Zeitschrift: Archives des sciences et compte rendu des séances de la Société
Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève
Band: 46 (1993)
Heft: 2: Archives des Sciences

Artikel: Test d'écotoxicité du Zn, Cu et Pb chez Chlorella rubescens, Chod. : utilisation de la RMN 31P

Autor: Calderon Llanten, Carlos Eduardo / Greppin, Hubert

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-740454

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 31.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Archs Sci. Genève	Vol. 46	Fasc. 2	pp. 249-258	Septembre 1993

TEST D'ÉCOTOXICITÉ DU Zn, Cu ET Pb CHEZ CHLORELLA RUBESCENS, CHOD.: UTILISATION DE LA RMN ^{31}P.

PAR

Carlos Eduardo CALDERON LLANTEN* & Hubert GREPPIN*

ABSTRACT

Adenosine triphosphate (ATP) measurements by non-invasive ^{31}P NMR method is proposed for the detection of quick effects of Zn, Cu and Pb intoxication. *C. rubescens* is very toterant to heavy metals, a part of which is immobilized by a thick cell wall. This test is rapid and interesting for ecotoxicity studies in aquatic environment.

RÉSUMÉ

Les effets rapides de l'intoxication par le Zn, Cu et Pb ont été mis en évidence par la mesure de l'adénosine triphosphate (ATP) au moyen d'une méthode non-invasive la RMN ^{31}P. L'algue *C. rubescens* est très tolérante aux métaux lourds dont une partie est immobilisée sur la paroi qui est épaisse. Ce test simple et rapide est intéressant pour des études d'écotoxicité dans l'environnement aquatique.

INTRODUCTION

Plus de soixante mille substances chimiques et un demi-million de préparations ou mélanges sont produits par l'homme, ce qui représente un impact réel et voire dangereux pour l'environnement naturel (SMEET, 1981). En matière d'écotoxicologie aquatique, des protocoles de tests ont été élaborés, mais l'harmonisation sur le plan international est loin d'être complète.

Un test de toxicité vis-à-vis des unicellulaires est fondé sur le principe de l'inhibition de la croissance d'une population donnée (QUEVAT, 1981). La détermination de la DL-50 (concentration d'élément toxique inhibant une fonction essentielle, ou provoquant la mortalité, de 50% d'une population donnée) est devenue une technique couramment utilisée. Si les auteurs ne s'accordent pas encore sur le, ou les paramètres à considérer dans ce type de tests, néanmoins l'approche énergétique, par la mesure de

* Laboratoire de Biochimie et Physiologie végétales, 3, place de l'Université, CH-1211 Genève 4.

l'ATP, est de plus en plus utilisée et acceptée internationalement (VASSEUR *et al.*, 1981; DIN & BROOKS, 1986). La rapidité de réponse de ce critère de toxicité présente un avantage par rapport aux autres techniques classiques de toxicité à court terme.

La mise au point de cultures synchrones de la micro-algue *Chlorella rubescens*, Chod. (SAYEGH & GREPPIN, 1973) et la caractérisation de la charge énergétique, tout au long du cycle cellulaire (CALDERON, 1990), nous ont encouragé à étudier un test de DL-50 pour les trois métaux suivants: Zn, Cu et Pb. Nous avons utilisé la RMN ^{31}P, technique non invasive et non destructive (LENK *et al.*, 1984) permettant une mesure *in vivo* de l'ATP, facilement repérable par sa triple raie spectrale (α, γ, β), sans risque de dénaturation (MITSUMORI & ITO, 1984; SIANOUDIS *et al.*, 1987).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Culture: *Chlorella rubescens* Chodat, souche No 24 de l'algothèque du Département de Botanique et de Biologie végétale, est cultivée de manière axénique et en condition autotrophe, dans un milieu liquide Detmer, dilué au tiers (PRINGSHEIM, 1951). Ce milieu est préalablement stérilisé à l'autoclave (120°C, 20 minutes) et le pH est maintenu à 6,5 pendant toute la durée des expériences.

Les populations d'algues sont synchronisées selon la méthode de PIRSON & LORENZEN (1966) modifiée par SAYEGH & GREPPIN (1973). Le cycle synchrone de *C. rubescens* est très long: 70 heures de lumière (croissance et différenciation) suivies de 24 heures d'obscurité (division cellulaire), celle-ci étant nécessaire pour déclencher la libération des autospores.

La température de culture est de 29°C, l'agitation et l'aération sont assurées par de l'air contenant 5% de gaz carbonique avec un débit de 100 ml/min (MITSUMORI & ITO, 1984; CALDERON, 1990). L'éclairage (10 Klux) est assuré par des tubes fluorescents Sylvania "dailight" de 40 W.

Dosage de l'ATP

RMN ^{31}P: 6 tubes de culture de 30 ml de milieu sont prélevés et centrifugés à 4° pendant 10 minutes à 12 000 g. Le culot est lavé trois fois avec une solution de MOPSO (acide 3'N'-morpholino-2-hydroxypropane sulfonique) de 50 mmole/l et d'EDTA, 2 mmole/l, à pH 6,5 (SIANOUDIS *et al.*, 1987); ceci pour éviter les interférences paramagnétiques. Ensuite les algues sont laissées dans un minimum de milieu de culture, à la concentration finale de 5.10^7 cell/ml.

Un dispositif spécial permettant le maintien de la capacité photosynthétique pendant la mesure RMN a été utilisé. Il comprend une fibre optique et un micro-barboteur (MITSUMORI & ITO, 1984; CALDERON, 1990). La source lumineuse est fournie par une lampe halogène de 40 W; l'éclairement de lumière blanche à l'intérieur du tube à essai RMN était de 10 Klux. L'échantillon d'algue est barboté avec de l'air contenant 5% de CO_2; le débit est 100 ml/min.

Nous avons utilisé un spectromètre RMN Bruker WP 200, avec une fréquence pour le ^{31}P de 81,01 MHz. Le temps d'accumulation a été de 0,5 sec., la relaxation de 2 sec et le temps entre deux scans de 2,5 sec. Jusqu'à 1000 scans sont accumulés avant d'enregistrer. Le calibrage des mesures est fait avec l'acide méthylène diphosphonique (0 ppm).

Le calibrage de l'ATP est obtenu à l'aide d'ATP purifié du commerce. La validation des mesures a été vérifiée par une autre voie possible de dosage de l'ATP: la méthode à la luciférine-luciférase (PRADET, 1967), après extraction du nucélotide adénylique (St. John, 1970); les conditions modifiées sont décrites par BONZON *et al.* (1981) et Calderon (1990). Nous avons utilisé un ATP-photomètre SAI 2000 pour ce faire.

L'étude de l'évolution de la charge énergétique de *C. rubescens*, en culture synchrone, a mis en évidence une fluctuation rythmique de celle-ci lors du développement (CALDERON, 1990). La charge énergétique est particulièrement intense après 52 heures de culture en lumière; c'est à ce stade que les mesures sont faites.

Concentration algale

L'estimation de la concentration en cellule est faite par comptage au microscope sur un hémacytomètre de Zeiss-Thoma (UEHLINGER & LINDER, 1955).

Poids sec

On filtre 10 à 20 ml de suspension d'algues sur un filtre Whatman WCN 1,2 pesé préalablement. Le culot et le filtre sont séchés à 70°C pendant 24 heures, puis pesés sur une balance analytique. L'échantillonage pour le poids sec est fait au maximum du poids sec, soit à la fin de la photophase (70 heures de culture) (SAYEGH & GREPPIN, 1973).

Détermination des métaux

Des concentrations diverses en métaux à tester sont ajoutées aux cultures synchronisées (70 heures lumière, 24 heures obscurité), cinq heures après le début de la photophase. L'analyse des métaux est faite sur des prélèvements faits la 70ème heure de culture (fin de la photophase).

On prélève 30 ml de culture, puis on centrifuge 15 minutes à 10 000 g. Le surnageant contenant les métaux en solution est l'objet de l'analyse. On calcule par différence ce qui est immobilisé par les algues (culot). A partir d'équations simplifiées (OAKLEY *et al.*, 1981; CALDERON, 1990), nous obtenons la constante d'immobilisation

$$K_I = \frac{[Me\ S]}{[Me_T]x[S_T]}$$

MeS est la concentration du métal immobilisé par les cellules (Mol. Lit^{-1}), Me_T la concentration du métal total dissout Mol. Lit^{-1}) et S_T la concentration en algues (poids sec; gr. Lit^{+1}). La densité d'immobilisation est exprimée en mol/gr selon l'équation

$$DI = \frac{[Me\ S]}{[S_T]}$$

Le dosage des métaux se fait par spectroscopie d'absorption atomique (Perkin-Elmer 2280), l'atomisation étant réalisée dans une cuve en graphite. Des solutions standards à partir des nitrates de chaque métal ont été utilisées comme courbe étalon. La cathode des lampes utilisées est constituée de l'élément dont on veut obtenir le spectre.

Statistique

Chaque expérience a été répétée au moins trois fois. Le coefficient de variations de l'ATP est de ± 1,5%, de ± 3,8% pour le poids sec et la concentration algale.

Résultats

Les figures 1, 2, 3 présentent dans les conditions standard d'étude (culture synchronisée; adjonction du métal après 5 heures de photophase; mesures après 52 heures pour l'ATP, 70 heures pour le poids sec et la concentration en métal du surnageant, 94 heures pour la concentration en cellules), l'évolution, par rapport aux témoins, (valeur maximale) de l'inhibition due aux effets toxiques de concentrations croissantes respectivement en Zn, Cu et Pb sur la production d'ATP, la croissance (poids sec) et la division cellulaires. Les effets du cuivre et du plomb sont assez semblables, celui-ci étant plus toxique, les doses sublétales (DL-50) pour les trois paramètres mesurés ne sont pas identiques.

Après une phase rapide d'inhibition de 2 µmoles jusqu'à 10 µmoles de Cu ou de Pb par ml, on constate ensuite une tolérance relativement forte à ces métaux lourds. La sensibilité au Zn est beaucoup moins importante, les premiers effets toxiques (fig. 1) apparaissent seulement dès 10 µmol/l et ne s'accélérant de manière marquée que dans la zone de 80 à 100 µmol/l. Une certaine tolérance aux effets toxiques des concentrations supérieures s'établit par la suite.

La DL-50 du Zn est nettement différente de celle des deux autres métaux; les besoins en zinc comme micro-nutriments sont plus élevés que ceux concernant le cuivre (10^{-8}M), ce dernier devenant toxique assez rapidement. L'inhibition de la production d'ATP est la réponse écotoxique la plus sensible.

L'ajout simultané, dans le milieu de culture du métal et d'EDTA (acide éthylène-diamine tétracétique) ou de phosphate (KH_2PO_4) permet de lever en grande partie l'effet toxique observé précédemment (fig. 4, 5). Cette action plus marquée pour l'agent chélateur EDTA que pour le phosphate, est plus importante sur la production d'ATP que sur la division cellulaire. Elle n'est efficace que dans une plage limitée de concentration.

Le tableau 1 permet d'apprécier la capacité des algues d'immobiliser les trois métaux testés pour des taux exerçant des effets toxiques. La densité d'immobilisation du Zn est la plus élevée et le seuil de toxicité correspond aussi à des valeurs beaucoup plus fortes que le Cu et le Pb. De ces deux derniers, le Pb a la densité d'immobilisation la plus grande et un seuil de toxicité beaucoup plus bas ($< 10^{-6}$M).

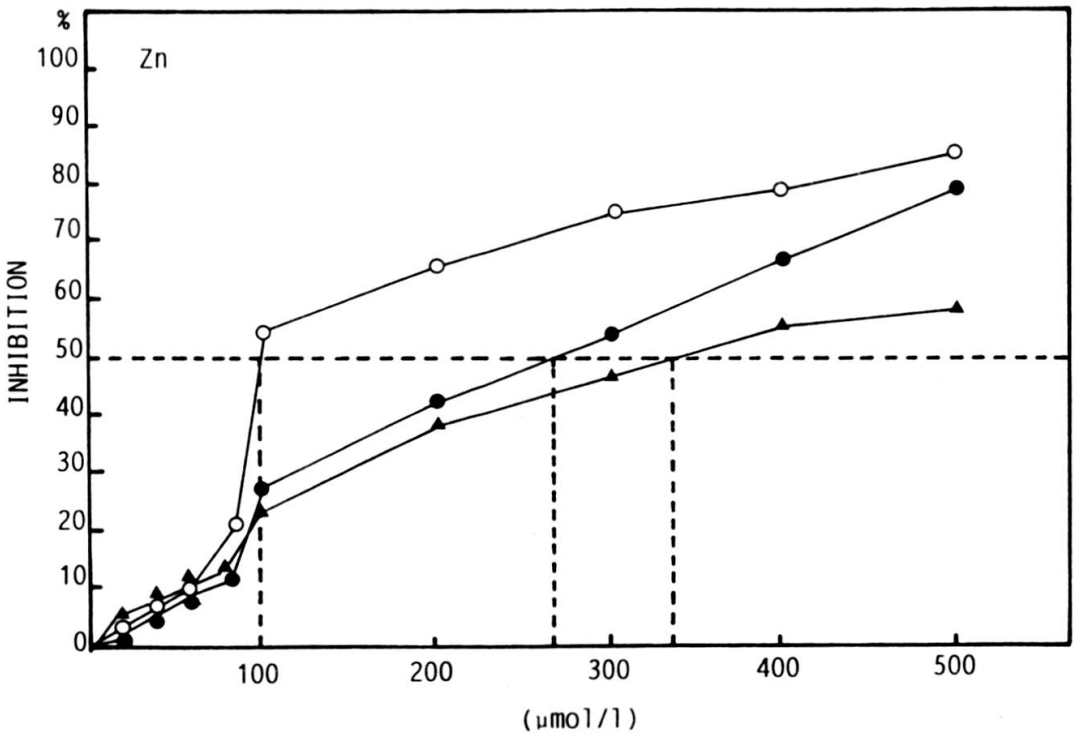

FIG. 1.

Inhibition (%), en référence à des cultures témoins, de la production d'ATP (●), du poids sec (▲) et de la multiplication cellulaire (○) sous l'action de concentrations croissantes en zinc (µmoles par litre). La DL50 pour les trois paramètres est représentée en traits discontinus. Les mesures sont faitres aux maxima respectifs d'expression de l'ATP (52 heures), du poids sec (70 heures) et du nombre de cellules (94 heures). Cultures témoins (ATP: 63,4± 0,37 µg/ml; poids sec: 0,36± 0,01 mgr/ml; nombre de cellules: 9137± 170 cellules/µl.).

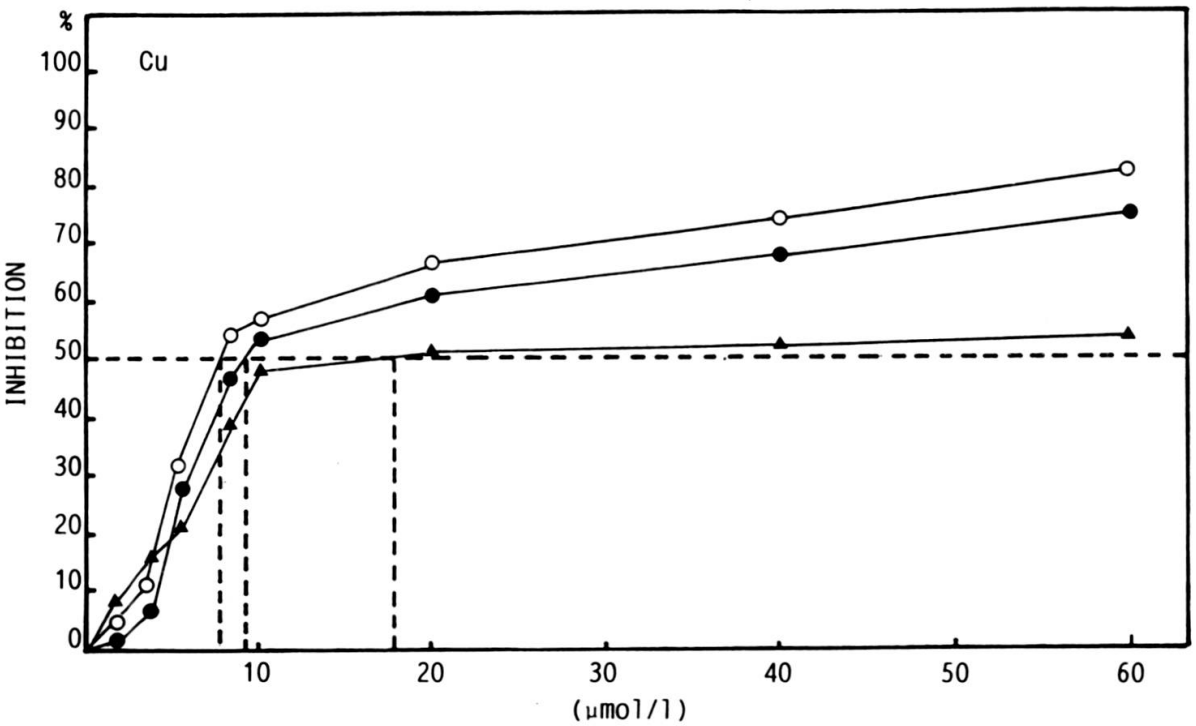

FIG. 2.

Effet du cuivre (cf. légende fig. 1).

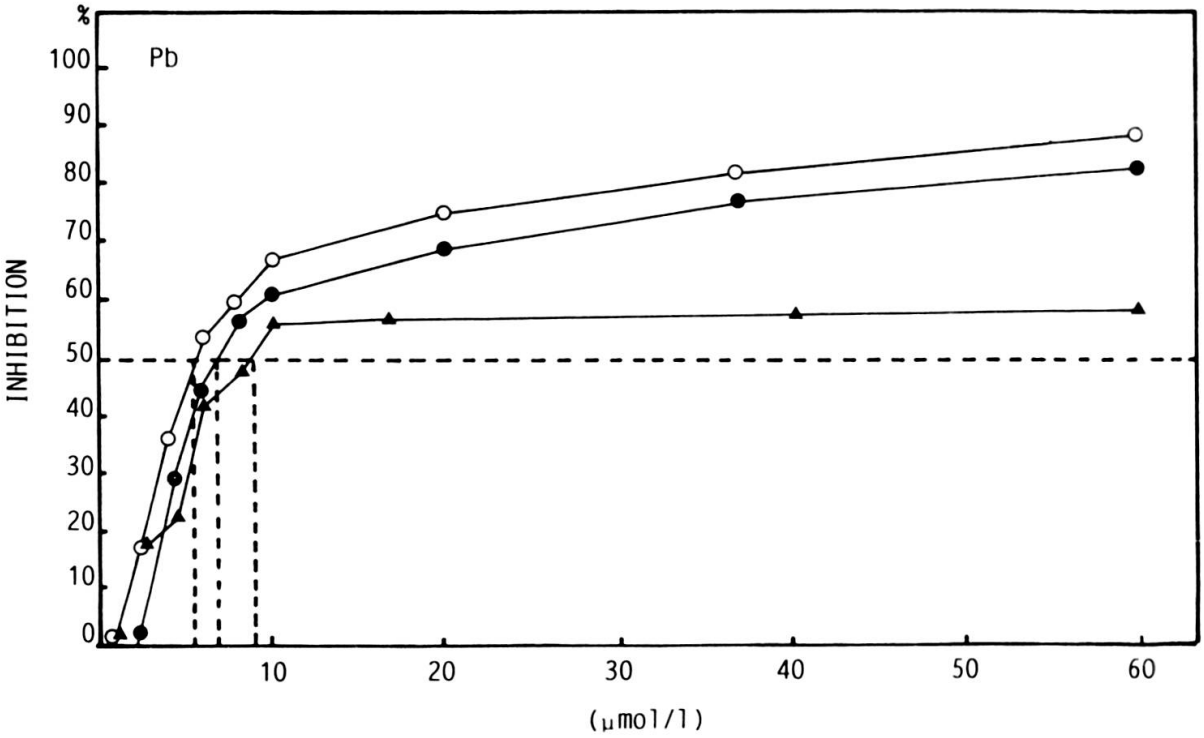

FIG. 3.

Effet du plomb (cf. légende fig. 1).

TABLEAU 1.

Immobilisation respective du zinc, cuivre et plomb par le culot algal de *Chlorella rubescens*. L'astérisque correspond à la saturation de l'algue par le zinc et le cuivre; il faut une concentration de 7.10^{-5}M pour saturer avec le plomb.

Concentration initiale mol./l.	Métal immobilisé dans le culot algal mol./l.	Métal dans le surnageant mol./l.	$D_{.I.}$ mol./g. algues	
Zn				
10^{-5}	$7,40.10^{-6}$ (74%)	$2,60.10^{-6}$ (26%)	$2,08.10^{-5}$	
6.10^{-5}	$4,11.10^{-5}$ (68)	$1,89.10^{-5}$ (32%)	$1,20\text{-}10^{-4}$	
5.10^{-4}	$1,36.10^{-4}$ (27%)	$3,64.10^{-4}$ (73%)	$9,18.10^{-4}$	*
Cu				
6.10^{-6}	$4,40.10^{-6}$ (74%)	$1,60.10^{-6}$ (26%)	$1,57.10^{-5}$	
10^{-5}	$4,40.10^{-6}$ (44%)	$5,60.10^{-6}$ /56%)	$2,37.10^{-5}$	
6.10^{-5}	$1,74.10^{-5}$ (29%)	$4,25.10^{-5}$ (71%)	$1,04.10^{-4}$	*
Pb				
6.10^{-6}	$4,59.10^{-6}$ (76%)	$1,41.10^{-6}$ (24%)	$2,14.10^{-5}$	
10^{-5}	$6,21.10^{-6}$ (62%)	$3,79.10^{-6}$ (38%)	$3,90.10^{-5}$	
6.10^{-5}	$1,67.10^{-5}$ (28%)	$4,33.10^{-5}$ (72%)	$1,13.10^{-4}$	*

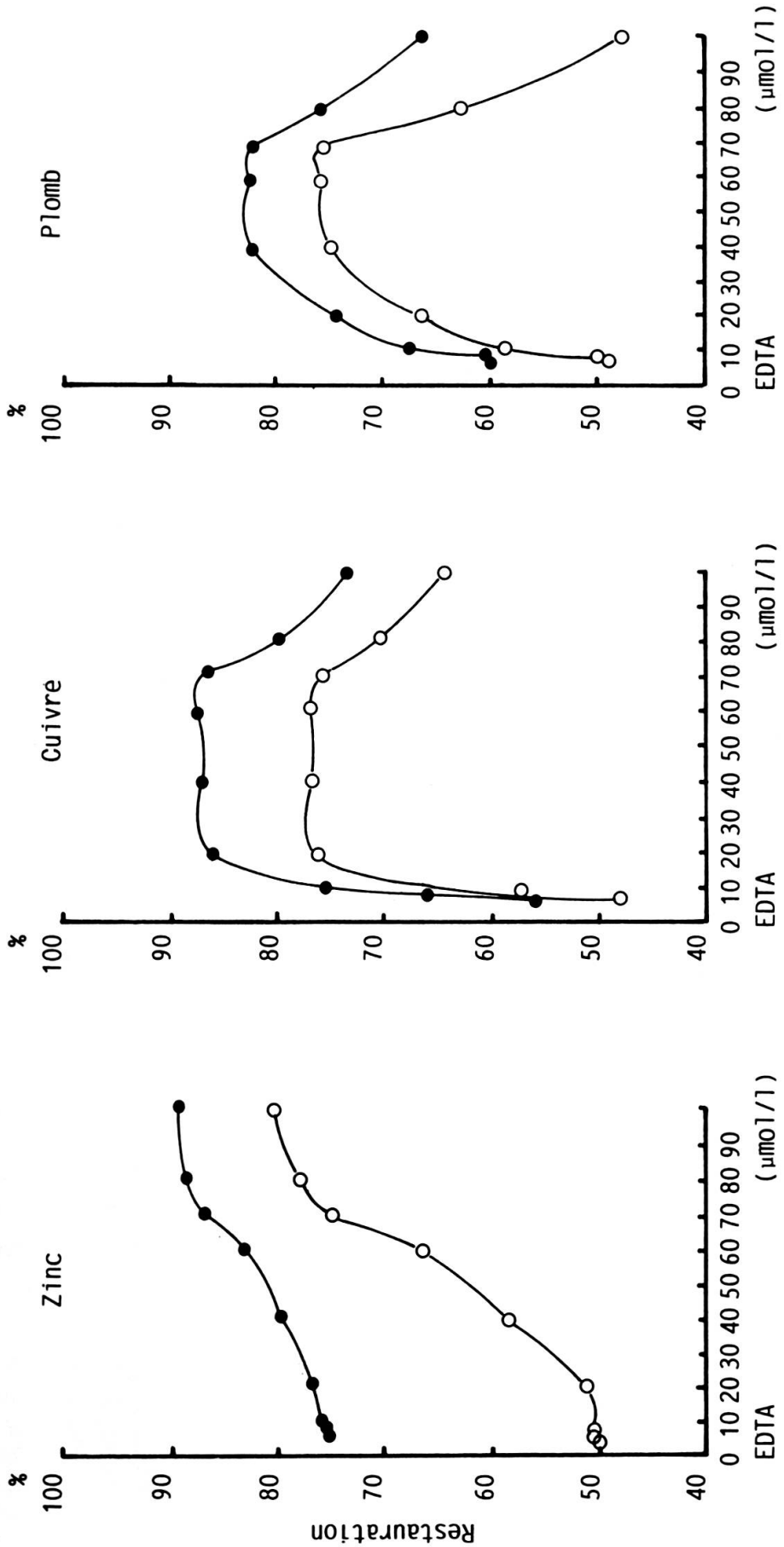

FIG. 4.

Effet de l'EDTA, en concentration croissantes, sur la restauration de la production d'ATP (●) et de la division cellulaire (○), en présence de doses sublétales (DL-50) de zinc, cuivre, plomb.

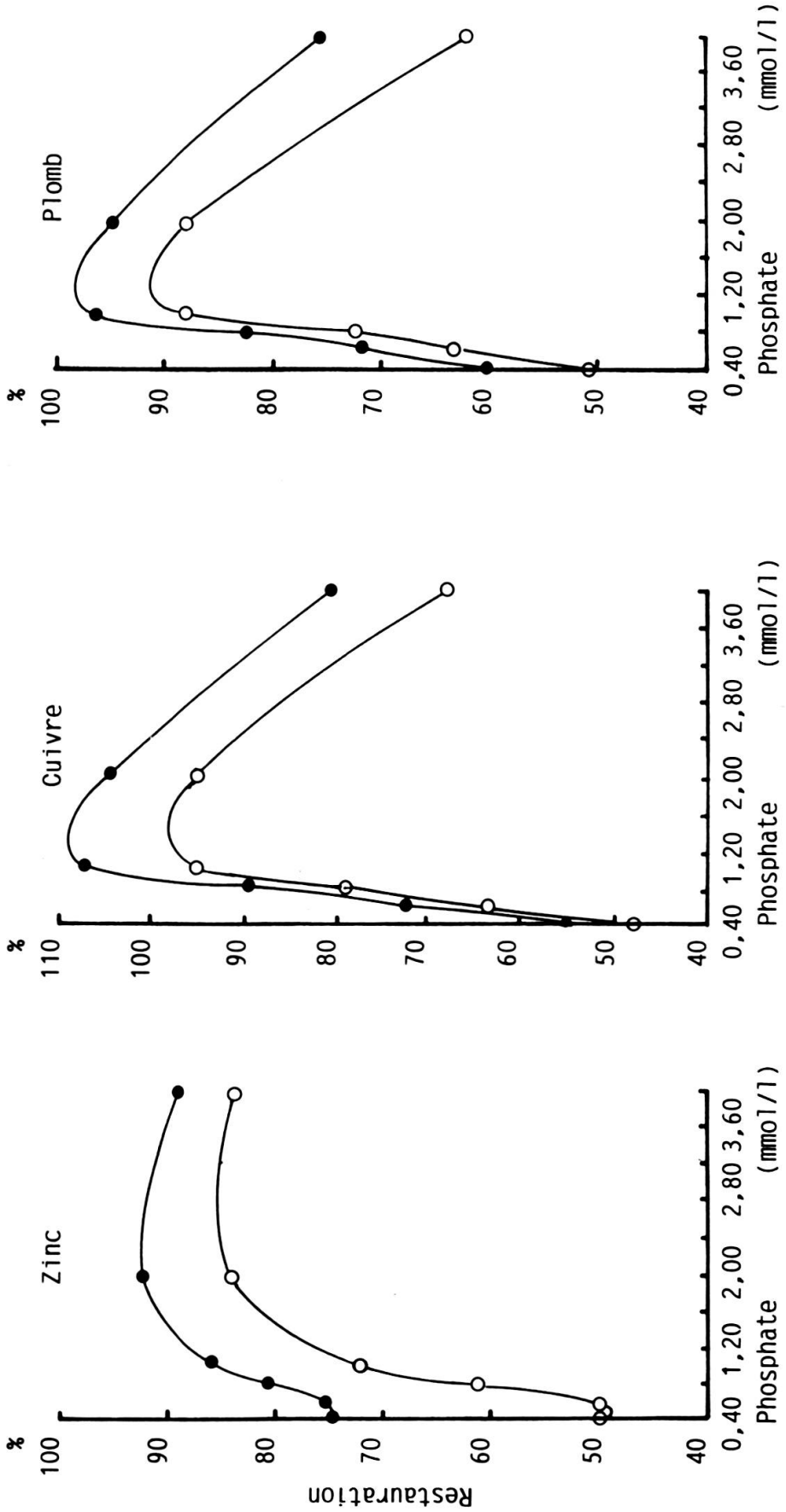

FIG. 5.

Idem fig. 4, mais en présence de concentrations croissantes en phosphate.

CONCLUSION

Le zinc et le cuivre font partie des micronutriments essentiels (10^{-6}M et 10^{-8}M, dans le milieu de culture). Ils participent à des fonctions importantes comme la photosynthèse et la respiration (Petersen, 1982). Le zinc est associé à la catalyse enzymatique de l'anhydrase carbonique, la carboxypeptidase et d'autres déhydrogénases spécifiques; le cuivre est lié à la laccase, l'acide ascorbique oxydase, la polyphénoloxydase (tyrosinase), la plastocyanine. Le plomb n'est pas un élément essentiel pour les cellules et est très toxique.

Le zinc, à doses sublétales, inhibe le métabolisme anaérobie du glucose (ANRAKU *et al.*, 1975). Il réduit aussi l'activité de la NADH/NADP transhydrogénase, la succinate déhydrogénase, la NADH oxydase, la D-lactate déhydrogénase (SINGH & BRAGG, 1974). Parmi les effets létaux de cuivre, il faut souligner la dégradation des chrophylles (GROSS *et al.*, 1970). Ceci aurait une incidence sur la production d'ATP. Le Pb se fixe sur les protéines enzymatiques et provoque une inhibition générale.

Dans le cas présent, nous ne connaissons que l'immobilisation globale des métaux, lesquels sont surtout fixés sur les parois (0,3 µm pour *C. rubescens* avec des cellules de 15 µm de diamètre), puis le plasmalemme et les protéines cellulaires. Un seuil de saturation existe en raison de la limitation des sites d'absorption qui sont différents pour chaque métal.

L'EDTA modifie la biodisponibilité en métaux lourds (complexation), mais il devient nocif à des concentrations pous élevées (ALLEN *et al.*, 1980). La toxicité des métaux peut être considérablement réduite par une augmentation importante des composants nutritifs du milieu de culture, ainsi le phosphate (HANNA & PATOVILLET, 1972). La réduction des phosphates dans un système eutrophe peut révéler cette toxicité latente.

L'utilisation de l'inhibition de la production d'ATP comme marqueur de l'effet toxique des métaux semble être un test efficace pour étudier l'impact possible d'un polluant dans l'environnement; il permet aussi de prévoir précocement l'importance de l'effet sur la croissance et la multiplication cellulaire. Il faut une forte restauration de l'énergie pour que l'on puisse s'attendre à une croissance et division plus performantes.

Nous remercions le Professeur J. Tronchet (section de Pharmacie) pour l'accès à la RMN ainsi que Mme Dr F. Barbalat-Rey pour ses précieux conseils. Nos remerciements vont aussi au Prof. W. Haerdi (département de chimie minérale, analytique et appliquée) et au Dr. A. Balikangeri pour l'emploi du spectroscope d'absorption atomique et de l'assistance technique y relative.

BIBLIOGRAPHIE

ALLEN H.E., HALL R.H. & BRISBIN T.D. (1980). Metal speciation. Effects on aquatic toxicity. *Environmental Science and Technology* 14 (4), 441-443.

ANRAKU, Y., KIN E. & TANAKA Y. (1975). Transport of sugars and amino acids in bacteria. XV. Comparative studies on the effects of various energy poisons on the oxydative and phosphorylating activities and energy coupling reactions for the active transport systems for amino acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 78, 165-179.

BONZON M., HUG M., WAGNER E. & GREPPIN H. (1981). Adenine nucleotides and energy charge evolution during the induction of flowering in spinach leaves. *Planta* 152, 189-194.

CALDERON C.E. (1990). Etude, en cultures synchrones autotrophes, mixotrophes et hétérotrophes, de l'évolution énergétique (P) de *Chlorella rubescens*, Chod.. Thèse No 2455, Genève, 175 p.

DIN Z.B. & BROOKS J.M. (1986). Use of adenylate energy charge as a physiological indicator in toxicity experiments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 1-8.

GROSS R.E., PUGNO P. & DUGGER W.M. (1970). Mechanism of copper damage in *Chlorella. Plant Physiol.* 46, 183-185.

HANNA P.J. AND PATOVILLET C. (1972). Effect of mercury on algal growth rates. *Biotechnol. Bioeng.* 14, 93-101.

LENK R., DUPANLOUP A., DESCOUTS P. & GREPPIN H. (1984). Réalisation d'un spectromètre RMN pour l'étude des végétaux. *Saussurea*, Genève, 15, 25-31.

MITSUMORI F. & ITO O. (1984). A simple photoirradiation method for biological samples in NMR probes and its application to photosynthetizing green algae. *Journal of magnetic resonance* 60, 106-108.

OAKLEY S.M., NELSON P.O. & WILLIAMSON K.J. (1981). Model of trace-metal partitioning in marine sediments. *Environmental Science and Technology* 15 (4), 474-480.

PETERSEN R. (1982). Influence of copper and zinc on the growth of a freshwater alga, Scenedesmus quadricauda: the significance of chemical speciation. *Environ. Sci. Technol.* 16, 443-447.

PIRSON A. & LORENZEN H. (1966). Synchronized dividing algae. *Annual Review of Plant Physiology* 17, 439.458.

PRADET A. (1967). Etude des adénosines- 5' -mono, -di et triphosphates dans les tissus végétaux. I. Dosage enzymatique. *Physiologie végétale* 5, 209-221.

PRINGSHEIM E.G. (1951). Methods for the cultivation of algae. In *Manual of Phycology*, pp. 347-357. Ed. Smith G.M.; Waltham, Massachusetts; Chronica Botanica Company.

QUEVAT J. (1981). La normalisation des tests de toxicité aiguë en écotoxicologie aquatique. La réponse à un besoin. In: *Colloque INSERM, Les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique*, H. Leclerc et D. Dive. Editions INSERM, Paris; 106, 21-32.

SAYEGH A. & GREPPIN H. (1973). *Chlorella rubescens* Ch.. Essai de synchronisation et mise en évidence de rythmes endogènes. *Archives des Sciences* (Genève) 8, 6-18.

SIANOUDIS J., KUSEL A.C., MAYER A., GRIMME L.H. & LEIBFRITZ D. (1987). The cytoplasmic pH in photosynthesizing cells of the green alga Chlorella fusca, measured by ^{31}P NMR spectroscopy. *Arch. Microbiol.*, 147, 25-29.

SINGH A.P. & BRAGG P.D. (1974). Inhibition of energization of Salmonella typhimurium membrane by zinc ions. *FEBS Lett.* 40, 200-202.

SMEETS J. (1981). Les tests d'écotoxicité aiguë en milieu aquatique (op. cit.) In: *Colloque INSERM*, H. Leclerc et D. Dive. Ed. INSERM, Paris. Introduction p. 8.

ST-JOHN J.B. (1970). Determination of ATP in Chlorella with the Luciferin-Luciferase enzyme system. *Analytical Biochemistry* 37, 409-416.

UEHLINGER V. & LINDER A. (1955). L'efficacité du dénombrement dans l'hémacytomètre. *Archives des Sciences* (Genève) 8, 429-441.

VASSEUR P., JOVANY J.M., FERARD J.F. & TOUSSAINT B. (1981). Intérêt du dosage de l'ATP en tant que critère d'écotoxicité aiguë chez les algues. In: *Colloque INSERM*, H. Leclerc et D. Dive. Ed. INSERM, Paris (op. cit.) 106, 207-226.