02 \times 10^{-8}$  et  $1,10 \times 10^{-6}$  M), lesquelles dépassaient la capacité de complexation de l'EDTA en présence de cations majeurs compétiteurs ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ...) malgré une concentration d'une concentration de  $10 \times 10^{-6}$  M d'EDTA. Dans les cultures contaminées par Cu 2, les précipités formés dans le milieu pourraient en effet constituer des associations avec les cellules phytoplanctoniques. Cette observation a également été relevée par Rueter *et al.* (1978) à propos de la même espèce. Dans d'autres travaux, il a été montré que la toxicité du cuivre était liée à la concentration en cuivre libre (Anderson *et al.*, 1978; Sunda *et al.*, 1976).

Lorsque le cuivre est présent en faibles concentrations dans un milieu, il peut facilement s'associer à l'EDTA, et ainsi ne plus manifester d'effet toxique sur la croissance de l'espèce. Cette hypothèse était vérifiée dans la présente étude, au niveau des cultures témoins, qui montraient une densité cellulaire importante ( $1,8 \times 10^6$  cellules  $\text{L}^{-1}$ ) et un taux de division élevé ( $1,05 \text{ J}^{-1}$ ), supérieurs à ceux observés en réponse aux autres traitements (Cu 1 et Cu 2) (Tableau V, Figure 21). De la même façon, concernant les cultures témoins et faiblement contaminées par le cuivre, les courbes de croissance étaient caractérisées par une courte phase d'adaptation, suivie d'une phase exponentielle commençant à partir du deuxième jour. Ce résultat confirmait que le cuivre, à ce seuil de toxicité, ne constituait pas un facteur de stress pour les cellules. Le cuivre est alors utilisé par ces microorganismes comme un oligo-élément indispensable à leur métabolisme, puisqu'il est un constituant essentiel de certaines enzymes fonctionnelles, comme les plastocyanines (Raven *et al.*, 1999) ou encore les oxydases (Kieffer, 1991).

En comparant l'évolution des teneurs en pigments (Chl *a*, phéopigments et caroténoïdes) au cours de la croissance de *Skeletonema costatum*, il apparaît que l'espèce produisait ces substances à des concentrations variables, en fonction du degré de contamination en cuivre (Figure 22). En conditions témoins, les teneurs en Chl *a* et en phéopigments ont évolué avec une tendance similaire à celle observée pour les cinétiques de croissance, et étaient nettement plus élevées par rapport aux teneurs mesurées en réponse aux traitements Cu 1 et Cu 2. Ces fortes concentrations en pigments pouvaient alors s'expliquer par une activité cellulaire

intense dans les cultures témoin, due aux faibles teneurs en cuivre ( $3 \times 10^{-8}$  M), et à la présence d'EDTA dans le milieu de culture, lequel jouait le rôle de chélateur. En revanche, dans les cultures contaminées par Cu 1, une augmentation modérée des teneurs en Chl *a* était observée en début de croissance, suivie d'une production stable de ce pigment jusqu'en fin de croissance. Cette tendance n'était donc pas similaire à celle observée pour les cinétiques, puisque beaucoup plus de pigments chlorophylliens devraient être produits pendant la phase exponentielle. Etant donné les faibles densités cellulaires en début de croissance, les concentrations plus élevées en Chl *a* alors observées ne peuvent être expliquées par les besoins énergétiques des cellules pour l'absorption et la réduction des éléments nutritifs comme les nitrates. Il est également à noter que, les teneurs plus élevées en phéopigments produits en fin de croissance résultaient vraisemblablement d'une intense dégradation chlorophyllienne. Le même résultat a été mentionné dans des études antérieures réalisées sur la même espèce, montrant une dégradation chlorophyllienne plus importante chez *Skeletonema costatum* que chez d'autres espèces, suggérant une forte activité de l'enzyme chlorophyllase chez cette diatomée (Jeffrey *et al.*, 1987).

Au cours de notre étude, les résultats d'ACP ont confirmé la sensibilité de *Skeletonema costatum* au cuivre (Figure 30). Il existe en effet une corrélation négative ( $P < 0,05$ ) entre les teneurs en pigments (Chl *a*, phéopigments et l'abondance) et les fortes concentrations en cuivre d'une part, et une corrélation positive ( $P > 0,05$ ) entre l'abondance cellulaire et les faibles concentrations en cuivre, d'autre part. Ces corrélations suggèrent que la croissance cellulaire et la production des pigments chlorophylliens étaient affectées par le cuivre. De la même manière, certains auteurs ont mis en évidence les effets drastiques du cuivre sur la croissance de *Skeletonema costatum*, se traduisant par la diminution du taux de croissance et par une augmentation de la taille des cellules (Berland *et al.*, 1977). Toutefois, *Skeletonema costatum* est considérée comme une espèce résistante au stress métallique par rapport à d'autres espèces de diatomées et de dinoflagellés, comme en témoigne sa présence dans les milieux contaminés par les métaux traces (Pistocchi *et al.*, 1997).

## II. EFFET DU STRESS MÉTALLIQUE SUR L'EXSUDATION DE BIOMOLÉCULES PAR *Skeletonema costatum*

Dans les conditions témoins, les concentrations en COD ont progressivement augmenté pendant la première phase de croissance, puis se sont stabilisées en fin de croissance. Cette tendance était similaire à celle des cinétiques de croissance (Figure 23). En outre, une corrélation positive ( $P < 0,05$ ) a été observée entre l'évolution des teneurs en COD et la densité cellulaire (Figure 30). Cette corrélation suggère que le COD pourrait être libéré par les cellules vivantes en conditions normales d'une part, mais aussi par les cellules mortes, d'autre part. En revanche, en présence d'une plus faible contamination (Cu 1), l'évolution des teneurs en COD a montré une allure semblable à celle observée en conditions témoins, avec une production légèrement plus importante de COD entre les phases exponentielle et stationnaire de la croissance (Figure 23). Ceci suggère qu'en réponse à la contamination Cu 1 ( $2,02 \times 10^{-8}$  M), *Skeletonema costatum* pourrait augmenter son exsudation de COD. En présence d'une contamination plus importante Cu 2 ( $1,10 \times 10^{-6}$  M), les teneurs en COD exsudé par *Skeletonema costatum* étaient moins importantes que celles mesurées dans les conditions témoins et Cu 1. Etant donné la faible densité cellulaire dans les cultures contaminées par Cu 2, le COD qui y est mesuré pourrait donc ne pas seulement résulter de l'exsudation cellulaire (Figure 23). Ce COD pourrait aussi résulter de la forte dégradation cellulaire que provoque la toxicité du cuivre libre dans le milieu, lequel est alors présent à des concentrations de l'ordre de  $10^{-8}$  M.

Comme indiqué en Figure 24, la différence de production du COD entre les cultures témoins et les cultures contaminées est d'autant plus remarquable lorsque les concentrations en carbone sont rapportées au nombre de cellules. De plus, la diminution du rapport COD/Cellule pendant la phase exponentielle, suggère une faible libération de molécules dans le milieu. La stabilisation de ce rapport en fin de croissance, dans les cultures témoin et Cu 1, pourrait correspondre à la diminution et à la stabilisation de la biomasse cellulaire dans le milieu. Dans les cultures Cu 2, ce rapport a présenté une évolution peu différente en fin de croissance, correspondant à une légère augmentation du rapport COD/Cellule. Ceci pourrait être expliqué par une forte dégradation cellulaire, contribuant à une augmentation du COD dans le milieu. Il est également à noter que les fortes concentrations en cuivre étaient positivement corrélées ( $P < 0,05$ ) au rapport COD/Cellule, au rapport Carbohydrates/cellule, au glucose et à la composante fluorescente C3 (Figure 30). Une telle corrélation traduit une réponse intense et synergique des produits d'exsudation, principalement EPS et protéines, par

*Skeletonema costatum*, vis-à-vis du stress cuivrique. Puddu *et al.* (2003) ont étudié les mécanismes de libération des exsudats cellulaires et ont révélé que les substances libérées étaient résistantes à la dégradation bactérienne. Selon ces auteurs, cette résistance semble être un facteur nécessaire pour préserver la stabilité du complexe ligand-métal, ce qui conduirait à expliquer l'adaptabilité des cellules face au stress métallique.

La concentration en carbohydrates dans les cultures de *Skeletonema costatum* montrait une variabilité en fonction de la phase de croissance et de la contamination en cuivre (Figure 25). Dans les conditions témoins, une production exponentielle de carbohydrates était observée pendant la première phase de croissance, suivie par une exsudation constante durant la phase stationnaire. La même tendance a été observée en présence d'une plus faible contamination (Cu 1), bien que les concentrations en carbohydrates aient été plus fortes. Comme cela a été suggéré pour le COD, la forte libération de carbohydrates pourrait être une réaction stimulée par l'excès de cuivre dans le milieu de culture. Néanmoins, en réponse à une plus forte contamination Cu 2, une concentration de carbohydrates assez importante a été mesurée durant la deuxième phase de croissance, mais celle-ci était relativement faible par rapport à celles mesurées dans les cultures témoins et contaminées par Cu 1 (Figure 25). Cette concentration en carbohydrates pourrait provenir des cellules vivantes dont l'exsudation a été stimulée par la forte teneur en cuivre total ( $1,10 \times 10^{-6}$  M), plus particulièrement par sa forme libre ( $\text{Cu}^{2+} = 10^{-8}$  M). En examinant l'évolution du rapport Carbohydrates/cellule, une allure décroissante de ce rapport a été observée pour les cultures témoins et Cu 2 (Figure 26). En revanche, une différence a été observée par rapport aux cultures Cu 1, lesquelles montraient un pic de concentration en carbohydrates en fin de phase exponentielle. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans d'autres travaux portant sur la libération des carbohydrates extracellulaires (Myklestad, 1995; Pistocchi *et al.*, 1997). La libération de ces biomolécules dans le milieu pourrait jouer un rôle crucial dans la spéciation des métaux, du fait des interactions entre leurs charges négatives et les cations métalliques (Vasconcelos *et al.*, 2002; Gonzalez-Davila, 1995).

La composition en monosaccharides dans les EPS exsudés a varié en fonction de la concentration en cuivre et de la phase de croissance (Figure 20). Ainsi, pour les cultures témoins, les cellules ont libéré plus de glucose, de galactose et de mannose, dans des proportions différentes (Figure 27). Toutefois, soumises à de faibles teneurs en cuivre (Cu 1), elles produisaient en plus de l'arabinose et du fucose. De façon similaire, en présence d'une plus forte contamination en cuivre (Cu 2), les cellules produisaient majoritairement du glucose.

### **III. EXSUDATION DES MOLÉCULES FLUORESCENTES PAR *Skeletonema costatum* SOUS LE STRESS MÉTALLIQUE**

L'application de la technique de fluorescence 3D dans le présent travail nous a permis de mettre en évidence l'apparition de molécules fluorescentes à des moments précis du processus de croissance de *Skeletonema costatum*. Le traitement PARAFAC effectué sur les différents échantillons a permis de détecter trois composantes. La troisième composante (C3) correspondrait à des substances protéiques (Figure 28). Les deux autres composantes (C1 et C2) correspondraient à des acides humiques et fulviques. Ces composés organiques sont naturellement présents dans l'eau de mer (Ishii et Boyer, 2012). Les microorganismes libèrent des substances organiques et leur capacité à libérer des molécules extracellulaires a été étudiée par plusieurs auteurs (Fogg et Westlake, 1955 ; Strmečki *et al.*, 2010). Les exsudats phytoplanctoniques peuvent avoir des propriétés de complexation avec le cuivre, et ainsi jouer un rôle important dans la spéciation de ce métal (González-Dávila, 1995; Vasconcelos *et al.*, 2002). Ceci pourrait être le cas dans les cultures faiblement contaminées (Cu 1) puisque la contribution de la composante C1 a augmenté pendant la phase exponentielle, traduisant l'exsudation de molécules qui complexent le cuivre (Figure 29). La composante C3 a montré une légère augmentation en fin de croissance, correspondant à une production cellulaire de protéines (Figure 29). L'absence de contribution des composantes C1 et C2 pourrait être attribuée au quenching du cuivre, excepté pour la composante C1, pendant la phase exponentielle.

Pour les cultures contaminées, le mécanisme de défense utilisé par *Skeletonema costatum* pourrait être une exsudation de composés complexant le cuivre. Ainsi, les composantes C2 et C3 n'étaient pas affectées par le cuivre (Figure 29), ce qui pourrait résulter de la complexation entre les composés à l'origine de ces composantes et le cuivre. Les mesures de fluorescence caractérisent deux types de composés : le premier composé C1, lié au COD libre directement exsudé par le phytoplancton ; le second composé C2, est du matériel réfractaire humique probablement produit *in situ*, en tant que sous-produit de la dégradation bactérienne de la matière phytogène (Ishii et Boyer, 2012). La présence de la composante C1, indique l'excrétion de protéines dissoutes durant la phase exponentielle.

## C- CONCLUSION

Nos travaux montrent que la croissance de *Skeletonema costatum* est affectée en réponse au stress cuivrique. Une augmentation de la concentration en matière organique exsudée (COD, carbohydrates, molécules fluorescentes et polysaccharides) a été observée dans le milieu de culture. La diatomée *Skeletonema costatum* est capable de libérer des molécules susceptibles de changer la spéciation métallique dans son environnement, l'exsudation étant plus prononcée sous une forte concentration métallique.

Les résultats obtenus ont aussi révélé que l'aldose le plus exsudé par *Skeletonema costatum* dans le milieu de culture, suite à une contamination par le cuivre est le glucose. L'exsudation de cet aldose semble être utilisée comme mécanisme de défense ou de protection vis-à-vis de la contamination métallique. En effet, les aldoses produits pendant les contaminations sont les constituants de base des EPS produits. Ces EPS possédant une structure complexes et de type polymérique pourrait permettre de former des complexes ligands-métaux, de façon à diminuer la biodisponibilité et la toxicité du métal.

Enfin, *Skeletonema costatum* a libéré des substances fluorescentes composées de protéines, d'acides humiques et fulviques. De la même façon que le glucose exsudé, ces biomolécules, détectées pendant la croissance en réponse au stress métallique, étaient probablement impliquées dans un mécanisme de défense. Elles pourraient également jouer le rôle de ligands complexant les métaux, limitant leurs biodisponibilités et leurs effets toxiques sur ce microorganisme.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication parue dans *Biometals* (Herzi *et al.*, 2013b) (Annexe A).

*CHAPITRE IV*

*RÉPONSE D'Alexandrium catenella À LA  
CONTAMINATION PAR LE CUIVRE, LE  
ZINC, LE CADMIUM ET LE PLOMB :  
CROISSANCE & EXSUDATION  
CARBONÉE*

# **A- RESULTATS**

## **I. EFFET DES ETMs (cuivre, zinc, plomb ou cadmium) SUR LA CROISSANCE d'*Alexandrium catenella***

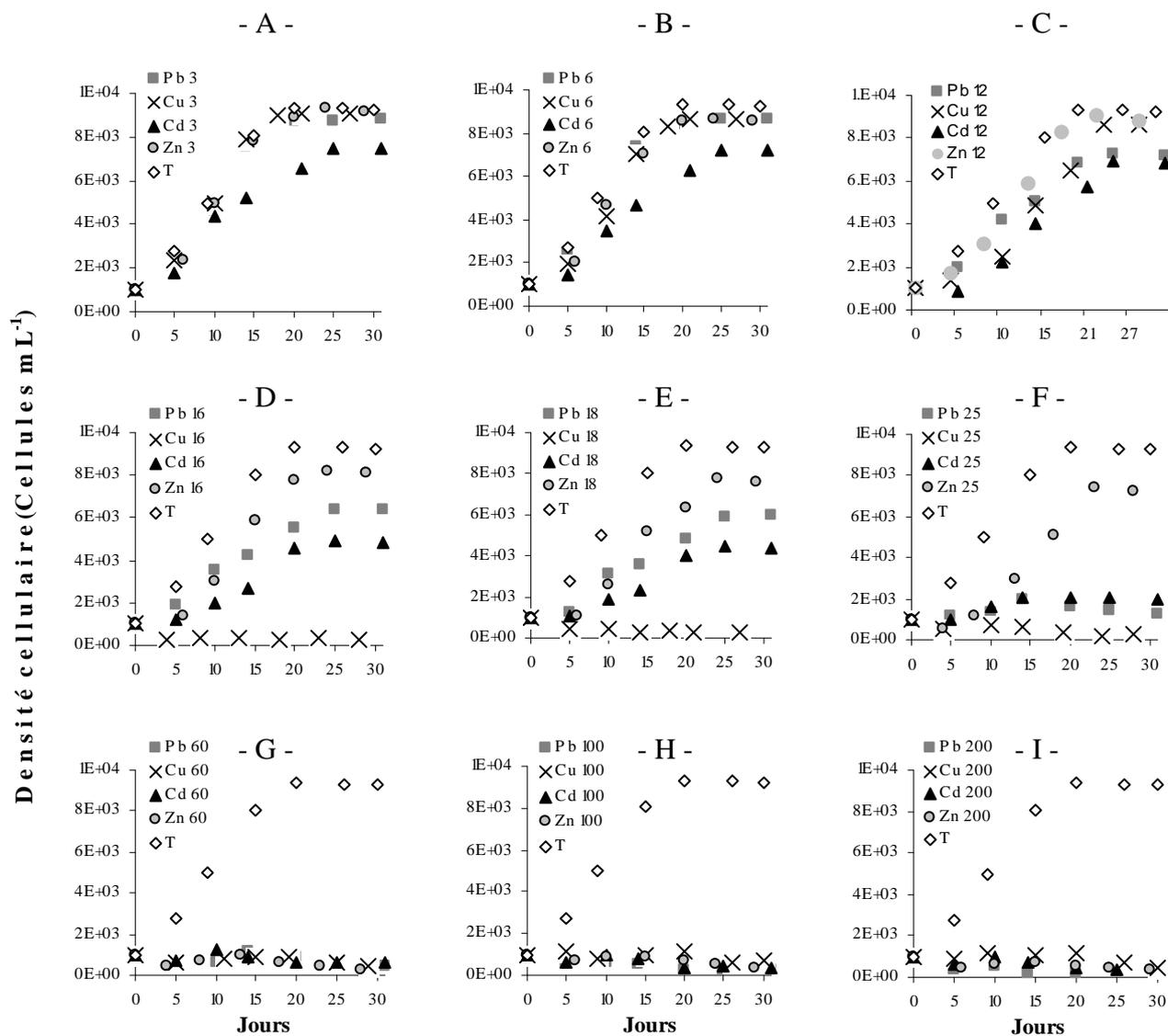
### **1. Effet du cuivre**

Les cinétiques de croissance des cultures d'*Alexandrium catenella* contaminées par le cuivre étaient perturbées par rapport à celles des cultures témoins (Figure 31). Ces perturbations étaient significatives à partir de la concentration 12  $\mu\text{M}$  (test Wilcoxon :  $P < 0,05$ ).

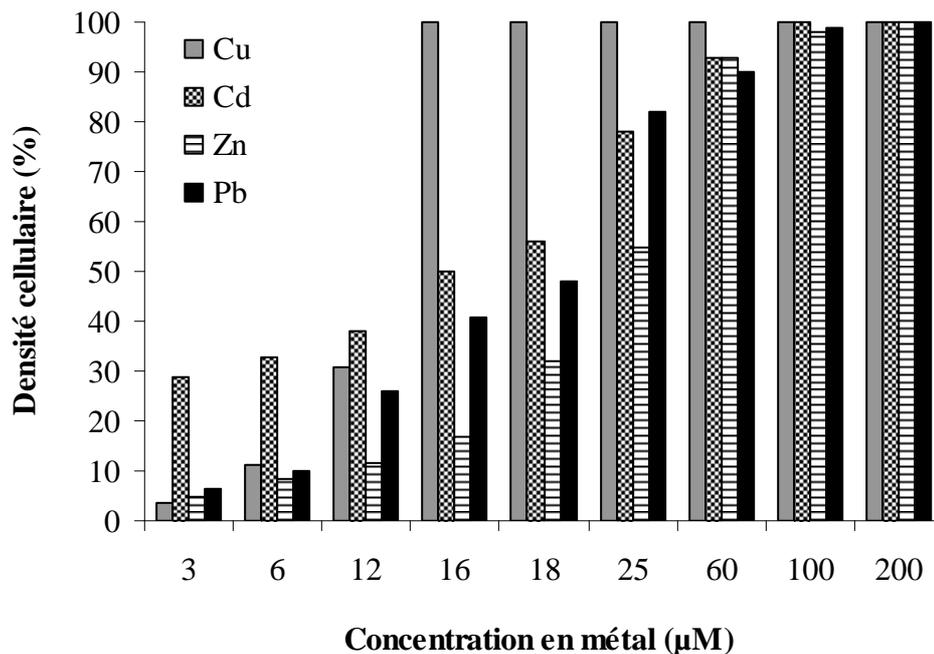
Pour les cultures contaminées par 3  $\mu\text{M}$  et par 6  $\mu\text{M}$  de Cu, les cinétiques de croissance étaient similaires à celles du témoin (Figure 31A, B). En présence de 6  $\mu\text{M}$  de Cu, la densité cellulaire pendant la phase stationnaire diminuait d'environ 10% par rapport aux cultures témoins (Figure 32). Les taux de croissance ( $0,14 \text{ J}^{-1}$ ) ainsi que le temps de dédoublement cellulaire (5,00 J) mesurés pendant la phase exponentielle, ont, quant à eux, été légèrement affectés en comparaison avec les cultures témoins ( $0,25 \text{ J}^{-1}$ , 2,78 J) (Tableau VIII).

Dans les cultures contaminées par 12  $\mu\text{M}$  de Cu, une diminution de 30% de la densité cellulaire a été observée par rapport aux cultures témoins (Figure 32). De même, le taux de croissance ( $0,13 \text{ J}^{-1}$ ) a diminué de 44% relativement aux cultures témoins ( $0,25 \text{ J}^{-1}$ ) et les cellules contaminées ont mis plus de temps à se dédoubler (5,55 J) que les cellules non contaminées (2,78 J) (Tableau VIII).

En présence de 16  $\mu\text{M}$  de Cu, une réduction de 100% de la densité cellulaire était observée (Figure 32). Par conséquent le taux de croissance était nul (Tableau VIII). Pour les concentrations 18, 25, 60, 100 et 200  $\mu\text{M}$ , le cuivre entraînait une forte mortalité des cellules végétatives ou un enkystement (Figure 31), tandis que le taux de croissance restait nul. En comparaison avec les autres métaux, le cuivre induisait la transformation des cellules végétatives en kystes dès la concentration 16  $\mu\text{M}$ . Ces kystes avaient une forme spécifique (Figure 33).



**Figure 31.** Cinétiques de croissance d'*Alexandrium catenella* ACT03 cultivée en conditions témoins et contaminées par les métaux traces cuivre, zinc, plomb ou cadmium



**Figure 32.** Diminution (%) de la densité cellulaire dans les cultures contaminées d'*Alexandrium catenella* ACT03 pendant leur phase stationnaire, par rapport aux conditions témoins

**Tableau VIII.** Taux de croissance ( $\mu$ , en  $J^{-1}$ ) et temps de dédoublement cellulaire (T, en J) d'*Alexandrium catenella* ACT03 cultivée en conditions témoins et contaminées par les métaux traces cuivre, zinc, cadmium ou plomb

	Cu		Zn		Cd		Pb	
	$\mu$	T	$\mu$	T	$\mu$	T	$\mu$	T
<b>Témoin</b>	0,25	2,78	0,25	2,78	0,25	2,78	0,25	2,78
<b>3 <math>\mu</math>M</b>	0,14	5,00	0,15	4,76	0,13	5,55	0,14	5,00
<b>6 <math>\mu</math>M</b>	0,14	5,00	0,14	5,00	0,14	5,00	0,14	5,00
<b>12 <math>\mu</math>M</b>	0,13	5,55	0,15	4,76	0,15	4,76	0,13	5,55
<b>16 <math>\mu</math>M</b>	0,00	0,00	0,15	4,76	0,12	5,88	0,12	5,88
<b>18 <math>\mu</math>M</b>	0,00	0,00	0,15	4,76	0,11	6,70	0,11	6,70
<b>25 <math>\mu</math>M</b>	0,00	0,00	0,16	4,34	0,06	12,50	0,11	6,70
<b>60 <math>\mu</math>M</b>	0,00	0,00	0,05	13,90	0,00	00,00	0,06	12,50
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	0,00	0,00	0,06	12,50	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>200 <math>\mu</math>M</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

## 2. Effet du zinc

Les contaminations par le zinc ont entraîné des perturbations significatives (test de Wilcoxon :  $P < 0,05$ ) des cinétiques de croissance d'*Alexandrium catenella* dès la concentration 12  $\mu\text{M}$  (Figure 31). En présence de 3 et 6  $\mu\text{M}$  de zinc, les densités cellulaires n'ont été réduites que de 5 et 8% respectivement, par rapport aux densités cellulaires des cultures témoins (Figure 32). De la même façon, les taux de croissance (0,14 - 0,15  $\text{J}^{-1}$ ), ainsi que les temps de dédoublement (4,76-5,00 J) ont modérément varié comparativement aux cultures témoins (0,25  $\text{J}^{-1}$  ; 2,78 J) (Tableau VIII).

Dans les cultures contaminées par 12  $\mu\text{M}$  de Zn, la croissance semblait être légèrement perturbée par rapport à la croissance observée en conditions témoins (Figure 31). Cette perturbation concernait uniquement 12% de la densité cellulaire. Le taux de croissance (0,15  $\text{J}^{-1}$ ), ainsi que le temps de dédoublement (4,76 J) étaient légèrement supérieurs à ceux des cultures témoins.

En présence d'une contamination par 16  $\mu\text{M}$ , 18  $\mu\text{M}$  et 25  $\mu\text{M}$  de Zn, la croissance était également perturbée par rapport aux conditions témoins. Ainsi, la densité cellulaire relevée au cours de la phase stationnaire était réduite de 17 et 45%, respectivement (Figure 32). Le taux de croissance était légèrement modifié (0,15  $\text{J}^{-1}$ ) ainsi que le temps de dédoublement (4,76 J). Toutefois, ces valeurs restaient équivalentes à celles mesurées en présence de cuivre, aux mêmes concentrations.

En présence de 60  $\mu\text{M}$  de Zn, la croissance d'*Alexandrium catenella* était fortement perturbée, le zinc manifestant son effet le plus toxique à partir de cette concentration. Ainsi, la diminution de la densité cellulaire enregistrée au cours de la phase stationnaire a été estimée à 93%, par rapport aux conditions témoins. Le taux de croissance et le temps de dédoublement mesurés pendant la phase exponentielle étaient alors de 0,05  $\text{J}^{-1}$  et 13,90 J, respectivement. Outre son effet inhibiteur de la croissance, le zinc induisait aussi la transformation d'une partie des cellules végétatives en kystes, à partir de la concentration 60  $\mu\text{M}$  (Figure 33). Pour les très fortes concentrations (100  $\mu\text{M}$  et 200  $\mu\text{M}$ ), la croissance cellulaire était totalement inhibée et toutes les cellules se transformaient en kystes.

### 3. Effet du cadmium

Contrairement aux autres ETMs étudiés, l'effet néfaste du cadmium sur les cinétiques de croissance a été observé dès les plus faibles contaminations (*i.e.* en présence de 3  $\mu\text{M}$  et de 6  $\mu\text{M}$  de Cd) (Figure 31). Ainsi, le Cd apparaissait comme le plus toxique des ETMs testés pour les trois premières concentrations. En effet, pour ces concentrations, les cultures contaminées par le cadmium présentaient les plus faibles densités cellulaires, durant toute la croissance (Figure 31). En outre, dès la contamination par 3  $\mu\text{M}$  de Cd, la densité cellulaire était réduite de 20%, alors que 7% était la réduction maximale enregistrée en présence des autres ETMs au même niveau de contamination (*i.e.* 3  $\mu\text{M}$ ) (Figure 32).

Dans les cultures contaminées par 12  $\mu\text{M}$  de Cd, la densité cellulaire diminuait par rapport au témoin de 38%, contre 30% pour le cuivre, 26% pour le Pb et 12% pour le zinc à la même concentration (Figure 32). A cette concentration, l'effet toxique du cadmium se traduisait par la formation de kystes, qui n'étaient pas observés en présence des autres métaux. En augmentant la contamination métallique de 16 à 25  $\mu\text{M}$  de Cd, la réduction des densités cellulaires était beaucoup plus importante (de 50 à 78%) que celle induite par les autres métaux, excepté le cuivre (< 53%) (Figure 32). Lorsque le cadmium était administré à de fortes concentrations (60, 100 et 200  $\mu\text{M}$ ), une forte mortalité cellulaire était observée, le taux de survie des cellules pendant la phase stationnaire avoisinant 0 % (Figure 32).

### 4. Effet du plomb

La croissance des cultures d'*Alexandrium catenella* contaminées par le plomb subissait une inhibition significative (test Wilcoxon :  $P < 0,05$ ) dès la concentration 12  $\mu\text{M}$  (Figure 31). En présence de faibles concentrations (3  $\mu\text{M}$  et 6  $\mu\text{M}$ ), le plomb n'induisait qu'une réduction de 6 à 10% de la densité cellulaire (Figure 32).

Dans les cultures contaminées par 12  $\mu\text{M}$  de Pb, la densité cellulaire n'était réduite que de 26% au cours de la phase stationnaire de la croissance (Figure 32). Cette contamination a imposé un taux de croissance ( $0,13 \text{ J}^{-1}$ ) sensiblement égal à celui du cuivre à la même concentration, donc deux fois plus faible qu'en conditions témoins (Tableau VIII). Il en est de même pour le taux de dédoublement cellulaire, qui était environ deux fois plus élevé ( $5,55 \text{ J}^{-1}$ ) qu'en conditions témoin.

Pour les concentrations intermédiaires de plomb (16  $\mu\text{M}$  et 18  $\mu\text{M}$ ), la croissance était davantage perturbée (Figure 30), montrant une importante réduction cellulaire (41 et 48%) par rapport au témoin, et aux cultures contaminées par le zinc (17 - 32%) aux mêmes

concentrations (Figure 31). Cette réduction cellulaire était associée à des taux de croissance de 0,12 et 0,11 J<sup>-1</sup>, et correspondait à des temps de dédoublement de 5,88 et 6,70 J<sup>-1</sup> (Tableau VIII).

A une concentration de 25 µM, le plomb a fortement inhibé la croissance de l'espèce. Son effet toxique s'est traduit par une réduction prononcée de l'abondance cellulaire (82%), par rapport aux cultures témoins (Figure 32), et par l'apparition de kystes représentant le stade ultime de la toxicité cellulaire (Figure 33). A ce stade, le taux de croissance et le temps de dédoublement étaient fortement affectés, estimés à 0,11 et 6,70 J, respectivement.

Aux très fortes concentrations (60 µM, 100 µM et 200 µM) en plomb, la croissance s'arrêtait totalement, toutes les cellules étant alors transformées en kystes.

## **5. Comparaison de l'effet des ETMs sur la croissance d'*Alexandrium catenella***

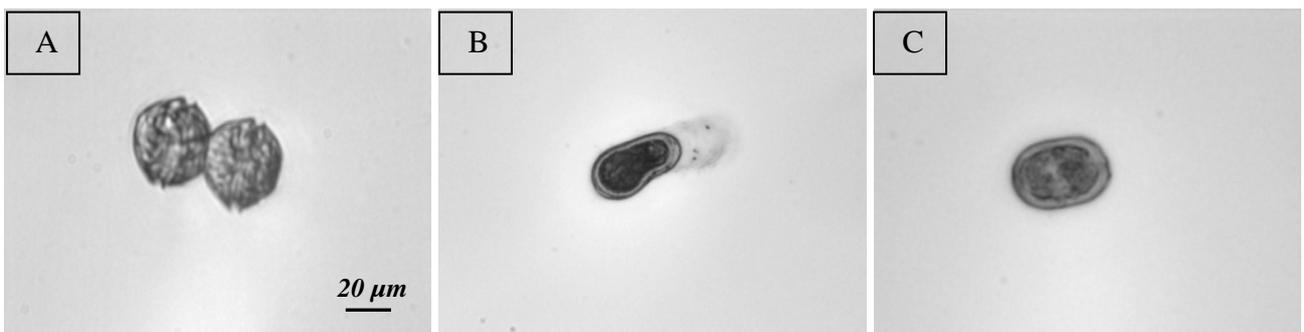
Aux faibles concentrations (3 µM et 6 µM), le cadmium apparaît le plus toxique des ETMs testés, car il induit l'inhibition de la croissance cellulaire et l'apparition de kystes à un stade précoce. Cependant, pour des concentrations moyennes (16 µM), le cuivre est le métal le plus toxique, puisqu'il induit, en plus de l'enkystement des cellules végétatives, l'inhibition totale de la croissance.

Pour le classement des métaux en fonction de l'inhibition de la croissance, le cadmium apparaît le plus toxique, suivi par le plomb, le cuivre et enfin le zinc. Si on considère l'apparition des kystes, le cadmium est toujours classé premier métal induisant cet effet, suivi par le cuivre, le plomb et enfin le zinc. D'après cette classification, on pourrait déduire que le cadmium est le métal le plus toxique et le zinc le moins toxique des métaux étudiés.

## II. EFFET DES ETMs (cuivre, zinc, plomb ou cadmium) SUR L'ENKYSTEMENT d'*Alexandrium catenella*

Des observations microscopiques ont révélé, qu'au-delà de certaines concentrations, variables selon les ETMs étudiés, le stress métallique induisait la transformation des cellules végétatives d'*Alexandrium catenella* en kystes (Figure 33A). Les concentrations métalliques minimales qui ont entraîné l'enkystement étaient de : 12  $\mu\text{M}$  pour le cadmium, 16  $\mu\text{M}$  pour le cuivre, 25  $\mu\text{M}$  pour le plomb et 60  $\mu\text{M}$  pour le zinc (Figure 31).

Des observations microscopiques ont permis de comparer l'aspect des kystes formés suite aux diverses contaminations métalliques. Ainsi, les kystes formés en réponse à la contamination cuivrique possédaient une forme spécifique, particulièrement allongée (Figure 33B), tandis que des kystes de forme circulaire étaient observés dans les cultures contaminées par les autres métaux (Figure 33C).



**Figure 33.** *Alexandrium catenella* ACT03 observée au microscope (G :  $\times 400$ ) (A) Cellules végétatives cultivées en conditions témoins (B) Cellule transformée en kyste sous l'effet du cuivre (C) Cellule enkystée en réponse aux autres contaminations métalliques

### **III. EFFET DES ETMs (cuivre, zinc, plomb ou cadmium) SUR L'EXSUDATION DU COD PAR *Alexandrium catenella***

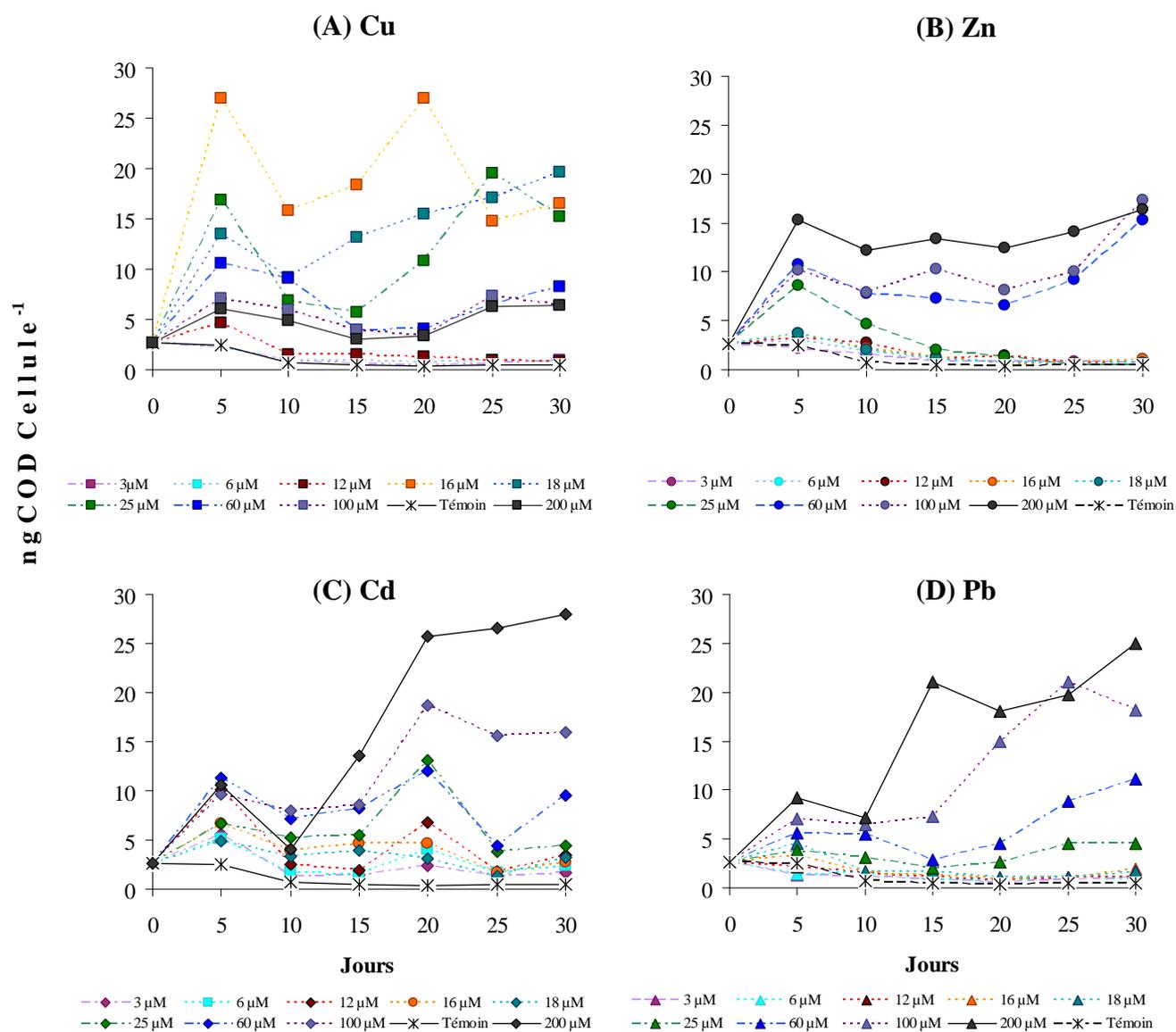
Les taux d'exsudation cellulaire du COD par *Alexandrium catenella* durant sa croissance montraient une évolution temporelle différente en fonction de la contamination métallique (Figure 34).

#### **1. Effet du cuivre**

Dans les cultures témoins, le rapport COD/Cellule a montré une diminution, du début de la croissance (4,0 ng COD cellule<sup>-1</sup>) jusqu'au jour 20 (2,5 ng COD cellule<sup>-1</sup>) (Figure 34A). La même tendance a été observée dans les cultures contaminées par de faibles concentrations de cuivre (*i.e.* 3 µM, 6 µM, 12 µM), avec des valeurs du rapport COD/Cellule similaires à celles des cultures témoins. En revanche, en présence de fortes concentrations de cuivre (*i.e.* 16 µM, 18 µM, 25 µM, 60 µM, 100 µM et 200 µM), le rapport COD/Cellule a montré des valeurs significativement supérieures à celles du témoin (3 - 27 ng COD cellule<sup>-1</sup>) (test Wilcoxon :  $P < 0,05$ ), avec un premier pic au jour 5 suggérant une réaction cellulaire envers le stress métallique. Les cultures contaminées par 16 µM de Cu montraient les valeurs les plus élevées (autour de 27 ng COD cellule<sup>-1</sup>), avec deux pics, l'un au jour 5, l'autre au jour 20, autour de 27 ng COD cellule<sup>-1</sup>.

#### **2. Effet du zinc**

Comme pour la contamination par le cuivre, pour les faibles contaminations de zinc (*i.e.* 3 µM, 6 µM et 12 µM), le rapport COD/Cellule montrait une évolution temporelle similaire à celle des cultures témoins, marquée par une diminution depuis le jour 5 (2 ng COD cellule<sup>-1</sup>) jusqu'à la fin de la croissance (1,5 ng COD cellule<sup>-1</sup>) (Figure 34B). Cependant, en présence de fortes concentrations de zinc (60 µM, 100 µM et 200 µM), un premier pic a été observé au jour 5 (16 ng COD cellule<sup>-1</sup>), suivi d'une diminution jusqu'au jour 20, puis d'un deuxième pic à partir du jour 20 (18 ng COD cellule<sup>-1</sup>). Enfin, à partir de la contamination par 16 µM de zinc, le rapport COD/Cellule était significativement plus élevé que celui obtenu pour le témoin (test Wilcoxon :  $P < 0,05$ ), ce qui était également le cas pour la contamination par le cuivre.



**Figure 34.** Evolution temporelle du rapport COD / Cellule, exsudé par les cultures d'*Alexandrium catenella* ACT03 cultivées en conditions témoins, et contaminées par les métaux traces cuivre, zinc, plomb ou cadmium

### 3. Effet du cadmium

Comme pour les autres ETMs testés, pour de fortes contaminations de cadmium (60  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  et 200  $\mu\text{M}$ ), le rapport COD/Cellule a présenté un premier pic au jour 5 (10 ng COD cellule<sup>-1</sup>), puis un deuxième, plus prononcé, au jour 20 (25 ng COD cellule<sup>-1</sup>), suivi d'une augmentation jusqu'à la fin de la croissance (Figure 34C). Dans les cultures faiblement contaminées (3  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$  et 12  $\mu\text{M}$ ) par le cadmium, le rapport COD/Cellule a montré des valeurs et des profils d'évolution similaires à ceux observés pour les cultures témoins. Au contraire, l'augmentation de la contamination par le cadmium (16  $\mu\text{M}$  – 200  $\mu\text{M}$ ) a été suivie d'une élévation de ce rapport. Les valeurs les plus élevées (28 ng COD cellule<sup>-1</sup>) étaient également observées en présence des plus fortes contaminations de cadmium (100  $\mu\text{M}$  et 200  $\mu\text{M}$ ). Ce rapport était significativement plus élevé que pour les cultures témoins (test Wilcoxon :  $P < 0,05$ ).

### 4. Effet du plomb

Les fortes contaminations par le plomb (16  $\mu\text{M}$  - 200  $\mu\text{M}$ ) ont induit une augmentation significative du rapport COD/Cellule par rapport aux conditions témoins (test de Wilcoxon :  $P < 0,05$ ), avec un premier pic au jour 5 (jusqu'à 10 ng COD cellule<sup>-1</sup>), suivi d'un deuxième pic ( $> 20$  ng COD cellule<sup>-1</sup>) au jour 15 (22 ng COD cellule<sup>-1</sup>) pour la concentration 200  $\mu\text{M}$ , puis d'une augmentation jusqu'au jour 30 (jusqu'à 26 ng COD cellule<sup>-1</sup>) (Figure 34D). En outre, le rapport COD/Cellule était d'autant plus élevé que le niveau de contamination augmentait, et était significativement plus élevé que celui observé pour les cultures témoins (test Wilcoxon :  $P < 0,05$ ).

#### **IV. EFFET DES ETMs (cuivre, zinc, plomb ou cadmium) SUR L'EXSUDATION DES MOLÉCULES FLUORESCENTES PAR *Alexandrium catenella***

Pour chaque concentration métallique, des matrices d'excitation-émission de la fluorescence (EEMs) de la FDOM ont été obtenues et analysées tous les cinq jours. Ainsi, des jeux de matrices de 6 (nombres de jours)  $\times$  4 (métaux étudiés)  $\times$  9 (concentrations étudiées) = 288 EEMs, ont été obtenus, puis analysés grâce à l'algorithme PARAFAC. La séparation a été optimale en utilisant quatre composantes fluorescentes (Mounier *et al.*, 2011).

La composante C1 était constituée d'un pic situé à des longueurs d'onde d'excitation entre 220 et 260 nm, et à des longueurs d'onde d'émission situées entre de 300 et 450 nm (Figure 35A-B). Ce domaine combinait un pic tryptophanique (pic R, selon Burdige, 2004), un pic de substances humiques (pic A', selon Burdige, 2004), et un pic signalant la présence des substances fulviques en milieu aquatique (pic A, selon Coble, 1996 et Patel-Sorrentino *et al.*, 2002). Cette composante représentait donc une zone fluorescente rassemblant des substances protéiniques, liée à un domaine de substances humiques.

La composante C2 était située entre 250 nm et 315 nm pour les longueurs d'onde d'excitation, et entre 315 nm et 400 nm pour celles d'émission (Figure 35C-D). Le maximum du pic était positionné sur le couple de longueurs d'onde EX / EM = 280 nm/355 nm. Cette composante fluorescente était attribuée à un fluorophore protéinique, du type tryptophane (pic T, selon Coble, 1996).

La composante C3 était située entre 270 nm et 370 nm pour les longueurs d'onde d'excitation, et entre 360 nm et 480 nm pour celles d'émission, avec une intensité maximale au niveau du couple de longueurs d'onde EX / EM = 325 nm / 410 nm (Figure 35E-F). Cette composante était associée à un fluorophore humique. Selon Coble (1996), l'existence de ce fluorophore est liée au milieu marin.

La composante C4 était constituée de deux pics fluorescents, dont les intensités maximales étaient alignées sur les mêmes longueurs d'onde d'émission. Le pic le moins prononcé était situé dans les hautes longueurs d'onde d'excitation (entre 325 nm et 410 nm). Il était moins étalé dans les longueurs d'onde d'émission (entre 425 nm et 540 nm) que le pic situé dans les basses longueurs d'onde d'excitation (entre 240 nm et 300 nm) (Figure 35G-H). Cette composante, en raison de ses pics séparés (selon Stedmon *et al.*, 2003 ; Alberts et Takacs (2004b), correspondait à des substances humiques terrestres. La présence de cette

composante montrait la diversité de l'état du milieu où des substances fulviques pouvaient aussi être retrouvées (Ishii et Boyer, 2012).

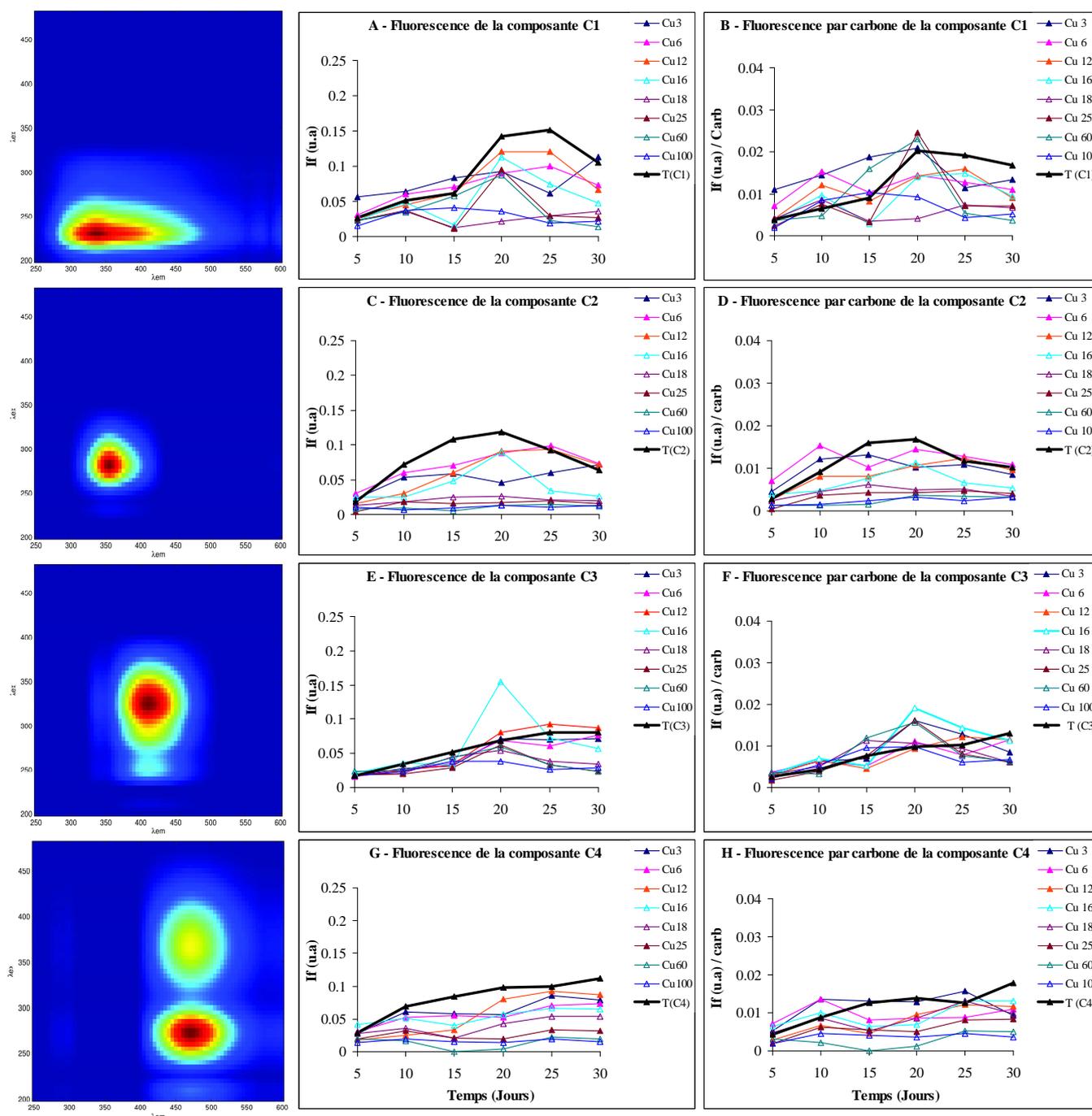
## **1. Contribution de la fluorescence en l'absence de contamination**

La contribution de la fluorescence a montré que celle-ci était élevée même en l'absence de contamination (Figure 35A-C-E-G), probablement en raison d'un effet de quenching des métaux contaminant par le milieu de culture. Toutes les composantes fluorescentes ont aussi montré une augmentation de leur contribution, du jour 5 au jour 20. Concernant la composante C1, une augmentation importante a été observée après le jour 15, suivie d'une diminution au jour 30 (Figure 35A). Pour la composante C2, une augmentation du jour 5 au jour 20 a été décelée, suivie d'une diminution régulière jusqu'au jour 30 (Figure 35C). En revanche, les composantes C3 et C4 ont montré une contribution qui augmentait régulièrement au cours de la croissance (Figure 35E-G). En l'absence de contamination, l'activité biologique semblait être maximale au jour 20 pour les composantes C1 et C2 (Figure 35A-C). Comme ces composantes étaient liées aux protéines, ce résultat pourrait correspondre à la faible activité biologique existant pendant la phase stationnaire de la croissance. L'augmentation régulière des composantes C3 et C4 (Figure 35E-G) indiquait la production progressive de complexes aromatiques fluorescents, confirmant la production marine de MOD (Ishii et Boyer, 2012).

## **2. Contribution de la fluorescence en réponse à la contamination par le cuivre**

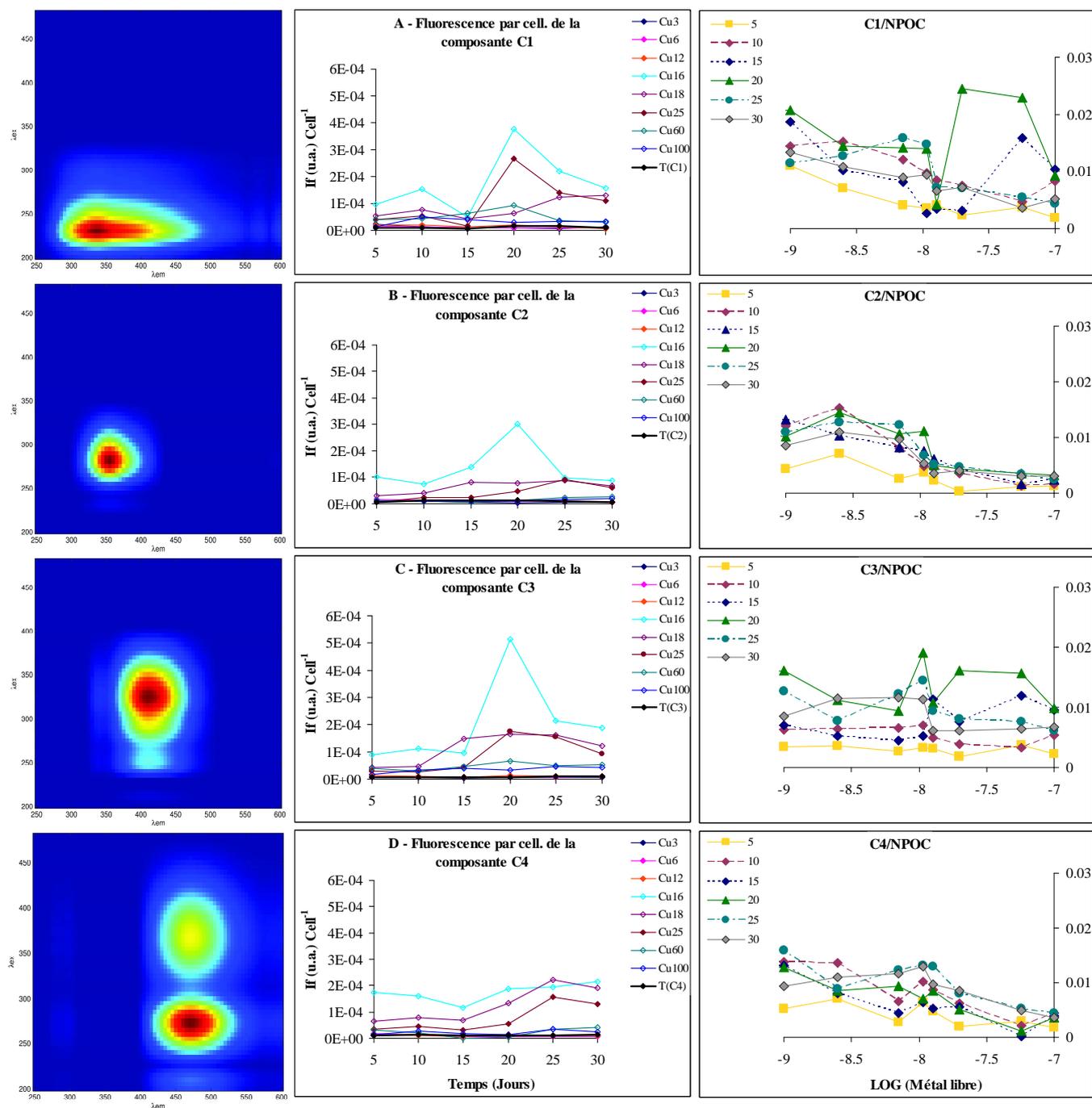
La contribution de la fluorescence en réponse à la contamination métallique a généralement été faible par rapport à celles des cultures non contaminées (Figure 35A-C-E-G). Cela pourrait être attribué à l'effet quenching du cuivre. Toutefois, cette faible contribution pourrait aussi être attribuée à la faible densité cellulaire dans les cultures contaminées, et ainsi, à la faible production de MOD. La contribution des composantes fluorescentes C1 et C2 en réponse à la contamination cuivrique, a montré une augmentation de libération de la FDOM aux jours 20 et 25, suivie d'une diminution progressive jusqu'à la fin de croissance. Cette forte contribution pourrait être attribuée à une importante activité métabolique des cellules au cours de la phase exponentielle (Figure 31). Toutefois, les composantes C3 et C4 montraient une diminution régulière de la contribution de fluorescence en fin de croissance. La composante C3 semblait être moins affectée par la contamination

cuvrique, excepté pour 16  $\mu\text{M}$  de Cu, au jour 20, où la contribution montrait un pic important. Quant à la composante C4, sa contribution était plus affectée et manifestait une diminution en fonction des teneurs en cuivre.



**Figure 35.** Evolution de la fluorescence (u.a.) et de la fluorescence par carbone (u.a./carbone) en réponse à la contamination par le cuivre, au cours de la croissance d'*Alexandrium catenella* ACT03

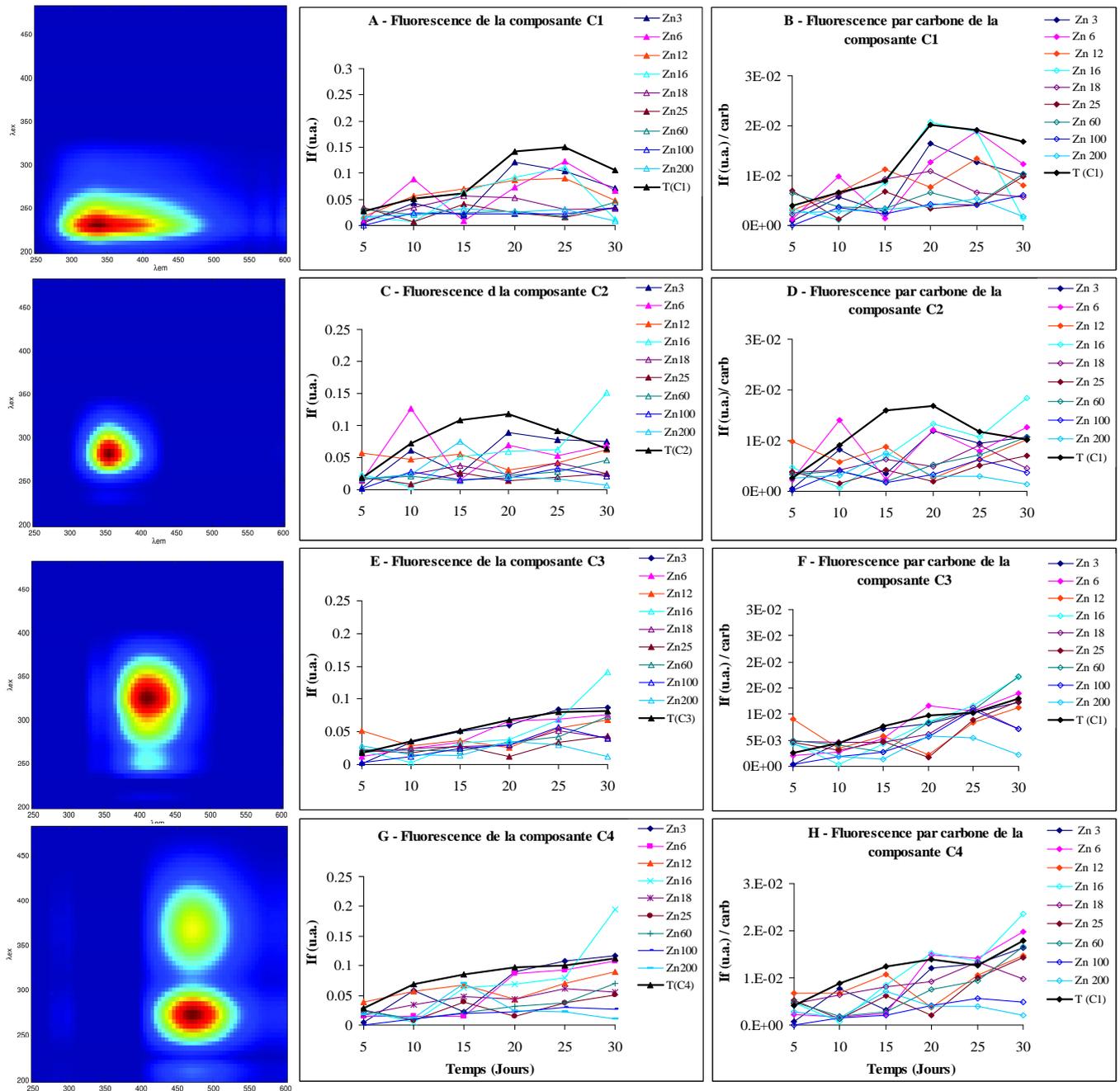
Concernant la contribution spécifique par carbone ( $F_{\text{carb}}$ ) (contribution divisée par le contenu en COD), les composantes C1 et C2 montraient des pics de fluorescence autour des jours 10 et 20, puis diminuaient progressivement jusqu'à la fin de croissance (Figure 35B-D-F-H). Cette contribution concernait plus particulièrement les contaminations par 6  $\mu\text{M}$  et 12  $\mu\text{M}$  de cuivre, respectivement. En comparaison avec les cultures témoins, les contributions spécifiques des composantes C3 et C4 n'ont pas changé de tendance. Concernant la contribution spécifique par carbone en fonction de la concentration du métal libre et du temps de croissance (Figure 36), celle-ci a montré une diminution progressive lorsque la teneur en cuivre libre augmentait dans le milieu de culture. Ceci pourrait signifier que la production du carbone organique fluorescent par les cellules n'était qu'indirectement liée au temps de croissance, et était plutôt en relation avec la concentration en  $\text{Cu}^{2+}$ , lequel montrait son effet toxique à fortes doses. Concernant la contribution spécifique par cellule ( $F_{\text{cell}}$ ) (Figure 36A-B-C-D), la plus forte contribution de fluorescence a été observée pour la concentration 16  $\mu\text{M}$  de cuivre, pour les composantes C1, C2 et C3. En présence de la concentration intermédiaire 18  $\mu\text{M}$  de cuivre, la contribution de la fluorescence a montré moins de variations et correspondait au domaine de concentration où les kystes sont apparus. Une légère contribution de  $F_{\text{cell}}$  a aussi été montrée pour la concentration 25  $\mu\text{M}$ , concernant la composante C1.



**Figure 36.** Évolution de la fluorescence spécifique par cellule et évolution de la contribution de la fluorescence par carbone (u.a. / NPOC) en fonction du LOG de la concentration en cuivre libre, en réponse à la contamination par le cuivre au cours de la croissance d'*Alexandrium catenella* ACT03

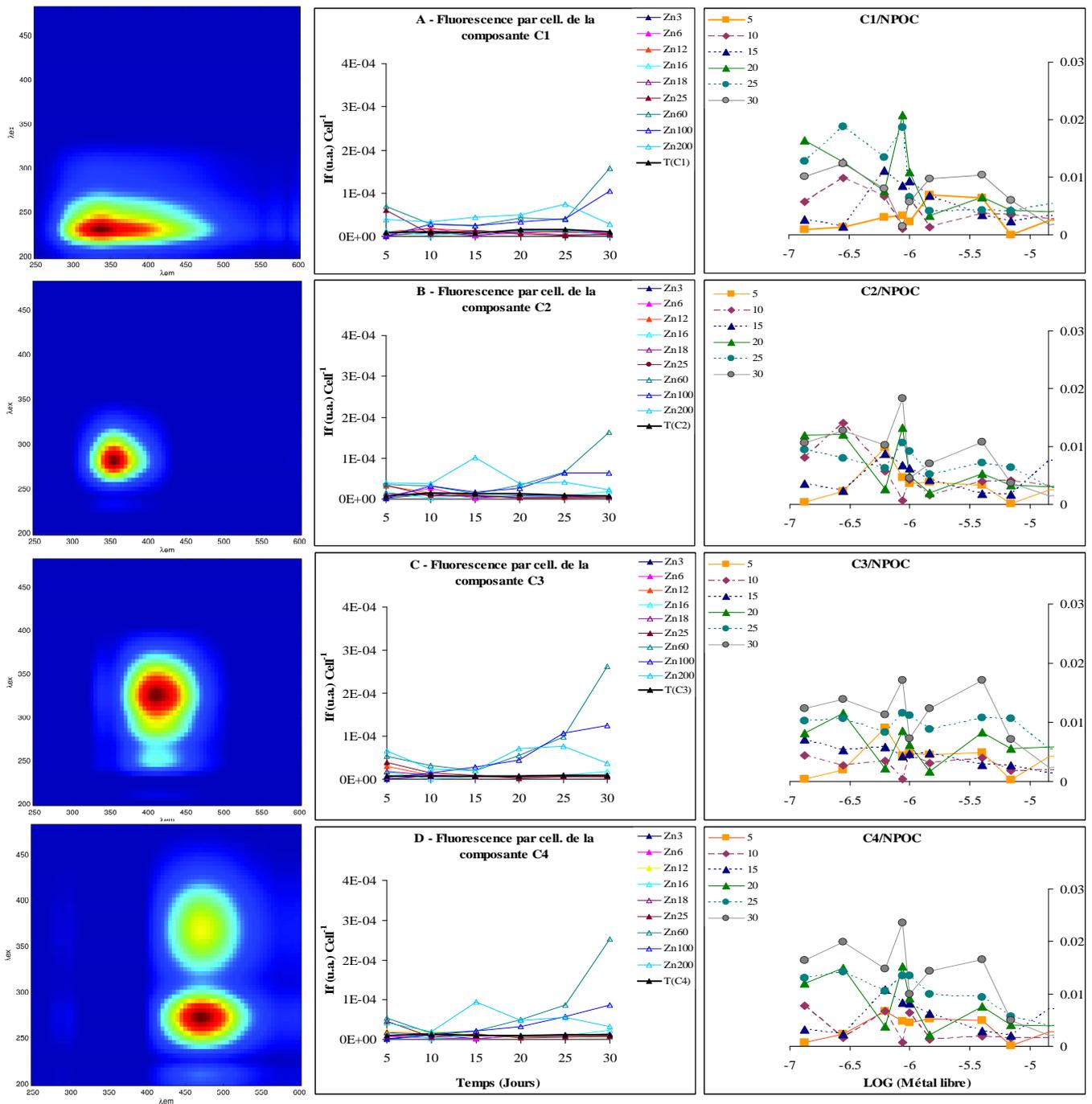
### 3. Contribution de la fluorescence sous la contamination par le zinc

Concernant la contamination par le zinc, une diminution globale de la contribution des composantes C1 et C2 a été observée en fonction de la concentration, mais pas de façon systématique (Figure 37A-C-E-G). A la fin de la croissance (jour 30), en présence de la contamination par 16  $\mu\text{M}$  de Zn, la FDOM a été particulièrement fluorescente pour toutes les composantes.



**Figure 37.** Evolution de la fluorescence (u.a.) et de la fluorescence par carbone (u.a./carbone) en réponse à la contamination par le zinc, au cours de la croissance d'*Alexandrium catenella* ACT03

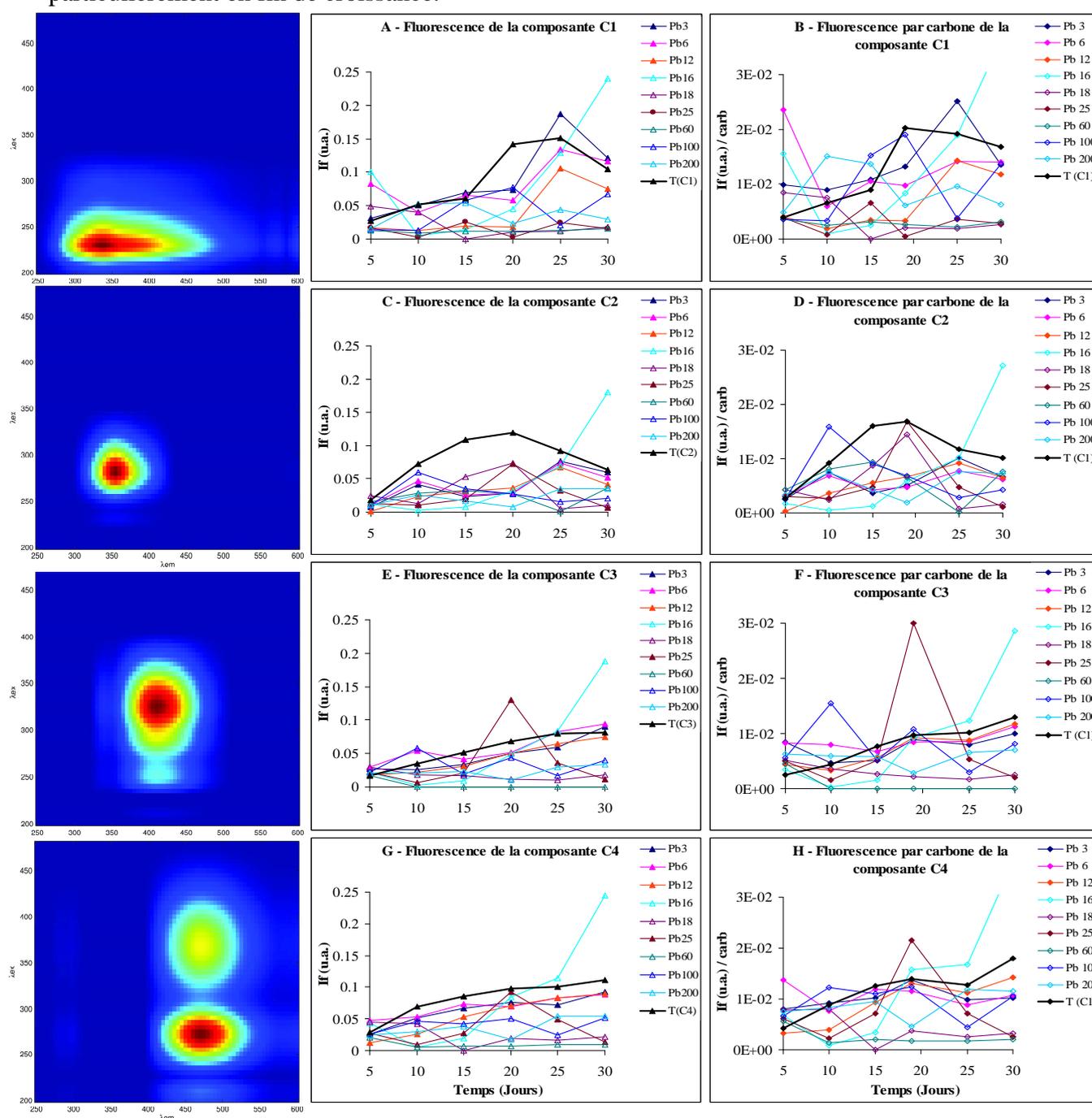
Pour la fluorescence par carbone ( $F_{carb}$ ), la composante C1 a augmenté du jour 5 jusqu'au jour 20, où elle a montré un maximum, puis elle a diminué progressivement vers le jour 30 (Figure 37B-D-F-H). La même tendance a été observée pour la composante C2, avec beaucoup plus de fluorescence au jour 10 et en fin de croissance. En revanche, pour les composantes C3 et C4, un rapport constant a été observé du jour 5 au jour 30. Concernant la fluorescence par cellule ( $F_{cell}$ ), celle-ci était liée aux fortes concentrations pour les quatre composantes étudiées (Figure 38A-B-C-D). Ceci pourrait signifier que les teneurs élevées en zinc ont stimulé les cellules à libérer davantage de MOD dans le milieu de culture. En présence d'une forte concentration en zinc (60  $\mu\text{M}$ ), la FDOM caractérisée pourrait provenir des kystes d'*Alexandrium catenella*.



**Figure 38.** Evolution de la fluorescence spécifique par cellule et évolution de la contribution de la fluorescence par carbone (u.a. / NPOC) en fonction du LOG de la concentration en zinc libre, en réponse à la contamination par le zinc au cours de la croissance d'*Alexandrium catenella* ACT03

## 4. Contribution de la fluorescence en réponse à la contamination par le plomb

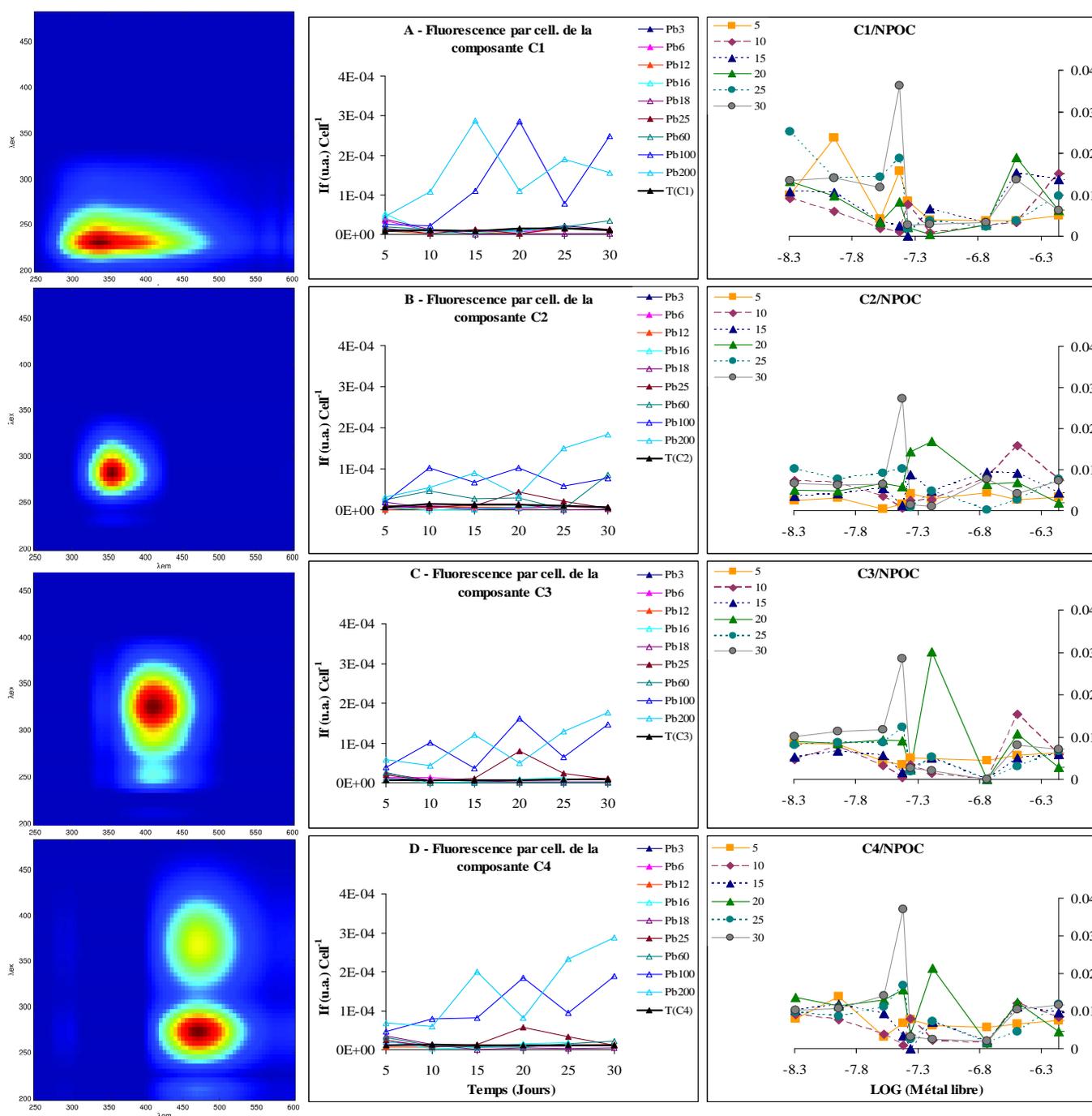
La contribution de la fluorescence augmentait régulièrement depuis le début jusqu'à la fin de la croissance (Figure 39A-C-E-G). Les cultures contaminées par 16  $\mu\text{M}$  de Pb ont montré une augmentation de la fluorescence pour les quatre composantes (C1, C2, C3 et C4), particulièrement en fin de croissance.



**Figure 39.** Evolution de la fluorescence (u.a.) et de la fluorescence par carbone (u.a./carbone) en réponse à la contamination par le plomb, au cours de la croissance d'*Alexandrium catenella* ACT03

La contribution spécifique par carbone a montré la même tendance. Cette augmentation de la fluorescence spécifique résultait probablement du carbone organique fluorescent exsudé par les cellules au cours de leur croissance.

Pour les cultures contaminées par 100  $\mu\text{M}$  de Pb, une fluorescence importante était décelée, particulièrement pendant la phase exponentielle et en fin de phase stationnaire. Cette FDOM pourrait provenir des kystes d'*Alexandrium catenella*.



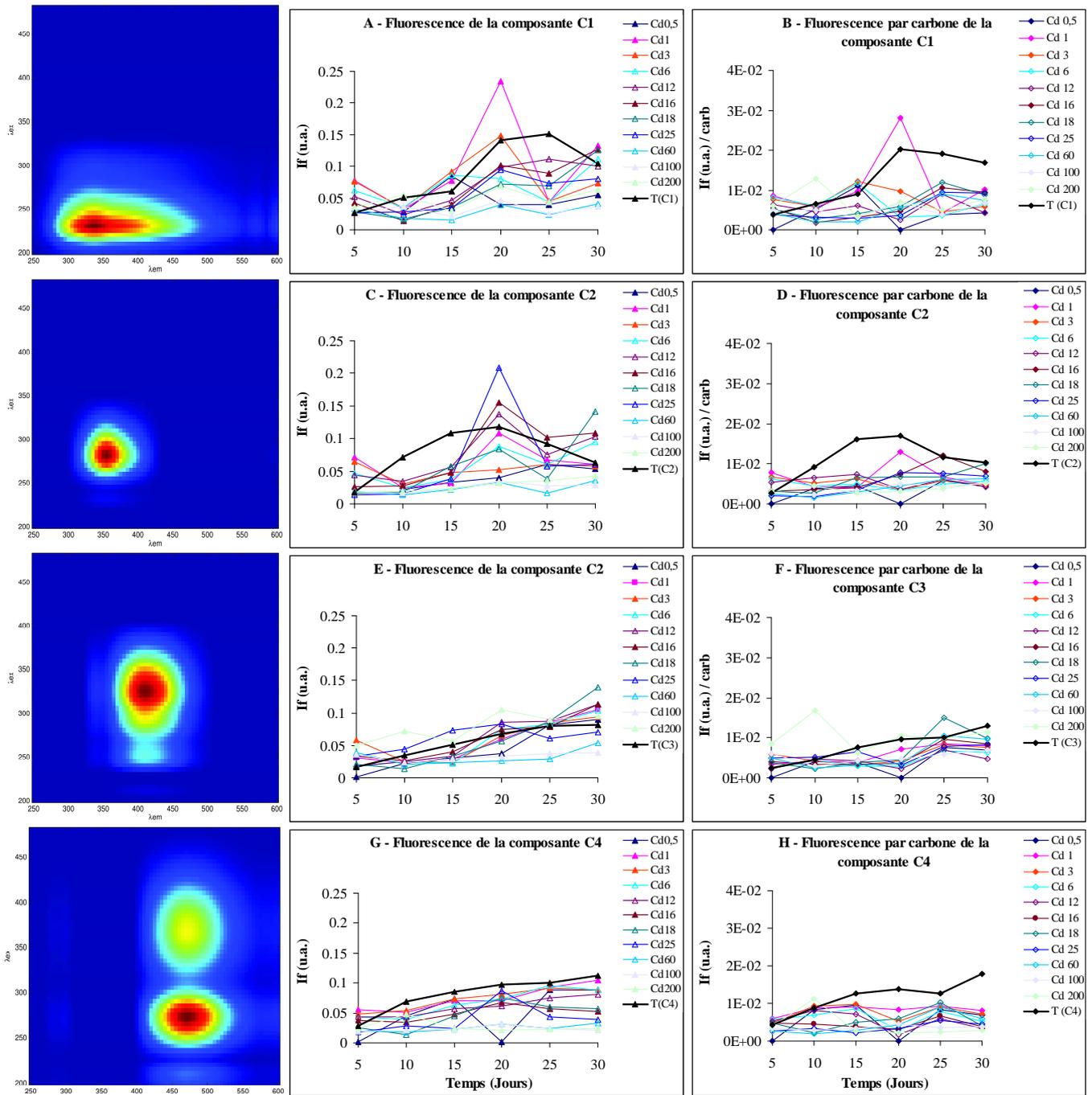
**Figure 40.** Evolution de la fluorescence spécifique par cellule et évolution de la contribution de la fluorescence par carbone (u.a. / NPOC) en fonction du LOG de la concentration en plomb libre, en réponse à la contamination par le plomb au cours de la croissance d'*Alexandrium catenella* ACT03

Quant à la contribution spécifique par cellule, elle était plus élevée en présence des fortes concentrations (100  $\mu\text{M}$  et 200  $\mu\text{M}$ ), et moins importante en présence de faibles teneurs (3  $\mu\text{M}$  et 12  $\mu\text{M}$ ) (Figure 40A-B-C-D, 1<sup>ère</sup> colonne).

## **5. Contribution de la fluorescence sous la contamination par le cadmium**

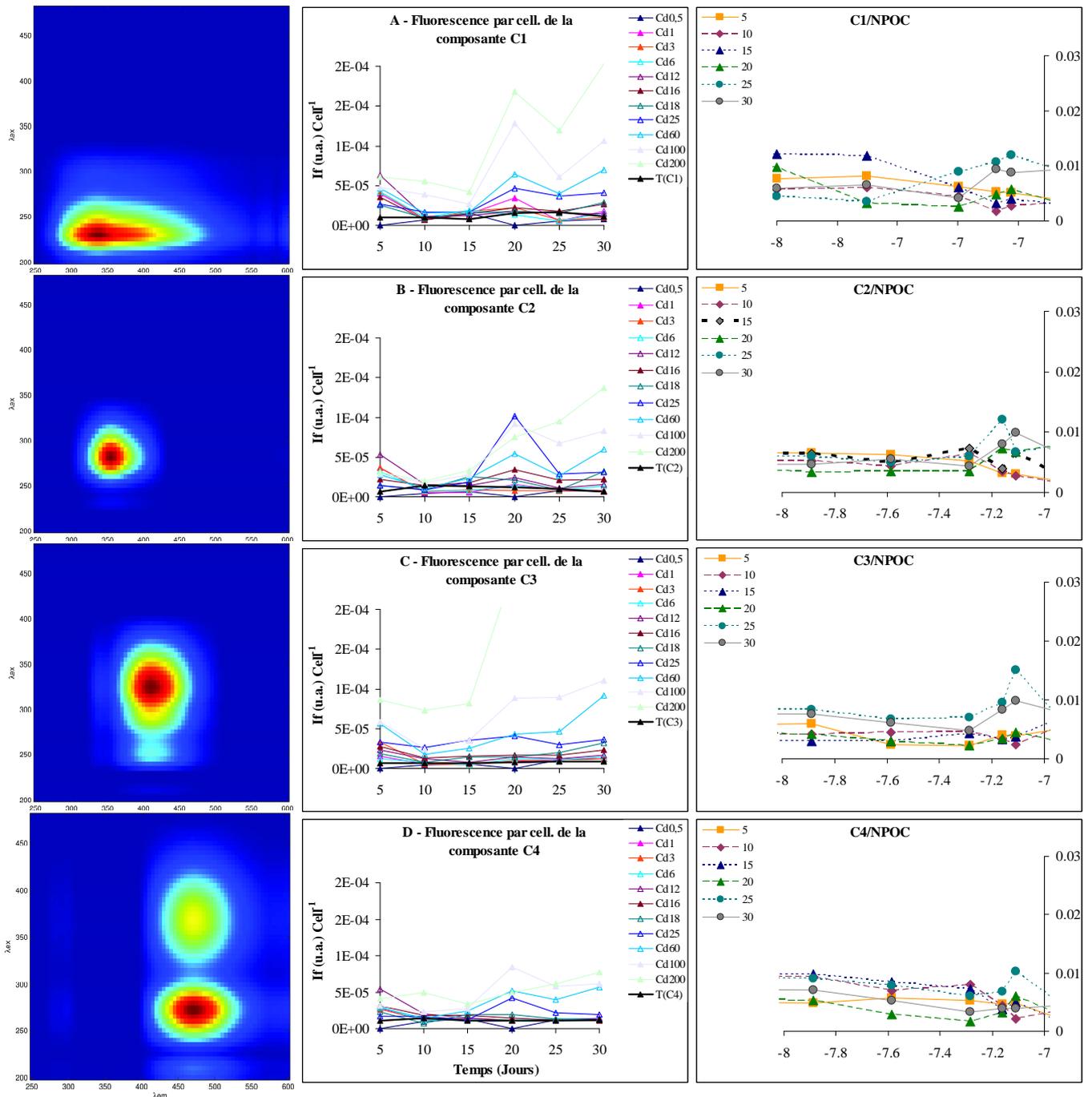
Concernant la contamination par cadmium, la contribution de la fluorescence était supérieure à celle des conditions témoin, au jour 5 pour la composante C1, au jour 20 pour la composante C2, et aux jours 5, 15 et 30 pour la composante C3 (Figure 41A-C-E-G). En revanche, la composante C4 était inférieure à celle observée dans les conditions témoins. Pour les composantes C1 et C2, la fluorescence diminuait du jour 5 au jour 10, puis elle augmentait régulièrement jusqu'au jour 20, où elle atteignait des maxima.

La plus forte contribution de fluorescence était obtenue pour la composante C1, en présence de 3  $\mu\text{M}$ , et pour la composante C2, en présence de 16  $\mu\text{M}$  et 18  $\mu\text{M}$ . Les composantes C3 et C4 ont montré une augmentation régulière et constante jusqu'à la fin de la croissance. Quant à la contribution spécifique par carbone, celle-ci montrait une tendance similaire pour les quatre composantes fluorescentes (Figure 41B-D-F-H). Elle était faible par rapport aux conditions témoins, excepté en présence de 3  $\mu\text{M}$  et 6  $\mu\text{M}$ , où elle montrait des pics fluorescents pendant la phase exponentielle.



**Figure 41.** Evolution de la fluorescence (u.a.) et de la fluorescence par carbone (u.a./carbone) en réponse à la contamination par le cadmium, au cours de la croissance d'*Alexandrium catenella* ACT03

De même, la contribution de la fluorescence par cellule ( $F_{cell}$ ) était plus importante pendant la phase exponentielle pour les fortes teneurs en cadmium (Figure 42A-B-C-D, 1<sup>ère</sup> colonne).



**Figure 42.** Evolution de la fluorescence spécifique par cellule et évolution de la contribution de la fluorescence par carbone (u.a. / NPOC) en fonction du LOG de la concentration en cadmium libre, en réponse à la contamination par le cadmium au cours de la croissance d'*Alexandrium catenella* ACT03

## **6. Contribution de la fluorescence sous la contamination par le cuivre et le cadmium**

Pour le cuivre et le cadmium, la contribution de la fluorescence des composantes C3 et C4 a montré une régulière augmentation au cours de la croissance, et une régulière diminution en fonction des concentrations contaminantes (Figures 35 et 41). Le cuivre et le cadmium induisaient des effets différents selon les composantes fluorescentes. La composante C3 était la moins affectée par le cuivre et le cadmium, car elle était liée à la matière humique marine et à l'EDTA. La composante C4 était principalement affectée par les deux métaux et sa contribution diminuait avec la concentration du métal.

La forte contribution de la fluorescence par carbone, observée aux jours 10 et 20, était plus importante en présence de faibles concentrations en cuivre libre (de  $9,93 \times 10^{-10}$  à  $7,06 \times 10^{-9}$  M) et en cadmium libre (de  $1,30 \times 10^{-8}$  à  $5,19 \times 10^{-8}$  M) (Figures 36 et 42). Cette matière fluorescente décrite par les composantes C1 et C2, définissait le domaine des protéines (Figure 35) et semblait être en relation avec l'activité biologique de l'espèce. A l'inverse, quand le niveau du métal libre augmentait dans le milieu de culture (de  $1,08 \times 10^{-8}$  à  $1,0 \times 10^{-7}$  M de  $\text{Cu}^{2+}$  ; et de  $1,08 \times 10^{-7}$  à  $4,38 \times 10^{-7}$  M de  $\text{Cd}^{2+}$ ), les cellules n'étaient plus capables de produire des molécules extracellulaires, en raison de la toxicité des métaux libres pour le métabolisme cellulaire. De ce fait, la FDOM était définie par un fluorophore de type humique, qui pourrait résulter des débris cellulaires ou du phénomène d'enkystement.

## **7. Contribution de la fluorescence sous la contamination par le zinc et le plomb**

Pour le zinc et le plomb, la contribution de la fluorescence des composantes C3 et C4 a montré une régulière augmentation au cours de la croissance, et une régulière diminution en fonction des concentrations contaminantes (Figures 37 et 39). Contrairement au cuivre et au cadmium, la composante C3, la plus affectée par le zinc et le plomb, était associée à la matière organique particulaire. En revanche, la composante C4 était moins affectée par les métaux, et sa contribution diminuait avec la concentration.

Comme pour le cuivre et le cadmium, la forte contribution de la fluorescence par rapport au NPOC était observée en présence de fortes concentrations en zinc libre ( $1,3 \times 10^{-7}$  à  $2,8 \times 10^{-7}$  M) et plomb libre ( $5,9 \times 10^{-9}$  à  $1,14 \times 10^{-8}$  M) (Figures 39 et 41). Ces fortes concentrations en métaux libres témoignaient de la présence de FDOM libérée dans le milieu

de culture, laquelle se traduisait par deux composantes fluorescentes C1 et C2, qui correspondaient à l'activité biologique de l'espèce.

## **V. MONOSUCRES EXSUDÉS PAR *Alexandrium catenella* EN RÉPONSE A LA CONTAMINATION PAR LES ETMs**

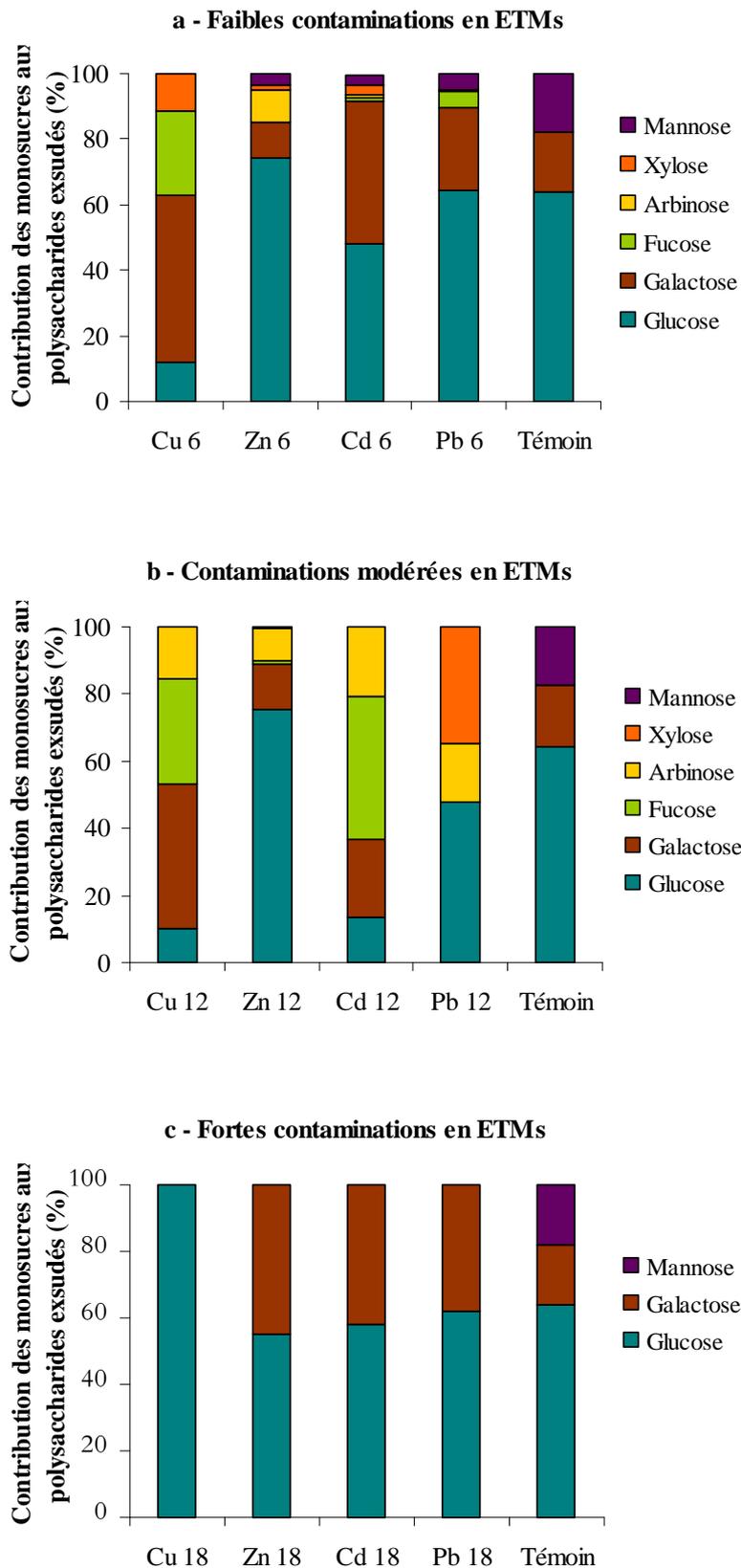
### **1. Caractérisation des monosucres exsudés par *Alexandrium catenella***

La nature et les proportions de monosucres composant les polysaccharides exsudés par *Alexandrium catenella* en fin de phase exponentielle-début de phase stationnaire de la croissance (Jour 20), étaient liées à la nature du métal contaminant et à sa concentration (Figure 43). Dans les cultures témoins, la prédominance de trois monosucres, glucose, galactose et mannose, était observée. Toutefois, le glucose était le monosaccharide le plus exsudé (64%), le galactose et le mannose contribuant à 35% aux monosucres totaux.

Pour les cultures contaminées par 6  $\mu\text{M}$  de chaque ETM (cuivre, zinc, plomb ou cadmium), la composition en monosucres exsudés a été différente en fonction du métal testé (Figure 43a). En présence de 6  $\mu\text{M}$  de Cu, les cellules ont principalement libéré du galactose (50%), ensuite du fucose (25%). D'autres monosucres comme le glucose et le xylose ont été produits, mais leur contribution est restée faible (20%). Pour les cultures exposées aux concentrations 6  $\mu\text{M}$  de zinc, cadmium ou plomb, le glucose était le plus exsudé, contribuant respectivement à 74, 47 et 64% aux monosucres totaux. Le galactose était le deuxième monosucres libéré, avec une contribution allant de 10 à 43%.

Les cellules exposées à une contamination cuivrique modérée (*i.e.* par 12  $\mu\text{M}$  de Cu), ont libéré du galactose (42%), du fucose (31%), du xylose (15%) et du glucose (10%) (Figure 43b). En revanche, celles cultivées en présence de zinc à la même concentration, produisaient principalement du glucose (75%), du galactose (13%) et du xylose (10%). Quant aux cellules maintenues en présence de 12  $\mu\text{M}$  de Cd, elles ont exsudé beaucoup plus de fucose (42%), puis du galactose (23%) et du xylose (20%). Enfin, la contamination par 12  $\mu\text{M}$  de Pb semblait favoriser la production de glucose (47%), de rhamnose (35%) et de xylose (17%).

Les cellules contaminées par 18  $\mu\text{M}$  de Cu libéraient exclusivement du glucose, tandis que celles exposées au zinc, au cadmium et au plomb, à la même concentration, ont exsudé du glucose (53 – 62%) et du galactose (37 – 46%) (Figure 43c).



**Figure 43.** Composition en monosucres des polysaccharides exudés par les cultures d'*Alexandrium catenella* ACT03 (J 20) témoins et contaminées par les ETMs (cuivre, zinc, plomb ou cadmium) aux concentrations 6  $\mu$ M, 12  $\mu$ M et 18  $\mu$ M en fin de phase exponentielle – début de phase stationnaire de la croissance

## **2. Évolution des contributions des monosucres exsudés par *Alexandrium catenella* en fonction des concentrations en ETMs**

### **2.1- Cuivre**

L'évolution de la contribution de chaque monosucré exsudé en fonction des concentrations en métaux, montrait qu'en présence de 6  $\mu\text{M}$  et de 12  $\mu\text{M}$  de Cu, le glucose était exsudé en faibles proportions, contrairement aux autres aldoses (galactose, fucose et xylose), lesquels présentaient des contributions élevées aux mêmes concentrations (Figure 44a). Toutefois, la diminution de la contribution de ces aldoses observée à 18  $\mu\text{M}$  de Cu, était synchrone avec une augmentation de la contribution du glucose.

### **2.2- Plomb**

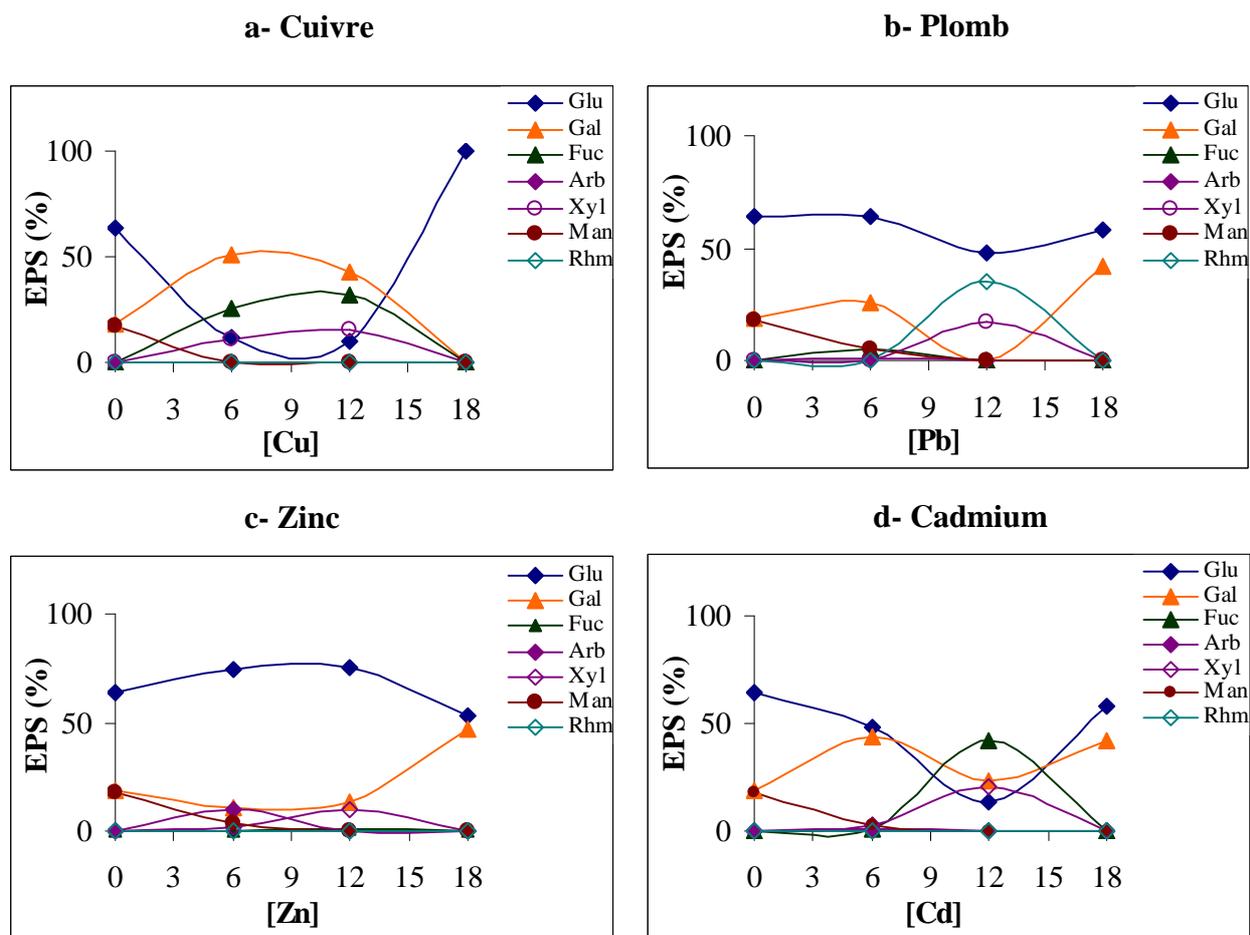
Quel que soit le niveau de contamination par le plomb, le glucose était l'aldose exsudé le plus abondant (Figure 44b). Le galactose était libéré dans des proportions relativement faibles par rapport au glucose, son exsudation étant stimulée en présence de 6  $\mu\text{M}$  et de 18  $\mu\text{M}$  de Pb. D'autres aldoses, comme le rhamnose et le xylose ont été fortement libérés à 12  $\mu\text{M}$ , tandis que leur exsudation était inhibée à 18  $\mu\text{M}$ .

### **2.3- Zinc**

En présence de 6  $\mu\text{M}$  et 12  $\mu\text{M}$  de Zn, l'exsudation du glucose a été relativement importante, contrairement à ce qui était observé pour le cuivre aux mêmes concentrations (Figure 44c). L'exsudation du galactose semblait être stimulée par 18  $\mu\text{M}$  de Zn, alors que celle du glucose diminuait dans ces conditions. Une libération modérée d'arabinose à 6  $\mu\text{M}$ , et de xylose à 12  $\mu\text{M}$ , était également observée.

### **2.4- Cadmium**

Comme pour le plomb, la libération du galactose semblait stimulée en présence de 6  $\mu\text{M}$  et de 18  $\mu\text{M}$  de Cd. Le fucose et le xylose étaient exsudés dans des proportions variables, à 12  $\mu\text{M}$ . D'autres aldoses, comme le rhamnose, l'arabinose et le mannose, ont également été exsudés, dans de très faibles proportions (Figure 44d).



**Figure 44.** Evolution des contributions des monosaccharides exsudés (Glu : glucose, Gal : galactose, Fuc : fucose, Arb : arabinose, Xyl : xylose, Man : mannose, Rhm : rhamnose) par les cultures d'*Alexandrium catenella* ACT03 (J 20) en fonction des concentrations en ETMs (Cu : a, Pb : b, Zn : c et Cd : d)

## VI. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES DES DIFFÉRENTES VARIABLES ESTIMÉES SOUS LES CONTAMINATIONS AVEC LES DIFFERENTS ETMs

Une ACP a été effectuée afin de comprendre l'implication des différents facteurs mesurés dans les variations qualitatives et quantitatives des substances exsudées par *Alexandrium catenella*. Les variables considérées dans cette ACP sont reportées dans le Tableau IX.

**Tableau IX.** Variables considérées dans l'ACP, des résultats de l'exsudation des monosucres par *Alexandrium catenella*

Variables	Symbole ACP
Abondance phytoplanctonique	Abond
Carbone organique dissous	COD
Glucose	Glu
Galactose	Gal
Mannose	Man
Xylose	Xyl
Rhamnose	Rhm
Arabinose	Arb
Fucose	Fuc
Composante 1	C1
Composante 2	C2
Composante 3	C3
Composante 4	C4
Composante 5	C5
COD/cellule	COD/cell
Carbohydrates/cellule	Carboh/Cell
Temps de culture	Temps

## 1. Cas de la contamination par le cuivre

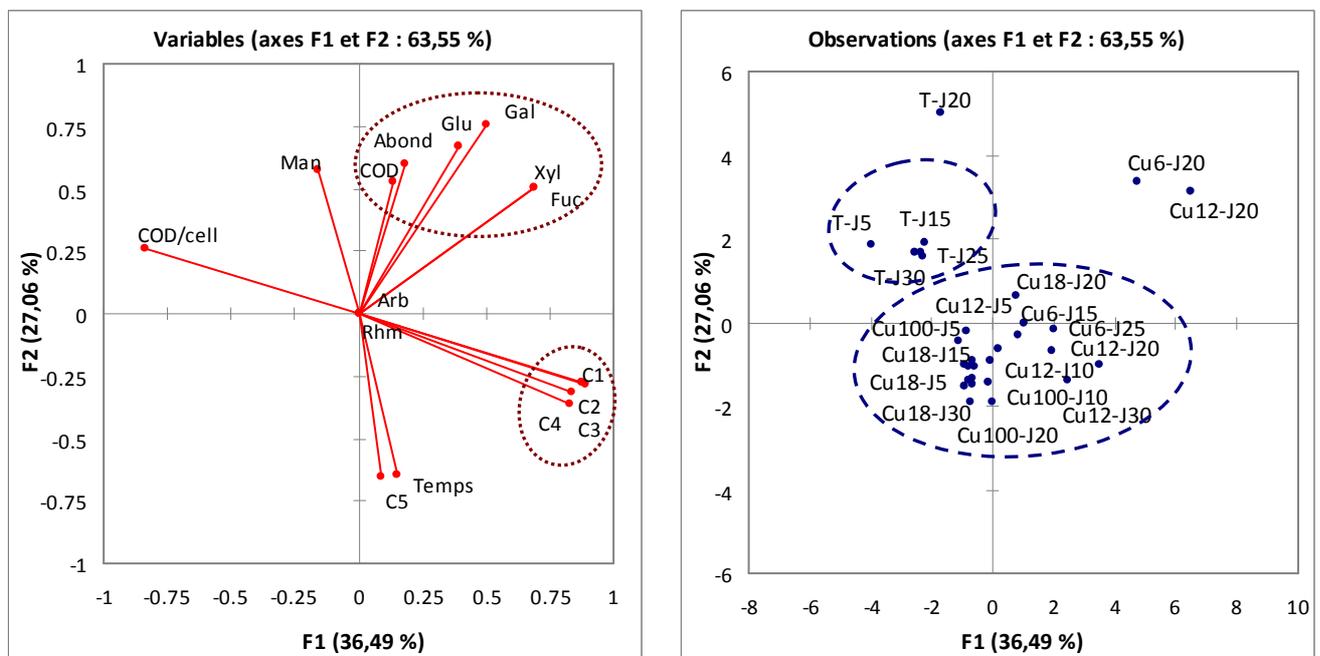
Pour la contamination cuivrique, le résultat de l'ACP révèle que les deux axes, F1 et F2 sont respectivement responsables de 36,49% et de 27,06% de la variance totale, soit d'un pourcentage cumulé de 63,55%. Ce résultat peut être considéré comme satisfaisant étant donné le nombre de variables considérées (Figure 45).

### 1.1- Projection sur l'axe F1

Sur ce premier axe, extrayant le plus d'inertie (36,49%), se projettent plusieurs variables. Au pôle positif de l'axe, des variables ayant un lien avec la fluorescence de la matière organique sont présentées ; parmi lesquelles : C1 (CTR = 15,65), C2 (CTR = 14,97), C3 (CTR = 13,72) et C4 (CTR = 13,20). Au pôle négatif de l'axe, se projette le rapport COD/cellule (CTR = 13,59). Du côté positif, se projette les faibles concentrations en cuivre, et de son côté négatif les fortes concentrations de ce métal.

### 1.2- Projection sur l'axe F2

Cet axe, qui extrait 27,06% de la variance totale, est positivement défini par le COD (CTR = 7,40), l'abondance phytoplanctonique (CTR = 9,48), le galactose (CTR = 15,01) et le glucose (CTR = 11,72). Sur son pôle négatif sont présentées les variables : temps (CTR = 10,88) et C5 (CTR = 11,32). Sur cet axe, se projettent les très fortes concentrations en cuivre.



**Figure 45.** Projection des variables considérées et concentrations en cuivre, sur les axes F1 et F2 de l'ACP

## 2. Cas de la contamination par le zinc

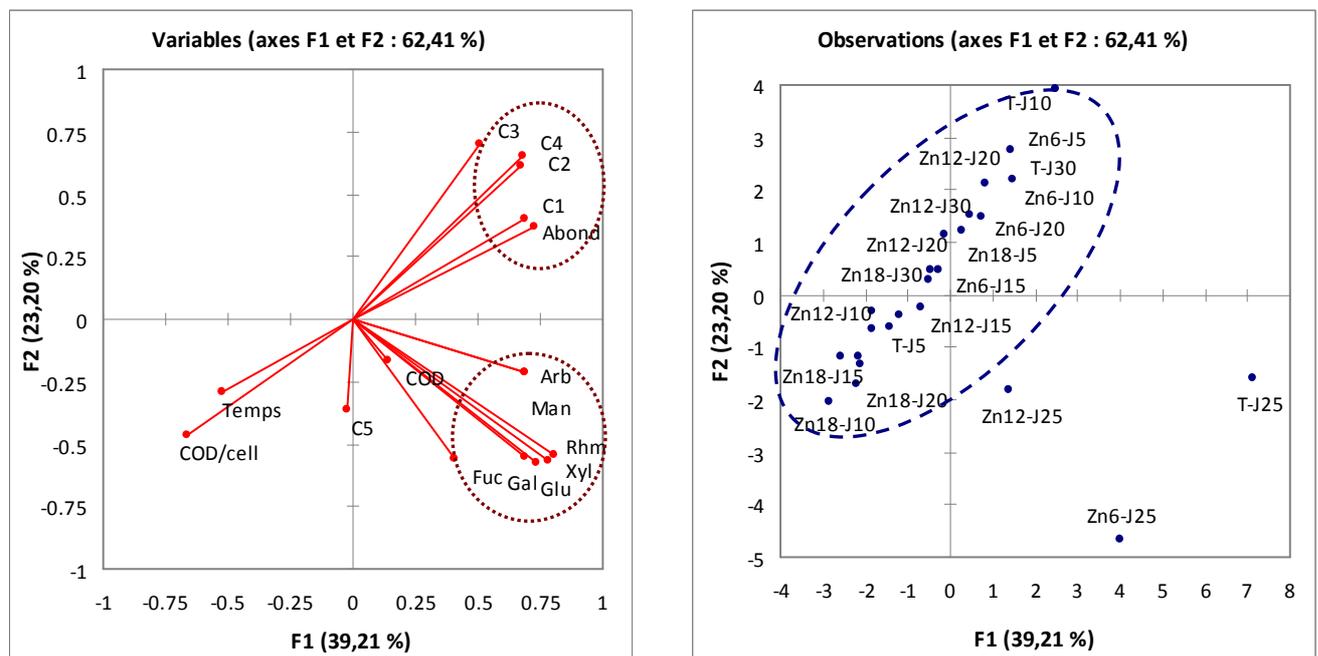
Les deux axes, F1 et F2, extraient respectivement 39,21% et 23,20% de la variance totale, soit un pourcentage cumulé de 62,41% (Figure 46).

### 2.1- Projection sur l'axe F1

Sur cet axe, ayant 39,21% de contribution du côté positif, sont présentes les variables : abondance phytoplanctonique (CTR = 8,45) et C1 (CTR = 7,50). Le galactose (CTR = 7,47), le xylose (CTR = 9,80), le rhamnose (CTR = 10,23), le mannose (CTR = 7,56) et l'arabinose (CTR = 7,56) se projettent du côté positif. Les concentrations modérées en zinc apparaissent du côté négatif de l'axe.

### 2.2- Projection sur l'axe F2

Cet axe, contribuant pour 23,20% à la variance totale, est défini, de son côté positif, par C2 (CTR=10,21), C3 (CTR=13,28) et C4 (CTR=11,57). Il porte également la projection des concentrations faibles et modérées en zinc.



**Figure 46.** Projection des variables considérées et concentrations en zinc, sur les axes F1 et F2 de l'ACP

### 3. Cas de la contamination par le plomb

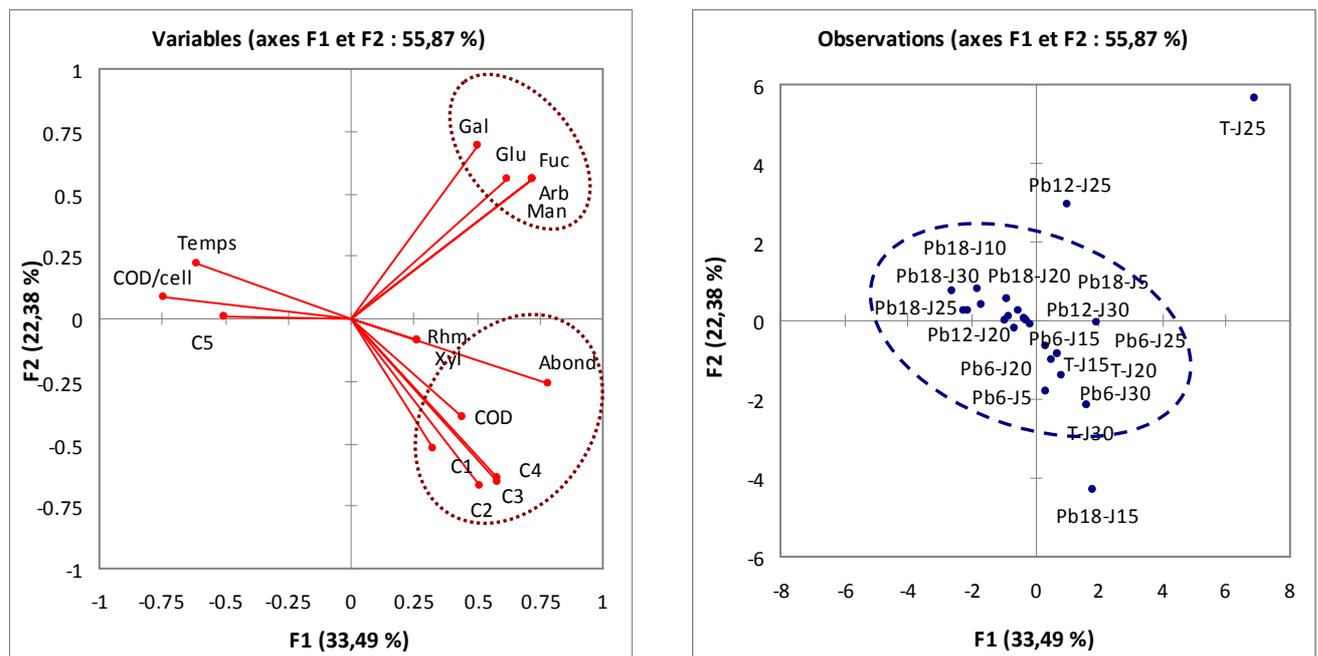
Les axes F1 et F2 extraient respectivement 33,49% et 22,38% de la variance totale, soit un pourcentage cumulé de 55,87% (Figure 47).

#### 3.1- Projection sur l'axe F1

Sur cet axe, ayant 33,49% de contribution, se projettent l'abondance phytoplanctonique (CTR = 11,39), le rapport COD/Cellule (CTR = 10,43), le fucose (CTR = 9,60), l'arabinose (CTR = 9,60), le mannose (CTR = 9,60) et le glucose (CTR = 7,20). Sur ce même axe sont également présentes les concentrations plus faibles et modérées en plomb.

#### 3.2- Projection sur l'axe F2

Cet axe, extrayant 22,38% de la variance totale, porte la variable galactose (CTR = 13,46) sur son pôle positif. Sur son pôle négatif, se projettent : C1 (CTR = 7,58), C2 (CTR = 12,51), C3 (CTR = 11,41) et C4 (CTR = 11,88).



**Figure 47.** Projection des variables considérées et concentrations en plomb, sur les axes F1 et F2 de l'ACP

## 4. Cas de la contamination par le cadmium

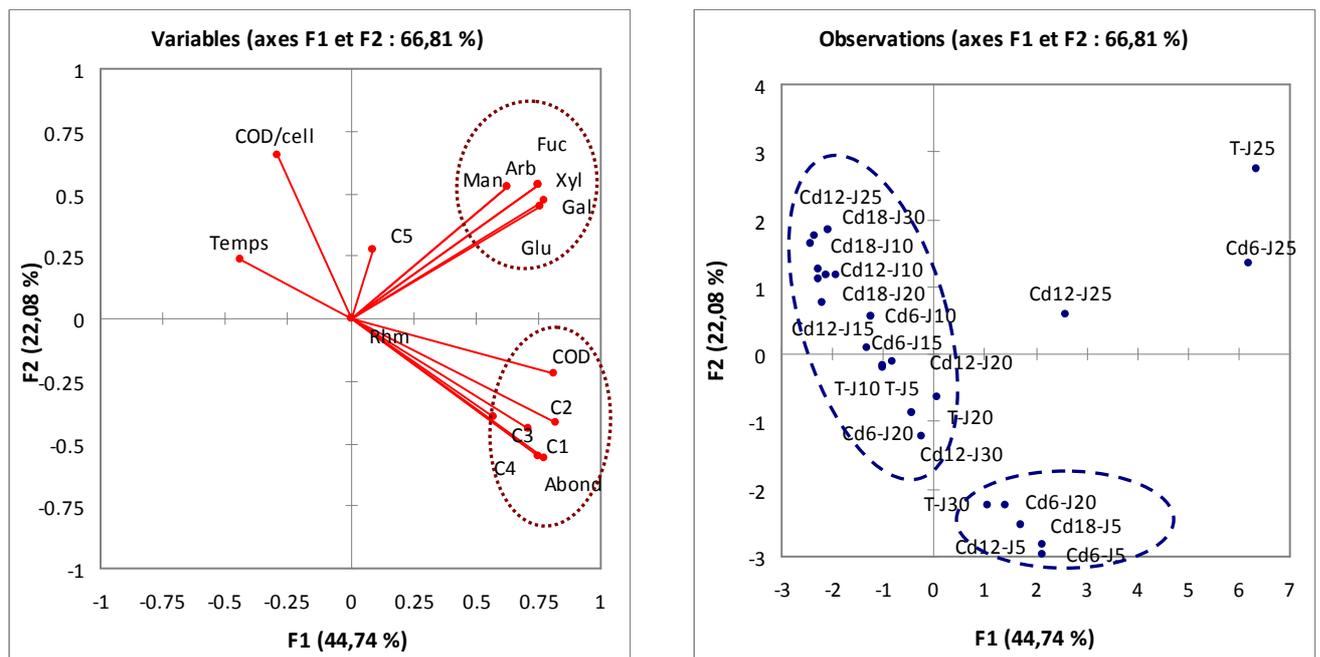
Les axes F1 et F2 extraient respectivement 44,74% et 22,08% de la variance, soit un pourcentage cumulé de 66,81% (Figure 48).

### 4.1. Projection sur l'axe F1

Sur cet axe, du côté positif, se projette un maximum de variables, parmi lesquelles le COD (CTR = 9,79), l'abondance phytoplanctonique (CTR = 8,38), le galactose (CTR = 8,98), le xylose (CTR = 8,48), le fucose (CTR = 8,48), le glucose (CTR = 8,51), C1 (CTR = 7,62), C2 (CTR = 9,99) et C4 (CTR = 8,89). La projection des concentrations en cadmium est également observée sur cet axe C2 et de moindre mesure selon l'axe C1.

### 4.2. Projection sur l'axe F2

Sur cet axe, extrayant 22,08% de la variance totale, se projette le rapport COD/cellule (CTR = 12,80).



**Figure 48.** Projection des variables considérées et concentrations en cadmium, sur les axes F1 et F2 de l'ACP

## VII. COMPARAISON DE L'EXSUDATION PAR *Skeletonema costatum* et *Alexandrium catenella*

L'analyse quantitative et qualitative des molécules exsudées par *Alexandrium catenella* au cours de sa croissance révèle qu'une grande partie des polysaccharides est exsudée pendant la phase exponentielle. Parmi les monosucres composant ces polysaccharides, le glucose était l'aldose le plus exsudé sous la contamination cuivrique (Figures 43 et 44). Cet aldose a également été exsudé par *Skeletonema costatum*, lorsque cette diatomée était soumise à une contamination par ce même métal à forte concentration. Cette réponse, commune aux deux espèces phytoplanctoniques, pourrait leur permettre d'utiliser le glucose comme ligand extracellulaire afin de complexer le cuivre, et ainsi, de réduire la biodisponibilité et la toxicité de ce métal.

De façon similaire, les analyses par fluorescence 3D appliquée aux deux espèces pendant leur croissance, ont mis en évidence plusieurs composantes fluorescentes confirmant l'exsudation de substances extracellulaires dissoutes. Ces substances fluorescentes renferment des substances protéiniques en cas de contamination par le cuivre. De la même façon que pour le glucose, les protéines exsudées par les cellules pourraient constituer un mécanisme modifiant la spéciation métallique dans leur environnement.

## **B- DISCUSSION**

### **I. EFFETS DES DIFFÉRENTS STRESS MÉTALLIQUES SUR LA CROISSANCE D'*Alexandrium catenella***

La croissance d'*Alexandrium catenella* a montré une variabilité importante en réponse aux différents stress métalliques en fonction des concentrations de métaux et de la phase de croissance. Dans les cultures contaminées par les concentrations 3  $\mu\text{M}$  et 6  $\mu\text{M}$ , le cadmium s'est avéré le métal le plus toxique pour la croissance d'*Alexandrium catenella* (Figure 31). Cette toxicité se traduit par une faible densité cellulaire et par un taux de croissance moins élevé ( $0,13 \text{ J}^{-1}$ ), en comparaison avec ceux obtenus en réponses aux contaminations par le cuivre, le zinc ou le plomb ( $0,14 - 0,15 \text{ J}^{-1}$ ). En outre, la diminution de la densité cellulaire induite par le cadmium, se traduit par une perte de 20% de la densité par rapport aux conditions témoins, contre 7% pour le cuivre, le zinc ou le plomb (Figure 32). Cette importante réduction indique que le cadmium affecte la croissance des cellules à des concentrations plus basses que les autres métaux. De plus, la transformation des cellules en kystes, induite par le cadmium à ces concentrations n'a pas été observée pour les autres métaux à ces niveaux de contamination. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par d'autres études (Berland *et al.*, 1976; Morelli et Scarano, 2001), lesquels ont montré des inhibitions de croissance et des perturbations des processus physiologiques de plusieurs espèces phytoplanctoniques contaminées par le cadmium. L'allongement de la phase de latence, observée dans les cultures contaminées par le cadmium par rapport aux autres métaux, a aussi été signalé par Torres *et al.* (1997). Contrairement au cadmium, le plomb a manifesté son effet toxique à partir de 12  $\mu\text{M}$ , induisant une diminution de la densité cellulaire de 22 à 26%, par rapport aux conditions témoins (Figure 32), correspondant à un taux de croissance de l'ordre de  $0,13 \text{ J}^{-1}$ . Toutefois, à partir de 16  $\mu\text{M}$ , le cuivre était le plus toxique des métaux testés, induisant alors une réduction de 97% par rapport aux conditions témoins (Figure 32). En revanche, le zinc a toujours été le moins toxique des métaux à ces concentrations. Néanmoins, les fortes concentrations métalliques (60  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  et 200  $\mu\text{M}$ ) ont inhibé la croissance et par conséquent entraîné, une forte mortalité cellulaire. A ces niveaux de contamination, le taux de croissance cellulaire était nul (Tableau VIII).

Le taux de croissance d'*Alexandrium catenella* enregistré pour les cultures témoins ( $0,25 \text{ J}^{-1}$ ) était inférieur à celui mesuré chez la même espèce ( $0,89 \text{ J}^{-1}$ ) cultivée en conditions de limitations nutritives (Collos *et al.*, 2007). En revanche, il était semblable à celui ( $0,29 \text{ J}^{-1}$ ) reporté par Siu *et al.* (1997) pour *Alexandrium catenella* cultivée à une température entre 20 et 25°C. Une étude récente, conduite par Laabir *et al.* (2011), a montré que les faibles taux de croissance observés chez *Alexandrium catenella* ( $0,30 \text{ J}^{-1}$ ) étaient étroitement liés aux faibles salinités du milieu. Nos résultats révèlent que les taux de croissance d'*Alexandrium catenella* ont progressivement diminué lorsque les concentrations en plomb, cadmium ou cuivre augmentaient dans les milieux de culture (Tableau VIII). Cette diminution suggère que les niveaux élevés de contamination métallique inhibaient la croissance des cellules en agissant sur leurs mécanismes de division cellulaire. Ces résultats sont en accord avec ceux mentionnés par Brand *et al.* (1983, 1986) pour lesquels la réduction de la croissance d'*Alexandrium catenella* était induite par l'excès de cuivre, de zinc ou de cadmium dans le milieu. D'une manière similaire, des travaux plus anciens portant sur la contamination métallique du phytoplankton indiquaient aussi une réduction de la croissance des différentes espèces (Gavis *et al.*, 1981) et une augmentation de la taille cellulaire (Stauber et Florence, 1987). De plus, les concentrations très élevées des quatre métaux testés sur *Alexandrium catenella*, ont induit le phénomène d'enkystement des cellules de cette espèce.

Le comportement des cellules d'*Alexandrium catenella* vis-à-vis des métaux totaux et libres a été examiné grâce à l'utilisation du logiciel de spéciation MINEQL+, en se basant sur le modèle de Sunda *et al.* (1976). Nos résultats révèlent que la biodisponibilité des métaux libres était moins importante pour le cuivre que pour les trois autres métaux étudiés. Les données ainsi calculées pour le cuivre indiquaient de faibles concentrations en métal libre (formes ionique et inorganique) par rapport à celles du métal total. Ces faibles teneurs en fraction libre suggèrent la présence de biomolécules complexantes libérées par les cellules pouvant jouer le rôle de ligands. L'augmentation des teneurs de ces molécules suggérait ensuite une réaction cellulaire en réponse au stress métallique. Les molécules exsudées pourraient posséder des propriétés complexantes vis-à-vis des métaux, et ainsi, protéger les cellules contre l'intoxication et l'apoptose. Ces mêmes observations étaient mentionnées par des études antérieures portant sur la biodisponibilité et la spéciation des métaux (Vasconcelos *et al.*, 2002 ; Le Faucheur *et al.*, 2005). Pour le zinc, la concentration en métal libre a été beaucoup plus élevée que pour le cuivre, le plomb ou le cadmium. Ces fortes concentrations en métaux libres par rapport à celles des métaux totaux, pourraient montrer qu'une faible quantité de molécules ayant un pouvoir complexant, a été exsudée, contrairement à ce qui a

été observé pour le cuivre. De même, le cadmium sous sa forme libre, était présent en fortes concentrations, plus élevées que pour le cuivre et pour le plomb. Ce métal s'associait préférentiellement aux ions  $\text{Cl}^-$  présents dans le milieu de culture. Cette association était faible et la dissociation était rapide, c'est pourquoi la fraction libre obtenue est aussi élevée. Des travaux précédents, réalisés sur des cultures phytoplanctoniques contaminées par les métaux traces, ont mentionné des résultats similaires (Millero et Hawke, 1992). L'influence des métaux libres sur la densité et la croissance des cellules a également été étudiée par Lage *et al.* (1994), lesquels ont montré que l'effet du métal biodisponible (libre) sur la croissance cellulaire était plus important que l'effet de la concentration totale du métal. Comme il a été montré dans des études antérieures (Vasconcelos *et al.*, 2002), les agents chélatants, par exemple l'EDTA utilisé dans la présente étude, ou bien les précipités d'hydroxydes de fer, mais également de manganèse, sont susceptibles de complexer les métaux traces. Ils contribuent par conséquent à la diminution de la fraction libre dans les milieux de cultures. Toutefois, les signaux fluorescents produits par les cellules au cours de leur croissance, correspondant à la FDOM sont capables de former des complexes ligands-métaux. Lorsque les cellules se transforment en kystes, elles pourraient être incapables de réagir à la forme libre du métal, et par conséquent, elles ne produiraient pas de molécules extracellulaires pour complexer le métal. La formation de kystes pourrait donc représenter une stratégie de défense, et dans le même temps, une forme de résistance cellulaire contre les conditions défavorables induites par le stress métallique (Genovesi *et al.*, 2009).

## II. EXSUDATION DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS PAR *Alexandrium catenella* EN RÉPONSE AUX DIFFÉRENTS STRESS MÉTALLIQUES

Au cours de la présente étude, le COD exsudé par *Alexandrium catenella* a subi une variabilité importante de ses concentrations en fonction du niveau de contamination métallique et de la phase de croissance. Ces concentrations atteignaient des valeurs importantes pour des contaminations élevées, principalement pendant la phase exponentielle (Figure 31). Ce carbone pourrait résulter de l'exsudation du phytoplancton, mais aussi de la dégradation des cellules mortes, dans le milieu de culture. En revanche, en réponse à des contaminations très élevées (60  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  et 200  $\mu\text{M}$ ), les concentrations de carbone étaient relativement faibles et ne pourraient résulter que des débris cellulaires. En effet, à ce niveau de contamination, un grand pourcentage de cellules s'est transformé en kystes, les autres cellules subissant une mort cellulaire. Toutefois, il reste difficile de relier l'origine du COD aux kystes, les études sur le sujet étant peu nombreuses, voire inexistantes.

En présence d'une contamination métallique plus faible (3  $\mu\text{M}$  et 6  $\mu\text{M}$ ), au contraire, les cellules libéraient moins de COD, avec un pic modéré d'exsudation observé en début de croissance, suggérant une réaction cellulaire face au stress métallique. Par la suite, la diminution des taux de COD libéré observée jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour, pourrait justifier l'adaptabilité des cellules aux conditions modérément contaminées du milieu (Figure 34).

Les valeurs les plus faibles du rapport COD/Cellule obtenues pour les cultures témoin par comparaison avec les cultures contaminées (Figure 34), pourraient correspondre à une faible libération de molécules par les cellules. D'autre part, les résultats des analyses statistiques appliquées aux conditions contaminantes, révélaient des corrélations positives ( $P < 0,05$ ) entre le COD, l'abondance phytoplanctonique et les concentrations 6  $\mu\text{M}$ , 12  $\mu\text{M}$  et 18  $\mu\text{M}$  de cuivre, de plomb ou de cadmium. Ces corrélations suggèrent que le COD était davantage libéré en présence de métaux, qu'en conditions non contaminantes. Parallèlement, il a été mentionné, en se basant sur les résultats d'ACP, que le COD exsudé était positivement corrélé ( $P < 0,05$ ) aux monosucres libérés, pour le zinc, le plomb et le cadmium (Figures 46, 47 et 48). Une telle corrélation pourrait indiquer qu'une réaction concomitante, matérialisée par une forte production de matière organique, a été déclenchée par les cellules d'*Alexandrium catenella*. Cette matière organique libérée pourrait être destinée aux métaux présents dans le milieu de culture, afin de neutraliser ceux-ci en limitant leur biodisponibilité pour les cellules. D'une manière similaire, des études antérieures avaient montré que le COD

exsudé par plusieurs espèces phytoplanctoniques était principalement constitué d'une fraction importante (15 – 30%) de carbohydrates (Biersmith et Benner, 1998 ; Vasconcelos *et al.*, 2002).

La relation qui pourrait exister entre la contamination métallique et l'exsudation du COD par *Alexandrium catenella*, traduit le degré d'adaptation des cellules aux conditions du milieu. Le carbone exsudé dans le milieu extracellulaire est destiné aux métaux traces, préférentiellement à la forme libre, dans le but de limiter sa biodisponibilité et former des complexes moins toxiques. Ce moyen de défense a également été évoqué par Kaplan *et al.* (1987), lequel montrait que les ions métalliques se fixaient aux polysaccharides anioniques libérés par certaines espèces phytoplanctoniques. Comme il a été montré par de nombreux auteurs (Ćosović, 2005; Plavsić *et al.*, 2006; Lorenzo *et al.*, 2007; Dryden *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008), les substances organiques dissoutes produites par *Alexandrium catenella*, renfermant des ligands type acides aminés et humiques, sont susceptibles de former des complexes ligands-métaux. Par ailleurs, les travaux de Vasconcelos *et al.* (2002) et Strmečki *et al.* (2010) sur des algues marines exposées au stress métallique, affirmaient que les exsudats libérés par les cellules étaient influencés par les teneurs en métaux. Hormis le stress dû aux métaux, la libération du carbone extracellulaire pourrait également être induite en conditions de limitations nutritives (Myklestad, 1995). Ainsi, la libération du COD pendant la phase stationnaire, pourrait être due aux éléments nutritifs devenant limitants en fin de croissance dans le milieu de culture.

### III. COMPOSITION ET CONCENTRATIONS DES MOLÉCULES EXSUDÉES PAR *Alexandrium catenella* EN RÉPONSE AUX DIFFÉRENTS STRESS MÉTALLIQUES

L'exsudation de monosaccharides dans le milieu de culture dépend du métal testé, de sa concentration et de la phase de croissance (Figure 43). En comparant les pourcentages d'aldoses exsudés en conditions témoins et contaminantes, des différences quantitatives plutôt que qualitatives apparaissent (Figure 44). Ainsi, dans les cultures témoins, les cellules libéraient principalement du glucose, puis du galactose et du mannose. À l'inverse, pour des niveaux de contamination de 3  $\mu\text{M}$  et de 6  $\mu\text{M}$ , *Alexandrium catenella* a exsudé, outre du xylose, de l'arabinose et du fucose, dans des proportions variables, bien que le glucose soit clairement le monosaccharide prédominant (Figure 43). Lorsque la contamination était plus importante (12  $\mu\text{M}$ ), les cellules ont alors libéré, en plus, du rhamnose. Pour de fortes contaminations métalliques (18  $\mu\text{M}$ ), les produits d'exsudation étaient principalement composés de glucose et de galactose (Figures 43 et 44). Les cinétiques de libération d'EPS chez *Alexandrium catenella* ont montré une hétérogénéité remarquable en fonction des concentrations croissantes en métaux. D'après les proportions observées, il apparaît que le glucose a été fortement exsudé à 18  $\mu\text{M}$  lorsque les concentrations des autres aldoses ont diminué (Figure 44). Cela suggérerait que dans des conditions de stress, le glucose s'avère être l'aldose le plus libéré dans la MOD (Benner *et al.*, 1992; Pakulski et Benner, 1994). D'une manière similaire, des études antérieures ont mis en évidence la prédominance du glucose dans la matière organique phytoplanctonique, avec des pourcentages allant de 28 à 71% (MacCarthy *et al.*, 1996; Skoog et Benner, 1997). Ainsi, le glucose est considéré comme l'aldose le plus abondant dans les cellules, en raison de sa fonction de réserve pour les espèces phytoplanctoniques (Handa, 1969; Cowie et Hedges, 1984; Hernes *et al.*, 1996). En revanche, d'autres investigations considèrent le galactose comme l'aldose prédominant avec le xylose, puis le glucose, le mannose, le fucose et l'arabinose (Biersmith et Benner, 1998). Hormis l'effet des métaux sur la variabilité quantitative et qualitative des aldoses, d'autres facteurs peuvent aussi interagir comme les concentrations en nutriments, la phase de croissance et l'éclairement (Myklestad, 1989). En outre, les résultats d'ACP montrent des corrélations positives ( $P > 0,05$ ) entre les aldoses exsudés, le COD et l'abondance cellulaire. Ces variables sont également corrélées avec les concentrations modérées (6  $\mu\text{M}$  et 12  $\mu\text{M}$ ) en cuivre, zinc, plomb ou cadmium. Toutes ces observations prouvent des réactions concomitantes

déclenchées par *Alexandrium catenella* visant à neutraliser les métaux libres, en formant des complexes stables moins biodisponibles pour les cellules.

#### **IV. MOLÉCULES FLUORESCENTES EXSUDÉES PAR *Alexandrium catenella* EN RÉPONSE AUX DIFFÉRENTS STRESS MÉTALLIQUES**

Nos résultats montrent différentes réponses de fluorescence au cours de la croissance d'*Alexandrium catenella*. Ces réponses étaient corrélées avec les cinétiques de croissance des cellules pour les composantes C1 et C2, tandis qu'elles étaient constantes pour les composantes C3 et C4 (Figure 35). Deux hypothèses ont été envisagées afin d'expliquer l'évolution de la matière fluorescente exsudée par les cellules en fonction de la croissance et des métaux testés. Selon une première hypothèse, il a été supposé que, si la réponse ne dépendait pas du stress métallique, alors, la contribution de la fluorescence spécifique par cellule devait être constante durant toute la croissance d'*Alexandrium catenella*, même si les concentrations métalliques augmentaient. Cela n'a pas été observé pour les moyennes et les fortes concentrations en métaux totaux, en présence desquelles plus de fluorescence était mesurée durant la croissance (Figures 35 - 42). De plus, la contribution spécifique par cellule a augmenté parallèlement avec la diminution de la densité cellulaire (Figures 35 - 42).

Selon une seconde hypothèse, la production de deux types de molécules fluorescentes est envisagée. Le premier type serait constitué de molécules fluorescentes exsudées par *Alexandrium catenella*, due à l'activité biologique des cellules vivantes en présence des faibles (1  $\mu\text{M}$  et 3  $\mu\text{M}$ ) et moyennes (6  $\mu\text{M}$  et 12  $\mu\text{M}$ ) concentrations. Tandis que le deuxième type proviendrait de la matière organique fluorescente libérée par *Alexandrium catenella*, résultant de la dégradation des cellules exposées à des niveaux très élevés d'ETMs (25  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$ ). Cette dernière a été révélée par les deux composantes fluorescentes C3 et C4, qui ont montré un rapport spécifique, constant en fonction du temps et des teneurs en métaux (plus de cellules mortes pendant la phase stationnaire) (Figure 37). Quant à la composante fluorescente C2, en lien avec les fluorophores de type protéinique / tryptophane (pic T selon Coble, 1996), elle correspondrait au premier type. La présence de cette composante fluorescente dans le milieu de culture, indique la libération de protéines en solution sous l'effet du stress métallique. La production de composantes fluorescentes était généralement forte lorsque la concentration totale du métal était en dessous d'une valeur critique (moins de 60  $\mu\text{M}$ ), pour tous les métaux considérés.

Face au stress métallique induit par le cuivre, le zinc, le plomb ou le cadmium, le phytoplancton réagissait donc en produisant plusieurs molécules fluorescentes. Les deux composantes C1 et C2 ont pu surpasser l'extinction de fluorescence due à la complexation par les métaux, et elles étaient moins affectées par rapport aux composantes C3 et C4. Ceci pourrait indiquer que leurs rôles est important dans la complexation des métaux présents dans le milieu de culture. A l'inverse, C3 et C4 ont été produites en continu au cours de la croissance des cellules (Figures 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 et 42), cette observation suggère leur lien important avec la production de matière organique d'origine marine (Ishii et Boyer, 2012). La variabilité de la fluorescence des composantes C3 et C4 en fonction du temps est gouvernée par la concentration en métal : plus la concentration en métal augmente, moins la contribution est importante, ce qui peut indiquer plus de complexation et donc davantage de quenching (Figure 35). En outre, la présence simultanée des différentes composantes et leur contribution à la fluorescence totale et spécifique (par cellule et par carbone), pendant la phase exponentielle (Figures 35-42), indique qu'elles étaient impliquées dans des mécanismes de défense contre le stress métallique.

Les résultats des analyses en composantes principales ont montré que les concentrations moyennes (6  $\mu\text{M}$  et 12  $\mu\text{M}$ ) sont positivement corrélées aux composantes fluorescentes C1, C2, C3 et C4, à l'abondance cellulaire, et au COD respectivement pour le zinc, le plomb et le cadmium (Figures 35-42). Ces observations pourraient permettre d'affirmer que les substances fluorescentes dans le milieu de culture proviennent des cellules soumises aux faibles concentrations en métaux, et par conséquent suggèrent la deuxième hypothèse comme la plus probable.

## **C- CONCLUSION**

Un des objectifs de ce travail était de réaliser la caractérisation quantitative et qualitative des molécules libérées au cours de la croissance d'*Alexandrium catenella*, dans un milieu contenant différentes concentrations en métaux traces, à savoir le cuivre, le plomb, le zinc ou le cadmium. Les résultats obtenus ont révélé que, dans des conditions de stress métalliques, la croissance d'*Alexandrium catenella* était affectée. Les cellules exposées à de faibles concentrations en métaux (3  $\mu\text{M}$  et 6  $\mu\text{M}$ ) ont montré une croissance moins perturbée que les cellules cultivées en présence de concentrations modérées (12  $\mu\text{M}$  et 16  $\mu\text{M}$ ). De plus, les cellules contaminées par des concentrations supérieures à 18  $\mu\text{M}$  ont commencé à se

transformer en kystes, quel que soit le métal testé. Concernant la classification des métaux en fonction de leur effet inhibiteur sur la croissance, le Cd se manifestait comme le métal le plus toxique, suivi par le plomb, le cuivre et enfin le zinc. Quant à leurs effets sur l'apparition des kystes, le cadmium était toujours classé le premier, suivi par le cuivre, le plomb et enfin le zinc. On pourrait donc conclure que le cadmium est le métal le plus toxique pour la croissance d'*Alexandrium catenella* alors que le Zn est le moins toxique parmi les métaux étudiés. Nos résultats révèlent aussi que la toxicité des métaux sur *Alexandrium catenella* se traduit en termes d'exsudation du COD dans le milieu extracellulaire. Le cuivre et le cadmium ont induit une forte libération du COD/Cellule, par rapport au plomb et au zinc. De plus, le glucose apparaît comme l'aldose prédominant parmi les monosucres exsudés, quel que soit le métal testé. Celui-ci pourrait être utilisé par les cellules comme outil de défense contre le stress métallique. Il a également été observé que les cellules produisaient beaucoup plus d'exsudats extracellulaires lorsqu'elles étaient exposées à des concentrations élevées en métaux. Cette augmentation était couplée, en partie, à l'évolution temporelle des concentrations en COD libéré durant la croissance, quel que soit le métal étudié. Ainsi, la libération des molécules organiques pourrait jouer un rôle important dans la spéciation des métaux. En effet, la matière organique exsudée par les espèces contaminées par les métaux, peut se complexer avec les métaux libres et, par conséquent, former des ligands moins toxiques et moins biodisponibles pour les cellules. Dans ce travail, les matrices d'excitation-émission de la FDOM ont été traitées par l'algorithme PARAFAC, mettant en évidence quatre composantes utilisables. Deux composantes C1 et C2 sont liées à l'activité biologique, et deux autres C3 et C4 sont liées à la matière organique produite par le phytoplancton.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication parue dans *Chemosphere* (Herzi *et al.*, 2013a) (Annexe B) et de deux publications acceptées dans *Journal of Phycology* et *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*.

*CHAPITRE V*

*IMPACT DES ÉLÉMENTS TRACES  
MÉTALLIQUES SUR LE PROTEOME*

*D'Alexandrium catenella*

# A- RESULTATS

## I. IMPACT DU PLOMB SUR LE PROTEOME D'*ALEXANDRIUM CATENELLA*

### 1. Impact de la contamination par le plomb 6 $\mu$ M

#### 1.1- Profils d'expression protéique

Les profils d'expression protéique (PEPs) d'*Alexandrium catenella* cultivée en présence de Pb 6  $\mu$ M sont présentés en Figure 49. Le nombre total de spots détectés sur ces PEPs était en moyenne de  $240 \pm 74$  spots ( $n = 3$ ). Ce résultat était inférieur (29% plus faible) à celui obtenu pour les PEPs Témoin (Figure 50), lesquels montraient un nombre total de spots égal en moyenne à  $339 \pm 89$  spots ( $n = 3$ ). Toutefois, cette différence n'était pas significative (Test de Student :  $P > 0,10$ ).

Les spots protéiques détectés en présence de Pb 6  $\mu$ M sont horizontalement répartis le long d'une gamme de pI comprise entre 4,0 et 7,1, tandis qu'ils sont verticalement distribués dans une gamme de poids moléculaires (MW) allant de 14 à 183 kDa. Cette répartition des spots protéiques était similaire à celle observée sur les PEPs Témoin (Figure 50). Sur la base des critères précédemment définis (chapitre II, partie I, section II.6.), 78 protéines d'intérêt (parmi les 240 protéines détectées) montraient une modification de leur expression, en réponse à la contamination par Pb 6  $\mu$ M. Sur les PEPs Pb 6  $\mu$ M, les protéines sur – exprimées et sous – exprimées sont désignées, respectivement, sous la forme de rectangles et de cercles noirs (Figure 49), tandis qu'elles sont désignées sous la forme de flèches noires sur les PEPs Témoin (Figure 50). Sur les PEPs Témoin, les protéines ayant disparu en réponse à la contamination par Pb 6  $\mu$ M sont signalées sous la forme de cercles blancs (Figure 50). Quelle que soit la nature de la modification de l'expression protéique (sur – expression, sous – expression, disparition), les protéines d'intérêt étaient toujours réparties de façon homogène sur les PEPs (Figures 49 et 50).

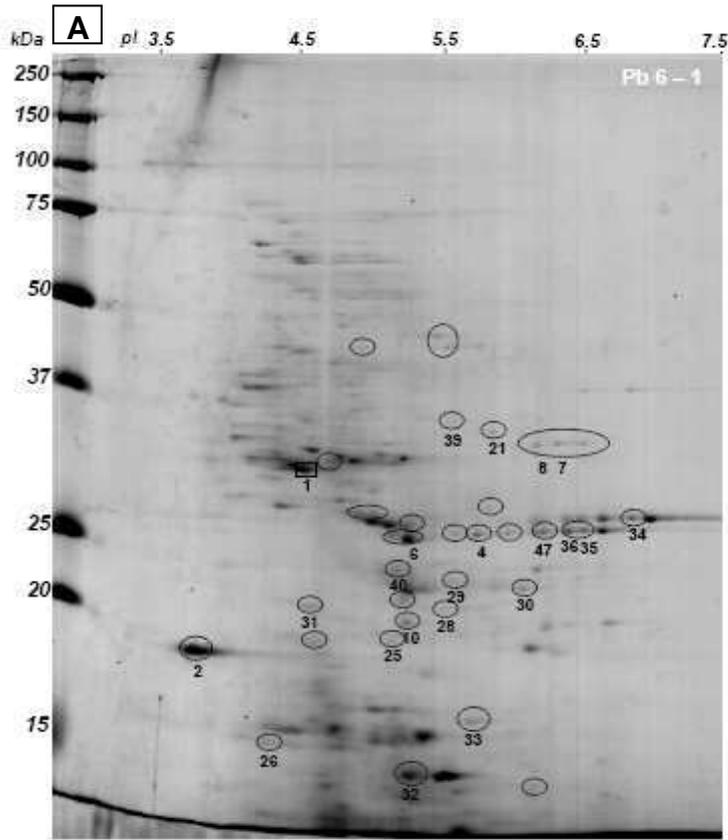
Sur les 78 protéines d'intérêt, une seule protéine (spot 1) était sur – exprimée de façon significative par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ ), tandis que 44 protéines étaient sous – exprimées, parmi lesquelles : 3 protéines (spots 4, 21, 33) l'étaient de façon très significative ( $P < 0,01$ ), 5 protéines (spots 2, 29, 36, 39, 40) de façon significative ( $0,01 < P < 0,05$ ), et 4 protéines (spots 7, 10, 25, 34) de façon assez significative ( $0,05 < P < 0,10$ ). Les protéines qui n'étaient pas sous – exprimées de façon significative par rapport au Témoin ( $P > 0,10$ ), étaient considérées comme indicatrices de modification du protéome lorsque leur sous – expression

s'avérait significative dans d'autres conditions contaminantes, *i.e.* soit en cas de plus forte contamination par le plomb (avec 12  $\mu\text{M}$  et/ou 18  $\mu\text{M}$ ), soit en cas de contamination par le zinc (avec 6  $\mu\text{M}$  et/ou 12  $\mu\text{M}$ , et/ou 18  $\mu\text{M}$ ).

Enfin, parmi les 78 protéines d'intérêt, au moins 33 protéines (exemple : spots 5 et 9) disparaissaient totalement des PEPs Pb 6  $\mu\text{M}$  par rapport au Témoin (Figure 50). Les coordonnées de poids moléculaire (MW) et point isoélectrique (pI) des protéines sur – exprimées, sous – exprimées, disparues, sont indiquées sur les Figures 49 et 50.

## Comparaison contamination par Pb 6 $\mu\text{M}$ vs Témoin

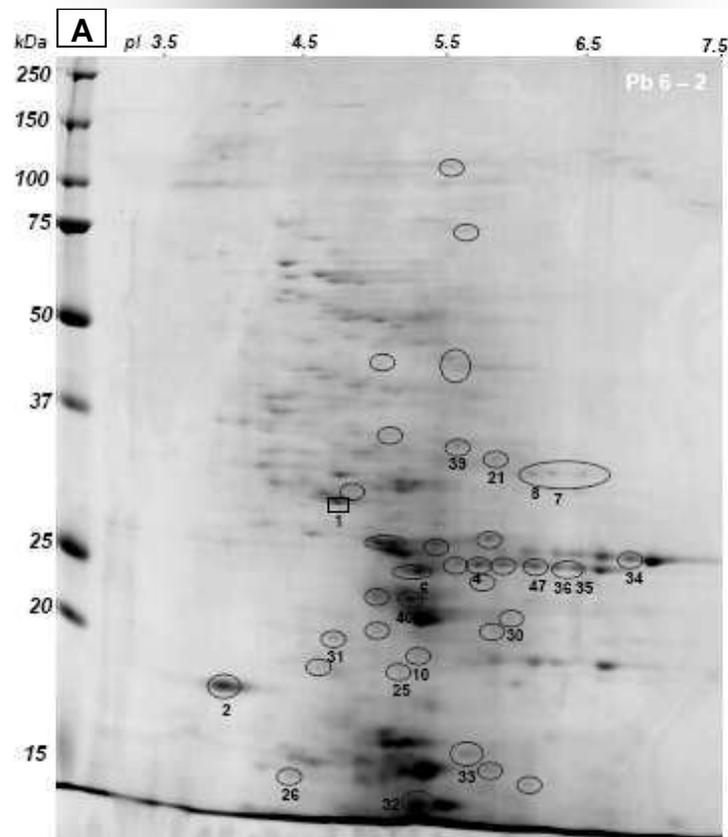
- Noms des protéines sur-exprimées en présence de Pb 6  $\mu\text{M}$
- Noms des protéines sous-exprimées en présence de Pb 6  $\mu\text{M}$



- Protéines sous-exprimées sur les gels *Pb 6* par rapport aux gels *Témoin*
- Protéines sur-exprimées sur les gels *Pb 6* par rapport aux gels *Témoin*

**B**

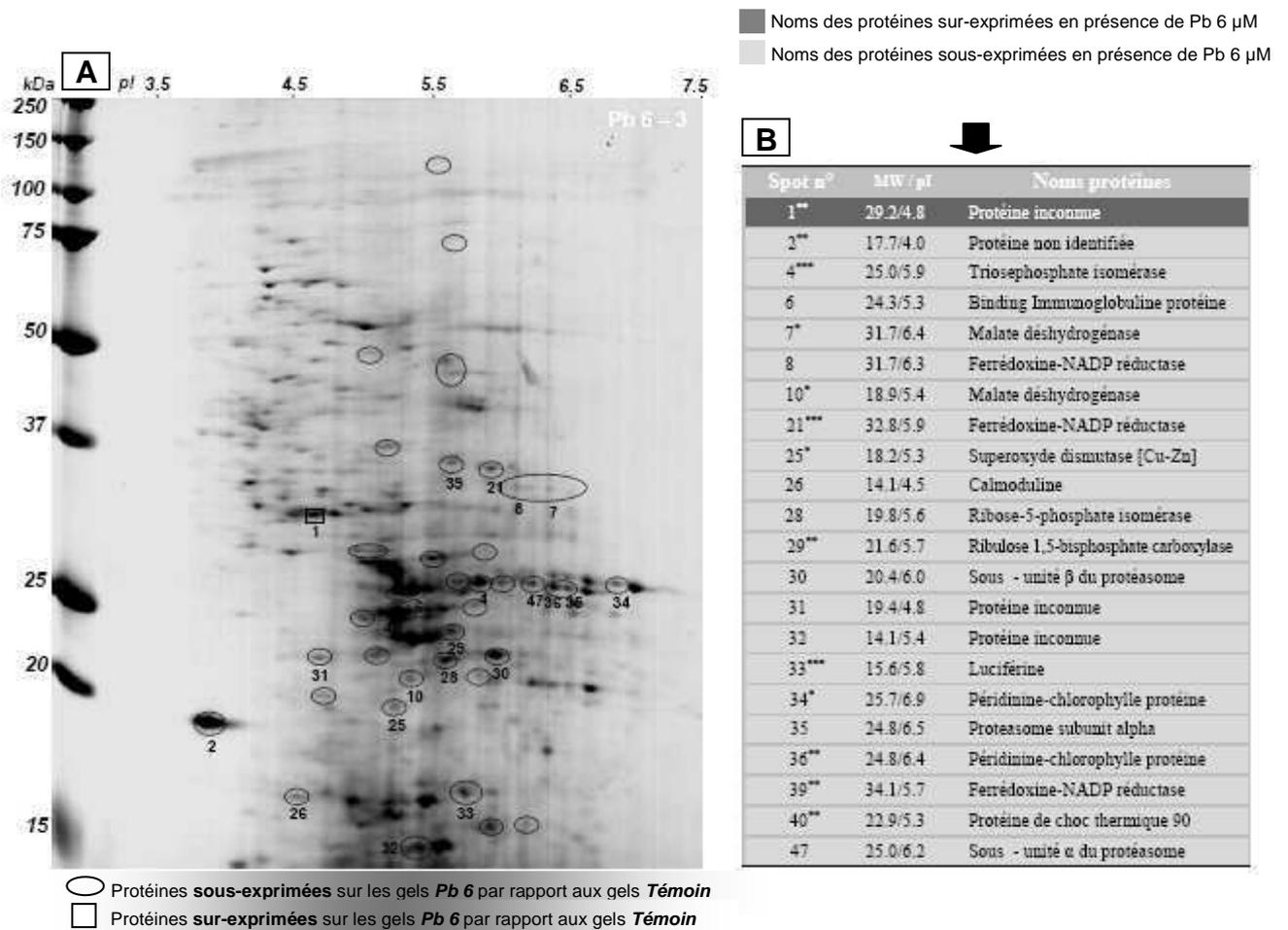
Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1**	29.2/4.8	Protéine inconnue
2**	17.7/4.0	Protéine non identifiée
4***	25.0/5.9	Triosephosphate isomérase
6	24.3/5.3	Binding Immunoglobuline protéine
7*	31.7/6.4	Malate déshydrogénase
8	31.7/6.3	Ferrédoxine-NADP réductase
10*	18.9/5.4	Malate déshydrogénase
21***	32.8/5.9	Ferrédoxine-NADP réductase
25*	18.2/5.3	Superoxyde dismutase [Cu-Zn]
26	14.1/4.5	Calmoduline
28	19.8/5.6	Ribose-5-phosphate isomérase
29**	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
30	20.4/6.0	Sous - unité $\beta$ du protéasome
31	19.4/4.8	Protéine inconnue
32	14.1/5.4	Protéine inconnue
33***	15.6/5.8	Luciférase
34*	25.7/6.9	Péridinine-chlorophylle protéine
35	24.8/6.5	Proteasome subunit alpha
36**	24.8/6.4	Péridinine-chlorophylle protéine
39**	34.1/5.7	Ferrédoxine-NADP réductase
40**	22.9/5.3	Protéine de choc thermique 90
47	25.0/6.2	Sous - unité $\alpha$ du protéasome



- Protéines sous-exprimées sur les gels *Pb 6* par rapport aux gels *Témoin*
- Protéines sur-exprimées sur les gels *Pb 6* par rapport aux gels *Témoin*

**B**

Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1**	29.2/4.8	Protéine inconnue
2**	17.7/4.0	Protéine non identifiée
4***	25.0/5.9	Triosephosphate isomérase
6	24.3/5.3	Binding Immunoglobuline protéine
7*	31.7/6.4	Malate déshydrogénase
8	31.7/6.3	Ferrédoxine-NADP réductase
10*	18.9/5.4	Malate déshydrogénase
21***	32.8/5.9	Ferrédoxine-NADP réductase
25*	18.2/5.3	Superoxyde dismutase [Cu-Zn]
26	14.1/4.5	Calmoduline
30	20.4/6.0	Sous - unité $\beta$ du protéasome
31	19.4/4.8	Protéine inconnue
32	14.1/5.4	Protéine inconnue
33***	15.6/5.8	Luciférase
34*	25.7/6.9	Péridinine-chlorophylle protéine
35	24.8/6.5	Proteasome subunit alpha
36**	24.8/6.4	Péridinine-chlorophylle protéine
39**	34.1/5.7	Ferrédoxine-NADP réductase
40**	22.9/5.3	Protéine de choc thermique 90
47	25.0/6.2	Sous - unité $\alpha$ du protéasome



**Figure 49.** Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures d'*Alexandrium catenella* contaminées par le plomb 6 μM

**A :** Gels 2D montrant les protéines d'intérêt (dont l'expression était modifiée en réponse à la contamination métallique). Les spots numérotés ont été analysés par LC-MS/MS

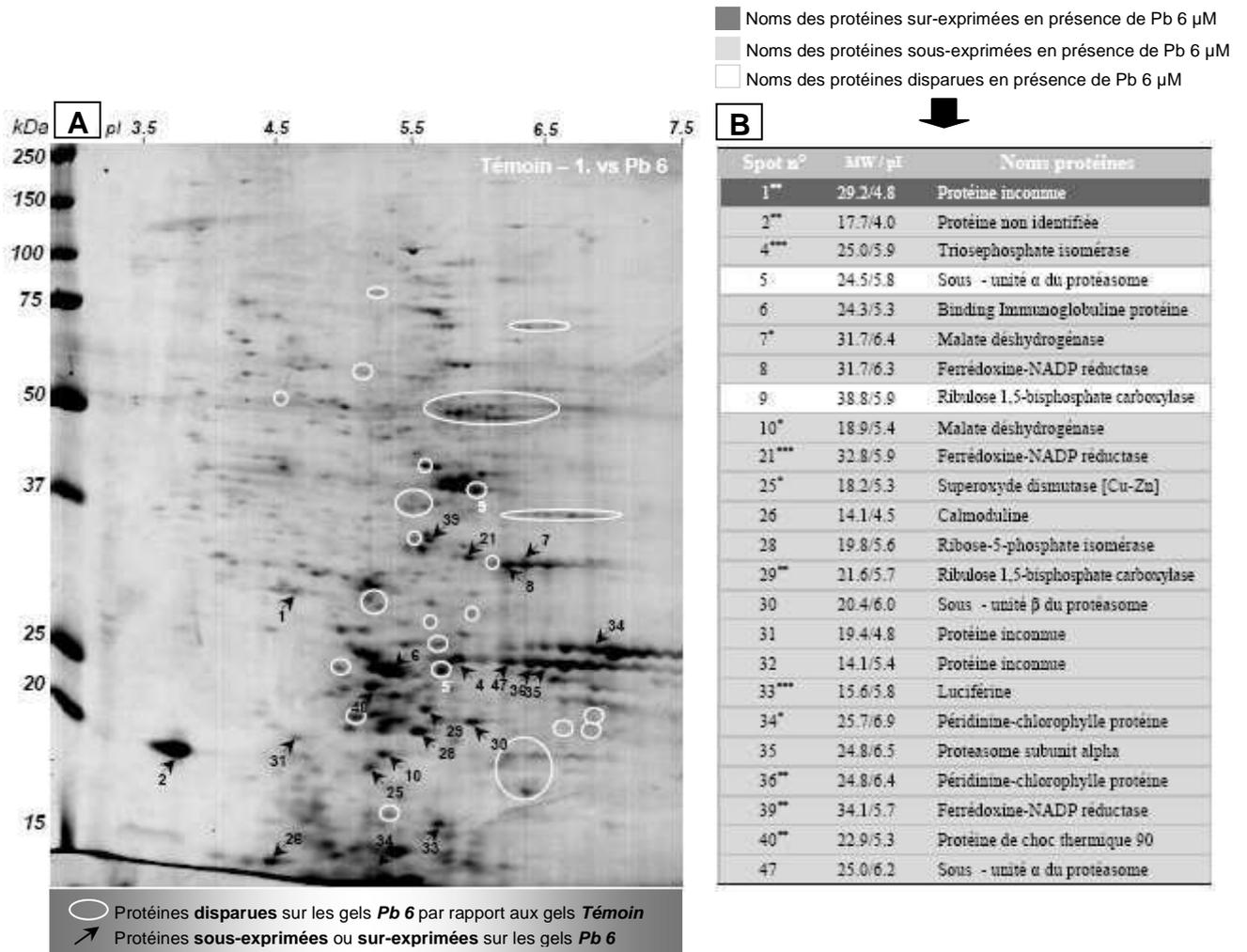
**B :** Noms, poids moléculaires (MW) et points isoélectriques (pI) des protéines d'intérêt

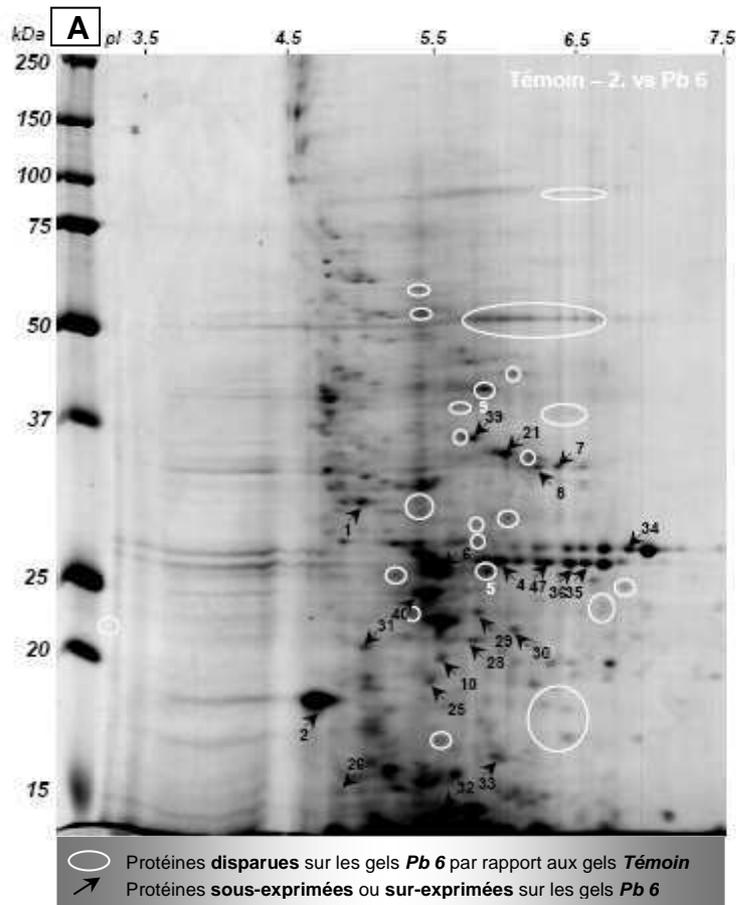
\*\*\* Protéine dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Protéine dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Protéine dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

## Comparaison Témoin vs contamination par Pb 6 µM

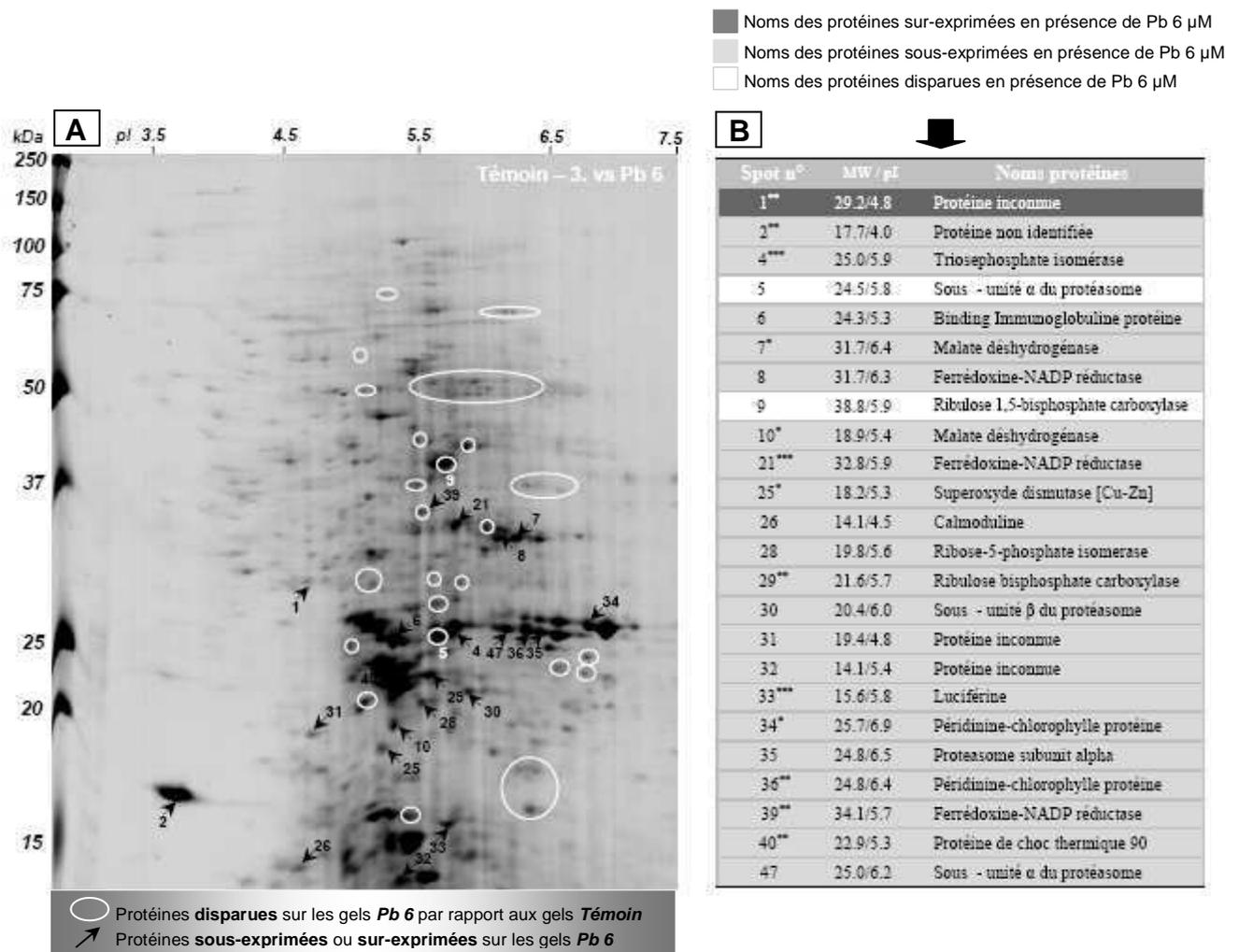




- Noms des protéines sur-exprimées en présence de Pb 6  $\mu\text{M}$
- Noms des protéines sous-exprimées en présence de Pb 6  $\mu\text{M}$
- Noms des protéines disparues en présence de Pb 6  $\mu\text{M}$

**B**

Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1**	29.2/4.8	Protéine inconnue
2**	17.7/4.0	Protéine non identifiée
4***	25.0/5.9	Triosephosphate isomérase
5	24.5/5.8	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
6	24.3/5.3	Binding Immunoglobuline protéine
7*	31.7/6.4	Malate déshydrogénase
8	31.7/6.3	Ferrédoxine-NADP réductase
9	38.8/5.9	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
10*	18.9/5.4	Malate déshydrogénase
21***	32.8/5.9	Ferrédoxine-NADP réductase
25*	18.2/5.3	Superoxyde dismutase [Cu-Zn]
26	14.1/4.5	Calmoduline
28	19.8/5.6	Ribose-5-phosphate isomérase
29**	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
30	20.4/6.0	Sous - unité $\beta$ du protéasome
31	19.4/4.8	Protéine inconnue
32	14.1/5.4	Protéine inconnue
33****	15.6/5.8	Luciférine
34*	25.7/6.9	Péridinine-chlorophylle protéine
35	24.8/6.5	Protéasome subunit alpha
36**	24.8/6.4	Péridinine-chlorophylle protéine
39**	34.1/5.7	Ferrédoxine-NADP réductase
40**	22.9/5.3	Protéine de choc thermique 90
47	25.0/6.2	Sous - unité $\alpha$ du protéasome



**Figure 50.** Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures témoins d'*Alexandrium catenella*

**A :** Gels 2D montrant les protéines d'intérêt (dont l'expression était modifiée en réponse à la contamination métallique). Les spots numérotés ont été analysés par LC-MS/MS

**B :** Noms, MW et pI des protéines d'intérêt

\*\*\* Protéine dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Protéine dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Protéine dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

## 1.2- Identification putative des protéines d'intérêt

Sur les 78 protéines d'intérêt, 24 protéines ont pu être prélevées dans les gels 2D pour identification par LC-MS/MS. Puisqu'*Alexandrium catenella* n'est pas une espèce modèle, peu de séquences peptidiques appartenant à cette espèce sont mentionnées dans les bases de données protéomiques. Par conséquent, l'identification des protéines d'*Alexandrium catenella* s'est avérée putative, nécessitant le plus souvent de réaliser une homologie avec les séquences peptidiques d'autres espèces appartenant au genre *Alexandrium* (*Alexandrium fundyense*, *Alexandrium minutum*, *Alexandrium ostenfeldii*), lorsque cela était possible.

Dans le cas contraire, les séquences d'autres dinoflagellés (*Amphidinium carterae*, *Gonyaulax polyedra*, *Heterocapsa triquetra*, *Karlodinium micrum*, *Oxyrrhis marina*), puis celles de certaines microalgues (*Cryptocodinium cohnii*, *Symbiodinium* sp.), ou protozoaires (*Neospora caninum*, *Paramecium tetraurelia*, *Plasmodinium berghei*, *Tetrahymena thermophila*, *Toxoplasma gondii*), ont été utilisées. Les résultats de l'identification putative des protéines d'intérêt mises en évidence dans cette étude, sont rassemblés dans le Tableau X, avec les coordonnées MW/pI (expérimentales et théoriques) de chaque protéine, et les noms des microorganismes utilisés pour l'analyse, par homologie, des données LC-MS/MS.

Pour certains spots, l'identification protéique s'est avérée infructueuse pour des raisons techniques (séquence peptidique non déterminée). Dans ce cas, les protéines ont été qualifiées de « non identifiées ». Pour certains autres spots, la séquence peptidique a été déterminée mais ne correspondait à aucune protéine connue. Dans ce cas, les protéines correspondantes ont été qualifiées d'« inconnues ».

**Tableau X.** Identification putative par LC-MS/MS des protéines d'intérêt dont l'expression est modifiée par *Alexandrium catenella* en réponse à une contamination métallique par le plomb 6 µM, 12 µM, 18 µM ; ou le zinc 6 µM, 12 µM, 18 µM

Spot n°	Nombre de peptides	MW (kDa) / pI		Noms des protéines	Species Accession number	Fonction biologique putative
		Exp.	Théo.			
1	22	29.2/4.8	-	Inconnue	<i>Paramecium tetraurelia</i> A0CJD5	Protéine non classifiée (99)
4	15	25.0/5.9	28.0/5.3	Triosephosphate isomérase (TPI)	<i>Karlodinium micrum</i> A7YXV7	Glycolyse (02.01)
5	2	24.5/5.8	29.0/5.4	Sous – unité α du protéasome	<i>Oxyrrhis marina</i> EG738318	Dégradation protéasomale (14.13.01.01)
6	11	24.3/5.3	74.3/5.1	Binding Immunoglobuline protéine (BIP - HSP 70)	<i>Cryptocodinium cohnii</i> Q8S4R0	Action chaperonne (14.01)
7	75	31.7/6.4	35.5/7.5	Malate déshydrogénase (MDH)	<i>Karlodinium micrum</i> F2WQ21	Cycle de Krebs (02.10)
8	19	31.7/6.3	45.0/7.0	Ferrédoxine-NADP réductase (FNR)	<i>Heterocapsa triquetra</i> Q5ENS9	Transport d'électron (20.01.15)
9	25	38.8/5.9	59.5/5.4	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (RUBISCO)	<i>Gonyaulax polyedra</i> Q42813	Photosynthèse (02.30)
10	6	18.9/5.4	35.5/7.5	Malate déshydrogénase (MDH)	<i>Karlodinium micrum</i> F2WQ21	Cycle de Krebs (02.10)
12	16	31.7/4.3	50.3/5.1	Inconnue	<i>Plasmodium berghei</i> Q4YAV6	Protéine non classifiée (99)
15	15	30.4/5.1	41.7/8.0	Phosphoglycolate phosphatase (PGP)	<i>Symbiodinium sp.</i> B5LYP0	Métabolisme du phosphore (01.04)
16	3	49.4/5.1	60.0/6.4	Sous – unité β de l'ATP synthase	<i>Neospora caninum</i> F0VGD5	Synthèse ATP (02.45.15)
18	6	46.5/4.9	28.3/4.9	Sous – unité α du protéasome	<i>Toxoplasma gondii</i> B9PR77	Dégradation protéasomale (14.13.01.01)
19	19	18.1/6.2	35.5/7.5	Malate déshydrogénase (MDH)	<i>Karlodinium micrum</i> F2WQ21	Cycle de Krebs (02.10)
20	3	19.1/6.7	38.0/9.1	Péridinine - chlorophylle protéine (PCP)	<i>Alexandrium minutum</i> GW806611	Absorption lumineuse (02.45.03)
21	23	32.8/5.9	45.0/7.0	Ferrédoxine-NADP réductase (FNR)	<i>Heterocapsa triquetra</i> Q5ENS9	Transport d'électron (20.01.15)
25	11	18.2/5.3	17.9/5.9	Superoxyde dismutase [Cu-Zn] (SOD)	<i>Tetrahymena thermophila</i> Q22H00	Detoxification (32.07)
26	3	14.1/4.5	16.8/4.1	Calmoduline (CaM)	<i>Oxyrrhis marina</i> EG730778	Fixation du Calcium (16.17.01)
28	13	19.8/5.6	33.2/5.9	Ribose 5-phosphate isomérase (RPI)	<i>Heterocapsa triquetra</i> Q5ENN9	Voie des Pentoses phosphates (02.07)
29	16	21.6/5.7	79.1/5.8	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (RUBISCO)	<i>Heterocapsa triquetra</i> Q5ENN5	Photosynthèse (02.30)
30	4	20.4/6.0	22.6/6.1	Sous – unité β du protéasome	<i>Alexandrium ostenfeldii</i> HO659379	Dégradation protéasomale (14.13.01.01)
31	3	19.4/4.8	-	Inconnue	<i>Alexandrium minutum</i> GW796469	Protéine non classifiée (99)
32	2	14.1/5.4	-	Inconnue	<i>Oxyrrhis marina</i> EG736358	Protéine non classifiée (99)
33	23	15.6/5.8	74.5/5.6	Luciférine (LBP)	<i>Alexandrium catenella</i> B1PIK4	Bioluminescence (02.45.01)
34	17	25.7/6.9	37.8/6.6	Péridinine - chlorophylle protéine (PCP)	<i>Symbiodinium sp.</i> P51874	Absorption lumineuse (02.45.03)
35	8	24.8/6.5	27.9/5.8	Sous – unité α du protéasome	<i>Alexandrium fundyense</i> A4UHA5	Dégradation protéasomale (14.13.01.01)
36	3	24.8/6.4	38.0/9.1	Péridinine - chlorophylle protéine (PCP)	<i>Alexandrium minutum</i> GW806611	Absorption lumineuse (02.45.03)
37	7	23.8/6.6	27.9/5.8	Sous – unité α du protéasome	<i>Alexandrium fundyense</i> A4UHA5	Dégradation protéasomale (14.13.01.01)
39	2	34.1/5.7	45.0/7.0	Ferrédoxine-NADP réductase (FNR)	<i>Heterocapsa triquetra</i> Q5ENS9	Transport d'électron (20.01.15)
40	8	22.9/5.3	31.9/5.3	Protéine de choc thermique 90 (HSP 90)	<i>Alexandrium fundyense</i> A4UHB7	Action chaperonne (14.01)
41	18	24.6/6.7	38.9/9.0	Péridinine - chlorophylle protéine (PCP)	<i>Gonyaulax polyedra</i> O00941	Absorption lumineuse (02.45.03)
42	3	25.4/7.1	38.0/8.9	Péridinine - chlorophylle protéine (PCP)	<i>Alexandrium minutum</i> GW801171	Absorption lumineuse (02.45.03)
43	17	25.7/6.7	38.2/8.7	Péridinine - chlorophylle protéine (PCP)	<i>Amphidinium carterae</i> P80484	Absorption lumineuse (02.45.03)
44	6	25.8/6.5	27.9/5.8	Sous – unité α du protéasome	<i>Alexandrium fundyense</i> A4UHA5	Dégradation protéasomale (14.13.01.01)
45	8	25.8/6.4	27.9/5.8	Sous – unité α du protéasome	<i>Alexandrium fundyense</i> A4UHA5	Dégradation protéasomale (14.13.01.01)
46	7	25.8/6.2	27.9/5.8	Sous – unité α du protéasome	<i>Alexandrium fundyense</i> A4UHA5	Dégradation protéasomale (14.13.01.01)
47	5	25.0/6.2	27.9/5.8	Sous – unité α du protéasome	<i>Alexandrium fundyense</i> A4UHA5	Dégradation protéasomale (14.13.01.01)

L'analyse des séquences de 23 protéines sur les 24 protéines d'intérêt prélevées, a conduit à un résultat d'identification.

Aucune fonction biologique connue n'a pu être assignée à la protéine associée au spot 1, seule protéine sur – exprimée significativement, sa séquence n'étant homologue qu'à celle d'une protéine inconnue rencontrée chez *Paramecium tetraurelia* (Tableau X).

Les séquences des protéines associées aux spots 4, 21 et 33, sous – exprimées très significativement, étaient respectivement homologues à celles des protéines : triosephosphate isomérase (TPI) exprimée par *Karlodinium micrum*, ferrédoxine – NADP réductase (FNR) séquencée chez *Heterocapsa triquetra*, et luciférine (LBP) synthétisée par *Alexandrium catenella*.

Les séquences des protéines associées aux spots 29, 36, 39 et 40, sous – exprimées significativement, étaient respectivement homologues à celles des protéines : ribulose 1,5 – bisphosphate carboxylase (RUBISCO) exprimée par *Gonyaulax polyedra*, péridinine – chlorophylle protéine (PCP) séquencée chez *Alexandrium minutum*, FNR séquencée chez *Heterocapsa triquetra*, et protéine de choc thermique 90 (HSP 90) exprimée par *Alexandrium fundyense*.

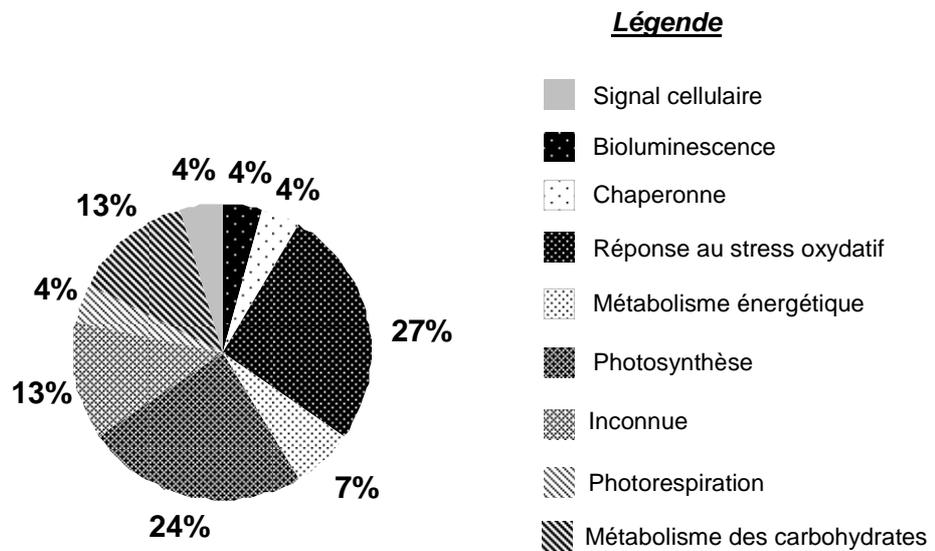
Les séquences des protéines associées aux spots 7, 10, 25 et 34, sous – exprimées assez significativement, étaient respectivement homologues à celles des protéines : malate déshydrogénase (MDH) exprimée par *Karlodinium micrum*, superoxyde dismutase [Cu – Zn] (SOD) séquencée chez *Tetrahymena thermophila*, et péridinine – chlorophylle (PCP) séquencée chez *Symbiodinium* sp.

Les séquences des protéines disparues associées aux spots 5 et 9, étaient respectivement homologues à celles des protéines : sous – unité  $\alpha$  du protéasome exprimée par *Oxyrrhis marina*, et RUBISCO séquencée chez *Gonyaulax polyedra*.

### 1.3- Catégories fonctionnelles des protéines d'intérêt

Les protéines d'intérêt, exprimées en réponse à la contamination par Pb 6  $\mu$ M, étaient associées à huit catégories fonctionnelles connues : signal cellulaire, bioluminescence, action chaperonne, réponse au stress oxydatif, métabolisme énergétique, photosynthèse, photorespiration et métabolisme des carbohydrates (Figure 51).

La réponse au stress oxydatif, *via* les sous – unités du protéasome, la SOD, HSP 90 et la Binding Immunoglobuline protéine (BIP) ; puis la photosynthèse, *via* la RUBISCO, la PCP, la FNR, la TPI et la ribose 5 – phosphate isomérase (RPI), représentaient, dans cet ordre, les deux catégories fonctionnelles les plus affectées par Pb 6  $\mu$ M (27% des protéines identifiées concernaient la réponse au stress oxydatif, 24% concernaient la photosynthèse). Puis, le métabolisme des carbohydrates (TPI, MDH, RPI) (13%), le métabolisme énergétique (FNR) (7%), la photorespiration (RUBISCO) (4%), le signal cellulaire (CaM) (4%), la bioluminescence (LBP) (4%) et l'action chaperonne (HSP 90, BIP) (4%), étaient les fonctions biologiques moins perturbées par cette contamination.

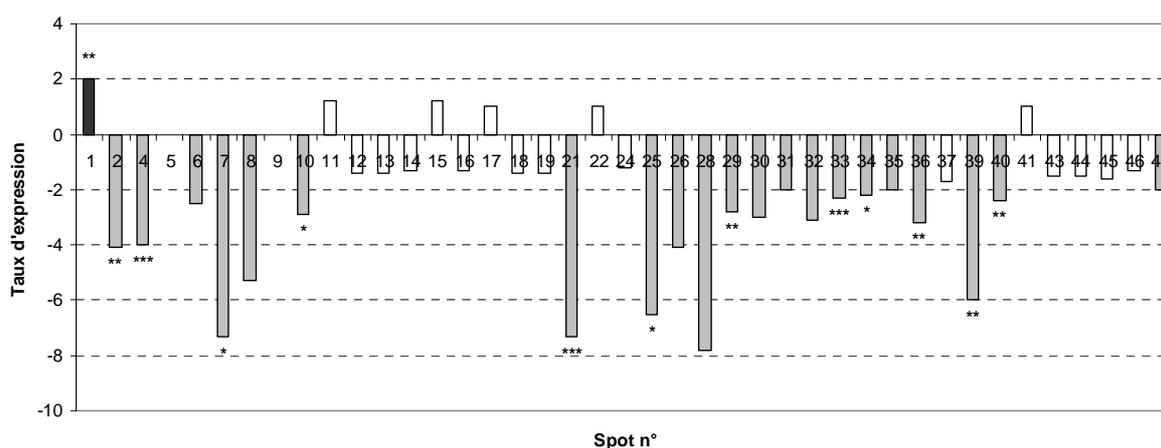


**Figure 51.** Distribution des fonctions biologiques assignées aux protéines d'intérêt exprimées par *Alexandrium catenella* en réponse à une contamination par Pb 6  $\mu$ M

#### 1.4- Taux d'expression des protéines analysées par LC-MS/MS

Les taux d'expression calculés dans le cas de la contamination par Pb 6  $\mu\text{M}$ , sont présentés sur la Figure 52, avec des signes positifs affectés aux taux de sur – expression, et des signes négatifs affectés aux taux de sous – expression.

La Figure 52 confirmait les perturbations du protéome d'*Alexandrium catenella* cultivée en présence de Pb 6  $\mu\text{M}$ , certaines protéines montrant une expression modifiée de -7,3 à +2,0 fois par rapport aux conditions Témoin ( $P < 0,10$ ). La seule protéine sur – exprimée (spot 1), inconnue, était +2,0 fois sur - exprimée en réponse à la contamination par Pb 6  $\mu\text{M}$ . Toutefois, les protéines les plus affectées par la contamination étaient sous – exprimées, il s'agissait de la MDH (spot 7) et de la FNR (spot 21), montrant des taux d'expression de -7,3 chacune. Puis, Pb 6  $\mu\text{M}$  avait un impact plus faible, quoique toujours significatif, sur la sous – expression des protéines : SOD (spot 25 : -6,5), TPI (spot 4 : -4,0), PCP (spot 36 : -3,2), RUBISCO (spot 29 : -2,8), HSP 90 (spot 40 : -2,4) et LBP (spot 33 : -2,3).



**Figure 52.** Taux d'expression des protéines d'intérêt exprimées par *Alexandrium catenella* en réponse à une contamination par Pb 6  $\mu\text{M}$ . L'axe des ordonnées indique le taux moyen d'expression de chaque protéine ; les valeurs positives, en noir, indiquent les taux d'expression des protéines sur – exprimées (taux  $\geq +2$ ) ; les valeurs négatives, en gris, indiquent les taux d'expression des protéines sous – exprimées (taux  $\leq -2$ ). En blanc, sont représentés les taux d'expression les moins modifiés ( $-2 < \text{taux} < +2$ ), de certaines protéines. Le taux d'expression des protéines disparues est égal à 0

\*\*\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

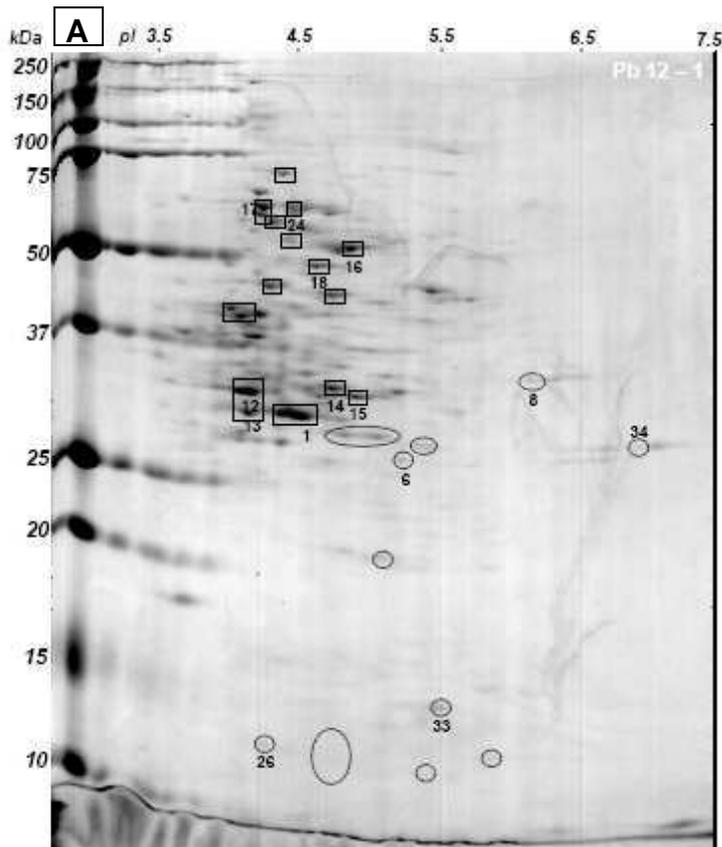
## 2. Impact de la contamination par le plomb 12 $\mu\text{M}$

### 2.1- Profils d'expression protéique

Les profils d'expression protéique (PEPs) d'*Alexandrium catenella* cultivée en présence de Pb 12  $\mu\text{M}$  sont présentés en Figure 53. Le nombre total de spots détectés sur ces PEPs était en moyenne de  $202 \pm 98$  spots ( $n = 3$ ). Ce résultat était inférieur (40% plus faible) à celui obtenu pour les PEPs Témoin (Figure 54), lesquels montraient un nombre total de spots égal en moyenne à  $339 \pm 89$  spots ( $n = 3$ ). Toutefois, cette différence n'était pas significative (Test de Student :  $P > 0,10$ ).

Les spots protéiques détectés en présence de Pb 12  $\mu\text{M}$  sont horizontalement répartis le long d'une gamme de pI comprise entre 4,0 et 7,1, tandis qu'ils sont verticalement distribués dans une gamme de MW allant de 14 à 183 kDa. Cette répartition des spots protéiques était similaire à celle observée sur les PEPs Pb 6  $\mu\text{M}$  et Témoin (Figures 49 et 54). Sur la base des critères précédemment définis (chapitre II, partie I, section II.6.), 107 protéines d'intérêt (parmi les 202 protéines détectées) montraient une modification de leur expression, en réponse à la contamination par Pb 12  $\mu\text{M}$ . Sur les 107 protéines d'intérêt, 18 protéines étaient sur – exprimées par rapport au Témoin, parmi lesquelles : 6 protéines (spots 1, 12, 14, 16, 17, 18) l'étaient de façon très significative ( $P < 0,01$ ), et 2 protéines (spots 13, 15) de façon significative ( $0,01 < P < 0,05$ ). L'ensemble des protéines sur – exprimées était regroupé dans la moitié supérieure gauche des PEPs Pb 12  $\mu\text{M}$ , avec des pI allant de 4,3 à 5,1, et des MW entre 29 et 72 kDa (Figure 53). Puis, 16 protéines étaient sous – exprimées par rapport au Témoin, parmi lesquelles une protéine (spot 34) l'était de façon assez significative ( $0,05 < P < 0,10$ ). L'ensemble des protéines sous – exprimées était regroupé dans la moitié inférieure des PEPs Pb 12  $\mu\text{M}$ , avec des pI entre 4,5 et 6,9, et des MW allant de 14 à 32 kDa (Figure 53). Les protéines dont la différence d'expression n'était pas significative ( $P > 0,10$ ) par rapport au Témoin, étaient considérées comme indicatrices de modification du protéome lorsque leur différence d'expression s'avérait significative dans d'autres conditions contaminantes, *i.e.* soit en présence d'autres concentrations de plomb (avec 6  $\mu\text{M}$  et/ou 18  $\mu\text{M}$ ), soit en cas de contamination par le zinc (avec 6  $\mu\text{M}$  et/ou 12  $\mu\text{M}$ , et/ou 18  $\mu\text{M}$ ). Enfin, parmi les 107 protéines d'intérêt, au moins 73 protéines (exemple : spots 5, 6, 9, 10, 19, 21, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 39, 40) disparaissaient totalement des PEPs Pb 12  $\mu\text{M}$  par rapport au Témoin. Ces protéines étaient distribuées de façon homogène sur les PEPs Témoin (Figure 54). Les coordonnées MW/pI des protéines sur – exprimées, sous – exprimées ou disparues, sont indiquées dans les Figures 53 et 54.

## Comparaison contamination par Pb 12 $\mu$ M vs Témoin

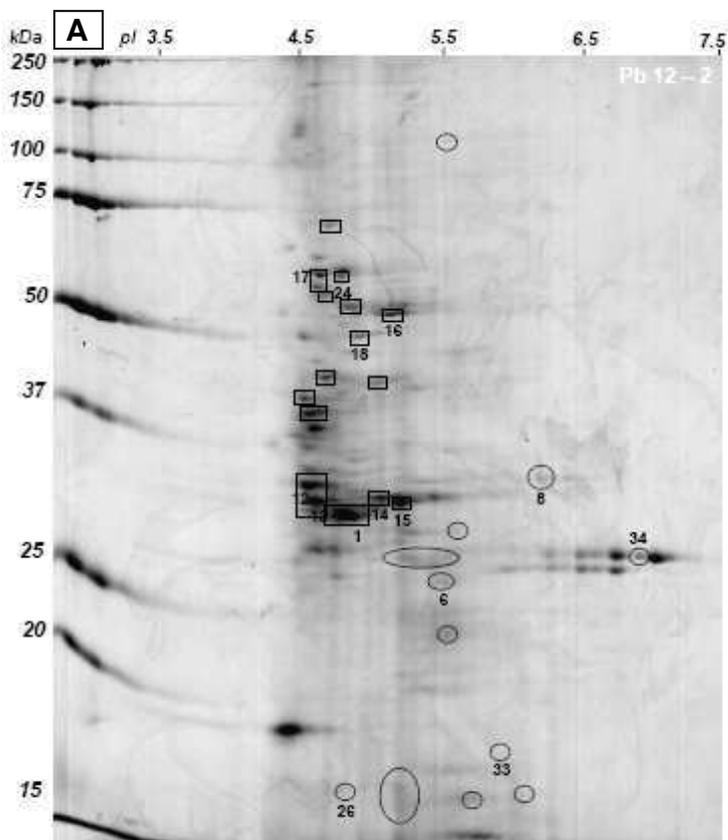


■ Noms des protéines sur-exprimées en présence de Pb 12  $\mu$ M  
 □ Noms des protéines sous-exprimées en présence de Pb 12  $\mu$ M

**B**

Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1***	29.2/4.8	Protéine inconnue
8	31.7/6.3	Ferrédoxine-NADP réductase
12***	31.7/4.3	Protéine inconnue
13**	30.3/4.4	Protéine non identifiée
14***	30.7/5.0	Protéine non identifiée
15**	30.4/5.1	Phosphoglycolate phosphatase
16***	49.4/5.1	Sous - unité $\beta$ de l'ATP synthase
17***	59.0/4.5	Protéine non identifiée
18***	46.5/4.9	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
24	57.4/4.8	Protéine non identifiée
26	14.1/4.5	Calmoduline
34*	25.7/6.9	Péridinine-chlorophylle protéine

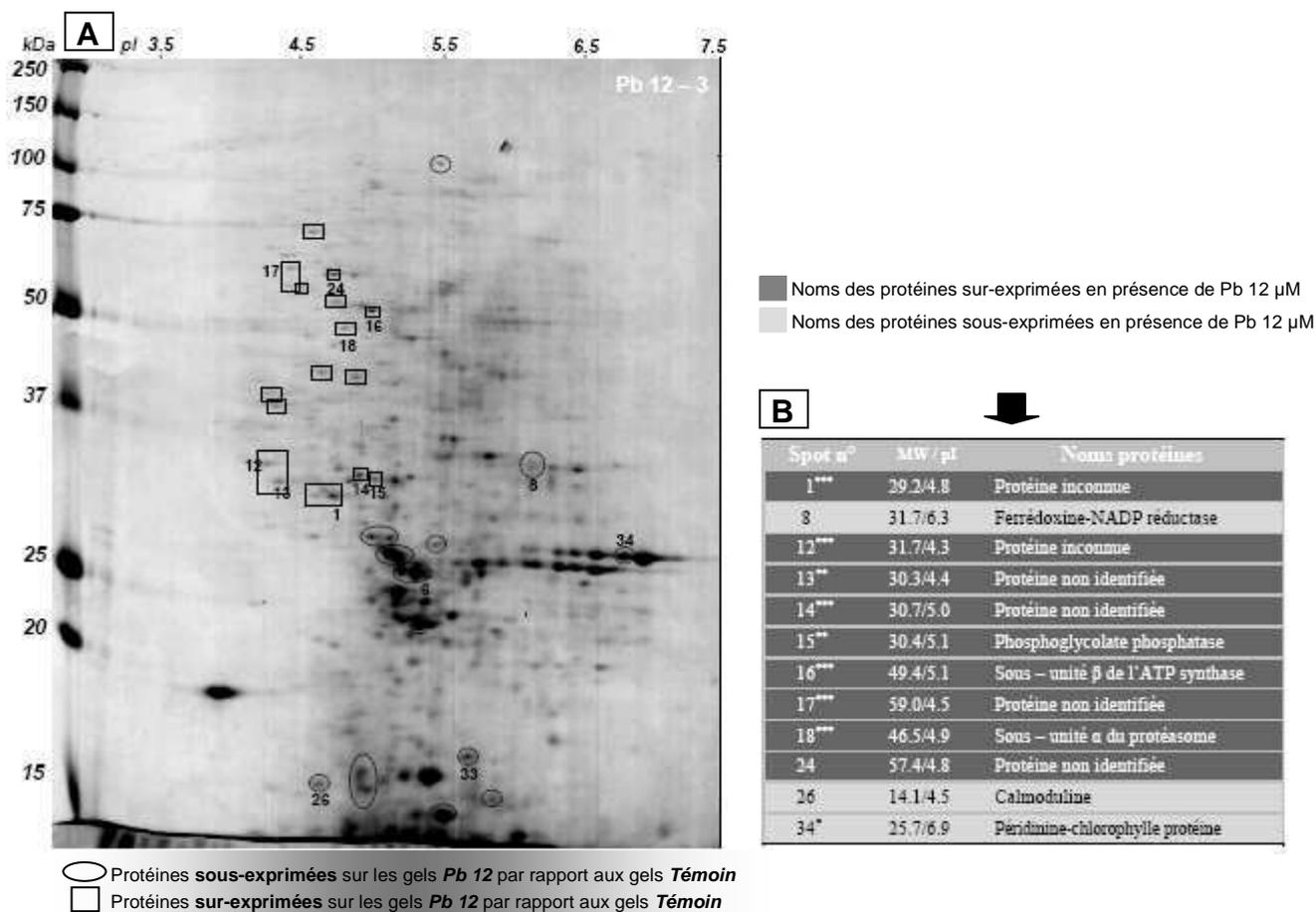
○ Protéines **sous-exprimées** sur les gels **Pb 12** par rapport aux gels **Témoin**  
 □ Protéines **sur-exprimées** sur les gels **Pb 12** par rapport aux gels **Témoin**



**B**

Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1***	29.2/4.8	Protéine inconnue
8	31.7/6.3	Ferrédoxine-NADP réductase
12***	31.7/4.3	Protéine inconnue
13**	30.3/4.4	Protéine non identifiée
14***	30.7/5.0	Protéine non identifiée
15**	30.4/5.1	Phosphoglycolate phosphatase
16***	49.4/5.1	Sous - unité $\beta$ de l'ATP synthase
17***	59.0/4.5	Protéine non identifiée
18***	46.5/4.9	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
24	57.4/4.8	Protéine non identifiée
26	14.1/4.5	Calmoduline
34*	25.7/6.9	Péridinine-chlorophylle protéine

○ Protéines **sous-exprimées** sur les gels **Pb 12** par rapport aux gels **Témoin**  
 □ Protéines **sur-exprimées** sur les gels **Pb 12** par rapport aux gels **Témoin**



**Figure 53.** Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures d'*Alexandrium catenella* contaminées par le plomb 12  $\mu\text{M}$

**A :** Gels 2D montrant les protéines d'intérêt (dont l'expression est modifiée en réponse à la contamination métallique). Les spots numérotés ont été analysés par LC-MS/MS

**B :** Noms, MW et pI des protéines d'intérêt

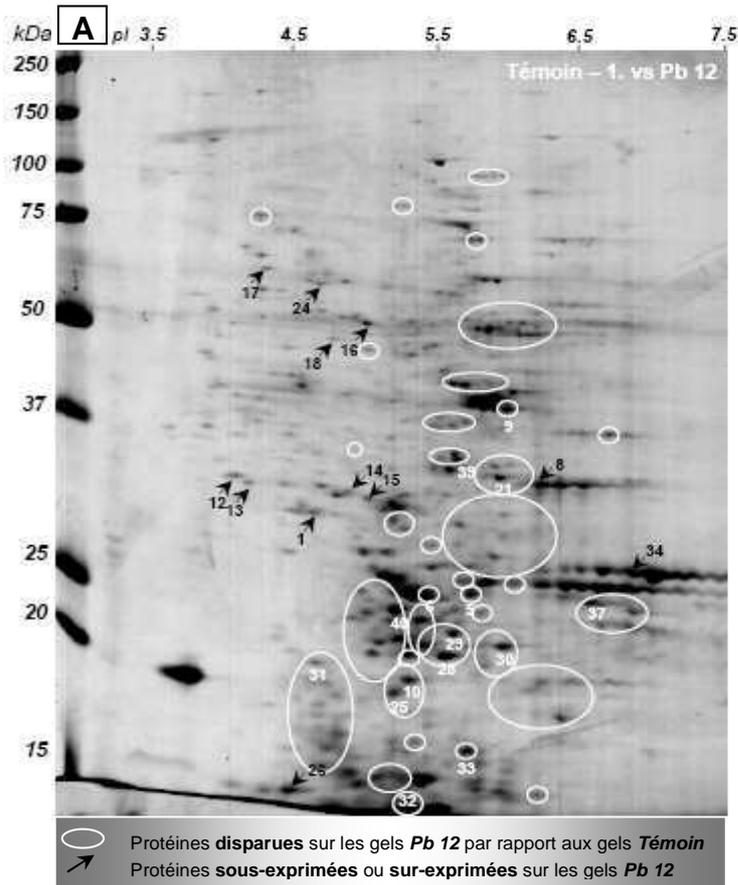
\*\*\* Protéine dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Protéine dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Protéine dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

## Comparaison Témoin vs contamination par Pb 12 µM

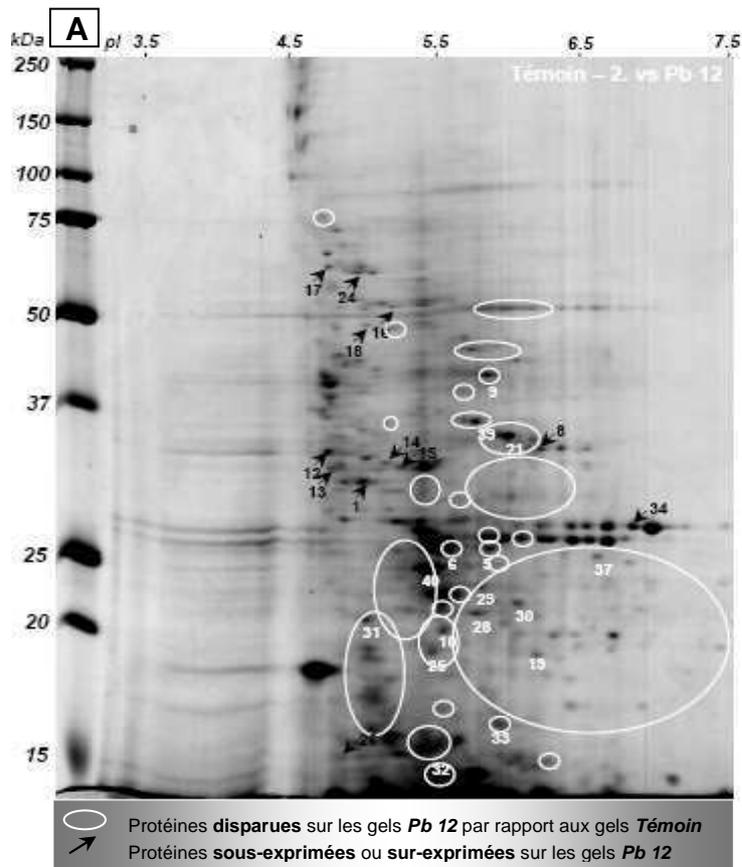
- Noms des protéines sur-exprimées en présence de Pb 12 µM
- Noms des protéines sous-exprimées en présence de Pb 12 µM
- Noms des protéines disparues en présence de Pb 12 µM



**B**

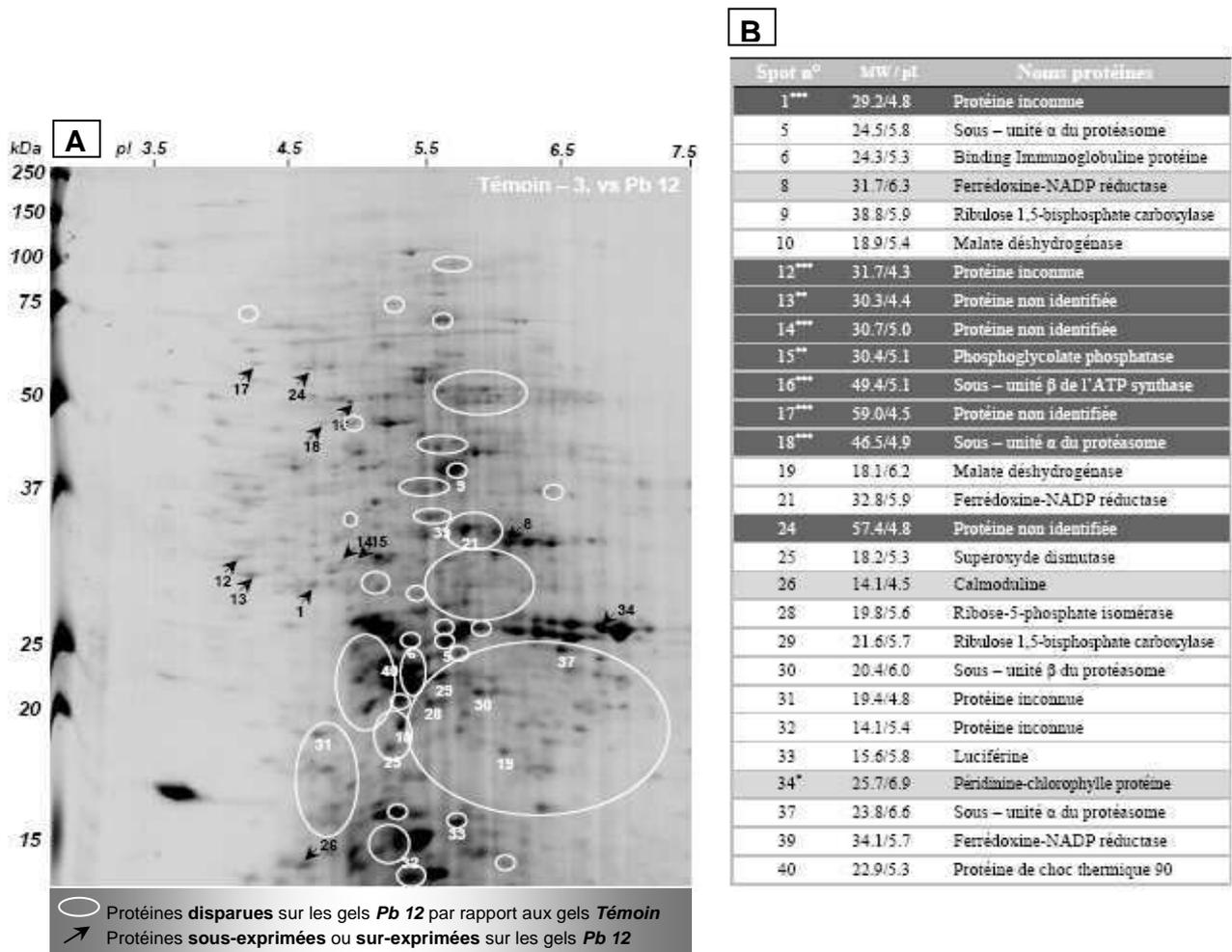


Spot n°	MW/pI	Noms protéines
1***	29.2/4.8	Protéine inconnue
5	24.5/5.8	Sous – unité α du protéasome
6	24.3/5.3	Binding Immunoglobuline protéine
8	31.7/6.3	Ferrédoxine-NADP réductase
9	38.8/5.9	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
10	18.9/5.4	Malate déshydrogénase
12***	31.7/4.3	Protéine inconnue
13**	30.3/4.4	Protéine non identifiée
14***	30.7/5.0	Protéine non identifiée
15**	30.4/5.1	Phosphoglycolate phosphatase
16***	49.4/5.1	Sous – unité β de l'ATP synthase
17***	59.0/4.5	Protéine non identifiée
18***	46.5/4.9	Sous – unité α du protéasome
21	32.8/5.9	Ferrédoxine-NADP réductase
24	57.4/4.8	Protéine non identifiée
25	18.2/5.3	Superoxyde dismutase
26	14.1/4.5	Calmoduline
28	19.8/5.6	Ribose-5-phosphate isomérase
29	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
30	20.4/6.0	Sous – unité β du protéasome
31	19.4/4.8	Protéine inconnue
32	14.1/5.4	Protéine inconnue
33	15.6/5.8	Luciférase
34*	25.7/6.9	Péridinine-chlorophylle protéine
37	23.8/6.6	Sous – unité α du protéasome
39	34.1/5.7	Ferrédoxine-NADP réductase
40	22.9/5.3	Protéine de choc thermique 90



**B**

Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1***	29.2/4.8	Protéine inconnue
5	24.5/5.8	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
6	24.3/5.3	Binding Immunoglobuline protéine
8	31.7/6.3	Ferrédoxine-NADP réductase
9	38.8/5.9	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
10	18.9/5.4	Malate déshydrogénase
12***	31.7/4.3	Protéine inconnue
13**	30.3/4.4	Protéine non identifiée
14***	30.7/5.0	Protéine non identifiée
15**	30.4/5.1	Phosphoglycolate phosphatase
16***	49.4/5.1	Sous - unité $\beta$ de l'ATP synthase
17***	59.0/4.5	Protéine non identifiée
18***	46.5/4.9	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
19	18.1/6.2	Malate déshydrogénase
21	32.8/5.9	Ferrédoxine-NADP réductase
24	57.4/4.8	Protéine non identifiée
25	18.2/5.3	Superoxyde dismutase
26	14.1/4.5	Calmoduline
28	19.8/5.6	Ribose-5-phosphate isomérase
29	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
30	20.4/6.0	Sous - unité $\beta$ du protéasome
31	19.4/4.8	Protéine inconnue
32	14.1/5.4	Protéine inconnue
33	15.6/5.8	Luciférase
34*	25.7/6.9	Péridinine-chlorophylle protéine
37	23.8/6.6	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
39	34.1/5.7	Ferrédoxine-NADP réductase
40	22.9/5.3	Protéine de choc thermique 90



**Figure 54.** Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures témoins d'*Alexandrium catenella*

**A :** Gels 2D montrant les protéines d'intérêt (dont l'expression était modifiée en réponse à la contamination métallique). Les spots numérotés ont été analysés par LC-MS/MS

**B :** Noms, MW et pI des protéines d'intérêt

\*\*\* Protéine dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Protéine dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Protéine dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

## 2.2- Identification putative des protéines d'intérêt

Sur les 107 protéines d'intérêt, 28 protéines ont pu être prélevées dans les gels 2D pour identification par LC-MS/MS. L'analyse des séquences de 24 protéines sur les 28 protéines d'intérêt prélevées, a conduit à un résultat d'identification.

Parmi les protéines sur – exprimées très significativement, les séquences des protéines associées aux spots 16 et 18 étaient respectivement homologues à celles des protéines : sous - unité  $\beta$  de l'ATP synthase exprimée par *Neospora caninum*, et sous - unité  $\alpha$  du protéasome séquencée chez *Toxoplasma gondii* (Tableau X). En revanche, aucune fonction biologique connue n'a pu être attribuée aux protéines des spots 1 et 12, la séquence de ces protéines n'étant homologue qu'à celles de protéines inconnues, respectivement rencontrées chez *Paramecium tetraurelia* et *Plasmodium berghei*, tandis que l'identification des protéines associées aux spots 13, 14 et 17 n'a abouti à aucun résultat. Sur les 2 protéines sur – exprimées significativement, seule la protéine associée au spot 15 a été putativement identifiée comme étant homologue à la phosphoglycolate phosphatase (PGP), séquencée chez *Symbiodinium* sp.

La séquence de la protéine associée au spot 34 sous – exprimée assez significativement, était homologue à celle de la protéine PCP, séquencée chez *Symbiodinium* sp.

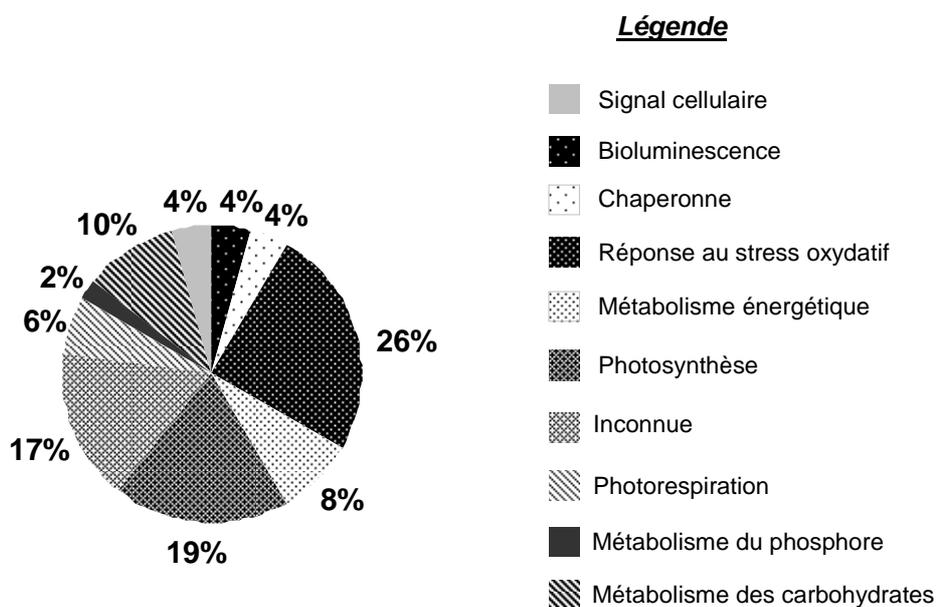
Enfin, les séquences de nombreuses protéines disparues, notamment celles des protéines associées aux spots 5, 37, 6, 9, 29, 10, 19, 21, 39, 25, 28, 30, 33, et 40, étaient respectivement homologues à celles des protéines : sous – unités  $\alpha$  du protéasome exprimées par *Oxyrrhis marina* et *Alexandrium fundyense*, BIP rencontrée chez *Cryptocodinium cohnii*, RUBISCO séquencée chez *Gonyaulax polyedra* et *Heterocapsa triquetra*, MDH chez *Karlodinium micrum*, FNR chez *Heterocapsa triquetra*, SOD chez *Tetrahymena thermophila*, RPI chez *Heterocapsa triquetra*, sous – unité  $\beta$  du protéasome exprimée par *Alexandrium ostenfeldii*, LBP chez *Alexandrium catenella* et HSP 90 exprimée par *Alexandrium fundyense*.

Pour certains spots, l'identification protéique s'est avérée infructueuse pour des raisons techniques (séquence peptidique non déterminée). Dans ce cas, les protéines ont été qualifiées de « non identifiées ». Pour certains autres spots, la séquence peptidique a été déterminée mais ne correspondait à aucune protéine connue. Dans ce cas, les protéines correspondantes ont été qualifiées d'« inconnues ».

### 2.3- Catégories fonctionnelles des protéines d'intérêt

Les protéines d'intérêt, exprimées en réponse à la contamination par Pb 12  $\mu$ M, étaient associées à neuf catégories fonctionnelles connues : signal cellulaire, bioluminescence, action chaperonne, réponse au stress oxydatif, métabolisme énergétique, photosynthèse, photorespiration, métabolisme du phosphore et métabolisme des carbohydrates (Figure 55).

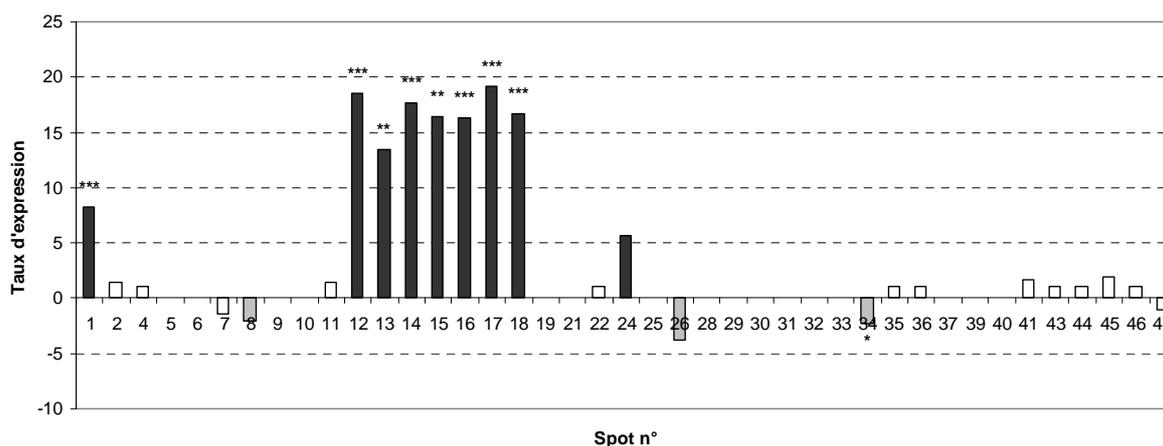
La réponse au stress oxydatif, *via* les sous – unités du protéasome, la SOD, HSP 90 et la BIP ; puis la photosynthèse, *via* la RUBISCO, l'ATP – synthase, la PCP, la FNR et la RPI, représentaient les deux catégories fonctionnelles les plus affectées par Pb 12  $\mu$ M (26% des protéines identifiées concernaient la réponse au stress oxydatif, 19% concernaient la photosynthèse). Puis, le métabolisme des carbohydrates (MDH, RPI) (10%), le métabolisme énergétique (ATP – synthase, FNR) (8%), la photorespiration (PGP, RUBISCO) (6%), le signal cellulaire (CaM) (4%), la bioluminescence (LBP) (4%), l'action chaperonne (BIP, HSP 90) (4%) et le métabolisme du phosphore (PGP) (2%), étaient les fonctions biologiques moins affectées par cette contamination.



**Figure 55.** Distribution des fonctions biologiques assignées aux protéines d'intérêt exprimées par *Alexandrium catenella* en réponse à une contamination par Pb 12  $\mu$ M

## 2.4- Taux d'expression des protéines analysées par LC-MS/MS

Les taux d'expression calculés dans le cas de la contamination par Pb 12  $\mu\text{M}$ , sont présentés en Figure 56. Les résultats obtenus indiquaient des modifications du protéome d'*Alexandrium catenella* en présence de Pb 12  $\mu\text{M}$ , certaines protéines montrant une expression modifiée de -2,3 à +19,2 fois par rapport aux conditions Témoin ( $P < 0,10$ ). La seule protéine significativement sous - exprimée (spot 34), attribuée à la PCP, était -2,3 fois sous - exprimée en réponse à la contamination par Pb 12  $\mu\text{M}$ . L'impact du stress métallique était autrement plus important sur les protéines sur - exprimées telles que la PGP (spot 15), la sous - unité  $\beta$  de l'ATP synthase (spot 16), une sous - unité  $\alpha$  du protéasome (spot 18), mais aussi des protéines non identifiées (spots 13, 14, 17) ou inconnues (spots 1, 12). Ces protéines montraient des taux de sur - expression particulièrement élevés, les plus importants de cette étude, dépassant +16,0 pour la plupart.



**Figure 56.** Taux d'expression des protéines d'intérêt exprimées par *Alexandrium catenella* en réponse à une contamination par Pb 12  $\mu\text{M}$ . L'axe des ordonnées indique le taux moyen d'expression de chaque protéine ; les valeurs positives, en noir, indiquent les taux d'expression des protéines sur - exprimées (taux  $\geq +2$ ) ; les valeurs négatives, en gris, indiquent les taux d'expression des protéines sous - exprimées (taux  $\leq -2$ ). En blanc, sont représentés les taux d'expression les moins modifiés ( $-2 < \text{taux} < +2$ ), de certaines protéines. Le taux d'expression des protéines disparues est égal à 0

\*\*\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

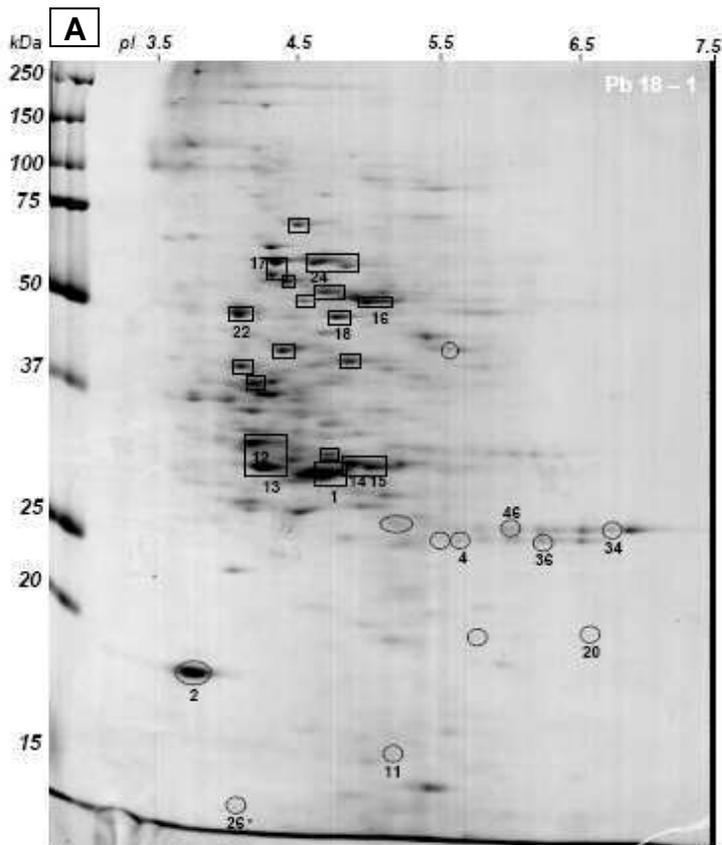
### 3. Impact de la contamination par le plomb 18 $\mu\text{M}$

#### 3.1- Profils d'expression protéique

Les profils d'expression protéique (PEPs) d'*Alexandrium catenella* cultivée en présence de Pb 18  $\mu\text{M}$  sont présentés en Figure 57. Le nombre total de spots détectés sur ces profils était en moyenne de  $239 \pm 92$  spots ( $n = 3$ ). Ce résultat était inférieur (29% plus faible) à celui obtenu pour les PEPs Témoin (Figure 58), lesquels montraient un nombre total de spots égal en moyenne à  $339 \pm 89$  spots ( $n = 3$ ). Toutefois, cette différence n'était pas significative (Test de Student :  $P > 0,10$ ).

Les spots protéiques détectés en présence de Pb 18  $\mu\text{M}$  sont horizontalement répartis le long d'une gamme de pI comprise entre 4,0 et 7,1, tandis qu'ils sont verticalement distribués dans une gamme de MW allant de 14 à 183 kDa. Cette répartition des spots protéiques était similaire à celle observée sur les PEPs Pb 6  $\mu\text{M}$ , Pb 12  $\mu\text{M}$  et Témoin (Figures 49, 53 et 58). Sur la base des critères précédemment définis (chapitre II, partie I, section II.6.), 89 protéines d'intérêt (parmi les 239 protéines détectées) montraient une modification de leur expression, en réponse à la contamination par Pb 18  $\mu\text{M}$ . Sur les 89 protéines d'intérêt, 21 protéines étaient sur – exprimées, parmi lesquelles seulement deux protéines (spots 14, 15) l'étaient de façon assez significative ( $0,05 < P < 0,10$ ). L'ensemble des protéines sur – exprimées était regroupé dans la moitié supérieure gauche des PEPs Pb 18  $\mu\text{M}$ , avec des pI allant de 4,1 à 5,1, et des MW entre 29 et 72 kDa (Figure 57). Puis, 14 protéines étaient sous – exprimées parmi lesquelles : une protéine (spot 4) l'était de façon significative ( $0,01 < P < 0,05$ ), et deux protéines (spots 11, 36) l'étaient de façon assez significative ( $0,05 < P < 0,10$ ). Les protéines sous – exprimées étaient principalement regroupées dans la moitié inférieure des PEPs Pb 18  $\mu\text{M}$ , avec des pI entre 4,0 et 6,9, et des MW allant majoritairement de 14 à 26 kDa (Figure 57). Les protéines dont la différence d'expression n'était pas significative par rapport au Témoin ( $P > 0,10$ ), étaient considérées comme indicatrices de modification du protéome, lorsque leur différence d'expression s'avérait significative dans d'autres conditions contaminantes, *i.e.* soit en présence d'autres concentrations de plomb (avec 6  $\mu\text{M}$  et/ou 12  $\mu\text{M}$ ), soit en cas de contamination par le zinc (avec 6  $\mu\text{M}$  et/ou 12  $\mu\text{M}$ , et/ou 18  $\mu\text{M}$ ). Enfin, parmi les 89 protéines d'intérêt, au moins 54 protéines (exemple : protéines 5, 9, 19, 25, 29 et 31) disparaissaient totalement des PEPs Pb 18  $\mu\text{M}$  par rapport au Témoin (Figure 58). Ces protéines étaient distribuées de façon homogène sur les PEPs Témoin (Figure 58). Les coordonnées MW/pI des protéines sur – exprimées, sous – exprimées ou disparues, sont indiquées dans les Figures 57 et 58.

## Comparaison contamination par Pb 18 µM vs Témoin

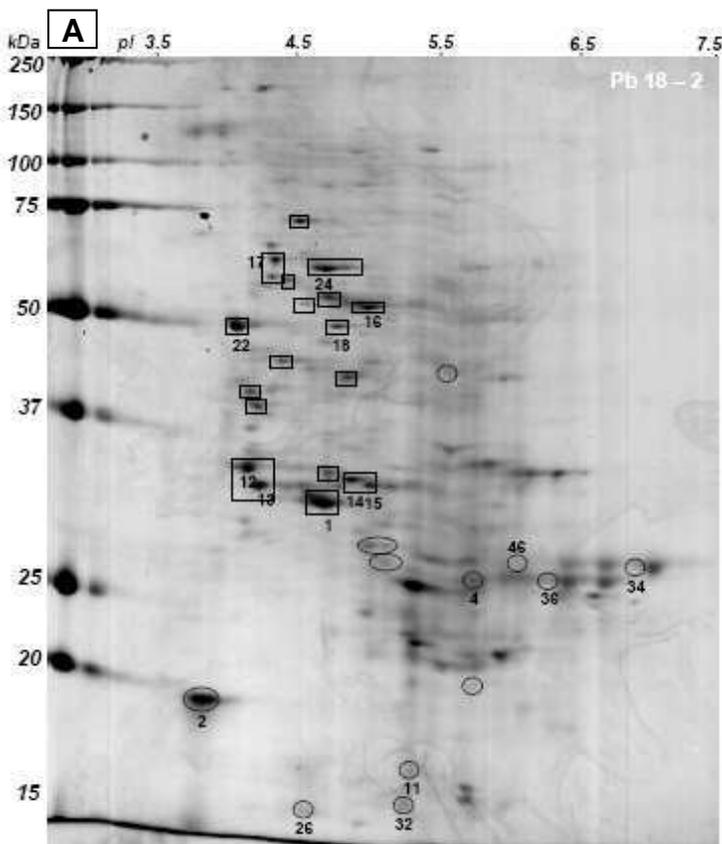


■ Noms des protéines sur-exprimées en présence de Pb 18 µM  
 ○ Noms des protéines sous-exprimées en présence de Pb 18 µM

**B**

Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1	29.2/4.8	Protéine inconnue
2	17.7/4.0	Protéine non identifiée
4**	25.0/5.9	Triose phosphate isomérase
11*	15.2/5.5	Protéine non identifiée
12	31.7/4.3	Protéine inconnue
13	30.3/4.4	Protéine non identifiée
14*	30.7/5.0	Protéine non identifiée
15*	30.4/5.1	Phosphoglycolate phosphatase
16	49.4/5.1	Sous - unité β de l'ATP synthase
17	59.0/4.5	Protéine non identifiée
18	46.5/4.9	Sous - unité α du proteasome
22	48.2/4.1	Protéine non identifiée
24	57.4/4.8	Protéine non identifiée
26	14.1/4.5	Calmoduline
34	25.7/6.9	Périidine-chlorophylle protéine
36*	24.8/6.4	Périidine-chlorophylle protéine
46	25.8/6.2	Sous - unité α du proteasome

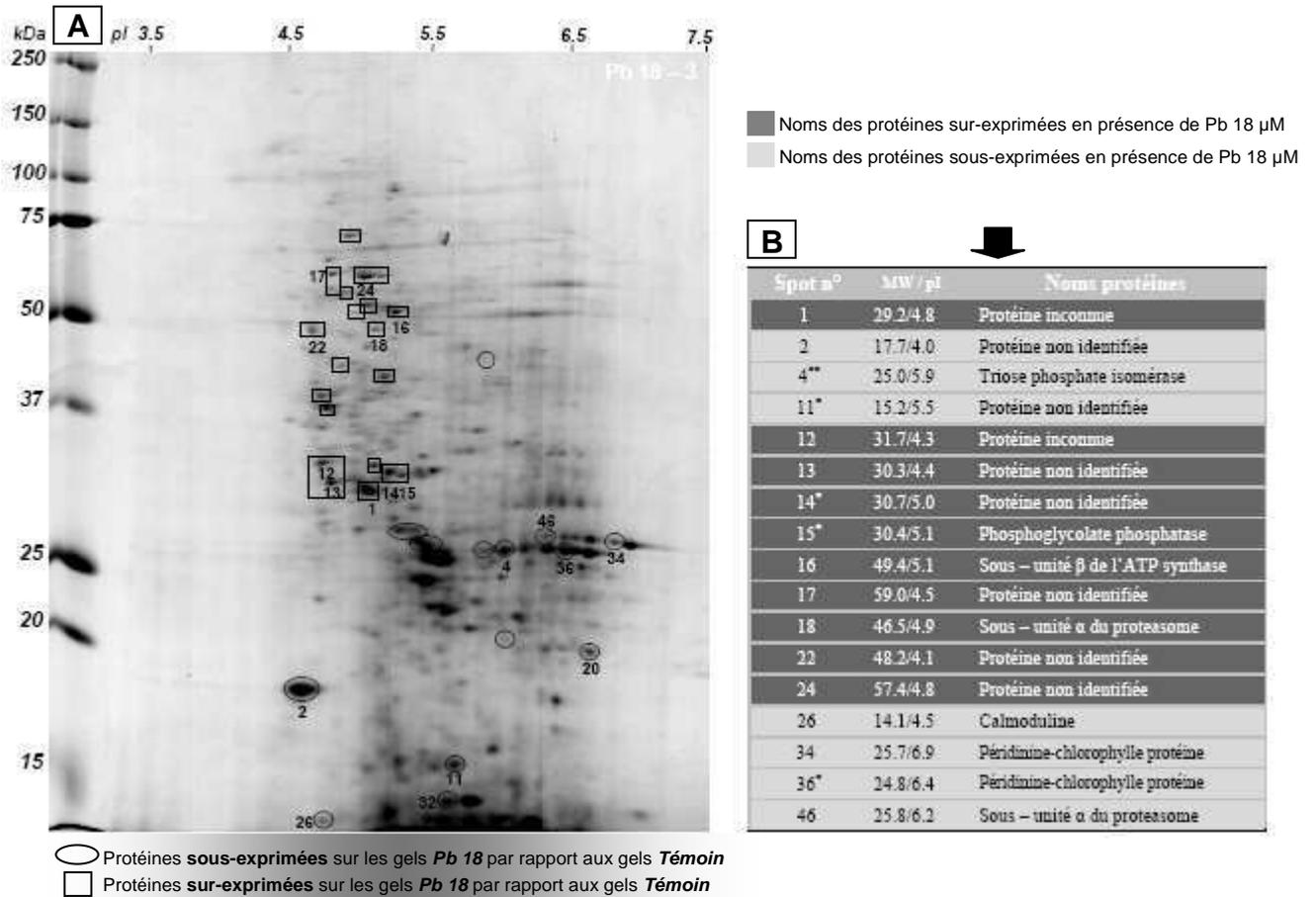
○ Protéines **sous-exprimées** sur les gels **Pb 18** par rapport aux gels **Témoin**  
 □ Protéines **sur-exprimées** sur les gels **Pb 18** par rapport aux gels **Témoin**



**B**

Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1	29.2/4.8	Protéine inconnue
2	17.7/4.0	Protéine non identifiée
4**	25.0/5.9	Triose phosphate isomérase
11*	15.2/5.5	Protéine non identifiée
12	31.7/4.3	Protéine inconnue
13	30.3/4.4	Protéine non identifiée
14*	30.7/5.0	Protéine non identifiée
15*	30.4/5.1	Phosphoglycolate phosphatase
16	49.4/5.1	Sous - unité β de l'ATP synthase
17	59.0/4.5	Protéine non identifiée
18	46.5/4.9	Sous - unité α du proteasome
22	48.2/4.1	Protéine non identifiée
24	57.4/4.8	Protéine non identifiée
26	14.1/4.5	Calmoduline
34	25.7/6.9	Périidine-chlorophylle protéine
36*	24.8/6.4	Périidine-chlorophylle protéine
46	25.8/6.2	Sous - unité α du proteasome

○ Protéines **sous-exprimées** sur les gels **Pb 18** par rapport aux gels **Témoin**  
 □ Protéines **sur-exprimées** sur les gels **Pb 18** par rapport aux gels **Témoin**



**Figure 57.** Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures d'*Alexandrium catenella* contaminées par le plomb 18  $\mu\text{M}$

**A :** Gels 2D montrant les protéines d'intérêt (dont l'expression était modifiée en réponse à la contamination métallique). Les spots numérotés ont été analysés par LC-MS/MS

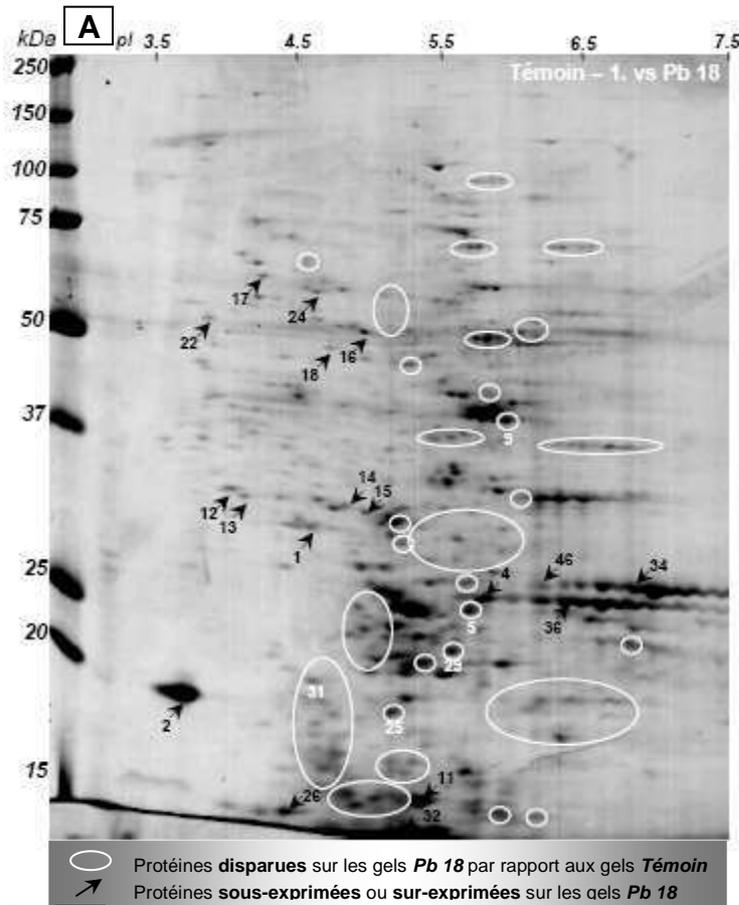
**B :** Noms, MW et pI des protéines d'intérêt

\*\*\* Protéine dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Protéine dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Protéine dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

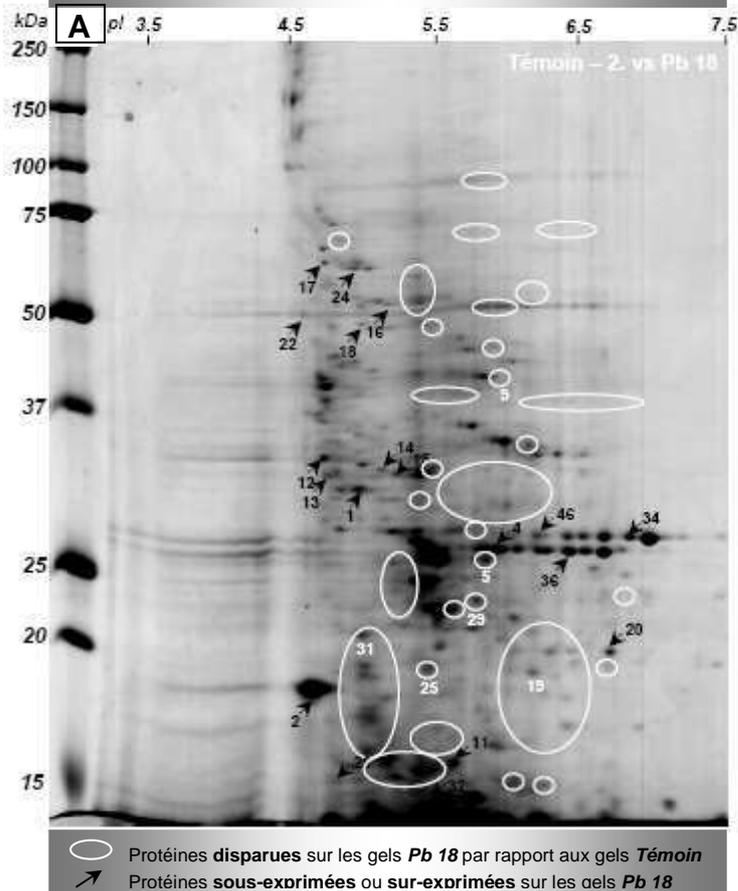
## Comparaison Témoin vs contamination par Pb 18 µM



- Noms des protéines sur-exprimées en présence de Pb 18 µM
- ▒ Noms des protéines sous-exprimées en présence de Pb 18 µM
- Noms des protéines disparues en présence de Pb 18 µM

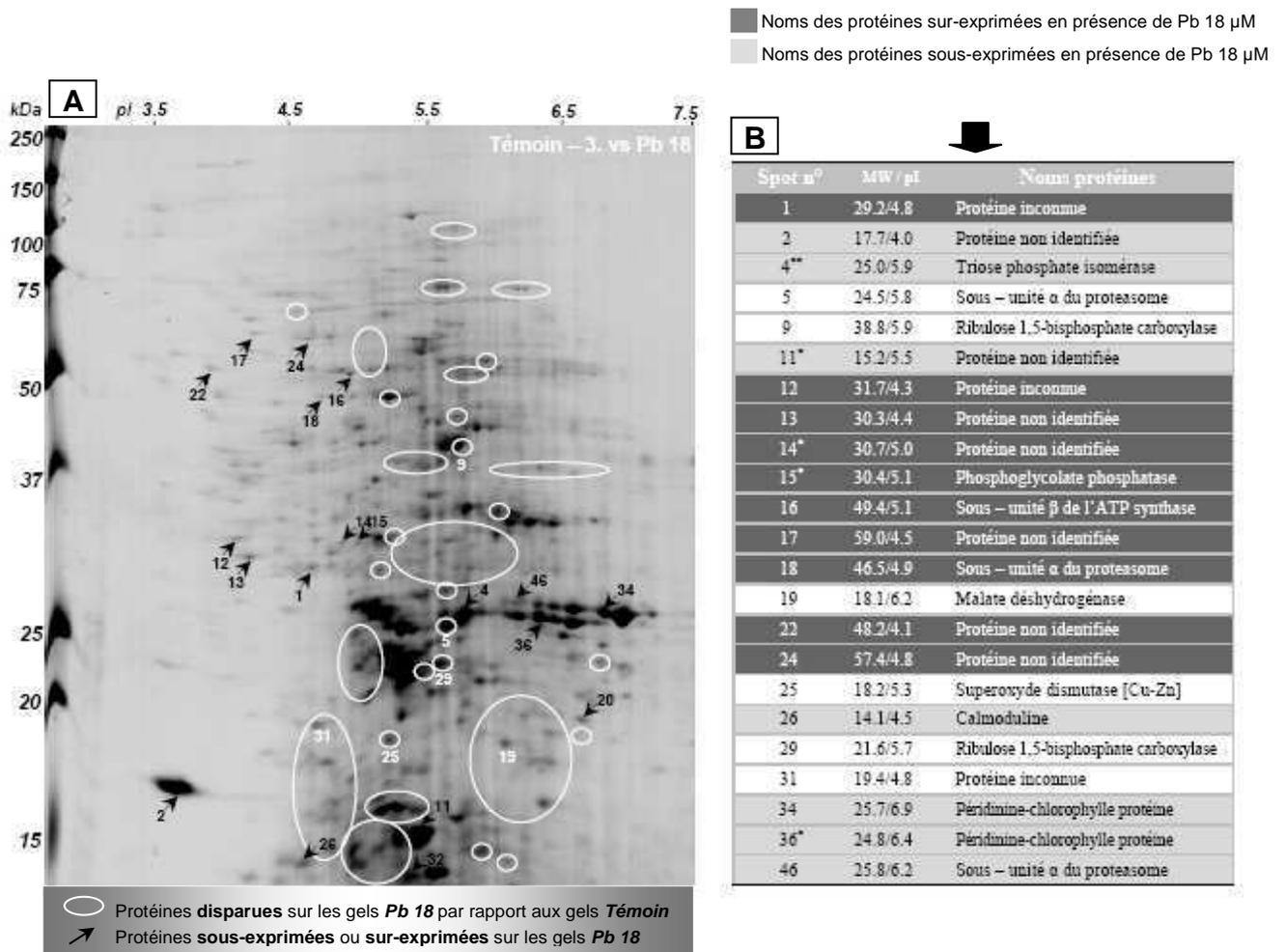
**B**

Spot n°	MW/pI	Noms protéines
1	29.2/4.8	Protéine inconnue
2	17.7/4.0	Protéine non identifiée
4**	25.0/5.9	Triose phosphate isomérase
5	24.5/5.8	Sous - unité α du proteasome
9	38.8/5.9	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
11*	15.2/5.5	Protéine non identifiée
12	31.7/4.3	Protéine inconnue
13	30.3/4.4	Protéine non identifiée
14*	30.7/5.0	Protéine non identifiée
15*	30.4/5.1	Phosphoglycolate phosphatase
16	49.4/5.1	Sous - unité β de l'ATP synthase
17	59.0/4.5	Protéine non identifiée
18	46.5/4.9	Sous - unité α du proteasome
22	48.2/4.1	Protéine non identifiée
24	57.4/4.8	Protéine non identifiée
25	18.2/5.3	Superoxyde dismutase [Cu-Zn]
26	14.1/4.5	Calmoduline
29	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
31	19.4/4.8	Protéine inconnue
34	25.7/6.9	Péridimine-chlorophylle protéine
36*	24.8/6.4	Péridimine-chlorophylle protéine
46	25.8/6.2	Sous - unité α du proteasome



**B**

Spot n°	MW/pI	Noms protéines
1	29.2/4.8	Protéine inconnue
2	17.7/4.0	Protéine non identifiée
4**	25.0/5.9	Triose phosphate isomérase
5	24.5/5.8	Sous - unité α du proteasome
9	38.8/5.9	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
11*	15.2/5.5	Protéine non identifiée
12	31.7/4.3	Protéine inconnue
13	30.3/4.4	Protéine non identifiée
14*	30.7/5.0	Protéine non identifiée
15*	30.4/5.1	Phosphoglycolate phosphatase
16	49.4/5.1	Sous - unité β de l'ATP synthase
17	59.0/4.5	Protéine non identifiée
18	46.5/4.9	Sous - unité α du proteasome
19	18.1/6.2	Malate déshydrogénase
22	48.2/4.1	Protéine non identifiée
24	57.4/4.8	Protéine non identifiée
25	18.2/5.3	Superoxyde dismutase [Cu-Zn]
26	14.1/4.5	Calmoduline
29	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
31	19.4/4.8	Protéine inconnue
34	25.7/6.9	Péridimine-chlorophylle protéine
36*	24.8/6.4	Péridimine-chlorophylle protéine
46	25.8/6.2	Sous - unité α du proteasome



**Figure 58.** Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures témoins d'*Alexandrium catenella*

**A :** Gels 2D montrant les protéines d'intérêt (dont l'expression était modifiée en réponse à la contamination métallique). Les spots numérotés ont été analysés par LC-MS/MS

**B :** Noms, MW et pI des protéines d'intérêt

\*\*\* Protéine dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Protéine dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Protéine dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

### 3.2- Identification putative des protéines d'intérêt

Sur les 89 protéines d'intérêt, 23 protéines ont pu être prélevées dans les gels 2D pour identification par LC-MS/MS. L'analyse des séquences de 15 protéines sur les 23 protéines d'intérêt prélevées, a conduit à un résultat d'identification.

Sur les deux protéines (spots 14, 15) sur – exprimées assez significativement, seule la séquence de la protéine associée au spot 15 a pu être identifiée par homologie avec la protéine PGP, déjà séquencée chez *Symbiodinium* sp. (Tableau X).

La séquence de la protéine associée au spot 4, sous – exprimée significativement, était homologue à celle de la protéine TPI, séquencée chez *Karlodinium micrum*, tandis que la séquence de la protéine associée au spot 36, sous-exprimée assez significativement, était attribuée à la PCP identifiée chez *Alexandrium minutum*.

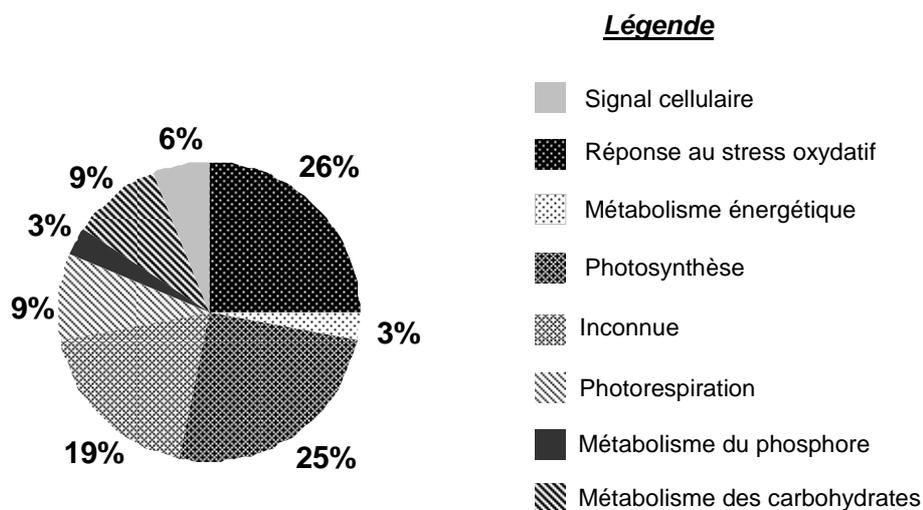
Enfin, les séquences des protéines disparues associées aux spots 5, 9, 29, 19 et 25, étaient respectivement homologues à celles des protéines : sous – unité  $\alpha$  du protéasome exprimée par *Oxyrrhis marina*, RUBISCO séquencée chez *Gonyaulax polyedra* et *Heterocapsa triquetra*, MDH chez *Karlodinium micrum*, et SOD chez *Tetrahymena thermophila*.

Pour certains spots, l'identification protéique s'est avérée infructueuse pour des raisons techniques (séquence peptidique non déterminée). Dans ce cas, les protéines ont été qualifiées de « non identifiées ». Pour certains autres spots, la séquence peptidique a été déterminée mais ne correspondait à aucune protéine connue. Dans ce cas, les protéines correspondantes ont été qualifiées d'« inconnues ».

### 3.3- Catégories fonctionnelles des protéines d'intérêt

Les protéines d'intérêt, exprimées en réponse à la contamination par Pb 18  $\mu$ M, étaient associées à sept catégories fonctionnelles connues : signal cellulaire, réponse au stress oxydatif, métabolisme énergétique, photosynthèse, photorespiration, métabolisme du phosphore et métabolisme des carbohydrates (Figure 59).

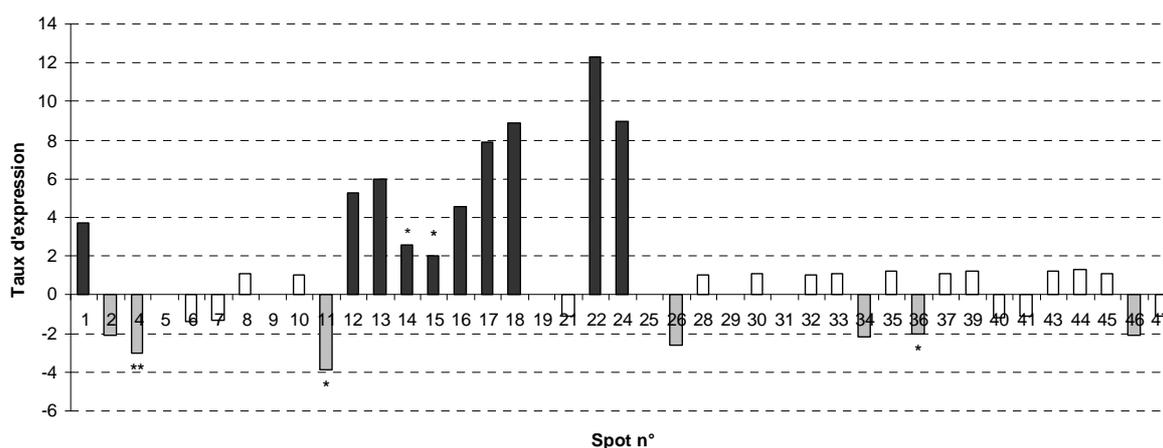
La réponse au stress oxydatif, *via* les sous – unités du protéasome et la SOD ; puis la photosynthèse, *via* la RUBISCO, l'ATP – synthase, la PCP et la TPI, représentaient les deux catégories fonctionnelles les plus affectées par Pb 18  $\mu$ M (26% des protéines identifiées concernaient la réponse au stress oxydatif, 25% concernaient la photosynthèse). Puis, la photorespiration (PGP, RUBISCO) (9%), le métabolisme des carbohydrates (TPI, MDH) (9%), le signal cellulaire (CaM) (6%), le métabolisme énergétique (ATP – synthase) (3%) et le métabolisme du phosphore (PGP) (3%), étaient les fonctions biologiques moins affectées par cette contamination.



**Figure 59.** Distribution des fonctions biologiques assignées aux protéines d'intérêt exprimées par *Alexandrium catenella* en réponse à une contamination par Pb 18  $\mu$ M

### 3.4- Taux d'expression des protéines analysées par LC-MS/MS

Les taux d'expression calculés dans le cas de la contamination par Pb 18  $\mu\text{M}$ , sont présentés en Figure 60. Les résultats obtenus indiquaient des modifications du protéome d'*Alexandrium catenella* en présence de Pb 18  $\mu\text{M}$ , certaines protéines montrant une expression modifiée de -3,9 à +2,0 fois par rapport aux conditions témoins ( $P < 0,10$ ). La seule protéine significativement sous – exprimée (spot 4), attribuée à la TPI, était -3,0 fois exprimée en réponse à la contamination par Pb 18  $\mu\text{M}$ . L'impact du stress métallique sur les protéines assez significativement sous – exprimées ( $0,05 < P < 0,10$ ) était moins important pour la PCP (spot 36), qui était -2,0 fois exprimée, mais plus élevé pour une protéine non identifiée (spot 11) dont le taux d'expression était de -3,9. La seule protéine significativement sur – exprimée (spot 15) identifiée, correspondant à la PGP, présentait un taux de sur - expression de +2,0.



**Figure 60.** Taux d'expression des protéines d'intérêt exprimées par *Alexandrium catenella* en réponse à une contamination par Pb 18  $\mu\text{M}$ . L'axe des ordonnées indique le taux moyen d'expression de chaque protéine ; les valeurs positives, en noir, indiquent les taux d'expression des protéines sur – exprimées (taux  $\geq +2$ ) ; les valeurs négatives, en gris, indiquent les taux d'expression des protéines sous – exprimées (taux  $\leq -2$ ). En blanc, sont représentés les taux d'expression les moins modifiés ( $-2 < \text{taux} < +2$ ), de certaines protéines. Le taux d'expression des protéines disparues est égal à 0

\*\*\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

## 4. Comparaison de l'impact du plomb aux concentrations testées

### 4.1- Comparaison des profils d'expression protéique

Comme cela a été mentionné précédemment, le nombre total de spots détectés en présence de chaque concentration de plomb (6  $\mu$ M, 12  $\mu$ M ou 18  $\mu$ M) était toujours inférieur à celui observé en conditions témoins, mais ces différences n'étaient pas significatives (Test de Student :  $P > 0,10$ ). Aucune différence significative n'existait entre le nombre total de spots détectés en présence de Pb 6  $\mu$ M, et le nombre total de spots détectés en présence de Pb 12  $\mu$ M, ou en présence de Pb 18  $\mu$ M, ce nombre étant similaire (compris entre 202 et 240 spots) ( $P > 0,10$ ).

Quelle que soit la concentration de plomb testée, tous les spots présents sur les PEPs contaminés sont répartis de façon homogène, dans la même gamme de pI et de MW (pI : 4,0 – 7,1 ; MW : 14 – 183 kDa). Cette gamme de répartition est identique à celle des spots détectés sur les PEPs Témoin.

Le nombre de protéines sur – exprimées augmentait avec la concentration contaminante de plomb, passant d'une protéine sur – exprimée en présence de Pb 6  $\mu$ M, à 18 protéines et à 21 protéines sur - exprimées en présence de Pb 12  $\mu$ M et de Pb 18  $\mu$ M, respectivement. Après analyse statistique, la contamination par Pb 12  $\mu$ M conduisait au plus grand nombre de protéines significativement sur – exprimées (8 protéines en présence de Pb 12  $\mu$ M, contre une protéine et deux protéines respectivement sur – exprimées en présence de Pb 6  $\mu$ M et Pb 18  $\mu$ M). Quelle que soit la concentration de plomb testée, les protéines sur – exprimées étaient toujours regroupées dans la moitié supérieure (verticalement), à gauche (horizontalement), des gels 2D (pI : 4,1 – 5,1 ; MW : 29 – 72 kDa).

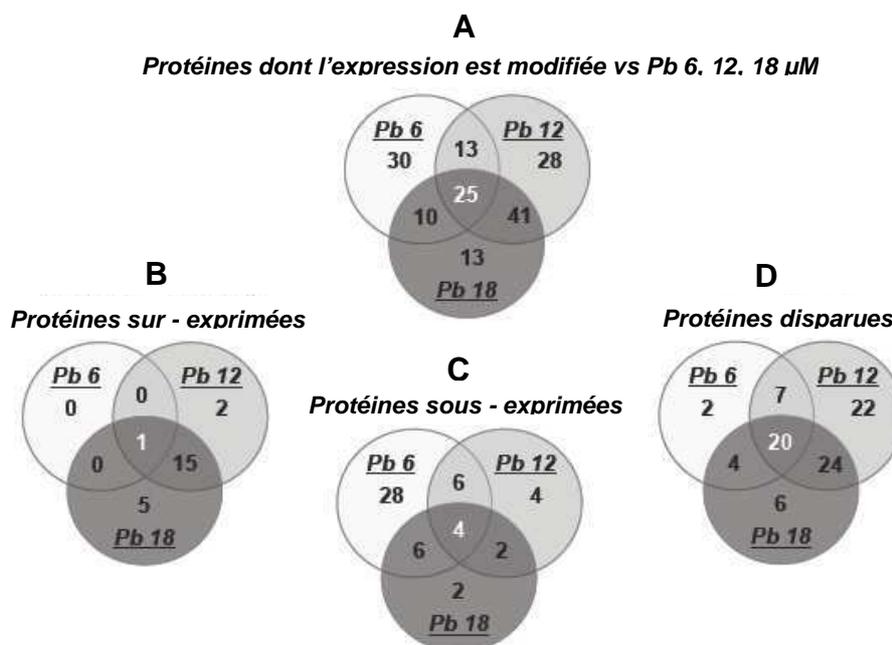
Les plus fortes concentrations de plomb conduisaient aux plus grands nombres de protéines disparues (73 protéines et 54 protéines respectivement disparues en présence de Pb 12  $\mu$ M et de Pb 18  $\mu$ M, contre 33 protéines disparues en présence de Pb 6  $\mu$ M), tandis que la plus faible concentration de plomb conduisait au nombre de protéines sous – exprimées le plus important (44 protéines sous – exprimées en présence de Pb 6  $\mu$ M, contre 16 protéines et 14 protéines respectivement sous – exprimées en présence de Pb 12  $\mu$ M et de Pb 18  $\mu$ M). La concentration 6  $\mu$ M conduisait au plus grand nombre de protéines significativement sous – exprimées (12 protéines en présence de Pb 6  $\mu$ M, contre une protéine et 3 protéines respectivement sous – exprimées en présence de Pb 12  $\mu$ M et de Pb 18  $\mu$ M). Excepté en présence de Pb 6  $\mu$ M, les protéines sous – exprimées étaient toujours regroupées dans la moitié inférieure des gels 2D (pI : 4,0 – 6,9 ; MW : 14 – 32 kDa).

#### 4.2- Protéines d'intérêt exprimées en commun

Le nombre de protéines d'intérêt exprimées en commun, en réponse aux contaminations par Pb 6  $\mu$ M, Pb 12  $\mu$ M, ou Pb 18  $\mu$ M, apparaît sur les diagrammes de Venn de la Figure 61. Ces diagrammes permettaient de dénombrer 25 protéines d'intérêt exprimées en commun (Figure 61A). Parmi ces 25 protéines, une seule était sur – exprimée (Figure 61B), associée au spot 1, correspondant à une protéine inconnue déjà rencontrée chez *Paramecium tetraurelia*.

Puis, 4 protéines étaient sous – exprimées en commun (Figure 61C). Sur ces 4 protéines, celles associées aux spots 26 et 34 ont été analysées par LC – MS/MS. La séquence de la protéine associée au spot 26 a été identifiée comme étant homologue à la CaM, déjà séquencée chez le dinoflagellé *Oxyrrhis marina* (Tableau X). La séquence de la protéine associée au spot 34 a été identifiée comme étant homologue à la PCP déjà séquencée chez la microalgue *Symbiodinium* sp., protéine impliquée dans l'absorption lumineuse indispensable à l'activité photosynthétique.

Enfin, 20 protéines avaient disparu en commun (Figure 61D), parmi lesquelles celles associées aux spots 5 et 9 ont été analysées par LC – MS/MS. La séquence de la protéine associée au spot 5 était homologue à la sous – unité  $\alpha$  du protéasome déjà séquencée chez le dinoflagellé *Oxyrrhis marina*, et ayant pour fonction la dégradation protéasomale des protéines mal repliées, dénaturées ou obsolètes (Tableau X). La séquence de la protéine du spot 9 a été identifiée était homologue à la RUBISCO déjà séquencée chez le dinoflagellé *Gonyaulax polyedra*. La RUBISCO est une protéine fondamentale impliquée dans la fixation du CO<sub>2</sub> indispensable à l'activité photosynthétique.



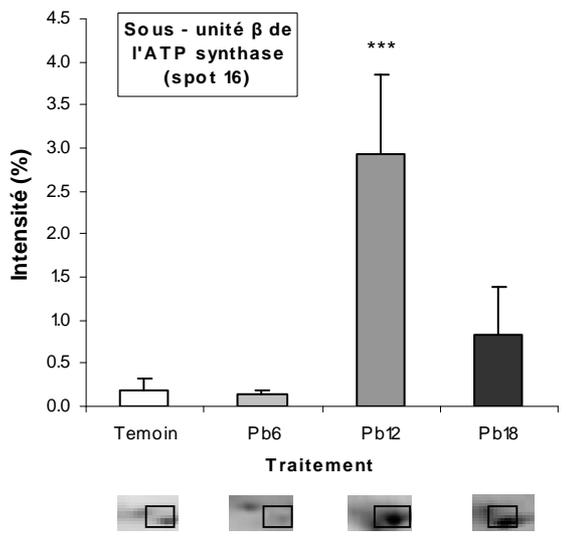
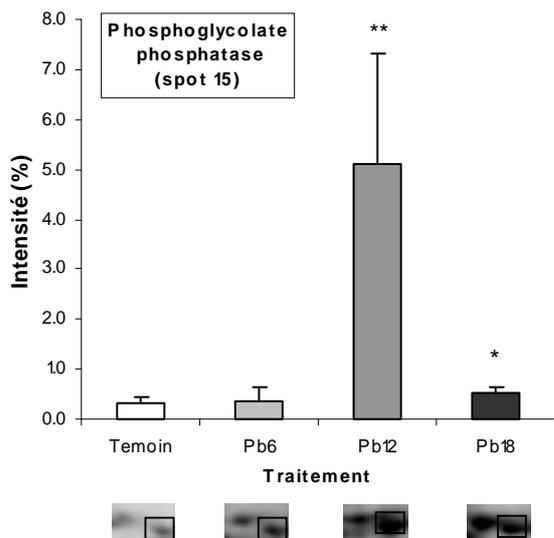
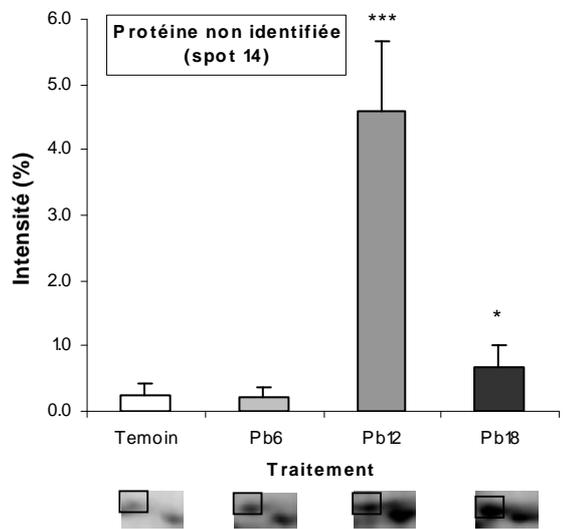
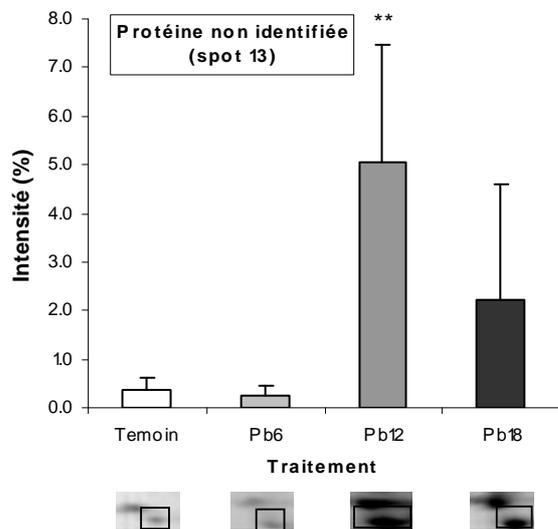
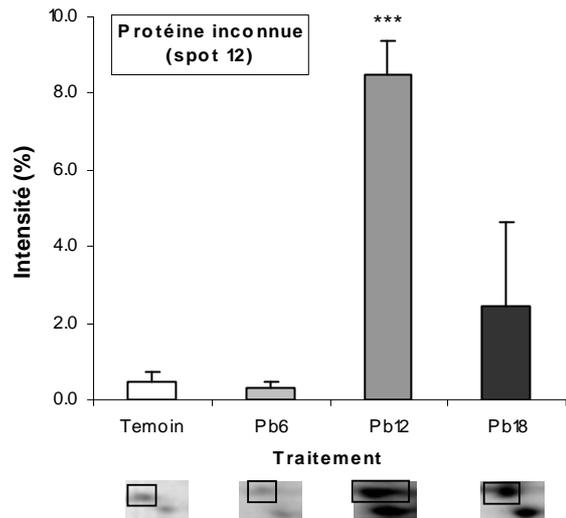
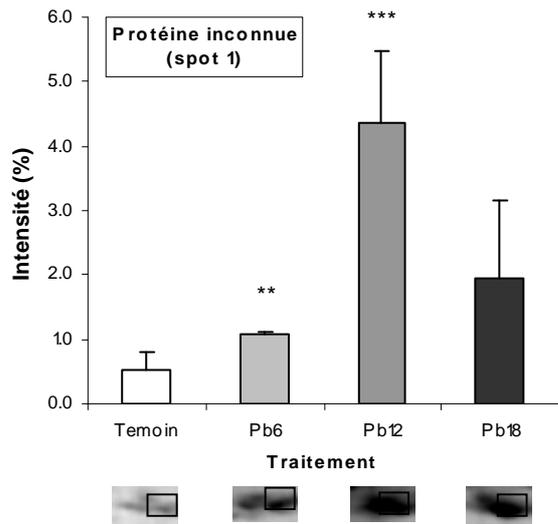
**Figure 61.** Diagrammes de Venn représentant les protéines d'intérêt exprimées en commun par *Alexandrium catenella* en réponse aux contaminations par le plomb 6  $\mu$ M, 12  $\mu$ M ou 18  $\mu$ M

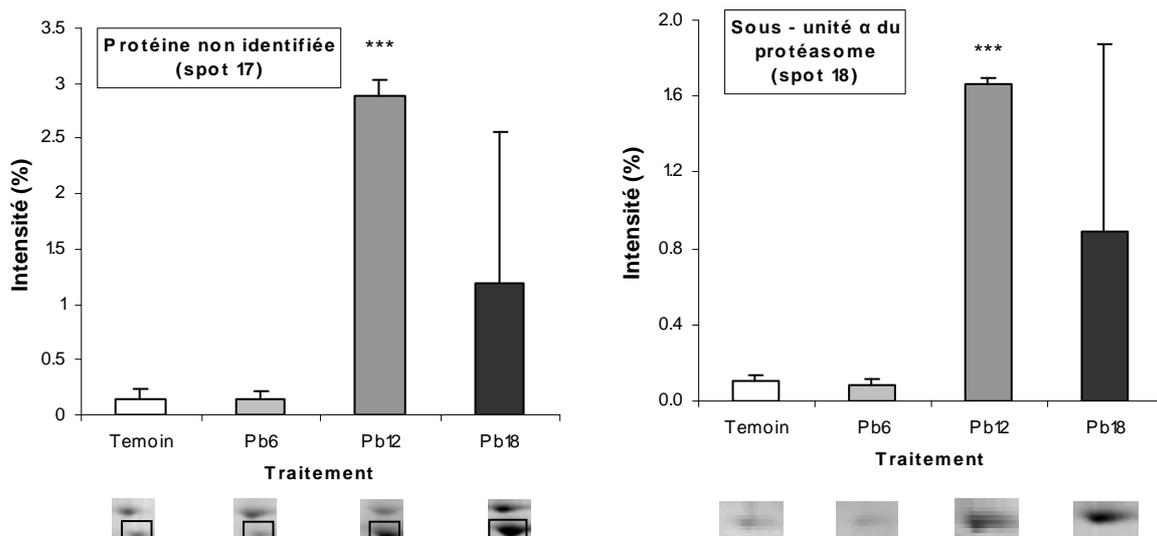
- A : Protéines d'intérêt exprimées en commun
- B : Protéines sur – exprimées en commun
- C : Protéines sous – exprimées en commun
- D : Protéines disparues en commun

### 4.3- Expression des protéines d'intérêt en fonction du niveau de contamination

#### 4.3.1 – Sur – expression des protéines d'intérêt en fonction du niveau de contamination

La protéine inconnue associée au spot 1 était sur – exprimée dès la plus faible concentration de plomb (Figure 62). Le taux de sur – expression de cette protéine a augmenté de +2,0 en présence de Pb 6  $\mu$ M à +8,2 en présence de Pb 12  $\mu$ M, pour diminuer en présence de Pb 18  $\mu$ M (Tableau XI). Les contaminations par Pb 12  $\mu$ M et/ou Pb 18  $\mu$ M (excepté celle par Pb 6  $\mu$ M) conduisaient à la sur – expression significative de 7 autres protéines d'intérêt (Figure 62). Celles - ci correspondaient à : une protéine inconnue (spot 12), 3 protéines non identifiées (spots 13, 14, 17), la PGP (spot 15), une sous – unité  $\beta$  de l'ATP synthase (spot 16), une sous – unité  $\alpha$  du protéasome (spot 18). En comparaison avec les contaminations par Pb 6  $\mu$ M et par Pb 18  $\mu$ M, la contamination par Pb 12  $\mu$ M induisait les taux de sur – expression les plus significatifs et les plus élevés pour les protéines sus – citées (Tableau XI). Ces taux étaient compris entre +13,5 (spot 13) et +19,2 (spot 17) ; ils étaient les plus élevés calculés dans cette étude (Tableau XI).





**Figure 62.** Intensité d'expression (intensité moyenne en %) des protéines d'intérêt sur – exprimées par *Alexandrium catenella*, en fonction de la concentration contaminante en plomb. Les barres d'histogramme en blanc, gris clair, gris, ou noir, correspondent respectivement à l'expression des protéines, en conditions témoins, en présence de Pb 6  $\mu\text{M}$ , de Pb 12  $\mu\text{M}$ , ou de Pb 18  $\mu\text{M}$

\*\*\* Expression **très significativement différente** en condition contaminée ( $P < 0,01$ )

\*\* Expression **significativement différente** en condition contaminée ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Expression **assez différente** en condition contaminée ( $0,05 < P < 0,10$ )

#### 4.3.2 – Sous – expression des protéines d'intérêt en fonction du niveau de contamination

La contamination par le plomb, quelle que soit la concentration testée, provoquait la disparition systématique de la sous – unité  $\alpha$  du protéasome, correspondant au spot 5 (Figure 63). De la même façon, Pb 12  $\mu\text{M}$  conduisait à la disparition des sous – unités  $\alpha$  et  $\beta$  du protéasome, associées aux spots 30 et 37. De plus, une tendance à la sous – expression, bien qu'étant non significative, était observée en présence de Pb 6  $\mu\text{M}$  concernant la protéine associée au spot 35, également assignée à une sous – unité  $\alpha$  du protéasome.

La contamination par Pb 6  $\mu\text{M}$  conduisait à la sous – expression de la MDH associée aux spots 7 (-7,3) et 10 (-2,9) (Tableau XI). La disparition de cette protéine était ensuite observée en présence d'une concentration supérieure (12  $\mu\text{M}$ ) pour le spot 10 (Figure 63). Cet impact était confirmé par la disparition de la MDH au niveau du spot 19, en présence de Pb 12  $\mu\text{M}$  et de Pb 18  $\mu\text{M}$ .

La contamination par Pb 6  $\mu\text{M}$  aboutissait à la sous – expression de la FNR associée aux spots 21 (-7,3) et 39 (-6,0), puis celle par Pb 12  $\mu\text{M}$  à la disparition de cette protéine au niveau de ces mêmes spots (Tableau XI). De plus, une tendance à la sous – expression, bien

que non significative, était observée en présence de Pb 6  $\mu$ M et de Pb 12  $\mu$ M concernant la protéine associée au spot 8, correspondant également à la FNR.

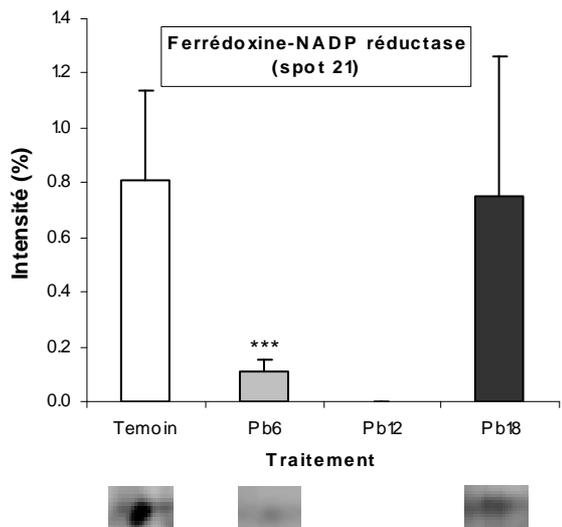
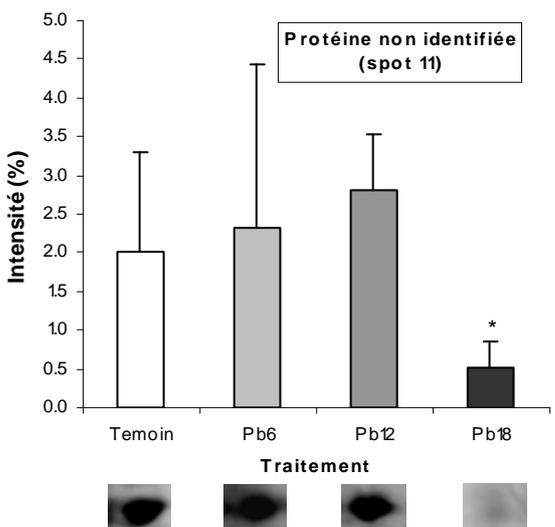
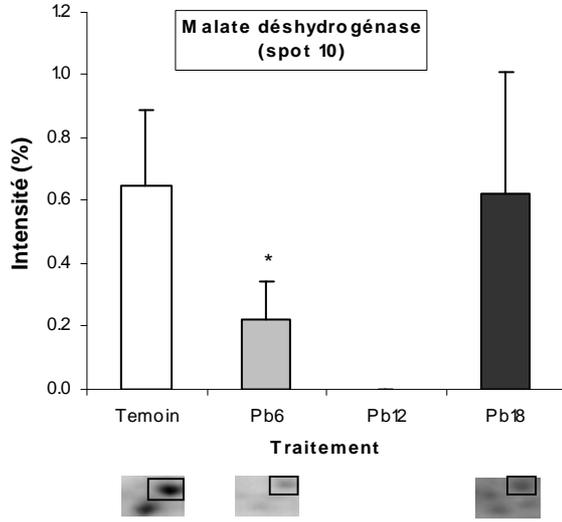
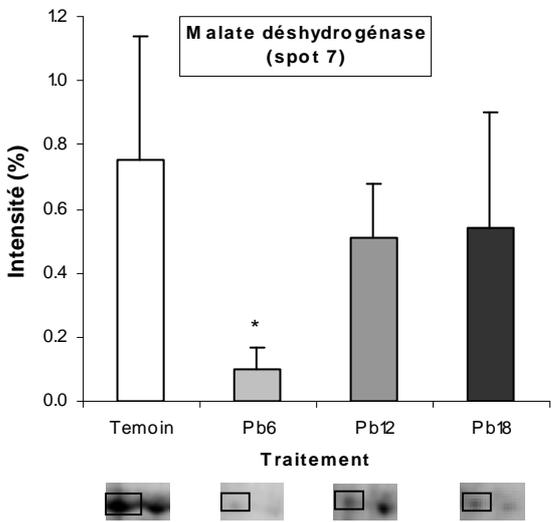
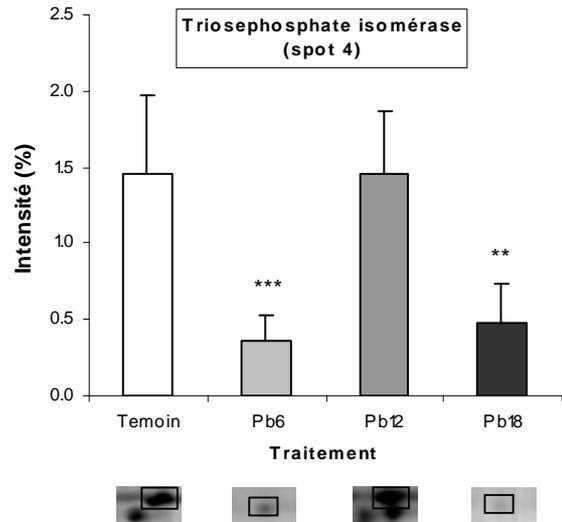
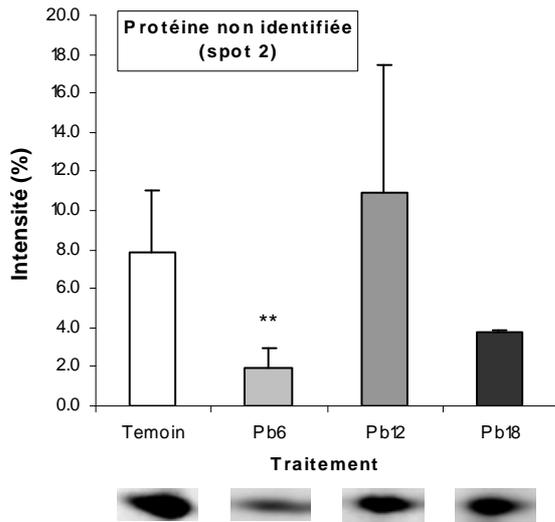
La sous – expression de la protéine PCP associée aux spots 34 (-2,2) et 36 (-3,2) était remarquée en présence de Pb 6  $\mu$ M (spots 34, 36) et de Pb 12  $\mu$ M (spot 34 : -2,3) (Figure 63 et Tableau XI).

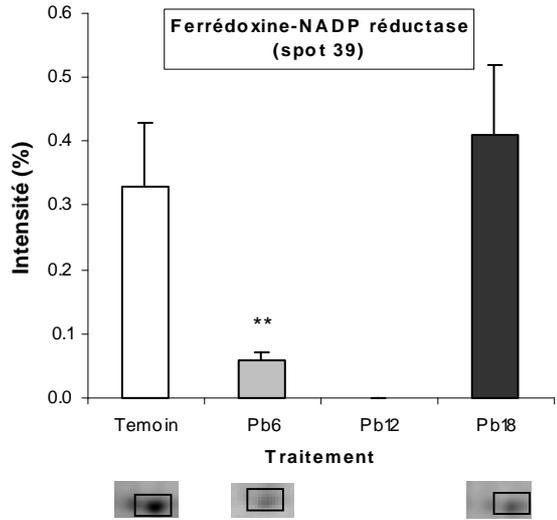
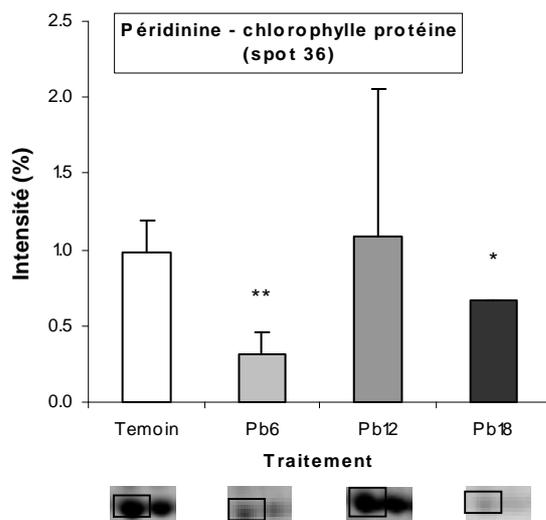
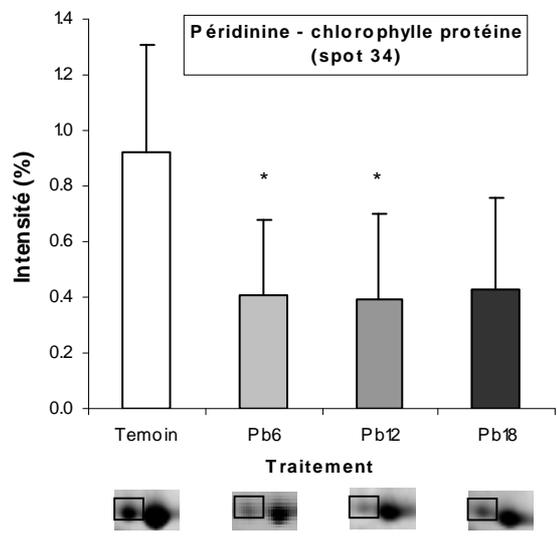
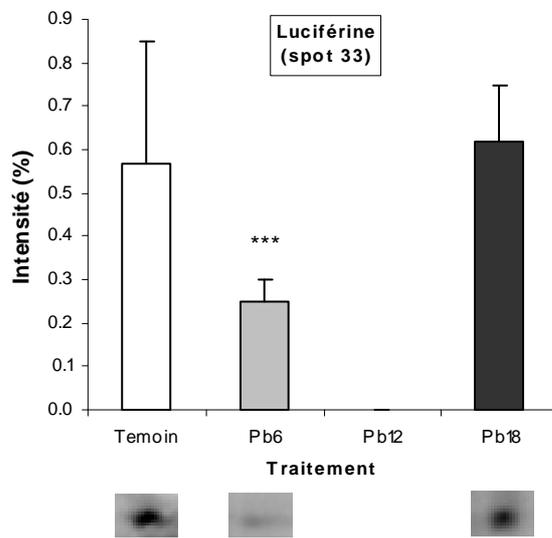
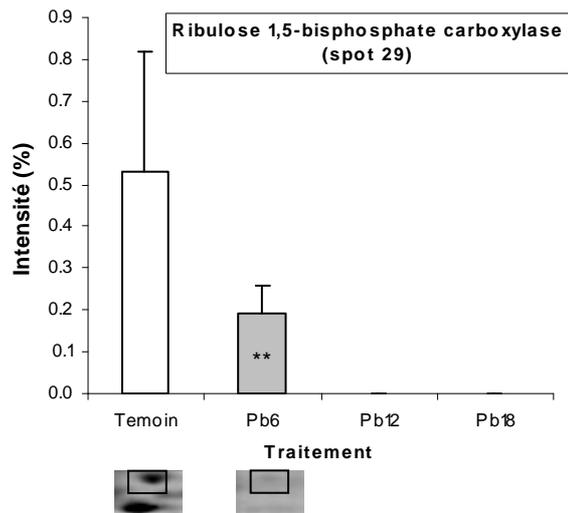
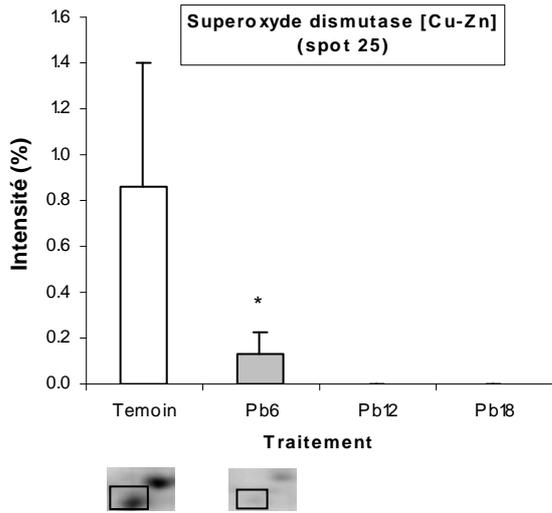
La RUBISCO n'était plus du tout exprimée en présence de plomb, quelle que soit sa concentration, en ce qui concerne le spot 9 (Figure 63). La contamination par Pb 12  $\mu$ M et par Pb 18  $\mu$ M conduisait à la disparition de cette protéine au niveau du spot 29, mais aussi à la disparition de la SOD associée au spot 25.

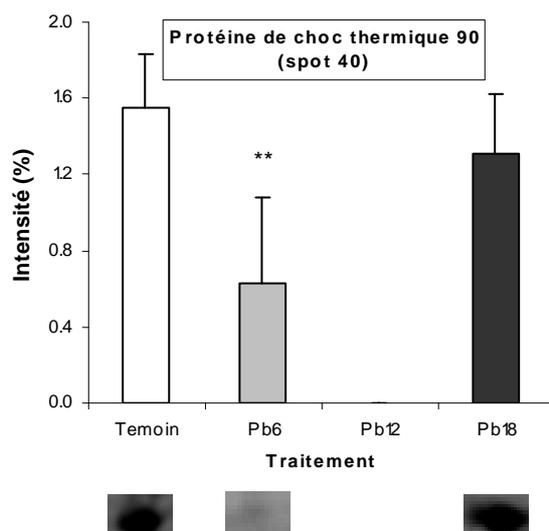
La contamination par Pb 12  $\mu$ M provoquait la disparition des protéines LBP (spot 33) et HSP 90 (spot 40), confirmant une tendance à la sous – expression de ces protéines, déjà observée en présence de Pb 6  $\mu$ M (spot 33 : -2,3 ; spot 40 : -2,4) (Figure 63 et Tableau XI). Elle conduisait aussi à la disparition des protéines BIP (spot 6), RPI (spot 28), ainsi qu'à celles de deux protéines inconnues (spots 31, 32) (Figure 63).

Enfin, Pb 6  $\mu$ M et Pb 18  $\mu$ M entraînaient la sous – expression de la TPI (spot 4 : -4,0 et -3,0, respectivement) ainsi que celle d'une protéine non identifiée (spot 2 : -4,1 et -2,1, respectivement), sous - expression observée seulement en présence de Pb 18  $\mu$ M, pour une autre protéine non identifiée (spot 11 : -3,9) (Figure 63 et Tableau XI).

La contamination par Pb 12  $\mu$ M semblait avoir l'effet le plus drastique, conduisant au plus grand nombre de protéines significativement sur – exprimées ou disparues (Tableau XI). Excepté dans le cas du spot 5, la contamination par Pb 6  $\mu$ M ne provoquait généralement pas la disparition des protéines mais seulement leur sous – expression ; même si elle induisait le nombre de protéines significativement sous – exprimées le plus important, à des taux compris entre : -2,2 (spot 34) et -7,3 (spots 7 et 21) (Tableau XI). La contamination par Pb 18  $\mu$ M semblait avoir un impact intermédiaire sur le protéome par rapport à celui induit par les deux concentrations précédentes (trois protéines d'intérêt significativement sous – exprimées, et six protéines d'intérêt disparues).







**Figure 63.** Intensité d'expression (intensité moyenne en %) des protéines d'intérêt sous – exprimées par *Alexandrium catenella*, en fonction de la concentration contaminante en plomb. Les barres d'histogramme en blanc, gris clair, gris, ou noir, correspondent respectivement à l'expression des protéines en conditions Témoin, en présence de Pb 6  $\mu$ M, de Pb 12  $\mu$ M, ou de Pb 18  $\mu$ M

\*\*\* Expression **très significativement différente** en condition contaminée ( $P < 0,01$ )

\*\* Expression **significativement différente** en condition contaminée ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Expression **assez différente** en condition contaminée ( $0,05 < P < 0,10$ )

#### 4.3.3 – Comparaison des catégories fonctionnelles associées aux protéines d'intérêt

Les protéines dont l'expression était modifiée suite aux contaminations par Pb 6  $\mu$ M, Pb 12  $\mu$ M ou Pb 18  $\mu$ M, étaient principalement associées, dans cet ordre, à la réponse au stress oxydatif, à la photosynthèse, ou au métabolisme des carbohydrates (Figures 51, 55 et 59). Quelle que soit la concentration de plomb testée, la réponse au stress oxydatif était toujours la fonction la plus affectée par la contamination (27% en présence de Pb 6  $\mu$ M, 26% en présence de Pb 12  $\mu$ M, 26% en présence de Pb 18  $\mu$ M). En présence de Pb 6  $\mu$ M ou de Pb 18  $\mu$ M, la photosynthèse semblait être perturbée de façon similaire (24% en présence de Pb 6  $\mu$ M, 25% en présence de Pb 18  $\mu$ M). En revanche, le métabolisme des carbohydrates semblait de moins en moins impacté par les concentrations croissantes de plomb (13% en présence de Pb 6  $\mu$ M, 10% en présence de Pb 12  $\mu$ M, 9% en présence de Pb 18  $\mu$ M). La bioluminescence d'*Alexandrium catenella* était perturbée en présence de Pb 6  $\mu$ M et de Pb 12  $\mu$ M, ce qui n'était plus le cas en présence de Pb 18  $\mu$ M. Cette observation concernait également l'activité chaperonne. En revanche, le métabolisme du phosphore n'était perturbé qu'en présence des plus fortes concentrations de plomb. Cet impact se traduisait par une sur – expression particulièrement significative de la PGP en réponse à la contamination (Figure 56).

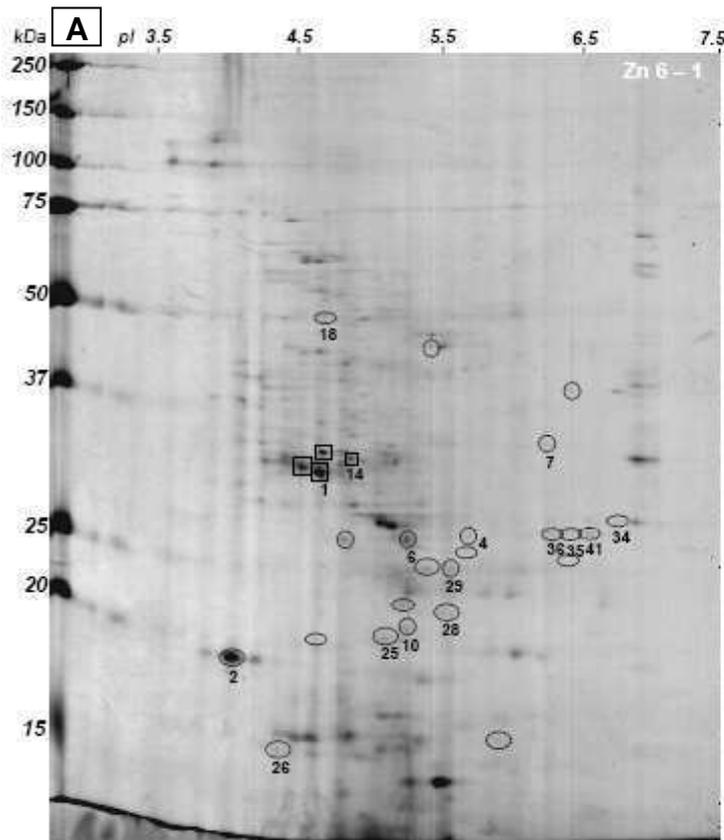
## II. IMPACT DU ZINC SUR LE PROTEOME D'*ALEXANDRIUM CATENELLA*

### 1. Impact de la contamination par le zinc 6 $\mu\text{M}$

#### 1.1- Profils d'expression protéique

Les profils d'expression protéique (PEPs) d'*Alexandrium catenella* cultivée en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$  sont présentés en Figure 64. Le nombre total de spots détectés sur ces PEPs était en moyenne de  $200 \pm 11$  spots ( $n = 3$ ). Ce résultat était significativement inférieur (Test de Student :  $P = 0,05$ ) (41% plus faible) à celui obtenu pour les PEPs Témoin (Figure 65), lesquels comportaient un nombre total de spots égal en moyenne à  $339 \pm 89$  spots ( $n = 3$ ). Les spots protéiques détectés en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$  sont horizontalement répartis le long d'une gamme de pI comprise entre 4,0 et 7,1, tandis qu'ils sont verticalement distribués dans une gamme de MW allant de 14 à 183 kDa. Cette répartition des spots protéiques était similaire à celle observée sur les PEPs Pb 6  $\mu\text{M}$ , Pb 12  $\mu\text{M}$ , Pb 18  $\mu\text{M}$  et Témoin (Figures 48, 52, 56 et 64). Sur la base des critères précédemment définis (chapitre II, partie I, section II.6.), 83 protéines d'intérêt (parmi les 200 protéines détectées) présentaient une modification de leur expression en réponse à la contamination par Zn 6  $\mu\text{M}$ . Sur ces 83 protéines, 4 protéines étaient sur – exprimées, parmi lesquelles une seule protéine (spot 14) l'était de façon assez significative ( $0,05 < P < 0,10$ ). Les 4 protéines sur – exprimées étaient regroupées au centre, à gauche des PEPs Zn 6  $\mu\text{M}$ , avec des pI autour de 4,5, et des MW autour de 30 kDa (Figure 64). Puis, 34 protéines étaient sous – exprimées parmi lesquelles, une protéine (spot 5) l'était de façon très significative ( $P < 0,01$ ), 5 (spots 4, 25, 35, 36, 41) l'étaient de façon significative ( $0,01 < P < 0,05$ ) et 2 (spots 18, 34) l'étaient de façon assez significative ( $0,05 < P < 0,10$ ) (Figure 64). La majorité des protéines sous – exprimées était répartie dans la moitié inférieure des PEPs Zn 6  $\mu\text{M}$ , avec des pI entre 4,0 et 6,9, et des MW de 14 à 32 kDa (Figure 64). Les protéines qui n'étaient pas sous – exprimées de façon significative par rapport au témoin ( $P > 0,10$ ), étaient indicatrices de modification du protéome lorsque leur sous – expression s'avérait significative dans d'autres conditions contaminantes, *i.e.* soit en cas de plus forte contamination par le zinc (avec 12  $\mu\text{M}$  et/ou 18  $\mu\text{M}$ ), soit en cas de contamination par le plomb (avec 6  $\mu\text{M}$  et/ou 12  $\mu\text{M}$ , et/ou 18  $\mu\text{M}$ ). Enfin, parmi les 83 protéines d'intérêt, au moins 45 protéines (protéines associées aux spots 8, 9, 21 et 30) disparaissaient totalement des PEPs Zn 6  $\mu\text{M}$  par rapport au Témoin (Figure 64). Ces protéines étaient distribuées de façon homogène sur les PEPs Témoin (Figure 65A). Les coordonnées MW/pI des protéines sur – exprimées, sous – exprimées ou disparues, sont indiquées sur les Figures 64 et 65.

## Comparaison contamination par Zn 6 $\mu$ M vs Témoin

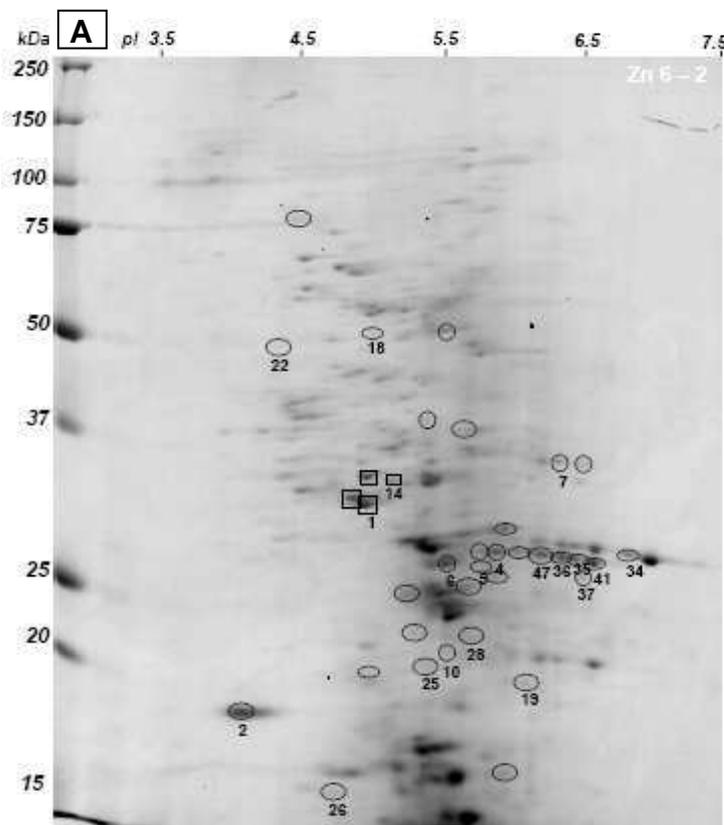


■ Noms des protéines sur-exprimées en présence de Zn 6  $\mu$ M  
 ○ Noms des protéines sous-exprimées en présence de Zn 6  $\mu$ M

**B** ↓

Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1	29.2/4.8	Protéine inconnue
2	17.7/4.0	Protéine non identifiée
4**	25.0/5.9	Triosephosphate isomérase
6	24.3/5.3	Binding Immunoglobuline protéine
7	31.7/6.4	Malate déshydrogénase
10	18.9/5.4	Malate déshydrogénase
14*	30.7/5.0	Protéine non identifiée
18*	46.5/4.9	Sous – unité $\alpha$ du protéasome
25**	18.2/5.3	Superoxyde dismutase [Cu-Zn]
26	14.1/4.5	Calmoduline
28	19.8/5.6	Ribose-5-phosphate isomérase
29	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
34*	25.7/6.9	Péridimine-chlorophylle protéine
35**	24.8/6.5	Sous – unité $\alpha$ du protéasome
36**	24.8/6.4	Péridimine-chlorophylle protéine
41**	24.6/6.7	Péridimine-chlorophylle protéine

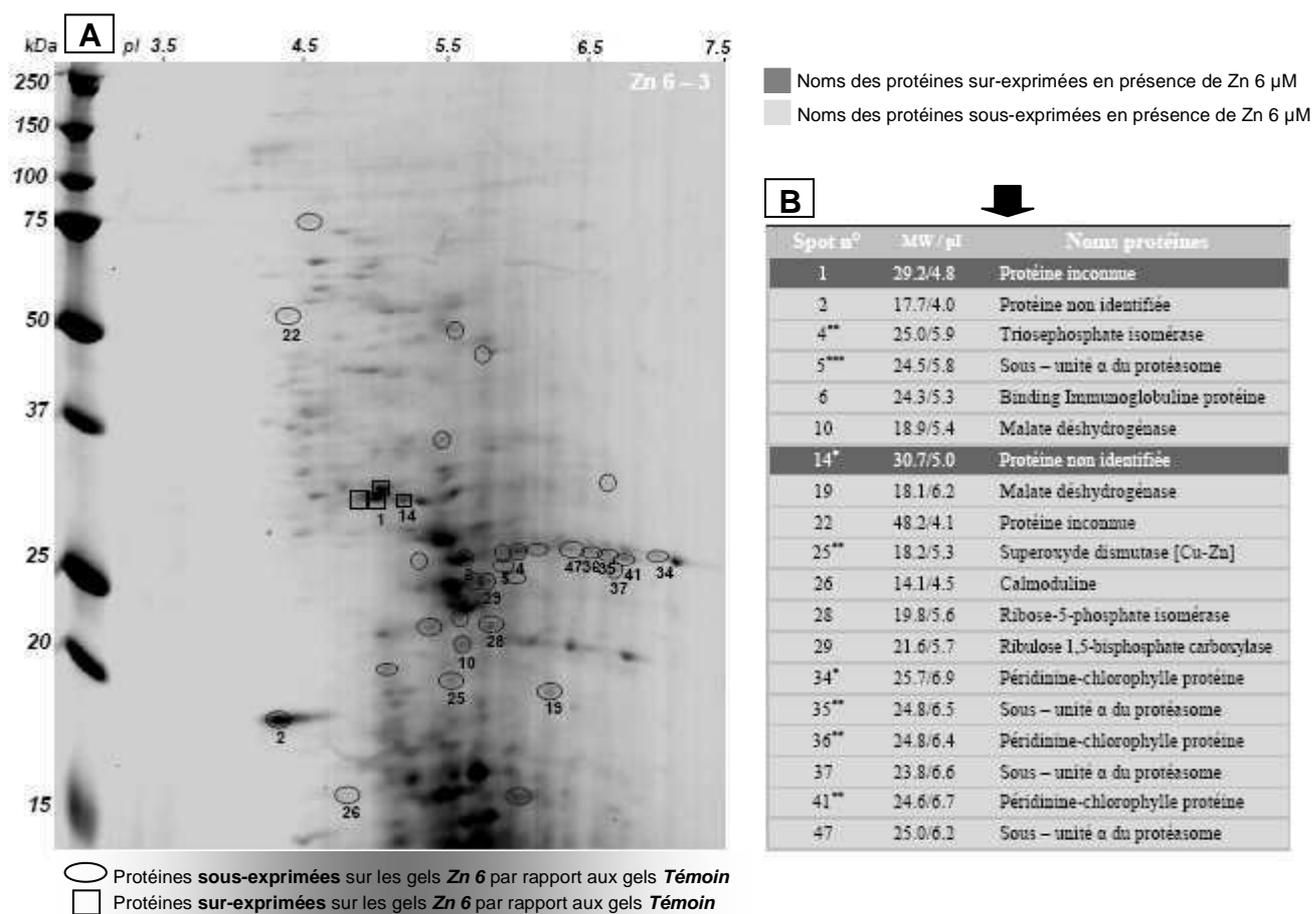
○ Protéines sous-exprimées sur les gels *Zn 6* par rapport aux gels *Témoin*  
 □ Protéines sur-exprimées sur les gels *Zn 6* par rapport aux gels *Témoin*



**B**

Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1	29.2/4.8	Protéine inconnue
2	17.7/4.0	Protéine non identifiée
4**	25.0/5.9	Triosephosphate isomérase
5***	24.5/5.8	Sous – unité $\alpha$ du protéasome
6	24.3/5.3	Binding Immunoglobuline protéine
7	31.7/6.4	Malate déshydrogénase
10	18.9/5.4	Malate déshydrogénase
14*	30.7/5.0	Protéine non identifiée
18*	46.5/4.9	Sous – unité $\alpha$ du protéasome
19	18.1/6.2	Malate déshydrogénase
22	48.2/4.1	Protéine inconnue
25**	18.2/5.3	Superoxyde dismutase [Cu-Zn]
26	14.1/4.5	Calmoduline
28	19.8/5.6	Ribose-5-phosphate isomérase
34*	25.7/6.9	Péridimine-chlorophylle protéine
35**	24.8/6.5	Sous – unité $\alpha$ du protéasome
36**	24.8/6.4	Péridimine-chlorophylle protéine
37	23.8/6.6	Sous – unité $\alpha$ du protéasome
41**	24.6/6.7	Péridimine-chlorophylle protéine
47	25.0/6.2	Sous – unité $\alpha$ du protéasome

○ Protéines sous-exprimées sur les gels *Zn 6* par rapport aux gels *Témoin*  
 □ Protéines sur-exprimées sur les gels *Zn 6* par rapport aux gels *Témoin*



**Figure 64.** Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures d'*Alexandrium catenella* contaminées par le zinc 6  $\mu$ M

**A :** Gels 2D montrant les protéines d'intérêt (dont l'expression était modifiée en réponse à la contamination métallique). Les spots numérotés ont été analysés par LC-MS/MS

**B :** Noms, MW et pI des protéines d'intérêt

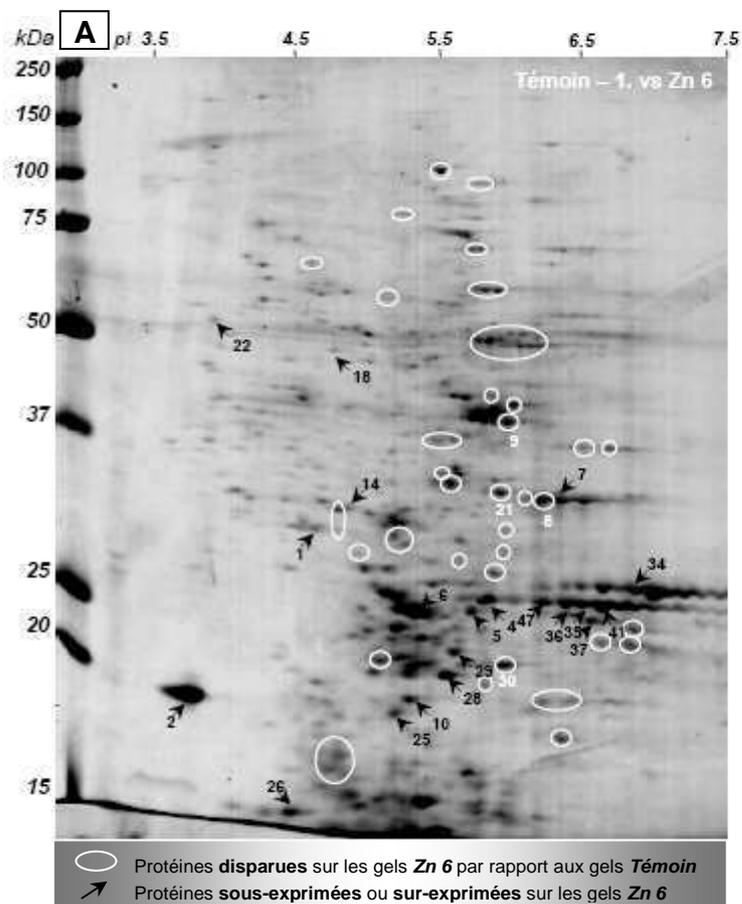
\*\*\* Protéine dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Protéine dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Protéine dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

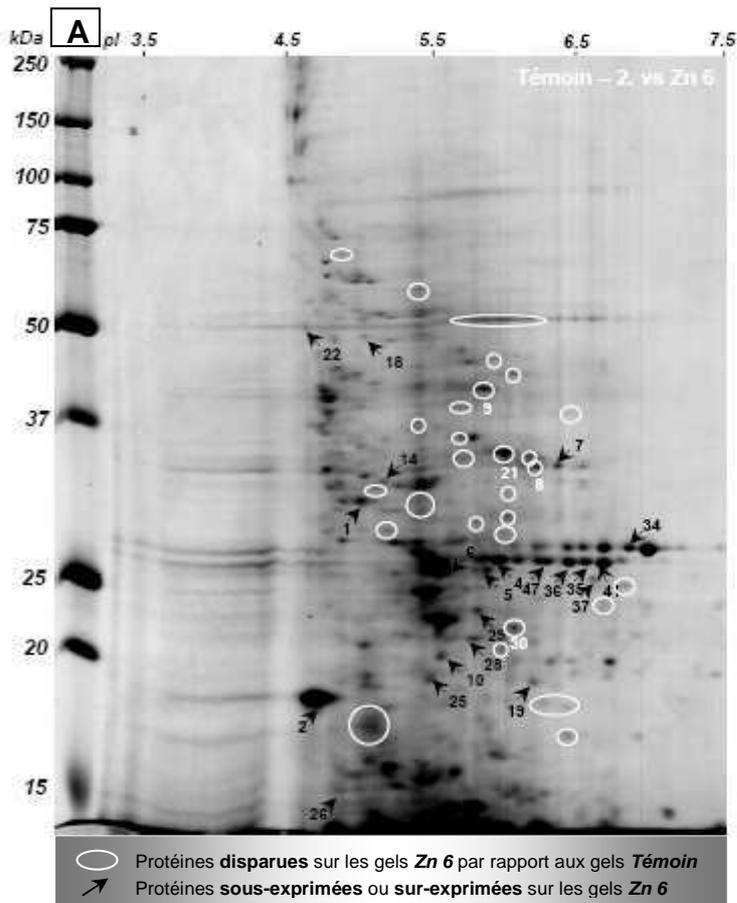
## Comparaison Témoin vs contamination par Zn 6 $\mu\text{M}$

- Noms des protéines sur-exprimées en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$
- Noms des protéines sous-exprimées en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$
- Noms des protéines disparues en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$



**B**

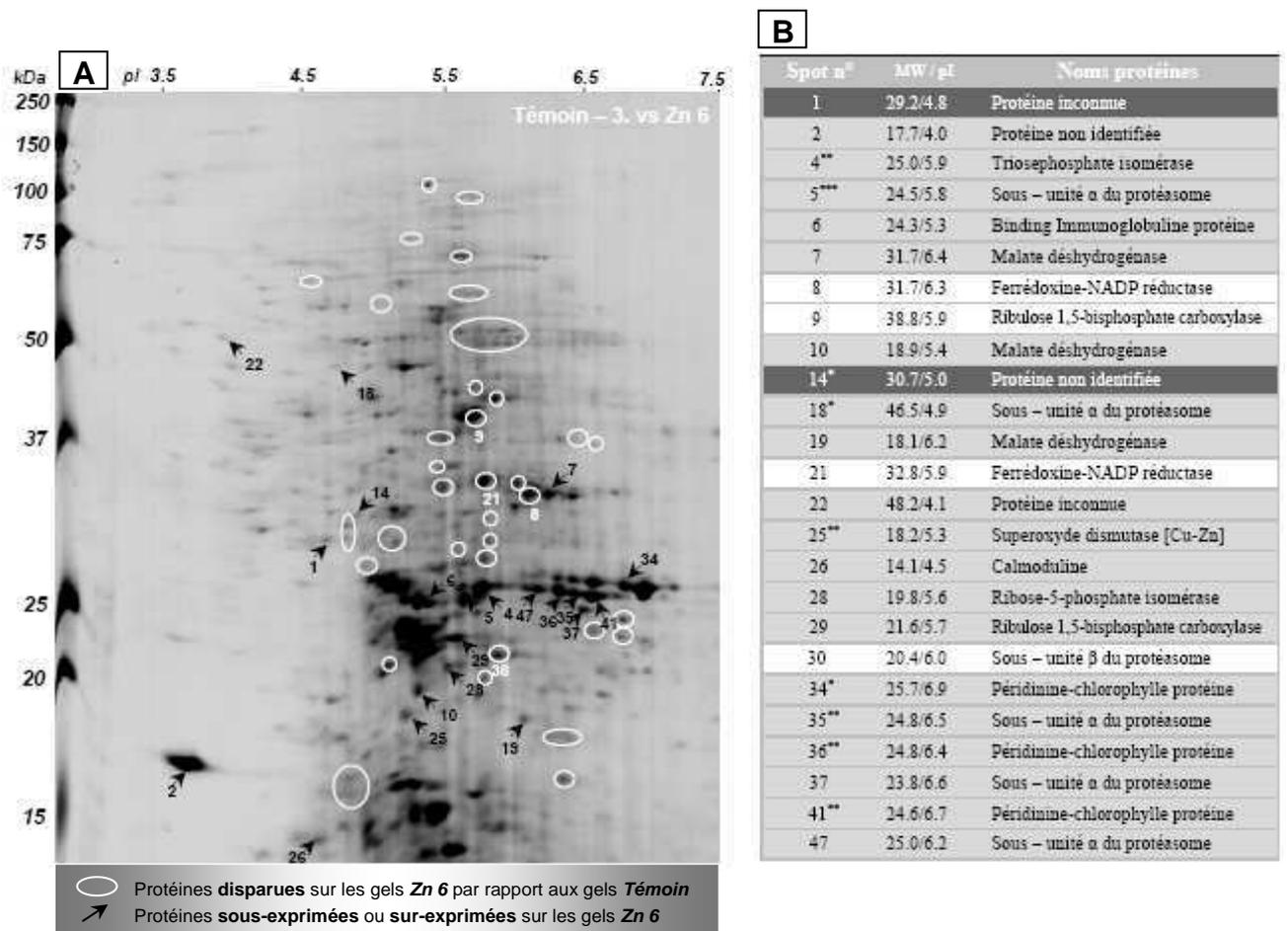
Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1	29.2/4.8	Protéine inconnue
2	17.7/4.0	Protéine non identifiée
4**	25.0/5.9	Triosephosphate isomérase
5***	24.5/5.8	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
6	24.3/5.3	Binding Immunoglobuline protéine
7	31.7/6.4	Malate déshydrogénase
8	31.7/6.3	Ferrédoxine-NADP réductase
9	38.8/5.9	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
10	18.9/5.4	Malate déshydrogénase
14*	30.7/5.0	Protéine non identifiée
18*	46.5/4.9	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
21	32.8/5.9	Ferrédoxine-NADP réductase
22	48.2/4.1	Protéine inconnue
25**	18.2/5.3	Superoxyde dismutase [Cu-Zn]
26	14.1/4.5	Calmoduline
28	19.8/5.6	Ribose-5-phosphate isomérase
29	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
30	20.4/6.0	Sous - unité $\beta$ du protéasome
34*	25.7/6.9	Péridimine-chlorophylle protéine
35**	24.8/6.5	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
36**	24.8/6.4	Péridimine-chlorophylle protéine
37	23.8/6.6	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
41**	24.6/6.7	Péridimine-chlorophylle protéine
47	25.0/6.2	Sous - unité $\alpha$ du protéasome



■ Noms des protéines sur-exprimées en présence de Zn 6  $\mu$ M  
 ■ Noms des protéines sous-exprimées en présence de Zn 6  $\mu$ M  
 □ Noms des protéines disparues en présence de Zn 6  $\mu$ M

**B**

Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1	29.2/4.8	Protéine inconnue
2	17.7/4.0	Protéine non identifiée
4**	25.0/5.9	Triosephosphate isomérase
5***	24.5/5.8	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
6	24.3/5.3	Binding Immunoglobuline protéine
7	31.7/6.4	Malate déshydrogénase
8	31.7/6.3	Ferrédoxine-NADP réductase
9	38.8/5.9	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
10	18.9/5.4	Malate déshydrogénase
14*	30.7/5.0	Protéine non identifiée
18*	46.5/4.9	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
19	18.1/6.2	Malate déshydrogénase
21	32.8/5.9	Ferrédoxine-NADP réductase
22	48.2/4.1	Protéine inconnue
25**	18.2/5.3	Superoxyde dismutase [Cu-Zn]
26	14.1/4.5	Calmoduline
28	19.8/5.6	Ribose-5-phosphate isomérase
29	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
30	20.4/6.0	Sous - unité $\beta$ du protéasome
34*	25.7/6.9	Péridimine-chlorophylle protéine
35**	24.8/6.5	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
36**	24.8/6.4	Péridimine-chlorophylle protéine
37	23.8/6.6	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
41**	24.6/6.7	Péridimine-chlorophylle protéine
47	25.0/6.2	Sous - unité $\alpha$ du protéasome



**Figure 65.** Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures témoins d'*Alexandrium catenella*

**A :** Gels 2D montrant les protéines d'intérêt (dont l'expression était modifiée en réponse à la contamination métallique). Les spots numérotés ont été analysés par LC-MS/MS

**B :** Noms, MW et pI des protéines d'intérêt

\*\*\* Protéine dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Protéine dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Protéine dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

## 1.2- Identification putative des protéines d'intérêt

Sur les 83 protéines d'intérêt, 25 protéines ont pu être prélevées dans les gels 2D pour l'identification par LC-MS/MS. L'analyse des séquences de 23 protéines sur les 25 protéines d'intérêt prélevées, a conduit à un résultat d'identification.

L'analyse de la seule protéine sur – exprimée assez significativement (spot 14) n'a abouti à aucun résultat.

La séquence de la protéine associée au spot 5, sous – exprimée très significativement, était homologue à celle de la protéine sous – unité  $\alpha$  du protéasome exprimée par le dinoflagellé *Oxyrrhis marina* (Tableau X).

Les séquences des protéines associées aux spots 4, 25, 35, 36 et 41, sous – exprimées significativement, étaient respectivement homologues à celles des protéines : TPI exprimée par *Karlodinium micrum*, SOD séquencée chez *Tetrahymena thermophila*, sous – unité  $\alpha$  du protéasome exprimée par *Alexandrium fundyense*, et PCP rencontrée chez *Alexandrium minutum* et *Gonyaulax polyedra*.

Les séquences des protéines associées aux spots 18 et 34, sous – exprimées assez significativement, étaient respectivement homologues à celles des protéines : sous – unité  $\alpha$  du protéasome exprimée par *Toxoplasma gondii* et PCP séquencée chez *Symbiodinium* sp.

Les séquences des protéines disparues associées aux spots 8, 21, 9 et 30, étaient respectivement homologues à celles des protéines : FNR rencontrée chez *Heterocapsa triquetra*, RUBISCO séquencée chez *Gonyaulax polyedra* et sous – unité  $\beta$  du protéasome exprimée par *Alexandrium ostenfeldii*.

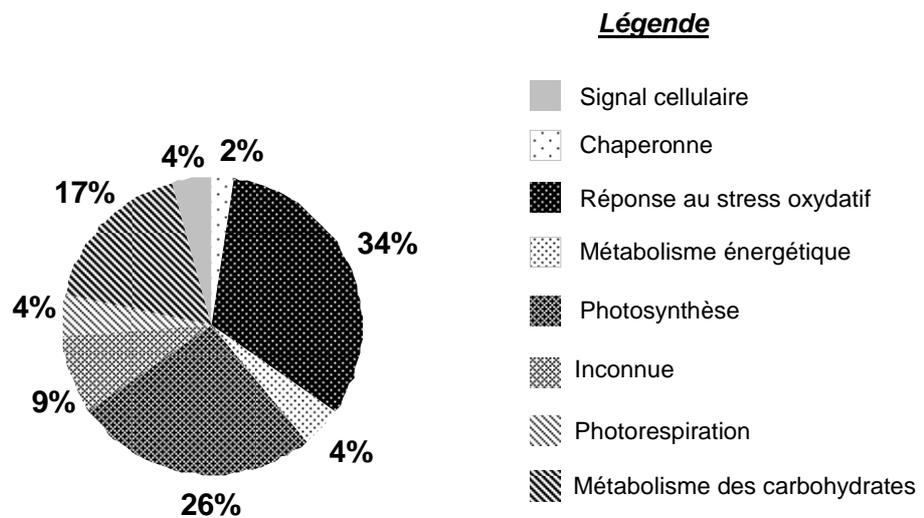
Pour certains spots, l'identification protéique s'est avérée infructueuse pour des raisons techniques (séquence peptidique non déterminée). Dans ce cas, les protéines ont été qualifiées de « non identifiées ». Pour certains autres spots, la séquence peptidique a été déterminée mais ne correspondait à aucune protéine connue. Dans ce cas, les protéines correspondantes ont été qualifiées d'« inconnues ».

### 1.3- Catégories fonctionnelles des protéines d'intérêt

Les protéines d'intérêt exprimées en réponse à la contamination par Zn 6  $\mu$ M, étaient associées à sept catégories fonctionnelles connues : signal cellulaire, action chaperonne, réponse au stress oxydatif, métabolisme énergétique, photosynthèse, photorespiration et métabolisme des carbohydrates (Figure 66).

La réponse au stress oxydatif, *via* les sous – unités du protéasome, la SOD et la BIP ; puis la photosynthèse, *via* la RUBISCO, la PCP, la FNR, la RPI et la TPI, représentaient, dans cet ordre, les deux catégories fonctionnelles les plus affectées par Zn 6  $\mu$ M (34% des protéines identifiées concernaient la réponse au stress oxydatif, 26% concernaient la photosynthèse).

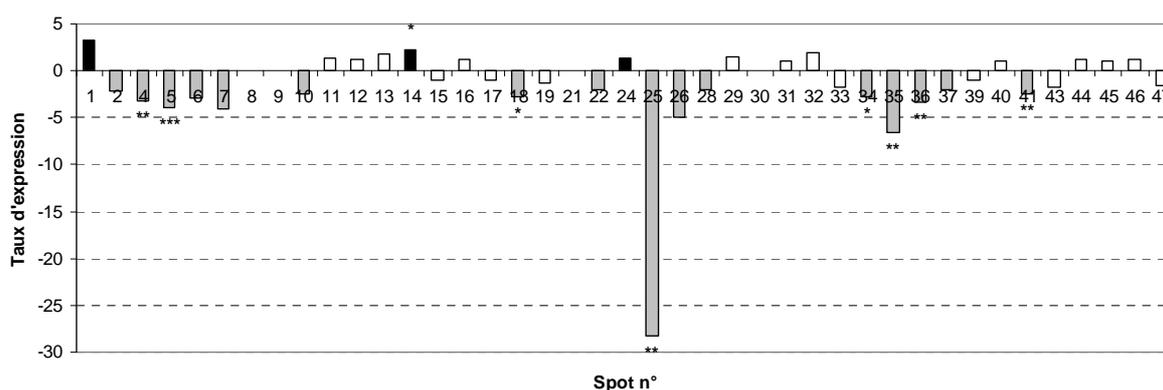
Puis, le métabolisme des carbohydrates (TPI, RPI, MDH) (17%), le signal cellulaire (CaM) (4%), la photorespiration (RUBISCO) (4%) et l'action chaperonne (BIP) (4%), étaient les fonctions biologiques moins perturbées par cette contamination.



**Figure 66.** Distribution des fonctions biologiques assignées aux protéines d'intérêt exprimées par *Alexandrium catenella* en réponse à une contamination par Zn 6  $\mu$ M

#### 1.4- Taux d'expression des protéines analysées par LC-MS/MS

Les taux d'expression calculés dans le cas de la contamination par Zn 6  $\mu$ M sont présentés en Figure 67. Les résultats obtenus indiquaient des modifications du protéome d'*Alexandrium catenella* en présence de Zn 6  $\mu$ M, certaines protéines montrant une expression modifiée de -28,0 à +2,1 fois par rapport aux conditions témoins ( $P < 0,10$ ). La seule protéine significativement sur - exprimée (spot 14), dont l'analyse n'a pas permis l'identification, était +2,1 fois exprimée en réponse à la contamination par Zn 6  $\mu$ M. L'impact du stress métallique était plus important sur les protéines sous - exprimées telles que la PCP (spots 34, 36, 41) dont les taux d'expression atteignaient entre -2,4 et -3,3, les sous - unités  $\alpha$  du protéasome (spots 5, 18, 35), et la TPI (-3,2). Toutefois, la protéine dont l'expression était la plus affectée par Zn 6  $\mu$ M, était la SOD, montrant un taux de sous - expression particulièrement bas, le plus faible calculé dans cette étude, égal à -28,0.



**Figure 67.** Taux d'expression des protéines d'intérêt exprimées par *Alexandrium catenella* en réponse à une contamination par Zn 6  $\mu$ M. L'axe des ordonnées indique le taux moyen d'expression de chaque protéine ; les valeurs positives, en noir, indiquent les taux d'expression des protéines sur - exprimées (taux  $\geq +2$ ) ; les valeurs négatives, en gris, indiquent les taux d'expression des protéines sous - exprimées (taux  $\leq -2$ ). En blanc, sont représentés les taux d'expression les moins modifiés ( $-2 < \text{taux} < +2$ ), de certaines protéines. Le taux d'expression des protéines disparues est égal à 0

\*\*\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

## 2. Impact de la contamination par le zinc 12 $\mu\text{M}$

### 2.1- Profils d'expression protéique

Les profils d'expression protéique (PEPs) d'*Alexandrium catenella* cultivée en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$  sont présentés en Figure 68. Le nombre total de spots détectés sur ces PEPs était en moyenne de  $162 \pm 90$  spots ( $n = 3$ ). Ce résultat était significativement inférieur (Test de Student :  $P = 0,07$ ) (52% plus faible) à celui obtenu pour les PEPs Témoin (Figure 69), lesquels montraient un nombre total de spots égal en moyenne à  $339 \pm 89$  spots ( $n = 3$ ).

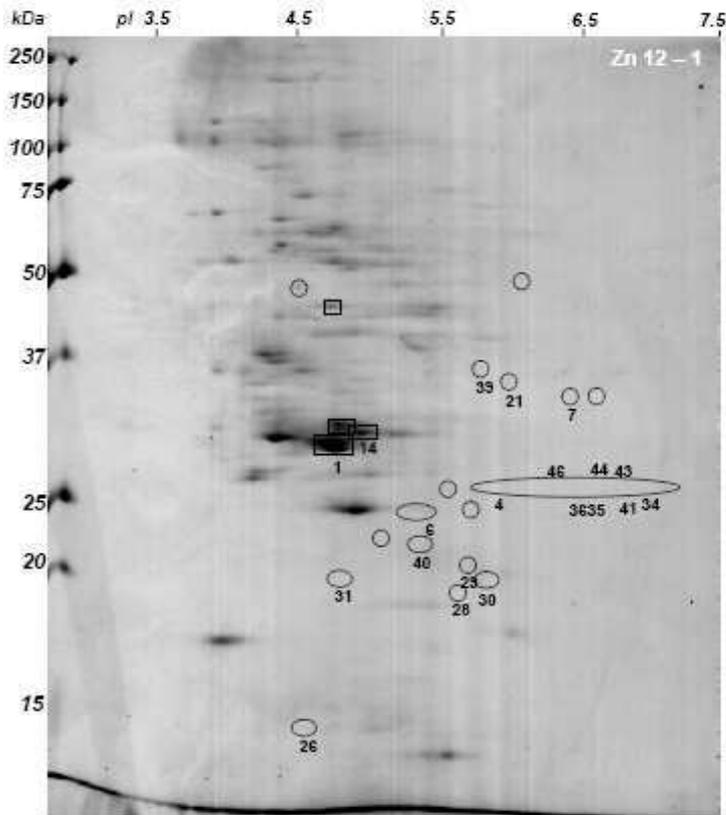
Les spots protéiques détectés en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$  sont horizontalement répartis le long d'une gamme de pI comprise entre 4,0 et 7,1, tandis qu'ils sont verticalement distribués dans une gamme de MW allant de 14 à 183 kDa. Cette répartition des spots protéiques était similaire à celle observée sur les PEPs Pb 6  $\mu\text{M}$ , Pb 12  $\mu\text{M}$ , Pb 18  $\mu\text{M}$ , Zn 6  $\mu\text{M}$  et Témoin (Figures 49, 53, 57, 64 et 69). Sur la base des critères précédemment définis (chapitre II, partie I, section II.6.), 87 protéines d'intérêt (parmi les 162 protéines détectées) présentaient une modification de leur expression, en réponse à la contamination par Zn 12  $\mu\text{M}$ .

Sur les 87 protéines d'intérêt, 3 protéines étaient sur – exprimées, parmi lesquelles une seule protéine (spot 1) l'était de façon significative ( $0,01 < P < 0,05$ ). Les 3 protéines sur – exprimées étaient regroupées au centre, légèrement à gauche des PEPs Zn 12  $\mu\text{M}$ , avec des pI autour de 4,5, et des MW autour de 30 kDa (Figure 68). Puis, 27 protéines étaient sous – exprimées, parmi lesquelles 5 protéines (spots 4, 21, 29, 31, 39) l'étaient de façon significative ( $0,01 < P < 0,05$ ) et 5 protéines (spots 26, 35, 36, 41, 43) l'étaient de façon assez significative ( $0,05 < P < 0,10$ ) (Figure 68). La majorité des protéines sous – exprimées était répartie dans la moitié inférieure des PEPs Zn 12  $\mu\text{M}$ , avec des pI entre 4,5 et 6,9, et des MW allant de 14 à 26 kDa (Figure 68).

Les protéines dont la différence d'expression n'était pas significative par rapport au Témoin ( $P > 0,10$ ), étaient considérées comme indicatrices de modification du protéome lorsque leur différence d'expression s'avérait significative dans d'autres conditions contaminantes, *i.e.* soit en présence d'autres concentrations de zinc (avec 6  $\mu\text{M}$  et/ou 18  $\mu\text{M}$ ), soit en cas de contamination par le plomb (avec 6  $\mu\text{M}$  et/ou 12  $\mu\text{M}$ , et/ou 18  $\mu\text{M}$ ).

Enfin, parmi les 87 protéines d'intérêt, au moins 57 protéines (exemple : spots 5, 8, 9, 10, 12, 17, 18, 19, 22, 25) disparaissaient totalement des PEPs Zn 12  $\mu\text{M}$  par rapport au Témoin (Figure 69). Ces protéines étaient distribuées de façon homogène sur les PEPs Témoin (Figure 69). Les coordonnées MW/pI des protéines sur – exprimées, sous – exprimées ou disparues, sont indiquées dans les Figures 68 et 69.

## Comparaison contamination par Zn 12 µM vs Témoin

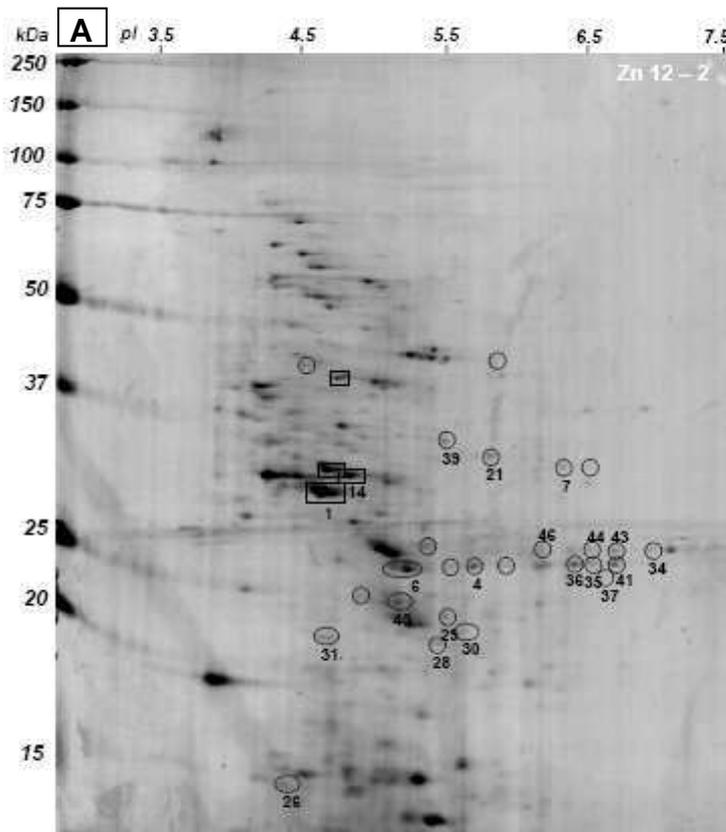


○ Protéines **sous-exprimées** sur les gels **Zn 12** par rapport aux gels **Témoin**  
 □ Protéines **sur-exprimées** sur les gels **Zn 12** par rapport aux gels **Témoin**

■ Noms des protéines sur-exprimées en présence de Zn 12 µM  
 □ Noms des protéines sous-exprimées en présence de Zn 12 µM

**B**

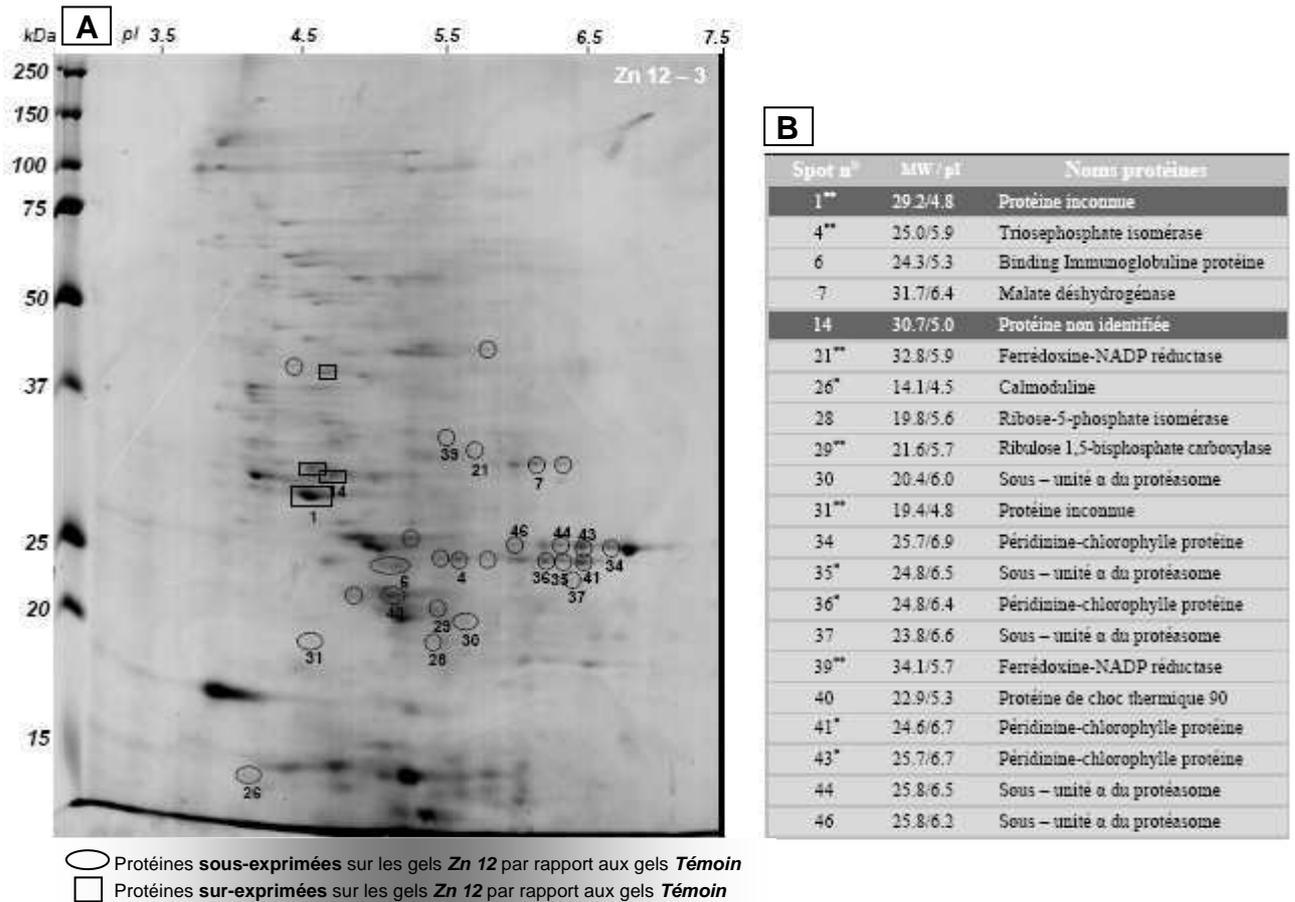
Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1**	29.2/4.8	Protéine inconnue
4**	25.0/5.9	Triosephosphate isomérase
6	24.3/5.3	Binding Immunoglobuline protéine
7	31.7/6.4	Malate déshydrogénase
14	30.7/5.0	Protéine non identifiée
21**	32.8/5.9	Ferrédoxine-NADP réductase
26*	14.1/4.5	Calmoduline
28	19.8/5.6	Ribose-5-phosphate isomérase
29**	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
30	20.4/6.0	Sous - unité α du protéasome
31**	19.4/4.8	Protéine inconnue
34	25.7/6.9	Péridinine-chlorophylle protéine
35*	24.8/6.5	Sous - unité α du protéasome
36*	24.8/6.4	Péridinine-chlorophylle protéine
39**	34.1/5.7	Ferrédoxine-NADP réductase
40	22.9/5.3	Protéine de choc thermique 90
41*	24.6/6.7	Péridinine-chlorophylle protéine
43*	25.7/6.7	Péridinine-chlorophylle protéine
44	25.8/6.5	Sous - unité α du protéasome
46	25.8/6.2	Sous - unité α du protéasome



○ Protéines **sous-exprimées** sur les gels **Zn 12** par rapport aux gels **Témoin**  
 □ Protéines **sur-exprimées** sur les gels **Zn 12** par rapport aux gels **Témoin**

**B**

Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1**	29.2/4.8	Protéine inconnue
4**	25.0/5.9	Triosephosphate isomérase
6	24.3/5.3	Binding Immunoglobuline protéine
7	31.7/6.4	Malate déshydrogénase
14	30.7/5.0	Protéine non identifiée
21*	32.8/5.9	Ferrédoxine-NADP réductase
26*	14.1/4.5	Calmoduline
28	19.8/5.6	Ribose-5-phosphate isomérase
29**	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
30	20.4/6.0	Sous - unité α du protéasome
31**	19.4/4.8	Protéine inconnue
34	25.7/6.9	Péridinine-chlorophylle protéine
35*	24.8/6.5	Sous - unité α du protéasome
36*	24.8/6.4	Péridinine-chlorophylle protéine
37	23.8/6.6	Sous - unité α du protéasome
39**	34.1/5.7	Ferrédoxine-NADP réductase
40	22.9/5.3	Protéine de choc thermique 90
41*	24.6/6.7	Péridinine-chlorophylle protéine
43*	25.7/6.7	Péridinine-chlorophylle protéine
44	25.8/6.5	Sous - unité α du protéasome
46	25.8/6.2	Sous - unité α du protéasome



**Figure 68.** Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures d'*Alexandrium catenella* contaminées par le zinc 12  $\mu$ M

**A :** Gels 2D montrant les protéines d'intérêt (dont l'expression était modifiée en réponse à la contamination métallique). Les spots numérotés ont été analysés par LC-MS/MS

**B :** Noms, MW et pI des protéines d'intérêt

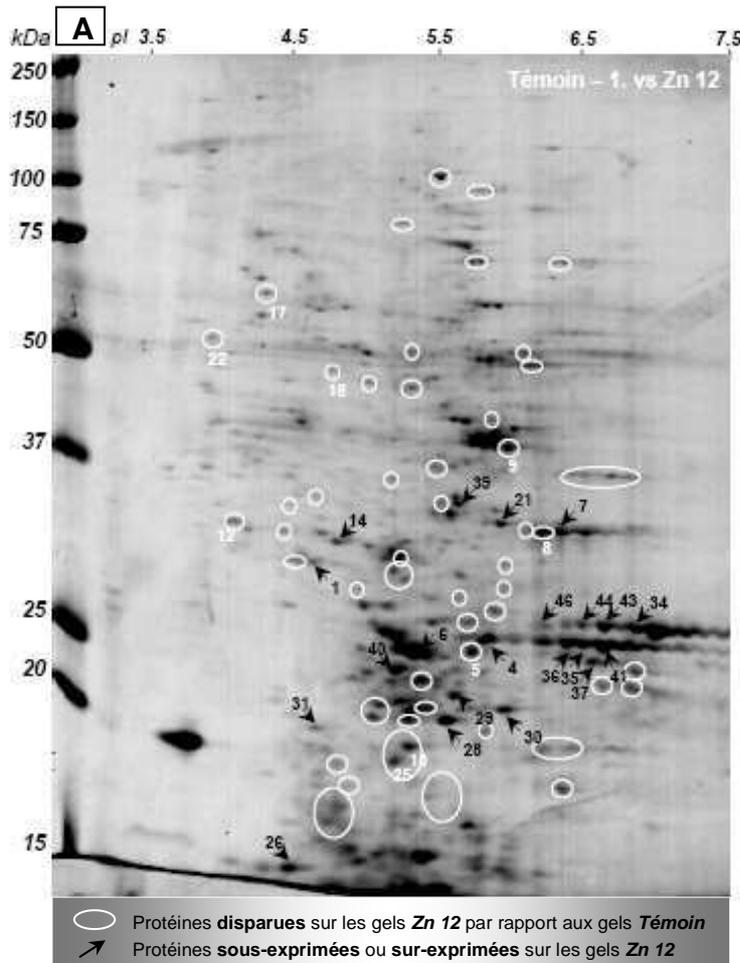
\*\*\* Protéine dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Protéine dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Protéine dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

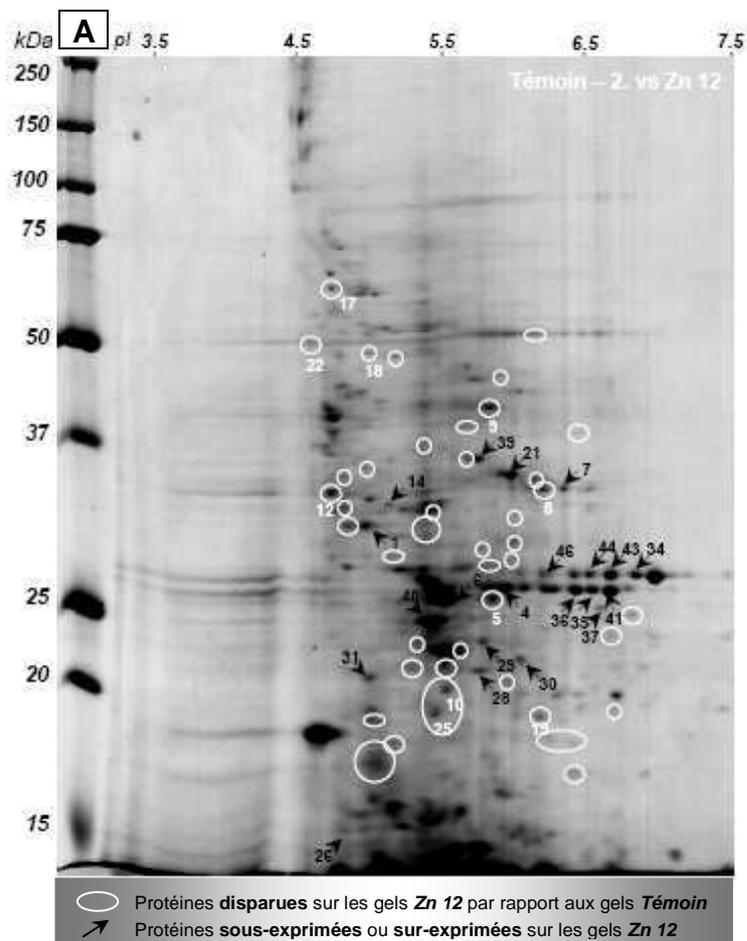
## Comparaison Témoin vs contamination par Zn 12 µM

- Noms des protéines sur-exprimées en présence de Zn 12 µM
- Noms des protéines sous-exprimées en présence de Zn 12 µM
- Noms des protéines disparues en présence de Zn 12 µM



**B**

Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1**	29.2/4.8	Protéine inconnue
4**	25.0/5.9	Triosephosphate isomérase
5	24.5/5.8	Sous – unité α du protéasome
6	24.3/5.3	Binding Immunoglobuline protéine
7	31.7/6.4	Malate déshydrogénase
8	31.7/6.3	Ferrédoxine-NADP réductase
9	38.8/5.9	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
10	18.9/5.4	Malate déshydrogénase
12	31.7/4.3	Protéine inconnue
14	30.7/5.0	Protéine non identifiée
17	59.0/4.5	Protéine non identifiée
18	46.5/4.9	Sous – unité α du protéasome
21**	32.8/5.9	Ferrédoxine-NADP réductase
22	48.2/4.1	Protéine non identifiée
25	18.2/5.3	Superoxyde dismutase [Cu-Zn]
26*	14.1/4.5	Calmoduline
28	19.8/5.6	Ribose-5-phosphate isomérase
29**	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
30	20.4/6.0	Sous – unité α du protéasome
31**	19.4/4.8	Protéine inconnue
34	25.7/6.9	Péridinine-chlorophylle protéine
35*	24.8/6.5	Sous – unité α du protéasome
36*	24.8/6.4	Péridinine-chlorophylle protéine
37	23.8/6.6	Sous – unité α du protéasome
39**	34.1/5.7	Ferrédoxine-NADP réductase
40	22.9/5.3	Protéine de choc thermique 90
41*	24.6/6.7	Péridinine-chlorophylle protéine
43*	25.7/6.7	Péridinine-chlorophylle protéine
44	25.8/6.5	Sous – unité α du protéasome
46	25.8/6.2	Sous – unité α du protéasome

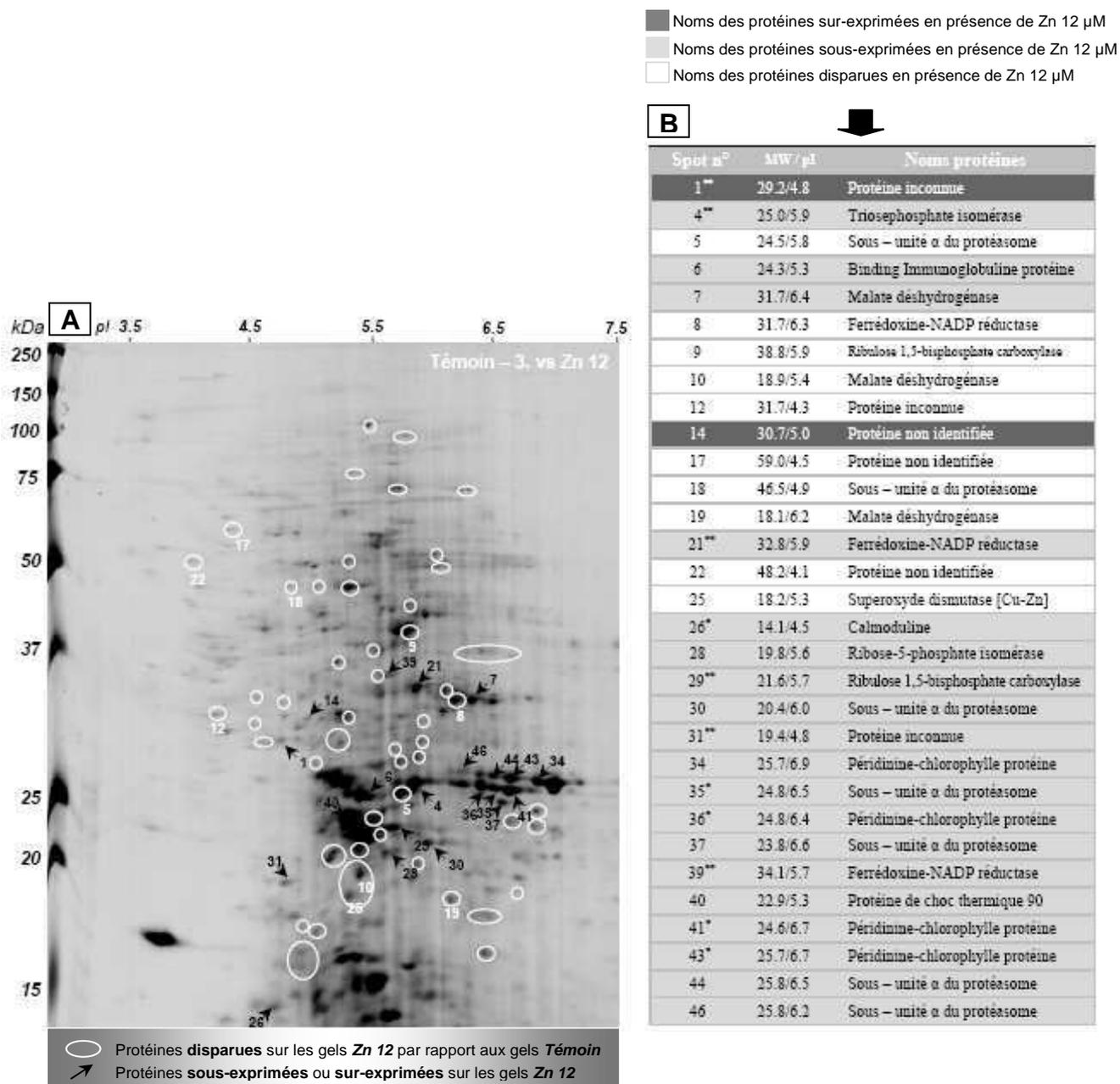


■ Noms des protéines sur-exprimées en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$   
 ■ Noms des protéines sous-exprimées en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$   
 □ Noms des protéines disparues en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$

**B**

↓

Spot n°	MW/pI	Noms protéines
1**	29.2/4.8	Protéine inconnue
4**	25.0/5.9	Triosephosphate isomérase
5	24.5/5.8	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
6	24.3/5.3	Binding Immunoglobuline protéine
7	31.7/6.4	Malate déshydrogénase
8	31.7/6.3	Ferrédoxine-NADP réductase
9	38.8/5.9	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
10	18.9/5.4	Malate déshydrogénase
12	31.7/4.3	Protéine inconnue
14	30.7/5.0	Protéine non identifiée
17	59.0/4.5	Protéine non identifiée
18	46.5/4.9	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
19	18.1/6.2	Malate déshydrogénase
21**	32.8/5.9	Ferrédoxine-NADP réductase
22	48.2/4.1	Protéine non identifiée
25	18.2/5.3	Superoxyde dismutase [Cu-Zn]
26*	14.1/4.5	Calmoduline
28	19.8/5.6	Ribose-5-phosphate isomérase
29**	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
30	20.4/6.0	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
31**	19.4/4.8	Protéine inconnue
34	25.7/6.9	Péridinine-chlorophylle protéine
35*	24.8/6.5	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
36*	24.8/6.4	Péridinine-chlorophylle protéine
37	23.8/6.6	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
39**	34.1/5.7	Ferrédoxine-NADP réductase
40	22.9/5.3	Protéine de choc thermique 90
41*	24.6/6.7	Péridinine-chlorophylle protéine
43*	25.7/6.7	Péridinine-chlorophylle protéine
44	25.8/6.5	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
46	25.8/6.2	Sous - unité $\alpha$ du protéasome



**Figure 69.** Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures témoins d'*Alexandrium catenella*

**A :** Gels 2D montrant les protéines d'intérêt (dont l'expression était modifiée en réponse à la contamination métallique). Les spots numérotés ont été analysés par LC-MS/MS

**B :** Noms, MW et pI des protéines d'intérêt

\*\*\* Protéine dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Protéine dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Protéine dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

## 2.2- Identification putative des protéines d'intérêt

Sur les 87 protéines d'intérêt, 31 protéines ont pu être prélevées dans les gels 2D pour identification par LC-MS/MS. L'analyse des séquences de 28 protéines sur les 31 protéines d'intérêt prélevées a conduit à un résultat d'identification.

Aucune fonction biologique connue n'a pu être assignée à la protéine associée au spot 1, seule protéine sur – exprimée significativement, sa séquence n'étant homologue qu'à celle d'une protéine inconnue rencontrée chez *Paramecium tetraurelia* (Tableau X).

Les séquences des protéines associées aux spots 4, 21, 39, 29 et 31, sous – exprimées significativement, étaient respectivement homologues à celles des protéines : TPI exprimée par *Karlodium micrum*, FNR séquencées chez *Heterocapsa triquetra*, RUBISCO exprimée par *Heterocapsa triquetra*, et protéine inconnue dont la séquence était rencontrée chez *Alexandrium minutum*.

Les séquences des protéines associées aux spots 26, 35, 36, 41 et 43, sous – exprimées assez significativement, étaient respectivement homologues à celles des protéines : CaM exprimée par *Oxyrrhis marina*, sous – unité  $\alpha$  du protéasome séquencée chez *Alexandrium fundyense*, PCP séquencées chez *Alexandrium minutum*, *Gonyaulax polyedra* et *Amphidinium carterae*.

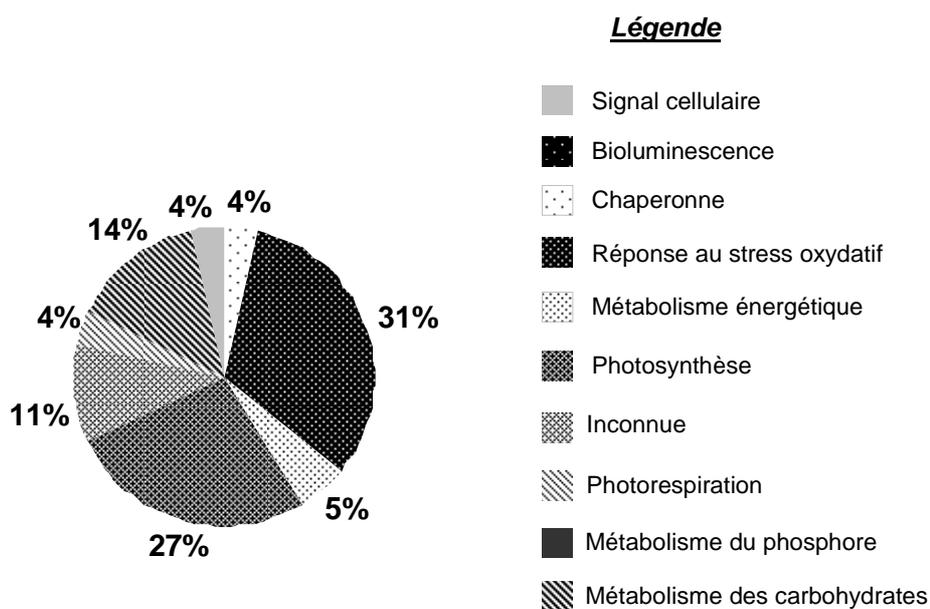
Les séquences des protéines associées aux spots 5, 18, 8, 9, 10, 19 et 25, disparues, étaient respectivement homologues à celles des protéines : sous – unités  $\alpha$  du protéasome séquencées chez *Oxyrrhis marina* et *Toxoplasma gondii*, FNR rencontrée chez *Heterocapsa triquetra*, RUBISCO séquencée chez *Gonyaulax polyedra*, MDH séquencées chez *Karlodium micrum*, et SOD exprimée par *Tetrahymena thermophila*. En revanche, l'analyse des séquences des protéines disparues associées aux spots 17 et 22, n'a abouti à aucun un résultat d'indentification, alors que celle de la protéine associée au spot 12 montrait une homologie avec la séquence d'une protéine inconnue déjà rencontrée chez *Plasmodinium berghei*.

Pour certains spots, l'identification protéique s'est avérée infructueuse pour des raisons techniques (séquence peptidique non déterminée). Dans ce cas, les protéines ont été qualifiées de « non identifiées ». Pour certains autres spots, la séquence peptidique a été déterminée mais ne correspondait à aucune protéine connue. Dans ce cas, les protéines correspondantes ont été qualifiées d'« inconnues ».

### 2.3- Catégories fonctionnelles des protéines d'intérêt

Les protéines d'intérêt, exprimées en réponse à la contamination par Zn 12  $\mu$ M, étaient associées à huit catégories fonctionnelles connues : signal cellulaire, action chaperonne, réponse au stress oxydatif, métabolisme énergétique, photosynthèse, photorespiration, métabolisme du phosphore et métabolisme des carbohydrates (Figure 70).

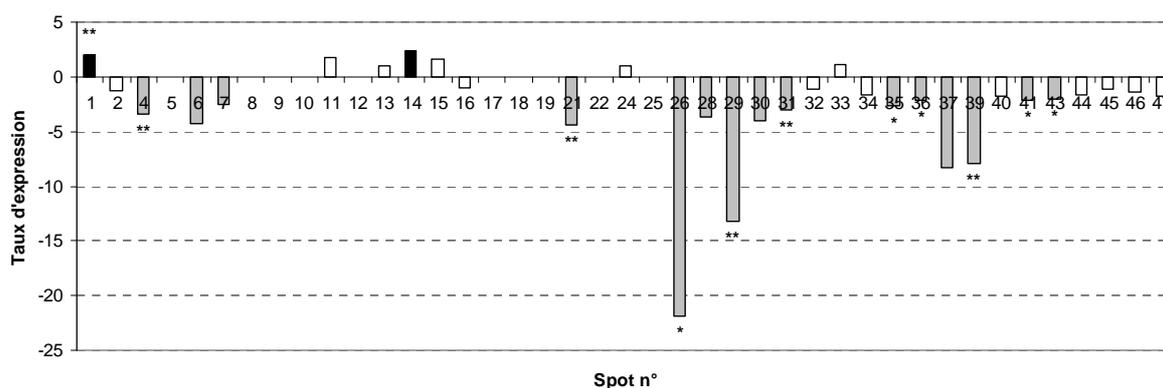
La réponse au stress oxydatif, *via* les sous – unités du protéasome, la SOD, HSP 90 et la BIP ; puis la photosynthèse, *via* la RUBISCO, la PCP, la FNR, la TPI et la RPI, représentaient, dans cet ordre, les deux catégories fonctionnelles les plus affectées par Zn 12  $\mu$ M (31% des protéines identifiées concernaient la réponse au stress oxydatif, 26% concernaient la photosynthèse). Puis, le métabolisme des carbohydrates (TPI, RPI, MDH) (17%), le métabolisme énergétique (FNR) (5%), le signal cellulaire (CaM) (4%), l'action chaperonne (HSP 90, BIP) (4%) et la photorespiration (RUBISCO) (4%), étaient les fonctions biologiques moins perturbées par cette contamination.



**Figure 70.** Distribution des fonctions biologiques assignées aux protéines d'intérêt exprimées par *Alexandrium catenella* en réponse à la contamination par Zn 12  $\mu$ M

## 2.4- Taux d'expression des protéines analysées par LC-MS/MS

Les taux d'expression calculés dans le cas de la contamination par Zn 12  $\mu\text{M}$  sont présentés en Figure 71. Les résultats obtenus indiquaient des modifications du protéome d'*Alexandrium catenella* en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$ , certaines protéines montrant une expression modifiée de -21,8 à +2,0 fois par rapport aux conditions témoins ( $P < 0,10$ ). La seule protéine significativement sur – exprimée (spot 1), dont l'analyse a abouti à une protéine inconnue, était +2,0 fois exprimée en réponse à la contamination par Zn 12  $\mu\text{M}$ . L'impact du stress métallique était beaucoup plus important pour les protéines sous – exprimées telles que : la RUBISCO (spot 29) dont le taux d'expression atteignait -13,2, la FNR (spots 21, 39) avec des taux entre -8,0 et -4,4, et la TPI (spot 4 : -3,4). Cet impact était moins important pour la sous – unité  $\alpha$  du protéasome (spot 35 : -2,7) et la PCP (spots 36, 41, 43), qui présentaient des taux d'expression autour de -2,0. Toutefois, la protéine dont l'expression était la plus affectée par Zn 12  $\mu\text{M}$  était la CaM, avec un taux de sous - expression particulièrement bas, égal à -21,8, parmi les plus faibles calculés dans cette étude.



**Figure 71.** Taux d'expression des protéines d'intérêt exprimées par *Alexandrium catenella* en réponse à une contamination par Zn 12  $\mu\text{M}$ . L'axe des ordonnées indique le taux moyen d'expression de chaque protéine ; les valeurs positives, en noir, indiquent les taux d'expression des protéines sur – exprimées (taux  $\geq +2$ ) ; les valeurs négatives, en gris, indiquent les taux d'expression des protéines sous – exprimées (taux  $\leq -2$ ). En blanc, sont représentés les taux d'expression les moins modifiés ( $-2 < \text{taux} < +2$ ), de certaines protéines. Le taux d'expression des protéines disparues est égal à 0

\*\*\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

### 3. Impact de la contamination par le zinc 18 $\mu\text{M}$

#### 3.1- Profils d'expression protéique

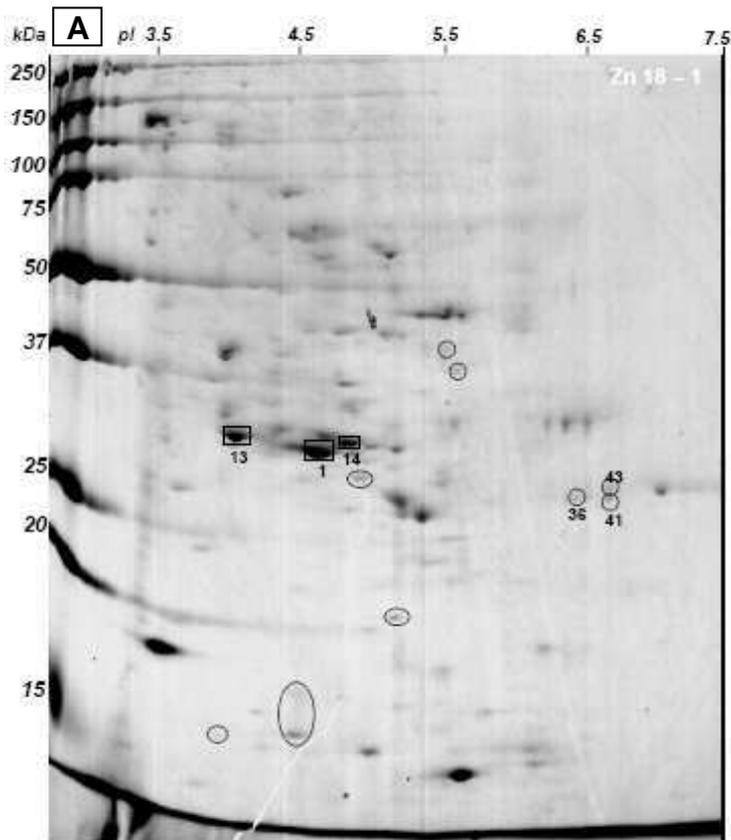
Les profils d'expression protéique (PEPs) d'*Alexandrium catenella* cultivée en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$  sont présentés en Figure 72. Le nombre total de spots détectés sur ces PEPs était en moyenne de  $136 \pm 37$  spots ( $n = 3$ ). Ce résultat était significativement inférieur (Test de Student :  $P = 0,02$ ) (60% plus faible) à celui obtenu pour les PEPs Témoin (Figure 73), lesquels montraient un nombre total de spots égal en moyenne à  $339 \pm 89$  spots ( $n = 3$ ).

Les spots protéiques détectés en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$  sont horizontalement répartis le long d'une gamme de pI comprise entre 4,0 et 7,1, tandis qu'ils sont verticalement distribués dans une gamme de MW allant de 14 à 183 kDa. Cette répartition des spots protéiques était similaire à celle observée sur les PEPs Pb 6  $\mu\text{M}$ , Pb 12  $\mu\text{M}$ , Pb 18  $\mu\text{M}$ , Zn 6  $\mu\text{M}$ , Zn 12  $\mu\text{M}$ , et Témoin (Figures 48, 52, 56, 63, 67 et 72). Sur la base des critères précédemment définis (chapitre II, partie I, section II.6.), 122 protéines d'intérêt (parmi les 136 protéines détectées) présentaient une modification de leur expression, en réponse à la contamination par Zn 18  $\mu\text{M}$ . Sur les 122 protéines d'intérêt, deux protéines (spots 1, 13) étaient sur – exprimées de façon très significative par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ ), tandis qu'une protéine (spot 14) était sur – exprimée de façon assez significative ( $0,05 < P < 0,10$ ). Ces trois protéines étaient regroupées au centre et à gauche des PEPs Zn 18  $\mu\text{M}$ , avec des pI entre 4,4 et 5,0, et des MW autour de 30 kDa (Figure 72).

Puis, 13 protéines étaient sous – exprimées parmi lesquelles, une protéine (spot 41) l'était de façon significative ( $0,01 < P < 0,05$ ), et deux protéines (spots 36, 43) l'étaient de façon assez significative ( $0,05 < P < 0,10$ ) (Figure 72). Les protéines sous – exprimées étaient réparties dans la moitié inférieure des PEPs Zn 18  $\mu\text{M}$ , avec des pI entre 4,6 et 6,7, et des MW globalement compris entre 14 et 26 kDa (Figure 72).

Enfin, parmi les 122 protéines d'intérêt, au moins 105 protéines (exemple : spots 4, 5, 9, 10, 16, 17, 18, 21, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 37, 39, 40, 44, 45, 46, 47) disparaissaient totalement des PEPs Zn 18  $\mu\text{M}$  par rapport au Témoin (Figure 73). Les coordonnées MW/pI des protéines sur – exprimées, sous – exprimées, disparues, sont indiquées dans les Figures 72 et 73.

## Comparaison contamination par Zn 18 $\mu$ M vs Témoin



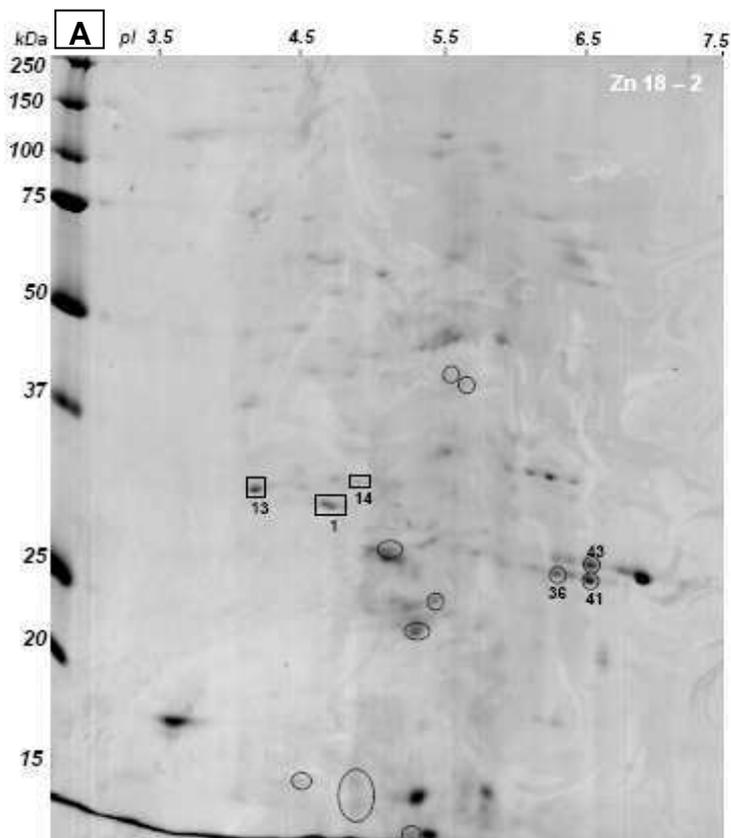
■ Noms des protéines sur-exprimées en présence de Zn 18  $\mu$ M  
 ○ Noms des protéines sous-exprimées en présence de Zn 18  $\mu$ M

**B**



Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1 <sup>***</sup>	29.2/4.8	Protéine inconnue
13 <sup>***</sup>	30.3/4.4	Protéine non identifiée
14 <sup>*</sup>	30.7/5.0	Protéine non identifiée
36 <sup>*</sup>	24.8/6.4	Péridinine-chlorophylle protéine
41 <sup>**</sup>	24.6/6.7	Péridinine-chlorophylle protéine
43 <sup>*</sup>	25.7/6.7	Péridinine-chlorophylle protéine

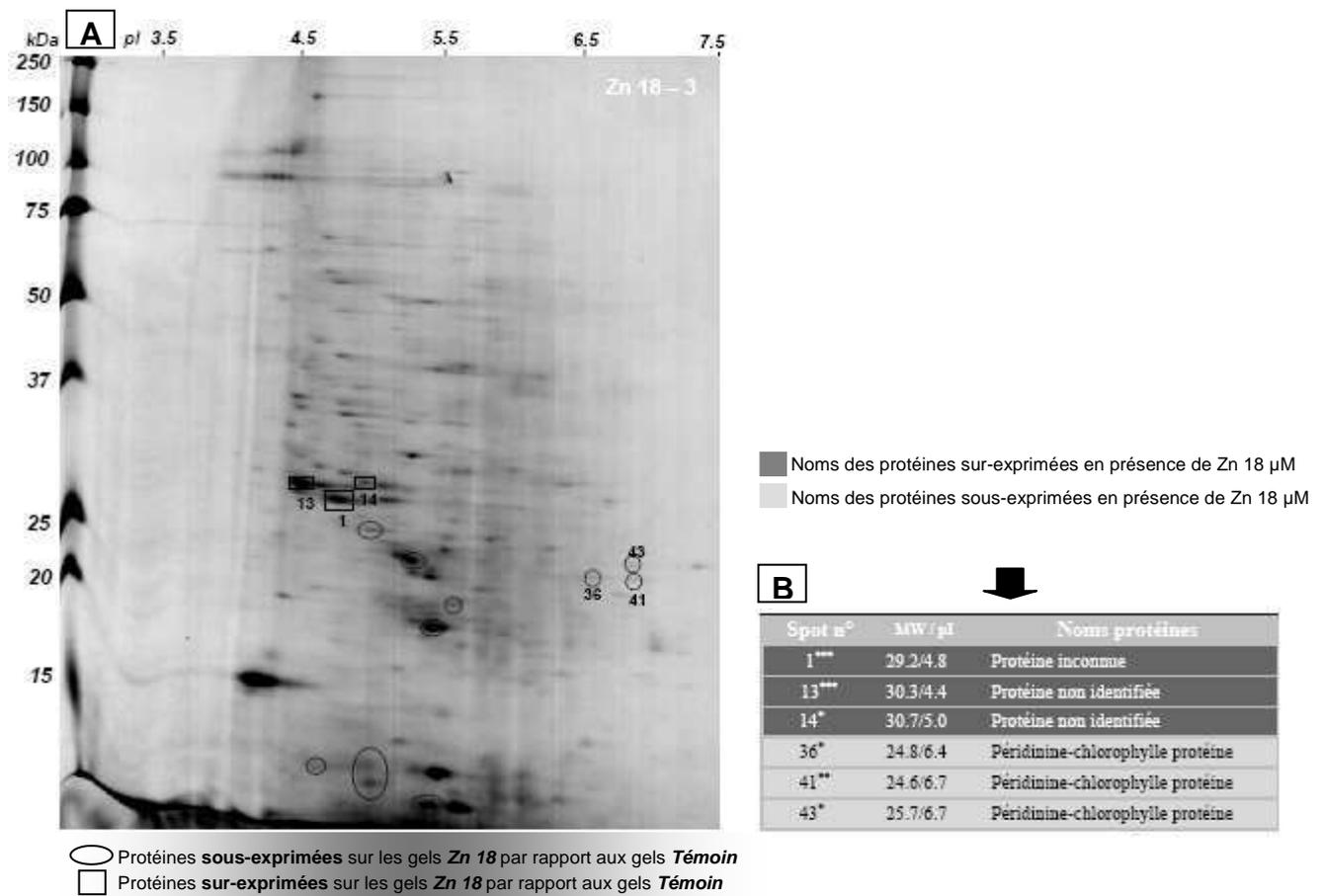
○ Protéines **sous-exprimées** sur les gels **Zn 18** par rapport aux gels **Témoin**  
 □ Protéines **sur-exprimées** sur les gels **Zn 18** par rapport aux gels **Témoin**



**B**

Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1 <sup>***</sup>	29.2/4.8	Protéine inconnue
13 <sup>***</sup>	30.3/4.4	Protéine non identifiée
14 <sup>*</sup>	30.7/5.0	Protéine non identifiée
36 <sup>*</sup>	24.8/6.4	Péridinine-chlorophylle protéine
41 <sup>**</sup>	24.6/6.7	Péridinine-chlorophylle protéine
43 <sup>*</sup>	25.7/6.7	Péridinine-chlorophylle protéine

○ Protéines **sous-exprimées** sur les gels **Zn 18** par rapport aux gels **Témoin**  
 □ Protéines **sur-exprimées** sur les gels **Zn 18** par rapport aux gels **Témoin**



**Figure 72.** Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures d'*Alexandrium catenella* contaminées par le zinc 18  $\mu$ M

**A :** Gels 2D montrant les protéines d'intérêt (dont l'expression était modifiée en réponse à la contamination métallique). Les spots numérotés ont été analysés par LC-MS/MS

**B :** Noms, MW et pI des protéines d'intérêt

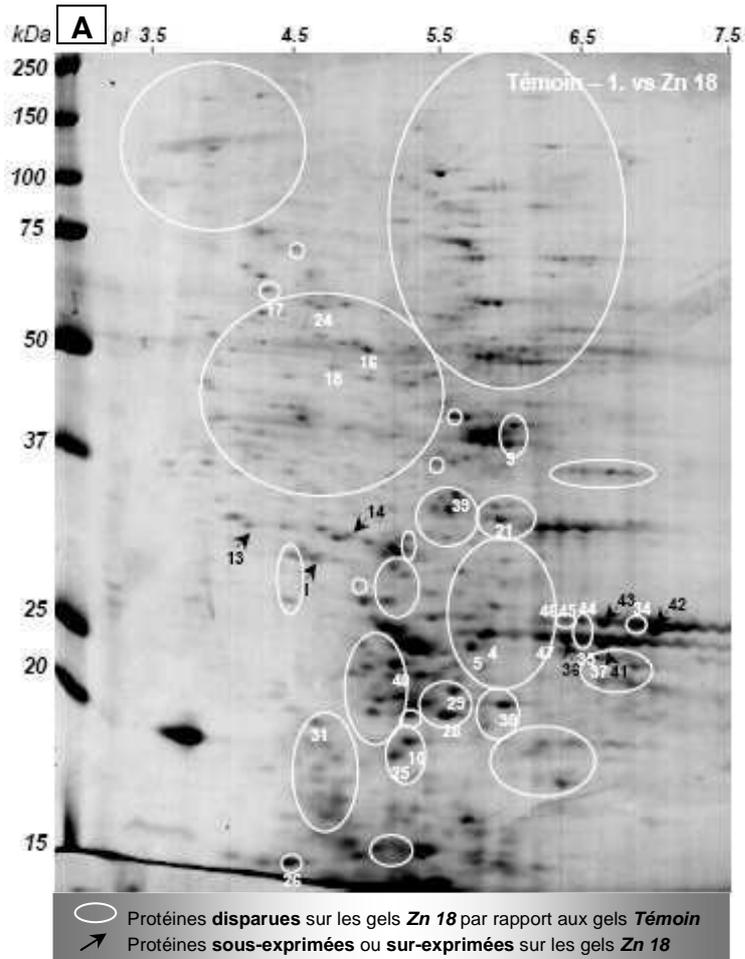
\*\*\* Protéine dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Protéine dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Protéine dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

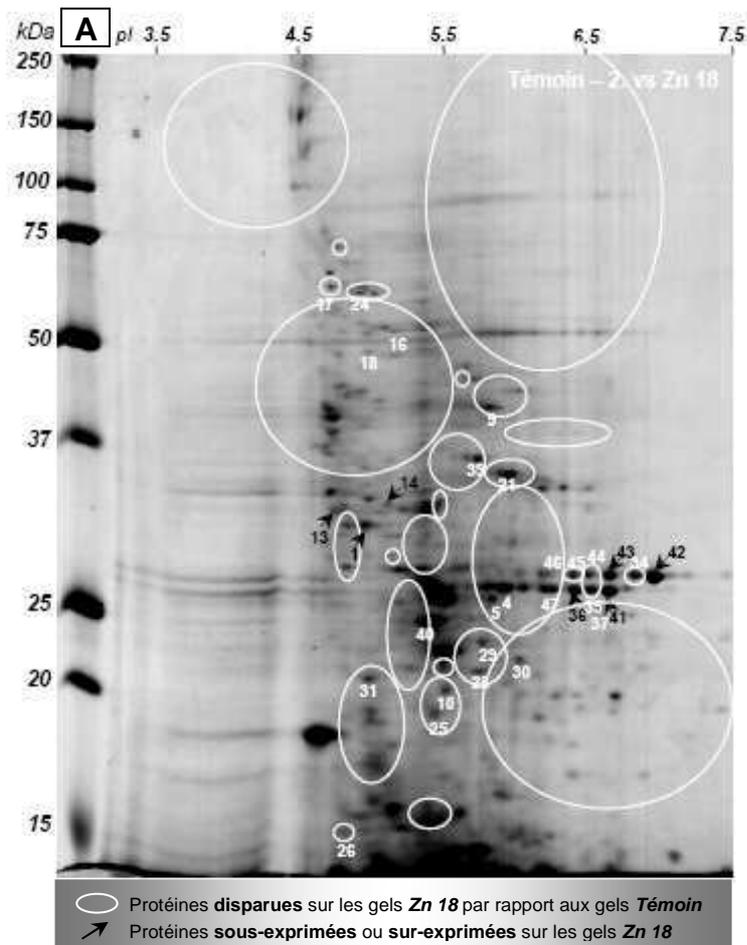
## Comparaison Témoin vs contamination par Zn 18 µM

- Noms des protéines sur-exprimées en présence de Zn 18 µM
- Noms des protéines sous-exprimées en présence de Zn 18 µM
- Noms des protéines disparues en présence de Zn 18 µM



**B**

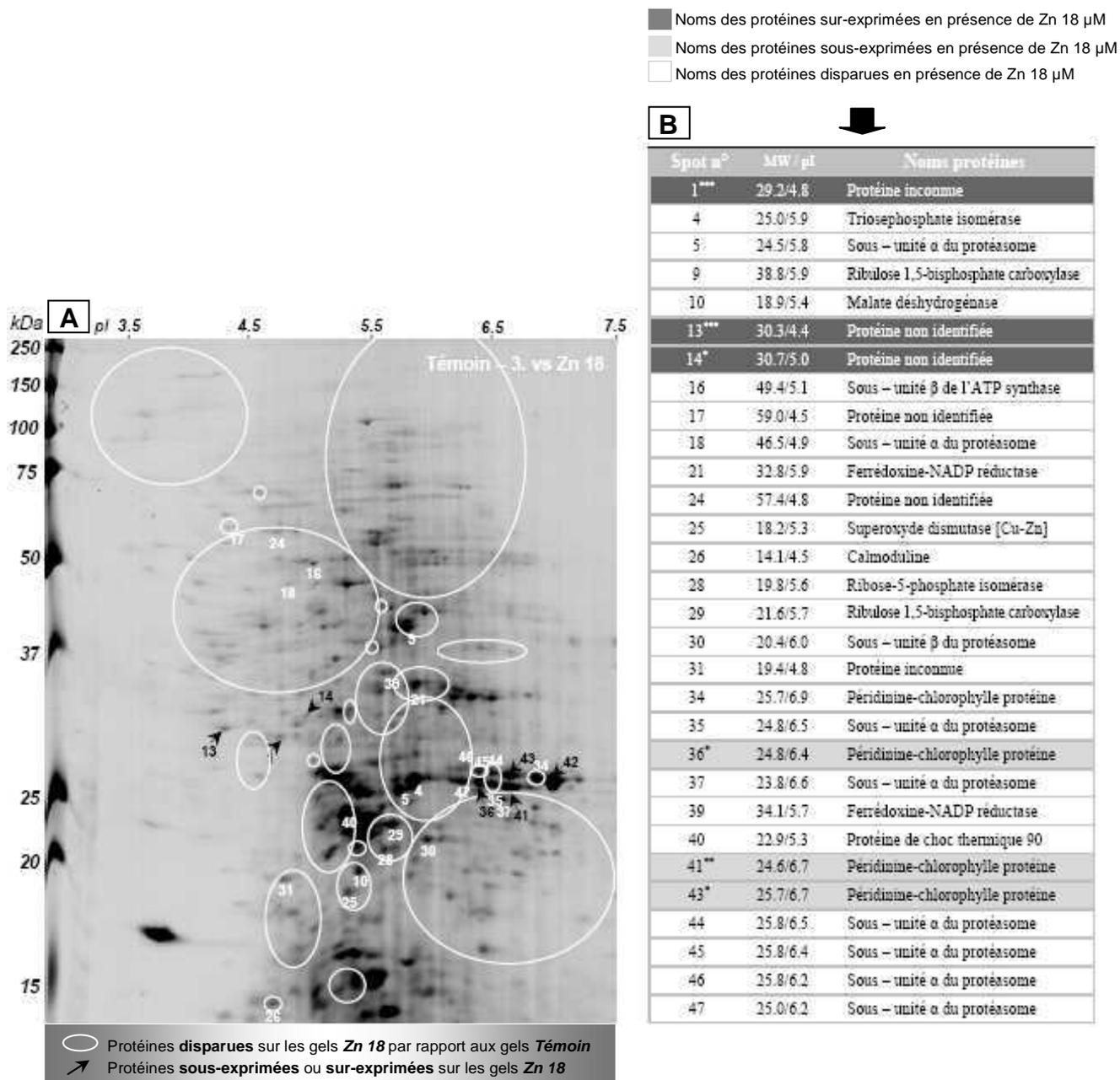
Spot n°	MW / pI	Noms protéines
1***	29.2/4.8	Protéine inconnue
4	25.0/5.9	Triosephosphate isomérase
5	24.5/5.8	Sous - unité α du protéasome
9	38.8/5.9	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
10	18.9/5.4	Malate déshydrogénase
13***	30.3/4.4	Protéine non identifiée
14*	30.7/5.0	Protéine non identifiée
16	49.4/5.1	Sous - unité β de l'ATP synthase
17	59.0/4.5	Protéine non identifiée
18	46.5/4.9	Sous - unité α du protéasome
21	32.8/5.9	Ferrédoxine-NADP réductase
24	57.4/4.8	Protéine non identifiée
25	18.2/5.3	Superoxyde dismutase [Cu-Zn]
26	14.1/4.5	Calmoduline
28	19.8/5.6	Ribose-5-phosphate isomérase
29	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
30	20.4/6.0	Sous - unité β du protéasome
31	19.4/4.8	Protéine inconnue
34	25.7/6.9	Péridinine-chlorophylle protéine
35	24.8/6.5	Sous - unité α du protéasome
36*	24.8/6.4	Péridinine-chlorophylle protéine
37	23.8/6.6	Sous - unité α du protéasome
39	34.1/5.7	Ferrédoxine-NADP réductase
40	22.9/5.3	Protéine de choc thermique 90
41***	24.6/6.7	Péridinine-chlorophylle protéine
43*	25.7/6.7	Péridinine-chlorophylle protéine
44	25.8/6.5	Sous - unité α du protéasome
45	25.8/6.4	Sous - unité α du protéasome
46	25.8/6.2	Sous - unité α du protéasome
47	25.0/6.2	Sous - unité α du protéasome



- Noms des protéines sur-exprimées en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$
- ▒ Noms des protéines sous-exprimées en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$
- Noms des protéines disparues en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$

**B**

Spot n°	MW/pI	Noms protéines
1 <sup>***</sup>	29.2/4.8	Protéine inconnue
4	25.0/5.9	Triosephosphate isomérase
5	24.5/5.8	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
9	38.8/5.9	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
10	18.9/5.4	Malate déshydrogénase
13 <sup>***</sup>	30.3/4.4	Protéine non identifiée
14 <sup>*</sup>	30.7/5.0	Protéine non identifiée
16	49.4/5.1	Sous - unité $\beta$ de l'ATP synthase
17	59.0/4.5	Protéine non identifiée
18	46.5/4.9	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
21	32.8/5.9	Ferrédoxine-NADP réductase
24	57.4/4.8	Protéine non identifiée
25	18.2/5.3	Superoxyde dismutase [Cu-Zn]
26	14.1/4.5	Calmoduline
28	19.8/5.6	Ribose-5-phosphate isomérase
29	21.6/5.7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
30	20.4/6.0	Sous - unité $\beta$ du protéasome
31	19.4/4.8	Protéine inconnue
34	25.7/6.9	Péridimine-chlorophylle protéine
35	24.8/6.5	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
36 <sup>*</sup>	24.8/6.4	Péridimine-chlorophylle protéine
37	23.8/6.6	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
39	34.1/5.7	Ferrédoxine-NADP réductase
40	22.9/5.3	Protéine de choc thermique 90
41 <sup>***</sup>	24.6/6.7	Péridimine-chlorophylle protéine
43 <sup>*</sup>	25.7/6.7	Péridimine-chlorophylle protéine
44	25.8/6.5	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
45	25.8/6.4	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
46	25.8/6.2	Sous - unité $\alpha$ du protéasome
47	25.0/6.2	Sous - unité $\alpha$ du protéasome



**Figure 73.** Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures témoins d'*Alexandrium catenella*

**A :** Gels 2D montrant les protéines d'intérêt (dont l'expression était modifiée en réponse à la contamination métallique). Les spots numérotés ont été analysés par LC-MS/MS

**B :** Noms, MW et pI des protéines d'intérêt

\*\*\* Protéine dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Protéine dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Protéine dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

### 3.2- Identification putative des protéines d'intérêt

Sur les 122 protéines d'intérêt, 30 protéines ont pu être prélevées dans les gels 2D pour identification par LC-MS/MS. L'analyse des séquences de 26 protéines sur les 30 protéines d'intérêt prélevées, a conduit à un résultat d'identification.

Malheureusement, l'analyse des trois protéines (spots 1, 13, 14) significativement sur – exprimées ne s'est pas avérée concluante. Soit elle ne donnait aucun résultat (spots 13 et 14), soit elle n'aboutissait à aucune fonction biologique connue (spot 1), la séquence n'étant homologue qu'à celle d'une protéine inconnue, rencontrée chez *Paramecium tetraurelia* (Tableau X).

La séquence de la protéine associée au spot 5, sous – exprimée très significativement, était homologue à celle de la protéine sous – unité  $\alpha$  du protéasome, exprimée par le dinoflagellé *Oxyrrhis marina* (Tableau X).

Les séquences des protéines associées aux spots 36, 41, 43, sous – exprimées significativement, étaient respectivement homologues à celles de la protéine PCP, rencontrée chez *Alexandrium minutum*, *Gonyaulax polyedra* et *Amphidinium carterae*.

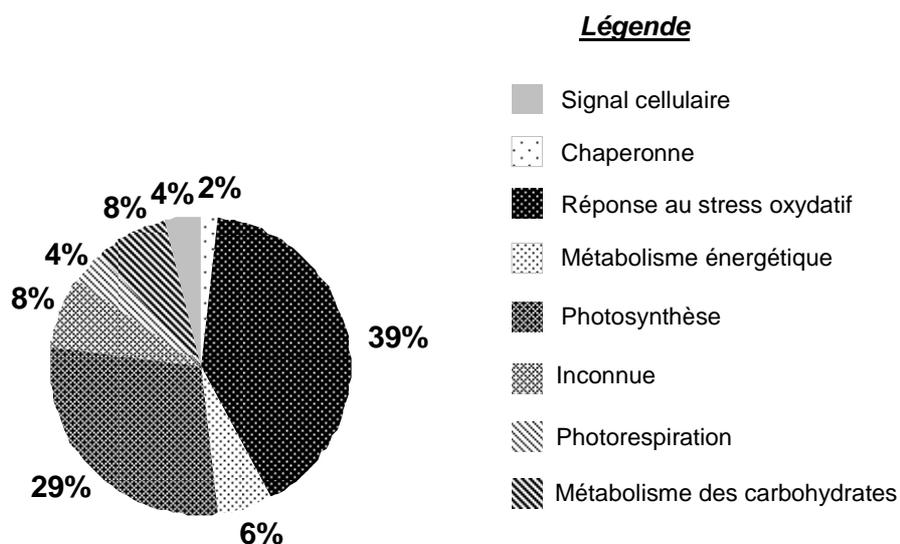
Les séquences des protéines disparues associées aux spots 5, 18, 30, 35, 37, 44, 45, 46, 47, étaient homologues à celles des sous – unités  $\alpha$  ou  $\beta$  du protéasome, respectivement exprimées chez *Oxyrrhis marina*, *Toxoplasma gondii*, *A. ostenfeldii* et *Alexandrium fundyense*. Celles des protéines associées aux spots 21 et 39 étaient homologues à la séquence de la FNR chez le dinoflagellé *Heterocapsa triquetra*. Les séquences des protéines disparues associées aux spots 4, 9, 29, 10, 16, 25, 26, 28, 34 et 40, étaient respectivement homologues à celles des protéines : TPI exprimée chez le dinoflagellé *Karlodinium micrum*, RUBISCO exprimée par *Gonyaulax polyedra* et *Heterocapsa triquetra*, MDH séquencée chez *Karlodinium micrum*, sous – unité  $\beta$  de l'ATP synthase, SOD rencontrée chez *Tetrahymena thermophila*, CaM séquencée pour le dinoflagellé *Oxyrrhis marina*, RPI exprimée par *Heterocapsa triquetra*, PCP séquencée chez *Symbiodinium* sp., HSP 90 rencontrée chez *Alexandrium fundyense*.

Pour certains spots, l'identification protéique s'est avérée infructueuse pour des raisons techniques (séquence peptidique non déterminée). Dans ce cas, les protéines ont été qualifiées de « non identifiées ». Pour certains autres spots, la séquence peptidique a été déterminée mais ne correspondait à aucune protéine connue. Dans ce cas, les protéines correspondantes ont été qualifiées d'« inconnues ».

### 3.3- Catégories fonctionnelles des protéines d'intérêt

Les protéines d'intérêt, exprimées en réponse à la contamination par Zn 18  $\mu$ M, étaient associées à sept catégories fonctionnelles connues : signal cellulaire, action chaperonne, réponse au stress oxydatif, métabolisme énergétique, photosynthèse, photorespiration et métabolisme des carbohydrates (Figure 74).

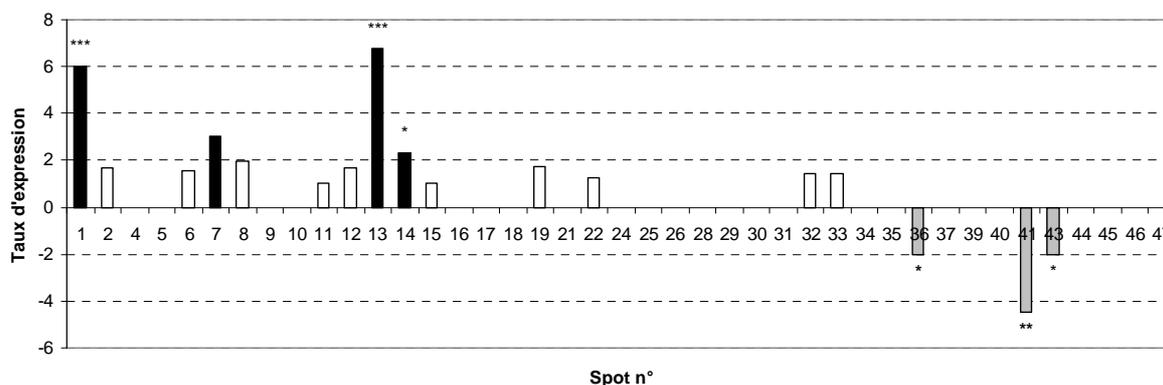
La réponse au stress oxydatif, *via* les sous – unités du protéasome, la SOD et HSP 90 ; puis la photosynthèse, *via* la RUBISCO, l'ATP – synthase, la PCP, la FNR, la TPI et la RPI, représentaient, dans cet ordre, les deux catégories fonctionnelles les plus affectées par Zn 18  $\mu$ M (39% des protéines identifiées concernaient la réponse au stress oxydatif, 29% concernaient la photosynthèse). Puis, le métabolisme des carbohydrates (TPI, MDH, RPI) (8%), le métabolisme énergétique (ATP – synthase, FNR) (6%), le signal cellulaire (CaM) (4%), la photorespiration (RUBISCO) (4%) et l'action chaperonne (HSP 90) (2%), étaient les fonctions biologiques moins perturbées par cette contamination.



**Figure 74.** Distribution des fonctions biologiques assignées aux protéines d'intérêt exprimées par *Alexandrium catenella* en réponse à la contamination par Zn 18  $\mu$ M

### 3.4- Taux d'expression des protéines analysées par LC-MS/MS

Les taux d'expression calculés dans le cas de la contamination par Zn 18  $\mu$ M sont présentés en Figure 75. Les résultats obtenus indiquaient des modifications du protéome d'*Alexandrium catenella* en présence de Zn 18  $\mu$ M, certaines protéines montrant une expression modifiée de -4,4 à +6,8 fois par rapport aux conditions Témoin ( $P < 0,10$ ). La seule protéine assez significativement sur – exprimée (spot 14), dont l'analyse n'a pu aboutir à l'identification, était exprimée +2,3 fois en réponse à la contamination par Zn 18  $\mu$ M. Les deux protéines très significativement sur – exprimées (spots 1, 13), dont l'analyse conduisait à une protéine inconnue et à une protéine non identifiée étaient +6,0 fois et +6,8 fois exprimées, respectivement. L'impact du stress métallique était moins important, compris entre -4,4 et -2,0, pour les protéines sous – exprimées assignées à la PCP (spots 36, 41, 43).



**Figure 75.** Taux d'expression des protéines d'intérêt exprimées par *Alexandrium catenella* en réponse à une contamination par Zn 18  $\mu$ M. L'axe des ordonnées indique le taux moyen d'expression de chaque protéine ; les valeurs positives, en noir, indiquent les taux d'expression des protéines sur – exprimées (taux  $\geq +2$ ) ; les valeurs négatives, en gris, indiquent les taux d'expression des protéines sous – exprimées (taux  $\leq -2$ ). En blanc, sont représentés les taux d'expression les moins modifiés ( $-2 < \text{taux} < +2$ ), de certaines protéines. Le taux d'expression des protéines disparues est égal à 0

\*\*\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **très significativement différente** par rapport au Témoin ( $P < 0,01$ )

\*\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **significativement différente** par rapport au Témoin ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Taux d'expression des protéines dont l'expression était **assez différente** par rapport au Témoin ( $0,05 < P < 0,10$ )

## 4. Comparaison de l'impact du zinc aux concentrations testées

### 4.1- Comparaison des profils d'expression protéique

Le nombre total de spots détectés en présence de chaque concentration de zinc (6  $\mu\text{M}$ , 12  $\mu\text{M}$ , ou 18  $\mu\text{M}$ ) était toujours significativement inférieur à celui observé en conditions témoins (Test de Student :  $P < 0,10$ ). Le nombre total de spots détectés sur les PEPs contaminés diminuait régulièrement avec la concentration contaminante de zinc, passant de  $200 \pm 11$  spots en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$ , à  $162 \pm 90$  spots en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$ , à  $136 \pm 37$  spots ( $n = 3$ ) en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$ .

Toutefois, aucune différence significative n'existait entre le nombre total de spots détectés en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$  et le nombre total de spots détectés en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$ , ni entre le nombre total de spots détectés en présence de Zn 12 et le nombre total de spots détectés en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$  (Test de Student :  $P > 0,10$ ). En revanche, le nombre total de spots détectés en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$  était significativement inférieur à celui détecté en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$  (Test de Student :  $P = 0,04$ ).

Tous les spots présents sur les PEPs contaminés sont répartis de façon homogène, dans la même gamme de pI et de MW (pI : 4,0 – 7,1 ; MW : 14 – 183 kDa). Cette gamme de répartition est identique à celle des spots détectés sur les PEPs Témoin.

Quelle que soit la concentration de zinc testée, le nombre total de protéines sur – exprimées était similaire, autour de 4 spots. Après analyse statistique, la contamination par Zn 18  $\mu\text{M}$  conduisait au plus grand nombre de protéines significativement sur – exprimées (3 protéines en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$ , contre 1 protéine en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$  ou de Zn 12  $\mu\text{M}$ ). Les protéines sur – exprimées étaient toujours regroupées au centre (verticalement), à gauche (horizontalement), des gels 2D (pI : 4,4 – 5,0 ; MW autour de 30 kDa).

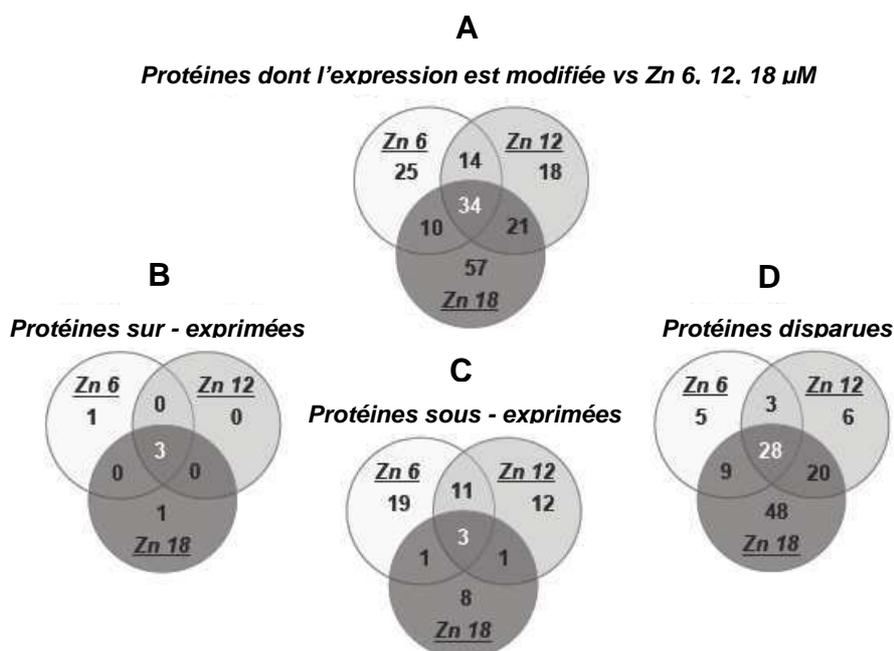
Les plus fortes concentrations de zinc conduisaient aux plus grands nombres de protéines disparues (57 et 105 protéines respectivement disparues en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$  et de Zn 18  $\mu\text{M}$ , contre 45 protéines disparues en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$ ), tandis que la plus faible concentration de zinc conduisait au nombre de protéines sous – exprimées le plus important (34 protéines sous – exprimées en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$ , contre 27 et 13 protéines respectivement sous – exprimées en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$  et de Zn 18  $\mu\text{M}$ ). Les protéines sous – exprimées étaient toujours regroupées dans la moitié inférieure des gels 2D (pI : 4,0 – 6,9 ; MW : 14 – 32 kDa).

#### 4.2- Protéines d'intérêt exprimées en commun

Le nombre de protéines d'intérêt exprimées en commun, en réponse aux contaminations par Zn 6  $\mu$ M, Zn 12  $\mu$ M, ou Zn 18  $\mu$ M, apparaît sur les diagrammes de Venn de la Figure 76. Ainsi, sur les 34 protéines exprimées en commun (Figure 76A), trois protéines étaient sur – exprimées (Figure 76B), parmi lesquelles les protéines associées aux spots 1 et 14 ont été analysées par LC – MS/MS. S'agissant de la protéine associée au spot 1, elle correspondait à une protéine inconnue, déjà rencontrée chez *Paramecium tetraurelia* (Tableau X). Quant à la protéine associée au spot 14, son analyse par LC – MS/MS n'a conduit à aucun résultat d'identification.

Puis, trois protéines étaient sous – exprimées en commun (Figure 76C). Sur ces trois protéines, celles associées aux spots 36 et 41 ont été analysées par LC – MS/MS. Les séquences de ces protéines étaient homologues à celles de la PCP, déjà séquencée chez les dinoflagellés *Alexandrium minutum* et *Gonyaulax polyedra* (Tableau X). La PCP est une protéine impliquée dans l'absorption lumineuse indispensable à l'activité photosynthétique.

Enfin, 28 protéines avaient disparu en commun (Figure 76D), parmi lesquelles la protéine associée au spot 9 a été analysée par LC – MS/MS. La séquence de la protéine associée au spot 9 était homologue à celle de la RUBISCO, déjà séquencée chez le dinoflagellé *Gonyaulax polyedra* (Tableau X). La RUBISCO est une protéine fondamentale impliquée dans la fixation du CO<sub>2</sub> associée à l'activité photosynthétique.



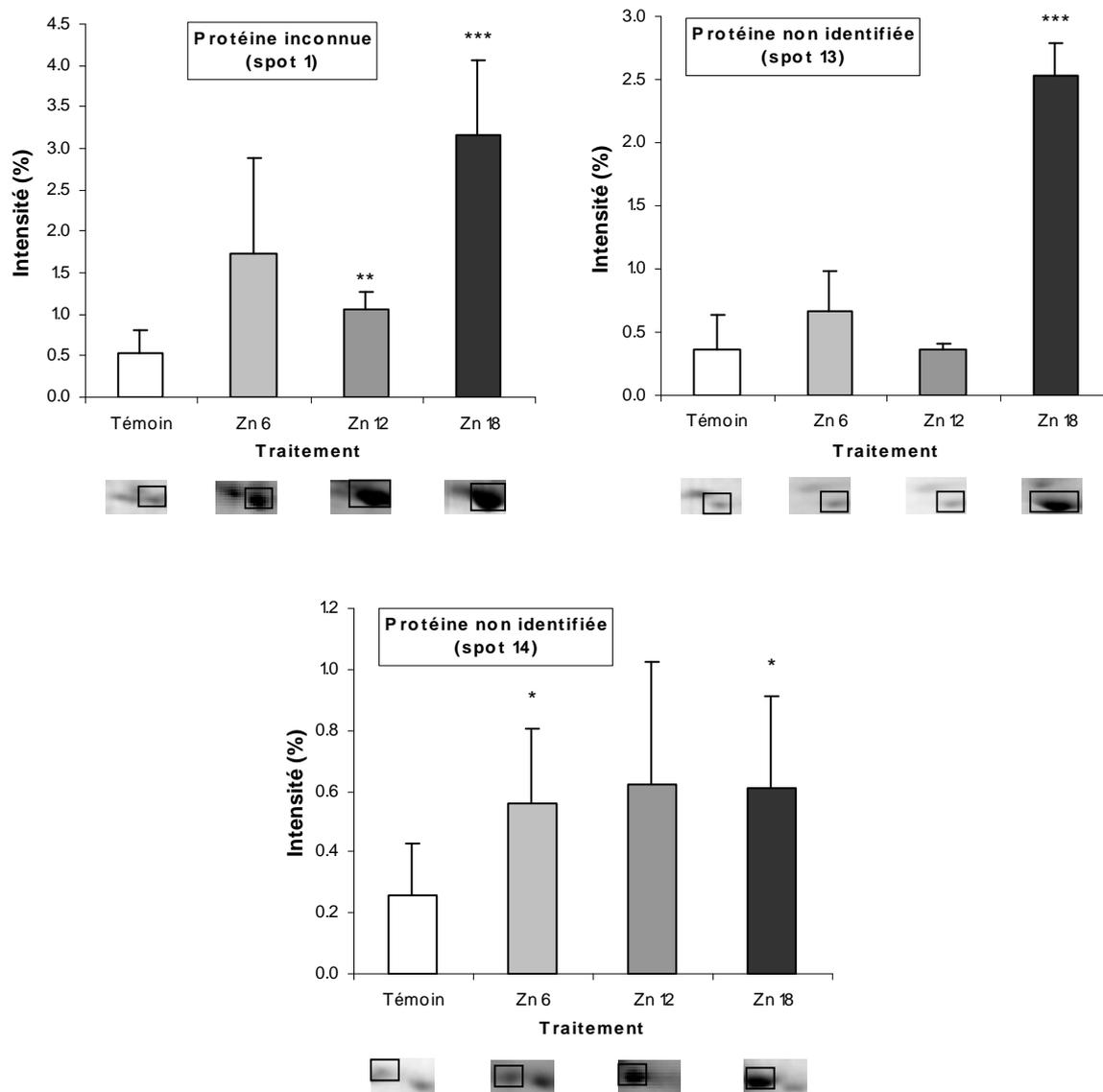
**Figure 76.** Diagrammes de Venn représentant les protéines d'intérêt exprimées en commun par *Alexandrium catenella* en réponse aux contaminations par le zinc 6  $\mu$ M, 12  $\mu$ M ou 18  $\mu$ M

- A :** Protéines d'intérêt exprimées en commun
- B :** Protéines sur – exprimées en commun
- C :** Protéines sous – exprimées en commun
- D :** Protéines disparues en commun

### 4.3- Expression des protéines d'intérêt en fonction du niveau de contamination

#### 4.3.1 – Sur – expression des protéines en fonction du niveau de contamination

Parmi les trois protéines significativement sur – exprimées en commun (spots 1, 13 et 14) en réponse à la contamination par le zinc, la protéine inconnue associée au spot 1 était significativement sur – exprimée à partir de la concentration Zn 12  $\mu$ M (Figure 77). A partir de cette concentration, le taux de sur – expression de la protéine augmentait de +2,0 à +6,0 en présence de Zn 18  $\mu$ M (Tableau XI). La sur – expression de la protéine non identifiée associée au spot 13 était seulement induite par Zn 18  $\mu$ M, avec un taux de sur - expression néanmoins élevé, de +6,8 (Tableau XI). La contamination par Zn 18  $\mu$ M et par Zn 6  $\mu$ M conduisait à la sur – expression de la protéine non identifiée correspondant au spot 14, avec un taux de sur – expression de +2,1 (Figure 77 et Tableau XI).



**Figure 77.** Intensité d'expression (intensité moyenne en %) des protéines d'intérêt sur – exprimées par *Alexandrium catenella*, en fonction de la concentration contaminante en zinc. Les barres d'histogramme en blanc, gris clair, gris, ou noir, correspondent respectivement à l'expression des protéines, en conditions témoins, en présence de Zn 6  $\mu$ M, de Zn 12  $\mu$ M, ou de Zn 18  $\mu$ M

- \*\*\* Expression **très significativement différente** en condition contaminée ( $P < 0,01$ )
- \*\* Expression **significativement différente** en condition contaminée ( $0,01 < P < 0,05$ )
- \* Expression **assez différente** en condition contaminée ( $0,05 < P < 0,10$ )

#### 4.3.2 – Sous – expression des protéines en fonction du niveau de contamination

La contamination par Zn 6  $\mu$ M conduisait à la sous – expression des sous – unités  $\alpha$  du protéasome correspondant aux spots 5 (taux de sous – expression : -3,9), 18 (taux de sous – expression : -2,7), 35 (taux de sous – expression : -6,5), et à la disparition de cette même protéine au niveau du spot 30 (Figure 78 et Tableau XI). De façon similaire, Zn 12  $\mu$ M conduisait à la disparition des sous – unité  $\alpha$  du protéasome associées aux spots 5 et 18, ainsi qu'à la sous – expression de cette protéine au niveau du spot 35 (taux de sous – expression : -2,7) (Figure 78 et Tableau XI). De plus, une tendance à la sous – expression, bien que non significative, était observée en présence de Zn 12  $\mu$ M, concernant les protéines associées aux spots 30 et 37, également assignées à la sous – unité  $\alpha$  du protéasome (Figure 78). Enfin, la contamination par Zn 18  $\mu$ M provoquait la disparition systématique des sous – unités  $\alpha$  du protéasome correspondant aux protéines associées aux spots 5, 18, 30, 35, 37, 44, 45, 46 et 47, dont la sous – expression était remarquée en présence de la concentration précédente, suggérant un effet de concentration sur l'impact de la contamination par le zinc (Figure 78).

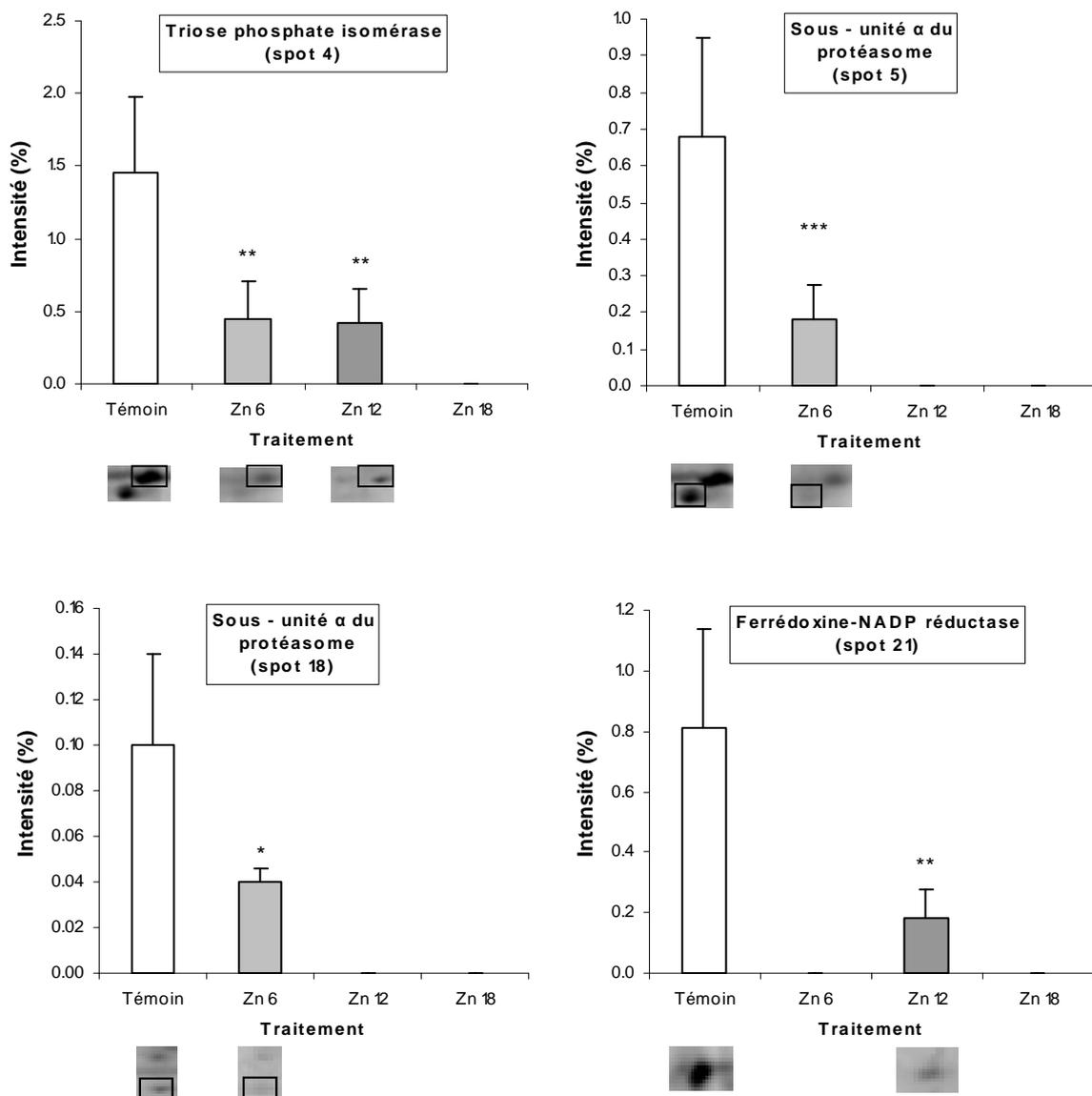
Quelle que soit la concentration testée, la contamination par le zinc provoquait la sous – expression de la PCP associée aux spots 36 (Zn 6 : -3,3 ; Zn 12 : -2,1 ; Zn 18 : -2,0) et 41 (Zn 6 : -2,4 ; Zn 12 : -2,2 ; Zn 18 : -4,4) (Figure 78 et Tableau XI). La PCP était également sous – exprimée en présence de Zn 12  $\mu$ M (-2,0) et de Zn 18  $\mu$ M (-2,0), concernant le spot 43 (Tableau XI). Cet impact était confirmé par la sous – expression de la PCP en présence de Zn 6  $\mu$ M (-2,7), laquelle était associée au spot 34, ainsi que par la disparition de cette protéine à la plus forte concentration de zinc (Figure 78 et Tableau XI).

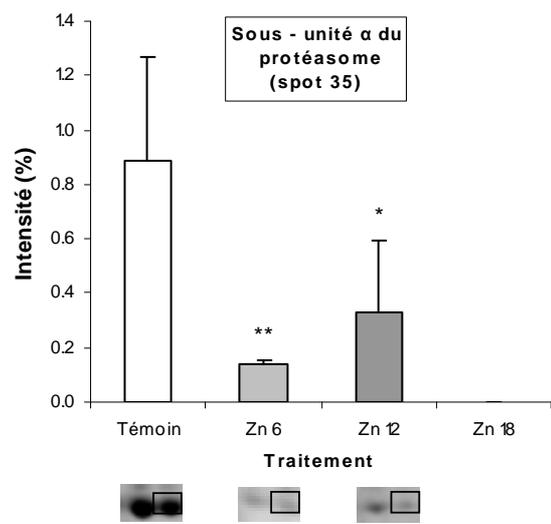
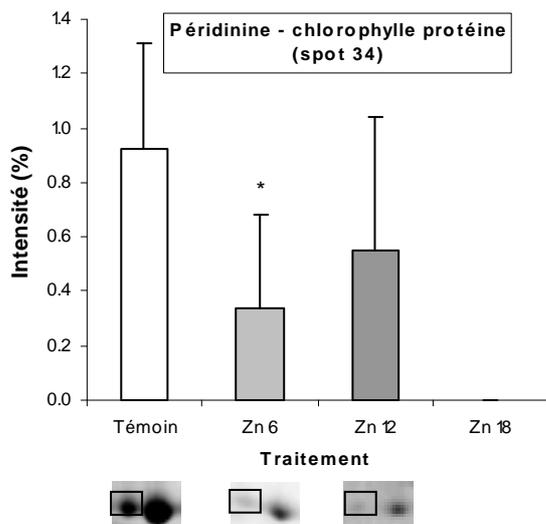
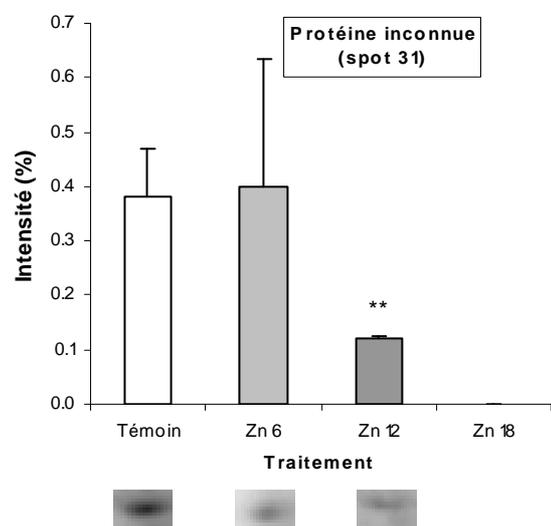
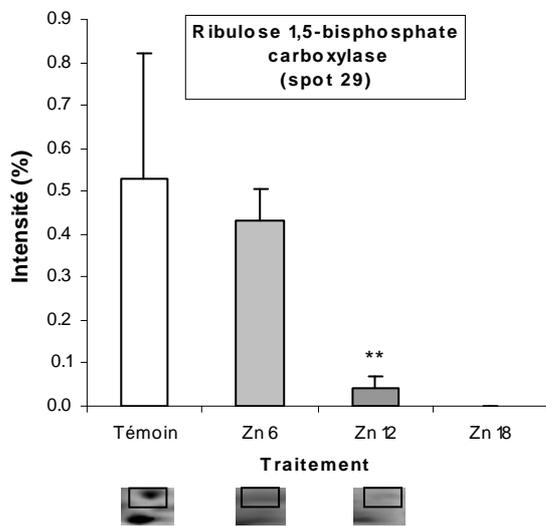
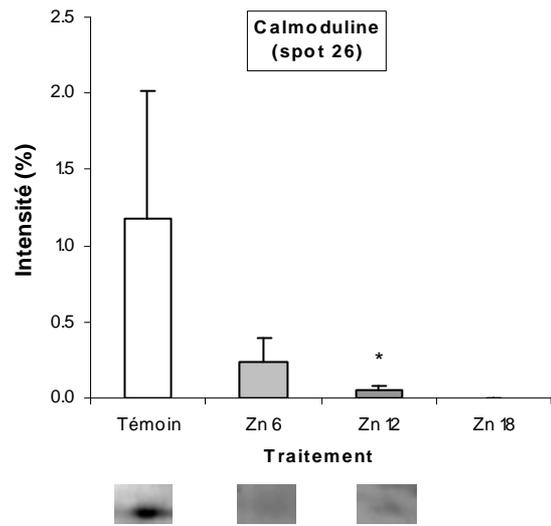
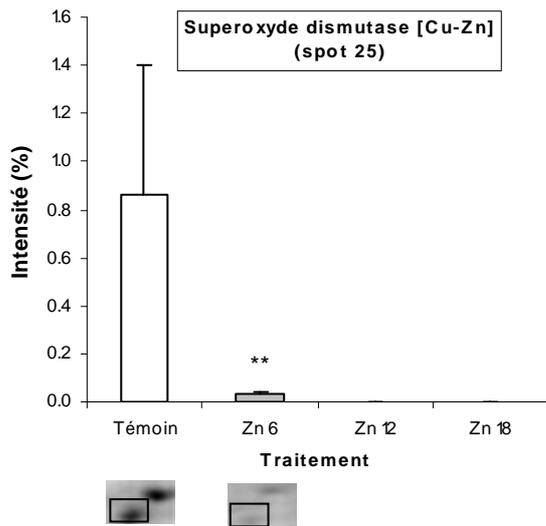
La contamination par Zn 6  $\mu$ M aboutissait à la disparition de la FNR associée aux spots 8 et 21, tandis que la contamination par Zn 12  $\mu$ M conduisait à la disparition de cette protéine au niveau du spot 8 (Figure 78). La contamination par Zn 12  $\mu$ M induisait la sous – expression de la FNR concernant les spots 21 (-4,4) et 39 (-8,0), tandis que la concentration supérieure (Zn 18  $\mu$ M) provoquait la disparition de cette protéine au niveau de ces mêmes spots (Figure 78 et Tableau XI).

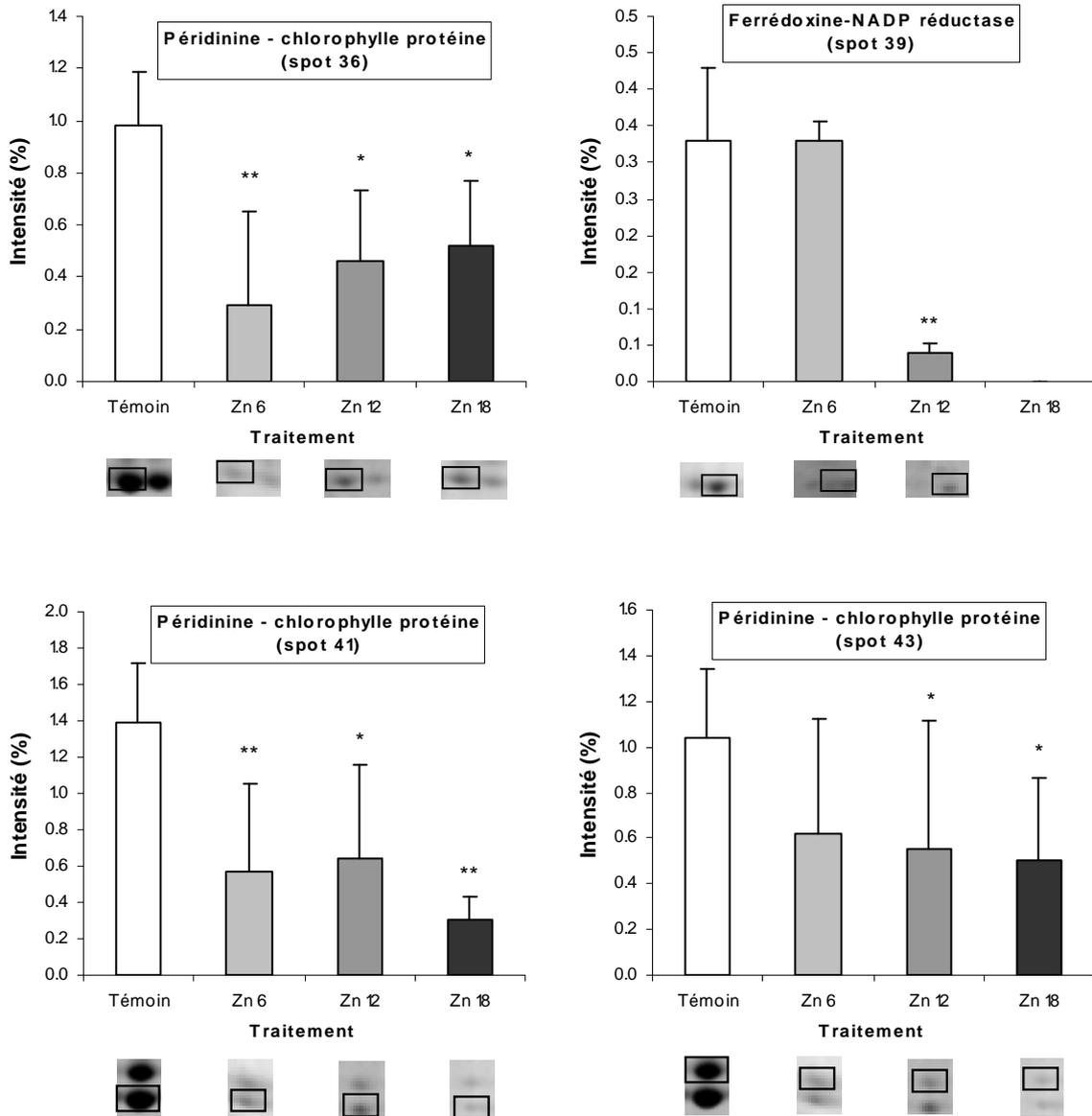
La TPI était de moins en moins exprimée en présence des concentrations croissantes de zinc, en ce qui concerne le spot 4, pour finalement disparaître, au niveau de ce spot, en présence de Zn 18  $\mu$ M (Figure 78), indiquant également un effet de concentration sur l'impact de la contamination par le zinc. Il en était de même pour la CaM associée au spot 26, et pour la RUBISCO associée au spot 29. Enfin, c'était sur la SOD (spot 25) que la contamination par le zinc semblait avoir l'impact le plus sévère, puisque la sous – expression de cette protéine

était très importante, dès la plus faible concentration de zinc testée (-28,0), sa disparition étant ensuite constatée en présence de Zn 12  $\mu$ M ou de Zn 18  $\mu$ M (Figure 78 et Tableau XI).

La contamination par Zn 18  $\mu$ M avait l'effet le plus drastique, nombre de protéines disparaissant à cette concentration (3 protéines d'intérêt significativement sous – exprimées, 24 protéines d'intérêt disparues) (Figures 72 et 73). La contamination par Zn 12  $\mu$ M avait un impact plus faible (10 protéines d'intérêt significativement sous – exprimées, 10 protéines d'intérêt disparues). Enfin, la contamination par Zn 6  $\mu$ M avait un effet moins significatif (8 protéines d'intérêt significativement sous – exprimées, 4 protéines d'intérêt disparues), bien que conduisant au taux de sous – expression le plus bas enregistré dans cette étude, égal à -28,0, pour la SOD associée au spot 25 (Figure 67 et Tableau XI).







**Figure 78.** Intensité d'expression (intensité moyenne en %) des protéines d'intérêt sous – exprimées par *Alexandrium catenella*, en fonction de la concentration contaminante en zinc. Les barres d'histogramme en blanc, gris clair, gris, ou noir, correspondent respectivement à l'expression des protéines, en conditions témoins, en présence de Zn 6  $\mu$ M, de Zn 12  $\mu$ M, ou de Zn 18  $\mu$ M

\*\*\* Expression **très significativement différente** en condition contaminée ( $P < 0,01$ )

\*\* Expression **significativement différente** en condition contaminée ( $0,01 < P < 0,05$ )

\* Expression **assez différente** en condition contaminée ( $0,05 < P < 0,10$ )

#### 4.3.3 – Comparaison des catégories fonctionnelles associées aux protéines d'intérêt

Les protéines dont l'expression était modifiée en réponse aux contaminations par Zn 6  $\mu$ M, Zn 12  $\mu$ M ou Zn 18  $\mu$ M, étaient principalement associées, dans cet ordre, à la réponse au stress oxydatif, à la photosynthèse, au métabolisme des carbohydrates (Figures 66, 70 et 74). Quelle que soit la concentration en zinc testée, la réponse au stress oxydatif était toujours la fonction la plus affectée, (34% en présence de Zn 6  $\mu$ M, 31% en présence de Zn 12  $\mu$ M, 39% en présence de Zn 18  $\mu$ M). Puis, la photosynthèse était de plus en perturbée par les concentrations contaminantes croissantes de zinc (26% en présence de Zn 6  $\mu$ M, 26% en présence de Zn 12  $\mu$ M, 29% en présence de Zn 18  $\mu$ M). En revanche, le métabolisme des carbohydrates était moins impacté lorsque les concentrations de zinc augmentaient (17% en présence de Zn 6  $\mu$ M, 17% en présence de Zn 12  $\mu$ M, 8% en présence de Zn 18  $\mu$ M).

### III. COMPARAISON DE L'IMPACT DU PLOMB ET DU ZINC SUR LE PROTEOME D'*ALEXANDRIUM CATENELLA*

#### 1. Comparaison des profils d'expression protéique

Quel que soit le niveau de contamination des cultures d'*Alexandrium catenella* par le zinc ou par le plomb, les protéines exprimées étaient toujours distribuées de façon homogène dans la même gamme de pI et de MW (pI : 4,0 – 7,1 ; MW : 14 – 183 kDa). Cette gamme était similaire à celle dans laquelle se répartissaient les protéines exprimées par *Alexandrium catenella* cultivée en conditions témoin.

Pour une concentration métallique donnée, le nombre total de spots détectés en réponse aux contaminations par le zinc était toujours inférieur au nombre total de spots détectés en réponse aux contaminations par le plomb, bien que ces différences ne soient pas significatives ( $P > 0,10$ ). Le nombre total de spots détectés en réponse aux contaminations par le zinc diminuait lorsque que la concentration contaminante de zinc augmentait, avec une différence significative entre le nombre de spots détectés en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$  et le nombre de spots détectés en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$  ( $P < 0,10$ ). En revanche, le nombre total de spots détectés en réponse aux différentes contaminations par le plomb était comparable d'une concentration à une autre (6  $\mu\text{M}$ , 12  $\mu\text{M}$ , ou 18  $\mu\text{M}$ ) ( $P > 0,10$ ).

Dans le cas de la contamination par le zinc, le nombre de protéines significativement sur – exprimées était peu élevé, égal à 3 protéines au maximum (en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$ ). Concernant la contamination par le plomb, le nombre maximal de protéines significativement sur – exprimées était plus important, égal à 8 protéines (en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$ ). Dans les deux cas de contamination métallique, les protéines étaient toujours situées à gauche des gels 2D ; ils présentaient donc des valeurs basses de pI.

Dans le cas de la contamination par le zinc, le nombre de protéines disparues augmentait en même temps que la concentration contaminante en zinc, passant de 45 protéines (en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$ ) à 105 protéines (en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$ ). La contamination par le plomb induisait soit un nombre de protéines disparues élevé (maximal dans cette étude) égal à 73 protéines (en présence de Pb 12  $\mu\text{M}$ ), soit un nombre de protéines disparues faible (minimal dans cette étude) égal à 33 protéines (en présence de Pb 6  $\mu\text{M}$ ). Pour chacune des concentrations métalliques 6  $\mu\text{M}$  et 18  $\mu\text{M}$ , le nombre de protéines

disparues était toujours plus faible en réponse à la contamination par le plomb qu'en réponse à la contamination par le zinc (33 protéines disparues pour Pb 6  $\mu$ M, contre 45 protéines disparues pour Zn 6  $\mu$ M ; 54 protéines disparues pour Pb 18  $\mu$ M, contre 105 protéines disparues pour Zn 18  $\mu$ M).

Concernant le nombre de protéines significativement sous – exprimées, aucune différence notable n'était observée entre les contaminations par le plomb ou par le zinc. Quel que soit le niveau de contamination, la répartition des protéines sous – exprimées était toujours comparable, homogène dans la même gamme de pI (4,0 – 6,9), mais regroupée dans la moitié inférieure des gels 2D, dans la gamme de MW (14 – 32 kDa).

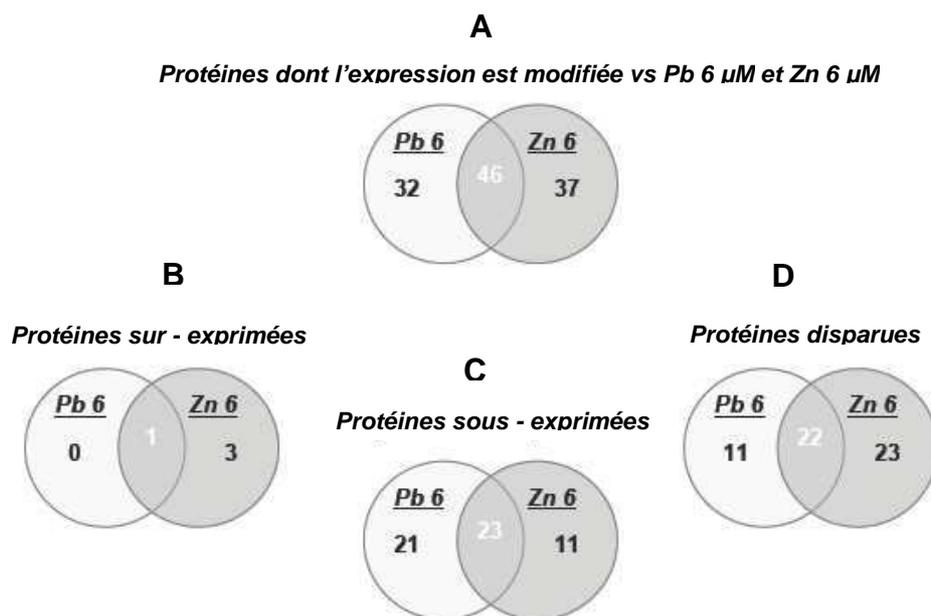
## **2. Protéines d'intérêt exprimées en commun**

### **2.1- Protéines exprimées en commun à la concentration contaminante 6 $\mu$ M**

Le nombre de protéines d'intérêt exprimées en commun en réponse aux contaminations par Pb 6  $\mu$ M et par Zn 6  $\mu$ M, apparaît sur les diagrammes de Venn de la Figure 79. Un nombre total de 46 protéines dont l'expression était modifiée en commun (protéines sur – exprimées, protéines sous – exprimées, protéines disparues), était dénombré en réponse aux contaminations par Pb 6  $\mu$ M et par Zn 6  $\mu$ M (Figure 79A). Sur ces 46 protéines, une protéine était sur – exprimée en commun (Figure 79B), il s'agissait de la protéine associée au spot 1, correspondant à une protéine inconnue (Tableau X).

Puis, 23 protéines étaient sous – exprimées en commun (Figure 79C). Sur ces 23 protéines, les protéines associées aux spots 4, 6, 7, 10, 25, 26, 28, 29, 34, 35 et 36, ont pu être identifiées. Leurs séquences étaient homologues à celles des protéines : TPI, BIP, MDH, SOD, CaM, RPI, RUBISCO, PCP et sous – unité  $\alpha$  du protéasome (Tableau X).

Enfin, sur ces 46 protéines, 22 protéines avaient disparu en commun (Figure 79D), parmi lesquelles la protéine associée au spot 9 était homologue à la RUBISCO.



**Figure 79.** Diagrammes de Venn représentant les protéines d'intérêt exprimées en commun par *Alexandrium catenella* en réponse aux contaminations par le zinc 6  $\mu$ M et par le plomb 6  $\mu$ M

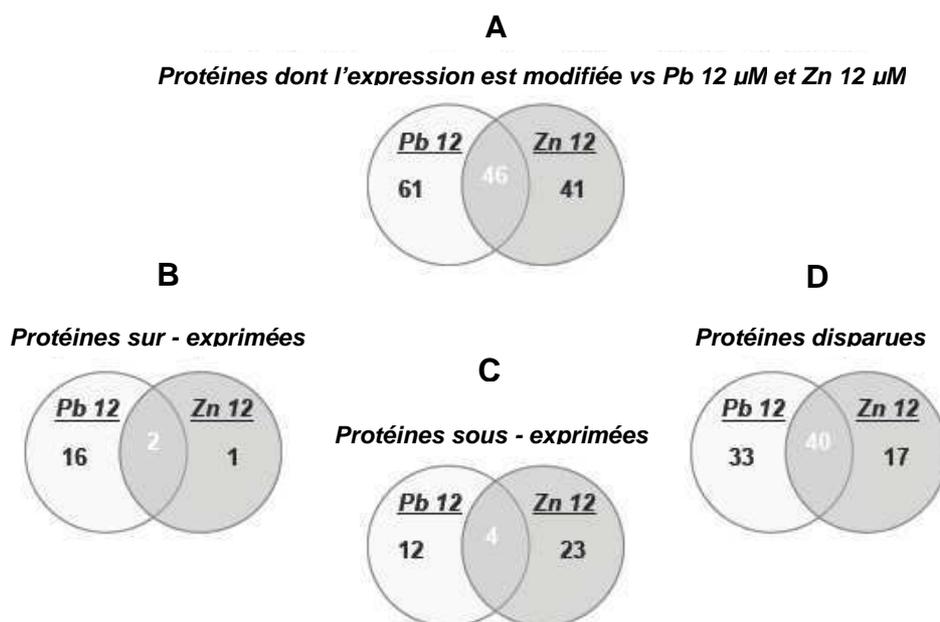
- A : Protéines d'intérêt exprimées en commun
- B : Protéines sur – exprimées en commun
- C : Protéines sous – exprimées en commun
- D : Protéines disparues en commun

## 2.2- Protéines exprimées en commun à la concentration contaminante 12 $\mu$ M

Le nombre de protéines d'intérêt exprimées en commun en réponse aux contaminations par Pb 12  $\mu$ M et par Zn 12  $\mu$ M, apparaît sur les diagrammes de Venn de la Figure 80. Un nombre total de 46 protéines dont l'expression était modifiée en commun (protéines sur – exprimées, protéines sous – exprimées, protéines disparues), était dénombré en réponse aux contaminations par Pb 12  $\mu$ M et par Zn 12  $\mu$ M (Figure 80A). Sur ces 46 protéines, deux protéines étaient sur – exprimées en commun (Figure 80B), il s'agissait de la protéine associée au spot 1, correspondant à une protéine inconnue, et de celle associée au spot 14, homologue à une protéine non identifiée (Tableau X).

Puis, 4 protéines étaient sous – exprimées en commun (Figure 80C), parmi lesquelles la séquence du spot 26 a été analysée. La séquence de cette protéine était homologue à celle de la CaM.

Enfin, sur ces 46 protéines, 40 protéines avaient disparu en commun (Figure 80D), parmi lesquelles les protéines 5, 9, 10, 19, 25 correspondaient respectivement aux protéines : sous – unité  $\alpha$  du protéasome, RUBISCO, MDH et SOD.



**Figure 80.** Diagrammes de Venn représentant les protéines d'intérêt exprimées en commun par *Alexandrium catenella* en réponse aux contaminations par le plomb 12  $\mu$ M et par le zinc 12  $\mu$ M

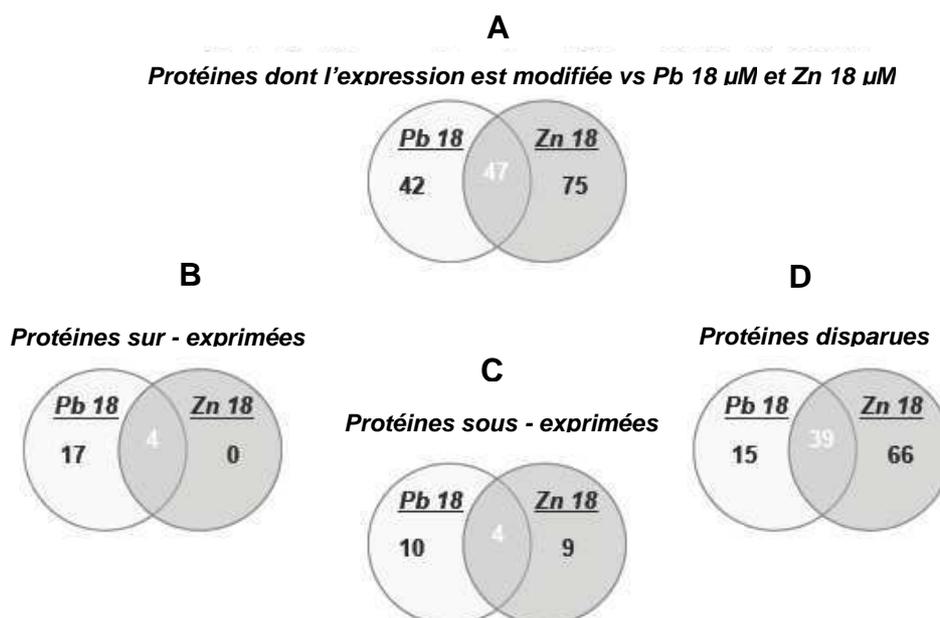
- A : Protéines d'intérêt exprimées en commun
- B : Protéines sur – exprimées en commun
- C : Protéines sous – exprimées en commun
- D : Protéines disparues en commun

### 2.3- Protéines exprimées en commun à la concentration contaminante 18 $\mu$ M

Le nombre de protéines d'intérêt exprimées en commun en réponse aux contaminations par Pb 18  $\mu$ M et par Zn 18  $\mu$ M, apparaît sur les diagrammes de Venn de la Figure 81. Un nombre total de 47 protéines dont l'expression était modifiée en commun (protéines sur – exprimées, protéines sous – exprimées, protéines disparues), était dénombré en réponse aux contaminations par Pb 18  $\mu$ M et par Zn 18  $\mu$ M (Figure 81A). Sur ces 47 protéines, 4 protéines étaient sur – exprimées en commun (Figure 81B). Parmi ces protéines, les protéines associées aux spots 1, 13 et 14 correspondaient respectivement à une protéine inconnue, et à deux protéines non identifiées (Tableau X).

Puis, 4 protéines étaient sous – exprimées en commun (Figure 81C), parmi lesquelles la protéine associée au spot 36 était homologue à une PCP.

Enfin, sur ces 47 protéines, 39 protéines avaient disparu en commun (Figure 81D), parmi lesquelles les protéines associées aux spots 5, 9, 29 et 25 correspondaient aux protéines sous – unité  $\alpha$  du protéasome, RUBISCO et SOD.



**Figure 81.** Diagrammes de Venn représentant les protéines d'intérêt exprimées en commun par *Alexandrium catenella* en réponse aux contaminations par le plomb 18  $\mu$ M et par le zinc 18  $\mu$ M

- A : Protéines d'intérêt exprimées en commun
- B : Protéines sur – exprimées en commun
- C : Protéines sous – exprimées en commun
- D : Protéines disparues en commun

### 3. Comparaison de l'impact du plomb et du zinc sur l'expression protéique

#### 3.1- Impact du plomb et du zinc sur la sur – expression des protéines

Une protéine inconnue (spot 1) était souvent significativement sur – exprimée par *Alexandrium catenella* en présence de plomb (6  $\mu$ M, 12  $\mu$ M) ou de zinc (12  $\mu$ M, 18  $\mu$ M) (Tableau XI). Cette protéine était significativement sur - exprimée dès la plus faible concentration de plomb testée, à un taux de +2,0 (Tableau XI), ce qui n'était le cas qu'à partir de la concentration 12  $\mu$ M pour le zinc avec un taux de sur – expression identique. Ce taux augmentait jusqu'à +6,0 en présence de Zn 18  $\mu$ M, et il atteignait des valeurs plus élevées encore, jusqu'à +8,2, en présence de Pb 12  $\mu$ M (Tableau XI). Ces observations suggèrent que le plomb pourrait avoir un impact plus fort que le zinc sur la sur - expression de cette protéine par *Alexandrium catenella*.

La contamination par le plomb aurait aussi un impact plus important que la contamination par le zinc, concernant la sur - expression d'une protéine non identifiée (spot 13). Cette protéine était significativement sur – exprimée en présence de Pb 12  $\mu$ M, à un taux

de +13,5, ce qui n'était le cas qu'à partir de la concentration 18  $\mu\text{M}$  en présence de zinc, et à un taux plus faible, valant +6,8 (Tableau XI).

De façon similaire, une protéine non identifiée (spot 14) était significativement sur – exprimée en présence de Pb 12  $\mu\text{M}$ , à un taux élevé de +17,7, alors qu'à la même concentration, la sur – expression de cette protéine n'était pas significative en présence de zinc (Tableau XI). A la concentration 18  $\mu\text{M}$ , le taux de sur – expression de cette protéine était plus élevé pour le plomb (+2,6) que pour le zinc (+2,3), indiquant ici aussi, que le plomb aurait un impact un peu plus important que le zinc sur la sur - expression de cette protéine.

Enfin, la contamination par le plomb conduisait à la sur – expression significative de cinq protéines différentes qui n'étaient pas sur - exprimées en présence de zinc (quelle que soit la concentration testée) (spots 12, 15, 16, 17 et 18). Parmi ces protéines, le niveau de sur – expression était remarquable en présence de Pb 12  $\mu\text{M}$ , pour la PGP (spot 15 : +16,4), la sous – unité  $\beta$  de l'ATP synthase (spot 16 : +16,3), et la sous – unité  $\alpha$  du protéasome (spot 18 : +16,7) (Tableau XI). Deux autres protéines étaient également sur – exprimées à des taux particulièrement élevés en présence de Pb 12  $\mu\text{M}$  (spots 12, 17), mais leur identification a été impossible (Tableau XI).

Ces résultats semblent indiquer que, de façon générale, le plomb pourrait avoir un impact plus fort que le zinc sur la sur – expression de certaines protéines du protéome d'*Alexandrium catenella*, le plomb conduisant à un nombre plus important de protéines significativement sur – exprimées, ceci à des taux particulièrement élevés.

### **3.2- Impact du plomb et du zinc sur la sous – expression et la disparition des protéines**

Quelle que soit la concentration contaminante de plomb ou de zinc, la RUBISCO associée au spot 9 disparaissait systématiquement des gels 2D (Tableau XI). Toutefois, il fallait une concentration plus élevée de zinc (18  $\mu\text{M}$ ) que de plomb (12  $\mu\text{M}$ ), pour induire l'inhibition d'expression de la RUBISCO assignée au spot 29, tandis qu'en présence d'une concentration contaminante de 6  $\mu\text{M}$ , la RUBISCO associée à ce spot, n'était significativement sous – exprimée qu'en présence de plomb (Tableau XI).

La différence d'impact suscitée par les métaux plomb et zinc n'était pas évidente à dégager en ce qui concerne l'expression de la sous - unité  $\alpha$  du protéasome. En effet, la sous – unité  $\alpha$  du protéasome associée au spot 18 était fortement sur - exprimée (+16,7) en présence

de Pb 12  $\mu\text{M}$ , tout en étant sous – exprimée, voire disparue, en réponse aux diverses contaminations par le zinc (Tableau XI), alors que celle associée au spot 5, disparaissait systématiquement en réponse aux contaminations par le plomb, tandis qu'en présence de zinc, elle ne disparaissait qu'à partir de la concentration 12  $\mu\text{M}$ , et était sous – exprimée (très significativement) à la concentration 6  $\mu\text{M}$  de ce métal (-3,9) (Tableau XI). Pourtant, le plomb n'affectait jamais de façon significative l'expression de la sous – unité  $\alpha$  du protéasome associée au spot 35, alors qu'en présence de zinc, la protéine associée à ce spot était notablement sous - exprimée (-6,5 en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$  ; -2,7 en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$ ), finissant par disparaître à la concentration 18  $\mu\text{M}$  de ce métal (Tableau XI). De façon similaire, la disparition systématique de certaines sous – unités  $\alpha$  du protéasome (spots 44, 45, 46, 47) était remarquée en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$ , alors que la contamination par le plomb ne conduisait à aucune modification significative d'expression de ces sous – unités, quelle que soit la concentration contaminante de ce métal. Toutefois, dans la plupart des cas, les métaux plomb et zinc semblaient toujours perturber l'expression des sous - unités  $\alpha$  du protéasome associées à certains spots des gels 2D (Tableau XI).

La contamination par le zinc semblait avoir un impact plus important que la contamination par le plomb concernant la sous - expression de la SOD (spot 25), de la CaM (spot 26), des PCP (spots 34, 36, 41, 43), des FNR (spots 8, 21), de la TPI (spot 4) et de la sous – unité  $\beta$  du protéasome (spot 30) par *Alexandrium catenella*. En effet, la SOD était significativement sous - exprimée en présence de plomb ou de zinc, dès la concentration contaminante 6  $\mu\text{M}$ , mais à un taux nettement plus élevé (-28,0) en présence de zinc, qu'en présence de plomb (-6,5) (Tableau XI). Puis, la SOD disparaissait aux concentrations 12  $\mu\text{M}$  et 18  $\mu\text{M}$ , quel que soit le métal testé. Concernant la CaM (spot 26), la sous – expression de cette protéine n'était pas significative en présence de plomb quelle que soit sa concentration, tandis qu'elle était significative en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$ , à un taux très élevé (-21,8), l'expression de cette protéine étant ensuite complètement inhibée en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$  (Tableau XI). Puis, la contamination par le zinc, quelle que soit la concentration testée, provoquait la sous – expression significative de la PCP associée à certains spots (41, 43), alors que la contamination par le plomb n'induisait jamais aucune modification d'expression de cette protéine (Tableau XI). De façon similaire, la PCP était sous – exprimée à des taux plus élevés (ou disparaissait) en présence de zinc plutôt qu'en présence de plomb (spots 34, 36). Les FNR (spots 8, 21) disparaissaient dès la plus faible concentration testée de zinc, ce qui n'était pas le cas pour le plomb. En présence de zinc, la TPI (spot 4) était soit

significativement sous – exprimée (-3,2 en présence de Zn 6  $\mu$ M ; -3,4 en présence de Zn 12  $\mu$ M), soit disparaissait (en présence de Zn 18  $\mu$ M), alors que cette protéine n'était pas sous – exprimée en présence de Pb 12  $\mu$ M, et ne disparaissait jamais en réponse à la contamination par le plomb. Enfin, la sous – unité  $\beta$  du protéasome (spot 30) disparaissait en présence de Zn 6  $\mu$ M et de Zn 18  $\mu$ M, mais pas en présence de plomb aux mêmes concentrations.

Inversement, la contamination par le plomb pourrait avoir un impact plus important que la contamination par le zinc sur la sous - expression de la LBP (spot 33), de la HSP 90 (spot 40) et des MDH (spots 7, 19) par *Alexandrium catenella*. L'expression de la LBP n'était modifiée qu'en présence de plomb, avec un effet plus drastique à la concentration 12  $\mu$ M (disparition) qu'à la concentration 6  $\mu$ M (taux : -2,3) (Tableau XI). Les mêmes modifications d'expression étaient faites concernant HSP 90 (sous – expression en présence de Pb 6  $\mu$ M : -2,4 ; disparition en présence de Pb 12  $\mu$ M), à la différence que cette protéine finissait par disparaître en présence de Zn 18  $\mu$ M. La MDH était soit significativement sous - exprimée en présence de Pb 6  $\mu$ M (spot 7), soit disparue en présence de Pb 12  $\mu$ M et de Pb 18  $\mu$ M (spot 19), ce qui n'était pas observé dans le cas de la contamination par le zinc (Tableau XI).

Enfin, la contamination par le plomb avait aussi un impact plus important que la contamination par le zinc concernant la sous - expression de la BIP (spot 6) et de la RPI (spot 28), puisque ces protéines disparaissaient en présence de Pb 12  $\mu$ M, ce qui n'était pas le cas pour Zn 12  $\mu$ M, même si une sous – expression non significative de ces protéines était alors remarquée (Tableau XI).

Ces résultats suggèrent que les métaux plomb et zinc avaient des impacts différents sur la sous – expression de certaines protéines du protéome d'*Alexandrium catenella*. Pour les protéines sous – exprimées SOD, CaM, PCP, FNR, TPI, sous – unité  $\beta$  du protéasome, la contamination par le zinc avait un impact plus important que la contamination par le plomb. En revanche, pour les protéines sous – exprimées HSP 90, MDH, BIP, RPI, la contamination par le plomb avait un impact plus important que la contamination par le zinc. Enfin, à l'inverse du zinc, le plomb induisait une expression modifiée (sous – expression) de la LBP chez *Alexandrium catenella*.

Concernant les sous - unités  $\alpha$  du protéasome, la RUBISCO et la SOD, leur expression par *Alexandrium catenella* était toujours affectée par les deux métaux testés, quelle que soient leurs concentrations respectives, sans qu'il soit pour autant possible de dégager une nette différence d'impact entre le plomb et le zinc.

**Tableau XI.** Taux d'expression des protéines d'intérêt en fonction des conditions contaminantes Pb 6 µM, Pb 12 µM, Pb 18 µM, Zn 6 µM, Zn 12 µM et Zn 18 µM.

(+): augmentation des teneurs en protéines en conditions contaminantes ; (-): diminution des teneurs en protéines en conditions contaminantes ; Disp. : disparition de la protéine en conditions contaminantes ; \*\*\* Expression très significativement différente en conditions contaminantes ( $P < 0,01$ ) ; \*\* Expression significativement différente en conditions contaminantes ( $0,01 < P < 0,05$ ) ; \* Expression assez différente en conditions contaminantes ( $0,05 < P < 0,10$ )

Spot n°	Protéine	Pb 6 µM	Pb 12 µM	Pb 18 µM	Zn 6 µM	Zn 12 µM	Zn 18 µM
1	Inconnue	2,0 ** (+)	8,2*** (+)	3,7 (+)	3,3 (+)	2,0** (+)	6,0*** (+)
2	Non identifiée	4,1** (-)	-	2,1 (-)	2,2 (-)	-	-
4	TPI	4,0*** (-)	-	3,0** (-)	3,2** (-)	3,4** (-)	Disp.
5	Sous – unité α protéasome	Disp.	Disp.	Disp.	3,9*** (-)	Disp.	Disp.
6	BIP	2,5 (-)	Disp.	-	2,9 (-)	4,3 (-)	-
7	MDH	7,3* (-)	-	-	4,0 (-)	2,5 (-)	-
8	FNR	5,3 (-)	2,0 (-)	-	Disp.	Disp.	-
9	RUBISCO	Disp.	Disp.	Disp.	Disp.	Disp.	Disp.
10	MDH	2,9* (-)	Disp.	-	2,5 (-)	Disp.	Disp.
11	Non identifiée	-	-	3,9* (-)	-	-	-
12	Inconnue	-	18,5*** (+)	5,3 (+)	-	Disp.	-
13	Non identifiée	-	13,5*** (+)	6,0 (+)	-	-	6,8*** (+)
14	Non identifiée	-	17,7*** (+)	2,6* (+)	2,1* (+)	2,4 (+)	2,3* (+)
15	PGP	-	16,4** (+)	1,7* (+)	-	-	-
16	Sous – unité β de l'ATP - synthase	-	16,3*** (+)	4,6 (+)	-	-	Disp.
17	Non identifiée	-	19,2*** (+)	7,9 (+)	-	Disp.	Disp.
18	Sous – unité α protéasome	-	16,7*** (+)	8,9 (+)	2,7* (-)	Disp.	Disp.
19	MDH	-	Disp.	Disp.	-	Disp.	-
21	FNR	7,3*** (-)	Disp.	-	Disp.	4,4** (-)	Disp.
22	Non identifiée	-	-	12,8 (+)	2,1 (-)	Disp.	-
24	Non identifiée	-	5,6 (+)	9,0 (+)	-	-	Disp.
25	SOD	6,5* (-)	Disp.	Disp.	28,0** (-)	Disp.	Disp.
26	CaM	4,1 (-)	3,8 (-)	2,6 (-)	4,9 (-)	21,8* (-)	Disp.
28	RPI	7,8(-)	Disp.	-	2,1(-)	3,6(-)	Disp.
29	RUBISCO	2,8** (-)	Disp.	Disp.	-	13,2** (-)	Disp.
30	Sous – unité β protéasome	3,0 (-)	Disp.	-	Disp.	4,0 (-)	Disp.
31	Inconnue	1,7 (-)	Disp.	Disp.	-	3,1** (-)	Disp.
32	Inconnue	3,1 (-)	Disp.	-	-	-	-
33	LBP	2,3*** (-)	Disp.	-	-	-	-
34	PCP	2,2* (-)	2,3* (-)	2,2 (-)	2,7* (-)	-	Disp.
35	Sous – unité α protéasome	2,0 (-)	-	-	6,5** (-)	2,7* (-)	Disp.
36	PCP	3,2** (-)	-	1,5* (-)	3,3** (-)	2,1* (-)	2,0* (-)
37	Sous – unité α protéasome	-	Disp.	-	2,1 (-)	8,3 (-)	Disp.
39	FNR	6,0** (-)	Disp.	-	-	8,0** (-)	Disp.
40	HSP 90	2,4** (-)	Disp.	-	-	-	Disp.
41	PCP	-	-	-	2,4** (-)	2,2* (-)	4,4** (-)
43	PCP	-	-	-	-	2,0* (-)	2,0* (-)
44	Sous – unité α protéasome	-	-	-	-	-	Disp.
45	Sous – unité α protéasome	-	-	-	-	-	Disp.
46	Sous – unité α protéasome	-	-	2,1 (-)	-	-	Disp.
47	Sous – unité α protéasome	2,0 (-)	-	-	-	-	Disp.

#### 4. Comparaison de l'impact du plomb et du zinc sur les catégories fonctionnelles assignées aux protéines d'intérêt

Quels que soient les métaux testés, plomb ou zinc, et leurs concentrations, les protéines d'intérêt étaient toujours principalement associées, dans cet ordre, à la réponse au stress oxydatif, à la photosynthèse et au métabolisme des carbohydrates (Figures 51, 55, 59, 66, 70 et 74).

Cependant, ces trois catégories fonctionnelles étaient toujours plus affectées par le zinc que par le plomb, comme semblaient l'indiquer les plus fortes proportions de protéines impliquées dans ces fonctions en présence de zinc qu'en présence de plomb (réponse au stress oxydatif : 34% en présence de Zn 6  $\mu$ M contre 27% en présence de Pb 6  $\mu$ M, 31% en présence de Zn 12  $\mu$ M contre 26% en présence de Pb 12  $\mu$ M, 39% en présence de Zn 18  $\mu$ M contre 26% en présence de Pb 18  $\mu$ M ; photosynthèse : 26% en présence de Zn 6  $\mu$ M contre 24% en présence de Pb 6  $\mu$ M, 26% en présence de Zn 12  $\mu$ M contre 19% en présence de Pb 12  $\mu$ M, 29% en présence de Zn 18  $\mu$ M contre 25% en présence de Pb 18  $\mu$ M ; métabolisme des carbohydrates : 17% en présence de Zn 6  $\mu$ M contre 13% en présence de Pb 6  $\mu$ M, 17% en présence de Zn 12  $\mu$ M contre 10% en présence de Pb 12  $\mu$ M).

De plus, toujours concernant le zinc, l'augmentation du niveau de contamination se traduisait par l'augmentation de la proportion des protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif, et dans la photosynthèse (stress oxydatif : de 34% en présence de Zn 6  $\mu$ M à 39% en présence de Zn 18  $\mu$ M ; photosynthèse : de 26% en présence de Zn 6  $\mu$ M à 29% en présence de Zn 18  $\mu$ M), suggérant un effet de concentration de ce métal sur ces deux catégories fonctionnelles. Aucun effet de concentration n'était pourtant constaté en présence de plomb, ni pour la réponse au stress oxydatif, ni pour la photosynthèse, le taux des protéines d'intérêt impliquées dans ces fonctions restant globalement constant en présence de ce métal, quel que soit sa concentration. En revanche, le plomb et le zinc partageaient le fait d'impacter plus faiblement le métabolisme des carbohydrates à mesure que leurs concentrations contaminantes augmentaient (de 17% en présence de Zn 6  $\mu$ M à 8% en présence de Zn 18  $\mu$ M ; de 13% en présence de Pb 6  $\mu$ M à 9% en présence de Pb 18  $\mu$ M).

En revanche, la fonction de bioluminescence d'*Alexandrium catenella*, représentée par la protéine LBP, n'était affectée qu'en cas de stress par le plomb, la contamination par le zinc ne modifiant aucunement l'expression de cette protéine. Il en était de même pour la fonction métabolisme du phosphore d'*Alexandrium catenella*, représentée par la protéine PGP.

## **B-DISCUSSION**

### **I. PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA REPONSE AU STRESS OXYDATIF**

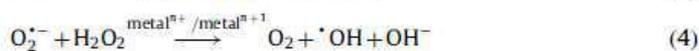
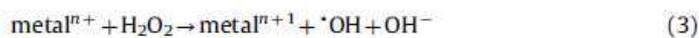
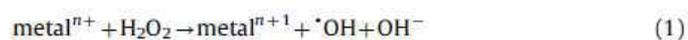
Parmi les différentes fonctions métaboliques perturbées par la contamination métallique (photorespiration, métabolisme du phosphore, métabolisme énergétique, photosynthèse, métabolisme des carbohydrates, signal cellulaire, bioluminescence, réponse au stress oxydatif, action chaperonne), la réponse au stress oxydatif, *via* les teneurs des sous – unités du protéasome, de la SOD, de HSP 90 et de BIP, était la fonction la plus affectée par les métaux plomb (26% à 27% des protéines d'intérêt) et zinc (31% à 39% des protéines d'intérêt) chez *Alexandrium catenella*. Toutefois, le zinc semblait avoir un impact plus fort que le plomb sur la réponse au stress oxydatif de ce dinoflagellé, avec un effet de concentration notable, cette catégorie fonctionnelle étant davantage perturbée lorsque les concentrations contaminantes augmentaient.

#### **1. Superoxyde dismutase**

Dans les conditions physiologiques, les cellules ayant un métabolisme aérobie produisent constamment et inévitablement des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS sont alors principalement générées au cours de la respiration cellulaire, à l'intérieur des mitochondries, mais aussi pendant la photosynthèse, à l'intérieur des chloroplastes, pour ce qui concerne les végétaux (Stohs et Bagchi, 1995 ; Kieffer *et al.*, 2009 ; Lee *et al.*, 2012). La forme la plus simple de ROS est l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet -}$  qui se forme par addition d'un électron à l'oxygène moléculaire  $O_2$ . Pendant la photosynthèse, les anions  $O_2^{\bullet -}$  sont les produits de la photoréduction de l' $O_2$  dans le photosystème I du chloroplaste (Miller-Morey et Van Dolah, 2004 ; Kieffer *et al.*, 2009). Au cours de la respiration cellulaire, les mitochondries produisent de 2 à 3 nmol d' $O_2^{\bullet -}$  par minute, par mg de protéines (Lee *et al.*, 2012). Des études estiment que 1 à 4% de l' $O_2$  moléculaire consommé par la chaîne respiratoire mitochondriale, reste incomplètement réduit en raison d'un « défaut » naturel du transport d'électrons au niveau de la NADH-ubiquinone-oxydoréductase (complexe I), ce qui conduit à l'oxydation incomplète de la fonction quinone du coenzyme Q, et donc à la formation de radicaux semi-quinones. Chaque radical semi-quinone est capable de transférer

un électron à une molécule d'O<sub>2</sub> et génère donc un radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Stohs et Bagchi, 1995).

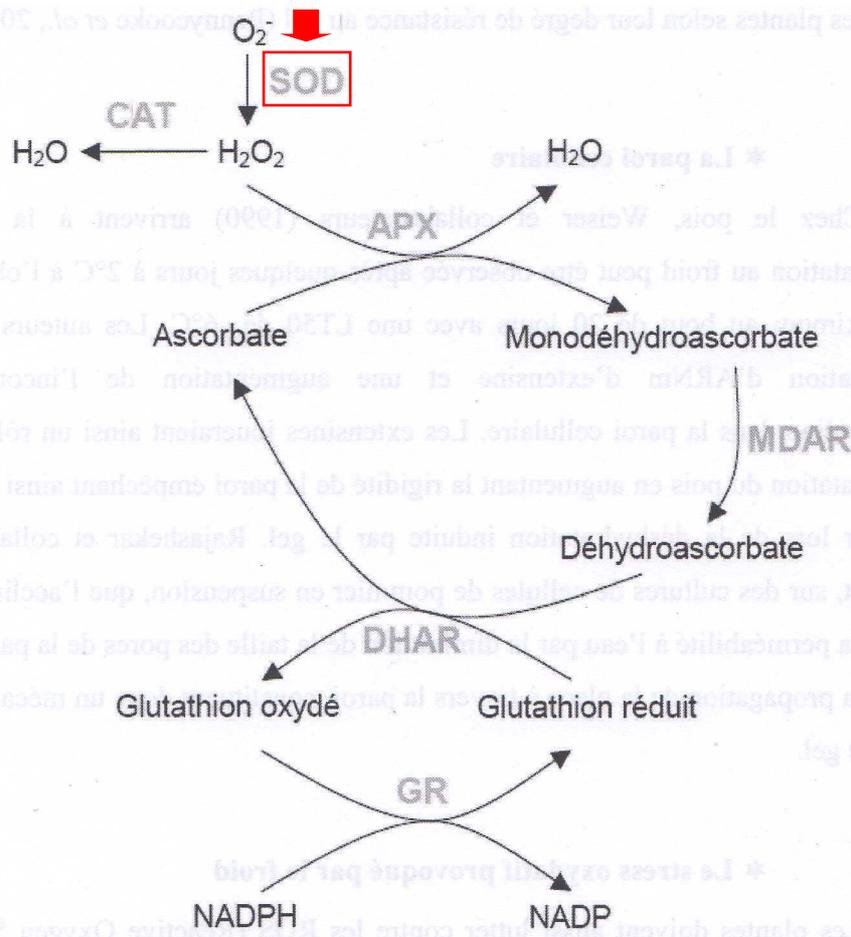
Toutefois, les stress environnementaux subis par les cellules peuvent augmenter leur production de ROS, ce qui perturbe l'équilibre physiologique initialement existant entre prooxydants et anti-oxydants. Ce déséquilibre vers un état prooxydatif est connu sous le nom de stress oxydatif (Okamoto et Colepicolo, 1998). La contamination métallique crée un stress oxydatif qui augmente les niveaux de ROS (Bareen *et al.*, 2012 ; Lee *et al.*, 2012), comme cela a par exemple été mesuré dans les chloroplastes du dinoflagellé marin *Gonyaulax polyedra* (Sigaud-Kutner *et al.*, 2002). En effet, les métaux entraînent la formation des radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et <sup>•</sup>OH, au cours des réactions de Fenton (1) et de Haber – Weiss (2), (3) et (4), suivantes (Lee *et al.*, 2012) :



Les très toxiques radicaux hydroxyles <sup>•</sup>OH, dérivant de la réaction d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec les métaux (cf. réaction (3) ci-dessus), représentent la majeure partie des ROS générées par le stress métallique (Lee *et al.*, 2012). En parallèle, les radicaux superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, modérément réactifs, peuvent interagir avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (en présence de métaux ou pas), ou encore avec <sup>•</sup>NO, afin de générer les oxydants plus puissants et très cytotoxiques : <sup>•</sup>OH, ROO<sup>•</sup> ou ONOO<sup>-</sup> (Okamoto et Colepicolo, 1998 ; Sigaud-Kutner *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2012). Le stress oxydatif induit par ces ROS en excès, entraîne des changements dans l'homéostasie cellulaire rédox, et conduit à une activation anormale des molécules du signal rédox sensibles (Lee *et al.*, 2012). De hauts niveaux de ROS peuvent aussi conduire à des dommages cellulaires importants *via* la dénaturation des protéines et des acides nucléiques, mais aussi *via* la peroxydation des lipides membranaires qu'ils occasionnent. En effet, les biomolécules sont des cibles potentielles du stress oxydatif, notamment pour le radical hydroxyle <sup>•</sup>OH, hautement toxique (Okamoto et Colepicolo, 1998 ; Lee *et al.*, 2012). Les ROS peuvent

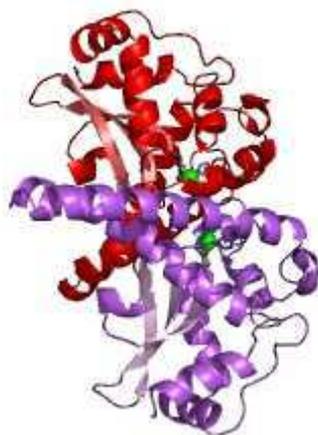
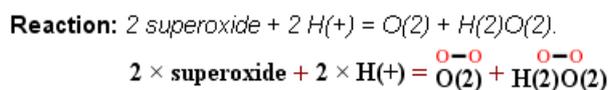
attaquer les biomolécules (i) en arrachant un électron à un atome de ces biomolécules (ii) en leur arrachant un atome d'hydrogène (iii) en s'additionnant sur leurs doubles liaisons (Kieffer *et al.*, 2009). Ainsi, ils peuvent réagir avec les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires, y initiant la formation de chaînes de peroxydation lipidique (Roméo *et al.*, 2000 ; Shi *et al.*, 2005). Par ailleurs, le stress oxydant peut entraîner la carbonylation des protéines, comme cela a été observé dans les protéines du foie, chez le poisson *Carassius auratus* exposé au cadmium (Shi *et al.*, 2005).

Dans des conditions physiologiques, un équilibre existe entre la production physiologique de ROS et leur détoxification à l'intérieur des cellules (Kieffer *et al.*, 2009). Cet équilibre repose sur l'action de molécules anti-oxydantes et d'enzymes spécifiques (Stohs et Bagchi, 1995), lesquelles sont particulièrement sollicitées en cas de stress oxydatif. Les mitochondries et les chloroplastes étant les principales sources de ROS, ces organites sont donc naturellement riches en enzymes anti-oxydantes (Lee *et al.*, 2012). Six enzymes sont impliquées dans la détoxification cellulaire des radicaux superoxydes  $O_2^{\bullet -}$  : la superoxyde dismutase (SOD), l'ascorbate peroxydase (APX), la catalase (CAT), la monodéhydroascorbate réductase (MDAR), la déshydroascorbate réductase (DHAR) et la glutathion réductase (GR) (Dumont, 2008 ; Kieffer *et al.*, 2009). Le processus de détoxification des radicaux superoxydes  $O_2^{\bullet -}$  repose sur l'action conjuguée de ces six enzymes, selon le schéma suivant (Figure 82) :



**Figure 82.** Processus de détoxification des radicaux superoxydes  $O_2^{\bullet -}$  assuré par six enzymes anti – oxydantes : superoxyde dismutase (SOD), ascorbate peroxydase (APX), catalase (CAT), monodéhydroascorbate réductase (MDAR), déshydroascorbate réductase (DHAR), et glutathion réductase (GR) (Dumont, 2008). *La protéine encadrée est sous – exprimée (voire dégradée) ou disparaît du protéome d’*Alexandrium catenella* en réponse à la contamination métallique*

Parmi ces enzymes anti-oxydantes, les SODs (Figure 83) sont des métalloprotéines, oxydo-réductases (EC 1.15.1.1), acceptrices de protons  $H^+$  au cours de la dismutation des anions superoxydes  $O_2^{\bullet -}$ , en  $O_2$  et  $H_2O_2$ , selon la réaction (Alscher *et al.*, 2002) :



**Figure 83.** Structure tridimensionnelle de la superoxyde dismutase (SOD) dans les mitochondries de rein humain (Borgstahl *et al.*, 1992) (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>)

Les SODs sont des enzymes ubiquistes, présentes à la fois dans les mitochondries, les chloroplastes, le cytosol et le milieu extracellulaire, selon les espèces considérées (Sigaud-Kutner 2002 ; Gillet *et al.*, 2006). Elles forment une famille comprenant trois classes d'isoformes spécifiquement localisées, identifiées sur la base des métaux fixés sur leurs sites actifs : les Cu-Zn SODs (chloroplastiques, cytosoliques), les Fe-SODs (chloroplastiques) et les Mn-SODs (mitochondriales) (Stohs et Bagchi, 1995 ; Hu *et al.*, 2003 ; Miller-Morey et Van Dolah, 2004 ; Le *et al.*, 2012 ; Lee *et al.*, 2012).

Les SODs participent à la 1<sup>ère</sup> ligne de défense contre le stress oxydatif (Figure 82) et les effets délétères qu'il impose aux cellules (Miller-Morey et Van Dolah, 2004 ; Baren *et al.*, 2012). Elles permettent de réguler efficacement et rapidement les teneurs en radicaux libres superoxydes  $\text{O}_2^{\cdot-}$  dans les cellules (Kieffer *et al.*, 2009 ; Kosova *et al.*, 2011 ; Leung *et al.*, 2011 ; Le *et al.*, 2012). Les SODs commencent par convertir ces anions en  $\text{H}_2\text{O}_2$  ; puis l' $\text{H}_2\text{O}_2$  qui résulte de cette conversion est détoxifié grâce à sa dismutation en  $\text{O}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ , sous l'action de la catalase (CAT) (Baren *et al.*, 2012 ; Lee *et al.*, 2012).

Les ROS formées en excès en réponse au stress métallique, peuvent agir comme molécules de signal pour l'induction cellulaire d'une réponse anti – oxydante, *via* l'expression d'enzymes telles que la SOD (Baren *et al.*, 2012). L'induction de la SOD est ainsi reconnue

comme un mécanisme protecteur minimisant les dommages cellulaires oxydatifs chez les organismes vivant dans les environnements pollués (Okamoto et Colepicolo, 1998). Ainsi, le cuivre induisait l'expression du gène de la Cu-Zn SOD chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Remans *et al.*, 2012). Une induction rapide de la Mn-SOD en réponse à la contamination par le plomb 18  $\mu\text{M}$ , était enregistrée dans les cellules du dinoflagellé marin *Karenia brevis* (Miller-Morey et Van Dolah, 2004). De la même façon, l'expression significative de la Cu-Zn SOD était constatée en cas de contamination du bivalve *Perna viridis* par du cadmium (Leung *et al.*, 2011).

Toutefois, chez la microalgue *Chlamydomonas reihnardtii* exposée au cadmium, une augmentation des teneurs en Mn-SOD était observée en même temps qu'une diminution des teneurs en Fe-SOD (Gillet *et al.*, 2006). D'autres études ont porté sur l'activité de la SOD chez *Gonyaulax polyedra* soumise à des expositions chroniques (30 jours) et rapides (48 heures) au mercure, au cadmium, au plomb et au cuivre (Okamoto et Colepicolo, 1998). Ces travaux rapportaient qu'en cas d'exposition chronique, l'activité de la SOD augmentait durant le 1<sup>er</sup> jour d'exposition, tandis qu'en cas d'exposition rapide, la Fe-SOD et la Mn-SOD étaient induites. En revanche, aucune induction de la Cu-Zn SOD n'était mentionnée dans ces conditions de stress métallique. Chez d'autres micro-organismes tels que les levures, une forte stimulation de l'expression de la Mn-SOD était mesurée, en même temps qu'une légère diminution de l'expression de la Cu-Zn SOD (Vido *et al.*, 2001). Dans les feuilles de Peuplier, une diminution des teneurs en Cu-Zn SOD était rapportée en conditions de stress par le cadmium (Kieffer *et al.*, 2008 ; Kosova *et al.*, 2011). De tels résultats étaient également mentionnés dans des études portant sur l'expression de l'ARNm, sur l'abondance et sur l'activité de la Cu-Zn SOD chez les plantes (Kieffer *et al.*, 2008, 2009). Ces études montraient une diminution effective de ces trois paramètres, dont l'origine pourrait être une disponibilité réduite des métaux cuivre et zinc par rapport au cadmium contaminant, ainsi qu'une compétition possible de ce métal, avec le cuivre et le zinc, sur le site du co-facteur de l'enzyme (Kieffer *et al.*, 2008, 2009).

De façon équivalente aux résultats rapportés ci – dessus, l'expression de la Cu-Zn SOD ne semblait pas induite par le stress métallique dû au plomb ou au zinc, lorsqu'*Alexandrium catenella* était exposée à ces métaux. En effet, dans la présente étude, la Cu-Zn SOD était toujours fortement perturbée (sous – expression ou dégradation) par les concentrations contaminantes de zinc ou de plomb testées. En présence des concentrations 12  $\mu\text{M}$  et 18  $\mu\text{M}$  de ces métaux, la Cu-Zn SOD disparaissait systématiquement du protéome

d'*Alexandrium catenella*, suggérant d'utiliser cette protéine comme marqueur protéomique du stress par le plomb et le zinc, à ces concentrations. En revanche, en présence de la plus faible contamination testée (6  $\mu\text{M}$ ), des différences d'impact sur le protéome semblaient exister entre le zinc et le plomb, le taux de sous – expression de la Cu-Zn SOD étant de -6,5 en présence de plomb, alors qu'il atteignait -28,0, soit la valeur minimale enregistrée, en présence de zinc. Ces résultats indiquaient donc que la contamination par le zinc avait un impact plus sévère, par rapport à la contamination par le plomb, sur la Cu-Zn SOD exprimée par *Alexandrium catenella*. Cette réduction drastique des teneurs en Cu-Zn SOD pourrait résulter d'une dégradation de cette protéine par les métaux testés. En effet, les acides aminés constitutifs des protéines sont très sensibles au stress oxydant, lequel peut se traduire par un clivage des séquences polypeptidiques, et dans le cas particulier d'enzymes, par l'inactivation de celles – ci (Stohs et Bagchi, 1995). De façon générale, l'oxydation des protéines les rend beaucoup plus sensibles à la dégradation par le protéasome (Delattre *et al.*, 2005), ce qui pourrait contribuer à expliquer la disparition la Cu-Zn SOD du protéome d'*Alexandrium catenella* aux fortes concentrations métalliques. Des travaux menés sur certains animaux (rat, grenouille) exposés au plomb, ont ainsi montré que la contamination par ce métal diminuait les teneurs en glutathione réduite, glutathione réductase, mais inhibait également le recyclage du glutathione oxydé, tout en réduisant les niveaux de SOD et de catalase, conduisant à une augmentation du taux de ROS, ainsi qu'à une diminution du potentiel anti-oxydant (Lee *et al.*, 2012).

## **2. Sous – unités $\alpha$ et $\beta$ du protéasome**

Le protéasome est un complexe enzymatique multi – protéique présent dans les cellules eucaryotes, où il est localisé à l'intérieur du noyau, dans le cytosol, ou encore associé au réticulum endoplasmique (Dasuri *et al.*, 2013). Le protéasome a pour fonction la dégradation protéolytique intracellulaire des protéines mal repliées, oxydées, endommagées ou obsolètes (Contreras *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2011 ; Marzano *et al.*, 2012). La dégradation protéasomale évite l'accumulation d'agrégats protéiques qui pourraient interférer avec les processus métaboliques, et de fait, induire la mort cellulaire (Flick et Kaiser, 2012 ; Marzano *et al.*, 2012). De par cette dégradation, le protéasome joue aussi un rôle important dans la réponse au stress oxydatif, l'expression génétique ou pendant le cycle cellulaire. La protéolyse par le protéasome peut s'effectuer (*i*) *via* la voie ubiquitine - protéasome, laquelle

est énergétiquement dépendante (ATP) (Flick et Kaiser, 2012 ; Rodrigues *et al.*, 2012) (ii) indépendamment de l'ubiquitine et de l'ATP (Shang et Taylor, 2012).

L'ubiquitine est une petite protéine (8,5 kDa, 76 acides aminés) capable de se lier de façon covalente à d'autres protéines, avec l'aide d'enzymes activant l'ubiquitine, au cours d'un processus appelé ubiquitination (Dasuri *et al.*, 2013). La voie ubiquitine – protéasome est un système protéolytique très sélectif qui comprend deux étapes : 1, l'identification du substrat protéique par ubiquitination, les protéines ciblées pour la dégradation étant marquées par la protéine ubiquitine ; 2, la dégradation des protéines cibles ubiquitinées (Shang et Taylor, 2012). L'ubiquitination est coordonnée par trois enzymes différentes, notées E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> et E<sub>3</sub>. L'ubiquitine est d'abord activée par E<sub>1</sub>, *via* la formation d'une liaison thiol-ester de haute énergie, entre un résidu C-terminal de la glycine dans l'ubiquitine et le résidu cystéine de E<sub>1</sub>. Puis, des enzymes E<sub>2</sub> conjuguées à l'ubiquitine, transfèrent l'ubiquitine activée, *via* l'intermédiaire thiol-ester ubiquitine, vers le substrat protéique à dégrader, lequel est spécifiquement lié à E<sub>3</sub>, enzyme appartenant à la famille des ligases ubiquitine – protéines. L'enzyme E<sub>3</sub> catalyse ensuite la formation d'une liaison isopeptide entre un groupe carboxyle de l'ubiquitine et le groupe amine du substrat protéique à éliminer.

Le complexe protéasome - ubiquitine a une forme de baril, avec une cavité cernée par quatre anneaux en son centre, dans laquelle s'effectue la digestion des protéines ubiquitinées (Dasuri *et al.*, 2013). Chaque anneau est composé de sept protéines : les deux anneaux internes comportent sept sous – unités  $\beta$  responsables de l'activité catalytique ; les deux anneaux externes contiennent sept sous – unités  $\alpha$ , qui contrôlent l'accès des protéines à dégrader au cœur du protéasome, et ont un rôle plutôt structural.

La protéolyse par le protéasome joue un rôle important dans la réponse au stress oxydatif, en éliminant les protéines oxydées, préalablement ciblées par ubiquitination (Flick et Kaiser, 2012). Ainsi, certains travaux rapportent une augmentation significative du taux de protéines ubiquitinées dans des cellules exposées à des contaminants métalliques suscitant un stress oxydatif (Marzano *et al.*, 2012). L'augmentation de l'abondance des sous - unités  $\alpha$  du protéasome était rapportée comme étant un indicateur de l'accélération de la dégradation protéasomale dans ces conditions (Rodrigues *et al.*, 2012). Des métaux tels que le cadmium augmentaient l'activité protéasomale chez le maïs (Pena *et al.*, 2007). De façon similaire, une sur – expression de +2,1 fois des sous - unités  $\alpha$  du protéasome était mesurée dans le protéome du crabe *Eriocheir sinensis* soumis à une exposition chronique au cadmium, la résistance de ce décapode face au cadmium reposant probablement sur la protéolyse des

protéines oxydées par le protéasome (Silvestre *et al.*, 2006). Chez l'algue brune marine *Scytosiphon gracilis* exposée au cuivre, et chez le poisson *Oryzias melanostigma* exposé au mercure, les sous - unités  $\alpha$  du protéasome étaient également sur - exprimées (Contreras *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2011).

Dans le contexte de l'étude, les concentrations des sous - unités  $\alpha$  du protéasome exprimées par *Alexandrium catenella* étaient toujours affectées par la contamination métallique au plomb ou au zinc, quel que soit le niveau de cette contamination. Concernant l'impact du plomb, celui - ci se traduisait exceptionnellement par la sur - expression, à un taux très élevé (+16,7), d'une sous - unité  $\alpha$  du protéasome (spot 18) (Tableau XI). Ces résultats étaient en accord avec ceux mentionnés dans les travaux ci - dessus, suggérant qu'*Alexandrium catenella* se prémunirait de l'accumulation des protéines oxydées par le stress métallique, en augmentant son taux de dégradation protéasomale. Toutefois, dans la plupart des cas, l'impact du plomb restait néfaste sur les sous - unités du protéasome. Quelle que soit la concentration de plomb testée dans l'étude, la disparition systématique de la sous - unité  $\alpha$  du protéasome correspondant au spot 5 était observée, suggérant l'utilisation de ce protéine comme indicateur protéomique du stress métallique par le plomb. De façon équivalente, Pb 12  $\mu$ M conduisait à la disparition de certaines sous - unités  $\alpha$  et  $\beta$  du protéasome (spots 30 et 37). Concernant la contamination par Zn 6  $\mu$ M, celle - ci conduisait à la sous - expression des sous - unités  $\alpha$  du protéasome au niveau des spots 5 (-3,9), 18 -2,7) et 35 (-6,5), mais aussi à la disparition de cette protéine au niveau du spot 30, tandis que Zn 12  $\mu$ M conduisait à la disparition des sous - unités  $\alpha$  du protéasome associées aux spots 5 et 18, ainsi qu'à la sous - expression de cette protéine au niveau du spot 35 (-2,7). Enfin, la contamination par Zn 18  $\mu$ M provoquait la disparition systématique des sous - unités  $\alpha$  du protéasome correspondant aux spots 5, 18, 30, 35, 37, 44, 45, 46 et 47. D'autres travaux montraient que le stress oxydatif pouvait cibler le protéasome lui - même, en induisant des modifications oxydatives de celui - ci, par glutathionylation ou par nitrosylation, et donc un dysfonctionnement de la dégradation protéasomale (Dasuri *et al.*, 2013), lequel pourrait donc aussi concerner le protéasome d'*Alexandrium catenella*.

## II. PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LA PHOTOSYNTHÈSE

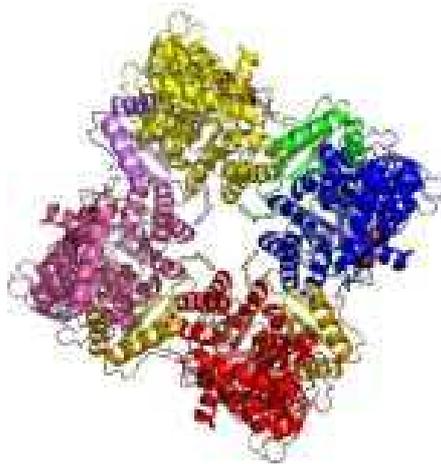
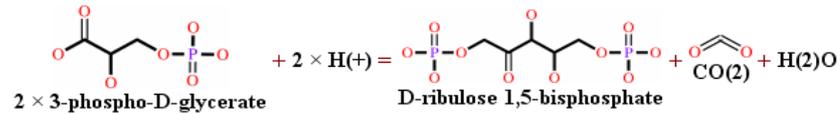
La photosynthèse, *via* les teneurs des protéines RUBISCO, FNR, PCP, ATP – synthase, RPI et TPI, était la 2<sup>ème</sup> fonction la plus affectée par les métaux plomb (19% à 25% des protéines d'intérêt) et zinc (26% à 29% des protéines d'intérêt). Globalement, le zinc avait un effet un peu plus important que le plomb sur l'activité photosynthétique, avec un effet de concentration, l'activité photosynthétique étant davantage perturbée lorsque les concentrations contaminantes de zinc augmentaient.

### 1. Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase

La ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (RUBISCO) était toujours fortement perturbée (sous – expression ou dégradation) par les concentrations contaminantes de zinc ou de plomb testées. La RUBISCO associée au spot 9 disparaissait systématiquement du protéome d'*Alexandrium catenella*, quelle que soit la concentration de plomb ou de zinc. De plus, la RUBISCO associée au spot 29 était de moins en moins exprimée en présence des concentrations contaminantes croissantes de chaque métal, pour finalement disparaître en présence de leurs plus fortes concentrations. Ces résultats suggèrent l'utilisation de la RUBISCO comme marqueur protéomique du stress métallique par le plomb ou par le zinc, chez *Alexandrium catenella*. La disparition de la RUBISCO correspondant au spot 29 était toutefois observée à partir d'une concentration plus faible de plomb (12  $\mu\text{M}$ ) que de zinc (18  $\mu\text{M}$ ); et pour une concentration contaminante de 6  $\mu\text{M}$ , cette RUBISCO était significativement sous – exprimée en présence de plomb, alors qu'aucune différence d'expression n'était constatée en présence de zinc à cette concentration, suggérant un impact plus fort du plomb que du zinc sur la RUBISCO synthétisée par *Alexandrium catenella*.

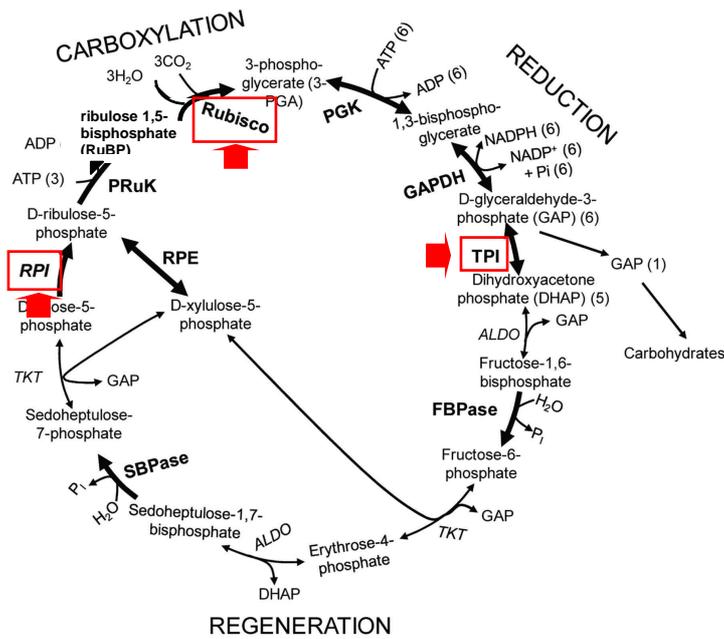
La RUBISCO (Figure 84) est une carboxy – lyase (EC 4.1.1.39) capable de catalyser la fixation du CO<sub>2</sub> sur le ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP : sucre portant cinq carbones), au cours de la réaction :

**Reaction:** 2 3-phospho-D-glycerate + 2 H(+) = D-ribulose 1,5-bisphosphate + CO(2) + H(2)O.



**Figure 84.** Structure tridimensionnelle de la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (RUBISCO) chez *Spinacia oleracea* (Taylor et Anderson, 1997) (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>)

La RUBISCO est l'enzyme la plus abondante sur notre planète, où elle contribue de 40% à 55%, à l'ensemble des protéines solubles présentes dans les feuilles des organismes photosynthétiques (Ishida *et al.*, 1997). Outre son implication dans la photorespiration, *via* l'oxygénation du RuBP, la RUBISCO présente dans le stroma des chloroplastes est indispensable à la 2<sup>ème</sup> étape de la photosynthèse, ou cycle de Calvin (Figure 85). Le cycle de Calvin est indépendant de la lumière, contrairement aux réactions claires de la photophosphorylation. Il permet de synthétiser divers carbohydrates (amidon, saccharose, glucose) associés à l'autotrophie des organismes photosynthétiques, en utilisant le CO<sub>2</sub> fixé par le RuBP en présence de RUBISCO, ainsi que l'énergie produite sous forme d'ATP et de NADPH pendant les réactions claires. Le cycle de Calvin comprend trois étapes : (1) la carboxylation du RuBP donnant du 3-phosphoglycérate (PGA), en présence d'H<sub>2</sub>O, de CO<sub>2</sub> et de RUBISCO ; (2) la réduction du PGA en glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP) en présence d'ATP et de NADPH, étape conduisant à la formation proprement dite des carbohydrates ; (3) la régénération du RuBP destiné à un nouveau cycle de Calvin.



**Figure 85.** Représentation schématique du cycle de Calvin (Abebe *et al.*, 2009). Les protéines encadrées sont sous – exprimées (ou dégradées) ou disparaissent du protéome d'*Alexandrium catenella* en réponse à la contamination métallique. ALDO, aldolase ; FBPase, fructose 1,6-bisphosphatase ; GAPDH, glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase ; PGK, phosphoglycérate kinase ; PRuK, phosphoribulokinase ; RPE, ribulosephosphate 3-épimérase ; RPI, ribose 5-phosphate isomérase; Rubisco, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ; SBPase, sedoheptulose 1,7-bisphosphatase ; TKT, transketolase ; TPI, triosephosphate isomérase

Plusieurs études ont mis en évidence les effets néfastes dus à l'accumulation des métaux dans l'appareil végétatif des organismes photosynthétiques. Les métaux provoquent (i) la dégradation des chlorophylles ce qui inhibe la photosynthèse (ii) endommagent jusqu'à l'ultrastructure des chloroplastes (iii) entraînent la sous – expression de nombreuses protéines impliquées dans l'activité photosynthétique, plus précisément dans le cycle de Calvin, telles que la RUBISCO, la triosephosphate isomérase (TPI) et l'aldolase (ALDO) (Gillet *et al.*, 2006 ; Fuhrs *et al.*, 2008 ; Kieffer *et al.*, 2008 ; Ahsan *et al.*, 2009). Les résultats de ces études sont donc en accord avec la réduction des teneurs en RUBISCO ici enregistrée en réponse au stress métallique, *via*, soit la sous – expression de cette protéine, soit sa disparition pour cause d'inhibition de l'expression protéique ou de dégradation. Les conséquences directes de cette réduction pourraient être une moindre fixation du CO<sub>2</sub>, ainsi qu'une moindre efficacité du recyclage du RuBP pendant le cycle de Calvin (Kieffer *et al.*, 2008). Chez d'autres microorganismes tels que la microalgue *Pseudokirchneriella subcapitata*, les contaminations par le chrome et le palladium entraînent une diminution drastique des quantités de RUBISCO à l'intérieur des chloroplastes (Vannini *et al.*, 2009, 2011). Des résultats similaires sont

obtenus en présence de cadmium chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* (Gillet *et al.*, 2006). Les métaux cadmium, cobalt, cuivre, lithium, strontium et zinc, induisaient une réponse similaire dans les feuilles de riz (Hajduch *et al.*, 2001). Des concentrations élevées d'arsenic conduisaient à la dégradation de plusieurs protéines impliquées dans la photosynthèse, dont la RUBISCO, dans les feuilles d'*Agrostis tenuis* (Duquesnoy *et al.*, 2009).

A l'intérieur de la structure primaire de la RUBISCO, l'acide aminé le plus sensible à l'oxydation est la méthionine (Ge *et al.*, 2009). Lorsque cet acide aminé est oxydé, il conduit à la formation de résidus sulfoxyde de méthionine (Stadtman *et al.*, 2005). Or, les résidus résultant de cette oxydation sont impliqués dans le marquage des protéines vouées à la dégradation protéolytique par les protéases (Brot et Weissbach, 2000 ; Desimone *et al.*, 1996). Par conséquent, la dégradation de la RUBISCO associée au stress métallique pourrait s'expliquer par le marquage oxydatif de cette protéine au niveau de ses acides aminés méthionine.

Outre la réduction des teneurs en RUBISCO, une diminution significative de l'activité de cette enzyme (autour de 50%) était constatée en présence de cobalt, de zinc ou de cuivre, chez la plante aquatique *Salvinia natans*, d'où un potentiel de fixation du carbone sévèrement perturbé (Dhir *et al.*, 2011). Le cadmium provoquait également la diminution de l'activité de la RUBISCO dans des plants de maïs et de haricot (Krantev *et al.*, 2008 ; Smeets *et al.*, 2005). Or, de nombreuses protéines portent des sites de liaison aux métaux, et nécessitent des cations métalliques pour leurs activités catalytiques (Demirevska – Kepova *et al.*, 2004). Ainsi, les sites actifs de la RUBISCO sont organisés autour d'un cation  $Mg^{2+}$ . La diminution d'activité de la RUBISCO résultant de la contamination métallique pourrait donc être liée à la substitution des ions  $Mg^{2+}$  par des cations métalliques contaminants (Van Assche et Clijsters, 1990). Elle pourrait également résulter d'une liaison irréversible se formant entre les cations métalliques contaminants et les groupements thiols de la RUBISCO (Pankovic *et al.*, 2000).

Le maintien de l'activité de la RUBISCO, ainsi que son assemblage, sont des processus complexes impliquant d'autres protéines ainsi que certains métabolites (Demirevska – Kepova *et al.*, 2004). Ainsi, l'activation de la RUBISCO est - elle réalisée par une protéine spécifique présente dans le chloroplaste : la RUBISCO activase (RA) (Salvucci *et al.*, 1987). L'assemblage de la RUBISCO fait intervenir une autre protéine du chloroplaste : la RUBISCO Binding Protein (RBP) (Roy *et al.*, 1988). Il a été rapporté que la RA pourrait

jouer un rôle dans le maintien de l'activité de la RUBISCO en conditions de stress métallique (Siedlecka et Krupa, 2004). D'autres travaux mentionnent une diminution des taux de RA et de RBP, et une diminution des taux de RUBISCO, en réponse à un stress métallique, par le cuivre, dans des plants de blé ; par le chrome, chez *Pseudokirchneriella subcapitata* (Demirevska – Kepova *et al.*, 2004 ; Vannini *et al.*, 2009) ; et par le cadmium, chez le Peuplier (Durand *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que les diminutions d'activité et de teneurs en RUBISCO, souvent enregistrées en réponse à un stress métallique, pourraient aussi être liées aux dégradations de la RA et de la RBP engendrées par les métaux.

## 2. Complexe péridinine chlorophylle - protéine

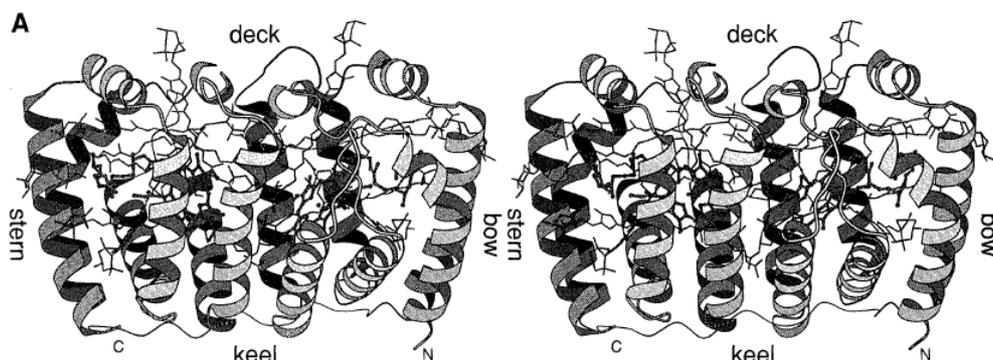
Le complexe péridinine chlorophylle – protéine (PCP) est toujours perturbé par les concentrations contaminantes de zinc ou de plomb imposées aux cultures d'*Alexandrium catenella*. Pour chaque concentration de plomb testée, la PCP associée au spot 34 présentait des teneurs significativement réduites (sous – expression, ou dégradation) par rapport au protéome témoin. Des résultats similaires étaient observés, quelle que soit la concentration de zinc, pour la PCP associée aux spots 36 et 41. La PCP pourrait donc être un marqueur protéomique du stress métallique par le plomb ou par le zinc chez *Alexandrium catenella*. Ces perturbations de la PCP semblaient moindres que celles enregistrées pour la RUBISCO, la PCP apparaissant toujours dans le protéome quel que soit le niveau de contamination métallique (excepté au niveau du spot 34 en présence de Zn 18  $\mu$ M), ce qui n'était pas le cas de la RUBISCO. Toutefois, contrairement au plomb, le zinc provoquait toujours la sous – expression de la PCP associée à certains spots (41, 43). De plus, concernant les protéines sous – exprimées en commun (spots 34 et 36), les taux de sous – expression de la PCP en cas de contamination par le zinc étaient plus bas qu'en cas de contamination par le plomb. Ces résultats suggèrent que le plomb et le zinc ont des niveaux d'impact différents sur la PCP, la contamination par le zinc ayant un effet plus important que celle par le plomb.

Il est généralement admis que les organismes chlorophylliens captent l'énergie lumineuse grâce à des complexes pigments – protéines (Norris et Miller, 1994). Parmi les organismes chlorophylliens, les dinoflagellés possèdent un complexe pigment – protéine spécifique, de nature hydrosoluble, appelé complexe péridinine chlorophylle - protéine (PCP). Le complexe PCP peut être particulièrement abondant chez certains dinoflagellés tels que

*Gonyaulax polyedra*, espèce chez laquelle il représente jusqu'à 5% des protéines solubles totales (Le *et al.*, 1997).

Le complexe PCP des dinoflagellés capte l'énergie lumineuse grâce à un pigment de type caroténoïde (Hofmann *et al.*, 1996). Ce pigment caroténoïde est la péricidine, captant l'énergie lumineuse dans le bleu – vert (longueur d'onde d'absorption entre 470 nm et 550 nm), à des longueurs d'onde inaccessibles pour la chlorophylle. L'énergie lumineuse captée par la péricidine est ensuite transférée vers les centres réactifs de la chlorophylle, lesquels convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique. Les molécules de péricidine d'un complexe PCP forment des interactions de Van der Waals avec la chlorophylle, rapprochant ces deux pigments, et facilitant par là – même, le transfert d'énergie lumineuse depuis la péricidine vers la chlorophylle, ce qui optimise la photosynthèse (Hofmann *et al.*, 1996).

Des études menées sur la PCP des dinoflagellés *Glenodinium* sp. et *Gonyaulax polyedra*, ont montré la prédominance de la péricidine par rapport à la chlorophylle *a*, avec un ratio de 4:1 (Prézélin et Haxo, 1976). La PCP peut adopter deux formes différentes selon les espèces considérées : la forme monomérique et la forme dimérique (Hiller *et al.*, 2001). La forme monomérique est une protéine de 32 kDa, présentant deux domaines similaires, dont chacun se lie à un cluster composé de quatre molécules de péricidine et d'une molécule de chlorophylle (Hofmann *et al.*, 1996). La forme dimérique comprend deux polypeptides de 15 kDa environ (lesquels peuvent être, ou ne pas être, identiques), chaque polypeptide étant relié à un cluster chromophore identique à celui de la PCP monomérique (Hofmann *et al.*, 1996) (Figure 86).



**Figure 86.** Structure tridimensionnelle de la forme dimérique de la péricidine chlorophylle – protéine (PCP) chez *Amphidinium carterae* (Hofmann *et al.*, 1996)

La PCP contient également une molécule d'un lipide appelé digalactosyl diacyl glycérol (DGDG) (Hofmann *et al.*, 1996). La PCP est tournée vers la lumière thylakoïdienne des chloroplastes, la partie lipidique DGDG étant enchâssée dans la membrane interne des thylakoïdes. Liée à la DGDG, la partie protéique de la PCP assume trois rôles (*i*) elle solubilise la PCP dans le compartiment aqueux du chloroplaste, puisqu'en la seule présence de la DGDG, la PCP serait hydrophobe (*ii*) elle module les propriétés d'absorption des pigments péridiniens et chlorophylliens (*iii*) elle arrange les molécules de pigments entre elles, de sorte qu'un transfert efficace de l'énergie lumineuse puisse avoir lieu.

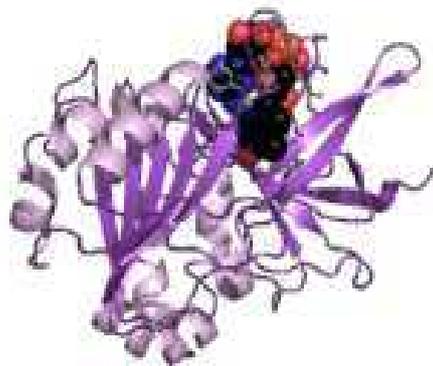
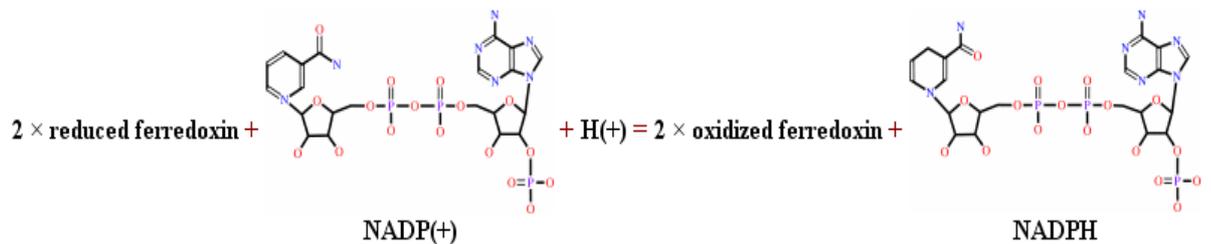
Les caroténoïdes peuvent servir de quenchers, désactivant, par transfert d'énergie, l'état excité d'une espèce chimique (Sigaud – Kutner *et al.*, 2002). Grâce à cette propriété, les caroténoïdes protègent des dommages photooxydatifs, les centres réactionnels de la photosynthèse ainsi que les complexes d'antennes associés, chez certaines plantes soumises à une forte intensité lumineuse ou à un stress froid (Ramalho *et al.*, 1998 ; Garcia-Plazaola *et al.*, 1999). Chez les dinoflagellés, la péridinine est un quencher important d'O<sub>2</sub> ; la péridinine et le β-carotène agissent comme des anti-oxydants cellulaires (Sigaud – Kutner *et al.*, 2002). La péridinine a un rôle protecteur majeur contre le stress oxydatif chez le dinoflagellé *Lingulodinium polyedrum*, sa production de péridinine augmentant de 60% en réponse au stress oxydatif (Pinto *et al.*, 2000). Des résultats antagonistes sont mentionnés dans d'autres études concernant le dinoflagellé *Gonyaulax polyedra*, chez lequel les niveaux de péridinine diminuent en cas d'exposition au mercure, au cadmium, au plomb ou au cuivre (Okamoto *et al.*, 2001). Les résultats de ces travaux sont en accord avec ceux ici présentés, les teneurs en PCP chez *Alexandrium catenella* étant réduites en réponse au stress métallique par le plomb ou par le zinc. La réduction des teneurs en péridinine diminuerait la capacité photosynthétique, mais permettrait parallèlement de réguler le flux d'électrons entre les photosystèmes I et II, empêchant ainsi la formation d'anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>-</sup> via la réaction de Mehler, et évitant donc les dommages photooxydatifs (Okamoto *et al.*, 2001).

### 3. Ferrédoxine – NADP réductase

La ferrédoxine - NADP réductase (FNR) est fortement perturbée (sous – expression, voire dégradation) par les concentrations contaminantes de zinc ou de plomb testées dans l'étude. En présence de plomb, la FNR associée aux spots 21 et 39 est sous - exprimée à partir de la concentration 6 µM, pour disparaître du protéome à la concentration 12 µM. En revanche, en présence de zinc, la FNR disparaît dès la concentration 6 µM au niveau des spots 8 et 21, disparition confirmée au niveau du spot 8 à la concentration 12 µM, tandis que la disparition des spots 21 et 39 est observée à la concentration contaminante supérieure (18 µM). La disparition de la FNR des spots 8 et 21 se produisait à partir d'une concentration plus faible de zinc (6 µM) que de plomb (12 µM), suggérant un impact néfaste plus important du zinc que du plomb, sur la FNR synthétisée par *Alexandrium catenella*.

La FNR (Figure 87) est une oxydo - réductase agissant sur certaines protéines fer – soufre (EC 1.18.1.2). Plus précisément, la FNR catalyse le transfert d'électrons existant entre le coenzyme NADP(H) et la protéine fer – soufre ferrédoxine notée Fd (Ceccarelli *et al.*, 2004), selon la réaction :

**Reaction:** 2 reduced ferredoxin + NADP(+) + H(+) = 2 oxidized ferredoxin + NADPH.



**Figure 87.** Structure tridimensionnelle de la ferrédoxine – NADP réductase (FNR) chez *Azotobacter vinelandii* (Prasad *et al.*, 1998) (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>)

La FNR est une flavoenzyme localisée dans le stroma des chloroplastes, à proximité de la membrane thylakoïdienne (Figure 97). Elle porte une liaison non-covalente avec un groupement prosthétique appelé Flavine Adénine Dinucléotide (FAD). Le groupement FAD est un co-facteur dérivé de la vitamine B2 (riboflavine) qui confère à la FNR sa capacité catalytique lors d'un transfert d'électrons (Sanchez-Azqueta *et al.*, 2012). La FNR intervient plus particulièrement pendant la photophosphorylation, lors de la dernière étape de transfert d'électrons de celle-ci (Figure 96). Ce transfert d'électrons par la FNR s'opère en présence du substrat Fd, métalloprotéine constituée de clusters fer-soufre, portant deux cations fer tétracoordonnés avec deux anions sulfures, et quatre groupements thiols de résidus cystéine (Lodeyro *et al.*, 2012). Lors du transfert d'électrons, les cations fer de la Fd oscillent entre les degrés d'oxydation +2 (forme réduite de Fd) et +3 (forme oxydée de Fd). Parallèlement au transfert d'électrons, le NADP<sup>+</sup> est réduit en NADPH (Hanke *et al.*, 2011), le NADPH étant un coenzyme essentiel au cycle de Calvin (Figure 85) ainsi qu'à d'autres réactions de régulation, de protection et de biosynthèse cellulaires (Lodeyro *et al.*, 2012). Dans cette étude, les quantités réduites de FNR exprimées par *Alexandrium catenella* en conditions de stress métallique auraient probablement un impact néfaste sur l'activité photosynthétique de cette espèce (i) de façon directe, pendant le transfert d'électrons de la photophosphorylation (ii) de façon indirecte, au cours du cycle de Calvin, en raison des quantités moindres de NADPH disponible.

La FNR participe à d'autres voies métaboliques que la photosynthèse, parmi lesquelles figurent l'assimilation de l'azote, la synthèse d'acides aminés (acide glutamique), l'assimilation du soufre et le métabolisme des lipides (Lodeyro *et al.*, 2012). Il peut donc être envisagé que ces voies métaboliques soient perturbées par le stress métallique chez *Alexandrium catenella*, au même titre que la photosynthèse. En raison de sa capacité à moduler l'environnement rédox dans lequel se trouvent les cellules, la FNR est également impliquée dans la défense cellulaire contre les dommages générés par le stress oxydatif (Palatnik *et al.*, 1997). Ainsi, l'expression génétique de la FNR était induite chez la bactérie *Pseudomonas putida* soumise à un stress oxydatif (Lee *et al.*, 2006). Ce type de résultats n'était pas observé au niveau du protéome d'*Alexandrium catenella*, puisque la FNR était soit sous-exprimée (ou dégradée), soit disparaissait, suggérant que les cellules de cette espèce étaient moins protégées des dommages occasionnés par le stress oxydatif.

Certaines études ont mis en évidence la solubilisation destructive de la FNR, depuis les membranes thylakoïdiennes vers le stroma des chloroplastes, lorsque des plantes étaient soumises à un traitement par des peroxydes et des viologènes, montrant l'effet toxique de ces substances oxydantes sur la FNR (Palatnik *et al.*, 1997). Il n'est donc pas à exclure que la réduction des teneurs en FNR mesurée dans notre étude soit le résultat, non pas d'une sous-expression spécifique de cette protéine, mais plutôt d'une telle solubilisation de la FNR en conditions oxydantes. Des travaux récents menés sur des algues et des cyanobactéries ont aussi montré que la Fd était une cible du stress oxydatif, au profit d'une autre enzyme appelée flavodoxine (Fld), dont l'activité est également catalysée par la FNR (Lodeyro *et al.*, 2012). La diminution des teneurs en Fd mesurée dans ces microorganismes semblait résulter de la forte sensibilité des clusters fer – soufre aux conditions oxydantes. L'oxydation de la Fd au niveau de ces clusters conduit à la formation de substances instables se dégradant rapidement, donc aboutissant à l'inactivation de la molécule, et à la libération du fer qu'elle contient (Lodeyro *et al.*, 2012).

Certains auteurs ont rapporté l'impact toxique du cadmium 150  $\mu\text{M}$  sur la FNR de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*, un taux de sous-expression de -1,7 de la FNR étant mesuré dans ces conditions (Gillet *et al.*, 2006). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans la présente étude, bien que les taux de sous-expression mesurés pour *Alexandrium catenella* exposée au zinc ou au plomb à des concentrations inférieures à celles du cadmium testées sur *C. reinhardtii*, soient beaucoup plus bas, entre -4,4 et -8,0 (en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$ ), témoignant de l'impact beaucoup plus fort du zinc ou du plomb chez *Alexandrium catenella*, que du cadmium chez *C. reinhardtii*.

En bref, la réduction des teneurs en RUBISCO, PCP et FNR enregistrée dans cette étude en réponse au stress métallique, montre que la voie photosynthétique est sévèrement perturbée par la contamination au zinc ou au plomb, chez *Alexandrium catenella*. Cette perturbation de l'activité photosynthétique pourrait s'accompagner d'un ralentissement du métabolisme énergétique associé à une réduction des réserves en ATP, puisque l'ATP est produit au cours de la photophosphorylation. Ce processus pourrait alors être compensé par la sur-expression de l'ATP – synthase pour produire davantage d'ATP, comme cela sera indiqué au point V de cette discussion.

### III. PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LE MÉTABOLISME DES CARBOHYDRATES

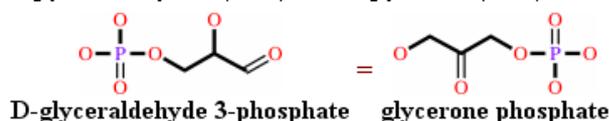
Le métabolisme des carbohydrates, *via* les teneurs des protéines RPI, TPI et MDH, est la 3<sup>ème</sup> fonction la plus affectée par les métaux plomb (9% à 13% des protéines d'intérêt) et zinc (8% à 17% des protéines d'intérêt). Globalement, le zinc semble avoir un effet un peu plus fort que le plomb sur le métabolisme des carbohydrates, tandis que l'impact de ces deux métaux diminue avec les concentrations contaminantes croissantes.

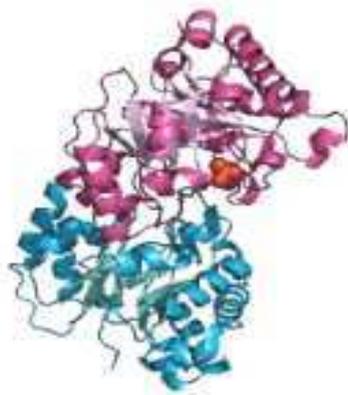
#### 1. Triosephosphate isomérase

Excepté en cas de contamination par Pb 12 µM, l'expression de la triosephosphate isomérase (TPI) semblait toujours modifiée en présence de plomb ou de zinc. Ainsi, les teneurs en TPI diminuaient significativement dans le protéome des cellules d'*Alexandrium catenella* exposées au Pb 6 µM et au Pb 18 µM, avec des taux de -4,0 et de -3,0 respectivement, qui ne témoignaient pas d'un effet de concentration de ce métal. En revanche, l'impact de la contamination par le zinc sur la TPI était de plus en plus fort en présence des concentrations croissantes de ce métal, la TPI finissant par disparaître en réponse à la contamination par Zn 18 µM. La contamination par le zinc avait un impact un peu plus important que la contamination par le plomb, puisque la TPI ne disparaissait jamais en réponse à la contamination par le plomb, ce qui n'était pas le cas en présence de zinc. Enfin, en présence de Pb 6 µM et de Zn 6 µM, la TPI était sous – exprimée (ou dégradée) de façon équivalente suggérant l'utilisation de cette protéine comme marqueur protéomique du stress occasionné par cette concentration métallique chez *Alexandrium catenella*.

La TPI est impliquée dans l'interconversion des aldoses et des cétooses (EC 5.3.1.1). La TPI est un dimère stable de deux sous – unités polypeptidiques composées d'environ 250 acides aminés, présent dans le cytosol cellulaire de la plupart des êtres vivants (Figure 88). La TPI catalyse très efficacement (Putman *et al.*, 1972), l'interconversion de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P) (Kosova *et al.*, 2011), au cours de la réaction :

**Reaction:** *D-glyceraldehyde 3-phosphate* = *glycerone phosphate*.

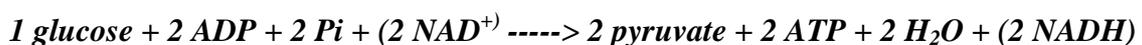




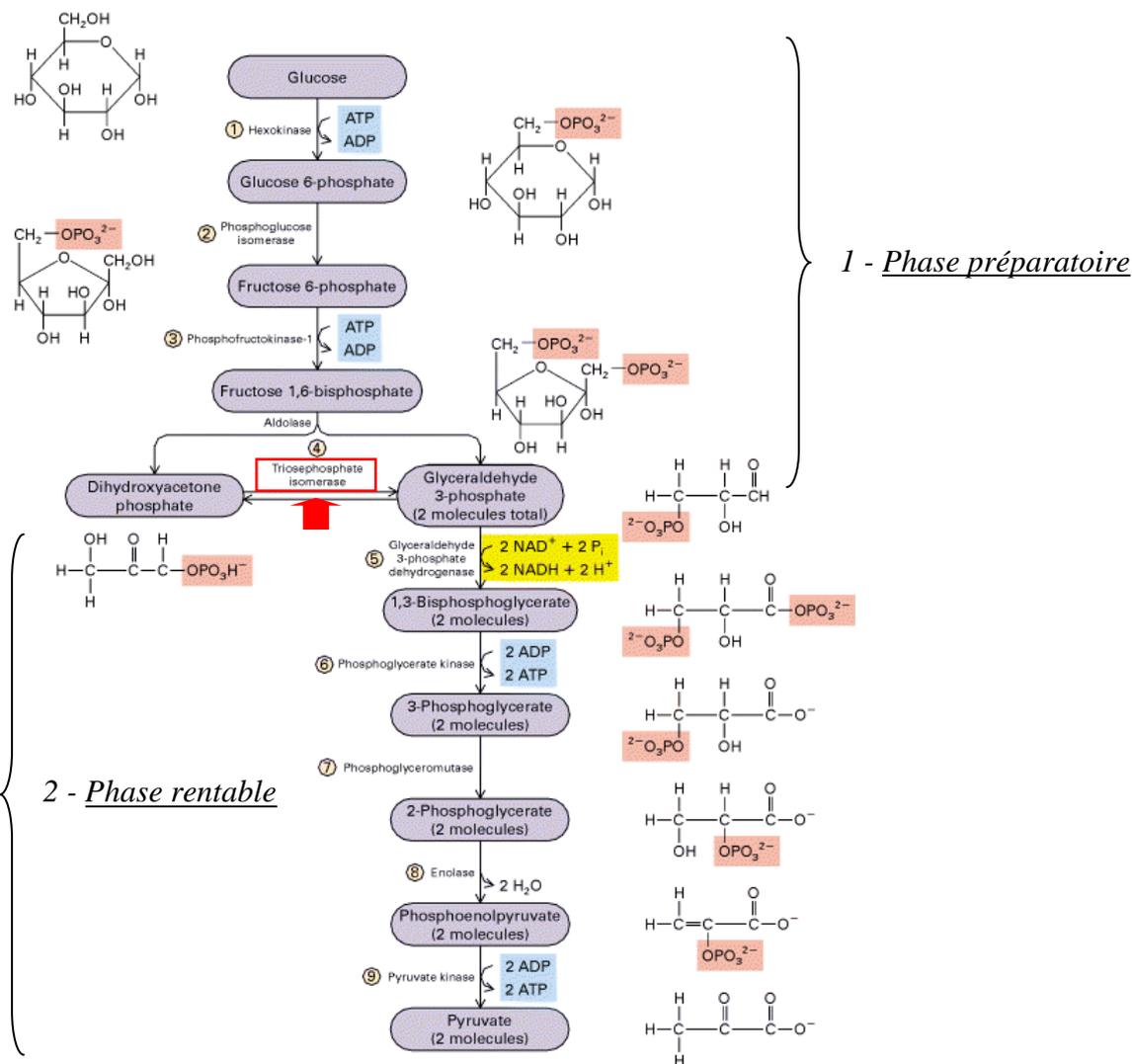
**Figure 88.** Structure tridimensionnelle de la triosephosphate isomérase (TPI) chez *Trypanosoma brucei* (Verlinde *et al.*, 1991) (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>)

La TPI participe à différentes voies métaboliques, dont le cycle de Calvin (photosynthèse) (Figure 85) et la glycolyse (Figure 89) (Ralser *et al.*, 2008). Dans le cycle de Calvin, la TPI catalyse la conversion du G3P en DHAP, au cours de la 3<sup>ème</sup> étape suivant la carboxylation du RuBP. Par conséquent, la réduction des teneurs en TPI observée en réponse au stress métallique confirme la perturbation de la photosynthèse, liée aux protéines RUBISCO, PCP et FNR, précédemment étudiées.

La glycolyse, également appelée voie d'Embden – Meyerhof – Parnas, est une voie d'assimilation du glucose qui se déroule dans le cytosol cellulaire. La glycolyse utilise le glucose comme substrat afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP, ainsi que du pyruvate disponible pour le cycle de Krebs. La réaction bilan de la glycolyse est :



La glycolyse est composée d'une série de dix réactions regroupées en deux phases successives : 1, une phase préparatoire (cinq réactions) qui consomme de l'énergie (2 ATP) au cours de laquelle la dégradation du glucose aboutit à deux trioses phosphates, 2, une phase rentable (cinq réactions) qui produit de l'énergie (4 ATP) ainsi que la forme réduite du coenzyme NAD<sup>+</sup> (2 NADH) (Figure 89). La TPI catalyse la 5<sup>ème</sup> étape de la phase préparatoire de la glycolyse, étape correspondant à l'isomérisation du DHAP en G3P (Ralser *et al.*, 2008).



**Figure 89.** Déroulement de la glycolyse. La protéine encadrée est sous – exprimée (voire dégradée) ou disparaît du protéome d'*Alexandrium catenella* en réponse à la contamination métallique

De façon similaire à ce qui est observé pour les cultures d'*Alexandrium catenella*, l'exposition des feuilles de Peuplier à du cadmium 20 µM conduisait à une diminution des quantités de TPI dans le protéome de cette espèce végétale (Kieffer *et al.*, 2008). Des résultats analogues étaient obtenus concernant des cellules de mammifères exposées à des extraits de sols contaminés par les métaux nickel, cadmium, plomb, fer et aluminium (Ben Fredj *et al.*, 2012). Toutefois, des concentrations en plomb autour de 100 µg L<sup>-1</sup> aboutissent à des résultats antagonistes chez l'huître *Saccostrea glomerata* (Thompson *et al.*, 2011, 2012), alors que chez certains poissons soumis à un stress chronique (*Sparus aurata*), la TPI est

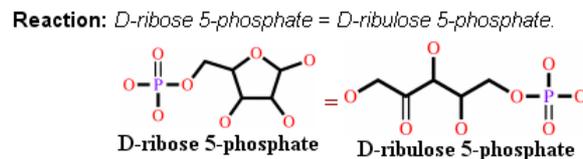
significativement sous – exprimée et proposée comme biomarqueur potentiel pour ce type de stress (Alves *et al.*, 2010).

L'activité catalytique réduite de la TPI pourrait conférer une résistance particulière au stress oxydatif chez les levures, et chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Ralser *et al.*, 2006, 2007). Les teneurs réduites de TPI mesurées en réponse au stress métallique dans le protéome d'*Alexandrium catenella* pourraient conférer à ce dinoflagellé une telle résistance. En réponse à un stress oxydant, *Saccharomyces cerevisiae* présente une diminution d'expression de plusieurs protéines impliquées dans la glycolyse, tandis qu'une augmentation d'expression des enzymes de la voie des pentoses phosphates est observée (Godon *et al.*, 1998). La glycolyse est en effet étroitement liée à la voie des pentoses phosphates, ces deux voies métaboliques utilisant le même substrat, le glucose 6-phosphate (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Metabo/pentosep.html>). Des résultats équivalents à ceux observés chez *S. cerevisiae* sont obtenus à partir de cellules épithéliales humaines soumises à des stress oxydants par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et NO (Le Goffe *et al.*, 2002). Une activité accrue des enzymes de la voie des pentoses phosphates conduirait à des taux élevés de NADPH, co-facteur requis par les principales enzymes anti – oxydantes (glutathion réductase) neutralisant les ROS formées en réponse au stress (Pollak *et al.*, 2007). Par conséquent, l'augmentation du flux de la voie des pentoses phosphates, conjuguée au ralentissement de la glycolyse, pourrait jouer un rôle crucial dans le système de protection cellulaire contre le stress oxydatif (Ralser *et al.*, 2007). Par ailleurs, le possible ralentissement de la glycolyse en réponse au stress métallique pourrait conduire à des teneurs plus importantes en glucose au niveau intracellulaire, et donc expliquer l'exsudation de cette biomolécule par *Alexandrium catenella* à de forts niveaux dans le milieu extracellulaire, comme cela a précédemment été mesuré et présenté (chapitre IV, section A, paragraphe V).

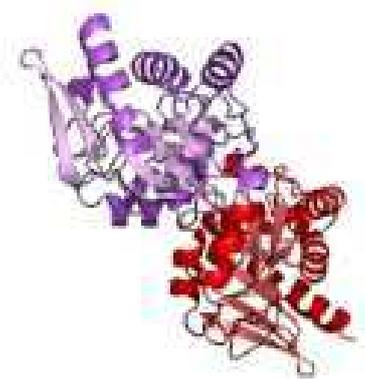
## 2. Ribose 5-phosphate isomérase

La ribose 5-phosphate isomérase (Rpi) n'est significativement affectée par les métaux testés (plomb, zinc), qu'en présence des plus fortes concentrations contaminantes. En effet, cette protéine ne disparaît du protéome d'*Alexandrium catenella* qu'en réponse aux contaminations par Pb 12  $\mu$ M et par Zn 18  $\mu$ M. Toutefois, à concentrations égales, la contamination par le plomb a un impact plus important que la contamination par le zinc sur la Rpi exprimée par *Alexandrium catenella*.

La Rpi (EC 5.3.1.6) catalyse l'interconversion (isomérisation et épimérisation) du ribose 5-phosphate (R5P, aldose) en ribulose 5-phosphate (Ru5P, cétose) (Zhang *et al.*, 2003), au cours de la réaction :



La Rpi est une enzyme intracellulaire ubiquiste existant sous deux formes distinctes, notées RpiA et RpiB (Zhang *et al.*, 2003) (Figure 90). Bien que ces deux formes catalysent la même réaction, la forme RpiA semble prédominer chez les eucaryotes (Stern *et al.*, 2007).



**Figure 90.** Structure tridimensionnelle de la ribose 5-phosphate isomérase (RpiA) chez *Escherichia coli* (Zhang *et al.*, 2003) (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>)

La Rpi a un rôle métabolique dans le cycle de Calvin (photosynthèse), où elle catalyse l'avant - dernière étape du cycle conduisant à la régénération finale du RuBP (Figure 85). La Rpi est également impliquée dans la voie des pentoses phosphates (Figure 91) (Zhang *et al.*, 2003). Cette voie, appelée voie de Warburg – Dickens - Horecker, se déroule dans le cytoplasme et utilise du glucose 6-phosphate, lequel est aussi substrat de la glycolyse. La voie des pentoses phosphates a plusieurs rôles : (i) elle conduit au co-facteur réduit NADPH impliqué dans la biosynthèse des acides gras et dans la réduction du glutathion à la base de la défense anti – oxydante (ii) elle produit du ribose 5-phosphate, précurseur des nucléotides présents dans les acides nucléiques (ADN, ARN), l'ATP et plusieurs coenzymes rédox (NADH, NADPH) (iii) elle aboutit à l'érythrose 4-phosphate, précurseur des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane). Dans le contexte de l'étude, les fonctions ci – dessus pourraient être perturbées par la déplétion de Rpi enregistrée en réponse au stress métallique chez *Alexandrium catenella*.

La voie des pentoses phosphates comprend deux phases successives (Figure 91) : la 1<sup>ère</sup> phase, dite oxydative, est irréversible, tandis que la 2<sup>ème</sup> phase, dite non oxydative, est réversible (Kruger et Schaewen, 2003). La 1<sup>ère</sup> phase oxydative génère du NADPH et du Ru5P à partir du glucose 6-phosphate. La 2<sup>ème</sup> phase non oxydative débute par l'interconversion du Ru5P en R5P, réaction alors catalysée par la Rpi, conduisant à la formation de trois carbohydrates distincts : le fructose 6-phosphate, le glycéraldéhyde 3-phosphate et l'érythrose 4-phosphate (Figure 91).



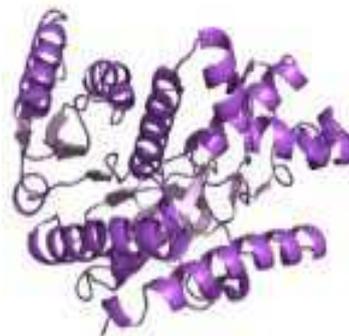
La contamination par le cadmium 150  $\mu\text{M}$  conduit à une diminution de 1,9 fois du taux de Rpi chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* (Gillet *et al.*, 2006). Des résultats similaires sont obtenus en réponse à une contamination par du cadmium 20  $\mu\text{M}$  chez le Peuplier (Kieffer *et al.*, 2008). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour la Rpi exprimée par *Alexandrium catenella*, puisque la Rpi n'apparaît plus dans le protéome de ce dinoflagellé lorsque celui – ci est exposé à Pb 12  $\mu\text{M}$  et à Zn 18  $\mu\text{M}$ . La comparaison de ces résultats suggère un impact plus important de ces concentrations en plomb et en zinc sur *A. catenella*, que des concentrations 150  $\mu\text{M}$  et 20  $\mu\text{M}$  de cadmium sur *C. reinhardtii* et sur le protéome du Peuplier, respectivement. Chez les organismes photosynthétiques, le stress métallique modifie les teneurs en Rpi ce qui perturbe la régénération du RuBP (cycle de Calvin), et donc la photosynthèse, confirmant ce qui était postulé précédemment chez *Alexandrium catenella*, concernant la sous – expression ou la dégradation des protéines photosynthétiques RUBISCO, PCP, FNR et TPI.

Les métaux pourraient également interférer avec la voie des pentoses phosphates, en se substituant à l'action co – enzymatique de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$ , cations requis tout au long de cette voie métabolique (Figure 91). Les réactions d'isomérisation aldose – cétose reposent sur deux mécanismes possibles : soit un déplacement hybride de proton, soit un transfert de proton *via* un intermédiaire 1,2-cis-enediol (Nagorski et Richard, 2001). Lors du 1<sup>er</sup> mécanisme, les enzymes catalysant la réaction d'isomérisation nécessitent la présence d'un métal agissant comme centre électrophile (Zheng *et al.*, 1993). Certaines études ont formulé l'hypothèse selon laquelle la Rpi pourrait appartenir à ces enzymes (Stern *et al.*, 2007). Afin de valider ce postulat, ces études ont mesuré l'activité de la RpiB en présence des métaux cadmium, magnésium et zinc, chez *Trypanosoma cruzi*. Toutefois, chez ce procaryote, l'activité de la RpiB n'est pas affectée par les métaux testés, montrant que cette enzyme agit sur son substrat indépendamment de la contamination métallique (Stern *et al.*, 2007).

### 3. Malate déshydrogénase

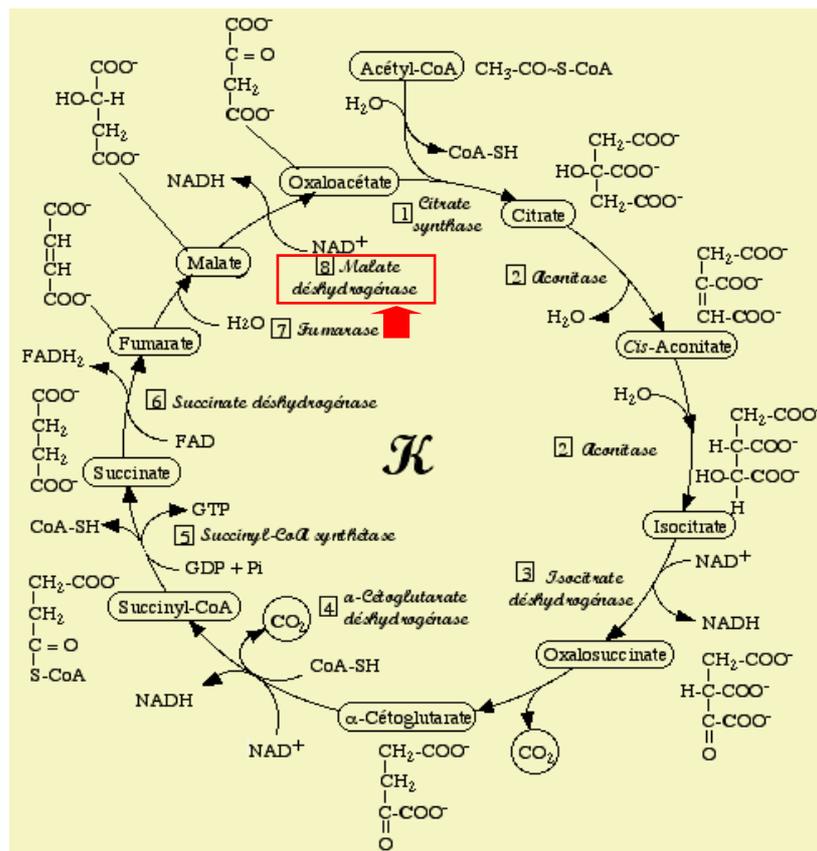
La malate déshydrogénase (MDH) est toujours affectée par la contamination au plomb, ses teneurs étant significativement plus faibles jusqu'à -7,3 fois (spot 7) en réponse à la contamination par Pb 6  $\mu\text{M}$  par rapport au protéome témoin ; et cette protéine disparaissant du protéome contaminé (spots 10 et 19) pour les concentrations supérieures en plomb (Pb 12  $\mu\text{M}$ , Pb 18  $\mu\text{M}$ ). L'impact du zinc sur la MDH semble toutefois moins fort que celui du plomb concernant certaines protéines, telles que celle associée au spot 7, dont l'expression n'est pas significativement modifiée en présence de Zn 6  $\mu\text{M}$ , et celle associée au spot 19, qui ne disparaît pas du protéome en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$ . Toutefois, l'impact néfaste du zinc est relevé pour la MDH associée au spot 10, lequel disparaît en réponse aux contaminations les plus importantes (Zn 12  $\mu\text{M}$ , Zn 18  $\mu\text{M}$ ). Cette protéine disparaît à la fois en présence de Pb 12  $\mu\text{M}$  et de Zn 12  $\mu\text{M}$ , indiquant que la MDH pourrait être un marqueur protéomique du stress occasionné par certaines concentrations contaminantes de plomb et de zinc chez *Alexandrium catenella*.

La MDH est une petite protéine de 62 kDa présente dans la matrice mitochondriale des cellules eucaryotes (Figure 92). La MDH (EC 1.1.1.37) est une oxydo – réductase catalysant la conversion du malate en oxaloacétate (Zhou *et al.*, 2009). Cette réaction de conversion s'accompagne de la réduction du coenzyme  $\text{NAD}^+$  en NADH, selon la réaction :



**Figure 92.** Structure tridimensionnelle de la malate déshydrogénase (MDH) chez *Aquaspirillum arcticum* (Kim *et al.*, 1999) (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>)

La MDH est impliquée dans le cycle de Krebs, appelé cycle des acides tricarboxyliques ou cycle du citrate (Figure 93) (Oh *et al.*, 2002, Silvestre *et al.*, 2006, Zhou *et al.*, 2009, Sukalovic *et al.*, 2011). Ce cycle comprend dix étapes qui se déroulent dans les mitochondries des cellules eucaryotes, sous l'action catalytique de huit enzymes différentes. La MDH catalyse la 10<sup>ème</sup> et dernière étape du cycle (Figure 93). Le cycle de Krebs succède à la glycolyse, et finalise le métabolisme des carbohydrates en produisant de l'énergie sous forme d'ATP. Pour cela, le pyruvate formé grâce à la glycolyse est converti en acétyl pris en charge par le coenzyme A (CoA-SH) pour donner de l'acétyl-CoA. Puis, l'acétyl subit une série de réactions produisant CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, ainsi que de l'énergie sous forme de divers coenzymes réduits (NADH, FADH<sub>2</sub> et CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>). Ces coenzymes réduits contiennent une partie de l'énergie initiale des carbohydrates métabolisés, énergie restituée sous forme d'ATP au cours de la phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire mitochondriale.



**Figure 93.** Cycle de Krebs, également appelé cycle des acides tricarboxyliques ou cycle du citrate (<http://www.snv.jussieu.fr>). La protéine encadrée est sous – exprimée (voire dégradée) ou disparaît du protéome d'*Alexandrium catenella* en réponse à la contamination métallique

Les résultats ici présentés concernant la réduction des teneurs en MDH par *Alexandrium catenella*, pourraient confirmer l'effet néfaste des métaux sur la déperdition énergétique liée à une diminution du stock d'ATP, diminution précédemment évoquée et associée à la perturbation d'expression de nombreuses protéines impliquées dans la photosynthèse. Ce processus pourrait être compensé par la sur – expression de l'ATP – synthase pour produire davantage d'ATP. D'après certains auteurs, la MDH pourrait tenir un rôle dans la régulation du stress résultant de la contamination métallique (Sukalovic *et al.*, 2011). Par ailleurs, la MDH pourrait protéger les cellules d'*Escherichia coli* des dommages induits par le stress oxydatif (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radiations  $\gamma$ ) (Oh *et al.*, 2012). Ainsi, plusieurs études mentionnent une accumulation de malate, substrat de la MDH, chez diverses plantes exposées à l'aluminium (Pellet *et al.*, 1995, Larsen *et al.*, 1998). Toutefois, l'activité de la MDH est inhibée dans des racines de maïs exposées à des concentrations millimolaires de cuivre et de zinc (Sukalovic *et al.*, 2011), et dans des plants de riz contaminés par du cadmium 2,5 ppm (Shah et Dubey, 1995). De la même façon, la MDH est sous – exprimée, dans les racines de plants de tomate en réponse à la contamination de celles – ci par l'aluminium 20  $\mu$ M (Zhou *et al.*, 2009), et chez le crabe *Eriocheir sinensis* en réponse à la contamination par le cadmium 500  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (Silvestre *et al.*, 2006). Ces travaux sont donc en accord avec les résultats de la présente étude.

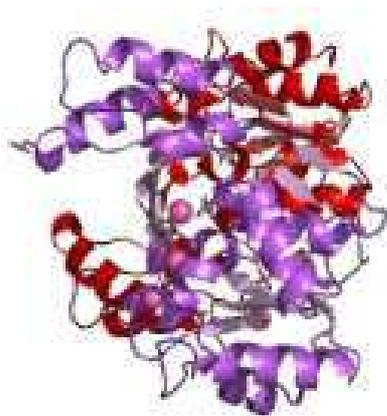
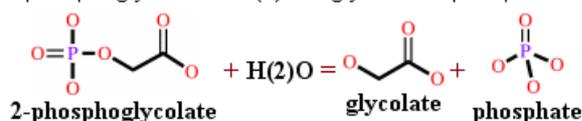
Par ailleurs, certains travaux montrent que des plantes tolérantes à l'aluminium exposées à ce métal, sécrètent des anions organiques acides tels que le malate, l'oxalate ou le citrate, afin de chélater, et donc d'immobiliser, les ions Al<sup>3+</sup> à la surface de leurs racines, et ainsi d'empêcher l'entrée du métal dans leur appareil végétatif *via* le système racinaire (Kobayashi *et al.*, 2005, 2007, Zhou *et al.*, 2009). La diminution des taux de MDH ici enregistrée pourrait ainsi induire une accumulation de malate capable de chélater les ions Pb<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup>, ce qui permettrait l'immobilisation de ces ions métalliques et pourrait diminuer leur toxicité.

## IV. PROTÉINE IMPLIQUÉE DANS LA PHOTORESPIRATION ET LE MÉTABOLISME DU PHOSPHORE

La phosphoglycolate phosphatase (PGP) est sur - exprimée par *Alexandrium catenella*, à des taux très élevés (> +16,0), en présence des fortes concentrations contaminantes de plomb (12  $\mu\text{M}$  et 18  $\mu\text{M}$ ) testées. Aucune modification d'expression de la PGP n'est observée dans le cas de la contamination par le zinc, quelle que soit sa concentration, suggérant que, contrairement au zinc, le plomb pourrait avoir un impact spécifique sur le protéome d'*Alexandrium catenella*.

La PGP (Figure 94) est une hydrolase spécifique des liaisons monoesterphosphoriques (EC 3.1.3.18). Elle catalyse l'hydrolyse du 2-phosphoglycolate, en 2-glycolate et orthophosphate (Lyngstadaas *et al.*, 1995), au cours de la réaction :

**Reaction:** 2-phosphoglycolate + H<sub>2</sub>O = glycolate + phosphate.

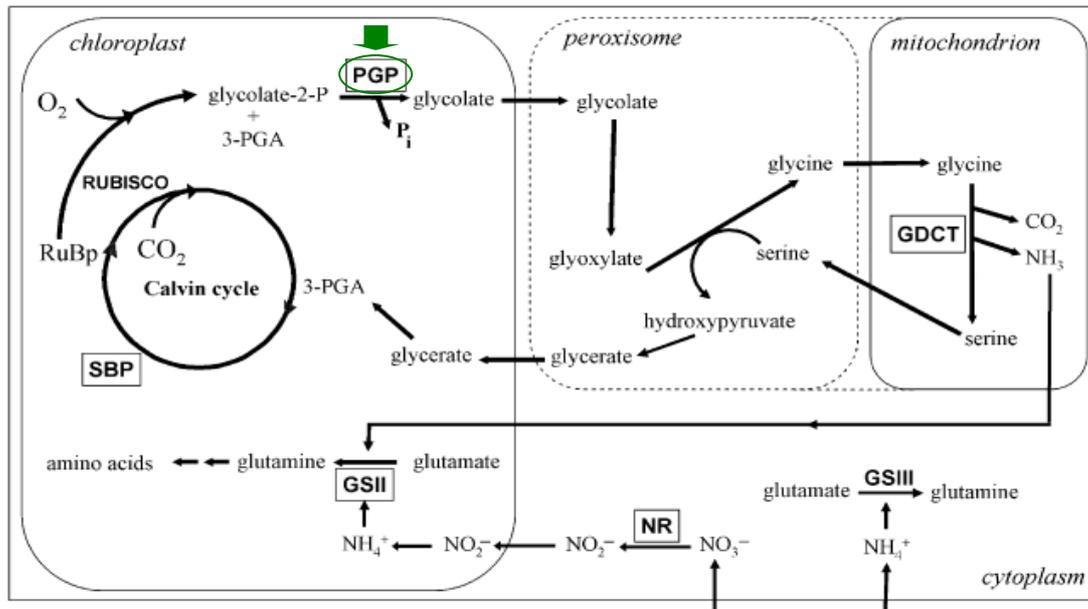


**Figure 94.** Structure tridimensionnelle de la phosphoglycolate phosphatase (PGP) chez *Thermoplasma acidophilum* (Kim *et al.*, 2003) (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>)

Plus précisément, la PGP est une enzyme impliquée dans la photorespiration des organismes photosynthétiques, qui se déroule dans les chloroplastes, les peroxysomes et les mitochondries (Figure 95). Sa sur - expression par *Alexandrium catenella* exposée à des concentrations contaminantes de plomb suggère une activation de la voie photorespiratoire chez cette espèce phytoplanctonique. Il est généralement admis que les cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$ ,

Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ou Co<sup>2+</sup>, activent le rôle catalytique de la PGP pendant la photorespiration (Kim *et al.*, 2004). Ces cations se fixent sur un site de liaison spécifique de l'enzyme, proche de son site catalytique (Stieger et Feller, 1997). Une fois fixés sur le substrat 2-phosphoglycolate, les cations polarisent la liaison phosphore – oxygène de cette molécule, augmentant le caractère électrophile de l'atome de phosphore, ce qui facilite l'attaque nucléophile de la liaison phosphore – oxygène par la molécule d'eau (Kim *et al.*, 2004). Dans cette étude, les cations Pb<sup>2+</sup> pourraient donc, au même titre que les cations sus – cités, activer le rôle catalytique photorespiratoire de la PGP, de plus sur - exprimée par *Alexandrium catenella*.

La photorespiration et la photosynthèse sont deux processus métaboliques essentiels, étroitement liés par l'activité de l'enzyme ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RUBISCO) sur le substrat ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) (Figure 95). En effet, la RUBISCO catalyse soit la carboxylation du RuBP (fixation de CO<sub>2</sub>) pendant la 2<sup>ème</sup> étape de la photosynthèse, soit son oxygénation (fixation d'O<sub>2</sub>) pendant la 1<sup>ère</sup> étape de la photorespiration (Reumann et Weber, 2006). Au niveau des chloroplastes, l'oxygénation photorespiratoire du RuBP conduit au 3-phosphoglycérate et au 2-phosphoglycolate. Le 3-phosphoglycérate obtenu est recyclé en RuBP pendant la 2<sup>ème</sup> étape de la photosynthèse (cycle de Calvin), tandis que le 2-phosphoglycolate ne peut servir d'intermédiaire photosynthétique. En revanche, grâce à l'activité catalytique de la PGP, le 2-phosphoglycolate est déphosphorylé en 2-glycolate et phosphate. Puis, 75% du 2-glycolate est recyclé en 3-phosphoglycérate qui est intégré dans le cycle de Calvin (Reumann et Weber, 2006). Ainsi, la déphosphorylation du 2-phosphoglycolate par la PGP présente deux avantages (i) elle évite l'accumulation du 2-phosphoglycolate à l'intérieur des chloroplastes, laquelle pourrait induire l'inhibition de l'enzyme triosephosphate isomérase impliquée dans la glycolyse (Mamedov *et al.*, 2001) (ii) elle permet au 2-phosphoglycolate d'être recyclé, *in fine*, en substrat RuBP, lequel est ainsi disponible en tant que substrat de la photosynthèse (Kim *et al.*, 2004).



**Figure 95.** Photorespiration, cycle de Calvin, et voie d'assimilation de l'azote, chez la diatomée *Thalassiosira pseudonana* (Parker et Armbrust, 2005). La protéine entourée est sur – exprimée par *Alexandrium catenella* en réponse à la contamination métallique. RuBP : ribulose 1,5-bisphosphate ; 3-PGA : 3-phosphoglycérate ; Pi : orthophosphate ; PGP : phosphoglycolate phosphatase ; GDCT : glycine décarboxylase T-protéine ; GSII : glutamine synthétase II ; NR : nitrate réductase ; GSIII : glutamine synthétase III

Contrairement à la photosynthèse, la photorespiration aboutit à la libération de  $\text{CO}_2$  et  $\text{NH}_3$ , en consommant du RuBP et de l'énergie sous forme d'ATP, tout en induisant une réduction de la fixation du carbone atteignant jusqu'à 50% (Bah *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2012). Certains travaux rapportent un manque de carbohydrates disponibles pour le métabolisme cellulaire, ainsi qu'un phénomène de sénescence cellulaire, comme conséquences néfastes d'une activité photorespiratoire intense (Wingler *et al.*, 2000). Par conséquent, la photorespiration pourrait être considérée comme un processus contre – productif pour les organismes photosynthétiques, notamment pour les cellules d'*Alexandrium catenella* stressées par le plomb, sur – exprimant la PGP impliquée dans la photorespiration.

Toutefois, certains auteurs soulignent qu'en raison de la consommation d' $\text{O}_2$  et d'énergie qu'elle occasionne, la photorespiration pourrait jouer un rôle primordial dans la protection des organismes photosynthétiques contre le stress photooxydatif (Wingler *et al.*, 2000). De plus, la photorespiration, *via* le  $\text{CO}_2$  et le  $\text{NH}_3$  qu'elle produit, fournirait des molécules directement assimilables pour les voies métaboliques du carbone et de l'azote (Parker et Ambrust, 2005). Ainsi, des études menées sur des mutants déficients en PGP, ont

révélé une interruption de croissance chez les plantes *Arabidopsis thaliana* (Somerville et Ogren, 1979) et *Hordeum vulgare* (Hall *et al.*, 1987), et chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* (Suzuki *et al.*, 1990). Cette interruption de croissance serait due à une accumulation de 2-phosphoglycolate à l'intérieur des chloroplastes, laquelle inhiberait l'activité de la triosephosphate isomérase impliquée dans la glycolyse (Mamedov *et al.*, 2001).

En outre, la photorespiration permettrait la dissipation de l'excès d'énergie chez tous les eucaryotes photosynthétiques exposés à de fortes intensités lumineuses (Wingler *et al.*, 2000 ; Parker *et al.*, 2004). La fixation, par la RUBISCO, d'O<sub>2</sub> plutôt que de CO<sub>2</sub>, donc la voie photorespiratoire plutôt que la voie photosynthétique, serait favorisée (i) lorsque l'apport énergétique dépasse la capacité de la voie photosynthétique à absorber l'excès d'énergie (ii) quand la teneur en CO<sub>2</sub> disponible est inférieure à la teneur en O<sub>2</sub> disponible. La photorespiration pourrait alors être utilisée par des organismes photosynthétiques stressés, comme un puits d'énergie évitant l'hyper – réduction de la chaîne photosynthétique de transport d'électrons (Wingler *et al.*, 2000). Plusieurs études mentionnent que des stress abiotiques peuvent conduire à une activation de la voie photorespiratoire *via* la sur – expression de la PGP. Ainsi, suite à un stress hydrique, la PGP est sur – exprimée dans les feuilles du Peuplier (*Populus americana*) (Bonhomme *et al.*, 2009). La photorespiration est en effet connue pour son action protectrice de l'appareil photosynthétique vis-à-vis de la photoinhibition (Osmond et Grace, 1995 ; Park *et al.*, 1996). De façon similaire, la plante *Puccinellia tenuiflora* développe une tolérance à la salinité grâce à l'augmentation de son taux photorespiratoire (Yu *et al.*, 2011). Le stress oxydatif généré par les cyclopentenone – oxylipines induit aussi la sur – expression de la PGP chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Duckershoff *et al.*, 2008). Enfin, la photorespiration produit certains métabolites tels que l'acide aminé glycine qui peut être utilisé dans la synthèse du glutathion impliqué dans la défense contre le stress oxydatif des cellules (Noctor et Foyer, 1998 ; Noctor *et al.*, 1999). De la même façon, la sur – expression de la PGP par *Alexandrium catenella* pourrait indirectement protéger les cellules du stress oxydatif occasionné par la contamination due au plomb, en éliminant l'excès d'énergie lié au stress.

Par ailleurs, le stress métallique dû à la contamination par le plomb pourrait stimuler le métabolisme du phosphore, puisque la PGP sur – exprimée serait capable d'agir sur des quantités plus importantes de 2-phosphoglycolate, produisant ainsi plus d'orthophosphates disponibles pour le cycle du phosphore. Cette hypothèse pourrait être validée par des travaux

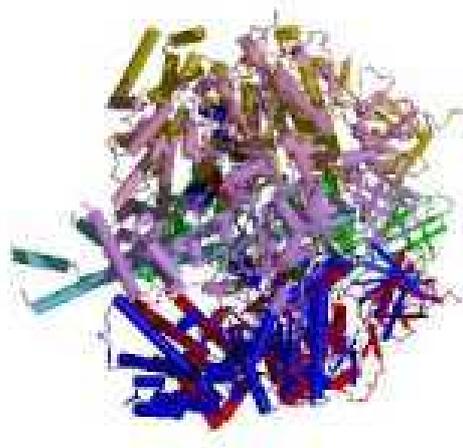
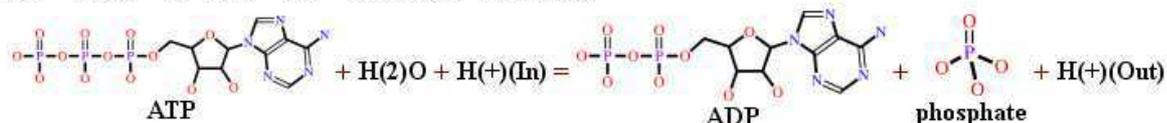
précédents, mentionnant qu'une autre phosphatase, la pyrophosphatase, catalysant l'hydrolyse du pyrophosphate en orthophosphate, est présente en plus fortes concentrations suite à l'exposition de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* à 150  $\mu\text{M}$  de cadmium (Gillet *et al.*, 2006). Certains auteurs ont d'ailleurs évoqué l'existence d'un couplage entre la détoxification des métaux et le métabolisme du phosphore, *via* un phénomène de vacuolisation cellulaire (Nishikawa *et al.*, 2003). Leurs travaux ont mis en évidence une diminution des teneurs en polyphosphates liée à une augmentation des teneurs en orthophosphates, à l'intérieur des vacuoles de la microalgue *Chlamydomonas acidophila* exposée pendant trois jours au cadmium 20  $\mu\text{M}$ . Les orthophosphates combinés au cadmium à l'intérieur des vacuoles, seraient alors indisponibles sous la forme d'orthophosphates cytoplasmiques, assurant aux cellules de *C. acidophila* une détoxification par séquestration vacuolaire (Nishikawa *et al.*, 2003). Une telle stratégie de détoxification pourrait être utilisée par *Alexandrium catenella*, grâce à l'activité d'une PGP sur - exprimée en présence de plomb, et donc à des teneurs plus importantes en orthophosphates.

## V. PROTÉINE IMPLIQUÉE DANS LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE

L'impact de la contamination par le plomb à forte concentration (12  $\mu\text{M}$ ) se traduit par la sur - expression à un taux particulièrement élevé ( $> +16,0$ ) de la sous - unité  $\beta$  de l'ATP - synthase chez *Alexandrium catenella*. Comme pour la phosphoglycolate phosphatase, cette sur - expression n'est jamais observée dans le cas de la contamination par le zinc, quelle que soit sa concentration, indiquant que le plomb a un impact spécifique sur l'expression de la sous - unité  $\beta$  l'ATP - synthase par *Alexandrium catenella*.

L'ATP - synthase (Figure 96), complexe protéique de masse moléculaire élevée (400 kDa) (Kang *et al.*, 2012), agit comme hydrolase des anhydrides d'acide phosphorique (EC 3.6.3.14). L'ATP - synthase réalise la synthèse d'ATP, à partir d'ADP et d'orthophosphate. L'ATP est à la base du métabolisme énergétique des êtres vivants, son hydrolyse en présence d'ATP - synthase apportant l'énergie indispensable au fonctionnement de toutes les cellules. Cette hydrolyse produit de l'ADP et de l'orthophosphate, au cours de la réaction :

**Reaction:**  $Atp + H(2)O + H(+)(In) = adp + phosphate + H(+)(Out)$ .

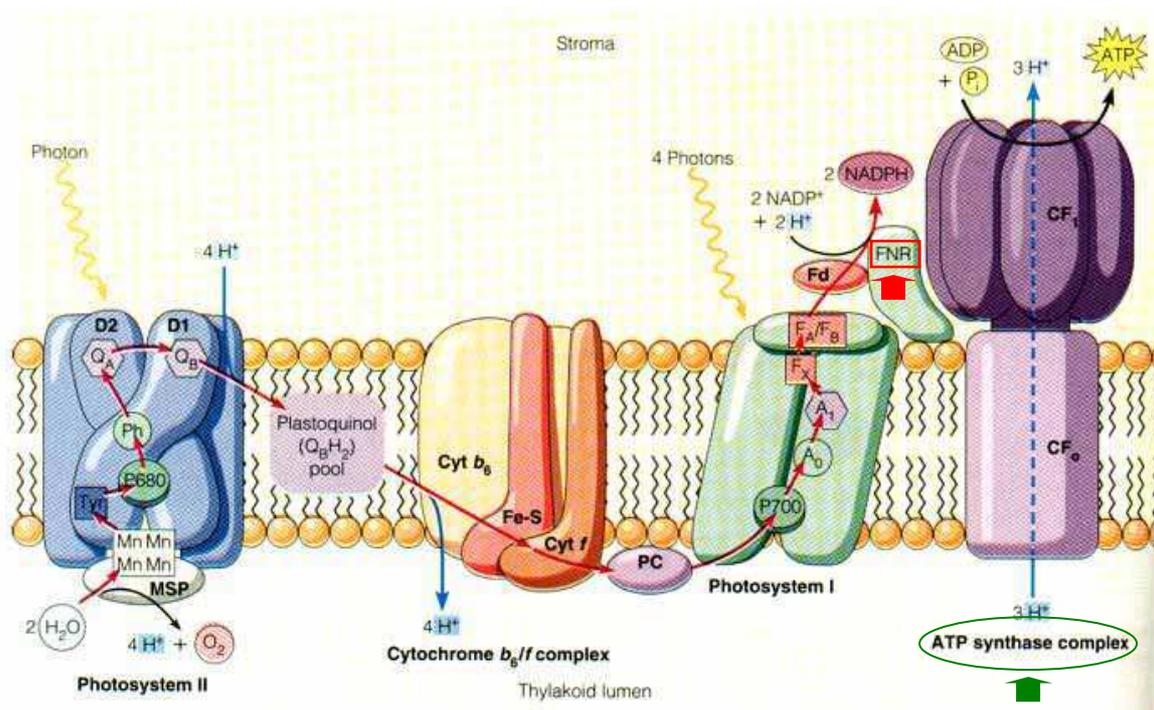


**Figure 96.** Structure tridimensionnelle de l'ATP - synthase chez *Bos taurus* (Abrahams *et al.*, 1994) (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>)

En outre, l'ATP – synthase est impliquée dans plusieurs autres fonctions métaboliques. Elle peut agir comme peptidase éliminant les protéines anormales ou endommagées, mais aussi comme chaperonne protégeant et réparant les protéines ayant un rôle clé dans le métabolisme cellulaire (Suzuki *et al.*, 1997). Dans le contexte de l'étude, ces fonctions particulières pourraient s'appliquer aux cellules d'*Alexandrium catenella* exposées au plomb, la sous – unité  $\beta$  de l'ATP – synthase alors sur – exprimée, permettant d'éliminer, ou de réparer, les protéines endommagées par le stress métallique.

L'ATP - synthase est localisée dans les membranes des crêtes mitochondriales, ainsi que dans les membranes thylakoïdiennes chloroplastiques des organismes photosynthétiques. Elle est composée de deux parties (Figure 97) : une partie polaire, notée  $F_0$ , enchâssée dans la membrane, et une partie globulaire, notée  $F_1$ , au contact soit de la matrice mitochondriale, soit du stroma des organismes photosynthétiques (Kang *et al.*, 2012). La partie  $F_1$ , appelée « *stator* », comprend trois sous - unités  $\beta$  directement impliquées dans la synthèse d'ATP, mais également trois sous - unités  $\alpha$ , structurales, ainsi que des sous - unités  $\epsilon$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . La partie  $F_0$ , appelée « *rotor* », constituée de sous - unités  $c$ ,  $\gamma$  et  $\epsilon$ , est mobile dans le plan de la membrane, autour d'un axe constitué de certaines sous - unités  $F_1$ .

Afin de fonctionner, l'ATP – synthase nécessite un gradient protonique de part et d'autre d'une membrane (Von Ballmoos et Dimroth, 2007), d'où la nécessité pour cette enzyme d'y être enchâssée, que la membrane soit mitochondriale ou thylakoïdienne. Dans les mitochondries, l'ATP – synthase est impliquée dans la synthèse d'ATP pendant la respiration cellulaire, lors de la dernière étape de celle - ci, étape de phosphorylation oxydative. Pendant la phosphorylation oxydative, des réactions rédox se produisent au niveau d'une chaîne respiratoire mitochondriale, laquelle est composée d'une série de complexes protéiques. Les réactions rédox de la phosphorylation oxydative impliquent une circulation d'électrons le long de la chaîne respiratoire, ce qui a pour conséquence une libération d'énergie. L'énergie libérée génère le gradient protonique, de part et d'autre de la membrane, gradient indispensable à la synthèse d'ATP. Puis, les protons du gradient traversent le complexe de l'ATP – synthase, ce qui induit la rotation de la partie « *rotor* » F<sub>o</sub>. Cette rotation provoque un changement de conformation de la partie « *stator* » F<sub>1</sub>, laquelle permet la phosphorylation de l'ADP en ATP, en présence d'orthophosphate. Dans les chloroplastes, l'ATP - synthase est impliquée dans la synthèse photosynthétique d'ATP, pendant les réactions claires de celle- ci. Le gradient protonique est alors créé grâce à une chaîne photosynthétique, puis la synthèse d'ATP, appelée photophosphorylation, se déroule dans le stroma sur la base de ce gradient protonique. L'ATP – synthase est donc une enzyme clé des phosphorylations respiratoires et photosynthétiques, lesquelles représentent deux voies indispensables au fonctionnement du métabolisme énergétique des organismes photosynthétiques auxquels appartient *Alexandrium catenella*.



**Figure 97.** Structure et fonctionnement de l'ATP - synthase dans la membrane thylakoïdienne, lors de la photophosphorylation (Winona State University website). La protéine entourée est sur - exprimée ; la protéine encadrée est sous - exprimée (voire dégradée) ou disparaît dans le protéome d'*Alexandrium catenella* en réponse à la contamination métallique

Certains travaux montrent que l'exposition des feuilles de *Typha angustifolia* à des concentrations millimolaires de chrome induit la sur - expression de l'ATP - synthase à des taux dépassant +1,5 (Bah *et al.*, 2010). De façon similaire, la cyanobactérie *Anabaena* sp. PCC712 réagit à la contamination par l'arsenic (à partir du 15<sup>ème</sup> jour de contamination), en sur - exprimant l'ATP - synthase en vue d'accroître la synthèse d'ATP (Pandey *et al.*, 2012). En présence d'arsenic, l'ATP - synthase est aussi sur - exprimée par les frondes de la fougère *Pteris vittata* (Bona *et al.*, 2010). D'autres métaux tels que le mercure ou le cadmium, induisent aussi une réponse protéomique adaptative visant à augmenter les quantités d'ATP - synthase chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*, et chez certains lichens (Gillet *et al.*, 2006 ; Nicolardi *et al.*, 2012). De façon générale, cette réponse protéomique adaptative instaurée par les organismes photosynthétiques, leur permettrait (i) de soutenir une activité photosynthétique généralement perturbée par le stress métallique, ainsi que l'atteste la perturbation par l'arsenic, de la chaîne photosynthétique de transport d'électrons chez *P. vittata* (Bona *et al.*, 2010) (ii) de répondre à des besoins énergétiques plus importants afin de résister au stress métallique (Kosova *et al.*, 2011). Le surplus d'énergie provenant d'une

hydrolyse activée de l'ATP pourrait aussi rendre plus productif le transport actif des cations métalliques contaminants hors de la cellule par l'ATP – synthase (Gillet *et al.*, 2006). Dans ces conditions, la sur – expression de l'ATP – synthase pourrait représenter une stratégie de détoxification, utilisée par une variété d'organismes dont *Alexandrium catenella*, pour lutter contre le stress métallique.

Le stress métallique peut aussi induire l'augmentation des niveaux d'ATP - synthase chez des organismes non photosynthétiques, comme cela est montré en présence d'arsenic, chez le cilié *Tetrahymena pyriformis* et chez la bactérie *Klebsiella pneumoniae* (Daware *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2012) ; en présence de chrome, chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Kiliç *et al.*, 2010) ; en présence de cadmium, chez le bivalve *Perna viridis* (Leung *et al.*, 2011) ; ou en présence de cuivre, chez le poisson *Oncorhynchus mykiss* (Eyckmans *et al.*, 2012).

Par ailleurs, certains auteurs rapportent l'augmentation synchrone des teneurs en ATP – synthase, et en enzyme pyrophosphatase impliquée dans l'hydrolyse du pyrophosphate en orthophosphate, chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* exposée à 150  $\mu\text{M}$  de cadmium (Gillet *et al.*, 2006). Des résultats comparables sont obtenus dans la présente étude, la contamination par Pb 12  $\mu\text{M}$ , voire celle par Pb 18  $\mu\text{M}$ , induisant aussi l'augmentation conjointe des teneurs en sous – unité  $\beta$  de l'ATP – synthase et en phosphoglycolate phosphatase chez *Alexandrium catenella*. Ces résultats suggèrent l'action conjuguée de ces deux enzymes, l'activité de la PGP conduisant à des orthophosphates disponibles pour la synthèse d'ATP en présence d'ATP – synthase. Ainsi, des teneurs accrues en PGP pourraient conduire à des quantités plus importantes d'orthophosphates, qui permettraient à de fortes teneurs en ATP – synthase de produire plus d'ATP disponible pour le métabolisme énergétique.

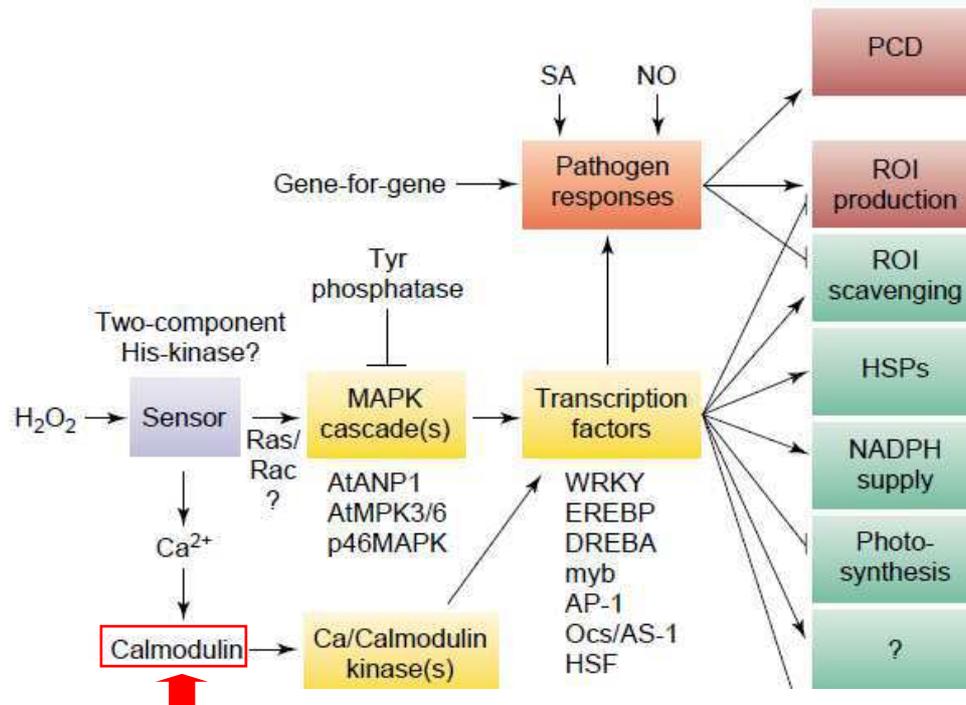
## VI. PROTÉINE IMPLIQUÉE DANS LE SIGNAL CELLULAIRE ET L'ACTIVATION DES PROTÉINES KINASES

L'ion  $\text{Ca}^{2+}$  contribue à la régulation du métabolisme cellulaire, *via* le contrôle qu'il exerce sur l'activité biologique de nombreuses protéines. Afin d'accomplir cette fonction de régulation, il peut s'associer à la CaM, protéine ubiquiste, soluble, de bas poids moléculaire (17 kDa), constituée d'une chaîne polypeptidique de 148 acides aminés. Pour cela, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  forment avec la CaM, un complexe calcium – calmoduline ( $\text{Ca}^{2+}$  - CaM) (Means et Dedman, 1980, Stefan *et al.*, 2008). La CaM ainsi liée au  $\text{Ca}^{2+}$ , agit comme modulateur de l'activité biologique de plusieurs protéines, ce qui explique le nom de calmoduline qui lui a été attribué.

Dans le protéome d'*Alexandrium catenella*, la calmoduline (CaM) (spot 26) était de moins en moins présente lorsque les concentrations contaminantes de zinc augmentaient, pour finalement disparaître du protéome en réponse à la plus forte concentration de zinc testée. Ainsi, les quantités de CaM étaient 21,8 fois plus faibles que dans le protéome témoin, en cas d'exposition des cellules d'*Alexandrium catenella* à Zn 12  $\mu\text{M}$ . Par ailleurs, la contamination par le zinc avait un impact plus important que la contamination par le plomb sur la CaM. En effet, la sous – expression de la CaM n'était pas significative en présence de plomb, quelle que soit sa concentration, tandis que cette sous - expression était significative en présence de Zn 12  $\mu\text{M}$ , à un taux très élevé (-21,8), l'expression de cette protéine étant ensuite complètement inhibée en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$ .

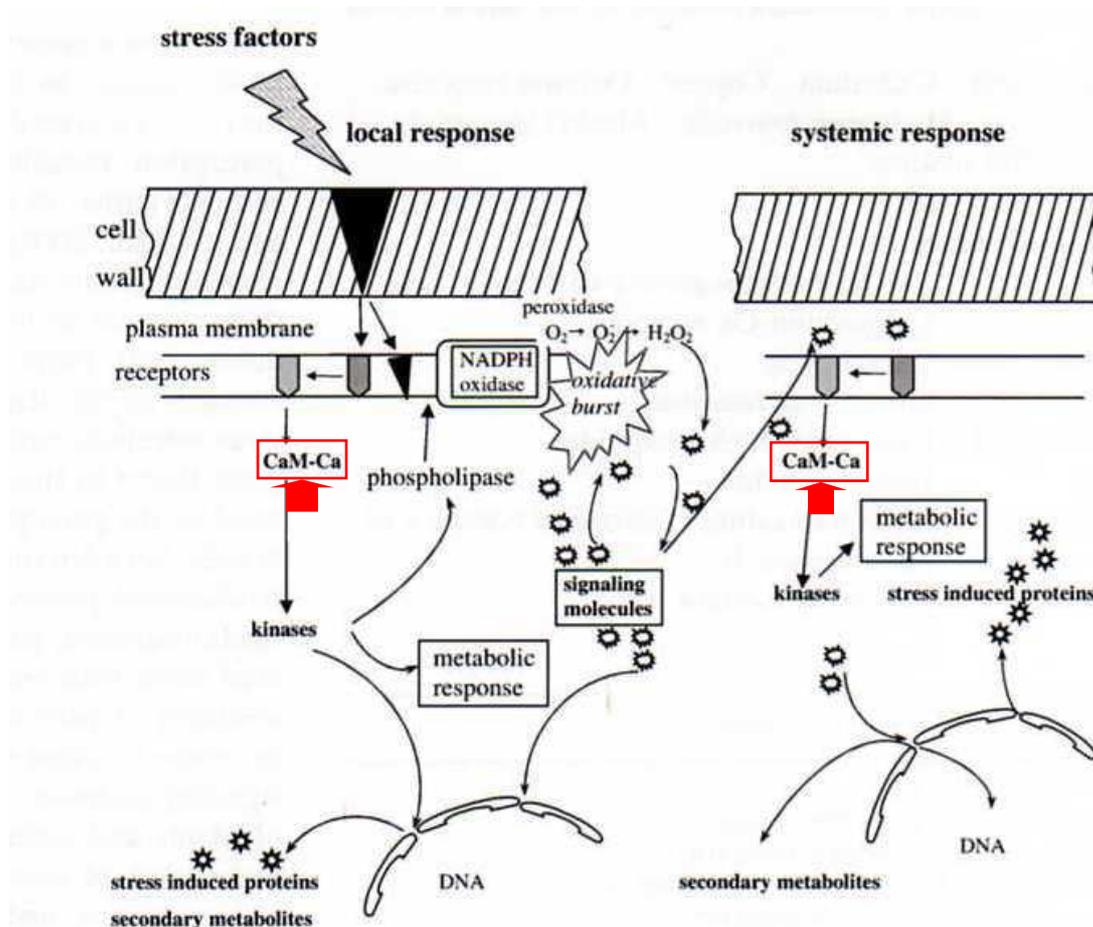
La CaM change de conformation pour conduire à une conformation dite activante, au moment de la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur au moins un de ses quatre sites de fixation (Means et Dedman, 1980). Cette nouvelle conformation permet à la CaM d'interagir avec des protéines cibles, les protéines kinases  $\text{Ca}^{2+}$  - calmoduline dépendantes (CaM kinases), afin de les activer (Alves *et al.*, 2010). Deux types de CaM kinases sont identifiées : les CaM kinases spécialisées et les CaM multifonctionnelles. Parmi les CaM kinases spécialisées, la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK) a un rôle dans la contraction musculaire. Les CaM kinases multifonctionnelles (CaM kinases II), quant à elles, contribuent à de nombreux processus métaboliques parmi lesquels (i) le métabolisme énergétique, grâce à la phosphorylase kinase capable d'activer la glycogénolyse (qui produit du glucose par phosphorylation du glycogène) (ii) la sécrétion de neurotransmetteurs (iii) la régulation par

facteurs de transcription. Dans ce dernier cas, les CaM kinases modulent l'activité des facteurs de transcription, qui sont par définition capables, soit de déclencher, soit de réprimer, le taux de transcription de l'ADN en protéines, suite à un signal reçu par un récepteur cellulaire spécifique (Figure 98) (Mittler, 2002).



**Figure 98.** Implication de la calmoduline dans la régulation des facteurs de transcription dans le cas d'un stress oxydatif par  $H_2O_2$  (Mittler, 2002). La protéine encadrée est sous – exprimée (voire dégradée) ou disparaît du protéome d'*Alexandrium catenella* en réponse à la contamination métallique

L'ion  $Ca^{2+}$  peut également être un messager dans la transduction de signaux cellulaires impliquant des récepteurs tels que l'histidine kinase (Desikan *et al.*, 2001). Lors de la stimulation d'un tel récepteur en réponse à un stress, les teneurs cytoplasmiques en  $Ca^{2+}$  s'élèvent, activant le système  $Ca^{2+}$  - calmoduline, lequel peut alors stimuler des voies métaboliques spécifiques *via* l'activation des CaM kinases (Figure 99) (Maksymiec, 2007).



**Figure 99.** Rôle du complexe  $\text{Ca}^{2+}$  - calmoduline ( $\text{Ca}^{2+}$  - CaM) dans la réponse au stress chez les plantes (Maksymiec, 2007). Les protéines encadrées sont sous – exprimées (voire dégradées) ou disparaissent du protéome d'*Alexandrium catenella* en réponse à la contamination métallique

Les molécules se liant au  $\text{Ca}^{2+}$ , telles que la CaM, sont des molécules cibles de la toxicité métallique, en raison de la similarité chimique entre les cations métalliques contaminants et le  $\text{Ca}^{2+}$  (Rivetta *et al.*, 1997). Au moment de la fixation sur la CaM, une compétition pour cette fixation s'établit entre le  $\text{Ca}^{2+}$  et les cations métalliques contaminants, comme cela a été mis en évidence lors d'une étude sur la germination des plants de radis exposés à  $\text{Cd}^{2+}$  (Rivetta *et al.*, 1997). La fixation des cations métalliques sur la CaM aurait pour effet la perturbation de la signalisation cellulaire dans laquelle cette protéine est impliquée (Clemens, 2006). Ainsi, des études montrent que le cadmium, une fois fixé sur la CaM, inhiberait l'activation par le complexe  $\text{Ca}^{2+}$  - CaM, de la protéine CaM kinase phosphodiesterase (Rivetta *et al.*, 1997).

Une diminution de 3,8 fois des quantités de CaM est observée dans les cellules du foie de daurade lorsque celles - ci sont soumises à un stress chronique (Alves *et al.*, 2010). Pourtant, les conditions de stress déclenchent généralement une série de réactions générant l'augmentation des niveaux de  $Ca^{2+}$ , laquelle induit l'activation des CaM kinases (Alves *et al.*, 2010). Prenant en compte ces informations, la diminution des quantités de CaM produites par *Alexandrium catenella* en réponse à la contamination par le zinc pourrait réprimer (i) la synthèse de nombreuses protéines *via* la répression des facteurs de transcription (Figure 98) (ii) la transduction du signal cellulaire (iii) l'activation de certaines enzymes telles que la phosphorylase kinase impliquée dans la glycogénolyse, ce qui conduirait à des quantités réduites de glucose disponible, et donc à un ralentissement du métabolisme énergétique.

## VII. PROTÉINES CHAPERONNES

Les « heat shock proteins » (HSPs) forment une famille de protéines ubiquistes dont la séquence d'acides aminés se conserve phylogénétiquement, depuis les bactéries jusqu'aux mammifères et aux plantes (Gao *et al.*, 2007). Ainsi, la séquence des HSPs reste homologue à 50% parmi toutes les séquences connues chez les eucaryotes (Miller – Morey et Van Dolah, 2004). Les HSPs, généralement cytoplasmiques, sont classées en trois catégories qui se distinguent par leurs poids moléculaires (i) les HSPs de poids compris entre 15 kDa et 30 kDa (ii) les HSPs de poids moléculaire autour de 70 kDa (iii) les HSPs dont le poids se situe entre 80 kDa et 110 kDa (Csermely et Kahn, 1991), les HSPs les plus couramment étudiées étant les HSPs 60, 70, 90 et 110 (Gao *et al.*, 2007). En l'absence de stress, elles représentent de 1 à 2% des protéines cellulaires, ce qui les classe parmi les protéines les plus abondantes (Gao *et al.*, 2007) ; toutefois les HSPs voient leur synthèse augmenter pendant le stress cellulaire (Hossain *et al.*, 2012). Ainsi, l'induction des HSPs dans les tissus d'êtres vivants exposés à des températures extrêmes, à des U.V. ou à des contaminants métalliques, permet d'utiliser ces protéines comme marqueurs moléculaires pour de tels types de stress (Venn *et al.*, 2009).

Dans des conditions physiologiques, les HSPs agissent en tant que chaperonnes assistant d'autres protéines dans leur maturation. Elles contribuent au repliement tridimensionnel adéquat de ces protéines, repliement sans lequel une perte de fonction pourrait se produire (Beere, 2005). En outre, les HSPs évitent l'agrégation des protéines avant la fin de leur repliement tridimensionnel, et participent également au transport membranaires des protéines (Hossain *et al.*, 2012).

En conditions de stress, notamment en cas de stress oxydatif lié à une contamination métallique, les HSPs sont requises en plus grandes quantités. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) se forment alors en excès et sont susceptibles (i) de modifier les résidus des acides aminés cystéines (ii) d'induire la formation de ponts disulfures inter- ou intramoléculaires (iii) d'oxyder les protéines contenant du fer ou du cuivre (Ramaglia *et al.*, 2004). Les HSPs sont alors capables de contrer ces effets en se liant aux polypeptides abîmés ou malformés. Les HSPs liées aux protéines irréversiblement abîmées assurent leur ciblage en vue d'une dégradation protéasomale, ou bien maintiennent les protéines partiellement endommagées dans leur état replié, afin d'éviter cette dégradation, puis contribuent à leur réparation et à leur réactivation (Miller-Morey et Van Dolah, 2004). Grâce aux HSPs, les protéines restent donc dans leurs conformations fonctionnelles et ne s'agrègent pas entre elles avant la fin du repliement tridimensionnel (Timperio *et al.*, 2008). Ainsi, certains auteurs ont observé une corrélation entre les taux de ROS et les teneurs en HSPs, confirmant l'implication de ces protéines dans la réponse au stress oxydatif (Timperio *et al.*, 2008). L'augmentation alors relevée de l'abondance des HSPs, s'accompagne ensuite de la reprise des processus métaboliques cellulaires (Thompson *et al.*, 2012).

Parmi les chaperonnes de petite taille, HSP 70 est la mieux étudiée (Gao *et al.*, 2007). Outre son activité chaperonne, HSP 70 est aussi exprimée en réponse à un stress chaud (Kobiyama *et al.*, 2010). La microalgue *Chlamydomonas* possède deux types de HSPs 70, l'une dans le cytosol, l'autre dans les chloroplastes ; tandis que chez les plantes, HSP 70 est présente dans le réticulum endoplasmique, le noyau et le cytoplasme (Kobiyama *et al.*, 2010). Afin d'éviter l'agrégation, les HSP 70 stabilisent les protéines non encore repliées en se groupant autour d'elles, puis établissent des liaisons à haute affinité et à faible affinité avec elles, afin que d'autres chaperonnes assistent les protéines dans leur repliement tridimensionnel (Mayer et Bukau, 2005).

Contrairement à HSP 70, HSP 90 est une protéine chaperonne parmi les moins connues (Ramaglia *et al.*, 2004). Elle est présente dans la plupart des cellules eucaryotes et procaryotes, où elle constitue jusqu'à 2% des protéines cytosoliques totales, même en l'absence de stress (Somji *et al.*, 2002). C'est une chaperonne indispensable à la viabilité des cellules eucaryotes, sa déficience les rendant particulièrement sensibles au stress (Picard, 2002). Dans des conditions physiologiques, outre son activité chaperonne, HSP 90 contribue (i) à la maintenance de l'intégrité structurale et à la régulation des protéines cytosoliques (Gao *et al.*, 2007) (ii) à la croissance et à la différenciation cellulaire (iii) au transport intracellulaire

(iv) à la régulation de l'activité des récepteurs hormonaux stéroïdiens, des protéines kinases et des facteurs de transcription, avec lesquels elle forme des complexes et interagit (Somji *et al.*, 2002). Il est montré que l'expression de HSP 90 est régulée par une variété d'agents stressants tels que la température, le stress hyperosmotique, mais aussi la contamination par les polychlorures de biphényles (PCBs), les arsénates et les métaux (Gao *et al.*, 2007). Ainsi, l'augmentation du taux de HSP 90 pourrait être utilisée stratégiquement par les organismes pour se prémunir de la toxicité de leur environnement.

Dans la présente étude, les quantités de HSP 70, aussi appelée Binding immunoglobuline protéine (BIP), sont fortement impactées par le plomb, comme l'indique la disparition de cette protéine en réponse à la contamination par Pb 12  $\mu\text{M}$  ; tandis que ces quantités ne sont pas du tout affectées par le zinc. Quant à HSP 90, la contamination par le plomb a également un impact plus important que la contamination par le zinc, sur son expression. En effet, cette protéine est sous - exprimée (ou dégradée) avec un taux de -2,4 suite à l'exposition des cellules à Pb 6  $\mu\text{M}$ , puis HSP 90 disparaît du protéome à la concentration supérieure (12  $\mu\text{M}$ ), alors qu'aucune modification n'est relevée en réponse à la contamination par le zinc aux mêmes concentrations (bien qu'HSP 90 finisse par disparaître en présence de Zn 18  $\mu\text{M}$ ).

D'autres travaux mentionnent des résultats similaires, les quantités d'HSPs diminuant aussi en réponse au stress métallique chez le mycète *Phanerochaete chrysosporium*, chez lequel les quantités d'HSP 20 sont réduites de 70 à 80% en présence de cuivre ou de cadmium 50  $\mu\text{M}$  (Ozcan *et al.*, 2007). Dans les huîtres Sydney Rock, HSP 70 est la protéine la plus affectée par le stress métallique, comme l'indique la diminution de ses teneurs en présence de cadmium (50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), de plomb (5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ou de zinc (5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Thompson *et al.*, 2012). Une réponse équivalente est observée chez certains végétaux, comme dans les graines de soja, où les quantités d'HSP 70 sont quatre fois inférieures en conditions de stress par le cadmium (Hossain *et al.*, 2012).

La régulation des teneurs en HSPs pourrait dépendre de la nature des contaminants métalliques, comme semblent l'indiquer les impacts différents du plomb et du zinc sur les HSPs 70 et 90 exprimées par *Alexandrium catenella*. Ainsi, dans des cellules de poumon humain, HSP 90 est sous - exprimée en présence de cadmium, de nickel et de chrome, alors qu'elle est sur - exprimée en présence d'arsenic (Andrew *et al.*, 2003). Néanmoins, HSP 70 sur - exprimée en réponse à des stress métalliques multiples, est une protéine candidate au

rôle de biomarqueur de la contamination métallique non spécifique chez les huîtres Sydney Rock (Thompson *et al.*, 2012). La régulation des teneurs en HSPs pourrait aussi être influencée par la concentration des contaminants métalliques testés (Leung *et al.*, 2011). Ainsi, une diminution d'expression d'HSP 22 est observée chez le bivalve *Argopectens irradians* exposé au cadmium  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ , tandis que l'expression de cette protéine est maximale dans les spécimens exposés au cadmium  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , suggérant que certaines HSPs sont exprimées dans une gamme limitée de concentrations en cadmium, tandis que de fortes concentrations de ce métal pourraient inhiber leur expression. L'effet particulièrement néfaste du plomb à la concentration  $12 \mu\text{M}$  sur les teneurs en HSPs 70 et 90 exprimées par *Alexandrium catenella*, pourrait donc s'expliquer par les concentrations élevées testées de ce métal, ces protéines ayant peut être été sur - exprimées en présence de concentrations métalliques plus faibles. En effet, de nombreuses études montrent une augmentation des quantités intracellulaires de HSPs en réponse au stress métallique (Hall, 2002). Comme précédemment évoqué, les HSPs contrent l'effet perturbateur qu'ont les métaux sur l'inactivation des enzymes vitales et des protéines fonctionnelles (Hossain *et al.*, 2012). L'augmentation d'expression de certaines HSPs est ainsi observée chez plusieurs bivalves marins tels que *Crassostrea gigas* (HSP 90) exposé au cadmium (Choi *et al.*, 2008), *Mytilus edulis* (HSP 60) exposé au cuivre (Sanders *et al.*, 1991), *Chlamys farreri* (HSP 90) exposé au cadmium, au plomb et au cuivre (Gao *et al.*, 2007), mais également chez les récifs coraliens *Montastraea franksi* (HSP 90) en réponse au stress par le cuivre (Venn *et al.*, 2009). L'exposition du dinoflagellé *Karenia brevis* au plomb à la concentration  $18 \mu\text{M}$ , induit également l'expression d'HSP 60 (Miller-Morey et Van Dolah, 2004), tandis qu'HSP 70 est sur - exprimée dans les macroalgues marines et les plantes d'eau douce exposées au cadmium (Ireland *et al.*, 2004).

## VIII. PROTÉINE IMPLIQUÉE DANS LA BIOLUMINESCENCE D'*Alexandrium catenella*

Certains dinoflagellés comme *Alexandrium catenella* sont capables de bioluminescence, contribuant à la phosphorescence nocturne des océans (Okamoto *et al.*, 1999). Cette bioluminescence résulte de la lumière émise par des organites très fragiles présents dans le cytoplasme des dinoflagellés, organites appelés scintillons émettant des flashes lumineux très rapides (environ 100 ms) (Morse *et al.*, 1989). Chez *Gonyaulax polyedra*, la bioluminescence résulte de la rupture de scintillons de forme sphérique vers la fin de la nuit (Okamoto *et al.*, 1999). Les scintillons contiennent trois molécules différentes responsables de la bioluminescence : 1, l'enzyme luciférase ; 2, la luciférine, qui est le substrat de la luciférase ; 3, une protéine liée à la luciférine, appelée luciférine – binding protéine (LBP) (Nicolas *et al.*, 1987, Morse *et al.*, 1989). La luciférase catalyse la réaction d'oxydation de la luciférine en présence d'O<sub>2</sub>, réaction produisant du CO<sub>2</sub> et le monoanion oxyluciférine à l'état excité (Kumar *et al.*, 1990). L'énergie d'excitation contenue dans l'oxyluciférine est libérée sous forme de photons dès lors que l'oxyluciférine retrouve son état stable (Morse *et al.*, 1989). La luciférine des dinoflagellés dériverait de la chlorophylle *a*, un lien étroit existant entre la photosynthèse et la bioluminescence de ces micro - organismes (Akimoto *et al.*, 2004). La luciférine est protégée de l'autooxydation par la liaison étroite qu'elle forme avec la LBP (Morse *et al.*, 1989).

La LBP est un dimère de deux sous – unités polypeptidiques étroitement liées entre elles par des liaisons non covalentes (Inouye, 2007). La LBP appartient à la famille des protéines capables de se lier au Ca<sup>2+</sup> (Kumar *et al.*, 1990), mais contrairement à la luciférase, elle n'a pas de fonction catalytique particulière. La LBP peut être un constituant majeur des dinoflagellés, comme chez *Gonyaulax polyedra*, où sa concentration peut atteindre jusqu'à 1% des protéines totales pendant la nuit, tandis qu'elle chute à 0,1% pendant la journée (Morse *et al.*, 1989). La synthèse maximale de LBP a lieu pendant les premières heures de la nuit, une fois terminée la production photosynthétique d'O<sub>2</sub> (Morse *et al.*, 1989). Après ce pic, la concentration de LBP reste constante pendant 6 heures, puis diminue rapidement jusqu'à atteindre 10% de sa concentration initiale dans la journée (Morse *et al.*, 1989). La LBP séquestre la luciférine dans un état stable jusqu'à ce que des ions Ca<sup>2+</sup> soient disponibles (Anderson *et al.*, 1974). Lorsque la concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup> augmente, la LBP, qui porte au moins deux sites à forte affinité pour Ca<sup>2+</sup>, est activée, ce qui initie la réaction bioluminescente (Kumar *et al.*, 1990). La LBP se lie alors aux ions Ca<sup>2+</sup> ce qui provoque un

changement de sa conformation (Hauck *et al.*, 2007). Un tel changement expose la liaison luciférine – O<sub>2</sub> à l'enzyme luciférase, ce qui facilite l'oxydation du substrat luciférine et permet à la lumière d'être émise (Hauck *et al.*, 2007). Il est donc admis que la luciférine de la LBP ne réagit avec la luciférase et l'O<sub>2</sub>, qu'en cas de liaison préalable de la LBP avec Ca<sup>2+</sup> (Kumar *et al.*, 1990).

Dans notre étude, seule la contamination des cultures d'*Alexandrium catenella* par le plomb a un impact sur les quantités de LBP présentes dans le protéome ce dinoflagellé. Ces résultats indiquent donc un impact spécifique du plomb sur la LBP. La contamination par Pb 12 µM provoque la disparition de la LBP du protéome d'*Alexandrium catenella*, confirmant la perturbation de cette protéine déjà observée en présence de Pb 6 µM, avec un taux de -2,3. Pourtant, une stimulation de la bioluminescence était observée chez *Gonyaulax polyedra* lorsque ce dinoflagellé était exposé aux métaux Hg<sup>2+</sup> (10 ppb), Cd<sup>2+</sup> (1 ppm), Pb<sup>2+</sup> (5 ppm) ou Cu<sup>2+</sup> (0,25 ppm) (Okamoto *et al.*, 1999). L'émission lumineuse provenant de *Gonyaulax polyedra* était alors quatre à huit fois plus importante en réponse au stress métallique, tandis que la fréquence des flashes bioluminescents augmentait de façon spectaculaire. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la capacité qu'ont les métaux à provoquer une augmentation de la fréquence des potentiels d'action à l'intérieur des vacuoles, qui se traduirait par une augmentation en retour de la fréquence des flashes lumineux. Toutefois, tous les métaux n'auraient pas cette capacité. Ainsi, des résultats équivalents à ceux obtenus chez *G. polyedra* sont observés en présence des métaux manganèse, magnésium et calcium, tandis que des résultats antagonistes sont obtenus en réponse à une contamination par les métaux fer, cuivre, nickel et zinc chez *G. polyedra*, *Pyrocystis lunula* et *Pyrocystis fusiformis* (Lecuyer *et al.*, 1979), se rapprochant alors de ceux obtenus pour *Alexandrium catenella* dans le contexte de l'étude.

*CONCLUSION GÉNÉRALE*  
*et PERSPECTIVES*

L'objectif de cette étude était d'examiner l'effet des métaux traces sur les réponses physiologiques et biochimiques de deux espèces appartenant à deux classes phytoplanctoniques différentes, mais originaires d'écosystèmes marins côtiers soumis à de fortes pressions anthropiques. Pour cela, des expériences d'écotoxicologie ont été menées au laboratoire en exposant les deux espèces *Skeletonema costatum* et *Alexandrium catenella* à des concentrations croissantes de différents métaux (cuivre, zinc, plomb ou cadmium).

Les expériences de contamination menées sur la diatomée *Skeletonema costatum* ont révélé que sa croissance était inhibée en réponse aux fortes concentrations de cuivre. De plus, des concentrations croissantes en MOD exsudée (COD, carbohydrates, molécules fluorescentes et polysaccharides exsudés) ont été mesurées dans les milieux extracellulaires des cultures contaminées, suggérant le rôle de la MOD dans la défense cellulaire contre la contamination métallique.

Parmi les composants polysaccharidiques composant la MOD exsudée par *Skeletonema costatum* suite à une contamination cuivrique, le glucose était l'aldose le plus libéré dans le milieu de culture. L'exsudation de cet aldose pourrait être utilisée comme un mécanisme de défense ou de protection vis-à-vis de la contamination métallique. La libération de FDOM composée de protéines, d'acides humiques et fulviques par *Skeletonema costatum* en réponse au stress métallique a également été mise en évidence.

Des expériences de contaminations métalliques ont également été menées sur le dinoflagellé toxique *Alexandrium catenella*. Ces expériences ont permis d'établir une étude quantitative et qualitative des molécules libérées au cours de la croissance de cette espèce, sous l'effet de la contamination par le cuivre, le zinc, le plomb ou le cadmium. Nos résultats ont révélé que dans des conditions de stress métallique, la croissance d'*Alexandrium catenella* était inhibée. Les cellules cultivées en présence de faibles concentrations en métaux (3  $\mu\text{M}$  et 6  $\mu\text{M}$ ) ont montré une croissance moins perturbée que les cellules cultivées en présence de concentrations plus modérées (12  $\mu\text{M}$  et 16  $\mu\text{M}$ ). En présence de concentrations supérieures à 18  $\mu\text{M}$ , les cellules contaminées par les métaux se transformaient en kystes de résistance. Le classement des métaux en fonction de leur effet inhibiteur sur la croissance montrait que le cadmium était le métal le plus toxique, suivi par le plomb, puis par le cuivre et enfin par le zinc. Quant à l'effet des métaux sur la transformation des cellules en kystes, le cadmium était toujours classé le premier, suivi par le cuivre, par le plomb et enfin par le zinc. Par conséquent, le cadmium était le métal le plus toxique pour la croissance d'*Alexandrium catenella*, tandis que le zinc était le moins toxique des métaux étudiés. La toxicité des métaux sur *Alexandrium catenella* se traduisait également en termes d'exsudation accrue du COD

dans le milieu extracellulaire. En effet, le cuivre et le cadmium induisaient une forte libération du COD/Cellule, par rapport au plomb et au zinc. En outre, le glucose et le galactose apparaissent comme les aldoses prédominants parmi les monosucres exsudés, quel que soit le métal testé. S'ajoutant à cela, l'exsudation de la FDOM par *Alexandrium catenella* a été analysée par spectroscopie de fluorescence 3D. A l'issue de cette analyse, des matrices d'excitation-émissions traitées par l'algorithme PARAFAC mettaient en évidence quatre composantes utilisables. Deux composantes (C1 et C2) étaient liées à l'activité biologique, et deux autres (C3 et C4) étaient liées à la matière organique produite par le phytoplancton.

Les ligands organiques libérés par la diatomée *Skeletonema costatum* et par le dinoflagellé *Alexandrium catenella* en conditions de stress métallique, pourraient modifier la spéciation métallique dans le milieu de culture et ainsi réduire la biodisponibilité des métaux en limitant leurs effets toxiques sur ces espèces phytoplanctoniques. Plus explicitement, la matière organique exsudée pourrait se complexer avec les métaux libres, et par conséquent, former des ligands moins toxiques et moins biodisponibles pour les cellules.

Enfin, l'analyse de la réponse protéomique d'*Alexandrium catenella* a mis en évidence des protéines de stress métalliques impliquées dans plusieurs catégories fonctionnelles, parmi lesquelles la réponse au stress oxydatif, la photosynthèse, le métabolisme des carbohydrates, la photorespiration et le métabolisme de phosphore. D'autres protéines étaient plutôt impliquées dans le métabolisme énergétique comme l'ATP-synthase, mais aussi dans le signal cellulaire, l'activité chaperonne ou la bioluminescence. La sous—expression, la dégradation, ou la sur-expression de ces protéines, pourraient apporter une capacité de résistance et d'adaptation au dinoflagellé *Alexandrium catenella* vis-à-vis des conditions de stress oxydatif suscitées par les métaux traces, notamment le plomb. Sur la base des résultats présentés dans cette étude, il peut être postulé que certains groupes phytoplanctoniques, grâce à des stratégies de défense telles que l'exsudation de ligands organiques et la modification d'expression de certaines protéines, pourraient se développer au détriment d'autres groupes, marquant de leur prédominance les écosystèmes marins côtiers perturbés par les contaminants métalliques.

Par ailleurs, il serait intéressant de compléter ces travaux par l'étude de l'influence du stade physiologique (phase d'adaptation, phase exponentielle, phase stationnaire) des espèces phytoplanctoniques *Alexandrium catenella* et *Skeletonema costatum* sur leurs réponses aux stress métalliques, en termes d'exsudation de MOD et de polysaccharides, et de modification des protéomes. Il serait également utile de tester l'effet des métaux sur l'enkystement et la toxicité (PSP) d'*Alexandrium catenella*, afin de mettre en évidence les protéines impliquées dans la conversion des cellules végétatives en kystes et dans la toxicité de ce dinoflagellé. L'étude de l'impact de stress combinés (cocktails de métaux et d'autres contaminants, T<sup>e</sup>...) permettrait de caractériser les réponses des espèces phytoplanctoniques *Alexandrium catenella* et *Skeletonema costatum* aux stress combinées dans des conditions davantage représentatives du milieu naturel. Enfin, l'analyse des teneurs en métaux accumulés dans leurs compartiments intracellulaires pourrait conduire à des corrélations entre ces teneurs et le degré d'impact des métaux sur les réponses physiologiques et biochimiques du phytoplancton.

## *BIBLIOGRAPHIE*

- Abadie E., Amzil Z. et Belin C. 1999. Contamination de l'étang de Thau par *Alexandrium tamarense*. Episode de novembre à décembre 1998. Ifremer., 44 pp. Available online at <http://www.ifremer.fr/docelec/doc/rapport-884.pdf> (accessed on 10 April 2009).
- Abebe T., Wise R.P. et Skadsen R.W. 2009. Comparative Transcriptional Profiling Established the Awn as the Major Photosynthetic Organ of the Barley Spike While the Lemma and the Palea Primarily Protect the Seed. *Plant Genome* **2**: 247-259.
- Abrahams J.P., Leslie A.G., Lutter R. et Walker J.E. 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**: 621-628.
- Adachi M., Sako Y. et Ishida Y. 1996. Analyses of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. *J. Phycol.* **32**: 424-432.
- Ahsan N., Renaut J. et Komatsu S. 2009. Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics* **9**: 2602-2621.
- Akimoto H., Wu C., Kinumi T. et Ohmiya Y. 2004. Biological rhythmicity in expressed proteins of the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* demonstrated by chronological proteomics. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **315**: 306-312.
- Alcoverro T., Conte E. et Mazzella L. 2000. Production of mucilage by the Adriatic epipellic diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) under nutrient limitation. *J. Phycol.* **36**: 1087-1095.
- Alscher R.G., Erturk N. et Heath L.S. 2002. Role of SODs in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* **53**: 1331-1341.
- Aluwihare L.I., Repeta D.J. et Chen R.F. 1997. A major biopolymeric component to dissolved organic carbon in surface seawater. *Nature* **387**: 166-169.
- Alves R.N., Cordeiro O., Silva T.S., Richard N., De Vareilles M., Marino G., Di Marco P., Rodrigues P.M et Conceicao L.E.C. 2010. Metabolic molecular indicators of chronic stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) using comparative proteomics. *Aquaculture* **299**: 57-66.
- Anderson J.M., Charbonneau H. et Cormier M.J. 1974. Mechanism of calcium induction of *Renilla* bioluminescence. Involvement of a calcium-triggered luciferin binding protein. *Biochemistry* **13**: 1195-1200.
- Anderson D.M et Morel F.M.M. 1978. Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. *Limnol. Oceanogr.* **23**: 283 - 295.
- Andrew A.S., Warren A.J., Barchowsky A., Temple K.A., Klei L., Soucy N.V., O'Hara K.A. et Hamilton J.W. 2003. Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in human lung cells. *Environ. Health Perspect.* **111**: 825-35.
- Antia H.N.J., McAllister C.D., Parsons T.R., Stephens K. et Strickland J.D.H. 1963. Further measurements of primary production using a large-volume plastic sphere. *Limnol. Oceanogr.* **8**: 166-183.
- Antoine D., Morel A. et André J.M. 1995. Algal pigment distribution and primary production in the eastern Mediterranean as derived from coastal zone color scanner observation. *J. Geophys. Res.* **100**: 16193-16209.
- Armi Z., Milandri A., Turki S. et Hajjem B. 2011. *Alexandrium catenella* and *Alexandrium tamarense* in the North Lake of Tunis: Blooms characteristics and the occurrence of paralytic Shellfish toxin. *African. J. Aqua. Sc.* **36**: 102-110.
- Artinger R., Buckau G., Geyer S., Fritz P., Wolf M. et Kim J. 2000. Characterization of groundwater humic substances: influence of sedimentary organic carbon. *Appl. Geochem.* **15**: 97-116.
- Azam F., Fenchel T., Field G.J., Gray J.S., Meyer-Reil L.A. et Thingstad F. 1983. The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10**: 257-263.
- Azam F., Smith D.C., Steward G.F. et Hagström A. 1994. Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microb. Ecol.* **28**: 167-179.
- Bae M.S., Cho E.J., Choi E.Y. et Park O.K. 2003. Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J.* **36**: 652-663.
- Bah A.M., Sun H., Chen F., Zhou J., Dai H., Zhang G. et Wu F. 2010. Comparative proteomic analysis of *Typha angustifolia* leaf under chromium, cadmium and lead stress. *J. Hazard Mat.* **184**: 191-203
- Baines S.B. et Pace M.L. 1991. The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: patterns across marine and freshwater systems. *Limnol. Oceanogr.* **36**: 1078-1090.
- Baird M.E., Emsley S.M. et McGlade J.M. 2001. Modelling the interacting effects of nutrient uptake, light capture and temperature on phytoplankton growth. *J. Plankton Res.* **23**: 829 - 840.
- Baker A. et Genty D. 1999. Fluorescence wavelength and intensity variations of cave waters. *J. Hydrol.* **217**: 19-34.
- Baker A. 2001. Fluorescence Excitation-Emission Matrix Characterization of Some Sewage-Impacted Rivers. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 948-953.
- Baker A. 2002. Fluorescence Excitation-Emission Matrix Characterization of River Waters Impacted by a Tissue Mill Effluent. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 1377-1382.

- Baker A. et Spencer R.G.M. 2004. Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. *Sci. Total. Environ.* **333**: 217-232.
- Banaitis M.R., Waldrip-Dail H., Diehl M.S., Holmes B.C., Hunt J.F., Lynch R.P. et Ohno T. 2006. Investigation sorption-driven dissolved organic matter fractionation by multidimensional fluorescence spectroscopy and PARAFAC. *J. Colloid. Interf. Sci.* **304**: 271-276.
- Bareen F., Shafiq M. et Jamil S. 2012. Role of plant growth regulators and a saprobic fungus in enhancement of metal phytoextraction potential and stress alleviation in pearl millet. *J. Hazard. Mat.* **237-238**: 186-193
- Barillé L., Haure J., Cognie B. et Leroy A. 2000. Variations in pallial organs and eulatero-frontal cirri in response to high particulate matter concentrations in the oyster *Crassostrea gigas*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **57**(4): 837-843.
- Baud J.P. et Bacfier C. 1990. Use of saline ground water for intensive rearing of *Ruditapes philippinarum* juveniles in a nursery system. *Aquaculture* **88**: 157-178
- Beere H.M. 2005. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J. Clin. Invest.* **115**: 2633-2639.
- Ben Fredj F.B., Han J., Irie M., Funamizu N., Ghrabi A. et Isoda H. 2012. Assessment of wastewater-irrigated soil containing heavy metals and establishment of specific biomarkers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **84**: 54-62.
- Benner R., Pakulski J.D., McCarthy M., Hedges J.I. et Hatcher P.G. 1992. Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. *Science* **255**: 1561-1564.
- Benner R. et Strom M. 1993. A critical evaluation of the analytical blank associated with DOC measurements by high - temperature catalytic oxidation. *Mar. Chem.* **41**: 153 -160.
- Bérard-Thériault L., Poulin M. et Bossé L., 1999. Guide d'identification du phytoplancton marin de l'estuaire et du Golfe du Saint-Laurent. *Publication spéciale canadienne des sciences halieutiques et aquatiques* **128**, 387 pp.
- Berland B.R., Bonin D.J., Kapkov V.I., Maestrini S.Y. et Arlhac D.P. 1976. Action toxique de quatre métaux lourds sur la croissance d'algues unicellulaires marines. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences. Paris* **282**: 633 - 636.
- Berland B.R., Bonin D.J., Guérin O.J., Kapkov V.I. et Arlhac D.P. 1977. Action of sub lethal doses of heavy metals on the growth characteristics of the diatom *Skeletonema costatum*. *Mar. Biol.* **42**: 17 - 30.
- Biddanda B. et Benner R. 1997. Carbon, nitrogen and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **42** (3): 506 - 518.
- Biersmith A. et Benner R. 1998. Carbohydrates in phytoplankton and freshly produced dissolved organic matter. *Mar. Chem.* **63**: 131 - 144.
- Billmire E. et Aaronson S. 1976. The secretion of lipids by the freshwater phytoflagellate *Ochmmonas abnica*. *Limnol. Oceanogr.* **21**: 138-140.
- Bloundi M.K. 2005. Etudes géochimiques de la lagune de Nador (Maroc oriental) : Impact des facteurs anthropiques.
- Bogé G., Jamet J.L., Richard S., Jamet D. et Jean N. 2002. Contribution of copepods, cladocerans and cirripeds to phosphatase activity in Mediterranean zooplankton. *Hydrobiologia* **468**: 147-154.
- Bogé G., Jean N., Jamet J.L., Jamet D. et Richard S. 2006. Seasonal changes in phosphatase activities in Toulon Bay (France). *Mar. Environ. Res.* **61**: 1-18.
- Bona E., Cattaneo C., Cesaro P., Marsano F., Lingua G., Cavaletto M. et Berta G. 2010. Proteomic analysis of *Pteris vittata* fronds: two arbuscular mycorrhizal fungi differentially modulate protein expression under arsenic contamination. *Proteomics* **10**: 3811-3834.
- Bonhomme L., Monclus R., Vincent D., Carpin S., Claverol S., Lomenech A.M., Labas V., Plomion C., Brignolas F. et Morabito D. 2009. Genetic variation and drought response in two *Populus × euramericana* genotypes through 2-DE proteomic analysis of leaves from field and glasshouse cultivated plants. *Phytochemistry* **70**: 988-1002.
- Borch N.H. et Kirchman D.L. 1997. Concentration and composition of dissolved combined neutral sugars polysaccharides in seawater determined by HPLC-PAD. *Mar. Chem.* **57**: 85-95.
- Borgstahl G.E.O., Parge H.E., Hickey M.J., Beyer W.F., Hallewell R.A. et Tainer J.A. 1992. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell* **71**: 107-118.
- Børsheim K.Y., Mykkestad S.M. et Sneli J.A. 1999. Monthly profiles of DOC, mono-and polysaccharides at two locations in the Trondheim fjord (Norway) during two years. *Mar. Chem.* **63**: 255-272.
- Bouchouicha Smida D., Sahraoui I., Mabrouk H.H. et Sakka Hlaili A. 2012. Dynamique saisonnière du genre *Alexandrium* (dinoflagellé potentiellement toxique) dans la lagune de Bizerte (Nord de la Tunisie) et contrôle par les facteurs abiotiques environnants. *C. R. Biologies* **335** : 406-416.
- Bougis P. 1974. Ecologie du plancton marin. I - Le phytoplancton. Masson et Cie, Paris, 196p.

- Brand L.E., Sunda W.G. et Guillard R.R.L. 1983. Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese and iron. *Limnol. Oceanogr.* **28**: 1182 - 1198.
- Brand L.E., Sunda W.G. et Guillard R.R.L. 1986. Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **96**: 225 – 250.
- Branica G. 1990. Environmental Research in Aquatic Systems. *Scientific Series of the International Bureau* **3**: 766 p.
- Bro R. 1997. PARAFAC Tutorial and applications. *Chemometr. Intell. Lab.* **38**: 149-171.
- Brot N. et Weissbach H. 2000. Peptide methionine sulfoxide reductase: Biochemistry and physiological role. *Pept. Sci.* **55**: 288–296.
- Bruland K.W., Donat J.R. et Hutchins D.A. 1991. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. *Limnol. Oceanogr.* **36**: 1555-1577.
- Buffle J. 1988. Complexation reactions in aquatic systems, Analytical Chemistry, Ellis Horwood, Chichester.
- Burdige D.J., Kline S.W. et Chen W. 2004. Fluorescence dissolved organic matter in marine sediment pore waters. *Mar. Chem.* **89**: 289 – 311.
- Carlucci A.F. et Bowes P.M. 1970. Vitamin production and utilization by phytoplankton in mixed culture. *J. Phycol.* **6**: 393-400.
- Ceccarelli E.A., Arakaki A.K., Cortez N. et Carrillo N. 2004. Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases. *Biochim. Biophys. Ac.* **1698**: 155-165.
- Chan L.L., Hodgkiss I.J., Lam P.K.S., Wan J.M.F., Chou H.N., Lum J.H.K., Lo M.G.Y., Mak A.S.C., Sit W.H. et Lo S.C.L. 2005. Use of two-dimensional gel electrophoresis to differentiate morphospecies of *Alexandrium minutum*, a paralytic shellfish poisoning toxin-producing dinoflagellate of harmful algal blooms. *Proteomics* **5**: 1580-1593.
- Chien Y.H. 1992. Water quality requirements and management for marine shrimp culture. In: Wyban J. (ed.) Proceedings of the special session on shrimp farming. *World Aquaculture Society, Baton Rouge*, p: 30 - 42.
- Chiffolleau J., Auger D., Chartier E., Michel P., Truquet I., Gonzalez J.L. et Romana L.A. 2001. Spatiotemporal changes in cadmium contamination in the Seine estuary (France). *Estuar. Coast* **24**: 1029-1040.
- Chikhaoui M. 2003. Impact d'une eutrophisation artificielle sur les communautés planctoniques (phytoplancton, protozooplancton et bactéries hétérotrophes) dans la lagune de Bizerte. *Mastère. Fac. Sci. Bizerte*, 140 pp.
- Chikhaoui M.A., Sakka Hlaili A. et Hadj Mabrouk H. 2008. Réponses saisonnières du phytoplancton aux rapports d'enrichissements N: Si: P dans la lagune de Bizerte (Sud-Ouest de la Méditerranée). *C.R. Biologies* **331**: 389-408.
- Choi Y.K., Jo P.G. et Choi C.Y. 2008. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **147**: 286-292.
- Chrétiennot-Dinet M.J., Robert R. et His E. 1986. Food-algae in aquaculture. *Ann. Biol.* **25**: 97-119.
- Clemens S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**: 1707–1719.
- Coble P.G. 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.* **51**: 325 – 346.
- Cole J.J., Findlay S. et Pace M.L. 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **43**: 1-10.
- Collos Y., Vaquer A., Laabir M., Abadie E., Laugier T., Pastoureaud A. et Souchu P. 2007. Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, southern France. *Harmful Algae* **6**: 781 – 789.
- Contreras L., Moenne A., Guillard F., Potin P. et Correa J.A. 2010. Proteomic analysis and identification of copper stress – regulated proteins in the marine alga *Scytosiphon gracilis* (Phaeophyceae). *Aquat.Toxicol.* **96**: 85–89.
- Cordova J.L. et Muller I. 2002. Use of PCR and partial sequencing of the large-subunit rRNA gene of identify *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) from the south of Chile. *Harmful Algae* **1**: 343 – 350.
- Cory R.M. et Mcknight D.M. 2005. Fluorescence Spectroscopy Reveals Ubiquitous Presence of Oxidized and Reduced Quinones in Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 8142-8149.
- Ćosović B. 2005. Surface active properties of the sea surface microlayer and consequences for pollution in the Mediterranean Sea. In: Saliot A (ed) The Mediterranean Sea. The Hand. *Environ. Chem. Ser. Springer*, Berlin, pp 269 – 297.
- Cosson R.P. 1992. Les métallothionéines. *Anal. Mag.* **6**: 50-53.
- Coutteau P. et Sorgeloos P. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *J. Shellfish Res.* **11**: 467-476.
- Cowie G.L. et Hedges J.I. 1984. Determination of neutral sugars in plankton, sediments, and wood by capillary gas chromatography of equilibrated isomeric mixtures. *Anal. Chem.* **56**: 497 – 504.

- Crist R.H., Martin J.R., Guptill P.W., Eslinger J.M. et Crist D.R. 1990. Interaction of metals and protons with algae. 2. Ion exchange in adsorption and metal displacement by protons. *Environ. Sci. Technol.* **24**: 337-342.
- Crist R.H., Oberholser K., McGarrity J., Crist D.R., Johnson J.K. et Brittsan J.M. 1992. Interaction of metals and protons with algae. 3. Marine algae, with emphasis on lead and aluminium. *Environ. Sci. Technol.* **26**: 496-650.
- Crooe J.P., Benedetti M.F. et Violleau D. 2003. Characterization and copper binding of humic and non humic organic matter isolated from the South Platte River: Evidence for the presence of nitrogenous binding site. *Environ. Sci. Technol.* **37**: 328-336.
- Csermely P. et Kahn C.R. 1991 The 90-kDa heat shock protein (hsp-90) possesses an ATP binding site and autophosphorylating activity. *J. Biol. Chem.* **266**: 4943-4950.
- Dagg M.J. 1974. Loss of prey body contents during feeding by an aquatic predator. *Ecology* **55**: 903-906.
- Daly Yahia M.N. 2001. Rapport final sur l'étude des méduses au sein de la Baie de Sousse. Analyse de la distribution spatio-temporelle des compartiments phytoplanctoniques et zooplanctoniques. Tunis, INSTM, 1-10.
- Daly Yahia-Kéfi O. 1998. Le phytoplancton de la baie de Tunis: Analyse systématique, biologique, quantitative et synécologique des diatomées et des dinoflagellés. *Thèse de doctorat, Fac. Sci. Tunis*, 332 pp.
- Daly Yahia-Kéfi O., Souissi S., Gomez F. et Daly Yahia M.N. 2005. Spatiotemporal distribution of the dominant Diatom and Dinoflagellate species in the Bay of Tunis (SW Mediterranean Sea). *Medit. Mar. Sci.* **6**: 17 - 34.
- Dasuri K., Zhang L. et Keller J.N. 2013. Oxidative stress, neurodegeneration and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Rad. Bio. Med.* **62**: 170-185.
- Daware V., Kesavan S., Patil R., Natu A., Kumar A., Kulkarni M. 2012. Effects of arsenite stress on growth and proteome of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biotechnol.* **158**: 8-16.
- De Grandpré M.D., Vodacek A., Nelson R.K., Bruce E.J. et Blough N.V. 1996. Seasonal seawater optical properties of the US middle Atlantic bight. *J. Geophys. Res.* **101**: 22727-22736.
- De Souza S.M.M. 1992. Caractérisation et réactivité de la matière organique fluorescente dans des milieux côtiers et marins. Thèse Université Bordeaux I.
- Del Castillo C.E., Coble P.G., Morell J.M., Lopez J.M. et Corredor J.E. 1999. Analysis of the optical properties of the Orinoco River plum by absorption and fluorescence spectroscopy. *Mar. Chem.* **66**: 35 – 51.
- Delattre J., Beaudeau J.L. et Bonnefont-Rousselot D. 2005. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Editions Lavoisier 548 p.
- Demirevska-Kepova K., Simova-Stoilova L., Stoyanova Z., Hölzer R. et Feller U. 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environ. Exp. Bot.* **52**: 253 – 266.
- Desai S.R., Verlecar X.N. et Goswami U. 2006. *Ecotoxicol.* **15**: 359-363.
- Desikan R., Mackeress S.A.H., Hancock J.T. et Neill S.J. 2001. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* **127**: 159-172.
- Desimone M., Henke A. et Wagner E. 1996. Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of ribulose 1, 5- bisphosphate carboxylase/oxygenase in isolated chloroplasts of Barley. *Plant Physiol.* **111**: 789-796.
- Despiau S., Gourdeau J., Jamet D., Geneys C. et Jamet J.L. 2002. Seawater DMS in a perturbed coastal ecosystem. *Hydrobiologia* **489**: 107-115.
- Dhir B., Sharmila P., Pardha Saradhi P., Sharma S., Kumar R. et Mehta D. 2011. Heavy metals induced physiological alterations in *Salvinia natans*. *Ecotox. Environ. Saf.* **74**: 1678-1684.
- Dienert F. 1910. De la recherche des substances fluorescentes dans le contrôle de la stérilisation des eaux. C. hebdomadaire. *Séanc. Acad. Sci. Paris* **150**: 487-488.
- Droop M.R. 1968. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* **48**: 689-733.
- Dryden C.L., Gordon A.S. et Donat J.R. 2007. Seasonal survey of copper-complexing ligands and thiol compounds in a heavily utilized, urban estuary: Elizabeth River, Virginia. *Mar. Chem.* **103**: 276 - 288.
- Dubois M., Gillies K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. et Smith F. 1956. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
- Dueckershoff K., Mueller S., Mueller M.J. et Reinders J. 2008. Impact of cyclopentenone-oxylipins on the proteome of *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Ac. Prot. Proteomics* **1784**: 1975–1985.
- Dumont E. 2008. Tolérance au gel après acclimatation au froid chez le pois : identification de protéines et cartographie de PQL et QTL. Thèse Université de Lille 1, 224 p.
- Dundas I. et Skjoldal H.R. 1991. The *Chrysochromulina polyylepis* bloom in the Skagerrak and the Kattegat in May-June 1988: environmental conditions, possible causes, and effects. *Cons. Int. Explor. Mer. Coop. Res. Rep.*, No. 175.

- Duquesnoy I., Goupil P., Nadaud I., Branlard G., Pissaloux A.P. et Ledoigt G. 2009. Identification of *Agrostis tenuis* leaf proteins in response to As(V) and As(III) induced stress using a proteomics approach. *Plant Science* **176**: 206–213.
- Dursma E.K. et Dawson R. 1981. Marine organic chemistry. Evolution, composition, interactions and chemistry of organic matter in seawater. Amsterdam - Oxford - New York: *Elsevier Oceanography Series*.
- Durand T.C., Sergeant K., Planchon S., Carpin S., Label P., Morabito D., Hausman J.F., et Renaut J. 2010. Acute metal stress in *Populus tremula*×*P. alba* (717-1B4 genotype): Leaf and cambial proteome changes induced by cadmium<sup>2+</sup>. *Proteomics* **10**: 349 – 368.
- Eberlein K., Teal M.T., Hammen H.K.D. et Hickel W. 1985. Dissolved organic substances during a *Phaeocystis pouchetti* bloom in the German Bight North Sea. *Mar. Biol.* **89**: 311-316.
- Elyse I.H., Harding S.J., Bonwick G.A., Jones M., Smith C.J. et Williams J.H. 2004. Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*. *Biomarkers* **9**: 139-155.
- Engel D.W. 1987. Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: Copper, zinc, and metallothionein. *Biol. Bull.* **172**: 69-82.
- Erickson S.J. 1972. Toxicity of copper to *Talassiosira Pseudonana* in unenriched inshore seawater. *J. Phycol.* **8**: 813-823.
- Errécalde O. et Campbell P.G.C. 2000. Cadmium and zinc bioavailability to *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae): accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate. *J. Phycol.* **36**: 473-483.
- Ewald M., Belin C., Berger P. et Weber J.H. 1983. Corrected fluorescence spectra of fulvic acids isolated from soil and water. *Environ. Sci. Technol.* **17**: 501-504.
- Eyckmans M., Benoot D., Geert A.A., Raemdonck V., Zegels G., Xaveer W.M., Ostade V., Witters E., Blust R. et De Boeck G. 2012. Comparative proteomics of copper exposure and toxicity in rainbow trout, common carp and gibel carp. *Comp.Biochem. Physiol. Genomics Proteomics* **7**: 220–232.
- Fajon C., Cauwet G., Lebaron P., Terzic S., Ahel M. et Malej A. 1999. The accumulation and release of polysaccharides by planktonic cells and the subsequent bacterial response during a controlled experiment. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **29**: 351-363.
- Falkowski P.G. et Owen T.G. 1980. Light-shade adaptation: tow strategies in marine phytoplankton. *Plant. Physiol.* **66**: 592 – 595.
- Farkas E. et Sóvágó I. 2002. Metal complexes of amino acids and peptides. In: Amino acids, peptides and proteins. *Royal society of chemistry, Special Periodical Reports* **33**: 295-364.
- Flick K. et Kaiser P. 2012. Protein degradation and the stress response. *Sem. Cell. Dev. Biol.* **2**: 515-522.
- Fogg G.E. 1983. The ecological significance of extracellular products of photosynthesis. *Bot. Mar.* **26**: 3–14.
- Fogg G.E. 1995. Some speculations on the nature of the pelagic mucilage community in the northern Adriatic Sea. *Sci. Total. Environ.* **165**: 59 – 63.
- Fowler B.A., Hildebrand C.E., Kojima Y. et Webb M. 1987. Nomenclature of metallothionein. *Experientia. Suppl.* **52**: 19-22.
- Frehi H., Couté A., Mascarell G., Perrette-Gallet C., Ayada M. et Kara M.H. 2007. Dinoflagellés toxiques et/ou responsables de blooms dans la baie d’Annaba (Algérie). *C.R. Biologies* **330**: 615-628.
- Führs H., Hartwig M., Molina L.E.B., Heintz D., Dorsselaer A.V., Braun H.P. et Horst J.W. 2008. Early manganese-toxicity response in *Vigna unguiculata* L. – a proteomic and transcriptomic study. *Proteomics* **8**: 149–159.
- Gao Q., Song L., Ni D., Wu L., Zhang H. et Chang Y. 2007. cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **147**: 704-715.
- Garcia-Plazaola J.I. et Becerril J.M. 1999. A rapide high-performance liquid chromatography method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochem. Analysis* **10**: 307-313.
- Gavis J., Guillard R.R.L. et Woodward B.L. 1981. Cupric ion activity and the growth of phytoplankton clones isolated from different marine environments. *J. Mar. Res.* **39**: 315 – 333.
- Ge C., Ding Y., Wang Z., Wan D., Wang Y., Shang Q. et Luo S. 2009. Responses of wheat seedlings to Cd, Hg and trichlorobenzene stresses. *J. Environ. Sci.* **2**: 806-813.
- Genovesi B., Mouillot D. et Vaquer A. 2007. Towards an optimal sampling strategy for *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) benthic resting cysts. *Harmful Algae* **6**: 837-848.
- Genovesi B., Laabir M., Masseret E., Collos Y., Vaquer A. et Grzebyk D. 2009. Dormancy and germination features in resting cysts of *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) can facilitate bloom formation in a shallow lagoon (Thau, southern France). *J. Plankton. Res.* **31**: 1209-1224.
- Gillet S., Decottignies P., Chardonnet S. et Le Maréchal P. 2006. Cadmium response and redoxin targets in *Chlamydomonas reinhardtii* : a proteomic approach. *Photosynth. Res.* **89**: 201-211.

- Glibert P.M, Anderson D.M., Gentien P., Graneli E. et Sellner K.G. 2005. The Global Complex Phenomena of Harmful Algal Blooms. *Oceanography* **18**: 136 – 147.
- Glover H.E., Keller M.D. et Spincad R.W. 1987. Effects of light quality and intensity on photosynthesis and growth of marine eukaryotic and prokaryotic phytoplankton clones. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **105**: 137 - 159.
- Godon C., Lagniel G., Lee J., Buhler J.M., Kieffer S., Perrot M., Boucherie H., Toledano M.B. et Labarre J. 1998. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**: 22480-22489.
- Goering J.J., Wallen D.D. et Naumann R.M. 1970. Nitrogen uptake by phytoplankton in the discontinuity layer of the eastern subtropical Pacific Ocean., *Limnol. Oceanogr.* **15**: 789-796.
- González-Dávila M., Santana-Casiano J.M. et Perez-Pena J. 1995. Binding of Cu (II) to the surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. *Environ. Sci. Technol.* **29**: 289 – 301.
- Gouvêa S.P., Vieira A.A.H. et Lombardi A.T. 2005. Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials of dominant microalgae and of water from a eutrophic reservoir. *Chemosphere* **60**: 1332-1339.
- Grami B., Niquil N., Hlaili A., Gosselin M., Hamel D. et Mabrouk H.H. 2008. The plancton food web of the Bizerte Lagoon (South-Western Mediterranean): II. Carbon steady-state modelling using inverse analysis. *Estuar. Coast. Shelf. S.* **79**: 111-113.
- Greene B. et Darnall D.W. 1988. Temperature Dependence of Metal Ions Sorption by Spirulina. *Biorecovery* **1**: 27-41.
- Guerzoni S., Chester Dulac F., Herut B., Loyer-Pliot M.D., Measures Migon C., Molinaroli E., Moulin C., Rossini P., Saydam C., Soudine A. et Ziveri P. 1999. The role of atmospheric deposition in the biogeochemistry of the Mediterranean Sea. *Progr. Oceanogr.* **44**: 147 - 190.
- Guillard R.R.L. et Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms, *I. Cyclotella nana Hustedt* and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* **8**: 229-239.
- Guillard R.R.L. et Hellebust J.A. 1971. Growth and the production of extracellular substances by two strains of *Phaeocystis pouchetti*. *J. Phycol.* **7**: 330-338.
- Hajduch M., Rakwal R., Kumar G., Yonekura A.M. et Pretova A. 2001. High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: Drastic reductions/ fragmentation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins. *Electrophoresis* **22**: 2824–2831.
- Hall N.P., Kendall A.C., Lea P.J., Turner J.C. et Wallsgrave R.M. 1987. Characteristics of a photorespiratory mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) deficient in phosphoglycolate phosphatase. *Photosynth. Res.* **11**: 89-96.
- Hall J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* **53**:1-11.
- Hallegraeff G.M. 1993. Review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* **32**: 79-99.
- Handa N. et Yanagi K. 1969. Studies on water-extractable carbohydrates of the particulate matter from the northwest Pacific Ocean. *Mar. Biol.* **4**: 197 – 207.
- Hanke G.T., Satomi Y., Shinmura K., Takao T. et Hase T. 2011. A screen for potential ferredoxin electron transfer partners uncovers new, redox dependent interactions. *Biochim. Biophys. Ac. Prot. Proteomics* **1814**: 366-374.
- Hansell D.A. et Carlson C.A. 1998. Net community production of dissolved organic carbon. *Global Biogeochem. Cy.* **12**: 443-453.
- Hansen J., Sato M., Ruedy R., Lo K., Lea D.W. et Medina-Elizade M. 2006. Global temperature change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 14288–14293.
- Harris G.P. et Piccinin B.B. 1977. Photosynthesis by natural phytoplankton populations. *Arch. Hydrobiol.* **8**: 405 - 457.
- Harvey G.R. et Boran D.A. 1981. Geochemistry of humic substances in seawater. In Humic Substances in soil, sediment and water, G.R. Aiken, D.M McKnight, R.L. Wershaw, P. MacCarthy (Eds.). Wiley, New York, pp 233-248.
- Hatcher P.G. et Spiker E.C. 1988. Selective Degradation of Plant Biomolecules. F.H. Frimmel, R.F. Christman, p. 59-74.
- Hauck L.L., Phillips W.S. et Weis V.M., 2007. Characterization of a novel EF-hand homologue, CnidEF, in the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **146**: 551-559.
- Hedges J.I. 1988. Polymerization of Humic Substances in Natural Environments. F.H. Frimmel, R.F. Christman, p. 45-58.
- Hellebust J.A. 1974. Extracellular products. In: N.D. Steward (Ed), Algal Physiology and Biochemistry. University of California Press, Berkeley, CA, pp. 838-863.
- Hernes P.J., Hedges J.I., Peterson M.L., Wakeham S.G. et Lee C. 1996. Neutral carbohydrate geochemistry of particulate material in the central equatorial Pacific. *Deep Sea Res.* **43**: 1181-1204.

- Herzi F., Jean N., Zhao Huiyu., Mounier S., Mabrouk H.H. et Sakka Hlaili A. 2013a. Copper and cadmium effects on growth and extracellular exudation of the marine toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*: 3D-fluorescence spectroscopy approach. *Chemosphere* **93**: 1230-1239. .
- Herzi F., Sakka Hlaili A., Le Poupon C., Mabrouk H.H. et Mounier S 2013b. Characterization of exudates released by the marine diatom *Skeletonema costatum* exposed to copper stress: a 3D-fluorescence spectroscopy approach. *Biometals* **26**: 773-781.
- Hiller R.G., Crossley L.G., Wrench P.M., Santucci N. et Hofmann E. 2001. The 15-kDa forms of the apo-peridinin-chlorophyll a protein (PCP) in dinoflagellates show high identity with the apo-32 kDa PCP forms, and have similar N-terminal leaders and gene arrangements. *Mol. Genet. Genomics* **266**: 254-259.
- Hoagland K., Rosowski J., Gretz M. et Roemaer S. 1993. Diatom extracellular polymeric substances: Function, fine structure, chemistry, and physiology. *J. Phycol.* **29**: 537–566.
- Hofmann E., Wrench P.M., Sharples F.P., Hiller R.G., Welte W. et Diederichs K., 1996. Structural basis of light harvesting by carotenoids peridinin-chlorophyll-protein from *Amphidinium carterae*. *Science* **272**: 1788-1791.
- Hoge F.E., Wright C.W., Swift R.N., Yungel J.K., Berry R.E. et Mitchell R. 1998. Fluorescence signatures of an iron enriched phytoplankton community in the eastern equatorial Pacific Ocean. *Deep Sea Res.* **45**: 1083-1092.
- Holbrook D., Yen J.H. et Grizzard T.J. 2006. Characterizing natural organic material from the Occoquan Watershed (Northern Virginia, US) using fluorescence spectroscopy and PARAFAC. *Sci. Total Environ.* **361**: 249–266.
- Holm-Hansen O., Lubin D. et Helbling E.W. 1993. Ultraviolet radiation and its effects on organisms in aquatic environments. In: W. (eds.): Environmental UV photobiology. *Plenum Press, New York*, pp. 379 - 425.
- Hossain Z., Makino T. et Komatsu S. 2012. Proteomic study of  $\beta$ -aminobutyric acid-mediated cadmium stress alleviation in soybean. *J. Proteomics* **75**: 4151-4164.
- Hu Y., Wang G., Chn G.Y.J., Fu X. et Yao S.Q. 2003. Proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under metal stress by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Electrophoresis* **24**: 1458-1470.
- Hudson R.J.M. 1998. Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Observations and predictions of non-equilibrium effects. *Sci. Total Environ.* **219**: 95-115.
- Ifremer. 2007. La culture du phytoplancton dans les bassins aquacoles. Aspects théoriques et applications pratiques : Ifremer /DAC/RST 2007-04.
- Inouye S. 2007. Expression, purification and characterization of calcium-triggered luciferin-binding protein of *Renilla reniformis*. *Prot. Expr. Purif.* **52**: 66-73.
- Ireland E., Harding S.J., Bonwick G.A., Jones M., Smith C.J. et Williams J.H. 2004. Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*. *Biomarkers* **9**:139-155.
- Iriarte A. et Purdie D.A. 1993. Photosynthesis and growth response of the oceanic picoplankter *Pycnococcus provasolii* Guillard to variations in irradiance, photoperiod and temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **168**: 239 - 257.
- Ishida H., Nishimori Y., Sugisawa M., Makino A. et Mae T. 1997. The Large Subunit of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase is Fragmented into 37-kDa and 16-kDa Polypeptides by Active Oxygen in the Lysates of Chloroplasts from Primary Leaves of Wheat. *Plant Cell Physiol.* **4**: 471-479.
- Ishii S.K.L. et Boyer T.H. 2012. Behavior of Reoccurring PARAFAC components in Fluorescent Dissolved Organic Matter in Natural and Engineered Systems: A Critical Review. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 2006 –
- Jackson G.A. 1993. The importance of the DOC pool for primary production estimates. *ICES Marine Science Symposia* **197**: 141-148.
- Jacques G. 1968. Aspects quantitatifs du phytoplancton de Banyuls sur Mer (Golfe du Lion). III – Diatomées et Dinoflagellés de juin 1965 à juin 1968. *Vie et Milieu* **20** : 91-126.
- Jaffé R., Boyer J.N., Lu X., Maie N., Yang C., Scully N.M. et Mock S. 2004. Source characterization of dissolved organic matter in a subtropical mangrove dominated estuary by fluorescence analysis. *Mar. Chem.* **84**: 195-210.
- Jamet J.L. et Ferec-Corbel A.S. 1996. Seasonal variations of the zooplankton community in a littoral marine ecosystem: Toulon Bay (Var, France). *Mar. Life* **6**: 15-20.
- Jamet J.L., Bogé G., Richard S., Geneys C. et Jamet D. 2001. The zooplankton community in bays of Toulon area (northwest Mediterranean Sea, France). *Hydrobiologia* **457**: 155-165.
- Jamet J.L., Jean N., Bogé G., Richard S. et Jamet D. 2005. Plankton succession and assemblage structure in two neighbouring littoral ecosystems in the north-west Mediterranean Sea. *Mar. Fresh. Res.* **56**: 69-83.
- Jean N., Bogé G., Jamet J.L., Richard S. et Jamet D. 2003. Seasonal changes in zooplanktonic alkaline phosphatase activity in Toulon Bay (France): the role of *Cypris* larvae. *Mar. Poll. Bull.* **46**: 346-352.
- Jean N., Boge G., Jamet J.L., Richard S. et Jamet D. 2005. Annual contribution of different plankton size classes to particulate dimethylsulfoniopropionate in a marine perturbed ecosystem. *J. Marine Syst.* **53**: 235 - 247.

- Jean N., Boge G., Jamet J.L. et Jamet D. 2006. Comparison of  $\beta$ -dimethylsulfoniopropionate (DMSP) levels in two Mediterranean ecosystems with different trophic levels. *Mar. Chem.* **101**: 190 – 202.
- Jean N., Dumont E., Durrieu G., Balliau T., Jamet J.-L., Personnic S. et Garnier C. 2012. Protein expression from zooplankton communities in a metal contaminated NW mediterranean coastal ecosystem. *Mar. Environ. Res.* **80**: 12-26.
- Jensen A., Rystad B. et Melsom S. 1976. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. II. Copper tolerance of three species in dialysis and batch cultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **22**: 249–256.
- Jensen L.M. 1983. Phytoplankton release of extracellular organic carbon, molecular weight composition, and bacterial assimilation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **11**: 39-48.
- Joanny M., Belin C., Claisse D., Miossec L., Berthome J.P., Grouhel A. et Raffin B. 1993. Qualité du milieu marin littoral. Ifremer, Plouzané, 241 p.
- Jouan M., Garreau P. et Raillard O. 2001. Modélisation de la rade de Toulon : test méthodologique. Rapport Ifremer. 117 p.
- Kang K.H., Shin H.S. et Park H. 2002. Characterization of humic substances present in landfill lactates with different ages and implications. *Water Res.* **36**: 4023-4032.
- Kang G., Li, G., Zheng B., Han Q., Wang C., Zhu Y. et Guo Y. 2012. Proteomic analysis on salicylic acid-induced salt tolerance in common wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Biochim. Biophys. Ac. (BBA) – Prot. Proteomics* **1824**: 1324–1333
- Kaplan D., Christiaen D. et Arad S. 1987. Chelating Properties of Extracellular Polysaccharides from *Chlorella* spp. *Appl. Environ. Microb.* **53**: 2953 – 2956.
- Khan S.H. et Saifullah S.M. 1986. Bioassay studies of phytoplankton of coastal waters of Karachi in relation of heavy metal pollution: I. Effect of copper and lead on *Skeletonema costatum*. *Pak. J. Bot.* **18**: 137 – 145.
- Kieffer F. 1991. Metals as essential trace elements for plants, animals and humans. In: E. Merian, Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis and biological relevance. *Weinheim, New-York*, pp 481 – 489.
- Kieffer P., Dommes J., Hoffmann L., Hausman J.F. et Renaut J. 2008. Quantitative changes in protein expression of cadmium – exposed poplar plants. *Proteomics* **8**: 2514-2530.
- Kieffer P., Schroder P., Dommes J., Hoffmann L., Renaut J. et Hausman J.F. 2009. Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *J. Proteomics* **72**: 379-396.
- Kiliç N.K., Stensballe A., Otzen D.E. et Dönmez G. 2010. Proteomic changes in response to chromium VI toxicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biores. Technol.* **101**: 2134-2140.
- Kim S.Y., Hwang K.Y., Kim S.H., Sung H.C., Han Y.S. et Cho Y. 1999. Structural basis for cold adaptation. Sequence, biochemical properties, and crystal structure of malate dehydrogenase from a psychrophile *Aquaspirillum arcticum*. *J. Biol. Chem.* **274**: 11761-11767.
- Kim Y., Joachimiak A., Edwards A., Xu X., Pennycooke M., Gu J., Cheung F. et Christendat D. 2003. Crystal structure of thermoplasma acidophilum 0175 (apc014) <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/1kyt>
- Kim Y., Yakunin A.F., Kuznetsova E., Xu X., Pennycooke M., Gu J., Cheung F., Proudfoot M., Arrowsmith C.H., Joachimiak A., Edwards A.M. et Christendat D. 2004. Structure- and function-based characterization of a new phosphoglycolate phosphatase from *Thermoplasma acidophilum*. *J. Biol. Chem.* **279**: 517-526.
- Kobayashi F., Maki T., Nakamura Y. et Ueda K. 2005. Determination of Cu, Pb, Fe, and Zn in plant component polymers of a hyperaccumulating plant. *Anal. Sci.* **21**: 1553-1556.
- Kobayashi Y., Hoekenga O.A., Itoh H., Nakashima M., Saito S., Shaff J.E., Maron L.G., Piñeros M.A., Kochian L.V. et Koyama H. 2007. Characterization of AtALMT1 expression in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **145**: 843-852.
- Kobiyama A., Tanaka S., Kaneko Y., Lim P.T. et Ogata T. 2010. Temperature tolerance and expression of heat shock protein 70 in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Harmful Algae* **9**: 180-185.
- Kosová K., Vítámvás P., Prášil I.T. et Renaut J. 2011. Plant proteome changes under abiotic stress. Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *J. Proteomics* **74**: 1301-1322.
- Kowalczyk P., Ston-Egiert J., Cooper W.J., Whitehead R.F. et Durako M.J. 2005. Characterization of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Baltic Sea by excitation emission matrix fluorescence spectroscopy. *Mar. Chem.* **96**: 273-292.
- Krantev A., Yordanova R., Janda T., Szalai G. et Popova L. 2008. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *J. Plant Physiol.* **165**: 920-931.
- Krom M.D., Brenner S., Israilov L. et Krumgalz B. 1991. Dissolved nutrients, performed nutrients and calculated elemental ratios in the South-East Mediterranean Sea. *Oceanol. Acta* **14**: 189-194.
- Kruger N.J. et Schaewen A.V. 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 236-246.

- Kumar S., Harrylock M., Walsh K.A., Cormier M.J. et Charbonneau H. 1990. Amino acid sequence of the Ca<sup>2+</sup> triggered luciferin binding protein of *Renilla reniformis*. *FEBS Lett.* **268**: 287-290.
- Laabir M., Genovesi-Giunti B., Barré N., Vaquer A., Collos Y., Erard-Le-Denn E., Cecchi P., Pons V. et Bibent B. 2004. The resting cyst of *Alexandrium catenella*, a dinoflagellate responsible for harmful algal blooms in Thau lagoon (Western French Mediterranean coast). In: Steidinger K.A., Landsberg J.H., Tomas C.R., Vargo G.A. (Eds.), *Harmful Algae 2002*. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco, pp. 26-28.
- Laabir M., Jauzein C., Genovesi B., Masseret E., Grzebyk D., Cecchi P., Vaquer A., Perrin I. et Collos Y. 2011. Importance of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *J. Plankton Res.* **33**: 1550-1563.
- Laane R.W.P.M. et Koole L. 1982. The relation between fluorescence and dissolved organic carbon in the Ems-Dollart estuary and the Western Wadden sea. *Netherlands J. Sea. Res.* **15**: 217-227.
- Laemmli K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lage O.M., Parente A.M., Soares H.M.V.M., Vasconcelos M.T.S.D. et Salema R. 1994. Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch cultures. *Eur. J. Phycol.* **29**: 253 – 260.
- Lampert W. 1978. Release of dissolved organic carbon by grazing zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* **23**: 831–834.
- Lancelot C. 1979. Gross excretion rates of natural marine phytoplankton and heterotrophic uptake of excreted products in the southern North Sea, as determined by short-term kinetics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1**: 179-186.
- Lancelot C. et Billen G. 1985. Carbon–nitrogen relationships in nutrient metabolism of coastal marine ecosystems. In: Jan-nasch, H.W., Williams, P.J. leB Eds. *Adv. Aquat. Microbiol.* **3**: 263–321.
- Landry M.R. et Hassett R.P. 1982. Estimating the grazing impact of marine microzooplankton. *Mar. Biol.* **67**: 283-288.
- Larsen P.B., Degenhardt J., Tai C.Y., Stenzler L.M., Howell S.H. et Kochian L.V. 1998. Aluminum-resistant *Arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminium accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol.* **117**: 9-18.
- Le Faucheur S., Behra R. et Sigg L. 2005. Phytochelatin induction, cadmium accumulation and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**: 1731-1737.
- Le Q.H., Markovic P., Hastings J.W., Jovine R.V.M. et Morse D. 1997. Structure and organization of the peridinin-chlorophyll a-binding protein gene in *Gonyaulax polyedra*. *Mol. Gen. Genet.* **255**: 595-604.
- Leboulanger C., Oriol L., Jupin H. et Descolas-Gros C. 1997. Diel variability of glycolate in the eastern tropical Atlantic Ocean. *Deep Sea Res.* **44**: 2131-2139.
- Lecuyer B., Arrio B., Fresneau C. et Volfin P. 1979. Dinoflagellate luciferases: purification of luciferases from *Gonyaulax polyedra*, *Pyrocystis lunula*, and *Pyrocystis fusiformis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **196**: 371-384.
- Lee Y., Pena-Llopis S., Kang Y.S., Shin H.D., Demple B., Madsen E.L., Jeon C.O. et Park W. 2006. Expression analysis of the fpr (ferredoxin-NADP+ reductase) gene in *Pseudomonas putida* KT2440. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **339**: 1246-1254.
- Lee J.C., Son Y.O., Pratheeshkumar P. et Shi X. 2012. Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radical Bio. Med.* **53**: 742-757.
- Legendre L. et Rassoulzadegan F., 1996a. Food-web mediated export of biogenic carbon in oceans. Hydrodynamic control. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **145**: 179 - 193.
- Le Goffe C., Vallette G., Charrier L., Candelon T., Bou-Hanna C., Bouhours J.F. et Laboisie C.L. 2002. Metabolic control of resistance of human epithelial cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO stresses. *Biochem. J.* **364**: 349-359.
- Leung P.T.Y., Wang Y., Mak S.S.T., Ng W.C. et Leung K.M.Y. 2011. Differential proteomic responses in hepatopancreas and adductor muscles of the green-lipped mussel *Perna viridis* to stresses induced by cadmium and hydrogen peroxide. *Aquat. Toxicol.* **105**: 49-61.
- Levasseur M.E. et Therriault J.C. 1987. Phytoplankton biomass and nutrient dynamics in a tidally induced upwelling: the role of the NO<sub>3</sub>: SiO<sub>4</sub> ratio. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **39**: 87 – 97.
- Lilly E.L., Kulis D.M., Gentien P. et Anderson D.M. 2002. Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from western Pacific: Evidence from DNA and toxin analysis. *J. Plankton Res.* **24**: 443 – 452.
- Ling X.Q., Lu D.Q., Wang J., Tu Q.B., Ren W. et Ouyang P.K. 2009. Optimization of enantio selective production of chiral epichlorohydrin catalyzed by a novel epoxide hydrolase from domestic duck liver by response surface methodology. *Afr. J. Biotechnol.* **8**: 5534-5541.
- Lodeyro A.F., Ceccoli R.D., Karlusich J.J.P. et Carrillo N. 2012. The importance of flavodoxin for environmental stress tolerance in photosynthetic microorganisms and transgenic plants. Mechanism, evolution and biotechnological potential. *FEBS Lett.* **586**: 2917-2924.

- Logan B.E., Grossart H.P. et Simon M. 1994. Direct observation of phytoplankton, TEP, and aggregates on polycarbonate filters using bright field microscopy. *J. Plankton Res.* **16**: 1811-1815.
- Lorenzo J.I., Nieto-Cid M., Alvarez-Salgado X.A., Perez P. et Beiras R. 2007. Contrasting complexing capacity of dissolved organic matter produced during the onset, development and decay of a simulated bloom of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Mar. Chem.* **103**: 61 – 75.
- Lowry O.H., Rosenbraugh N.J., Farr A.L. et Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Luciani X., Mounier S., Paraquetti H.H.M., Redon R., Lucas Y., Bois A., Lacerda L.D., Raynaud M. et Ripert M. 2008. Tracing of dissolved organic matter from the SEPETIBA Bay (Brazil) by PARAFAC analysis of total luminescence matrices. *Mar. Environ. Res.* **65**: 148-157.
- Luciani X., Mounier S., Redon R. et Bois A. 2009. A simple correction method of inner filter effects affecting FEEM and its application to the PARAFAC decomposition. *Chemometr. Intell. Lab.* **96**: 227-238.
- Lyngstadaas A., Løbner-Olesen A. et Boye E. 1995. Characterization of three genes in the dam-containing operon of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 546-554.
- Mac Kenzie L., De Salas M., Adamson J. et Beuzenberg V. 2004. The dinoflagellate genus *Alexandrium* (Halim) in New Zealand coastal waters: comparative morphology, toxicity and molecular genetics. *Harmful Algae* **3**: 71 – 92.
- Mague T.H., Friberg E., Hughes D.J. et Morris I. 1980. Extracellular release of carbon by marine phytoplankton; a physiological approach. *Limnol. Oceanogr.* **25**: 262–279.
- Maksymiec W., Wójcik M. et Krupa Z. 2007. Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere* **66**: 421-427.
- Malone T.C. et Neale P.J. 1981. Parameters of light dependent photosynthesis for phytoplankton size fraction in temperate estuarine and coastal environment. *Mar. Biol.* **61**: 289 - 297.
- Mamedov T.G., Suzuki K., Miura K., Kucho K. et Fukuzawa H. 2001. Characteristics and sequence of phosphoglycolate phosphatase from a eukaryotic green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **276**: 45573-45579.
- Mandelli E.F. 1969. The inhibitory effects of copper on marine phytoplankton. *Contr. Mar. Sci.* **14**: 47 – 57.
- Mantoura R.F.C., Martin J.M. et Wollast R. 1991. Ocean margin processes in global change. Dahlem Workshop Report, Wiley, Chichester, West Sussex, England, 469 pp.
- Marzano V., Santini S., Rossi C., Zuccherelli M., D'alessandro A., Marchetti C., Mingardi M., Stagni V., Barila D. et Urbani A. 2012. Proteomic profiling of ATM kinase proficient and deficient cell lines upon blockage of proteasome activity. *J. Proteomics* **75**: 4632-4646.
- Masseret E., Grzebyk D. et Nagai S. 2009. Unexpected genetic diversity among and within populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* as revealed by nuclear microsatellite markers. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 2037-2045.
- Mayer M.P. et Bukau B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* **62**: 670-684.
- McCarthy M., Hedges J.I., Benner R. 1993. The chemical composition of dissolved organic matter in seawater. *Chem. Geol.* **107**: 503–507.
- McCarthy M., Hedges J.I. et Benner R. 1996. Major biochemical composition of dissolved high-molecular weight organic matter in seawater. *Mar. Chem.* **55**: 281-297.
- MacCarthy P. 2001. The principles of humic substances. *Soil Sci.* **166**: 738-751.
- Means A.R. et Dedman J.R. 1980. Almodulin-an intracellular calcium receptor. *Nature* **285**: 73-77.
- Midorikawa T. et Tanoue E. 1998. Molecular masses and chromophoric properties of dissolved organic ligands for copper (II) in oceanic water. *Mar. Chem.* **62**: 219-239.
- Miller-Morey J.S. et Van Dolah F.M. 2004. Differential responses of stress proteins, antioxidant enzymes, and photosynthetic efficiency to physiological stresses in the Florida red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **138**: 493-505.
- Millero F.J. 1992. Stability constants for the formation of rare earth inorganic complexes of a function of ionic strength. *Geochim. Cosmochim. Ac.* **56**: 123–132.
- Miquel M. 2001. Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Rapport Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (Dir.). *Rapport Sénat* n°26: 360.
- Mittler R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**: 405-410.
- Mopper K. et Schultz C.A. 1993. Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components. *Mar. Chem.* **41**: 229-238.
- Mopper K., Zhou J., Ramana K.S., Passow U., Dam H.G. et Drapeau D.T. 1995. The role of surface-active carbohydrates in the flocculation of a diatom bloom in a mesocosm. *Deep Sea Res.* **42**: 47-73.
- Morel N.M.L., Rueter J.C. et Morel F.M.M. 1978. Copper toxicity of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* **14**: 43 – 48.

- Morel A. et André J.M. 1991. Pigment distribution of primary production in the western Mediterranean as derived and modelled from coastal zone scanner observation. *J. Geophys. Res.* **96**: 12685 - 12698.
- Morelli E. et Scarano G. 2001. Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Environ. Res.* **52**: 383-395.
- Morse D., Fritz L., Pappenheimer A.M. et Hastings J.W. 1989. Properties and cellular localization of a luciferin binding protein in the bioluminescence reaction of *Gonyaulax polyedra*. *J. Biolumin. Chemilumin.* **3**: 79-83.
- Mounier S., Patel N., Quilici L., Benaim J.Y. et Benamou C. 1999. Fluorescence 3D de la matière organique dissoute du fleuve amazon (Three-dimensional fluorescence of the dissolved organic carbon in the Amazon River). *Water Res.* **33**: 1523-1533.
- Moutin T. et Raimbault P. 2002. Primary production, carbon export and nutrient availability in western and eastern Mediterranean Sea in early summer. *J. Marine Syst.* **322**: 651-659.
- Murphy L.S. et Belastock R.A. 1980. The effects of environmental origin on the response of marine diatoms to chemical stress. *Limnol. Oceanogr.* **25**: 160-165.
- Murphy K.R., Stedmon C.A. et Waite T. 2008. David, Ruiz Gregory M. Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy. *Mar. Chem.* **108**: 40-58.
- Myklestad S.M. 1995. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Sci. Total Environ.* **165**: 155 - 164.
- Nagao S., Mastunnga T., Suzuki Y., Ueno T. et Amano H. 2003. Characteristics of humic substances in the Kuji River waters as determined by high-performance size exclusion chromatography with fluorescence detection. *Water Res.* **37**: 4159-4170.
- Nagata T. 2000. Production mechanisms of dissolved organic matter, p. 121-152. In D. L. Kirchman [ed.], *Microbial ecology of the oceans*. John Wiley.
- Nagorski R.W. et Richard J.P. 2001. Mechanistic imperatives for aldose-ketose isomerization in water: specific, general base- and metal ion-catalyzed isomerization of glyceraldehyde with proton and hydride transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 794-802.
- Neale P.J. et Richardson P.J. 1987. Photoinhibition and the diurnal variation of phytoplankton photosynthesis. I. Development of photosynthesis irradiance model from studies of *in situ* responses. *J. Plankton Res.* **9**: 167 - 193.
- Nicolardi V., Cai G., Parrotta L., Puglia M., Bianchi L., Bini L. et Gaggi C. 2012. The adaptive response of lichens to mercury exposure involves changes in the photosynthetic machinery. *Environ. Poll.* **160**: 1-10.
- Nicolas M.T., Sweeney B.M. et Hastings J.W. 1987. The ultrastructural localization of luciferase in three bioluminescent dinoflagellates, two species of *Pyrocystis*, and *Noctiluca*, using anti-luciferase and immunogold labelling. *J Cell Sci.* **87**: 189-196.
- Nishikawa K., Yamakoshi Y., Uemura I. et Tominaga N. 2003. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**: 253-259.
- Noctor G. et Foyer C.H. 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 249-279.
- Noctor G., Arisi A.C.M., Jouanin L., et Christine H.F. 1999. Photorespiratory glycine enhances glutathione accumulation in both the chloroplastic and cytosolic compartments. *J. Exp. Bot.* **50**: 1157-1167.
- Norris B.J. et Miller D.J. 1994. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the precursor of the peridinin-chlorophyll a-binding protein from the dinoflagellate *Symbiodinium* sp. *Plant Mol. Biol.* **24**: 673-677.
- O'Farrell H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- Oh T.J., Kim I.G., Park S.Y., Kim K.C. et Shim H.W. 2002. NAD-dependent malate dehydrogenase protects against oxidative damage in *Escherichia coli* K-12 through the action of oxaloacetate. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **11**: 9-14.
- Okamoto O.K. et Colepicolo P. 1998. Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **119**: 67-73.
- Okamoto O.K., Shao L., Hastings J.W. et Colepicolo P. 1999. Acute and chronic effects of toxic metals on viability, encystment and bioluminescence in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **123**: 75-83.
- Okamoto O.K., Pinto E., LaTorre L.R., Bechara E.J.H. et Colepicolo P. 2001. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **40**: 18-24.
- Osmond C.B. et Grace S.C. 1995. Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis. *J. Exp. Bot.* **46**: 1351-1362.

- Ozcan S., Yildirim V., Kaya L., Albrecht D., Becher D., Hecker M. et Ozcengiz G. 2007. *Phanerochaete chrysosporium* soluble proteome as a prelude for the analysis of heavy metal stress response. *Proteomics* **7**: 1249-1260.
- Pakulski J.D. et Benner R. 1994. Abundance and distribution of carbohydrates in the ocean. *Limnol. Oceanogr.* **39**: 930-940.
- Palatnik J.F., Valle E.M. et Carrillo N. 1997. Oxidative stress causes ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase solubilization from the thylakoid membranes in methyl viologen-treated plants. *Plant Physiol.* **113**: 1721-1727.
- Pandey S., Rai R. et Rai L.C. 2012. Proteomics combines morphological, physiological and biochemical attributes to unravel the survival strategy of *Anabaena* sp. PCC7120 under arsenic stress. *J. Proteomics* **75**: 921-937.
- Pankovic D., Plesnicar M., Arsenijenic-Maksimovic I., Petrovic N., Sakac Z. et Kastori R. 2000. Effects of nitrogen nutrition on photosynthesis in Cd-treated sunflower plants. *Ann. Bot.* **86**: 841-847.
- Park Y., Chow W.S., Barry C., Osmond I. et Anderson J.M. 1996. Electron transport to oxygen mitigates against the photoinactivation of Photosystem II in vivo. *Photosynth. Res.* **50**: 23-32.
- Parker M.S. et Armbrust E.V. 2005. Synergetic effects of light, temperature, and nitrogen source on transcription of genes for carbon and nitrogen metabolism in the centric diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* **41**: 1142-1153.
- Parlanti E., Worz K., Geoffroy L. et Lamotte M. 2000. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Org. Geochem.* **31**: 1765-1781.
- Passow U. et Wassmann P. 1994. On the trophic fate of *Phaeocystis pouchetii* (Hariot): IV. The formation of marine snow by *P. pouchetii*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **104**: 151-163.
- Passow U. et Alldredge A.L. 1995. A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP). *Limnol. Oceanogr.* **40**: 1326-1335.
- Passow U. 2002. Transparent exopolymer particles (TEP) in the aquatic environments. *Prog. Oceanogr.* **55**: 287-333.
- Patel-Sorrentino N., Mounier S. et Benaim J.Y. 2002. Excitation - emission fluorescence matrix to study pH influence on organic matter fluorescence in the Amazon Basin Rivers. *Water Res.* **36**: 2571-2581.
- Pawlik-Skowronska B. 2001. Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. *Aquat. Toxicol.* **52**: 241-249.
- Pellet D.M., Grunes D.L. et Kochian L.V. 1995. Organic acid exudation as an aluminium tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* **196**: 788-795.
- Pena L.B., Pasquini L.A., Tomaro M.L. et Gallago S.M. 2007. 20S Proteasome and accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins in maize leaves subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* **68**: 1139-1146.
- Penna A., Berluti S., Penna N. et Magnani M. 1999. Influence of nutrient ratios on the in vitro extracellular polysaccharide production by marine diatoms from the Adriatic Sea. *J. Plankton Res.* **21**: 1681-1690.
- Penna A., Garcés E., Vila M., Giacobbe M.G., Fraga S., Lugliès A., Bravo I., Bertozzini E. et Vernesi C. 2005. *Alexandrium catenella* (Dinophyceae), a toxic ribotype expanding in the NW Mediterranean Sea. *Mar. Biol.* **148**: 13 - 23.
- Peperzak L., Colijn F., Koeman R., Gieskes W.W.C. et Joordens J.C.A. 2003. Phytoplankton sinking rates in the Rhine region of fresh water influence. *J. Plankton Res.* **25**: 365-383.
- Picard D. 2002. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol. Life Sci.* **59**: 1640-1648.
- Pinto E., Sigaud-Kutner T.C.S., Leitao M.A.S., Okamoto O.K., Morse D. et Colepicolo P. 2000. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* **39**: 1008-1018.
- Piscator M. 1964. On cadmium in normal human kidneys with a report on the isolation of metallothionein from cadmium exposed rabbit livers. *Nord Hyg. Tidskr.* **45**: 76-82.
- Pistocchi, R., Guerrini, F., Balboni, V. et Boni, L., 1997. Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium* sp. *Eur. J. Phycol.* **32**: 125-132.
- Plavsić M., Lee C., Čosović B. et Lee C. 2006. Copper complexing properties of melanoidins and marine humic material. *Sci. Total Environ.* **366**: 310-319.
- Poirier I., Jean N., Guary J.C. et Bertrand M. 2009. Robustness to cell disruption of heavy metal-resistant *Pseudomonas fluorescens* BA3SM1 isolates. *Environ. Eng. Sci.* **26**: 1451-1457.
- Pollak N., Dölle C. et Ziegler M. 2007. The power to reduce: pyridine nucleotides—small molecules with a multitude of functions. *Biochem J. Mar.* **402**: 205-218.
- Prasad G.S., Kresge N., Muhlborg A.B., Shaw A., Stout C.D., Jung Y.S. et Burgess B.K. 1998. The crystal structure of NADPH: Ferredoxin reductase from *Azotobacter vinelandii*. *Prot. Sci.* **7**: 2541-2549.
- Prézélin B.B. et Haxo F.T. 1976. Purification and characterization of peridinin-chlorophyll a-proteins from the marine dinoflagellates *Glenodinium* sp and *Gonyaulax polyedra*. *Planta* **128** : 133-141.

- Puddu A., Zoppini A., Fazi S., Rosati M., Amalfitano S. et Magaletti E. 2003. Bacterial uptake of DOM released from P-limited phytoplankton. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **46**: 257-268.
- Putman S.J., Coulson A.F., Farley I.R., Riddeston B. et Knowles J.R. 1972. Specificity and kinetics of triose phosphate isomerase from chicken muscle. *J. Biochem.* **192**: 301-310.
- Ralsler M., Heeren G., Breitenbach M., Lehrach H. et Krobitch S. 2006. Triose phosphate isomerase deficiency is caused by altered dimerization--not catalytic inactivity--of the mutant enzymes. *Plos One* **1**: e30.
- Ralsler M., Wamelink M.M., Kowald A., Gerisch B., Heeren G., Struys E.A., Klipp E., Jakobs C., Breitenbach M., Lehrach H. et Krobitch S. 2007. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J. Biol.* **21**: 10.
- Ralsler M., Nebel A., Kleindorp R., Krobitch S., Lehrach H., Schreiber S., Reinhardt R. et Timmermann B. 2008. Sequencing and genotypic analysis of the triosephosphate isomerase (TPI 1) locus in a large sample of long-lived Germans. *BMC Genet.* **9**: 38-42.
- Ramaglia V., Harapa G.M., White N. et Buck L.T. 2004. Bacterial infection and tissue-specific Hsp72, -73 and -90 expression in western painted turtles. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **138**: 139-148.
- Ramvalho J.C., Campos P.S., Teixeira M. et Nuenes M.A. 1998. Nitrogen dependent changes in antioxidant system and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. *Plant Sci.* **135**: 115-124.
- Rausser W.E. 1995. Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol.* **109**: 1141-1149.
- Raven J.A., Evans M.C.W. et Korb R.E. 1999. The role of trace metals in photosynthetic electron transport O<sub>2</sub> evolving organisms. *Photosynth. Res.* **60**: 111 - 149.
- Remans T., Opendakker K., Guisez Y., Carleer R., Schat H., Vangronsveld J. et Cuypers A. 2012. Exposure of *Arabidopsis thaliana* to excess Zn reveals a Zn- specific oxidative stress signature. *Environ. Exp. Bot.* **84**: 61-71.
- Reumann S. et Weber A.P.M. 2006. Plant peroxisomes respire in the light: Some gaps of the photorespiratory C<sub>2</sub> cycle have become filled—Others remain. *Biochim. Biophys. Ac. – Mol. Cell Res.* **1763**: 1496–1510.
- Revelante N. et Gilmartin M. 1976. The effects of P River discharge on phytoplankton dynamics in the northern Adriatic Sea. *Mar. Biol.* **34**: 259-271.
- Richard S. et Jamet J.L. 2001. An unusual distribution of *Oithona nana* Giesbrecht (1882) (Crustacea: Cyclopoida) in a bay: the case of Toulon Bay (France, Mediterranean sea). *J. Coast. Res.* **17**: 957-963.
- Richards F.A. et Thompson T.G. 1952. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J. Mar. Res.* **11**: 156-172.
- Ridame C., Guieu C. et Loy E-Pilot M.D. 1999. Trend in total atmospheric deposition fluxes of aluminium, iron and trace metals in the north western Mediterranean, over the past decade (1985–1997). *J. Geophys. Res.* **104**: 127-138.
- Ridame. C. 2001. Rôle des apports atmosphériques d'origines continentales dans la biogéochimie marine. Impact des apports sahariens sur la production primaire en Méditerranée. *Thèse Université Paris VI*, 246 pp.
- Rincé Y., Lebeau T. et Robert J.M. 1999. Artificial cell-immobilization: a model stimulating Immobilization in natural environments ? *J. Appl. Phycol.* **11**: 263-272.
- Riper D.M., Owens T.G. et Falkowski P.G. 1979. Chlorophyll turnover in *Skeletonema costatum*. A marine plankton diatom. *Plant Physiol.* **64**: 49 -54.
- Riva A. et Lelong P. 1981. Growth of juvenile bivalve molluscs associated with continuous cultures of natural marine phytoplankton. pp 253-268.
- Rivetta A., Negrini N. et Cocucci M. 1997. Involvement of Ca<sup>2+</sup> calmodulin in Cd<sup>2+</sup> toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Cell Environ.* **20**: 600-608.
- RNO (1974-2004). "Surveillance du milieu marin. Bulletins annuels édités par l'Ifremer et le Ministère de l'Aménagement du Territoire de l'Environnement.
- Robert R. 1994. Visite de trois écloses industrielles de mollusques bivalves dans l'Etat de Washington et en Colombie Britannique: Rôle et importance. *Equinoxe* **50**: 19-31.
- Rochelle-Newall E.J. et Fisher T.R. 2002. Chromophoric dissolved organic matter and dissolved organic carbon in Chesapeake Bay. *Mar. Chem.* **77**: 23-41.
- Rodrigues P.M., Silva T.S., Dias J. et Jessen F. 2012. Proteomics in aquaculture: applications and trends. *J. Proteomics* **75**: 4325-4345.
- Romankevich E.A. 1984. Geochemistry of Organic Matter in the Ocean. Springer Verlag, Berlin, pp. 199-229.
- Romdhane M.S., Eilertsen H.C., Daly Yahia-Kefi O. et Daly Yahia M.N. 1998. Toxic dinoflagellate blooms in Tunisian lagoons: causes and consequences for aquaculture. In: *Harmful Algae* (B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt eds), pp. 80-83. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Vigo.

- Romeo M., Bennami N., Gnessia-Barelli M., Lafaurie M. et Girard J.P. 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol.* **48**: 185-194.
- Rossi N. et Jamet J.L. 2008. In situ heavy metals (copper, lead and cadmium) in different plankton compartments and suspended particulate matter in two coupled Mediterranean coastal ecosystems (Toulon Bay, France). *Mar. Poll. Bull.* **56**: 1862-1870.
- Rousseau V., Vaulot D., Casotti R., Cariou V., Lenz J., Gunkel J. et Baumann M.E.M. 1994. The life cycle of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae): Evidence and hypotheses. *J. Marine Syst.* **5**: 23-39.
- Roy H., Cannon S. et Gilson M. 1988. Assembly of Rubisco from native subunits. *Biochim. Biophys. Ac.* **957**: 323-334.
- Rueter J.G. 1977. The response of *Skeletonema costatum* to copper Relating to the Questions of Medium Conditioning. Masters Thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts. pp 35.
- Sakka Hlaili A., Legendre L., Gosselin M., Le Blanc., Delesalle B. et Price N.M. 1999. Nitrate, phosphore, and iron limitation of phytoplankton assemblage in the lagoon of Takapoto Atoll (Tuamotu Archipelago, French Polynesia). *Aquat. Microb. Ecol.* **19**: 149-161.
- Sakka Hlaili A., Legendre L., Gosselin M., Niquil N. et Delesalle B. 2002. Carbon budget of the planktonic food web in an atoll lagoon (Takapoto French Polynesia). *J. Plankton Res.* **24**: 301-320.
- Sakka Hlaili A., Grami B., Niquil N., Gosselin M., Dominique H. et Troussellier M. 2008. The planktonic food web of the Bizerte lagoon (South-Western Mediterranean) during summer: I. Spatial distribution under different anthropogenic pressures. *Estuar. Coast. Shelf S.* **78**: 61-77.
- Salvucci M.E., Werneke J.M., Ogren W.L. et Portis A.R. 1987. Purification and species distribution of rubisco activase. *Plant Physiol.* **84**: 930-936.
- Sanchez-Azqueta A., Musumeci M.A., Martinez-Julvez M., Ceccarelli E.A. et Medina M. 2012. Structural backgrounds for the formation of a catalytically competent complex with NADP(H) during hyride transfer in ferredoxin-NADPH reductases. *Biochim. Bioph. Ac. Bioenergetics* **1817**: 1063-1071.
- Sanders B.M. et Martin L.S. 1991. Relationships between accumulation of a 60 kDa stress protein and scope-for-growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Mar. Environ. Res.* **31**: 81-97.
- Scholin C.A. et Anderson D.M. 1994. Identification of group and stain-specific genetics markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). I RFLP analysis of SSUrRNA genes. *J. Phycol.* **30**: 744 – 754.
- Sciandra A., Harlay J., Lefevre D., Lemee R. et Rimmelin P. 2003. Response of coccolithophorid *Emiliania huxleyi* to elevated partial pressure of CO<sub>2</sub> under nitrogen limitation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **261**:111-122.
- Sellner K.G., Doucette G.J. et Kirkpatrick G.J. 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **30**: 383 – 406.
- Senesi N. 1990. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals: Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Anal. Chim. Ac.* **232**: 77-106.
- Shah K. et Dubey K. 1995. Effect of cadmium on RNA levels as well as activity and molecular forms of ribonuclease in growing rice seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* **33**: 577-584.
- Shang F. et Taylor A. 2012. Roles for the ubiquitin-proteasome pathway in protein quality control and signaling in the retina: implications in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Mol. Aspects Med.* **33**: 446-466.
- Shi H., Sui Y., Wang X., Luo Y. et Ji L. 2005. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **140**: 115-21.
- Shimizu Y., Kinoshita M. et Ooi F. 1998. Highly sensitive, non-radioactive assays for protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A. In: *Harmful Algae*, B. Reguera, M.L. Fernandez and T. Wyatt (eds), Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 537-540.
- SIAT. 2002. Contrat de baie. Dossier définitif. 124 p.
- Siedlecka A. et Krupa Z. 2004. Rubisco activity maintenance in environmental stress conditions: How many strategies ? *Cell Mol. Biol. Lett.* **9**: 56-57.
- Sierra M.M.D., Giovanela M., Parlanti E. et Sorriano-Sierra E.J. 2005. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* **58**: 715-733.
- Sigaud-Kutner T.C.S., Pinto E., Okamoto O.K., Latorre L.R. et Colepicolo P. 2002. Changes in superoxide dismutase activity and photosynthetic pigment content during growth of marine phytoplankters in batch – cultures. *Physiol. Plantarum* **114**: 566-571.
- Silvestre F., Dierick J.F., Dumont V., Dieu M., Raes M. et Devos P. 2006. Differential protein expression profiles in anterior gills of *Eriocheir sinensis* during acclimatation to cadmium. *Aquat. Toxicol.* **76**: 46-58.

- Siu G.K.Y., Young M.L.C. et Chan D.K.O. 1997. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Hydrobiologia* **352**: 117 – 140.
- Skoog A. et Benner R. 1997. Aldoses in various size fractions of marine organic matter: implications for carbon cycling. *Limnol. Oceanogr.* **42**: 1803 – 1813.
- Smayda T. 1997a. What is a bloom ? A commentary. *Limnol. Oceanogr.* **42**: 1132-1136.
- Smayda T. 1997b. Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol. Oceanogr.* **42**: 1137-1153.
- Smeets K., Cuypers A., Lambrechts A., Semane B., Hoet P., Van Laere A. et Vangronsveld J. 2005. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol. Biochem.* **43**: 437-444.
- Smith R.C., Baker K.S., Holm-Hansen O. et Olson R. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural waters. *Photochem. Photobiol.* **31**: 585-590.
- Somerville C.R. et Ogren W.L. 1979. Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature* **286**: 257-259.
- Somji S., Ann Sens M., Garrett S.H., Gurel V., Todd J.H. et Sens D.A. 2002. Expression of hsp 90 in the human kidney and in proximal tubule cells exposed to heat, sodium arsenite and cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* **133**: 241-254.
- Souchu P., Vaquer A. et Collos Y. 2001. Influence of shellfish farming, activities on the biogeochemical composition of the water column in Thau lagoon. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **218**: 141-152.
- Sournia A. 1973. La production primaire planctonique en méditerranée. Essai de mise à jour. New lettre of coopérative Investigation in the méditerranéen Sea (ed.), Monaco, 5, 127.
- Srarfi F., Tagourti M.A., Tlig S. et Shimi S.N. 2010. Influence de la séparation granulométrique sur la composition des sédiments en métaux lourds de la lagune de Bizerte (Tunisie). *Com. Sci. Technol.* **8**: 95-103.
- Staats N., Stal L.J. et Mur L.R. 2000. Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium*: effects of nutrient conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **249**: 13-27.
- Stadtman E.R., Van Remmen H., Richardson A., Wehr N.B. et Levine R.L. 2005. Methionine oxidation and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Prot. Proteomics* **1703**: 135-140.
- Stauber J.L. et Florence T.M. 1987. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Mar Biol.* **94**: 511- 519.
- Stedmon C.A., Markager S. et Bro R. 2003. Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Mar. Chem.* **82**: 239-254.
- Stedmon C.A. et Markager S. 2005. Tracing the production and degradation of autochthonous fractions of dissolved organic matter by fluorescence analysis. *Limnol. Oceanogr.* **50**: 1415-1426.
- Steeman-Nielsen E. et Wium Andersen S. 1970. Copper ions as poison in the sea and in freshwater. *Mar. Biol.* **6**: 93-97.
- Stefan M.I., Edelstein S.J. et Le Novère N. 2008. An allosteric model of calmodulin explains differential activation of PP2B and CaMKII. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 10768-10773.
- Stern A.L., Burgos E., Salmon L. et Cazzulo J.J. 2007. Ribose 5-phosphate isomerase type B from *Trypanosoma cruzi*: kinetic properties and site-directed mutagenesis reveal information about the reaction mechanism. *Biochem J.* **401**: 279-285.
- Stieger P.A. et Feller U. 1997. Degradation of stromal proteins in pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts under oxidising conditions. *J. Plant Physiol.* **151**: 556-562.
- Stillman M.J. 1995. Metallothioneins. *Coord. Chem. Rev.* **144**: 461-511.
- Stoderegger K. et Herndl G.J. 1998. Production and release of bacterial capsular material and its subsequent utilization by marine bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 877-884.
- Stohs S.J. et Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* **18**: 321-336.
- Strom S., Benner R., Ziegler S. et Dagg M. 1997. Planktonic grazers are a potentially important of marine dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.* **42**: 1364-1374.
- Sukalovic V.H.T., Vuletic M., Markovic K., Vucinic Z. 2011. Cell wall associated malate dehydrogenase activity from maize roots. *Plant Sci.* **181**: 465-470.
- Sunda W.G. et Guillard R.R.L. 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.* **34**: 511-529.
- Suzuki K., Marek L.F. et Spalding M.H. 1990. A photorespiratory mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **93**: 231-237.
- Suzuki C.K., Rep M., Van Dijl J.M., Suda K., Grivell L.A. et Schatz G. 1997. ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 118-123.

- Tarhouni I. 2012. Réponse de la communauté printanière du phytoplancton à une remise en suspension de sédiment contaminé dans la région de Bizerte. *Mémoire de master*. Faculté des Sciences de Bizerte.
- Taylor T.C. et Andersson I. 1997. Structure of a product complex of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Biochemistry* **36**: 4041–4046.
- Tessier E., Garnier C., Mullet J.U., Lenoble V., Arnaud M., Raynaud M. et Mounier S. 2011. Study of the spatial and historical distribution of sediment inorganic contamination in the Toulon Bay (France). *Mar. Poll. Bull.* **62**: 2075 – 2086.
- Thomas W.A., Dodson A.N. et Reid F.M.H. 1978. Diatom productivity compared to other algae in natural marine phytoplankton assemblages. *J. Phycol.* **14**: 250-253.
- Thomas W.H., Hollibaugh J.T. et Seibert D.L.R. 1980. Effects of heavy metals on the morphology of some marine phytoplankton. *Phycologia* **19**: 202-209.
- Thompson E.L., Taylor D.A., Nair S.V., Birch G., Haynes P.A. et Raftos D.A. 2011. A proteomic analysis of the effects of metal contamination on Sydney Rock Oyster (*Saccostrea glomerata*) haemolymph. *Aquat. Toxicol.* **103**: 241-249.
- Thompson E.L., Taylor D.A., Nair S.V., Birch G., Haynes P.A. et Raftos D.A. 2012. Proteomic discovery of biomarkers of metal contamination in Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquat. Toxicol.* **109**: 202-212.
- Tian R.C., Vézina A.F., Starr M. et Saucier F. 2001. Seasonal dynamics of coastal ecosystems and export production at high latitudes: a modelling study. *Limnol. Oceanogr.* **46**: 1845-1859.
- Timperio A.M., Egidì M.G. et Zolla L. 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *J. Proteomics* **71**:391-411.
- Torres E., Cid A., Fidalgo P., Herrero C. et Abalde J. 1997. Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. *Aquat. Toxicol.* **39**: 231- 246.
- Touzet N., Davidson K., Pete R., Flanagan K., McCoy G.R., Amzil Z., Maher M., Chapelle A. et Raine R. 2010. Co-Occurrence of the West European (Gr. III) and North American (Gr. I) Ribotypes of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in Shetland, Scotland. *Protist.* **161**: 370-384.
- Town R.M. et Filella M. 2000a. Dispelling the myths: is the existence of L1 and L2 ligands necessary to explain metal ion speciation in natural waters ? *Limnol. Oceanogr.* **45**: 1341 -1357.
- Town R.M. et Filella M. 2000b. Determination of metal ion binding parameters for humic substances. Part 2. Utility of ASV pseudo-polarography. *J. Electroanal. Chem.* **488**: 1-16.
- Travers M. 1971. Diversité du microplancton du Golfe de Marseille en 1964. *Mar. Biol.* **8**: 308-343.
- Tripathi B.N. et Gaur J.P. 2006. Physiological behavior of *Scenedesmus* sp. during exposure to elevated levels of Cu and Zn after withdrawal of stress. *Protoplasma* **229**: 1–9.
- Turki S. et Balti N. 2005. Detection of toxic *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech in clam production zone of North Lake and Channel, Tunisia. *Harmful Algae* **28**: 1–2.
- Van Assche F.V. et Clijsters H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* **13**: 195-206.
- Vannini C., Marsoni M., Domingo G., Domingo F., Biondi S. et Bracale M. 2009. Proteomic analysis of chromate – induced modifications in *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere* **76**: 1372–1379.
- Vannini C., Domingo G., Marsoni M., Fumagalli A., Terzaghi R., Labra M., De Mattia F., Onelli E. et Bracale M. 2011. Physiological and molecular effects associated with palladium treatment in *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquat. Toxicol.* **102**: 104 – 113.
- Vaquar A., Troussellier M. et Courties C. 1996. Standing Stock and dynamics of picophytoplankton in the Thau Lagoon (Northwest Mediterranean coast). *Limnol. Oceanogr.* **41**: 1821 - 1828.
- Vasconcelos M.T.S.D. et Leal M.F.C. 2001. Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae. *Mar. Chem.* **74**: 65-85.
- Vasconcelos M.T.S.D., Leal M.F.C. et Van Den Berg C.M.G. 2002. Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake and exudation of *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Mar. Chem.* **77**: 187 – 210.
- Venn A.A., Quinn J., Jones R. Et Bodnar A. 2009. P-glycoprotein (multi-xenobiotic resistance) and heat shock protein gene expression in the reef coral *Montastraea franksi* in response to environmental toxicants. *Aquat. Toxicol.* **93**: 188-195.
- Véry P. 1981. Effects of temperature, irradiance and daylength on the marine diatom *Leptocylindrus danicus* cleve. II. Excretions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **55**: 159-169.
- Verlinde C.L.M.J., Noble M.E.M., Kalk K.H., Groendijk H., Wierenga R.K., Hol W.G.J. 1991. Anion binding at the active site of trypanosomal triosephosphate isomerase. *Eur. J. Biochem.* **198**: 53-57.
- Viarengo A., Pertica M., Canesi L., Mazzucotelli A., Orunesu M. et Bouqueneau J.M. 1989. Purification and biochemical characterization of a lysosomal copper-rich thionein like protein involved in metal

- detoxification in the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Phys. Part C: Comp. Pharmacol.* **2**: 389-395.
- Videau C., Ryckaert M. et L' Helguen S. 1998. Phytoplankton en baie de seine. Influence du panache fluvial sur la production primaire. *Oceanol. Ac.* **21**: 907-921.
- Vido K., Spector D., Lagniel G., Lopez S., Toledano M.B. et Labarre J. 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**: 8469-8474.
- Vila M., Camp J., Garcés E., Maso M. et Delgado M. 2001. High resolution spatio-temporal detection of potentially harmful dinoflagellates in confined waters of the NW Mediterranean. *J. Plankton Res.* **23**: 497-514.
- Vincent W.F. et Roy S. 1993. Solar ultraviolet- B radiation in aquatic primary production: Damage, protection and recovery. *Environ. Rev.* **1**: 1 - 12.
- Violleau D. 1999. Intérêt du fractionnement et de l'extraction des matières organiques naturelles d'eau de surface pour l'étude de leurs propriétés structurales et de leur pouvoir complexant vis-à-vis d cuivre. Thèse de l'Université de Poitiers.
- Von Ballmoos C. et Dimroth P. 2007. Two distinct proton binding sites in the ATP synthase family. *Biochemistry* **46**: 11800-11809.
- Vollenweider R.A. et Nauwerck A. 1961. Some observations on the C14 method for measuring primary production. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **14**: 134-139.
- Walker L. 1984. Life histories, dispersal, and survival in marine, planktonic dinoflagellates. In: Steidinger, K., Walker, L. (Eds.), *Marine Plankton Life Cycle Strategies*. CRC Press.
- Walsh J.J., Premuzic E.T., Gaffney J.S., Rowe G.T., Harbottle G., Stoenner R.W., Balsam W. L., Betzer P.R. et Macko S.A. 1985. Organic storage of CO<sub>2</sub> on the continental slope off the Mid-Atlantic Bight, the south-eastern Bering Sea, and the Peru coast. *Deep Sea Res.* **32**: 853-883.
- Walsh J.J. 1989. Arctic carbon sinks: present and future. *Global Biogeochem. Cy.* **3**: 393-411.
- Wang M., Wang Y., Lin L., Hong H. et Wang D. 2011. Proteome profiles in medaka (*Oryzias melastigma*) liver and brain experimentally exposed to acute inorganic mercury. *Aquat. Toxicol.* **103**: 129-139.
- Weber J.H. 1988. Binding and Transport of Metals by Humic Materials. *Frimmel F.H., Christman R.F. Eds, Humic Substances and their Role in the Environment, Dahlem Workshop Reports, John Wiley & Sons, New York*, 165-178.
- Wiebe W.J. et Smith D.F. 1977. Direct measurement of dissolved organic carbon release by phytoplankton and incorporation by microheterotrophs. *Mar. Biol.* **42**: 213-223.
- Williams P.M., Druffel E.R.M. et Smith J.R.K.L. 1987. Dietary carbon sources for deep-sea organisms as inferred from their organic radiocarbon activities. *Deep Sea Res.* **34**: 253-266.
- Windom H.L., Scropp S.J., Calder F.D., Ryan J.D., Smith R.G., Burney J.L.C., Lewis F.G. et Rawlinson C.H. 1989. Natural trace metal concentrations in estuarine and coastal marine sediments of the southeaster United States. *Environ. Sci. Tech.* **23**: 314-320.
- Wingender J., Neu T.R. et Flemming H.C. 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances ? In: Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C. (Eds.), *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure, and Function*. Springer, Berlin, pp. 1-19.
- Wingler A., Lea P.J., Quick W.P. et Leegood R.C. 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* **355**: 1517-1529.
- Xu Y. et Jaffe R. 2009. Geochemical record of anthropogenic impacts on Lake Valencia, Venezuela. *Appl. Geochemist.* **24**: 411-418.
- Xue H.B., Stumm W. et Sigg L. 1988. The binding of heavy metals to algal surfaces. *Water Res.* **22**: 917-926.
- Yacobi Y.Z., Zohary T., Kress N., Hecht A., Robarts R.D., Waiser M., Wood A.M. et Li W.K.W. 1995. Chlorophyll distribution throughout the southern Mediterranean in relation to the physical structure of the waters masses, *J. Mar. Res.* **6**: 179-190.
- Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumot G. et Clardy J. 1984. Diarrhetic shellfish poisoning. In: *Seafood Toxins*, E.P. Ragelis (ed), Washington DC: *American Chemical Society*. 207-214.
- Yeung P.K.K., Wong F.T.W. et Wong J.T.Y. 2002. Large subunit rDNA sequences from *Alexandrium catenella* strains isolated during algal blooms in Hong Kong. *J. App. Phycol.* **14**: 147-150.
- Yin K., Qian P.Y., Chen J.C., Hsieh D.P.H. et Harrison P.J. 2000. Dynamic of nutrients and phytoplankton biomass in the Pearl River estuary and adjacent waters of Hong Kong during summer: preliminary evidence for phosphorus and silicon limitation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **194**: 295 - 305.
- Yoshida M., Hamdi H., Abdul Nasser I. et Jedidi N. 2004. Contamination of potentially toxic elements (PTEs) in Bizerte lagoon bottom sediments, surface sediment and sediment repository. Research Programme (RPP-SEPMCL). Study on environmental pollution of Bizerte Lagoon, Final Report: 31-54.

- Yu J., Chen S., Zhao Q., Wang T., Yang C., Diaz C., Sun G., et Dai S. 2011. Physiological and Proteomic Analysis of Salinity Tolerance in *Puccinellia tenuiflora*. *J. Proteome Res.* **10**: 3852–3870.
- Zeitschel B. 1978. Oceanographic factors influencing the distribution of plankton in space and time. *Micropaleontology* **24**: 139-159.
- Zhang R.G., Andersson C.E., Savchenko A., Skarina T., Evdokimova E., Beasley S., Arrowsmith C.H., Edwards A.M., Joachimiak A. et Mowbray S.L. 2003. Structure of *Escherichia coli* ribose-5-phosphate isomerase: a ubiquitous enzyme of the pentose phosphate pathway and the Calvin cycle. *Structure* **11**: 31-42.
- Zhang S., Xu C. et Santschi P.H. 2008. Chemical composition and binding of extracellular polymeric substances (EPS) produced by the marine diatom *Amphora* sp. *Mar. Chem.* **112**: 81 – 92.
- Zhang C., Yin Y., Zhang Y., Lu Q., Wen X., Zhu Z., Zhang L. et Lu C. 2012. Comparative proteomic study reveals dynamic proteome changes between superhybrid rice *LYP9* and its parents at different developmental stages. *J. Plant Physiol.* **169**: 387–398.
- Zheng Y.J., Merz K.M. Jr et Farber G.K. 1993. Theoretical examination of the mechanism of aldose-ketose isomerization. *Protein Eng.* **6**: 479-84.
- Zhou S., Sauvé R. et Thannhauser T.W. 2009. Proteome changes induced by aluminium stress in tomato roots. *J. Exp. Bot.* **60**: 1849-1857.
- Zohary T. et Robarts R.D. 1998. Experimental study of microbial P limitation in the eastern Mediterranean. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 387 – 395.

*LISTE DES FIGURES,  
TABLEAUX ET ABRÉVIATIONS*

## 1. Liste des Figures

Figure 1 : Diatomée pennée : stries radiant convergentes vers le nodule central (A) ; Diatomée centrale : stries rayonnantes convergentes vers le centre (B) -----	7
Figure 2 : Reproduction sexuée (ou auxosporulation) chez les diatomées centrales. Les cellules algales sont réunies en file par l'emboîtement des digitations terminant les expansions externes -----	8
Figure 3 : <i>Skeletonema costatum</i> Chaîne de cellules en vue cingulaire (Microscope photonique $\times 100$ ) (A) ; Détail des expansions externes (Microscope électronique à balayage) (B)-----	9
Figure 4 : Morphologie d'un dinoflagellé-----	10
Figure 5 : <i>Alexandrium catenella</i> (chaîne de deux cellules) observée au microscope inversé ( $\times 100$ )-----	15
Figure 6 : Cinétique de croissance des cellules phytoplanctoniques mises en culture -----	19
Figure 7 : Spéciation des différentes espèces physico-chimiques dans le milieu marin -----	26
Figure 8 : Cycle des éléments traces métalliques dans les milieux aquatiques -----	28
Figure 9 : Concentrations des métaux dissous (cadmium, cuivre, plomb et zinc) dans la rade de Toulon-----	29
Figure 10 : Mécanismes de transports membranaires -----	31
Figure 11 : Petite rade de Toulon : Localisation de la station d'isolement de <i>Skeletonema costatum</i> -----	36
Figure 12 : Repiquage et mise en culture de <i>Skeletonema costatum</i> -----	40
Figure 13 : Protocole expérimental utilisé pour la culture du dinoflagellé toxique <i>Alexandrium catenella</i> ACT03	41
Figure 14 : Etapes expérimentales d'extraction et de caractérisation des exopolysaccharides-----	46
Figure 15 : Concentrations en (M) des métaux totaux ( $M_{\text{Total}}$ ) et libres ( $M_{\text{Libres}}$ ) dans les milieux de cultures contaminés par le cuivre, le zinc, le plomb et le cadmium-----	48
Figure 16 : Protocole expérimental de la réhydratation active -----	51
Figure 17 : Protocole expérimental d'isoélectrofocalisation -----	52
Figure 18 : Protocole de préparation des gels discontinus de polyacrylamide utilisés pour la séparation verticale des protéines -----	53
Figure 19 : Protocole expérimental de l'équilibration -----	55
Figure 20 : Protocole expérimental de la SDS-PAGE -----	56
Figure 21 : Cinétiques de croissance de <i>Skeletonema costatum</i> lors des traitements témoins (T), et contaminés par le cuivre $2,02 \times 10^{-8}$ M (Cu 1) et $1,10 \times 10^{-6}$ M (Cu 2) (Densité cellulaire moyenne $\pm$ écart type, n = 3) -----	59
Figure 22 : Evolution des concentrations en chlorophylle a (Chl a), en phéopigments (Pheop.) et en caroténoïdes (Carot.) au cours de la croissance de <i>Skeletonema costatum</i> dans les conditions témoins T (A), et contaminées Cu 1 (B) ( $2,02 \times 10^{-8}$ M) et Cu 2 (C) ( $1,10 \times 10^{-6}$ M) (Moyenne $\pm$ écart type, n = 3)-----	62
Figure 23 : Evolution des concentrations en COD en conditions témoins (T) et contaminées Cu 1 ( $2,02 \times 10^{-8}$ M) et Cu 2 ( $1,10 \times 10^{-6}$ M) (Moyenne $\pm$ écart type, n = 3)-----	63
Figure 24 : Evolution du rapport COD/Cellule au cours de la croissance de <i>Skeletonema costatum</i> en conditions témoins (T) et contaminées par le cuivre Cu 1 ( $2,02 \times 10^{-8}$ M) et Cu 2 ( $1,10 \times 10^{-6}$ M) (Moyenne $\pm$ écart type, n = 3)-----	64
Figure 25 : Evolution des concentrations en carbohydrates au cours de la croissance de <i>S.costatum</i> en conditions témoin (T) et contaminées par le cuivre Cu 1 ( $2,02 \times 10^{-8}$ M) et Cu 2 ( $1,10 \times 10^{-6}$ M) (Moyennes $\pm$ écart types, n = 3) -----	66
Figure 26 : Evolution du rapport Carbohydrates / cellule dans les cultures de <i>Skeletonema costatum</i> en conditions témoins (T) et contaminées par le cuivre Cu 1 ( $2,02 \times 10^{-8}$ M) et Cu 2 ( $1,10 \times 10^{-6}$ M) (Moyenne $\pm$ écart type, n = 3)-----	66
Figure 27 : Composition en monosucres des polysaccharides exsudés pendant la croissance de <i>Skeletonema costatum</i> soumise aux conditions témoins (A) et contaminées (B et C)-----	68
Figure 28 : Contribution des trois composantes fluorescentes C1, C2 et C3, caractérisant la matière organique exsudée dans les cultures témoins et contaminées Cu 1 et Cu 2. En abscisse, sont représentées les longueurs d'ondes d'émission ( $\lambda_{em}$ ), et en ordonnées, les longueurs d'ondes d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ) -----	70
Figure 29 : Evolution temporelle de l'intensité de fluorescence $I_f$ (en u.a : unité arbitraire) (A,B et C), de l'intensité de fluorescence par cellule (D, E et F) et de l'intensité de fluorescence par mg de C (G, H et I), des trois composantes fluorescentes (C1, C2 et C3), détectées dans la matière organique exsudée en réponse aux différents traitements (T, Cu 1 et Cu 2)-----	71
Figure 30 : Projection des variables considérées (A) et concentrations relatives (B), sur les axes F1 (en traits discontinus rouges) et F2 (en traits discontinus verts) -----	74
Figure 31 : Cinétiques de croissance d' <i>Alexandrium catenella</i> ACT03 cultivée en conditions témoins et contaminées par les métaux traces cuivre, zinc, plomb ou cadmium)-----	84
Figure 32 : Diminution (%) de la densité cellulaire dans les cultures contaminées d' <i>Alexandrium catenella</i> ACT03 pendant leur phase stationnaire, par rapport aux conditions témoins-----	85
Figure 33 : <i>Alexandrium catenella</i> ACT03 observée au microscope (G : $\times 400$ ) (A) Cellules végétatives cultivées en conditions témoins (B) Cellule transformée en kyste sous l'effet du cuivre (C) Cellule enkystée en réponse aux autres contaminations métalliques -----	89
Figure 34 : Evolution temporelle du rapport COD / Cellule, exsudé dans les cultures d' <i>Alexandrium catenella</i> ACT03 cultivées en conditions témoins, et contaminées par les métaux traces cuivre, zinc, plomb ou cadmium --	91

Figure 35 : Evolution de la fluorescence (u.a) et de la fluorescence par carbone (u.a/ carbone) en réponse à la contamination par le cuivre, au cours de la croissance d' <i>Alexandrium catenella</i> ACT03	95
Figure 36 : Evolution de la fluorescence spécifique par cellule et évolution de la contribution de la fluorescence par carbone (u.a/ NPOC) en fonction du LOG de la concentration en cuivre libre, en réponse à la contamination par le cuivre au cours de la croissance d' <i>Alexandrium catenella</i> ACT03	97
Figure 37 : Evolution de la fluorescence (u.a), et de la fluorescence par carbone (u.a / carbone), en réponse à la contamination par le zinc, au cours de la croissance d' <i>Alexandrium catenella</i> ACT03	98
Figure 38 : Evolution de la fluorescence spécifique par cellule et évolution de la contribution de la fluorescence par carbone (u.a / NPOC) en fonction du LOG de la concentration en zinc libre, en réponse à la contamination par le zinc au cours de la croissance d' <i>Alexandrium catenella</i> ACT03	100
Figure 39 : Evolution de la fluorescence (u.a), et de la fluorescence par carbone (u.a / carbone), en réponse à la contamination par le plomb, au cours de la croissance d' <i>Alexandrium catenella</i>	101
Figure 40 : Evolution de la fluorescence spécifique par cellule et évolution de la contribution de la fluorescence par carbone (u.a / NPOC) en fonction du LOG de la concentration en plomb libre, en réponse à la contamination par le plomb au cours de la croissance d' <i>Alexandrium catenella</i> ACT03	102
Figure 41 : Evolution de la fluorescence (u.a), et de la fluorescence par carbone (u.a/ carbone), en réponse à la contamination par le cadmium, au cours de la croissance d' <i>Alexandrium catenella</i>	104
Figure 42 : Evolution de la fluorescence spécifique par cellule et évolution de la contribution de la fluorescence par carbone (u.a / NPOC) en fonction du LOG de la concentration en cadmium libre, en réponse à la contamination par le cadmium, au cours de la croissance d' <i>Alexandrium catenella</i> ACT03	105
Figure 43 : Composition en monosucres des polysaccharides exsudés par les cellules d' <i>Alexandrium catenella</i> ACT03 témoins et contaminées par les ETMs (cuivre, zinc, plomb ou cadmium) aux concentrations 6 $\mu$ M, 12 $\mu$ M et 18 $\mu$ M en fin de phase exponentielle-début de phase stationnaire de croissance	108
Figure 44 : Evolution des contributions des monosaccharides exsudés (Glu : glucose, Gal : galactose, Fuc : fucose, Arb : arabinose, Xyl : xylose, Man : mannose, Rhm : rhamnose) par les cultures d' <i>Alexandrium catenella</i> ACT03 en fonction des concentrations en ETMs (Cu : a, Pb : b, Zn : c et Cd : d)	110
Figure 45 : Projection des variables considérées et concentrations en cuivre, sur les axes F1 et F2 de l'ACP	112
Figure 46 : Projection des variables considérées et concentrations en zinc, sur les axes F1 et F2 de l'ACP	113
Figure 47 : Projection des variables considérées et concentrations en plomb, sur les axes F1 et F2 de l'ACP	114
Figure 48 : Projection des variables considérées et concentrations en cadmium, sur les axes F1 et F2 de l'ACP	115
Figure 49 : Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures d' <i>Alexandrium catenella</i> contaminées par le plomb 6 $\mu$ M	130
Figure 50 : Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures témoins d' <i>Alexandrium catenella</i>	133
Figure 51 : Distribution des fonctions biologiques assignées aux protéines d'intérêt exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse à une contamination par Pb 6 $\mu$ M	137
Figure 52 : Taux d'expression des protéines d'intérêt exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse à une contamination par Pb 6 $\mu$ M	138
Figure 53 : Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures d' <i>Alexandrium catenella</i> contaminées par le plomb 12 $\mu$ M	141
Figure 54 : Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures témoins d' <i>Alexandrium catenella</i>	144
Figure 55 : Distribution des fonctions biologiques assignées aux protéines d'intérêt exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse à une contamination par Pb 12 $\mu$ M	146
Figure 56 : Taux d'expression des protéines d'intérêt exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse à une contamination par Pb 12 $\mu$ M	147
Figure 57 : Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures d' <i>Alexandrium catenella</i> contaminées par le plomb 18 $\mu$ M	150
Figure 58 : Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures témoins d' <i>Alexandrium catenella</i>	152
Figure 59 : Distribution des fonctions biologiques assignées aux protéines d'intérêts exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse à une contamination par Pb 18 $\mu$ M	154
Figure 60 : Taux d'expression des protéines d'intérêt exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse à une contamination par Pb 18 $\mu$ M	155
Figure 61 : Diagrammes de Venn représentant les protéines d'intérêt exprimées en commun par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse aux contaminations par le plomb 6 $\mu$ M, 12 $\mu$ M ou 18 $\mu$ M	158
Figure 62 : Intensité d'expression (intensité moyenne en %) des protéines d'intérêt sur – exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> , en fonction de la concentration contaminante en plomb	160
Figure 63 : Intensité d'expression (intensité moyenne en %) des protéines d'intérêt sous – exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> , en fonction de la concentration contaminante en plomb	164
Figure 64 : Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures d' <i>Alexandrium catenella</i> contaminées par le zinc 6 $\mu$ M	167
Figure 65 : Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures témoin d' <i>Alexandrium catenella</i>	170

Figure 66 : Distribution des fonctions biologiques assignées aux protéines d'intérêt exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse à une contamination par Zn 6 $\mu$ M-----	172
Figure 67 : Taux d'expression des protéines d'intérêt exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse à une contamination par Zn 6 $\mu$ M -----	173
Figure 68 : Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures d' <i>Alexandrium catenella</i> contaminées par le zinc 12 $\mu$ M -----	176
Figure 69 : Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures témoins d' <i>Alexandrium catenella</i> -----	179
Figure 70 : Distribution des fonctions biologiques assignées aux protéines d'intérêt exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse à la contamination par Zn 12 $\mu$ M -----	181
Figure 71 : Taux d'expression des protéines d'intérêt exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse à une contamination par Zn 12 $\mu$ M-----	182
Figure 72 : Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures d' <i>Alexandrium catenella</i> contaminées par le zinc 18 $\mu$ M -----	185
Figure 73 : Profils d'expression protéique (PEPs) des cultures témoins d' <i>Alexandrium catenella</i> -----	188
Figure 74 : Distribution des fonctions biologiques assignées aux protéines d'intérêt exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse à la contamination par Zn 18 $\mu$ M -----	190
Figure 75 : Taux d'expression des protéines d'intérêt exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse à une contamination par Zn 18 $\mu$ M-----	191
Figure 76 : Diagrammes de Venn représentant les protéines d'intérêt exprimées en commun par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse aux contaminations par le zinc 6 $\mu$ M, 12 $\mu$ M ou 18 $\mu$ M -----	194
Figure 77 : Intensité d'expression (intensité moyenne en %) des protéines d'intérêt sur – exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> , en fonction de la concentration contaminante en zinc -----	195
Figure 78 : Intensité d'expression (intensité moyenne en %) des protéines d'intérêt sous – exprimées par <i>Alexandrium catenella</i> , en fonction de la concentration contaminante en zinc-----	199
Figure 79 : Diagrammes de Venn représentant les protéines d'intérêt exprimées en commun par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse aux contaminations par le zinc 6 $\mu$ M et par le plomb 6 $\mu$ M -----	203
Figure 80 : Diagrammes de Venn représentant les protéines d'intérêt exprimées en commun par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse aux contaminations par le plomb 12 $\mu$ M et par le zinc 12 $\mu$ M-----	204
Figure 81 : Diagrammes de Venn représentant les protéines d'intérêt exprimées en commun par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse aux contaminations par le plomb 18 $\mu$ M et par le zinc 18 $\mu$ M-----	205
Figure 82 : Processus de détoxification des radicaux superoxydes O <sub>2</sub> <sup>-</sup> assuré par six enzymes anti – oxydantes : superoxyde dismutase (SOD), ascorbate peroxydase (APX), catalase (CAT), monodéshydroascorbate réductase (MDAR), déshydroascorbate réductase (DHAR), et glutathion réductase (GR) -----	214
Figure 83 : Structure tridimensionnelle de la superoxyde dismutase (SOD) dans les mitochondries de rein humain -----	215
Figure 84 : Structure tridimensionnelle de la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (RUBISCO) chez <i>Spinacia oleracea</i> -----	221
Figure 85 : Représentation schématique du cycle de Calvin-----	222
Figure 86 : Structure tridimensionnelle de la forme dimérique de la péridinine chlorophylle – protéine (PCP) chez <i>Amphidinium carterae</i> -----	225
Figure 87 : Structure tridimensionnelle de la ferrédoxine – NADP réductase (FNR) chez <i>Azotobacter vinelandii</i> -----	227
Figure 88 : Structure tridimensionnelle de la triosephosphate isomérase (TPI) chez <i>Trypanosoma brucei</i> -----	231
Figure 89 : Déroulement de la glycolyse -----	232
Figure 90 : Structure tridimensionnelle de la ribose 5-phosphate isomérase (RpiA) chez <i>Escherichia coli</i> -----	234
Figure 91 : Voie métabolique des pentoses phosphates -----	236
Figure 92 : Structure tridimensionnelle de la malate déshydrogénase (MDH) chez <i>Aquaspirillum arcticum</i> -----	238
Figure 93 : Cycle de Krebs -----	239
Figure 94 : Structure tridimensionnelle de la phosphoglycolate phosphatase (PGP) chez <i>Thermoplasma acidophilum</i> -----	241
Figure 95 : Photorespiration, cycle de Calvin et voie d'assimilation de l'azote chez la diatomée <i>Thalassiosira pseudonana</i> -----	243
Figure 96 : Structure tridimensionnelle de l'ATP-synthase chez <i>Bos taurus</i> -----	246
Figure 97 : Structure et fonctionnement de l'ATP-synthase dans la membrane thylakoïdienne, lors de la photophosphorylation -----	248
Figure 98 : Implication de la calmoduline dans la régulation des facteurs de transcription dans le cas d'un stress oxydatif par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -----	251
Figure 99 : Rôle du complexe Ca <sup>2+</sup> - calmoduline (Ca <sup>2+</sup> - CaM) dans la réponse au stress chez les plantes -----	252

## 2. Liste des Tableaux

Tableau I : Composition du milieu utilisé pour cultiver la diatomée <i>Skeletonema costatum</i> -----	39
Tableau II : Composition du milieu utilisé pour cultiver le dinoflagellé <i>Alexandrium catenella</i> -----	40
Tableau III : Préparation des solutions de métaux utilisées pour tester la réponse d' <i>Alexandrium catenella</i> aux stress métalliques -----	47
Tableau IV : Composition élémentaire d'un gel 2D discontinu de polyacrylamide / Bis-acrylamide-----	54
Tableau V : Taux de croissance ( $\mu$ ), taux de dédoublement (K) et temps de dédoublement (T), observés chez <i>Skeletonema costatum</i> en réponse aux traitements témoins (T), et contaminés par le cuivre $2,02 \times 10^{-8}$ M (Cu 1) et $1,10 \times 10^{-6}$ M (Cu 2). Chaque résultat est la moyenne de valeurs obtenues en triplicat -----	60
Tableau VI : Variables considérées pour le traitement ACP-----	72
Tableau VII : Variables considérées avec leurs coordonnées (COOR) et leurs contributions relatives (CTR) sur les axes factoriels F1 et F2-----	73
Tableau VIII : Taux de croissance ( $\mu$ , en $J^{-1}$ ) et temps de dédoublement (T, en J) d' <i>Alexandrium catenella</i> ACT03 cultivée en conditions témoins et contaminées par les métaux traces cuivre, zinc, plomb ou cadmium -----	85
Tableau IX : Variables considérées dans l'ACP, des résultats de l'exsudation des monosucres par <i>Alexandrium catenella</i> -----	111
Tableau X : Identification putative par LC-MS/MS des protéines d'intérêt dont l'expression est modifiée par <i>Alexandrium catenella</i> en réponse à une contamination métallique par le plomb 6 $\mu$ M, 12 $\mu$ M, 18 $\mu$ M ; ou le zinc 6 $\mu$ M, 12 $\mu$ M, 18 $\mu$ M -----	135
Tableau XI : Taux d'expression des protéines d'intérêt en fonction des conditions contaminantes Pb 6 $\mu$ M, Pb 12 $\mu$ M, Pb 18 $\mu$ M, Zn 6 $\mu$ M, Zn 12 $\mu$ M et Zn 18 $\mu$ M-----	209

### 3. Liste des abréviations

ACP	Analyse en composantes principales
APS	Ammonium persulfate
Arb	Arabinose
ATP	Adénosine triphosphate
BBP	Bleu de bromophénol
Carot	Caroténoïdes
CEP	Ciguatera fish poisoning
Chl <i>a</i>	Chlorophylle <i>a</i>
COD	Carbone organique dissous
COT	Carbone organique total
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DSP	Diarrhetic shellfish poisoning
DTT	Dithiothréitol
EEMs	Excitation emission matrices
EPS	Exopolysaccharides
ETMs	Eléments traces métalliques
Fcarb	Fluorescence par carbone
Fcell	Fluorescence par cellule
FDOM	Matière organique dissoute fluorescente
FNR	Ferrédoxine-NADP réductase
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GAP	Glycéraldéhyde 3-phosphate
Glu	Glucose
HAB	Harmful algal bloom
HSP	Heat shock protein
ICP	Intoxication par consommation de poissons
IDFM	Intoxication diarrhéique par consommation de fruits de mer
IEF	Isoélectrofocalisation
INFM	Intoxication neurologique par consommation de fruits de mer
IPFM	Intoxication paralysante par consommation de fruits de mer
IPG	Immobilized pH Gradient
LC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
Man	Mannose
MDH	Malate déshydrogénase
MO	Matière organique
MOD	Matière organique dissoute
MON	Matière organique naturelle
MOP	Matière organique particulaire
NPOC	Non purgeable organic carbon
NSP	Neurologic shellfish poisoning
PARAFAC	Parallel factor analysis
PCB	Polychlorure de biphenyle
PCP	Complexe péridinine chlorophylle-protéine
PEP	Profil d'expression protéique
Pheo	Phéopigments
PSP	Paralytic shellfish poisoning
RBP	Rubisco binding protein
Rhm	Rhamnose
ROS	Reactive oxygen species
RPI	Ribose-5-phosphate isomérase
RUBISCO	Ribulose 1,5-bisphosphate Carboxylase
SDS	Sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	Sodium dodécylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SOD	Superoxyde dismutase
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TGS	Tris-glycine-SDS
TPI	Triosephosphate isomérase
Xyl	Xylose

# *ANNEXES*

## Characterization of exudates released by the marine diatom *Skeletonema costatum* exposed to copper stress: a 3D-fluorescence spectroscopy approach

Faouzi Herzi · Asma Sakka Hlaili ·  
Christophe Le Poupon · Hassine Hadj Mabrouk ·  
Stéphane Mounier

Received: 28 March 2013 / Accepted: 4 July 2013 / Published online: 19 July 2013  
© European Union 2013

**Abstract** In a laboratory study, metal contamination experiments were conducted to investigate the effects of two free copper concentrations ( $10^{-9}$  and  $10^{-8}$  M) on cell growth and on dissolved organic matter exudation by a marine diatom *Skeletonema costatum*. Throughout incubation, the growth kinetics and exudation of extracellular molecules (i.e. dissolved organic carbon (DOC) and the fluorescent organic matter) were determined. Results revealed an inhibition of *S. costatum* growth when the free copper level increased (from  $10^{-9}$  to  $10^{-8}$ ). Furthermore, DOC release was more significant in cultures contaminated

by  $10^{-9}$  M  $\text{Cu}^{2+}$  than in control, suggesting a coping mechanism developed by this species. In this study, samples were daily analysed by 3D-fluorescence and PARAFAC algorithm, in order to compare the fluorescent material produced during growth under different contaminations. PARAFAC treatment revealed two main contributions: one related to the biological activity (C1), the other linked to the marine organic matter (C2). The third component C3 was typically protein-like. This fluorophore was considered as a tryptophan-like fluorophore, whereas the C1 and the C2 components were associated to marine production such as humic matter.

**Keywords** Trace metals · 3D-fluorescence spectroscopy · Copper · Exudation · Fluorescence proteins · Diatoms

### Abbreviations

CanDecomp	Canonical polyadic decomposition
Carot	Carotenoid
CDA	Controlled dilution approach
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
DOC	Dissolved organic carbon
DOM	Dissolved organic matter
EEM	Excitation-emission matrix of fluorescence
FDOM	Fluorescent dissolved organic matter
PARAFAC	Parallel factor analysis
Pheop	Pheopigment
TOC	Total organic carbon

F. Herzi · A. S. Hlaili · H. H. Mabrouk  
Laboratoire de Cytologie Végétale et  
Phytoplanktonologie, Département des Sciences de la Vie,  
Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage,  
7021 Jarzouna, Bizerte, Tunisia  
e-mail: faouzi-herzi@univ-tln.fr

A. S. Hlaili  
e-mail: asma\_sakka@yahoo.fr

F. Herzi · C. Le Poupon · S. Mounier (✉)  
Laboratoire des Processus de Transferts et d'Echanges  
dans l'Environnement (PROTEE EA 3819), Equipe  
Chimie Analytique et Processus de Transferts dans  
l'Environnement, Université du Sud Toulon—Var, BP  
20132, 83957 La Garde Cedex, France  
e-mail: mounier@univ-tln.fr

C. Le Poupon  
e-mail: lepoupon@univ-tln.fr

## Introduction

Phytoplankton, at the base of marine food webs, can accumulate the metallic pollutants dispersed in marine environments (Hudson 1998). Indeed, metals could be adsorbed on algal membrane, or complexed by the dissolved organic matter (DOM) exudates released by phytoplankton (Visviki and Rachlin 1994). In polluted aquatic environments, phytoplankton interacts with trace metals which can then be found in intracellular organelles (Ballan-Dufrançais et al. 1991), or linked to proteins (Ahner et al. 1994). Some metals can be toxic to marine organisms, leading to growth inhibition, as well as to increasing rates of cell death (Khan and Saifullah 1986; Perrein-Ettajani et al. 1999). In some polluted marine environments, phytoplankton species proved themselves to be resistant to metals, and hence, can play an important role in seawater metal speciation (Gouvêa et al. 2005). The algal resistance depends on a number of factors, such as the nature of the contaminant metal, the culture conditions and the capacity of the phytoplankton species to overcome the metal toxicity (Pistocchi et al. 1997). According to a previous study (Mopper et al. 1995), phytoplankton exudates extracellular molecules and metabolites to complex the metal ions present in the extracellular medium. This complexation can reduce metal toxicity, and thereby changes its availability (Maeda and Sakaguchi 1990). Several substance classes, including amino acids (glutathione-like), humic substance originating from aged organic matter or sulphur-rich substances have been hypothesized to play a central role in metal binding (Dryden et al. 2007; Zhang et al. 2008). Cysteine and glutathione-like substances, which are phytoplankton-derived amino acids, are known to act as trace metal ligands (Lorenzo et al. 2007). Glutathione is an important Cu-ligand, responsible for copper complexation (Ross et al. 2003). Proteins, lipids, humic-like substances, which possess hydrophobic and hydrophilic functional groups ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$ ) (Ćosović 2005) can act as metal ligands, and efficiently bind Cu (Plavšić et al. 2006).

Copper is a trace element required for phytoplankton growth and cellular activities (O'Halloran and Culotta 2000). However, its excess induces an inhibition or a reduction of microalgae growth (Yan and Pan 2002; Bossuyt and Janssen 2004). Among the phytoplankton, diatoms are an important group that contribute to large

primary production and to its trophic transfer in coastal ecosystems (Sakka Hlaili et al. 2007). Considering diatoms' crucial role in planktonic food webs, some studies have examined their responses to various contaminants (Ben Othman et al. 2012), in particular metals. Among the diatoms, *Skeletonema costatum* has been extensively studied, with a focus on the toxicity of copper (Pistocchi et al. 1997).

The fluorescence spectroscopy technique has been used to characterize DOM coming from various environment, such as rivers (Nagao et al. 2003), estuaries (Jaffé et al. 2004), marine ecosystems (Kowalezuk et al. 2005), and biological cultures (Parlanti et al. 2000). To identify the fluorescent compounds, the parallel factor analysis (PARAFAC) algorithm was applied as a statistical EEM treatment (Bro 1997). Thanks to this algorithm, the fluorescent DOM (FDOM) can be mathematically identified, leading to the optimal separation of several fluorescent components. PARAFAC algorithm was successfully used to investigate DOM origins of aquatic samples from estuarine (Luciani et al. 2008), marine (Murphy and Belastock 1980) and freshwater ecosystems (Holbrook et al. 2006). However, to our knowledge, no study mentioned the use of PARAFAC to characterize DOM released in phytoplankton cultures contaminated by trace metals.

The aims of this study were (i) to examine the effect of free copper levels on the *S. costatum* stress response, (ii) to characterize the FDOM present in *S. costatum* cultures grown under increasing levels of free copper. This characterization, based on dissolved organic carbon (DOC) analysis and on FDOM treated by PARAFAC, aimed at explaining the links between trace metal contamination and DOM exudates as a result of stress reaction.

## Materials and methods

### Phytoplankton cultures and metal contamination

The *S. costatum* strain was isolated from the small bay of Toulon (France) in 2009, by the laboratory Processus de Transferts et d'Echanges dans l'Environnement (PRO-TEE, Université du Sud Toulon-Var). Cultures were grown on *f/2* medium (Guillard and Ryther 1962) prepared into 0.2  $\mu\text{m}$ -filtered and sterilized natural seawater. The total copper concentration in the basal

medium was below  $3 \times 10^{-8}$  M (Jean et al. 2012). Culture of *S. costatum* was subcultured each week during exponential phase, by injecting 1 mL of ancient culture in 200 mL of fresh f/2 medium. The cultures were maintained at +20 °C, and exposed to  $135 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  during a light:dark cycle of 12 h:12 h.

In order to study the effects of copper on the exudation of extracellular DOM, culture medium was supplemented with  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dissolved in ultra-pure water. Two free copper concentrations in the f/2 medium were achieved:  $10^{-9}$  and  $10^{-8}$  M in presence of  $10 \times 10^{-6}$  M EDTA. For the controls, the final concentration was  $10^{-12}$  M of  $\text{Cu}^{2+}$ . To take into account the free copper ion activity in the f/2 medium, speciation calculation of these initial conditions were performed, and led to a cupric concentration of  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$  and  $10^{-8}$  M of  $\text{Cu}^{2+}$ , for control,  $\text{Cu}_1$  and  $\text{Cu}_2$  conditions, respectively. All cultures were performed in triplicates, in 300 mL of f/2 solution, and were grown for 8 days under the same conditions. Each culture was daily sampled (25 mL) to determine cell abundance, pigment levels, DOC contents and FDOM.

#### Phytoplankton abundance

From the triplicates of each treatment, subsamples (1 mL) were preserved in Eppendorf tubes and fixed with 0.4 mL of acidic Lugol solution. *S. costatum* cells were counted under an inverted microscope (Leica DMI 4000 B), at a magnification of  $100\times$  on a Malassez cell.

#### Pigment analysis

The remaining subsample (24 mL) was filtrated onto Whatman GF/F filters. The obtained filters were frozen, and pigments were extracted from the filters with acetone (90 %) for 24 h in the dark. Chlorophyll *a* (Chl *a*), carotenoids (Carot) and pheopigments (pheop) were estimated by spectrophotometry. Supernatant absorbance was measured at 480, 510, 665 and 750 nm before and after acidification. Calculation of pigment concentration was achieved according to Richards and Thompson (1952), and Lorenzen (1967).

#### Analysis of dissolved organic carbon (DOC)

Subsamples (18 mL) from the 24 mL filtrated samples were dedicated to the DOC concentration measurements.

DOC concentrations were determined with a total organic carbon analyser (TOC-V<sub>CSH</sub>, Shimadzu) linked to an automatic sample injector (ASI-V, Shimadzu). Measurements were carried out in triplicates. Before measurements, samples were acidified (with 1 % of HCl) and bubbled for 10 min, to remove eliminate inorganic carbon.

#### Fluorescence analysis

The excitation emission matrix of fluorescence (EEM) measurements was carried out on 4 mL culture subsamples, taken from the 24 mL of filtrated aliquot. Fluorescence of the obtained filtrates was measured using a spectrofluorometer (Hitachi F4500) equipped with a Xenon excitation lamp (Xe152HUS, USHIO). The slits of both excitation and emission were fixed at 5 nm. The excitation wavelengths were set from 200 to 480 nm, and that of the emission between 200 and 600 nm, with a step interval of 5 nm. A scan speed of  $2400 \text{ nm min}^{-1}$  was used. The PARAFAC CanDecomp was programmed based on the MATLAB software (version 6.5) and algorithm of Stedmon and Bro (2008). After elimination of the Rayleigh and Raman diffusion scattering, the inner filter effect was corrected by the CDA method, by mean of two spectra (the raw one and the diluted one), for the same sample (Luciani et al. 2009). After these corrections, the data treatment of the EEM led to a decomposition of the dataset by three components.

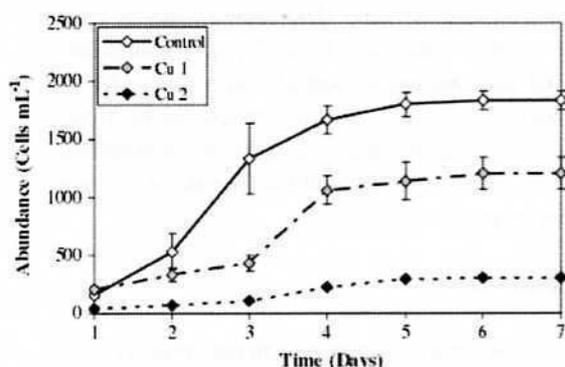
#### Statistical analyses

Statistical tests were performed using Statistica 7.1 software for Windows. The non-parametric Wilcoxon test was particularly applied to compare growth kinetics and organic matter produced among contaminated and control cultures of *S. costatum*. Differences, characterized by *p* coefficients, were considered as significant at  $p < 0.05$ .

## Results

#### Growth kinetics

In the control cultures, the *S. costatum* abundance increased from 540 to  $1,840 \text{ cells mL}^{-1}$ , corresponding to a maximal growth rate ( $\mu$ ) of  $1.05 \text{ d}^{-1}$  (Fig. 1). The duplication rate (*K*) and the time of duplication (*T*) were



**Fig. 1** Growth kinetics of *S. costatum* in the control and the contaminated cultures ( $\text{Cu}_1$ :  $10^{-9}$  M  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cu}_2$ :  $10^{-8}$  M  $\text{Cu}^{2+}$ ) ( $n = 3$ )

**Table 1** Net growth rates ( $\mu$ , in  $\text{d}^{-1}$ ), specific doubling rates ( $K$ , in  $\text{d}^{-1}$ ) and times of cell doubling ( $T$ , in d) of *S. costatum* in control,  $\text{Cu}_1$ , and  $\text{Cu}_2$  conditions

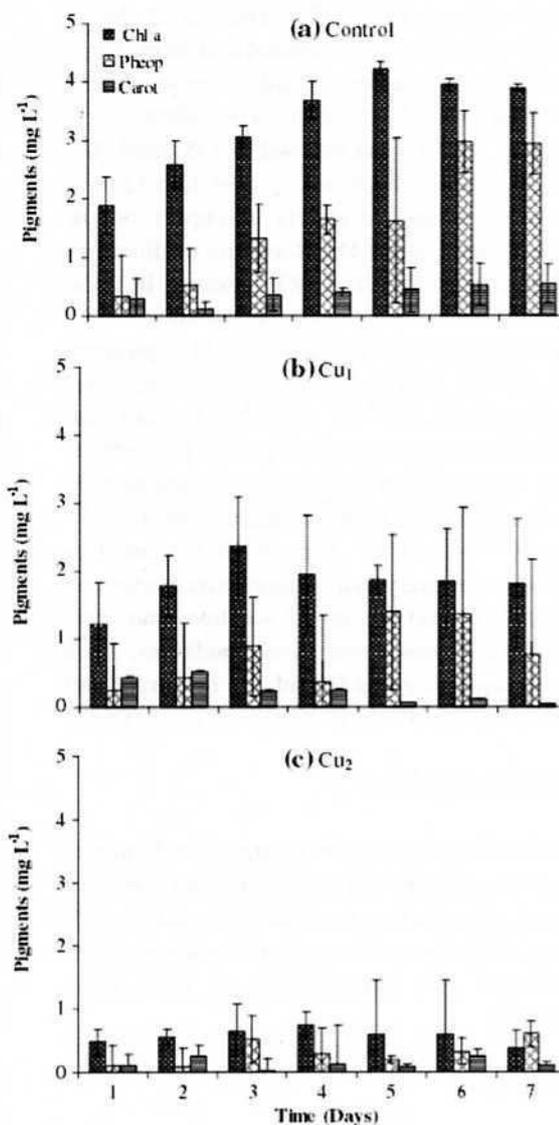
	Control	$\text{Cu}_1$	$\text{Cu}_2$
$\mu$ ( $\text{d}^{-1}$ )	1.05	0.51	0.47
$K$ ( $\text{d}^{-1}$ )	1.51	0.73	0.67
$T$ (d)	0.95	1.96	2.12

evaluated to  $1.51 \text{ d}^{-1}$  and to  $0.95 \text{ d}$ , respectively (Table 1). In  $\text{Cu}_1$  conditions, the growth rate ( $\mu = 0.51 \text{ d}^{-1}$ ) and the duplication rate ( $K = 0.73 \text{ d}^{-1}$ ) observed during the exponential phase were smaller than the control (Fig. 1). The *S. costatum* cell density reached at day 4 ( $1,205 \text{ cells mL}^{-1}$ ), was 34 % below that obtained with the control. In  $\text{Cu}_2$  conditions, the growth parameters were drastically decreased compared to the control and to  $\text{Cu}_1$  (Fig. 1). A low density at the end of the exponential phase ( $300 \text{ cells mL}^{-1}$ ) can also be noticed, representing 83 % of reduction compared to the control.

#### Pigment concentrations

In control, Chl *a* exhibited an increase, from  $1.88 \pm 0.48$  to  $4.22 \pm 0.11 \text{ mg L}^{-1}$ , during the exponential growth phase, then, a progressive decrease was observed, to reach  $4.0 \pm 0.10 \text{ mg L}^{-1}$  throughout the stationary phase (Fig. 2a). Levels of carotenoids and pheopigments showed a gradual increase from the beginning of incubation until the end of experiment.

In  $\text{Cu}_1$  conditions, a significant decrease ( $p < 0.05$ ) of Chl *a* relatively to the control was observed (Fig. 2b). The Chl *a* reached a maximal concentration



**Fig. 2** Temporal evolution of pigment concentrations (Chl *a*, pheopigments and carotenoids) in the control (a) and copper contaminated cultures of *S. costatum*:  $\text{Cu}_1$  (b) and  $\text{Cu}_2$  (c) ( $n = 3$ )

of  $2.37 \pm 0.30 \text{ mg L}^{-1}$  during the growth phase. However, a decrease in the concentration was observed after day 3 until  $1.81 \pm 0.55 \text{ mg L}^{-1}$ . Carotenoid and pheopigment concentrations were noticeably lower in contaminated cultures compared to control cultures.

In  $\text{Cu}_2$  conditions, Chl *a* exhibited the lowest levels compared to control and to  $\text{Cu}_1$ . The Chl *a* concentrations never exceeded  $0.73 \pm 0.22 \text{ mg L}^{-1}$  during the growth phase (Fig. 2c). Similarly, the maximal level of

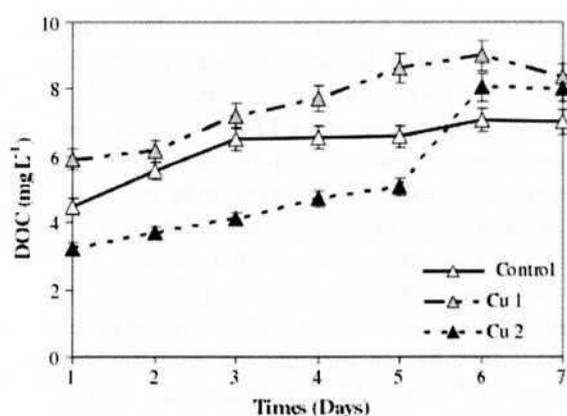
pheopigments ( $0.53 \pm 0.23 \text{ mg L}^{-1}$ ) was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than the control ( $2.98 \pm 0.10 \text{ mg L}^{-1}$ ). Carotenoid levels decreased from  $0.22 \pm 0.17$  to  $0.09 \pm 0.03 \text{ mg L}^{-1}$ , and remained under the control conditions.

#### Release of DOC

Temporal evolution of the released DOC by *S. costatum* was variable among the three studied conditions (Control, Cu<sub>1</sub> and Cu<sub>2</sub>) (Fig. 3). In the control, DOC levels increased from 4.49 to  $7.0 \text{ mg L}^{-1}$ , and remained constant from day 4 to day 6. This increase could be linked to the physiological liberation of organic molecules by the strain. In Cu<sub>1</sub> conditions, DOC presented similar evolution pattern as in the control, but exhibited systematically higher levels, particularly pronounced from day 4 to the end of incubation, reaching a maximum ( $8.98 \text{ mg L}^{-1}$ ) at day 6. In Cu<sub>2</sub> conditions, the released DOC was less important from day 1 ( $3.23 \text{ mg L}^{-1}$ ) to day 5 ( $4.72 \text{ mg L}^{-1}$ ), compared to control and Cu<sub>1</sub>. Then, the released DOC increased suddenly, from  $5.07$  to  $8.05 \text{ mg L}^{-1}$ , in one day, reaching higher levels than control.

#### Release of fluorescent organic matter

In culture medium, several molecules can be exudated, with different chemical properties. Some molecules had fluorescent properties, mainly proteins (tyrosine, tryptophan, phenylalanine), and aromatic compounds.



**Fig. 3** Temporal evolution of DOC exudates by *Skeletonema costatum* grown in control and copper conditions (Cu<sub>1</sub> and Cu<sub>2</sub>) ( $n = 3$ )

Following the treatment by PARAFAC, three components were extracted in control and contaminated cultures (Concordia: 70.50 %) (Fig. 4).

The C1 component was composed of two maxima (250/475 and 325/475 nm), which can be attached to organic matter such as fulvic and humic matter (Fig. 4). This component could be linked to degradation of dead cells during the late stationary phase, in response to cupric stress.

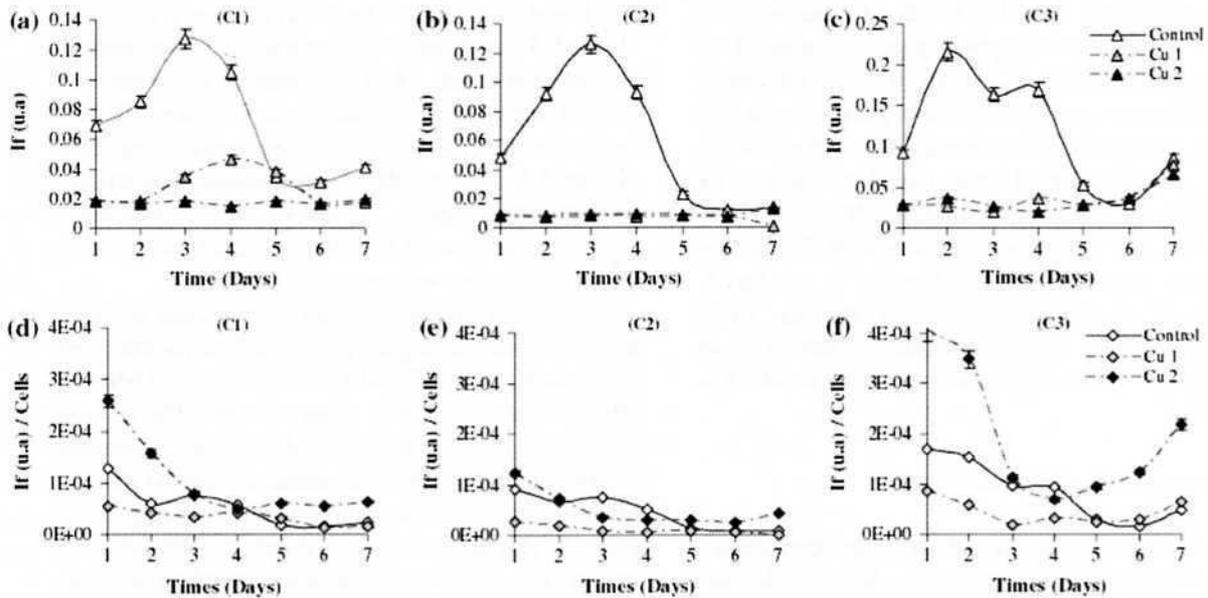
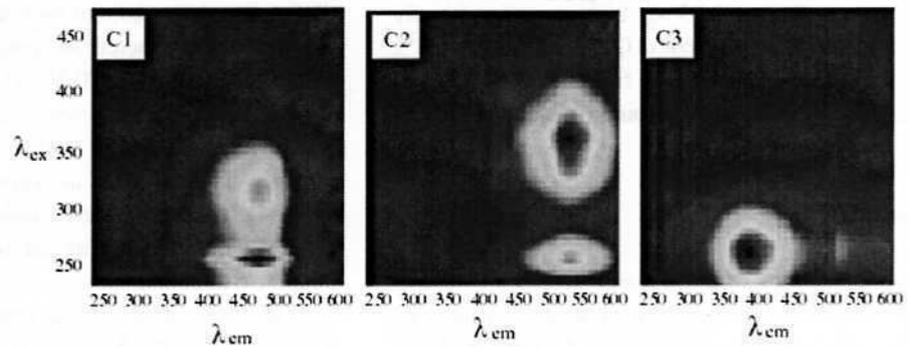
The C2 component was composed of two maxima (250/550 and 350/550 nm) (Fig. 4). This component was described as related to marine production (Ishii and Boyer 2012), even if one can observe a red-shift.

The C3 component was composed of a maximum at 250/380 nm, and of a secondary maximum at 250/500 nm, and was typically protein-like (Fig. 4). In protein area, there was only one protein peak that appeared. This fluorophore was considered as tryptophan-like fluorophore. The evolution of the fluorescence contribution of the three detected components during incubation was presented on Fig. 5.

For control conditions, there was a regular increase in fluorescence during the growth period for the three components (C1, C2 and C3) until day 3. Then, an important decrease was observed until the end of incubation. In Cu<sub>1</sub> conditions, a delay in the apparition of the C1 component (maximum on day 4) can be observed, with a lower contribution compared to the control. This delay was yet observed in the growth graphs (Fig. 1). In Cu<sub>2</sub> conditions, contribution of the C1 component was constant and low. The C2 and C3 components were similar, except the last day for the C3 component, where an increase in fluorescence was observed. The decrease in the component contribution observed after the exponential phase for control, Cu<sub>1</sub> and Cu<sub>2</sub> could explain the stabilisation of the organic matter produced during the stationary phase.

When examining the specific fluorescent response to cell content, a pronounced exponential decrease in the control and the Cu<sub>2</sub> conditions (Fig. 5d–f) can be observed. For Cu<sub>1</sub>, the decrease was less important, meaning that the production of fluorescent molecules was controlled by the cell number under moderate  $[\text{Cu}^{2+}] = 10^{-9} \text{ M}$ . The C3 component showed a high specific fluorescence contribution, at the beginning, and at the end of the incubation period (Fig. 5f). This component was related to the protein domain, its evolution also showed an increase on day 7, for all the studied treatments. This could be linked to cell

**Fig. 4** Representation of the C1, C2 and C3 component contributions. For three graphs, abscissa represented wavelength emission and the ordinate wavelength excitation



**Fig. 5** Evolution of fluorescence intensity (a, b and c) and of specific fluorescence (divided by cells) (d, e and f) throughout the time of culture, for the three components (C1, C2 and C3) detected in the different conditions (control, Cu<sub>1</sub> and Cu<sub>2</sub>)

degradation, as suggested by the pheopigment increase occurring at the end of incubation.

## Discussion

In the present study, the physicochemical conditions of the three studied cultures essentially differed in terms of free copper concentrations. The decrease in the growth kinetics in Cu<sub>1</sub> and Cu<sub>2</sub> conditions, compared to the control, could explain the effects of free copper levels on the lag phase, which appeared less important when concentrations of Cu<sup>2+</sup> increased from 10<sup>-9</sup> to 10<sup>-8</sup> M. This could mean that cells spent much time to divide when cupric activities became

high, i.e. [Cu<sup>2+</sup>] = 10<sup>-8</sup> M, in the medium. The same results were obtained by Rueter (1977), and Anderson and Morel (1978) for *S. costatum*, which reported a variation of the lag phase, according to increases in free copper concentrations. Similarly, the results of Morel et al. (1978) showed an increase in the length of the lag phase, when in presence of 10<sup>-8.5</sup> M of Cu<sup>2+</sup>. This concentration was close to that causing the growth inhibition in the present study. Previously, it has been shown that *S. costatum* was inhibited at [Cu] = 6 × 10<sup>-6</sup> M, in presence of 5 × 10<sup>-6</sup> M EDTA, i.e. 10<sup>-8.5</sup> M of Cu<sup>2+</sup> (Morel et al. 1978). By contrast, in this study, the inhibition was observed for the same species, at 10<sup>-9</sup> M of Cu<sup>2+</sup>, in presence of 10 × 10<sup>-6</sup> M of EDTA. Moreover, Brand et al.

(1986) reported that *S. costatum* was particularly resistant to free copper, being able to divide, at the cupric ion activities tested ( $10^{-9.5}$  and  $10^{-9.2}$  M of  $\text{Cu}^{2+}$ ), like in the present  $\text{Cu}_1$  conditions. Above the  $\text{Cu}_1$  range of concentrations ( $10^{-8}$  to  $10^{-8.4}$  M  $\text{Cu}^{2+}$ ), *S. costatum* did not grow, as it has been demonstrated by Metaxas and Lewis (1991).

The effect of  $\text{Cu}^{2+}$  levels on the variability of the lag and the stationary phases, led to suggest a cellular adaptation. As a result, one can think that the medium became conditioned by the cells themselves, and that the conditioning occurred during the extended lag phase. Indeed, cell exudated organic substances in response to the increase in free metals. The produced DOM should alter the copper speciation in the medium by binding the metals (Fisher and Fabris 1982). This assumption was validated for  $\text{Cu}_1$  conditions, through a higher DOC release and by the C1 fluorescent component production peak, on days 3–5. Another possibility was that the surviving cells may become adapted to the high free copper levels, during the extended lag phase. This adaptation may implicate an intracellular physiological response, such as the exudation of fluorescent tryptophan-like at the beginning of the lag phase. The isolated strain coming from coastal polluted waters (small bay of Toulon), wherein the concentrations of total Cu were about  $4 \times 10^{-8}$  M (Rossi and Jamet 2008; Jean et al. 2012), could be more resistant than strain isolated from open waters. This observation was also proved by Murphy and Belastock (1980), in their examination of the tolerance of *S. costatum* to metal stress in two oceanic and neritic environments.

The significant effects of free copper activity on the *S. costatum* response were also supported by result concerning pigment concentration. In control conditions, Chl *a* and pheopigments exhibited the same patterns as growth kinetics. In this culture medium, free copper activity ( $10^{-12}$  M  $\text{Cu}^{2+}$ ) seemed not to be toxic for cells and pigment production. On the other hand, the presence of EDTA at  $10 \times 10^{-6}$  M played an important role in chelating processes. However, when  $\text{Cu}^{2+}$  increased in the medium ( $10^{-9}$  M), the pigment concentrations decreased, compared to the control. Furthermore, the production of Chl *a* was high during the growth phase and then fell during the stationary phase. The enhancement of Chl *a* during the exponential phase could be related to the energetic necessity of cells for absorption and reduction of some

nutrients, in contaminated medium. By contrast, the decrease in Chl *a* production in stationary phase involved the difficulty of the strain to adapt in the medium used up of nutrients. These data suggest that the photosynthesis process could be affected under high copper levels (Côté 1983; Thompson and Couture 1991).

Results of DOC showed different behaviors between control and contaminated cultures. Indeed, the synchronous DOC release with growth kinetics in control conditions meant that a part of the DOC was produced by cells. The stability of DOC concentrations registered at the end of incubation may result from cellular degradation. When  $\text{Cu}^{2+}$  increased ( $10^{-9}$  M), the released DOC was significantly higher than in control cultures, proving that cells triggered a reaction of exudation in response to stress (Pistocchi et al. 1997; Diannelidis and Delivopoulos 1997). By contrast, under high  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations ( $10^{-8}$  M), despite a low DOC release, an enhancement of DOC to cell ratio was observed in presence of the low cell densities. In this case, it can be hypothesized that DOC came from both exudation and cell degradation, which was clearly confirmed by the high pheopigment levels observed at the end of incubation in  $\text{Cu}_2$  conditions. The organic molecules exudated by *S. costatum* might have complexing properties towards free copper and could play an important role in metal speciation, as it has been reported in previous studies (Vasconcelos et al. 2002). This could be confirmed by the increase in fluorescence contribution of the C1 component during the exponential phase under  $10^{-9}$  M  $\text{Cu}^{2+}$ . The 3D-fluorescence spectroscopy also revealed that under increased cupric activities ( $10^{-9}$ – $10^{-8}$  M  $\text{Cu}^{2+}$ ), the fluorescence contribution was low for the three studied components. The C3 component, which exhibited a little increase at the end of the incubation, could be an indicator of the cell proteins release. Moreover, the absence of fluorescence contribution for component under contaminated conditions could be attributed to copper quenching, except for the component C1, for which the fluorescence signal occurred under  $10^{-9}$  M of  $\text{Cu}^{2+}$ . This fluorescence peak meant that a back quenching occurred, due to competitive complexing molecules produced by the cells. However, it seemed that for  $\text{Cu}_2$  conditions, free copper concentrations ( $10^{-8}$  M  $\text{Cu}^{2+}$ ) were too high limiting the phytoplankton biomass and decreasing the fluorescence of dissolved proteins. The C2 and C3 components were

more affected compared to C1, may be due to the low complexation constant between exudates and these components. The first type C1 was related to labile DOC, directly exudated by phytoplankton. The second component C2 was refractory humic-like material, presumably produced in situ, by transformation of biological material (Ishii and Boyer 2012). Their occurrence confirmed the marine origin of these components. Furthermore, these components could be the origin of the organic compounds naturally present in seawater (Coble 1996; Ishii and Boyer 2012). The ability of *S. costatum* to release DOM in responses to cupric stress has been also studied by Lorenzo et al. (2007), which demonstrated an exudation of ligands complexing free copper.

## Conclusion

The present study confirmed that under increasing free copper concentrations, the growth of the diatom *S. costatum* was affected. As a result, the concentrations of organic molecules (DOC and FDOM) increased in medium contaminated by moderate cupric concentration ( $10^{-9}$  M  $\text{Cu}^{2+}$ ). Fluorescence measurements revealed that the phytoplankton cells here studied were able to release a material susceptible to change metallic speciation. Release-DOC and C1 humic-like fluorescent component (250/475 and 325/475 nm) increases occurred during the growth process. Indeed, the diatom exudation was more pronounced during the exponential phase freeing the fluorescent C1 component under copper contamination. It was not possible to define if these complexant molecules were directly responsible for the speciation changes. Contamination of copper, influencing the production of carbon and of fluorescent components, led to modification of the cell environment.

**Acknowledgments** We gratefully acknowledge the financial assistance provided by the ARCUS CERES program. This work would have never achieved without the analysis of carbon measurements provided by Mr. Gaël Durrieu.

## References

- Ahner BA, Price NM, Morel FMM (1994) Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8433–8436
- Anderson DM, Morel FMM (1978) Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. *Limnol Oceanogr* 23:283–295
- Ballan-Dufrançais C, Marcaillou C, Amiard-Triquet C (1991) Response of the phytoplanktonic alga *Tetraselmis suecica* to copper and silver exposure: vesicular metal bioaccumulation and lack of starch bodies. *Biol Cell* 72:103–112
- Ben Othman H, Le Boulanger C, Le Floch E, Mabrouk HH, Hlaili AS (2012) Toxicity of benz(a)anthracene and fluoranthene to marine phytoplankton in culture: does cell size really matter. *J Hazard Mater* 243:204–211
- Bossuyt BTA, Janssen CR (2004) Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: changes in tolerance and physiology. *Aquat Toxicol* 68:61–74
- Brand LE, Sunda WG, Guillard RRL (1986) Reproduction of marine phytoplankton rate by copper and cadmium. *J Exp Mar Biol Ecol* 96:225–250
- Bro R (1997) PARAFAC tutorial and applications. *Chemom Intell Lab* 38:149–171
- Coble PG (1996) Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar Chem* 51:325–346
- Ćosović B (2005) Surface active properties of the sea surface microlayer and consequences for pollution in the Mediterranean Sea. In: Saliot A (ed) *The Mediterranean Sea. The handbook of environmental chemistry series*. Springer, Berlin, pp 269–297
- Côté R (1983) Toxic aspects of copper on the biomass and productivity of phytoplankton in the Saguenay River, Quebec. *Hydrobiologia* 98:85–95
- Diannelidis BE, Delivopoulos SG (1997) The effects of zinc, copper and cadmium on the fine structure of *Ceramium ciliatum*. *Mar Environ Res* 44:127–134
- Dryden CL, Gordon AS, Donat JR (2007) Seasonal survey of copper-complexing ligands and thiol compounds in a heavily utilized, urban estuary: Elizabeth River, Virginia. *Mar Chem* 103:276–288
- Fisher NS, Fabris JG (1982) Complexation of Cu, Zn and Cd by metabolites excreted from marine diatoms. *Mar Chem* 11:245–255
- Gouvea SP, Vieira AAH, Lombardi AT (2005) Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials of dominant microalgae and of water from a eutrophic reservoir. *Chemosphere* 60:1332–1339
- Guillard RRL, Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol* 8:228–239
- Holbrook RD, Yen JH, Grizzard TJ (2006) Characterizing natural organic material from the Occoquan Watershed (Northern Virginia, US) using fluorescence spectroscopy and PARAFAC. *Sci Total Environ* 361:249–266
- Hudson RJM (1998) Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Observations and predictions of non-equilibrium effects. *Sci Total Environ* 219:95–115
- Ishii SKL, Boyer TH (2012) Behavior of reoccurring PARAFAC components in fluorescent dissolved organic matter in natural and engineered systems: a critical review. *Environ Sci Technol* 46:2006–2017

- Jaffé R, Boyer JN, Lu X, Maie N, Yang C, Scully NM, Mock S (2004) Source characterization of dissolved organic matter in a subtropical mangrove dominated estuary by fluorescence analysis. *Mar Chem* 84:195–210
- Jean N, Estelle D, Durrieu G, Balliau T, Jamet JL, Personnic S, Garnier C (2012) Protein expression from zooplankton communities in a metal contaminated NW mediterranean coastal ecosystem. *Mar Environ Res* 80:12–26
- Khan SH, Saifullah SM (1986) Bioassay studies of phytoplankton of coastal waters of Karachi in relation of heavy metal pollution: I. Effect of copper and lead on *Skeletonema costatum*. *Pak J Bot* 18:137–145
- Kowalczyk P, Ston-Egiert J, Cooper WJ, Whitehead RF, Durako MJ (2005) Characterization of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Baltic Sea by excitation emission matrix fluorescence spectroscopy. *Mar Chem* 96:273–292
- Lorenzen CJ (1967) Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnol Oceanogr* 12:343–346
- Lorenzo JJ, Nieto-Cid M, Alvarez-Salgado XA, Perez P, Beiras R (2007) Contrasting complexing capacity of dissolved organic matter produced during the onset, development and decay of a simulated bloom of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Mar Chem* 103:61–75
- Luciani X, Mounier S, Paraquetti HHM, Redon R, Lucas Y, Bois A, Lacerda LD, Raynaud M, Ripert M (2008) Tracing of dissolved organic matter from the Sepetiba Bay (Brazil) by PARAFAC analysis of total luminescence matrices. *Mar Environ Res* 65:148–157
- Luciani X, Mounier S, Redon R, Bois A (2009) A simple correction method of inner filter effects affecting FEEM and its application to the PARAFAC decomposition. *Chemom Intell Lab* 96:227–238
- Maeda S, Sakaguchi T (1990) Accumulation and detoxification of toxic metal elements by algae. In: Akatsuka I (ed) Introduction to applied phycology. SPB Academic Publishing, Hague, pp 109–136
- Metaxas A, Lewis AG (1991) Copper tolerance of *Skeletonema costatum* and *Nitzschia thomasi*. *Aquat Toxicol* 19:265–280
- Mopper K, Zhou J, Ramana KS, Passow U, Dam HG, Drapeau DT (1995) The role of surface-active carbohydrates in flocculation of diatom bloom in a mesocosm. *Deep Sea Res* 42:47–73
- Morel NML, Rueter JG, Morel FMM (1978) Copper toxicity of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 14:43–48
- Murphy LS, Belastock RA (1980) The effects of environmental origin on the response of marine diatoms to chemical stress. *Limnol Oceanogr* 25:160–165
- Nagao S, Mastunaga T, Suzuki Y, Ueno T, Amano H (2003) Characteristics of humic substances in the Kuji River waters as determined by high-performance size exclusion chromatography with fluorescence detection. *Water Res* 37:4159–4170
- O'Halloran TV, Culotta VC (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem* 275:25057–25060
- Parlanti E, Morin B, Vacher L (2000) Combined 3D-spectrofluorimetry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the characterization of dissolved organic matter in natural waters. *Org Geochem* 33:221–236
- Perrein-Ettajani H, Amiard JC, Haure J, Renaud C (1999) Effects of heavy metals (Ag, Cd, Cu) on the biochemical composition and bioaccumulation of these metals on the microalgae *Skeletonema costatum* and *Tetraselmis suecica*. *Can J Fish Aquat Sci* 56:1757–1765
- Pistocchi R, Guerrini F, Balboni V, Boni L (1997) Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium* sp. *Eur J Phycol* 32:125–132
- Plavšić M, Lee C, Čosović B, Lee C (2006) Copper complexing properties of melanoidins and marine humic material. *Sci Total Environ* 366:310–319
- Richards FA, Thompson TG (1952) The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J Mar Res* 11:156–172
- Ross ARS, Ikononou MG, Orians KJ (2003) Characterization of copper complexing ligands in seawater using immobilized copper (II) ion affinity chromatography and electro-spray ionization mass spectrometry. *Mar Chem* 83:47–58
- Rossi N, Jamet JL (2008) In situ heavy metals (copper, lead and cadmium) in different plankton compartments and suspended particulate matter in two coupled Mediterranean coastal ecosystems (Toulon Bay, France). *Mar Pollut Bull* 56:1862–1870
- Rueter JG (1977) The response of *Skeletonema costatum* to copper relating to the questions of medium conditioning. Masters thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge
- Sakka Hlaïli A, Grami B, Hadj Mabrouk H, Gosselin M, Hamel D (2007) Phytoplankton growth and microzooplankton grazing rates in a restricted Mediterranean lagoon (Bizerte Lagoon, Tunisia). *Mar Biol* 151:767–783
- Stedmon CA, Bro R (2008) Oceanography methods characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Environ Res* 6:572–579
- Thompson PA, Couture P (1991) Short- and long-term changes in growth and biochemical composition of *Selenastrum capricornutum* populations exposed to cadmium. *Aquat Toxicol* 21:135–144
- Vasconcelos MTSD, Leal MFC, Van Den Berg CMG (2002) Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake and exudation of *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Mar Chem* 77:187–210
- Visviki I, Rachlin JW (1994) Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: effects on growth. *Arch Environ Contam Toxicol* 26:149–153
- Yan H, Pan G (2002) Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere* 49:471–476
- Zhang S, Xu C, Santschi PH (2008) Chemical composition and 234Th (IV) binding of extracellular polymeric substances (EPS) produced by the marine diatom *Amphora* sp. *Mar Chem* 112:81–92



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)

## Copper and cadmium effects on growth and extracellular exudation of the marine toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*: 3D-fluorescence spectroscopy approach

Faouzi Herzi<sup>a,b</sup>, Natacha Jean<sup>b</sup>, Huiyu Zhao<sup>b</sup>, Stéphane Mounier<sup>b,\*</sup>, Hassine Hadj Mabrouk<sup>a</sup>, Asma Sakka Hlaili<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université de Carthage, Faculté des Sciences de Bizerte, LCVP, 7021 Jarzouna, Bizerte, Tunisia

<sup>b</sup> Université de Toulon, PROTEE, EA 3819, 83 957 La Garde, France

### HIGHLIGHTS

- Effects of trace metals on growth kinetics of the marine toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*.
- Effects of trace metals on organic exudates from the marine toxic dinoflagellate *A. catenella*.
- *A. catenella* is a species tolerant to high trace metal concentrations.
- Release of Fluorescent Dissolved Organic Matter by toxic phytoplankton could play an important role in metal speciation.
- Defence mechanisms set up by the toxic dinoflagellate against metal stress.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 March 2013

Received in revised form 21 June 2013

Accepted 29 June 2013

Available online xxx

#### Keywords:

Metals

DOC

3D-fluorescence spectroscopy

PARAFAC

*Alexandrium catenella*

Toxic dinoflagellate

### ABSTRACT

In this study, metal contamination experiments were conducted to investigate the effects of copper and cadmium on the growth of the marine toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and on the production of dissolved organic matter (Dissolved Organic Carbon: DOC; Fluorescent Dissolved Organic Matter: FDOM). This species was exposed to increasing concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  ( $9.93 \times 10^{-10}$ – $1.00 \times 10^{-7}$  M) or  $\text{Cd}^{2+}$  ( $1.30 \times 10^{-8}$ – $4.38 \times 10^{-7}$  M), to simulate polluted environments. The drastic effects were observed at  $\text{pCu}^{2+} = 7.96$  ( $\text{Cu}^{2+}$ :  $1.08 \times 10^{-8}$  M) and  $\text{pCd}^{2+} = 7.28$  ( $\text{Cd}^{2+}$ :  $5.19 \times 10^{-8}$  M), where cyst formation occurred. Lower levels of  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{pCu}^{2+} > 9.00$ ) and  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{pCd}^{2+} > 7.28$ ) had no effect on growth. However, when levels of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  were beyond  $10^{-7}$  M, the growth was totally inhibited. The DOC released per cell (DOC/Cell) was different depending on the exposure time and the metal contamination, with higher DOC/Cell values in response to  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$ , comparatively to the control. Samples were also analyzed by 3D-fluorescence spectroscopy, using the Parallel Factor Analysis (PARAFAC) algorithm to characterize the FDOM. The PARAFAC analytical treatment revealed four components (C1, C2, C3 and C4) that could be associated with two contributions: one, related to the biological activity; the other, linked to the decomposition of organic matter. The C1 component combined a tryptophan peak and a characteristic humic substances response, and the C2 component was considered as a tryptophan protein fluorophore. The C3 and C4 components were associated to marine organic matter production.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Abbreviations:** CFP, Ciguatera Fish Poisoning; CDA, Controlled Dilution Approach; DOC, Dissolved Organic Carbon; DOM, dissolved organic matter; EEM, Excitation–Emission Matrix of Fluorescence; FDOM, Fluorescent Dissolved Organic Matter; HAB, Harmful Algal Bloom; NSP, Neurotoxic Shellfish Poisoning; PARAFAC, Parallel Factor Analysis; PSP, Paralytic Shellfish Poisoning.

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 94 14 28 29; fax: +33 4 94 14 21 68.

E-mail addresses: [faouzi-herzi@univ-tln.fr](mailto:faouzi-herzi@univ-tln.fr) (F. Herzi), [jean@univ-tln.fr](mailto:jean@univ-tln.fr) (N. Jean), [huiyu.zhao@univ-tln.fr](mailto:huiyu.zhao@univ-tln.fr) (H. Zhao), [mounier@univ-tln.fr](mailto:mounier@univ-tln.fr) (S. Mounier), [asma\\_sakka@yahoo.fr](mailto:asma_sakka@yahoo.fr) (A.S. Hlaili).

0045-6535/\$ - see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.084>

### 1. Introduction

Dinoflagellates are responsible for 75% of the marine harmful algal blooms (HABs) (Chan et al., 2002). They may induce various syndromes such as: The Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP), the Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) and the Ciguatera Fish Poisoning (CFP) (Glibert et al., 2005). Over the last decades, the frequency and the distribution of HABs have increased in marine coastal ecosystems (Sellner et al., 2003). As a result, although it has not yet been

Please cite this article in press as: Herzi, F., et al. Copper and cadmium effects on growth and extracellular exudation of the marine toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*: 3D-fluorescence spectroscopy approach. Chemosphere (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.084>

really demonstrated, eutrophication forced by anthropogenic inputs could partially explain the HAB expansion (Glibert et al., 2005). Among the dinoflagellates, *Alexandrium* genus is one source of HABs. Blooms of *Alexandrium* have been reported in various marine waters, such as the northwest Mediterranean (Penna et al., 2005), the coastal waters of Chile (Cordova and Muller, 2002), Tunisia (Turki and Balti, 2005), Algeria (Frehi et al., 2007), and in France (Thau lagoons) (Lilly et al., 2002).

In a polluted coastal marine ecosystem (Toulon Bay, France), the dinoflagellates were predominant relatively to other phytoplankton groups like diatoms (Jean et al., 2005). In this ecosystem, where metal contamination has been reported (Tessier et al., 2011), *Alexandrium* bloomed at some periods of the year (Jean et al., 2006), suggesting that this genus could be tolerant to metal contamination.

In marine ecosystems, metal cations are complexed by natural inorganic and organic ligands. This complexation leads to a competition between natural ligands present in organic matter, inorganic anions, and membrane transport proteins for binding metal cations, which change the bioavailability of the metal for the cell (Sunda and Hunstman, 1998). As a result, complexation of metals by natural organic ligands often decreases their toxicity in aquatic environments (Moffett et al., 1990). Hence, metal toxicity towards organisms does not only depend on the total metal concentration, but essentially on the metal cation chemical speciation, which can be calculated on the basis of the free ion activity model (Sunda and Guillard, 1976). The natural organic ligands capable of metal complexation can have a biological origin, as the phytochelate, which is produced by phytoplankton for the metal detoxication (Le Faucheur et al., 2005). Moreover, organic ligands released by phytoplankton can modify trace metal speciation (Vasconcelos et al., 2002). Therefore, the studies characterizing the DOM released by phytoplankton under stress metal conditions should bring a better knowledge of the DOM implication in the metal availability for phytoplankton. This DOM can be monitored by 3D-fluorescence spectroscopy approach.

The fluorescence spectroscopy technique has been applied to characterize DOM coming from various environments. Successive advances in fluorescence analysis have improved the method, from 1-dimension (Vodacek et al., 1997), and then, 2-dimensions (Lloyd, 1971), to a powerful technique based on the Excitation–Emission Matrices of fluorescence (EEMs). Studies on Fluorescent Dissolved Organic Matter (FDOM) have been carried out from samples collected in many types of aquatic ecosystems, such as rivers (Mounier et al., 1999), estuaries (Jaffé et al., 2004), benthic (sediment pore water) or polluted areas (Burdige, 2004), biological cultures (Parlanti et al., 2000) and marine ecosystems (Kowalczyk et al., 2005). To improve identification of fluorescent compounds, the PARAFAC algorithm is applied as a statistical EEMs treatment (Bro, 1997). Thanks to PARAFAC, the FDOM can be mathematically identified, leading to the optimal separation of fluorescent components. Other algorithms have helped to non linear corrections: the elimination of Rayleigh and Raman scatterings (Zepp et al., 2004), the statistical method Concordia (Bro and Kiers, 2003), and an inner filter effect correction using the Controlled Dilution Approach (CDA) (Luciani et al., 2009). PARAFAC has been successfully used to investigate the FDOM origins in aquatic samples from estuarine (Luciani et al., 2008), marine (Murphy et al., 2008) and freshwater ecosystems (Holbrook et al., 2006), and it also has been applied to soil-extracted DOM (Banaitis et al., 2006). However, to our knowledge, no study mentions the use of PARAFAC to characterize FDOM released by phytoplankton grown in cultures contaminated by metals.

The first objective of this study is to examine the effects of the two trace metals, copper and cadmium, on the growth of *Alexandrium catenella*, in order to explore the physiological response of this

dinoflagellate to metal stress. A second objective is to characterize the FDOM released by *A. catenella* cultures submitted to increasing Cu and Cd concentrations. This characterization, based on DOC analysis, and on FDOM 3D-fluorescence results treated by PARAFAC, aimed at investigating the links potentially existing between FDOM exudates and metal contamination as a result of *A. catenella* stress reaction.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *Alexandrium catenella* cultures

A strain of *A. catenella* (ACT03) was isolated from the Thau lagoon (France) in 2003, by the Laboratory Ecologie des Systèmes Marins Côtiers (ECOSYM UMR 5119, Université Montpellier 2, CNRS, Ifremer and IRD). The cultures from this strain were maintained in f/2 medium prepared in 0.2 µm polycarbonate filtered and sterilized natural low contaminated seawater. The cultures were grown at +20 °C in sterile 250 mL flasks exposed to 135 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> during light:dark cycle of 12 h:12 h.

To study the effects of metal contamination on the growth, on DOC and on the FDOM responses, culture medium was supplemented with two different solutions of the studied metals, prepared in ultrapure water with CuSO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O or with 3CdSO<sub>4</sub>, 8H<sub>2</sub>O salts. For each metal, different levels of contamination were achieved thanks to eight different total concentrations (3, 6, 12, 16, 18, 25, 60 and 100 µM). Growth conditions were labeled as following: Cd<sub>i</sub> or Cu<sub>j</sub>, where *i* and *j* are the total metal concentrations expressed in µM. Based on the MINEQL-program and on the known composition of the f/2 solution, the corresponding Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> were calculated, and reported in pM<sup>2+</sup> units. The pCu<sup>2+</sup> and pCd<sup>2+</sup> were defined as the negative Log<sub>10</sub> of the molar free Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> ion concentrations (Table 1). Cation activities of Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> were calculated and found below 10<sup>-11</sup> M in the control conditions.

### 2.2. *A. catenella* growth kinetics

Growth kinetics of contaminated and control cultures were monitored by counting cells present in 1 mL-Lugol fixed subsamples, with an inverted microscope (Leica DMI 4000 B) at a magnification of 100×. Cell counts were performed until the stationary phase, i.e. during 30 d, at 5 d period interval. The net growth rate ( $\mu$ ) and cell doubling rate (*K*), were then calculated using an exponential model (Landry and Hassett, 1982).

At a given metal concentration, decrease in cell concentration ( $\Delta D$ ) was calculated by the following equation:

$$\Delta D = \frac{D_T - D_M}{D_T} \times 100$$

where  $D_T$  is the cell concentration in control conditions during stationary phase, and  $D_M$ , the cell concentration in given metal contamination conditions during the stationary phase.

**Table 1**

Total and free metal concentrations, expressed in M, and free metal concentration expressed in pM<sup>2+</sup> units, used for Cu and Cd contamination of *Alexandrium catenella* ACT03 cultures.

[M]T (M)	[Cd <sup>2+</sup> ] (M)	pCd <sup>2+</sup>	[Cu <sup>2+</sup> ] (M)	pCu <sup>2+</sup>
3 × 10 <sup>-6</sup>	1.30 × 10 <sup>-8</sup>	7.88	9.93 × 10 <sup>-10</sup>	9.00
6 × 10 <sup>-6</sup>	2.59 × 10 <sup>-8</sup>	7.58	2.51 × 10 <sup>-9</sup>	8.60
12 × 10 <sup>-6</sup>	5.19 × 10 <sup>-8</sup>	7.28	7.06 × 10 <sup>-9</sup>	8.15
16 × 10 <sup>-6</sup>	6.93 × 10 <sup>-8</sup>	7.15	1.08 × 10 <sup>-8</sup>	7.96
18 × 10 <sup>-6</sup>	7.80 × 10 <sup>-8</sup>	7.10	1.27 × 10 <sup>-8</sup>	7.89
25 × 10 <sup>-6</sup>	1.08 × 10 <sup>-7</sup>	6.96	1.98 × 10 <sup>-8</sup>	7.70
60 × 10 <sup>-6</sup>	2.92 × 10 <sup>-7</sup>	6.53	5.69 × 10 <sup>-8</sup>	7.24
100 × 10 <sup>-6</sup>	4.38 × 10 <sup>-7</sup>	6.36	1.00 × 10 <sup>-7</sup>	7.00

### 2.3. DOC determination

The DOC concentrations were measured on 35 mL *A. catenella* subsamples, first homogenized, and then filtered through a pre-combusted (450 °C, 4 h) glass fiber filter (Whatman GF/F). In the obtained filtrates, DOC concentrations were determined with a total organic carbon analyzer (TOC-V<sub>CSH</sub>, Shimadzu) linked to an automatic sample injector (ASI-V, Shimadzu). DOC measurements were carried out in triplicate, standard deviations being always below 2%. The relative carbon content by cell was obtained by dividing the DOC content by the cell concentration DOC/Cell (ng C Cell<sup>-1</sup>), to express the cell activity.

### 2.4. 3D-fluorescence spectroscopy

The EEMs measurements were carried out in 4 mL of filtered *A. catenella* subsamples. Fluorescence was measured using a spectrofluorometer (Hitachi F4500) equipped with a Xenon excitation lamp (Xc152HUS, Ushio). The slits of both excitation and emission were fixed at 5 nm. The excitation wavelengths were scanned from 200 nm to 480 nm, and those of the emission were between 200 nm and 600 nm, both with a 5 nm step and a scan speed of 2400 nm min<sup>-1</sup>. PARAFAC was programmed based on the software MATLAB (version 6.5) and algorithm of Stedmon (Stedmon and Bro, 2008). The inner filter effect was systematically corrected by the CDA procedure (Luciani et al., 2009) by measuring the raw filtered sample and the half diluted one. After these corrections, the best decomposition of the 96 EEMs (6 d × 2 metals × 8 concentrations of metal) was optimized for four components (Concordia: 84.51%). Contribution of the components were divided by the DOC concentration to give the specific fluorescence, called F<sub>DOC</sub>, or divided by the number of cells in solution to have cell specific fluorescence contribution, called F<sub>Cell</sub>.

### 2.5. Statistical analyses

Statistical tests were performed using Statistica 7.1. software for Windows. The non-parametric Wilcoxon test was applied to compare growth kinetics among contaminated and control cultures of *A. catenella*. Differences, characterized by *p* coefficients, were considered as significant at *p* < 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Effects of metals on *A. catenella* growth kinetics

Growth of the metal contaminated cultures showed quantitative perturbations in comparison with the control (Fig. 3). For low Cu<sup>2+</sup> concentration,  $\Delta D$  was decreased from 7% at pCu<sup>2+</sup> = 9.00 (Cu<sub>3</sub>) to 38% at pCu<sup>2+</sup> = 8.15 (Cu<sub>12</sub>) (Fig. 1). At higher concentrations, beyond pCu<sup>2+</sup> = 7.96 (Cu<sub>16</sub>),  $\Delta D$  decreased drastically (100%), indicating that no growth was observed. For Cd,  $\Delta D$  was about 30% at pCd<sup>2+</sup> = 7.88 (Cd<sub>3</sub>). Concentration of free metals reaching around 1.30 × 10<sup>-8</sup> M induced 100% of decrease in cell concentration for Cu<sub>18</sub> and 30% for Cd<sub>3</sub>. These results suggest that Cu was more toxic for *A. catenella* than Cd, at equal concentration in free ions. Between pCd<sup>2+</sup> = 7.88 and 7.28,  $\Delta D$  increased slightly to 40%, and then more so until pCd<sup>2+</sup> = 6.36, where no growth was observed.

The net growth rate ( $\mu$ , Fig. 2) and the doubling rate (*K*, data not shown) of cells in control cultures, reached 0.24 and 0.34 d<sup>-1</sup>, respectively. For Cu contamination, beyond pCu<sup>2+</sup> = 7.96 (Cu<sub>16</sub>), the growth of *A. catenella* was totally inhibited ( $\mu$  and *K* = 0.00 d<sup>-1</sup>). For Cd contamination, between pCd<sup>2+</sup> = 7.88 and pCd<sup>2+</sup> = 7.28, the *A. catenella* growth seemed to be slightly

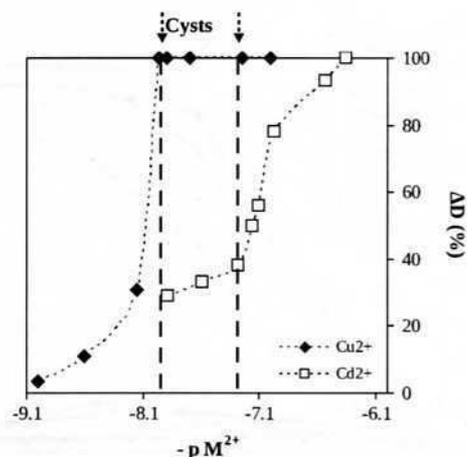


Fig. 1. Decrease in cell concentration of *Alexandrium catenella* ACT03 at the stationary phase of growth (>day 20) under Cu or Cd contamination.  $\Delta D$ : decrease in cell concentration.

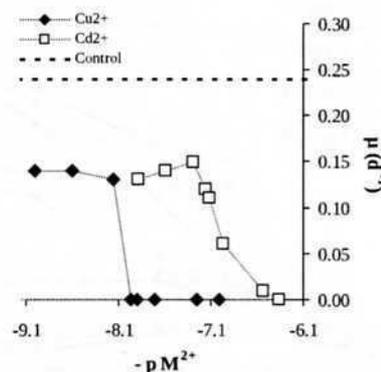


Fig. 2. Net growth rates ( $\mu$ , in d<sup>-1</sup>) of *Alexandrium catenella* ACT03 in control and metal contaminated cultures.

enhanced, as attested by the increase in  $\mu$  (0.13–0.15 d<sup>-1</sup>) and in *K* (0.18–0.21 d<sup>-1</sup>). Then, a regular decrease in the  $\mu$  values was observed from pCd<sup>2+</sup> = 7.15 (0.12 d<sup>-1</sup>) to pCd<sup>2+</sup> = 6.36 (0.00 d<sup>-1</sup>).

### 3.2. Effects of metals on DOC/Cell release

The DOC/Cell released was systematically observed at day 5, suggesting a fast cell reaction towards metal stress (Fig. 4). The cultures contaminated by pCu<sup>2+</sup> = 9.00 and pCu<sup>2+</sup> = 8.60, exhibited no significant difference in DOC/Cell (Wilcoxon test: *p* > 0.05) compared to control. However, the contamination at pCu<sup>2+</sup> = 7.96 (Cu<sub>16</sub>) showed significantly higher DOC/Cell (3.3–27.0 ng Cell<sup>-1</sup>) than the control (Wilcoxon test: *p* < 0.05) (Fig. 4A). This increase was persistent until pCu<sup>2+</sup> = 7.89 (Cu<sub>18</sub>). For Cd contamination, it seemed that DOC/Cell was enhanced under higher contamination levels (Fig. 4B), but in a lesser value than that obtained in presence of copper. For both Cu and Cd, the cellular exudation carbon ratio showed a depression on day 10. The maximal values of DOC/Cell were observed at pCu<sup>2+</sup> = 7.96 and at pCd<sup>2+</sup> = 6.36.

### 3.3. Effects of metals on FDOM

The C1 component (Figs. 5–7, Line 1) had a maximum intensity for 240 nm of excitation and 350 nm of emission, with a slow decrease until 420 nm. This component combined a tryptophan peak (SR peak maximum around 340 nm, in Burdige et al., 2004), and

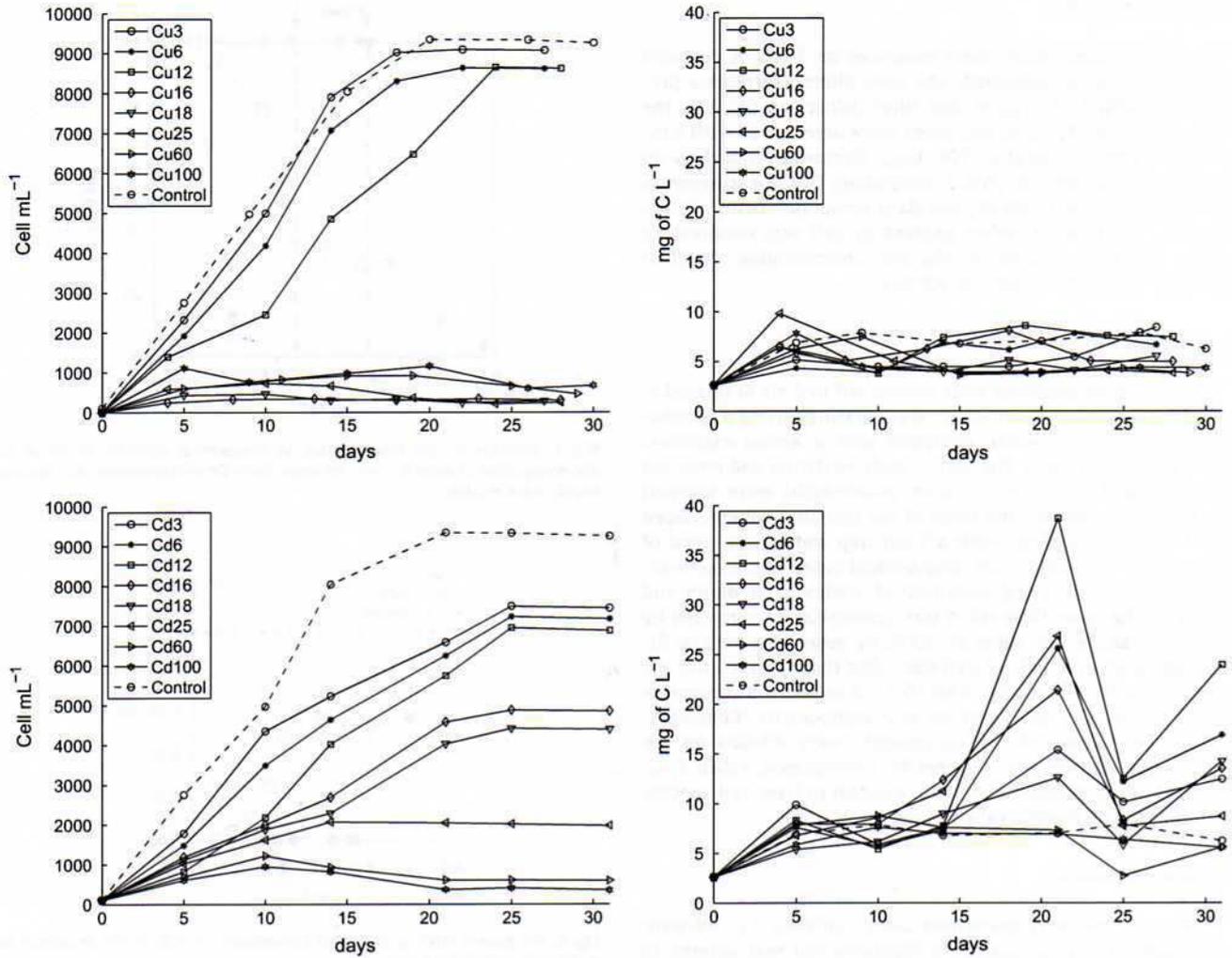


Fig. 3. Temporal evolution of the cell concentration ( $\text{Cell mL}^{-1}$ ) and of the dissolved organic carbon ( $\text{mg of C L}^{-1}$ ) from *Alexandrium catenella* cultures grown in metal contaminated conditions. Cell concentration and DOC released in response to Cu contaminations are presented upper left and right, respectively. Cell concentration and DOC released in response to Cd contaminations are presented down left and right, respectively. The dotted line represents the control condition without metal contamination.

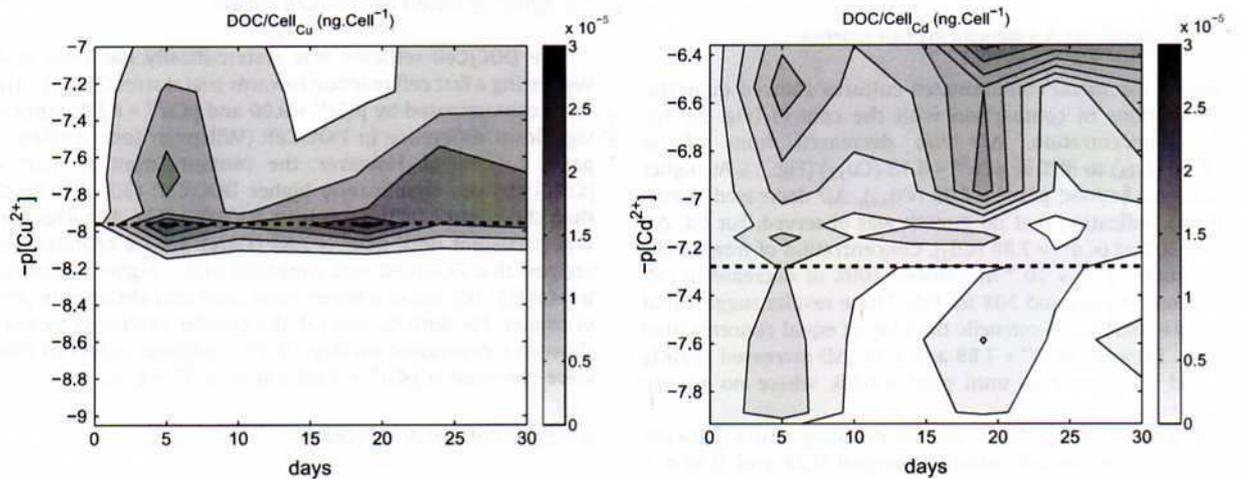


Fig. 4. Temporal evolution of the DOC/Cell from *Alexandrium catenella* cultures grown in metal contaminated conditions. (A): DOC/Cell released under contamination by free Cu (B): DOC/Cell released under contamination by free Cd. The dotted line represents the cyst apparition and control conditions are represented by the x axis.

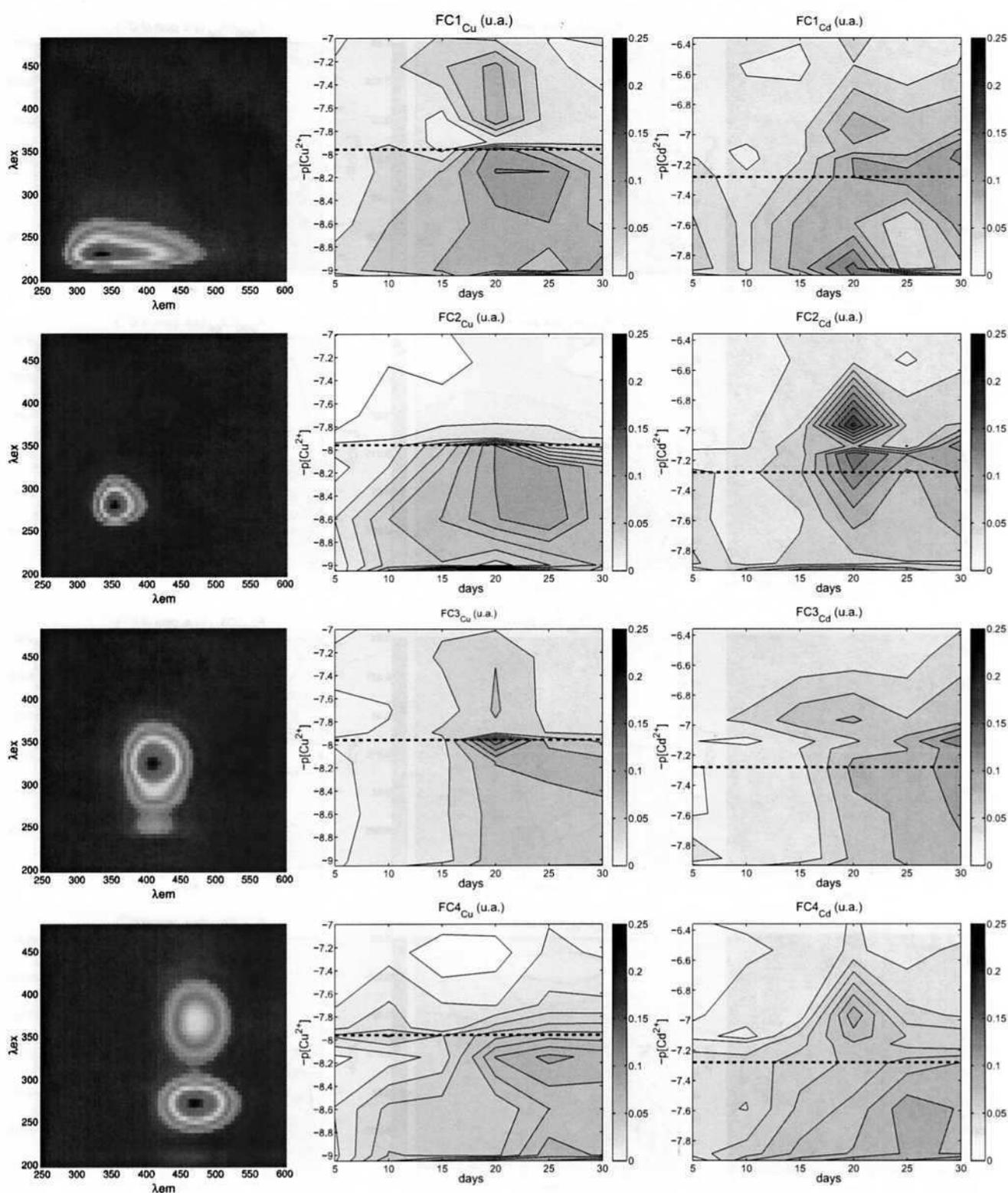


Fig. 5. Representation of raw component contributions to fluorescence from *Alexandrium catenella* according to the free Cu and Cd concentrations. The columns represent respectively the Cu and Cd impacts on FDOM, and the lines the components C1, C2, C3 and C4. On each graph, the abscissa represents the days from 5 to 30. The dotted line represents the cyst apparition.

characteristics of a humic/fulvic substances peak (Coble, 1996; Patel-Sorrentino et al., 2002). It therefore represented a domain

gathering the fluorescent protein substances excitation wavelengths, associated with the humic substances.

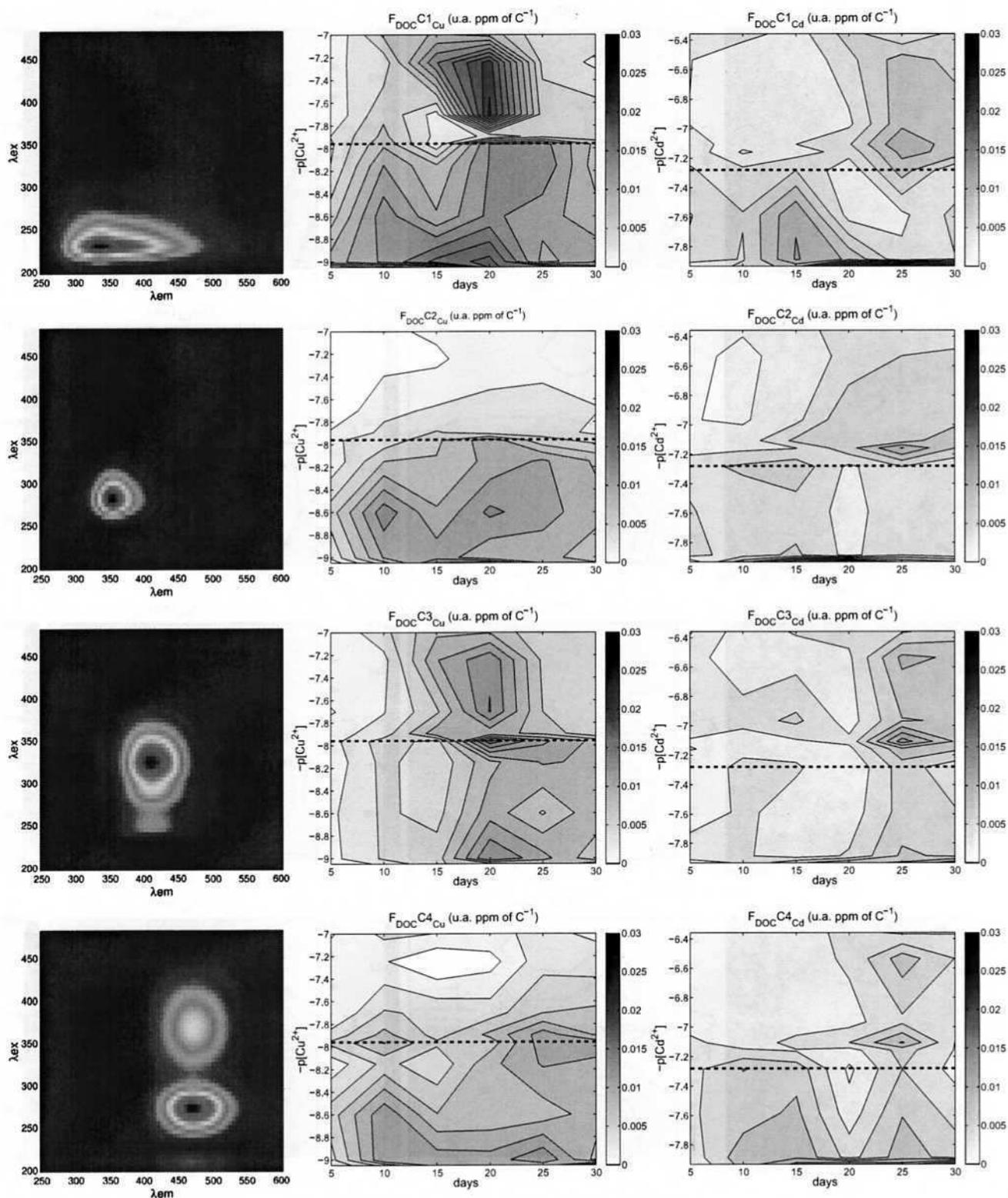


Fig. 6. Representation of  $F_{\text{DOC}}$  (u.a. ppm of  $\text{C}^{-1}$ ) from *Alexandrium catenella* according to free Cu and Cd concentrations. The lines represent the components C1, C2, C3, C4. On each graph, abscissa represent the days from 5 to 30. The dotted line represents the cyst apparition.

The C2 component (Figs. 5–7, Line 2) was located between 250 and 315 nm for excitation and between 315 and 400 nm for emission. Indeed, the maximum of the peak was positioned at the

couple of wavelengths EX/EM = 280/355 nm. This component was considered as a fluorescent protein fluorophore tryptophan (type T).

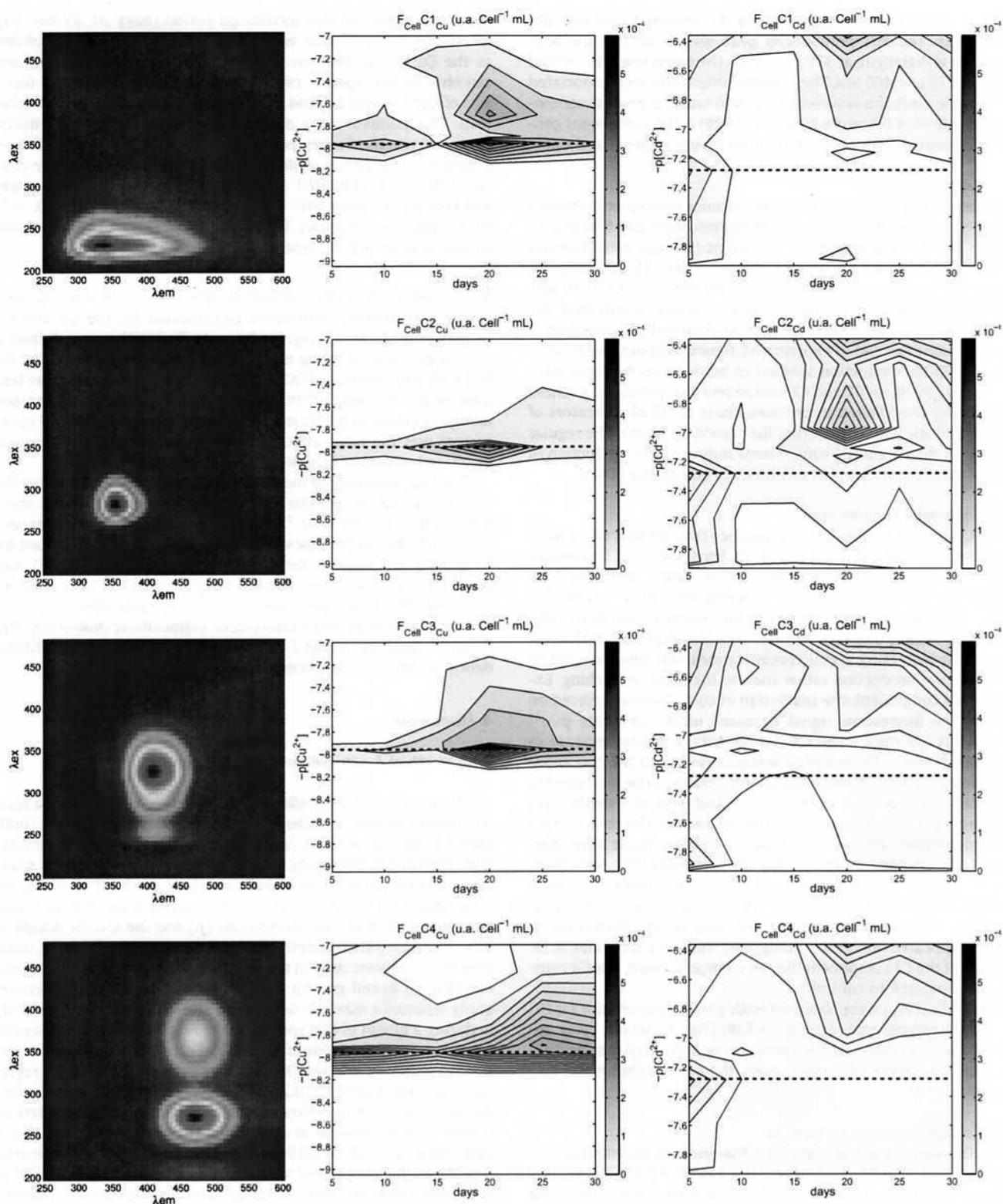


Fig. 7. Representation of  $F_{Cell}$  (u.a.  $Cell^{-1}$  mL) from *Alexandrium catenella* according to free Cu and Cd concentrations. The lines represent the components C1, C2, C3, C4. On each graph, abscissa represent the days from 5 to 30. The dotted line represents the cyst apparition and control conditions are represented by the x axis.

The C3 component (Figs. 5–7, Line 3) was positioned around 325 nm for excitation and 415 nm for emission. This component was related to humic fluorophores in environmental waters.

According to Coble (1996), the existence of this fluorophore is linked to the marine environment (type C) and is widespread during the marine production (Ishii and Boyer, 2012).

Please cite this article in press as: Herzi, F., et al. Copper and cadmium effects on growth and extracellular exudation of the marine toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*: 3D-fluorescence spectroscopy approach. Chemosphere (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.084>

The C4 component (Figs. 5–7, Line 4) contained two well defined peaks. The less pronounced peak was located in the high excitation wavelength, at 370 nm, while the major one was excited between 275 and 460 nm. The maximal intensities were associated to the same emission wavelength, at 460 nm. The nearest component described in literature by Coble (1996) is the component generally associated with humic terrestrial inputs (types A and C).

### 3.3.1. Control condition

In the control cultures, all the fluorescence components showed an increase in the fluorescence contribution, from day 5 to day 15 (Fig. 5). For C1 component, an important increase was observed after day 15, followed by maxima on days 20 and 25, and decrease on day 30. For C2 component, the increase from day 15 to 20 was softer, with a regular decrease from day 20 to day 30. However, the C3 and C4 components accused a linear contribution according to the days, until the end of experiment. Hence, without metal addition, the F<sub>DOC</sub> production seemed to be maximal between days 20–25 and 15–20, for C1 and C2 components, respectively. As these components were linked to proteins, these could be indicators of the low biological activity during the stationary phase. The regular increase in the C3 and C4 components indicated the production of more aromatic and complex components among the F<sub>DOC</sub>.

### 3.3.2. Contamination with copper

For Cu contamination, the fluorescence contribution was generally lower than for the control (Fig. 5). For C1, C2 and C3 components, the fluorescence contribution increased until the cyst development, defined as the Cu<sup>2+</sup> concentration: pCu<sup>2+</sup> = 7.96. Beyond this value, the contribution to fluorescence was drastically decreased. Hence, one can consider that the decrease in fluorescence with increasing metal concentrations was more related to low biological production rather than to the metal quenching. Except for C4 component, the maximum of contribution occurred on day 20. The fluorescent signal appeared under moderate pCu<sup>2+</sup> (8.15–8.60). For the C3 and C4 components, a regular increase in the contribution to fluorescence was observed until the cyst apparition defined above. These components seemed to be less affected by metal contamination, except for the last days of growth (days 20, 25 and 30), where the contribution decreased. The contribution of C4 component decreased with pCu<sup>2+</sup>, keeping linear trend during the experiments, except on day 25, before the cyst apparition.

The specific contribution (F<sub>DOC</sub>), for C1 component, decreased between low (9.00) and high pCu<sup>2+</sup> (8.15) (Fig. 6). For the C2 component, the F<sub>DOC</sub>, which increased until day 10, and decreased on day 15, appeared for pCu<sup>2+</sup> comprised between 8.60 and 8.15. The F<sub>DOC</sub> of the C3 component did not change in trend, like C4 component, compared to control.

The highest F<sub>Cell</sub> were observed with a lesser importance for C1, C2 and C3 components, at pCu<sup>2+</sup> = 7.96 (Fig. 7), where cysts appeared. Based on these observations, the maximum of specific fluorescence was hence observed when the cells transformed into resistance cysts.

### 3.3.3. Contamination with cadmium

For Cd, like for Cu, the maximum fluorescence contribution occurred on day 20, with an increase until pCd<sup>2+</sup> = 7.15 (Fig. 5). This behavior was more intense for C2 component. Furthermore, the highest fluorescence contributions were obtained for the C1 component, represented by low concentration (pCd<sup>2+</sup> = 7.88), and the C2 component, represented by medium concentrations (pCd<sup>2+</sup> = 7.10–7.15). However, the C3 and C4 components showed a regular increase until the end of incubation, with a similar peak in intensity at day 20.

For F<sub>DOC</sub>, the maximum was observed on day 25 (instead 20 observed for Cu conditions) (Fig. 6). A maximum plateau was

observed during the last incubation period (days 20, 25 and 30), when free concentration was above the cyst apparition, defined as the Cd<sup>2+</sup> concentration: pCd<sup>2+</sup> = 7.28. Otherwise, like Cu, one can observe that specific contribution was quite constant in function of Cd<sup>2+</sup>, except beyond pCd<sup>2+</sup> = 6.96, where there was the plateau. This pointed out a difference between Cu and Cd effects. However, specific fluorescence contribution by cell (F<sub>Cell</sub>) was less important than for Cu contamination at the same free concentration (Fig. 7). It exhibited an increase after the cyst apparition, and kept a maximum after the exponential phase, on day 20, visible at high concentrations. The maximum of F<sub>Cell</sub> was observed just before, at pCd<sup>2+</sup> = 6.36, where no growth was observed.

### 3.3.4. Comparison of the contaminant effects of copper and cadmium

For both metals, fluorescent contribution for the C3 and C4 components showed a regular increase during the growth, and a regular decrease with the metal concentration (Fig. 5). Cu and Cd had different effects on F<sub>DOC</sub> release. The C3 component was less affected by Cd<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> than by the growth phase, as this component was linked to humic marine matter. By contrast, the C4 component was the most affected component, since its contribution decreased with the increasing metal concentrations.

The F<sub>DOC</sub> according to the different Cu levels, observed at day 20, was enhanced in presence of low free concentrations, from  $9.93 \times 10^{-10}$  to  $7.06 \times 10^{-9}$  M, whereas, for Cd, the trend was less observable due to the low values of F<sub>DOC</sub>. The F<sub>DOC</sub>, described by C1 and C2 components, defined the protein domains (Fig. 6), and was thus in relation with the biological activity. Hence, when Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> levels were beyond the cyst apparitions, the cells were not able to produce fluorescent extracellular molecules. The F<sub>DOC</sub> defined by humic fluorophores, could result from cellular debris, or encystment phenomenon.

## 4. Discussion

### 4.1. Growth of *A. catenella* and DOC/Cell release

The growth of *A. catenella* in f/2 culture medium followed a similar pattern to that described for other dinoflagellate species (Juhl, 2005). Reduction of the *A. catenella* growth after metal contamination, recorded in this study, was in agreement with previous studies conducted on other dinoflagellates (Lage et al., 1994). Here, we have expressed the decrease in cell concentration through some variables such as the net growth rate ( $\mu$ ) and the specific doubling rate ( $K$ ) (Landry and Hassett, 1982). Net growth rate ( $\mu$ ) is the most prevalent endpoint used in toxicity tests, since any toxic effect may be reflected in cell growth change (Miao et al., 2005). A previous study reported a maximal net growth rate of  $0.89 \text{ d}^{-1}$  for *A. catenella* during a bloom of this species in the Angle creek of Thau lagoon (southern France) (Collos et al., 2007). This rate, mentioned for the species grown *in situ*, was 3 times higher than that we have registered in control cultures ( $0.24 \text{ d}^{-1}$ ). However, our values were similar to those found by others authors reporting a net growth rate of  $0.29 \text{ d}^{-1}$  for *A. catenella* at an optimal temperature of  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , for a light–dark cycle of 14 h:10 h (Siu et al., 1997). In contaminated conditions, for the present study, *A. catenella* exhibited contrasting net growth rates according to the metal contamination. In response to the first addition of Cu or Cd, the growth rates showed lower values around  $0.14 \text{ d}^{-1}$ , compared to the control ( $0.24 \text{ d}^{-1}$ ). These values were lower than those obtained for *Gymnodinium* sp. contaminated by 0.2 and  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  of Cu, which were of the order of 0.33 and  $0.34 \text{ d}^{-1}$  respectively, compared to the control ( $0.54 \text{ d}^{-1}$ ) (Pistocchi et al., 1997). In contrast, for similar metal concentrations, higher growth rates ( $0.92\text{--}0.46 \text{ d}^{-1}$ ) have been found for *Cylindrotheca fusiformis* (Pistocchi et al., 1997). On the other

hand, for *Amphidinium carterae*, the growth rate was affected in a more acute way at low concentration of Cu (Lage et al., 1994). These observations suggest that dinoflagellate growth could be more sensitive to metals than diatom growth.

In the present study, for copper contamination, the values of  $\mu$  and  $K$  have dropped suddenly to zero just after  $pCu^{2+} = 7.96$ , meaning a drastic toxic effect on *A. catenella*. For cadmium contamination, the decrease in  $\mu$  and  $K$  values was slower, from  $pCd^{2+} = 7.15$  to  $pCd^{2+} = 6.36$  where values became null. This suggests different toxic effects on the species, between copper and cadmium. The contaminant effects of these metals on FDOM and DOC, at low free concentrations, differed, indicating different mechanisms of adaptation to the presence of toxic ions. The  $\Delta D$  was about 30% for the ion free activity concerning Cd ( $pCd^{2+} = 7.88$ ) or Cu ( $pCu^{2+} = 8.15$ ). This may indicate the resistance of the cells at these low free metal concentrations in the medium. Free Cu concentrations up to  $pCu^{2+} = 8.60$ , acted slightly on the growth of *A. catenella*. However, the effect of  $Cu^{2+}$  was evident for concentrations higher than  $pCu^{2+} = 8.15$ , since *A. catenella* cells transformed into cysts. Similar results have been found in other studies for *A. carterae* and *Prorocentrum micans* exposed to total Cu concentration of  $7.87 \mu M$  ( $1.94 \mu M$  labile copper), these species showing inhibition (100%) or reduction (70%) of cell motility in these conditions (Lage et al., 1994).

At high metal concentrations, although the growth rates declined, *A. catenella* cells seemed to resist towards Cu and Cd stress, and be still able to survive. This resistance was marked by the release of extracellular DOM by cells. The general trend for the DOC released could be explained by an increase in the cell number (Fig. 3), more rapid than the DOC production, leading to a depression of the DOC/Cell pattern during the exponential phase. During the stationary phase (>day 20), the DOC/Cell reached a maximum plateau. The DOC/Cell was maximal for  $pCu^{2+} = 7.96$  and  $pCd^{2+} = 6.36$ , as the cells produced the maximum of DOC, when the free metal toxicity was reached. Cells could release more chelating molecules in the culture medium, in response to the increased metal contamination. These mechanisms seemed to function even when total inhibition was reached, independently of the cyst development.

DOC exudated by the cells showed increases according to free metal concentrations. This trend could be consistent with tendency of cells to protect themselves against damages that could affect cell metabolism, by producing more DOC. It has already been shown that anionic polysaccharides, able to bind metal ions, are released by some phytoplankton species to protect cells from metals (Kaplan et al., 1987). The latter study was in accordance with the increased values of DOC/Cell released by *A. catenella* in response to metal stress, found in our study.

#### 4.2. Fluorescence

The observed fluorescence exhibited variations according to the free metal concentrations and to the incubation time. The contribution of fluorescence of each component (C1, C2, C3 and C4), for the two metal studied, was dependent on the growth, the free metal activity, or the two at the same time. The results here presented, showed an enhancement of fluorescence during the incubation period. This increase in fluorescence was synchronized with exponential growth of cells for the C1 and C2 components, and showed a linear increase slightly perturbed by metal, for the C3 and C4 components. For this reason, two hypotheses can be considered. The first one supposed that  $F_{Cell}$  should be constant, during the incubation of the cultures in the presence of metals, even if the free metal concentrations increased. This was not the case, particularly for high  $Cu^{2+}$  levels. Moreover, the  $F_{DOC}$  has increased with the increasing in cell numbers, meaning that the DOC release was

related to the phytoplankton concentration. This suggests that the fluorescence was more related to the extracellular carbon exudates by cells. The second hypothesis suggested that the fluorescent substances released by cells were linked to free metals, meaning that concentrations of  $Cu^{2+}$  under the cyst apparition, activated mechanisms that produced fluorescent substances in the medium. However, at concentration of  $10^{-8} M$  for  $Cu^{2+}$  and  $10^{-7} M$  for  $Cd^{2+}$ , cells were transformed into cysts; therefore, the fluorescence could come from cyst formation or from cell degradation. The variation of fluorescence was expressed through the C3 and C4 components, indicated that the specific contribution increased with time (more dead cells during stationary phase, and with the free metal concentrations). These fluorophores were typical of marine humic-like material (Parlanti et al., 2000) and their appearance is a sign of degradation of organic matter. Furthermore, the fluorophore responsible of these two components have already been recognized as typical humic-like components receiving individual designation, like A and C (Coble, 1996; Patel-Sorrentino et al., 2002). The C3 and C4 components were continuously produced during the growth, and were associated with DOC, suggesting their important relationships to the marine production of fresh organic matter, rather than to terrestrial signal (Coble, 1996). The biological origin of this fluorescence contribution was supported by the fact that the net production (DOC) was affected by the metal quenching. Indeed, the more the free metal concentration increased, the less the contribution was important. Besides, the maximal level of specific DOC/Cell was synchronized with this fluorescence contribution, which occurred during the exponential growth phase. This indicated that these components occurred at the same time that the defense mechanisms against metal stress.

The presence of the C1 and C2 components may indicate the excretion of dissolved protein and their protein by-products (amino acids for example). The fluorescence of proteins was generally observed when free metal levels were below the critical values, specific for each metal, reaching  $5.19 \times 10^{-8} M$  and  $1.08 \times 10^{-8} M$  for  $Cd^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ , respectively. Below these values, the cells overcame the quenching effect due to Cu and Cd, and produced fluorescent components.

The C1 and C2 components were also used as markers, to estimate biological activity and different stages of the biological production, as it has been shown by previous studies (Parlanti et al., 2000). Indeed, the C1 component seemed to be more related to the defense mechanisms of cells, while the C2 component appeared more linked to the growth process of the species. Chlorophyll-*a* degradation product could not be responsible for this signal, since their fluorescence maxima were situated above 650 nm (French, 1960).

#### 5. Conclusions

The main objective of this study was to determine, for the first time, the characterization of exudates from the toxic dinoflagellate *A. catenella* grown in metal contaminated medium. Results revealed that under metal stress conditions, the development of *A. catenella* was perturbed from the ion free concentration of:  $10^{-8} M$  for Cu and  $10^{-7} M$  for Cd.

We report an increase in organic matter exudates by cells under metal stress, at the end of the exponential phase. The release of organic molecules should play an important role in metal speciation. It is concluded that the dynamic release of organic molecules depended on the nature and on the concentration of metals. The metal toxicity induced pronounced release of extracellular material, and led to an inhibition of the net growth.

The FDOM was treated by the PARAFAC and gave 4 usable components. Two components (C1 and C2) were related to the

biological activity involved in growth processes, and defence against stress metal. C1 appeared before and after cyst apparition, while C2 was involved in low contamination stress conditions. The two others components (C3 and C4) were more linked to degradation of organic matter from algal cells. These components were more sensitive to metal quenching during growth process. The fluorescence quantum yield of the released carbon, decreased according to metal concentrations, it was high under low metal concentrations, but declined with increasing metal levels. This observation is consistent with the production of less fluorescent DOC, suggesting the predominance of polysaccharides instead of proteins in the exudated molecules.

### Acknowledgments

This research was supported by the Conseil Général du Var (CG), Toulon Provence Méditerranée (TPM) and ARCUS CERES project (Région PACA-MAE). We are deeply indebted to Yves COLLOS and Estelle MASSERET from the Laboratory ECOSYM UMR 5119 of the Montpellier 2 University, for providing us with the *A. catenella* strain ACT03 used in the study.

### References

- Banaitis, M.R., Waldrip-Dail, H., Diehl, M.S., Holmes, B.C., Hunt, J.F., Lynch, R.P., Ohno, T., 2006. Investigating sorption-driven dissolved organic matter fractionation by multidimensional fluorescence spectroscopy and PARAFAC. *J. Colloid Interf. Sci.* 304, 271–276.
- Bro, R., Kiers, H.A.L., 2003. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. *J. Chemometr.* 17, 274–286.
- Bro, R., 1997. PARAFAC tutorial and applications. *Chemometr. Intell. Lab. Syst. J.* 38, 149–171.
- Burdige, D.J., Kline, S.W., Chen, W., 2004. Fluorescent dissolved organic matter in marine sediment pore waters. *Mar. Chem.* 89, 289–311.
- Chan, L.L., Lo, S.C.L., Hodgkiss, I.J., 2002. Proteomic study of a model causative agent of harmful red tide, *Prorocentrum triestinum* I: optimization of sample preparation methodologies for analyzing with two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2, 1169–1186.
- Coble, P.G., 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.* 51, 325–346.
- Collos, Y., Vaquer, A., Laabir, M., Abadie, E., Laugier, T., Pastoureaud, A., Souchu, P., 2007. Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, southern France. *Harmful Algae* 6, 781–789.
- Cordova, J.L., Muller, I., 2002. Use of PCR and partial sequencing of the large-subunit rRNA gene to identify *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) from the south of Chile. *Harmful Algae* 1, 343–350.
- Frehi, H., Couté, A., Mascarell, G., Perrette-Gallet, C., Ayada, M., Kara, M.H., 2007. Dinoflagellés toxiques et/ou responsables de blooms dans la baie d'Annaba (Algérie). *C.R. Biologies* 330, 615–628.
- French, C.S., 1960. The chlorophylls in vivo and in vitro. In: Ruhland, W. (Ed.), *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer, Berlin, pp. 252–279.
- Glibert, P.M., Anderson, D.M., Gentien, P., Graneli, E., Sellner, K.G., 2005. The global complex phenomena of harmful algal blooms. *Oceanography* 18, 136–147.
- Holbrook, R.D., Yen, J.H., Grizzard, T.J., 2006. Characterizing natural organic material from the Occoquan Watershed (Northern Virginia, US) using fluorescence spectroscopy and PARAFAC. *Sci. Total Environ.* 361, 249–266.
- Ishii, S.K.L., Boyer, T.H., 2012. Behavior of reoccurring PARAFAC components in fluorescent dissolved organic matter in natural and engineered systems: a critical review. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2006–2017.
- Jaffé, R., Boyer, J.N., Lu, X., Maie, N., Yang, C., Scully, N.M., Mock, S., 2004. Source characterization of dissolved organic matter in a subtropical mangrove dominated estuary by fluorescence analysis. *Mar. Chem.* 84, 195–210.
- Jean, N., Boge, G., Jamet, J.L., Jamet, D., 2006. Comparison of  $\beta$ -dimethylsulfoniopropionate (DMSP) levels in two Mediterranean ecosystems with different trophic levels. *Mar. Chem.* 101, 190–202.
- Jean, N., Boge, G., Jamet, J.L., Richard, S., Jamet, D., 2005. Annual contribution of different plankton size classes to particulate dimethylsulfoniopropionate in a marine perturbed ecosystem. *J. Mar. Syst.* 53, 235–247.
- Juhl, A.R., 2005. Growth rates and elemental composition of *Alexandrium monilatum*, a red-tide dinoflagellate. *Harmful Algae* 4, 287–295.
- Kaplan, D., Christaen, D., Arad, S., 1987. Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp.. *Appl. Environ. Microb.* 53, 2953–2956.
- Kowalczyk, P., Ston-Egiert, J., Cooper, W.J., Whitehead, R.F., Durako, M.J., 2005. Characterization of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Baltic Sea by excitation emission matrix fluorescence spectroscopy. *Mar. Chem.* 96, 273–292.
- Lage, O.M., Parente, A.M., Soares, H.M.V.M., Vasconcelos, M.T.S.D., Salema, R., 1994. Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch cultures. *Eur. J. Phycol.* 29, 253–260.
- Landry, M.R., Hassett, R.P., 1982. Estimating the grazing impact of marine microzooplankton. *Mar. Biol.* 67, 283–288.
- Le Faucheur, S., Behra, R., Sigg, L., 2005. Phytochelatin induction, cadmium accumulation and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1731–1737.
- Lilly, E.L., Kulis, D.M., Gentien, P., Anderson, D.M., 2002. Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *J. Plankton Res.* 24, 443–452.
- Lloyd, J.B.F., 1971. Synchronized excitation of fluorescence emission spectra. *Nature* 231, 64–65.
- Luciani, X., Mounier, S., Paraquetti, H.H.M., Redon, R., Lucas, Y., Bois, A., Lacerda, L.D., Raynaud, M., Ripert, M., 2008. Tracing of dissolved organic matter from the SEPETIBA Bay (Brazil) by PARAFAC analysis of total luminescence matrices. *Mar. Environ. Res.* 65, 148–157.
- Luciani, X., Mounier, S., Redon, R., Bois, A., 2009. A simple correction method of inner filter effects affecting FEEM and its application to the PARAFAC decomposition. *Chemometr. Intell. Lab. Syst. J.* 96, 227–238.
- Miao, A.J., Wang, W.X., Juneau, P., 2005. Comparison of Cd, Cu, and Zn toxic effects of four marine phytoplankton by pulse-amplitude-modulated fluorometry. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2603–2611.
- Moffett, J.W., Brand, L.E., Zika, R.G., 1990. Distribution and potential sources and sinks of copper chelators in the Sargasso Sea. *Deep Sea Res.* 37, 27–36.
- Mounier, S., Patel, N., Quilici, L., Benaim, J.Y., Benamou, C., 1999. Fluorescence 3D de la matière organique dissoute du fleuve amazon (three-dimensional fluorescence of the dissolved organic carbon in the Amazon river). *Water Res.* 33, 1523–1533.
- Murphy, K.R., Stedmon, C.A., Waite, T.D., Ruiz, G.M., 2008. Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy. *Mar. Chem.* 108, 40–58.
- Parlanti, E., Morin, B., Vacher, L., 2000. Combined 3D-spectrofluorimetry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the characterization of dissolved organic matter in natural waters. *Org. Geochem.* 33, 221–236.
- Patel-Sorrentino, N., Mounier, S., Benaim, J.Y., 2002. Excitation-emission fluorescence matrix to study pH influence on organic matter fluorescence in the Amazon basin rivers. *Water Res.* 36, 2571–2581.
- Penna, A., Garcés, E., Vila, M., Giacobbe, M., Fraga, S., Lugliès, A., Bravo, I., Bertozzini, E., Vernesi, C., 2005. *Alexandrium catenella* (Dinophyceae), a toxic ribotype expanding in the NW Mediterranean Sea. *Mar. Biol.* 148, 13–23.
- Pistocchi, R., Mormile, M.A., Guerrini, F., Lsani, G., Boni, L., 1997. Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *J. Appl. Phycol.* 12, 469–477.
- Sellner, K.G., Doucette, G.J., Kirkpatrick, G.J., 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 30, 383–406.
- Siu, G.K.Y., Young, M.L.C., Chan, D.K.O., 1997. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Hydrobiologia* 352, 117–140.
- Stedmon, C.A., Bro, R., 2008. Oceanography methods characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Environ. Res.* 6, 572–579.
- Sunda, W.G., Guillard, R.R.L., 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.* 34, 511–529.
- Sunda, W.G., Hunstman, S.A., 1998. Processes regulating cellular and metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems. *Sci. Total Environ.* 219, 165–181.
- Tessier, E., Garnier, C., Mullot, J.U., Lenoble, V., Arnaud, M., Raynaud, M., Mounier, S., 2011. Study of the spatial and historical distribution of sediment inorganic contamination in the Toulon Bay (France). *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2075–2086.
- Turki, S., Balti, N., 2005. Detection of toxic *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) balech in clam production zone of North Lake and Channel, Tunisia. *Harmful Algae* 28, 1–2.
- Vasconcelos, M.T.S.D., Leal, M.F.C., Van der Berg, C.M.G., 2002. Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake and exudation of *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Mar. Chem.* 77, 187–210.
- Vodacek, A., Blough, N.V., DeGrandpre, M.D., Peltzer, E.T., Nelson, R.K., 1997. Seasonal variation of CDOM and DOC in the Middle Atlantic Bight: terrestrial inputs and photo oxidation. *Limnol. Oceanogr.* 42, 674–686.
- Zepp, R.G., Sheldon, W.M., Moran, M.A., 2004. Dissolved organic fluorophores in southeastern US coastal waters: correction method for eliminating Rayleigh and Raman scattering peaks in excitation-emission matrices. *Mar. Chem.* 89, 15–36.

**Résumé :** L'impact de plusieurs éléments traces métalliques (ETMs) (plomb, zinc, cuivre ou cadmium) sur la croissance de deux espèces phytoplanctoniques marines, la diatomée *Skeletonema costatum* et le dinoflagellé toxique *Alexandrium catenella*, a été étudié à partir de cultures réalisées en conditions physiologiques et en conditions contaminantes. Les résultats obtenus ont révélé des perturbations de croissance chez *S. costatum* et chez *A. catenella*, lorsque ces espèces étaient exposées à de fortes concentrations métalliques. Les effets létaux se manifestaient par une forte mortalité cellulaire, accompagnée, chez *A. catenella*, par la conversion d'un certain nombre de cellules végétatives en kystes de résistance. Puis, l'exsudation de la matière organique dissoute (MOD) par *S. costatum* et par *A. catenella* en réponse aux stress métalliques, a été caractérisée. L'exsudation du carbone organique dissous (COD) variait en fonction de la phase de croissance, et était associée au niveau de contamination métallique, et à la nature du métal testé. Les valeurs maximales de COD exsudé par cellule étaient mesurées en réponse à la contamination par le cuivre 16 µM pendant la phase d'adaptation, et en réponse à la contamination par le cadmium 200 µM pendant la phase exponentielle de la croissance. Plus spécifiquement, la matière organique dissoute fluorescente (FDOM) exsudée par *S. costatum* et par *A. catenella* a été analysée par spectroscopie de fluorescence 3D associée à l'algorithme PARAFAC. Les traitements PARAFAC révélaient quatre composantes, lesquelles étaient attribuées à deux contributions principales, l'une liée à l'activité biologique de l'espèce, l'autre liée à la décomposition de la matière organique. Les composantes C1 et C2 étaient combinées à des pics tryptophaniques et à des substances humiques, tandis que les composantes C3 et C4 étaient associées à la production de matière organique marine. Par ailleurs, le glucose puis le galactose étaient les aldoses prédominants parmi les polysaccharides exsudés dans la MOD. De plus, des modifications protéomiques étaient observées dans les protéomes d'*A. catenella*, en réponse aux divers stress métalliques. Les protéines de stress exprimées par *A. catenella* étaient mises en évidence par comparaison des profils d'expression protéiques (PEPs) obtenus par électrophorèse bidimensionnelle (électrophorèse 2D), en conditions physiologiques et en conditions contaminantes. Les protéines de stress étaient impliquées dans de nombreuses catégories fonctionnelles : réponse au stress oxydatif (superoxyde dismutase, sous-unités du protéasome), photosynthèse (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, complexe péridinine chlorophylle - protéine, ferrédoxine-NADP réductase), métabolisme des carbohydrates (triosephosphate isomérase, ribose 5-phosphate isomérase, malate déshydrogénase, photorespiration et métabolisme du phosphore (phosphoglycolate phosphatase), métabolisme énergétique (ATP - synthase), signal cellulaire (calmoduline), activité chaperonne (HSP 70, HSP 90) et bioluminescence d'*A. catenella* (luciférine - binding protéine). La sur-expression de la phosphoglycolate phosphatase (PGP) et celle de l'ATP - synthase, observées en réponse à la contamination par le plomb, pourraient participer à une stratégie de défense mise en place par *A. catenella* afin (i) de se protéger du stress oxydatif lié à la contamination métallique, la PGP étant impliquée dans la dissipation de l'excès d'énergie (ii) de produire davantage de réserves énergétiques (ATP) et ainsi de répondre à des besoins accrus en raison du stress métallique, dans le but de s'y adapter.

**Mots clés :** *Skeletonema costatum*, *Alexandrium catenella*, éléments traces métalliques, pollution, exsudation, matière organique dissoute, protéomique, protéines de stress

**Abstract:** Impact of several trace metals (lead, zinc, copper or cadmium) on the growth of two marine phytoplankton species: the diatom *Skeletonema costatum* and the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*, has been studied from cultures grown under physiological and contaminated conditions. The results obtained revealed growth perturbations in *S. costatum* and in *A. catenella*, when these species were exposed to high metal concentrations. The lethal effects appeared through a strong cell death, coming, in *A. catenella*, with the conversion of vegetative cells into resistance cysts. Then, exudation of dissolved organic matter (DOM) by *S. costatum* and by *A. catenella* in response to metal stress has been characterized. Exudation of dissolved organic carbon (DOC) varied according to the growth phase, and was associated with the level of metal contamination and the nature of the tested metal. The maximal values of DOC exudated per cell were measured in response to contamination by copper 16 µM during the adaptation phase, and in response to contamination by cadmium 200 µM during the exponential phase of growth. More specifically, the fluorescent dissolved organic matter (FDOM) exudated by *S. costatum* and by *A. catenella* has been analyzed by 3D fluorescence spectroscopy combined with PARAFAC algorithm. The PARAFAC treatments revealed four components, which were attributed to two main contributions, one related to the biological activity of the species, and the other related to the decomposition of organic matter. The C1 and C2 components were combined with tryptophan peaks and with humic substances, while the C3 and C4 components were generally associated with the production of marine organic matter. Moreover, glucose then galactose were the main aldoses among the polysaccharides exudated in the DOM. Proteomic changes occurred in the proteomes of *A. catenella* in response to the various metal stresses. Stress proteins expressed by *A. catenella* were obtained by comparison of the protein expression profiles (PEPs) achieved by two-dimensional electrophoresis (2D - electrophoresis) under physiological and contaminated conditions. Stress proteins are involved in many functional categories: response to oxidative stress (superoxide dismutase, proteasome sub - units), photosynthesis (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, peridinin chlorophyll protein complex, ferredoxin -NADP reductase), carbohydrate metabolism (triosephosphate isomerase, ribose 5-phosphate isomerase, malate dehydrogenase), photorespiration and phosphorus metabolism (phosphoglycolate phosphatase), energy metabolism (ATP - synthase), cell signalling (calmodulin), chaperone activity (HSP 70, HSP 90) and bioluminescence of *A. catenella* (luciferin - binding protein). Over - expression of phosphoglycolate phosphatase (PGP) and of ATP - synthase, occurring in response to metal contamination by lead, could represent a strategy of defence set up by *A. catenella* (i) to protect itself from the oxidative stress due to metal contamination, PGP being involved in the dissipation of excess energy (ii) to produce more reserves of energy (ATP) so as to satisfy the increased requirements resulting from the metal stress, in order to adapt to it.

**Keywords:** *Skeletonema costatum*, *Alexandrium catenella*, trace metals, pollution, exudation, dissolved organic matter, proteomics, stress proteins