

Effets du chlorure de tributylétain sur la croissance et le métabolisme de la diatomée marine *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin)

Tributylétain
Diatomée marine
Métabolisme
Absorption de nutriments
Accumulation de nutriments

Tributyltin
Marine diatom
Metabolism
Nutrient uptake
Cell accumulation

K. MOUHRI ^a, P. MARSOT ^{b*}, E. PELLETIER ^b, M. LOUDIKI ^a et
R. SAINT-LOUIS ^b

^a Département de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, BP S15, Marrakech, Maroc.

^b Institut National de la Recherche Scientifique, Rimouski, G5L 3A1, Québec, Canada.

* Auteur à qui la correspondance doit être adressée.

Reçu le 14/02/95, révisé le 24/03/95, accepté le 04/04/95.

RÉSUMÉ

Le tributylétain (TBT) est un composé organométallique toxique. Son utilisation comme ingrédient actif dans les peintures antisalissures pour bateaux peut occasionner une pollution locale des environnements côtiers. Notre travail consiste à évaluer l'impact du TBT sur la croissance et le métabolisme d'une diatomée marine dominante de l'estuaire du Saint-Laurent: *Phaeodactylum tricornutum*. L'algue est maintenue en cultures confinées exposées à des concentrations en TBT variant de 0,5 et 20,0 $\mu\text{g l}^{-1}$. Les résultats de l'expérience menée pendant une semaine indiquent que la croissance de l'algue est affectée par des concentrations de 2,0 à 20,0 $\mu\text{g l}^{-1}$ provoquant une réduction de 40 à 80 % de la densité cellulaire et une augmentation du taux de mortalité. La diatomée réagit au polluant en formant des agrégats mucilagineux de cellules qui favorisent sa sédimentation rapide. L'analyse des nutriments $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ et PO_4^{3-} intracellulaires et extracellulaires montre les effets du polluant sur les activités d'absorption et d'accumulation. L'inhibition de l'activité d'absorption des $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ n'est perceptible qu'après 72 h d'exposition à une forte contamination. Par ailleurs, le TBT provoque une accumulation intracellulaire des nutriments suggérant une inhibition des processus d'assimilation et d'incorporation de l'azote et du phosphore. L'analyse des organoétains montre une bioaccumulation du TBT par l'algue dès les premières 24 h. Cette bioaccumulation augmente avec le degré de contamination pour atteindre une charge cellulaire maximale après une exposition de 72 h. La bioaccumulation est accompagnée d'un processus de biodégradation en dibutylétain (DBT).

ABSTRACT

Effects of tributyltin chloride on the growth and metabolism of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin).

Tributyltin (TBT) is a toxic organometallic compound, used as a biocide in marine antifouling paints, that may be harmful to marine organisms living in coastal waters. This study attempts to provide a better understanding of the effects of TBT on the growth and metabolism of a dominant marine diatom from the St Lawrence Estuary: *Phaeodactylum tricornutum*. Experiments were conducted in

batch cultures exposed during one week to TBT concentrations ranging from 0.5 to 20.0 $\mu\text{g l}^{-1}$. The algal growth was much reduced by concentrations of 2.0 to 20.0 $\mu\text{g l}^{-1}$, with reduction of cell density and cell death occurring within a few days at higher TBT concentrations. Exposure to pollutant also resulted in mucilaginous agglutination of cells into large, rapidly sinking aggregates. The physiological toxic effects of TBT on $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ uptake after a 72-hour exposure to high TBT level (20.0 $\mu\text{g l}^{-1}$) and on assimilation and incorporation activities were reflected in an important intracellular accumulation of these nutrients. Bioaccumulation of TBT by algae was detected after 24 h of continuous exposure, and concentrations increased with increasing levels of contamination. A plateau in algal bioaccumulation of organotins appeared after 72 h with a partial biodegradation of TBT into dibutyltin (DBT).

Oceanologica Acta, 1995, 18, 3, 363-370.

INTRODUCTION

Le tributylétain (TBT) est bien connu comme un composé organométallique toxique dont l'utilisation comme ingrédient actif dans les peintures antisalissures pour les coques des bateaux peut occasionner une pollution locale des environnements côtiers (Tolosa *et al.*, 1992). La toxicité des organoétains envers les organismes marins varie d'une espèce à l'autre et dépend également des caractéristiques physico-chimiques de l'environnement aquatique contaminé (Alzieu, 1989). L'impact du TBT sur le phytoplancton marin a été étudié essentiellement sur la croissance, la productivité et la photosynthèse (Wong *et al.*, 1982; Salazar, 1985; Walsh *et al.*, 1985; Beaumont et Newman, 1986; Liying *et al.*, 1990). Il est également établi que plusieurs espèces de microalgues peuvent tolérer et accumuler le TBT en le dégradant en dibutylétain (DBT) et en monobutylétain (MBT) (Maguire *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1989; Saint-Louis *et al.*, 1994). A l'inverse, l'effet de ce polluant sur les activités d'absorption, d'accumulation et d'assimilation des nutriments reste mal connu contrairement à celui de la pollution par les métaux lourds décrit par de nombreux auteurs (Harrisson *et al.*, 1977; Peterson et Healey, 1985). De plus, les réactions cellulaires, morphologiques et comportementales de l'algue témoignant de son degré d'adaptation et de sa capacité à réagir à l'apport du polluant dans son environnement méritent également une attention particulière.

Le présent travail se propose d'évaluer l'effet du chlorure de tributylétain sur la croissance et le métabolisme d'une diatomée marine *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin) abondante dans le plancton de l'estuaire du Saint-Laurent (Sinclair, 1978). Il met en évidence le degré de tolérance au TBT de cette espèce, maintenue en culture confinée, comparativement à d'autres microalgues, et son type de comportement réactionnel vis-à-vis du polluant. Des mesures des $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ et PO_4^{3-} dans le milieu de culture et dans les cellules en croissance nous ont permis d'évaluer les conséquences de la contamination par le TBT sur les activités d'absorption, d'accumulation et d'assimilation des nutriments.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'algue utilisée pour cette expérience est la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin) (*Bacillariophyceae*). La souche provient de la collection du Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA, USA. Elle est maintenue en culture axénique de routine sur milieu f/2 de Guillard et Ryther (1962), jusqu'au moment de son ensemencement dans une enceinte de culture de 20 l stérilisée. Cette dernière est préparée à partir de l'eau de l'estuaire (salinité de 2,7 ‰) enrichie en azote, en silice et en phosphore aux concentrations du milieu f/2. La culture est exposée à une intensité lumineuse saturante de 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provenant de fluorescents « cool-white » avec une photopériode de 16 h sur 24 h. La température d'incubation est de $16,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ et l'aération et l'agitation de la culture sont assurées à l'aide d'un apport continu d'air stérile (débit de 150 ml min^{-1}) et par la révolution d'une barre aimantée à 60 r.p.m.

Durant sa phase exponentielle, la culture mère est distribuée également dans cinq enceintes de croissance. Ces cultures subissent une période d'acclimatation de deux jours, aux mêmes conditions de température et de lumière qu'auparavant, et sont ensuite contaminées durant une semaine au chlorure de tributylétain aux concentrations finales de 0,5; 2,0; 10,0 et 20,0 $\mu\text{g l}^{-1}$ de culture. Une enceinte recevant un volume équivalent de solvant du TBT (100 μl d'éthanol) sert de témoin. Au moment de la contamination (jour 0), les 5 cultures ont atteint environ la même densité cellulaire soit 1,4 à 1,5 $\times 10^6$ cellules ml^{-1} (fig. 1) et affichent un taux de divisions/jour de 1,6 d^{-1} . Des échantillons de 600 ml de chaque culture, prélevés chaque jour à la même heure (soit 3 h après le début de la photopériode), sont utilisés pour les mesures de la biomasse et des paramètres de croissance ainsi que pour l'analyse du TBT.

Le dénombrement et l'observation des cellules algales sont accomplis au microscope en contraste de phase à l'aide d'un hématimètre de Neubauer. Le comptage est répété plusieurs fois. Les mesures du poids sec sont effectuées en duplicata selon la méthode de Parsons *et al.* (1961). Le volume cellulaire moyen de l'algue est estimé à l'aide d'un appareil Coulter Counter (modèle 2B-C 1000), muni

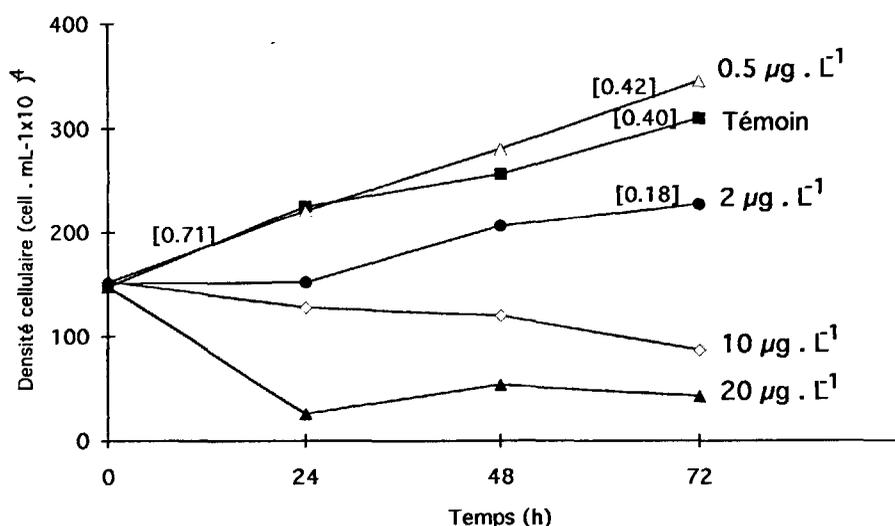


Figure 1

Évolution de la densité cellulaire de cultures confinées de *Phaeodactylum tricornutum* non-contaminée (témoin) et contaminées par des concentrations croissantes de TBT. Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de divisions par jour.

Cell density variation of control batch cultures of Phaeodactylum tricornutum and cultures exposed to increased concentrations of TBT. The number in parenthesis represents cell divisions/day.

d'une sonde de 70 µm d'ouverture. Le test de sédimentation est réalisé dans un contenu cylindrique de faible diamètre (3,2 cm) muni d'une base conique. Le taux de sédimentation est déterminé au Coulter Counter en mesurant l'équivalent en poids frais des cellules algales ayant atteint le fond du cylindre. L'extraction des nitrates + nitrites et des orthophosphates intracellulaires est effectuée selon le protocole Q-1 de Thoresen *et al.* (1982) en y apportant quelques modifications: la culture (50 ml) est filtrée sur filtre Gelman (2,3 cm) en exerçant un vide inférieur à 66,6 hPa. Le filtrat est conservé pour l'analyse des nutriments du milieu de culture et le filtre chargé de cellules est ensuite rincé avec 10 ml d'une solution isotonique de NaCl (Suprapur, Merk, Co. Darmstadt, Allemagne) avant d'être plongé dans 5 ml d'eau déionisée bouillante. Les échantillons, réalisés en double, sont congelés à -20°C jusqu'au moment de l'analyse des nutriments. Les sels nutritifs sont analysés sur l'appareil Technicon Autoanalyser II suivant la méthode colorimétrique décrite par Strickland et Parsons (1972). La variation analytique des replicats s'est avérée en moyenne inférieure à 15 %.

L'extraction des organoétains des cellules algales et leur analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée au détecteur à piégeage d'ions (CG-SM) sont réalisées selon le protocole de Reader et Pelletier (1992). Les teneurs en TBT sont exprimées par rapport à l'ion TBT⁺. L'échantillonnage est réalisé en double et la variation analytique des replicats est de 12 % pour le dibutylétain (DBT) et de 10 % pour le tributylétain.

RÉSULTATS

Les courbes de croissance de *P. tricornutum* en cultures confinées soumises à divers taux de contamination au TBT sont présentées à la figure 1. La culture exposée à la plus faible concentration de TBT (0,5 µg l⁻¹) affiche un taux de croissance moyen légèrement supérieur à celui du témoin. Seulement ces deux cultures (témoin et celle exposée à 0,5 µg l⁻¹) poursuivent leur activité de croissance, évaluée à 0,71 division/jour, après le début de l'expérimentation

(0 à 24 h). L'impact du polluant est noté à la concentration de 2,0 µg l⁻¹. Aux doses plus élevées de 10,0 et 20,0 µg l⁻¹, la densité cellulaire est réduite de 40 à 80 % respectivement avec une augmentation importante du nombre d'algues vidées de leur contenu cellulaire (cellules fantômes, fig. 2). Ce pourcentage reste cependant sous-estimé puisqu'une diatomée morte ou moribonde (observée au microscope) ne correspond pas toujours à une cellule totalement vide, sans contenu cellulaire. De plus, l'observation de certaines cellules met en évidence une nette détérioration du chloroplaste.

L'analyse particulière au Coulter Counter indique une augmentation du volume moyen des particules avec le niveau de la contamination des cultures. Ce résultat, appuyé par l'observation microscopique, traduit non pas une augmentation du volume cellulaire, mais plutôt la présence d'agrég-

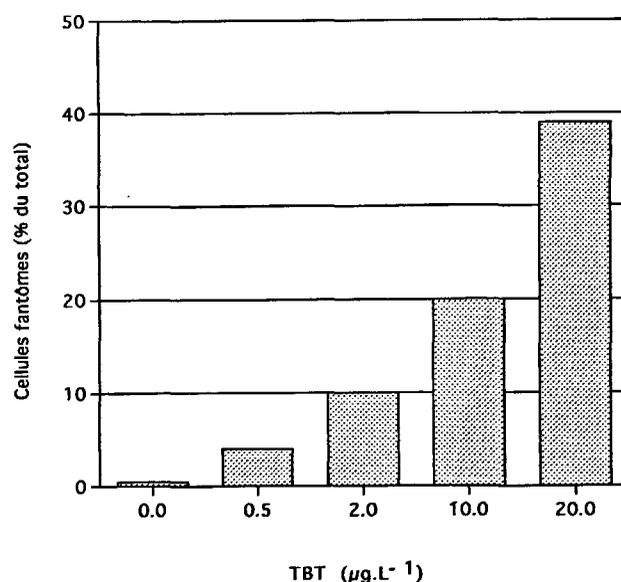


Figure 2

Pourcentages de cellules mortes de *Phaeodactylum tricornutum* dans les cultures témoin et contaminées 72 h au TBT.

Percentage (%) of dead cells in control and contaminated cultures of Phaeodactylum tricornutum after 72-hour exposure to TBT.

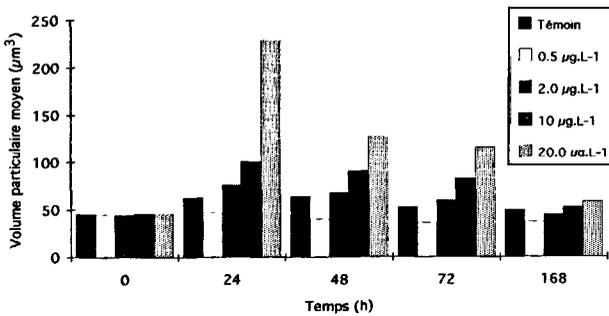


Figure 3

Variations du volume particulaire moyen (cellules et agrégats) de cultures confinées de *Phaeodactylum tricornutum* exposées à des concentrations croissantes de TBT.

Mean particle (cells and aggregates) volume of batch cultures of *Phaeodactylum tricornutum* after exposure to TBT.

gats mucilagineux de cellules triradiées et fusiformes de *P. tricornutum* (fig. 3). Le volume maximum de 225 µm³ obtenu après 24 h d'exposition à 20 µg l⁻¹ de TBT, témoigne d'une forte agglutination des cellules de *P. tricornutum* sous l'effet des concentrations élevées du polluant. La formation d'agrégats est aussi observée dans la culture témoin, après 24 h de croissance, mais à un degré moindre tel qu'indiqué par l'augmentation du volume particulaire de 45 à 70 µm³ (fig. 3).

La figure 4 présente l'évolution du spectre de taille des particules d'une culture polluée avec 20 µg l⁻¹ de TBT. Au temps 0 h (avant la contamination), nous observons un

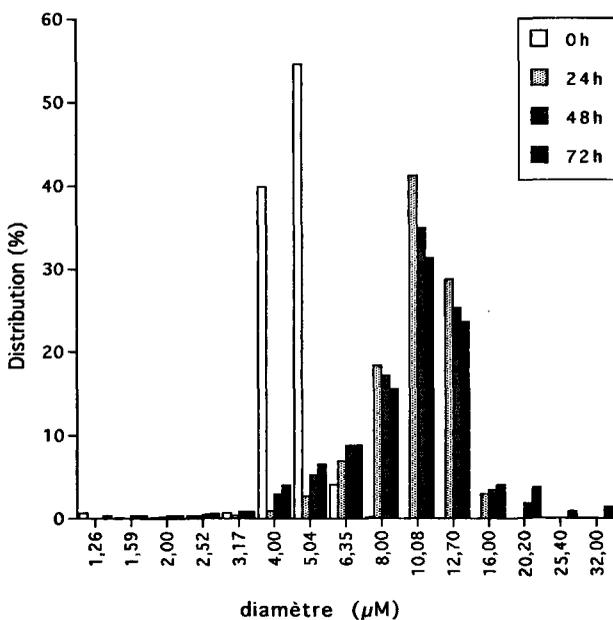


Figure 4

Variations du spectre de taille des particules d'une culture confinée de *Phaeodactylum tricornutum* exposée à 20,0 µg l⁻¹ de TBT.

Variation of size-frequency distribution of culture particles of *Phaeodactylum tricornutum* exposed to 20,0 µg l⁻¹ of TBT.

spectre étroit incluant 95 % de la population dans deux classes de taille (3,8 et 4,8 µm). Ces diamètres correspondent à la dimension normale de *P. tricornutum* et rend bien compte de la monospécificité et de la pureté de la culture avant l'essai. Après 24 heures de contamination, la distribution des fréquences de taille des particules est plus étalée à cause de la formation d'agglomérats de cellules dont certains atteignent plus de 20 µm de diamètre. Les débris ou les fragments cellulaires (particules < 3,8 µm) sont rares (< 0,2 %) même après 72 h d'exposition au TBT (20 µg l⁻¹). Par ailleurs, le taux de sédimentation des agrégats cellulaires formés dans un milieu pollué (20 µg l⁻¹ de TBT) s'est avéré plus de deux fois plus élevé que celui des cellules ou les agglomérats du milieu non contaminé.

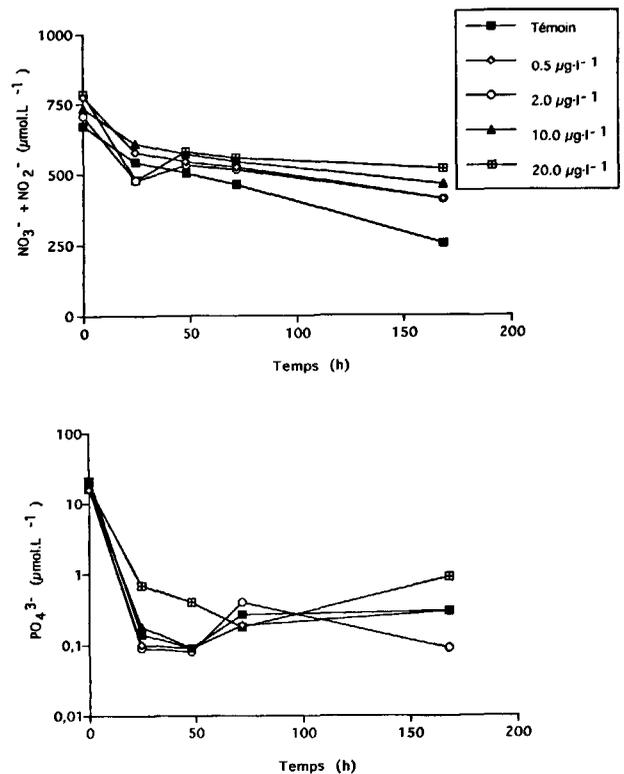


Figure 5

Variations des concentrations en NO₃⁻ + NO₂⁻ et PO₄³⁻ des milieux de cultures de *Phaeodactylum tricornutum* non contaminée (témoin) et contaminées durant 168 h par des concentrations croissantes de TBT.

Concentrations of NO₃⁻ + NO₂⁻ and PO₄³⁻ in the ambient culture medium during 168 h growth of *Phaeodactylum tricornutum* in control and TBT-contaminated cultures.

L'analyse de la figure 5, représentant les variations des concentrations extracellulaires en nutriments, montre une disparition relativement lente des NO₃⁻ + NO₂⁻ par comparaison aux PO₄³⁻ qui s'épuisent dès les premières 24 h. On peut en déduire que dans nos conditions de culture (éclairage et température), la croissance des algues est d'abord limitée par les PO₄³⁻. De plus, l'écart des concentrations en NO₃⁻ + NO₂⁻ entre le milieu témoin et les milieux fortement contaminés n'est vraiment apparent

Tableau 1

Biodégradation du tributylétain (TBT) en dibutylétain (DBT) par *Phaeodactylum tricornutum* en cultures confinées contaminées par des concentrations croissantes de TBT. ^b concentration de l'espèce chimique en $\mu\text{g g}^{-1}$ de poids sec. ND = non détecté.

Biodegradation of tributyltin (TBT) into dibutyltin (DBT) by Phaeodactylum tricornutum in batch cultures contaminated by increasing TBT concentrations. ^b concentration of the chemical species in $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry weight. ND = undetected.

TBT $\mu\text{g l}^{-1}$	24 h			48 h			72 h			168 h		
	TBT	DBT	DBT/TBT	TBT	DBT	DBT/TBT	TBT	DBT	DBT/TBT	TBT	DBT	DBT/TBT
0,5	ND	ND	-	ND	ND	-	0,1	ND	-	ND	ND	-
2,0	0,3 ^b	ND	-	0,4	ND	-	0,4	0,3 ^b	0,8	0,3	0,2	0,6
10,0	1,2	ND	-	1,6	0,3	0,2	1,5	0,9	0,6	0,6	0,3	0,4
20,0	6,1	ND	-	8,0	0,4	0,1	9,6	1,6	0,2	1,6	0,7	0,4

qu'après 72 h d'exposition au polluant: un résultat qui peut traduire à ce stade une meilleure utilisation du nutriment par la culture témoin.

Le contenu cellulaire en $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ paraît nettement affecté par les fortes concentrations du polluant (fig. 6). Par exemple, on retrouve après une exposition de 72 h au TBT ($20 \mu\text{g l}^{-1}$) une réserve cellulaire des nutriments 20 fois supérieure à celle du témoin. Les faibles contami-

nations semblent provoquer un effet contraire. Une accumulation cellulaire massive est également notée pour les PO_4^{3-} après 24 h de forte contamination. Cette réaction cellulaire semble également se reproduire aux plus faibles contaminations à 48 et 72 h mais à un degré moindre.

L'analyse des organoétains met en évidence une bioaccumulation du contaminant par les cellules dès les premières 24 h d'exposition à 2,0, 10,0 et $20,0 \mu\text{g TBT l}^{-1}$ (fig. 7). Cette bioaccumulation peut représenter une charge cellulaire maximale de $9,64 \mu\text{g g}^{-1}$ de poids sec. L'accumulation du TBT est accompagnée d'un processus de biodégradation en dibutylétain (DBT). Les concentrations du DBT augmentent avec le niveau de contamination du milieu (tab. 1) mais la proportion du DBT par rapport au TBT de l'algue varie en sens inverse.

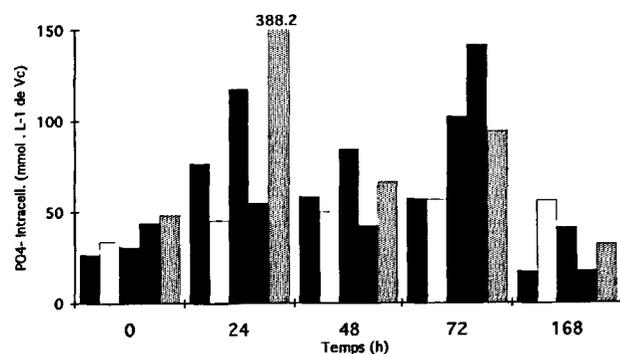
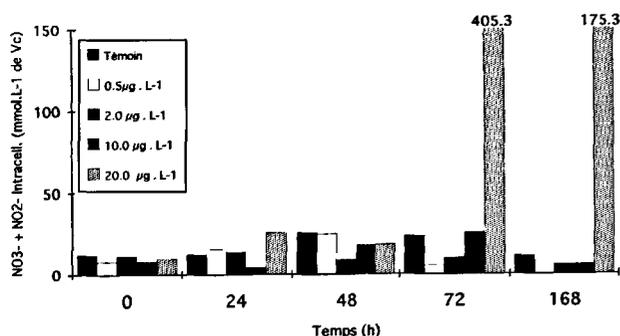


Figure 6

Variations des concentrations intracellulaires en $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ et PO_4^{3-} de cultures de *Phaeodactylum tricornutum* non contaminée (témoin) et contaminées durant 168 h par des concentrations croissantes de TBT.

Intracellular concentrations of $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ and PO_4^{3-} of Phaeodactylum tricornutum grown during 168 h in control culture and cultures contaminated by increasing TBT concentrations.

DISCUSSION

La sensibilité de *P. tricornutum* au TBT (figs. 1 et 2) peut se comparer à ce qui a déjà été observé en milieu confiné chez d'autres espèces marines notamment *Pavlova lutheri* et *Dunaliella tertiolecta* (Beaumont et Newman, 1986): un taux de croissance affecté par des concentrations de 1 à $2 \mu\text{g l}^{-1}$ et des concentrations létales supérieures à $5 \mu\text{g l}^{-1}$. Toutefois, *P. tricornutum* semble beaucoup plus tolérante que d'autres diatomées marines telles que *Skeletonema costatum* et *Thalassiosira pseudonana*. Ces dernières subissent une réduction importante de leur croissance en présence de 0,1 et $0,36 \mu\text{g l}^{-1}$ de TBT (Walsh *et al.*, 1985; Beaumont et Newman, 1986) alors que chez *P. tricornutum*, le même effet n'est observé qu'à des concentrations supérieures à $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ de TBT (fig. 1). Le taux de croissance noté en présence de $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ de TBT, est légèrement supérieur à celui de la culture témoin. Cette réponse, bien que peu significative, peut évoquer le phénomène d'hormèse révélant une stimulation de la croissance d'organismes exposés à des faibles doses de contaminants (Stebbing, 1985). L'ensemble de ces résultats suggèrent une meilleure capacité d'adaptation de cette espèce face au polluant (Salazar, 1985) et corroborent les essais de Liying

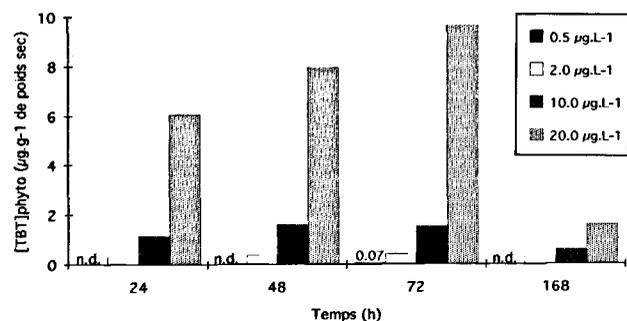


Figure 7

Accumulation du TBT par *Phaeodactylum tricornutum* en cultures confinées contaminées par des concentrations croissantes de TBT.

Accumulation of TBT by Phaeodactylum tricornutum in batch cultures contaminated by increasing TBT-concentrations.

et coll. (1990) qui montrent une baisse du taux de croissance de *P. tricornutum* (EC50) en présence de $0,93 \mu\text{g l}^{-1}$ de TBT. De plus, ils soulignent la tolérance particulière des organismes phytoplanctoniques à l'égard du TBT en comparaison de plusieurs espèces animales pour lesquelles l'effet toxique se révèle à des concentrations de l'ordre de quelques nanogrammes (Beaumont et Budd, 1984; U'ren, 1983).

L'examen microscopique des cultures confirme que l'augmentation de taille des particules est due à une agglomération massive des cellules de *P. tricornutum* sous l'effet des concentrations croissantes du polluant (fig. 3). Cette coalescence rappelle le phénomène de floculation phytoplanctonique observée en période de « bloom » (marine snow) et qui a comme conséquence d'accélérer la sédimentation cellulaire à travers la colonne d'eau (Allredge et Gotschalk, 1989). L'agglutination cellulaire se réalise grâce à l'excrétion de mucopolysaccharides et de particules carbohydratées (Passow *et al.*, 1994). Cette excrétion est induite chez *P. tricornutum*, lors de conditions autotrophes prolongées (Marsot et Houle, 1989) ou de conditions défavorables telle que la photoinhibition (exposition solaire; observations personnelles). L'excrétion de polysaccharides et la coalescence de diatomées peuvent aussi apparaître lors d'un stress nutritionnel (Jensen, 1984). La formation d'agrégats de *P. tricornutum* favorise la sédimentation des cellules contaminées, ce qui pourrait constituer dans le milieu naturel, une menace accrue pour les communautés benthiques, tout particulièrement les organismes filtreurs et suspensivores, en raison de la charge cellulaire non négligeable en butylétain, sous sa forme la plus toxique (fig. 7). Toutefois, la biodégradation du TBT en une molécule considérée moins toxique, le DBT (tab. I) (Wong *et al.*, 1982; Maguire *et al.*, 1984), contribuerait à la détoxification partielle du composé initial. L'efficacité de dégradation du TBT par *P. tricornutum* diminue avec le niveau de contamination du milieu, si l'on en juge par l'augmentation du rapport DBT/TBT. Dans nos conditions d'éclairage et en raison de l'extinction lumineuse des milieux de culture, la dégradation du TBT par photolyse nous semble improbable (Saint-Louis *et al.*, 1994). De plus, la biodégradation du TBT a été observée chez d'autres espèces d'algues en cultures continue (St-Louis *et al.*,

1994) et confinée (Maguire *et al.*, 1984). Par ailleurs, l'excrétion de polysaccharides menant à la formation d'agrégats, peut être perçue comme une stratégie de survie de la microalgue. La sédimentation rapide des cellules constituerait un moyen efficace de fuir un milieu contaminé d'autant qu'en milieu marin, ce polluant s'accumule dans le film hydrophobe à l'interface air-mer (Saint-Louis, 1994).

Le suivi des concentrations extracellulaires des nutriments $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ et PO_4^{3-} (Fig. 5) montre que les cultures utilisant préférentiellement les orthophosphates, jusqu'à leur épuisement après 24 h d'expérimentation. Les concentrations en $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ne sont pas limitantes et demeurent bien supérieures à la constante de demi-saturation ($K_s = 7 \mu\text{M}$) relative à l'absorption du nutriment par l'espèce (Syrett, 1988). L'épuisement des PO_4^{3-} est probablement attribuable à l'intensité lumineuse non saturante exercée sur nos cultures ($300 \mu\text{E. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) ayant comme effet d'accélérer les processus d'incorporation du P_i et de photophosphorylation au niveau des chloroplastes (Cembella *et al.*, 1984). L'éclairage de nos cultures équivaut approximativement aux intensités mesurées *in situ* dans la zone euphotique, aux profondeurs déterminant une activité photosynthétique maximale (Dubinsky, 1986). L'épuisement des PO_4^{3-} provoque ainsi une augmentation importante (plus de 10 fois) du rapport N/P après 24 h. Cette condition pourrait favoriser l'excrétion des polysaccharides (Myklestad et Haug, 1972) et déclencher l'agglutination cellulaire. Cette réaction de *P. tricornutum* est d'ailleurs observée à l'occasion dans la culture témoin (l'examen microscopique montre environ 5 % de cellules agglomérées) mais elle est grandement amplifiée en présence du TBT (figs. 3 et 4).

La baisse progressive en $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$, durant les premiers jours d'expérimentation, est comparable pour les cinq milieux de culture. L'effet du polluant ne se fait véritablement sentir qu'après 72 h d'exposition au TBT, alors que la culture témoin montre une concentration de nutriments inférieure aux autres cultures (fig. 5). Ceci témoigne d'une plus grande activité d'absorption des sels nutritifs par la culture non contaminée. Thomas et Robinson (1986) ont obtenu un comportement similaire de la diatomée *Nitzschia ovalis* dont le taux d'absorption des NO_3^- décroissait seulement après plusieurs heures de contact avec une peinture antisalissure au TBT.

La diminution des concentrations en $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ d'un milieu de culture reflète une activité d'absorption cellulaire mais pas nécessairement une assimilation ou une incorporation puisque les cellules algales peuvent accumuler et concentrer le nutriment sous sa forme inorganique. Les analyses du contenu intracellulaire en nutriments nous renseignent donc indirectement sur leur degré d'utilisation et sur l'anabolisme l'algue, dans la mesure où les faibles concentrations intracellulaires d'un nutriment peuvent traduire une forte activité d'assimilation (Marsot *et al.*, 1992). Ainsi, l'intense accumulation observée sur la culture fortement contaminée, après 24 h pour les PO_4^{3-} et 72 et 168 h pour les $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ (fig. 6) suggère une importante inhibition des réactions d'assimilation et d'incorporation des nutriments par rapport au témoin. L'effet nocif du TBT semble se produire d'abord par un fort blocage du

processus d'assimilation des PO_4^{3-} (accumulation élevée du P_i comparée au témoin). Cette immobilisation du P_i suppose un ralentissement des mécanismes de phosphorylation et d'utilisation du phosphate inorganique ($\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$) au niveau des chloroplastes. Cette hypothèse est appuyée par les travaux de Millner et Evans (1981) montrant les effets inhibiteurs du triphénylétain sur les processus de photophosphorylation des algues pluricellulaires. L'accumulation des PO_4^{3-} est suivie, dans un deuxième temps (48 h plus tard), d'une accumulation massive des $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$, traduisant ainsi une faible activité d'assimilation, d'autant que la diminution des $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ du milieu de culture est négligeable (fig. 5). On peut donc supposer qu'une déficience en ATP cellulaire, résultant du blocage des P_i (inhibition de la photophosphorylation), pourrait être à l'origine d'une assimilation et d'une incorporation déficientes de l'azote et de l'important catabolisme cellulaire de *P. tricornutum* qui en résulte (figs. 1 et 2). A cet égard, l'action toxique du TBT s'apparente à celle du pesticide Atrazine dont l'effet sur le *P. tricornutum* se traduit par une inhibition des réactions photosynthétiques de synthèse de l'ATP (Neuville *et al.*, 1974; Mayasich *et al.*, 1986). On connaît le rôle de l'ATP et les besoins énergétiques des réactions enzymatiques menant à la réduction du NO_3^- et à l'incorporation de l'azote par la voie du GS-GOGAT (Syrett, 1981).

CONCLUSION

La croissance de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* en culture confinée est affectée par une contamination au TBT supérieure à $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$. Aux concentrations de $2,0$ à $20,0 \mu\text{g l}^{-1}$ de TBT, la tolérance de la diatomée diminue

RÉFÉRENCES

- Aldredge A.L. et C.C. Gotschalk (1989). Direct observations of the mass flocculation of diatom blooms: characteristics, settling velocities and formation of diatom aggregates. *Deep-Sea Res.* **36**, 159-171.
- Alzieu C. (1989). L'étain et les organoétains en milieu marin: biogéochimie et écotoxicologie. Rapport scientifique et technique. IFREMER. France. **17**, 93 p.
- Beaumont A.R. et M.D. Budd (1984). High mortality of the larvae of the common mussel at low concentrations of tributyltin. *Mar. Pollut. Bull.* **15**, 402-405.
- Beaumont A.R. et P.B. Newman (1986). Low levels of tributyl tin reduce growth of marine micro-algae. *Mar Pollut. Bull.* **17**, 457-461.
- Cembella A.D., N.J. Antia et P.J. Harrison (1984). The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae. A multidisciplinary perspective: part I. *CRC Critical Rev. In Microbiol.* **10**, 317-391.
- Dubinsky Z. (1986). Productivity of algae under natural conditions. Algal mass culture conditions. Algal mass culture and water blooms in nature. In: *CRC Handbook of microalgal mass culture*, A. Richmond ed. CRC Press Inc. Boca Raton Fla., 101-145.
- Guillard R.R.L. et J.H. Ryther (1962). Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* (Hustedt), and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* **8**, 229-239.
- Harrison W.G., R.W. Eppley et E.H. Renger (1977). Phytoplankton nitrogen metabolism, nitrogen budgets and observations on copper toxicity: controlled ecosystem pollution experiment. *Bull. mar. Sci.* **27**, 44-57.
- Jensen A. (1984). Excretion of organic carbon as function of nutrient stress. Proceedings of the 5th conference of the European Society for comparative physiology and biochemistry. Taormina, Italy, 1983. O. Holm-Hansen, L. Bolis, R. Gilles eds. 61-72.
- Lee R.F., A.O. Valkins et P.F. Seligman (1989). Importance of microalgae in the biodegradation of tributyltin in estuarine waters. *Environ. sci. Technol.* **23**, 1515-1518.
- Liying Z., L. Xiankun et S. Bingyi (1990). Toxic effects of organotin on marine diatoms. *J. Ocean University of Qingdao* **20**, 125-131.
- Maguire R.J., P.T.S. Wong et J.S. Rhamey (1984). Accumulation and metabolism of tri-n-butyltin cation by a green alga, *Ankistrodesmus falcatus*. *Can. J. Fish. aquat. Sci.* **41**, 537-540.
- Marsot P. et L. Houle (1989). Excrétion cellulaire et morphogénèse de *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *Bot. Mar.* **32**, 355-367.
- Marsot P., K. Mouhri et A.D. Cembella (1992). Assimilation du nitrate en cycles diurnaux par *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol. Biochem.* **30**, 665-673.

rapidement et se manifeste par une réduction du taux de croissance et une mortalité cellulaire. De plus, la réaction de *P. tricornutum* se traduit par la formation d'agrégats mucilagineux de cellules fusiformes et triradiées favorisant la sédimentation de l'algue. Ce type de comportement peut être perçu comme un moyen efficace de fuir une zone superficielle contaminée. Par contre, il peut avoir comme conséquence d'entraîner vers les sédiments une partie du polluant de la colonne d'eau et de contaminer les organismes benthiques.

Le tributylétain provoque une accumulation intracellulaire des PO_4^{3-} . Cette réaction de l'algue témoigne d'une action inhibitrice du TBT sur les activités de photophosphorylation et d'utilisation du P_i ($\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$). Par ailleurs, l'accumulation cellulaire massive des $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$, en présence de fortes doses de TBT ($20,0 \mu\text{g l}^{-1}$), suggère une inhibition des processus d'assimilation et d'incorporation de l'azote par manque d'ATP.

La bioaccumulation du TBT varie en fonction du niveau de pollution. A l'inverse, l'efficacité de biodégradation du tributylétain en dibutylétain augmente avec la baisse du niveau de pollution.

Remerciements

Cette recherche a reçu l'appui financier de l'organisme AUPELF-UREF (Association des Universités Partiellement de Langue Française) et du Fonds Institutionnel de Recherche de l'Institut National de la Recherche Scientifique (Québec) et l'aide logistique de l'Institut National de la Recherche Scientifique-Océanologie (Rimouski).

- Mayasich J.M., E.P. Karlander et D.E. Terlizzi Jr. (1986). Growth responses of *Nannochloris oculata* Droop and *Phaeodactylum tri-cornutum* Bohlin to the herbicide atrazine as influenced by light intensity and temperature. *Aquat. Toxicol.* **8**, 175-184.
- Millner P.A. et L.V. Evans (1981). Preparation of phosphorylating chloroplasts from the marine macroalga *Enteromorpha intestinalis* and their sensitivity to triphenyltin chloride. *Plant Sci. Lett.* **21**, 71-74.
- Mykkestad E. et A. Haug (1972). Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran.) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* **9**, 125-136.
- Neuville D., P. Daste et R. Longchamp (1974). Toxicité comparée de divers pesticides à l'égard de deux espèces de Diatomées utiles à l'ostréiculture. *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. 279, Série D, 675-678.
- Parsons T.R., K. Stephens et J.D.H. Strickland (1961). On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **18**, 1001-1016.
- Passow U., A.L. Alldredge et B.E. Logan (1994). The role of particulate carbohydrate exudates in the flocculation of diatom blooms. *Deep-Sea Res.* **41**, 335-357.
- Peterson H.G. et F.P. Healey (1985). Comparative pH dependent metal inhibition of nutrient uptake by *Scenedesmus quadricauda* (*Chlorophyceae*). *J. Phycol.* **21**, 217-222.
- Reader S. et E. Pelletier (1992). Identification and determination of butyltin compounds by gas chromatography-ion trap spectrometry. *Anal. chim. Acta* **262**, 307-314.
- Saint-Louis R. (1994). Rôle du phytoplancton dans le devenir des organoétains à l'interface air-mer. Thèse de Ph.D., Université du Québec à Rimouski, Québec.
- Saint-Louis R., E. Pelletier, P. Marsot et R. Fournier (1994). Distribution et effets du chlorure de tributylétain et de ses produits de dégradation sur la croissance de l'algue marine *Pavlova lutheri* en culture continue. *Water Res.* **28**, 2533-2544.
- Salazar S.M. (1985). The effects of bis(tri-n-butyltin) oxide on three species of marine phytoplankton. Technical Report 1039, Naval Ocean System Center, San Diego, CA. USA, 16 p.
- Sinclair M. (1978). Summer phytoplankton variability in the lower St.-Lawrence estuary. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **35**, 1171-1185.
- Stebbing A.R.D. (1985). Organotins and water quality. Some lessons to be learned. *Mar. Pollut. Bull.* **16**, 383-390.
- Strickland J.D.H. et T.R. Parsons (1972). A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.* **167**, 1-310.
- Syrett P.J. (1981). Nitrogen metabolism of microalgae. In: Physiological bases of phytoplankton ecology. T. Platt ed. *Can. Bull. Fish. aquat. Sci.* **210**, 182-204.
- Syrett P.J. (1988). Uptake and utilization of nitrogen compounds. In: Biochemistry of the algae and cyanobacteria. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, L.J. Rogers, J.F. Gallon eds. Oxford Un. Press, Oxford, 23-29.
- Thomas T.E. et M.G. Robinson (1986). The physiological effects of the leachates from a self-polishing organotin antifouling paint on marine diatoms. *Mar. environ. Res.* **18**, 215-229.
- Thoresen S.S., Q. Dortch et S.I. Amhed (1982). Comparison of methods for extracting intracellular pools of inorganic nitrogen from marine phytoplankton. *J. Plankt. Res.* **4**, 695-704.
- Tolosa, I., L. Merlini, N. de Bertrand, J.M. Bayona et J. Albaigés (1992). Occurrence and fate of tributyl- and triphenyltin compounds in Western Mediterranean coastal enclosures. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**, 145-155.
- U'ren S.C. (1983). Acute toxicity of bis (tributyltin) oxide to a marine copepod. *Mar. Pollut. Bull.* **14**, 303-306.
- Walsh G.E., L.L. McLaughlan, E.M. Lores, M.K. Louie et C.H. Deans (1985). Effects of organotins on growth and survival of two marine diatoms, *Skeletonema costatum* and *Thalassiosira pseudonana*. *Chemosphere*, **14**, 383-392.
- Wong P.T.S., Y.K. Chau, O. Kramar, G.A. Bengert (1982). Structure toxicity relationship of tin compounds on algae. *Can. J. Fish. aquat. Sci.* **39**, 483-488.