Université du Québec INRS - Eau, Terre et Environnement

ÉVOLUTION TEMPORELLE DE LA PRISE EN CHARGE ET DE LA TOXICITÉ DE L'ARGENT (EN PRÉSENCE ET EN ABSENCE D'ACIDE HUMIQUE) ET DU CADMIUM CHEZ L'ALGUE VERTE

Pseudokirchneriella subcapitata

Par Nathalie Paquet

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Louis Martel, CEAEQ

Examinateur externe

Philippe Juneau, UQAM

Directeur de recherche

Claude Fortin, INRS-ETE

Codirecteur de recherche

Peter G.C. Campbell, INRS-ETE

[©] droits réservés de Nathalie Paquet, 2007



À la mémoire d'un ange au ciel, sans qui je n'aurais pu vivre les expériences vécues ces deux dernières années...

REMERCIEMENTS

La réalisation d'un projet de maîtrise tel que celui-ci ne se fait pas seul. De nombreuses personnes ont gravité autour de moi et ont été présentes pour m'aider et me supporter. Dans cette optique, je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, M. Claude Fortin, pour son encadrement, son support et surtout de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir permis de faire mes preuves dans un domaine qui me passionne. Je le remercie également d'avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses interrogations, les connaissances que j'ai acquises me serviront tout au long de ma carrière. Une pensée va également à mon co-directeur de recherche, M. Peter Campbell, pour ses commentaires constructifs pendant mon cheminement. Malgré des continents qui nous ont séparés lors de ma première année d'étude, il a toujours su mettre son grain de sel dans ce projet, ce qui a grandement aidé à le faire progresser.

Je tiens également à remercier Mme Isabelle Laurion de m'avoir donné l'opportunité de travailler à l'aide de la cytométrie en flux. Ce fut une expérience des plus enrichissantes. De plus, merci à l'équipe de BD Bioscience pour son support technique lors du développement de mon protocole. Il ne faut pas oublier l'aide technique prodiguée par les différents employés de l'INRS, spécialement Lise Rancourt pour m'avoir fait comprendre après de multiples tentatives les calculs de radioactivité...

Les parfois longues journées de laboratoire ont passé plus rapidement grâce à de nombreux étudiants, spécialement Julie, Emmanuelle, Joëlle et Jonathan, qui m'ont aidée à progresser et m'ont encouragée lors des moments de découragement. Grâce à eux, j'ai su garder ma bonne humeur, la plupart du temps... Finalement, je tiens à remercier ma famille et mes ami(e)s de m'avoir encouragée et accompagnée tout au long de mes études. Eux comme moi savent les sacrifices que j'ai dû faire pour me rendre là où je suis aujourd'hui. Plus que des remerciements à Sylvain, pour avoir supporté sautes d'humeur, week-ends parfois écourtés et journées rythmées au son du clavier pendant ces derniers mois. Merci d'avoir su me remotiver quand le besoin s'en faisait sentir, de m'avoir aidée à ne pas penser qu'au mémoire et, le plus important, d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

<u>:</u>

RÉSUMÉ

Plusieurs facteurs influencent la toxicité des métaux chez les organismes phytoplanctoniques. Le facteur clé, bien documenté et reconnu, est la spéciation chimique du métal en solution. On présume habituellement que celle-ci demeure constante tout au long d'une exposition. Or, il s'avère que même lorsque le métal est bien tamponné, par exemple avec de l'EDTA (acide éthylènediamine-tétraacétique), les phénomènes d'adsorption et d'absorption des métaux, de même que ceux d'exsudation de ligands organiques peuvent modifier les conditions d'exposition pendant l'expérience. L'impact de ce biais méthodologique sur l'estimation des données toxicologiques telle que la CE50 (concentration ayant un effet sur 50 % de la population) demeure peu connu.

L'argent (Ag) est un métal très toxique. Aux concentrations nécessairement faibles employées dans les tests de toxicité, il ne reste que très peu longtemps dans le milieu à l'étude. L'absorption par les algues est très rapide et aucun ligand non métabolisable ne permet de maintenir la concentration en argent stable dans le milieu d'exposition. On s'attend donc à ce que l'argent soit presque épuisé du milieu d'exposition sur une période de quelques heures. Pour arriver à évaluer les effets de ce métal sur la croissance du phytoplancton, nous avons exposé l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* à diverses concentrations d'argent, en absence et en présence de matière organique dissoute (MOD) et nous avons mesuré la prise en charge du métal, sa concentration cellulaire et l'inhibition de la croissance en fonction du temps. Nous avons utilisé de petits inoculums et, grâce à la cytométrie en flux, il nous a été possible d'énumérer précisément ces faibles densités cellulaires initiales. En démarrant avec une population faible et en diminuant le temps d'exposition, nous croyions pouvoir minimiser l'exsudation de ligands pouvant modifier la spéciation des métaux, donc leur biodisponibilité, ainsi que les pertes de métal en solution par prise en charge et par absorption.

Cette prédiction a d'abord été validée à l'aide du cadmium (Cd), un métal dont la toxicité est très étudiée. Comparativement aux tests normés réalisés avec ce métal (test

CEAEQ; CE50 = 83 ± 2 nM), nous avons observé une toxicité plus élevée à l'aide de notre méthode (CE50 = 20 ± 6 nM). Ceci peut s'expliquer par la plus grande biodisponibilité du métal dans de telles conditions. Les résultats obtenus avec l'argent abondent dans le même sens, les résultats de toxicité obtenus avec notre méthode étant de 13 ± 3 nM, soit environ deux fois moins que les valeurs rapportées dans la littérature.

De la matière organique dissoute a également été ajoutée lors des tests d'exposition effectués avec l'argent. L'influence quantitative de ce ligand sur la biodisponibilité des métaux a été peu étudiée à ce jour, tout particulièrement chez l'argent. Ceci s'explique par la quasi-absence de technique analytique et/ou de modèle d'équilibre chimique fiables permettant d'estimer la concentration de métal libre en présence de MOD. Pour remédier à ce constat, une technique d'échange ionique a été utilisée pour mesurer la concentration d'argent libre en présence de MOD dans nos milieux d'exposition. Ainsi, nos résultats indiquent que la matière organique a un effet protecteur sur le phytoplancton. Après une exposition de 96 h, la toxicité de ce métal était inférieure en présence 5 mg C/L d'acide humique provenant de la rivière Suwannee (CE $50_{Ag-dissous} = 46 \pm 3$ nM) qu'en son absence $(CE50_{Ag-dissous} = 13 \pm 3 \text{ nM})$. Ce résultat peut s'expliquer par la concentration inférieure de l'ion libre Ag⁺ en présence de MOD, la CE50 évaluée à 96 h selon la concentration de métal libre en solution étant de 5.0 ± 0.6 nM. La prise en charge et l'adsorption sont également inférieures en présence de MOD. Plus étonnamment, quand la toxicité est exprimée en termes de quotas cellulaires, nos résultats suggèrent que moins d'argent interne est nécessaire en présence de MOD pour inhiber la croissance algale de 50 %. Des tests plus poussés seraient nécessaires afin d'éclairer les causes de ce dernier phénomène observé.

TABLE DES MATIÈRES

| REMERCIEMENTS | iii |
|---|------|
| RÉSUMÉ | v |
| TABLES DES MATIÈRES | vii |
| LISTE DES TABLEAUX | ix |
| LISTE DES TABLEAUX | xi |
| LISTE DES FIGURES | xiii |
| LISTE DES ABBRÉVIATIONS | |
| | • |
| 1.0: Introduction | |
| 1.1 : Description du contaminant sélectionné | |
| 1.1.1: Production mondiale et exploitation de l'argent | |
| 1.1.2: L'argent dans l'environnement | 4 |
| 1.2 : Complexation de l'argent et formes retrouvées en milieux aqueux | |
| 1.2.1: Ligands inorganiques | |
| 1.2.2: Ligands organiques | |
| • | |
| 1.3 : Modèle de l'ion libre | 12 |
| 1.3.1: Prémisses du modèle de l'ion libre (MIL) | |
| 1.3.2: Ag-MOD et MIL | |
| 1.4: Description des tests de toxicité normés | |
| 1.4.1 : Problèmes reliés à l'étude de l'argent en laboratoire | |
| 1.4.2: Moyens envisagés pour contrer ces problèmes | |
| 1.4.2.1 : Cultures en continu | |
| | |
| 1.5: Accumulation et toxicité de l'argent | |
| 1.5.1 : Chez les invertébrés aquatiques | |
| 1.5.2 : Chez les poissons | |
| 1.5.4: Chez le phytoplancton | |
| 1.6: Objectifs | |
| • | |
| 2.0: Matériel et Méthode | 33 |
| 2.1 : Espèce d'algue choisie | 33 |
| 2.2 : Milieu de culture et autres solutions utilisées | 34 |
| 2.3 : Décomptes cellulaires | 38 |

| | 2.3.1 2.3.2 | | Tests permettant de déterminer la précision analytique du cytomètre flux selon la densité cellulaire utilisée | 42 |
|-----|------------------------------|----------------------------------|--|---------------------------------|
| 2.4 | : | Dosage o | des radio-isotopes | .43 |
| | 2.5.1 | Prise en : 2 : | charge de l'argent par le phytoplancton | 45 |
| 2.6 | : | Prise en | charge de l'argent en présence de MOD par le phytoplancton | 49 |
| 2.7 | : | Toxicité | de l'argent chez Pseudokirchneriella subcapitata | 50 |
| 2 | : 2.8.1 2.8.2 2.8.3 | 2: | Description de la méthode normée Prise en charge du cadmium par l'algue verte <i>Pseudokirchneriella</i> subcapitata Toxicité du cadmium chez <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 5152 |
| | | | ue d'échange ionique (TÉI) | |
| 2 | 2. | 2 : 3 : 9.3.1 : 9.3.2 : | Théorie Montage expérimental Méthodologie employée Cas de l'argent Cas de l'argent en présence de MOD : Influence de la lumière et de la température sur l'atteinte de l'équili | 58 60 60 63 |
| | | 9.3.3 : | d'une solution d'argent en présence de MOD | 63 |
| | | | harge et toxicité du cadmium chez l'algue verte riella subcapitata : Résultats et Discussion | 65 |
| 3.1 | : | | on de la concentration de Cd ²⁺ retrouvée en solution en fonction du | 65 |
| 3.2 | : | Quotas c | rellulaires chez Pseudokirchneriella subcapitata exposé au cadmium | 70 |
| 3.3 | : | Adsorpti | on du cadmium par <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 79 |
| 3.4 | : | Toxicité | du cadmium chez Pseudokirchneriella subcapitata | 82 |
| 3.5 | : | Conclusi | ion | 88 |
| | | | harge et toxicité de l'argent chez l'algue verte riella subcapitata : Résultats et Discussion | 91 |
| 4.1 | : | Bilan de | masse de l'argent en solution | €1 |
| 4.2 | :, | | on de la concentration d'Ag ⁺ retrouvée en solution en fonction du | |
| 4 | .2.1 | : | Calcul du coefficient de distribution | 94 |

| 4.2.2 : | | 2 : Mesure de la quantité d'argent libre retrouvée en solution à la suite de l'ajout de chlorure dans le milieu96 |
|---------|--------------|--|
| | 4.2 | , • |
| | 4.3: | Quotas cellulaires chez <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> exposé à l'argent99 |
| | 4.4: | Adsorption de l'argent par Pseudokirchneriella subcapitata102 |
| | 4.5 : | Importance relative de l'adsorption et de la prise en charge de l'argent chez Pseudokirchneriella subcapitata |
| | 4.6: | Toxicité de l'argent chez Pseudokirchneriella subcapitata |
| | 4.6 : | Conclusion |
| o | _ | Prise en charge et toxicité de l'argent en présence de matière que dissoute chez l'algue verte <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> : ts et Discussion |
| | 5.1: | Bilan de masse de l'argent en solution en présence de substances humiques |
| | 5.2: 5.2. | Évaluation de la concentration d'Ag ⁺ retrouvée en solution en présence de MOD |
| | 5.2.2 | 2 : Influence des facteurs abiotiques sur l'atteinte de l'équilibre d'une solution d'argent en présence de MOD |
| | 5.3: | Quotas cellulaires chez <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> exposé à de l'argent en présence de MOD |
| | 5.4 : | Adsorption de l'argent en présence de MOD par <i>Pseudokirchneriella</i> subcapitata |
| | 5.5: | Toxicité de l'argent chez <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> en présence de matière organique dissoute |
| | 5.6: | Conclusion |
| 6 | .0: | Conclusion |
| | 6.1: | Conclusions sur le cadmium |
| | 6.2: | Conclusions sur l'argent |
| | 6.3: | Conclusions sur l'argent en présence de MOD143 |
| | 6.4 : | Perspectives 144 |
| 7 | .0: | Bibliographie147 |
| 8 | .0: | Annexes |

| 8.1 : | Bilans de masse des concentrations de cadmium retrouvées dans chaque milieu |
|-------|--|
| 8.2 : | Bilans de masse des concentrations d'argent retrouvées dans chaque milieu. 163 |
| 8.3 : | Bilans de masse des concentrations d'argent retrouvées dans chaque milieu en présence de MOD |

LISTE DES TABLEAUX

| Tableau 1.1: Principaux pays producteurs d'argent en 2005, selon The Silver Institute 2006 |
|---|
| Tableau 1.2 : Production mondiale d'argent (en Moz) au cours des dix dernières années |
| Tableau 1.3 : Propriétés chimiques des substances humiques et leurs rôles dans divers enjeux environnementaux (tiré de Porcher, 2004) |
| Tableau 1.4 : Toxicité de l'argent chez diverses espèces phytoplanctoniques. Adapté de Lee et al. (2005) |
| Tableau 2.1 : Concentrations molaires des cations et des anions composant le milieu de culture MHSM-1 |
| Tableau 2.2 : Composantes et proportions des solutions mères utilisées dans la préparation du milieu de culture MHSM-1 |
| Tableau 2.3 : Comparaison des densités cellulaires nominales à celles obtenues à l'aide du cytomètre en flux, dans le but de déterminer la densité minimale à utiliser lors des tests de toxicité (n = 10) |
| Tableau 2.4 a): Compositions des différentes solutions stocks entrant dans la fabrication du milieu du CEAEQ (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec 2003) |
| Tableau 2.4 b): Concentrations des différents éléments se retrouvant dans le milieu du CEAEQ (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2003)54 |
| Tableau 3.1 : Coefficients de distribution pour le cadmium obtenus par différents utilisateurs |
| Tableau 3.2 : Concentrations de cadmium total mesuré, de cadmium libre calculées et de cadmium libre mesurées à la suite du passage de solutions standards avant chaque utilisation de la résine |
| Tableau 4.1 : Calibrage des colonnes (n = 3) à différentes concentrations pour obtenir le coefficient de distribution |
| Tableau 5.1 : Évolution de la quantité de métal libre en solution contenu dans des milieux abiotiques dans différentes conditions de température et de luminosité. Les erreurs représentent les écart-types sur trois mesures |



LISTE DES FIGURES

| Figure 1.1 : Répartition de la production mondiale d'argent dans les différents domaines industriels en 2006, selon The Silver Institute, 2006 |
|---|
| Figure 1.2 : Flux de l'argent des diverses industries vers l'environnement. La taille des flèches est indicative de la quantité de métal circulant entre chaque compartimen (adapté de Purcell et Peters, 1998). |
| Figure 1.3 : Schéma général montrant la spéciation chimique des métaux en solution Adapté de Twiss et al. (2001) |
| Figure 1.4 : Structure représentative de la matière organique dissoute (MOD) naturelle telle que proposée par Schulten et Schnitzer (1993) |
| Figure 1.5 : Représentation conceptuelle des interactions métaux-organismes où M ^{z+} = ior libre, ML = métal complexé, L ^{z-} = ligand et M-X = métal complexé à la surface (tirée de Boily, 2004) |
| Figure 2.1 : Courbe de croissance de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> en fonction du temps en jours |
| Figure 2.2a: Schéma illustrant le fonctionnement d'un cytomètre en flux. Tiré du site Internet: http://www.tours.inra.fr/equipements/cytometrie/utilisations-principes/schema-cytometre.htm |
| Figure 2.2b : Schéma détaillé de la chambre d'écoulement. Tiré du site Internet http://www.affordcd4.com/affCD4_2.htm40 |
| Figure 2.3 : Courbe de croissance de trois cultures distinctes de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> en absence de contaminant, effectuée à l'aide d'un cytomètre en flux sur une période de 12 h. La densité cellulaire initiale était de 2500 cellules/mL43 |
| Figure 2.4 : Pertes d'argent observées sur les parois de différents contenants en fonction du temps. Les barres d'erreur représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures |
| Figure 2.5 : Schéma expérimental de la Technique d'échange ionique. Tiré du mémoire de maîtrise de Frédéric Boily, 2004 |
| Figure 2.6 : Schémas de fabrication de la résine (section de gauche) et de la colonne terminée installée sur un module de TEI (section de droite). Cette figure est tirée de Olsen et Dufour, 2004. |
| Figure 2.7: Profil d'atteinte d'un état stationnaire entre l'argent et les différentes résines |

| e | e 3.1 : Évolution de la concentration de métal libre en solution à la suite d'une exposition de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> à diverses concentrations totales de cadmium. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures |
|----------------|---|
| t, | e 3.2 : Pourcentage de cadmium libre retrouvé en solution selon la densité cellulaire mesurée au temps d'exposition t = 96 h. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures, en tenant compte de la propagation d'erreur |
| e (c | e 3.3 : Quotas cellulaires de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> à la suite d'une exposition au cadmium, évalués selon la concentration initiale de métal en solution (A), selon la concentration mesurée à chaque pas de temps (B) et selon la concentration de métal libre mesurée à 96 h (C). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures |
| c s | e 3.4 : Évolution des quotas cellulaires dans le temps pour chaque concentration de cadmium total testé lors de l'exposition de l'algue verte <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> à ce métal. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures |
| r h | e 3.5: Quotas cellulaires obtenus à chaque pas de temps en fonction de la concentration de cadmium dissous présente dans le milieu. La figure A montre les résultats pour un temps d'exposition de 12 h, la figure B pour t = 24 h, C pour t = 48 h, D pour t = 72 h, E pour t = 96 h alors que la figure F illustre les quotas cellulaires obtenus à chaque pas de temps pour les faibles concentrations testées. Les barres d'erreur représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures |
| n r | e 3.6 : Flux d'entrée du cadmium à l'intérieur de la cellule selon la concentration moyenne de métal présent en solution à chaque pas de temps. Les barres d'erreur représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures, en ayant tenu compte de a propagation d'erreur |
| e c p | e 3.7 : Comparaison des quotas cellulaires obtenus après 96 h à la suite d'une exposition au cadmium à l'aide des méthodes développée (cercles) et normée (carrés), ces derniers résultats ayant été fournis par Frédéric Maloney (communication personnelle). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures |
| . d c p | e 3.8 : Adsorption de cadmium par <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> exposée à différentes concentrations de ce métal, exprimée par rapport à la concentration de cadmium initialement mesurée (A), à la concentration de cadmium mesurée à chaque pas de temps (B) et à la concentration finale de cadmium libre Cd ²⁺ (C). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures |
| Figure e c p n | n, D pour t = 72 h, E pour t = 96 h alors que la figure F illustre les quotas cellulaires obtenus à chaque pas de temps pour les faibles concentrations testées. Les barres d'erreur représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures |

| Figure 3.9 : Comparaison de la quantité de cadmium adsorbée par <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> après 96 h d'exposition à ce métal selon la méthode normée (carrés) et selon la méthode développée (cercles), ces derniers résultats ayant été fournis par Frédéric Maloney (communication personnelle). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures |
|---|
| Figure 3.10: Courbes doses-réponses de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> exposée à différentes concentrations de cadmium total. La figure A montre la croissance relative en fonction de la concentration de métal initialement présente en solution, alors que la figure B montre la croissance relative de l'algue en fonction de la concentration de métal restant en solution à chaque pas de temps. Les cercles correspondent à un temps d'exposition de 24 h, les triangles à t = 48 h, les carrés à t = 72 h alors que les losanges correspondent à t = 96 h. Les barres d'erreurs indiquent les écart-types sur les trois mesures. |
| Figure 3.11 : Flux d'entrée moyen du cadmium à l'intérieur de la cellule algale à chaque pas de temps testé pour une concentration de cadmium total équivalant à 220 nM. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures84 |
| Figure 3.12 : Comparaison des CE50s obtenues à l'aide de la méthode développée (cercles) à celles obtenues à l'aide de la méthode normée (carrés). La CE50 est exprimée par rapport à la concentration de cadmium mesurée initialement (A), à la concentration de cadmium mesurée à chaque pas de temps (B), aux quotas cellulaires de cadmium (C), à la quantité de cadmium adsorbé (D) et par rapport à la quantité de cadmium libre mesurée (E). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % sur les trois mesures. |
| Figure 4.1: Pourcentage d'argent retrouvé en solution à la suite de l'exposition de Pseudokirchneriella subcapitata à différentes concentrations de ce métal (inoculum initial = 2500 cellules/mL). |
| Figure 4.2 : Comparaison de la proportion d'argent libre mesurée à l'aide de la TÉI à la valeur prédite par le logiciel MINEQL ⁺ à la suite de l'ajout de différentes concentrations de chlorures. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures |
| Figure 4.3: Relation entre les concentrations d'argent libre retrouvées en solution à chaque pas de temps et celles d'argent total dissous à la suite d'une exposition de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> à diverses concentrations totales d'argent. Chaque symbole correspond à un temps d'exposition différent, les cercles représentant un temps de 24 h, les triangles un temps de 48 h, les carrés un temps de 72 h et les losanges représentant un temps d'exposition de 96 h. Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types sur trois mesures distinctes |
| |

| Figure 4.4 : Quotas cellulaires en argent chez <i>P. subcapitata</i> exposées à différentes concentrations d'Ag total initial en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent les écart-types obtenus sur la moyenne de trois mesures97 |
|--|
| Figure 4.5: Quotas cellulaires de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> exposées à différentes concentrations d'argent total mesurées initialement. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures |
| Figure 4.6: Concentration d'argent adsorbé par <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> exposé à différentes concentrations de ce métal en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures |
| Figure 4.7: Adsorption de l'argent chez l'algue verte <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> selon la concentration de métal présent dans le milieu initialement à chaque pas de temps. Les barres d'erreur représentent les écart-types sur trois mesures distinctes |
| Figure 4.8 : Comparaison des quotas cellulaires obtenus à chaque pas de temps (cercle) aux valeurs d'adsorption (triangle) évalués selon la concentration de métal initialement présente en solution. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types sur la moyenne de trois mesures |
| Figure 4.9 : Densité relative de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> exposée à différentes concentrations d'argent mesuré initialement (A) et à chaque pas de temps (B). Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur trois mesures |
| Figure 4.10 : Toxicité de l'argent évaluée selon différents paramètres. La figure A exprime la CE50 par rapport à la concentration d'argent mesurée initialement, la figure B par rapport à la valeur mesurée à chaque pas de temps, la figure C par rapport aux quotas cellulaires, D par rapport à la quantité de métal adsorbé alors que E exprime la CE50 par rapport à la concentration de métal libre mesurée à chaque pas de temps. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95% |
| Figure 5.1: Pourcentage d'argent retrouvé en solution à la suite de l'exposition de Pseudokirchneriella subcapitata à différentes concentrations de ce métal en présence de 5 mg C/L de substances humiques |
| Figure 5.2 : Courbe de titrage d'une solution d'acide humique de la rivière Suwannee (5 mg C/L) en fonction de la concentration totale d'argent à pH 7 (n = 3) à t = 0. Les solutions étaient préparées 24 h à l'avance et laissées équilibrer à l'obscurité à 4°C. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures.118 |
| Figure 5.3 : Évolution de la concentration de métal libre en solution en fonction du temps pendant l'exposition de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> à différentes concentrations |

| d'argent total en présence de MOD. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur trois mesures |
|--|
| Figure 5.4 : Prise en charge de l'argent à chaque pas de temps en présence de MOD chez l'algue verte <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , évalués selon la concentration de métal dissous mesurée initialement dans le milieu. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures |
| Figure 5.5 : Comparaison de la prise en charge en absence (cercle) et en présence (carré) de MOD chez l'algue verte <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . Les barres d'erreurs représentent types sur trois mesures |
| Figure 5.6: Quotas cellulaires obtenus pour chaque concentration d'argent en présence de MOD en fonction du temps chez l'algue verte <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . Les barres d'erreurs représentent les écart-types mesurés sur la moyenne de trois mesures |
| Figure 5.7: Concentration d'argent adsorbée par <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> exposées à différentes concentrations d'argent en présence de substances humiques en fonction du temps. Les barres d'erreurs indiquent les écart-types obtenus sur trois mesures différentes |
| Figure 5.8: Adsorption de l'argent à chaque pas de temps chez l'algue verte Pseudokirchneriella subcapitata selon la concentration de métal présent dans le milieu initialement en présence de MOD. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur trois mesures |
| Figure 5.9 : Comparaison de l'adsorption de l'argent en présence (carré) et en absence (cercle) de MOD chez l'algue verte <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . Les barres d'erreurs représentent les écart-types obtenus sur la moyenne de trois mesures 131 |
| Figure 5.10 : Densité relative de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> exposé à différentes concentrations d'argent mesuré initialement en présence de MOD. Les barres d'erreurs représentent les écart-types obtenus sur trois mesures différentes132 |
| Figure 5.11: Toxicité de l'argent chez l'algue verte <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> en absence (cercle) et en présence de MOD (carré). La toxicité a été évaluée selon la concentration initiale de métal (A), la concentration de métal à chaque pas de temps (B), les quotas cellulaires (C), l'adsorption (D) et la concentration de métal libre (E). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95% |



LISTE DES ABRÉVIATIONS

 μ : Taux de croissance

λ: Coefficient de distribution métal-résine

AF: Acide fulvique AH: Acide humique

ANOVA: Analyse de variance à une voie BLM: Modèle du ligand biotique

CE50 : Concentration ayant un effet sur 50 % de la population testée CEAEQ : Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec

CPM: Comptes par minute

DPM: Désintégrations par minute DPS: Désintégrations par seconde DVB: Groupements divinylbenzène

EDTA: Acide éthylènediamine-tétraacétique

HDPE: Polyéthylène à haute densité

HSM: High salt medium I: Force ionique

IHSS: International Humic Substances Society

K: Constante d'équilibre chimique K_m: Constante de demi-saturation

L: Ligand

 m_r : Masse de résine M^{z^+} : Ion métallique libre

MHSM: Modified high salt medium
MIL: Modèle de l'ion libre

 $\begin{array}{ll} ML: & M\text{\'etal complex\'e \`a un ligand} \\ ML_n^{\ 0}: & Complexe neutre lipophile \\ ML_n^{\ \pm}: & Complexe hydrophile \\ MOD: & Mati\`ere organique dissoute \\ \end{array}$

MOPS: Acide N-morpholino-3-propane sulfonique NIST: National Institute of Standards and Technology

PC: Polycarbonate PP: Polypropylène

PTF: Polymère de tétrafluoroéthylène

R: Résine échangeuse d'ions
S(II'): Espèces de soufre réduit
SH: Substances humiques
SRHA: Suwannee River humic acid

TEI: Sawannee River namic acia
TEI: Technique d'échange ionique

TFE: Tétrafluoroéthylène

USEPA: United States Environmental Protection Agency

UTCC: University of Toronto Culture Collection WHAM: Windermere humic aqueous model

1.0: Introduction

Les métaux sont retrouvés de façon naturelle dans la croûte terrestre. La vie a évolué dans ce milieu et l'ensemble des organismes vivants a dû s'adapter à leur présence, dont certains métaux sont nécessaires dans des proportions et des mélanges appropriés. Cependant, depuis plusieurs années, l'industrialisation a entraîné de nombreuses conséquences, tant sur les différents écosystèmes que sur leurs habitants respectifs. Depuis l'avènement des industries, les concentrations de métaux se retrouvant dans notre environnement ont considérablement augmenté, quoique la concentration de la plupart des métaux diminue graduellement depuis les dix dernières années (Croteau *et al.* 2002; Perceval *et al.* 2006; Sofyan *et al.* 2006). Malgré que certains d'entre eux soient essentiels (e.g.: Cu, Mn, Ni, Zn), d'autres sont considérés comme toxiques et peuvent créer de nombreux dommages au niveau des organismes vivants. C'est le cas notamment de l'argent.

1.1: <u>Description du contaminant sélectionné</u>

L'argent est un métal mou ou de classe 2 (métaux ayant une forte affinité pour les groupements thiols), non-essentiel aux organismes vivants. Il s'agit d'un métal blanc, ductile et malléable, qui a la capacité de conduire très efficacement l'électricité et la chaleur. D'ailleurs, de tous les métaux, il est celui qui possède la meilleure conductivité électrique. De plus, n'étant pas sujet à la corrosion, son utilisation minimise les risques de surchauffe et d'incendie. Il entre dans la confection de pièces de monnaie, de bijoux, d'argenterie, de miroirs, d'alliages et de diverses composantes électriques et électroniques telles que les accumulateurs. Le pouvoir toxique de sa forme libre fait également en sorte qu'il est utilisé comme fongicide et comme agent microbien, des concentrations de 0,05 mg/L suffisant pour contrer toute prolifération de la flore bactérienne (USEPA, 1980; Murata *et al.* 2005). Cependant, sa plus grande utilisation demeure dans l'industrie de la photographie, quoiqu'une baisse est observée depuis certaines années en relation avec l'avènement des appareils numériques sur le marché. L'argent est utilisé dans les développements photographiques à cause de sa grande réactivité photochimique. En effet, lorsque des photons de lumière percutent les cristaux d'halogénures d'argent (Ag-X) qui

composent les pellicules photographiques, ils convertissent l'Ag⁺ en argent métallique, produisant ainsi une image latente.

1.1.1: Production mondiale et exploitation de l'argent

Dans la nature, l'argent existe sous quatre états d'oxydation différents, soit 0, 1⁺, 2⁺ et 3⁺. Bien que les états 0 et 1⁺ soient les formes les plus prédominantes, les états 2⁺ et 3⁺ peuvent à l'occasion être retrouvés (Etris, 1997; dans Purcell et Peters, 1998). Ce métal peut être extrait sous sa forme native. Cependant, il a tendance à se complexer facilement pour former des minerais comme l'argentite (Ag₂S), la cérargyrite (AgCl), la proustite (Ag₃AsS₃) et la pyrargyrite (Ag₃SbS₃). Il sera donc principalement extrait comme sousproduit dans la production minière du cuivre, du nickel, du plomb, du zinc et de l'or. Au Canada, environ 70 % de l'argent est obtenu comme sous-produit de l'affinage de métaux industriels et 30 % est extrait des minerais d'argent (Greenwood et Earnshaw, 1998).

En 2005, la production totale d'argent était estimée à 911,9 millions d'onces, soit 28 367 tonnes (The Silver Institute, 2006). Ceci représente une augmentation de 1055 tonnes par rapport à l'année précédente, soit 3 % de la production annuelle. En tout, 58 pays exploitent ce minerai (The Silver Institute, 2006). Les principaux pays producteurs sont le Pérou, avec une production de 102,6 millions d'onces, suivi de près par le Mexique, à 92,3 millions d'onces (cf. Tableau 1.1). À eux deux, ces pays produisent ≈ 21 % de la production mondiale. Le Canada se classe 9^{ème}, avec une production d'environ 34 millions d'onces.

Tableau 1.1: Principaux pays producteurs d'argent en 2005, selon The Silver Institute, 2006.

| Rang | Pays producteurs d'Ag | Production (Moz) |
|-----------|-----------------------|------------------|
| 1 Diagram | | 100 6 |
| 1 | Pérou | 102,6 |
| 2 3 | Mexique | 92,3 |
| | Australie | 77,4 |
| 4 | Chine | 64,7 |
| 5 | Chili | 44,3 |
| 6 | Russie | 42,2 |
| 7 | Pologne | 40,5 |
| 8 | Etats-Unis | 39,2 |
| 9 | Canada | 34,1 |
| 10 | Kazakhstan | 25,9 |
| 11 | Bolivie | 12,8 |
| 12 | Indonésie | 9,9 |
| 13 | Suède | 9,1 |
| 14 | Maroc | 7,4 |
| 15 | Argentine | 5,2 |
| 16 | Turquie | 5,2 |
| 17 | Afrique du Sud | 2,8 |
| 18 | Iran | 2,6 |
| 19 | Uzbekistant | 2,2 |
| 20 | Inde | 2,1 |
| | | |

De cette production, 27 % était utilisée pour la fabrication de bijoux et d'argenterie (249,6 Moz), 18 % dans l'industrie photographique (164,8 Moz), 45 % pour les diverses applications industrielles (409,3 Moz), 5 % pour la monnaie (40,6 Moz) alors que le 5 % restant a servi lors d'investissement (cf. Figure 1.1). Actuellement, près de 95 % de la production annuelle d'argent est destinée au secteur industriel (électricité et électronique, photographie, joaillerie et argenterie). La demande de ce métal est supérieure à la production, qui ne cesse d'augmenter d'années en années (cf. Tableau 1.2).

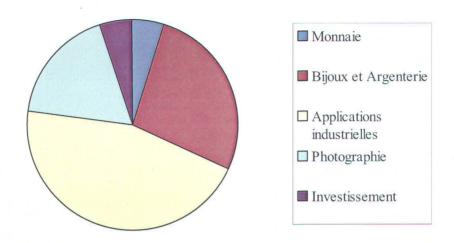


Figure 1.1 : Répartition de la production mondiale d'argent dans les différents domaines industriels en 2006, selon The Silver Institute, 2006.

Tableau 1.2 : Production mondiale d'argent (en Moz) au cours des dix dernières années.

| Type de | | | þ | | An | née | | | | |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| production | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 |
| Production minière | 491 | 520 | 542 | 557 | 591 | 606 | 597 | 601 | 620 | 642 |
| Ventes intergouvernementales | 19 | - | 34 | 97 | 60 | 63 | 59 | 91 | 67 | 68 |
| Ferraille | 158 | 169 | 194 | 181 | 180 | 182 | 187 | 184 | 181 | 187 |
| Garantie de change | | 68 | 7 | _ | _ | 19 | - | - | 10 | 15 |
| Désinvestissement | 143 | 86 | 53 | 49 | 100 | - | 21 | - | - | - |
| Production totale | 811 | 844 | 829 | 884 | 931 | 871 | 863 | 875 | 878 | 912 |

1.1.2: L'argent dans l'environnement

L'argent est retrouvé naturellement dans la croûte terrestre à une concentration variant de 0,01 à 5 mg/kg, la moyenne se situant autour de 0,1 mg/kg. Cependant, que ce soit de façon naturelle ou plutôt accidentelle, l'argent est libéré dans l'environnement via différents processus (cf. Figure 1.2). Cela peut être lors de sa transformation dans les divers types d'industries, via les fonderies, la combustion du charbon ou par les effluents miniers,

industriels et municipaux (Purcell et Peters, 1998). Une fois dans la nature, une grande partie de ces rejets se retrouve dans les écosystèmes aquatiques, y compris les étendues d'eaux douces.

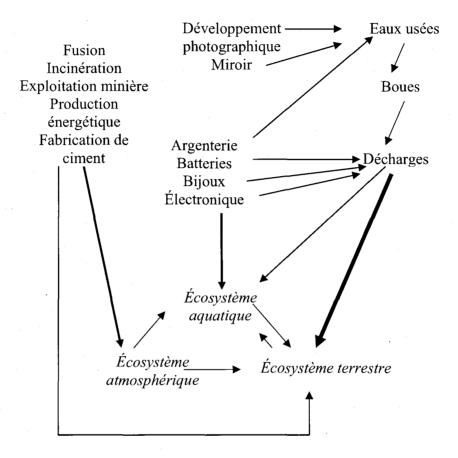


Figure 1.2 : Flux de l'argent des diverses industries vers l'environnement. La taille des flèches est indicative de la quantité de métal circulant entre chaque compartiment (adapté de Purcell et Peters, 1998).

Dans les eaux de surface, les concentrations d'argent dissous sont très faibles. Des données indiquent que les concentrations en argent des affluents situés en aval de zones industrielles et urbaines peuvent atteindre une concentration allant jusqu'à 3 nM (rivière Quinnipiac : Benoit, 1994; rivière Asakawa : Yamazaki *et al.* 1996). Des données moins récentes colligées par Andren *et al.* (1995) recensent des concentrations d'argent inférieure à 5 µg/L (46 nM) dans les lacs et dans les rivières, au Canada comme aux États-Unis. L'argent présent dans la colonne d'eau va ultimement se retrouver dans les sédiments à

cause surtout de la tendance qu'a ce métal à s'adsorber aux particules (Wingert-Runge et Andren, 1993).

Peu de données rapportent les concentrations d'argent dissous retrouvées dans les étendues d'eaux salées. Il existe néanmoins des profils exhibant les concentrations de ce métal dans divers bassins océaniques. Pour le Pacifique Nord, la mer Okhotsk et la mer du Japon, les concentrations varient entre 4 et 47 pmol/kg, avec une augmentation systématique de la concentration avec la profondeur (Zhang et al. 2001). La même tendance a été observée dans l'océan Atlantique, les concentrations dissoutes étant cependant plus faibles (entre 0,25 et 0,75 pmol/kg) (Ndung'u et al. 2001; Flegal et al. 1995). Dans les zones très industrialisées, les concentrations peuvent atteindre des valeurs plus élevées, comme c'est le cas dans la Baie de San Francisco, où des valeurs de 243 pmol/kg ont été observées (Sanudo-Wilhelmy et Flegal, 1992). Les variations interspatiales s'expliqueraient principalement par les forts apports atmosphériques et en moindre importance par les courants, les upwellings et les phénomènes biologiques (e.g.: les [Ag] seraient proportionnelles à celles du Si). Cependant, l'évolution dans les techniques d'extraction et d'analyse de l'Ag dans le temps peut être un autre facteur important à considérer.

En ce qui concerne les émissions atmosphériques, quelques mesures ont été effectuées pour déterminer les concentrations d'argent retrouvées dans l'air. Cependant, elles remontent à plusieurs années. Scow *et al.* (1981) ont estimé les teneurs atmosphériques totales aux environs de 91 x 10³ kg, ce qui représente environ 4 % des émissions relâchées dans l'environnement. Ces émissions seraient majoritairement d'origine anthropique (e.g.: combustibles fossiles, incinération de déchets, relâchement d'iodure d'argent provoquant des précipitations), ces dernières étant 80 fois supérieures aux émissions naturelles dans l'atmosphère (e.g.: poussières provenant du sol ou d'éruptions volcaniques) (Galloway *et al.* 1982). Les précipitations contiennent également des teneurs appréciables en argent, celles-ci étant 460 fois plus élevées en milieu urbain et 8 fois en milieu rural qu'en région éloignée (Galloway *et al.* 1982).

1.2 : Complexation de l'argent et formes retrouvées en milieux aqueux

La spéciation de l'argent, c'est-à-dire sa répartition parmi ses différentes formes chimiques, va grandement influencer la toxicité de ce métal sur un organisme (Templeton et *al.* 2000). Un métal cationique peut former différents types de liaison avec les anions présents dans le milieu, et ce, en fonction de certains facteurs tel que le pH et la température. Les aquo ions peuvent former des hydroxo-complexes, des complexes inorganiques, des complexes organiques simples (ligands monomères) ou des complexes organiques de grande taille moléculaire (ligands hétéropolymères) (cf. Figure 1.3). Dans le cas de l'argent, l'aquo ion $Ag(H_2O)^+$ peut former des complexes avec des ligands inorganiques (chlorure, thiosulfate, sulfures), ainsi qu'avec des ligands organiques simples (ex. : acides aminés, notamment la cystéine) et complexes (substances humiques).

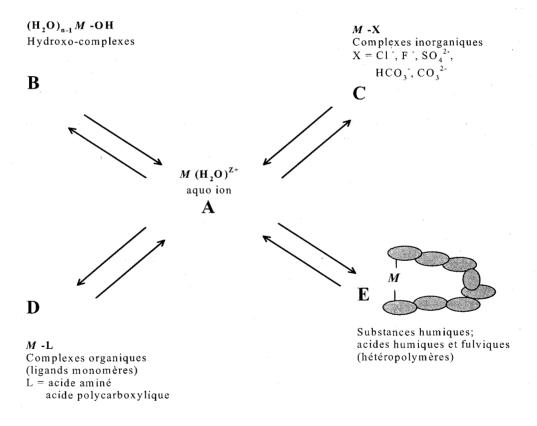


Figure 1.3 : Schéma général montrant la spéciation chimique des métaux en solution. Adapté de Twiss *et al.* (2001).

1.2.1: Ligands inorganiques

L'argent est un métal qui a relativement peu d'affinité avec les ligands inorganiques (OH⁻, HCO₃⁻, CO₃²-, SO₄²-, F⁻). En effet, en absence de sulfures, seuls le chlorure et le thiosulfate exercent une influence sur la forme de métal retrouvée en solution, formant une série de complexes stables $(AgCl_2^0, AgCl_2^{-1} : log K_1 = 3,31, log <math>\beta_2 = 5,25; AgS_2O_3^{-1},$ $Ag(S_2O_3)_2^{3}$: $log K_1 = 8,82, log \beta_2 = 13,50$). Par contre, en présence de HS ou d'une espèce de la même famille, la spéciation de l'argent est presque uniquement contrôlée par ce ligand (Adams et Kramer, 1999). En effet, des études récentes ont démontré que des concentrations de soufre métastable réduit (S(II-)) de l'ordre du nanomolaire influençaient fortement la spéciation de l'argent, allant jusqu'à lier quasi-complètement l'ion libre Ag⁺ présent dans le milieu étant donné sa faible présence dans les écosystèmes aquatiques (Bowles et al. 2003). Normalement, on ne s'attendrait pas à ce que ces espèces de soufre soient présentes dans les eaux oxiques naturelles, à cause de leur grande instabilité thermodynamique en présence d'oxygène (Rozan et al. 2000). Cependant, tout porte à croire que le soufre réduit peut tout de même se retrouver dans ce type d'environnement et qu'il en résulte des complexes très stables (e.g. : $AgHS^0$, $Ag(HS)_2^{-1}$: $log K_1 = 14,0$, $log \beta_2$ = 17,7; Martell et al. 1998).

1.2.2 : Ligands organiques

La spéciation de certains métaux non-essentiels comme l'argent est fortement influencée par la présence de ligands organiques, principalement la matière organique dissoute (MOD). L'argent étant un métal de classe 2, on peut s'attendre à ce que son affinité pour les groupements phénoliques et carboxyliques soit relativement faible et qu'il démontre plutôt une affinité pour les groupements thiols, présents en quantité faible mais décelable dans la MOD (Ravichandran, 2004).

1.2.2.1: Description de la MOD

La matière organique dissoute est majoritairement composée d'hétéropolymères complexes provenant de la décomposition des végétaux, des animaux et des microorganismes. Elle est retrouvée en abondance dans les eaux de surface et dans les sols, et dans une moindre proportion, dans les eaux souterraines. Elle peut être d'origine aquatique, mais elle est principalement d'origine terrestre (McKnight et Aiken, 1998). La concentration de MOD dans les eaux de surface peut atteindre jusqu'à 100 mg de carbone par litre (Tipping, 2002). Cependant, la concentration moyenne se situerait autour de 5 mg C/L (Thurman, 1985).

La fraction hétéropolymère de la MOD est constituée de deux différents types de molécules : les acides humiques (AH) et les acides fulviques (AF). Chacune se retrouve dans tous les types d'environnement, la différence entre elles étant les pHs auxquels elles sont solubles. Les AF demeurent en solution sur l'ensemble de la gamme alors que les AH sont insolubles à des pHs inférieurs à 2, mais se dissolvent à des pHs supérieurs à ce dernier (McKnight et Aiken, 1998). Les acides humiques sont majoritairement utilisés lors des études en laboratoire à cause de cette caractéristique. Elles entrent dans la composition de la matière organique dans une proportion de 50 à 80 % (Buffle, 1988). Elles sont en général constituée d'environ 50 % de carbone, 40 % d'oxygène, 5 % d'hydrogène et d'environ 1 % d'azote (Tipping, 2002). Certaines analyses révèlent aussi la présence de soufre et de phosphore à des concentrations traces (< 1 %) (Thurman et Malcolm, 1995; Ravichandran, 2004). Leur structure n'est pas très bien définie, mais on connaît l'existence des groupements fonctionnels carboxyliques, phénoliques et alcooliques de même que des cétones et des quinones.

De par leur complexité, les substances humiques se retrouvent associées à divers processus environnementaux (cf. Tableau 1.3). Dans les eaux naturelles, elles peuvent servir de tampon, de réservoir de nutriments et/ou de ligand. En effet, la capacité à complexer les cations en solution est une caractéristique physico-chimique importante des SH, reliée à la présence dans sa structure de groupements carboxyliques, d'atomes de soufre et d'azote (Tipping, 2002). Elles peuvent également agir comme des surfactants,

leurs molécules étant composées de domaines hydrophiles et hydrophobes (Visser, 1982). Ceci leur donne donc la possibilité de s'accumuler à l'interface air-eau et de s'adsorber à des surfaces hydrophobes, telles que les parois algales (Campbell *et al.* 1997; Parent *et al.* 1996; Vigneault *et al.* 2000). Cette interaction directe entre les algues et la matière organique peut occasionner un changement dans la perméabilité membranaire de la cellule, ce qui influencera la prise en charge et la toxicité des métaux envers les organismes aquatiques (Boullemant *et al.* 2004).

Tableau 1.3 : Propriétés chimiques des substances humiques et leurs rôles dans divers enjeux environnementaux (tiré de Porcher, 2004).

| Enjeux | Rôles des SH | Propriétés chimiques |
|------------------------------|--|---|
| Acidification des eaux | • Complexation des ions H ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ et M ^{z+} | Acides faibles (groupements carboxyliques et phénoliques) |
| • Contrôle des nutriments | Formation de complexes ternaires | Polyfonctionnels |
| Déchets radioactifs | Réactions redox | Polyélectrolytes |
| • Métaux | Transport et biodisponibilité de micronutriments (Fe, P) et des contaminants | Surfactant |
| Pesticides xénobiotiques | Adsorption de composés organiques hydrophobes Influence sur la | Domaines hydrophobes (chaînes aliphatiques et noyaux aromatiques) |
| | biodisponibilité | |
| Pénétration de la lumière | Absorption et atténuation de la lumière | • Chromophores (électrons π excitables) |

L'étude des interactions existant entre chaque molécule de MOD et les métaux est un travail laborieux. En effet, la plupart des quelques études effectuées sur le sujet sont en général de nature qualitative, la nature polyélectrolyte des substances humiques faisant en sorte que des changements de pH affectent la conformation de toute la molécule et non seulement le degré d'ionisation des groupements fonctionnels impliqués dans les réactions

de complexation. De plus, la valeur de K_M diminue au fur et à mesure que le rapport M/L augmente, ce qui signifie qu'il n'y a aucune valeur fixe ou constante pour K_{ML}. Finalement, l'interaction est difficile à évaluer puisque chaque molécule de MOD est distincte. En fait, la structure primaire est sensiblement la même d'une molécule à une autre (cf. Figure 1.4), mais il n'existe pas d'homogénéité par rapport à la structure secondaire (voir aussi Sutton et al. 2005 pour des représentations graphiques plus élaborées). Les groupements fonctionnels n'étant pas bien définis, les propriétés de complexation ne le sont pas non plus. L'incapacité à prédire correctement les interactions entre la matière organique et les divers métaux limite l'utilisation de modèles de spéciation chimique pour définir les milieux d'exposition. Il est donc difficile, voire impossible, d'utiliser des logiciels de spéciation comme MINEQL⁺ pour calculer avec confiance la spéciation d'un métal comme l'argent en présence de MOD. Les modèles plus complexes qui tiennent comptent de l'hétérogénéité et de la polyfonctionnalité tels que WHAM (Tipping, 2002) et ECOSAT (Keizer et Van Riemsdijk, 1999) demeurent peu fiables en raison de la rareté de données expérimentales permettant de les calibrer. Certaines techniques existent afin de doser les ions métalliques libres, mais celles-ci sont souvent compromises par la présence de la MOD. Ainsi, l'absence de données thermodynamiques permettant de calculer les concentrations des différentes formes chimiques de l'argent empêche l'obtention de résultats prévisibles sur ce sujet, ce qui rend l'étude de l'interaction entre le métal et la matière organique difficile.

Figure 1.4 : Structure représentative de la matière organique dissoute (MOD) naturelle, telle que proposée par Schulten et Schnitzer (1993).

1.3: Modèle de l'ion libre

Pour étudier le comportement des ions Ag⁺, il est important de connaître la chimie de coordination et sa signification pour la spéciation de l'argent en milieu aquatique, sa spéciation dépendant des autres ions présents dans les eaux. Pour expliquer l'influence de la spéciation d'un métal sur sa prise en charge par un organisme, on se réfère au Modèle de l'Ion Libre (MIL). Celui-ci a été explicitement formulé pour la première fois par Morel en 1983 et sa description a été amélioré par la suite à de nombreuses reprises, notamment par Campbell (1995), Hudson (1998) et Campbell et Couillard (2004). Il décrit et quantifie la biodisponibilité de certains métaux dans les écosystèmes aquatiques. Il prédit que la réponse d'un organisme (prise en charge, toxicité et nutrition) face à un métal trace cationique est directement proportionnelle à l'activité de l'ion libre M^{z+}. La réponse biologique engendrée par un métal dissous est ainsi fonction de la concentration de son ion métallique libre, cette dernière étant à son tour influencée par la concentration totale du

métal, la concentration et la nature des ligands présents en solution. Un effet toxique est considéré inversement proportionnel au degré de liaison avec ces ligands (Bianchini et Wood, 2002). Toutefois, le MIL limite le rôle du ligand à celui d'un simple complexant présent dans le milieu qui ne fait que diminuer la concentration de l'ion métallique (Campbell *et al.* 2002).

Le MIL, maintenant connu sous le nom de BLM (modèle du ligand biotique), est basé sur la théorie voulant que la toxicité d'un métal n'est pas seulement liée à la concentration totale de métal dans le milieu, mais à la complexation aux sites d'actions où la toxicité doit être considérée. Il tient compte des ligands biologiques (e.g.: membrane cellulaire algale, branchies de poissons...), tout comme de la compétition entre cations pour les sites de transport / d'action et des agents de complexation pouvant influencer la spéciation et la biodisponibilité du métal (Wilkinson et al. 2002). Ainsi, ce modèle veut qu'un équilibre s'établisse à la surface cellulaire, impliquant non seulement la forme libre en solution (M^{z+}), mais également sa forme complexée (ML). Dans les deux cas, la relation entre le métal et la surface cellulaire peut être représentée par une réaction de complexation de surface, donnant lieu à la formation du complexe M-X-cellule (M = métal et X-cellule = ligand cellulaire). L'étape limitante demeure le transport trans-membranaire subséquent du métal, la membrane biologique étant quasi-imperméable aux espèces chargées ou polaires. Les ions libres sont habituellement pris en charge par la cellule par une liaison avec des ligands de transport associés avec la membrane cellulaire (Sunda, 1989). La relation entre la surface de la cellule et le métal peut être décrite en fonction de la concentration du métal libre selon les équations suivantes, peu importe la forme (libre ou complexée) impliquée dans la réaction initiale de complexation avec le ligand cellulaire :

Équilibre en solution (charges omises pour simplification)

$$\mathbf{M}^{\mathbf{z}^{+}} + \mathbf{L} \xleftarrow{\mathbf{K}_{1}} \mathbf{M} \mathbf{L}$$
 1.1

$$K_{1} = \frac{\left[\begin{array}{c}ML\end{array}\right]}{\left[\begin{array}{c}M^{z+}\end{array}\right] \bullet \left[\begin{array}{c}L\end{array}\right]}$$

Réaction de surface de M^{z+} (charges omises pour simplification)

$$M^{z^+} + X$$
-cellule $\leftarrow K_2 \rightarrow M$ -X-cellule 1.3

$$\left\{ \text{ M-X-cellule } \right\} = K_2 \left\{ \text{ X-cellule } \right\} \bullet \left[\text{ M}^{z+} \right]$$
1.4

où K_1 et K_2 sont des constantes et L un ligand en solution. Ainsi, si la réponse biologique varie en fonction de la concentration du complexe {M-X-cellule} (i.e. selon le degré de saturation des sites X-cellule), et si la concentration des sites X-cellule libres demeure constante dans la gamme d'exposition (pour les faibles concentrations de métal), on peut déduire à partir de l'équation 1.4 que la réponse biologique suivra la concentration de l'ion métallique libre $[M^{z+}]$ en solution.

La concentration du complexe M-X-cellule peut aussi varier en fonction de la concentration de l'ion métallique libre en solution, si la réaction avec le ligand cellulaire s'effectue par échange de ligands (Campbell, 1995) :

Réaction de surface de ML

$$ML + X\text{-cellule} \xleftarrow{K_3} M\text{-}X\text{-cellule} + L$$
1.5

$$\frac{\left[\begin{array}{c} \mathbf{ML} \end{array}\right]}{\left[\begin{array}{c} \mathbf{L} \end{array}\right]} = \mathbf{K}_{1} \bullet \left[\begin{array}{c} \mathbf{M}^{z^{+}} \end{array}\right]$$

1.6

$$\left\{ \text{ M-X-cellule } \right\} = K_3 \frac{\left\{ \text{ X-cellule } \right\} \bullet \left[\text{ ML } \right]}{\left[\text{ L } \right]}$$

1.7

$$\left\{ \text{ M-X-cellule } \right\} = K_3 \bullet K_1 \bullet \left\{ \text{ X-cellule } \right\} \bullet \left[\text{ M}^{\text{z+}} \right]$$
1.8

En réarrangeant l'équation 1.2, on obtient l'équation 1.6 que l'on peut substituer dans l'équation 1.7 pour donner l'équation 1.8. Selon cette dernière équation, la concentration du complexe clé M-X-cellule, et donc la réponse biologique, montrent la même dépendance sur la concentration de métal libre en solution que nous avons établit dans l'équation 1.4. Donc, peu importe l'espèce qui se présente à la surface biologique, M^{Z+} ou ML, la réponse biologique sera fonction de la concentration de l'ion métallique libre, à condition que le produit de la réaction soit le complexe simple M-X-cellule. En effet, d'autres complexes peuvent être formés, en lien avec la compétition pour les sites de complexation à la surface entre le métal d'intérêt et les espèces cationiques présentes en solution (e.g.: H⁺, Ca²⁺ et Mg²⁺) (Di Toro *et al.* 2001; Slaveykova et Wilkinson, 2005). Ainsi, si nous supposons que les transporteurs de cations sont peu sélectifs, une augmentation de la concentration des ions compétiteurs se traduira par une baisse de la réponse du métal à l'étude, la probabilité que le métal forme un complexe M-X-cellule étant plus faible à cause de la formation des complexes H-X-cellule, Ca-X-cellule et Mg-X-cellule.

1.3.1 : Prémisses du modèle de l'ion libre (MIL)

À la lumière de ce qui vient d'être décrit dans les paragraphes précédents, il est possible de résumer les prémisses de base du modèle de l'ion libre, telles qu'énumérées par Campbell *et al.* en 1995 et en 2002 :

- a) La membrane plasmique constitue le site primaire de l'interaction d'un métal en solution avec un organisme aquatique.
- b) L'interaction du métal avec la membrane biologique peut être décrite par la formation d'un complexe de surface M-X-cellule.
- c) Dans la gamme de concentrations d'intérêt toxicologique du métal, la concentration des sites de liaisons libres, {'X-cellule}, doit demeurer pratiquement constante. De plus, les variations du {M-X-cellule} suivent celles de [M^{z+}] en solution (équations (1.4) et (1.8)).
- d) La propagation du métal en solution à travers la couche de diffusion (c.f. Figure 1.5) vers la paroi cellulaire et sa complexation subséquente sur la surface

biologique se produisent plus rapidement que sa prise en charge par l'organisme aquatique. Ainsi, un pseudo-équilibre s'établit entre l'ion métallique en solution et la surface biologique.

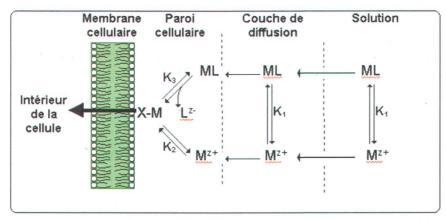


Figure 1.5 : Représentation conceptuelle des interactions métaux-organismes où M^{z^+} = ion libre, ML = métal complexé, L^{z^-} = ligand et M-X = métal complexé à la surface (tirée de Boily, 2004).

- e) La réponse biologique, qui peut être définie comme étant la prise en charge, la micro-nutrition ou la toxicité, est proportionnelle à la concentration du complexe de surface {M-X-cellule}.
- f) Durant l'exposition de l'organisme au métal d'intérêt, la nature de la surface biologique doit demeurer constante.

1.3.2 : Ag-MOD et MIL

Si on applique ce modèle au projet en cours, la prise en charge de l'argent par l'algue serait proportionnelle à la concentration en argent libre Ag^+ , que ce soit en absence ou en présence de complexes organiques tels que ceux avec la matière organique dissoute. Une baisse de la concentration en ion libre, engendrée par une complexation de l'argent par le ligand en présence, résulterait donc en une diminution de la réponse (prise en charge, toxicité) de l'organisme face à ce métal. De ce fait, pour des milieux avec ou sans ligand, où des concentrations semblables de métal libre $[M_z^+]$ sont comparées, la réponse biologique devrait être identique dans les deux cas. Cependant, certaines études suggèrent que la présence de MOD dans le milieu ait un effet sur la membrane cellulaire (Porcher,

2004). Ainsi, le MIL ne peut être appliqué de façon universelle à toutes les conditions présentes dans les eaux douces naturelles. Cette étude vérifiera si le système Ag-MOD est une exception au MIL.

1.4: Description des tests de toxicité normés

La toxicité d'un métal peut être évaluée sur différents types d'organismes, que ce soit sur l'algue verte Pseudokirchneriella subcapitata, sur la daphnie Daphnia magna ou sur l'espèce ichtyenne Oncorhynchus mykiss. Les algues vertes unicellulaires sont particulièrement utilisées étant donné leur petite taille, leur court temps de reproduction et leur grande sensibilité face aux divers polluants. L'algue d'eau douce Pseudokirchneriella subcapitata (aka Selenastrum capricornutum) est une espèce phytoplanctonique favorisée lors des tests de toxicité puisqu'elle s'est avérée très sensible face à divers éléments toxiques présents dans l'environnement (USEPA, 2002). Le United States Environmental Protection Agency (USEPA) a d'ailleurs développé un protocole l'utilisant lors de l'évaluation des différents effets des polluants inorganiques sur les algues. Il consiste en un test de type statique, ce qui signifie que des cultures en lot sont effectuées. L'organisme cible est alors exposé à différentes concentrations de métal et sa croissance est comparée à celle d'un témoin non contaminé. La densité cellulaire et la croissance algale sont mesurées tout au long de ce test, qui peut durer de quelques heures à plusieurs jours (durée typique de 96 h). Ces deux paramètres sont reconnus pour refléter de façon représentative l'action d'un polluant sur les algues unicellulaires. Les résultats de toxicité sont présentés par le paramètre CE50, qui représente la concentration de métal nécessaire pour engendrer un effet de 50 % sur la population. Ce protocole a par la suite été repris et optimisé par le gouvernement du Québec, via le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ, 2003).

Afin de maintenir stable les concentrations d'oligo-éléments en solution (e.g. : Fe, Cu, Co, Zn...), les milieux de cultures contiennent habituellement un ligand fort qui complexe les métaux. Par le fait même, le métal d'intérêt sera également complexé et sa concentration libre en solution sera relativement stable. Le ligand le plus utilisé est

l'EDTA (acide éthylènediamine-tétraacétique). Ce dernier a une forte affinité pour plusieurs métaux, notamment le fer et le cadmium. Ainsi, lorsque la concentration en métal libre ([M^{z+}]) dans le milieu diminue à cause de la prise en charge de ce métal par les algues, l'EDTA libère ce métal par dissociation du complexe M-EDTA, ce qui fait en sorte que la concentration en M^{z+} libre demeure relativement stable tout au long de l'expérimentation. De plus, ce ligand, de même que ses complexes métalliques, ne sont pas assimilés par les algues, ce qui simplifie de beaucoup l'interprétation des résultats expérimentaux (Huebert et Shay, 1992; Twiss *et al.* 2001).

Malheureusement, cette approche n'est pas parfaite et les résultats obtenus montrent quelques signes de faiblesses. En effet, les densités algales initiales utilisées lors de ces tests varient habituellement entre 10⁴ et 10⁵ cellules/mL, ce qui est considéré être un compromis entre l'obtention de la sensibilité optimale lors du bio-essai et l'utilisation d'une densité cellulaire suffisante pour être détectée par les compteurs de particules conventionnels (Stauber, 1995). Cette densité est cependant nettement plus élevée que celle retrouvée dans les écosystèmes aquatiques, cette dernière variant entre 100 et 1000 cellules/mL dans les lacs oligotrophes (Franklin *et al.* 2002). Cette forte densité a donc comme conséquence que les résultats obtenus lors de ces tests ne sont pas représentatifs de ce qui se passe réellement dans la nature. De plus, la présence en grande quantité de ces algues rend difficile le maintien d'une concentration stable de la substance toxique dans le milieu d'exposition, les algues ayant la capacité de modifier leur milieu par l'absorption et l'adsorption du métal, et par le relâchement de déchets métaboliques servant de ligands potentiels au métal en solution. Ainsi, certaines conditions utilisées lors de ces tests risquent d'avoir une forte influence sur le calcul de la CE50.

1.4.1 : Problèmes reliés à l'étude de l'argent en laboratoire

Un des principaux problèmes liés à l'étude écotoxicologique de l'argent est qu'il est très toxique et qu'aux concentrations nécessairement faibles employées dans les tests de toxicité, il ne reste que très peu longtemps dans le milieu à l'étude. En effet, l'absorption par les algues est très rapide et aucun ligand non métabolisable (comme l'EDTA utilisé

dans les tests normés) ne permet de maintenir la concentration d'argent stable dans le milieu d'exposition. De plus, plusieurs études laissent croire qu'une densité algale élevée, telle que celles utilisées dans les tests normés, provoquerait une exsudation importante, c'est-à-dire un relâchement de déchets métaboliques pouvant potentiellement servir de ligands au métal en solution (Vasconcelos et Leal, 2001; Vasconcelos et al. 2002). Ce phénomène contribuerait à modifier la spéciation chimique du métal, ce qui signifie du même coup sa biodisponibilité et la réponse de l'organisme face à ce métal. Tous ces problèmes réunis font en sorte qu'on s'attend à ce que l'argent soit presque épuisé du milieu d'exposition sur une période de quelques heures. Ceci signifie donc que les conditions d'exposition imposées au début de l'expérimentation ne sont plus les mêmes à la fin du temps d'exposition et qu'il est difficile d'évaluer la toxicité du métal pour une concentration donnée si cette dernière varie en fonction du temps. Les tests statiques risquent de sous-estimer donc la toxicité exercée par un métal chez le phytoplancton, ce qui nous pousse à se tourner vers des méthodes alternatives.

1.4.2 : Moyens envisagés pour contrer ces problèmes

Le système de culture en lot est utilisé dans la majorité des études toxicologiques où les algues sont impliquées. Cependant, comme il a été mentionné précédemment, plusieurs problèmes peuvent survenir lors de son utilisation lorsqu'il est question de l'argent. Ainsi, pour arriver à améliorer l'évaluation de la toxicité de ce métal, plusieurs moyens alternatifs peuvent être utilisés. Ces moyens ont tous pour but de contrer les pertes de métal générés par la présence élevée d'algues.

1.4.2.1: Cultures en continu

Une des méthodes alternatives aux cultures en lot consiste à effectuer des études en continu où un renouvellement de milieu s'opère régulièrement. Il en existe deux types. Le premier d'entre eux est le chemostat. Il s'agit d'un appareil dans lequel le milieu de culture est renouvelé continuellement. Dans ce cas-ci, la densité cellulaire dépend du taux de dilution choisi et de la composition du milieu de culture (Hall *et al.* 1989). Le second type de culture en continu, le turbidostat, consiste à mesurer la densité optique dans le récipient

contenant les algues, qui correspond à une densité algale donnée (Bennett, 1988; Bennett, 1990; Clarkson *et al.* 1998; Hiriart-Baer *et al.* 2006). Lorsque la densité algale dépasse un seuil sélectionné, le milieu est renouvelé, ce qui permet de maintenir la densité algale constante dans le temps.

Ces deux techniques ont pour avantages d'assurer un renouvellement du milieu d'exposition et donc de minimiser les fluctuations dans sa composition chimique. Les quelques résultats connus quant à ces procédés démontrent une plus grande sensibilité des algues en culture en continu qu'en culture en lot. En effet, Hall *et al.* (1989) ont observé une sensibilité au cuivre dissous 10 000 fois plus importante chez *Chlorella* en chemostat qu'en culture en lot.

Malgré les nombreux avantages des cultures en continu, ces dernières connaissent également certaines limitations, que ce soit au niveau de la préparation du matériel, l'axénicité des cultures, des volumes de milieux de cultures nécessaires et du coût de l'équipement relié à l'achat et à l'entretien de l'appareil.

1.4.2.2 : Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode rapide de la mesure de la dispersion de la lumière et des propriétés fluorescentes de particules en suspension. Il s'agit d'un appareil très sensible, qui détecte de façon précise et reproductible de faibles quantités de particules. Ceci a donc pour avantage de permettre l'utilisation de petits inoculums et d'énumérer précisément de faibles densités cellulaires. Cette grande sensibilité permet de minimiser : i) la surface d'algues exposées et ainsi diminuer les pertes de métal par adsorption / absorption ; et ii) la concentration de ligands organiques (exsudats) pouvant fortement complexer les métaux en solution, ce qui contribuerait à modifier leur spéciation chimique et leur biodisponibilité. Cet appareil est grandement utilisé dans divers domaines scientifiques, mais son emploi comme outil en écotoxicologie n'est apparu il n'y a que quelques années.

Cette approche a été utilisée avec succès pour évaluer l'influence de la densité initiale sur la toxicité du cuivre chez l'espèce phytoplanctonique algale Pseudokirchneriella subcapitata (Franklin et al. 2002). Pour y arriver, ces auteurs ont exposé différentes densités algales de départ (gamme variant entre 10² et 10⁵ cellules/mL) à des concentrations croissantes de cuivre. Ils ont ensuite mesuré les effets de ce métal sur la croissance de l'algue, à la suite de décomptes cellulaires effectués à l'aide d'un cytomètre. Franklin et al. (2002) ont ainsi observé une corrélation entre la densité algale et la toxicité, une augmentation de la densité initiale d'algues signifiant une baisse apparente de la toxicité. En effet, la CE50 chez cette espèce passe de 7 à 17 µg/L de Cu lorsque la densité initiale augmente de 10^2 à 10^5 cellules/mL. Aucune différence significative n'a cependant été observée pour les densités les plus faibles (100 et 1000 cellules/mL). Cette différence de toxicité observée avec une augmentation de la densité cellulaire a été attribuée à la perte de métal significative survenant dans les milieux à de fortes densités algales, de même qu'au relâchement d'exsudats plus important dans ces circonstances. Ces résultats confirment ainsi le potentiel de la cytométrie comme outil permettant d'améliorer les tests normés existants.

1.5: Accumulation et toxicité de l'argent

L'argent est considéré comme étant l'un des métaux traces les plus toxiques pour les organismes aquatiques (Ratte, 1999). D'ailleurs, sa grande toxicité résulte de son affinité élevée pour les groupements sulfurés S(II) contenus dans les enzymes et les protéines (Luoma *et al.* 2002). De nombreux cas d'accumulation de ce métal ont déjà été observés chez diverses espèces, tout au long de la chaîne trophique.

1.5.1: Chez les invertébrés aquatiques

Aucun phénomène de biomagnification n'a été observé dans le cas de l'argent le long de la chaîne trophique. D'ailleurs, chez *Daphnia magna*, un invertébré très sensible à la présence de ce contaminant, le pourcentage d'argent accumulé par l'organisme à la suite d'une contamination par l'eau pendant 72 h ([Ag]_{tot} = 200 ng/L) varie de 10 à 17 % alors

qu'il n'est que de 4 à 5 % lors d'une contamination provenant de la nourriture ([Ag]_{tot} = 50 ng/L) (Lam et Wang, 2006). Les invertébrés aquatiques sont davantage exposés à ce contaminant que le sont les espèces unicellulaires, principalement à cause de l'apport de l'argent particulaire, de l'argent associé aux proies, en plus de celui des sédiments. En effet, puisque l'argent s'adsorbe en grande majorité aux particules composant les sédiments, et que chez les invertébrés, la toxicité est reliée à l'espèce et à la façon d'entrer du métal dans l'organisme (via l'eau, la diète ou les sédiments), les individus étant en contact perpétuel avec l'élément toxique accumulé dans les sédiments sont davantage sensibles que les autres organismes (Hook et Fisher, 2001).

Plusieurs effets néfastes ont été observés chez le zooplancton à la suite d'une contamination à l'argent. Bianchini et Wood (2002) ont remarqué chez la daphnie une légère baisse du taux de reproduction à la suite d'une exposition chronique à l'argent ([Ag] = 46 ± 0,4 nM) sur une période de 21 jours. Cette contamination provenait à la fois de l'eau et de la nourriture. Ainsi, 14 % moins de néonates par adulte ont été produits. Cette baisse dans la capacité de reproduction a aussi été relatée chez diverses espèces de copépodes et de cladocères (Hook et Fisher, 2001), de même que chez des bivalves (Hornberger et al. 1999). Bianchini et Wood (2002) mentionnent également une importante perturbation dans les mécanismes d'ionorégulation, se traduisant par une baisse de sodium (Na^{+}) dans tout le corps de 65 % à la suite d'une contamination à 46 ± 1 nM d'Ag pendant 21 jours. Ce manque de sodium peut entraîner de nombreux problèmes de santé, et éventuellement, la mort. En présence de substances humiques, ces effets néfastes sont atténués, la matière organique dissoute restaurant la prise en charge du sodium ainsi que le taux de reproduction pour les ramener à leur point de départ, soit celui du témoin (Glover et Wood, 2004). Cette présence diminue également l'accumulation de métal à l'intérieur de la daphnie, celle-ci étant quantifiée à 0,09 ng/animal en présence de MOD versus 0,34 ng/animal en absence de ce ligand pour une concentration d'exposition en argent de 5 nM pendant 24 h. Par ailleurs, Bury et al. (2002) ont observé chez Daphnia magna que la présence de 10 mg/L d'acide humique augmentait d'un facteur six la valeur des LC50_{48h}, principalement à cause de la complexation de l'argent avec des sites de haute affinité de la matière organique dissoute. Cet effet protecteur a également été observé chez des espèces

d'invertébrés plus sensibles, telles que la moule zébrée (Roditi et al. 2000; Zimmermann et al. 2002) et l'huître (Guo et al. 2001).

1.5.2: Chez les poissons

Les mêmes problèmes d'ordres physiologiques et comportementaux que chez les invertébrés aquatiques ont été observés chez les poissons exposés à une source quelconque d'argent. En outre, des difficultés d'ionorégulation ont été détectées chez diverses espèces de poissons adultes. Ce disfonctionnement physiologique serait imputable à la liaison entre l'ion libre Ag+ et l'épithélium branchial (Morgan et al. 1997; McGeer et Wood, 1998; Bury et al. 1999). Ainsi, Ag⁺ inhiberait l'activité enzymatique de la protéine de transport Na⁺-K⁺-ATPase, en empêchant l'entrée des ions Na⁺ et Cl⁻ à l'intérieur des cellules. Ce faisant, la concentration de ces deux éléments dans le plasma déclinerait, entraînant une acidification du sang, une hausse de la concentration d'ammoniaque, une perturbation du volume des fluides et une hémoconcentration pouvant conduire à un arrêt cardiaque et à la mort (Wood et al. 1996; Hogstrand et Wood, 1998; Webb et Wood, 1998). Une baisse du taux de reproduction a également été observée chez diverses espèces de la faune ichthyenne. Celle-ci s'expliquerait par une éclosion prématurée des œufs, ce qui rendrait les alevins plus enclin aux cas d'embryotoxicité. C'est ce que Davies et al. (1978) ont conclut après avoir observé des œufs de truites arc-en-ciel, conservés dans un milieu dont la concentration en argent atteignait 1,6 nM. Ces problèmes de santé ne surviennent cependant pas chez toutes les espèces, la truite arc-en-ciel (Oncorhynchus mykiss) ne ressentant aucun effet à la suite d'une contamination journalière de sa nourriture à différentes concentrations de métal (Galvez et al. 2001). Par contre, en présence de MOD, la situation est légèrement différente. L'effet engendré par l'ajout de cette substance sur la survie des organismes composant la faune ichthyenne varierait dépendant de l'espèce utilisée et des conditions expérimentales. Ainsi, la MOD aurait normalement un effet protecteur en diminuant la toxicité des métaux, alors que dans quelques expériences on a pu démontrer que la MOD accentuait la toxicité ressentie par l'organisme. De plus, lorsque les tests sont réalisés avec de l'eau salée, la toxicité ressentie par les poissons est très faible, principalement à cause de la forte complexation avec les chlorures et les groupements fonctionnels de la MOD, ce qui rend l'ion Ag⁺ très peu disponible (Nichols *et al.* 2006). De ce fait, de façon générale, la présence de ce ligand engendre un effet protecteur dans la majorité des cas (Rose-Janes et Playle, 2000; Brauner et Wood, 2002; Nichols *et al.* 2006).

1.5.3 : Chez les animaux d'ordres supérieurs

Chez les mammifères, peu de données existent sur l'absorption, la répartition et le devenir de l'argent ingéré par ces animaux. Cependant, celles qui existent montrent que presque tout le métal ingéré est rapidement excrété et que très peu est absorbé. Aucun phénomène de bioamplification n'est observé le long de la chaîne alimentaire. Des accumulations d'argent ont néanmoins été rapportées chez la souris dans les régions musculaires, dorsales et cérébrales à la suite d'une ingestion de métal via l'eau consommée (Pelkonen *et al.* 2003). Des effets sur le fonctionnement des reins, des problèmes intestinaux, des nécroses cardiaques et des baisses de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase dans le sang ont également été observés (Van Vleet et Ferrans, 1992; Kalachniuk *et al.* 1994). Cependant, dans tous ces cas, les concentrations utilisées n'ont pas été mentionnées, ce qui peut signifier qu'elles ne sont pas représentatives de celles retrouvées dans la nature.

Chez l'humain, l'unique conséquence connue découlant d'une exposition prolongée à l'argent ou à l'un de ses composés est l'argyrie, une maladie provoquant une pigmentation grisâtre de la peau, des muqueuses et des yeux. La décoloration des tissus résulte de l'accumulation du métal à l'intérieur de ceux-ci. L'ion Ag⁺ y précipite sous forme de chlorure (AgCl) qui, une fois soumis aux rayons ultraviolets, entame un processus de photoréduction. L'argent métallique est par la suite formé et sa réaction rapide avec des espèces sulfurées génère un composé noir, le sulfure d'argent (Ag₂S) (Eisler, 1996). Bien que non-létale, l'argyrie entraîne des conséquences esthétiques importantes et irréversibles. Cette maladie a été observée à la suite d'exposition supérieure à 1 g/L (selon Gault et Staund, 1935 ainsi que Hill et Pillsbury, 1939 dans Purcell et Peters,

1998). Aucune indication de l'effet cancérogène, mutagène ou tératogène n'a été relevée jusqu'ici.

1.5.4: Chez le phytoplancton

Jusqu'à ce jour, la toxicité de l'argent envers les algues unicellulaires a été très peu étudiée, si l'on compare avec d'autres métaux tels que le cadmium ou le cuivre. Les quelques études recensées font pour la plupart état des valeurs de CE50 évaluées chez des espèces phytoplanctoniques en milieu marin, ce qui signifie une teneur en ions chlorures très importante. Ainsi, le métal se complexe avec ces ions, ce qui modifie la biodisponibilité de l'Ag⁺ et expliquerait que les valeurs de CE50 soient plutôt élevées, puisqu'elles sont exprimées en [Ag] dissous ou [Ag] nominal et non pas en [Ag⁺] (cf. Tableau 1.4).

Tableau 1.4 : Toxicité de l'argent chez diverses espèces phytoplanctoniques. Adapté de Lee et al. (2005).

| Espèce algale | CE50 (nM) | Références |
|--|-------------|--------------------------------|
| | | |
| Scenedesmus acuminatus ¹ | 70 | Stokes (1981) |
| Scenedesmus acutiformis ¹ | 190 | Stokes (1981) |
| Haematococcus capensis¹ | 930 | Hutchinson (1973) |
| Nostoc muscorum ¹ | 26 | Rai et Raizada (1985) |
| Pseudokirchneriella subcapitata ¹ | 59 | Turbak <i>et al.</i> (1986) |
| Pseudokirchneriella subcapitata ¹ | 24 | USEPA, 1987 |
| Pseudokirchneriella subcapitata ¹ | 26 | Lee et al. (2005) |
| Pseudokirchneriella subcapitata ¹ | 22 | Hiriart-Baer et al. (2006) |
| Chlamydomonas reinhardtii ^l | 12 | Lee et al. (2005) |
| Chlamydomonas reinhardtii ¹ | 26 | Fortin (2000) |
| Dunaliella tertiolecta ² | 25 100 | Fisher <i>et al.</i> (1984) |
| Emiliana huxleyi ² | 316 | Fisher <i>et al.</i> (1984) |
| Oscillatoria woronichinii² | 79 | Fisher <i>et al.</i> (1984) |
| Thalassiosira pseudonana ² | 1260 | Fisher <i>et al.</i> (1984) |
| Ditylum brightwellii ² | > 550 | Canterford et Canterford (1980 |
| Skeletonema costatum² | 1200 - 1600 | USEPA, 1987 |
| | | |
| | | |

Espèce d'eau douce

2: Espèce d'eau salée

1:

L'organisme gouvernemental américain chargé de l'environnement, le USEPA, a néanmoins évalué la toxicité de l'argent chez l'algue verte d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* à la suite d'une exposition à l'argent sur une période de 96 h (USEPA, 1987). Les chercheurs chargés de ce projet devaient déterminer les concentrations d'argent nécessaires pour inhiber la croissance de chaque culture de 50 %, selon l'évolution temporelle de la chlorophylle a. La CE50s obtenue était de 24 nM. De plus, des études réalisées par Sanders et Cibik (1988), de même que par Sanders et al. (1990), ont démontré que la composition et la reproduction de certaines espèces phytoplanctoniques retrouvées dans la baie de Chesapeake étaient significativement affectées lorsque cette communauté était soumise sur une longue période à une concentration d'argent de 2,8-5,6 nM. À une teneur dix fois plus élevée et un temps d'exposition de 3 à 4 semaines, l'espèce *Anacystis marina*, une algue bleu-vert, a disparu complètement au profit de la diatomée *Skeletonema costatum*.

Malgré le peu d'informations tirées de la littérature existante sur la toxicité de l'argent seul, un fait important revient dans chaque publication, soit que la toxicité est influencée par plusieurs facteurs, comme l'espèce utilisée, le temps d'exposition, ainsi que les conditions d'exposition (Fortin, 2000). Les principaux paramètres qui influencent les résultats obtenus avec l'argent sont les ligands présents en solution, soient ceux ayant une forte affinité pour ce métal, comme c'est le cas des chlorures et du thiosulphate. Ainsi, en présence de chlorure, la prise en charge de l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii exposée sur de courtes périodes à une concentration de 8 nM d'Ag⁺ est supérieure d'un facteur 4 selon la concentration de chlorure présente (Fortin et Campbell, 2000). Cette augmentation a été attribuée à une prise en charge très rapide de l'argent par Chlamydomonas reinhardtii, ce qui a pour effet de diminuer la concentration présente dans la couche limite entourant la cellule algale. La vitesse de prise en charge de l'argent est alors limitée par la vitesse de diffusion du métal et de la solution d'exposition jusqu'à la surface algale. L'effet engendré par la diffusion n'est présent qu'aux concentrations égales ou inférieures à 10⁻⁷ M (Fortin et Campbell, 2000) et devient négligeable lorsque l'on teste d'autres espèces algales assimilant l'argent plus lentement et ne créant pas de limitation diffusive (Lee et al. 2004). Lee et al. (2005) ont également étudié la toxicité de l'argent à

la suite d'une exposition de 6 h des algues vertes *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlamydomonas reinhardtii* à des concentrations croissantes de ce métal en présence de chlorures. Dans cette étude, la toxicité était atténuée chez les deux espèces lorsque les ions Cl' étaient présents. Par exemple, pour une exposition de *Chlamydomonas reinhardtii* à 20 nM d'argent dissous, la croissance relative de cette espèce était de 20 % en absence de chlorures, alors qu'elle était d'environ 70 % en leur présence. Pour une exposition à la même concentration d'argent dissous chez *Pseudokirchneriella subcapitata*, la croissance relative représentait près de 65 % en leur absence alors qu'elle était de 85 % en leur présence. Ce résultat s'explique par la complexation de l'argent dans le milieu, ce qui rend ce métal moins disponible pour l'espèce à l'étude.

La présence de l'anion thiosulfate (S₂O₃²-) dans un milieu d'exposition contenant de l'argent peut également influencer sa toxicité et sa prise en charge par l'organisme phytoplanctonique. Ceci a d'ailleurs été étudié par Fortin et Campbell (2001) lors d'une expérience semblable à celle réalisée par ces mêmes auteurs en présence de chlorure (Fortin et Campbell, 2000). La concentration d'argent libre testée était de 10 nM, tandis que celle de thiosulfate était de 0,11 µM. Les résultats ont montré que dans ce cas-ci, la prise en charge était deux fois plus élevée que pour celle obtenue avec la plus importante concentration de chlorure (4 mM). De plus, si l'ion sulfate était retiré du milieu d'exposition, cette augmentation passait à un facteur d'environ quatre par rapport au milieu avec chlorure. Les auteurs ont conclu que le complexe Ag-thiosulfate était transporté à travers la membrane algale et que le sulfate agissait comme un inhibiteur de ce transport. Ce résultat s'avère concluant si on regarde les expériences de toxicité réalisées par Hiriart-Baer et al. (2006), toujours chez Pseudokirchneriella subcapitata et Chlamydomonas reinhardtii. Ces auteurs ont exposé graduellement ces deux espèces d'algues à des concentrations d'argent et de thiosulfate dans un turbidostat et ont remarqué que la toxicité augmentait avec une augmentation de ces deux ions. Ceci confirme l'effet amplificateur qu'exerce le thiosulfate sur l'accumulation et la toxicité de l'argent.

Étant donné la forte affinité de l'argent pour la matière organique, cette substance peut également influencer la réponse d'un organisme face à ce métal. Il existe quelques études quantitatives qui ont été réalisées sur des systèmes algues-métaux-MOD, mais les conclusions ne montrent pas de consensus à propos de l'effet de la MOD sur la réponse biologique. Les résultats obtenus précédemment sur la prise en charge de l'argent en présence de MOD sur une courte période indiquent que pour une concentration d'argent libre donnée, *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlamydomonas reinhardtii* accumulaient plus d'argent en présence de MOD par rapport à un milieu inorganique sans MOD (Porcher. 2004). Cet auteur a considéré trois explications possibles pour ce résultat, soient : i) des complexes Ag-AH s'adsorbent à la surface algale, contribuant ainsi à la prise en charge mesurée; ii) la méthode de dosage de l'argent libre en présence de SRHA (*Suwannee River Humic Acid*) sous-estime la [Ag⁺] réelle ; et/ou iii) des interactions se produisent entre la SRHA et la cellule algale (membrane cellulaire), menant à une plus grande perméabilité de la membrane algale. Selon une revue de littérature, les travaux menés par Porcher (2004) seraient les premiers évaluant la biodisponibilité de l'argent en présence de MOD réalisés sur des algues d'eaux douces.

Cependant, d'autres études ont été menées pour quantifier l'effet de la MOD sur le phytoplancton en présence de certains métaux. Ainsi, Parent *et al.* (1996) ont démontré que la croissance de l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* n'était pas affectée lorsque celle-ci était exposée à 6 µM de l'ion libre Al³⁺ avec 5,5 mg C/L de matière organique sous forme d'acide fulvique, alors qu'en absence de ce ligand, la croissance algale était inhibée de 71 %. De plus, ces auteurs ont noté que la présence d'AF protégeait la membrane cellulaire, sa perméabilité membranaire à la suite de l'ajout d'Al³⁺ n'étant pas affectée en présence d'AF, alors qu'une diminution de la perméabilité vis-à-vis du sorbitol était observée en absence d'AF.

L'effet protecteur de la matière organique a également été observé dans quelques études avec le cadmium. En effet, dans le cas de ce métal, Lum (1987) a rapporté que dans le fleuve St-Laurent, entre 31 et 44 % du cadmium était complexé avec des ligands en présence. Xue et Sigg (1998) ont pour leur part déterminé que dans un lac Suisse eutrophe, la presque totalité du cadmium total dissous (0,03 à 0,09 nM) était complexée à la matière organique naturelle, soit moins de 4 % sous sa forme libre ([Cd²⁺] = 0,7 à 3,5 pM). Ces

auteurs ont également fait des mesures en rivières, où seulement ~ 9 % du cadmium dissous était sous forme libre. Sachant que le modèle de l'ion libre (MIL) prédit que la prise en charge d'un métal sera proportionnelle à la concentration d'ion libre disponible, si [Cd²⁺] est inférieure en présence de MOD, la prise en charge par l'organisme phytoplanctonique le sera tout autant. Cette prédiction a été vérifiée en laboratoire par Vigneault et Campbell (2005). Ces derniers ont exposé sur de courtes périodes (t < 60 min) les algues vertes Chlamydomonas reinhardtii et Pseudokirchneriella subcapitata à différentes concentrations de cadmium libre en présence d'AH et d'AF de la rivière Suwannee, pour en comparer les taux de prise en charge en absence et en présence de ligands. Ces résultats ont montré que, pour chaque espèce algale utilisée et pour une même concentration de Cd²⁺ dans les deux conditions expérimentales testées, la présence de ligand n'avait aucune influence sur la prise en charge. Ainsi, pour une même [Cd2+], le taux de prise en charge est identique pour les milieux avec de l'AH ou de l'AF de la rivière Suwannee. Cette étude est donc en accord avec les prédictions du MIL, qui suppose que la MOD dans le milieu ne fait que complexer le métal présent et n'interfère aucunement avec la cellule algale.

1.6: Objectifs

La contamination des milieux aquatiques par l'argent peut entraîner des conséquences tout au long de la chaîne trophique, les premiers organismes à être touchés étant les consommateurs primaires, c'est-à-dire les algues qui composent le phytoplancton. Ces organismes constituant la base du réseau alimentaire, ils représentent un maillon essentiel à la survie des espèces des niveaux trophiques supérieurs. Ainsi, si un effondrement de leur population survient, les populations des niveaux supérieurs en subiront également les conséquences, principalement à cause de la baisse de la disponibilité de nourriture engendrée par cet affaissement. Ceci créera alors un effet nommé « bottom-up ». L'argent ayant un pouvoir toxique assez élevé, l'étude des effets de ce métal sur les organismes phytoplanctoniques est donc importante pour démystifier les conséquences que peuvent entraîner ce pouvoir toxique sur les écosystèmes aquatiques.

Le but principal de ce projet est d'évaluer de façon la plus représentative possible les effets de l'argent sur le phytoplancton, que ce soit en absence ou en présence de matière organique dissoute. L'argent étant un métal particulièrement difficile à étudier à cause de sa forte capacité à s'adsorber aux particules retrouvées en solution, le protocole habituellement utilisé pour évaluer la toxicité et la prise en charge d'un métal a été modifié afin d'utiliser des inoculums cellulaires de densité inférieure. En démarrant avec une population faible et en diminuant le temps d'exposition, nous croyons qu'il est possible de minimiser l'exsudation de ligands pouvant modifier la spéciation de l'argent, donc sa biodisponibilité, ainsi que les pertes par prise en charge et par adsorption. Un suivi de la quantité de métal absorbé et de la croissance cellulaire sera donc fait sur une période maximale de 96 h, un temps plus court pouvant minimiser davantage la présence d'exsudats. Dans ces circonstances, nous croyons que la toxicité ressentie et la prise en charge seront plus élevées, le métal étant plus disponible pour l'organisme. Ceci donnerait de plus des résultats de toxicité plus près de la réalité. Cette méthode sera d'abord validée à l'aide du cadmium, un métal dont la toxicité est très étudiée, ce qui fait en sorte qu'il sera plus facile de comparer nos résultats avec ceux déjà publiés. Elle sera par la suite reprise avec l'argent.

Les objectifs qui découlent de ce projet sont donc :

- a) Élaborer un nouveau protocole permettant d'effectuer des tests de toxicité à faible densité cellulaire.
- b) Déterminer l'accumulation et la toxicité de l'argent en absence et en présence de MOD chez l'espèce phytoplanctonique Pseudokirchneriella subcapitata.
- c) Comparer les résultats obtenus et déterminer les causes des différences, si tel est le cas.
- d) Explorer les mécanismes pouvant régir l'absorption de l'argent en présence de MOD.

Cette étude permettra d'améliorer les connaissances en ce qui concerne la toxicité et l'absorption de l'argent en présence de matière organique, et ce, de manière quantitative.

Puisque les résultats des recherches antérieures sont souvent incomplets à cause d'un manque d'information sur la spéciation du métal, ceci contribuera à combler une grande lacune dans le domaine de l'écotoxicologie. Ainsi, les résultats obtenus lors de cette étude permettront d'évaluer le risque écotoxicologique que représente l'argent dans l'environnement, ce qui fournira une approche scientifique plus exacte et plus facile à utiliser pour développer les critères de la qualité de l'eau. L'exactitude accrue des résultats se traduira par une amélioration des normes de qualité de l'eau et de la réglementation des métaux dans l'environnement.

2.0: Matériel et Méthode

2.1: Espèce d'algue choisie

L'espèce sélectionnée était *Pseudokirchneriella subcapitata*, anciennement connue sous le nom de *Selenastrum capricornutum*. Notre choix s'est porté vers cette algue étant donné sa grande utilisation dans de nombreux laboratoires, ce qui permet de comparer plus facilement les résultats obtenus. Cette espèce provenait de la collection de l'Université de Toronto (*University of Toronto Culture Collection*; UTCC37).

Pseudokirchneriella subcapitata est une algue verte unicellulaire en forme de demilune. Elle a un diamètre moyen d'environ 4 μm. Sa courbe de croissance (cf. Figure 2.1) est caractérisée par une courte phase de latence (I) dont la durée varie entre 1 et 36 h. Celle-ci est suivie par une phase de croissance exponentielle (II) durant entre 48 et 72 h. Le tout se termine par une phase stationnaire (III), qui se produit lors d'un manque de certains éléments nutritifs essentiels et/ou une baisse de luminosité entraînée par une densité cellulaire trop élevée. Lors de cette dernière phase, les cellules sont toujours viables, mais la division est grandement atténuée. La mort cellulaire se produit par la suite.

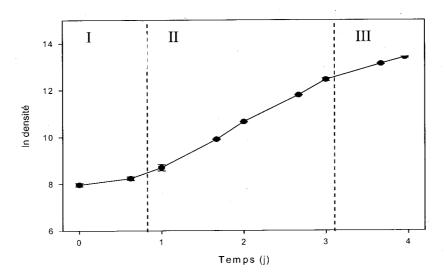


Figure 2.1 : Courbe de croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata* en fonction du temps en jours.

Les algues étaient cultivées en lots de façon axénique dans des erlenmeyers de verre de 250 mL contenant 100 mL de milieu de culture. Elles étaient placées à l'intérieur d'une chambre à environnement contrôlé (Conviron, CMP4030) où la température était de 20,0 ± 0,1°C et la luminosité de 100 ± 10 μE (= μmol/m²/s). Les récipients reposaient sur une plaque agitatrice qui oscillait à une vitesse de 60 rotations par minutes, empêchant ainsi la sédimentation des cellules au fond de l'erlenmeyer. Afin de s'assurer de la survie et du bon état physiologique de ces cultures, un transfert d'environ 2 mL d'algues dans 100 mL de milieu de culture frais et stérile était exécuté une fois par semaine. Après 14 repiquages, les cultures étaient jetées et de nouvelles étaient inoculées à partir de la souche UTCC37. Les différentes cultures étaient utilisées au début de la phase exponentielle, soit deux jours après le repiquage de la culture. L'absence de contamination bactérienne était vérifiée périodiquement par placage sur agar (*Difco-Bacto Agar*).

2.2 : Milieu de culture et autres solutions utilisées

Le milieu nutritif utilisé pour la croissance algale était le milieu MHSM-1 (MHSM: Modified high salt medium). Ce dernier correspond à celui utilisé par Fortin lors de tests réalisés avec l'argent (thèse de doctorat, 2000). Il a été favorisé afin d'assurer une continuité avec les travaux précédemment réalisés dans nos laboratoires et portant sur l'argent. De plus, il contient une très faible quantité de chlorure (6 µM, cf. Tableau 2.1), ce qui est idéal pour les expériences avec l'argent, la spéciation de ce métal étant sensible à cet anion.

Tableau 2.1 : Concentrations molaires des cations et des anions composant le milieu de culture MHSM-1.

| Ions | Concentration présente dans le milieu MHSM-1 ^a (M) | |
|---|---|--|
| NH ₄ ⁺ CI K ⁺ PO ₄ ³⁻ CO ₃ ²⁻ NO ₃ ²⁻ SO ₄ ²⁻ Mg ²⁺ Ca ²⁺ Na + BO ₃ ²⁻ Mn ²⁺ EDTA Fe ³⁺ MoO ₄ ²⁻ Zn ²⁺ Co ²⁺ Co ²⁺ Cu ²⁺ | 9,37 x 10 ⁻⁴ 5,98 x 10 ⁻⁶ 4,22 x 10 ⁻³ 1,37 x 10 ⁻⁴ Atm. b 5,07 x 10 ⁻³ 8,12 x 10 ⁻⁵ 8,12 x 10 ⁻⁵ 6,80 x 10 ⁻⁵ 1,02 x 10 ⁻⁴ 3,01 x 10 ⁻⁶ 2,10 x 10 ⁻⁶ 2,10 x 10 ⁻⁷ 5,92 x 10 ⁻⁷ 3,00 x 10 ⁻⁸ 2,43 x 10 ⁻⁸ 1,09 x 10 ⁻⁸ 7,04 x 10 ⁻¹¹ | |

a: Fortin, 2000.

b : Aucun ajout de carbonates n'est effectué, la concentration de ces derniers s'ajustant par équilibre gazeux avec l'atmosphère.

Le milieu a été préparé à partir de six solutions mères (cf. Tableau 2.2) préalablement filtrées (0,2 μm; Poretics). Cette filtration avait pour but d'éliminer toutes particules en suspension, en plus de diminuer les chances d'obtenir une contamination bactérienne. L'ammonium #2, le phosphate #2 ainsi que le KNO₃ étaient donc mélangés avec de l'eau ultrapure (~ 18 Mohms•cm) avant d'être autoclavés. Les oligo-éléments (AAP), de même que le NaOH, étaient ajoutés 24 h après l'autoclavage afin d'éviter la précipitation de composés peu solubles à température élevée (Fortin, 2000).

Tableau 2.2 : Composantes et proportions des solutions mères utilisées dans la préparation du milieu de culture MHSM-1.

| Solution mère ^a | Volume utilisé ^b | Composantes | Concentrations | Fournisseurs |
|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|----------------|--------------|
| Ammonium #2 | 5 mL/L | NH ₄ NO ₃ | 15,0 g/L | Omega |
| | | MgSO ₄ ●7H ₂ O | 4,00 g/L | Omega |
| | | $Ca(NO_3)_2 \bullet 4H_2O$ | 3,21 g/L | BDH |
| Phosphate #2 | 250 μL/L | KH ₂ PO ₄ | 29,6 g/L | BDH |
| | | K₂HPO₄ | 57,6 g/L | BDH |
| KNO ₃ (1,0 M) | 4 mL/L | | 101,11 g/L | Omega |
| AAP | 1 mL/L | H ₃ BO ₃ | 186 mg/L | ACP |
| | | MnCl ₂ •4H ₂ O | 415 mg/L | Fisher |
| • • • | | FeCl ₃ •6H ₂ O | 160 mg/L | BDH |
| | | Na₂EDTA•2H₂O | 300 mg/L | Fisher |
| ** | | Zn ^c (1 g/L) | 1,59 mg/L | Fisher |
| | | Co ^c (1 g/L) | 0,64 mg/L | Fisher |
| | | Mo ^c (1 g/L) | 2,88 mg/L | Fisher |
| | | Cu ^c (1 g/L) | 4,47 μg/L | Fisher |
| NaOH (0,1 M) | 7 mL/L | | 4,00 g/L | BDH |

a: Chaque solution a été filtrée sur 0,2 μm.

Le tampon MOPS (acide N-morpholino-3-propane sulfonique, SIGMA-ALDRICH, M3183) a été utilisé à une concentration de 10 mM afin de maintenir le pH constant tout au long de l'expérimentation. Le pH était ajusté au départ à 7,0 ± 0,1 avec une solution de NaOH 0,1 M ou de HNO₃ 1,5 M. Les lectures de pH se faisaient à l'aide d'une électrode ORION (électrode combinée verre/gel, # 9206 BN, Fisher) reliée à un pH-mètre PHM 240 de précision ± 0,01 (*Meter*Lab, Radiometer Analytical, France). La calibration de l'appareil était effectuée quotidiennement en utilisant des solutions-tampons de pH 4 et 7 (VWR). L'intégrité de l'électrode était préservée par un trempage dans une solution composée de 200 mL de tampon pH 7 et de 1 g de chlorure de potassium (KCl), de même que par un nettoyage régulier avec une solution de pepsine et d'acide nitrique. Ceci

b: Volume de solution mère nécessaire pour préparer le milieu de culture ; volume final = 1000 mL.

c: Étalon pour absorption atomique dans une matrice de HNO₃

permettait d'augmenter la longévité de l'électrode, en plus d'obtenir des lectures de pH plus reproductibles.

Les solutions mères, tout comme l'ensemble des solutions nécessaires à la réalisation de ce projet, étaient préparées en utilisant des réactifs de grade analytique ou supérieur, ce qui atténuait les risques de contamination par des métaux traces. Elles étaient conservées dans des récipients de polypropylène (PP) ou de polyéthylène haute densité (HDPE), préalablement lavés à l'acide. D'ailleurs, tout le matériel utilisé en laboratoire (pointes de pipettes, pinces, unités de filtration, etc.) était décontaminé de façon standard: trempage de 24 h dans l'acide HNO₃ (15 % v/v), suivi de cinq rinçages consécutifs dans de l'eau déminéralisée pour terminer avec deux rinçages dans de l'eau ultrapure. De plus, toutes les manipulations avaient lieu sous une hotte à flux laminaire à l'aide de matériel stérile, toujours dans le but d'éliminer toutes les chances de contamination.

La solution radioactive d'argent (Ag-110m, 0,2 mCi/mL) a été commandée chez Isotope Products (Valencia, Californie, États-Unis). Les solutions intermédiaires étaient acidifiées (pH < 2) avec de l'acide nitrique (HNO₃) et conservées dans des contenants en téflon (TFE, PTFE), matériel réputé pour sa faible capacité d'adsorption. Ainsi, les pertes sur les parois étaient minimisées. Le tout était conservé à 4°C à l'obscurité, ce qui atténuait les risques de photo-réduction.

En ce qui concerne la matière organique dissoute, cette dernière a été achetée sous forme d'acide humique auprès de l'International Humic Substances Society (IHSS, # 2S101H). Elle a été récoltée dans la rivière Suwannee en Floride (Georgie, États-Unis; MOD standardisée et grandement utilisée dans la littérature). Elle était conservée dans un récipient opaque et placée dans un dessiccateur. La MOD sous forme solide était ensuite resuspendue dans une solution basique de NaOH 0,01 M et agitée à l'obscurité pendant une période de 24 h. Ceci permettait de faciliter la dissolution des acides humiques. Par la suite, la solution mère, tout comme l'ensemble des solutions contenant de l'AH, étaient filtrées sur une membrane de 0,4 μm (Poretics), ce qui permettait d'obtenir la fraction

dissoute. Elles étaient ensuite conservées à l'obscurité à 4°C jusqu'à utilisation, toujours dans le but d'atténuer les risques de photo-dégradation.

2.3: <u>Décomptes cellulaires</u>

Le décompte de la concentration algale en solution se fait habituellement à l'aide d'un compteur de particules (Beckman Coulter, Multisizer III). Le principe de fonctionnement de cet appareil est relativement simple : les cellules algales, diluées dans une solution électrolytique (Isoton III), sont aspirées dans un tube possédant une ouverture de 70 µm qui sépare deux électrodes parcourues par un faible courant électrique. Quand la particule traverse l'ouverture, elle déplace son propre volume de liquide isotonique, ce qui augmente momentanément l'impédance de l'ouverture. Ce changement de résistance est transformé en concentration de particules par l'appareil.

Cependant, à des densités au-dessous de 20 000 cellules/mL, l'appareil n'est pas assez sensible et ne détecte pas convenablement la concentration d'algues présente en suspension. Cette densité minimale était trop élevée pour ce que nous voulions faire, c'est-à-dire de maintenir une population algale faible dans le but de minimiser la présence de résidus d'algues et d'exsudats pouvant modifier la spéciation de l'argent. Les décomptes cellulaires ont donc été réalisés en utilisant un cytomètre en flux. En effet, à l'aide de cet appareil, il est possible de mesurer des densités extrêmement faibles, ce qui permet de déterminer la croissance cellulaire maximale tout en minimisant l'impact des cellules sur leur milieu d'exposition (Franklin et al. 2001a; Stauber et al. 2002; Franklin et al. 2004). Le cytomètre a d'ailleurs été utilisé avec succès pour déterminer la toxicité du Cu chez différentes espèces phytoplanctoniques (Franklin et al. 2001b).

La cytométrie en flux est une méthode rapide pour la mesure quantitative de la dispersion de la lumière et des propriétés fluorescentes chez les cellules. Malgré sa grande utilisation dans les domaines biomédical et environnemental, son potentiel comme outil dans les études écotoxicologiques n'a pas encore été entièrement exploité. L'utilisation d'algues unicellulaires, comme dans notre cas les algues vertes, est idéale puisque leurs chloroplastes contiennent des pigments photosynthétiques, tels que la chlorophylle a, qui

auto-fluorescent une fois excitée par un laser de couleur bleue, ce qui facilite la détection de l'organisme et permet d'effectuer facilement des décomptes cellulaires (Stauber *et al.* 2002).

Le fonctionnement d'un cytomètre est fort simple (cf. Figures 2.2a et b). L'échantillon contenant les cellules suspendues dans leur milieu de culture est placé à l'endroit approprié et par une pression exercée par l'air, les cellules sont aspirées vers la chambre d'écoulement (1) où arrive également le liquide d'entraînement (eau ultrapure dans notre cas). Le passage par cet ensemble de structure permet l'alignement des cellules les unes derrière les autres lors de la sortie. Elles sont par la suite acheminées vers la source d'excitation lumineuse, un laser dans ce cas-ci (2). Les cellules, excitées, émettent alors différents types de signaux. Ces signaux sont alors captés et ils permettent un dénombrement précis de la densité cellulaire. Pour chaque cellule, les variations dans la dispersion de la lumière sont enregistrées sur des détecteurs (3), ce qui permet de déduire la taille (détecteur FSC), la forme et la granulométrie de la cellule (détecteur SSC). Des filtres optiques (4) sont disposés devant les détecteurs de façon à assurer la spécificité de la mesure (détecteurs FL1, FL2 et FL3, qui sélectionnent la longueur d'onde en provenance de l'échantillon excité par le laser). Le signal lumineux est transformé en un signal électrique analogique, qui est par la suite converti en un signal numérique. C'est ce signal qui est enregistré et qui constitue le fichier informatique où sont représentés les résultats sous forme d'histogrammes.

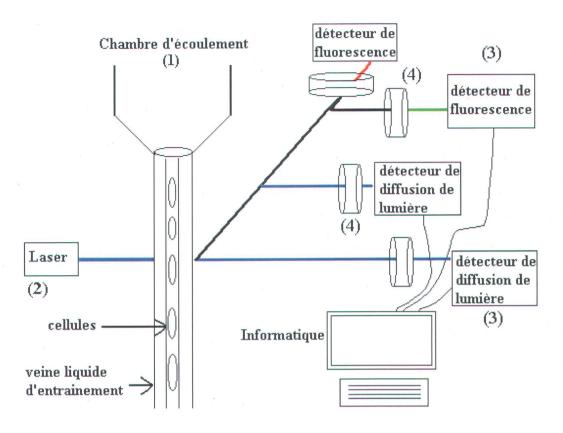


Figure 2.2a: Schéma illustrant le fonctionnement d'un cytomètre en flux. Tiré du site Internet: http://www.tours.inra.fr/equipements/cytometrie/utilisations-principes/schema-cytometre.htm

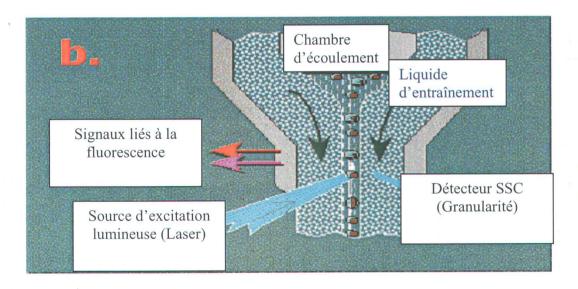


Figure 2.2b : Schéma détaillé de la chambre d'écoulement. Tiré du site Internet : http://www.affordcd4.com/affCD4_2.htm.

Dans notre cas, l'appareil que nous avons utilisé est un FacsCalibur, distribué par BD Biosciences. Il est muni d'un laser émettant une longueur d'onde de 488 nm, ce qui excite la chlorophylle a des cellules algales. Après avoir été vortexé 5 secondes, chaque échantillon d'un volume de 1 mL était placé dans l'appareil pour ensuite être aspiré au débit le plus élevé (60 μ L/min) pendant une période de deux minutes. Aucune bille n'était ajoutée à l'échantillon, ces dernières créant des interférences lors du dénombrement de la densité cellulaire. Le taux d'aspiration était plutôt mesuré à chaque 10 échantillons à l'aide de billes TRUCount (BD BioScience, # 340334) et la concentration (C_{pop}) était déterminée en utilisant la formule suivante, grandement citée dans la littérature (Campbell, 2001; Marie *et al.* 2005):

$$\frac{nb.\acute{e}v\acute{e}nements*\left[\left(\frac{V_{total}}{V_{algues}}\right)\right]}{R_{Aspiration}*T_{lecture}} = Cpop. \tag{2.1}$$

La variable nb. événements représente le dénombrement obtenu à la suite de la lecture de l'échantillon au cytomètre, V_{algues} représente le volume de milieu de culture prélevé contenant les algues, V_{total} représente le volume total de l'échantillon à la suite de l'ajout de billes ou de fixatif, $R_{aspiration}$ représente le taux d'aspiration de l'appareil alors que $T_{lecture}$ représente le temps de lecture de chaque échantillon.

Les détecteurs que nous avons utilisés, soient le SSC (granularité de la cellule) et le FL3 (détecteur captant les émissions de couleur rouge correspondant à la réponse de la chlorophylle a contenue dans nos cellules d'intérêts à la suite du passage devant le laser), étaient respectivement fixés à des valeurs de 245 et 500 V. Le bruit de fond (threshold) était également réglé sur FL3. Ainsi, toutes les cellules mortes, de même que les particules ayant une fluorescence moindre que les cellules phytoplanctoniques utilisées étaient éliminées des lectures, la réponse étant uniquement focalisée sur les émissions de chlorophylle a des cellules de Pseudokirchneriella subcapitata. Il est à noter que lors du fonctionnement du cytomètre, il était très important de s'assurer de l'absence de bulles d'air à l'intérieur des tubes ou dans les échantillons à ajouter. En effet, ces bulles d'air faussaient considérablement la mesure car elles exerçaient un important effet de dispersion

de la lumière incidente, en plus d'entraîner des différences brutales dans les mesures effectuées. Il y avait donc lieu de les éviter et de les éliminer.

2.3.1 : <u>Tests permettant de déterminer la précision analytique du cytomètre en flux selon la</u> densité cellulaire utilisée

Le premier test à avoir été effectué sur le cytomètre avait pour but de déterminer la précision analytique de notre appareil en fonction de la densité algale présente en solution. À partir d'une culture-mère de *Pseudokirchneriella subcapitata* dont la densité cellulaire avait été déterminée à l'aide du compteur de particules, diverses dilutions ont été faîtes pour ensuite être analysées sur le FacsCalibur. Les concentrations obtenues à l'aide de cet appareil ont été comparées à celles nominales, qui étaient de l'ordre de : 1000, 2500, 5000, 7500, 10 000 et 15 000 cellules/mL. Une densité cellulaire de 2500 cellules/mL a été favorisée, car en-dessous de cette dernière, il était difficile d'obtenir un dénombrement cellulaire précis et reproductible (cf. Tableau 2.3).

Tableau 2.3 : Comparaison des densités cellulaires nominales à celles obtenues à l'aide du cytomètre en flux, dans le but de déterminer la densité minimale à utiliser lors des tests de toxicité (n = 10).

| Densité nominale (cellules/mL) | Densité obtenue ± Écart-type (cellules/mL) |
|--------------------------------|--|
| 1000 | 653 ± 487 |
| 2500 | 2536 ± 140 |
| 5000 | 4887 ± 343 |
| 7500 | 8307 ± 494 |
| 10 000 | 11 463 ± 594 |
| 15 000 | 17 834 ± 719 |

2.3.2 : Effet de la densité initiale sur la courbe de croissance

Lorsque nous avons déterminé la densité cellulaire initiale à laquelle nous allions travailler, l'étape suivante était de s'assurer de l'efficacité et de la reproductibilité de notre méthode. Ainsi, trois milieux de culture ont été inoculés à une concentration nominale de 2500 cellules/mL (densité moyenne de 2544 ± 655 cellules/mL) et nous avons suivi la croissance sur une courte période de 12 h. Ce temps a été favorisé afin de vérifier si une

croissance était mesurable sur une aussi petite période. Dans un tel cas, l'éventualité de diminuer la durée des expositions à ce laps de temps aurait pu être envisagée ultérieurement, tout dépendant des résultats de toxicité obtenus en fonction du temps. Leurs courbes de croissance respectives ont donc été dessinées (cf. Figure 2.3) en effectuant un décompte de la concentration présente en suspension en prenant une aliquote de 1 mL de culture à chaque heure pour ensuite faire une lecture au cytomètre en flux. Un test d'ANOVA nous a permis de déterminer qu'il n'y avait aucune différence significative entre les différentes courbes ($\mu = 0.07 \pm 0.01$) et a confirmé notre choix de concentration à privilégier lors des tests de toxicité et de prise en charge.

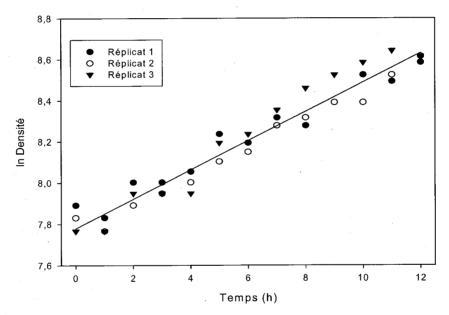


Figure 2.3 : Courbe de croissance de trois cultures distinctes de *Pseudokirchneriella* subcapitata en absence de contaminant, effectuée à l'aide d'un cytomètre en flux sur une période de 12 h. La densité cellulaire initiale était de 2500 cellules/mL.

2.4 : Dosage des radio-isotopes

Pour déterminer la quantité d'argent accumulé à l'intérieur de la cellule, nous avons opté pour l'utilisation d'un radio-isotope de ce métal (Ag-110m). Bien que cet isotope se dose aussi facilement par spectrométrie gamma (γ) (Wallac 1480, Perkin-Elmer Life Sciences, Turku, Finlande), l'activité des échantillons contenant de l'Ag-110m était mesuré à l'aide d'un compteur bêta (β) (Wallac 1414), à la suite de l'ajout d'un liquide à scintillation (Eco-Lume, ICN). Notre choix s'est porté vers cet appareil à cause de sa

grande disponibilité, en plus de son excellente efficacité de comptage (95 \pm 1 %). Cette dernière a été déterminée en effectuant diverses dilutions (n = 4) à partir de la solution mère, aucun étalon commercial n'étant disponible pour l'Ag-110m.

Le volume de liquide à scintillation ajouté différait selon la présence ou l'absence d'eau dans les échantillons dosés. En effet, les échantillons aqueux ont tendance à être instables et à se séparer en bi-phase pour certaines proportions eau : solvant organique (Fortin, 2000). Pour minimiser ce problème, nous avons respecté le ratio 1 : 5 en ajoutant 4 mL d'Eco-Lume à chaque millilitre d'échantillon aqueux. En ce qui concerne les échantillons non aqueux, soient les algues marquées récoltées sur filtres, un volume différent d'eau et de liquide à scintillation a été ajouté. En effet, des tests préliminaires ont démontré que l'efficacité de comptage des échantillons algaux était inférieure à 95 % lorsque le filtre n'était pas entièrement recouvert de liquide à scintillation. Pour contrer ce problème, des filtres ont été contaminés avec une concentration connue d'argent. Par la suite, l'efficacité de comptage de ces filtres a été mesurée après l'ajout de différents volumes d'eau et d'Eco-Lume, jusqu'à l'obtention de l'efficacité désirée. Ainsi, chaque membrane était déposée dans un flacon de 20 mL en borosilicate contenant 5 mL d'eau ultrapure et 12 mL de liquide à scintillation. Ceci avait pour but d'optimiser le comptage, tout en minimisant les effets de matrices, auxquelles le compteur β est très sensible.

Le temps de comptage a été fixé à 1000 secondes, soit environ 15 minutes. Ce temps engendrait des erreurs inférieures ou égales à 2 % pour toutes les lectures. Pour les échantillons ayant une activité plus faible, un volume plus grand d'échantillon était déposé dans les flacons afin d'obtenir un signal plus élevé. Le même ratio eau/liquide à scintillation était respecté. L'argent ayant deux pics d'émission, soit un à 658 KeV et un second à 885 KeV, la fenêtre entière (1 à 1024 KeV) a été utilisée pour les lectures au compteur bêta.

Pour convertir nos nombres de comptes par minutes (CPM) obtenus en désintégrations par minutes (DPM), nous avons divisé le nombre de CPM par l'efficacité en pourcentage de l'appareil pour le radio-isotope utilisé. Par la suite, le nombre de DPM

était converti en désintégrations par secondes (DPS), en divisant le résultat obtenu par 60. Le tout était ramené en nanomoles en utilisant l'activité spécifique corrigée de la source (Bq/nmol), calculée à partir de l'équation suivante :

$$N = N_O \bullet e^{\frac{-\ln 2 \cdot t}{t} \frac{t}{t/2}}$$
 (2.2)

N représentant l'activité à un temps t, N_o l'activité initiale telle qu'étalonnée par le fournisseur et t½ la demi-vie du radioisotope (Ag-110m : 249,8 jours). Il est à noter que l'activité spécifique tenait compte de toute dilution isotopique effectuée, soit le rapport entre la quantité d'argent chaud (Ag-110m) et celle d'argent froid (Ag-107 / Ag-109). En ce qui concerne les échantillons algaux, la quantité détectée était normalisée en fonction de la surface totale d'algues exposées, en m², telle qu'estimée à l'aide du compteur de particules (cf. section 2.5.1 : Préparation du matériel et choix des contenants à utiliser).

2.5: Prise en charge de l'argent par le phytoplancton

2.5.1 : Préparation du matériel et choix des contenants à utiliser

Lors de la réalisation de tests de prise en charge comme nous nous apprêtions à faire, le protocole habituellement utilisé veut que les milieux soient conservés dans des bouteilles en téflon, où la concentration de métal désirée est ajoutée 24 h avant l'expérimentation. Ceci permet à la solution de se stabiliser et d'atteindre son équilibre. Cependant, dans le cas de l'argent, des tests préliminaires nous ont révélé que ce métal pouvait disparaître complètement du milieu sur une période de 96 h, soit la durée des temps d'exposition. Pour déterminer la cause de cette perte de métal, un suivi du pourcentage d'argent retrouvé en solution à chaque 24 h a été effectué, en utilisant différents types de contenants pour entreposer le milieu de culture contaminé (cf. figure 2.4). Les résultats nous montrent que l'argent est de moins en moins disponible avec le temps, qu'importe le contenant utilisé. Puisque ceux en polycarbonate nous ont donné les pertes les moins importantes, l'utilisation de ce type de plastique a été favorisée. De plus, pour s'assurer de minimiser le plus possible les pertes dans le temps, le contaminant était ajouté directement aux milieux d'exposition le matin du départ de l'expérimentation, dans le but de réduire le plus possible le temps de contact entre le récipient et le métal.

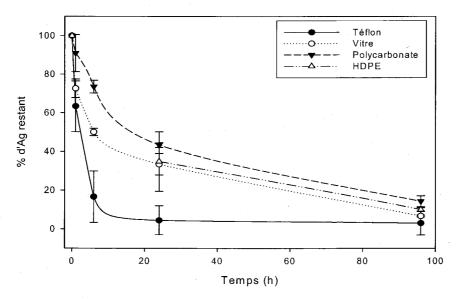


Figure 2.4 : Pertes d'argent observées sur les parois de différents contenants en fonction du temps. Les barres d'erreur représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures.

Une fois ce problème caractérisé, la prise en charge de l'argent a pu être évaluée en absence de ligands. Pour se faire, des milieux de culture d'un volume de 300 mL chacun étaient préparés en triplicata pour chaque concentration testée, ce qui représente un volume total de 900 mL (3 x 300 mL) par concentration. Chaque volume était déposé dans des erlenmeyers de polycarbonate de 500 mL. Des concentrations nominales d'argent total variant entre 0 et 100 nM (0, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 20, 30, 50, 80 et 100) ont été testées. Il est à noter que dans le milieu MHSM-1, l'argent se retrouvait principalement (> 99 %) sous sa forme libre, tel que calculé par le logiciel de spéciation MINEQL⁺ (v.4.5, Halowell, Maine, États-Unis).

Une fois l'argent ajouté, la totalité des milieux était filtrée sur deux membranes de polycarbonate superposées de 0,2 µm (Poretics). En faisant un décompte des membranes au compteur bêta et en soustrayant l'activité du second filtre à celle du premier, il était possible de déterminer s'il y avait ou non perte d'argent sur les filtres, liée à la présence de métal s'ayant adsorbé à des particules. Dans tous les cas, les pertes par adsorption étaient inférieures à 10 % de la valeur d'argent initialement mesurée.

Le pH des milieux était réajusté au besoin à une valeur de 7,0 ± 0,1 et l'activité initiale d'Ag-110m de chaque concentration était mesurée, ce qui permettait de s'assurer qu'on avait la bonne concentration d'argent en solution. Par la suite, la quantité d'algues désirée était ajoutée dans chaque erlenmeyer. Pour cela, une culture-mère en phase exponentielle était filtrée sur une membrane de polycarbonate d'une porosité de 2 µm (Poretics). Afin de ne pas abîmer les cellules, un vide maximal de 10 cm Hg était utilisé. Les algues étaient ensuite rincées (5 x 10 mL) avec un milieu de culture frais et stérile. Ce rincage avait pour but d'éliminer tous les ligands et métaux potentiellement présents en suspension et pouvant entrer en compétition avec l'argent pour les sites de complexation à la surface algale. Les cellules ainsi recueillies étaient resuspendues dans un petit volume (~ 20 mL) de milieu MHSM. La densité, de même que la taille des cellules et leur superficie étaient déterminées au compteur de particules. Les deux derniers paramètres mentionnés étaient déterminés à l'aide de cet appareil, car il était impossible à l'aide du FacsCalibur de déterminer avec exactitude la taille d'une particule de dimension inférieure à 5 µm. Ces paramètres étaient mesurés à nouveau aux temps t = 24, 48, 72 et 96 h. À partir de la densité cellulaire obtenue, il a été possible de déterminer le volume à ajouter afin d'inoculer nos milieux à une concentration algale de 2500 cellules/mL. Le temps pendant lequel les algues demeuraient confinées dans un faible volume était minimisé pour éviter tout changement physiologique à la culture d'intérêt. En effet, un manque d'oxygène lié à la grande densité présente dans un petit volume pourrait créer des conditions anoxiques et possiblement fausser nos résultats. Le temps de confinement était noté et le temps le plus élevé était d'environ 5 minutes.

Immédiatement après l'inoculation, les erlenmeyers étaient placés dans une chambre environnementale pendant une période de 96 h. À chaque 24 h, le pH était vérifié et noté pour s'assurer de sa stabilité. Afin de ne pas contaminer les milieux, des aliquotes de 4 mL étaient prélevées pour la lecture au pH-mètre et jetées par la suite.

2.5.2 : Détermination de la prise en charge et de l'adsorption de l'argent

Afin de quantifier l'effet des exsudats dans les milieux d'exposition et de déterminer la façon dont pénètre le métal à l'intérieur de la cellule, la prise en charge et l'adsorption ont donc été suivis en fonction du temps. Pour bien interpréter les différents résultats d'exposition recueillis au cours de l'expérimentation, il est primordial de distinguer la quantité de métal absorbée de celle adsorbée à la surface de la cellule algale. Ceci a pour but d'éviter une sur-estimation de la prise en charge du métal. L'adsorption des métaux à la surface de la cellule se caractérise par une augmentation très rapide dans les premières minutes suivie d'un plateau survenant à la suite de l'atteinte d'un équilibre rapide (Bates et al. 1982; Schenck et al. 1988; Knauer et al. 1997). Quant au métal intracellulaire, il augmente de façon linéaire dans le temps jusqu'à ce que le taux d'entrée diminue ou que le taux de sortie augmente (Errécalde et Campbell, 2000). Ainsi, après 24, 48, 72 et 96 h, un volume de 10 mL de culture contenant les cellules algales était récolté sur deux membranes de 2,0 µm. La première permettait la récolte des algues, alors que la seconde permettait d'évaluer le bruit de fond occasionné par l'absorption et/ou l'adsorption de l'argent sur le filtre. Le filtrat était recueilli (filtrat # 1) et l'activité totale de l'Ag-110m dans ce dernier était mesurée, ce qui permettait de déterminer s'il y a eu une perte d'argent significative au cours de l'expérience. Les filtrats recueillis à la toute fin du temps d'exposition (96 h) étaient conservés pour une analyse subséquente de la concentration en métal libre à la technique d'échange ionique, alors que certains d'entre eux obtenus à chaque pas de temps (24, 48 et 72 h) étaient aussi dosés pour déterminer l'évolution de la concentration de métal libre en solution en fonction du temps (cf. section 2.9 : Technique d'échange ionique (TÉI)).

Sur une autre fiole de filtration, deux rinçages consécutifs des algues de trois minutes chacun, avec un volume de 20 mL ($V_{tot} = 40 \text{ mL}$) d'une solution MHSM-1 à pH 7,0 contenant 100 nM d'argent froid étaient exécutés. Ceci permettait de désorber l'argent chaud (Ag-110m) faiblement lié à la surface des algues par échange isotopique avec de l'argent froid (solution d'argent stable; dilution 1:10 d'un étalon de 1000 mg/L dans une

matrice de 5 % HNO₃, *Fisher*) (Fortin, 2000). Ce filtrat était récupéré (filtrat # 2) et son décompte permettait de déterminer la quantité de métal adsorbée à la surface de la cellule.

Un décompte de la concentration d'argent retrouvée en solution dans les filtrats, de même que dans les algues a été effectué à l'aide du compteur bêta. Ceci a permis de faire le bilan de la perte en argent au cours de l'expérience et de déterminer la prise en charge et l'adsorption. La différence détectée entre les deux filtres représentait la prise en charge du métal par les algues, après avoir normalisé les résultats en fonction de la surface algale totale. Cette normalisation facilitait la comparaison des résultats entre espèces, en plus de permettre la mesure des flux de métal pénétrant à l'intérieur de la cellule. Un bilan de masse (quantité d'argent dans la solution initiale - quantité d'argent dans la solution finale à chaque pas de temps (filtrat # 1) - quantité dans les algues - quantité adsorbée sur les algues (filtrat # 2) = 0) a permis de vérifier si nous avons perdu de l'argent en cours de route (ex. : adsorption sur les parois des contenants).

2.6 : Prise en charge de l'argent en présence de MOD par le phytoplancton

En ce qui concerne les expérimentations en présence de matière organique dissoute, le protocole utilisé était semblable à celui cité précédemment (cf. section 2.5 : <u>Prise en charge de l'argent par le phytoplancton</u>), à l'exception d'un ajout de substances humiques provenant de la rivière Suwannee (Géorgie et Floride, États-Unis). De plus, le volume des milieux d'exposition a été diminué de 300 à 150 mL par réplicat, dans le but d'économiser les substances entrant en jeu dans cette expérimentation. Puisqu'aucune perte de métal significative n'a été observée sur les parois des contenants en polycarbonate en présence de MOD (cf. section 5.1 : <u>Bilan de masse de l'argent en solution en présence de substances humiques</u>), les différents milieux étaient préparés 24 h à l'avance et laissés à équilibrer à l'obscurité pendant toute la nuit. Le matin de l'expérience, les échantillons étaient séparés dans des erlenmeyers de 250 mL de polycarbonate, juste avant l'inoculation par les algues.

La concentration de matière organique dissoute que nous avons utilisée était de 10 mg/L (cf. section 1.2.2.1 : <u>Description de la MOD</u>), ce qui équivaut à environ 5 mg C/L selon le contenu en carbone rapporté par l'IHSS (50 %). Cette concentration serait

représentative de ce qui est normalement retrouvé dans les écosystèmes aquatiques (Thurman, 1985). À titre comparatif, certains lacs de la région de Rouyn-Noranda ont un contenu en COD variant entre 8 et 16 mg C/L (Perceval *et al.* 2004). Pour connaître la quantité d'acides humiques à ajouter à chaque milieu d'exposition, nous avons effectué un dosage de la concentration de carbone organique dissous (COD) contenu dans la solution-mère d'AH (Shimadzu TOC – 5000A, Kyoto, Japon). Cette dernière, dont la concentration se situait autour de 683 mg C/L, était préparée afin de faciliter la répartition de la MOD entre les bouteilles d'exposition. Les dilutions nécessaires selon le volume d'exposition employé étaient par la suite effectuées afin d'obtenir 5 mg C/L dans chaque milieu d'exposition. En ce qui concerne les concentrations de métal testées, ces dernières variaient entre 0 et 150 nM d'argent total nominal (15, 30, 45, 50, 60, 75, 80, 90, 100, 110, 120 et 150 nM).

2.7 : Toxicité de l'argent chez Pseudokirchneriella subcapitata

Le protocole utilisé lors des tests de toxicité était semblable à celui utilisé lors des tests de prise en charge (cf. section 2.5 : Prise en charge de l'argent par le phytoplancton). Cependant, quelques étapes étaient ajoutées. En effet, à chaque douze heures, et ce, à partir du temps 0, 1 mL de chaque erlenmeyer a été pipeté pour ensuite être fixé dans 100 μL d'une solution de glutéraldéhyde-paraformaldéhyde (décrite par Tsuji et Yanagita, 1981). Cette solution a été favorisée en raison de sa capacité à garder intactes les cellules, dont la fluorescence de la chlorophylle a, ce qui n'altèrerait pas les décomptes au cytomètre. De plus, il a un long pouvoir de préservation, soit de plusieurs années (Throndsen, 1978). Les cellules fixées étaient conservées à l'obscurité à 4°C jusqu'au lendemain, où un décompte du nombre de cellules retrouvées dans chaque échantillon était effectué. Ceci a permis de suivre l'évolution de la croissance des algues au fil du temps et de dessiner les courbes doses-réponses en représentant la densité relative (i.e. le rapport des densités obtenues pour chacune des concentrations sur celles obtenues pour le milieu de référence MHSM sans métal, en tenant compte des calculs de propagation d'erreur) par rapport aux différentes concentrations de contaminants présents dans les milieux d'exposition. Malgré qu'il existe différentes façons de dessiner les courbes doses-réponses (e.g.: croissance relative par rapport aux concentrations testées), celle-ci a été favorisée en raison des plus petits écarttypes obtenus. À partir des données de densités recueillies, les CE50s, soit la concentration ayant un effet de 50 % sur la population, ont été évaluées en fonction du temps. Ce paramètre a été calculé à l'aide d'une macro sur Excel (REGTOX V7.0.4, eric.vindimian.9online.fr/). En comparant les résultats avec et sans MOD, il a été possible de déterminer si ce ligand organique influençait la toxicité de l'argent chez le phytoplancton. Il est à noter que les analyses au cytomètre ont commencé par les échantillons témoins, ces derniers ayant une fluorescence maximale, ce qui permettait d'ajuster les paramètres de l'appareil en conséquence. Par la suite, l'analyse s'est faite par concentration croissante d'argent, pour éviter toute forme de contamination.

2.8 : Validation de la méthode développée

Pour s'assurer de la validité de la méthode que nous avons développé, nous avons exposé l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* à différentes concentrations de cadmium. Ce métal a été favorisé car sa toxicité est bien connue. Une évaluation de l'adsorption, de la prise en charge et de la toxicité a été faîte et ces résultats ont été comparés à ceux obtenus par un test normé (Maloney, en évaluation), soit celui du CEAEQ (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2003). Étant donné que la densité cellulaire utilisée dans notre protocole est inférieure lors de l'inoculation à celle utilisée par le CEAEQ, nous croyions que la concentration de cadmium (total et libre) retrouvée en solution à la suite du temps d'exposition de 96 h devrait être supérieure à celle retrouvée lorsque la densité algale est plus élevée. Ceci s'expliquerait par la présence moindre d'exsudats et de débris cellulaires pouvant lier les métaux en solution, ainsi qu'à la biomasse plus faible, diminuant du même coup les pertes par prise en charge et par adsorption.

2.8.1 : Description de la méthode normée

La méthode normée du CEAEQ consistait à exposer un inoculum de 10 000 cellules/mL de l'espèce phytoplanctonique *Pseudokirchneriella subcapitata* à différentes concentrations de métal sur une période de 96 h. Les cultures étaient effectuées dans des erlenmeyers de 250 mL de polycarbonate et maintenues sous une luminosité et une

température constante. La toxicité était mesurée en effectuant un suivi de la croissance aux temps 0, 24, 36, 48, 60, 72, 84 et 96 h à l'aide d'un compteur de particules. L'expérience était réalisée en triplicata et les résultats étaient exprimés par le CE50 au temps final, soit à 96 h. La prise en charge et l'adsorption ne faisaient pas partie du protocole initial de ce test normé. Cependant, ils ont été ajoutés afin de mieux comprendre ce qui influence la toxicité chez l'organisme phytoplanctonique testé.

2.8.2 : Prise en charge du cadmium par l'algue verte Pseudokirchneriella subcapitata

Le protocole que nous avons utilisé lors de cette étape est le même que lors des tests de prise en charge avec l'argent (cf. section 2.5 : <u>Prise en charge de l'argent par le phytoplancton</u>). Cependant, certaines modifications ont été nécessaires afin d'uniformiser notre protocole à celui normé et de l'ajuster en fonction du métal.

Tout d'abord, le milieu de culture utilisé a été remplacé par celui du CEAEQ. Il ne contenait pas d'EDTA (acide éthylènediamine-tétraacétique), faisant ainsi en sorte que le cadmium se retrouvait principalement sous sa forme libre (~ 97 %). Il a été préparé à partir de 7 solutions stocks (c.f. Tableau 2.3), desquelles on prélevait 625 μL pour chaque litre de solution d'exposition et 1000 μL pour les cultures-mères. Ce milieu a été préféré au milieu MHSM afin de faciliter la comparaison de ces résultats à ceux obtenus par Maloney (en évaluation).

Tableau 2.4 a): Compositions des différentes solutions stocks entrant dans la fabrication du milieu du CEAEQ (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2003).

| Solutions éléments nutritifs | Composés | Quantité dissoute dans 500 mL d'eau distillée | |
|------------------------------|--|---|--|
| 1 2 3 4 | NaNO ₃ MgCl ₂ •6H ₂ O CaCl ₂ •2H ₂ O H ₃ BO ₃ MnCl ₂ •4H ₂ O ZnCl ₂ FeCl ₃ •6H ₂ O CoCl ₂ •6H ₂ O Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O CuCl ₂ •2H ₂ O MgSO ₄ •7H ₂ O K ₂ HPO ₄ NaHCO ₃ | 12,75 g 6,08 g 2,20 g 92,90 mg 208,00 mg 1,64 mg a 79,90 mg 0,71 mg b 3,63 mg c 0,006 mg d 7,35 g 0,52 g 7,50 g | |

a : Dissoudre 164 mg de ZnCl₂ dans 100 mL d'eau distillée. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution #4.

b : Dissoudre 71,4 mg de CoCl₂•6H₂O dans 100 mL d'eau distillée. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution #4.

c : Dissoudre 36,3 mg de Na₂MoO₄•2H₂O dans 10 mL d'eau distillée. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution #4.

d : Dissoudre 60,0 mg de CuCl₂•2H₂O dans 1000 mL d'eau distillée. Prendre 1 mL de cette solution et diluer dans 10 mL. Ajouter 1 mL de cette seconde solution à la solution #4.

Tableau 2.4 b): Concentrations des différents éléments se retrouvant dans le milieu du CEAEQ (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2003).

| Éléments | Concentration présente dans le milieu CEAEQ (M) | |
|----------|---|--|
| N | 1,88 x 10 ⁻⁴ | |
| Mg | $7,47 \times 10^{-5}$ | |
| Ca | 1,86 x 10 ⁻⁵ | |
| S | $3,73 \times 10^{-5}$ | |
| P | $3,73 \times 10^{-6}$ | |
| Zn | $1,50 \times 10^{-8}$ | |
| Fe | $3,70 \times 10^{-7}$ | |
| Na | $3,00 \times 10^{-4}$ | |
| C | $1,12 \times 10^{-4}$ | |
| Cu | 4,65 x 10 ⁻¹¹ | |
| K | 7,46 x 10 ⁻⁶ | |
| В | $1,88 \times 10^{-6}$ | |
| Mn | $1,31 \times 10^{-6}$ | |
| Со | $3,75 \times 10^{-9}$ | |
| Mo | 1,88 x 10 ⁻⁸ | |
| Cl | $1,16 \times 10^{-4}$ | |

La solution de cadmium radioactive (Cd¹⁰⁹; 3,45 mCi/mg) provenait de chez Amersham (Piscataway, New Jersey, États-Unis). La demi-vie de ce radio-isotope est de 462,3 jours. Encore une fois, les solutions intermédiaires étaient acidifiées (pH < 2) avec de l'acide nitrique (HNO₃) et conservées dans des contenants en téflon (TFE, PTF), pour minimiser les pertes sur les parois. Elles étaient entreposées à l'obscurité, à une température de 4°C.

Chaque exposition étant réalisée en triplicata, un volume total de 210 mL de milieu par concentration a été préparé, représentant 70 mL par réplicat. Puisqu'aucune perte significative n'a été observée sur les parois des bouteilles utilisées, les solutions étaient entreposées dans des contenants en téflon et la concentration désirée de cadmium a été ajoutée 24 h avant le début de l'expérience. Ceci a permis au métal de s'équilibrer. Les concentrations nominales testées de cadmium total étaient de 8, 15, 23, 29, 40, 50, 60, 81, 128, 153, 227 et de 270 nM. Le pH était ajusté à 7,0 ± 0,1 et maintenu constant à l'aide du

tampon MOPS à une concentration de 10 mM. Le pH initial était ajusté avec du NaOH ou du HCl 0,1 M.

Tout comme dans le cas de l'argent, à la fin de chaque temps d'exposition choisi (24, 48, 72 et 96 h), un volume de 10 mL de chaque erlenmeyer était filtré sur deux membranes d'une porosité de 2,0 µm. Ce premier filtrat était récolté pour déterminer la quantité de métal restant en solution à chaque pas de temps. De plus, le filtrat recueilli à la fin de l'expérimentation était conservé pour une analyse subséquente par la technique d'échange ionique (cf. section 2.9). Afin de distinguer le métal absorbé à l'intérieur de la cellule algale de celui adsorbé à la surface, un premier rinçage était effectué à l'aide d'un volume de 5 mL d'une solution d'EDTA 2 x 10⁻⁴ M, et ce, pendant une période de dix minutes. Après ce temps, le vide était appliqué et les algues étaient rincées avec 5 mL supplémentaire de la solution d'EDTA. Cette méthode de rinçage a été préférée à l'échange isotopique étant donné la grande affinité de l'EDTA pour le métal à l'étude (log K_{CdEDTA} = 18,26). De plus, l'EDTA est non assimilable par la cellule, ce qui en fait un excellent ligand de désorption. Des études antérieures réalisées à l'aide de métaux divalents (ex.: Cd, Cu, Mn et Zn) en ont d'ailleurs fait la démonstration (Bates et al. 1982; Harrison et al. 1986; Schenck et al. 1988; Hassler et al. 2004). Le filtrat ainsi récolté était dosé, ce qui permettait de connaître la quantité de cadmium adsorbée à la surface de la cellule.

Une dernière série de rinçages était effectuée sur chaque échantillon par $3 \times 5 \text{ mL}$ de milieu d'exposition simplifié, ce qui signifie en absence d'oligo-éléments et d'EDTA. Ces derniers rinçages permettaient d'éliminer tout résidu pouvant se retrouver sur la surface cellulaire, permettant ainsi la détermination de la quantité de cadmium pris en charge par la cellule par l'analyse des filtres. La lecture des échantillons recueillis a été réalisée à l'aide du compteur bêta, selon le même protocole d'utilisation que l'argent (cf. section 2.4 : Dosage des radio-isotopes). Cet appareil a été favorisé encore une fois à cause de sa plus grande disponibilité, sans oublier son excellente efficacité (95 \pm 1 %). L'ensemble des analyses ont permis de réaliser un bilan de masse, nous informant si une certaine quantité de métal avait été perdue au cours de l'expérience.

2.8.3 : Toxicité du cadmium chez Pseudokirchneriella subcapitata

Le protocole utilisé pour réaliser cette étape est identique à celui utilisé lors des tests de toxicité de l'argent chez *Pseudokirchneriella subcapitata* (cf. section 2.7 : <u>Toxicité de l'argent chez *Pseudokirchneriella subcapitata*</u>).

2.9: <u>Technique d'échange ionique (TÉI)</u>

2.9.1: Théorie

La réponse biologique d'un organisme n'est que rarement proportionnelle à la concentration totale de métal retrouvée en solution. En effet, si l'on se fie aux prémisses du modèle de l'ion libre, l'accumulation d'un métal, tout comme la toxicité observée chez un organisme, sont plutôt proportionnelles à la concentration du métal sous sa forme libre, c'est-à-dire sous sa forme cationique (M^{z+}). Cependant, il s'avère difficile de prédire la quantité de métal libre en solution à la suite d'une exposition à long terme, les algues modifiant leur milieu tout au long d'une exposition par le relâchement de ligands organiques (exsudats), ce que les modèles de spéciation ne peuvent pas prendre en compte. De plus, ces mêmes modèles ne peuvent prédire la spéciation d'un métal en présence de matière organique dissoute, cette macro-molécule n'étant pas encore très bien caractérisée.

Ainsi, pour évaluer la concentration de métal libre en solution, nous avons analysé les nombreux filtrats que nous avons recueillis à la suite des expériences de prise en charge à l'aide d'une technique appelée « technique d'échange ionique » (TÉI). Elle est développée et utilisée dans nos laboratoires depuis plus de 10 ans (Fortin et Campbell, 1998). Le fonctionnement de ce montage de chromatographie ionique miniaturisée est fort simple. En effet, il suffit de passer l'échantillon d'intérêt à travers une colonne contenant une petite quantité de billes de résine échangeuse d'ions de type Dowex (environ 7 mg) jusqu'à ce que l'état stationnaire soit atteint. Dans ces circonstances, la concentration de métal initialement en solution égale la concentration de métal à la sortie de la colonne. L'utilisation d'un petit volume de résine permet de minimiser de façon significative le volume d'échantillon à passer avant d'atteindre l'état stationnaire. La résine sulfonée de type Dowex a été utilisée lors de tous les essais. Elle est composée d'un polymère de

styrène réticulé contenant des groupements divinylbenzène (DVB) sur lesquels un groupement fonctionnel de type sulfonique a été ajouté (R-SO₃⁻). Cette résine a été sélectionnée pour sa faible affinité pour les métaux, ce qui permet de travailler en conditions traces.

Ainsi, lorsque les ions libres (M^{z^+}) entrent en contact avec la résine sous forme sodique (RNa), il se produit une réaction qui se poursuit jusqu'à l'atteinte de l'équilibre qui peut se traduire par une constante conditionnelle pour un pH et une force ionique donné (K^c_{IE}) :

$$M^{Z^+} + zRNa \xleftarrow{\kappa^c_{EI}} R_z M + zNa^+$$
 (2.3)

$$K^{c}_{EI} = \frac{\left[R_{Z}M\right]\left[Na^{+}\right]^{Z}}{\left[M^{Z+}\right]\left[RNa\right]^{Z}}$$
(2.4)

En présence d'une concentration suffisamment élevée de contre-ions (ex. : Na⁺), il est possible de minimiser les interactions entre la résine et les ions M^{z^+} . La concentration de Na⁺ en solution et sur la résine est très peu affectée par l'échange de l'ion métallique M^{z^+} présent à une concentration « trace » ([RNa⁺]>> [R_zM]). Ainsi, pour un pH et une force ionique stable, l'équation citée précédemment peut-être réorganisée pour former un coefficient de distribution entre le métal d'intérêt sous sa forme libre en solution et la résine, soit $\lambda_{o, i, pH}$ (L/g) :

$$\lambda_{0,i,pH} = K^{c}_{EI} \frac{\left[RNa\right]^{Z}}{\left[Na^{+}\right]^{Z}} = \frac{\left[R_{Z}M\right]}{\left[M^{Z+}\right]}$$
(2.5)

Le coefficient de distribution pour un métal donné est mesuré en passant des solutions exemptes de ligands et de concentrations connues de ce métal sur la résine. Tous les autres paramètres étant connus, il ne reste plus qu'à évaluer le coefficient de distribution à l'aide de l'équation 2.5.

Pour déterminer la concentration de métal adsorbée à la résine ($[R_zM]$), il suffit d'effectuer une élution à l'aide d'un volume connu (V) d'une solution éluante (ex. : HNO_3 ,

Na₂S₂O₃), ce qui permet de déloger les ions M^{z+} liés à la surface de chaque bille de résine. En recueillant l'éluat et en utilisant un radio-isotope du métal sélectionné, la concentration en métal se retrouvant cet éluat (M_{éluant}) peut être déterminée en réalisant un décompte au compteur bêta. En connaissant le poids exact de la résine (m_r), [R_zM] peut être calculé selon l'expression suivante :

$$\left[\begin{array}{c} R_{z}M \end{array}\right] = \frac{\left[\begin{array}{c} M_{\text{\'e}LUANT} \end{array}\right] \times V}{m_{z}} \tag{2.6}$$

Finalement, en combinant les deux dernières équations, une relation permettant de déterminer la concentration d'ion métallique libre en solution est obtenue :

$$\left[\begin{array}{c} \mathbf{M}^{\mathrm{Z}^{+}} \end{array}\right] = \frac{\left[\begin{array}{c} \mathbf{M} \end{array}\right] \times \mathbf{V}}{\lambda_{0,\mathrm{inff}} \times \mathbf{m}_{\mathrm{r}}} \tag{2.7}$$

2.9.2: Montage expérimental

Le montage de ce système (c.f. Figure 2.5) consistait à unir une pompe péristaltique (Minipuls3, GILSON) à une valve rotative à six positions (Milton Roy) acheminant les solutions d'exposition vers la colonne emprisonnant les nombreuses billes de résine (Dowex 50W-X8, 50-100 mesh, Sigma). Les tubes et les connexions servant à relier les solutions à la résine étaient composés de TFE, à l'exception de ceux reliant la sortie de la valve à la colonne, via la pompe, qui étaient en Tygon (Technicon vert-vert).

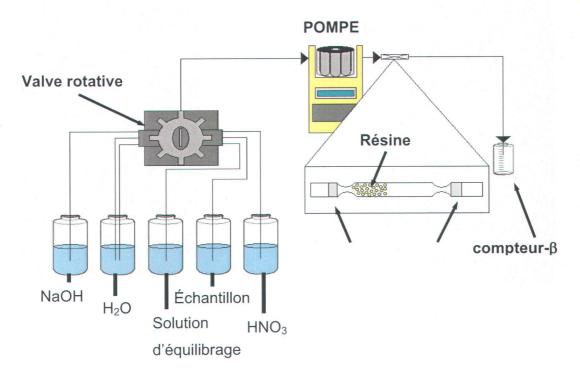


Figure 2.5 : Schéma expérimental de la Technique d'échange ionique. Tiré du mémoire de maîtrise de Frédéric Boily, 2004.

Dans le but d'optimiser l'efficacité de la méthode, trois colonnes distinctes ont été fâbriquées et utilisées en parallèle. Pour se faire, la résine préalablement purifiée a été placée à l'étuve à 60°C pendant un minimum de 24 h, permettant l'élimination de toute l'eau que pouvait contenir la résine. Par la suite, une quantité d'environ 7 mg de résine par colonne a été pesée avec une micro-balance Sartorius (Edgewood, New York, États-Unis). Cette étape doit être réalisée rapidement afin d'éviter que la résine n'absorbe l'humidité de l'air, ce qui fausserait la valeur de sa masse. De plus, toutes les précautions nécessaires ont été prises pour atténuer le plus possible le phénomène d'électricité statique, diminuant ainsi les chances de perdre une petite quantité de résine. La masse précise de résine a été notée pour être utilisée ultérieurement lors des calculs de calibration (cf. équation 2.7). Les billes étaient ensuite suspendues dans un volume d'eau d'environ 1 mL. Cette suspension facilitait l'introduction de la résine à l'intérieur de la colonne, via une extrémité. Ainsi, à l'aide de la pompe péristaltique, la solution était aspirée dans les tubes en TFE, jusqu'à l'atteinte d'un premier fritté (Frit UHMWPE 0.062x. 0.062x.100 10U. # 0570750,

Upchurch Scientific). Lorsque l'ensemble de la résine était retenue à l'intérieur du tube, un second fritté était ajouté à l'autre extrémité, complétant ainsi la colonne (cf. Figure 2.6).

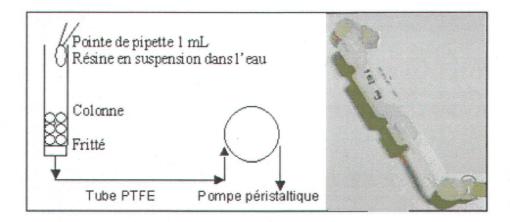


Figure 2.6 : Schémas de fabrication de la résine (section de gauche) et de la colonne terminée installée sur un module de TEI (section de droite). Cette figure est tirée de Olsen et Dufour, 2004.

2.9.3 : Méthodologie employée

2.9.3.1 : <u>Cas de l'argent</u>

La première étape consistait à mesurer le coefficient de distribution de chaque colonne. Pour se faire, nous avons fait passer des solutions exemptes de ligands de concentrations connues d' Ag^+ variant entre 5 et 100 nM à plusieurs reprises (n = 3). Ceci nous a donné un coefficient pour le pH et la force ionique que nous allions utiliser, soit pH = 7 et I = 0,01 éq/L.

Pour s'assurer de la validité de notre méthode et des valeurs de λ obtenues, nous avons ajouté à nos milieux différentes concentrations de chlorure ([Cl]] = 0.5, 1, 2 et 3 mM) sous forme de NaCl (EM Science), ligand inorganique complexant fortement l'argent en solution. La concentration de métal total dans chaque cas égalait 50 nM. À l'aide du logiciel de spéciation chimique MINEQL⁺, la quantité de métal libre dans chaque solution a pu être calculée et il ne restait plus qu'à comparer ces valeurs à celles mesurées à l'aide de la TÉI. Il est important de mentionner que la force ionique de la solution était maintenue constante en substituant les ions NO_3^- par les ions Cl⁻.

Le protocole que nous avons utilisé pour effectuer nos titrages d'argent libre en solution est fortement inspiré de celui utilisé par Céline Porcher lors de sa maîtrise (2004). Cependant, certaines modifications ont été apportées pour s'ajuster aux nouvelles colonnes que nous avons fabriquées. Ainsi, avant chaque utilisation, le montage était nettoyé à l'aide d'une solution d'acide nitrique 1,5 M pendant environ 15 minutes à un débit de la pompe de 5 mL/min. Chaque tube était ensuite rincé avec de l'eau ultrapure pendant ce même laps de temps. Le débit de la pompe était ajusté à chaque jour, ce dernier ayant tendance à varier au cours des utilisations. En effet, des problèmes de colmatage des frittés ou d'usure prématuré des tubes pouvaient engendrer des variations, voire des restrictions du débit.

Le dosage du métal libre débutait par une séquence de quatre minutes, où de l'eau ultrapure circulait dans les tubes. Cette étape était suivie d'une séquence de deux minutes où une solution de NaOH 0,1 M permettait la conversion de la résine sous sa forme sodique (Na⁺). Un second rinçage à l'eau ultrapure de quatre minutes était ensuite effectué. Afin d'acclimater la résine à notre milieu, une solution MHSM dont la force ionique avait été ajustée à 0,01 éq/L à l'aide de NaNO₃ était passé dans chaque colonne jusqu'à la stabilisation du pH à la valeur désirée, soit autour de 7 (temps ≈ 5 min). Il ne restait par la suite qu'à passer l'échantillon à doser jusqu'à l'atteinte de l'état stationnaire entre la résine et la solution. Une calibration de chaque colonne évaluant la quantité de métal à la sortie en fonction du temps a permis de déterminer qu'il fallait environ 20 minutes, soit un volume de 100 mL, pour que la concentration à la sortie égale celle de la solution (cf. Figure 2.7).

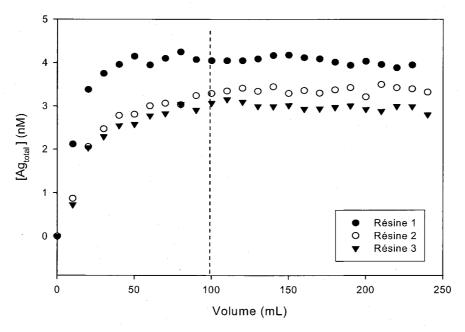


Figure 2.7 : Profil d'atteinte d'un état stationnaire entre l'argent et les différentes résines.

À la suite du passage de l'échantillon, de l'eau ultrapure était passée dans chaque colonne pendant environ 5 secondes, temps suffisamment grand pour déloger les gouttelettes d'échantillon pouvant demeurer dans les espaces interstitiels, évitant du même coup toute contamination de l'éluant. Les tubes étaient par la suite vidés par une circulation d'air. La solution éluante, soit dans ce cas-ci, du thiosulfate 200 μM (NaS₂O₃•5H₂O, EM Science), était ensuite passée pendant une période de dix minutes à un débit de 0,5 mL/min, optimisant le temps de contact entre l'éluant et la résine et permettant de déloger efficacement l'Ag⁺ lié à la résine. La totalité de l'éluat était recueillie dans des contenants en borosilicate de 20 mL (Opticlear) pour une mesure au compteur bêta. Le nombre de cpm détecté était converti en moles, comme décrit à la section 2.4 : Dosage des radioisotopes. En connaissant la quantité de métal retrouvée dans chaque échantillon, de même que le coefficient de distribution (L/g), le volume exact d'éluant (mL) et la masse de la résine utilisée (mg), il était possible de déterminer la concentration en ions libres présents dans chaque échantillon, à l'aide de l'équation 2.7 citée précédemment (cf. section 2.9.1).

2.9.3.2 : Cas de l'argent en présence de MOD

Le même protocole d'utilisation de la résine dosant l'argent seul (cf. section 2.9.3.1 : <u>Cas de l'argent</u>) a été utilisé en présence de MOD. Puisqu'aucune constante de formation thermodynamique n'existe pour la matière organique dissoute naturelle, la structure de cette dernière variant d'une molécule à une autre, la TÉI a du être utilisée pour caractériser la spéciation d'un métal en présence de MOD. Pour déterminer le pourcentage d'argent libre initialement présent dans nos solutions à la suite de l'ajout de 5 mg C/L de MOD, une courbe de titrage a été réalisée. Dix concentrations d'argent total variant entre 10 et 300 nM (10, 20, 30, 50, 60, 85, 100, 150, 200 et 300) ont été dosées en triplicata à l'aide de la TÉI. L'obtention de cette courbe nous a permis d'estimer les concentrations de métal à ajouter dans nos milieux d'expositions lors des tests de toxicité et de prise en charge.

2.9.3.2.1 : <u>Influence de la lumière et de la température sur l'atteinte de l'équilibre</u> d'une solution d'argent en présence de MOD

L'analyse préliminaire de nos résultats nous a permis de voir que la spéciation de l'argent en présence de MOD variait en fonction du temps. Un suivi de l'évolution de la concentration de métal libre sur 96 h a donc été fait pour certaines concentrations ([Ag]_{tot} = 10, 30, 50 et 80 nM). De plus, pour déterminer les causes de ces changements, une expérience voulant démontrer l'effet de la lumière et de la température sur les milieux abiotiques, soit sur des milieux MHSM ne contenant que de l'argent et des substances humiques, a été effectuée. Pour cela, trois séries de trois erlenmeyers différents contenant chacun 200 mL de milieu MHSM en présence de MOD et d'argent ([Ag]_{tot} = 10 nM) ont été préparées. Chaque série a été déposée dans un endroit différent, soit une à 20°C exposée à la lumière, une à 20°C à la noirceur et une à 4°C à la noirceur. Il n'a pas été possible de réaliser une expérience à 4°C à la lumière, aucun endroit n'étant disponible pour ceci dans nos laboratoires. La concentration de métal libre a été mesurée dans tous les cas aux temps 0 et 96 h. En comparant les résultats obtenus, il nous a été permis de voir si la lumière ou la température engendrait un effet sur la formation du complexe Ag-MOD.

2.9.3.3 : Cas du cadmium

Le cadmium ayant fait l'objet de plusieurs études dans nos laboratoires, le protocole que nous avons utilisé pour doser la concentration de cadmium libre en solution est celui utilisé par mes prédécesseurs (Fortin, 1996; Boily, 2004; Maloney, en évaluation). Il ressemble à celui utilisé pour doser l'argent libre, mais puisque les propriétés chimiques de ces deux métaux diffèrent, certaines solutions utilisées, tout comme leur temps de passage à l'intérieur de la colonne, varient. De plus, le volume d'échantillon dont nous disposions étant plus faible que lors des tests avec l'argent, il fallait réajuster la méthode selon nos besoins. Ainsi, à la suite du rinçage effectué après la conversion de la résine sous sa forme sodique, une solution de NaNO₃ 0,2 M a été passée comme électrolyte fort jusqu'à la stabilisation du pH, soit pendant environ deux minutes. Le passage de l'échantillon survenait après l'ajustement de la force ionique à une valeur de 0,2 éq/L à l'aide d'une solution de NaNO₃. Le temps de passage avant d'atteindre l'état stationnaire pour ce métal est très court. En effet, un temps de quatre minutes (V = 20 mL) suffit pour que l'état stationnaire soit atteint. L'élution se faisait à l'aide d'une solution d'acide nitrique 1,5 M, pendant quatre minutes, à un débit de 0,5 mL/min. L'éluat était encore une fois recueilli dans un flacon de 20 mL (Opticlear, borosilicate) préalablement pesé. Une fois l'éluat recueilli, ce dernier était repesé et avec la densité de la solution d'acide nitrique utilisée (1,055 g/mL), il était possible de déterminer le volume exact d'éluat. La conversion afin d'obtenir la quantité de métal libre en solution était effectuée de la même manière qu'en présence d'argent.

3.0 : <u>Prise en charge et toxicité du cadmium chez l'algue verte</u> <u>Pseudokirchneriella subcapitata</u> : Résultats et Discussion

Le Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ) a développé une méthode normée pour mesurer la toxicité de différents contaminants sur les organismes aquatiques. Afin de déterminer la toxicité du cadmium sur l'algue verte Pseudokirchneriella subcapitata, nous avons utilisé cette méthode, en abaissant la densité cellulaire initialement présente en solution de 10 000 à 2500 cellules/mL. Des concentrations de cadmium total de 8, 15, 23, 29, 40, 50, 60, 81, 128, 153, 227 et de 270 nM ont été testées et nous avons fait un suivi de la croissance, des quotas cellulaires et de la quantité de métal adsorbée en fonction du temps, sur une période maximale de 96 h. La baisse de densité utilisée avait pour but de quantifier l'effet d'une différence d'inoculum dans un milieu, très peu d'études ayant obtenu de résultats sur le sujet. En abaissant ce paramètre, nous croyions pouvoir diminuer la présence d'exsudats complexant le métal d'intérêt, en plus de diminuer l'épuisement de celui-ci en solution, lié aux pertes par absorption/adsorption par l'algue. Ainsi, la prise en charge, l'adsorption et la toxicité seraient plus élevées, une plus grande proportion de métal libre étant disponible pour l'organisme. Ces résultats devraient être davantage proches de ce qui se passe réellement dans la nature, la densité que nous avons utilisée étant plus représentative de celle qui est retrouvée dans nos écosystèmes aquatiques (milieu oligotrophe) que les densités habituellement utilisées dans les tests de toxicité classiques.

3.1 : Évaluation de la concentration de Cd²⁺ retrouvée en solution en fonction du temps

Pour évaluer l'impact d'un abaissement de la densité, il fallait d'abord être capable de déterminer la quantité de cadmium libre disponible pour l'organisme à l'étude. Nous y sommes parvenus à l'aide d'une technique de chromatographie miniaturisée, nommée « technique d'échange ionique » (TÉI, cf. section 2.9 : <u>Technique d'Échange Ionique</u>). Cependant, avant de pouvoir utiliser cette méthode pour le métal d'intérêt, il fallait d'abord la calibrer, en mesurant le coefficient de distribution. Ceci a été possible en faisant passer dans chacune des colonnes (n = 9) un milieu CEAEQ d'une concentration initiale de

cadmium total de 100 nM. Puisque notre solution ne contenait pas d'EDTA, la concentration en Cd^{2+} représentait 83 % de la concentration total de cadmium en solution, compte tenu de la complexation par les nitrates, présents à de fortes concentrations (proportion calculée à l'aide du logiciel MINEQL⁺). Le coefficient de distribution moyen obtenu était de 0.41 ± 0.05 L/g.

Si on compare ce résultat à ceux obtenus par d'autres utilisateurs de cette technique ayant également étudié le comportement du cadmium, on s'aperçoit que cette valeur est nettement plus faible qu'à l'habitude (cf. Tableau 3.1). Ceci laisse croire que la résine que nous avons utilisée avait une capacité d'adsorption inférieure à la moyenne. Cette différence pourrait être attribuée à deux phénomènes distincts. Tout d'abord, il se peut que la résine contenue dans les différentes colonnes se soit dégradée à la suite des nombreux passages d'acide nitrique nécessaires pour nettoyer le montage avant chaque utilisation. Il est également possible qu'il y ait eu une perte de billes de résine lors de la délicate confection de chaque colonne. Ainsi, une baisse de la qualité ou une quantité erronée de résine présente dans chaque colonne pourrait engendrer une plus faible capacité de rétention du métal, d'où un coefficient plus faible.

Tableau 3.1 : Coefficients de distribution pour le cadmium obtenus par différents utilisateurs

| Coefficient de distribution $\lambda \pm \text{Écart-type}$ (L/g) | Référence | |
|---|-------------------------|--|
| $0,41 \pm 0,05$ | Cette étude. | |
| 0.76 ± 0.06 | Laforte, 2003. | |
| 0.86 ± 0.02 | Boily, 2004. | |
| 0.70 ± 0.06 | Fortin, 1996. | |
| $0,88 \pm 0,08$ | Maloney, en évaluation. | |

Lorsque nous avons obtenu le coefficient dont nous avions besoin pour l'utilisation de cette technique, nous avons fait l'analyse de différents échantillons recueillis au début et à la fin de l'exposition de *Pseudokirchneriella subcapitata* au cadmium, pour en mesurer la concentration de métal libre retrouvée en solution (cf. Figure 3.1). Ceci nous a permis de déterminer l'influence des exsudats sur la complexation du cadmium, la quantité de

déchets métaboliques étant plus importante avec un temps d'exposition plus long. À l'observation de la figure 3.1, on remarque qu'au temps 0, la concentration de métal libre mesurée est proportionnelle à la concentration de métal total retrouvée en solution. Ceci semble également vrai pour les mesures effectuées à la fin du temps d'exposition. Cependant, si on diminue l'échelle employée, on remarque qu'aux concentrations inférieures à 50 nM de cadmium total, les valeurs obtenues ne sont pas significativement différentes de 0 ($m_1 = 0.06$; voir encadré à l'intérieur de la figure 3.1). Par la suite, on observe une cassure et la concentration de métal libre augmente de façon proportionnelle à la concentration de métal présent en solution ($m_2 = 0.19$). Si on compare les deux temps d'exposition entre eux (i.e. comparaison des pentes à partir des régressions linéaires), on remarque que la concentration de Cd^{2+} diminue de façon importante dans le temps pour une gamme de concentration de cadmium total se situant entre 0 et 270 nM. Ainsi, 52 ± 6 % du cadmium se retrouve sous sa forme libre au temps 0 alors que seulement 18 ± 1 % est libre à la fin du temps d'exposition.

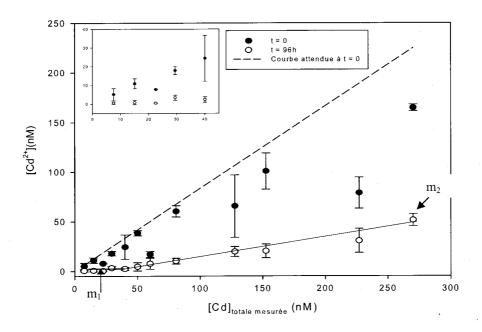


Figure 3.1 : Évolution de la concentration de métal libre en solution à la suite d'une exposition de *Pseudokirchneriella subcapitata* à diverses concentrations totales de cadmium. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Selon les calculs effectués avec le logiciel MINEQL⁺, au temps 0, dans le milieu du CEAEQ, 83,3 % du cadmium se retrouve sous sa forme libre. Ceci est une proportion relativement plus élevée si nous la comparons à celle obtenue par dosage à ce même pas de temps, soit 52 ± 6 %. Cependant, certains points de la droite ont contribué à tirer la régression obtenue vers le bas, spécialement en ce qui concerne ceux représentant les concentrations les plus élevées. Ainsi, la valeur mesurée est inférieure à celle attendue, quoiqu'en général, la tendance observée se situe près de celle attendue. De plus, des solutions étalons composées du milieu CEAEQ de concentration en cadmium connue ont été analysées (n = 3) avant chaque expérimentation et ont donné les valeurs espérées (cf. Tableau 3.2). La composition particulière du milieu du CEAEQ pourrait en partie expliquer la légère différence observée entre les résultats prédits selon le modèle de spéciation et ceux obtenus à la suite du passage des échantillons à la TÉI. En effet, le fer présent dans ce milieu est instable en absence d'EDTA, comme il en est question dans ce cas-ci. Il peut donc former des précipités et des colloïdes, qui peuvent par la suite adsorber le cadmium et le rendre non disponible.

Tableau 3.2 : Concentrations de cadmium total mesuré, de cadmium libre calculées et de cadmium libre mesurées à la suite du passage de solutions standards avant chaque utilisation de la résine.

| Date | [Cd] _{tot. mes.} | $[Cd^{2+}]_{mes.} \pm ET$ | [Cd ²⁺] _{calc.} |
|------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| | (nM) | (nM) | (nM) |
| 17/02/2006 | 163 | 135 ± 3 | 136 |
| 17/03/2006 | 193 | 161 ± 6 | 161 |
| 24/03/2006 | 97 | 77 ± 4 | 81 |

Qu'importe la raison expliquant la différence observée entre la valeur mesurée et la valeur attendue, ce phénomène n'empêche pas de tirer une conclusion importante. En effet, si on compare les résultats obtenus au temps 0 à ceux obtenus à 96 h, on observe une différence significative (test de Student, t=2,5; p=0,02), le pourcentage de métal libre mesuré passant de 52 ± 6 % au début du temps d'exposition à 18 ± 1 % à la fin de l'expérimentation pour la gamme de concentration de cadmium total étudiée ([Cd]_{tot} = 0 à

270 nM). Il se produit ainsi un changement de complexation du cadmium au cours du temps. Une augmentation de la densité cellulaire présente en solution pourrait expliquer cette diminution de la biodisponibilité du cadmium. En effet, comme en témoigne la figure 3.2 qui représente le pourcentage de Cd²⁺ libre (i.e. [Cd²⁺] mesurée à 96 h/ [Cd]_{total} mesurée à 96 h x 100) selon la densité algale mesurée dans chaque milieu, le pourcentage de cadmium libre serait inversement proportionnel à la densité cellulaire présente en solution. Par contre, il n'y a pas de différence significative entre les points. Une concentration importante d'algues signifie du même coup une présence croissante d'exsudats dans le milieu, complexant de plus en plus le métal en solution. D'ailleurs, il a été démontré que certaines algues, telles que Chlamydomonas reinhardtii et Emiliania huxleyi, peuvent conditionner leur milieu en relâchant certains molécules organiques (e.g. sidérophores et ferrichromes pour le Fe), dans le but de rendre leur habitat plus propice à leur croissance (Leal et al. 1999; Vasconcelos et Leal, 2001; Vasconcelos et al. 2002; Rijstenbil et Gerringa, 2002). Aucun article ne mentionne ce phénomène chez l'algue verte Pseudokirchneriella subcapitata. Cependant, l'exsudation de ligands est un phénomène généralisé chez le phytoplancton, ce qui signifie qu'il est fort probable que cette algue excrète également des molécules organiques susceptibles d'influencer la complexation du cadmium en fonction du temps. Ces résultats concordent d'ailleurs avec ceux obtenus par Boily (2004), ce dernier ayant observé une baisse d'environ 70 % du cadmium libre à la suite d'une exposition de l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii au cadmium pendant 72 h.

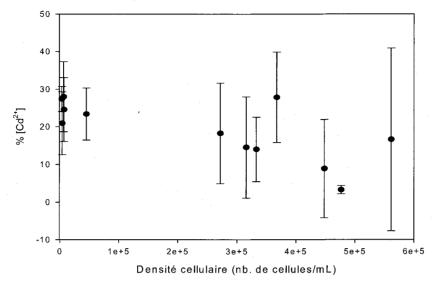


Figure 3.2 : Pourcentage de cadmium libre retrouvé en solution selon la densité cellulaire mesurée au temps d'exposition t = 96 h. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures, en tenant compte de la propagation d'erreur.

Les résultats de prise en charge et de toxicité étant habituellement présentés en fonction de la concentration de métal libre retrouvée en solution au temps déterminé, ces résultats seront réutilisés pour évaluer les quotas cellulaires et les CE50s. Ceci permettra du même coup de vérifier si le modèle de l'ion libre est respecté.

3.2 : Quotas cellulaires chez Pseudokirchneriella subcapitata exposé au cadmium

Une fois notre méthode pour mesurer la quantité de métal libre en solution au point, nous nous sommes concentrés sur l'évaluation des quotas cellulaires chez l'espèce phytoplanctonique *Pseudokirchneriella subcapitata* exposée au cadmium. Pour se faire, nous avons repris le protocole du CEAEQ, tout en ayant abaissé la densité cellulaire initialement présente. Ceci permettait de quantifier l'effet d'une différence d'inoculum sur les paramètres influençant la toxicité du cadmium, dont l'absorption. Ainsi, nous avons exposé nos cultures à différentes concentrations de métal total (Cd_{tot}: 8, 15, 23, 29, 40, 50, 60, 81, 128, 153, 227 et 270 nM) et nous avons effectué un suivi de la prise en charge de l'algue en fonction du temps. Les résultats sont présentés à la figure suivante, selon trois paramètres distincts, soit par rapport à la concentration de métal initialement présent dans

le milieu (cf. Figure 3.3A), par rapport à la concentration de métal mesurée à chaque pas de temps (cf. Figure 3.3B) et par rapport à la concentration de métal libre mesurée à la fin du temps d'exposition (cf. Figure 3.3C). Le but de cette étape était de suivre la cinétique d'entrée du cadmium à long terme à l'intérieur de la cellule.

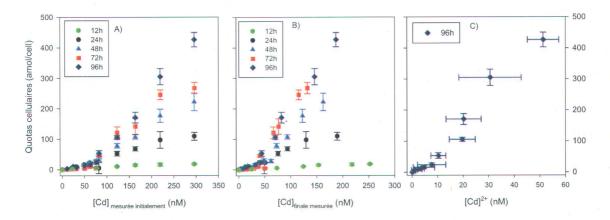


Figure 3.3 : Quotas cellulaires de *Pseudokirchneriella subcapitata* à la suite d'une exposition au cadmium, évalués selon la concentration initiale de métal en solution (A), selon la concentration mesurée à chaque pas de temps (B) et selon la concentration de métal libre mesurée à 96 h (C). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

À l'observation de ces figures, on se rend compte qu'il existe une différence entre les courbes si on évalue les quotas cellulaires selon la concentration initiale de métal en solution, selon la concentration présente en solution à chaque pas de temps ou selon la concentration de métal libre mesurée à la fin du temps d'exposition. Ainsi, les quotas cellulaires augmentent dans le temps par rapport à la concentration initiale de métal (cf. Figure 3.3A). Cette tendance diffère légèrement par rapport à celle qui se dessine quand on considère la concentration mesurée à chaque pas de temps (cf. Figure 3.3B), où les quotas augmentent pour atteindre des niveaux semblables entre 72 h et 96 h. En d'autres mots, les courbes obtenues aux temps 72 et 96 h se recoupent et il n'existe aucune différence significative sur les pentes de ces deux dernières (test de Student, t = 1,73; p = 0,11). Cette observation est d'ailleurs visible à la figure 3.4, celle-ci présentant les quotas cellulaires en fonction du temps pour chaque concentration testée. Nous y observons qu'il n'existe aucune différence significative entre les valeurs mesurées à 72 h et celles mesurées à 96 h. L'atteinte d'un état stationnaire dans les quotas cellulaires à \sim 72 h est davantage

représentatif de la réalité qu'une prise en charge qui augmente constamment dans le temps comme celle obtenue en fonction de la concentration de métal initialement présent dans le milieu. La cellule ne peut continuer d'accumuler indéfiniment le cadmium à l'intérieur d'elle-même. Après un certain laps de temps, il se produit un état stationnaire, où la quantité de métal qui entre égale à la quantité de métal qui sort de la cellule (Errécalde et Campbell, 2000).

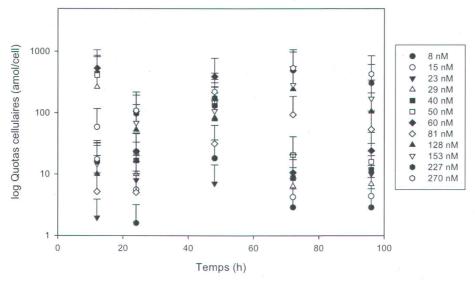


Figure 3.4 : Évolution des quotas cellulaires dans le temps pour chaque concentration de cadmium total testé lors de l'exposition de l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* à ce métal. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures.

Si on évalue les quotas cellulaires en fonction de la concentration de métal libre mesurée à la suite du temps d'exposition (cf. Figure 3.3C), on se rend compte qu'il existe une cassure apparente dans la courbe obtenue. Les quotas obtenus aux faibles concentrations de métal libre (≤ 10 nM), sont extrêmement faibles, alors qu'ils augmentent très rapidement aux concentrations supérieures. Si on compare cette courbe à celle évaluée selon la concentration de métal retrouvée en solution à 96 h (cf. Figure 3.3B), on remarque que ces deux courbes ont la même allure. Il est important de rappeler que la concentration de métal libre en solution pour le cadmium n'a été caractérisée qu'à un temps d'exposition de 96 h, le temps d'analyse et le volume d'échantillon nécessaire étant trop élevés pour effectuer ces tests aux autres pas de temps.

Pour davantage caractériser la cinétique d'entrée du cadmium à l'intérieur de la cellule phytoplanctonique, les résultats de quotas cellulaires évalués par rapport à la concentration de métal dissous présent à chaque pas de temps ont été repris pour être présentés de façon individuelle pour les temps d'exposition de 12, 24, 48, 72 et 96 h (cf. Figures 3.5A à E). On constate alors que pour les concentrations utilisées lors de ce test, il y a une relation linéaire entre la prise en charge et la concentration de métal retrouvée en solution pour des temps d'exposition inférieurs ou égaux à 24 h. Par la suite, on observe une cassure dans cette relation : pour les faibles concentrations (≤ 50 nM), une quantité de métal maximale semble absorbée (variant entre 0 et 50 amol/cellule), alors que pour les concentrations plus fortes (≥ 50 nM), la prise en charge continue d'augmenter (cf. Figure 3.5F).

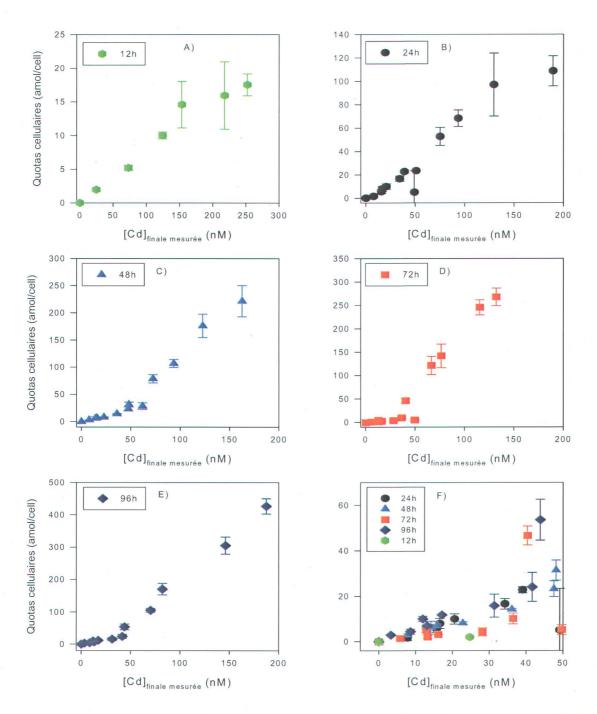


Figure 3.5: Quotas cellulaires obtenus à chaque pas de temps en fonction de la concentration de cadmium dissous présente dans le milieu. La figure A montre les résultats pour un temps d'exposition de 12 h, la figure B pour t = 24 h, C pour t = 48 h, D pour t = 72 h, E pour t = 96 h alors que la figure F illustre les quotas cellulaires obtenus à chaque pas de temps pour les faibles concentrations testées. Les barres d'erreur représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures.

Pour interpréter le changement de pente observé dans les quotas cellulaires avec une augmentation de la concentration de cadmium initialement présent en solution, nous avons envisagé trois explications. Tout d'abord, nous avons examiné de plus près le taux d'entrée du cadmium (i.e. la différence obtenue entre les quotas cellulaires mesurés entre deux intervalles de temps / l'intervalle de temps en question) en fonction de la concentration de métal présent dans le milieu à chaque pas de temps (cf. Figure 3.6). Dans tous les cas, on observe exactement la même tendance qu'en fonction de la prise en charge. Aux concentrations inférieures à 50 nM, le flux de cadmium se dirigeant à l'intérieur de la cellule est extrêmement faible et constant, et ce, à chaque pas de temps testé (cf. Figure 3.5F). De ce fait, lorsque la concentration de cadmium est inférieure à 50 nM, Pseudokirchneriella subcapitata semble capable de minimiser la quantité de Cd entrant à l'intérieur de sa structure. Pour les temps d'exposition supérieurs à 12 h, le flux d'entrée de ce métal augmente avec un accroissement de la concentration présente dans le milieu pour les concentrations de cadmium en solution supérieures à 50 nM, la pente de cette relation étant nettement plus élevée que celle pour les concentrations inférieures à 50 nM. Ceci laisse croire que moins de complexation a été observée dans ce dernier cas et que la proportion de métal libre en solution est croissante. Il y aurait donc plus de métal de disponible pour l'algue, ce qui fait en sorte que cette dernière n'est plus capable de contrôler l'entrée de cadmium dans son cytoplasme. Ainsi, puisque le flux est plus élevé, la quantité de métal s'accumulant à l'intérieur de la cellule l'est également, d'où les résultats de quotas cellulaires obtenus. Une revue de littérature effectuée sur ce sujet n'a pas permis de trouver de références ayant observées un phénomène semblable à celui que nous avons obtenu. Ce serait ainsi la première fois qu'un tel résultat serait documenté.

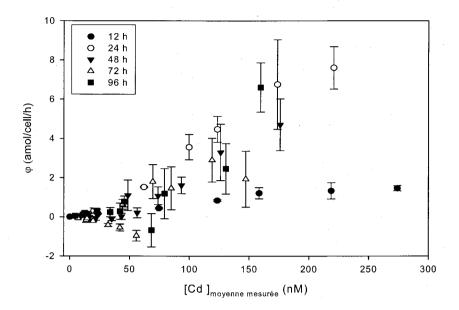


Figure 3.6 : Flux d'entrée du cadmium à l'intérieur de la cellule selon la concentration moyenne de métal présent en solution à chaque pas de temps. Les barres d'erreur représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures, en ayant tenu compte de la propagation d'erreur.

Le fait que le flux de cadmium augmente plus rapidement passé un certain seuil (autour de 50 nM) peut sembler assez étonnant. En effet, aux concentrations les plus élevées, la croissance algale est diminuée, si ce n'est pas complètement atténuée. Le métabolisme des cellules est alors ralenti. Malgré cela, les cellules continuent quand même de prendre en charge le métal en solution. Ce phénomène pourrait être attribué à un changement survenu dans l'intégrité de la membrane cellulaire (ex. : augmentation de la perméabilité de la cellule ou du nombre de transporteurs dans le temps), ce qui ferait en sorte que cette dernière ne jouerait plus son rôle de barrière et que davantage de métal serait pris en charge aux concentrations les plus élevées. D'ailleurs, les résultats obtenus à t = 12 h renforce cette hypothèse puisque le flux mesuré à ce laps de temps y est plus faible comparativement aux autres pas de temps testés. Cette hypothèse semble davantage réaliste que la première, le cadmium étant reconnu comme étant l'un des métaux induisant le plus de changements morphométriques sur les cellules (Fernandez-Leborans et Novillo, 1995; Nishikawa *et al.* 2003).

Cette accumulation de métal par des cellules en mauvais état physiologique a déjà été observée chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii, de même que chez les espèces Chlorella vulgaris et Scenedesmus quadricauda exposées à des concentrations croissantes de cadmium (Harris et Ramelow, 1990; Adhiya et al. 2002). Ce résultat signifie donc que les algues en moins bonnes conditions accumulent davantage de métal que celles en excellente santé. Cependant, ces auteurs n'ont effectué aucune distinction entre le métal absorbé et celui adsorbé par la cellule, ce qui pourrait amplifier l'effet observé. Le comportement de l'algue en présence de fortes concentrations de cadmium pourrait expliquer ce qui a été observé. En effet, nous avons vu auparavant que pour les concentrations les plus élevées, les flux d'entrée du cadmium est constant dans le temps, à partir de t = 24 h. De plus, à ces concentrations, la croissance est atténuée étant donné la grande toxicité de ce métal chez le phytoplancton. Ainsi, si le flux d'entrée du cadmium est constant dans le temps et que le taux de croissance diminue avec une augmentation de la concentration, la biodilution par la croissance est moindre, ce qui fait en sorte que le taux d'entrée apparent du cadmium est plus élevé. Ceci expliquerait donc les valeurs plus élevées de quotas cellulaires observées aux fortes concentrations de cadmium total. La modélisation de ce phénomène à l'aide d'un logiciel informatique permettrait de déterminer si cette hypothèse est plausible. Des études plus poussées (ex.: suivi des changements morphologiques observés chez la cellule à la suite d'une exposition au cadmium...) seraient néanmoins nécessaires afin de conclure avec certitude quelle/quelles hypothèse/s il faudrait retenir.

Toujours dans le but de déterminer l'influence d'une variation de densité cellulaire dans les milieux d'exposition, nous avons comparé nos résultats de prise en charge obtenus à 96 h selon la concentration de métal mesurée à la fin du temps d'exposition à ceux obtenus par F. Maloney (en évaluation), ce dernier ayant utilisé la méthode normée du CEAEQ pour déterminer la prise en charge et la toxicité du cadmium chez l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* (cf. Figure 3.7). Il est cependant important de mentionner que ces deux études ont été réalisées à un intervalle d'environ un an, ce qui signifie qu'il peut y avoir un certain biais dans les résultats, les algues ne provenant pas de la même culture-mère. Ainsi, à l'observation de cette figure, on constate que les quotas cellulaires

sont semblables pour les concentrations totales de cadmium inférieures à 50 nM. Par la suite, la quantité de métal absorbée à l'intérieur de la cellule est plus faible lorsque la densité cellulaire de départ est élevée. Il est important de rappeler que ces résultats valent uniquement pour un temps d'exposition de 96 h, les valeurs pour la méthode normée n'étant pas disponibles aux autres pas de temps. Ce résultat coïncide avec notre hypothèse de départ, voulant que la prise en charge soit plus élevée avec un inoculum plus faible. En ayant une densité plus faible à l'intérieur de la culture tout au long de l'expérience, il y a vraisemblablement moins d'exsudats en solution pouvant complexer le métal, ce qui le rend plus biodisponible. Les cellules peuvent donc accumuler davantage de métal dans ces circonstances. Härdstedt-Roméo et Gnassia-Barelli (1980) avaient déjà observé une diminution de l'accumulation de cuivre et de cadmium chez l'espèce marine *Cricosphaera elongata* à la suite d'une exposition à un milieu contenant des exsudats. Aucune étude récente de ce genre n'ayant été publiée sur le sujet, cette hypothèse ne peut être renchérit par d'autres auteurs ayant observé le même phénomène. Cependant, nos résultats portent à croire que celui-ci est réel.

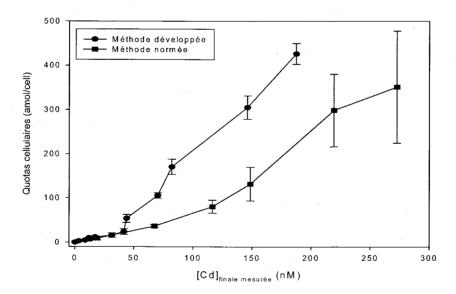


Figure 3.7: Comparaison des quotas cellulaires obtenus après 96 h à la suite d'une exposition au cadmium à l'aide des méthodes développée (cercles) et normée (carrés), ces derniers résultats ayant été fournis par Frédéric Maloney (communication personnelle). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

3.3 : Adsorption du cadmium par Pseudokirchneriella subcapitata

La prochaine étape de ce protocole consistait à évaluer l'adsorption du cadmium chez l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*. Pour y arriver, à chaque concentration testée, la quantité de métal adsorbée à la surface de la cellule a été quantifiée en fonction du temps (t = 12, 24, 48, 72 et 96 h), par rapport aux mêmes paramètres cités précédemment, soit par rapport à la concentration de métal initialement présent en solution (cf. Figure 3.8A), par rapport à la concentration de métal mesurée à chaque pas de temps (cf. Figure 3.8B) et par rapport à la concentration de métal libre mesurée à la fin du temps d'exposition (cf. Figure 3.8C). Les résultats sont présentés selon une échelle log, afin de mieux visualiser l'ensemble des données.

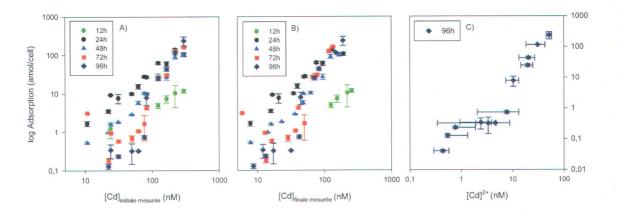


Figure 3.8: Adsorption de cadmium par *Pseudokirchneriella subcapitata* exposée à différentes concentrations de ce métal, exprimée par rapport à la concentration de cadmium initialement mesurée (A), à la concentration de cadmium mesurée à chaque pas de temps (B) et à la concentration finale de cadmium libre Cd²⁺ (C). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Dans ce cas-ci, contrairement au cas des quotas cellulaires, les profils d'adsorption du cadmium par la cellule sont semblables, peu importe si on évalue l'adsorption selon la concentration de métal initialement présent en solution (cf. Figure 3.8A) ou selon la concentration de métal mesurée à chaque pas de temps (cf. Figure 3.8B). Ainsi, on observe qu'après 12 h, l'adsorption est linéaire et elle est proportionnelle à la concentration de métal présente dans le milieu. C'est à ce pas de temps que l'adsorption est la plus faible.

Après 24 h, la relation entre l'adsorption et la concentration présente en cadmium dans le milieu demeure linéaire, comme c'est le cas à chaque pas de temps testé. Cependant, dans ce cas-ci, l'adsorption du cadmium est maximale. Par la suite, l'adsorption diminue dans le temps pour les plus faibles concentrations utilisées alors qu'elle semble stable aux concentrations les plus élevées. Dans tous les cas, les concentrations utilisées étaient trop faibles pour saturer tous les sites d'adsorption et atteindre un plateau.

Deux explications sont possibles afin d'expliquer la variation d'adsorption dans le temps lorsque la concentration de cadmium mesurée est inférieure à 100 nM. Tout d'abord, cette variation pourrait être causée par un changement dans la surface de l'algue. En effet, des résultats précédemment publiés ont démontré que le nombre de charges négatives à la surface de la membrane cellulaire diminuait avec le temps (Lukiewics et Korohoda, 1965; Davies, 1974; Bates et al. 1982). Ce changement serait attribué à une altération des composantes des protéines et des polysaccharides durant le cycle cellulaire. Dans notre cas, un nombre plus petit de charge négative signifie un plus faible taux d'adsorption puisque le contaminant à l'étude est un ion de charge positive. Cependant, cette affirmation ne peut être confirmée puisque la charge de la cellule n'a pas été évaluée dans cette étude. La baisse d'adsorption pourrait également être attribuée à un changement de spéciation dans le milieu de culture. En effet, nous avons déjà démontré que la spéciation dans le milieu se transformait de façon considérable dans le temps (cf. Figure 3.1), probablement à cause d'un fort relâchement d'exsudats. Le cadmium se complexant avec ces ligands, ceci favorise la désorption du métal de la surface cellulaire (Butler et al. 1980). Il est raisonnable de croire que le relâchement d'exsudats augmente en fonction du temps et qu'on observe donc une baisse de l'adsorption entre t = 24 et à t = 96 h.

Pour ce qui est du profil de la courbe d'adsorption par rapport à la concentration de métal libre (cf. Figure 3.8C), son allure est plus linéaire que celles des deux autres figures présentées pour le même pas de temps (96 h). La cassure dans la tendance y est moins évidente, démontrant que le changement de spéciation du cadmium explique bien les profils d'adsorption observés dans les figures 3.8A et 3.8B. Toutefois, la persistance de cette cassure indique qu'un autre facteur entre en jeu. En effet, l'adsorption augmente avec

la concentration de Cd^{2+} selon une pente à peu près unitaire et ce jusqu'à ~ 10 nM. Au-delà de cette concentration, la pente est >> 1, ce qui signifie que la nature de la surface cellulaire (affinité des sites d'adsorption) est altérée.

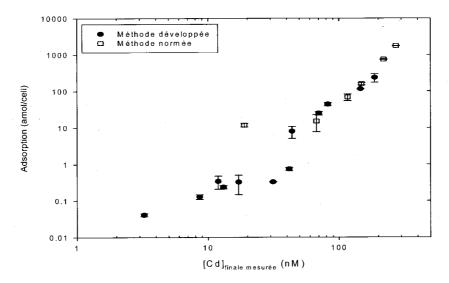


Figure 3.9 : Comparaison de la quantité de cadmium adsorbée par *Pseudokirchneriella subcapitata* après 96 h d'exposition à ce métal selon la méthode normée (carrés) et selon la méthode développée (cercles), ces derniers résultats ayant été fournis par Frédéric Maloney (communication personnelle). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

La comparaison des résultats d'adsorption obtenus à l'aide de la méthode développée avec ceux obtenus à l'aide de la méthode normée pour un temps d'exposition de 96 h (Figure 3.9) indique qu'il n'y a que peu de différence entre les deux courbes. À certaines concentrations, l'adsorption serait plus élevée avec la méthode normée. Cependant, il faudrait ajouter certains points aux deux courbes, principalement à des concentrations inférieures à 70 nM, pour s'assurer de l'exactitude de cette tendance. Considérant que les algues avaient environ la même surface cellulaire dans les deux cas, soit autour de 100 μm² et en présumant que la nature de la surface demeure semblable, pour que l'adsorption de cadmium par cellule soit identique entre les deux méthodes, il faut que la proportion de Cd²+ soit également la même pour une concentration totale dissoute donnée. On peut donc penser que la spéciation finale (i.e. à 96 h) est la même avec les deux méthodes par contre il demeure possible que la spéciation évolue différemment dans le temps pour atteindre une spéciation à peu près similaire à la fin.

3.4: Toxicité du cadmium chez Pseudokirchneriella subcapitata

Lors des tests de prise en charge et d'adsorption réalisés chez Pseudokirchneriella subcapitata en présence de cadmium, nous avons également évalué la toxicité de ce métal. Ainsi, nous avons effectué un dénombrement de la quantité de cellules présentes en solution à chaque 12 h sur la totalité du temps d'exposition. L'effet toxique d'un métal chez un organisme peut être illustré par une courbe dose-réponse. Il existe différents paramètres pour mesurer l'effet toxique : la mesure du taux de croissance (pente de la courbe de croissance) et la mesure du rendement (nombre de cellules). Celui pour lequel nous avons opté, qui est également le plus utilisé, est le rendement de la culture (cf. section 2.7 : Toxicité de l'argent chez Pseudokirchneriella subcapitata). Notre choix s'est porté vers ce dernier étant donné les écart-types moins importants obtenus avec cette méthode comparativement à ceux obtenus avec la mesure du taux de croissance. On a alors illustré la densité relative de l'algue (c'est-à-dire le rapport de la densité algale retrouvée dans les milieux contaminés sur la densité du témoin) par rapport à deux paramètres d'exposition différents, soit la concentration initiale de métal dans le milieu (cf. Figure 3.10A) et la concentration mesurée à chaque pas de temps (cf. Figure 3.10B). Les deux graphiques sont relativement similaires, excepté les légères différences de concentrations reliées aux pertes par biodilution (cf. Annexe 1).

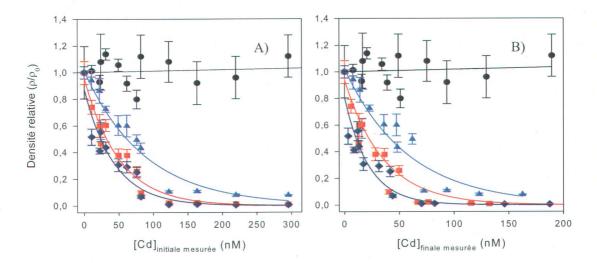


Figure 3.10: Courbes doses-réponses de *Pseudokirchneriella subcapitata* exposée à différentes concentrations de cadmium total. La figure A montre la croissance relative en fonction de la concentration de métal initialement présente en solution, alors que la figure B montre la croissance relative de l'algue en fonction de la concentration de métal restant en solution à chaque pas de temps. Les cercles correspondent à un temps d'exposition de 24 h, les triangles à t = 48 h, les carrés à t = 72 h alors que les losanges correspondent à t = 96 h. Les barres d'erreurs indiquent les écart-types sur les trois mesures.

Si on s'attarde à l'évolution des courbes dans le temps, on remarque d'abord que nous ne détectons aucune toxicité à la suite d'un temps d'exposition de 24 h des cellules algales de l'espèce *Pseudokirchneriella subcapitata*. Les effets sur la croissance apparaissent après un temps minimum de 48 h, pour s'amplifier par la suite. Ceci pourrait s'expliquer par la cinétique d'accumulation du métal à l'intérieur de la cellule. En effet, à la figure 3.11, qui représente le flux moyen d'entrée du cadmium en fonction du temps, on voit que le cadmium est très lentement accumulé par l'espèce phytoplanctonique *Pseudokirchneriella subcapitata*. Cependant, après un temps d'exposition de 24 h, on observe une augmentation du flux d'entrée du métal à l'intérieur de l'algue d'un facteur 4. L'écart-type est relativement élevée, mais peut s'expliquer par la fluctuation du flux mesuré par rapport à la concentration utilisée. Ainsi, dans les premières heures d'exposition, puisqu'il y a peu de métal d'accumulé à l'intérieur de la cellule, son métabolisme continue de fonctionner normalement. Par contre, on observe une poussée de métal pénétrant à l'intérieur de la cellule après un temps de 24 h. Cette augmentation subite

de concentration de métal à l'intérieur de l'algue ne peut qu'occasionner des effets néfastes sur la cellule et sur la croissance de l'algue. Ces effets ne se font cependant sentir qu'après un temps de 48 h. Ceci laisse croire que la toxicité du cadmium n'est pas immédiate et que ce métal agit lentement. Plus les algues sont exposées, plus elles sont sensibles au cadmium. À partir de 48 h, la toxicité accroît avec le temps, tout comme la prise en charge, qui n'a toujours pas atteint un état stationnaire. L'augmentation de la quantité de métal s'accumulant à l'intérieur de la cellule, liée au temps que prend le cadmium pour occasionner un effet, peut expliquer la hausse constante de toxicité dans le temps. Lorsque l'état stationnaire entre la quantité de métal entrant à l'intérieur de la cellule et la quantité de métal en ressortant sera atteint, tout laisse croire que la toxicité se stabilisera. L'utilisation de ce même protocole sur un temps d'exposition plus élevé permettrait de valider cette hypothèse.

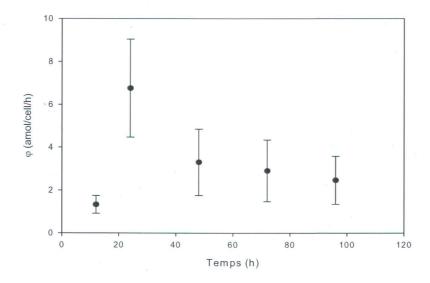


Figure 3.11: Flux d'entrée moyen du cadmium à l'intérieur de la cellule algale à chaque pas de temps testé pour une concentration de cadmium total équivalant à 220 nM. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures.

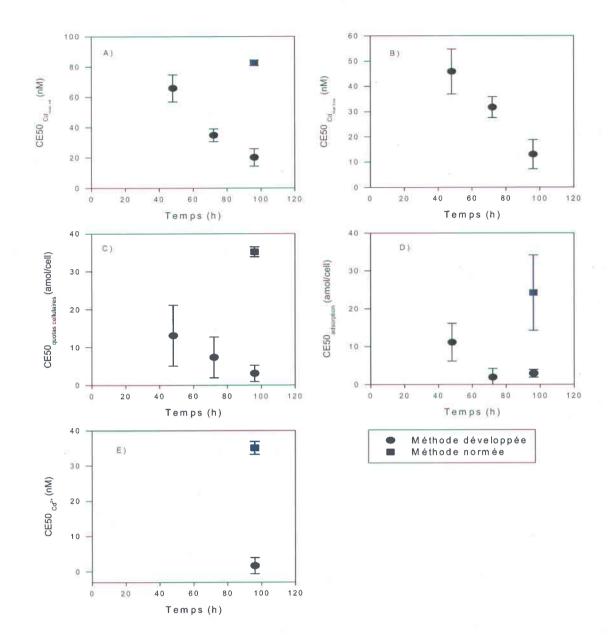


Figure 3.12: Comparaison des CE50s obtenues à l'aide de la méthode développée (cercles) à celles obtenues à l'aide de la méthode normée (carrés). La CE50 est exprimée par rapport à la concentration de cadmium mesurée initialement (A), à la concentration de cadmium mesurée à chaque pas de temps (B), aux quotas cellulaires de cadmium (C), à la quantité de cadmium adsorbé (D) et par rapport à la quantité de cadmium libre mesurée (E). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % sur les trois mesures.

À partir de ces courbes doses-réponses, il nous a été possible de déterminer les CE50s pour l'algue utilisée, c'est-à-dire la concentration de métal occasionnant une baisse de 50 % du taux global de croissance de la population. Ce paramètre a été mesuré par rapport à différentes variables, soit en fonction de la concentration de métal initialement présent en solution (cf. Figure 3.12A), de la concentration de métal restant en solution à chaque pas de temps (cf. Figure 3.12B), des quotas cellulaires (cf. Figure 3.12C), de la quantité de cadmium adsorbé à la surface cellulaire (cf. Figure 3.12D) et de la concentration de métal libre mesurée à l'aide de la technique d'échange ionique (cf. Figure 3.12E). Les valeurs de CE50s obtenues ont par la suite été comparées à celles obtenues à l'aide de la méthode normée. Ceci nous a ainsi permis de déterminer si la densité cellulaire initialement utilisée est une variable importante à considérer dans des tests de toxicité.

À l'observation de la figure 3.12A, qui présente les résultats de toxicité en fonction de la concentration de métal présent initialement en solution, on voit que les CE50s diminuent dans le temps, ce qui signifie que la toxicité augmente. Aucune valeur de CE50 n'a pu être déterminée à un temps de 24 h, ce qui concorde avec les courbes concentrationréponse présentées précédemment. Si on compare nos résultats à ceux de la méthode normée, on s'aperçoit qu'à un temps de 96 h, la toxicité est plus élevée avec notre méthode. Il est impossible de comparer les valeurs de CE50s pour les autres pas de temps, ces valeurs n'ayant pas été mesurées pour la méthode normée. Cependant, on voit que notre méthode est plus sensible, et ce, à partir d'un temps d'exposition de 48 h. En d'autres mots, ceci signifie que la toxicité est plus élevée à partir de ce temps, si on compare chaque CE50 à la valeur de CE50 obtenue à 96 h avec la méthode normée. Cette même tendance est observée si on évalue la toxicité en fonction de la quantité de cadmium adsorbé à la cellule (cf. Figure 3.12D) ou selon la concentration de métal retrouvée en solution à chaque pas de temps (cf. Figure 3.12B). Cependant, dans ce cas-ci, on ne peut comparer nos résultats avec ceux obtenus avec la méthode normée, cette dernière n'offrant de valeurs de CE50 qu'après 96 h. En ce qui concerne l'évolution de la toxicité évaluée selon la quantité de métal pris en charge par la cellule (cf. figure 3.12C), celle-ci augmente également dans le temps, quoiqu'il n'y ait aucune différence significative entre les valeurs obtenues. Néanmoins, toutes les valeurs calculées sont plus faibles qu'avec la méthode normée.

Finalement, la toxicité a également été évaluée en fonction de la quantité de métal libre retrouvée en solution (cf. Figure 3.12E). Puisque seuls les filtrats récupérés à la fin du temps d'exposition ont été analysés, nous ne pouvons suivre l'évolution de la toxicité dans le temps selon ce paramètre. Cependant, à 96 h, on s'aperçoit encore une fois que la CE50 obtenue avec la méthode développée est grandement inférieure à celle obtenue par la méthode normée. Il est assez surprenant de voir qu'à une densité cellulaire de 2500 cellules/mL, cela prend une concentration interne plus faible de métal pour avoir le même effet qu'à une densité cellulaire plus élevée, soit de 10 000 cellules/mL. Logiquement, les CE50s en fonction de [Cd²⁺] auraient dues être équivalentes. Malheureusement, nous n'avons pas d'hypothèse expliquant ce résultat. En résumé, peu importe par rapport à quelle variable la toxicité a été évaluée, les valeurs de CE50s sont toujours plus faibles lorsque l'on utilise un inoculum plus petit, soit à l'aide de la méthode que nous avons développée. Cette tendance est de plus en plus évidente avec un temps d'exposition plus grand, la toxicité étant de plus en plus élevée en fonction du temps avec la nouvelle méthode. Il est important de mentionner que la différence de toxicité observée dans le temps existe peut-être également avec la méthode normée, mais ces données ne sont pas disponibles.

Conformément à nos attentes, on observe une toxicité plus élevée chez l'inoculum plus faible, obtenu à l'aide de la méthode développée. Ceci peut s'expliquer par une biodilution moins importante, ce qui signifie une concentration d'exposition plus stable et par le fait même, une plus grande biodisponibilité du métal dans de telles conditions. En effet, la présence d'une plus grande densité d'algues, comme dans le cas de la méthode normée, occasionnerait un relâchement de déchets métaboliques plus important agissant comme ligands en solution. Ceci diminue ainsi la quantité de métal libre en solution, ce qui signifie, selon le modèle de l'ion libre, une toxicité plus faible. Cette affirmation est renforcée par les résultats présentés à la section 3.1 montrant l'évolution de la concentration de métal libre selon la concentration de métal présent en solution. En effet, on y voit qu'une fois le temps d'exposition terminé, on retrouve très peu de cadmium libre dans le milieu pour les faibles concentrations testées. Ces concentrations (≤ 30 nM) correspondent à celles atténuant le moins la croissance des algues, ce qui signifie une

densité plus élevée et par le fait même, un plus fort relâchement de ligands potentiels. Aux concentrations métalliques plus élevées, le phénomène contraire se produit. En effet, la croissance est quasi-nulle, ce qui engendre un plus faible relâchement d'exsudats, d'où une proportion de métal libre retrouvée dans le milieu relativement plus élevée. Ainsi, en inoculant nos milieux de culture avec une densité cellulaire plus petite, les ligands relâchés par les algues sont en moins grandes quantités, ce qui complexe moins le cadmium en solution, le rendant plus disponible. Toutefois nos résultats d'adsorption indiquaient que la spéciation du cadmium après 96 h est similaire pour les deux méthodes, ce qui laisse croire que la différence de toxicité observée est surtout liée au phénomène de biodilution. On a également observé que toutes les valeurs de CE50 obtenues à l'aide de la méthode développée étaient plus faibles à partir d'un temps d'exposition de 48 h que celles obtenues à l'aide de la méthode normée à 96 h. Un temps plus court pouvant minimiser davantage la présence d'exsudats et les pertes par assimilation, la même explication demeure valable. De plus, cette affirmation permet d'envisager la possibilité d'écourter la durée des tests de toxicité à 48 h, les résultats étant plus sensibles après une exposition de cette durée qu'après un temps d'exposition plus élevé avec une densité cellulaire initiale plus importante.

3.5: Conclusion

Cette étape avait pour objectif de tester la méthode que nous avons développée et de comparer les résultats de toxicité, de prise en charge et d'adsorption obtenus en exposant l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* à ceux d'une méthode normée. Pour la valider, nous avons utilisé le cadmium, un métal dont la prise en charge et la toxicité ont été grandement étudiées. En abaissant la densité cellulaire de départ, on s'est rendu compte que la prise en charge par cellule algale était plus élevée, le métal étant plus biodisponible. La toxicité était également plus élevée, pour la même raison. Pour ce qui est de l'adsorption, elle est similaire après 96h.

Si on s'attarde maintenant aux profils obtenus selon la concentration de métal testée, un changement dans la pente a été observé à une concentration en cadmium autour de 50 nM lors de l'analyse des résultats de prise en charge, d'adsorption et de ceux obtenus

à l'aide de la technique d'échange ionique après un temps d'exposition de 96 h. Ceci laisse présager que les algues ne réagissent pas de façon uniforme selon la concentration de cadmium testée. Ainsi, aux faibles concentrations, l'algue semble capable de minimiser l'entrée du cadmium à l'intérieur de sa structure et les changements observés dans le milieu se font progressivement dans le temps. Aux concentrations plus élevées, le changement est abrupt et l'algue semble incapable de réagir à tout ajout de métal supplémentaire dans le milieu. Ceci se traduit donc par une augmentation de la prise en charge, de la proportion de métal libre dans le milieu et par une adsorption plus élevée que celle mesurée aux concentrations inférieures. Avec les tests effectués jusqu'à présent, il est difficile d'expliquer la raison pourquoi nous observons ce bris, de même que la raison pourquoi ce dernier se situe autour de la valeur mesurée. Ceci pourrait s'expliquer par un changement dans l'intégrité de la membrane cellulaire aux concentrations supérieures à 50 nM ou par une biodilution par la croissance moins importante, liée au flux d'entrée du cadmium constant et à une diminution du taux de croissance. Des tests plus poussés seraient nécessaires pour en connaître la cause. Une étude sur l'évolution morphologique de l'algue dans le temps lors d'une exposition au cadmium serait très intéressante et permettrait de déterminer si un changement dans la structure membranaire expliquerait le phénomène observé. Des études antérieures ont d'ailleurs démontré ce type d'effet chez les espèces Scenedesmus quadricauda et Chlorella vulgaris exposées au cuivre lors d'expériences à long terme (Bastien et Côté, 1989a; Bastien et Côté, 1989b). De plus, tout laisse croire que le bris observé serait relié aux valeurs de CE50s déterminées selon la concentration de métal présente en solution, la valeur moyenne de ces dernières se situant autour de 50 nM...

La prochaine étape consistera à appliquer la méthode développée à un autre métal, soit l'argent. Ce métal a été sélectionné car il est difficile à tamponner dans le milieu et, de surcroit, les taux d'absorption par les algues sont très élevés. Ces deux facteurs augmenteront le phénomène de déplétion que notre approche permet de minimiser.

4.0 : <u>Prise en charge et toxicité de l'argent chez l'algue verte</u> <u>Pseudokirchneriella subcapitata</u> : Résultats et Discussion

Après avoir validé la méthode que nous avons développée à l'aide du cadmium, l'étape suivante consistait à réutiliser cette dernière dans le but d'étudier la toxicité et la prise en charge de l'argent. Notre choix s'est porté vers ce contaminant en raison de ces caractéristiques physiques et chimiques. En effet, un des principaux problèmes liés à l'étude toxicologique de ce métal est qu'il est très toxique et qu'aux concentrations nécessairement faibles employées dans les tests de toxicité, il ne reste que très peu longtemps dans le milieu à l'étude. L'absorption par les algues est très rapide et contrairement au cas du cadmium, aucun ligand non métabolisable ne permet de maintenir la concentration d'argent stable dans le milieu. On s'attend donc à ce que l'argent soit presque épuisé du milieu d'exposition sur une période de quelques heures (Hiriart-Baer et al. 2006). En abaissant la densité cellulaire initiale de nos milieux à une valeur de 2500 cellules/mL, nous croyons que ce phénomène de déplétion sera minimisé et que les résultats de toxicité, de prise en charge et d'adsorption seront plus élevées chez l'algue verte Pseudokirchneriella subcapitata, le métal étant plus biodisponible. Pour le savoir, des concentrations nominales d'argent total variant entre 0 et 100 nM (0, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 20, 30, 50, 80 et 100) ont été testées et un suivi de la toxicité, des quotas cellulaires et de l'adsorption a été effectué en fonction du temps sur une période de 96 h.

4.1 : Bilan de masse de l'argent en solution

À cause des problèmes nommés précédemment et reliés à l'étude de l'argent en laboratoire, il est difficile d'évaluer la toxicité pour une concentration d'argent donnée si celle-ci varie en fonction du temps. Des tests préliminaires (cf. section 2.5.1 : Préparation du matériel et choix des contenants à utiliser) ont confirmé l'ampleur de ce problème, nous démontrant que l'argent avait une forte tendance à disparaître des milieux d'exposition, qu'importe le type de contenant utilisé (plastique, verre, téflon...). Ce phénomène de perte avait déjà été recensé dans la littérature, lors de tests de toxicité réalisés en présence d'argent (Lee et al. 2005; Hiriart-Baer et al. 2006). Toutefois, ces auteurs n'avaient pas documenté le phénomène observé. Notre but était donc de quantifier ces pertes, pour tenter

de les atténuer par la suite. Nous croyions que ceci était réalisable en abaissant le plus possible la densité cellulaire, diminuant du même coup les pertes par prise en charge et par adsorption.

Malheureusement, comme en témoigne la figure 4.1, le résultat est mitigé. En effet, l'analyse des premiers filtrats recueillis nous montre que les pertes peuvent aller jusqu'à 85 % pendant les premiers 24 h d'exposition, les pertes les plus importantes étant observées pour les concentrations inférieures à 10 nM. Dans ce cas-ci, plus la concentration utilisée était élevée et moins les pertes relatives étaient grandes. Ceci fait en sorte que l'algue était exposée au métal principalement pendant les premières heures de l'expérimentation. Par la suite, la quantité de métal présente en solution demeurait stable jusqu'à la fin du temps d'exposition pour l'ensemble de concentrations testées.

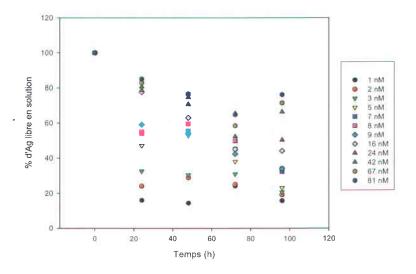


Figure 4.1 : Pourcentage d'argent retrouvé en solution à la suite de l'exposition de Pseudokirchneriella subcapitata à différentes concentrations de ce métal (inoculum initial = 2500 cellules/mL).

Si on analyse les bilans de masse obtenus lors de cette expérience (cf. Annexe 2), on remarque que près de la moitié des pertes sont reliées à l'absorption de l'argent par les cellules phytoplanctoniques. Une très faible quantité de métal est retrouvée en solution à chaque pas de temps pour chaque concentration testée, ce qui signifie qu'un troisième « capteur » viendrait puiser dans la réserve de métal initialement déposée dans chaque erlenmeyer. La comparaison de ces résultats à ceux obtenus par Hiriart-Baer *et al.* en 2006

à la suite de la réalisation d'un test semblable à celui-ci démontre que, pour la majorité des concentrations d'argent testées, les pertes après 24 h étaient aussi importantes que dans la présente expérience, peu importe la densité initiale utilisée. Ceci était également le cas pour Lee et al. en 2005, ce dernier ayant cependant réalisé des tests de toxicité à une densité de 120 000 cellules/mL sur une période de 6 h. Ceci laisse donc croire que les pertes d'argent observées lors de l'exposition à ce métal ne seraient que partiellement reliées à la densité cellulaire présente en solution. L'hypothèse la plus plausible demeure une liaison entre le métal et une composante des contenants utilisés. Le pH jouerait également un rôle dans les pertes recensées, ce phénomène n'étant pas observé aux pHs acides puisque la protonation des sites d'adsorption (compétition entre cations H⁺ et Ag⁺) vient libérer l'argent en solution, le rendant ainsi disponible pour les organismes. D'ailleurs, l'acidification de certains de nos milieux à un pH \cong 2 a montré qu'il n'y avait aucune perte significative (résultats non présentés), ce qui sous-entend que le pH influencerait de façon importante la disponibilité de l'argent dans le temps. Ainsi, le bilan de masse étant négatif (cf. Annexe 2), ces pertes seraient principalement reliées à l'adsorption du métal par le récipient utilisé.

Afin d'éliminer le plus possible tous les inconvénients reliés à ces pertes lors de futurs tests de toxicité et de prise en charge, plusieurs solutions ont été envisagées. Celle que nous avons retenue a été de diminuer le temps de contact entre le métal et le contenant utilisé. Ainsi, l'étape de stabilisation ayant lieu habituellement 24 h avant le début de l'expérimentation a été éliminée et le métal a été ajouté immédiatement avant l'ajout des algues dans le milieu. Ceci n'a vraisemblablement pas d'effet sur l'équilibre thermodynamique du milieu, l'argent ne se liant pas significativement avec les composantes du milieu MHSM (cf. section 2.2 : Milieu de culture et autres solutions utilisées du Chapitre Matériel et Méthode pour connaître les composantes du milieu MHSM).

4.2 : Évaluation de la concentration d'Ag⁺ retrouvée en solution en fonction du temps

Comme il en était le cas pour l'étude du cadmium, nous avons évalué la concentration de métal libre retrouvée en solution à chaque pas de temps à la suite de l'exposition de *Pseudokirchneriella subcapitata* à différentes concentrations d'argent total. Ceci avait encore une fois pour but de déterminer l'influence des exsudats sur la complexation de notre métal d'intérêt, la quantité croissante d'exsudats dans le milieu ayant grandement influencé la complexation du cadmium en solution (cf. section 3.1 : Évaluation de la concentration de Cd²⁺ retrouvée en solution en fonction du temps). Ainsi, les premiers filtrats recueillis ont été analysés à l'aide de la TÉI pour déterminer la concentration d'Ag⁺ retrouvée dans chaque échantillon.

4.2.1 : Calcul du coefficient de distribution

Avant de pouvoir déterminer la concentration de métal libre en solution, il a d'abord fallu mesurer le coefficient de distribution de chaque colonne pour notre métal d'intérêt, soit l'argent. Ainsi, quatre concentrations différentes d'argent total, testées en triplicata, ont été passées à la technique d'échange ionique, pour calculer le coefficient pour ce métal et pour s'assurer que ce dernier ne variait pas en fonction de la concentration utilisée (cf. Tableau 4.1).

Tableau 4.1 : Calibrage des colonnes (n = 3) à différentes concentrations pour obtenir le coefficient de distribution

| [Ag ⁺] nominale | Coefficient de distribution $\lambda \pm I.C$ (95%) | | | |
|-----------------------------|---|--|--|--|
| (nM) | (L/g) | | | |
| 5 | 0.95 ± 0.32 | | | |
| 10 | 0.73 ± 0.09 | | | |
| 50 | 0.81 ± 0.02 | | | |
| 80 | 0.89 ± 0.07 | | | |
| Valeur moyenne | 0.83 ± 0.12 | | | |

La valeur du coefficient de distribution obtenu est semblable pour toutes les concentrations testées. De plus, il n'y a pas de différence significative entre les colonnes. On a donc fait une moyenne pour obtenir un coefficient de 0.83 ± 0.12 L/g.

Ces résultats sont distincts de ceux obtenus par C. Porcher (2004) lors de la mesure du coefficient de distribution au cours de sa maîtrise. En effet, dans son cas, les coefficients de distribution étaient plus élevés et ils diminuaient au fur et à mesure que la concentration d'Ag⁺ dans le milieu augmentait. L'auteur avait tenté d'expliquer ce phénomène par une différence d'affinité des sites de la résine pour le métal libre en solution. Aucune autre publication jusqu'à ce jour n'ayant mesuré la concentration d'argent libre à l'aide d'une telle technique, il n'y a donc pas d'autres points de comparaison. De plus, les colonnes utilisées dans nos deux cas n'étaient pas les mêmes, ce qui fait en sorte que nous ne pouvons tirer de conclusion claire sur la tendance que devrait avoir le coefficient de distribution en fonction de la concentration utilisée. Cependant, ce même genre de mesure a été fait ultérieurement avec d'autres métaux, tel que le cadmium, et il n'existait aucune différence sur la mesure du coefficient de distribution selon la concentration de métal utilisée (Laforte, 2003). Ceci laisse donc présager que nos coefficients mesurés pour chaque concentration sont fiables.

En ce qui concerne l'écart observé entre les valeurs des coefficients, celui que nous avons mesuré est plus faible que celui obtenu par Porcher ($\lambda = 2,31-3,55$). Ceci était également le cas pour le cadmium (cf. section 3.1: Évaluation de la concentration de Cd^{2+} retrouvée en solution en fonction du temps), où les mêmes colonnes avaient été utilisées. Puisque notre coefficient est encore une fois plus petit que ceux obtenus par d'autres auteurs, ceci appuie nos hypothèses voulant que la résine Dowex se soit partiellement dégradée avec le temps ou que la masse de résine présente dans la colonne soit inférieure à la quantité nominale ajoutée. Dans ces circonstances, le profil d'atteinte de l'état stationnaire entre le métal et la résine a été refait pour chaque colonne (cf. Figure 2.7), l'équilibre risquant d'être atteint plus rapidement avec une résine altérée. Une solution MHSM contenant une concentration d'argent total de 5 nM a ainsi été analysée en fonction du temps. Notre hypothèse s'est avérée vraie puisque l'équilibre était atteint après seulement 20 minutes (V = 100 mL; cf. Figure 2.7), contrairement au temps de passage original qui était fixé à 48 minutes (V = 240 mL).

4.2.2 : Mesure de la quantité d'argent libre retrouvée en solution à la suite de l'ajout de chlorure dans le milieu

Pour s'assurer de la validité du coefficient obtenu, nous avons ajouté différentes concentrations de chlorures à nos solutions d'argent. En substituant le KNO $_3$ contenu dans le milieu MHSM par du KCl, ceci complexe une portion de l'argent libre en solution, contrôlant ainsi la concentration présente de cet ion, tout en gardant la même force ionique. Cette étape avait pour but de comparer la valeur d'Ag $^+$ obtenue à la suite du passage à la TÉI à celui du logiciel de spéciation MINEQL $^+$, ce logiciel nous permettant de connaître la concentration théorique de métal libre en solution. Ceci nous a permis de valider les mesures de coefficient obtenues en utilisant un ligand dont les constantes thermodynamiques sont bien connues. Des concentrations de chlorures de 0,5, 1, 2 et 3 mM ont été testées avec une concentration d'argent total de 51 \pm 6 nM (cf. Figure 4.2).

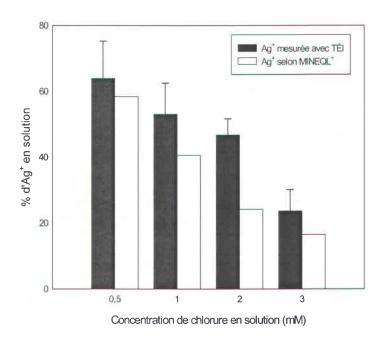


Figure 4.2 : Comparaison de la proportion d'argent libre mesurée à l'aide de la TÉI à la valeur prédite par le logiciel MINEQL⁺ à la suite de l'ajout de différentes concentrations de chlorures. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures.

La concentration de métal libre diminue au fur et à mesure que la concentration de chlorure augmente. Les valeurs mesurées et calculées concordent relativement bien, sauf pour une concentration de chlorure de 2 mM et des résultats similaires avaient été rapportés par Porcher (2004). Ceci signifie que, globalement, notre technique répond convenablement à des modifications de la spéciation de l'argent. La légère différence entre les concentrations mesurées et celles calculées pourrait être causée par la formation d'un complexe ternaire sur la résine, c'est-à-dire résine-Ag-Cl, ou encore par une précipitation partielle du complexe AgCl⁰_(s) (Cérargyrite) qui se déposerait sur le lit de résine. En ce qui concerne cette dernière possibilité, la solubilité de la Cérargyrite atteint son minimum à la suite de l'ajout d'une concentration de chlorure variant entre 2 et 3 mM, ce minimum étant de ~520 nM. Même si notre concentration totale en argent (51 nM) était inférieure à cette limite, il est possible qu'elle ait été dépassée localement lors du mélange des solutions.

4.2.3 : Évolution dans le temps de la concentration d'argent libre en solution

Une fois notre méthode au point, nous avons suivi l'évolution de la concentration de métal libre en solution pendant l'exposition de *Pseudokirchneriella subcapitata* à quatre concentrations différentes d'argent total (10, 30, 50 et 80 nM). Les concentrations de métal testées ont été choisies afin qu'elles soient représentatives de l'ensemble de la gamme utilisée ultérieurement lors des tests de toxicité et de prise en charge. Ainsi, les filtrats recueillis à chaque pas de temps ont été analysés par un passage à la TÉI. Le but de cette étape était de déterminer si la présence d'exsudats influençait la concentration de métal libre retrouvée en solution.

La figure 4.3 montre le résultat de cette analyse. On y voit que la concentration de métal libre mesurée dans chaque échantillon représente près de 100 % de la concentration de métal total retrouvée en solution ($m = 0.85 \pm 0.15$; $p \ge 0.05$). De plus, on n'observe qu'une légère différence entre les pas de temps. D'ailleurs, les régressions linéaires de chacune de ces séries de points se superposent. Ainsi, les exsudats n'influenceraient pas la concentration de métal libre en solution dans le cas de l'argent. Ceci diffère du cas du cadmium, où une baisse d'environ 40 % de la proportion de métal libre a été observée entre le début et la fin du temps d'exposition. Puisque dans les deux études, l'espèce algale utilisée était la même, le type de ligands relâchés ne peut être mis en cause, la nature des exsudats ne variant probablement pas d'une expérience à une autre. Cette différence entre

les métaux serait plutôt reliée à l'affinité existant entre le métal et le ligand. Dans le cas du cadmium, pour complexer le métal libre en solution et ainsi perturber la spéciation du cadmium, le ligand doit avoir une constante de complexation conditionnelle relativement élevée puisque les concentrations excrétées sont présumées faibles (Vasconcelos et Leal, 2001; Vasconcelos et al. 2002; Rijstenbil et Gerringa, 2002). Dans le cas de l'argent, la constante doit avoir une valeur faible (ligand ne contenant vraisemblablement pas de S(II) comme atome donneur), ce qui signifie du même coup une faible affinité entre le ligand et le métal, d'où l'absence d'influence des exsudats sur la complexation de l'argent.

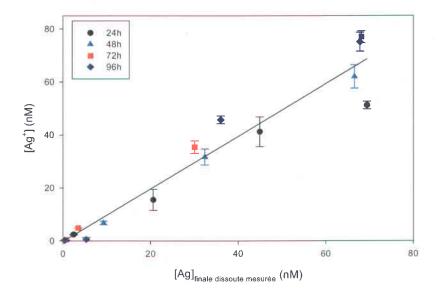


Figure 4.3: Relation entre les concentrations d'argent libre retrouvées en solution à chaque pas de temps et celles d'argent total dissous à la suite d'une exposition de *Pseudokirchneriella subcapitata* à diverses concentrations totales d'argent. Chaque symbole correspond à un temps d'exposition différent, les cercles représentant un temps de 24 h, les triangles un temps de 48 h, les carrés un temps de 72 h et les losanges représentant un temps d'exposition de 96 h. Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types sur trois mesures distinctes.

4.3 : Quotas cellulaires chez Pseudokirchneriella subcapitata exposé à l'argent

En parallèle aux tests effectués à l'aide de la technique d'échange ionique, un suivi de la prise en charge de l'argent chez l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* sur une période de 96 h a été effectué à la suite de la contamination de nos milieux par différentes concentrations de ce métal (0, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 20, 30, 50, 80 et 100 nM). Puisque aucun test de ce genre n'a été réalisé auparavant avec l'argent sur une aussi longue période, nous n'avons pu comparer nos valeurs avec celles obtenues par une méthode normée. Cependant, les résultats obtenus avec le cadmium ayant prouvé l'efficacité de la méthode développée, il nous a été possible d'évaluer la prise en charge de ce métal lorsqu'une faible densité cellulaire était utilisée. Ainsi, un suivi des quotas cellulaires en fonction du temps est présenté à la figure 4.4. On y voit que pour les concentrations inférieures à 30 nM, les quotas diminuent dans le temps en suivant une fonction exponentielle décroissante.

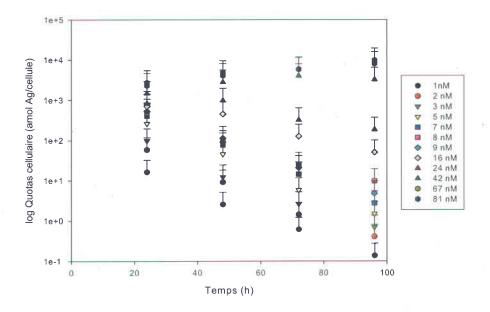


Figure 4.4 : Quotas cellulaires en argent chez *P. subcapitata* exposées à différentes concentrations d'Ag total initial en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent les écart-types obtenus sur la moyenne de trois mesures.

Cette tendance se manifeste aux concentrations où les pertes sont les plus élevées. Il se produirait donc un effet de biodilution lorsque les algues sont en division cellulaire. En effet, lorsque les algues se multiplient en nombre, une partie de l'argent accumulé à

l'intérieur du cytosol est transmise à la nouvelle génération. Ceci diminue la quantité de métal présent à l'intérieur de chaque cellule. Étant donné que l'argent est presque complètement disparu des milieux à ces concentrations, les algues ne peuvent en accumuler davantage en fonction du temps et c'est ce qui explique une diminution des quotas. Pour les concentrations supérieures à 30 nM, la tendance diffère et les quotas sont stables dans le temps. À partir de cette concentration, le métabolisme des algues en culture est extrêmement ralenti et leur croissance est quasi nulle. Le phénomène de biodilution qui survient lors de la division ne peut donc se produire. De plus, un état stationnaire semble atteint entre la quantité de métal qui arrive à l'intérieur de la cellule et celle qui en sortirait. La stabilité des quotas dans le temps pourrait s'expliquer par un effet algistatique ou par une mortalité des cellules une fois un certain seuil d'argent intracellulaire atteint.

La baisse de prise en charge observée dans le temps pourrait également s'expliquer par un changement physiologique survenu dans la structure cellulaire. D'ailleurs, une modification de la perméabilité de la membrane cellulaire a déjà été observée chez des cellules rénales exposées à du nitrate d'argent ([Ag]tot = 10⁻⁴ M). Cette transformation serait causée par une interaction entre l'ion métallique Ag⁺ et les groupements sulfhydryles contenus dans les protéines membranaires (Kone *et al.* 1988). Cette variation de perméabilité, qui survient de façon précoce, engendre une augmentation du taux de sortie des ions K⁺, ainsi qu'une hausse de l'entrée des ions Na⁺. Ce changement dans le déplacement des ions essentiels laisse présager que les autres ions en présence ne peuvent plus pénétrer de façon aussi efficace à l'intérieur de la cellule et que la prise en charge des métaux, tel que l'argent, serait ralentie. Un changement de perméabilité n'a toutefois pas encore été observé chez des cellules phytoplanctoniques.

Les résultats de prise en charge ont également été présentés en fonction de la concentration de métal initialement présent en solution (cf. Figure 4.5). Comme dans le cas de la figure 4.4, on voit que les quotas diminuent en fonction du temps pour les faibles concentrations testées, alors qu'ils s'équivalent pour les concentrations supérieures à 30 nM. Ceci illustre de nouveau la tendance observée précédemment. De plus, pour chaque pas de temps, on observe une augmentation des quotas cellulaires en fonction de la

concentration présente en solution. Ceci équivaut à la tendance normalement observée chez une espèce algale (Bates *et al.* 1983; Mehta *et al.* 2000; Fortin *et al.* 2004). Aucun plateau (i.e. saturation) n'est atteint, les concentrations utilisées étant trop faibles (même si elles sont plutôt élevées par rapport aux concentrations trouvées dans les eaux naturelles). On voit également que la prise en charge est à peu près linéaire (échelles log-log) dans tous les cas, mais que la pente est de plus en plus abrupte en fonction du temps. Ce changement de pente serait directement relié aux pertes inégales de métal observées sur les parois des contenants selon la concentration utilisée. Aux faibles concentrations, l'argent disparaît quasi-complètement des milieux, ce qui mène au phénomène de biodilution expliqué cihaut. Ainsi, il y a de moins en moins de métal absorbé par la cellule avec le temps. Avec une augmentation de la concentration survient une atténuation des pertes de métal en solution. Les algues continuent donc d'accumuler de l'argent en fonction du temps. La diminution des quotas cellulaires dans le temps aux concentrations inférieures à 30 nM, liée à la constance de la prise en charge aux concentrations supérieures, explique alors le changement de pente obtenu.

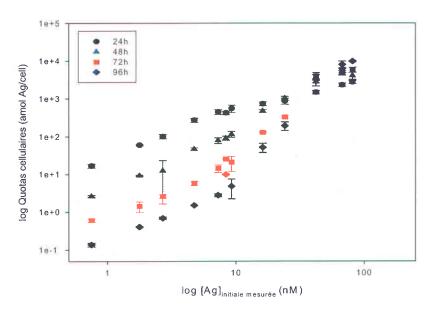


Figure 4.5: Quotas cellulaires de *Pseudokirchneriella subcapitata* exposées à différentes concentrations d'argent total mesurées initialement. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures.

4.4 : Adsorption de l'argent par Pseudokirchneriella subcapitata

L'adsorption de l'argent chez l'algue verte Pseudokirchneriella subcapitata a également été évaluée pour l'ensemble des concentrations utilisées. La concentration de métal adsorbé à la surface cellulaire a été mesurée aux temps t = 24, 48, 72 et 96 h. L'évolution de ce paramètre en fonction du temps est présentée à la figure 4.6. On y voit que l'adsorption du métal diminue en fonction du temps pour la majorité des concentrations testées. Cependant, il y aurait une augmentation de la concentration adsorbée à 96 h pour les deux concentrations les plus élevées. Puisque la tendance observée pour ces deux concentrations lors des 72 premières heures d'exposition est à la baisse, tout laisse croire que ces valeurs seraient des données aberrantes. Ainsi, l'adsorption de l'argent diminuerait dans le temps pour l'ensemble des concentrations testées. Ceci pourrait s'expliquer de nouveau par les pertes de métal recensées dans le milieu de culture. En effet, puisqu'il y a de moins en moins d'argent dans le milieu, les ions pouvant potentiellement se lier à la surface cellulaire sont à plus faibles concentrations, d'où la baisse d'adsorption observée. De plus, pour les quelques concentrations supérieures à 50 nM, on a vu que c'était à partir de celles-ci qu'il y avait absence de croissance. Un repiquage de ces dernières cultures dans un milieu sain a révélé que les cellules étaient probablement mortes, aucune croissance n'étant perçue deux semaines après ce repiquage. Puisque les algues ne se trouvent pas en bon état physiologique, leur métabolisme risque d'être affecté, de même que la structure de leur surface cellulaire. D'ailleurs, Bates et al. (1983) ont démontré que la concentration en sites d'adsorption diminuait au fur et à mesure que les cellules algales vieillissaient. Cette étude avait été réalisée chez l'espèce phytoplanctonique Chlamydomonas variabilis lors d'une exposition de plusieurs jours au zinc. Ainsi, si la composition des protéines ou des lipides composant la membrane cellulaire est transformée au cours du temps, ceci pourrait expliquer pourquoi il y a une baisse dans l'adsorption de l'argent, l'affinité entre l'argent et la surface pouvant être affaiblie. De plus, il a déjà été démontré chez la macroalgue Nitellopsis obtusa que l'un des effets engendrés par une exposition aux métaux est un changement de polarité de la membrane cellulaire, occasionné par une inhibition de l'enzyme H⁺-ATPase (Manusadzianas et al. 2002). Ce changement engendre un

déséquilibre de l'homéostasie ionique, ce qui conduit à la mort cellulaire. Des tests plus poussés seraient nécessaires pour déterminer si un tel changement est observé chez l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* en présence d'argent. Les pertes par adsorption sur les parois des contenants étant atténuées avec une augmentation de la concentration présente en solution, ceci explique pourquoi il y a une différence entre les pentes obtenues à chaque concentration.

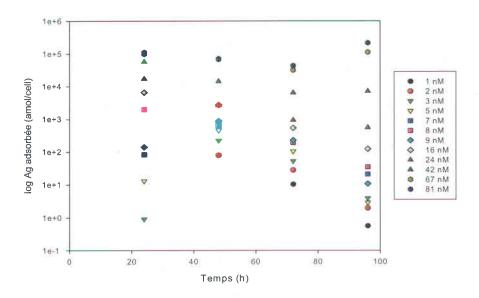


Figure 4.6: Concentration d'argent adsorbé par *Pseudokirchneriella subcapitata* exposé à différentes concentrations de ce métal en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures.

Si on regarde maintenant l'allure des courbes d'adsorption obtenues en fonction de la concentration de métal initialement présent dans le milieu (cf. Figure 4.7), on observe le même phénomène qu'à la figure 4.5, soit que l'adsorption diminue en fonction du temps. On voit également que l'adsorption de l'argent augmente en fonction de la concentration initialement présente en solution pour chaque pas de temps. Ces concentrations n'étant pas assez élevées, la saturation n'est pas encore atteinte. Comme dans le cas des quotas cellulaires, il y a un léger changement de pente entre chaque pas de temps testé, les différences s'accentuant avec une diminution de la concentration de métal présent en solution. L'explication prévalant pour la prise en charge demeure valable dans ce cas-ci, c'est-à-dire que ce changement de pente serait relié aux pertes inégales de métal observées

sur les parois des contenants selon la concentration utilisée. Ainsi, aux faibles concentrations d'argent, les pertes importantes engendrent une forte différence dans les degrés d'adsorption, alors qu'aux concentrations élevées, le fait que le métal demeure encore en concentration importante fait en sorte qu'il n'y a aucune différence entre chaque pas de temps.

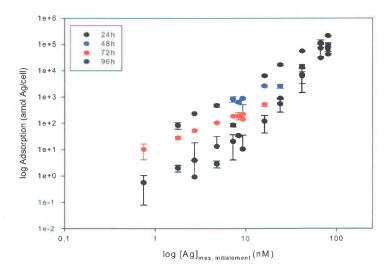


Figure 4.7 : Adsorption de l'argent chez l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* selon la concentration de métal présent dans le milieu initialement à chaque pas de temps. Les barres d'erreur représentent les écart-types sur trois mesures distinctes.

4.5 : <u>Importance relative de l'adsorption et de la prise en charge de l'argent chez Pseudokirchneriella subcapitata</u>

Afin de déterminer lequel des deux paramètres évalués ci-haut était le plus important lors d'une exposition de l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* à de l'argent, nous avons comparé les valeurs de quotas cellulaires que nous avons obtenus à ceux des quotas externes (adsorption à la surface de l'algue) mesurés à chaque pas de temps. Ceci nous permettait ainsi de caractériser l'importance relative des deux paramètres et de vérifier si celle-ci varie (i) au cours d'une expérience (i.e. en fonction du temps) et (ii) en fonction de la concentration d'exposition testée. Les résultats sont présentés à la figure 4.8.

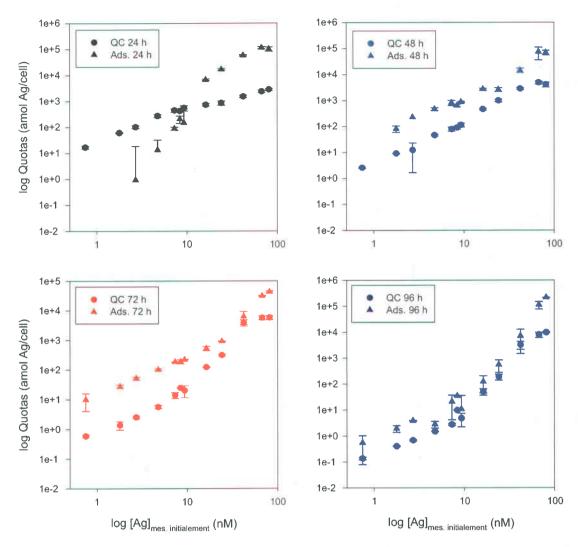


Figure 4.8 : Comparaison des quotas cellulaires obtenus à chaque pas de temps (cercle) aux valeurs d'adsorption (triangle) évalués selon la concentration de métal initialement présente en solution. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types sur la moyenne de trois mesures.

À l'observation de cette figure, on voit qu'après 24 h d'exposition, la prise en charge de l'argent est plus importante pour les faibles concentrations testées, soient celles inférieures à 10 nM d'argent total. Pour les concentrations plus élevées, l'adsorption prend le dessus et les quotas externes peuvent atteindre des valeurs $100 \times 100 \times 100 \times 100 \times 100 \times 100 \times 1000 \times 1000$

la prise en charge est plus importante, alors qu'aux fortes concentrations, l'adsorption prend le dessus. Ceci peut s'expliquer par le fait que la cellule contient davantage de sites d'adsorption que de transporteurs permettant l'entrée de l'argent à l'intérieur de la cellule. Ainsi, aux fortes concentrations, le métal s'adsorbe rapidement aux parois, tandis qu'il pénètre lentement à l'intérieur de l'algue. De plus, cette tendance peut s'expliquer par les quotas cellulaires diminuant avec le temps (cf. Figure 4.5).

4.6 : Toxicité de l'argent chez Pseudokirchneriella subcapitata

La toxicité de l'argent a été grandement étudiée dans les dernières années et ce métal est considéré comme l'un des plus toxiques chez les organismes aquatiques. On sait que sa toxicité est influencée par différents facteurs, notamment par la présence de ligand comme la MOD (Rose-Janes et Playle, 2000; Brauner et Wood, 2002; Glover et Wood, 2004). La densité cellulaire présente en solution est un autre facteur pouvant influer sur sa toxicité face à un organisme. Cependant, peu d'études ont mis l'accent sur cette variable, principalement à cause du manque d'appareil pouvant effectuer des décomptes cellulaires à faible densité. L'utilisation de notre méthode nous a permis d'évaluer la toxicité de l'argent en utilisant une faible densité cellulaire de départ. L'effet toxique a été évalué en effectuant un suivi de la densité cellulaire sur une période de 96 h, pour l'ensemble des concentrations d'argent testées. Les résultats des courbes doses-réponses sont présentés en fonction de la concentration de métal initialement présent en solution (cf. Figure 4.9A) et selon la concentration de métal mesurée à chaque pas de temps (cf. Figure 4.9B).

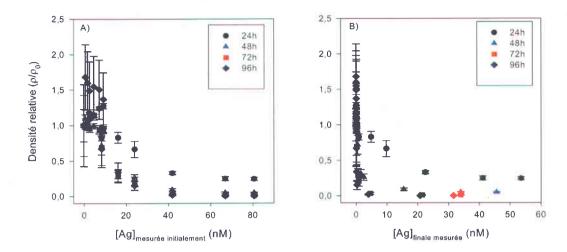


Figure 4.9 : Densité relative de *Pseudokirchneriella subcapitata* exposée à différentes concentrations d'argent mesuré initialement (A) et à chaque pas de temps (B). Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur trois mesures.

La figure 4.9A montre qu'en absence de ligands dans le milieu d'exposition MHSM, la croissance des algues est atténuée avec une augmentation de la concentration d'argent présente dans le milieu. D'ailleurs, aucune croissance n'est observée à partir d'une concentration mesurée initiale se situant autour de 50 nM d'argent total. De plus, on voit qu'une toxicité appréciable est déjà détectée après un temps d'exposition de 24 h, ce qui n'était pas le cas avec le cadmium. Un test d'ANOVA a permis de dire que les courbes aux temps 48, 72 et 96 h ne sont pas significativement différentes, ce qui signifie que la toxicité est pleinement ressentie chez *Pseudokirchneriella subcapitata* à partir de la deuxième journée d'exposition.

À l'observation de la figure 4.9B, on voit qu'il y a absence totale de croissance pour les concentrations résiduelles supérieures à 3 nM, et ce, dès un temps d'exposition de 48 h. Toutefois, on se rend vite compte qu'il serait impossible d'évaluer la toxicité de l'argent en tenant compte de la concentration de métal mesurée, comme nous l'avons fait dans le cas du cadmium. Le fait qu'une proportion importante d'argent disparaisse du milieu empêche d'analyser les résultats selon cette variable. En effet, dans plusieurs cas les concentrations d'argent sont passées sous la limite de détection, ce qui donne une large gamme d'effets (sur la figure 4.8B, voir la dispersion des points dans le sens vertical) que

l'on attribue à une concentration nulle, ce qui est déraisonnable. L'étude par rapport à la concentration de métal libre en solution n'est pas valable pour la même raison puisque [Ag⁺] < [Ag]_{dissous}. Pour contrer ce problème, certains auteurs ont opté pour faire la moyenne entre la valeur nominale de métal et celle retrouvée à la fin du temps d'exposition (Lee et al. 2005). Cette alternative a été rejetée puisque, étant donné les faibles bilans de masse obtenus pour les concentrations inférieures à 10 nM (cf. Annexe 2), qui représentent 50 % des concentrations testées, l'utilisation des moyennes arithmétiques diminuerait dans certains cas de moitié la concentration initialement présente. De plus, étant donné que l'argent disparaît très rapidement des milieux, c'est-à-dire dès les premières heures d'exposition, il semble préférable d'utiliser la concentration initiale comme variable, si on veut obtenir des résultats représentatifs de ce qui se passe en solution pour une concentration donnée. Ceci justifie donc notre choix d'évaluer la prise en charge et l'adsorption de l'argent en fonction de la concentration de métal initialement présente en solution, l'évaluation selon ce paramètre étant la plus envisageable. Nous avons néanmoins évalué la toxicité selon les différents paramètres nommés précédemment, afin de déterminer lequel il était préférable d'utiliser.

L'obtention des courbes doses-réponses présentées précédemment a permis de déterminer la toxicité ressentie par l'algue face à une exposition à l'argent. Les résultats de toxicité obtenus ont été présentés sous la forme de CE50s, soit la concentration ayant réduit de 50 % la croissance de la population d'algues. Les CE50s ont été évaluées selon la concentration de métal initialement présente en solution (cf. Figure 4.10A), la concentration de métal mesurée à chaque pas de temps (cf. Figure 4.10B), les quotas cellulaires (cf. Figure 4.10C), la concentration d'argent adsorbé à la surface cellulaire (cf. Figure 4.10D) et selon la concentration de métal libre mesurée à chaque pas de temps à l'aide de la technique d'échange ionique (cf. Figure 4.10E).

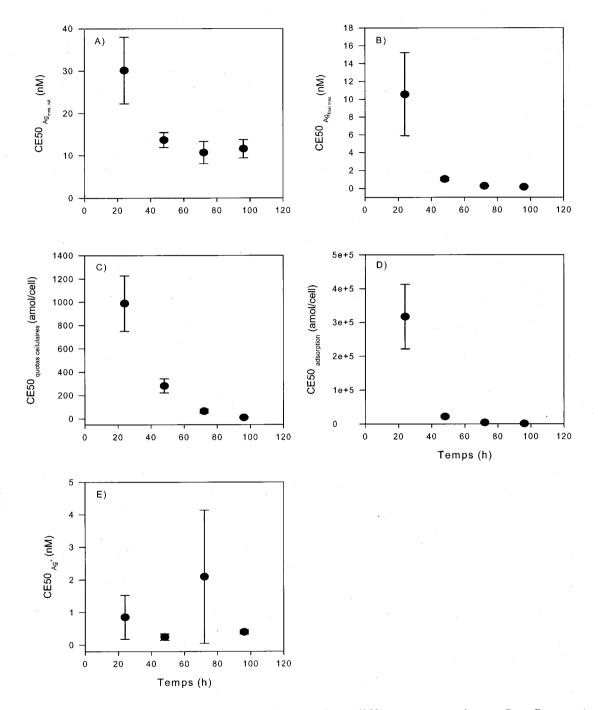


Figure 4.10 : Toxicité de l'argent évaluée selon différents paramètres. La figure A exprime la CE50 par rapport à la concentration d'argent mesurée initialement, la figure B par rapport à la valeur mesurée à chaque pas de temps, la figure C par rapport aux quotas cellulaires, D par rapport à la quantité de métal adsorbé alors que E exprime la CE50 par rapport à la concentration de métal libre mesurée à chaque pas de temps. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95%.

À l'observation de ces figures, on voit immédiatement que l'argent est un métal extrêmement toxique. En effet, les valeurs de CE50s sont très faibles, ce qui signifie qu'il faut une petite concentration pour inhiber de 50 % la croissance de la population. Si on regarde plus attentivement chaque courbe, on observe d'abord que la CE50 de l'argent selon la concentration initiale de métal (cf. Figure 4.10A) se situe à 30 ± 8 nM après 24 h d'exposition pour diminuer à 13 ± 2 nM après 48 h. La toxicité est semblable pour les autres pas de temps, ce qui signifie qu'elle a varié d'un facteur trois pendant la durée de l'expérimentation. Si on regarde la toxicité selon la concentration finale d'argent à chaque pas de temps (cf. Figure 4.10B), la courbe a la même allure. Cependant, les valeurs de CE50s sont extrêmement faibles (0,2 - 1,0 nM) et sont même inférieures aux concentrations mesurées dans plusieurs étendues d'eaux (rivière Quinnipiac : Benoit, 1994; rivière Asakawa: Yamazaki et al. 1996). Ainsi, si ces valeurs de toxicité sont réelles, ceci signifierait qu'aux concentrations retrouvées dans la nature, la croissance du phytoplancton serait grandement réduite (en supposant que l'étendue d'eau étudiée ait de faibles concentrations en ligands, tel que la MOD, les chlorures et les sulfures). Puisque nous savons que ce n'est pas le cas, ceci confirme qu'on ne peut utiliser ce paramètre pour évaluer la toxicité. Si on examine maintenant la toxicité selon les quotas cellulaires, on voit que les CE50s diminuent dans le temps et que les valeurs aux temps t = 72 et 96 h s'équivalent. Selon la quantité de métal adsorbé, les résultats montrent une toxicité très faible après 24 h d'exposition. La toxicité augmente après 48 h et elle demeure stable jusqu'à 96 h. Finalement, si on observe la toxicité par rapport à la concentration de métal libre mesurée (cf. Figure 4.10E), il n'y a aucune différence significative entre chaque point. Ce résultat est assez surprenant. En effet, les CE50s diffèrent de celles présentées selon la concentration finale de métal en solution, malgré le fait que nous avions démontré que la concentration de métal libre en solution égalait la concentration de métal total à chaque pas de temps (cf. Figure 4.3). Cette différence dans les résultats peut être reliée aux pertes de métal observées sur les parois, ce qui laisse de très faibles concentrations de métal en solution. Ces faibles concentrations mènent inévitablement à des valeurs de CE50s extrêmement faibles et rend les mesures au compteur bêta très difficiles (proximité des mesures du bruit de fond ambiant). L'évaluation de la toxicité selon ce paramètre est donc également questionnable.

Pour quantifier l'effet d'un changement de densité cellulaire dans le milieu, puisqu'aucune étude sur la toxicité de l'argent avec le protocole du CEAEQ n'a été retracée dans la littérature, nous avons comparé nos résultats à ceux du USEPA (United States Environmental Protection Agency), soit l'organisme américain chargé de la protection de l'environnement. Leur protocole est semblable à celui utilisé au gouvernement du Québec, mais le USEPA ajoute de l'EDTA dans ses milieux d'exposition, ce qui n'est pas le cas du CEAEQ. Par contre, la complexation de l'argent n'étant pas influencée par l'EDTA, la présence de ce ligand ne modifiera que très peu les résultats de toxicité obtenus, ce qui signifie que les deux méthodes s'équivalent lors de l'étude de la toxicité de l'argent. Ainsi, si on compare les résultats obtenus à l'aide de chaque protocole, on remarque encore une fois que la toxicité est plus élevée à l'aide de notre méthode qu'à l'aide de la méthode normée. On obtient dans notre cas une toxicité de 12 ± 2 nM alors que le USEPA donne une toxicité de 24 nM d'argent total après 96 h d'exposition (USEPA, 1987). Ainsi, comme dans le cas du cadmium, notre méthode est plus sensible après un temps d'exposition de 48 h, ce qui signifie que la durée des tests pourrait être abaissée à deux jours, tout en obtenant des résultats aussi sensibles (sinon plus) et valables qu'à 96 h avec les tests normés.

En comparant nos valeurs de toxicité à celles publiées par d'autres chercheurs ayant utilisés des méthodes d'analyses et des temps d'exposition différents des nôtres, on remarque que les valeurs de CE50s sont relativement semblables. En effet, Hiriart-Baer *et al.* (2006) ont obtenu un CE50 de 22 ± 13 nM après 72 h d'exposition de l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* à des concentrations d'argent variant entre 0 et 75 nM. Cette concentration de métal a été maintenue relativement stable grâce à l'utilisation d'un turbidostat. Quant à Lee *et al.* (2005), ils ont obtenus des valeurs de CE50s de 26 ± 5 nM à la suite de l'exposition de la même espèce algale pendant 6 h à des concentrations d'argent total variant entre 0 et 80 nM. Le fait que les résultats de CE50s soient très regroupés, malgré des temps d'exposition différents, laisse croire que ce métal agit très rapidement sur la croissance algale et que les premières heures d'exposition à l'argent sont critiques. Ceci confirme ainsi notre hypothèse voulant que la concentration initiale de métal soit celle à privilégier lors de l'analyse des résultats de toxicité de ce métal.

Finalement, si on examine de plus près l'allure générale des courbes de CE50s (cf... Figure 4.10) en fonction du temps que l'on peut considérer (soit par rapport à la concentration d'argent initialement présente en solution, par rapport aux quotas cellulaires et par rapport au taux d'adsorption), on remarque qu'elles suivent toutes la même tendance. En effet, ces courbes montrent que la toxicité de l'argent est déjà mesurable après 24 h d'exposition et qu'elle augmente à 48 h pour demeurer stable par la suite. Ce résultat diffère de celui observé avec le cadmium, où la toxicité n'était détectable qu'après 48 h d'exposition. Ceci pourrait être expliqué en partie par des taux d'absorption de l'argent plus rapides par Pseudokirchneriella subcapitata que ceux du cadmium. Ainsi, la prise en charge par la cellule dans les 24 premières heures d'exposition est élevée, ce qui fait en sorte que l'effet est déjà ressenti après un aussi court laps de temps. Par la suite, on a vu que la prise en charge est stable dans le temps pour les concentrations les plus élevées, alors qu'elle ne diminue que légèrement pour les concentrations les plus faibles (cf. Figure 4.4). Puisque les quotas sont relativement constants dans le temps (cf. Figure 4.5), ceci peut expliquer la tendance obtenue pour la toxicité pour le reste de l'expérimentation. De plus, le fait que l'ensemble des courbes ait la même allure laisse présager qu'aucun de ces paramètres n'est préférable à un autre pour évaluer la toxicité de l'argent en absence de ligands.

4.6: Conclusion

La méthode que nous avons développée avec le cadmium a été réutilisée pour mesurer la toxicité et la prise en charge de l'argent chez l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*. Ce métal a été choisi à cause de ses tendances à disparaître du milieu, ce qui rend son étude fort difficile. Notre méthode ayant pour objectif de minimiser ces pertes, nous croyions pouvoir étudier l'absorption et l'adsorption de notre métal d'intérêt de façon plus représentative. Malheureusement, les pertes étant encore considérables, nous avons dû conclure qu'il est préférable de se fier uniquement à la concentration de métal initialement présente dans le milieu. Les résultats obtenus sont néanmoins fort intéressants. En effet, nous avons vu que les quotas et des données d'adsorption diminuaient dans le temps, principalement à cause des pertes de métal dans le milieu d'exposition. D'ailleurs, ces pertes contrôlaient l'ensemble des résultats obtenus. Pour ce qui est de la toxicité de ce

métal, elle était très élevée et stable dans le temps à partir d'un temps d'exposition égale à 48 h. La durée des temps d'exposition pourrait d'ailleurs être diminuée à cette période, les premières heures d'exposition à ce métal étant critiques pour la croissance de la cellule phytoplanctonique. En ce qui concerne les exsudats, nous avons vu que ces derniers n'influençaient pas la concentration de métal libre retrouvée dans le milieu, seules les pertes sur les parois diminuant la quantité d'ion Ag⁺ retrouvée en solution.

L'étape suivante consistait à ajouter de la matière organique dissoute dans le milieu de culture, ce qui devrait rendre la concentration d'argent plus stable dans le temps. Il sera ainsi plus facile d'évaluer la prise en charge et la toxicité de l'argent, la concentration de métal en solution étant tamponnée par l'ajout d'un ligand. De plus, ceci nous permettra de voir ce qui se passe réellement dans la nature, la MOD étant retrouvée dans tous les types d'écosystèmes aquatiques.

5.0: <u>Prise en charge et toxicité de l'argent en présence de matière organique dissoute chez l'algue verte Pseudokirchneriella subcapitata</u>: Résultats et Discussion

La matière organique dissoute (MOD) est un mélange de molécules complexes provenant de la décomposition de plantes, d'animaux et de microorganismes. Elle est constituée à la fois de molécules de faible poids moléculaire (normalement présentes à de très faibles concentrations) et de diverses macromolécules, dont seulement environ 20 % sont identifiées (Buffle, 1988). En considérant la diversité des processus de synthèse et de dégradation existant dans la nature, il est logique que le nombre de constituants de la MOD soit considéré comme excessivement grand (Buffle, 1988). Plusieurs de ces constituants possèdent de groupements fonctionnels (e.g.: R-COOH, R-OH) pouvant potentiellement complexer les métaux se retrouvant dans le milieu. C'est d'ailleurs ce qui explique la grande affinité de la MOD pour les cations majeurs (Lu et Allen, 2002). La complexation des ions métalliques par la MOD est un phénomène largement étudié puisqu'il influence la spéciation chimique des éléments en question, ce qui signifie par le fait même, un effet sur la prise en charge et la toxicité des métaux vis-à-vis des organismes aquatiques (Buffle et al. 1977; Cao et al. 2004). Il apparaît donc important de connaître les propriétés de complexation de la MOD dans le but de prédire la spéciation des métaux dans un environnement donné.

Ainsi, à la suite des tests de toxicité et de prise en charge exécutés en présence d'argent, nous avons décidé de reprendre ce même protocole en ajoutant de la matière organique dissoute naturelle sous forme d'acide humique à une concentration représentative de celle que l'on peut retrouver dans la nature (soit autour de 5 mg C/L). L'ajout de MOD nous a permis de connaître l'effet de ce ligand sur la toxicité et la prise en charge de l'argent. À titre comparatif, les résultats en présence de MOD ont été présentés en fonction de la concentration de métal retrouvée initialement en solution. Les pertes d'argent étant beaucoup plus faibles en présence de substances humiques, les tendances demeurent les mêmes, qu'importe l'échelle utilisée. De plus, une analyse des résultats en

fonction de la concentration de métal libre en solution a été effectuée, la présence d'un ligand risquant de grandement influencer l'activité de l'ion libre Ag^+ .

5.1 : Bilan de masse de l'argent en solution en présence de <u>substances humiques</u>

La première étape de ce protocole consistait à évaluer si les pertes d'argent observées en présence de MOD étaient aussi importantes qu'en présence d'argent uniquement. Une concentration constante de 5 mg de carbone par litre de matière organique a donc été ajoutée à nos milieux d'exposition ([Ag]_{total} = 15, 30, 45, 50, 60, 75, 80, 90, 100, 110, 120 et 150 nM) et nous avons évalué les pertes de métal à chaque pas de temps (cf. Figure 5.1).

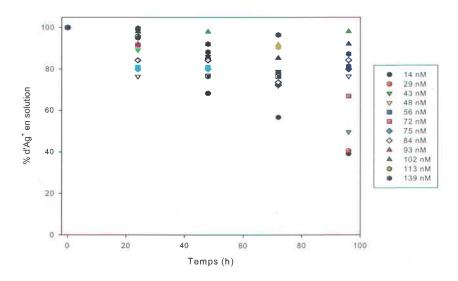


Figure 5.1 : Pourcentage d'argent retrouvé en solution à la suite de l'exposition de *Pseudokirchneriella subcapitata* à différentes concentrations de ce métal en présence de 5 mg C/L de substances humiques.

À la figure 5.1, on voit que l'ajout de SH provenant de la rivière Suwannee atténue les pertes de métal dans le milieu. En effet, les pertes maximales sur une période de 96 h pour les concentrations les plus faibles équivalent à environ 60 % de la concentration de métal initialement présent dans le milieu alors qu'elles pouvaient atteindre près de 85 % en moins de 24 h en absence de ligand. De très légères pertes sur les parois des récipients ont été observées en présence de MOD, mais uniquement dans le cas des concentrations les plus faibles ([Ag]_{tot} < 50 nM). Pour les concentrations supérieures à celles-ci, aucune perte

significative n'a été détectée, les bilans de masse (cf. Annexe 3) montrant que l'argent qui n'est pas en solution se retrouve à l'intérieur et à la surface des algues (i.e. absorbé / adsorbé par *Pseudokirchneriella subcapitata*). Le fait que l'argent en solution se complexe principalement à la matière organique dissoute (surtout à de faibles concentrations) et que ce complexe soit chargé négativement, le métal aura donc moins tendance à se lier à un autre substrat se trouvant sur son chemin, ce qui pourrait expliquer les pertes moins importantes observées en présence de ligand.

5.2 : Évaluation de la concentration d'Ag⁺ retrouvée en solution en présence de MOD

Pour déterminer si le modèle de l'ion libre était respecté dans le cas d'une contamination à l'argent en présence de substances humiques, nous avons mesuré, à l'aide de la technique d'échange ionique, la concentration de métal libre Ag^+ retrouvée en solution à la suite de l'ajout de 5 mg C/L d'AH. En comparant ces résultats à ceux obtenus en absence de ligands, il est possible de connaître le comportement des ions en présence de MOD, ce qui est important pour prédire la toxicité et la prise en charge de l'argent dans ces conditions. Ainsi, différentes solutions d'exposition filtrées ont été passées à travers une résine échangeuse d'ions dans le but de connaître la quantité de métal libre retrouvée en solution. En déterminant le pourcentage de métal se liant initialement avec la MOD, ceci nous permettait d'ajuster la concentration de métal total de nos milieux d'exposition pour qu'ils aient des concentrations en Ag⁺ semblables à celles testées en absence de ligand. Cette étape a dû être exécutée à l'aide de la TÉI puisque aucun logiciel ne permet de prédire adéquatement la complexation de l'argent en présence de MOD, étant donné la grande complexité de ces molécules organiques. En effet, une des théories les plus connues décrivant la forme moléculaire de la MOD veut que la structure primaire soit semblable d'une molécule à l'autre, mais qu'il y ait absence d'homogénéité quant à la structure secondaire (Schulten et Schnitzer, 1993). Cette absence d'homogénéité fait en sorte que les propriétés de complexation de la molécule sont mal définies et que les études portant sur la toxicité et la prise en charge d'un métal en présence de MOD sont habituellement de nature qualitative et tiennent rarement compte de manière quantitative de l'interaction métal-MOD. Notre but était donc de remédier à cette situation en quantifiant le métal libre se liant initialement à la MOD. Ainsi, différentes concentrations d'argent total (10, 20, 30, 50, 60, 85, 100, 150, 200 et 300 nM) en présence du ligand d'intérêt ont été analysées au début du temps d'exposition pour dessiner une courbe de titrage de l'argent en présence de MOD (cf. Figure 5.2). Les solutions d'argent en présence de MOD étaient préparées 24 h à l'avance et laissées équilibrer à l'obscurité à 4°C jusqu'à analyse. Puisque le métal d'intérêt était le même, le coefficient de distribution dans ce cas-ci était semblable à celui mesuré en absence de ligands.

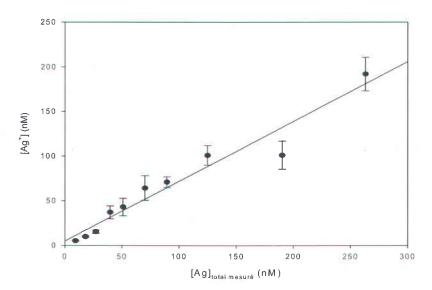


Figure 5.2: Courbe de titrage d'une solution d'acide humique de la rivière Suwannee (5 mg C/L) en fonction de la concentration totale d'argent à pH 7 (n = 3) à t = 0. Les solutions étaient préparées 24 h à l'avance et laissées équilibrer à l'obscurité à 4°C. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures.

Les résultats montrent que la complexation de l'argent en présence de MOD est proportionnelle à la quantité de métal total présent, 68 ± 5 % de l'argent étant libre au temps zéro. Ce résultat diffère de celui obtenu par Pocher (2004) lors de la réalisation d'une courbe de titrage dans les mêmes conditions que les nôtres. En effet, dans son cas, aucun métal libre n'était décelé avant une concentration d'argent total de 50 nM. Par la suite, la concentration d'argent libre était proportionnelle à celle retrouvée en solution, mais la proportion de métal libre était inférieure, soit de 48 ± 9 %. Il est difficile d'expliquer cette différence, mais, elle pourrait être attribuée à deux phénomènes distincts. Tout d'abord, les conditions d'entreposage des solutions étaient différentes dans les deux cas, Porcher (2004) laissant équilibrer ses solutions à la température de la pièce, alors que

nous le faisions à l'obscurité à 4°C. De plus, malgré que les substances humiques provenaient dans les deux études de chez IHSS, les lots utilisés n'étaient pas les mêmes. Il est donc possible que la composition de la MOD différait également. Ainsi, puisque aucune molécule de matière organique n'est semblable, il se peut que la différence dans les résultats obtenus soit liée au lot employé.

5.2.1 : Évolution temporelle de l'ion Ag⁺ pendant l'exposition de *Pseudokirchneriella* subcapitata en présence de MOD

L'étape suivante avait pour but de vérifier l'évolution de la complexation de l'argent libre en solution dans le temps. La MOD étant une molécule complexe et la concentration en argent ajouté étant faible, il est possible que l'atteinte de son équilibre en solution se fasse sur une période assez longue (Ma et al. 1999). Notre intention était donc de s'assurer que les conditions expérimentales demeurent stables tout au long de l'expérimentation. Ainsi, la complexation de l'argent en présence de MOD a été évaluée pour trois concentrations distinctes ([Ag]_{total} = 30, 60 et 90 nM) à chaque pas de temps (t = 24, 48, 72 et 96 h) à la suite de l'inoculation de nos milieux par l'algue verte Pseudokirchneriella subcapitata à une densité cellulaire initiale de 2500 cellules/mL. Les résultats sont présentés à la figure 5.3. On y voit que la concentration de métal libre mesurée varie de façon importante avec le temps. En effet, plus le temps passe et plus l'argent semble se complexer davantage avec la MOD. De plus, il y aurait un changement dans la capacité de complexation dans le temps, la relation entre [Ag⁺] et [Ag]_{total} passant d'une tendance linéaire à t = 0 (cf. Figure 5.2) à une tendance plutôt exponentielle à un temps de 24 → 96 h (cf. Figure 5.3).

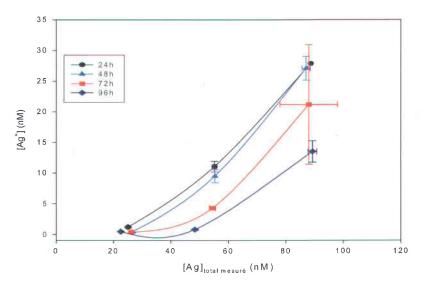


Figure 5.3 : Évolution de la concentration de métal libre en solution en fonction du temps pendant l'exposition de *Pseudokirchneriella subcapitata* à différentes concentrations d'argent total en présence de MOD. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur trois mesures.

Il est difficile d'expliquer le changement de spéciation de l'argent observé dans le temps. En effet, on sait que ce métal n'est pas influencé par la présence croissante d'exsudats relâchés par l'espèce *Pseudokirchneriella subcapitata*, la complexation de ce métal en absence de MOD ne variant pas dans le temps (cf. section 4.2.3 : Évolution dans le temps de la concentration d'argent libre en solution). Malgré l'ajout de MOD, ce comportement devrait demeurer inchangé. Nous avons donc tenté d'isoler les facteurs biotiques et abiotiques de nos milieux afin d'identifier la cause de ce changement de spéciation apparent dans le temps.

5.2.2 : <u>Influence des facteurs abiotiques sur l'atteinte de l'équilibre d'une solution d'argent en présence de MOD</u>

Deux paramètres abiotiques ont été testés, soit la lumière et la température. Les tests d'exposition étaient réalisés à une luminosité de 100 µE à une température de 20°C. Cette étape consistait à quantifier l'effet de ces paramètres sur la complexation de l'argent en présence de MOD mais en absence d'algues. Nous avons donc suivi l'évolution de la concentration de métal libre retrouvée dans des milieux abiotiques (contenant 5 mg/L d'AH et 10 nM d'Ag_{total}) exposées à différentes conditions de luminosité et de température.

La concentration d'Ag⁺ a été quantifiée au début et à la fin des 96 h d'exposition (cf. Tableau 5.1). Ceci avait pour but de déterminer si les variations de métal libre observées en présence de substances humiques sont reliées à la présence des algues ou plutôt à un facteur externe.

Tableau 5.1 : Évolution de la quantité de métal libre en solution contenu dans des milieux abiotiques dans différentes conditions de température et de luminosité. Les erreurs représentent les écart-types sur trois mesures.

| Condition | [Ag] _{tot.} | | [Ag ⁺] _{mes.} | |
|------------------|----------------------|---------------|------------------------------------|---------------|
| | t = 0 h | t = 96 h | t = 0 h | t = 96 h |
| 20°C / lumière | | $7,2 \pm 0,4$ | , | 0.2 ± 0.1 |
| 20°C / obscurité | $10,5 \pm 2,4$ | $8,5 \pm 0,1$ | $5,2 \pm 0,6$ | $0,4 \pm 0,1$ |
| 4°C / obscurité | | $8,3 \pm 0,6$ | | $2,3 \pm 0,1$ |

Nos résultats démontrent que la concentration d'Ag⁺ diminue de façon drastique entre 0 et 96 h pour les milieux entreposés à 20°C. À cette température et en présence de lumière, il ne reste que 3 % de l'argent libre initialement présent en solution après 96 h (0,2 nM d'Ag⁺ à t = 96 h vs 5,2 nM à t = 0). À la même température, mais dans des conditions d'obscurité, c'est 8 % de la concentration initiale qui est retrouvée dans le milieu (0,4 nM d'Ag⁺ à t = 96 h vs 5,2 nM à t = 0). Quoique les concentrations de métal libre mesurées dans les deux cas soient très proches, la luminosité occasionne un effet, la différence entre les milieux exposés ou non à la lumière étant significative (test de Student, t = 2,8 ; p < 0.01). Pour ce qui est des milieux conservés à 4°C, le phénomène observé est le même, quoique la proportion de métal libre mesuré à la fin est nettement supérieure, soit de 56 % $(2,3 \text{ nM d'Ag}^+ \text{ à } t = 96 \text{ h vs } 5,2 \text{ nM à } t = 0)$. Dans ce cas-ci, il y a une différence très significative liée à la température, les milieux conservés à une basse température subissant une modification moins importante de la complexation de l'argent en solution que les milieux conservés à 20° C (test de Student, t = 2.8; p < 0.001). Ces résultats confirment les changements de complexation observés dans le temps lors de l'évaluation de la concentration de métal libre retrouvée en solution en fonction du temps pour les tests d'exposition de Pseudokirchneriella subcapitata à l'argent en présence de MOD (cf. Figure 5.3). Ainsi, ce changement de spéciation serait relié, du moins en partie, à des facteurs abiotiques, ce phénomène se produisant certainement autant en présence qu'en absence d'algues. Une étude plus approfondie sur l'effet d'autres facteurs abiotiques (ex.: effet d'une variation de pH, influence des éléments inorganiques dans le milieu...) serait intéressante pour compléter l'information déjà acquise sur le sujet. D'ailleurs, des chercheurs ont démontré que la biodisponibilité du mercure était réduite à la suite de l'augmentation des niveaux de phosphates, de nitrates, de nitrites, de silicates et de matière organique dissoute dans de l'eau échantillonnée au lac Pilicat en Inde (Kannan et Krishnamoorthy, 2006). Puisque cette eau provenait d'un lac naturel, cette dernière contenait déjà des niveaux relativement élevés de MOD, ce qui laisse croire que plusieurs phénomènes influencent la biodisponibilité d'un métal en présence de ce ligand.

5.3 : Quotas cellulaires chez *Pseudokirchneriella subcapitata* exposé à de l'argent en présence de MOD

Une fois la concentration de métal libre mesurée à chaque pas de temps, un suivi des quotas cellulaires en présence de matière organique dissoute a été fait pour l'ensemble des concentrations d'argent utilisées. Ces dernières variaient entre 0 et 150 nM d'argent total (15, 30, 45, 50, 60, 75, 80, 90, 100, 110, 120 et 150 nM), le but étant d'obtenir la même concentration de métal libre dans cette condition qu'en absence de ligand. Elles ont été estimées à partir de la courbe de titrage de l'argent en présence de MOD, les solutions étant préparées dans les mêmes conditions dans les deux cas (cf. section 5.2 : Évaluation de la concentration d'Ag⁺ retrouvée en solution en fonction du temps en présence de MOD).

L'analyse des quotas cellulaires en fonction de la quantité de métal initialement présent en solution (cf. Figure 5.4) nous montre qu'à chaque pas de temps donné, la prise en charge s'accentue avec une augmentation de la concentration d'argent dans le milieu. Un plateau est cependant atteint à une concentration se situant autour de 80 nM. Ce plateau n'avait pas été observé de façon aussi distinctive en absence de MOD, malgré que la gamme de concentration en Ag⁺ utilisée soit semblable, les concentrations de métal total utilisées étant toutefois plus élevées. L'observation de cette figure nous informe également que pour les concentrations supérieures à 80 nM d'argent total, les quotas cellulaires sont passablement stables dans le temps (échelle log-log). Ceci diffère de la tendance observée pour les concentrations testées les plus faibles (< 80 nM), où la prise en charge augmentait

de façon proportionnelle à la concentration de métal présente dans le milieu. Ce changement de pente pourrait s'expliquer par trois phénomènes distincts. Premièrement, nous avons vu précédemment qu'aux concentrations d'argent total inférieures à 80 nM, la concentration d'ion Ag⁺ libre diminuait avec le temps. Si on se réfère au MIL, qui prédit que la quantité de métal absorbé est proportionnelle à la quantité de métal libre en solution, ceci peut expliquer que les quotas cellulaires ne soient pas stables dans le temps. Deuxièmement, aux faibles concentrations testées, les algues se divisent tout en accumulant du métal à l'intérieur de sa structure. Ceci mènerait normalement à l'atteinte d'un état stationnaire, mais les concentrations diminuant dans le temps (par adsorption et par prise en charge), ceci donne des quotas cellulaires plus faibles à t = 96 h qu'à t = 24 h pour une concentration donnée d'argent total initiale. En d'autres mots, ceci signifie qu'il y a biodilution. Puisque les pertes sont plus faibles aux concentrations les plus élevées (> 80 nM) et que la croissance des algues est la plus affectée, ceci donne l'atteinte d'un plateau pour ces concentrations. Le troisième phénomène serait relié à l'état physiologique des cellules en culture. En effet, nous avons démontré que les algues, aux concentrations d'argent total supérieures à 80 nM en présence de MOD étaient mortes, les cultures exposées à ces concentrations ne croissant plus après un repiquage dans un milieu sain. Ainsi, les algues accumulent de l'argent et une fois un certain seuil atteint, elles meurent et n'accumulent plus.

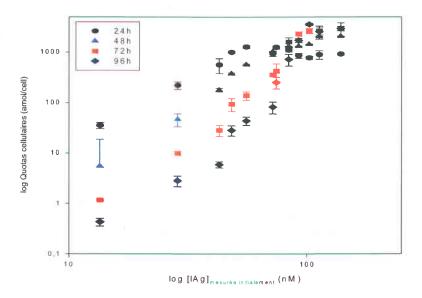


Figure 5.4 : Prise en charge de l'argent à chaque pas de temps en présence de MOD chez l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*, évalués selon la concentration de métal dissous mesurée initialement dans le milieu. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur la moyenne de trois mesures.

Les quotas cellulaires obtenus à chaque pas de temps lors des essais effectués dans les deux conditions expérimentales avec l'argent, c'est-à-dire en présence et en absence de MOD, ont été comparés entre eux (cf. Figure 5.5). Les résultats nous démontrent que la concentration de métal absorbée par *Pseudokirchneriella subcapitata* est moins élevée en présence de substances humiques pour chaque pas de temps testé. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de la MOD qui complexe le métal présent et diminue ainsi la biodisponibilité de celui-ci pour les organismes aquatiques (Glover et Wood, 2005; Nichols *et al.* 2006). Une hypothèse veut que l'argent pénètre à l'intérieur de la cellule via un transporteur du cuivre par un transport accidentel (Odermatt *et al.* 1994; Solioz et Odermatt, 1995; Verheijen *et al.* 1998). Le transporteur répondra donc à la [Ag⁺] en solution et puisque celle-ci est plus faible en présence de MOD, la prise en charge le sera tout autant. Ceci expliquerait ainsi les quotas cellulaires plus faibles en présence de ligands.

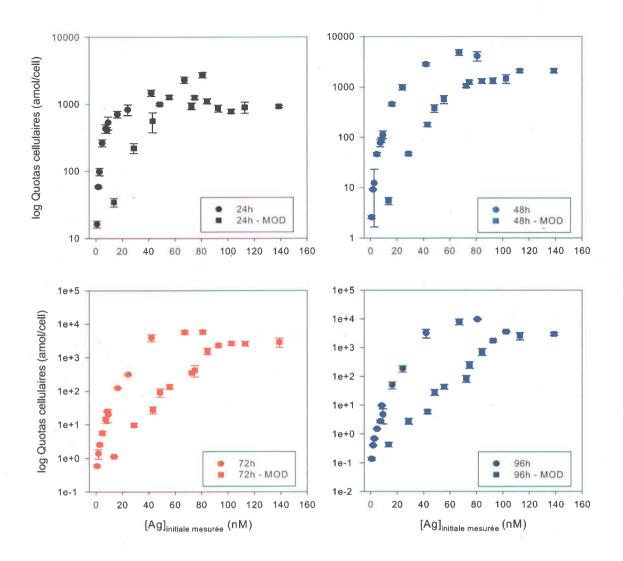


Figure 5.5 : Comparaison de la prise en charge en absence (cercle) et en présence (carré) de MOD chez l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*. Les barres d'erreurs représentent types sur trois mesures.

Si on regarde les résultats de prise en charge de l'argent en fonction du temps en présence de la MOD (cf. Figure 5.6), une tendance semblable à celle observée à la figure 5.4 est observée, c'est-à-dire que la quantité de métal absorbé par *Pseudokirchneriella subcapitata* augmente de façon linéaire dans le temps pour les fortes concentrations ([Ag]_{tot} > 80 nM) alors qu'elle diminue pour les concentrations plus faibles ([Ag]_{tot} < 80 nM). Cette tendance avait également été observée en absence de matière organique dissoute, mais à des concentrations de métal total légèrement plus faibles (≈ 40 nM). Si on ramène ces concentrations de métal total en concentration de métal libre mesurée au temps 0 après

24 h d'équilibrage à l'obscurité à 4°C, on remarque que dans les deux cas, ceci représente environ 40 nM d'Ag⁺. En effet, en absence de MOD, on a vu que la concentration de métal libre équivalait à la concentration de métal retrouvée en solution (cf. section 4.2.3 : Évolution dans le temps de la concentration d'argent libre en solution). Puisque nous avions 40 nM d'argent total, ceci représente donc 40 nM d'Ag⁺. En présence de MOD, environ 30 % de l'argent est complexé, ce qui représente une concentration d'Ag⁺ si situant autour de 45 nM, ce qui se rapproche de la concentration retrouvée en solution en absence de MOD, les pertes dans le temps font en sorte que la concentration de métal libre diminue dans le temps. En présence de MOD, on a vu qu'il se produisait un fort changement de spéciation occasionné par des facteurs abiotiques, ce qui diminuait du même coup la concentration de métal libre retrouvée en solution. Les quotas cellulaires diminuant dans le temps, tout comme la concentration d'Ag⁺ en solution, ceci laisse présager que la quantité de métal pris en charge dans le temps est régit par la concentration de métal libre dans le milieu.

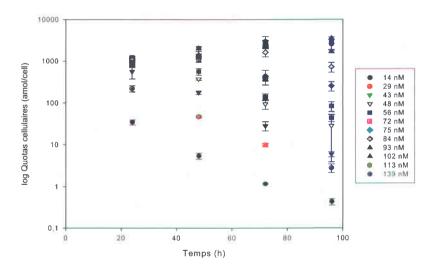


Figure 5.6: Quotas cellulaires obtenus pour chaque concentration d'argent en présence de MOD en fonction du temps chez l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*. Les barres d'erreurs représentent les écart-types mesurés sur la moyenne de trois mesures.

Une telle tendance a été observé chez les algues vertes *Chlamydomonas reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata* exposées sur de courtes périodes (t < 60 min) à du cadmium sous forme libre (Cd^{2+}) en présence de différents ligands dont faisaient partie

l'AH et l'AF de la rivière Suwannee (Vigneault, 2000). Dans ce cas, les taux d'absorption du cadmium en présence et en absence de ligands ont été comparés et les résultats illustrent que la présence du ligand n'avait aucune influence sur la prise en charge pour une même concentration de Cd²⁺ dans les milieux d'exposition, et ce pour chaque espèce d'algues. Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'argent et le cadmium sont des métaux qui agissent de façon différente sur les algues. Cependant, ils ont certaines ressemblances, dont le fait qu'ils réagissent de manière semblable à la présence de MOD dans le milieu.

Ce résultat à long terme diffère cependant de celui obtenu par Porcher (2004) lors de la réalisation de ce même type d'expérience, mais sur de courtes périodes ($t \le 40$ min). En effet, cette auteure avait observé que la prise en charge d'argent en présence de SH était légèrement plus élevée qu'en absence celles-ci. Elle avait considéré trois explications possibles, soit i) la présence à la surface algale de complexes Ag-AH adsorbés, ii) la méthode de dosage de l'argent libre en présence de SRHA (Suwannee River Humic Acid) qui sous-estime la [Ag⁺] réelle et iii) les interactions de la SRHA existant au niveau de la cellule algale (membrane cellulaire). De toutes ces hypothèses, la troisième demeure la plus valide. En effet, la première ne peut s'appliquer, puisque s'il y avait bel et bien présence d'un complexe ternaire à la surface cellulaire, les quotas évalués seraient plus élevés en présence de MOD, les rinçages avec de l'argent froid ne risquant pas de désorber l'argent fixé aux substances humiques étant donné la forte affinité de l'ion pour le ligand et la cinétique apparemment lente (cf. Figure 5.3). La technique d'échange ionique pourrait effectivement sous-estimer la [Ag⁺] réelle (cf. Figure 4.2), mais cette méthode a fait ses preuves au cours des dernières années et les résultats obtenus sont très reproductibles. Il se peut donc que la membrane cellulaire subisse des transformations dans le temps à la suite de l'interaction de la SRHA avec cette dernière. Ceci pourrait se traduire par une plus grande entrée de métal dans la première heure d'exposition. Par contre, cette réponse initiale (observée sur quelques minutes) pourrait n'être que transitoire, les algues s'acclimatant à la présence des SH. L'algue étant capable de s'acclimater à divers stress, l'effet initialement observé s'estomperait donc après un temps d'exposition qui s'échelonnent sur plusieurs heures (jusqu'à 96 h). Les premières mesures d'absorption ayant été prises après 24 h, il est impossible de confirmer si le phénomène observé par Porcher (2004) s'est produit également dans notre cas. Des études plus approfondies seraient nécessaires pour déterminer si des interactions existent entre la membrane cellulaire et la matière organique dissoute, ce qui permettrait par la suite de savoir ce qui se passe avec exactitude au niveau de la surface de l'algue.

5.4 : Adsorption de l'argent en présence de MOD par *Pseudokirchneriella subcapitata*

En parallèle avec les expériences de prise en charge réalisées avec la matière organique dissoute, l'adsorption de l'argent en présence de ce ligand a été évaluée à chaque pas de temps pour l'ensemble des concentrations utilisées. Ainsi, le suivi dans le temps de la quantité de métal se retrouvant à la surface de la cellule montre encore une fois, comme il en était question lors des tests réalisés en absence de MOD, une diminution de la concentration d'argent adsorbée par *Pseudokirchneriella subcapitata* pour chaque concentration testée (cf. Figure 5.7). Cette diminution est plus importante pour les faibles concentrations de métal. De ce fait, plus la concentration d'argent augmente et moins les pertes sont considérables. Ce phénomène avait également été observé en absence de substances humiques, ce qui laisse croire que les causes de cette variation dans le temps seraient encore une fois les pertes de métal dans le milieu aqueux, lié au changement de spéciation qui se produit dans le temps (i.e. une augmentation de la complexation de l'ion Ag⁺ par la MOD). Les pertes étant plus importantes pour les faibles concentrations, moins de métal est disponible pour s'adsorber à la surface cellulaire, ce qui explique cette baisse dans le temps.

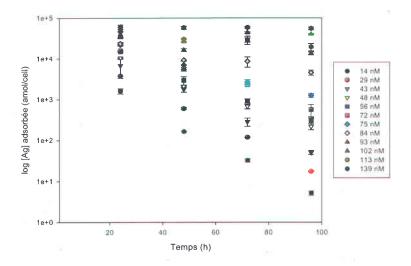


Figure 5.7: Concentration d'argent adsorbée par *Pseudokirchneriella subcapitata* exposées à différentes concentrations d'argent en présence de substances humiques en fonction du temps. Les barres d'erreurs indiquent les écart-types obtenus sur trois mesures différentes.

Un suivi de l'adsorption de métal en présence de MOD a également été fait en fonction de la concentration de métal initialement présent en solution (cf. Figure 5.8). Dans ce cas-ci, plus la concentration de métal en solution augmente et plus il y a d'argent adsorbé à chaque cellule. Un plateau est atteint à une concentration se situant autour de 90 nM (échelle log-log). L'adsorption est relativement faible pour les concentrations inférieures à celle-ci et cette tendance s'accentue avec un temps d'exposition plus élevé. Pour les concentrations d'ordre supérieur, l'adsorption est relativement stable, qu'importe la concentration ou le temps d'exposition. Ce phénomène avait également été observé lors de l'analyse des résultats obtenus avec le cadmium et l'argent seul. Il peut s'expliquer par le fait qu'aux faibles concentrations, les [Ag] diminuent dans le temps (pertes par adsorption et accumulation), ce qui diminue l'adsorption en conséquence. Aux plus fortes concentrations, la croissance est atténuée, ce qui engendre une concentration externe en argent plus stable et un équilibre qui change peu, d'où des quotas externes plus stables aux fortes concentrations.

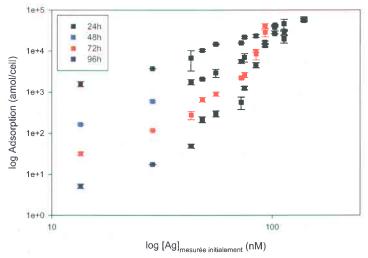


Figure 5.8 : Adsorption de l'argent à chaque pas de temps chez l'algue verte Pseudokirchneriella subcapitata selon la concentration de métal présent dans le milieu initialement en présence de MOD. Les barres d'erreurs représentent les écart-types sur trois mesures.

La concentration d'argent adsorbée à la surface cellulaire en présence de substances humiques par l'algue verte Pseudokirchneriella subcapitata a été comparée à celle obtenue en absence de ce ligand. Les résultats nous démontrent qu'à chaque pas de temps examiné, la concentration de métal adsorbée est plus petite lorsqu'il y a ajout de matière organique dissoute dans le milieu (cf. Figure 5.9). Cette tendance est la même que celle observée selon les autres paramètres utilisés précédemment (e.g.: concentration initiale de métal dans le milieu). Elle pourrait encore une fois s'expliquer par la complexation de l'argent par la MOD qui réduit la concentration de métal libre en solution, mais également par une des propriétés de la MOD. En effet, les substances humiques sont reconnues comme étant d'excellents surfactants naturels, ce qui signifie qu'elles peuvent s'adsorber aux surfaces biologiques (Campbell et al. 1997). Cette adsorption est observée principalement à pH 5 (Vigneault et al. 2000), mais existe néanmoins à pH 7 (Parent et al. 1996). Ainsi, en présence de MOD, il y a moins de métal pouvant se lier à la surface, ce qui expliquerait pourquoi l'adsorption est moins importante en présence de MOD. De plus, en présence de MOD, on observe une évolution dans le tracé des courbes, ces dernières passant d'une tendance linéaire au temps initial à une allure parabolique après 96 h d'exposition (échelle normale). Ce même changement dans l'allure des courbes a déjà été observé lors de la mesure de la concentration de métal libre à chaque pas de temps (cf. section 5.2.1 : Évolution temporelle de l'ion Ag⁺ pendant l'exposition de *Pseudokirchneriella subcapitata* en présence de MOD). En effet, dans ce cas précis, on voyait que la complexation de l'argent en présence de substances humiques augmentait dans le temps et que la courbure des droites obtenues s'accentuait à chaque pas de temps. Ainsi, ce résultat laisse présager que l'adsorption de l'argent en présence de SH est régit uniquement par l'ion libre Ag⁺.

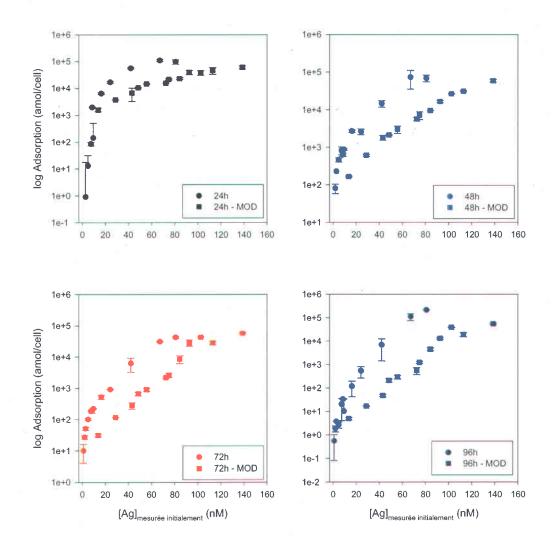


Figure 5.9 : Comparaison de l'adsorption de l'argent en présence (carré) et en absence (cercle) de MOD chez l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*. Les barres d'erreurs représentent les écart-types obtenus sur la moyenne de trois mesures.

5.5 : Toxicité de l'argent chez *Pseudokirchneriella subcapitata* en présence de matière organique dissoute

La présence de ligands, tels que la matière organique dissoute, peut influencer la toxicité d'un métal face à un organisme vivant (cf. section 1.2 : Complexation de l'argent et formes retrouvées en milieu aqueux). Pour savoir si celui utilisé avait une influence sur la toxicité de l'argent chez l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*, nous avons fait un suivi des densités cellulaires retrouvées en solution sur une période de 96 h, pour ensuite mesurer les CE50s à plusieurs pas de temps, soit à 24, 48, 72 et 96 h. La courbe dose-réponse obtenue est présentée à la figure 5.10. On y observe la même tendance qu'en absence de substances humiques, c'est-à-dire que les courbes doses-réponses déterminées à t = 48, 72 et 96 h sont semblables, mais décalées en lien avec la complexation de l'argent avec la MOD. Ceci laisserait présager que l'argent agit toujours de la même manière chez les organismes phytoplanctoniques, la tendance observée étant la même en absence qu'en présence de ligand.

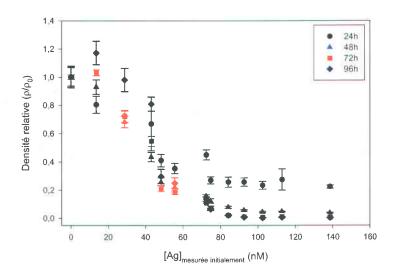


Figure 5.10 : Densité relative de *Pseudokirchneriella subcapitata* exposé à différentes concentrations d'argent mesuré initialement en présence de MOD. Les barres d'erreurs représentent les écart-types obtenus sur trois mesures différentes.

L'ajout de MOD dans le milieu d'exposition pourrait néanmoins influencer la croissance mesurée chez *Pseudokirchneriella subcapitata*. En effet, puisque ce ligand est

un excellent surfactant, sa présence occasionnerait une variation dans le taux d'entrée des éléments essentiels et risquerait de diminuer la croissance des algues en présence de substances humiques. Par contre, nos observations nous laissent croire que la MOD ne nuit pas à la croissance, bien au contraire. En effet, le taux de croissance des cultures témoins était plus important ($\mu_{max} \approx 3.8$ division / j) en présence de MOD qu'en son absence ($\mu_{max} \approx 1.7$ division / j). Il est toutefois important de mentionner que le volume de culture utilisé dans les deux cas n'était pas le même, un volume inférieur pouvant favoriser le taux de croissance d'un organisme en raison d'un meilleur apport en carbonates (rapport surface : volume favorable à la diffusion du CO_2 de l'atmosphère; Réty, 2006). Étant donné que nous avons observé une meilleure croissance dans des conditions pourtant défavorables, il semble donc que la MOD favoriserait la croissance des algues.

Les valeurs de toxicité (CE50s) sont présentées à la figure suivante (cf. Figure 5.11). On y compare les résultats en absence et en présence de MOD selon différents paramètres, soit selon la quantité de métal présent initialement (cf. Figure 5.11A), la quantité de métal mesurée à chaque pas de temps (cf. Figure 5.11B), les quotas cellulaires (cf. Figure 5.11C), la quantité de métal adsorbée (cf. Figure 5.11D) et la quantité de métal libre mesurée à chaque pas de temps (cf. Figure 5.11E).

En ce qui concerne la toxicité de l'argent, on remarque qu'elle augmente dans les 48 premières heures d'exposition, qu'importe par rapport à quel paramètre cette dernière est évaluée. Par la suite, la toxicité continue d'augmenter si on évalue la toxicité selon la quantité de métal pris en charge ou adsorbé à la surface cellulaire (cf. Figures 5.11 C et D) alors qu'il n'y a aucune différence significative entre les CE50s évalués aux temps t = 48, 72 et 96 h si on évalue la toxicité selon la concentration de métal en solution (cf. Figures 5.11 A et B). Cette tendance dans le temps est observable autant en absence qu'en présence de matière organique dissoute. Dans le cas de l'argent libre, il existe une légère différence : la toxicité est stable sur l'ensemble du temps d'exposition. Cette tendance concorde avec les CE50(Ag⁺) obtenus lors des tests de toxicité en présence uniquement d'argent.

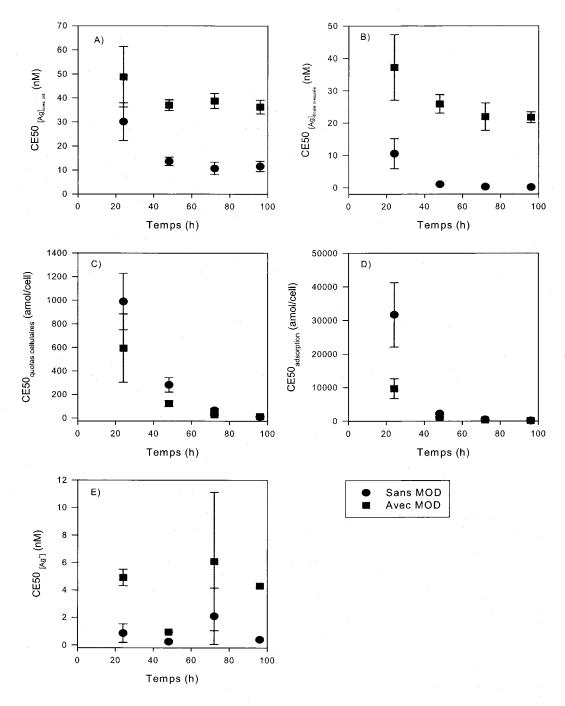


Figure 5.11: Toxicité de l'argent chez l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* en absence (cercle) et en présence de MOD (carré). La toxicité a été évaluée selon la concentration initiale de métal (A), la concentration de métal à chaque pas de temps (B), les quotas cellulaires (C), l'adsorption (D) et la concentration de métal libre (E). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95%.

Si on s'attarde maintenant à la comparaison des résultats obtenus dans les deux conditions expérimentales, on remarque qu'il existe une différence selon quel paramètre les CE50s ont été évalués. En fonction de la concentration initiale de métal mesurée (cf. Figure 5.11A), l'ajout de MOD aurait un effet protecteur sur Pseudokirchneriella subcapitata, les CE50s étant plus élevés dans ces circonstances. La même conclusion peut être tirée si on évalue la toxicité selon la concentration finale de métal mesurée (cf. Figure 5.11B) ou selon la concentration de métal libre aux temps t = 24, 48 et 96 h (cf. Figure 5.11E). Le résultat obtenu à la troisième journée d'exposition ne peut être considéré puisqu'aucune différence significative n'existe entre les deux valeurs illustrées. La forte affinité de l'argent pour la MOD serait responsable de l'effet protecteur observé chez les espèces aquatiques d'eaux douces. En se complexant avec l'argent, la MOD séquestre et rend biologiquement non disponible l'ion Ag⁺ (Janes et Playle, 1995; Glover et Wood, 2004). Ainsi, les organismes aquatiques sont exposés en proportion moins imposante à l'élément toxique, ce qui du même coup, les protège. De plus, Parent et al. (1996) ont démontré que la présence d'acides fulviques (2,3 – 22 mg C/L) dans le milieu d'exposition avait pour effet de protéger l'algue verte Chlorella pyrenoidosa exposée à une concentration constante d'aluminium inorganique ([Al $_i$] = 6,0 \pm 0,2 μM ; [Al $_{tot}$] = 6,2 -17,8 µM), en restaurant sa croissance au même niveau que les témoins. Ces auteurs avaient expliqué ce phénomène par l'effet compensatoire qu'auraient les substances fulviques sur la membrane cellulaire de l'algue et démontré que l'aluminium provoquait une diminution de la perméabilité membranaire tandis que les acides fulviques la restauraient. Par conséquent, la matière organique jouerait un double rôle, soit un premier de ligand complexant le métal et le rendant indisponible, et un second comme protecteur de la perméabilité membranaire de la cellule algale. Dans le cas de l'argent, les résultats présentés jusqu'à présent pour les quotas cellulaires en présence de substances humiques laissent croire que la perméabilité membranaire de la cellule algale est affectée. Les quotas cellulaires obtenus en présence de MOD sont d'ordre inférieur à ceux obtenus en absence de ligand (cf. Figure 5.5). Un parallèle est toutefois difficile à établir entre l'effet observé de l'aluminium sur la perméabilité membranaire et nos résultats puisque nous ne connaissons pas l'influence de l'argent sur la perméabilité membranaire de notre algue. L'ajout dans nos milieux d'exposition (en absence et en présence de MOD) d'un soluté non polaire pouvant pénétrer à l'intérieur de la cellule de façon passive (e.g. : sorbitol) serait nécessaire pour déterminer la portée de l'argent sur la perméabilité membranaire. Ainsi, il serait possible de déterminer si ce ligand joue également un double rôle dans cette étude.

L'effet protecteur observé précédemment (cf. Figures 5.11 A et B) n'est pas présent si on évalue la toxicité en fonction de la quantité de métal pris en charge par l'algue (cf. Figure 5.11C). La réaction serait même inversée dans ce cas-ci, la toxicité étant plus élevée en présence de MOD. Cependant, aucune différence significative n'est visible à t = 24 h. Ce résultat est inédit et d'autant plus difficile à expliquer. Il semble qu'en absence de MOD, l'argent absorbé par l'algue atteigne plus facilement les sites intracellulaires sensibles de l'algue. En effet, Boily (2004) avait observé un phénomène similaire en présence et absence de thiosulfate. L'argent, une fois à l'intérieur de la cellule, pourrait se complexer avec une multitude de ligands différents ce qui ferait en sorte que l'argent ne serait plus disponible et qu'il n'engendrerait que très peu d'effet sur l'algue. Toutefois, contrairement au thiosulfate, la MOD n'est pas internalisée. Pour que notre explication s'applique, il faudrait donc que la présence de MOD influe sur la composition intracellulaire des algues. Nous ne pouvons à ce stade que spéculer sur ce point mais selon cette conjecture, la MOD diminuerait indirectement le pool de ligands intracellulaires. Ainsi, l'argent pris en charge par Pseudokirchneriella subcapitata aurait moins d'obstacles et pourrait attaquer des cibles intracellulaires plus facilement qu'en absence de MOD. Pour démystifier davantage ce phénomène, il serait intéressant de s'attarder à la spéciation intracellulaire, un domaine très peu exploré jusqu'à ce jour.

Finalement, si on évalue la toxicité en fonction de la quantité d'argent adsorbée, il n'y a aucune différence significative entre les points mesurés aux temps d'exposition de 48, 72 et 96 h. Cette constatation avait également été observée lors de la comparaison des courbes d'adsorption en présence et en absence de ligand. Ainsi, pour une même concentration de métal libre dans le milieu, le même effet délétère sur la croissance de l'algue est caractérisé. Ceci signifierait donc que, dans ce cas précis, le modèle de l'ion libre est respecté, puisque celui-ci prédit que la réponse biologique d'un organisme sera

identique, qu'importe la présence ou l'absence de ligands, cette dernière ne dépendant que de la concentration d'ion libre en solution (Campbell, 1995). D'ailleurs, de tous les résultats de toxicité obtenus, seul celui selon le taux d'adsorption respecté ce modèle. Tous les autres sont inattendus, notamment ceux obtenus lors de la comparaison des quotas cellulaires. Cependant, même si les résultats que nous avons obtenus ne sont pas tout à fait conformes à ce qui est prédit par le MIL, ils concordent avec ceux déterminés par Hiriart-Baer et al. (2006) pour le complexe AgS₂O₃ et Chlamydomonas reinhardtii. En effet, ces auteurs ont observé un effet protecteur du thiosulfate contre la toxicité de l'argent chez Chlamydomonas reinhardtii, la CE(Ag⁺) étant environ 1,6 fois plus élevée en présence de thiosulfate (CE50 = 13.9 ± 0.9 nM en absence de thiosulfate et de 21.0 ± 1.6 nM en présence de thiosulfate). Par contre, ils n'ont pas observé cette atténuation de toxicité chez notre algue d'intérêt, Pseudokirchneriella subcapitata, ce qui suggérerait que l'espèce utilisée jouerait un rôle important dans la toxicité d'un métal. Le thiosulfate et la MOD sont deux ligands forts différents. En effet, le premier est assimilable par l'algue, alors que le second ne l'est pas. Malgré leurs différences, ces ligands ont tous les deux une forte affinité pour l'argent, ce qui sous-entend qu'ils agissent de façon semblable sur l'algue, en la protégeant contre l'élément toxique.

5.6: Conclusion

La matière organique dissoute est un ligand naturel omniprésent dans nos écosystèmes aquatiques d'eaux douces. Elle est caractérisée par de nombreuses caractéristiques distinctes, sa principale étant sa forte affinité pour les métaux, ce qui fait en sorte qu'elle lie ces derniers et diminue leur biodisponibilité dans le milieu. Malheureusement, puisque sa structure moléculaire demeure encore un mystère, il est difficile de prédire avec exactitude comment réagira un métal à la présence de ce ligand. Nous avons donc étudié la prise en charge, l'adsorption et la toxicité de l'argent chez l'espèce phytoplanctonique *Pseudokirchneriella subcapitata* en présence de MOD sur une période de 96 h, le but de cette dernière étape étant de quantifier l'effet de l'ajout de MOD sur la toxicité de notre métal d'intérêt.

En premier lieu, nous nous sommes rendus compte que l'ajout d'acide humique stabilisait la concentration d'argent dans le milieu, les pertes observées sur les parois des contenants étant moins importantes, ce qui a grandement aidé à l'analyse des résultats. Ainsi, si on examine de plus près les résultats d'adsorption et de prise en charge, nous observons que lors de l'ajout de MOD, ces deux paramètres diminuent en fonction du temps, un bris dans la pente se produisant à une concentration autour de 80 nM en présence de ce ligand. Cette variation serait reliée au fait qu'aux faibles concentrations, les [Ag⁺] diminuent dans le temps (pertes par adsorption et accumulation), ce qui diminue l'adsorption et la prise en charge en conséquence. Aux plus fortes concentrations, la croissance est atténuée, ce qui engendre une concentration externe en argent plus stable et un équilibre qui change peu, d'où des quotas internes et externes plus stables.

Pour quantifier l'effet de la MOD sur la biodisponibilité de l'argent, les filtrats recueillis à la fin de chaque temps d'exposition ont été analysés à l'aide de la TÉI pour en déterminer la concentration de métal libre en solution. Les courbes obtenues démontrent que la spéciation de l'argent varie également dans le temps, la relation entre la concentration de métal libre retrouvée dans le milieu en fonction de la concentration totale de métal passant de linéaire à t = 0 à une relation parabolique à t = 96 h (cf. Figure 5.3). Ce changement serait relié non pas aux algues mais plutôt à des facteurs abiotiques. En effet, nos résultats semblent indiquer que la cinétique de complexation de l'argent est très lente à 4 °C. La complexation moins importante observée à 4°C qu'à 20°C après 96 h supporte cette interprétation, la température étant habituellement un facteur important dans la cinétique réactionnelle. Cette modification dans la spéciation explique également le changement d'adsorption observé dans le temps en présence de ce ligand.

À l'aide des mesures de métal libre effectuées à la TÉI, nous avons pu déterminer si le modèle de l'ion libre était respecté dans le cas d'une contamination à l'argent en présence de substance humique. C'est effectivement le cas en ce qui concerne l'accumulation, l'argent pris en charge étant semblable en présence et en absence de MOD pour une même concentration de métal libre dans le milieu. Si on observe l'effet de ce métal sur la croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata*, la MOD engendrerait un effet

protecteur sur l'algue verte utilisée selon la concentration totale de métal présent dans le milieu. Ceci s'expliquerait par la biodisponibilité du métal inférieure en présence de MOD. Par contre, si on évalue la toxicité selon la concentration de métal pris en charge, la tendance serait inversée et la toxicité serait supérieure à la suite de l'ajout de SH, c'est-àdire qu'il faut une dose interne plus faible d'argent pour inhiber 50 % de la croissance de l'algue en présence d'AH qu'en absence d'AH. Dans ce cas-ci, il est difficile d'expliquer le résultat obtenu, mais nous spéculons que ce serait relié au fait que la MOD présente dans le milieu modifie la spéciation intracellulaire de l'argent qui rendrait l'algue plus sensible à l'argent. Malgré ces résultats apparemment contradictoires, une conclusion peut être tirée. En effet, qu'il y ait ajout ou non de MOD, l'argent demeure un métal extrêmement toxique, les valeurs de CE50s se retrouvant dans l'ordre du nanomolaire. Toutefois, afin de contextualiser nos résultats, les valeurs de CE50s obtenues avec MOD ne sont pas représentatives des concentrations d'argent actuellement retrouvées dans la nature. En tenant compte de la forte complexation de l'argent par l'AH observée (du moins après 96 h d'équilibre), les concentrations en Ag⁺ seront vraisemblablement extrêmement faibles dans la nature. Finalement, nos résultats suggèrent que la connaissance de la concentration de l'ion libre Ag+ ne suffit pas à prédire la toxicité de l'argent envers le phytoplancton en présence de matière organique. Ainsi, les résultats obtenus sur la complexation de l'argent et de la MOD au cours de ce projet tracent la voie à des études plus approfondies sur la spéciation de ce ligand à l'argent afin de compléter les connaissances acquises jusqu'à maintenant.

| | • | | | |
|---|-----|--|--|-------|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | . • • |
| | | | | |
| | | | | |
| | • • | | | |
| | | | | |
| ÷ | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | , | | | · |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

6.0: Conclusion

Un des principaux problèmes reliés à l'étude de la toxicité des métaux envers les algues est que certains d'entre eux ne restent que très peu longtemps dans le milieu à l'étude (ex. : argent). En effet, l'absorption par les algues est très rapide, d'autant plus lorsque aucun ligand non métabolisable ne permet de maintenir la concentration de métal libre stable dans le milieu. On s'attend donc à ce que, dans ces circonstances, le métal soit presque épuisé du milieu d'exposition sur une période de quelques heures. Grâce à la cytométrie en flux, il est maintenant possible d'utiliser des inoculums plus faibles et d'énumérer précisément de petites densités cellulaires. Cette grande sensibilité permet de minimiser: i) la surface d'algues exposées et ainsi diminuer les pertes par adsorption / absorption; et ii) la concentration de ligands organiques (exsudats) pouvant fortement complexer les métaux en solution, ce qui contribuerait à modifier leur spéciation chimique et leur biodisponibilité. Nous avons donc abaissé les densités cellulaires initialement utilisées dans les tests normés de 10 000 à 2500 cellules/mL. L'algue verte Pseudokirchneriella subcapitata a par la suite été exposée sur une période maximale de 96 h à diverses concentrations de deux métaux non-essentiels et la prise en charge des métaux, l'adsorption et l'inhibition de la croissance en fonction du temps ont été mesurés. Le cadmium a d'abord été utilisé, suivi par l'argent, en absence et présence de matière organique dissoute. En démarrant avec une population faible, nous croyions qu'il est possible de minimiser l'exsudation de ligands pouvant modifier la spéciation du métal, donc sa biodisponibilité, ainsi que les pertes par prise en charge et par adsorption. Le suivi des variables s'est fait en fonction du temps, un temps plus court pouvant également minimiser la présence d'exsudats. Cette démarche a donc permis d'explorer la possibilité d'écourter la durée des tests de toxicité avec les algues pour en optimiser la production de résultat.

6.1: Conclusions sur le cadmium

Pour s'assurer de la validité de notre méthode, nous avons testé notre protocole avec le cadmium. La toxicité de ce métal est bien connue dans le domaine de l'écotoxicologie, ce qui permet de comparer les résultats obtenus à ceux déjà publiés.

Ainsi, comparativement aux tests normés réalisés par le CEAEQ avec le cadmium (CE50 = 83 ± 2 nM), notre méthode s'est avérée être plus sensible (CE50 = 20 ± 6 nM). Ceci peut s'expliquer par la plus grande biodisponibilité du métal libre dans nos conditions, malgré que la spéciation du cadmium ait été grandement affectée par la présence des exsudats tout au long de l'expérience. En ce qui concerne les résultats de prise en charge, celle-ci était également plus élevée lors des tests avec un inoculum plus faible. Ceci s'expliquerait encore une fois par la plus grande biodisponibilité de l'ion libre Cd²⁺. Pour ce qui est de l'adsorption, elle était semblable dans les deux cas à la suite d'une exposition de 96 h.

Nos résultats ont également démontré que la prise en charge et l'adsorption du cadmium variaient selon la concentration de métal testée. En effet, à des concentrations en cadmium relativement faibles (< 50 nM), la croissance des algues se poursuivait, favorisant ainsi une certaine biodilution et minimisant l'augmentation de la concentration interne en cadmium. Les changements observés dans le milieu se faisaient de façon progressive dans le temps. Aux concentrations en cadmium plus élevées (> 50 nM), la diminution observée dans la croissance était abrupte et la population d'algues semblait incapable de réagir à tout ajout de métal supplémentaire dans le milieu. Les plus faibles taux de croissance se sont donc traduits par une augmentation des concentrations intracellulaires en cadmium. Dans ces conditions, la proportion de métal libre dans le milieu et l'adsorption se sont avérées plus élevées que celles mesurées aux concentrations inférieures.

6.2: Conclusions sur l'argent

Le protocole utilisé ayant fait ces preuves, nous l'avons repris pour effectuer des tests de toxicité avec l'argent. Contrairement au cas du cadmium, la concentration en Ag^+ ne peut être tamponnée à l'aide de l'EDTA, ce qui signifie que sa concentration dans les milieux d'exposition a tendance à diminuer rapidement dans le temps. Les résultats obtenus avec ce métal allaient sensiblement dans le même sens que ceux obtenus avec le cadmium. En effet, encore une fois, la méthode que nous avons développée s'est avérée être plus sensible, la CE50 mesurée à la suite d'une exposition de 96 h étant de 12 ± 2 nM dans notre cas alors qu'elle était de 24 nM lors des tests réalisés par le USEPA à une densité initiale de $10\ 000\ \text{cellules/mL}$. Malgré la plus grande sensibilité observée lors du

dénombrement des cellules algales à l'aide de la cytométrie en flux, l'utilisation de ce protocole n'a pas permis d'éliminer les fortes pertes d'argent observées sur les parois des récipients, de même que celles observées via le phénomène d'absorption / adsorption par l'algue. Les pertes étant toujours considérables, les résultats de prise en charge et d'adsorption ont été régis par ces dernières. Ainsi, les quotas cellulaires et les données d'adsorption chez Pseudokirchneriella subcapitata lors d'une exposition de 96 h à l'argent ont montré une diminution dans le temps. Ceci est également le cas pour les concentrations d'argent totale en solution, cette variable étant également régit par les pertes observées en solution. Ce résultat nous a permis de conclure qu'il est préférable, dans le cas de l'argent, d'analyser les résultats de prise en charge et d'adsorption selon la concentration initiale d'argent présente en solution, la toxicité de ce métal se faisant ressentir très rapidement et demeurant stable dans le temps dès t = 48 h. La durée des temps d'exposition pourrait d'ailleurs être diminuée à cette période, les premières heures d'exposition à ce métal étant critiques pour la croissance de la cellule phytoplanctonique. En revanche, contrairement au cadmium, la présence d'exsudats ne semble pas affecter de façon notable la spéciation de l'argent, reflétant une différence d'affinité importante des exsudats selon le métal utilisé.

6.3 : Conclusions sur l'argent en présence de MOD

Pour évaluer la toxicité de l'argent de façon encore plus représentative de la réalité, nous avons ajouté à nos milieux d'exposition de la matière organique dissoute (i.e. acide humique extraite de la rivière Suwannee). Le but de cette étape était de caractériser de façon quantitative l'interaction existante entre l'argent et la MOD, cette dernière n'ayant été que rarement évaluée jusqu'à ce jour étant donné la grande complexité de la matière organique naturelle. Les ions métalliques libres se complexant avec la MOD, ceux-ci se retrouvent en moins grande concentration en solution, ce qui diminue habituellement la prise en charge et la toxicité du métal vis-à-vis les organismes phytoplanctoniques.

Les résultats obtenus lors de l'exposition de l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* à l'argent en présence de matière organique dissoute indiquent, tel que nous l'anticipions, que ce ligand a un effet protecteur sur la toxicité exercée par l'argent sur le phytoplancton. En effet, après une exposition de 96 h, nous avons observé une toxicité plus

faible en présence de MOD (CE50 = 46 ± 3 nM Ag_{tot}) qu'en absence de ce ligand (CE50 = 13 ± 3 nM Ag_{tot}). Ceci signifie ainsi que la concentration de métal nécessaire pour inhiber la croissance de 50 % est 3,5 fois plus élevée en présence de 5 mg/L d'acide humique. Selon le modèle de l'ion libre (MIL), ceci peut s'expliquer par la concentration plus faible d'ion Ag⁺ dans ces circonstances. Cette explication régit d'ailleurs l'ensemble des résultats obtenus sous ces conditions, la prise en charge et l'adsorption étant également plus faibles en présence de MOD. Fait inédit toutefois, nous avons mis en évidence une certaine augmentation de la « toxicité intracellulaire » de l'argent en présence de MOD puisqu'une quantité plus faible d'argent à l'intérieur des cellules était nécessaire pour produire un effet toxique donné.

6.4: Perspectives

Afin d'approfondir davantage les phénomènes décrit dans ce mémoire, de nombreuses expériences complémentaires pourraient être réalisées. Tout d'abord, il serait intéressant de reprendre l'utilisation de la cytométrie en flux et d'appliquer ce protocole à d'autres métaux et à d'autres espèces phytoplanctoniques. Ainsi, il serait possible de savoir si les résultats obtenus pour le cadmium et l'argent peuvent s'appliquer à l'ensemble des métaux. De plus, il serait intéressant d'évaluer l'état physiologique de la cellule et de la membrane cytoplasmique lors des tests d'exposition aux métaux. Nous pourrions alors conclure si le changement de pente observé dans les courbes de prise en charge et d'adsorption s'explique par un changement dans l'intégrité de la membrane cellulaire aux fortes concentrations ou par une biodilution par la croissance moins importante, liée au flux d'entrée de métal et à une diminution du taux de croissance. Finalement, pour pouvoir généraliser l'effet de la MOD naturelle sur la prise en charge et la toxicité des métaux, il serait intéressant d'évaluer l'influence de ce ligand chez d'autres espèces phytoplanctoniques dans d'autres conditions que celles que nous avons testées. Par exemple, le test pourrait être repris en variant le pH, la concentration et la source de MOD ou ces tests pourraient être réalisés à différentes intensités lumineuses et à différentes températures. Ces expériences permettraient d'éclaircir les interactions existantes entre la MOD, le métal en solution et la cellule, ce qui permettrait du même coup d'améliorer l'applicabilité du MIL dans les eaux naturelles.

Cette étude a permis d'améliorer les connaissances en ce qui concerne la toxicité et l'absorption de l'argent en présence de matière organique, et ce, de manière quantitative. Puisque les résultats des recherches antérieures étaient souvent incomplets à cause d'un manque d'information sur la spéciation du métal, ce projet a contribué à combler une grande lacune dans le domaine de l'écotoxicologie. Ainsi, les résultats obtenus lors de cette étude ont permis d'évaluer le risque écotoxicologique que représente l'argent dans l'environnement, ce qui a fourni une approche scientifique plus exacte et plus facile à utiliser pour développer les critères de la qualité de l'eau. L'exactitude accrue des résultats se traduira par une amélioration des normes de qualité de l'eau et de la réglementation des métaux dans l'environnement. De meilleures connaissances entraîneront une définition appropriée des critères de qualité, en plus de mieux évaluer le risque écologique dans les écosystèmes aquatiques.

| | | | • |
|--|--------|--|---|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | • • | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

7.0: Bibliographie

- Adams, N.W.H. et J.R. Kramer. 1999. Silver speciation in wastewater effluent, surface waters, and pore waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 2667-2673.
- Adhiya J., X. Cai, R.T. Sayre et S.J. Traina. 2002. Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 210, 1-11.
- Andren, A.W., B. Wingert-Runge et D. Sedlak. 1995. The occurrence and behavior of silver in natural waters. *Proceedings*, 3rd International Conference, Transport, Fate and Effects of silver in the Environment. Washington, DC, 7-8.
- Bastien, C. et R. Côté. 1989a. Variations temporelles de l'ultrastructure de *Scenedesmus quadricauda* exposée au cuivre lors d'une expérience à long terme. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*, 74, 207-219.
- Bastien, C. et R. Côté. 1989b. Effets du cuivre sur l'ultrastructure de Scenedesmus quadricauda et Chlorella vulgaris. Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie, 74, 51-71.
- Bates S.S., A. Tessier, P.G.C. Campbell et J. Buffle. 1982. Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. *Journal of Phycology*, 18, 521-529.
- Bates S.S., M. Létourneau, A. Tessier et P.G.C. Campbell. 1983. Variation in zinc adsorption and transport during growth of *Chlamydomonas variabilis* (Chlorophyceae) in batch culture with daily addition of zinc. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40, 895-904.
- Bennett, W.N. 1988. Assessment of selenium toxicity in algae using turbidostat culture. Water Research, 22, 939-942.
- Bennett, W.N. 1990. Measurement of manganese amelioration of cadmium toxicity in *Chlorella pyrenoidosa* using turbidostat culture. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19, 118-123.
- Benoit, G. 1994. Clean technique measurement of Pb, Ag, and Cd in freshwater: A redefinition of metal pollution. *Environmental Science and Technology*, 28, 1987-1991.
- Bianchini, A. et C.M. Wood. 2002. Physiological effects of chronic silver exposure in *Daphnia magna. Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 133, 137-145.

- Boily, F. 2004. Mécanismes de prise en charge et toxicité du cadmium en présence de thiosulfate chez une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*. Mémoire de maîtrise, INRS-ETE. Québec, Qc. Canada.
- Boullemant, A., B. Vigneault, C. Fortin et P.G.C. Campbell. 2004. Uptake of neutral metal complexes by a green alga: Influence of pH and humic substances. *Australian Journal of Chemistry*, 57, 931-936.
- Bowles, K.C., M.J. Ernste et J.R. Kramer. 2003. Trace sulfide determination in oxic freshwaters. *Analytica Chimica Acta*, 477, 113-124.
- Brauner, C.J. et C.M. Wood. 2002. Effect of long-term silver exposure on survival and ionoregulatory development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos and larvae, in the presence and absence of added dissolved organic matter. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 133, 161-173.
- Buffle, J., F.L. Greter et W. Haerdi. 1977. Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrode. *Analytical Chemistry*, 49, 216-222.
- Buffle, J. 1988. Complexation reactions in aquatic systems. Analytical Chemistry, Ellis Horwood, Chichester, 692 p.
- Bury, N.R., J.C. McGeer et C.M. Wood. 1999. Effects of altering freshwater chemistry on physiological responses of rainbow trout to silver exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 49-55.
- Bury, N.R., J. Shaw, C. Glover et C. Hogstrand. 2002. Derivation of a toxicity-based model to predict how water chemistry influences silver toxicity to invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 133, 259-270.
- Butler, M., A.E.J. Haskew et M.M. Young. 1980. Copper tolerance in the green algae *Chlorella vulgaris. Plant, Cell and Environment*, 3, 119–126.
- Campbell, L. 2001. Flow cytometric analysis of autotrophic picoplankton. In: *Methods in Microbiology: Marine Microbial Ecology*, 30, 317-343. J.H. Paul (ed.) Academic Press.
- Campbell, P.G.C. 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. Dans: A. Tessier et D.R. Turner (Eds), Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. New York, NY, USA: John Wiley & Sons. 45-102.
- Campbell, P.G.C., M.R. Twiss et K.J. Wilkinson. 1997. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, 2543-2554.

- Campbell P.G.C., O. Errécalde, C. Fortin, V. Hiriart-Baer et B. Vigneault. 2002. Metal bioavailability to phytoplancton applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 133, 189-206.
- Campbell, P.G.C. et Y. Couillard. 2004. Prise en charge et détoxication des métaux chez les organismes aquatiques. Dans : E. Pelletier, P.G.C. Campbell et F. Denizeau, Écotoxicologie moléculaire Principes fondamentaux et perspectives de développement, Les Presses de l'Université du Québec, Ste-Foy, Québec, Canada, pp. 9-61.
- Canterford, G.S. et D.R. Canterford. 1980. Toxicity of heavy metals to the marine diatom Ditylum brightwellii (West) Grunow: Correlation between toxicity and metal speciation. Journal of the Marine Biological Association, 60, 227-242.
- Cao, J., K.C. Lam, R.W. Dawson, W.X. Liu et S. Tao. 2004. The effect of pH, ion strength and reatant content on the complexation of Cu(II) by various natural organic ligands from water and soil in Hong Kong. *Chemosphere*, 54, 507-514.
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ). 2003. Détermination de la toxicité: inhibition de la croissance chez l'algue verte Selenastrum capricornutum. M.A. 500 – S. cap. 2.0., Ministère de l'environnement du Québec, 26 p.
- Clarkson, N., J.W. Leftley, D.T. Meldrum et J.W. Watson. 1998. An assessment of the cage-culture turbidostat as an alternative algal bioassay. *Water Research*, 32, 1162-1168.
- Croteau, M.N., L. Hare et A. Tessier. 2002. Increases in food web cadmium following reductions in atmospheric inputs to some lakes. *Environmental Science and Technology*, 36, 3079-3082.
- Davies, A.G. 1974. The growth kinetics of Isochrysis galbana in cultures containing sublethal concentrations of mercuric chloride. *Journal of the Marine Biological Association*, 54, 157-169.
- Davies, P.H., J.P. Goettl Jr et J.R. Sinley. 1978. Toxicity of silver to rainbow trout. *Water Research*, 12, 133-117.
- Di Toro, D.M., H.E. Allen, H.L. Bergman, J.S. Meyer, P.R. Paquin et R.C. Santore. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 2383-2396.
- Eisler, R. 1996. Silver hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review. Biological Science report 32. Washington, D.C., U.S.A: U.S. Department of the Interior, National Biological Service. 44 p.

- Errécalde, O. et P.G.C. Campbell. 2000. Cadmium and zinc bioavailability to *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae): Accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate. *Journal of Phycology*, 36, 473-483.
- Etris, S. 1997. Silver and silver alloys. In Howe-Grant M, ed, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th ed, vol. 22, John Wiley and Sons, New York, NY, USA, 163-179.
- Fernandez-Leboran, G. et A. Novillo. 1995. The effects of cadmium on the successional stages of a freshwater protozoa community. *Ecotoxicology and environmental Safety*, 31, 29-36.
- Fisher, N.S., M. Bohé et J.-L. Teyssié. 1984. Accumulation and toxicity of Cd, Zn, Ag, and Hg in four marine phytoplankters. Marine Ecology Progress Series, 18, 201-203.
- Flegal, A.R., S.A. Sanudo-Wilhelmy et G.M. Scelfo. 1995. Silver in the eastern Atlantic Ocean. *Marine Chemistry*, 49, 315-320.
- Fortin, C. 1996. Méthode analytique de mesure de l'ion métallique libre (Cd²⁺, Zn²⁺) par échange ionique. Mémoire de maîtrise, INRS-Eau. Ste-Foy, QC, Canada.
- Fortin, C. et P.G.C. Campbell. 1998. An ion-exchange technique for free-metal ion measurements (Cd²⁺, Zn²⁺): Applications to complex aqueous media. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 73, 173-194.
- Fortin, C. et P.G.C. Campbell. 2000. Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas* reinhardtii in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environmental* Toxicology and Chemistry, 19, 2769-2778.
- Fortin, C. 2000. Mécanismes de prise en charge et toxicité de l'argent chez une algue verte en relation avec la spéciation chimique. Thèse de doctorat. INRS-ETE, Université du Québec. Québec. 159 p.
- Fortin, C. et P.G.C. Campbell. 2001. Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: role of anion transporters in metal uptake. *Environmental Science and Technology*, 35, 2214-2218.
- Fortin, C, L. Dutel et J. Garnier-Laplace. 2004. Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: the importance of the free uranyl ion. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 974-981.
- Franklin, N.M., M.S. Adams, J.L. Stauber et R.P. Lim. 2001a. Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40, 469-480.

- Franklin, N.M., J.L. Stauber et R.P. Lim. 2001b. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20, 160-170.
- Franklin, N.M., J.L. Stauber, S.C. Apte et R.P. Lim. 2002. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of cooper in microalgal bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 742-751.
- Franklin, N.M., J.L. Stauber et R.P. Lim. 2004. Development of multispecies algal bioassays using flow cytometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23, 1452-1462.
- Galloway, G. N., J. D. Thornton, S. A. Norton, H. L. Volchok et R. A. N. McLean. 1982. Trace metals in atmospheric deposition: A review and assessment. *Atmospheric Environment*, 16, 1677-1700.
- Galvez, F., C. Hogstrand, J.C. McGeer et C.M. Wood. 2001. The physiological effects of a biologically incorporated silver diet on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 55, 95-112.
- Gault, L.E. et A.H. Staund. 1935. Seventy cases of generalized argyrosis following organic and colloidal silver medication, including biospectrometric analysis. *Journal of the American Medical Association*, 104, 1387-1390.
- Glover, C.N. et C.M. Wood. 2004. Physiological interactions of silver and humic substances in *Daphnia magna*: effects on reproduction and silver accumulation following an acute silver challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 139, 273-280.
- Glover, C.N et C.M. Wood. 2005. Accumulation and elimination of silver in *Daphnia magna* and the effect of natural organic matter. *Aquatic Toxicology*, 73, 406–417.
- Greenwood, N.N. et A. Earnshaw. 1998. *Chemistry of the Elements*, 2nd Edition, Butterworth-Heinemann.
- Guo, L., B.J. Hunt, P.H. Santschi et S.M. Ray. 2001. Effect of dissolved organic matter on the uptake of trace metals by American oysters. *Environmental Science and Technology*, 35, 885-893.
- Hall, J., F.P. Healey et G.G.G. Robinson. 1989. The interaction of chronic copper toxicity with nutrient limitation in chemostat cultures of *Chlorella*. *Aquatic Toxicology*, 14, 15-26.
- Härdstedt-Roméo, M. et M. Gnassia-Barelli. 1980. Effect of complexation by natural phytoplankton exudates on the accumulation of cadmium and copper by the haptophyceae *Cricosphaera elongata*. *Marine Biology*, 59, 79-84.

- Harris, P.O. et G.J. Ramelow. 1990. Binding of metal ions by particulate biomass derived from *Chorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. *Environmental Science and Technology*, 24, 220-228.
- Harrison G.I., P.G.C. Campbell et A. Tessier. 1986. Effects of pH changes on zinc uptake by *Chlamydomonas variabilis* grown in batch culture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43, 687-693.
- Hassler C.S., V.I. Slaveykova et K.J. Wilkinson. 2004. Discrimination between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnology and Oceanography*, Methods 2, 237-247.
- Hill, W.B. et D.M. Pillsbury. 1939. Argyria: the pharmacology of silver. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Hiriart-Baer V.P., C. Fortin, D.Y. Lee et P.G.C. Campbell. 2006. Toxicity of silver to the freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, growth under continuous culture: Influence of thiosulphate. *Aquatic Toxicology*, 78, 136-148.
- Hogstrand, C. et C.M. Wood. 1998. Toward a better understanding of the bioavailability, physiology and toxicity of silver in fish: Implications for water quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 547-561.
- Hook, S. E. et N.S. Fisher. 2001. Sublethal effects of silver in zooplankton: importance of exposure pathways and implications for toxicity testing. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 568-574.
- Hornberger, M., M.S. Luoma, D. Cain, F. Parchaso, C. Brown, R. Bouse, C. Wellise et J. Thompson. 1999. Bioaccumulation of the metals by the bivalve *Macoma balthica* at a site in South San Francisco Bay between 1977 and 1997: Long term trends and associated biological effects with the changing pollutant loadings. USGS Open File Report, USA, 99-155.
- 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. *Science of the Total Environment*, 219, 95-115.
- Huebert, D.B. et J.M. Shay. 1992. The effect of EDTA on cadmium and zinc uptake and toxicity in *Lemna trisulca*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 22, 313-318.
- Hutchinson, T.C. 1973. Comparative studies of the toxicity of heavy metals to phytoplankton and their synergistic interactions. *Water Pollution Research of Canada*, 8, 68-90.

- Janes, N. et R.C. Playle. 1995. Modeling silver bonding to gills of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Environmental Toxicology and Chemistry, 14, 1847-1858.
- Kalachniuk, H.I., M. Marounek, L.H. Kalachniuk et O.H. Savka. 1994. Rumen bacterial metabolism as affected by extracellular redox potential (Metabolism bakterii rubtsia za dii zovnishn'oklitynnoho redoks-potentsialu). *Ukrainskii Biokhimcheskii Zhurnal*, 66, 30-40.
- Kannan, S.K. et R. Krishnamoorthy. 2006. Isolation of mercury resistant bacteria and influence of abiotic factors on bioavailability of mercury A case study in Pulicat Lake North of Chennai, South East India. *Science of the Total Environment*, 367, 341-353.
- Keizer, M.G. et W.H. Van Riemsdijk. 1999. A Computer Program for the Equilibrium Calculation of Speciation and Transport in Soil-Water Systems (ECOSAT 4.7). Wageningen University: The Netherlands.
- Knauer, K., R. Behra et L. Sigg. 1997. Effects of free Cu²⁺ ad Zn²⁺ ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 220-229.
- Kone, B.C., M. Kaleta et S.R. Gullans. 1988. Silver ion (Ag⁺)-induced increases in cell membrane K⁺ and Na⁺ permeability in the renal proximal tubule: reversal by thiol reagents. *Journal of Membrane Biology*, 102, 11-19.
- Laforte, L. 2003. Étude de la complexation du cadmium par le thiosulfate par échange ionique. INRS-ETE, RI-145, 18 p.
- Lam, I.K.S. et W.X. Wang. 2006. Acumulation and elimination of aqueous and dietary silver in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 64, 26-35.
- Leal, M.F.C., M.T.S.D. Vasconcelos et C.M.G. Van den Berg. 1999. Copper-induced release of complexing ligands similar to thiols by *Emiliania huxleyi* in seawater cultures. *Limnology and Oceanography*, 44, 1750-1762.
- Lee, D.Y., C. Fortin et P.G.C. Campbell. 2004. Influence of chloride on silver uptake by two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1012-1018.
- Lee, D.Y., C. Fortin et P.G.C. Campbell. 2005. Constrasting effects of chloride on the toxicity of silver to two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquatic Toxicology, 75, 127-135.
- Lu, Y. et H.E. Allen. 2002. Characterization of copper complexation with natural dissolved organic matter (DOM)-link to acidic moieties of DOM and competition by Ca and Mg. *Water Research*, 36, 5038-5101.

- Lukiewics, S. et W. Korohoda. 1965. Some recent advances in the technique of cell microelectrophoresis. In: E. J. Ambrose (ed.), *Cell Electrophoresis*. pp. 26--33. Little, Brown & Co., London.
- Lum, K.R. 1987. Cadmium in fresh waters: the Great Lakes and the St. Lawrence River. *Advances in Environmental Science and Technology*, 19, 35-50.
- Luoma, S.N., C. Hogstrand, R.A. Bell, G.K. Bielmeyer, F. Galvez, G.A. LeBlanc, B.G. Lee, T.W. Purcell, R.C. Santore, P.H. Santschi et J.R. Shaw. 2002. Biological Processes. Dans: *Silver in the environment: Transport, Fate and Effects*. Andren A.W. et T.W. Bober. SETAC Press, Florida, USA, 65-95.
- Ma, H., S.D. Kim, D.K. Cha, et H.E. Allen. 1999. Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 828-837.
- Maloney, F. 2007. Influence de paramètres physico-chimiques (dureté, pH et présence d'un agent chélateur, l'EDTA) sur la réponse toxique au cadmium de l'algue verte d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata*. Mémoire de maîtrise. INRS-ETE. En évaluation.
- Manusadzianas, L., G. Maksimov, J. Darginaviciene, S. Jurkoniene, K. Sadauskas et R. Vitkus. 2002. Response of the charophyte *Nitellopsis obtusa* to heavy metals at the cellular, cell membrane, and enzyme levels. *Environmental Toxicology*, 17, 275-283.
- Marie, D., N. Simon, et D. Vaulot. 2005. Phytoplankton cell counting by flow cytometry. Dans: Anderson, R.A. (ed). Algal culturing techniques. Chapitre 17, 253-267. Academic Press, Elsevier.
- Martell, A.E., R.M. Smith et R.J. Motekaitis. 1998. NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes Database (Version 5.0) [NIST Standard Reference Database 46]. Gaithersburg, MD, USA: U.S. Department of Commerce.
- McGeer, J.C. et C.M. Wood. 1998. Protective effects of water Cl on physiological responses to waterborne silver in rainbow trout. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55, 2447-2454.
- McKnight, D.M. et G.R. Aiken. 1998. Sources and age of aquatic humus. Dans: Aquatic Humic Substances, vol. Ecological Studies Vol. 133, D.O. Hessen et L.J. Tranvik (Eds.). Berlin: Springer-Verlag. p. 9-39.
- Mehta, S.K, B.N. Tripathi et J.P. Gaur. 2000. Influence of pH, temperature, culture age and cations on adsorption and uptake of Ni by *Chorella vulgaris*. *European Journal of Protistology*, 36, 443-450.

- Morel, F.M.M. 1983. <u>Principles of Aquatic Chemistry</u>. New York, NY, USA: John Wiley & Sons. 446 p.
- Morgan, I.J., R.P. Henry et C.M. Wood. 1997. The mechanism of acute silver nitrate toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is inhibition of gill Na and Cl transport. *Aquatic Toxicology*, 38, 145-163.
- Murata, T., M. Kanao-Koshikawa et T. Takamatsu. 2005. Effects of Pb, Cu, Sb, In and Ag contamination on the proliferation of soil bacterial colonies, soil dehydrogenase activity, and phospholipid fatty acid profiles of soil microbial communities. *Water, Air and Soil Pollution*, 164, 103-118.
- Ndung'u, K., M.A. Thomas et A.R. Flegal. 2001. Silver in the western equatorial and South Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 48, 2933-2945.
- Nichols, J.W., S. Brown, C.M. Wood, P.J. Walsh et R.C. Playle. 2006. Influence of salinity and organic matter on silver accumulation in Gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Aquatic Toxicology*, 78, 253-261.
- Nishikawa, K., Y. Yamakoshi, I. Uemura et N. Tominaga. 2003. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiology Ecology*, 1503, 1-7.
- Odermatt, A., R. Krapf et M. Solioz. 1994. Induction of the putative copper ATPases, CopA and CopB, of *Enterococcus hirae* by Ag⁺ and Cu²⁺ extrusion by CopB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 202, 44-48.
- Olsen, C. et M. Dufour. 2004. Optimisation de la technique d'échange ionique (TEI). Rapport final no 1. Projet de recherche R0000013. COREM. 66p.
- Parent, L., M.R. Twiss et P.G.C. Campbell. 1996. Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga *Chlorella*: A test of the free-ion model of trace metal toxicity. *Environmental Science and Technology*, 30, 1713-1720.
- Pelkonen, K.H.O, H. Heinonen-Tanski et O.O.P. Hänninen. 2003. Accumulation of silver from drinking water into cerebellum and musculus soleus in mice. *Toxicology*, 186, 151-157.
- Perceval, O., Y. Couillard, B. Pinel-Alloul, A. Giguere et P.G.C. Campbell. 2004. Metalinduced stress in bivalves living along a gradient of Cd contamination: relating subcellular metal distribution to population-level responses. *Aquatic Toxicology*, 69, 327-345.

- Perceval, O., Y. Couillard, B. Pinel-Alloul, E. Bonneris et P.G.C. Campbell. 2006. Long-term trends in accumulated metals (Cd, Cu and Zn) and metallothionein in bivalves from lakes within a smelter-impacted region. *Science of the Total Environment*, 369, 403-418.
- Porcher, C. 2004. Interactions de l'argent (Ag) avec les algues d'eau douce en présence de matière organique dissoute naturelle. Mémoire de maîtrise. INRS-ETE. Québec, Qc, Canada.
- Purcell, T.W. et J.P. Peters. 1998. Sources of silver in the environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 537-538.
- Rai, L.C. et M. Raizada. 1985. Effect of nickel and silver ions on survival, growth, carbon fixation and nitrogenase activity in *Nostoc muscorum*: Regulation of toxicity in EDTA and calcium. *Journal of General and Applied Microbiology*, 31, 329-338.
- Ratte, H.T. 1999. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review. Environmental Toxicology and Chemistry, 18, 89-108.
- Ravichandran, M. 2004. Interactions between mercury and dissolved organic matter- a review. *Chemosphere*, 55, 319-331.
- Réty, C. 2006. Mesure de la toxicité des métaux envers les algues unicellulaires : Comparaison de deux méthodes, culture en lot et culture en continu (turbidostat). Rapport de stage de Master 2. Université Jean Monnet, Master écologie et éthologie appliquée, Option gestion des écosystèmes. 51p.
- Rijstenbil, J.W. et L.J.A. Gerringa. 2002. Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquatic Toxicology*, 56, 115-131.
- Roditi, H.A., N.S. Fisher et S.A. Sanudo-Wilhelmy. 2000. Uptake of dissolved organic carbon and trace elements by zebra mussels. *Nature*, 407, 78-80.
- Rose-Janes, N.G. et R.C. Playle. 2000. Protection by two complexing agents, thiosulphate and dissolved organic matter, against the physiological effects of silver nitrate to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in ion-poor water. *Aquatic Toxicology*, 51, 1-18.
- Rozan, T.F., M.E. Lassman, D.P. Ridge et G.W. Luther III. 2000. Evidence for iron, copper and zinc complexation as multinuclear sulphide clusters in oxic rivers. *Nature*, 406, 879–882.
- Sanders, J.G. et S.J. Cibik. 1988. Response of Chesapeake Bay phytoplankton communities to low levels of toxic substances. *Marine Pollution Bulletin*, 19, 439-444.

- Sanders, J.G., G.R. Abbe et G.F. Riedel. 1990. Silver uptake and subsequent effects on growth and species composition in an estuarine community. *Science of the Total Environment*, 97/98, 761-769.
- Sanudo-Wilhelmy, S. et A.R. Flegal. 1992. Anthropogenic silver in the Southern California Bight: a new tracer of sewage in coastal waters. *Environmental Science and Technology*, 26, 2147-2151.
- Schenck, R.C., A. Tessier et P.G.C. Campbell. 1988. The effect of pH on iron and manganese uptake by green alga. *Limnology and Oceanography*, 33, 538-550.
- Schulten, H.R. et M.A. Schnitzer. 1993. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften*, 80, 29-30.
- Scow, K., M. Goyer et L. Nelken, 1981. Exposure risk assessment for silver. Technical Report. Office of Water, USEPA, Washington, DC.
- Slaveykova, V.I. et K.J. Wilkinson. 2005. Predicting the bioavailability of metals and metals complexes: critical review of the biotic ligand model. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2, 9-24.
- Sofyan, A., J.R. Shaw et W.J. Birge. 2006. Metal trophic transfer from algae to cladocerans and the relative importance of dietary metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 1034-1041.
- Solioz, M. et A. Odermatt. 1995. Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicules of *Enterococcus hirae*. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 9217-9221.
- Stauber, J.L. 1995. Toxicity testing using marine and freshwater unicellular algae. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 1, 15-24.
- Stauber, J.L., N.M. Franklin et M.S. Adams. 2002. Applications of flow cytometry to ecotoxicity. *TRENDS in Biotechnology*, 20, 141-143.
- Stokes, P.M. 1981. Multiple metal tolerance in copper tolerant green algae. *Journal of Plant Nutrition*, 3, 667-678.
- Sunda, W.G. 1989. Trace metal interactions with marine phytoplankton. *Biological Oceanography*, 6, 411-442.
- Sutton, R., G. Sposito, M.S. Diallo et H.R. Schulten. 2005. Molecular Simulation of a Model of Dissolved Organic Matter. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1902-1911.

- Templeton, D.M., F. Ariese, R. Cornelis, L.-G. Danielsson, H. Muntau, H.P. Van Leeuwen et R. Lobinski. 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure and Applied Chemistry*, 72, 1453-1470.
- The Silver Institute. 2006. World Silver Survey 2006. Washington, DC, USA.
- Throndsen, J. 1978. Preservation and storage, p. 69-74. *In* A. Sournia [ed.], Phytoplankton Manual. Monographs on oceanographic methodology. Unesco.
- Thurman, E.M. 1985. Organic geochemistry of natural waters. Dordrecht: Dr. W. Martinus Nijhoff. Junk publishers. 497 p.
- Thurman, E.M. et R.L. Malcolm. 1995. Nitrogen and amino acids in fulvic and humic acids from the Suwannee river. Dans *Humic substances in the Suwannee River, Georgia: Interactions, Properties and Proposed Structures*. R.C. Everett, D.M. Leenheer, D.A. McKnight et K.A. Thorn (Eds.). Denver, CO, USA.: US Geological Survey. P. 55-66.
- Tipping, E. 2002. Cation binding by humic substances. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 434 p.
- Tsuji, T et T. Yanagita. 1981. Improved fluorescent microscopy for measuring the standing stock of phytoplankton including fragile components. *Marine Biology*, 64, 207-211.
- Turbak, S.C., S.B. Olson et G.A. McFeters. 1986. Comparison of algal assay systems for detecting waterborne herbicides and metals. *Water Research*, 20, 91-96.
- Twiss, M.R., O. Errécalde, C. Fortin, P.G.C. Campbell, C. Jumarie, F. Denizeau, E. Berkelaar, B. Hale et K. Van Rees. 2001. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 13, 9-24.
- USEPA. 1980. Ambient water quality criteria: silver. Rapport No. PB81-117882, Environmental Criteria and Assessment Office. 212 p.
- USEPA. 1987. Ambient life water quality criteria for silver. Rapport No. 440/5-87- 011. Duluth, MN, USA: Office of Research and Development. 104 p.
- USEPA. 2002. Short-erm methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Fourth Edition, USEPA, 335 p.
- Van Vleet, J.F. et V.J. Ferrans. 1992. Etiologic factors and pathologic alterations in selenium-vitamin E deficiency and excess in animals and humans. *Biological Trace Element Research*, 33, 1-21.

- Vasconcelos M.T.S.D. et M.F.C. Leal. 2001. Adsorption and uptake of Cu by *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Environmental Science and Technology*, 35, 508-515.
- Vasconcelos M.T.S.D., M.F.C. Leal et C.M.G. Van Den Berg. 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. *Marine Chemistry*, 77, 187-210.
- Verheijen, F.W., C.E.M.T. Beerens, A.C. Havelaar, W.J. Kleijer et G.M.S. Mancini. 1998. Fibroblast silver loading for the diagnosis of Menkes disease. *Journal of Medical Genetics*, 35, 849-851.
- Vigneault, B. 2000. Interactions des substances humiques dissoutes avec les algues unicellulaires Mécanismes et implications. Thèse de doctorat, INRS-Eau, Ste-Foy, Québec, Canada.
- Vigneault, B., A. Percot, M. Lafleur et P.G.C. Campbell. 2000. Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology*, 34, 3907-3913.
- Vigneault, B et P.G.C. Campbell. 2005. Uptake of cadmium by freshwater green algae: effects of pH and aquatic humic substances. *Journal of Phycology*, 41, 55-61.
- Visser, S.A. 1982. Surface active phenomena by humic substances of aquatic origin. *Revue Française des Sciences de l'Eau*, 1, 285-296.
- Webb, N.A. et C.M. Wood. 1998. Physiological analysis of the stress response associated with acute silver nitrate exposure in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environmental Toxicology and Chemistry, 17, 579-588.
- Wilkinson, K.J., V.I. Slaveykova, C.S. Hassler et C. Rossier. 2002. Physicochemical mechanisms of trace metal bioaccumulation by microorganisms. *Chimia*, 56, 681-684.
- Wingert-Runge, B. et A. Andren. 1993. Adsorptive behavior of silver and natural sediments in aqueous systems. *Proceedings*, 1st International Conference, Transport, Fate and Effects of silver in the Environment. University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA, 19-22.
- Wood, C.M., C. Hogstrand, F. Galvez et R.S. Munger. 1996. The physiology of water-borne silver toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 1. The effects of ionic Ag⁺. Aquatic Toxicology, 35, 93-109.
- Xue H.B. et L. Sigg. 1998. Cd speciation and complexation by natural organic ligands in freshwater. *Analytica Chimica Acta*, 363, 249-259.

- Yamazaki, M., Y. Tanizaki et T. Shimokawa. 1996. Silver and other trace elements in a freshwater fish, *Carasius auratus langsdorfii*, from the Asakawa River in Tokyo, Japan. *Environmental Pollution*, 94, 83-90.
- Zhang, Y., H. Amakawa et Y. Nozaki. 2001. Oceanic profiles of dissolved silver: precise measurements in the basins of western North Pacific, Sea of Okhotsk, and the Japan Sea. *Marine Chemistry*, 75, 151-163.
- Zimmermann, S., F. Alt, J. Messerschmidt, A. Von Bohlen, H. Taraschewski et B. Sures. 2002. Biological availability of traffic-related platinum-group elements (palladium, platinum, and rhodium) and other metals to the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in water containing road dust. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 2713-2718.

8.0 : Annexes
8.1 : Bilans de masse des concentrations de cadmium retrouvées dans chaque milieu

| | Temps d'exposition = 24 h | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------------------|---------------|-------------------------|--------------|-------------------------|------------|-------|--|--|--|--|
| [Cd] _{initiale} | [Cd] _{t=0} | [Cd]filtrat 1 | [Cd] _{interne} | Cdinterne | [Cd] _{externe} | Différence | Écart | | | | |
| (nM) | (nmol) | (nmol) | (nmol) | (%) | (nmol) | (nmol) | (%) | | | | |
| 11 | 0,75 | 0,54 | 0,002 | 0,23% | 0,0004 | 0,20 | 27,0 | | | | |
| 22 | 1,54 | 1,10 | 0,005 | 0,30% | 0,0006 | 0,44 | 28,6 | | | | |
| 31 | 2,17 | 1,44 | 0,007 | 0,32% | 0,0011 | 0,72 | 33,3 | | | | |
| 36 | 2,50 | 1,16 | 0,004 | 0,14% | 0,0009 | 1,34 | 53,5 | | | | |
| 49 | 3,45 | 2,39 | 0,011 | 0,32% | 0,0014 | 1,04 | 30,2 | | | | |
| 62 | 4,32 | 2,73 | 0,014 | 0,32% | 0,0020 | 1,57 | 36,4 | | | | |
| 76 | 5,30 | 3,56 | 0,010 | 0,18% | 0,0024 | 1,73 | 32,6 | | | | |
| 107 | 7,50 | 3,44 | 0,002 | 0,03% | 0,0022 | 4,06 | 54,1 | | | | |
| 160 | 11,20 | 5,27 | 0,018 | 0,16% | 0,0045 | 5,91 | 52,8 | | | | |
| 187 | 13,10 | 6,54 | 0,023 | 0,18% | 0,0042 | 6,53 | 49,9 | | | | |
| 282 | 19,71 | 9,07 | 0,028 | 0,14% | 0,0082 | 10,61 | 53,8 | | | | |
| 301 | 21,08 | 13,26 | 0,038 | 0,18% | 0,0073 | 7,78 | 36,9 | | | | |
| | | | Temps d'expos | ition = 48 h | | | 7 | | | | |
| 11 | 0,75 | 0,55 | 0,01 | 1,77% | 0,0004 | 0,19 | 25,0 | | | | |
| 22 | 1,54 | 0,99 | 0,02 | 1,13% | 0,0008 | 0,54 | 34,8 | | | | |
| 31 | 2,17 | 1,59 | 0,03 | 1,16% | 0,0012 | 0,55 | 25,2 | | | | |
| 36 | 2,50 | 1,10 | 0,02 | 0,64% | 0,0008 | 1,38 | 55,2 | | | | |
| 49 | 3,45 | 2,53 | 0,03 | 0,99% | 0,0014 | 0,89 | 25,7 | | | | |
| 62 | 4,32 | 3,32 | 0,06 | 1,29% | 0,0029 | 0,93 | 21,6 | | | | |
| 76 | 5,30 | 4,33 | 0,03 | 0,61% | 0,0027 | 0,94 | 17,7 | | | | |
| 107 | 7,50 | 3,36 | 0,03 | 0,46% | 0,0023 | 4,10 | 54,6 | | | | |
| 160 | 11,20 | 5,07 | 0,06 | 0,52% | 0,0044 | 6,07 | 54,2 | | | | |
| 187 | 13,10 | 6,53 | 0,08 | 0,59% | 0,0040 | 6,49 | 49,5 | | | | |
| 282 | 19,71 | 8,59 | 0,08 | 0,41% | 0,0084 | 11,03 | 56,0 | | | | |
| 301 | 21,08 | 11,38 | 0,10 | 0,47% | 0,0089 | 9,59 | 45,5 | | | | |

| | | | Temps d'expos | ition = 72 h | | | |
|-----|-------|-------|---------------|--------------|--------|-------|------|
| 11 | 0,75 | 0,41 | 0,04 | 5,60% | 0,0004 | 0,30 | 39,9 |
| 22 | 1,54 | 0,93 | 0,06 | 3,99% | 0,0006 | 0,56 | 36,1 |
| 31 | 2,17 | 1,13 | 0,07 | 3,24% | 0,0013 | 0,97 | 44,8 |
| 36 | 2,50 | 0,96 | 0,09 | 3,45% | 0,0007 | 1,45 | 58,0 |
| 49 | 3,45 | 1,97 | 0,07 | 2,14% | 0,0013 | 1,41 | 40,8 |
| 62 | 4,32 | 2,55 | 0,16 | 3,79% | 0,0019 | 1,60 | 37,1 |
| 76 | 5,30 | 3,48 | 0,06 | 1,13% | 0,0021 | 1,77 | 33,3 |
| 107 | 7,50 | 2,88 | 0,16 | 2,17% | 0,0020 | 4,45 | 59,3 |
| 160 | 11,20 | 4,71 | 0,09 | 0,83% | 0,0029 | 6,39 | 57,1 |
| 187 | 13,10 | 5,41 | 0,12 | 0,90% | 0,0033 | 7,58 | 57,8 |
| 282 | 19,71 | 8,14 | 0,11 | 0,57% | 0,0080 | 11,45 | 58,1 |
| 301 | 21,08 | 9,30 | 0,10 | 0,47% | 0,0081 | 11,67 | 55,4 |
| | | | Temps d'expos | ition = 96 h | | | |
| 11 | 0,75 | 0,23 | 0,09 | 12,39% | 0,0003 | 0,43 | 57,2 |
| 22 | 1,54 | 0,60 | 0,14 | 8,97% | 0,0008 | 0,80 | 52,0 |
| 31 | 2,17 | 0,92 | 0,23 | 10,70% | 0,0016 | 1,02 | 47,0 |
| 36 | 2,50 | 0,84 | 0,14 | 5,56% | 0,0009 | 1,53 | 61,0 |
| 49 | 3,45 | 1,20 | 0,27 | 7,97% | 0,0014 | 1,97 | 57,2 |
| 62 | 4,32 | 2,19 | 0,36 | 8,35% | 0,0016 | 1,76 | 40,8 |
| 76 | 5,30 | 2,91 | 0,45 | 8,43% | 0,0027 | 1,94 | 36,7 |
| 107 | 7,50 | 3,07 | 0,08 | 1,05% | 0,0022 | 4,35 | 58,0 |
| 160 | 11,20 | 4,91 | 0,10 | 0,87% | 0,0050 | 6,19 | 55,3 |
| 187 | 13,10 | 5,74 | 0,11 | 0,84% | 0,0064 | 7,24 | 55,3 |
| 282 | 19,71 | 10,22 | 0,11 | 0,53% | 0,0094 | 9,38 | 47,6 |
| 301 | 21,08 | 13,11 | 0,09 | 0,44% | 0,0096 | 7,87 | 37,3 |

8.2 : Bilans de masse des concentrations d'argent retrouvées dans chaque milieu

| | Temps d'exposition = 24 h | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------------------|---------------|-------------------------|------------|-------------------------|------------|-------|--|--|--|--|
| [Ag] _{initiale} | $[Ag]_{t=0}$ | [Ag]filtrat 1 | [Ag] _{interne} | Aginterne | [Ag] _{externe} | Différence | Écart | | | | |
| (nM) | (nmol) | (nmol) | (nmol) | (%) | (nmol) | (nmol) | (%) | | | | |
| 1 | 0,22 | 0,00 | 0,03 | 15% | 0,00 | 0,19 | 84,0 | | | | |
| 2 | 0,53 | 0,01 | 0,13 | 24% | 0,00 | 0,41 | 75,9 | | | | |
| 3 | 0,81 | 0,01 | 0,25 | 31% | 0,00 | 0,55 | 67,5 | | | | |
| 5 | 1,42 | 0,01 | 0,66 | 46% | 0,00 | 0,75 | 52,8 | | | | |
| 7 | 2,19 | 0,01 | 1,16 | 53% | 0,01 | 1,01 | 46,0 | | | | |
| 9 | 2,78 | 0,02 | 1,49 | 53% | 0,01 | 1,26 | 45,2 | | | | |
| 8 | 2,51 | 0,25 | 1,05 | 42% | 0,17 | 1,04 | 41,2 | | | | |
| 16 | 4,85 | 1,45 | 1,79 | 37% | 0,53 | 1,08 | 22,4 | | | | |
| 24 | 7,21 | 2,93 | 1,70 | 24% | 1,05 | 1,54 | 21,3 | | | | |
| 42 | 12,55 | 6,77 | 1,48 | 12% | 1,89 | 2,42 | 19,3 | | | | |
| 67 | 20,08 | 12,32 | 1,75 | 9% | 2,58 | 3,43 | 17,1 | | | | |
| 81 | 24,18 | 16,05 | 2,03 | 8% | 2,50 | 3,60 | 14,9 | | | | |
| | | T | emps d'expos | ition = 48 | 3 h | | | | | | |
| 1 | 0,22 | 0,01 | 0,03 | 15% | -0,01 | 0,19 | 85,6 | | | | |
| 2 | 0,53 | 0,01 | 0,11 | 21% | 0,03 | 0,38 | 71,1 | | | | |
| 3 | 0,81 | 0,03 | 0,14 | 17% | 0,08 | 0,56 | 69,6 | | | | |
| 5 | 1,42 | 0,02 | 0,55 | 38% | 0,19 | 0,67 | 47,1 | | | | |
| 7 | 2,19 | 0,05 | 0,87 | 40% | 0,30 | 0,97 | 44,4 | | | | |
| 9 | 2,78 | 0,06 | 1,26 | 45% | 0,33 | 1,12 | 40,4 | | | | |
| 8 | 2,51 | 0,16 | 0,97 | 39% | 0,22 | 1,15 | 45,8 | | | | |
| 16 | 4,85 | 0,47 | 2,16 | 45% | 0,42 | 1,79 | 37,0 | | | | |
| 24 | 7,21 | 0,74 | 4,00 | 55% | 0,35 | 2,12 | 29,4 | | | | |
| 42 | 12,55 | 4,67 | 3,99 | 32% | 0,69 | 3,20 | 25,5 | | | | |
| 67 | 20,08 | 10,19 | 3,71 | 18% | 1,42 | 4,77 | 23,7 | | | | |
| 81 | 24,18 | 13,66 | 3,06 | 13% | 1,74 | 5,72 | 23,6 | | | | |

| | Temps d'exposition = 72 h | | | | | | | | | |
|----|---------------------------|-------|-------------|-------------|------|------|------|--|--|--|
| 1 | 0,22 | 0,01 | 0,03 | 14% | 0,02 | 0,17 | 75,8 | | | |
| 2 | 0,53 | 0,01 | 0,08 | 14% | 0,05 | 0,40 | 75,0 | | | |
| 3 | 0,81 | 0,01 | 0,14 | 18% | 0,10 | 0,56 | 69,1 | | | |
| 5 | 1,42 | 0,01 | 0,33 | 23% | 0,20 | 0,88 | 62,0 | | | |
| 7 | 2,19 | 0,01 | 0,68 | 31% | 0,30 | 1,20 | 54,9 | | | |
| 9 | 2,78 | 0,02 | 1,00 | 36% | 0,37 | 1,40 | 50,2 | | | |
| 8 | 2,51 | 0,05 | 0,82 | 32% | 0,20 | 1,45 | 57,7 | | | |
| 16 | 4,85 | 0,16 | 1,77 | 36% | 0,26 | 2,67 | 55,0 | | | |
| 24 | 7,21 | 0,25 | 3,20 | 44% | 0,32 | 3,44 | 47,7 | | | |
| 42 | 12,55 | 1,37 | 6,50 | 52% | 0,35 | 4,34 | 34,6 | | | |
| 67 | 20,08 | 6,43 | 4,27 | 21% | 1,04 | 8,33 | 41,5 | | | |
| 81 | 24,18 | 10,17 | 4,37 | 18% | 1,12 | 8,52 | 35,2 | | | |
| | | T | emps d'expo | sition = 96 | 5 h | | 414 | | | |
| 1 | 0,22 | 0,00 | 0,03 | 13% | 0,00 | 0,19 | 84,3 | | | |
| 2 | 0,53 | 0,00 | 0,08 | 16% | 0,01 | 0,43 | 80,9 | | | |
| 3 | 0,81 | 0,01 | 0,13 | 17% | 0,03 | 0,64 | 79,4 | | | |
| 5 | 1,42 | 0,00 | 0,30 | 21% | 0,02 | 1,10 | 77,0 | | | |
| 7 | 2,19 | 0,03 | 0,54 | 25% | 0,13 | 1,48 | 67,7 | | | |
| 9 | 2,78 | 0,02 | 0,86 | 31% | 0,06 | 1,84 | 66,2 | | | |
| 8 | 2,51 | 0,02 | 0,75 | 30% | 0,08 | 1,66 | 66,1 | | | |
| 16 | 4,85 | 0,04 | 1,96 | 40% | 0,14 | 2,72 | 56,0 | | | |
| 24 | 7,21 | 0,08 | 3,21 | 45% | 0,33 | 3,59 | 49,7 | | | |
| 42 | 12,55 | 1,18 | 6,66 | 53% | 0,47 | 4,23 | 33,7 | | | |
| 67 | 20,08 | 6,25 | 5,14 | 26% | 2,95 | 5,75 | 28,6 | | | |
| 81 | 24,18 | 9,49 | 5,11 | 21% | 3,79 | 5,79 | 23,9 | | | |

[•] Les données en italiques représentent celles où les valeurs sont inférieures à la moitié de la valeur de la limite de détection.

8.3 : Bilans de masse des concentrations d'argent retrouvées dans chaque milieu en présence de MOD

| Temps d'exposition = 24 h | | | | | | | | | | |
|---------------------------|--------------|---------------------------|-------------------------|--------------|-------------------------|------------|-------|--|--|--|
| [Ag] _{initiale} | $[Ag]_{i=0}$ | [Ag] _{filtrat t} | [Ag] _{Interne} | Aginterne | [Ag] _{externe} | Différence | Écart | | | |
| (nM) | (nmol) | (nmol) | (nmol) | (%) | (nmol) | (nmol) | (%) | | | |
| 14 | 2,03 | 1,71 | 0,06 | 2,7% | 0,16 | 0,10 | 5,0 | | | |
| 29 | 4,30 | 3,60 | 0,15 | 3,6% | 0,36 | 0,19 | 4,4 | | | |
| 43 | 6,43 | 5,00 | 0,25 | 3,8% | 0,49 | 0,70 | 10,9 | | | |
| 48 | 7,23 | 3,82 | 1,16 | 16,1% | 0,56 | 1,69 | 23,4 | | | |
| 56 | 8,33 | 4,76 | 1,24 | 14,9% | 0,73 | 1,59 | 19,0 | | | |
| 72 | 10,84 | 8,69 | 0,32 | 2,9% | 0,91 | 0,92 | 8,5 | | | |
| 75 | 11,20 | 6,81 | 1,33 | 11,9% | 0,81 | 2,24 | 20,0 | | | |
| 84 | 12,61 | 8,21 | 1,52 | 12,0% | 0,92 | 1,98 | 15,7 | | | |
| 93 | 13,87 | 10,06 | 1,67 | 12,0% | 1,03 | 1,12 | 8,1 | | | |
| 102 | 15,35 | 12,06 | 2,01 | 13,1% | 0,95 | 0,33 | 2,1 | | | |
| 113 | 16,91 | 14,63 | 0,43 | 2,6% | 1,76 | 0,08 | 0,5 | | | |
| 139 | 20,78 | 18,18 | 0,55 | 2,7% | 1,81 | 0,23 | 1,1 | | | |
| | | | Temps d' | exposition = | 48 h | | | | | |
| 14 | 2,03 | 1,23 | 0,05 | 2,6% | 0,10 | 0,64 | 31,6 | | | |
| 29 | 4,30 | 3,24 | 0,14 | 3,2% | 0,28 | 0,65 | 15,0 | | | |
| 43 | 6,43 | 4,76 | 0,24 | 3,7% | 0,54 | 0,90 | 13,9 | | | |
| 48 | 7,23 | 3,82 | 1,16 | 16,1% | 0,56 | 1,69 | 23,4 | | | |
| 56 | 8,33 | 4,76 | 1,24 | 14,9% | 0,73 | 1,59 | 19,0 | | | |
| 72 | 10,84 | 7,38 | 0,33 | 3,0% | 0,61 | 2,53 | 23,3 | | | |
| 75 | 11,20 | 6,81 | 1,33 | 11,9% | 0,81 | 2,24 | 20,0 | | | |
| 84 | 12,61 | 8,21 | 1,52 | 12,0% | 0,92 | 1,98 | 15,7 | | | |
| 93 | 13,87 | 10,06 | 1,67 | 12,0% | 1,03 | 1,12 | 8,1 | | | |
| 102 | 15,35 | 12,06 | 2,01 | 13,1% | 0,95 | 0,33 | 2,1 | | | |
| 113 | 16,91 | 14,07 | 0,49 | 2,9% | 1,00 | 1,35 | 8,0 | | | |
| 139 | 20,78 | 16,19 | 0,63 | 3,0% | 1,50 | 2,46 | 11,8 | | | |

| | Temps d'exposition = 72 h | | | | | | | | | |
|-----|---------------------------|-------|---------|----------------|--------|-------|------|--|--|--|
| 14 | 2,03 | 0,98 | 0,06 | 2,9% | 0,11 | 0,88 | 43,3 | | | |
| 29 | 4,30 | 2,67 | 0,17 | 4,0% | 0,28 | 1,18 | 27,4 | | | |
| 43 | 6,43 | 4,31 | 0,25 | 3,9% | 0,50 | 1,37. | 21,3 | | | |
| 48 | 7,23 | 3,79 | 0,97 | 13,4% | 0,45 | 2,02 | 28,0 | | | |
| 56 | 8,33 | 4,80 | 1,08 | 13,0% | 0,57 | 1,88 | 22,6 | | | |
| 72 | 10,84 | 7,12 | 0,35 | 3,2% | 0,81 | 2,56 | 23,6 | | | |
| 75 | 11,20 | 6,24 | 1,14 | 10,2% | 0,70 | 3,12 | 27,8 | | | |
| 84 | 12,61 | 7,33 | 1,25 | 9,9% | 0,69 | 3,33 | 26,4 | | | |
| 93 | 13,87 | 10,06 | 1,45 | 10,4% | 1,21 | 1,16 | 8,3 | | | |
| 102 | 15,35 | 10,72 | 1,36 | 8,8% | 1,01 | 2,27 | 14,8 | | | |
| 113 | 16,91 | 13,69 | 0,46 | 2,7% | 1,13 | 1,63 | 9,6 | | | |
| 139 | 20,78 | 17,86 | 0,56 | 2,7% | 1,58 | 0,77 | 3,7 | | | |
| | | | Temps o | l'exposition = | = 96 h | | | | | |
| 14 | 2,03 | 0,67 | 0,07 | 3,3% | 0,05 | 1,23 | 60,9 | | | |
| 29 | 4,30 | 1,44 | 0,15 | 3,5% | 0,16 | 2,55 | 59,4 | | | |
| 43 | 6,43 | 2,60 | 0,24 | 3,8% | 0,35 | 3,24 | 50,4 | | | |
| 48 | 7,23 | 3,82 | 1,16 | 16,1% | 0,56 | 1,69 | 23,4 | | | |
| 56 | 8,33 | 4,76 | 1,24 | 14,9% | 0,73 | 1,59 | 19,0 | | | |
| 72 | 10,84 | 6,22 | 0,37 | 3,4% | 0,66 | 3,59 | 33,1 | | | |
| 75 | 11,20 | 6,81 | 1,33 | 11,9% | 0,81 | 2,24 | 20,0 | | | |
| 84 | 12,61 | 8,21 | 1,52 | 12,0% | 0,92 | 1,98 | 15,7 | | | |
| 93 | 13,87 | 10,06 | 1,67 | 12,0% | 1,03 | 1,12 | 8,1 | | | |
| 102 | 15,35 | 12,06 | 2,01 | 13,1% | 0,95 | 0,33 | 2,1 | | | |
| 113 | 16,91 | 12,16 | 0,50 | 2,9% | 1,10 | 3,15 | 18,6 | | | |
| 139 | 20,78 | 16,09 | 0,57 | 2,7% | 1,55 | 2,67 | 12,8 | | | |