

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

Thèse de doctorat

présentée

à

l'Institut national de la recherche scientifique

INRS-Eau

par

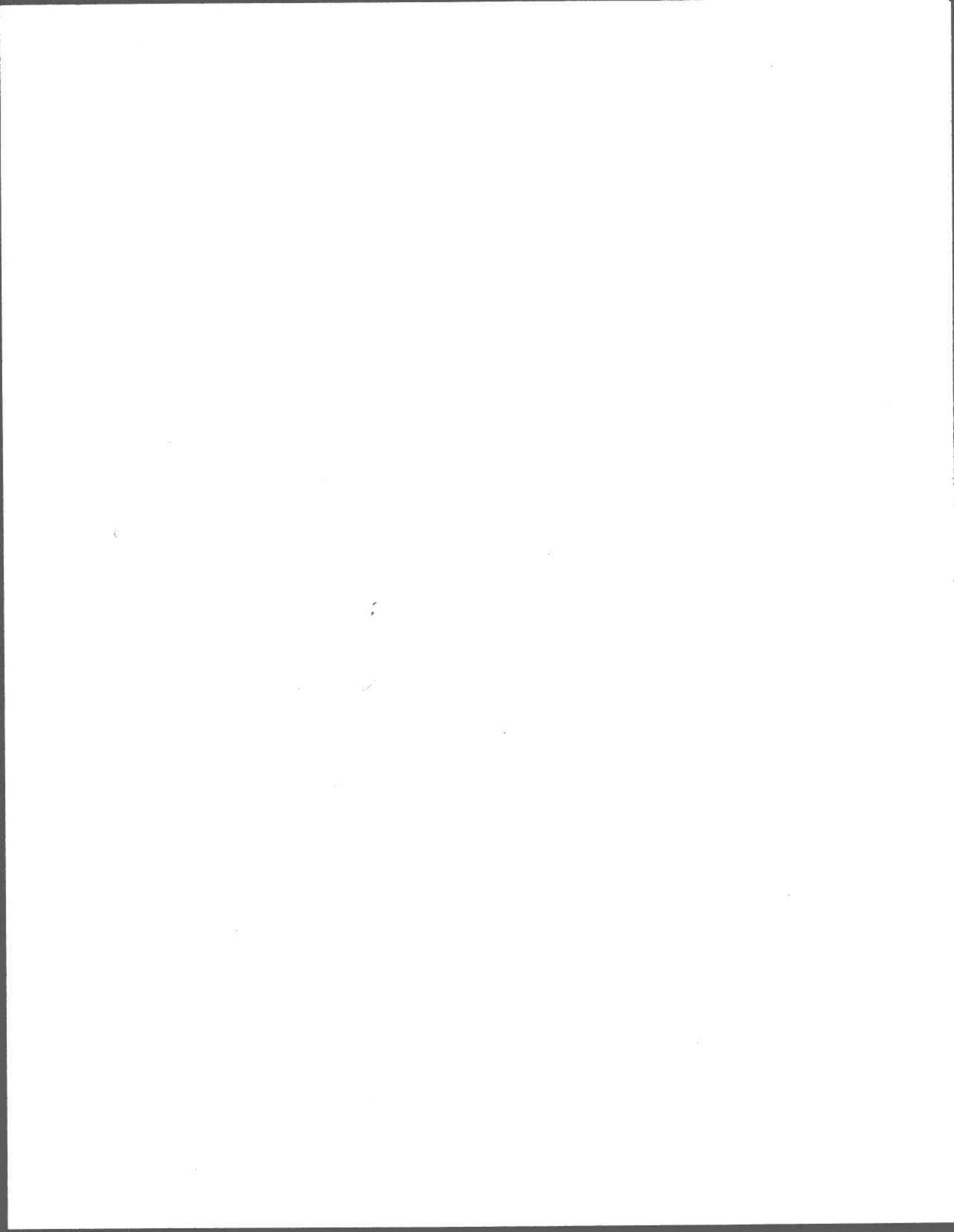
Lise Parent

B. Sc. Biologiques

Maîtrise en Sc. de l'Environnement

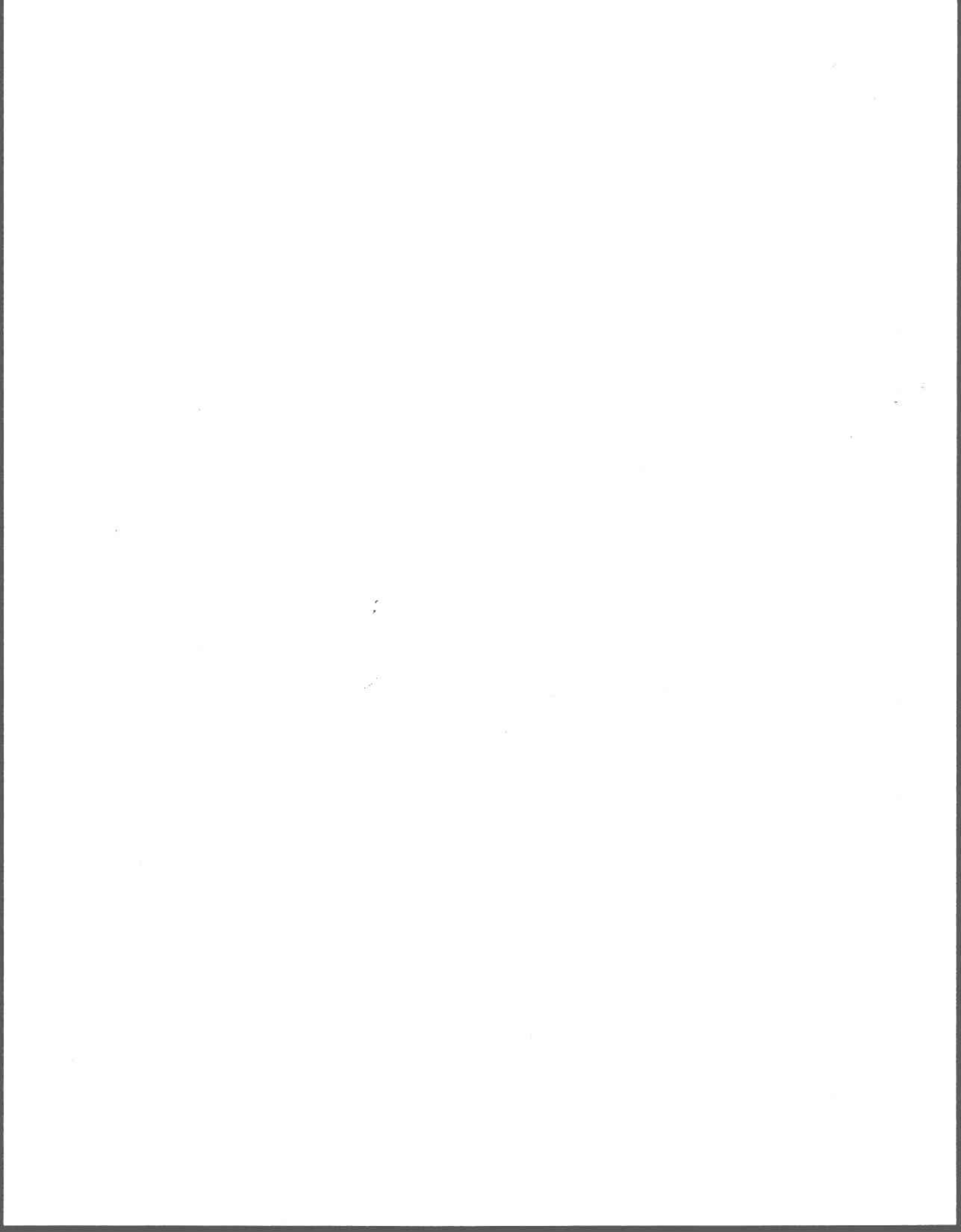
"Biodisponibilité de l'aluminium dans les
eaux douces en relation avec les pluies acides"

Décembre 1991



Hors l'amour, les jeunes gens
ne sont que des pantins animés
par des aspirations dérisoires.
Hors l'amour, ils mènent une
vie en trompe l'oeil.

Alexandre Jardin

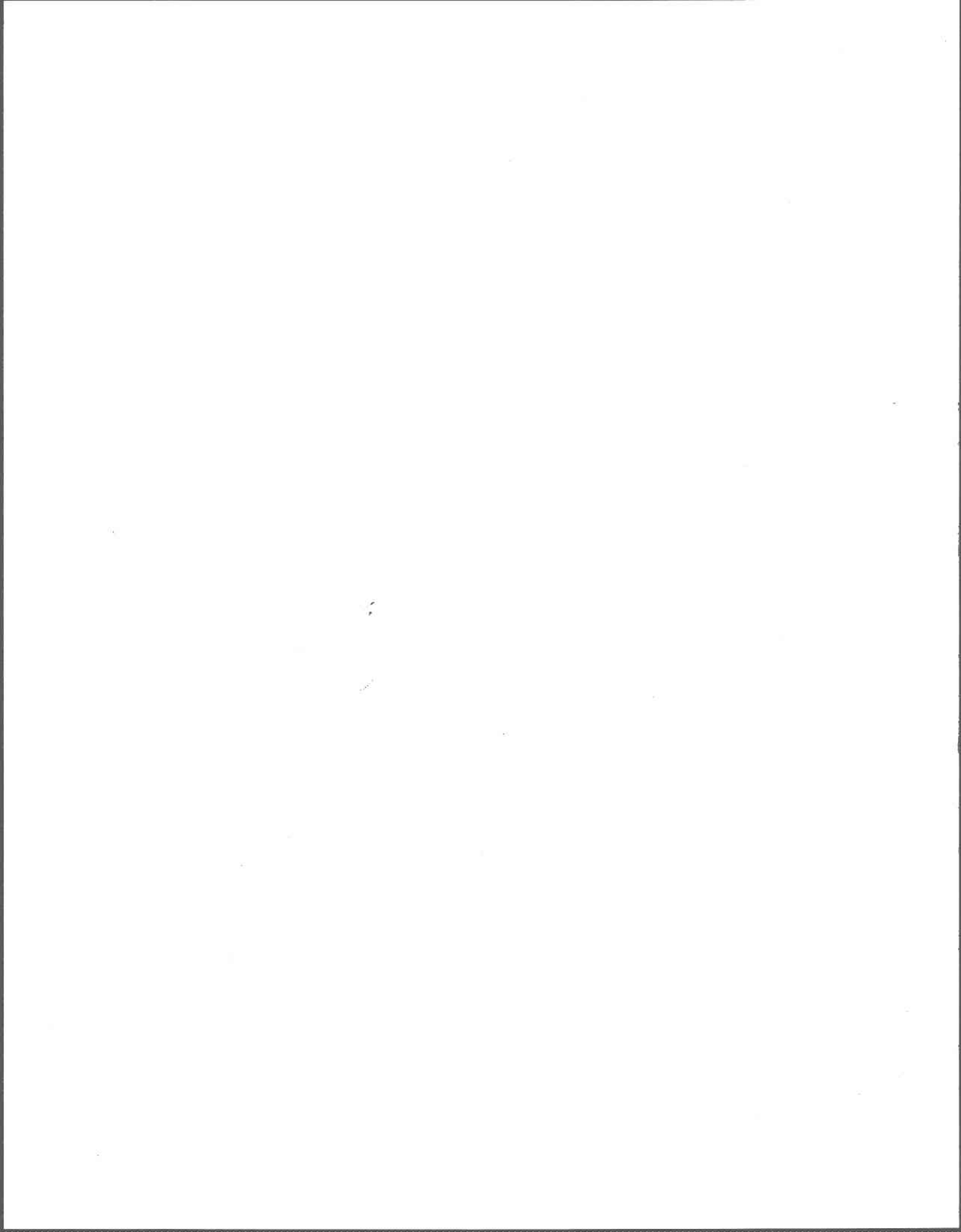


REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier les membres du jury qui ont bien voulu apporter leurs critiques tout autant constructives les unes que les autres. Je veux aussi exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, le docteur Peter G. C. Campbell, pour sa patience et sa facilité de conciliation avec mes points de vue qui plus souvent qu'autrement divergeaient à prime abord avec les siens.

Je ne peux non plus passer sous silence, la contribution inestimable des techniciens dont Michèle Bordeleau et Bernard Veilleux sous la supervision de Sylvie Desjardins, qui dans un sprint final m'ont aidée à conclure cette thèse par des expériences complémentaires qui n'étaient pas faciles à réaliser. Mes étudiants d'été, Kevin Wilkinson, Michel Desjardins et Albert Craig, dont deux ont opté pour le programme de doctorat à l'INRS-eau, m'ont aussi aidée à persévérer dans l'élaboration de la méthodologie.

Je dois de plus remercier mes collègues qui depuis le début ont partagé avec moi ce que j'ai nommé les fameuses angoisses doctorales. Un gros merci à Daniel Houle pour m'avoir servi de contact permanent à l'INRS-eau ainsi que de m'avoir fourni le gîte lors de la phase terminale du doctorat. Je ne peux non plus déposer cette thèse sans remercier du fond du coeur ma famille, et plus particulièrement ma lectrice: ma mère Denise, pour leurs encouragements et leurs soutiens constants.



RÉSUMÉ

Le sujet de la thèse porte sur la biodisponibilité de l'aluminium dans les eaux douces en relation avec les pluies acides. Il s'insère dans la problématique de la mobilisation géochimique de certains métaux qui se produit en même temps que l'acidification des eaux de surface. Le but général de ce programme de recherche est de relier la spéciation de l'aluminium à sa biodisponibilité en utilisant une algue unicellulaire (Chlorella pyrenoidosa) en milieu de culture défini.

Les objectifs plus spécifiques sont:

- 1 - de vérifier la capacité du "modèle d'ion libre", où la réponse biologique à un métal (M) est fonction de la concentration de l'ion libre $[M^{2+}]$, pour expliquer la bioaccumulation et la toxicité de l'aluminium;
- 2 - de tester l'amélioration possible du modèle, en évaluant la part des formes d'aluminium monomère inorganique, polymère et organique à l'origine de la toxicité, et en ajoutant le concept de compétition H^+/Al^{3+} au niveau de la membrane;
- 3 - d'évaluer la capacité du modèle révisé à prédire la biodisponibilité de l'aluminium dans les eaux naturelles, notamment en présence de matière organique dissoute d'origine naturelle.

Etant donné qu'en milieu acide, l'influence du pH se joue sur deux niveaux, soit la spéciation du métal en solution et la sensibilité biologique au niveau de la surface cellulaire, et que ces deux réponses à l'acidification sont antagonistes et ont le potentiel de s'annuler l'une l'autre, on a évalué les effets du pH sur les interactions métaux-surface algale selon trois approches:

- 1- Par titrage des algues, afin de quantifier les ligands (L) disponibles à la surface cellulaire à différents pH et ainsi mesurer l'importance des interactions entre les ions H^+ et la surface cellulaire.
- 2- Par incubation des algues à des pH variant de 7 à 5, en présence d'un métal (Mn) dont la spéciation ne change pas en fonction du pH, ce qui a permis de vérifier que les ions H^+ diminuaient la prise en charge d'un métal.
- 3- Par des mesures de perméabilité membranaire, à des pH variant de 7 à 5, et en présence/absence de l'Al, qui ont mis en évidence la sensibilité de la barrière membranaire à l'acidification.

Ces trois approches nous ont permis de conclure que la disponibilité des sites cellulaires ayant le potentiel de lier l'Al diminuait à bas pH, même si le pH à lui seul (pH 7.0-->4.3)

n'affectait pas significativement la croissance de Chlorella pyrenoidosa.

Trois formes d'aluminium ont été testées pour connaître leur potentiel de toxicité.

1-) L'aluminium monomère inorganique, pour vérifier si le modèle d'ion libre (M^{2+}) pouvait expliquer les résultats obtenus dans un système simple (exempt de ligands organiques ou de formes polynucléaires).

2-) L'aluminium polymère, $Al_{13}O_4(OH)_{24}^{7+}$, puisque dans la littérature on peut trouver des indications tout à fait contradictoires concernant la toxicité de cette forme métastable vis-à-vis des producteurs primaires. De plus, considérant la possibilité de sa présence dans des milieux en récupération (augmentation du pH après acidification naturelle ou artificielle), il nous semblait important de connaître le potentiel toxique de cette forme.

3-) L'aluminium organique, Al-acide fulvique, puisque même si les effets qualitatifs de la matière organique sur la toxicité des métaux sont assez bien connus, rares sont les expériences où on a vérifié quantitativement si le modèle de l'ion libre s'appliquait en présence de la matière organique naturelle.

Pour mesurer la sévérité de la réponse résultant de l'exposition à l'Al, on a produit des graphiques mettant en relation la concentration de l'Al et la réponse observée, soit le % de croissance par rapport au témoin. De cette façon, on a pu observer un effet de gamme important, mais qui variait aussi avec le pH.

Ainsi, on a pu démontrer une toxicité significative, surtout à la concentration en aluminium monomère inorganique maximale, pour chacun des pH testés. De plus, pour une concentration donnée de l'ion libre, Al^{3+} , cette toxicité augmentait avec le pH. La droite résultante de la régression linéaire du pourcentage d'inhibition de croissance en fonction de la concentration en Al monomère inorganique devenait de plus en plus plane à faible pH, ce qui nous suggère qu'il y avait compétition ionique entre les cations Al et H^+ . La même relation a été observée pour les tests avec l'aluminium polymère, alors que cette dernière forme a toujours été considérée, jusqu'à tout récemment (1990), comme étant non toxique. Plus surprenant encore furent les résultats des effets de l'aluminium organique sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa en présence d'aluminium monomère inorganique. En effet les différentes expériences portant sur l'effet de l'Al organique (en présence d'une concentration constante d'Al inorganique) sur la

croissance de Chlorella pyrenoidosa ont montré un effet inhibiteur des effets dus à $Al_{\text{inorganique}}$ menant à une amélioration de la croissance qui ne pouvait être expliquée en termes conventionnels (complexation de l'Al en solution et baisse de la $[Al^{3+}]$).

Nous avons observé que la toxicité de l'aluminium due aux formes monomères et polymères était supérieure aux pH plus élevés. Nous avons associé cette toxicité accrue à une augmentation de la perméabilité membranaire à pH plus élevé et à une compétition moins intense entre les cations H^+ et $l'Al(OH)_n^{(3-n)+}$ pour les sites accepteurs présents à la surface cellulaire. Nous avons évalué si la toxicité de l'aluminium pouvait être expliquée en partie ou en totalité par sa prise en charge, par son flux cellulaire, par son effet sur la perméabilité membranaire, par ses interactions possibles avec les réserves en phosphore intracellulaire et par ses effets indirects sur la division cellulaire (surface et volume cellulaire).

L'influence des ions hydrogène se faisait sentir à tous les niveaux étudiés. Cependant, après avoir tenu compte de l'effet du pH sur la concentration en $[Al^{3+}]$ disponible et sur les ligands cellulaires $[L^-]$ libres, on observe toujours un effet résiduel du pH, de quoi soupçonner la sous-évaluation des effets du pH sur l'intégrité et le métabolisme membranaire. De fait, contrairement à ce que laisserait supposer le modèle d'ion libre, l'évaluation seule de $[Al^{3+}]$ et de $[L^-]_{\text{libre}}$ ne suffit pas à expliquer la tendance observée. Des mécanismes de toxicité différents sont suggérés pour les trois formes d'aluminium testées.

Les conclusions suivantes découlent de cette recherche:

- 1) Le pH est le paramètre primordial à considérer lorsqu'on évalue la toxicité de l'aluminium. Ainsi, plus le pH est élevé (pH 4.0 ---> 6.0) plus l'aluminium est toxique et ce à des concentrations retrouvées en milieu naturel.
- 2) La concentration en Al^{3+} nécessaire à inhiber 30% la croissance de Chlorella pyrenoidosa peut s'exprimer de la façon suivante:
 $-\log [Al^{3+}] = 1.77 \text{ pH} - 9.09$
- 3) Le quota cellulaire provoquant (ou résultant de) l'inhibition de croissance de 30% est de l'ordre de $20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ d'Al, exprimé par rapport à la surface algale.
- 4) L'aluminium polymère a une toxicité additive sur l'aluminium monomère inorganique de l'ordre de 50% de celle de l'aluminium monomère.
- 5) En présence d'acide fulvique et pour une même $[Al^{3+}]$, la toxicité est diminuée. Cette observation constitue un échec majeur du modèle de l'ion libre et remet en cause son applicabilité dans le milieu naturel.

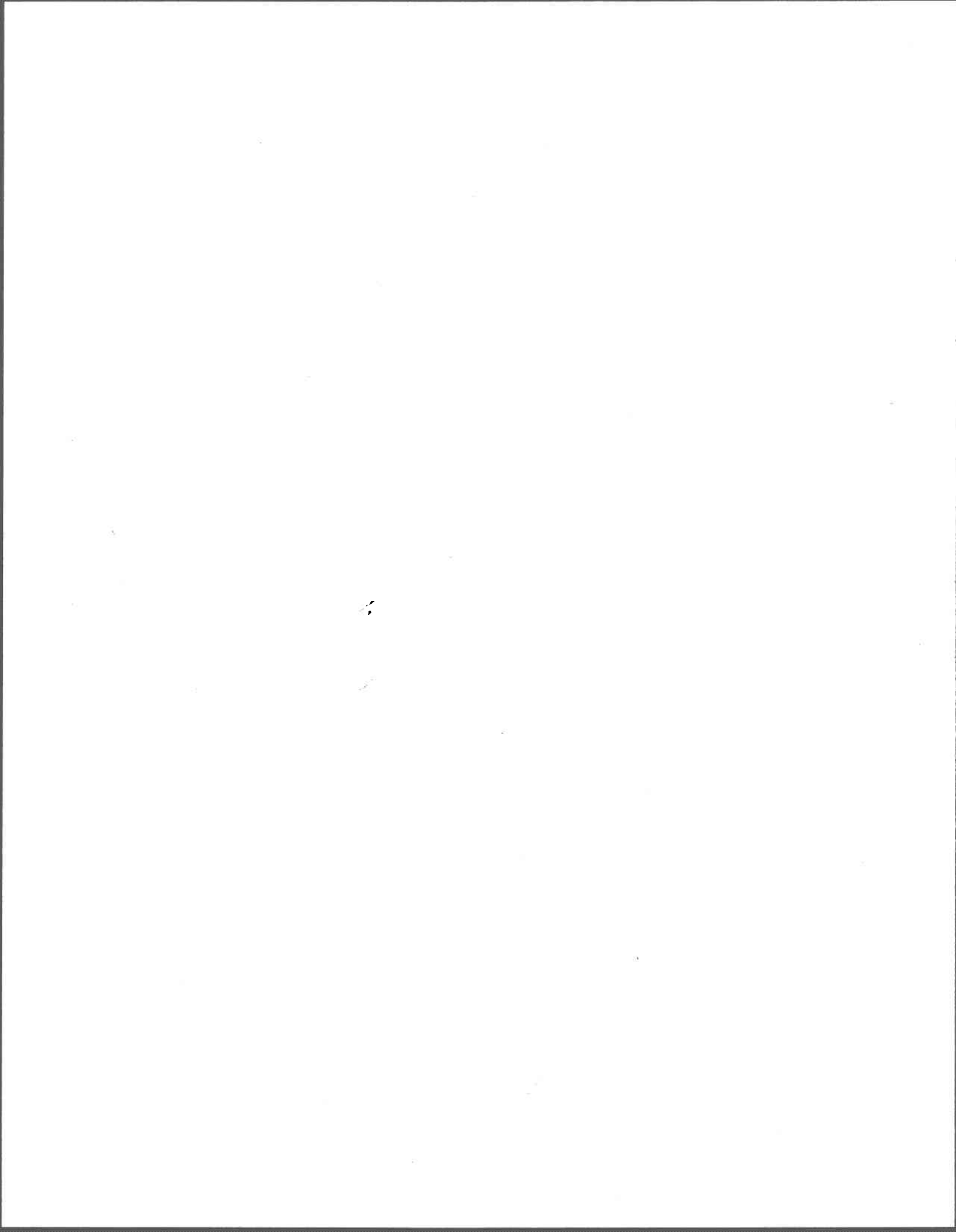


TABLE DES MATIERES

	Page
REMERCIEMENTS	i
RÉSUMÉ	ii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	xiv
LISTE DES FIGURES	xviii
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2: MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE	74
CHAPITRE 3: ETUDE DES EFFETS DU pH SUR LA CROISSANCE DE <u>CHLORELLA PYRENOIDOSA</u>	105
CHAPITRE 4: EFFETS DU pH SUR LES INTERACTIONS MÉTAUX-SURFACE ALGALE	185
CHAPITRE 5: TOXICITÉ DE L'ALUMINIUM EN RELATION AVEC SA SPÉCIATION	249
CHAPITRE 6: BIODISPONIBILITÉ DE L'ALUMINIUM POUR <u>CHLORELLA PYRENOIDOSA</u> EN RELATION AVEC LE pH	323
CHAPITRE 7: SYNTHÈSE ET CONCLUSION	429

CHAPITRE 1: INTRODUCTION ET PROBLÉMATIQUE

	Page
1.1 Introduction générale et objectifs.....	3
1.2 Problématique spécifique.....	6
1.2.1 Interaction M^{2+} /organisme: "modèle d'ion libre"....	6
1.2.2 Interaction H^+/M^{2+} /organisme.....	11
1.2.2.1 Prise en charge des métaux vs pH.....	16
1.2.2.2 Toxicité des métaux vs pH.....	21
1.3 État des connaissances.....	22
1.3.1 Géochimie de l'aluminium.....	23
1.3.2 Toxicité de l'aluminium.....	29
1.3.2.1 Revue des effets toxiques attribués à l'aluminium chez les plantes.....	30
1.3.2.2 Facteurs influençant la toxicité de l'aluminium.....	37
1.4 Concept et démarche expérimentale.....	48
1.4.1 Le modèle d'ion libre et son application au cas de l'aluminium.....	48
1.4.2 Examen détaillé et approfondi des cas d'exception apparents (algues).....	52
1.5 Références.....	61

CHAPITRE 2 : MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

	Page
2.1 Approche générale.....	76
2.1.1 Spéciation de l'aluminium.....	76
2.1.2 Biodisponibilité de l'aluminium.....	77
2.2 Analyses.....	79
2.2.1 Généralités analytiques.....	79
2.2.2 Spéciation de l'aluminium.....	81
2.2.3 Analyse de l'aluminium et du manganèse.....	84
2.2.4 Digestion des algues.....	90
2.2.5 Analyse du phosphore.....	91
2.2.6 Analyse du carbone organique dissous.....	93
2.3 Organisme et conditions de croissance.....	94
2.4 Milieu d'exposition pour (AAP-P-MT, tampon 0.01 M).....	96
2.5 Protocole expérimental.....	97
2.5.1 Mesure de la croissance.....	97
2.5.2 Mesure de la prise en charge des métaux.....	99
2.6 Références.....	102

CHAPITRE 3: EFFET DU pH SUR LA CROISSANCE DE CHLORELLA
PYRENOIDOSA

	Page
3.1 Introduction.....	108
3.2 Matériel et méthodes.....	112
3.2.1 Conditions de croissance.....	112
3.2.2 Conditions expérimentales.....	114
3.2.3 Protocole expérimental.....	116
3.3 Mise au point du milieu d'exposition.....	118
3.3.1 Utilisation de tampons biologiques.....	118
3.3.2 Discussion.....	128
3.4 Sélection du paramètre de croissance.....	130
3.4.1 Biomasse finale (cellules·mL ⁻¹).....	134
3.4.2 Taux de croissance moyen (μ -moyen).....	138
3.4.3 Taux de croissance maximal (μ -max).....	139
3.4.4 Aire sous la courbe de croissance (A).....	141
3.4.5 Superficie (m ²) et volume cellulaire (m ³).....	143
3.4.6 Conclusion.....	147
3.5 Effet du pH sur la croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> ..	148
3.6 Références.....	150

ANNEXE 3.A:Mise au point du milieu expérimental.....	154
A.A Milieu AAP; pH 5 (NaOAc); pH 6 (MES); pH 7 (PIPES) (0.01M);.....	157
A.B Milieu AAP-T-MT; pH 5, 5.5, 6, 7;.....	160
A.C Milieu AAP-P-MT; pH 5 (NaOAc); pH 5.5, 6 (MES); pH 7 (PIPES) (0.001M);.....	163
A.D Milieu AAP-P-MT; pH 5 (NaOAc); pH 5.5, 6 (MES); pH 7 (PIPES) (0.01M);.....	165
A.E Milieu AAP-P-MT; pH 5, 5.5, 6 (MES); pH 7 (PIPES) (0.01M);.....	169
A.F Milieu AAP-P-MT; pH 4, 4.5 (MES, NaOAc); pH 5, 5.5, 6 (MES); pH (PIPES); (0.01 M);.....	171
A.G Milieu AAP-P-MT; pH 5, 5.5, 6 (MES); pH 7 (PIPES; HEPES); (0.01M);.....	174
A.H Milieu AAP-P-MT; pH 4, 4.5 (MES, DMGA); (0.01 M);..	177
A.I Milieu AAP-P-TM; pH 4, 4.5 (DMGA); (0.01 M);.....	180
Références.....	183

CHAPITRE 4: EFFETS DU pH SUR LES INTERACTIONS MÉTAUX/SURFACE ALGALE

	Page
4.1 Introduction.....	187
4.2 Titrage des algues.....	192
4.2.1 Introduction.....	192
4.2.2 Matériel et méthodes.....	196
4.2.3 Résultats.....	199
4.2.4 Discussion.....	211
4.3 Effet du pH sur l'adsorption du Mn.....	219
4.3.1 Introduction.....	219
4.3.2 Matériel et méthodes.....	220
4.3.3 Résultats.....	225
4.3.4 Discussion.....	229
4.4 Effet du pH sur la perméabilité membranaire.....	236
4.4.1 Introduction.....	236
4.4.2 Matériel et méthodes.....	239
4.4.3 Résultats.....	240
4.4.4 Discussion.....	243
4.5 Conclusion.....	244
4.6 Références.....	246

CHAPITRE 5: TOXICITE DE L'ALUMINIUM EN RELATION AVEC SA SPECIATION

	Page
5.1 Introduction.....	251
5.2 Toxicité de l'aluminium monomère.....	257
5.2.1 Matériel et méthodes.....	257
5.2.2 Résultats.....	259
5.2.3 Discussion.....	268
5.3 Toxicité de l'aluminium polymère.....	283
5.3.1 Matériel et méthodes.....	285
5.3.2 Résultats.....	287
5.3.3 Discussion.....	291
5.4 Toxicité de l'aluminium organique.....	299
5.4.1 Matériel et méthodes.....	302
5.4.2 Résultats.....	305
5.4.3 Discussion.....	313
5.5 Conclusion.....	317
5.6 Références.....	319

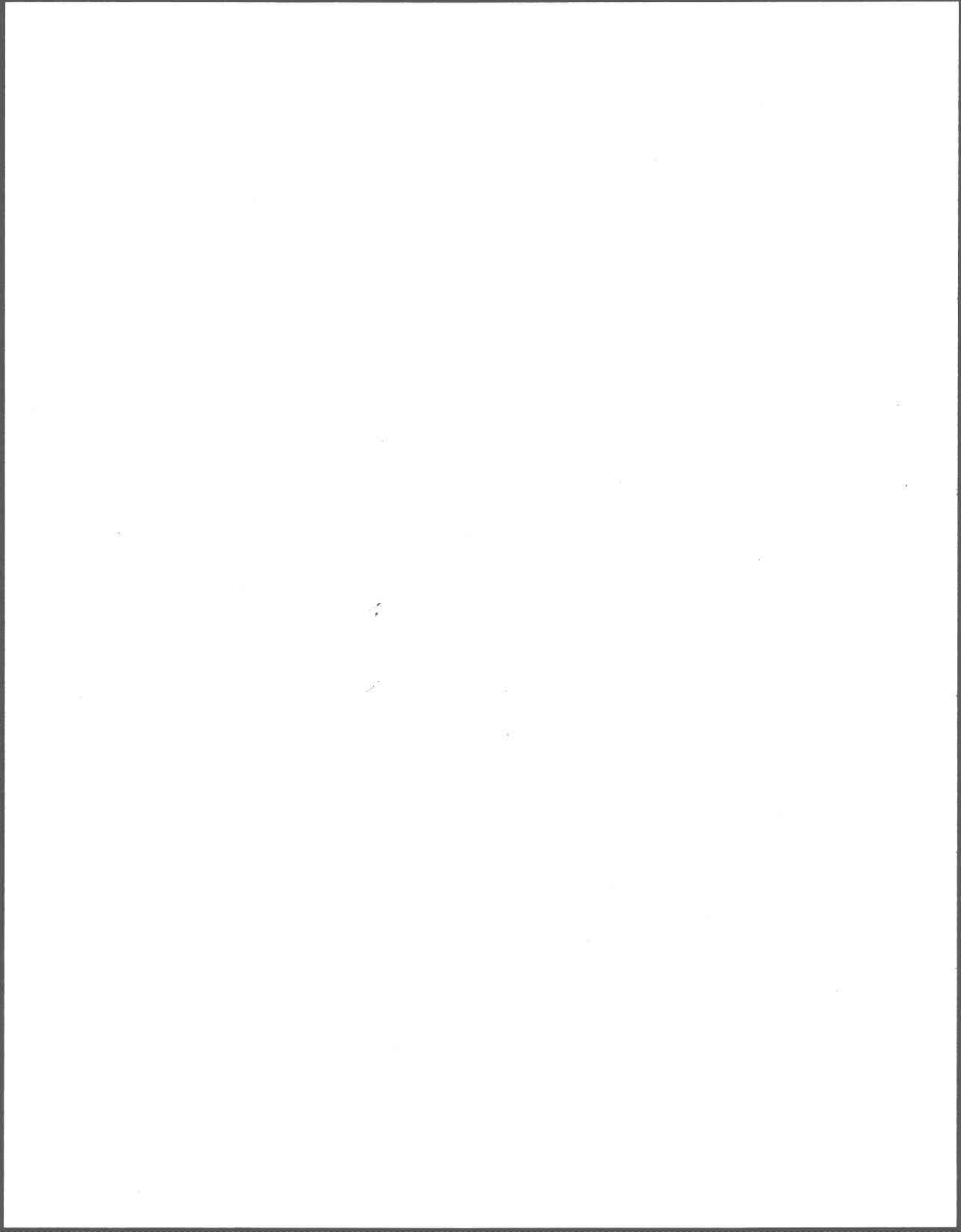
CHAPITRE 6: BIOACCUMULATION DE L'ALUMINIUM PAR CHLORELLA
PYRENOIDOSA EN RELATION AVEC LE PH

Page

6.1	Introduction.....	325
6.2	Prise en charge de l'aluminium.....	325
6.2.1	Introduction.....	325
6.2.2	Matériel et méthodes.....	330
6.2.3	Résultats et discussion.....	332
6.2.3.1	Al monomère.....	339
6.2.3.2	Al polymère.....	359
6.2.3.3	Al organique.....	363
6.2.3.4	Mesure du flux cellulaire.....	369
6.2.4	Discussion générale.....	377
6.3	Relation entre l'Al intracellulaire et le P cellulaire..	388
6.3.1	Introduction.....	388
6.3.2	Matériel et méthodes.....	389
6.3.3	Résultats.....	390
6.3.4	Discussion.....	400
6.4	Effet de l'Al sur la perméabilité membranaire.....	405
6.4.1	Introduction.....	405
6.4.2	Matériel et méthodes.....	406
6.4.3	Résultats.....	408
6.4.4	Discussion.....	413
6.5	Références.....	416
Annexe B.1	Extraction de l'aluminium adsorbé sur une algue (Chlorella pyrenoidosa) par EDTA (10^{-3} M) selon le pH de la solution extractante.....	422
Annexe B.2	Evaluation du temps de contact optimal de l'EDTA avec les algues pour désorber tout Al.....	427

CHAPITRE 7 : SYNTHÈSE ET CONCLUSION

	Page
7.1 Biodisponibilité de l'aluminium en milieu acide.....	431
7.2 Effets biologiques.....	431
7.3 Disponibilité.....	436
7.4 Modélisation.....	446
7.5 Conclusion.....	448
7.6 Références.....	449



LISTE DES TABLEAUX

	Page
1.1 Résumé des effets bio-physiologiques de l'aluminium chez les plantes et les algues	36
1.2 Constantes d'équilibre utilisées pour déterminer l'activité des espèces d'aluminium (Tiré de Kinraide et Parker, 1989).....	41
1.3 Références et données expérimentales d'études récentes sur la toxicité de Al.....	45
1.4 Toxicité relative associée à différentes formes d'aluminium.....	50
1.5 Effet de l'aluminium en présence ou non de différents ligands sur le taux de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> dans une eau synthétique dure, à pH 5.2 et contenant 1.1 μM d'aluminium total (tiré et adapté de Helliwell et al., 1983).....	54
2.1 Résumé des méthodes analytiques employées dans les laboratoires de l'INRS-eau (Tiré de Campbell et al., 1989).....	80
2.2 Composition du milieu AAP (Algal Assay Procedure) modifié (inspiré de Chiaudani et de Vighi, 1978, et de Payne et Hall, 1978).....	94
3.1 Taux de croissance maximal (division $\cdot j^{-1}$), moyen et écart type pour <u>Chlorella pyrenoidosa</u> (AAP: milieu de culture; AAP-P-MT: milieu d'exposition ne contenant ni phosphore ni métaux; PIPES, NaOAc, MES, HEPES, DMGA: voir leur nom dans le texte, section 3.2.2) (effectif (n) apparaît en exposant).....	119
3.2 Evolution du pH dans un milieu synthétique avec tampon (10^{-2} M), sur une période d'incubation de 7 jours.....	126
3.3 Valeurs moyennes de biomasse finale de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> dans des milieux de pH différents. (n= nombre d'essais).....	134
3.4 Valeurs moyennes des taux de croissance moyens de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> dans des milieux de pH différents (n= nombre d'essais).....	138

LISTE DES TABLEAUX

	Page
3.5 Valeurs moyennes des taux maximum de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> dans des milieux de pH différents (n= nombre d'essais).....	141
3.6 Valeurs moyennes des aires sous la courbe de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> pour une période de 4 jours dans des milieux de pH différents (n= nombre d'essais).....	143
3.7 Volume cellulaire moyen (μm^3) de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à différents pH au cours de différentes expériences (voir annexe A).....	147
A.B Evolution du pH dans un milieu synthétique sans tampon, après une période d'incubation de 5 jours.....	161
A.D Evolution du pH dans un milieu synthétique avec tampon (10^{-2} M), pendant une période d'incubation de 4 jours...	167
A.F Evolution du pH dans un milieu synthétique avec tampon, sur une période d'incubation de 8 jours.....	172
A.G Evolution du pH dans un milieu synthétique avec tampon (10^{-2} M), pendant une période d'incubation de 7 jours...	176
A.H Evolution du pH dans un milieu synthétique avec tampon (10^{-2} M), pendant une période d'incubation de 8 jours...	179
4.1 Résultats obtenus pour le titrage "en lot" de <u>Chlorella pyrenoidosa</u>	202
4.2 Titrage de cellules mortes de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> : ions H^+ liés et libres. (essai 1: $7 \cdot 10^6$ cellules $\cdot \text{mL}^{-1}$).....	204
4.3 Titrage de cellules mortes de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> : ions H^+ liés et libres. (essai 2: $7 \cdot 10^6$ cellules $\cdot \text{mL}^{-1}$).....	205
4.4 Titrage de cellules vivantes de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à la noirceur: ions H^+ liés et libres. ($1.13 \cdot 10^6$ cellules $\cdot \text{mL}^{-1}$).....	208
4.5 Bilan des expériences de titrage de <u>Chlorella pyrenoidosa</u>	212

LISTE DES TABLEAUX

	Page
4.6 Tableau comparatif des expériences visant à évaluer la capacité de liaison des ions hydrogène par les organismes unicellulaires.....	216
4.7 Bioaccumulation du Mn par <u>Chlorella pyrenoidosa</u> en fonction du pH (4 h d'exposition).....	226
5.1 Gamme de concentrations en Al monomère testées.....	258
5.2 Spéciation de l'aluminium pour chacun des pH. Al_{T-N} : Aluminium total nominal; Al_T : aluminium total mesuré au jour 4 ou 5; Al_D : aluminium dissous mesuré; Al_{CV} : aluminium inorganique monomère mesuré; Al^{3+} , $Al(OH)^{2+}$, $Al(OH)_2^+$, déterminés par MINEQL à partir des concentrations nominales.....	262
5.3 Pourcentage de l'aire sous la courbe du témoin pour chacune des expériences. Les valeurs soulignées signifient qu'elles sont significativement différentes entre elles et par rapport aux autres valeurs non soulignées ($\alpha=0.05$), et ce, pour un même pH.....	267
5.4 Conditions expérimentales pour vérifier les effets de Al polymère sur la croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> . Les valeurs soulignées indiquent la concentration maximale en Al monomère pour chacun des pH tandis que les valeurs entre parenthèse signifient les valeurs nominales en Al polymère.....	286
5.5 Concentrations moyennes mesurées en aluminium pour chacun des pH.....	288
5.6 Concentration en aluminium dans les différents milieux d'exposition à pH 5.0. Al_T : Al total; Al_D : Al dissous; Al_{CV} : Al monomère; Al_{CVR} : Al monomère organique; $Al_{CV}-Al_{CVR}$: Al monomère inorganique.....	306
5.7 Essais préliminaires - évolution de Al en solution ($\mu g \cdot L^{-1}$) en présence ou pas d'acide fulvique ($20 mg \cdot L^{-1}$). Ac. fulv.: acide fulvique; Al_T : Al total; Al_D : Al dissous; Al_{CV} : Al monomère; Al_{CVR} : Al monomère organique; Al_I : Al monomère inorganique.....	307
5.8 Concentrations initiales en aluminium inorganique (Al_{CV-CVR}) et organique (Al_{CVR}) pour la deuxième série expérimentale. (N: nominal; M: mesuré).....	308

LISTE DES TABLEAUX

	Page
6.1 Relations entre biodisponibilité et bioaccumulation.....	327
6.2 Bioaccumulation de Al par <u>Chlorella pyrenoidosa</u> après 4 jours de contact avec une solution contenant de l'aluminium dissous à différents pH. ([Al]total=bioaccumulation totale de Al; [Al]cell.= aluminium non extractible à l'EDTA; [Al]ads.= [Al]total-[Al]cell.; % : pourcentage d'Al adsorbé; *= inhibition de croissance significative par rapport au témoin).....	334
6.3 Mesure du flux cellulaire de Al ⁺³ pour <u>Chlorella pyrenoidosa</u> et calcul du flux théorique maximal pour Al ⁺³	370
6.4 Mesure du taux maximal de division cellulaire, du volume cellulaire moyen, de la densité cellulaire et du phosphore cellulaire à la phase stationnaire de croissance pour <u>Chlorella pyrenoidosa</u>	391
7.1: Relations entre biodisponibilité et bioaccumulation - Influence de changements de pH.....	438

LISTE DES FIGURES

	Page
1.1 Courbes typiques de prise en charge du manganèse par <u>Chlamydomonas variabilis</u> (tirée de Schenck et al., 1988).....	19
1.2 Concentration cellulaire en manganèse (A) et concentration de manganèse adsorbé (B) en fonction du temps (tirée de Schenck et al., 1988). Symboles: ● = pH 5; □ = pH 7.....	20
1.3 (a) Représentation schématique de l'aquo-ion d'aluminium $Al(H_2O)_6^{6+}$; (b) Représentation schématique du dimère $Al_2(OH)_2(H_2O)_8^{4+}$ (Tirée Driscoll et Schecher, 1988).....	27
1.4 Distribution de l'activité de différentes espèces d'Al en fonction du pH et produites selon trois séries de constantes d'équilibre: L- Lindsay (1979); N-Nordstrom et May (1988); P- Parks (1972) (Tiré de Kinraide et Parker, 1989).....	42
1.5 Courbes de distribution d'espèces d'aluminium selon le pH (tirée de Helliwell et al., 1983).....	55
1.6 Courbes représentant la concentration d'aluminium labile pouvant diminuer le taux de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> de 50%, en fonction du pH (tirée de Helliwell et al., 1983).....	57
2.1 Schéma analytique pour déterminer la spéciation de l'aluminium (voir Rogeberg et Henriksen, 1985). (aa: spectrophotométrie d'absorption atomique au four de graphite). Tiré de Campbell et al. (1989).....	83
2.2 Diagramme présentant la technique utilisée pour distinguer le métal adsorbé du métal cellulaire.....	101
3.1 Courbe de croissance typique de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> dans un milieu AAP, aéré et agité.....	113
3.2 Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> selon différents traitements.	
A: Milieu AAP tamponné avec divers tampons à 0.01 M (pH 5, 6 et 7); tampons: NaOAc; MES; PIPES.	
B: Milieu AAP-P-MT non tamponné.	
C: Milieu AAP-P-MT tamponné avec divers tampons à 0.01 M (pH 5, 5.5, 6 et 7); tampons: NaOAc; MES; PIPES.....	120

LISTE DES FIGURES

Page

3.2 (Suite) Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> selon différents traitements.	
D: Milieu AAP-P-MT tamponné avec divers tampons à 0.01 M (pH 5, 5.5, 6 et 7); tampons: NaOAc; MES; PIPES.	
E: Milieu AAP-P-MT tamponné avec divers tampons à 0.01M (5, 5.5, 6, et 7); tampons ; MES, PIPES.	
F: Milieu AAP-P-MT tamponné avec divers tampons à 0.01 M (pH 4, 4.5, 5, 5.5, 6 et 7); tampons: NaOAc; MES; PIPES.....	121
3.2 (Suite) Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> selon différents traitements.	
G: Milieu AAP-P-MT tamponné avec divers tampons à 0.01 (pH 5, 5.5, 6 et 7); tampons: MES, PIPES.	
H: Milieu AAP-P-MT tamponné avec divers tampons 0.01M (4, 4.5); tampons ; MES, DMGA.	
I: Milieu AAP-P-MT tamponné avec divers tampons 0.01 M (pH 4, 4.5); tampon: DMGA.....	122
3.3 A. Evolution du taux maximum de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à différents pH (moyenne de 3 échantillons et écart type). Les milieux sont tamponnés par des tampons à une concentration de 0.01 M. pH 4, 5, 5.5 et 6 = MES; pH 4.5= DMGA; pH 7 = HEPES (voir le tableau 3.1, les traitements 11, 12 et 13).	
B. Variation du pH après quatre jours d'incubation pour ces mêmes milieux.....	125
3.4 Variation de la biomasse finale de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> en fonction du pH (voir courbes de croissance de la figure 3.2.F).....	137
3.5 Variation du volume cellulaire selon différentes périodes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> : La distribution relative des cellules en fonction du log du volume cellulaire pour des cellules à différents pH.....	145
A.A Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> dans un milieu AAP à différents pH tamponné avec NaOAc (pH 5), MES (pH 6) et PIPES (pH 7) 0.01M. Notons que le milieu "AAP" ne contient pas de tampon.....	158

LISTE DES FIGURES

Page

A.B	Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> dans un milieu AAP ne contenant ni phosphore, ni métaux, ni tampons (Noter que le pH s'est avéré très variable).....	162
A.C	Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> dans un milieu AAP-P-MT à différents pH tamponné avec NaOAc (pH 5), MES (pH 5.5, pH 6) et PIPES (pH 7) 0.001 M	164
A.D	Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> dans un milieu AAP-P-MT à différents pH tamponné avec NaOAc (pH 5), MES (pH 5.5, pH 6) et PIPES (pH 7) 0.01M.....	166
A.E	Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> dans un milieu AAP-P-MT à différents pH tamponné avec MES (pH 5, 5.5, 6) et PIPES (pH 7) 0.01 M.....	170
A.F	Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> dans un milieu AAP-P-MT à différents pH tamponné avec de l'acétate de sodium (pH 4, 4.5), MES (pH 4, 4.5, 5, 5.5, pH 6) et PIPES (pH 7) 0.01 M.....	173
A.G	Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> dans un milieu AAP-P-MT à différents pH tamponné avec MES (pH 5, 5.5, pH 6), PIPES (pH 7) et HEPES (pH 7) 0.01M.....	175
A.H	Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> dans un milieu AAP-P-MT à différents pH tamponné avec MES (pH 4,4.5) et DMGA (pH 4, 4.5) 0.01 M.....	178
A.I	Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> dans un milieu AAP-P-MT à différents pH tamponné avec DMGA (pH 4, 4.5) 0.01 M	181
4.1	Evolution du pH des échantillons avec algues (<u>Chlorella pyrenoidosa</u>) vs les échantillons sans algues (les algues ont été tuées au préalable). Chaque point correspond à la moyenne de 3 essais avec son écart type.....	199
4.2	Relation entre $1/[HL]$ et $1/[H^+]$ pour l'expérience de titrage en lot de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> et du milieu d'exposition (où les algues avaient été tuées au préalable). Chaque point correspond à la moyenne de 3 essais avec son écart type.....	200

LISTE DES FIGURES

	Page	
4.3	Relation entre $[HL]/L_t$ et le pH pour l'expérience de titrage en lot de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> et du milieu d'exposition (où les algues avaient été tuées au préalable).....	201
4.4	Relation entre $[HL]/L_t$ et la concentration en ions H^+ pour l'expérience de titrage en lot de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> et du milieu d'exposition (où les algues avaient été tuées au préalable).....	201
4.5	Relation entre $1/[HL]$ et $1/[H^+]$ pour l'expérience de titrage à la burette de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> et du milieu d'exposition (où les algues avaient été tuées au préalable).....	206
4.6	Relation entre $[HL]/L_t$ et le pH pour l'expérience de titrage de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> et du milieu d'exposition (où les algues avaient été tuées au préalable).....	207
4.7	Relation entre $[HL]/L_t$ et la concentration en ions H^+ pour l'expérience de titrage de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> et du milieu d'exposition (où les algues avaient été tuées au préalable).....	207
4.8	Relation entre $1/[HL]$ et $1/[H^+]$ pour l'expérience de titrage à la burette de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> et du milieu d'exposition (où les algues sont vivantes)....	209
4.9	Relation entre $[HL]/L_t$ et le pH pour l'expérience de titrage de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> et du milieu d'exposition (où les algues sont vivantes).....	210
4.10	Relation entre $[HL]/L_t$ et la concentration en ions H^+ pour l'expérience de titrage de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> et du milieu d'exposition (où les algues sont vivantes).....	210
4.11	Prise en charge totale de Mn sur une période de 4 h par <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à pH 5.5 et 7.0. La concentration initiale en Mn dissous du milieu était de $1.8 \mu M$	226
4.12	Prise en charge cellulaire de Mn pendant une période de 4 h par <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à pH 5.5 et 7.0. La concentration initiale en Mn dissous du milieu était de $1.8 \mu M$	228

LISTE DES FIGURES

	Page
4.13 Adsorption de Mn pendant une période de 4 h par <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à pH 5.5 et 7.0. La concentration initiale en Mn dissous du milieu était de 1.8 μM	228
4.14 Evolution du de Mn dissous au cours de l'expérience de prise en charge cellulaire de Mn pendant une période de 4 h par <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à pH 5.5 et 7.0. La concentration initiale en Mn dissous du milieu était de 1.8 μM	229
4.15 Prise en charge du ^{14}C -sorbitol par <u>Chlorella pyrenoidosa</u> en fonction du pH. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 essais à chaque pH avec l'écart type.....	241
4.16 Prise en charge du ^{14}C -sorbitol par <u>Chlorella pyrenoidosa</u> après 15 minutes d'incubation en fonction du pH. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 essais à chaque pH avec l'écart type.....	242
5.1 Schéma du protocole expérimental utilisé pour étudier la toxicité de l'aluminium envers <u>Chlorella pyrenoidosa</u>	256
5.2 Evolution de l'aluminium monomère inorganique maximal à différents pH.....	260
5.3 Spéciation théorique de l'aluminium dans le milieu d'exposition calculée par le programme MINEQL. ($[\text{Al}] = 8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.3 \mu\text{M}$).....	263
5.4 Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à différentes concentrations d'aluminium inorganique monomère et à différents pH.....	265
5.5 Graphique du pourcentage de l'aire sous la courbe de croissance du témoin en fonction de la concentration en aluminium monomère inorganique.....	270
5.6 Graphique du pourcentage de l'aire sous la courbe de croissance du témoin en fonction de la concentration en aluminium monomère inorganique.....	274

LISTE DES FIGURES

	Page	
5.7	<p>CI₃₀ exprimée en Al monomère inorganique pour <u>Chlorella pyrenoidosa</u> en fonction du pH. (---: CI₃₀ pour Al⁺³ calculé et: CI₅₀ pour Al⁺³ calculé à partir des données de Helliwell et al. (1983) et repris en mortaise).....</p>	276
5.8	<p>Concentration en Al labile provoquant une diminution de 50% du taux de croissance (μg·L⁻¹) (Tiré de Helliwell et al., 1983).....</p>	278
5.9	<p>A- Pourcentage de différentes formes d'aluminium monomère inorganique en fonction du pH. B- Concentration en Al⁺³ susceptible de provoquer une diminution de croissance de 30% de <u>Chlorella pyrenoidosa</u>. C- Régression linéaire de -log CI₃₀ (exprimée en Al⁺³) en fonction du pH. D- Concentration en L⁻ à la surface cellulaire en fonction du pH.....</p>	284
5.10	<p>Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à différentes concentrations d'aluminium inorganique monomère et polymère et à différents pH.....</p>	290
5.11	<p>Pourcentage de l'aire sous la courbe du témoin en fonction de l'aluminium polymère nominale.....</p>	292
5.12	<p>Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à différentes concentrations d'aluminium inorganique et organique monomère à pH 5.0.....</p>	310
5.13	<p>Courbes de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à différentes concentrations d'aluminium inorganique et organique monomère à pH 5.0.....</p>	311
5.14	<p>Moyenne (et écart type, n=3) de l'aire sous la courbe de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> pour différents traitements.....</p>	312

LISTE DES FIGURES

Page

5.15 Aire sous la courbe de croissance en fonction de la concentration en acide fulvique associé avec Al (0) et où $Al_{cv-cvr} = 150 \mu g \cdot L^{-1}$. Les points noirs (0) représentent l'aire sous la courbe dans les milieux ne contenant pas d'aluminium..... 314

6.1 Bioaccumulation totale par Chlorella pyrenoidosa d'Al après 4 jours de contact avec différentes concentrations totales en aluminium comprenant des formes monomères uniquement (pH 4.3, 4.6, 5.0) et des formes monomères et polymères (pH 4.8, 5.2, 5.5, 6.0). Les coefficients de corrélation ont été calculés pour chacun des pH..... 335

6.2 Bioaccumulation totale d'Al monomère par Chlorella pyrenoidosa après 4 jours de contact. (Moyennes et écart type pour chacune des concentrations nominales en Al_{cv-cvr} pour différents pH: pH 4.3 (0, 25, 50, 100, 150 $\mu g \cdot L^{-1}$), pH 4.6 (0, 100, 150, 200, 400 $\mu g \cdot L^{-1}$), pH 4.8 (0, 200, 400 $\mu g \cdot L^{-1}$), pH 5.0 (0, 25, 50, 100, 150 $\mu g \cdot L^{-1}$), pH 5.2 (0, 100 $\mu g \cdot L^{-1}$), pH 5.5 (0, 8, 15, 25, 30, 35 $\mu g \cdot L^{-1}$), pH 6.0 (0, 8 $\mu g \cdot L^{-1}$)..... 340

6.3 Evolution de la bioaccumulation de Al_{cv-cvr} maximal pour chacun des pH. (Moyennes et écart type de trois essais simultanés; Al total: concentration totale en Al chez les algues; Al cellulaire: Al non extractible à l'EDTA; Al adsorbé = Al total - Al cellulaire)..... 341

6.4 Bioaccumulation totale d'Al polymère par Chlorella pyrenoidosa après 4 jours de contact. (Moyennes pour chacune des concentrations nominales en $Al_{polymère}$ pour différents pH)..... 360

6.5 Courbes de prise en charge de l'aluminium polymère par Chlorella pyrenoidosa. (Moyennes et écart type pour chacune des concentrations maximales en $Al_{polymère}$ testées pour différents pH)..... 361

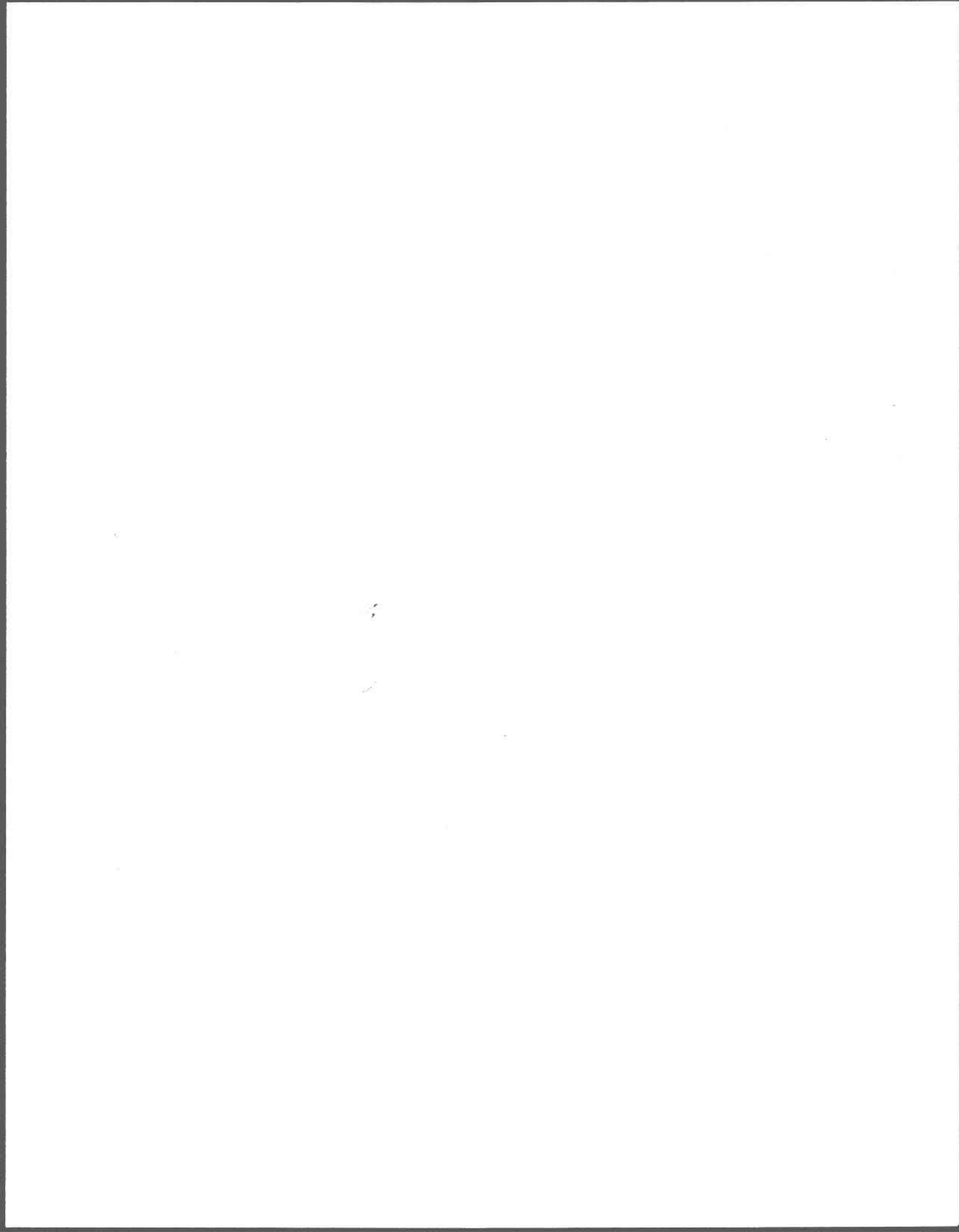
6.6 Evolution de la bioaccumulation de Al_{cv-cvr} ($150 \mu g \cdot L^{-1}$) et Al_{cvr} ($350 \mu g \cdot L^{-1}$) à pH 5.0. (Moyennes et écart type de trois essais simultanés; Al total: concentration totale en Al chez les algues; Al cellulaire: Al non extractible à l'EDTA; Al ads.= Al total - Al cellulaire)..... 364

LISTE DES FIGURES

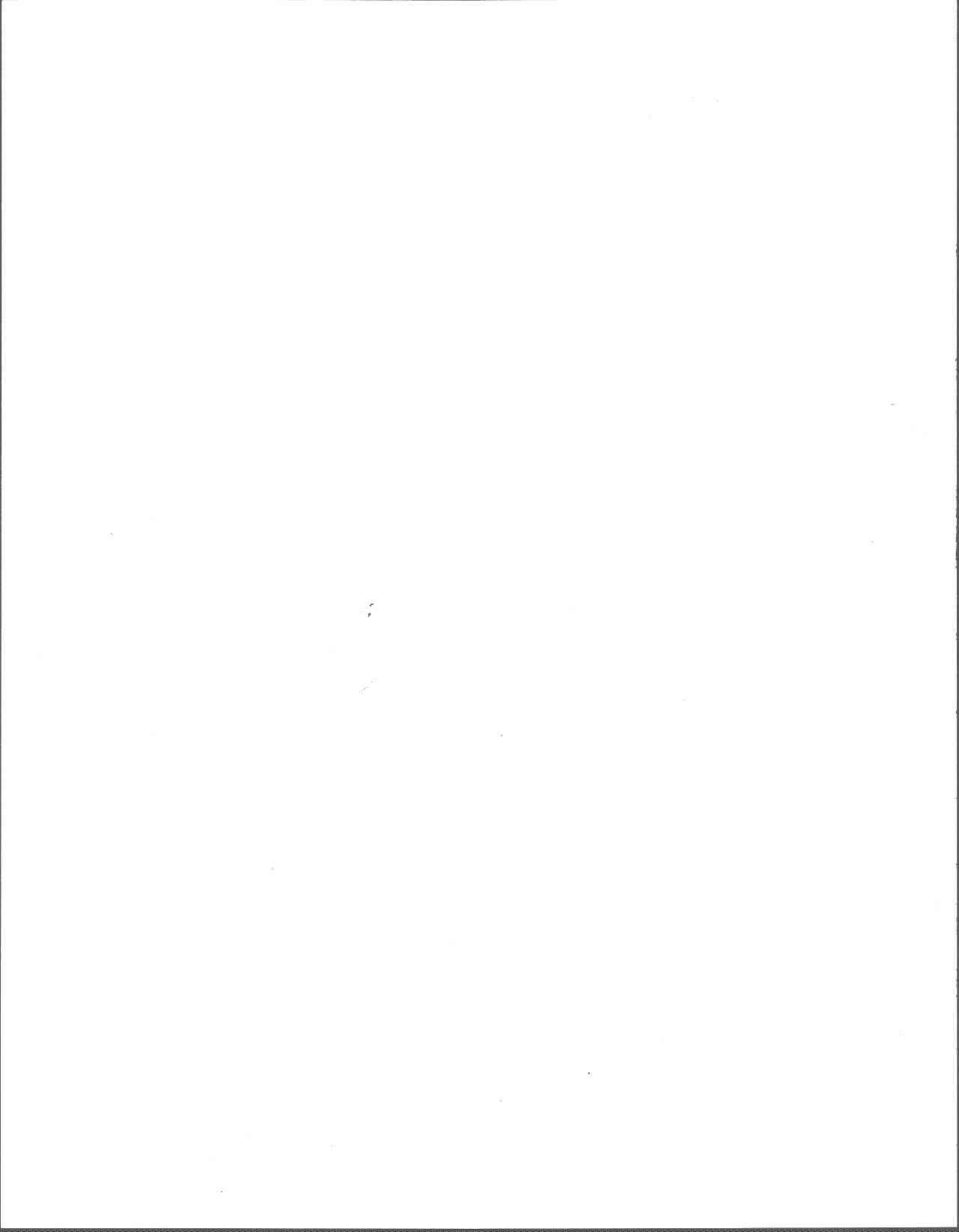
	Page
6.7 Evolution de la bioaccumulation de Al_{cv-cvr} ($150 \mu g \cdot L^{-1}$) et Al_{cyr} ($350 \mu g \cdot L^{-1}$) à pH 5.0. (Moyennes et écart type de trois essais simultanés; Al total: concentration totale en Al chez les algues; Al cellulaire: Al non extractible à l'EDTA; Al ads.= Al total - Al cellulaire).....	365
6.8 Flux cellulaire (t = 0--> 4h) de Al mesuré à différents pH en fonction de la concentration nominale initiale en Al_{cv-cvr} dans les milieux d'exposition.....	372
6.9 Flux cellulaire (t=0---> 4h) de Al mesuré à différents pH en fonction de la concentration nominale initiale en Al^{+3} dans les milieux d'exposition.....	373
6.10 Relation entre le logarithme naturel de la constante de prise en charge de Al^{+3} et le pH, où $k' = \frac{\text{flux cellulaire}}{[Al^{+3}][L]}$..	376
6.11 Pourcentage de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> en relation avec la prise en charge d'aluminium pour chacun des pH testés.....	384
6.12 Taux maximal de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> en fonction de la concentration en Al_{cv-cvr} et selon le pH (% par rapport aux cultures témoins).....	392
6.13 Densité cellulaire de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> au temps= 4 jours, en fonction de la concentration en Al_{cv-cvr} et selon le pH (% par rapport aux cultures témoins).....	393
6.14 Phosphore cellulaire de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> au temps= 4 jours, en fonction de la concentration en Al_{cv-cvr} et selon le pH (% par rapport aux cultures témoins).....	395
6.15 Taux maximal de croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> en fonction de la concentration en Al_{poly} et selon le pH (% par rapport aux cultures témoins Al_{cv-cvr} max).....	398
6.16 Phosphore cellulaire de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> au temps= 4 jours, en fonction de la concentration en Al_{poly} et selon le pH (% par rapport aux cultures témoins Al_{cv-cvr} max).....	399
6.17 Effet de l'aluminium sur la perméabilité membranaire de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à l'hexitol. (pH 4.3*, $500 \mu g \cdot L^{-1}$).....	409

LISTE DES FIGURES

	Page
6.18 Effet de l'aluminium sur la perméabilité membranaire de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à l'hexitol. (pH 5.0*, 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	410
6.19 Effet de l'aluminium sur la perméabilité membranaire de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à l'hexitol. (pH 6.0*, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	411
6.20 Effet de l'aluminium inorganique et organique sur la perméabilité membranaire de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> à l'hexitol au pH 5.0. (ac.f.= acide fulvique; Al_i = Aluminium inorganique; Al_o = Aluminium organique)....	412
6.b Effet du temps de contact avec 10^{-3} M EDTA sur la concentration de Al extrait de la surface cellulaire (■) de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> et ce qui reste de Al après cette extraction (Al cellulaire) (○); incubation des cellules avec $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Al monomère inorganique à pH 5.0 dans le milieu expérimental pour une période de 30 minutes; concentration cellulaire initiale = $5\cdot 10^4$ cellules $\cdot\text{mL}^{-1}$	428

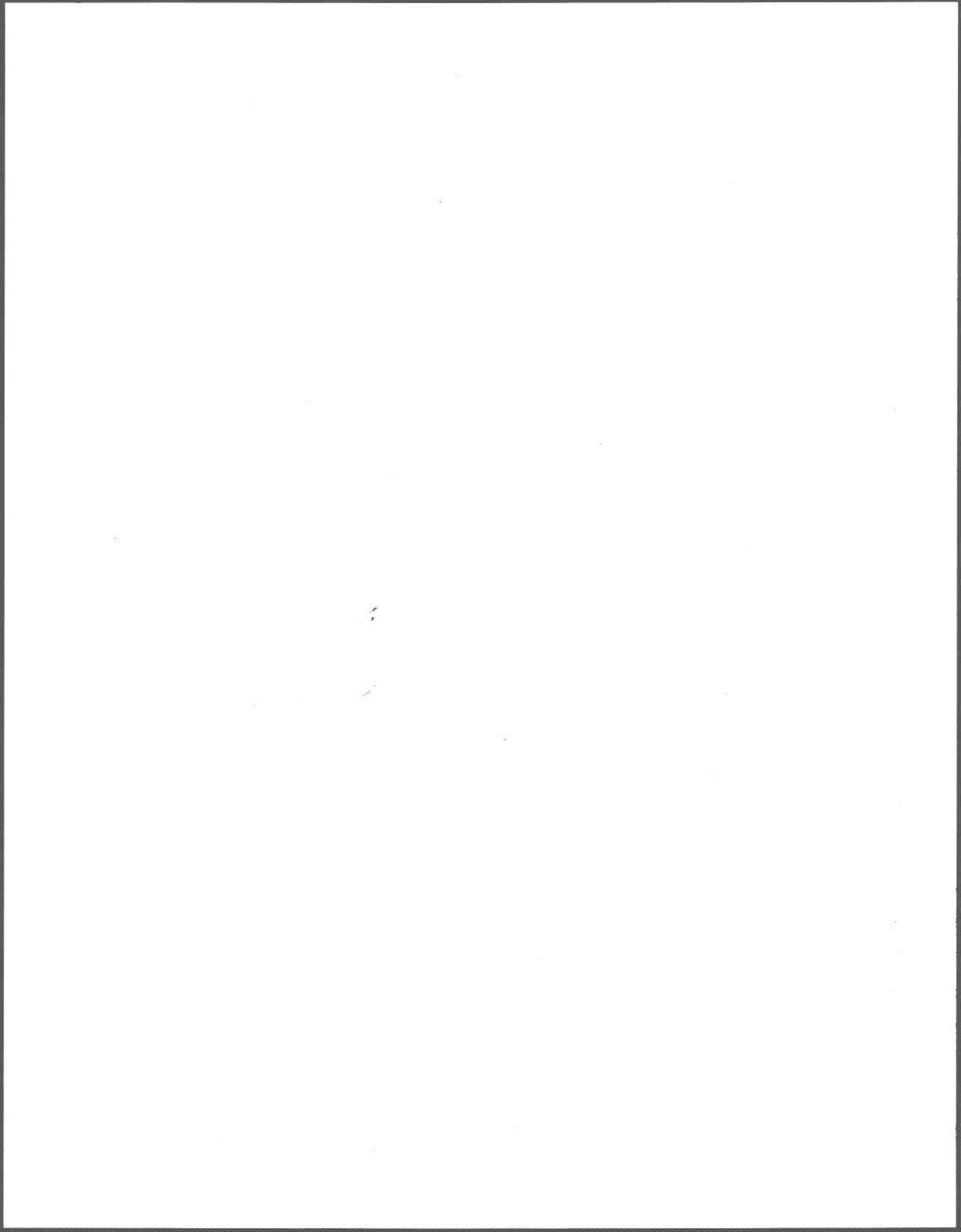


CHAPITRE 1 : INTRODUCTION ET PROBLÉMATIQUE



CHAPITRE 1: INTRODUCTION ET PROBLÉMATIQUE

	Page
1.1 Introduction générale et objectifs.....	3
1.2 Problématique spécifique.....	6
1.2.1 Interaction M^{2+} /organisme: "modèle d'ion libre"....	6
1.2.2 Interaction H^+/M^{2+} /organisme.....	11
1.2.2.1 Prise en charge des métaux vs pH.....	16
1.2.2.2 Toxicité des métaux vs pH.....	21
1.3 État des connaissances.....	22
1.3.1 Géochimie de l'aluminium.....	23
1.3.2 Toxicité de l'aluminium.....	29
1.3.2.1 Revue des effets toxiques attribués à l'aluminium chez les plantes.....	30
1.3.2.2 Facteurs influençant la toxicité de l'aluminium.....	37
1.4 Concept et démarche expérimentale.....	48
1.4.1 Le modèle d'ion libre et son application au cas de l'aluminium.....	48
1.4.2 Examen détaillé et approfondi des cas d'exception apparents (algues).....	52
1.5 Références.....	61



CHAPITRE 1: INTRODUCTION ET PROBLÉMATIQUE

1.1 Introduction générale et objectifs

Depuis une quinzaine d'années, on a noté un intérêt marqué vis-à-vis les effets possibles de l'acidification sur les biota en général, et plus spécifiquement sur les écosystèmes aquatiques (Almer et al., 1978; NRCC, 1981; Campbell et Stokes, 1985; Dupont et Grimard, 1989). De plus, une attention particulière fut consacrée aux métaux traces, étant donné la mobilisation géochimique de certains métaux qui se produit en même temps que l'acidification des eaux de surface. En effet, une augmentation marquée des concentrations en manganèse, en aluminium et en zinc a été observée dans les eaux lacustres en fonction d'une diminution du pH (Dickson, 1978; Cronan et Schofield, 1979; Driscoll et al., 1980; Johannessen et al., 1980; Schindler et al., 1980; NRCC, 1981; Lachance et al., 1983; Nelson et Campbell, 1991).

Parallèlement à ces observations, on a démontré à partir d'expériences exécutées sur plusieurs organismes (algues, bactéries, benthos et poissons) que la toxicité d'un métal donné n'était pas corrélée à la concentration totale du métal en question mais plutôt à la concentration des ions métalliques libres, $M^{+z}(H_2O)_n$, laquelle est fonction de la nature et de la concentration des ligands présents dans le milieu (Borgmann, 1983; Morel, 1983).

La problématique qui relie les métaux aux précipitations acides, ou tout simplement à l'acidification du milieu, est que l'abaissement du pH provoque une dissociation des complexes que forment les métaux et les ligands organiques et inorganiques, menant conséquemment à une augmentation des concentrations en ions métalliques libres (Campbell et Stokes, 1985). Par ce phénomène, on a alors associé la toxicité d'un métal donné au degré d'acidité du milieu. On a avancé qu'un métal serait plus toxique en milieu acide qu'en milieu neutre. On a supporté cette idée par la faible richesse, la faible productivité et la faible croissance du biotope en eau acide. Par exemple, plusieurs études ont expliqué la faible diversité du phytoplancton observée dans les lacs acides comme étant une conséquence de l'acidification des eaux de surface (Grahn et al., 1974; Kwiatkowski et Roff, 1976; Almer et al., 1978; NRCC, 1981; Stokes, 1986). Les raisons pouvant expliquer une telle pauvreté d'espèces, dans ce cas, sont l'augmentation de l'acidité par elle-même (Gensemer et Kilham, 1984), la diminution de la disponibilité du phosphore par précipitation de $AlPO_4(s)$ (Hendrey et Wright, 1976; Hornstrom et al., 1984; Nalewajko et Paul, 1985) et la toxicité ou la limitation des métaux traces (Peterson et al., 1984; Campbell et Stokes, 1985; Peterson et Healy, 1985; Schenck et al., 1988).

Malheureusement, le seul argument qui nous a permis de supposer qu'un milieu acide signifie une plus grande toxicité de la part des métaux repose presque uniquement sur les effets anticipés

d'une telle baisse de pH sur la spéciation du métal (forme libre). En effet, très peu d'expériences ont été effectuées afin de vérifier directement cette hypothèse. Il s'avère alors justifié de poursuivre de telles expériences et plus précisément d'étudier les mécanismes d'interaction ions hydrogène/organismes/métaux.

Le but général de ce programme de recherche s'attaque à cette hypothèse; il consiste à étudier la relation entre la spéciation de l'aluminium, déterminée de façon expérimentale et à partir de calculs thermodynamiques, à sa biodisponibilité en utilisant une algue unicellulaire (Chlorella pyrenoidosa) en milieu de culture défini. De façon plus spécifique, ce programme permet:

1 - de vérifier la capacité du modèle d'ion libre pour expliquer la bioaccumulation et la toxicité de l'aluminium;

2 - de tester l'amélioration possible du modèle, en évaluant la part des formes d'aluminium monomère, polymère et organique à l'origine de la toxicité, en ajoutant le concept de compétition H^+/Al^{+3} au niveau de la membrane;

3 - d'évaluer la capacité du modèle révisé pour prédire la biodisponibilité de l'aluminium dans les eaux naturelles, notamment en présence de matière organique dissoute de faible poids moléculaire.

L'approche expérimentale implique des mesures parallèles de spéciation d'aluminium et de biodisponibilité d'aluminium (bioaccumulation/toxicité) dans des solutions synthétiques de composition connue (variables: $[Al]_T$, pH).

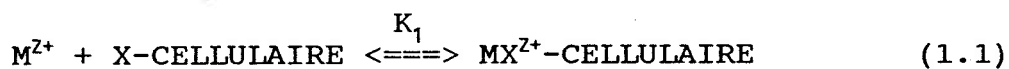
En éclaircissant nos connaissances sur la relation existant entre la spéciation de l'aluminium et sa biodisponibilité, les résultats de cette recherche devraient contribuer à une meilleure compréhension des interactions métal/organisme, et devraient de cette façon aider à une meilleure évaluation de l'impact environnemental des précipitations acides.

1.2 Problématique spécifique

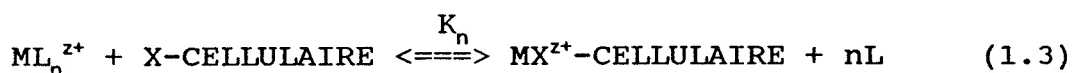
1.2.1 Interaction M^{2+} /organisme: "modèle d'ion libre"

Depuis environ une dizaine d'années, des travaux en laboratoire sur des organismes tests (algues, bactéries, macro-benthos, poissons) ont permis de cumuler entre autre chose des résultats expérimentaux concernant le lien entre la spéciation des métaux traces et leur toxicité. Ces observations ont conduit à l'élaboration de modèles simples portant sur l'interaction des métaux avec des organismes vivants (Morel, 1983; Morel et Morel-Laurens, 1983; Pagenkopf, 1983).

Pour qu'il y ait réponse biologique d'un organisme à un métal, ou pour que ce métal s'accumule dans l'organisme, il faut évidemment que le métal donné rentre en contact avec la membrane biologique ou bien qu'il traverse celle-ci: il y a donc interaction entre le métal et la membrane appelée ici "surface cellulaire". Cette interaction du métal avec la surface cellulaire, impliquant les espèces réactives M^{2+} et ML_n^{2+} , peut être exprimée en termes de formation de complexe: M-X-surface cellulaire (Nelson et al., 1981; Petersen, 1982; Morel et Morel-Laurens, 1983; Sunda et Huntsman, 1983) où X-surface cellulaire correspond à un ligand cellulaire se trouvant à la surface de la cellule. Il peut être le site sensible lui-même ou un site transporteur qui permettrait au métal d'atteindre une cible intracellulaire. Cette approche (Morel, 1983) ne tient pas compte de la formation possible de complexes mixtes à la surface biologique.



$$[MX^{2+}\text{-CELLULAIRE}] = K_1 [X\text{-CELLULAIRE}] [M^{2+}] \quad (1.2)$$



Dans ce dernier cas (1.3), en conditions d'équilibre, la concentration de métal lié à la cellule peut être exprimée comme:

$$[MX^{2+}\text{-cellulaire}] = K_n \frac{[X\text{-cellulaire}] [ML_n^{2+}]}{[L]^n} \quad (1.4)$$

On peut à ce moment transformer l'équation 1.5:



pour l'équation 1.6:

$$\frac{[ML_n]}{[L]^n} = K'_n [M^{2+}] \quad (1.6)$$

En transposant l'équation 1.6 dans 1.4, on a :

$$[MX^{2+}\text{-cellulaire}] = K_n \cdot K'_n [X\text{-cellulaire}] [M^{2+}] \quad (1.7)$$

Cette dernière équation met en évidence la même dépendance de $[MX^{2+}\text{-cellulaire}]$ sur M^{2+} que celle de l'équation 1.2. Dans les deux cas, la réponse biologique devrait être fonction de la concentration du complexe $[M\text{-}X\text{-cellulaire}]$, laquelle dépend de la concentration en M^{2+} .

Le mécanisme menant à un effet biologique devrait alors impliquer la liaison de M^{2+} à un site métaboliquement actif sur la surface cellulaire, ce qui résulterait en une réponse biologique directe (Pagenkopf, 1983). De façon alternative, la liaison de M^{2+} à la surface cellulaire pourrait tout simplement précéder son transport dans la cellule, où la réaction avec un centre métaboliquement actif ne se ferait alors que dans la cellule, soit de façon intracellulaire (Harrison et Morel, 1983; Sunda et Huntsman, 1983).

La plupart des résultats appuyant ce "modèle d'ion libre" proviennent d'expériences au laboratoire où la concentration de M^{2+} était contrôlée à l'aide d'un ligand synthétique (EDTA, TRIS) (ex: Cu^{2+} : Anderson et Morel, 1978). Par ailleurs, il existe un certain nombre de résultats avec de tels ligands qui ne s'accordent pas avec ce modèle où, à une concentration égale de M^{2+} , la toxicité observée est plus élevée en présence du ligand qu'en son absence (Guy et Kean, 1980; Florence et al., 1983). Ce genre de résultats laisse supposer que dans certains cas la forme M-L puisse être directement disponible, c'est-à-dire que la membrane cellulaire soit perméable aux complexes (ex: ML^0 , neutre, lipophile; ML^+ , où L serait un métabolite de poids moléculaire faible tel un acide aminé ou un acide polycarboxylique), ou que le ligand serve de transporteur jusqu'à la surface membranaire où le métal qui y est associé est libéré. Dans ce dernier cas, le transport à travers la membrane serait plus rapide que le transport dans la solution près de la surface membranaire, c'est-à-dire, que le modèle serait de type cinétique plutôt qu'un d'équilibre.

Par ailleurs, il existe aussi dans la littérature scientifique de nombreuses expériences, où est utilisé un ligand non pas synthétique mais plutôt naturel (c'est-à-dire de la matière organique dissoute naturelle, des acides fulviques ou humiques). Dans ces expériences on a généralement observé une réduction de la toxicité du métal étudié : phytoplancton (Prakash et Rashid, 1968); bactéries (Gunn et al., 1986); poissons (Brown et al., 1974). La

disponibilité des métaux traces est aussi dépendante de la taille de la fraction organique avec laquelle le métal est associé (Giesy et al., 1977). La presque totalité des études portant sur l'influence des ligands organiques naturels sur la toxicité des métaux est cependant restée à ce niveau qualitatif. L'étude de Sunda et Lewis (1978) représente une exception notable à cette règle. Ils ont réussi à démontrer que l'inhibition de la croissance d'une algue par le cuivre, en présence de concentrations variables de carbone organique dissous, était proportionnelle aux concentrations de Cu^{2+} , tout comme on l'aurait anticipé pour un ligand synthétique tel que l'EDTA. Toutefois, dans quelques cas où la matière organique dissoute a été fractionnée selon ses dimensions physiques (poids moléculaire), on a observé une toxicité accrue en présence de la fraction plus petite de matière organique dissous, c'est à dire qu'à concentration de métal égale, la toxicité était plus élevée en présence de cette fraction (Giesy et al., 1977; 1983).

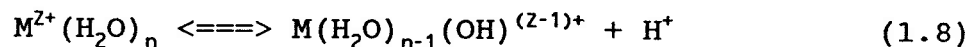
1.2.2 INTERACTIONS H⁺/M^{Z+}/ORGANISMES

Principes

Les modèles simples portant sur l'interaction des métaux avec des organismes vivants permettent de prendre en considération deux facteurs, soit l'influence du pH sur la spéciation d'un métal en solution et l'influence du pH sur les interactions métal-surface à l'interface organisme-milieu (Campbell et Stokes, 1985).

Influence du pH sur la spéciation d'un métal en solution

Pour une même concentration constante de métal dissous, des changements de pH peuvent faire varier la spéciation du métal de deux façons: soit en déplaçant vers la gauche l'équilibre d'hydrolyse, favorisant ainsi la formation d'aquo-ions,



ou en provoquant un changement de l'équilibre de complexation par compétition entre le métal ionisé (M^{Z+}) et l'ion hydrogène (H⁺) pour le même ligand (ou site cellulaire).





Dans ces équations, M^{z+} désigne un cation métallique portant une charge $+Z$ et L représente le ligand (pour des fins de simplicité, on ne montre pas de charge nette sur le ligand L).

Effet du pH sur les interactions métaux/organismes

Il est difficile de comparer les résultats et les expériences qui ont porté sur les interactions H^+ /métaux/organismes, et ce, pour plusieurs raisons. La première est que les critères expérimentaux considérés comme "importants" ont changé depuis 20 ans. En effet, avant les années 1970, les effets de variations de pH sur les organismes aquatiques en présence ou non de métaux traces étaient généralement interprétés en terme de réponses physiologiques de l'organisme, en négligeant plus ou moins les variations chimiques induites par le pH dans le milieu externe. Depuis quelques années, l'orientation des recherches s'est retournée complètement en direction opposée, et les effets des changements de pH tendent maintenant à être interprétés uniquement en termes de variations de la spéciation du métal en question dans le milieu externe.

Comme on l'a mentionné, une diminution de pH peut affecter à la fois la spéciation du métal en solution et la sensibilité biologique au niveau de la surface cellulaire. Ces deux réponses

à l'acidification sont antagonistes et ont le potentiel de s'annuler l'une l'autre: la réponse globale d'un organisme face à des changements de pH de 7 à 4 ainsi qu'à une concentration totale constante d'un métal toxique, peut alors s'avérer positive, négative ou nulle. Les explications données pour les interactions antagonistes entre les aquo-ions et les ions hydrogène sont:

. compétition H^+/M^{2+} pour des sites de liaison

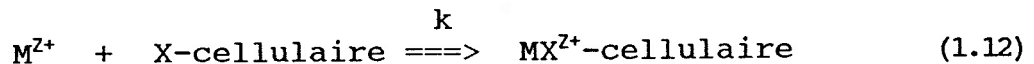
Il existe sur les surfaces cellulaires plusieurs groupes fonctionnels ayant le potentiel de se lier avec un métal (Beveridge et Murray, 1980; Doyle et al., 1980; Crist et al., 1981; Nelson et al., 1981; Gonçalves et al., 1987). Ces liaisons peuvent impliquer des groupes fonctionnels individuels, ou une action d'ensemble impliquant plus de deux groupes fonctionnels, c'est-à-dire la chélation. Il ne faut pas perdre de vue qu'il existe pour ces sites de liaison un potentiel à lier des cations autres que métalliques (M^{2+}), comme les ions hydrogène, H^+ , par exemple. Selon les valeurs de pK des groupes fonctionnels impliqués, des changements de pH pourraient alors affecter le degré de protonation de ces sites de liaison:



Dans un tel cas, le proton jouerait un rôle protecteur analogue à celui que jouent les cations durs (Ca^{2+} , Mg^{2+}) (Borgmann, 1983;

Pagenkopf, 1983), réduisant ainsi la bio-disponibilité des sites de liaison pour les métaux toxiques. On peut aussi ajouter que les ions hydrogène jouant un rôle compétiteur pour les sites de liaison peuvent avoir un rôle d'inhibition selon que le métal ou son ligand est utilisé comme élément nutritif. Dans le cas où la prise en charge biologique de l'ion métallique se produit par transport facilité, par exemple lorsque la perméabilité de la membrane lipidique au métal sous forme ionique est faible, les ions hydrogène peuvent compétitionner directement avec l'ion métallique pour ces sites de transport.

Les ions hydrogène peuvent jouer de tels rôles si on considère qu'il existe un état d'équilibre entre le métal présent dans la solution et le métal lié à la surface de la cellule. Si la réaction de M^{2+} à la surface cellulaire n'est pas réversible, c'est-à-dire, si la liaison de M^{2+} provoque une réponse biologique instantanée et irrévocable, alors la protection que procure l'ion hydrogène (ou Ca^{2+} ou Mg^{2+}) ne serait que transitoire. En effet, une augmentation de la concentration des ions H^+ devrait diminuer la proportion des sites de liaison ne portant pas de protons, X-surface cellulaire, et réduirait ainsi le taux de formation des complexes biologiques pertinents M-X-cellulaire:



Une diminution de pH devrait alors retarder la réponse biologique.

. changements allostériques

Par ailleurs, puisqu'une variation de pH peut aussi induire des changements allostériques dans la conformation des sites de liaison de métal, elle peut conséquemment altérer l'affinité de ces sites (pK_1) pour le métal toxique d'intérêt.

. potentiel membranaire à la surface cellulaire

Considérant l'importance pour les métaux de passer passivement à travers la membrane cellulaire, des changements de pH peuvent affecter le potentiel membranaire qui peut alors affecter la répartition du métal entre la surface cellulaire et la solution (McLaughlin, 1977). Plus le potentiel est négatif, plus cette répartition favorisera la surface cellulaire; les concentrations effectives du métal dans la zone proche de la membrane seront plus élevées.

. potentiel transmembranaire

De façon à maintenir une charge négative sur la partie intérieure de la membrane, les protons peuvent être "pompés" vers l'extérieur de la cellule (Raven, 1980). Plus le pH est bas, plus la tendance des ions H^+ à entrer dans la cellule sera grande, et la pompe à proton agira de façon à maintenir la charge interne

différentielle. Eventuellement, il y aura dépolarisation de la membrane, reliée à la diminution du pH, ayant des effets conséquents sur le potentiel transmembranaire et sur la prise en charge des ions métalliques.

Tous ces mécanismes peuvent aider à comprendre les résultats de l'influence du pH sur la prise en charge du métal.

1.2.2.1 Prise en charge des métaux vs pH

Il existe beaucoup plus d'informations traitant de l'influence qu'exerce des variations de pH sur l'adsorption de métaux à des surfaces abiotiques (oxydes de métal, oxyhydroxydes-Stumm et Morgan, 1981; Anderson et Rubin, 1981- ainsi que le matériel humique-Kerndorff et Schnitzer, 1980) qu'il en existe en ce qui concerne les surfaces biologiques.

Afin de pouvoir vérifier sans ambiguïté s'il y a compétition entre H^+ et M^{Z+} à l'interface cellule/milieu, il faut que le protocole expérimental réponde à certains critères (Campbell et Stokes, 1985):

1- la spéciation du métal en solution doit changer peu avec le pH (Ag, Cd, Co, Mn, Ni et Zn), afin que toute variation d'adsorption

ou d'assimilation soit imputable à des processus se produisant à l'interface cellule/milieu;

2- le milieu d'incubation inorganique doit être bien défini, ou sinon, un milieu organique défini ne contenant que des tampons faiblement complexant (pour minimiser les changements de spéciation dans la solution quand le pH est modifié);

3- les concentrations de métal doivent être compatibles avec celles observées en milieu naturel;

4- les incubations, en présence du métal étudié, doivent être de courte durée afin de minimiser la présence d'exudats dans le milieu, afin d'empêcher des variations de pH dues à la croissance des algues, et afin d'éviter que l'inhibition de croissance soit attribuable à des carences en éléments nutritifs (ex.: phosphore) plutôt qu'à l'effet du métal lui-même.

Les résultats publiés dans la littérature montrent que lors d'une diminution de pH de 7 à 4, pour le Cd, le Mn, et le Zn, on observe une compétition évidente entre l'ion H^+ et l'aquo-ion (M^{+2}) pour les sites de liaison de la surface cellulaire des algues ou des bactéries (Sakaguchi et al., 1979, Doyle et al., 1980; Crist et al., 1981; Bates et al., 1982; Stary et al., 1983; Lee et Walker, 1984; Harrison et al., 1986, Parent et al., 1987, Schenck et al., 1988). Par exemple, ces derniers chercheurs ont étudié l'effet des

variations de pH (7-->5) sur l'assimilation du fer et du manganèse par le phytoplancton, utilisant Chlamydomonas variabilis comme organisme indicateur, et ont mesuré l'assimilation à court terme sous des conditions chimiques contrôlées.

Ils ont mesuré la concentration de métal total pris en charge par l'algue. Des extractions sélectives avec EDTA ont permis d'évaluer la concentration de métal cellulaire ($\text{mole} \cdot \text{cm}^{-2}$), soit la concentration de métal non extractible à l'EDTA. La concentration du métal extractible ou associé à la surface cellulaire était calculée par la différence entre la concentration totale et la concentration cellulaire en métal.

Les courbes typiques de prise en charge de manganèse en fonction du temps sont présentées aux figures 1.1 et 1.2. On associe la première étape de la courbe (rapide) à la liaison du métal à la surface cellulaire tandis que la phase lente serait due au transport à travers la membrane. On observe à la figure 1.1 que la prise en charge totale en manganèse varie selon le pH de la même façon que la prise en charge du manganèse intracellulaire (figure 1.2), quoique cette dernière semble continue c'est-à-dire qu'elle augmente linéairement avec le temps et n'atteint pas de plateau après 4 heures. Au contraire, pour ce qui est de l'adsorption du manganèse à la surface cellulaire, elle ne dépend pas du pH et atteint rapidement un plateau.

Les auteurs suggèrent qu'une diminution de prise en charge de métal à bas pH pourrait signifier une diminution de la toxicité du métal, ou encore, dans le cas d'un métal essentiel au métabolisme, une diminution de sa disponibilité comme oligoélément nutritif.

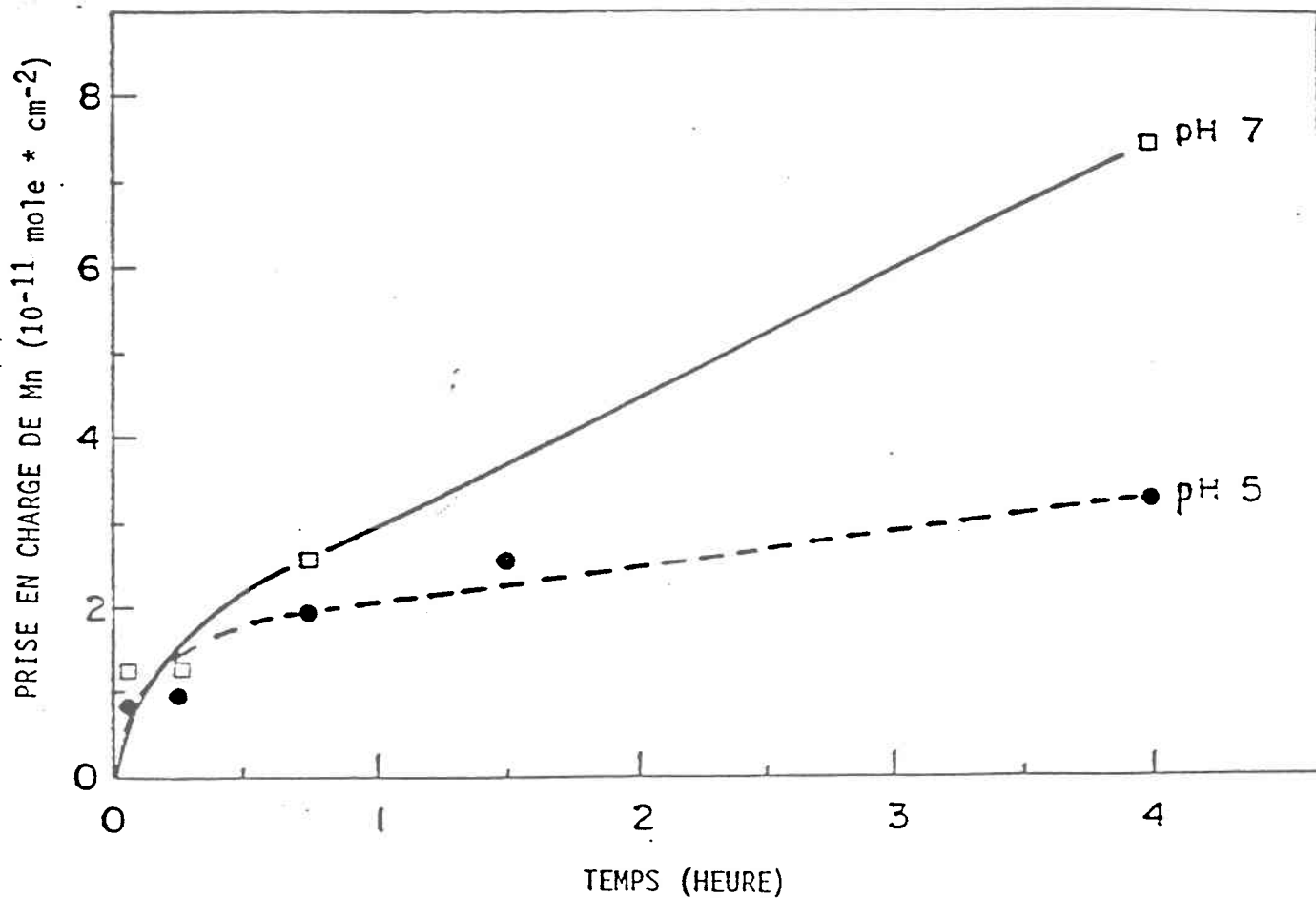


Figure 1.1: Courbes typiques de prise en charge du manganèse par *Chlamydomonas variabilis* (tirée de Schenck et al., 1988).

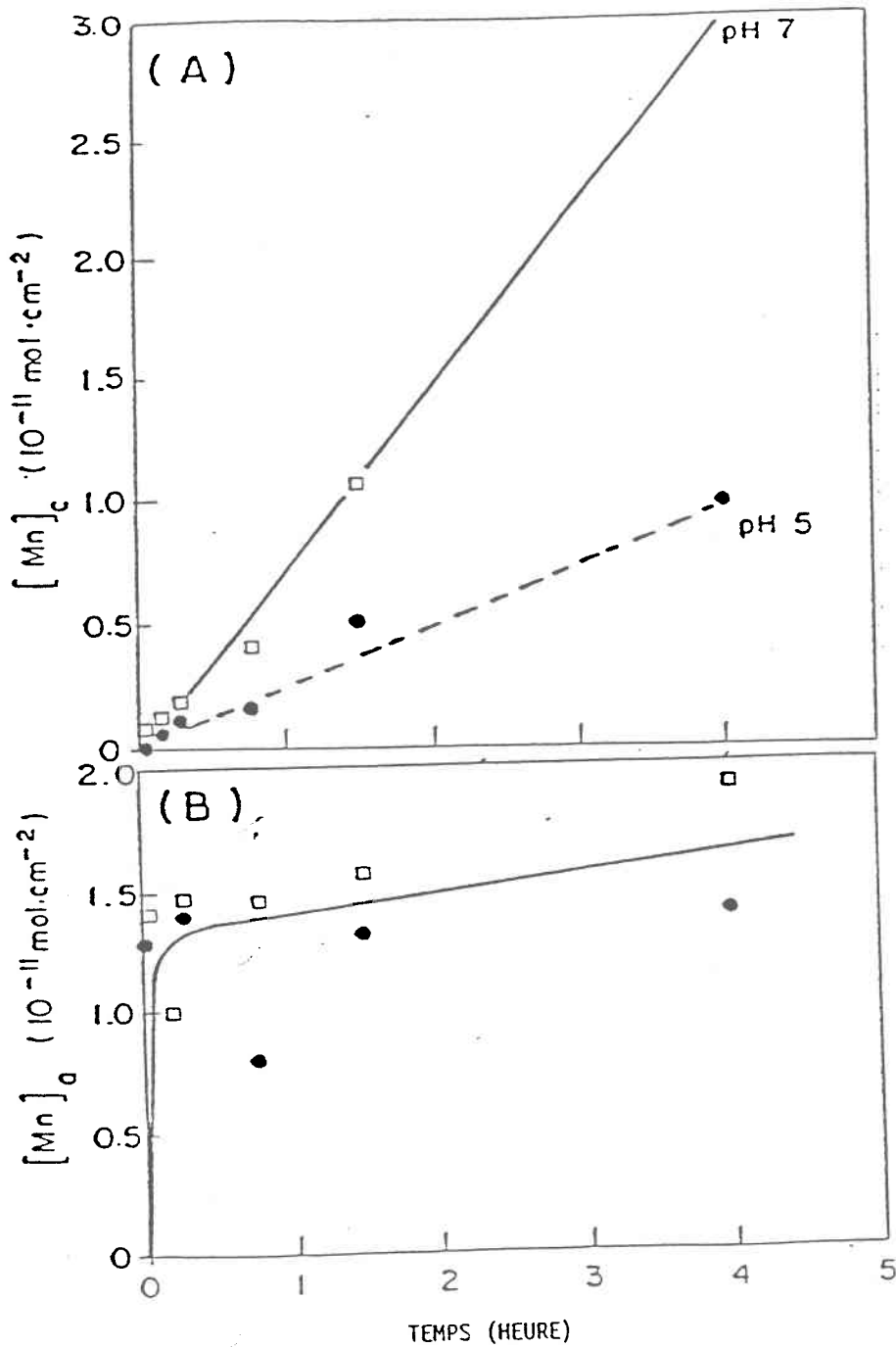


Figure 1.2: Concentration cellulaire en manganèse (A) et concentration de manganèse adsorbé (B) en fonction du temps (tirée de Schenck et al., 1988). Symboles: ● = pH 5; □ = pH 7.

1.2.2.2 Toxicité des métaux vs pH

Ce qu'on retrouve dans la littérature au sujet de la toxicité des métaux en relation avec le pH est également difficile à interpréter en terme d'effets respectifs du pH sur la spéciation chimique du métal dans l'environnement et sur la toxicité même du métal pour l'organisme.

Dans le premier type d'étude, menée en milieu naturel, où il existe une corrélation entre le pH et la concentration totale de métaux comme l'aluminium, le manganèse et le zinc dans les eaux de surface (Wright et Snekvic, 1978; Dickson, 1980; Bailey et Stokes, 1984), on peut supposer que les organismes qui tolèrent les faibles pH tolèrent aussi les concentrations élevées de métaux dans leur environnement (Campbell et Stokes, 1985). A cause de l'absence de détermination détaillée de spéciation de métal dans ces situations, les effets respectifs de la variation de la concentration en H^+ et de la variation de la concentration en métaux ne peuvent être séparés.

Le deuxième type d'étude portant sur les effets du pH sur la toxicité d'un métal implique des manipulations expérimentales de pH et de métaux en laboratoire et quelques fois sur le terrain (enclos). Cependant ces études font aussi face à certaines lacunes soit: un manque d'information sur l'environnement chimique, une culture d'algue dans un milieu non défini pour assurer une

meilleure croissance mais qui change souvent, et pour les organismes hétérotrophes, l'apport d'éléments nutritifs organiques pouvant faire changer la spéciation du métal en solution (Campbell et Stokes, 1985). En général on a tout de même observé une diminution de la toxicité du zinc, du cuivre et du cadmium avec une diminution de pH (Steemann Nielsen et al., 1969; Steemann Nielsen et Kamp-Nielsen, 1970; Hargreaves et Whitton, 1976; Mierle et Stokes, 1976; Harding et Whitton, 1977; Rai et al., 1981; Shehata et Whitton, 1982; Babich et Stotsky, 1983; Chang et al., 1983; Bradley, 1984; Peterson et al., 1984; Cusimano et al., 1985): réponse parallèle à celle mesurée en ce qui a trait à la prise en charge.

1.3 État des connaissances

Historiquement, on s'est rarement préoccupé de la présence de l'aluminium dans les eaux naturelles puisque ses concentrations étaient très faibles et qu'on n'avait pas encore noté de toxicité pour les organismes aquatiques (Burrows, 1977; NRCC, 1986). Par contre, depuis quelques années, on a observé une augmentation des concentrations dans les eaux douces de certaines régions (Cronan et Schofield, 1979; Dickson, 1980). Cette augmentation est attribuée aux précipitations acides, lesquelles lessivent l'aluminium des bassins versants vers le milieu aquatique. Plusieurs études ont démontré que des concentrations relativement faibles ($<0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

peuvent agir sur les organismes aquatiques. La perte de quelques populations de poissons en Amérique du Nord (Schofield et Trojnar, 1980) et en Scandinavie (Muniz et Leivestad, 1980) a été reliée en partie aux concentrations élevées en aluminium dans la colonne d'eau (NRCC, 1986).

Dans les eaux douces, la chimie de l'aluminium est très complexe: il peut exister sous forme libre (Al^{+3}), ou être lié à des ligands organiques et/ou inorganiques, ou être adsorbé sur des particules solides. Le rôle de cette partie de la thèse est de résumer l'information disponible sur la géochimie et la spéciation de l'aluminium dans l'environnement aquatique et d'évaluer ses effets sur les organismes aquatiques.

1.3.1 Géochimie de l'aluminium

L'aluminium a été considéré jusqu'à récemment comme un élément inoffensif dans un contexte environnemental, compte tenu de sa faible solubilité à des pH près de la neutralité (Wood, 1974). L'aluminium(III) constitue un des principaux métaux que l'on retrouve dans les sols où il est présent sous forme d'aluminosilicates ou d'autres formes solides telles la gibbsite ($Al(OH)_3$), quoique cette forme n'ait jamais été mesurée par technique physique (Lindsay, 1979). L'aluminium peut exister sous différentes formes dans les eaux douces. Il peut être dissous ou particulaire. Il peut être lié à des ligands organiques ou

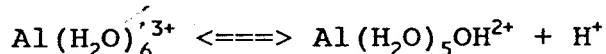
inorganiques, ou on peut le retrouver sous forme ionique libre. Il peut exister sous forme monomère dans les eaux naturelles mais selon des conditions de température, de pH, de concentration et selon le temps d'équilibre, il peut polymériser.

Le pH constitue le facteur le plus important dans le contrôle de la solubilité et de la spéciation de l'aluminium. L'aluminium est généralement non disponible dans les eaux de pH près de la neutralité, mais il est mobilisé dans les solutions acides et basiques. La solubilité de l'aluminium augmente à pH acide et basique et atteint un minimum entre le pH 5.5 et 6.0. Quand le pH augmente de 4.5 à 6.5, l'aluminium a tendance à se polymériser; selon les conditions de mélange, la température, la concentration en Al et la concentration de divers anions (SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , F^- , ...), ces réactions peuvent produire des formes solides bien définies (comme la gibbsite ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ou la bayerite ($\text{Al}(\text{OH})_3$) ou encore des formes métastables et difficiles à caractériser (Hem, 1968; Turner et Ross, 1969; 1970; Turner et Sulaiman, 1971; NRCC, 1986)

Sous conditions acides, ces minéraux riches en hydroxydes se solubilisent jusqu'à une certaine limite, et l'aluminium est relâché dans les eaux interstitielles où il s'équilibre en de nombreuses espèces chimiques qui dépendent de la présence de ligands pour l'aluminium. Les espèces mononucléaires d'aluminium qui peuvent ainsi se développer comprennent Al^{+3} , AlOH^{2+} , $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, AlF^{2+} , AlF_2^+ , AlF_3 , AlSO_4^+ , et beaucoup d'autres incluant des

complexes organiques. Toutes ces espèces mononucléaires sont en équilibre (Baes et Mesner, 1976; Lindsay, 1979; Nordstrom et May, 1989). Les fluoro-complexes sont également importants dans les eaux douces. On retrouve les formes monofluorées (AlF^{2+}) jusqu'aux formes hexafluorées (AlF_6^{3-}) lorsque la concentration en fluorure augmente (Hem, 1968). Dans la plupart des eaux naturelles, ce sont les espèces AlF^{2+} à AlF_3 qui prédominent.

Lorsqu'un sel d'aluminium est dissous dans l'eau en absence d'anions complexant, l'ion métallique libre Al^{3+} s'hydrate en coordonnant six molécules d'eau selon une orientation octaédrale, et réagit pour former plusieurs espèces hydrolytiques. La première étape de l'hydrolyse se produirait selon la façon suivante (Rubin, 1985):



Sous le pH 4.0, l'Al existe alors de façon prédominante comme un cation trivalent, entouré de 6 molécules d'eau: $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ (Manahan, 1975). A des pH se situant entre 4.5 et 6.5 et à des concentrations en Al relativement faibles, les espèces d'aluminium se distribuent selon les formes suivantes: Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ et $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$. En milieu basique, l'aluminium existe surtout sous forme anionique $\text{Al}(\text{OH})_4^-$.

Tel qu'indiqué ci-haut, une augmentation du pH provoque une perte d'ion H^+ pour donner l'hydroxo-complexe $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_5\text{OH}^{2+}$. Si la concentration en $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_5\text{OH}^{2+}$ est élevée, ce monomère a tendance à se polymériser en plus grosses molécules en établissant des doubles

ponts OH entre les deux atomes Al adjacents: $\text{Al}_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_8^{4+}$ (figure 1.3). Des unités structurales plus grosses peuvent évoluer par la formation d'autres ponts OH. La tendance à la polymérisation augmente lorsque la concentration en aluminium est élevée et que le pH de la solution se situe à des valeurs intermédiaires où le rapport OH:Al est d'environ 2.5.

Le taux de polymérisation dépend de la concentration en OH et en Al aussi bien que du rapport OH:Al. Des expériences utilisant des solutions synthétiques définies ont montré que lorsque le rapport OH:Al < 1 , seuls des espèces monomères et des dimères étaient présents en solution (Hem, 1968). Lorsque le rapport molaire OH:Al se situe entre 2.0 et 3.0, et que la solution est en équilibre depuis environ 10 jours à 25°C, le diamètre des particules se situe autour de 0.10 μm . Par contre, lorsque le rapport excède 3.0, le précipité formé est de la bayerite et cette polymérisation en unités très larges constitue un processus relativement lent à 25°C (Hem, 1968). Les espèces particulières formées à pH 4.75-6.50 sont de la gibbsite (Hem, 1968). Johansson (1962) a identifié une unité structurale contenant 13 atomes d'aluminium et 40 atomes d'oxygène avec un nombre varié de protons dans une base cristalline de sulfate. Le polymère le plus connu en milieu aquatique est le $\text{Al}_{13}(\text{OH})_{32}^{7+}$. Ceci indique que les solutions aqueuses d'aluminium peuvent vieillir avec le temps, engendrant des changements dans la taille, la spéciation et la solubilité de l'aluminium.

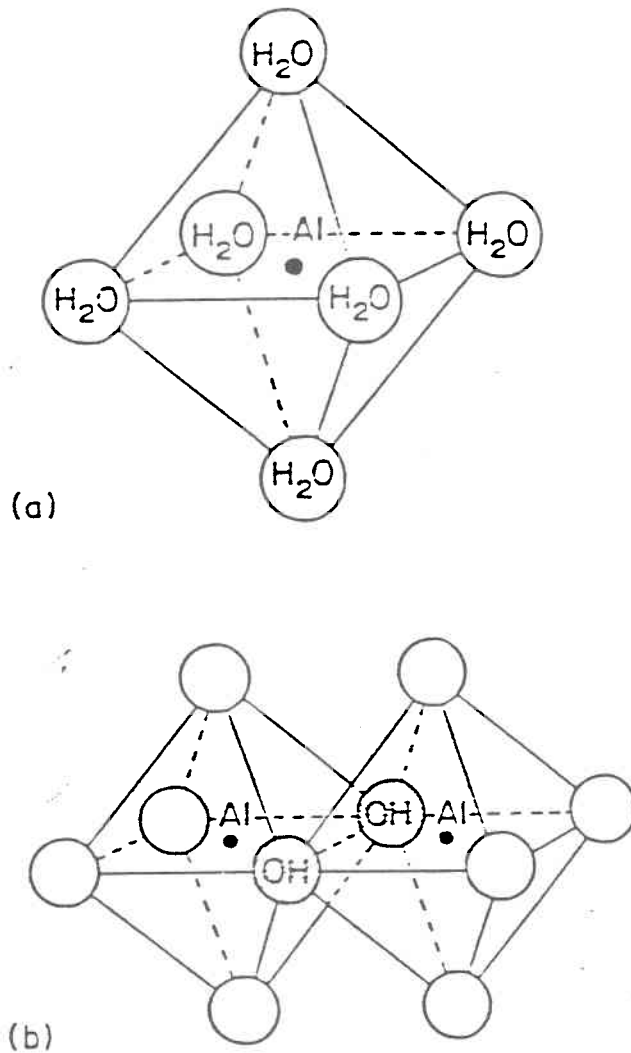


Figure 1.3: (a) Représentation schématique de l'aquo-ion d'aluminium $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{6+}$;
 (b) Représentation schématique du dimère $\text{Al}_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_8^{4+}$
 (Tirée Driscoll et Schecher, 1988).

En résumé, il existe des concentrations "seuils" en aluminium qui déterminent la forme mono- ou polymère qui prédomine dans la solution. Ces concentrations "seuils" sont fonction du pH, de la température, des ligands inorganiques et organiques qui caractérisent la solution. Connaissant ces derniers paramètres, on peut contrôler une solution pour que l'aluminium qui s'y trouve soit uniquement sous la forme monomère. On peut aussi provoquer la polymérisation et obtenir de l'aluminium polymère.

De plus, l'aluminium peut former de forts complexes avec plusieurs ligands organiques, tout comme le fer (III). De cette façon, la solubilité de l'aluminium peut être considérablement augmentée par la présence de solutés organiques. On a d'ailleurs observé que les concentrations d'aluminium dans les lacs contenant beaucoup d'acides humiques étaient plus élevées que celles prédites à partir des valeurs de pH (Dickson, 1980). Les acides humiques et fulviques ont été reconnus pour mobiliser l'aluminium (Driscoll et Schecher, 1988). De plus, il a été montré que l'acide fulvique qu'on retrouve dans les sols complexerait les ions trivalents Fe^{+3} et Al^{+3} plus fortement que les cations bivalents en milieu acide. Par exemple les constantes de stabilité pour les complexes ligands-Fe (III), -Al (III) et -Cu (II) permettent la comparaison, pour une même force ionique, entre la force de complexation des ions trivalents vs un métal bivalent (Cu) qui est le plus complexé dans les eaux naturelles (Martell et Smith, 1977).

Ligand	log K ₁ (I--->0)		
	Fe (III)	Al (III)	Cu(II)
<u>EDTA</u>	25.10	16.70	18.92
<u>acides aminés</u>			
. arginine	3.29	6.67	7.53
. tétracycline	9.90	7.40	7.80
<u>acides polycarboxyliques</u>			
. ac. méso-tartarique	6.60	5.62	3.25
. ac. oxalique	7.59	6.10	5.53
<u>acides humiques</u>			
. ac. phthalique	4.20	3.18	3.15
. ac. salicylique	16.30	12.90	12.03
. ac. malonique	25.10	16.70	18.92

1.3.2 Toxicité de l'aluminium

La mise en évidence de la toxicité de l'aluminium pour les organismes aquatiques a été grandement documentée. L'aluminium est maintenant reconnu comme étant toxique pour une variété d'organismes aquatiques (poissons, amphibiens, invertébrés, algues) à des concentrations de l'ordre du 100 µg·L⁻¹, à de faibles pH et à des concentrations basses en calcium (Odonnel et al., 1984). La combinaison de ces trois facteurs (augmentation de la concentration

en aluminium, bas pH, faible concentration en calcium) est soupçonnée d'être une des causes des effets biologiques de l'acidification des eaux de surface, incluant le déclin des pêches (Baker et Schofield, 1982; Henriksen et al., 1984). On a aussi montré que de fortes concentrations en aluminium dans les eaux acidifiées pouvaient avoir des effets indirects, menant à la flocculation de complexes impliquant le phosphore et les acides humiques; la disponibilité des éléments nutritifs diminuerait par conséquence et affecterait la croissance du phytoplancton.

1.3.2.1 Revue des effets toxiques attribués à l'aluminium chez les plantes et les algues

Les fortes concentrations en aluminium ont été associées à de graves réponses toxiques chez plusieurs espèces aquatiques en milieu acide (NRCC, 1986). Cette partie de l'introduction se limitera à la revue de littérature qui concerne les plantes et les algues. Les effets toxiques de l'Al sur les plantes vasculaires ont été revus par Andersson (1988) et Taylor (1988).

Pour les plantes supérieures, on a démontré que les premiers symptômes de toxicité de l'Al apparaissaient habituellement par des dommages structuraux ou fonctionnels des racines, qui affecteraient

leur efficacité dans l'absorption d'eau et d'éléments nutritifs. Ces symptômes peuvent être dus à un dérangement de la mitose (Foy, 1974, Foy et al., 1978; Morimura et al., 1978; Foy, 1984) et à des variations de la perméabilité des membranes des racines. De la même façon, Hornstrom et al. (1984) a montré que les trois premiers effets de l'Al sur le phytoplancton étaient la diminution de la croissance, la production de cellules à gros volume (Monoraphidium griffithii) et la contorsion des cellules sur elles-mêmes.

A l'échelle moléculaire, on a avancé que l'aluminium pouvait affecter la réplication de l'ADN (Karlik et al., 1980), la synthèse des protéines, l'activité de quelques enzymes, le métabolisme du phosphore (Viola et al., 1980), les interactions avec les murs cellulaires ainsi qu'avec les membranes (Bradley et Parker, 1968; Viestra et Haug, 1978; Haug, 1984), et l'induction de déficience en Ca^{+2} (Nyholm, 1981; Siegel et Haug, 1983).

En effet, on a observé que dans la cellule végétale, l'Al était particulièrement concentré dans le noyau (McLean et Gilbert, 1927; DeBoni et al., 1974; Foy et al., 1978). Par coloration à l'hématoxyline, Havas (1986) a observé que les sites de liaison de l'aluminium chez les plantes aquatiques étaient le noyau et le mur cellulaire pour l'algue verte Mougeotia et seulement le mur

cellulaire pour la mousse aquatique: Leptodictyum riparium. Selon plusieurs chercheurs le cycle mitotique serait affecté par l'aluminium, probablement lors de la réplication de l'ADN à cause de l'inhibition de la synthèse d'acides nucléiques par l'aluminium (Clarkson, 1969; Foy, 1974; Foy et al., 1978). De plus, l'aluminium pourrait empêcher l'activité initiatrice de l'ADN en se liant au phosphore présent dans les acides nucléiques (Matsumoto et al., 1976; Matsumoto et Morimura, 1980). La double hélice de l'ADN deviendrait plus rigide à cause de l'interaction entre l'Al et les groupements phosphates, ce qui réduirait la réplication de l'ADN (Clarkson et Sanderson, 1969; Foy, 1984). De plus, on a montré que la séquence de bases dans l'ADN pouvait aussi être dérangée par l'Al (Sampson et al., 1965). En effet, l'aluminium peut causer une distribution anormale; des ribosomes sur le réticulum endoplasmatique, menant à un désordre dans la synthèse protéinique (McLean, 1980) et aussi réduire la synthèse de l'ARN (Matsumoto et Morimura, 1980).

Parmi les effets de l'aluminium chez les plantes supérieures, plusieurs effets biochimiques de l'Al sont probablement dus aux changements dans la structure et dans la fonction de la membrane des racines (Hecht-Buchholz et Foy, 1981; Zhao et al., 1987). Selon le pH, l'Al pourrait se lier aux protéines ou aux lipides de la membrane (Foy, 1984), ce qui réduirait la perméabilité des racines. Conséquemment, cette réduction de la perméabilité diminuerait la prise et l'utilisation d'eau et d'éléments nutritifs

(Foy et al., 1978; Zhao et al., 1987). On peut imaginer les mêmes effets chez les algues. L'aluminium pourrait aussi former des liaisons entre les protéines adjacentes (Clarkson et Sanderson, 1969) ou les pectines (Foy, 1984), rendant le mur cellulaire plus rigide.

On a aussi observé que la diminution de la respiration des racines était conséquente à la toxicité de l'Al (Clarkson, 1969; Foy, 1974, Foy et al., 1978; Foy, 1984). Selon Clarkson (1969) l'Al n'inhiberait pas la production d'ATP, mais plutôt l'utilisation d'ATP dans la phosphorylation du glucose. Ainsi, de fortes concentrations en Al réduiraient la phosphorylation du sucre (Clarkson, 1966; Foy, 1974) en interférant avec les enzymes qui la permettent (Foy, 1984).

Il a été démontré que des concentrations micromolaires d'ions Al réduisaient l'activité de l'ATP-ase de la membrane, qui joue un rôle important dans le maintien du potentiel transmembranaire. Ceci serait dû à la formation de complexes Al-calmoduline rendant la calmoduline non disponible pour stimuler normalement l'activité de l'ATP-ase (Siegel et Haug, 1983). La toxicité de l'aluminium peut aussi s'expliquer par l'inhibition de l'activité de quelques enzymes et par son influence sur les sites sensibles de la mitochondrie et du noyau cellulaire (Matsumoto et al., 1976).

Pour ce qui est des algues, Pettersson et al. (1985a) ont observé des effets négatifs de l'aluminium sur la chlorophylle-a, sur l'activité de la nitrogénase, sur la fixation du CO₂, sur l'accumulation de granules de cyanophycine et sur la dégradation de thylakoïdes d'Anabaena cylindrica. Selon ces auteurs la toxicité de l'aluminium était principalement due à son effet sur la disponibilité du phosphore et sur l'intégrité des membranes.

Il existe des variations considérables dans la tolérance à l'Al entre les espèces et entre des variétés de la même espèce. Plusieurs mécanismes de tolérance à l'Al ont été suggérés. Les plantes tolérantes peuvent posséder des mécanismes actifs d'exclusion (Clarkson, 1967; Foy, 1983; Wagatsuma et Yamasaku, 1985) ou peuvent être capables d'inactiver l'Al dans leurs tissus (Foy, 1983): augmentation du pH induite par la plante dans la rhizosphère (Foy et al., 1965, 1978), excrétion d'agents chélateurs, habileté à résister ou à compenser les déficiences en nutriments induites par l'Al (Clarkson, 1967; Foy et al., 1978). Par exemple, Pettersson et al. (1985b) ont observé que l'aluminium était rapidement pris en charge par Anabaena cylindrica et qu'il était accumulé dans des granules de polyphosphates après seulement quatre heures de contact, pour ensuite se fixer sur les groupements négatifs des murs cellulaires. Même si ces auteurs ont observé ces résultats dans des conditions où la chimie était plus ou moins contrôlée (concentrations en Al ($\gg 190 \mu\text{M}$) et en P ($\gg 180 \mu\text{M}$) extrêmement élevées), on peut tout de même suggérer que

l'accumulation de l'aluminium dans ces structures agirait comme mécanisme de détoxification.

En plus de fonctionner comme réservoir de phosphore et comme source d'énergie (Kulaev et Vagabov, 1983), les granules de polyphosphate peuvent agir comme site d'emmagasinage pour les cations mono- et divalents comme K^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} (Jensen et al., 1982). Par contre, il ne semble pas y avoir de compétition pour leurs liaisons puisque Pettersson et al. (1985b) n'ont observé ni pertes ni variations dans la concentration de ces ions pour les cellules traitées avec l'Al comparativement aux cellules non traitées. L'Al localisé dans les granules de polyphosphate peut influencer la génération de phosphate et d'énergie, varier la translocation d'autres ions ou être relâché et devenir toxique quand les granules de polyphosphate sont métabolisées. Un résumé des effets physiologiques de l'aluminium chez les plantes et les algues apparaît au tableau 1.1.

Tableau 1.1: Résumé des effets physiologiques de l'aluminium chez les plantes et les algues.

Organismes	Symtômes	Causes	Références
Plantes supérieures (générales)	<ul style="list-style-type: none"> • dommages structuraux ou fonctionnels des racines - effet sur l'absorption d'eau et d'éléments nutritifs; • effets sur la réplication de l'ADN • effets sur la synthèse des protéines, sur l'activité enzymatique et sur le métabolisme du phosphore • interaction avec les membranes • induction de déficience en Ca²⁺ • diminution de la respiration des racines 	<ul style="list-style-type: none"> • dérangement de la mitose • Al lié aux protéines et aux lipides de la membrane: variations de la perméabilité membranaire • inhibition de la synthèse d'acides nucléiques • interaction Al-P des acides nucléiques • formation de complexes d'Al-calmoduline • Al concentré dans le noyau • réduction de la phosphorylation du sucre 	<p>Foy, 1974; 1984; Morimura et al., 1978;</p> <p>Karlik et al., 1980;</p> <p>Viola et al., 1980; Matsumoto et al., 1976; Foy, 1984;</p> <p>Bradley et Parker, 1968; Viestra et Haug, 1978; Haug, 1984;</p> <p>Nyholm, 1981; Siegel et Haug, 1983;</p> <p>Foy, 1984;</p>
Algues: <u>Monoraphidium griffithii</u>	<ul style="list-style-type: none"> • diminution de la croissance • production de cellules à gros volume • contorsion des cellules sur elles mêmes 		<p>Hornstrom et al., 1984;</p>
<u>Anabaena cylindrica</u>	<ul style="list-style-type: none"> • effets sur la chlorophylle-a, sur l'activité de la nitrogénase, la fixation du CO₂, • provoque l'accumulation de granules de cyanophycine et la dégradation des thylakoïdes • effet sur la disponibilité du phosphore et sur l'intégrité des membranes • Al localisé dans les granules de polyphosphates 		<p>Pettersson et al., 1985 a;</p> <p>Pettersson et al., 1985 b;</p>

1.3.2.2 Facteurs influençant la toxicité de l'aluminium

La disponibilité et la phytotoxicité de l'Al dépendent de plusieurs facteurs abiotiques et biotiques dont la spéciation et la solubilité de l'aluminium, le pH, la concentration en matière organique, la concentration des autres cations, anions et sels totaux dans l'eau, de même que l'espèce et les propriétés génétiques individuelles des plantes (Foy, 1974, 1984).

Spéciation et solubilité

En général, selon Andersson (1988) et Taylor (1988), l'activité des espèces monomères inorganiques constitue le meilleur indicateur de la fraction d'aluminium phytotoxique. Des expériences récentes avec Allium cepa en solution de culture, en présence de substances humiques, ont révélé que les espèces d'aluminium monomère labile constituaient la "fraction toxique" (Berggren et Fiskesjö, 1987). Ceci supporte l'idée que seul l'Al monomère est toxique pour la croissance des racines (Blamey et al., 1983; Alva et al., 1986a,b). Dans Alva et al. (1986b) la somme de l'activité des espèces d'Al monomère était le meilleur indice de la toxicité due à l'Al pour la fève de soya, le clou de girofle, la luzerne et le tournesol. Par contre l'aluminium complexé avec SO_4^{-2} , OH^- , F^- (Cameron et al., 1986; Kinraide et Parker, 1987b; Tanaka et al., 1987) était moins toxique que Al^{+3} . Selon le modèle

d'interaction métaux-membrane décrit plus haut (1.7), la toxicité de l'aluminium devrait dépendre de la concentration en ions libres $[Al^{+3}]$.

Contrairement à l'ensemble de ces expériences, dont l'interprétation simple laisse croire que seules les espèces monomères inorganiques d'Al étaient toxiques pour les organismes aquatiques, des études récentes (Parker et al., 1989) ont montré que certaines plantes de blé et de fève soya (Triticum aestivum; Glycine max) étaient plus tolérantes à Al^{3+} qu'à la forme réactive d'Al polymère. Parker et al. (1988a) sont les premiers auteurs à avoir vérifié la toxicité de l'Al polymère dans des conditions très contrôlées. Ces auteurs ont constaté que l'effet de l'ajout d'ions OH^- était assez problématique puisque même si l'augmentation du pH de la solution diminue généralement la toxicité, il n'avait jamais été démontré que ce phénomène était imputable à une toxicité différentielle entre les espèces hydrolysées mononucléaires, ou bien si c'était dû à la formation de complexes d'hydroxy-Al polynucléaires ou de phases solides $Al(OH)_3$ non toxiques. Les auteurs ont examiné la relation entre la spéciation de l'Al et la phytotoxicité dans un système de culture dilué, et chimiquement bien défini, où OH^- constituait le seul agent complexant de l'Al.

Ces auteurs ont trouvé qu'en absence d'Al-polymère, l'augmentation du pH diminuait considérablement la toxicité de l'Al, suggérant que même si Al^{+3} n'était pas la seule espèce

toxique, son activité restait le meilleur indicateur de stress dû à l'Al. Leurs résultats n'ont pas confirmé que la somme des activités d'autres espèces mononucléaires étaient reliées à la prédiction de la phytotoxicité de l'aluminium, contrairement à ce que Alva et al. (1986b) avaient mentionné. Ils ont par ailleurs démontré que l'aluminium polymère était toxique.

Parker et al. (1988a) ont proposé cinq facteurs qui peuvent expliquer pourquoi certains auteurs, dont Alva et al. (1986b), ont noté une forte corrélation entre la toxicité et la sommation des formes monomères d'aluminium:

- 1) la présence de ligands (phosphate, citrate) peut introduire certaines incertitudes dans la spéciation de l'aluminium;
- 2) l'existence d'une collinéarité entre les différentes espèces mononucléaires: le problème de la collinéarité est particulièrement sévère dans les solutions de sol où Al dissous total est principalement contrôlé par le pH (Wright et al., 1987). Pour cette raison, des corrélations significatives entre l'inhibition de l'élongation des racines et des espèces d'Al individuelles ne signifient pas réellement une toxicité de ces espèces (Kinraide et Parker, 1989);
- 3) le choix des constantes thermodynamiques: Les constantes de formation récentes pour AlOH_2^+ et $\text{Al}(\text{OH})_3$ sont plus faibles que les

anciennes, ce qui signifie que les concentrations en hydroxo-complexes d'aluminium ont pu être sur-évaluées (Kinraide et Parker, 1989: voir tableau 1.2 et figure 1.4). De plus ces études n'ont pas considéré la présence possible d' Al_{13} , alors que cette présence dans des solutions partiellement neutralisées aurait pour effet de générer une certaine toxicité, laquelle serait attribuée par erreur aux hydroxo-complexes d'aluminium mononucléaire;

4) les différences réelles entre la toxicité des espèces polynucléaires créées par les divers chercheurs;

5) la possibilité que l'Al monomère soit, en fait, véritablement plus toxique chez les dicotylédones que chez les monocotylédones.

Selon les résultats de Parker et al. (1988b), les plants de blé et de fèves de soya étaient plus tolérants à l' Al^{+3} qu'à l'Al polymère réactif, ce qui suggère des différences physiologiques fondamentales de la toxicité des deux types d'aluminium. De la même façon, Kinraide et Parker (1989) ont démontré que l' Al^{+3} était une substance rhizotoxique très importante dans les sols acides. Même si Al^{+3} était en équilibre avec les espèces mononucléaires comme $AlOH^{2+}$ et $AlOH_2^+$, la toxicité de ces formes n'a pas été déterminée. Ces auteurs ont noté que les espèces polynucléaires d'Al pouvaient coexister avec Al^{+3} , et une de ces espèces $AlO_4Al_{12}(OH)_{24}(H_2O)_{12}^{7+}$ était selon eux très toxique.

Tableau 1.2: Constantes d'équilibre utilisées pour déterminer l'activité des espèces d'aluminium (Tiré de Kinraide et Parker, 1989).

Réactions d'équilibre	Constante d'équilibre (log K)		
	Parks (1972)	Lindsay (1979)	Nordstrom et May (1989)
$\text{Al}^{3+} + \text{H}_2\text{O} = \text{AlOH}^{2+} + \text{H}^+$	-5.01	-5.02	-5.00
$\text{Al}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O} = \text{AlOH}_2^+ + 2\text{H}^+$	-8.70	-9.30	-10.10
$\text{Al}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O} = \text{Al}(\text{OH})_3 + 3\text{H}^+$	-15.20	-14.99	-16.80
$\text{Al}^{3+} + 4\text{H}_2\text{O} = \text{AlOH}_4^- + 4\text{H}^+$	-23.30	-23.33	-22.70
$\text{Al}^{3+} + \text{SO}_4^{2-} = \text{AlSO}_4^+$		3.20	3.50
$\text{Al}^{3+} + 2\text{SO}_4^{2-} = \text{Al}(\text{SO}_4)_2^-$		5.10	5.40
$\text{Ca}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} = \text{CaSO}_4$		2.31	
$\text{Mg}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} = \text{MgSO}_4$		2.23	

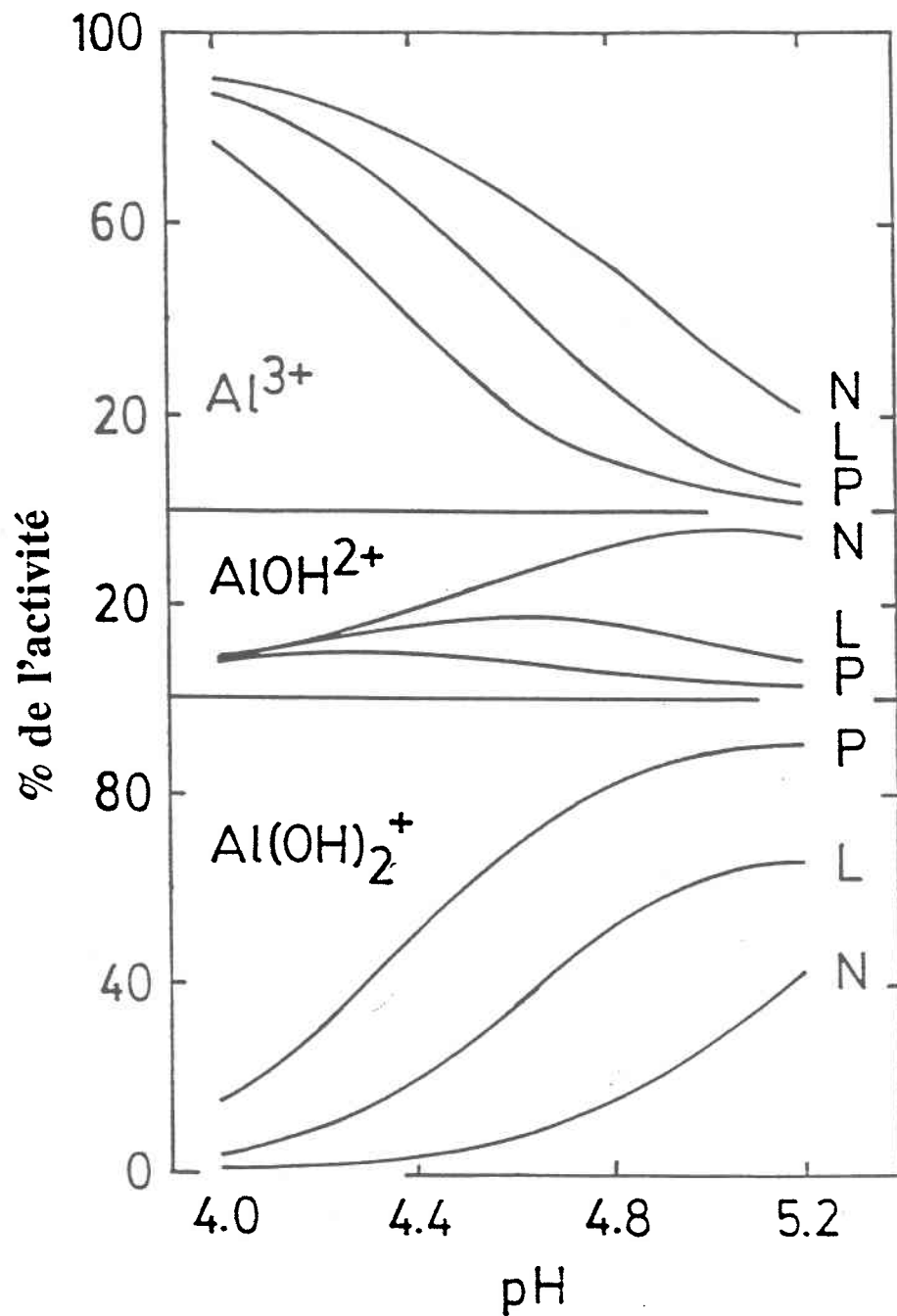


Figure 1.4: Distribution de l'activité de différentes espèces d'Al en fonction du pH et produites selon trois séries de constantes d'équilibre: L- Lindsay (1979); N-Nordstrom et May (1989); P- Parks (1972) (Tiré de Kinraide et Parker, 1989).

Parker et al. (1988a) ont suggéré que le transport de l'Al dans la cellule n'était pas nécessairement une étape requise pour l'expression de la toxicité, et que les premières lésions pourraient être extracellulaires. De façon similaire, Kinraide et Parker (1987a) ont reporté que les sels chlorés de Ca, Mg, Sr, K et Na diminuaient la toxicité de l'Al³⁺, et que les cations divalents étaient 10 à 15 fois plus efficaces que les monovalents lorsque comparés à la même activité. Ces résultats suggèrent une forte compétition selon la valence des cations pour les sites de liaison externe, négativement chargés.

Que les formes polynucléaires soient toxiques est consistant avec les hypothèses décrites plus haut. Même si la polymérisation entraîne une diminution de charge positive par atome d'Al (Smith, 1971; Hsu, 1977), la charge totale avec des facteurs stériques, peut mener à une forte affinité de surface de ces espèces. Cependant, la forte taille relative et la forte charge des polymères vont à l'encontre du transport à travers la membrane plasmique.

Pour leur part, Kinraide et Parker (1989) rapportent aussi qu'ils n'ont considéré que les espèces dans la solution. Par contre les extrémités des racines génèrent un courant d'ions H⁺ vers l'intérieur, lequel alcalinise l'espace libre et une microcouche autour. Conséquemment, l'identité quantitative des espèces d'aluminium qui font contact avec les membranes plasmiques

reste inconnue. Selon ces auteurs, la considération pratique pour estimer la toxicité d'une solution reste l'activité de Al^{+3} lorsque celle-ci peut être déterminée et que l'amélioration due à d'autres cations est prise en considération (Kinraide et Parker, 1987 a). Par ailleurs, la somme des activités de Al^{+3} et des hydroxo-complexes mononucléaires demeure un indice non précis de la toxicité d'une solution (Parker et al., 1988 a).

La plupart des expériences apparaissant au tableau 1.3 suggèrent que la phytotoxicité devrait être induite uniquement par l'aluminium mononucléaire. La non-certitude des constantes d'hydrolyse mononucléaire pour l'aluminium ont cependant confondu l'interprétation de plusieurs résultats d'analyse. L'accord entre les constantes publiées est assez faible, surtout pour la formation de $Al(OH)_2^+$ et $Al(OH)_3$ (Baes et Mesmer, 1976), et des valeurs disparates ont été rapportées pour toutes les constantes (Sadiq et Lindsay, 1979).

Les expériences à partir desquelles le protocole de cette recherche doctorale a été élaboré apparaissent au tableau 1.3. Il s'agit pour la plupart d'expériences réalisées sur des végétaux supérieurs (exp. 2, 3, 6, 7, 8 et 9). Ce sont les approches expérimentales décrites dans les expériences 7, 8 et 9 qui permettent le mieux de différencier entre la toxicité relative de Al^{+3} , $AlSO_4^+$, AlF_x et Al polymère.

Tableau 1.3: Références et données expérimentales d'études récentes sur la toxicité de Al

#	référence	espèce	réponse	pH	[Al] total (μM)	ligands
1	Hellawell et al., 1983	<u>Chlorella</u> <u>pyrenoidosa</u>	croissance	4.8-7.0	0 à 16	-----
2	Alva et al., 1986b	<u>Glycine max</u> L. <u>Helianthus</u> annuus L. <u>Trifolium</u> subterraneum L. <u>Medicago</u> sativa L.	élongation des racines	4.0-5.0	0 à 40	H_2PO_4^- SO_4^{2-} Fe-citrate
3	Cameron et al., 1986	<u>Hordeum vulgare</u>	élongation des racines	4.5	0-100	F^- SO_4^{2-}
4	Gunn et al., 1986	<u>Photobacterium</u> <u>phosphoreum</u>	émission de lumière	5.5	0-185	citrate fluorure ac. fulvique naturel
5	Petterson et al., 1985a et 1985b	<u>Anabaena</u> <u>cylindrica</u>	croissance [chlorophylle a] [phycocyanine] fixation $\text{CO}_2\text{-N}_2$ activité de la nitrogénase [cyanophycine] dégradation de thylakoïdes	6.0	3.5-370	H_2PO_4^- ac. Citrique EDTA
6	Kinraide et Parker, 1987a et 1987b	<u>Iricium aestivum</u> L. <u>Trifolium pratense</u>	élongation des racines	4.3	0-10	SO_4^{2-}
7	Parker et al., 1988a,b	<u>Iricium aestivum</u> L.	élongation des racines	4.2-5.0	0-12	OH^-
8	Kinraide et Parker, 1989	<u>Iricium aestivum</u> L. cv. Tyler	élongation des racines	4.3-4.9	0-3.2	SO_4^{2-}
9	Parker et al., 1989	<u>Iricium aestivum</u> L. cv. Tyler	élongation des racines	5.0-5.2	15	SO_4^{2-}

Selon les résultats des expériences qui apparaissent au tableau 1.3, si les espèces mononucléaires d'Al seules étaient considérées, on pourrait généraliser que la complexation améliorerait la toxicité, que ce soit par le ligand sulfate (Kinraide et Parker, 1987b; Cameron et al., 1986), fluorure (Cameron et al., 1986), ou hydroxy (Parker et al., 1988a), ou par un acide organique (Hue et al., 1986).

pH

En milieu naturel de fortes concentrations en Al^{+3} sont souvent accompagnées par de fortes concentrations en H^+ et on a établi une corrélation entre un bas pH et la toxicité de l'Al lors d'expériences en agriculture (Kinraide et al., 1985). Cependant, comme H^+ peut être toxique par lui même, il est difficile de connaître la toxicité réelle due à l'Al seul. Des effets directs de la toxicité de l'ion H^+ ont été observés sur Allium cepa dans des solutions de $pH \leq 4.1$ (Berggren et Fiskesjö, 1987). La toxicité due aux ions hydrogène sur les racines de coton a aussi été observée à $pH \leq 4.25$ (Howard et Adams, 1965).

Matière organique

Tel que mentionné plus haut, la présence de matière organique soluble, spécialement d'acides fulviques, en solution de sol, influence la distribution de l'aluminium entre ses différentes

fractions (Berggren et Fiskesjö, 1987). Selon ces auteurs, lorsque l'Al était complexé à la matière organique, aucun dommage sur les racines de Allium cepa n'était détecté. Les acides humiques semblent aussi prévenir la toxicité de l'Al pour la luzerne (Medicago sativa) dans des milieux de culture (Brogan, 1967). Hornstrom et al. (1984) ont aussi observé que la présence d'humus diminuait les effets de l'Al sur le phytoplancton par sa capacité à réduire le taux de précipitation du phosphore dans le milieu de culture.

Hue et al. (1986) ont démontré que l'activité de l'Al⁺³, ou la phytotoxicité de l'Al, était aussi affectée par la présence d'acides organiques de faible poids moléculaire. Dans un milieu expérimental avec du coton (Gossypium hirsutum), les acides organiques se sont groupés en trois catégories selon leur capacité à détoxifier l'Al (1) fort (citrique, oxalique, tartarique) (2) intermédiaire (malique, malonique, salicylique) et (3) faible (succinique, lactique, formique, acétique, phthalique) (Hue et al., 1986). De plus la présence de citrate dans le milieu a semblé prévenir la toxicité de l'Al sur le maïs (Bartlett et Riego, 1972), le riz et le blé (Kinraide et al., 1985). Cependant, comme exception, des effets toxiques sévères de citrate et de tartrate d'aluminium sur la luzerne ont été reportés par McLean et Gilbert (1927). Pour leur part, les agents chélateurs synthétiques (EDDHA, EDTA) détoxifiaient Al (Clarkson, 1966).

1.4 Concept et démarche expérimentale

1.4.1 Le modèle d'ion libre et son application au cas de l'Al

Dans l'Introduction nous avons d'abord considéré les interactions métaux lourds/H⁺/organisme (section 1.2), en développant le concept du "modèle d'ion libre"; dans un deuxième temps nous nous sommes concentrés sur un seul métal, l'Al, en considérant son comportement géochimique et sa toxicité chez les plantes. Maintenant, on peut se demander si la toxicité de l'aluminium cadre avec le modèle simple d'interaction des métaux avec des organismes vivants (section 1.2.1). Si on s'en tient au "modèle de toxicité de l'ion libre" où la réponse biologique est proportionnelle à la concentration des complexes de surface [M^{Z+}-L-cellule] (voir équation 1.7), la réponse biologique des organismes aquatiques devrait être prédite par la concentration de l'ion aqueux Al³⁺ (Cameron et al., 1986; Kinraide et Parker, 1989).

Il faut signaler d'abord qu'il n'existe dans la littérature que très peu de données valables pour répondre à cette question: dans la presque totalité des études toxicologiques on a négligé certains aspects de la chimie de l'aluminium en solution aqueuse (ex.: sa solubilité limitée entre pH 5.5 et 7.0; la lenteur de

certaines de ses réactions (polymérisation, précipitation), sa tendance à former des espèces métastables et sa tendance à s'adsorber (Burrows, 1977). Par ailleurs, les quelques résultats utiles, obtenus pour différents organismes (bactéries, algues, amphibiens (oeufs), poissons, végétaux supérieurs) semblent parfois contradictoires et n'associent pas toujours la réponse biologique des organismes aquatiques à la concentration de l'ion aqueux Al^{+3} (tableau 1.4). On doit mentionner ici que la forte variabilité entre les résultats n'est pas spécialement attribuable à la gamme d'organismes tests étudiés.

Les résultats qui apparaissent au tableau 1.4 sont présentés selon un ordre chronologique. Dans tous les cas où la toxicité de l'aluminium organique a été testée (exp. 1, 2, 5 et 7), on lui a attribué une toxicité relativement faible, même si les résultats proviennent de tests effectués sur des organismes différents (truite, algue, vairon, bactérie). De la même façon, là où les complexes Al-F ont été testés (exp. 1, 2, 3, 4, 5 et 8), on a considéré que sous cette forme, l'aluminium était moins toxique que la forme monomère libre ou le complexe $AlOH^{2+}$. Ces observations sont partagées par tous les auteurs cités au tableau 1.4, à l'exception de Clark et LaZerte (1985) (exp. 4) qui n'ont pas observé de toxicité différente entre ces formes pour les oeufs d'amphibiens.

Tableau 1.4: Toxicité relative associée à différentes formes d'aluminium

espèces d'aluminium	références
${}^1\text{Al(OH)}_x > \text{AlF}_x > \text{Al-citrate}$	(<u>Salvelinus fontinalis</u> : Driscoll et al., 1980)
${}^2\text{Al(OH)}_2^+ > \text{autres formes de Al}$	(<u>Anabaena cylindrica</u> : Pettersson et al., 1985a)
${}^3\text{Al(OH)}_2^{2+} >> \text{Al}^{+3}, \text{AlOH}^{+2} > \text{AlF}_x > \text{Al-polymère}$	(<u>Chlorella pyrenoidosa</u> : Helliwell et al., 1983)
${}^4\text{Al}^{+3} = \text{Al(OH)}_x = \text{AlF}_x$	(<u>Bufo americanus</u> , <u>Rana sylvatica</u> : Clark et Lazerte, 1985)
${}^5\text{Al}^{+3} > \text{AlF}_x > \text{Al-malate} > \text{Al-citrate}$	(<u>Notropis cornutus</u> : Kramer et Humel, 1985)
${}^6\text{Al(OH)}_x^{2+} > \text{Al}^{+3}$	(<u>Glycine</u>): (Alva et al., 1986b)
${}^7\text{Al}^{+3} > \text{AlF}_x > \text{Al-fulvique}$ > Al-citrate > Al-polymère	(<u>Photobacterium phosphoreum</u> : Gunn et al., (1986)
${}^8\text{Al}^{+3} > \text{AlF}_x$	(Plantes supérieures; Cameron et al., 1986; Kinraide et Parker, 1987a; Tanaka et al., 1987)
${}^9\text{Al}^{+3} > \text{hydroxy-Al}$:	(<u>Triticum aestivum</u> : Kinraide et Parker, 1989)

En ce qui concerne l'effet du pH sur la toxicité de l'aluminium, les études montrent plus d'inconsistance. Cette constatation est peu surprenante étant donné que la concentration en ions H^+ peut affecter la solubilité de l'aluminium, sa spéciation en solution et sa prise en charge biologique. Il peut aussi se produire une réponse physiologique par laquelle de faibles pH prédisposent l'organisme à des effets de l'aluminium et que les effets observés avec l'augmentation du pH soient d'une certaine façon indépendants de la variation de la spéciation de l'aluminium.

Règle générale, selon quatre expériences récentes (tableau 1.4: exp. 5, 7, 8 et 9), la toxicité de l'aluminium semble s'accorder au modèle d'ion libre élaboré plus haut. Par contre, certains des résultats présentés au tableau 1.4 (surtout pour les expériences 2, 3, 4 et 6) contrastent nettement avec ceux observés pour d'autres métaux et ne semblent pas, à première vue, cadrer avec le modèle simple élaboré plus haut.

1.4.2 Examen détaillé et approfondi des cas d'exception apparents (algues)

Etant donné que les recherches réalisées dans le cadre de cette thèse ont porté exclusivement sur les algues, il importe de considérer en détail les cas d'exception apparents qui touchent ces cibles biologiques (tableau 1.4, exp. 2 et 3). Rappelons que le contrôle inadéquat de la chimie des solutions et indirectement de la spéciation de l'aluminium peut engendrer des conclusions erronées. On sait que les études antérieures à ≈ 1980 et d'autres plus récentes portant sur l'effet de l'aluminium sur la croissance d'algues avaient été faites en employant un milieu de culture standard (Foy et al., 1972; Burrows, 1977; Pettersson et al., 1985a,b). Ces milieux contiennent en général des phosphates, silicates, agents complexants, hydroxyde ferrique colloïdale et d'autres constituants pouvant réagir avec l'aluminium, et de cette façon diminuer sa toxicité en le rendant moins disponible: il en résulte que les calculs de la spéciation de l'aluminium dans de tels milieux sont presque impossibles à faire.

Ainsi, dans l'expérience 2 Pettersson et al. (1985a) attribuent à la forme $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ une plus forte toxicité qu'à l'ion Al^{+3} , mais ils ont pratiqué leurs expériences dans un milieu qui contenait à la fois des phosphates, de l'acide citrique et de l'EDTA. De plus, les concentrations en Al utilisées dépassaient largement les limites de solubilité de l'Al à pH 6.0. Par

conséquent, les auteurs n'auraient pas dû suggérer que la forme $Al(OH)_2^+$ soit la forme toxique puisqu'ils travaillaient en présence d'autres formes qu'ils ne connaissaient, ni ne contrôlaient.

Les résultats de l'expérience no. 3, réalisée par Helliwell et al. (1983), sont plus difficiles à "rejeter". En effet, conscients du danger de garder du phosphore dans leurs milieux d'exposition, ces chercheurs ont contourné ce problème en effectuant des mesures du taux de croissance dans une eau dure synthétique, libre de milieu de culture. Ils ont travaillé sur la spéciation et sur la toxicité de l'aluminium dans une eau dure synthétique afin de pouvoir associer l'espèce (ou les espèces) physico-chimiques d'aluminium à la toxicité observée sur Chlorella pyrenoidosa. Même s'ils ont démontré l'importance de la présence de ligands sur la réponse biologique observée (tableau 1.5), ils ont aussi travaillé à des concentrations très élevées en Al et à des pH près de la neutralité. A partir de mesures du taux de croissance dans les solutions d'aluminium de pH 5.8 à 6.2, où la concentration des formes polynucléaires passait par son maximum (figure 1.5), et en soumettant ces résultats à une analyse statistique, Helliwell et al. (1983) ont avancé que la toxicité vis-à-vis de l'algue test était fonction de l'aluminium labile plutôt que de l'aluminium total. Selon les auteurs, ces résultats indiqueraient que le polymère par lui-même ne serait pas toxique (Florence, 1991, communication personnelle).

Tableau 1.5: Effet de l'aluminium en présence ou non de différents ligands sur le taux de croissance de Chlorella pyrenoidosa dans une eau dure synthétique, à pH 5.2 et contenant 1.1 μM d'aluminium total (tiré et adapté de Helliwell et al., 1983). La concentration en Al^{3+} est calculée à partir du programme MINEQL. (---- signifie que les données nécessaires au calcul n'étaient pas disponibles).

LIGANDS [mg·L ⁻¹]	Al LABILE MESURÉ [μM]	[Al ³⁺] CALCULÉ [μM]	TAUX DE CROISSANCE (% témoin)
Sans	0.76	0.22	48
Acide salicylique, 5.0	0.92	0.26	85
Acide fulvique, 10.0	0.63	0.18	85
Acide tannique, 4.0	≤ 0.07	----	113
PO_4^{-3} , 105 [μM]	0.37	0.11	125
F^- , 53 [μM]	0.31	≈ 0	62
SO_4^{2-} , 10000 [μM]	0.83	0.12	50
SiO_3^{-2} , 79 [μM]	< 0.19	<0.06	116

L'effet de différents ligands sur la labilité de l'aluminium est démontré sur ce tableau. Les valeurs d'Al labile mesurées rendent compte de l'importance de la complexation de certains ligands pour l'Al. Alors que les sulfates et l'acide salicylique affectent peu la labilité de l'Al, les acides tanniques, les silicates, les fluorures et les phosphates s'y complexent grandement et influencent sa labilité vis-à-vis du réactif colorimétrique, le pyrocatechol violet (PCV). On se rend compte alors que la concentration nominale en Al utilisée dans un milieu contenant des ligands organiques ou inorganiques, n'indique en rien sur la biodisponibilité chimique de l'aluminium.

Par ailleurs, les concentrations en aluminium labile mesurées ne reflètent pas nécessairement la portion toxique de l'aluminium pour Chlorella pyrenoidosa. Par exemple, même si la concentration en Al labile mesurée est supérieure en présence d'acide salicylique (0.92 μM) que sans acide (0.76 μM), la croissance de l'algue n'y est pas plus affectée. Au contraire elle est augmentée par rapport au milieu ne contenant pas de ligand, ce qui suggère qu'en présence d'acides salicylique, fulvique et tannique, l'aluminium se retrouve sous une forme non disponible pour les algues et conséquemment affecte moins leur taux de croissance. Inversement, alors que la concentration en Al labile mesurée est semblable en présence de phosphates et de fluorure, la forme fluorée, semble plus disponible et toxique pour les algues que la forme phosphatée. En résumé, ce tableau démontre ⁽ⁱ⁾ que la mesure de la forme labile en aluminium n'est pas un bon indice de la toxicité de l'aluminium présent et ⁽ⁱⁱ⁾ que les complexes d'aluminium avec le silicate, le phosphate, ou l'acide tannique n'affectent pas ou peu la croissance de Chlorella pyrenoidosa, et ⁽ⁱⁱⁱ⁾ que le fluorure et le sulfate offrent peu de protection à l'algue.

La concentration en Al^{3+} calculée à partir des concentrations mesurées en Al labile montrent aussi qu'elles ne sont pas reliées directement à la toxicité. Par exemple, le fluorure complexe tout l'aluminium, diminuant la concentration en Al^{3+} à des niveaux très bas (<0.0 μM), mais la croissance de l'algue est néanmoins beaucoup affectée. De même, alors que $[\text{Al}^{3+}]$ est semblable en présence de l'acide salicylique ou non, la toxicité de l'Al s'avère beaucoup plus importante dans le milieu sans acide salicylique. C'est le même phénomène qu'on observe en présence de phosphate et de silicate, où Al^{3+} calculé est semblable mais les effets sont deux fois plus importants en présence de sulfate comparativement au phosphate.

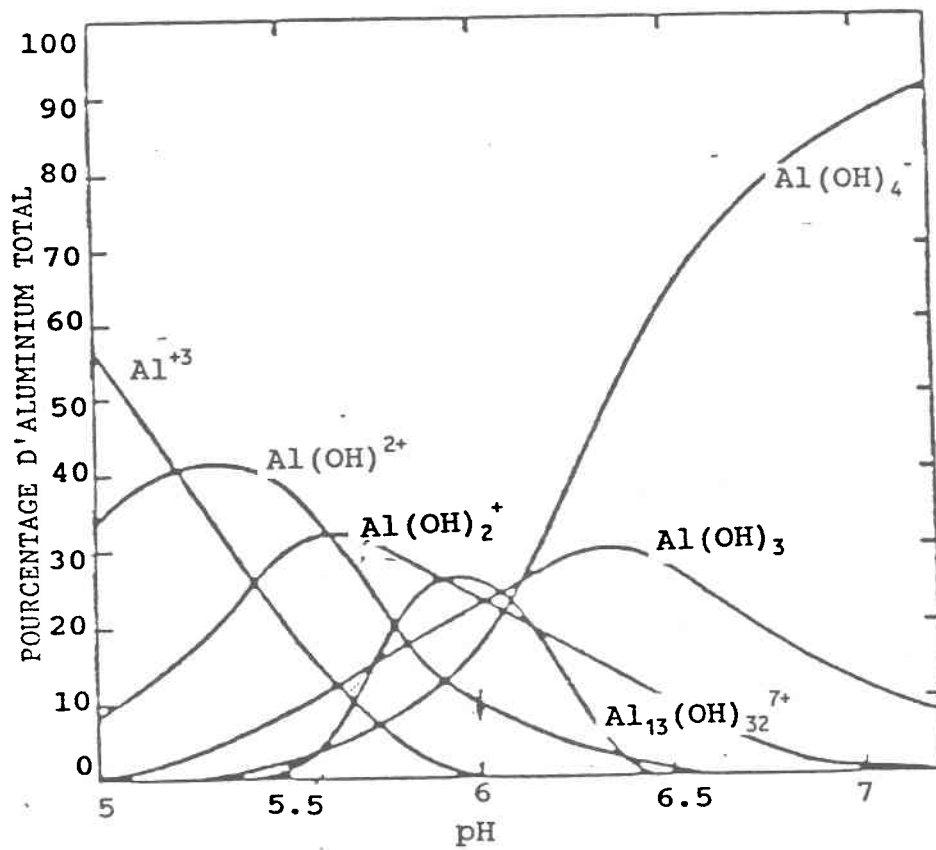


Figure 1.5: Courbes de distribution d'espèces d'aluminium selon le pH (tirée de Helliwell et al., 1983).

A la figure 1.6, la concentration d'aluminium labile requise pour réduire de 50 % le taux de croissance est présentée en fonction du pH. Des expériences avec des solutions libres d'aluminium ont démontré que des variations de pH dans la gamme 4.9 et 7.1 n'avaient que peu d'effets sur la croissance algale (données non présentées). En comparant la courbe de toxicité vs pH (figure 1.6) avec la distribution d'espèces de la figure 1.5, les auteurs ont conclu que les espèces labiles, Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})_3$ et $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ ne contribuaient pas de façon significative à la toxicité de l'aluminium pour Chlorella pyrenoidosa. Des fonctions de toxicité générées par un ordinateur ont montré une plus grande correspondance avec la courbe expérimentale lorsque $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ était considérée comme étant la "seule espèce toxique". Ces auteurs considéraient alors que les espèces toxiques étaient $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ ou une combinaison de $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ et $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$.

Une telle conclusion va complètement à l'encontre du modèle d'interaction métaux-algues décrit dans la section 1.2.1, où la toxicité est reliée à la concentration de l'ion métallique libre (ici: Al^{3+}) et selon lequel on ne peut parler d'"espèce toxique" (toutes les espèces monomères étant en équilibre avec elles-mêmes ainsi qu'avec l'espèce Al-X-cellule).

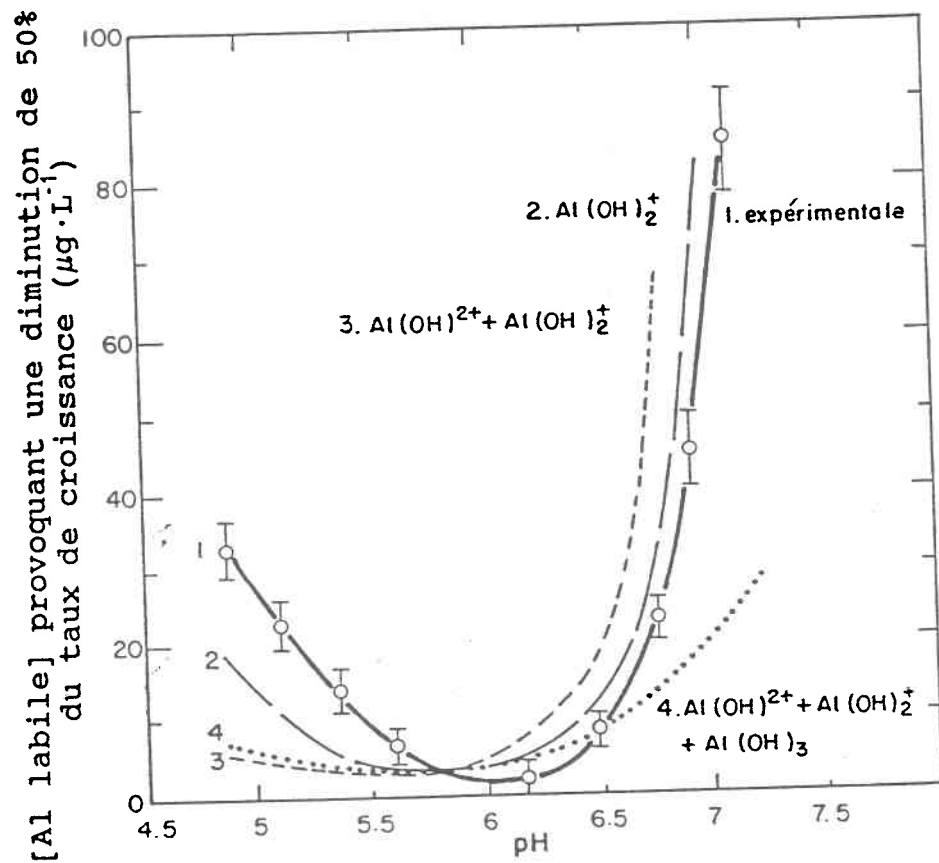


Figure 1.6: Courbes représentant la concentration d'aluminium labile pouvant diminuer le taux de croissance de Chlorella pyrenoidosa de 50%, en fonction du pH (tirée de Helliwell et al., 1983).

Selon les auteurs (Helliwell et al., 1983), pour qu'une toxicité sélective de $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ se produise, il faudrait que les formes Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ et $\text{Al}(\text{OH})_2^{2+}$ ne soient pas adsorbées par l'algue ou qu'elles le soient également. Ceci semble peu probable. Il est connu que l'équilibre entre ces formes est établi rapidement (Smith, 1971; Baes et Mesmer, 1976; Plankey et al., 1986) probablement plus vite que l'expression de la réponse biologique (Wilkinson et al., 1990) et une prise en charge sélective de $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ de cette solution par adsorption sur l'algue mènerait à une re-équilibration rapide des formes ci-haut mentionnées. **La dite toxicité sélective de $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ nécessiterait alors que la toxicité de l'aluminium soit déterminée non pas selon l'approche thermodynamique d'équilibre chimiques, mais plutôt selon un modèle cinétique.** En d'autres termes, la toxicité de l'aluminium s'exprimerait au fur et à mesure que l'aluminium se lierait à la surface algale (la liaison de l'aluminium provoquerait une réponse biologique instantanée et irrévocable)... et il faudrait postuler que la forme $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ réagisse plus rapidement que toutes les autres formes de l'aluminium. C'est pourquoi de tels résultats ne doivent pas être interprétés comme étant la conséquence d'une plus forte toxicité ou d'une plus grande disponibilité des hydroxy-complexes d'aluminium (Neville et Campbell, 1988).

La seule conclusion que l'on peut tirer des résultats de cette étude, est que l'aluminium dissous pourrait être hautement toxique pour les algues, et peut-être pour d'autres organismes, dans les

eaux naturelles légèrement acides et pauvres en matière organique et en éléments nutritifs comme les phosphates et les silicates.



Comme il l'a été démontré dans ce premier chapitre, l'évaluation de la toxicité de l'aluminium en milieu acide s'avère assez complexe. Nous tenterons dans les prochains chapitres de vérifier la capacité du modèle d'ion libre pour expliquer la toxicité et la bioaccumulation de l'aluminium en contrôlant le plus possible les paramètres biotiques et abiotiques qui sont influencés par le pH. Le chapitre 2 décrit en détail la méthodologie et le matériel employés pour cette recherche. La mise au point du milieu d'exposition et l'évaluation des effets du pH sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa constituent le chapitre 3. Dans le chapitre 4, nous avons évalué les effets du pH sur les interactions métaux/membrane ¹ en titrant les algues et en quantifiant les ligands (L⁻) présents sur la surface cellulaire; ² en mesurant l'adsorption d'un métal (Mn) dont la spéciation ne varie pas dans la gamme de pH étudiée (7-->5); et ³ en évaluant les effets du pH sur la perméabilité membranaire.

C'est dans le chapitre 5 que l'évaluation de la toxicité de l'aluminium en fonction de sa spéciation est réalisée. Trois formes d'aluminium ont été testées: aluminium monomère inorganique, aluminium polymère et aluminium organique. Le concept de

compétition H^+/Al^{+3} au niveau de la membrane a été considéré. Le chapitre 6 vise à relier la toxicité de l'aluminium à sa bioaccumulation, à ses interactions avec le métabolisme du phosphore, à ses effets sur le volume cellulaire et à ses influences sur la perméabilité membranaire. Enfin le chapitre 7 synthétise toute l'information présentée dans la thèse et amène des avenues de recherche qui resteraient à être explorées.

1.5 REFERENCES

- Almer, B., W. Dickson, C. Ekstrom et E. Hornstrom, 1978. Sulphur pollution and the aquatic ecosystem, p. 293-295. Dans: Sulphur in the environment part II: ecological impacts. J.O. Nriagu (ed.), J. Wiley and Sons Inc., New York.
- Alva, A.K., D.G. Edwards, C.J. Asher et F.P.C. Blamey, 1986a. Effects of phosphorus/aluminium molar ratio and calcium concentration on plant response to aluminium toxicity. Soil Sci. Soc. Am. J., 50: 133-137.
- Alva, A.K., D.G. Edwards, C.J. Asher et F.P.C. Blamey, 1986b. Relationships between root length of soybean and calculated activities of aluminium monomers in nutrient solution. Soil Sci. Soc. Am. J., 50: 959-962.
- Anderson D.M. et F.M.M. Morel, 1978. Copper sensitivity of Gonyaulax tamarensis. Limnol. Oceanogr., 23:283-295.
- Anderson, M.A. et A.J. Rubin, 1981. (éds). Adsorption of Inorganics at Solid-Liquid interfaces. Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor, Michigan, 357 p.
- Andersson, M., 1988. Toxicity and tolerance of aluminium in vascular plants. Water Air Soil Pollut., 39:439-462.
- Babich, H. et G. Stotsky, 1983. Influence of chemical speciation on the toxicity of heavy metal to microbiota, p. 1-46. Dans: Aquatic Toxicology. J. O. Nriagu (éd.), J. Wiley and Sons Inc., New-York.
- Baes, C.F. Jr. et R.E. Mesmer, 1976. The hydrolysis of cations. J. Wiley and Sons Inc., New York, 112 p.
- Bailey, R.C. et P.M. Stokes, 1984. Evaluation of filamentous algae as biomonitors of metal accumulation in softwater lakes, p. 5-26. Dans: Proceedings 7th ASTM Aquatic Toxicity Symposium, ASTM Special Publ. No. 854, American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Baker, J.P. et C.L. Schofield, 1982. Aluminium toxicity to fish in acidic waters. Water Air Soil Pollut., 18: 289-309.
- Bartlett, R.J. et D.C. Riego, 1972. Effect of chelation on the toxicity of aluminum. Plant Soil, 37:419-423.

- Bates, S.S., A. Tessier, P.G.C. Campbell, et J. Buffle, 1982. Zinc adsorption and transport by Chlomydomonas variabilis et Scenedesmus subspicatus (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. *J. Phycol.*, 18: 521-529.
- Berggren, D. et G. Fiskesjö, 1987. *Environ. Toxic. Chem.*, 6:771.
- Beveridge, T.J. et R.G.E. Murray, 1980. Sites of metal deposition in the cell wall of Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.*, 141:876-887.
- Blamey, F.P.C., D.G. Edwards et C.J. Asher, 1983. Effects of aluminum, OH:Al and P:Al molar ratios, and ionic strength on soybean root elongation in solution culture. *Soil Sci.*, 136:197-207.
- Borgmann, U., 1983. Metal speciation and toxicity of free metal ions to aquatic biota, p. 47-72. Dans: *Aquatic Toxicology*. J.O. Nriagu (éd.), J. Wiley and Sons Inc., New York, NY.
- Bradley, R.W., 1984. The influence of pH, hardness and alkalinity on the acute toxicity of zinc to rainbow trout, Salmo gairdneri. Ph.D. Dissertation, Department of Zoology, University of Guelph, 184 p.
- Bradley, T.J. et M.S. Parker, 1968. Binding of aluminum ions by Staphylococcus aureus 893. *Experientia*, 24: 1175-1176.
- Brogan, J.C., 1967. International Congress of Soil Science 8. Bucharest 3, 227.
- Brown V.M., T.L. Shaw et D.G. Shurben, 1974. Aspects of water quality and the toxicity of copper to rainbow trout. *Water Res.*, 8:797-803.
- Burrows, W.D., 1977. Aquatic aluminium: chemistry, toxicology and environmental prevalence. Chemical Rubber Co., Crit. Rev. *Environ. Control*, 7:167-216.
- Cameron, R.S., G.S.P. Ritchie et A.D. Robson, 1986. Relative toxicities of inorganic aluminum complexes to barley. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 50: 1231-1236.
- Campbell, P.G.C. et P.M. Stokes, 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 2034-2049.

- Chang, P.S.S., D.F. Malley, N.E. Strange et J.F. Klaverkamp, 1983. The effects of low pH, selenium and calcium on the bioaccumulation of ^{203}Hg by seven tissues of the crayfish, Orconectes virilis, p.45-67. Dans: Proceedings 8th Ann. Aquat. Toxicity Workshop, N.K. Kaushik et K.R. Solomon (éds), Can. Tech. Report Fish Aquat. Sci., No 1151, Fisheries and Oceans Canada.
- Clark, K.K. et B.D. LaZerte, 1985. A laboratory study of effects of aluminum and pH on amphibian eggs and tadpoles. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42:1544-1551.
- Clarkson, D.T., 1966. Effect of aluminum on the uptake and metabolism of phosphorus by barley seedlings. Plant Physiol., 41:165-172.
- Clarkson, D.T., 1967. Interactions between aluminum and phosphorus on root surfaces and cell wall material. Plant Soil, 27:347.
- Clarkson, D.T., 1969. Metabolic aspects of aluminum toxicity and some possible mechanisms for resistance, p.381-397. Dans: Ecological Aspects of the Mineral Nutrition of Plants, I.H. Rorison (éd.), Blackwell, Oxford, UK.
- Clarkson, D.T. et J. Sanderson, 1969. The uptake of a polyvalent cation and its distribution in the root apices of Allium cepa. Tracer and autoradiographic studies. Planta, 89:136-154.
- Crist, R.H., K. Oberholser, N. Shank et M. Nguyen, 1981. Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. Environ. Sci. Technol., 15:1212-1217.
- Cronan, C.S. et C.L. Schofield, 1979. Aluminium leaching response to acid precipitation: effects on high elevation watersheds in the Northeast. Science, 204: 304-306.
- Cusimano, R.F., D.F. Brakke et G.A. Chapman, 1985. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (Salmo gairdneri). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 43:1497-1503.
- DeBoni, U., J.W. Scott et D.R. Crapper, 1974. Intracellular aluminum binding; a histochemical study. Histochem., 40: 31-37.
- Dickson, W., 1978. Some effects of the acidification of Swedish lakes. Verh. Int. Verein. Limnol., 20:851-856.
- Dickson, W., 1980. Properties of acidified waters, p. 75-83. Dans: Ecological Impact of Acidic Precipitation, D. Drablos et A. Tollan, (éds), Oslo: SNSF Project.

- Doyle, R.J., T.H. Matthews et U.N. Streips, 1980. Chemical basis for selectivity of metals ions by the Bacillus subtilis cell wall. *J. Bacteriol.*, 143:471-480.
- Driscoll, C.T. Jr., J.P. Baker, J.J. Bisogni Jr. et C.L. Schofield, 1980. Aluminium speciation in dilute acidified waters and its effects on fish. *Nature*, 284: 161-164.
- Driscoll, C.T. et W.D. Schecher, 1988. Aluminum in the environment, p. 59-122. Dans: *Aluminum and its Role in Biology*. H. Sigel (éd.), Marcel Dekker Inc., New York.
- Dupont, J. et Y. Grimard, 1989. A simple dose-effect model of lake acidity in Québec (Canada). *Water Air Soil Pollut.* 44:259-272.
- Florence, T.M., B.G. Lumsden et J.J. Fardy, 1983. Evaluation of some physico-chemical techniques for the determination of the fraction of dissolved copper toxic to the marine diatom Nitzschia closterium. *Anal. Chim. Acta*, 151: 281-295.
- Florence, T.M., 1991. Communication personnelle, CSIRO, Lucas Height, NSW, Australie.
- Foy, C.D., G.R. Burns, J.C. Brown et A.L. Fleming, 1965. Differential aluminum tolerance of two wheat varieties associated with plant-induced pH changes around their roots. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 29:64-67.
- Foy, C.D., A.L. Fleming et G.C. Gerloff. 1972. Differential aluminum tolerance in two snapbean varieties. *Agron. J.*, 64:815-818.
- Foy, C.D., 1974. Effects of aluminum on plant growth, p. 601-642. Dans: *The Plant Root and Its Environment*, E.W. Carson (éd.), University Press of Virginia, Charlottesville, VA.
- Foy, C.D., R.L. Chaney et M.C. White, 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29:511-523.
- Foy, C.D., 1983. The physiology of plant adaptation to mineral stress. *Iowa State J. of Res.*, 57:355-391.
- Foy, C.D., 1984. Physiological effects of hydrogen, aluminium and manganese toxicities in acid soils. Dans: *Soil acidity and liming*, F. Adams (éd.), *Agronomy* 12:57-97.
- Gensemer, R.W. at S.S. Kilham, 1984. Growth rates of five freshwater algae in well-buffered acidic media. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41:1240-1243.

- Giesy, J.P., G.J. Laversee et D.R. Williams, 1977. Effects of naturally occurring aquatic organic fractions on cadmium toxicity to Simocephalus serrulatus (Daphnidae) and Gambusia affinis (Poeciliidae). *Wat. Res.*, 11:1013-1020.
- Giesy, J.P., A. Newell et G.J. Laversee, 1983. Copper speciation in soft, acid, humic waters: effects on copper bioaccumulation by and toxicity to Simocephalus serrulatus (Daphnidae). *Sci. Total Environ.*, 28: 23-36.
- Gonçalves, M.L.S., L. Sigg, M. Reutlinger et W. Stumm, 1987. Metal ion binding by biological surfaces: voltammetric assessment in the presence of bacteria. *Sci. Total Environ.*, 60:105-119.
- Grahn, O., H. Hultberg et L. Lander, 1974. Oligotrophication-a selfaccelerating process in lakes subjected to excessive supply of acid substances. *Ambio*, 3:93-94.
- Gunn, A.M., E.T.E. Hunt et D.A. Winnard, 1986. Aluminium speciation and its effect on toxicity in a bacterial assay. *Water Research Centre, Medmenham, U.K.*, document ER 1338-M, 26 p.
- Guy, R.D. et A.R. Kean, 1980. Algae as a chemical speciation monitor-1: a comparison of algal growth and computer calculated speciation. *Wat. Res.*, 14:891-899.
- Hansen, H.J. et P.G.C. Campbell, 1987. Aluminum speciation in rivers on the Canadian Precambrian Shield (Côte-Nord du Saint-Laurent, Québec) during snowmelt, p. 372-379. Dans: *Acid Rain: Scientific and Technical Advances*. R.Perry, R.M. Harrison, J.N.B. Bell et J.N. Lester (éds), Selper Ltd., London, U.K.
- Harding, J.P.C. et B.A. Whitton, 1977. Environmental factors reducing the toxicity of zinc to Stigeoclonium tenue. *Brit. Phycol. J.*, 12:17-21.
- Hargreaves, J. W. et B.A. Whitton, 1976. Effect of pH on the tolerance of Hormium rivulare to zinc and copper. *Oecologia*, 26:235-243.
- Harrison, G.I. et F.M.M. Morel, 1983. Antagonism between cadmium and iron in the marine diatom Thalassiosira weissflogii. *J. Phycol.*, 19:495-507.
- 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. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43: 687-693.
- Haug, A., 1984. Molecular Aspects of Aluminum Toxicity, *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 1:345-373.

- Havas, M., 1986. A hematoxylin staining technique to locate sites of aluminum binding in aquatic plants and animals. *Water Air Soil Pollut.*, 30:735-741.
- Hecht-Buchholz, C. et C.D. Foy, 1981. Effect of aluminum toxicity on the mucilage of barley root tips, p.343-345. Dans: *Structure and Function of Plant Roots*, R. Brouwer et al., (éds), Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague, Pays Bas.
- Helliwell, S., G.E. Batley, T.M. Florence et B.G. Lumsden, 1983. Speciation and toxicity of aluminum in a model fresh water. *Environ. Technol. Lett.*, 4: 141-144.
- Hem, J.D., 1968. Aluminum species in water, p. 98-114. Dans: *Advances in Chemistry, Series 73: Trace Inorganics in Water*. Chapitre 4, Am. Chem. Soc., Washington, DC.
- Hendrey, G.R. et R.E. Wright, 1976. Acid precipitation in Norway. *J. Great Lakes Res.*, 2: 192-207.
- Henriksen, A., O.K. Skogheim et B.O. Rosseland, 1984. Episodic changes in pH and aluminium-speciation kill fish in a Norwegian salmon river. *Vatten*, 40:255-260.
- Hornstrom, E., C. Ekstrom et M.O. Duraini, 1984. Effects of pH and different levels of aluminium on lake plankton in the Swedish West Coast Area. Institute of Freshwater Research Drottningholm, Report No. 61: 115-127.
- Howard, D.D. et F. Adams, 1965. Calcium requirement for penetration of subsoils by primary cotton roots. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 29: 558-562.
- Hsu, P.H., 1977. Aluminum hydroxides and oxyhydroxides, pp. 99-143. Dans: *Minerals in Soil Environments*. J.B. Dixon et S.B. Weed (éds), Soil. Sci. Soc. Am., Madison, WI.
- Hue, N.V., G.R. Craddock et F. Adams, 1986. Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 50:28-34.
- Jackson, T.A., 1975. Humic matter in natural waters and sediments. *Soil Sci.*, 119:56-64.
- Jenne, E.A., 1979. Chemical Modeling in Aqueous Systems, A.C.S. Symp. Ser. No. 93. American Chemical Society, Washington, DC, 893 p.

- Jensen, T.E., M. Baxter, J.W. Rachlin et V. Jani, 1982. Uptake of heavy metals by Plectonema boryanum (Cyanophyceae) into cellular components especially polyphosphate bodies: an X-ray energy dispersive study. *Environ. Pollut. (Series A)*, 27:119-127.
- Johannessen, M., A. Skartveit et R.F. Wright, 1980. Stream-water chemistry before, during and after snowmelt, p. 224-225. Dans: *Ecological Impact of Acidic Precipitation*, Drablos D. et A. Tollan (éds). SNSF Project, Norway.
- Johansson, G., 1962. On the crystal structure of basic aluminum sulfate $13\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{SO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. *Ark. Kemi.*, 20:321-342.
- Karlik, S.J., G.L. Eichhorn et D.R. Crapper McLachlan, 1980. Molecular interactions of aluminium with DNA. *Neurotoxicology*, 1:83-88.
- Kerndorff, H. et M. Schnitzer, 1980. Sorption of metals on humic acid. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 44:1701-1708.
- Kinraide, T.B., R.C. Arnold et V.C. Baligar, 1985. A rapid assay for aluminium phytotoxicity at submicromolar concentrations. *Physiol. Plant.*, 65:254-250.
- Kinraide, T.B. et D.R. Parker, 1987a. Cation amelioration of aluminum toxicity in wheat. *Plant Physiol.*, 83:546-551.
- Kinraide, T.B. et D.R. Parker, 1987b. Nonphytotoxicity of the aluminum sulfate ion, AlSO_4^- . *Physiol. Plant*, 71:207-212.
- Kinraide, T.B. et D.R. Parker, 1989. Assessing the phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 53:789-796.
- Kramer, J.R. et J. Humel, 1985. Aluminum toxicity to Notropis cornutus: Effects of complexes and histological studies, communication personnelle.
- Kulaev, I.S. et M. Vagabov, 1983. Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.*, 24:83-158.
- Kwiatkowski, R.E. et J.C. Roff, 1976. Effects of acidity on the phytoplankton and primary productivity of selected northern Ontario lakes. *Can. J. Bot.*, 54:2546-2561.
- Lachance, M., D. Brouard, R. Van Coillie et J.D. Dutil, 1983. Composition chimique des eaux de la rivière Sainte-Marguerite en période de fonte. *Wat. Pollut. Res. J. Can.*, 18:85-102.

- Lee, A. et R.W. Walker, 1984. Toxicity and binding of copper, zinc, and cadmium by the blue-green alga, Chroococcus parisi. *Water Air Soil Pollut.*, 23:129-139.
- Lindsay, W.L., 1979. *Chemical Equilibria in Soils*, pp. 34-49. J. Wiley and Sons Inc., New York, NY.
- Manahan, S.E., 1975. *The Nature and Composition of Natural Waters. Environmental Chemistry*, 2nd Ed., Willard Grant Press, Boston.
- Martell, A.E. et R.M. Smith, 1977. *Critical Stability Constants*, Vol. 3, Plenum Press, NY. 271 p.
- Matsumoto, H., F. Hirasawa, E. Torikai et E. Takakashi, 1976. Localization of adsorbed aluminum in pea root and its binding to nucleic acids. *Plant Cell Physiol.*, 17:127-137.
- Matsumoto, H. et S. Morimura, 1980. Repressed template activity of chromatin of pea roots treated by aluminium. *Plant Cell Physiol.*, 21:951-959.
- McLaughlin, S., 1977. Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces. *Curr. Topics Membr. Transport*, 9:71-144.
- McLean, F.T. et B.E. Gilbert, 1927. The relative aluminum tolerance of crop plants. *Crop Sci.*, 24:163-175.
- McLean, I.B., 1980. Masters Abstr., Michigan State Univ., East Lansing. Univ. Microfilms Int. 1314642, Ann Arbor, Mich., Vol. 18: 259.
- Mierle, G. et P.M. Stokes, 1976. Heavy metal tolerance and metal accumulation by planktonic algae. *Trace Subst. Environ. Health*, 10:113-122.
- Morel, F.M.M., 1983. *Principles of Aquatic Chemistry*, J. Wiley and Sons Inc., New York, NY, pp. 300-308.
- Morel, F.M.M. et N.M.L. Morel-Laurens, 1983. Trace metals and plankton in the oceans: facts and speculations, p. 841-869. Dans: *Trace Metals in Sea Water*, C.S. Wong, E. Boyle, K.W. Bruland, J.D. Burton et E.D. Goldberg (eds), Plenum Press, New York, NY.
- Morimura, S., E. Takahashi et H. Matsumoto, 1978. Association of aluminium with nuclei and inhibition of cell division in onion (Allium cepa) roots. *Z. Pflanzenphysiol.*, 88:395-401.
- Muniz, I.P. et H. Leivestad, 1980. Acidification-effects on freshwater fish, p. 84-92. Dans: *Proc. Int. Conf. Ecol. Impact Acid Precip.* SNSF project, Oslo, Norway.

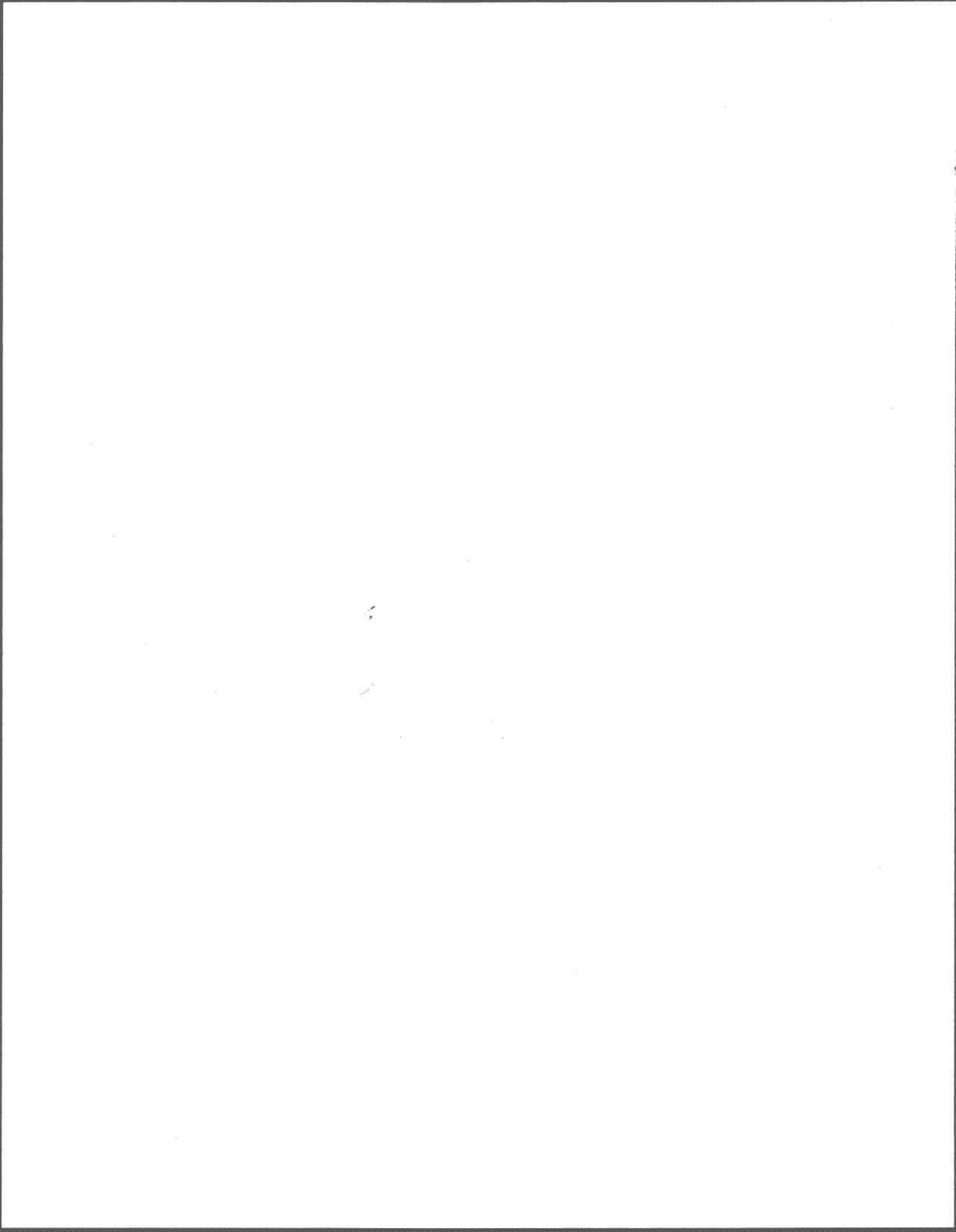
- Nalewajko, C. et B. Paul, 1985. Effects of manipulations of aluminium concentrations and pH on phosphate uptake and photosynthesis of planktonic communities in two Precambrian Shield lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 1946-1953.
- Nelson, W.O. et P.G.C. Campbell, 1991. The effects of acidification on the geochemistry of Al, Cd, Pb and Hg in freshwater environments: a literature review. *Environ. Pollut.* 71:91-130.
- Nelson, P.O., A.K. Chung et M.C. Hudson, 1981. Factors affecting the fate of heavy metals in the activated sludge process. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 53:1323-1333.
- Neville, C.M. et P.G.C. Campbell, 1988. Proposed mechanisms of aluminium toxicity in a dilute, acidic environment to fingerlings and older life stages of salmonids. *Water Air Soil Pollut.*, 42:311-327.
- Nordstrom, D.K. et H.M. May, 1989. Aqueous equilibrium data for mononuclear aluminum species, pp. . Dans: *The Environmental Chemistry of Aluminum*, G. Sposito (éd.), CRC Press, Boca Raton, FL.
- NRCC (National Research Council of Canada), 1981. Acidification in the Canadian Environment. National Research Council of Canada, Assoc. Committee Sci. Criteria Environ. Quality, Report No. NRCC 18475, 369 p.
- NRCC (National Research Council of Canada), 1986. Aluminum in the Canadian Environment. National Research Council of Canada, Assoc. Committee Sci. Criteria Environ. Quality, Report No. NRCC 24759, 331 p.
- Nyholm, N.E.I., 1981. Evidence of involvement of aluminium in causation of defective formation of eggshells and of impaired breeding in wild passerine birds. *Environ. Res.*, 26:363-371.
- Odonnel, A.R., G. Mance et R. Norton, 1984. A review of the toxicity of aluminium in fresh water. Water Research Centre, Medmerham, U.K., Technical Report TR 197, 27 p.
- Pagenkopf, G.K., 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environ. Sci. Technol.*, 17: 347-352.
- Parent, L., P.G.C. Campbell et P.M. Stokes, 1987. Manganese bioavailability towards freshwater algae in acidified environments, p. 415-419. Dans: *Acid Rain: Scientific and Technical Advances*, R. Percy, R.M. Harrison, J.N.B. Bell et J.N. Lester (éds), Selper Ltd., London, U.K.

- Parker, D.R., Kinraide T.B. et L.W. Zelazny, 1988a. Aluminum speciation and phytotoxicity in dilute hydroxy-aluminum solutions. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 52:438-444.
- Parker, D.R., L.W. Zelazny et T.B. Kinraide, 1988b. Comparison of three spectrophotometric methods for differentiating mono- et polynuclear hydroxy-aluminum complexes. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 52:67-75.
- Parker D.R., T.B. Kinraide et L.W. Zelazny, 1989. On the phytotoxicity of polynuclear hydroxo-aluminium complexes. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 53: 789-796.
- Parks, G.A., 1972. Free energies of formation and aqueous solubilities of aluminum hydroxides and oxide hydroxides at 25°C. *Am. Min.*, 57:1163-1189.
- Peterson, H.G., F.P. Healy et R. Wagemann, 1984. Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 974-979.
- Peterson, H.G. et F.P. Healy, 1985. Comparative pH dependent metal inhibition of nutrient uptake by Scenedesmus quadricauda (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 21:217-222.
- Petersen, R., 1982. Influence of copper and zinc on the growth of a freshwater alga, Scenedesmus quadricauda: the significance of chemical speciation. *Environ. Sci. Technol.*, 16: 443-447.
- Pettersson, A., L. Hallbom et B. Bergman, 1985a. Physiological and structural responses of the cyanobacterium Anabaena cylindrica to aluminium. *Physiol. Plant*, 63:153-158.
- Pettersson, A., L. Kunst, B. Bergman et G. M. Roomans, 1985b. Accumulation of aluminium by Anabaena cylindrica into polyphosphate granules and cell walls: an X-ray energy-dispersive microanalysis study. *J. Gen. Microbiol.*, 131:2545-2548.
- Plankey, B.J., H.H. Patterson et C.S. Cronan, 1986. Kinetics of aluminum fluoride complexation in acidic waters. *Environ. Sci. Technol.*, 20:160-165.
- Prakash, A. et M.A. Rashid, 1968. Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: Dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.*, 13:598-606.
- Rai, L.C., J.P. Gaur et H.K. Kumar, 1981. Protective effects of certain environmental factors on the toxicity of zinc, mercury and methylmercury to Chlorella vulgaris. *Environ. Res.*, 25:250-259.

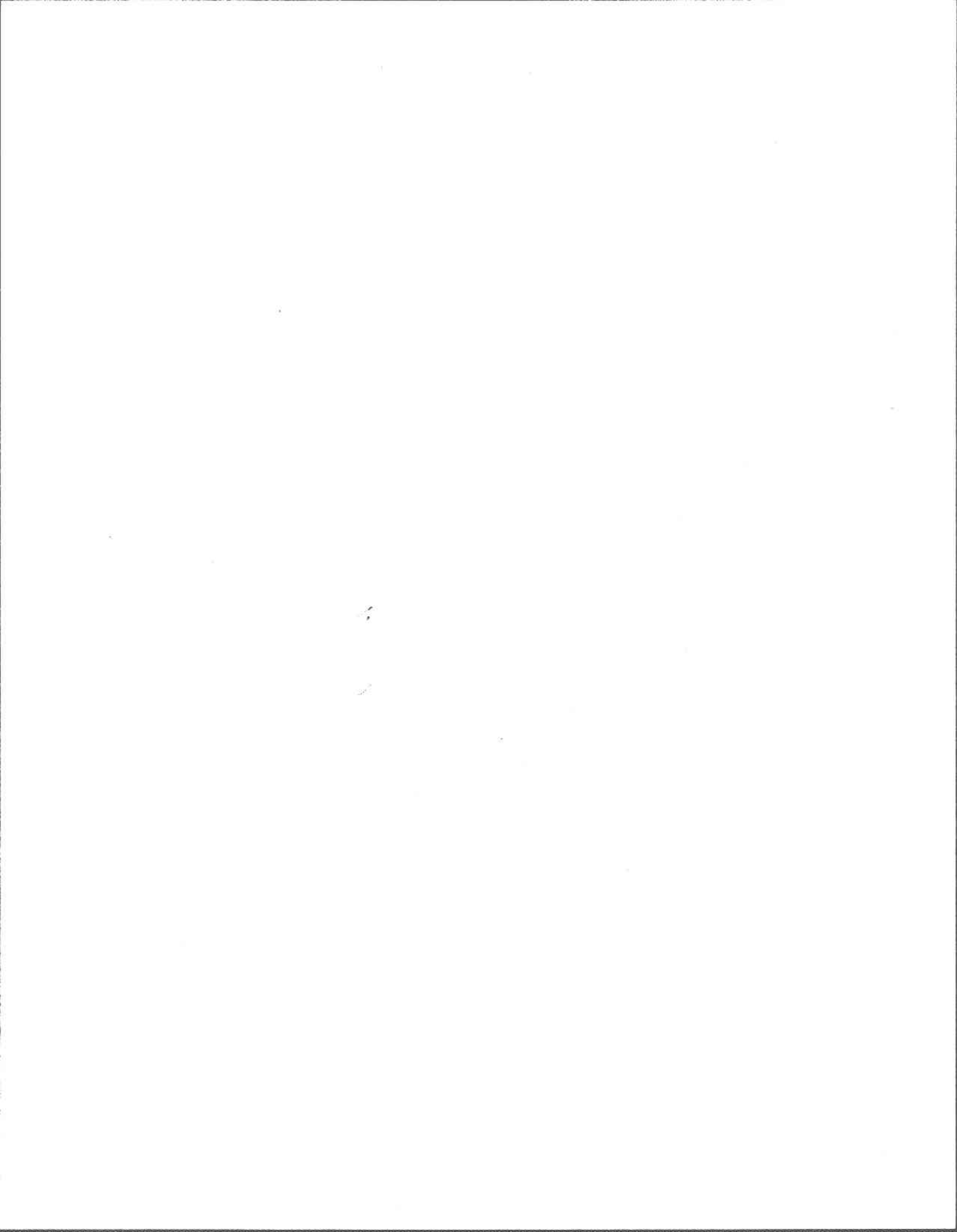
- Raven, J.A., 1980. Nutrient transport in microalgae, p. 47-226. Dans: Adv. Microb. Physiol., A.H. Rose et J.G. Morris (éds), Vol. No. 21, Academic Press, New York, NY.
- Rubin, A.J., 1985. Aqueous chemistry of aluminum (III). An introduction and brief review of the literature, Dans: U.S. EPA Workshop on aluminum, Las Vegas, Oct. 85. 9p.
- Sadiq, M. et W.L. Lindsay, 1979. Selection of standard free energies of formation for use in soil chemistry, pp. 79-128. Colorado State Univ. Exp. Sta. Tech. Bull., 134 p.
- Sakaguchi T., T. Tsuji, A. Nakajima et T. Horikoshi, 1979. Accumulation of cadmium by green microalgae. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 8:207-245.
- Sampson, M., Clarkson, D.T. et D.D. Davies, 1965. DNA synthesis in aluminium-treated roots of barley roots of barley. Science, 148: 1476-1477.
- Schenck R.C., A. Tessier et P.G.C. Campbell, 1988. The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. Limnol. Oceanog., 33:538-550.
- Schindler, D.W., R.H. Hesslein, R. Wagemann et W. S. Broecker, 1980. Effects of acidification on mobilization of heavy metals and radionuclides from sediments of a lake. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 37:373-377.
- Schofield, C.L. et J.R. Trojnar, 1980. Aluminium toxicity to fish in acidified waters, p. 341-346. Dans: Polluted Rain, T.Y. Toribara, M.W. Miller et P.E. Morrows (éds), Plenum Press, New York, NY.
- Shehata, F.H.A. et B.A. Whitton, 1982. Zinc tolerance in strains of the blue-green alga Anacystis nidulans. Brit. Phycol. J., 17:5-12.
- Siegel, N. et A. Haug, 1983. Calmodulin dependent formation of membrane potential in barley root plasma membrane vesicles: A biochemical model of aluminium toxicity in plants. Physiol. Plant, 59:285-291.
- Smith, R.M., 1971. Relations among equilibrium aqueous species of aluminium hydroxy complexes, pp. 250-279. Dans: Nonequilibrium Systems in Natural Water Chemistry, Chap.10, J.D. Hem (éd.), ACS Advances in Chemistry Series No. 106, Am.Chem. Soc., Washington, DC.
- Stary, J., K. Kratzer et J. Prasilova, 1983. Systematic study of the cumulation of elements on alga. Toxicol. Environ. Chem., 7:47-61.

- Steemann Nielsen, E., L. Kamp-Nielsen et S. Wium-Andersen, 1969. The effect of deleterious concentrations of copper on the photosynthesis of Chlorella pyrenoidosa. *Physiol. Plant*, 22:1121-1123.
- Steemann Nielsen, E. et L. Kamp-Nielsen, 1970. The influence of deleterious concentrations of copper on the growth of Chlorella pyrenoidosa. *Physiol. Plant*, 23: 828-840.
- Stokes, P.M., 1986. Ecological effects of acidification on primary producers in aquatic ecosystems. *Water Air Soil Pollut.*, 30: 421-438.
- Stumm, W. et J.J. Morgan, 1981. *Aquatic chemistry. Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters*, 2nd ed., J. Wiley and Sons Inc., New York, NY.
- Sunda, W.G. et S.A. Huntsman, 1983. Effect of competitive interactions between manganese and copper on cellular manganese and growth in estuarine and oceanic species of the diatom Thalassiosira. *Limnol. Oceanogr.*, 28: 924-934.
- Sunda, W.G. et J.A.M. Lewis, 1978. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, Monochrysis lutheri. *Limnol. Oceanogr.*, 23:870-876.
- Tanaka, A., T. Radano, K. Yamamoto et N. Kanamura, 1987. Comparison of toxicity to plants among Al^{3+} , $AlSO_4^+$ et Al-F complex ions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 33:43-55.
- Taylor, G.J., 1988. The physiology of aluminum phytotoxicity, p. 123-163. Dans: *Aluminium and its role in Biology, Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 24. Sigel H. et A. Sigel (éds). Marcel Dekker, inc., USA, 440p.
- Turner, R.C. et G.J. Ross, 1969. Conditions in solution during the formation of gibbsite in dilute aluminum salt solutions. III. Hydroxyaluminum products of reactions during the neutralization of aluminum chloride solutions with sodium hydroxide. *Can. J. Soil. Sci.*, 49:389-396.
- Turner, R.C. et G.J. Ross, 1970. Conditions in solution during the formation of gibbsite in dilute aluminum salt solutions. 4. Effect of Cl concentration and temperature and a proposed mechanism for gibbsite formation. *Can. J. Chem.*, 48:723-729.
- Turner, R.C. et W. Sulaiman, 1971. Kinetics of reactions of 8-quinolinol and acetate with hydroxyaluminum species in aqueous solutions. 1. Polynuclear hydroxyaluminum cations. *Can. J. Chem.*, 49:1683-1687.

- Viestra, R. et A. Haug, 1978. The effect of Al^{+3} on the physical properties of membrane lipids in Thermoplasma acidophilum: Biochem. Biophys. Res. Commun., 84:138-143.
- Viola, R.E., J.F. Morrison et W.W. Cheland, 1980. Interactions of metal (III)-adenosine 5'-triphosphate complexes with yeast hexokinase. Biochemistry, 19:3131-3137.
- Wagatsuma, T. et K. Yamasahu, 1985. Relationship between differential aluminum tolerance and plant-induced pH change of medium among barley cultivars. Soil Sci. Plant Nutr. 31:521-235.
- Wilkinson, K.J., P.G.C. Campbell et P. Couture, 1990. Effect of fluoride complexation on aluminum toxicity towards juvenile Atlantic salmon (Salmo salar). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 47:1446-1452.
- Wood J.M., 1974. Biological cycles for toxic elements in the environment. Science, 183:1049-1052.
- Wright, R.F. et E. Snekvic, 1978. Acid precipitation: chemistry and fish populations in 700 lakes in southernmost Norway. Verh. Int. Verein. Limnol., 20:765-775.
- Wright, R.J., V.C. Baligar et S.F. Wright, 1987. Estimation of phytotoxic aluminum in soil solution using three spectrophotometric methods. Soil Sci., 144:224-232.
- Zhao, X.-J., Sucoff, E. et E.J. Stadelmann, 1987. Al^{3+} and Ca^{2+} alteration of membrane permeability of Quercus rubra root cortex cells. Plant Physiol., 83: 159-162.

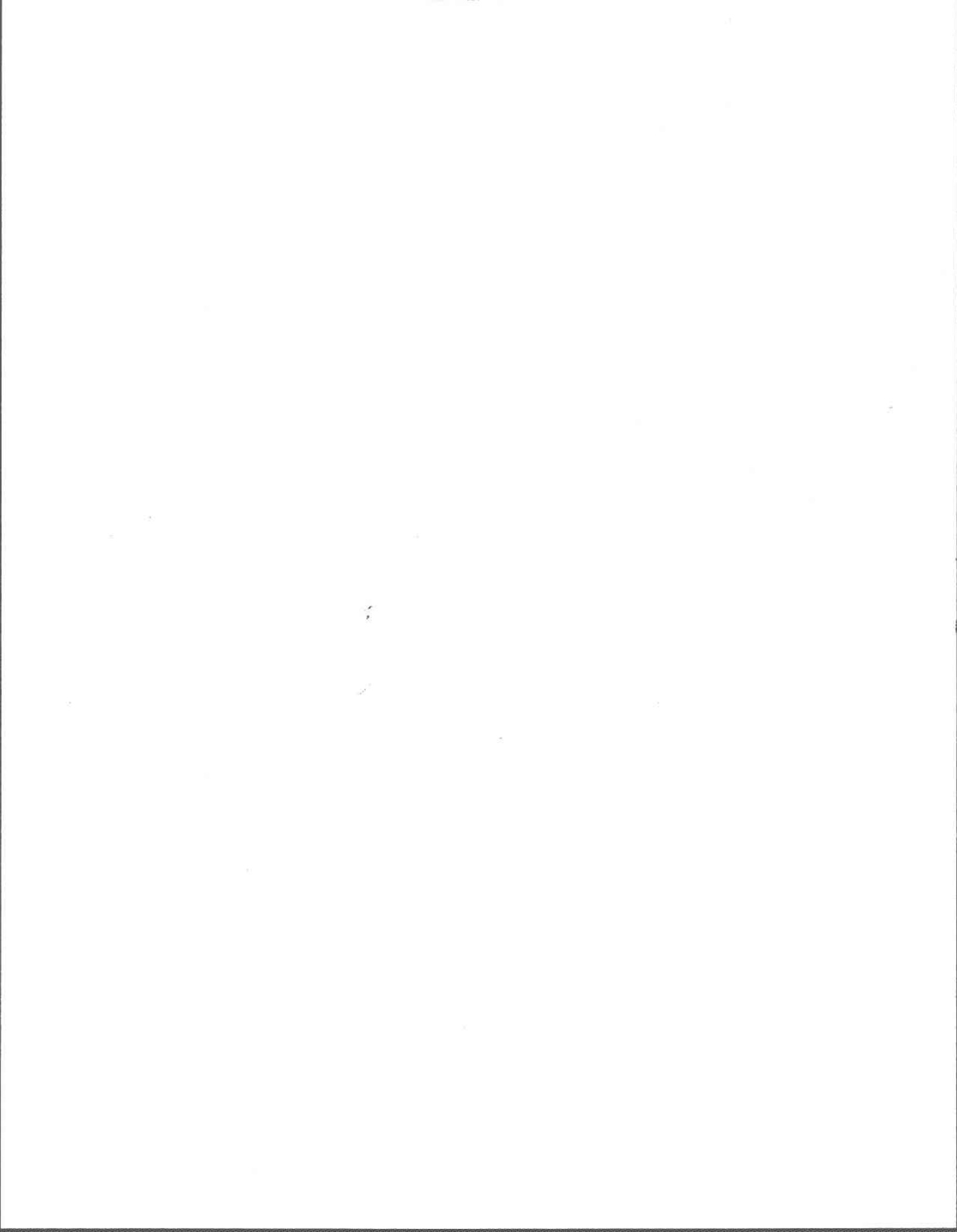


CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES



CHAPITRE 2 : MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

	Page
2.1 Approche générale.....	76
2.1.1 Spéciation de l'aluminium.....	76
2.1.2 Biodisponibilité de l'aluminium.....	77
2.2 Analyses.....	79
2.2.1 Généralités analytiques.....	79
2.2.2 Spéciation de l'aluminium.....	81
2.2.3 Analyse de l'aluminium et du manganèse.....	84
2.2.4 Digestion des algues.....	90
2.2.5 Analyse du phosphore.....	91
2.2.6 Analyse du carbone organique dissous.....	93
2.3 Organisme et conditions de croissance.....	94
2.4 Milieu d'exposition pour (AAP-P-MT, tampon 0.01 M).....	96
2.5 Protocole expérimental.....	97
2.5.1 Mesure de la croissance.....	97
2.5.2 Mesure de la prise en charge des métaux.....	99
2.6 Références.....	102



CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce chapitre décrit l'approche expérimentale et les techniques de base utilisées dans les expériences présentées dans les chapitres suivants. Une description spécifique et plus détaillée apparaît dans la section "Matériel et méthodes" de chacun de ces chapitres.

2.1 Approche générale

L'approche expérimentale implique des mesures parallèles de spéciation d'aluminium et de biodisponibilité d'aluminium (bioaccumulation/toxicité) dans des solutions synthétiques de composition connue (variables: $[Al]_T$, pH).

2.1.1 Spéciation de l'aluminium

La détermination de la spéciation de l'aluminium est réalisée selon deux approches différentes mais complémentaires (Florence et Batley, 1980; Florence, 1982; Campbell et Tessier, 1988), l'une expérimentale et l'autre théorique.

1- La méthode expérimentale implique la détermination des propriétés physiques (taille) et/ou des réactivités chimiques (c.a.d. comportement d'échange ionique) de l'aluminium. Ainsi, pour déterminer la spéciation de l'aluminium, des techniques

expérimentales (filtration, échange d'ions, chélation-extraction) sont utilisées pour estimer les contributions relatives de l'aluminium inorganique dissous, organique dissous et de l'aluminium colloïdale (Campbell et al., 1983; Driscoll, 1984; LaZerte, 1984; Seip et al., 1984).

2- La méthode théorique consiste en calculs thermodynamiques impliquant l'utilisation des concentrations totales ($[M]_T$, $[L]_T$), du pH et des valeurs publiées des constantes de stabilité qui servent à calculer la contribution à l'équilibre des différentes espèces (Jenne, 1979). Un modèle d'équilibre chimique (ex.: MINEQL-Westall et al., 1976) est utilisé pour calculer la spéciation théorique de l'aluminium, soit la distribution de l'aluminium parmi ses différentes formes inorganiques (Al^{+3} , $Al(OH)_x$, AlF_x , $Al_n(OH)_n$).

2.1.2 Biodisponibilité de l'aluminium

La biodisponibilité de l'aluminium est évaluée par l'utilisation d'une algue unicellulaire (Chlorella pyrenoidosa) sensible à l'aluminium (Helliwell et al., 1983) en suivant son accumulation et ses effets sur l'inhibition de sa croissance.

Les bioessais sont réalisés en milieu synthétique défini ($[Al]$, pH, $[F]$...). Une attention particulière est portée pour différencier entre les changements survenant dans la solution expérimentale, c.-à-d. les changements de spéciation, et ceux qui

surviennent à l'interface biologique (e.g. changements de la chimie de surface, de la perméabilité de membrane). La contamination et les pertes en aluminium par précipitation ou par adsorption sur les parois de contenants sont minimisées.

Les cellules sont prélevées de leur milieu de culture tôt pendant la phase exponentielle de croissance (réserves intracellulaires en éléments nutritifs suffisamment élevées pour permettre une croissance soutenue dans le milieu contenant l'aluminium, qui ne peut contenir des phosphates ni des silicates), et la croissance est évaluée pendant 5 jours (Helliwell et al., 1983).

Puisqu'il convient de faire varier la spéciation de l'aluminium inorganique en changeant le pH (Helliwell et al., 1983; Clark et LaZerte, 1985) on doit se préoccuper de l'influence de ces changements de pH sur l'interface biologique elle-même (Peterson et al., 1984; Campbell et Stokes, 1985). Pour évaluer l'importance de cet effet chez les algues unicellulaires, on y fait varier le pH dans des expériences de contrôle (sans Al) et on suit la perméabilité des cellules (sorbitol-¹⁴C) et les propriétés de surface (en employant comme indicateur les ions Mn^{+2} dont le pourcentage d'ion libre ne change pas dans la gamme de pH 4.5 à 7.0). De plus on effectue des titrages des suspensions d'algues (Stary et al., 1983) afin de caractériser les propriétés acide-base de la surface algale. De la même manière, on évalue l'influence de changements de pH sur le taux de croissance de l'algue test. Les expériences décrites permettent de vérifier l'applicabilité du modèle d'interaction $Al(OH)_n +$ cellule algale.

2.2 Analyses

2.2.1 Généralités analytiques

Sauf avis contraire, les réactifs utilisés dans la présente étude sont de grade analytique. L'eau ultrapure employée pour la préparation des solutions de réactifs ou d'étalons analytiques provient d'un système commercial (Millipore Milli Q3-RO/Milli Q2). Ce système implique d'abord de l'osmose renversée, suivie de l'échange ionique, d'un traitement au charbon actif et d'une filtration finale (0.2 μm).

Afin d'éviter la contamination en aluminium par la verrerie, seule la vaisselle en polyéthylène, en polypropylène ou en Teflon^R est employée. Avant son utilisation, elle est mise à tremper dans de l'acide nitrique dilué (20% v/v; 24 h) et ensuite elle est rincée 6 fois à l'eau désionisée puis finalement 3 fois à l'eau ultrapure.

Aucune contamination en aluminium et en manganèse n'a été détectée ($< 3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Al; $< 0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Mn) dans les solutions.

Le tableau 2.1 décrit les méthodes analytiques employées pour mesurer les différents paramètres d'intérêt dans la présente étude.

Tableau 2.1 Résumé des méthodes analytiques employées dans les laboratoires de l'INRS-eau (Tiré de Campbell et al., 1989).

Paramètre	Méthodes analytique
Carbone organique	Conversion en CO ₂ par digestion humide en milieu oxydant et sous irradiation UV, puis mesure de conductivité après combinaison avec une solution de NaOH dans un autoanalyseur.
pH	Mesure par électrode sélective aux ions H ⁺ . Etalonnage à l'aide de solutions tampon commerciales.
Al total	Mesure par spectrophotométrie d'absorption atomique au four de graphite après acidification de 0.5% V/V avec de l'acide nitrique ultrapur (Ultrex). Etalonnage à l'aide de dilutions d'une solution étalon commerciale d'aluminium.
Al dissous	Comme dans le cas précédent sauf que la portion d'échantillon est filtrée sur membrane de polycarbonate (0.40 µm; Nuclepore) avant l'acidification.
Al monomère total	Filtration sur membrane de polycarbonate (0.40µm; Nuclepore) et réaction avec le catéchol violet à pH 5.6, puis mesure de l'absorbance du complexe formé à 590 nm à l'aide d'un autoanalyseur.
Al monomère organique	Comme dans le cas précédent sauf que l'échantillon est passé sur une colonne à échange de cations avant la réaction colorimétrique.
Phosphore	Oxydation du phosphore total en orthophosphates dissous; formation d'un complexe phospho-molybdate d'antimoine; formation d'un complexe de couleur bleu après réduction à l'acide ascorbique; mesure colorimétrique par autoanalyseur Technicon.

2.2.2 Spéciation de l'aluminium

La solution est d'abord filtrée sur une membrane en polycarbonate (0.4 μm Nuclepore; membrane rincée au préalable à l'eau ultrapure) ce qui permet de distinguer l'aluminium total et l'aluminium dissous. Cette procédure a déjà été testée pour son efficacité (pas de pertes d'aluminium ni de contamination: Campbell et al., 1983).

Dans un deuxième temps la contribution de formes monomères et polymères de la solution est déterminée pour connaître la spéciation chimique de l'aluminium. La technique utilisée s'inspire de celle décrite dans Rogeberg et Henriksen (1985) et utilise l'échange cationique pour différencier l'aluminium inorganique de l'aluminium associé à la matière fulvique ou humique (Campbell et al., 1983; 1989; Driscoll, 1984). L'aluminium est dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique au four de graphite (Al total; Al filtrable) ainsi que par colorimétrie. Cette dernière étape implique la réaction de l'aluminium avec le catéchol violet, un réactif colorimétrique qui, à pH 5.6 et pour de courts temps de réaction, ne réagit qu'avec l'aluminium monomère (Dougan et Wilson, 1974).

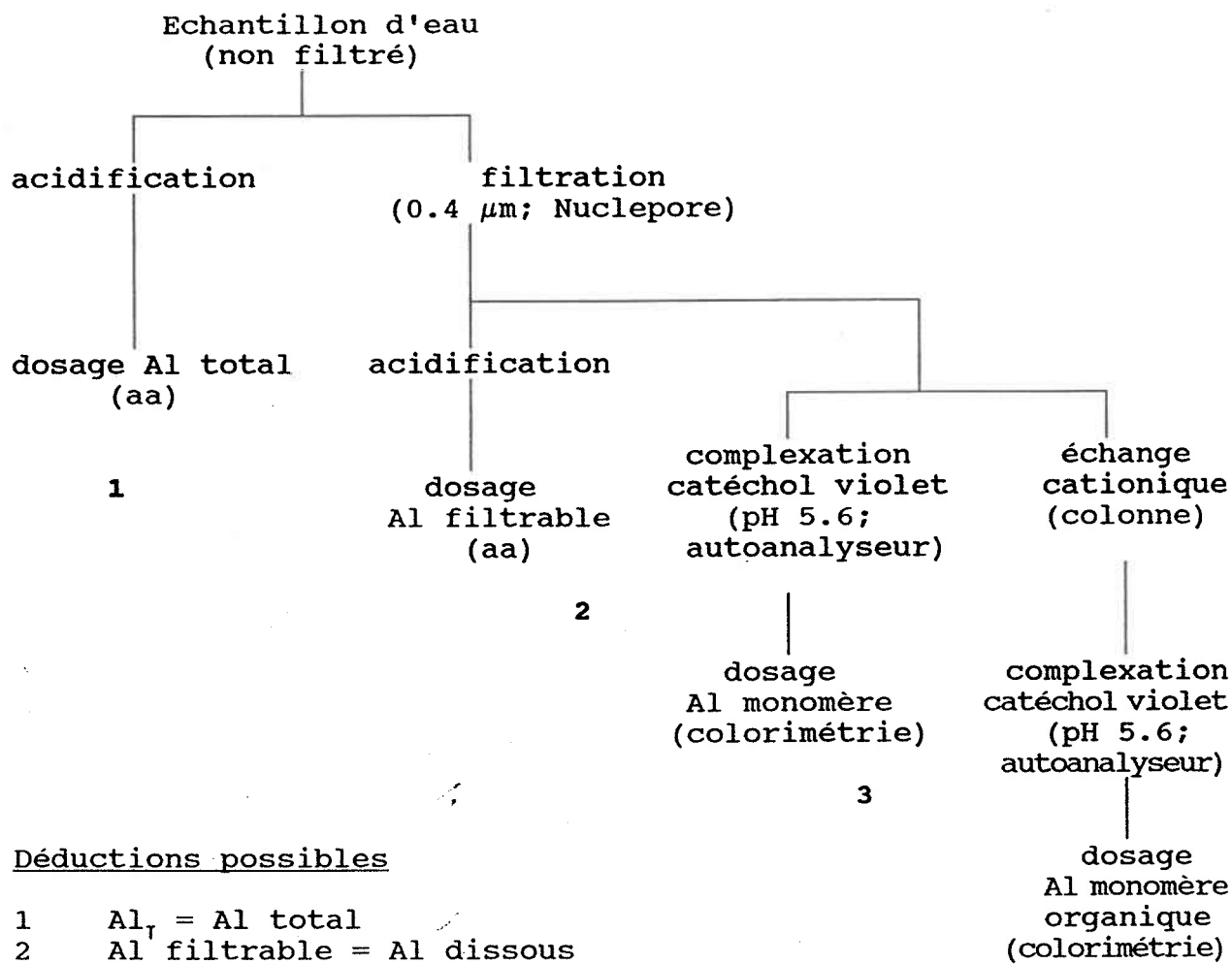
Cette approche analytique permet de différencier entre l'aluminium particulaire, l'aluminium dissous monomère (inorganique

ou organique) et l'aluminium colloïdal ou polynucléaire. Le schéma analytique est présenté à la figure 2.1.

La distribution de l'aluminium, parmi ses différentes formes inorganiques monomères, est calculée à partir des valeurs de pH, de $[F]_T$ et de $[SO_4]_T$, à l'aide d'un modèle mathématique rendant compte des équilibres chimiques impliqués (Westall et al., 1976; Campbell et al., 1982; 1984a, b). Le modèle mathématique tient compte des formes d'aluminium suivantes:

aquo ion	Al^{+3}
hydroxo-complexes	$AlOH^{+2}$, $Al(OH)_2^+$, $Al(OH)_4^-$
fluoro-complexes	AlF^{+2} , AlF_2^+ , AlF_3 , AlF_4^- , AlF_5^{2-} , AlF_6^{3-}
sulfato-complexes	$AlSO_4^+$, $Al(SO_4)_2^-$
précipité d'hydroxyde d'aluminium	$Al(OH)_3(s)$

Notons que cette liste ne comprend pas de complexes polynucléaires ni de complexes organiques. Nous avons donc employé les valeurs d'aluminium inorganique monomère comme données d'entrée pour le modèle mathématique. Les résultats numériques ainsi obtenus, quoique très révélateurs, doivent être considérés prudemment à cause de l'imprécision liée aux données thermodynamiques de base (Nordstrom et al., 1979; Schecher et Driscoll, 1987).



Déductions possibles

- 1 $Al_T = Al \text{ total}$
- 2 $Al_{filtrable} = Al \text{ dissous}$
- 1-2 $Al \text{ particulaire}$
- 3 $Al_{CV} = Al \text{ monomère (inorganique + organique)}$
- 4 $Al_{CVR} = Al \text{ monomère organique}$
- 2-3 $Al \text{ polynucléaire}$
- 3-4 $(Al_{CV}) - (Al_{CVR}) = Al \text{ monomère inorganique}$

Figure 2.1: Schéma analytique pour déterminer la spéciation de l'aluminium (voir Rogeberg et Henriksen, 1985). (aa: spectrophotométrie d'absorption atomique au four de graphite). Tiré de Campbell et al. (1989).

2.2.3 Analyse de l'aluminium et du manganèse

Aluminium total et dissous

L'aluminium total ainsi que l'aluminium dissous sont mesurés par spectrophotométrie d'absorption atomique au four de graphite (spectrophotomètre Varian, série SpectrAA-30; four-échantillonneur: GTA-96). Les échantillons sont préservés au préalable à 4°C au réfrigérateur après acidification avec 0.5% de HNO₃ concentré Ultrex dans des bouteilles de polyéthylène.

Le programme utilisé pour la mesure est le suivant:

longueur d'onde: 309.3 nm

fente: 0.5 nm

courant de la lampe: 5.0 mA

calibration: absorbance

gaz porteur: Argon (Normal), azote (Alterné)

correcteur de bruit de fond: off

conc. / 0.25 μ A: 125 μ g · L⁻¹

Etape	Temp. (°C)	temps (s)	débit	type	lecture
1	75	5	3	Alt	
2	100	30	3	Alt	
3	150	25	3	Alt	
4	1000	5	3	N	
5	1000	10	3	N	
6	1000	2	0		
7	2500	1.2	0		OUI
8	2500	1	0		OUI
9	2550	2	3	N	

Un modificateur de matrice est utilisé pour empêcher l'interférence majeure due à la précipitation de l'aluminium sous l'effet de la chaleur sous la forme de Al_2O_3 . Le modificateur utilisé vise à complexer l'aluminium. Il s'agit d'un mélange de Triton X-100 et de EDTA qui permet l'atomisation à plus faible température.

Cette technique permet une limite de détection de $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'aluminium. La gamme de travail se situe entre 3 et $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'Al. Selon l'expertise du laboratoire de l'INRS-eau, la précision de la méthode est de 2% à une concentration de $23.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et la justesse égale 4% d'écart à une concentration de $23.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les échantillons certifiés utilisés sont le SLRS-1 du CNRC. La valeur certifiée est de $23.5 \pm 1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Aluminium monomère organique et monomère total

La méthode utilisée pour mesurer l'aluminium monomère organique et monomère total est basée sur la réaction de l'aluminium avec le pyrocatechol violet en incorporant une colonne à échange d'ions adaptée à un autoanalyseur Technicon.

Afin d'éviter la complexation du fer avec le pyrocatechol violet, on ajoute de la phénanthroline ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Celle-ci a une constante de complexation plus élevée avec le fer qu'avec le pyrocatechol violet avec le fer.

Les échantillons prélevés pour ces analyses ne sont pas acidifiés mais sont conservés à 4°C au réfrigérateur dans une bouteille de polyéthylène. L'appareillage, le schéma de montage et le protocole analytique sont décrits dans le document de méthodes analytiques du laboratoire de l'INRS-Eau (1989).

La limite de détection de cette méthode est de 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La gamme de travail se situe de 3 à 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Selon des tests effectués au laboratoire de l'INRS-eau, la précision est de 6.3% à une concentration de 15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et à 2.3% à une concentration de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. L'échantillon certifié utilisé est le même qu'en absorption atomique: SLRS-1 du CNRC. Par contre celui-ci ne sert qu'à titre indicatif car sa fiabilité n'a pas encore été démontrée pour cette technique puisqu'il n'est pas évident que tout l'aluminium contenu dans l'échantillon SLRS-1 soit présent sous forme monomère.

Aluminium dans les tissus biologiques

Après avoir digéré les échantillons d'algues (voir section 2.2.4) l'aluminium dans les solutions acides résultantes de la digestion est mesuré par spectrophotométrie d'absorption atomique au four de graphite. Entre l'étape de digestion et l'analyse, les échantillons sont conservés au réfrigérateur à 4°C.

Le spectrophotomètre utilisé est le même que pour l'aluminium total et dissous. Les conditions d'utilisation sont les suivantes:

longueur d'onde: 309.3 nm

fente: 0.5 nm

courant de la lampe: 5.0 mA

calibration: absorbance

gaz porteur: Argon (Normal), azote (Alterné)

correcteur de bruit de fond: off

conc. / 0.25 μA : 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Etape	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	temps (s)	débit	type	lecture
1	75	5	3	Alt	
2	100	30	3	Alt	
3	150	25	3	Alt	
4	1000	5	3	N	
5	1000	10	3	N	
6	1000	2	0		
7	2500	1.2	0		OUI
8	2500	1	0		OUI
9	2550	2	3	N	

Dans ce cas-ci on utilise aussi un modificateur de matrice soit le Triton X-100 et l'EDTA. La limite de détection pour des échantillons standards (NBS) de feuilles de citronnier pesant 1 g est de 1 μg . La précision varie beaucoup selon la concentration de l'échantillon: 6 % à une concentration de 74.1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 20% à une concentration de 123 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. La justesse est évaluée à 16% d'écart à une concentration de 92 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ et à 1.5% pour une concentration de 39.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Les échantillons certifiés utilisés sont les feuilles de citronnier du NBS qui ont une valeur certifiée de $92 \pm 15 \mu\text{g Al}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec.

Manganèse total et dissous

Le manganèse total et dissous est mesuré par spectrophotométrie d'absorption atomique au four de graphite (Spectrophotomètre Varian, série SpectrAA-30; four-échantillonneur Varian GTA-96). Les échantillons sont conservés au réfrigérateur à 4°C dans des bouteilles en polyéthylène ou en Teflon^R. Les conditions d'analyses au four de graphite sont les suivantes:

longueur d'onde: 279.5 nm

fente: 0.2 nm

courant de la lampe: 5.0 mA

calibration: hauteur de pic

température d'injection: 40°C

gaz porteur: Argon + azote

correcteur de bruit de fond: on

conc. / $0.50 \mu\text{A}$: $8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Etape	Temp. (°C)	temps (s)	débit	type	lecture
1	75	5	3	Azote	
2	110	30	3	Azote	
3	200	20	3	Argon	
4	900	2	3	Argon	
5	900	5	3	Argon	
6	900	2	0	Argon	
7	2500	0.8	0	Argon	OUI
8	2500	2	0	Argon	OUI
9	2550	1	3	Argon	

Aucune interférence n'a été relevée pour cette analyse. La limite de détection pour le manganèse est de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La gamme de travail se situe entre 0.50 et $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La précision est de 4% à une concentration de $1.7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Aucun échantillon certifié n'est présentement disponible pour le manganèse.

Manganèse dans les digestions d'algues

La même méthode décrite pour l'analyse du manganèse total et dissous est utilisée pour l'analyse du manganèse dans les solutions résultantes des digestions d'algues. Les feuilles de citronnier sont utilisées comme échantillon certifié ($23 \pm 2 \mu\text{g Mn}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec).

2.2.4 Digestion des algues

Après filtration des suspensions d'algues, les filtres (filtres Nuclepore, 0.4 μm) sont rincés avec le milieu expérimental ne contenant ni algues ni métaux puis transposés dans un pétri et mis à sécher dans un four à 70°C pendant plus de 24 h ou jusqu'à ce que les échantillons aient un poids constant pendant 3 jours consécutifs après un séjour de 24 heures au dessiccateur. Les filtres sont ensuite déposés délicatement dans une bombe de Teflon[®] avec 0.5 mL d'acide nitrique concentré (Ultrex). Les digestions sont pratiquées dans un bain marie pendant 15 minutes à 100°C. Les bombes sont alors immédiatement asséchées et laissées de côté sous la hotte à flux laminaire pour que leur température retombe à la température de la pièce (12 heures). On ajoute ensuite 4.5 mL d'eau ultrapure pour dilution. A cette étape, les échantillons sont prêts à l'analyse pour leur contenu en Mn ou en Al.

Toutes les manipulations à l'exception des digestions sont faites sous la hotte à flux laminaire.

Des échantillons standards de feuilles de citronnier sont traités de façon identique pour chaque expérience afin de vérifier la validité de la digestion et de l'analyse (citrus leaves, NBS No. 1572: [Al] = $92 \pm 15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; [Mn] = $23 \pm 2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Parallèlement, des blancs (réactifs digérés sans échantillon biologique) sont mesurés.

2.2.5 Analyse du phosphore

Le phosphore est mesuré par autoanalyseur Technicon après digestion et transformation du phosphore total en orthophosphates. La méthode d'analyse est basée sur la formation d'un complexe de couleur bleu par réduction à l'acide ascorbique du complexe phospho-molybdate d'antimoine formé à partir de molybdate d'ammonium, de tartrate de potassium et d'antimoine.

On récolte 50 mL de la suspension d'algues dans un ballon volumétrique. Les solutions sont alors digérées en ajoutant 0.4 g de persulfate de potassium et 2% d'acide sulfurique et en les autoclavant à 250°C pendant 20 minutes. Après jaugeage à l'eau Millipore, les orthophosphates sont mesurés par autoanalyseur Technicon. La limite de détection est de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en P. La gamme de travail se situe entre 10 et 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en P. La précision est de 2% à une concentration de 60 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Le protocole analytique est décrit dans le document de méthodes analytiques du laboratoire de l'INRS-eau (INRS-eau, 1989).

2.2.6 Analyse du carbone organique dissous

Les concentrations en matière organique dissous, exprimées en $\text{mg C}\cdot\text{L}^{-1}$, sont obtenues à l'aide d'un auto-analyseur Technicon muni d'un dispositif "DIC-DOC" selon la technique mise au point au Ministère de l'Environnement du Québec (Ministère de l'Environnement du Québec, 1986).

Une fois l'échantillon acidifié avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4 1N; $\text{pH} < 2$) le carbone inorganique est éliminé par un courant d'argon. On ajoute ensuite du persulfate de potassium (0.15 M) et on irradie à la lumière ultraviolette. La matière organique est alors transformée en acide carbonique absorbé dans une solution de NaOH (0.0017 N). La concentration en carbone organique dissous est ensuite déterminée par une mesure de la conductivité électrique à partir de la conductivité équivalente limite à 25°C du NaOH et du Na_2CO_3 .

La conductivité électrique diminue proportionnellement avec la quantité de gaz carbonique absorbé dans la solution. La sensibilité de la méthode est de $0.80 \mu\text{mhos}\cdot\text{cm}^{-1}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pour une concentration de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. La limite de détection en carbone organique dissous est de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbone. La gamme de travail se situe entre 1.0 et $20.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ou entre 0.1 et $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbone. La précision a été déterminée comme étant de 0.5% pour une concentration de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et à 2.4% pour une concentration de

1.0 mg·L⁻¹. Ces caractéristiques sont déterminées à partir de standards "faits maison" produits à l'INRS-Eau, où, à partir d'une solution de 1000 mg·L⁻¹, des sous-échantillons de 0.1 et 20 mg·L⁻¹ sont mesurés 10 fois.

2.3 Organisme et condition de croissance

Pour toutes les expériences effectuées on utilise une algue verte (Chlorophyta) unicellulaire: Chlorella pyrenoidosa, fréquemment employée (Helliwell et al., 1983; Colman et al., 1986) en laboratoire à cause de la facilité à la faire croître et à la manipuler. Il s'agit d'une Chlorococcacea de l'ordre des Chlorococcales.

Cette algue unicellulaire est caractérisée par sa forme sphérique ayant un diamètre de 6 à 12 µm. On la retrouve solitaire ou agrégée. Ces cellules sont rondes ou ellipsoïdes et ses chloroplastes sont pariétaux ou plats. La reproduction se déroule à partir du protoplaste de la cellule mère pour former 4 ou 8 cellules filles (non mobiles).

Les cultures de Chlorella pyrenoidosa croissent dans le milieu AAP modifié par Chiaudani et Vighi (1978) dont la composition est présentée au tableau 2.2. Afin de minimiser la précipitation d'oxyde de fer dans le milieu de culture, le mélange de métaux traces et les macronutriments sont autoclavés séparément et sont

Tableau 2.2:

Composition du milieu AAP (Algal Assay Procedure) modifié (inspiré de Chiaudani et Vighi, 1978, et de Payne et Hall, 1978).

COMPOSES	CONCENTRATION FINALE (M)
----------	--------------------------

MACROELEMENTS

NaNO ₃	3.00 · 10 ⁻⁴
MgCl ₂	5.99 · 10 ⁻⁵
MgSO ₄	1.23 · 10 ⁻⁴
CaCl ₂	3.00 · 10 ⁻⁵
NaHCO ₃	1.79 · 10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	6.00 · 10 ⁻⁶

OLIGO-ELEMENTS

H ₃ BO ₃	3.00 · 10 ⁻⁶
MnCl ₂	2.10 · 10 ⁻⁶
ZnCl ₂	2.50 · 10 ⁻⁹
CoCl ₂	1.20 · 10 ⁻⁹
CuCl ₂	5.00 · 10 ⁻¹¹
Na ₂ MoO ₄	3.00 · 10 ⁻⁸
FeCl ₃	1.00 · 10 ⁻⁶
Na ₂ EDTA	8.00 · 10 ⁻⁷

La force ionique de ce milieu est de
1.034 · 10⁻³ M · L⁻¹ (avant l'ajout du tampon).

combinés de façon aseptique après refroidissement (Bates et al., 1982).

Les cultures axéniques de Chlorella pyrenoidosa sont placées dans un incubateur de type "Conviron" (modèle CMP 2023) où la température ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) et la luminosité de $115 \pm 5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ sont maintenues constantes. La lumière est produite par des tubes fluorescents froids et blancs.

Les algues sont cultivées en milieu semi-continu; la dilution du milieu de croissance à tous les cinq jours (1/5 jour) maintient la culture en croissance exponentielle. Pour obtenir une biomasse importante, les algues sont maintenues dans une bouteille de Teflon^R de deux litres transparente et sont aérées avec de l'air stérilisé et humidifié.

Les cultures d'algues sont testées pour leur axénicité dans un bouillon de culture BHI (Difco) 1/10. De façon à isoler des algues axéniques, la formation de colonies est vérifiée sur agar. L'agar est préparé en chauffant 100 mL de milieu AAP à 95°C dans un flacon de 200 mL au bain-marie, et en ajoutant lentement avec agitation 1.5% d'agar ($1.5 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$). Le tout est stérilisé à 121°C , 1034.2 mm Hg pour 20 à 35 min. Des pétris vides sont aussi stérilisés. La solution est ensuite refroidie jusqu'à environ 50°C et est versée dans des pétris (environ 20 mL/pétri) de façon aseptique. Les pétris sont laissés dans l'incubateur pour une

période de 24 h. On inocule l'agar à l'aide de tiges de platine stériles. On attend ensuite quelques jours jusqu'à la formation de colonies distinctes d'algues. La colonie la plus éloignée des colonies bactériennes est inoculée dans un nouveau milieu AAP. Après quelques jours, on vérifie si la stérilisation est efficace en procédant avec un bouillon de culture bactérienne.

Le pH des milieux est maintenu constant par l'utilisation de tampons dits biologiques et connus pour leur faible pouvoir de complexation (Martell et Smith, 1977). Les tampons ont été choisis judicieusement après plusieurs expériences qui sont décrites au chapitre 3. Pour maintenir le pH 4.5, on utilise DMGA (acide 3,3-diméthylglutarique), pour les pH 4 et $5 < \text{pH} < 6$: MES (acide 2-(N-morpholino)-éthanesulfonique); pour les pH > 7 : HEPES (acide N-2-hydroxyéthylpiperazine-N'-éthanesulfonique), (10^{-2}M).

2.4 Milieu d'exposition (AAP-P-MT, tampon 0.01 M)

La mise au point du milieu d'exposition utilisé pour Chlorella pyrenoidosa est décrite au chapitre 3. Ce milieu est sensiblement le même que le milieu de croissance sauf que le phosphore ainsi que les métaux traces en sont exclus. Le pH est ajusté finement avec du HCl et du NaOH 0.1 M, et est maintenu constant par l'utilisation de tampons biologiques. Les tampons employés n'ont pas de pouvoir élevé de complexation avec les métaux étudiés (Martell et Smith,

1977). Le choix des tampons est expliqué plus loin (3.3: Mise au point du milieu d'exposition).

2.5 Protocole expérimental

2.5.1 Mesure de la croissance

Toutes les expériences concernant les effets du pH, de l'Al ou du Mn sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa se déroulent dans un incubateur de type "Conviro" (modèle CMP 2023) où la température ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) et la luminosité de $115 \pm 5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ sont maintenues constantes. La lumière est produite par des tubes fluorescents froids et blancs. Les pH sont mesurés presque tous les jours. Les milieux expérimentaux sont toujours préparés au moins 24 heures avant le début de l'expérience afin de permettre un meilleur équilibre.

Les cellules sont comptées tous les jours avec un compteur à particules (Coulter Counter: modèle TA-II). Le volume cellulaire moyen (VCM) est obtenu en calculant la moyenne géométrique de la distribution des classes de taille. Considérant que les cellules sont sphériques, la surface cellulaire en est déduite à partir du rayon.

Le début de la phase exponentielle de ces algues correspond à environ 10^5 cellules $\cdot \text{mL}^{-1}$ (figure 3.1). C'est à cette concentration de cellules que les algues sont centrifugées à 6 000 tours $\cdot \text{min}^{-1}$

durant 20 minutes, dans des tubes de polycarbonate. Notons que selon Bates et al. (1982) la nature de la surface cellulaire n'est pas altérée de façon significative après ce traitement.

Après ce traitement, les algues sont rincées avec un milieu AAP modifié à pH déterminé (ne contenant ni phosphore, ni métal et de force ionique égale à $9.9 \cdot 10^{-4} \text{ M} \cdot \text{L}^{-1}$). Cette routine est répétée trois fois afin de s'assurer que, ni phosphore, ni métal, ne soit introduit dans les milieux expérimentaux. Le culot final des cellules est resuspendu dans un faible volume de milieu expérimental. Un millilitre de cette culture concentrée est transféré dans une bouteille de Teflon^R de 1 L contenant le milieu expérimental.

Au début de chacune des expériences, les cellules sont comptées et leur état morphologique apparent est caractérisé au microscope. La croissance est suivie sur une période moyenne de seulement 4 jours afin que les tests de toxicité effectués relatent bien l'effet du toxique et non pas le manque d'éléments nutritifs et d'autres facteurs limitants, où même les échantillons contrôles pourraient être affectés.

Les expériences sont répétées en triple pour chacun des traitements, que l'on compte deux fois. Les moyennes et les écart type sont calculés sur 3 répétitions. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à un témoin.

Les différences significatives entre les traitements sont testées par une analyse de variance à un critère de classification à un seuil de 5%. L'hypothèse principale que sous-tend cette analyse est l'égalité des moyennes ($H_0: \mu_1=\mu_2=\mu_3=\dots=\mu_k$). L'hypothèse inverse (H_1) veut qu' au moins deux moyennes soient différentes. De plus, l'analyse de variance suppose l'égalité des variances et la normalité des populations d'origine. Si des différences significatives sont calculées (H_1 acceptée), on procède à un test de comparaisons multiples Duncan (Duncan's multiple range test) qui permet d'identifier les échantillons différents (Scherrer, 1984). Lorsque des comparaisons de moyennes sont effectuées entre 2 échantillons, le test t de Student est utilisé avec un seuil de signification de 5%. Si l'égalité des variances n'est pas vérifiée ou si les échantillons ont des effectifs différents, on procède à une analyse non paramétrique: Kruskal-Wallis. L'analyse de variance s'effectue alors sur les rangs.

2.5.2 Mesure de la prise en charge des métaux

La prise en charge est mesurée à partir d'algues qui ont été mises en contact avec un métal. Après des périodes de temps bien déterminées, un aliquot d'algues est filtré sous faible pression, digéré et mesuré. On détermine ainsi la concentration totale en métal pris en charge par les algues (voir figure 2.2).

Afin de distinguer les métaux adsorbés des métaux absorbés, on procède à une extraction à l'EDTA (Bates et al., 1982). A chaque prise d'échantillons, une série parallèle est mise en contact avec 10^{-4} M de EDTA et $6 \cdot 10^{-4}$ M de chlorure de calcium (pour ajuster la force ionique) pendant une période d'au moins 20 minutes. L'échantillon est ensuite filtré, digéré et analysé pour déterminer la concentration en métal non-extractible à l'EDTA, qu'on appellera ici "cellulaire". Le métal adsorbé (ou extractible à l'EDTA) résulte de la soustraction entre le métal total et le métal cellulaire. Les concentrations sont exprimées en mole par surface cellulaire filtrée ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$).

Milieu expérimental

+

algues

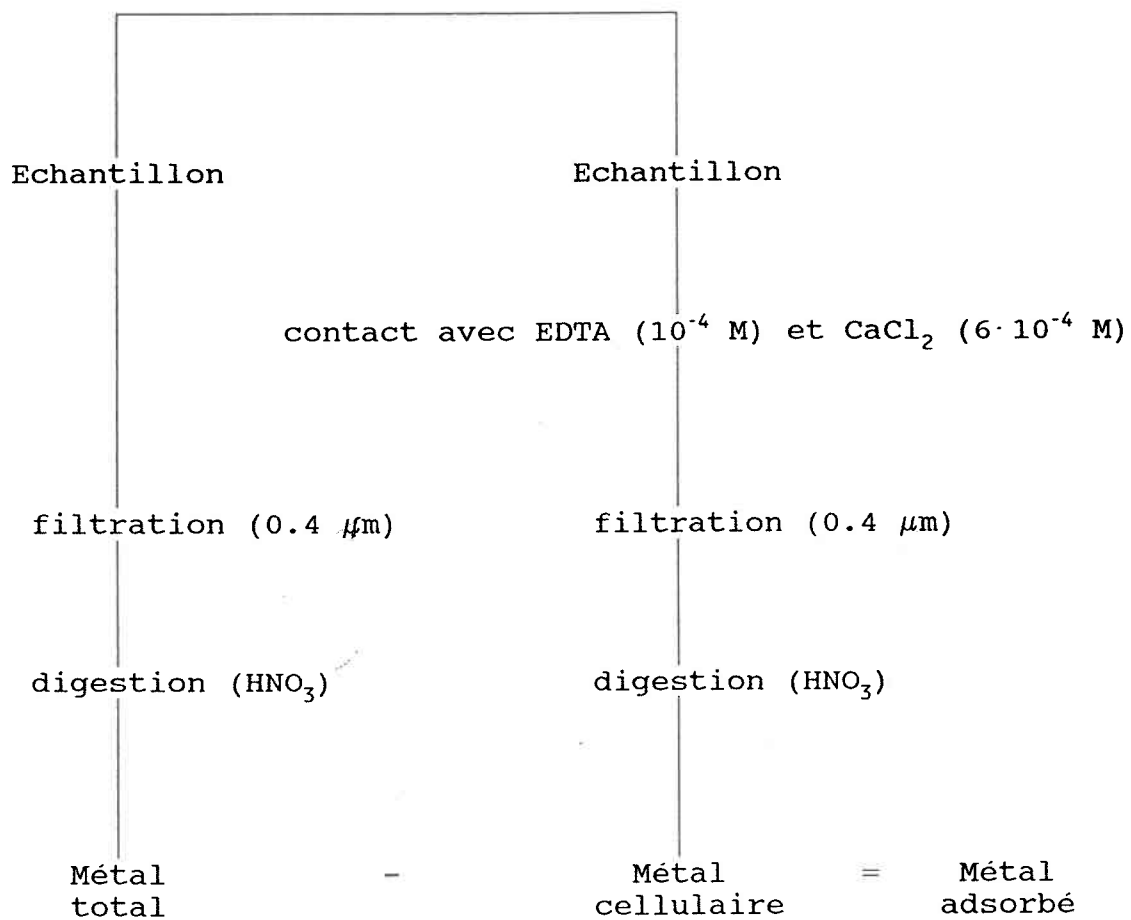


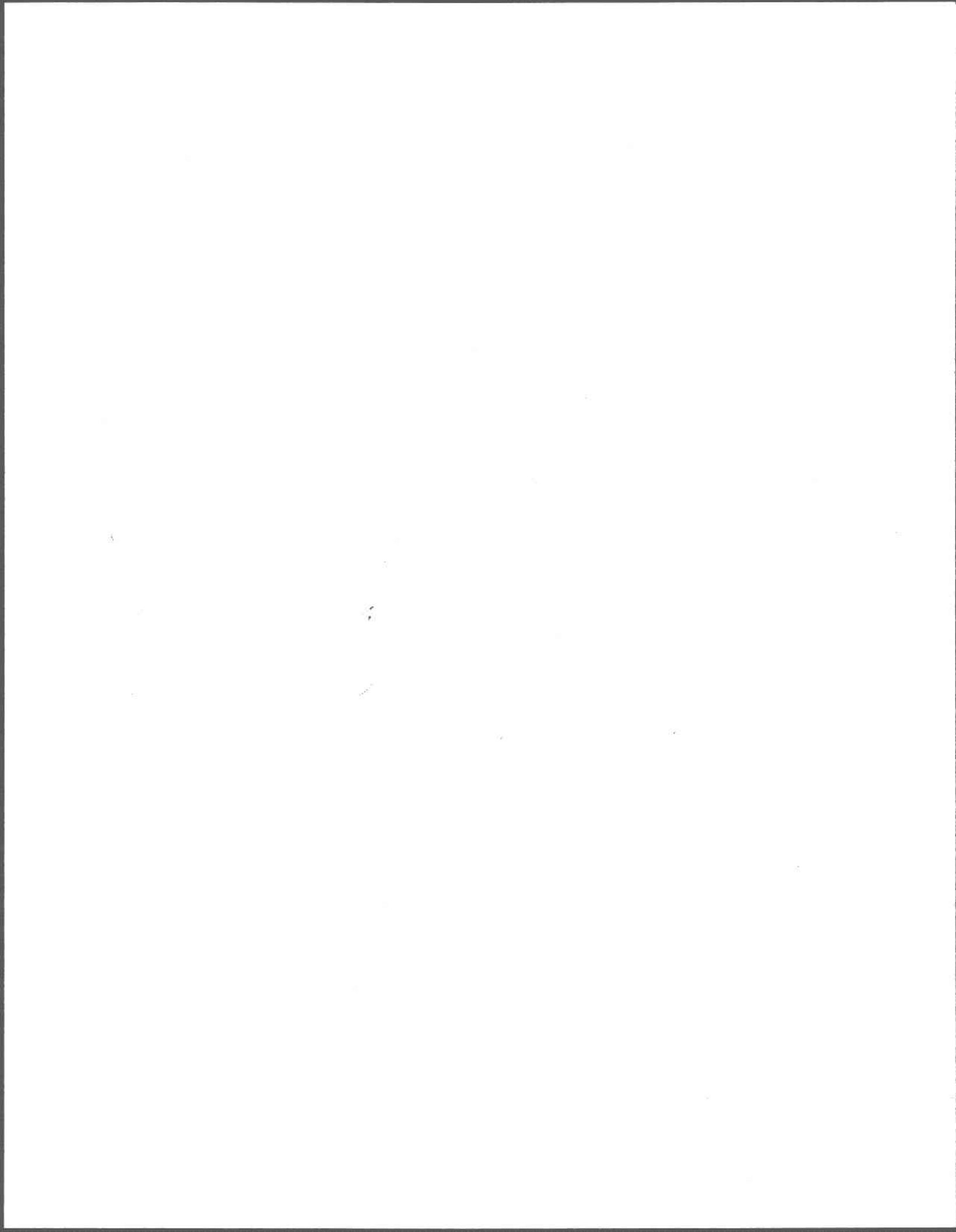
Figure 2.2 Diagramme présentant la technique utilisée pour distinguer le métal adsorbé du métal cellulaire.

2.6 Références

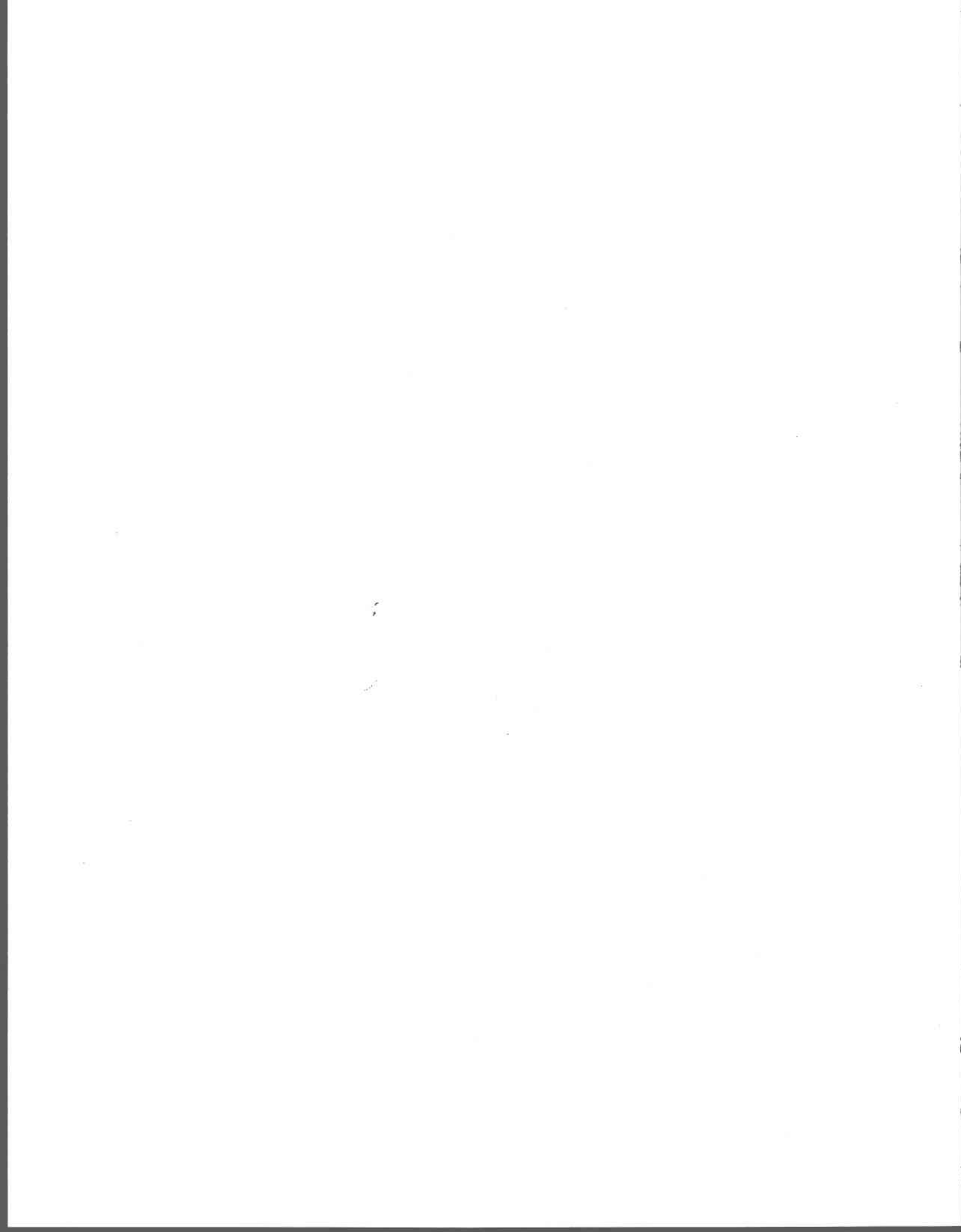
- Bates, S.S., A. Tessier, P.G.C. Campbell et J. Buffle, 1982. Zinc adsorption and transport by Chlamydomonas variabilis and Scenedesmus subspicatus (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. J. Phycol., 18:521-529.
- Campbell, P.G.C., B. Dubreuil et H.J. Hansen, 1989. Comportement géochimique de l'aluminium dans quelques rivières à saumon de la Côte-Nord (golfe du Saint-Laurent). Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat. No. 1697:x+ 63 p.
- Campbell, P.G.C., R. Bougie et A. Tessier, 1984a. Comportement géochimique de l'aluminium dans les eaux de la rivière Casette (bassin de la rivière des Escoumins) au cours de la fonte printanière 1984. INRS-Eau, rapport scientifique no 174, 38 p. (Pour le ministère des Pêches et des Océans).
- Campbell, P.G.C., R. Bougie, A. Tessier et J.P. Villeneuve, 1984b. Aluminium speciation in surface waters on the Canadian Pre-Cambrian Shield. Verh. Int. Verein. Limnol., 22: 371-375.
- Campbell, P.G.C., M. Bisson, R. Bougie, A. Tessier et J.P. Villeneuve, 1983. Speciation of aluminium in acidic freshwaters, Anal. Chem., 55:2246-2252
- Campbell, P.G.C., M. Bisson, J. Boisvert, R. Bougie, A. Tessier et J.P. Villeneuve, 1982. Méthodologie analytique pour déterminer la spéciation de l'aluminium dans les eaux lacustres en voie d'acidification. INRS-Eau, rapport scientifique no 145, 113 p., 1 annexe. (Pour Environnement Canada).
- Campbell, P.G.C. et P.M. Stokes, 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42: 2034-2049.
- Campbell G.C. et A. Tessier, 1988. Metal speciation in natural waters: Influence of environmental acidification, p.185-207. Dans: Advances in Chemistry Series 216: Sources and Fates of Aquatic Pollutants, Am. Chem. Soc., Washington, DC.
- Chiaudani, G. et M. Vighi, 1978. The use of Selenastrum capricornutum batch cultures in toxicity studies, Mitt. Int. Verein. Limnol., 21:316-329.
- Clark, K.K. et B.D. LaZerte, 1985. A laboratory study of effects of aluminum and pH on amphibian eggs and tadpoles. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42:1544-1551.

- Colman, B., P.C. Brickell et K.A. Gehl, 1986. The uptake of mannitol and sorbitol by a species of Chlorella (CHLOROPHYCEA). J. Phycol., 22, 436-440.
- Dougan, W.K. et A.L. Wilson, 1974. The absorptiometric determination of aluminum in water. A comparison of some chromogenic reagents and the development of an improved method. Analyst, 99: 413-430.
- Driscoll, C.T., 1984. A procedure for the fractionation of aqueous aluminium in dilute acidic waters. Int. J. Environ. Anal. Chem., 16:267-283.
- Florence, T.M. et G.E. Batley, 1980. Chemical speciation in natural waters. Crit. Rev. Anal. Chem., 9:219-296.
- Florence, T.M., 1982. The speciation of trace elements in waters. Talanta, 29:345-364.
- Helliwell, S., G.E. Batley, T.M. Florence et B.G. Lumsden, 1983. Speciation and toxicity of aluminum in a model fresh water. Environ. Technol. Lett., 4: 141-144.
- INRS-eau, 1989. Manuel des méthodes de laboratoire, Institut national de la recherche scientifique, juin 1989, 350p.
- LaZerte, B.D., 1984. Forms of aqueous aluminum in acidified catchments of central Ontario: a methodological analysis. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 41:766-776.
- Martell, A.E. et R.M. Smith, 1977. Critical Stability Constants, Vol. 3, Plenum Press, NY. 271 p.
- Ministère de l'Environnement du Québec, 1986. Eaux-Détermination du carbone organique dissous. Méthode conductivimétrique automatisée. Méthode MENVIQ. 86.01/303 - C 2.1.
- Nordstrom, D.K., L.N. Plummer, J.M.L. Wigley, T.J. Wolery, J.W. Ball, E.A. Jenne, R.L. Bassett, D.A. Crerar, T.M. Florence, B. Fritz, M. Hoffman, G.R. Holdren, G.M. Lafon, S.V. Mattigod, R.E. McDuff, F. Morel, M.M. Reddy, G. Sposito et J. Thrailkill, 1979. A comparison of computerized chemical models for equilibrium calculations in aqueous systems, p. 857-892. Dans: Chemical modeling in aqueous systems, E.A. Jenne (éd.), A.C.S. symposium Series No 93, Am. Chem. Soc., Washington, DC.
- Payne A.G. et Hall R.H., 1978. A method for measuring algal toxicity and its application to the safety assessment of new chemicals, pp. 171-180. Dans: Aquatic Toxicology, L.L. Marking et R.A. Kimerle (éds), ASTM STP 667, Am. Soc. Testing Materials, Philadelphia, PA.

- Peterson, H.G., F.P. Healy et R. Wagemann, 1984. Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 974-979.
- Rogeberg, E.J.S. et A. Henriksen, 1985. An automated method for fractionation and determination of aluminum species in freshwaters. *Vatten*, 41: 48-53.
- Schecher, W. D. et C. T. Driscoll, 1987. An evaluation of uncertainty associated with aluminum equilibrium calculations. *Wat. Resour. Res.* 23:525-534.
- Scherrer, B. 1984. *Biostatistique* (éd.) Gaëtan Morin, Montréal, PQ. 850 p.
- Seip, H.M., Muller, L. et A. Naas, 1984. Aluminium speciation: comparison of two spectrophotometric analytical methods and observed concentrations in some acidic aquatic systems in Southern Norway. *Water Air Soil Pollut.*, 23:81-95.
- Stary, J., K. Kratzer et J. Prasilova, 1983. Systematic study of the cumulation of elements on alga. *Toxicol. Environ. Chem.*, 7:47-61.
- Westall, J.C., J.L. Zachary et F.M.M. Morel, 1976. MINEQL, a Computer Program for the Calculation of the Chemical Equilibrium Composition of Aqueous Systems. *Mass. Inst. Technol, Dep. Civ. Eng. Rep. No.18*, 91 p.



CHAPITRE 3 : EFFET DU pH SUR LA CROISSANCE DE CHLORELLA PYRENOIDOSA



CHAPITRE 3: EFFET DU pH SUR LA CROISSANCE DE CHLORELLA PYRENOIDOSA

Page

3.1	Introduction.....	108
3.2	Matériel et méthodes.....	112
3.2.1	Conditions de croissance.....	112
3.2.2	Conditions expérimentales.....	114
3.2.3	Protocole expérimental.....	116
3.3	Mise au point du milieu d'exposition.....	118
3.3.1	Utilisation de tampons biologiques.....	118
3.3.2	Discussion.....	128
3.4	Sélection du paramètre de croissance.....	130
3.4.1	Biomasse finale (cellules \cdot mL ⁻¹).....	134
3.4.2	Taux de croissance moyen (μ -moyen).....	138
3.4.3	Taux de croissance maximal (μ -max).....	139
3.4.4	Aire sous la courbe de croissance (A).....	141
3.4.5	Superficie (m ²) et volume cellulaire (m ³).....	143
3.4.6	Conclusion.....	147
3.5	Effet du pH sur la croissance de <u>Chlorella pyrenoidosa</u> ..	148
3.6	Références.....	150

	Page
ANNEXE 3.A: Mise au point du milieu expérimental.....	154
A.A Milieu AAP; pH 5 (NaOAc); pH 6(MES); pH 7 (PIPES) (0.01M);.....	157
A.B Milieu AAP-T-MT; pH 5, 5.5, 6, 7;.....	160
A.C Milieu AAP-P-MT; pH 5 (NaOAc); pH 5.5, 6 (MES); pH 7 (PIPES) (0.001M);.....	163
A.D Milieu AAP-P-MT; pH 5 (NaOAc); pH 5.5, 6 (MES); pH 7 (PIPES) (0.01M);.....	165
A.E Milieu AAP-P-MT; pH 5, 5.5, 6 (MES); pH 7 (PIPES) (0.01M);.....	169
A.F Milieu AAP-P-MT; pH 4, 4.5 (MES, NaOAc); pH 5, 5.5, 6 (MES); pH (PIPES); (0.01 M);.....	171
A.G Milieu AAP-P-MT; pH 5, 5.5, 6 (MES); pH 7 (PIPES; HEPES); (0.01M);.....	174
A.H Milieu AAP-P-MT; pH 4, 4.5 (MES, DMGA); (0.01 M);..	177
A.I Milieu AAP-P-TM; pH 4, 4.5 (DMGA); (0.01 M);.....	180
Références.....	183

CHAPITRE 3: EFFET DU pH SUR LA CROISSANCE DE CHLORELLA PYRENOIDOSA

3.1 Introduction

La volonté d'étudier les effets biologiques des précipitations acides a suscité l'élaboration de milieux expérimentaux pouvant rendre compte des effets des ions hydrogène sur les organismes vivants. Les tampons dits biologiques sont maintenant utilisés couramment dans les bioessais (Good et al., 1966; Bates et al., 1982; Schenck et al., 1988) où les systèmes carbonates ne s'avèrent pas toujours adéquats. Par exemple, puisque dans les milieux oligotrophes québécois modérément acides (pH 5.0-6.5) les concentrations en HCO_3^- sont assez faibles ($< 100 \mu\text{Eq}\cdot\text{L}^{-1}$) (Bobée et al., 1982; Dupont, 1985), l'utilisation de systèmes $\text{CO}_3-\text{HCO}_3^-$ comme tampon pourrait biaiser les résultats.

Puisque le pH constitue une variable maîtresse pour à peu près toutes les réactions biochimiques, il peut influencer la croissance et la distribution des algues de différentes façons (Gensemer et Kilham, 1984). Un des effets possibles du pH est son influence sur les équilibres du système de carbone inorganique, qui contrôlent les formes chimiques devant servir comme source de carbone pour les algues autotrophes (Goldman et al., 1972; Talling, 1976; Gensemer et Kilham, 1984). Le pH ambiant détermine quelle forme de carbone prédomine, et des recherches ont démontré que le CO_2 ou le HCO_3^- sont utilisés différemment par les algues (Raven, 1970; Shapiro,

1973; Moss, 1973). Ceci explique pourquoi, par exemple, Scenedesmus (qui peut utiliser HCO_3^-) est généralement retrouvé dans les milieux neutres alors que Chlorella (qui utilise uniquement le CO_2) est restreinte à des conditions plus acides (Raven, 1970; Goldman et al., 1972; Gensemer et Kilham, 1984).

Les tampons contribuent de plus en plus de façon importante à l'étude de réactions biologiques en maintenant les concentrations en ions hydrogène constantes. Selon Good et al. (1966), les tampons les plus souhaitables pour les systèmes biologiques auraient les propriétés suivantes:

- 1) forte solubilité dans l'eau, mais solubilité limitée dans les solvants organiques, pour les préserver d'une accumulation dans la phase biologique (ne doit pas passer à travers les membranes biologiques);
- 2) contribution minimale en ions dans le milieu;
- 3) pK_a faiblement influencé par le milieu;
- 4) forment des complexes avec des cations biologiques qui sont solubles dans l'eau avec des constantes de liaison bien caractérisées;
- 5) n'interfèrent pas avec la spectrophotométrie à des longueurs d'onde plus élevées que 230 nm;
- 6) ne sont pas réactifs, mais stables et inertes;
- 7) ne doivent pas agir comme inhibiteurs de réactions biochimiques.

En général, selon les mêmes auteurs, les "bons tampons" seraient solubles dans l'eau, seraient des zwitterions avec une gamme de pH tamponnable de pH 6 à pH 10. Avec des tampons zwitterioniques, il est préférable de travailler sous le pK_a plutôt qu'au-dessus. L'inverse est vrai pour les tampons anioniques, spécialement pour les acides carboxyliques; avec ceux-ci il est habituellement préférable de travailler à un pH au dessus du pK_a où la plus grande partie du tampon est ionisée.

Les expériences décrites dans les chapitres suivants visent à étudier les interactions métaux-algues à différents pH. Dans ce cadre, l'objectif général de cette partie de la recherche est de mettre en évidence l'influence du pH seul sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa. Une telle approche permet de mieux cerner les effets toxiques respectifs des métaux et du pH et de mettre au point un milieu expérimental standard qui servira de milieu d'exposition.

Les objectifs spécifiques de cette recherche sont de mettre au point un milieu expérimental d'exposition adapté à l'étude des interactions métaux-organisme, de déterminer les effets du pH sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa, et de fixer les paramètres de croissance qui seront utilisés ultérieurement comme indicateurs de réponse biologique à des traitements aux métaux. Plusieurs expériences ont été menées afin de vérifier s'il y avait des effets

significatifs du pH sur la croissance de l'algue unicellulaire:
Chlorella pyrenoidosa.

Au total, 9 expériences se sont déroulées de juillet 1986 à juin 1987, et chacune d'elle présente des améliorations par rapport à la précédente. L'originalité de ces expériences tient du respect des conditions pour maintenir l'intégrité à la fois des cellules algales et de la chimie du milieu. En effet, les milieux d'exposition ne contiennent pas d'agents complexants significatifs (voir chapitre 2 pour la description du milieu d'exposition). De plus, comme les milieux d'exposition ne contiennent ni phosphore ni azote pouvant influencer la disponibilité et la spéciation des métaux, les cellules sont recueillies au début de leur phase exponentielle de croissance et transférées aux milieux d'exposition de façon à permettre un suivi continu de croissance sans ces éléments nutritifs sur une période de plusieurs jours (Helliwell et al., 1983).

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Conditions de croissance

Pour toutes les expériences effectuées, on utilise l'algue verte unicellulaire: Chlorella pyrenoidosa, fréquemment employée (Helliwell et al., 1983; Colman et al., 1986) en laboratoire à cause de la facilité à la faire croître et à la manipuler. Les cultures d'algues sont testées pour leur axénicité dans un bouillon de culture BHI (Difco) 1/10. Chlorella pyrenoidosa est cultivée dans un milieu AAP modifié par Chiaudani et Vighi (1978) dont la composition est présentée au tableau 2.1.

Tel que mentionné au chapitre précédent, la dilution du milieu de croissance à tous les cinq jours (1/5 par jour) maintient la culture en croissance exponentielle continue. Ainsi, les algues sont cultivées en milieu semi-continu. Les cultures axéniques de Chlorella pyrenoidosa sont placées dans un incubateur de type Conviron où la température ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) et la luminosité de $115 \pm 5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ sont maintenues constantes. La lumière est produite par des tubes fluorescents blancs. Pour obtenir une biomasse importante, les algues sont cultivées dans une bouteille de Teflon^R de deux litres transparente et sont aérées avec de l'air stérilisé et humidifié.

La courbe de croissance typique obtenue dans ces conditions est présentée à la figure 3.1.

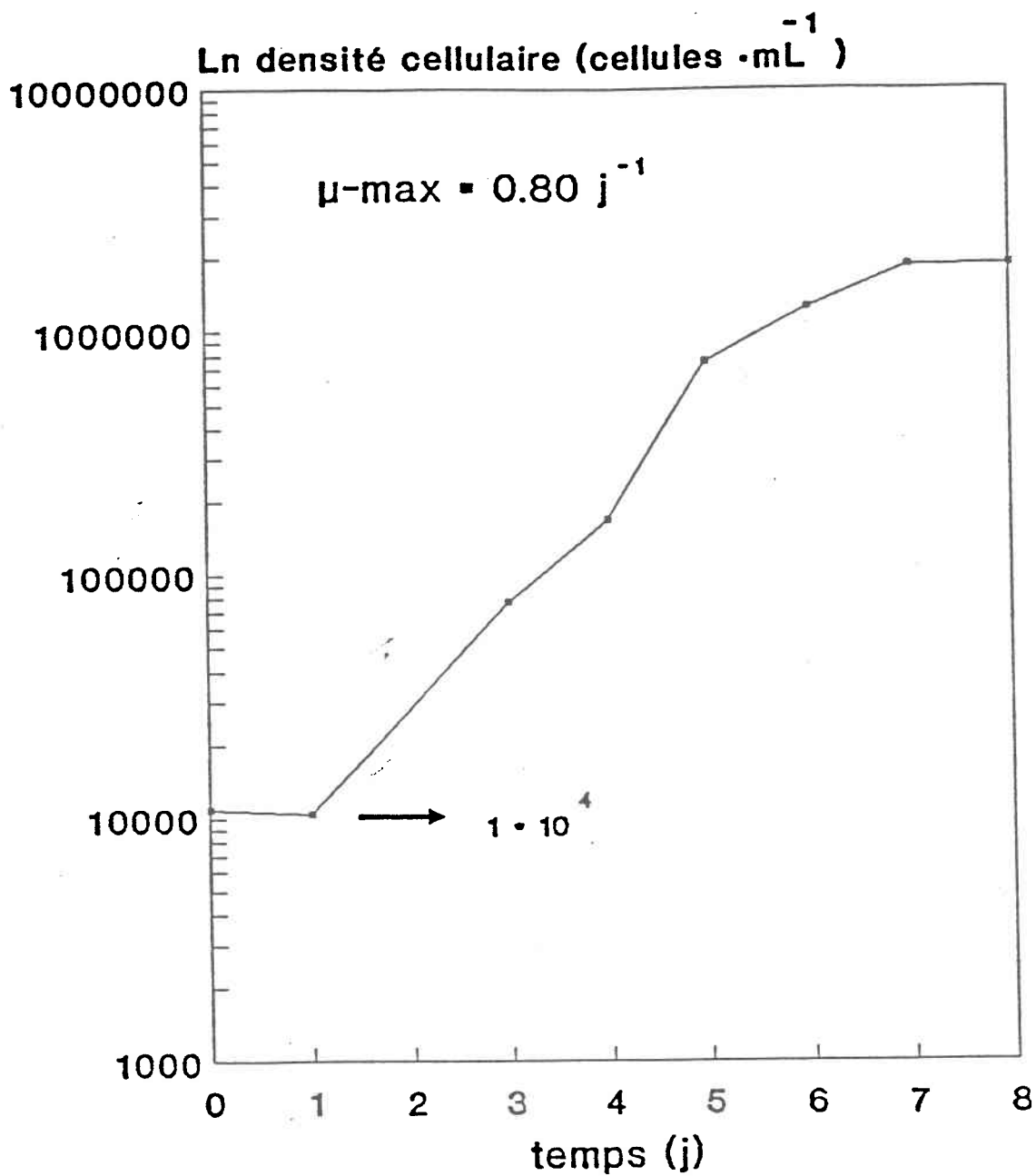


Figure 3.1: Courbe de croissance typique de Chlorella pyrenoidosa dans un milieu AAP, aéré et agité.

Notons que le taux maximal de croissance dans les conditions décrites plus haut est d'environ 0.80 divisions par jour et que la densité cellulaire au début de la phase exponentielle de croissance est d'environ $1 \cdot 10^5$ cellules \cdot mL⁻¹.

3.2.2 Conditions expérimentales

Les cellules sont normalement comptées tous les jours avec un compteur à particules (Coulter Counter: modèle TA-II). Le volume cellulaire moyen (VCM) est obtenu en calculant la moyenne géométrique de la distribution des classes de tailles. La surface cellulaire en est déduite.

Le début de la phase exponentielle correspond à une densité cellulaire d'environ $1 \cdot 10^5$ cellules \cdot mL⁻¹ (figure 3.1). C'est à cette concentration de cellules que les algues sont centrifugées à 6000 tours \cdot min⁻¹ durant 15 minutes, dans des tubes de polycarbonate. Après ce traitement, elles sont rincées avec un milieu AAP modifié (soit \approx 50 mL du milieu d'exposition) de pH voulu (ne contenant ni phosphore, ni métal et de force ionique égale à $1 \cdot 10^{-3}$ M lorsqu'il ne contient pas de tampon). Cette routine est recommencée trois fois afin de s'assurer que ni phosphore ni métal n'est introduit dans les milieux expérimentaux. Le culot final des cellules est resuspendu dans un faible volume du milieu d'exposition (\approx 40 mL) pour une période d'acclimatation de 24 heures. Un millilitre ($1 \pm$

0.05) de cette culture concentrée est récolté à l'aide d'une pipette stérile et est transféré dans une fiole conique de 125 mL contenant le milieu d'exposition aux pH voulus.

Toutes les cultures sont réalisées dans des fioles coniques en polycarbonate de 125 mL, contenant 50 mL de milieu. On procède avec trois répétitions pour chacun des pH, que l'on compte deux fois lors de chaque prélèvement. Le pH de ces milieux est ajusté finement avec du HCl et du NaOH 0.1M, et est maintenu constant par l'utilisation de tampons biologiques. Le choix des tampons est expliqué plus loin (3.3: Mise au point du milieu d'exposition).

Les tampons utilisés dans cette expérience proviennent de la compagnie Aldrich. Voici quelques unes de leurs caractéristiques:

HEPES: . Acide 1,4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine éthane sulfonique, $pK_a=7.55$;
. Il ne se lie pas avec Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} et Cu^{2+} ;
. Il n'inhibe pas la croissance autotrophe de Chlorella;

MES: . Acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique, $pK_a=6.15$;
. Ce tampon a une très faible tendance à se lier aux métaux et à pH 6.15 (0.05 M); il n'inhibe pas la croissance autotrophe de Chlorella.

PIPES: Acide piperazine-N,N'-bis(2-éthane sulfonique), $pK_a=6.96$;

DMGA: Acide 3,3-diméthylglutarique, $pK_{a2} = 6.31$;

HOAc/NaOAc: Acide acétique, $pK_a=4.64$.

3.2.3 Protocole expérimental

Au début de chacune des expériences, les cellules sont comptées et on s'assure à ce moment de leur état morphologique apparent au microscope. La croissance est normalement suivie pendant une période de 4 jours. Cette courte période est choisie afin que les tests de toxicité effectués relatent bien l'effet de la substance toxique et non pas le manque éventuel d'éléments nutritifs et d'autres facteurs limitants, où même les échantillons témoins pourraient être affectés. D'après plusieurs organismes de standardisation (ISO: International Standards Organization et, OECD: Organization for Economic Cooperation and Development), on devrait minimiser la durée de la phase de latence en inoculant les cellules lorsqu'elles se situent en phase exponentielle.

Pour la mise au point du milieu expérimental, un seul indicateur de croissance est utilisé. Il s'agit du taux maximal de croissance. Il se calcule sur la partie linéaire de la courbe de croissance avec en ordonnée le logarithme naturel de la densité cellulaire et en abscisse le temps ($\ln X$ vs temps). Le taux de

croissance maximum est calculé à partir de l'équation habituelle (Nyholm, 1985) et est exprimé en division·jour⁻¹:

$$\mu\text{-max} = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t}$$

où

X_0 = à la densité cellulaire à $t=0$ ou au début de la partie linéaire de la courbe de croissance;

X_t = à la densité cellulaire à la fin de la partie linéaire de la courbe de croissance;

t = au temps, en jours, durant lequel s'étale la partie linéaire de la courbe du témoin ou du contrôle.

Les moyennes et les écart type sont calculés sur 3 répétitions. La croissance est déterminée sur une période d'environ 4 jours et le pH mesuré régulièrement.

Puisque ce chapitre relate la mise au point d'une technique, les variations méthodologiques seront expliquées en annexe (3.A) selon l'ordre chronologique dans lequel les expériences ont été réalisées.

3.3 Mise au point du milieu d'exposition

3.3.1 Utilisation de tampons

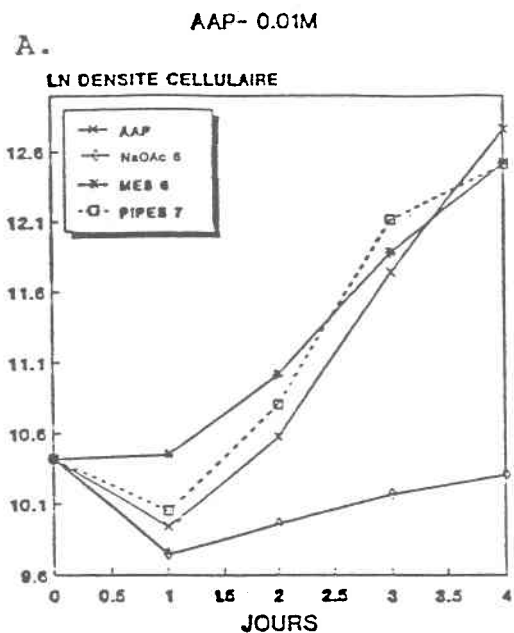
De plus en plus, les tampons biologiques sont utilisés en laboratoire pour maintenir constants les pH (Bates et al., 1982; Schenck et al., 1988). Par contre, un choix judicieux d'un ou de plusieurs tampons s'impose pour ne pas introduire d'artefacts non désirés dans le système expérimental.

Pour trouver le meilleur tampon utilisable pour des pH entre 4 et 7, on a repris plusieurs expériences à différents pH, avec différents tampons de concentration variable dans des milieux complets AAP ou ne contenant ni phosphate ni métaux (AAP-P-MT) (tableau 3.1: compilation de tous les résultats expérimentaux pour un même traitement, n peut évaluer 3, 6, 9, 12, 15 ou 18). Dans cette première étape, on a indiqué pour chacun des traitements, les valeurs de croissance maximale comme unité de comparaison. Le déroulement des expériences est décrit aux annexes A.A à A.I et les courbes de croissance pour chacun des neuf tests apparaissent à la figure 3.2.

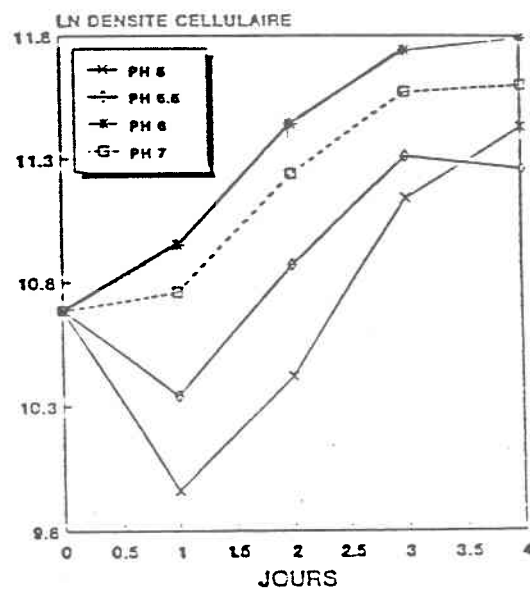
Si on compare les taux de croissance maximale qui apparaissent au tableau 3.1, on observe que l'utilisation du tampon PIPES (10^{-2} M) pour maintenir le pH du milieu AAP à 7 ne semble pas avoir

Tableau 3.1: Taux de croissance maximal moyen (division $\cdot j^{-1}$) et écart type () pour Chlorella pyrenoidosa (AAP: milieu de culture; AAP-P-MT: milieu d'exposition ne contenant ni phosphore ni métaux; PIPES, NaOAc, MES, HEPES, DMGA: voir leur nom dans le texte, section 3.2.2) (effectif (n) apparaît en exposant).

TRAITEMENT tampon	[]	pH					
		4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	7.0
1. AAP sans tampon							.77 ³ (.05)
2. AAP PIPES 0.01M							.77 ³ (.07)
3. AAP-P-MT PIPES 0.001M							.51 ³ (.16)
4. AAP-P-MT PIPES 0.01M							.63 ¹⁸ (.04)
5. AAP-P-MT Sans tampon				.52 ³ (.07)	.49 ³ (.09)	.40 ³ (.07)	.40 ³ (.08)
6. AAP NaOAc .01M				.01 ³ (.01)			
7. AAP-P-MT NaOAc 0.001M				.75 ³ (.18)			
8. AAP-P-MT NaOAc 0.01M		.16 ³ (.04)	.21 ³ (.12)	.01 ⁶ (.00)			
9. AAP MES 0.01M						.71 ³ (.05)	
10. AAP-P-MT MES 0.001M					.77 ³ (.04)	.73 ³ (.13)	
11. AAP-P-MT MES 0.01M		.99 ⁶ (.09)	.83 ⁶ (.05)	.70 ⁹ (.06)	.79 ¹⁵ (.21)	.90 ¹⁵ (.12)	
12. AAP-P-MT HEPES 0.01M							.77 ³ (.04)
13. AAP-P-MT DMGA 0.01M		.07 ⁶ (.09)	1.09 ⁶ (.13)				



B. AAP-P-MT SANS TAMPON



C. AAP-P-MT, 0.001M

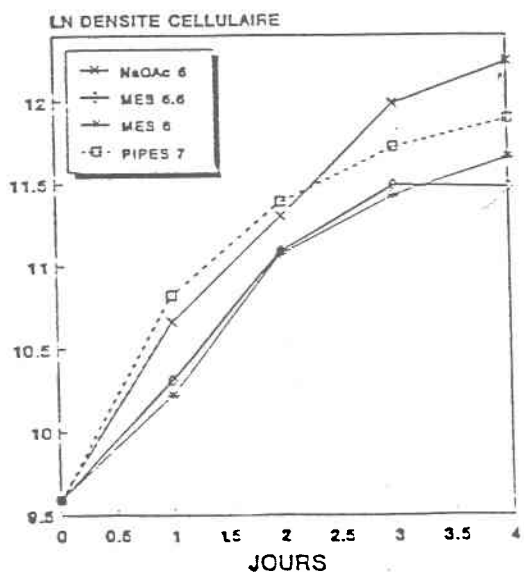
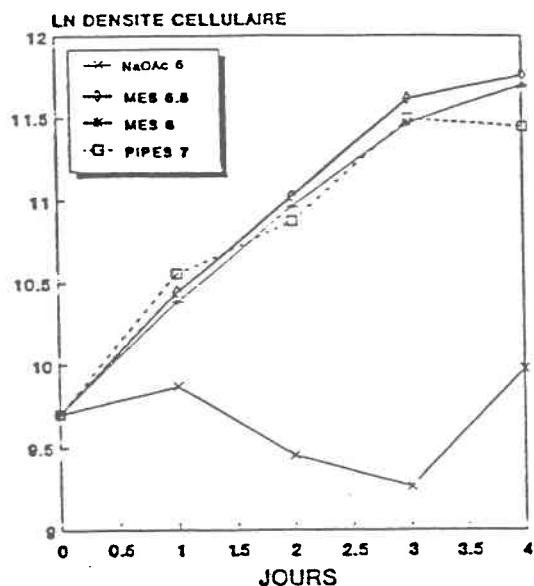


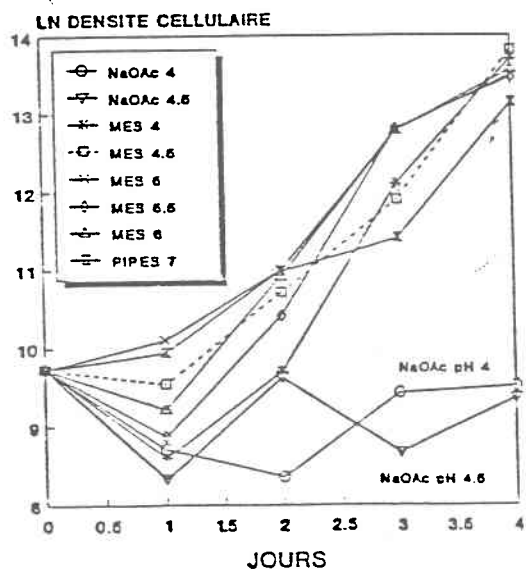
Figure 3.2: Courbes de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* selon différents traitements.

- A: Milieu AAP tamponné avec divers tampons à 0.01 M (pH 5, 6 et 7); tampons: NaOAc; MES; PIPES.
- B: Milieu AAP-P-MT non tamponné.
- C: Milieu AAP-P-MT tamponné avec divers tampons à 0.001 M (pH 5, 5.5, 6 et 7); tampons: NaOAc; MES; PIPES.

D. AAP-P-MT, 0.01 M



F. AAP-P-MT; 0.01M



E.

AAP-P-MT; 0.01M

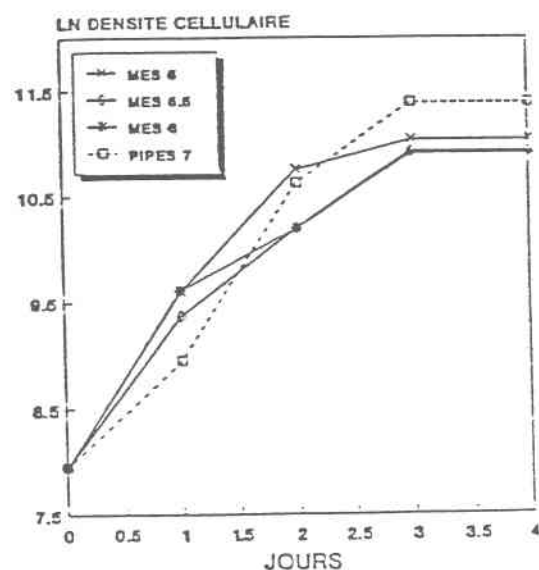


Figure 3.2 (Suite) Courbes de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* selon différents traitements.

- D: Milieu AAP-P-MT tamponné avec divers tampons à 0.01 M (pH 5, 5.5, 6 et 7); tampons: NaOAc; MES; PIPES.
- E: Milieu AAP-P-MT tamponné avec divers tampons à 0.01M (5, 5.5, 6, et 7); tampons: MES, PIPES.
- F: Milieu AAP-P-MT tamponné avec divers tampons à 0.01 M (pH 4, 4.5, 5, 5.5, 6 et 7); tampons: NaOAc; MES; PIPES.

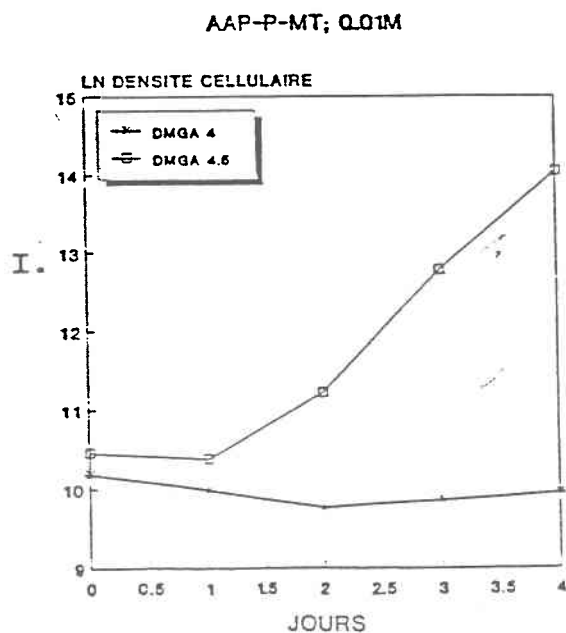
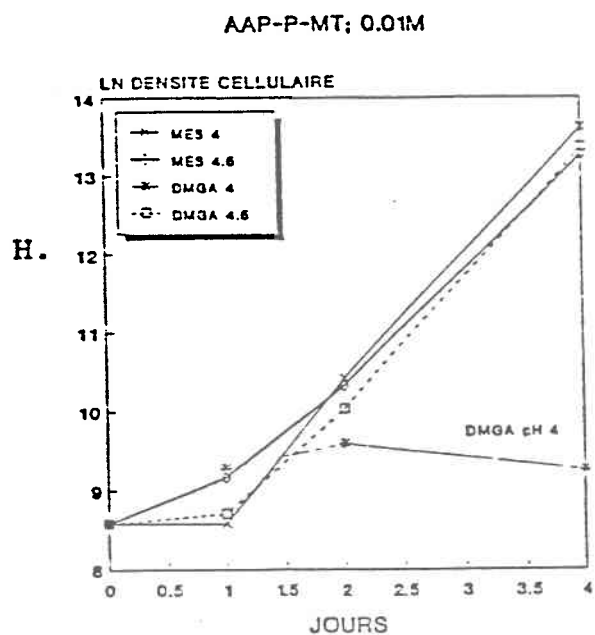
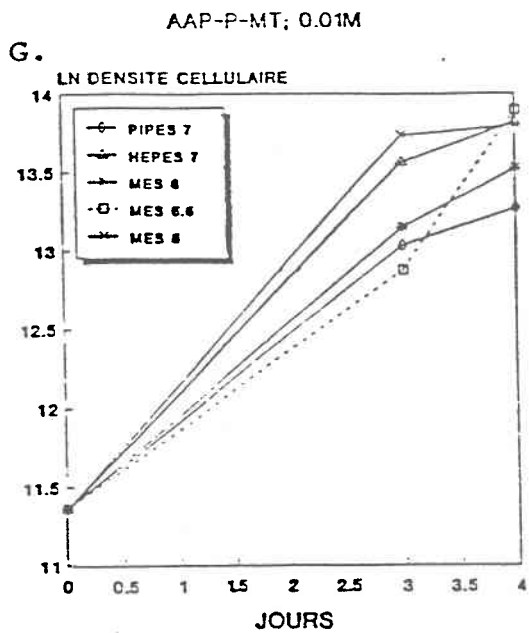


Figure 3.2 (Suite) Courbes de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* selon différents traitements.

- G: Milieu AAP-P-MT tamponné avec divers tampons à 0.01 (pH 5, 5.5, 6 et 7); tampons: MES, PIPES.
- H: Milieu AAP-P-MT tamponné avec divers tampons 0.01M (4, 4.5); tampons: MES, DMGA.
- I: Milieu AAP-P-MT tamponné avec divers tampons 0.01 M (pH 4, 4.5); tampon: DMGA.

d'effets sur la croissance maximum de Chlorella (tableau 3.1: traitement 2 vs 1; et figure 3.2.A). L'utilisation du tampon MES à pH 6.0 dans le milieu AAP (tableau 3.1: traitement 9 vs 1) n'affecte pas non plus le μ -max de façon significative. Par contre le milieu AAP à pH 5 tamponné par de l'acétate de sodium (0.01 M) (tableau 3.1: traitement 6) ne permet pas la croissance de Chlorella.

De plus, le milieu d'exposition (AAP-P-MT) seul (sans tampon) ne favorise pas une croissance optimale de Chlorella (tableau 3.1: traitement 5 vs 1). Par contre, il semble que dans ces milieux (traitement 5) le pH initial n'agisse pas sur le taux de croissance. Malgré un ajustement du pH initial aux pH voulus, le pH observé au jour 5 était semblable dans tous les milieux et tendait vers 6.8. Un tel type de milieu n'est d'aucune utilité pour les expériences projetées, où il faudra maintenir un pH constant.

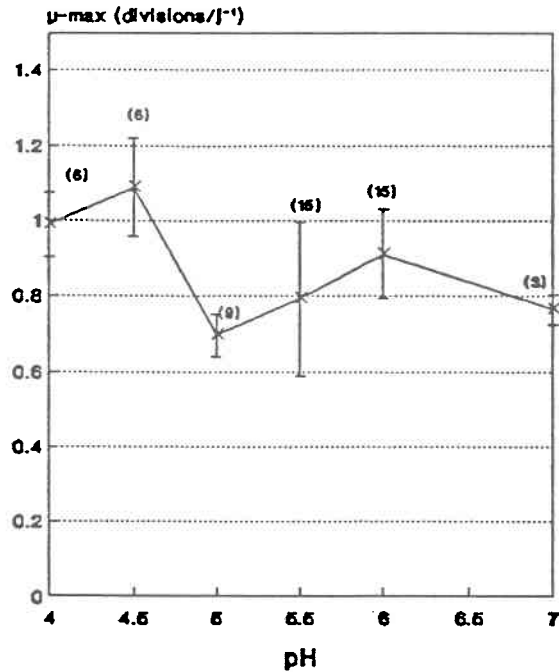
L'utilisation de tampons à une concentration de 10^{-3} M s'avère elle aussi inadéquate pour le maintien du pH pendant une période de croissance de 5 jours. En effet, les pH initiaux de 5.0 et 5.5 (NaOAc et MES: traitements 7 et 10 du tableau 3.1) ont augmenté de 0.9 et 0.5 unités de pH respectivement. Par contre, à une concentration de 10^{-2} M, les tampons MES et PIPES ont maintenu les pH de 5.5, 6.0 (MES) et 7.0 (PIPES) relativement constants pour toute la durée de la période expérimentale (pH 5.5 ± 0.08 ; pH 6.0

± 0.02 ; pH 7.0 ± 0.02). Pour sa part, à cette même concentration, l'acétate de sodium a permis une hausse de 0.2 unités du pH initial 5.0.

L'utilisation de ce dernier tampon (tableau 3.1: traitement 8) s'est avéré inefficace pour la croissance de Chlorella pyrenoidosa aux trois pH testés (4.0, 4.5, 5.0; Figure 3.2.A, D, F). En effet, comparativement aux autres milieux, la croissance est beaucoup diminuée et cette diminution ne semble pas due aux bas pH puisque d'autres tampons (MES, DMGA) utilisés aux mêmes pH permettent une bonne croissance (Figure 3.2.E, F, G). Selon P. Stokes (1988: Institute for Environmental Studies, Université de Toronto, communication personnelle), on a déjà observé une action toxique de l'acétate de sodium, ou encore de l'acide acétique non-ionisé, chez certaines algues.

Il faut souligner sans contredit l'importance d'effectuer plusieurs essais et de bien définir le milieu expérimental avant de tirer des conclusions de cause à effets. Si on s'en était tenu uniquement aux résultats obtenus au traitement 8, on aurait pu croire à des effets négatifs des pH < 5.0 sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa. Par contre les essais faits avec MES et DMGA pour ces mêmes pH ont permis une croissance équivalente à tous les pH (pH 4.0-->7.0) (Figure 3.2.E, F, G, H). La seule contrainte dans l'utilisation du tampon MES aux pH 4.0 et 4.5 est la dérive de pH observée après 4 jours d'incubation, qui est de l'ordre de +0.5 et +0.2 unités de pH respectivement (figure 3.3).

A.



B.

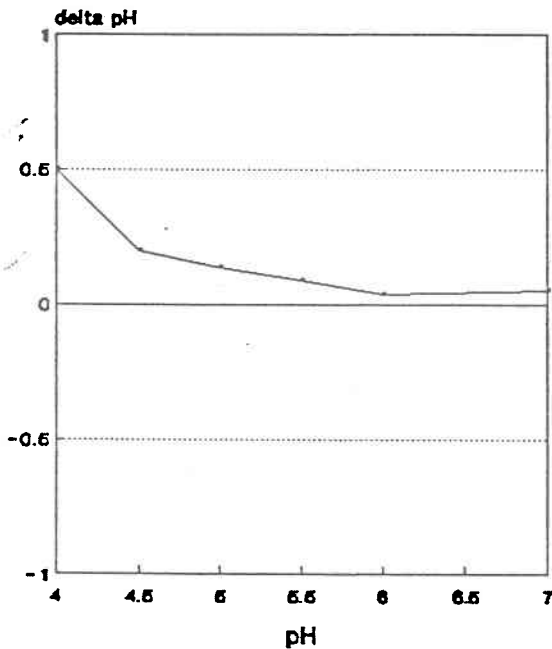


Figure 3.3: A. Evolution du taux maximum de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* à différents pH (moyenne de 3 échantillons et écart type). Les milieux sont tamponnés par des tampons à une concentration de 0.01 M. pH 4, 5, 5.5 et 6 = MES; pH 4.5 = DMGA; pH 7 = HEPES (voir le tableau 3.1, les traitements 11, 12 et 13). B. Variation du pH après quatre jours d'incubation pour ces mêmes milieux.

Pour remédier à la situation, on a essayé le tampon DMGA (10^{-2} M) aux pH 4.5 et 4.0. Alors que la croissance à pH 4.5 en présence du DMGA est comparable à celle observée avec le MES (figure 3.2.H), elle est complètement inhibée à pH 4.0. Les explications possibles à cette observation sont, d'une part l'effet toxique du DMGA en milieu contaminé par des bactéries (Ferguson et al., 1980), ou d'autre part tout simplement un effet du pH. La première explication n'est pas vraiment plausible puisque les cultures ont toutes été obtenues de la même façon et on n'observe pas ce phénomène à pH 4.5. De plus, ce sont les mêmes résultats que l'on retrouve pour les trois échantillons. La deuxième explication pourrait s'avérer plus véritable puisqu'en effet c'est la première fois que le milieu est relativement maintenu à pH 4 tout au cours de l'expérience (tableau 3.2), alors que dans les milieux contenant du MES le pH augmentait de 0.5 unités de pH pendant cette même période.

Tableau 3.2: Evolution du pH dans un milieu synthétique avec tampon (10^{-2} M), sur une période d'incubation de 7 jours.

milieu	pH mesuré			
	t=1 j	t=2 j	t=4 j	t=7 j
MES 4.0	4.10	4.16	4.50	4.46
MES 4.5	4.62	4.90	5.09	5.10
DMGA 4.0	4.12	4.17	4.12	4.17
DMGA 4.5	4.63	4.70	4.85	4.90

Étant donné que les valeurs de μ -max à pH 7 en présence de PIPES étaient souvent plus faibles qu'aux pH 6, 5.5 et 5 tamponnés par MES, on a vérifié l'efficacité d'un autre tampon, HEPES. Selon les résultats, ce dernier permet une meilleure croissance (tableau 3.1: traitement 12). Il a déjà été observé que le tampon HEPES avait des effets positifs sur le transport d'électrons et sur la capacité de phosphorylation des mitochondries des plantes (Smith et Foy, 1974). L'utilisation du tampon HEPES semble plus efficace pour la croissance de Chlorella que le tampon PIPES à pH 7.0.

A la suite de toutes ces expériences, on a donc opté pour l'utilisation des tampons DMGA ($4.0 < \text{pH} < 5.0$); MES ($5.0 < \text{pH} < 6.0$) et HEPES ($6.0 < \text{pH} < 7.0$) à une concentration de 0.01 M pour les expériences ultérieures, en considérant que le pH seul n'aurait pas d'effet significatif sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa dans la gamme $4.5 < \text{pH} < 7$.

En effet, l'analyse de variance ne détecte pas de différences significatives du taux de croissance maximum dans la gamme entre les pH 4 et 7 dans les milieux expérimentaux spécifiques. Il faut par contre noter l'efficacité décroissante des tampons à mesure que le pH diminue (Figure 3.3.B). Alors que les tampons MES et HEPES ne permettent qu'une légère déviation du pH initial après 4 jours d'incubation pour les pH 5, 5.5, 6 et 7, le DMGA à pH 4.5 et le MES à pH 4.0 permettent une augmentation de 0.2 à 0.5 unités de pH respectivement. Good et al. (1966) notaient que les pH idéaux pour l'utilisation de ses tampons "biologiques" étaient de pH 6 à pH 10.

3.3.2 Discussion

Selon une étude faite par Wehr et al. (1986), le tampon HEPES employé dans une culture à base de NH_4^+ pour la croissance de Chrysochromulina breviturrita Nich. ne permettait pas de dérive de pH de plus de 0.12 unités comparativement à 2 unités dans un milieu non tamponné. Le tampon HEPES a été montré supérieur au TRIS et à d'autres tampons pour sa capacité tampon autour du pH 7.0 et parce qu'il n'affecte pas la physiologie algale (Smith et Foy, 1974). Ces caractéristiques et sa capacité de complexation négligeable font que HEPES est souvent utilisé dans une variété de milieux de culture algale (Bekheet et Syrett, 1977; Healy, 1977; Francke et tenCate, 1980; Whitton et Shehata, 1982).

Dans cette même étude (Wehr et al., 1986), le tampon MES permettait le contrôle du pH autour de 6.0. Aucune des bactéries testées ne pouvait métaboliser le HEPES ni le MES. Le tampon MES ne semblait pas agir sur la croissance de 6 espèces algales provenant de 5 classes différentes: seule Ochromonas danica faisait exception à cette règle, une plus forte biomasse finale étant observée dans son cas. Par contre, le taux de division maximal et la biomasse cellulaire finale n'étaient pas affectés par des concentrations de MES < 25 mM. La croissance était toutefois inhibée à des concentrations supérieures à 25 mM. Pour leur part, Gensemer et Kilham (1984) n'ont pas observé d'effets du pH (6.0-7.0; MES) sur la croissance de plusieurs algues d'eau douce

(Asterionella formosa; Scenedesmus sp., Cryptomonas ozolini et Anabaena flosquae). Notons aussi que le tampon MES fut utilisé dans des expériences portant sur l'influence de l'aluminium sur la taille cellulaire de deux algues vertes à pH 5 (Tornqvist et Claesson, 1987). Enfin, le MES est considéré comme étant le tampon le plus utile pour les gammes de pH autour de 5.0-6.5 vue sa stabilité biologique, sa capacité tampon, la quantité minimale de base nécessaire pour ajuster le pH et sa très faible capacité à complexer les métaux.

Ne contenant ni N ni S, et n'étant pas un zwitterion, le tampon DMGA diffère des autres tampons dits "biologiques". De plus, il résiste moins bien à la biodégradation. Ayant deux groupements carboxyliques, le DMGA est utilisable dans la gamme $3.5 < \text{pH} < 6.0$. Par contre, la présence de ces deux groupements suggère la possibilité d'une complexation non négligeable entre le DMGA et des cations bi- ou trivalents. Tel que démontré par Wehr et al. (1986), les capacités tampons de DMGA et MES étaient supérieures à HEPES.

Comme l'indiquaient Ferguson et al. (1980), il est primordial que les chercheurs effectuent des tests pour s'assurer que les observations faites lors de tests de toxicité sont bien dues à la substance testée plutôt qu'à l'utilisation de tampons. Comme les résultats l'ont démontré dans cette recherche, le pH n'affecte pas la croissance de Chlorella pyrenoidosa lorsque le taux de

croissance maximum est utilisé comme paramètre indicateur de stress. Ces résultats sont conformes à ceux observés dans des tests effectués sur Chlorella pyrenoidosa à différents pH (pH 6 à pH 7), où l'utilisation de HEPES et autres tampons non utilisés dans notre recherche (Dispo, Heppso, Mopso, PLO, Popso, Tapso, Tes, Ticine) n'affectaient presque pas la croissance même à fortes concentrations (Ferguson et al., 1980).

L'absence d'information sur les effets du pH contrôlé par les tampons utilisés dans cette recherche, pour la gamme de pH étudié (pH 4 à 7), justifie l'effort déployé à la mise au point du milieu expérimental décrit dans ce chapitre.

3.4 Sélection des paramètres de croissance

Différents indicateurs de croissance sont souvent utilisés dans les expériences de toxicité avec les algues. Parmi les plus fréquemment utilisés on retrouve: la biomasse finale (cellules \cdot mL⁻¹), le taux de croissance moyen (μ -moyen), le taux de croissance maximum (μ -max), l'aire sous la courbe de croissance (A), la superficie (m²) et le volume (m³) cellulaires. Chacun de ces indicateurs rend compte de processus physiologiques qui sont souvent différents.

Nous verrons dans cette section de quelle façon nous informons ces indicateurs de croissance, quels sont les effets du pH sur chacun d'eux, qu'elle est leur reproductibilité et leur sensibilité, pour enfin choisir comment ils pourront être utilisés dans les expériences ultérieures.

Nyholm, en 1985, a fait une revue de littérature portant sur les avantages et les désavantages de l'utilisation de deux paramètres indicateurs de la croissance, la biomasse et le taux de croissance, pour exprimer les effets dus à un ou à des facteurs extérieurs sur la croissance d'algues-tests. Bien que l'auteur ne détermine pas laquelle des deux méthodes est la plus réaliste, il fait un bon compte rendu de l'interprétation que l'on peut donner à ces deux indicateurs.

Selon cet auteur, le paramètre le plus utilisé est la biomasse relative à la fin d'un test. On exprime alors l'inhibition de croissance (IC) de la façon suivante:

$$IC = \frac{BC-BT}{BC} \cdot 100\%$$

où BC= Biomasse finale du contrôle

BT= Biomasse finale du traitement

Comme estimé de la biomasse, on emploie soit le poids sec, le volume cellulaire ou la densité cellulaire (Miller et al., 1978; Joubert, 1980; ISO, 1982; U.S. EPA, 1982).

Des mesures du taux de croissance sont par contre moins souvent utilisées (Kallqvist, 1978; Payne et Hall, 1978; OECD, 1981; Walsh et al., 1982). Le taux de croissance moyen se calcule de la façon suivante:

$$\mu\text{-moyen} = \frac{(\ln X_t - \ln X_0)}{t} \quad \text{où } X_0 = \text{concentration nominale à l'inoculation.}$$

Si une phase lag se produit, certains chercheurs préfèrent utiliser seulement la partie linéaire de la courbe de croissance pour estimer le taux de croissance maximum, alors que d'autres prennent le taux de croissance moyen pour toute la durée du test. D'après l'ISO (International Standards Organization) et l'OCDE (Organisation pour la Coopération et le Développement économique), on devrait éviter la phase de latence en utilisant comme inoculum des cellules croissant exponentiellement.

Selon Wong et Couture (1986) la procédure adaptée de l'ISO pour tester les effets chimiques sur des algues d'eau douce, et utilisée comme méthode standard de bioessais algaux dans le monde, consiste principalement à inoculer un petit nombre de cellules algales dans un milieu contenant une substance toxique connue, de compter la densité cellulaire périodiquement et de comparer les

effets avec ceux obtenus dans la culture contrôle. L'inhibition de croissance est évaluée comme la moyenne de la réduction de la densité cellulaire dans la culture exposée à la substance toxique comparativement au contrôle. L'évaluation est basée sur la comparaison des aires sous les courbes de croissance.

Par ailleurs, comme la croissance spécifique et la respiration du phytoplancton (surtout des diatomées) ont souvent semblé être inversement reliées à la taille cellulaire, surtout dans des conditions de croissance optimale, la superficie et le volume cellulaires (Tornqvist et Claesson, 1987) constituent d'autres paramètres indicateurs de croissance. Cette dépendance de la croissance et des quotas cellulaires de subsistance sur la taille implique que la superficie cellulaire influence une variété de processus métaboliques, la prise en charge d'éléments nutritifs, la photosynthèse et la respiration. De plus, la croissance des organismes unicellulaires peut être étudiée en suivant les variations de la distribution des tailles cellulaires d'une population, qui peut varier selon les conditions de croissance.

3.4.1 Biomasse finale (cellules·mL⁻¹)

Les arguments avancés pour l'utilisation de la biomasse finale (détermination à la fin du test ou au moment où la croissance exponentielle dans les cultures contrôles cesse) sont les suivants:

1) simplicité, 2) interprétation directe sans aucune considération pour le mode de croissance, 3) CE₅₀ (concentration effective qui, dans ce cas, diminue la biomasse finale de 50 % par rapport à un témoin) plus faible, donc test plus sensible, 4) effets toxiques détectés plus aisément puisque de petits changements dans le taux de croissance résultent en des variations plus grandes dans la biomasse (Nyholm, 1985). Pour ce qui est de nos expériences, les résultats de biomasse (j=4) pour ces milieux choisis à la partie 3.3 sont présentés au tableau 3.3.

Tableau 3.3: Valeurs moyennes de biomasse finale de Chlorella pyrenoidosa dans des milieux de pH différents. (n= nombre d'essais)

pH	Tampon (10 ⁻² M)	n	Biomasse finale (cellules·mL ⁻¹)		
			Moyenne (x 10 ³)	Ecart-type (x 10 ³)	CV (%)
4.0	MES	6	857	186	22
4.5	DMGA	6	492	168	24
5.0	MES	9	576	376	65
5.5	MES	12	335	281	84
6.0	MES	12	381	320	84
7.0	HEPES	3	803	169	21

Notons que dans nos expériences, la phase stationnaire n'est pas toujours atteinte après 4 jours d'incubation. Au contraire, le protocole initial visait à obtenir une croissance exponentielle tout au long de l'expérience (Helliwell et al., 1983). Par contre, les résultats obtenus aux expériences B, C, D, E et G (figure 3.2), suggèrent l'atteinte du plateau avant le terme de l'expérience. On comprendra alors la forte variation inter-expériences observée au tableau 3.3 exprimée par les coefficients de variation (cv), surtout lorsque des résultats obtenus lors d'expériences différentes sont cumulés ensembles (quand $n > 3$).

Ainsi, il s'avère que le paramètre de biomasse après 4 jours d'incubation n'est pas tellement reproductible. Pour cette raison, il ne sera pas utilisé comme indicateur de croissance absolu au cours des expériences futures.

La variation inter-expériences est due à au moins deux artefacts, soit une inoculation initiale variable pour ce qui est de la densité cellulaire, soit une différence initiale en ce qui concerne l'état physiologique des cellules. Tel que mentionné à la partie 3.2.3, les cellules sont centrifugées et lavées trois fois avant l'expérience. Bien que la procédure ait été la même d'une expérience à l'autre, des variations peuvent s'introduire lors du décantage des cellules entre les centrifugations, influençant ainsi la densité cellulaire initiale. Aussi, les cellules étant récoltées au début de la phase exponentielle, le temps pris pour la

centrifugation et l'acclimatation pourrait varier quelque peu entre chacune des 9 expériences. Considérant que cette étape de la croissance est très critique, puisqu'exponentielle, on pouvait là aussi, induire des variations entre chacune des manipulations.

Le paramètre de biomasse finale peut tout de même être utilisé à des fins relatives. Par exemple, lorsque la biomasse finale est calculée à partir d'une même expérience (figure: 3.2.F), on observe que le pH entre 4 et 6 n'a pas d'effet significatif sur la biomasse finale (figure 3.4). Notons que les coefficients de variation sont de l'ordre de 8%, ce qui est très acceptable. De cette façon, le paramètre de biomasse finale pourrait être utilisé efficacement relativement à un témoin. L'importance reliée à ce paramètre tient de l'information qu'il apporte quant aux réserves nutritives intracellulaires chez l'inoculum. Comme nous le verrons dans les chapitres suivants, cette connaissance peut s'avérer très utile, surtout d'une façon qualitative. Il peut arriver que des réductions considérables du taux de croissance n'affectent en rien ou que peu la biomasse finale puisque la courbe de croissance des cultures affectées par la substance toxique peut graduellement se rapprocher de celle des cultures témoin à cause des éléments nutritifs qui deviennent limitants. A ce moment, le taux de croissance maximal ou moyen peut être d'une forte utilité. Aussi il faut tenir compte qu'au cours du test, la toxicité peut être inhibée, cela étant dû à des mécanismes variés, et donc ne causer que peu ou pas d'effet sur le rendement final (Walsh et al., 1982).

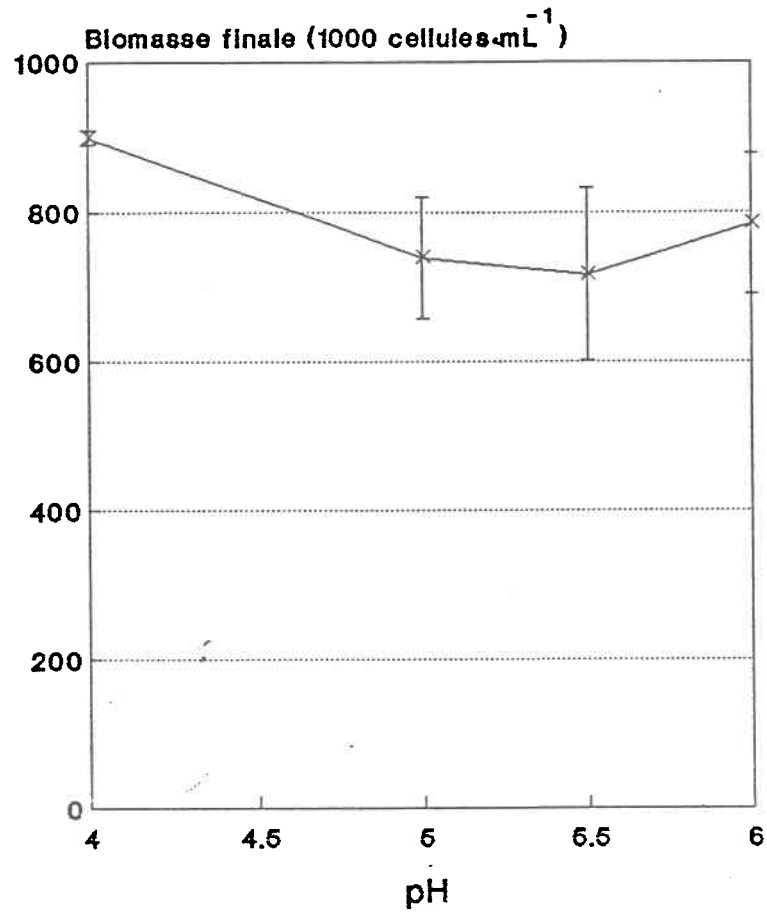


Figure 3.4: Variation de la biomasse finale de Chlorella pyrenoidosa en fonction du pH (voir courbes de croissance de la figure 3.2.F).

3.4.2 Taux de croissance moyen (μ -moyen)

Le taux de croissance moyen permet d'intégrer les effets lorsqu'une phase de latence est induite par une substance toxique. Ce type d'effet toxique est laissé pour compte lorsqu'on considère uniquement les points de la partie log-linéaire de la courbe de croissance.

Les résultats obtenus pour l'ensemble des expériences sont présentés au tableau 3.4. Là aussi, on observe de fortes variations inter-expériences (34% en moyenne) qui sont probablement liées aux facteurs évoqués plus haut (surtout pour les essais où $n > 3$, où la moyenne est calculée sur 2 expériences ou plus).

Tableau 3.4: Valeurs moyennes des taux de croissance moyens de Chlorella pyrenoidosa dans des milieux de pH différents (n = nombre d'essais).

pH	Tampon (10^{-2} M)	n	Taux moyen de croissance (divisions $\cdot j^{-1}$)		
			Moyenne	Ecart-type	CV (%)
4.0	MES	6	1.13	0.67	50
4.5	DMGA	6	1.18	0.45	38
5.0	MES	9	0.79	0.25	32
5.5	MES	12	0.89	0.23	26
6.0	MES	12	0.97	0.43	44
7.0	HEPES	3	0.70	0.08	11

Même s'il existe de fortes variations inter-expériences, l'utilisation du taux moyen de croissance permet une intégration de toutes les réactions d'une population d'algues à une substance toxique. Par exemple, si on se réfère à la figure 3.2.F, le taux moyen de croissance à pH 4 (MES) est inférieur aux autres pH (milieux avec même tampon) alors que la biomasse finale et le taux maximum de croissance sont équivalents. Le taux moyen de croissance pourra alors être utilisé par rapport à un témoin de façon qualitative. Les résultats compilés en pourcentage à un témoin (pH 6, MES 0.01M) par exemple pour deux expériences (figure 3.2.E et F) donnent des résultats comparables:

Taux de croissance moyen

pH	% par rapport au témoin	
	E	F
6	100	100
5.5	92 (\pm 15)	92 (\pm 11)
5	91 (\pm 3)	95 (\pm 13)

3.4.3 Taux de croissance maximal (μ -max)

Si on fait fi de toute interprétation écologique, il semble que d'un point de vue théorique le taux de croissance spécifique serait préférable à la biomasse finale simplement à cause du caractère spécifique du mode exponentiel de croissance des algues.

En effet, le taux de croissance maximal est spécifique d'une espèce à l'autre. Il rend compte des caractéristiques de croissance intrinsèques à une espèce. De plus, il se mesure facilement en laboratoire sous des conditions optimales et contrôlées.

Comme nous l'avons abordé dans les deux parties précédentes, à cause de la forme de croissance exponentielle, les résultats absolus de la biomasse varient avec le temps et sont aussi affectés par la magnitude absolue du taux de croissance spécifique. Alors, on peut anticiper que l'utilisation du taux maximum de croissance comme variable réponse devrait donner une reproductibilité plus élevée et comparable entre les expériences, par rapport à la biomasse. Effectivement, les résultats obtenus montrent beaucoup moins de variabilité inter-expérimentale (tableau 3.5) pour ce paramètre de croissance par rapport aux deux autres (coefficient de variation moyen=13%).

De plus, selon Nyholm (1985), il semble insensé de dire que la biomasse donne une estimation de l'état de croissance plus sensible que le taux de croissance. Le fait que la CE_{50} calculée à partir de la biomasse est habituellement numériquement plus petite que ce qui pourrait être calculé à partir du taux de croissance, est dû tout simplement aux conséquences mathématiques de la forme de la croissance exponentielle. Par ailleurs, d'un point de vue écologique, ce qui importe est de connaître comment le taux de croissance est affecté, puisque le taux de croissance est décisif dans la détermination du succès compétitif d'une espèce algale dans un écosystème naturel dynamique.

Tableau 3.5: Valeurs moyennes des taux maximum de croissance de Chlorella pyrenoidosa dans des milieux de pH différents (n= nombre d'essais).

pH	Tampon (10 ⁻² M)	n	Taux maximal de croissance (divisions·j ⁻¹)		
			Moyenne	Ecart type	(CV) (%)
4.0	MES	6	0.99	0.09	9
4.5	DMGA	6	1.09	0.13	12
5.0	MES	9	0.67	0.06	9
5.5	MES	12	0.79	0.21	27
6.0	MES	12	0.91	0.12	13
7.0	HEPES	3	0.77	0.04	5

3.4.4 Aire sous la courbe de croissance (A)

La surface sous la courbe de croissance est utilisée puisqu'elle intègre le stress encouru par les algues sur toute la période de croissance, y compris la phase de latence, pour une période de 4 jours. L'aire sous la courbe de croissance est obtenue en additionnant l'aire entre des points-temps successifs (Wong et Couture, 1986).

La proposition récente adoptée par l'ISO et l'OCDE (1983) est d'utiliser l'aire sous la courbe de croissance, en utilisant les mesures de biomasse sans de transformations-log. L'aire est calculée facilement par l'intégration d'un trapézoïde qui équivaut à la construction d'une courbe de croissance en liant les points

avec une ligne. L'idée de cette procédure est d'extraire le plus d'information possible des données disponibles sans faire référence à un modèle de croissance donné ni à une forme particulière de la courbe de croissance.

Tel que rapporté par Nyholm (1985), il existe une grande incertitude associée aux transformations-log des faibles densités cellulaires. C'est pourquoi on suggère de ne pas transformer en log les densités cellulaires initiales. La proposition courante est d'utiliser directement la biomasse mesurée sans transformation log, c'est-à-dire que la courbe de croissance est dessinée sur une échelle linéaire. Pour des bioessais avec une croissance exponentielle cela implique, cependant, que la méthode de comparaison des aires en principe est reliée à la méthode de base de biomasse, même si plus élaborée. Si les données de biomasse sont transformées en log, la méthode peut être considérée comme une autre façon d'estimer le taux de croissance moyen.

Tout comme pour le taux de croissance moyen et la biomasse finale, l'aire sous la courbe constitue un paramètre de croissance qui varie énormément d'une expérience à l'autre et même plus que tout autre paramètre indicateur de croissance (tableau 3.6).

Tableau 3.6: Valeurs moyennes des aires sous la courbe de croissance de Chlorella pyrenoidosa pour une période de 4 jours dans des milieux de pH différents (n= nombre d'essais).

pH	Tampon	n	Aire sous la courbe (10^5 cellules·j·mL ⁻¹)		
			Moyenne	Ecart type	CV (%)
4.0	MES	6	6.33	6.14	97
4.5	DMGA	6	5.40	4.05	75
5.0	MES	9	5.26	5.46	104
5.5	MES	12	2.69	2.24	83
6.0	MES	12	3.14	2.91	93
7.0	HEPES	3	11.30	2.46	22

On se rend compte de l'extrême sensibilité de ce paramètre. Par contre, les valeurs relatives de l'aire sous la courbe peuvent être d'une grande utilité lorsqu'exprimées par rapport à un témoin. Notons que les unités sont en densité totale de cellules pour une période globale de 4 jours.

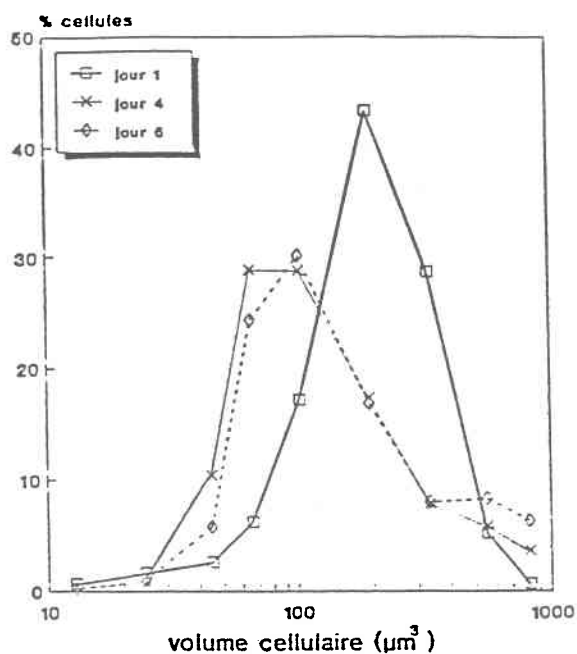
3.4.5 Superficie cellulaire (m²) et volume cellulaire (m³)

La croissance des organismes unicellulaires peut être étudiée par l'augmentation de la densité cellulaire comme on l'a vu plus haut, mais aussi en suivant les variations de la distribution des tailles cellulaires d'une population qui peut varier selon les conditions de croissance.

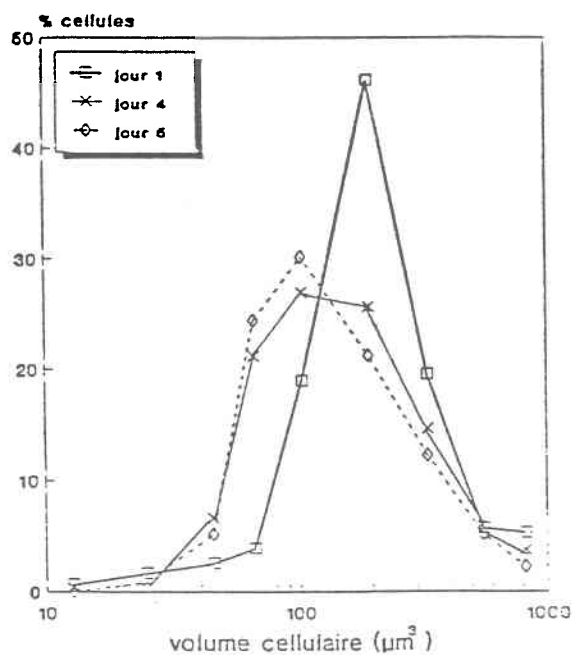
L'étude de la variation de la taille cellulaire pendant la croissance peut nous informer sur la santé des cellules (Johnston et al., 1977). La figure 3.5 montre une série de courbes de distribution de volume cellulaire pour différents pH. Trois courbes de distribution ont été choisies à différents intervalles de temps de la période de croissance (1, 2 et 3 jours pour l'expérience A.F- voir annexe A; 1, 3 et 4 jours pour l'expérience A.G). Dans la plupart des cas, la taille des cellules est au plus fort au premier jour d'incubation, soit pendant la période de latence. A la phase exponentielle, les cellules deviennent généralement plus petites (il y a une légère migration de la courbe vers la gauche). Les plus petites cellules se retrouvent juste avant la phase stationnaire (jour 4).

Dans notre cas, il ne semble pas y avoir d'effets marqués du pH sur l'évolution de la taille des cellules dans le temps. Par contre, cet indicateur de croissance pourra éventuellement être utilisé pour décrire les effets de l'aluminium sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa.

pH 5.0 (MES, 0.01 M)



pH 6.0 (MES, 0.01 M)



pH 7.0 (HEPES, 0.01 M)

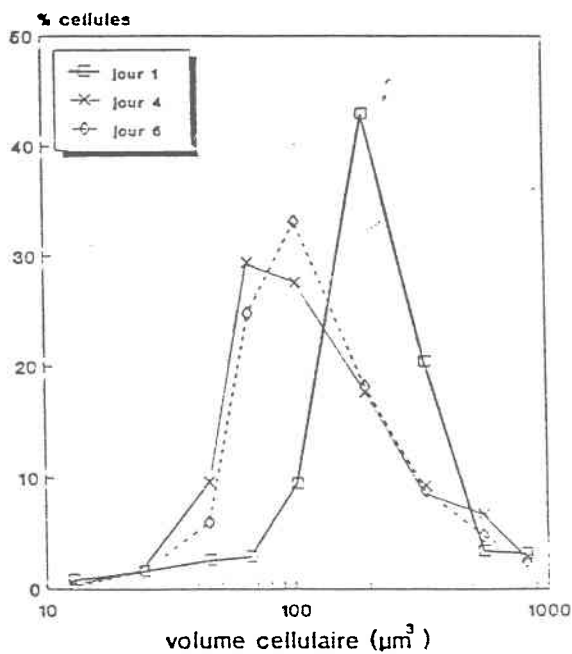


Figure 3.5: Variation du volume cellulaire selon différentes périodes de croissance de *Chlorella pyrenoidosa*: La distribution relative des cellules en fonction du log du volume cellulaire pour des cellules à différents pH.

La variation de la distribution de la taille des cellules pendant la croissance peut aussi s'étudier par les valeurs de volume cellulaire moyen. Lors d'une croissance normale, le volume cellulaire moyen augmente durant la phase de latence. Au moment de la division cellulaire, le volume diminue jusqu'à ce que la population atteigne le volume moyen le plus petit, soit juste avant la transition à la phase plateau. Puis, les cellules grossissent lentement pendant la phase stationnaire.

Les résultats obtenus au cours des expériences A.F, A.G, A.H et A.I (voir annexe A) montrent que l'évolution du volume cellulaire moyen au cours d'une expérience semble assez reproductible d'une expérience à l'autre (tableau 3.7) mais pour plus de sûreté, la comparaison qualitative avec un témoin serait plus souhaitable.

Johnston et al. (1977) ont fait remarquer que les cellules peuvent devenir étrangement très grosses à cause d'effets environnementaux, comme l'exposition à des radiations ionisées ou à des produits chimiques qui peuvent temporairement arrêter le processus de division de l'ADN et avoir un effet marqué sur la taille des algues. L'utilisation du volume cellulaire moyen en association avec la courbe de croissance peut mettre en évidence des phénomènes de toxicité, à savoir des effets sur la division cellulaire ou des effets sur le grossissement des cellules.

Tableau 3.7: Volume cellulaire moyen (μm^3) de Chlorella pyrenoidosa à différents pH au cours de différentes expériences (voir annexe A).

pH	Jour	Expérience (Volume cellulaire moyen- μm^3)			
		A.F	A.G	A.H	A.I
4	1	322		332	
	4	288		297	
	5	229		264	
4.5	1			301	347
	4			248	242
	5				129
5	1	291	231		
	4	194	215		
	5	182	185		
5.5	1	241	260		
	4	238	253		
	5	165	222		
6	1	332	255		
	4	301	100		
	5	246	100		
7	1		185		
	4		86		
	5		76		

3.4.6 Conclusion

De l'ensemble de ces résultats, il en découle que les tests de toxicité avec les algues devraient être de durée relativement courte et se terminer avant que la croissance de la culture témoin ne devienne sévèrement contrainte à cause des facteurs limitants.

Selon la position de l'ISO et de l'OCDE les tests devraient être conçus pour que les cultures témoins poussent de façon exponentielle durant toute la durée du test. Il ne faut pas perdre de vue que même si la forme de croissance est de façon prédominante exponentielle, des croissances irrégulières peuvent survenir chez des cultures peu ou fortement inhibées. L'utilisation de la biomasse finale nous apparaît donc très contraignante vis-à-vis de l'interprétation des résultats.

Pour cette raison, le taux de croissance maximal pourra être utilisé de façon absolue d'une expérience à l'autre, mais pour bien comprendre les mécanismes de toxicité, les paramètres intégrateurs tels le taux de croissance moyen et l'aire sous la courbe pourront aussi être utilisés relativement à un témoin. De plus, l'état morphologique des cellules, soit la superficie et le volume cellulaires moyens, seront de bons indices pour aider l'interprétation des résultats observés à partir de l'état général de la courbe de croissance.

3.5 Effet du pH sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa

Dans les sous-chapitres précédents, on a tenté de mettre au point le milieu d'exposition de façon à ce que les tampons utilisés n'affectent pas la croissance de Chlorella pyrenoidosa. Notre choix s'est arrêté sur l'utilisation du tampon MES pour les pH <

6.0, sauf pour le pH 4.5 qui sera tamponné par DMGA; et le tampon HEPES pour le pH 7. La figure 3.3b présente l'efficacité de ces tampons à maintenir le pH alors que la figure 3.3a montre que le pH ne semble pas avoir d'effet significatif sur le taux maximum de division cellulaire.

Par le biais de l'étude comparative des paramètres de croissance, les résultats pour ces différents paramètres n'ont pas non plus démontré de tendance relative aux effets du pH, que ce soit pour la biomasse finale (figure 3.4), pour le taux de croissance moyen (tableau 3.4), pour l'aire sous la courbe de croissance (tableau 3.6) et pour le volume cellulaire moyen (tableau 3.7).

Claesson et Tornqvist (1988) ont aussi conclu que le pH n'avait aucun effet sur le taux de croissance de deux algues vertes tolérantes à l'acide: Monoraphidium dybowskii et Stichococcus sp. Les courbes de croissance avaient une forme similaire indépendamment du pH (5.0, 5.5 et 6.0). De plus, tout comme dans nos expériences, ces auteurs observaient un taux de croissance maximum comparable à celui observé pour Chlorella pyrenoidosa, même si leur milieu contenait du phosphore ($5.6 \mu\text{g P} \cdot \text{L}^{-1}$), alors que le nôtre n'en contient pas. Sans pour autant présenter de données pour appuyer leur conclusion, Helliwell et al. (1983) ont aussi rapporté peu d'effets dus à la variation du pH dans la gamme 4.9 à 7.1 sur le taux de croissance de Chlorella pyrenoidosa, mais ces auteurs n'utilisaient pas de tampons pour maintenir le pH constant.

3.6 Références

- 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. *J. Phycol.*, 18:521-529.
- Bekheet, I.A. et P.J. Syrett, 1977. Urea-degrading enzymes in algae. *Br. Phycol. J.*, 12:137-143.
- Bobée, B., Y. Grimard, M. Lachance et A. Tessier, 1982. Nature et étendue de l'acidification des lacs au Québec. INRS-eau. Rapport scientifique no 140, pour le ministère de l'Environnement du Québec, 243 p.
- Chiaudani, G. et M. Vighi, 1978. The use of Selenastrum capricornutum batch cultures in toxicity studies, *Mitt. Int. Verein. Limnol.*, 21:316-329.
- Claesson, A. et L. Tornqvist, 1988. The toxicity of aluminium to two acido-tolerant green algae. *Wat. Res.*, 22: 977-983.
- Colman, B., P.C. Brickell et K.A. Gehl, 1986. The uptake of mannitol and sorbitol by a species of Chlorella (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 22: 436-440.
- Dupont, J., 1985. Étude de la physico-chimie de 22 lacs du parc de la Vérendrye en rapport avec les processus d'acidification des eaux lacustres. Direction des relevés aquatiques, MENVIQ, 73 p.
- Ferguson, W.J., K.I. Braunschweiger, W.R. Braunschweiger, J.R. Smith, J. Justin McCormick, C. C. Wasmann, N. P. Jarvis, D. H. Bell et N. E. Good, 1980. Hydrogen ion buffers for biological research. *Anal. Biochem.*, 104:300-310.
- Francke, J.A. et H.J. TenCate, 1980. Ecotypic differentiation in response to nutritional factors in the algal genus Stigeoclonicum Kütz. (Chlorophyceae). *Br. Phycol. J.*, 15:343-355.

- Gensemer, R.W. et S.S. Kilham, 1984. Growth rates of five freshwater algae in well-buffered acidic media. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41: 1240-1243.
- Goldman, J.C., D.B. Porcella, E.J. Middlebrooks et D.F. Toerien, 1972. The effect of carbon on algal growth- its relationship to eutrophication. *Wat. Res.*, 6: 637-679.
- Good, N.E., G.D. Winget, W. Winter, T.N. Connolly, S. Izawa et R.M.M. Singh, 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, 5:467-477.
- Healy, F.P., 1977. Ammonium and urea uptake by some freshwater algae. *Can. J. Bot.*, 55:61-69.
- Helliwell, S., G.E. Batley, T.M. Florence et B.G. Lumsden, 1983. Speciation and toxicity of aluminium in a model fresh water. *Environ. Technol. Lett.*, 4:141-144.
- ISO, 1982. International Standards Organization, Draft method, Determination of toxicity with algae. ISO/TC 147/SC 5/WG5 N67. Nederlands Normalisatie-instituut, Delft, The Netherlands,
- Johnston, G.C., J.R. Pringle et L.H. Hartwell, 1977. Coordination of growth with cell division in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Exp. Cell Res.*, 105: 79-98.
- Joubert G., 1980. A bioassay application for quantitative toxicity measurements using the green algae Selenastrum capricornutum. *Wat. Res.*, 14: 1759-1763.
- Kallqvist, T., 1978. Noen erfaringer av alge-toksisitets tester ved NIVA, pp. 147-166. Dans: Toxicitetstester. Fjordtonde Nordiska Symposiet om Vattenforskning. Nordic Cooperative Organization of Applied Research. Secretariat of Environmental Sciences, Helsinki, Finland.
- Miller W.E., Greene J.C. et Shiroyama T. 1978. The Selenastrum capricornutum Printz Algal Assay Bottle Test. Experimental Design, Application, and Data Interpretation Protocol. EPA-600/9-78-018. U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR.

- Moss, B., 1973. The influence of environmental factors on the distribution of freshwater algae: an experimental study II: the role of pH and the carbon dioxide-bicarbonate system. *J. Ecol.*, 61: 157-177.
- Nyholm N., 1985. Response variable in algal growth inhibition tests-Biomass or growth rate? *Wat. Res.*, 19:273-279.
- OECD, 1981. Organization for Economic Cooperation and Development, Guideline for Testing of Chemicals, No. 201. Algal, Growth Inhibition Test, Paris, France.
- Payne A.G. et R.H. Hall, 1978. A method for measuring algal toxicity and its application to the safety assessment of new chemicals, pp. 171-180. Dans: *Aquatic Toxicology*, L.L. Marking et R.A. Kimerle (éds), ASTM STP 667, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- Raven, J.A., 1970. Exogenous inorganic carbon sources in plant photosynthesis. *Biol. Rev.*, 45:167-221.
- Schenck R.C., A. Tessier, et P.G.C. Campbell, 1988. The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. *Limnol. Oceanog.*, 33:538-550.
- Shapiro, J., 1973. Blue-green algae: why they become dominant. *Science*, 179: 382-384.
- Smith, R.V. et R.H. Foy, 1974. Improved hydrogen ion buffering of media for the culture of freshwater algae. *Br. Phycol. J.*, 9:239-245.
- Talling, J.F., 1976. The depletion of carbon dioxide from lake water by phytoplankton. *J. Ecol.*, 64:79-121.
- Tornqvist, L. et A. Claesson, 1987. The influence of aluminum on the cell-size distribution of two green algae. *J. Environ. Exp. Bot.*, 27: 481-488.

U.S. EPA, 1982. Environmental Effects Test Guidelines. Algal Acute Toxicity Test. EPA 560/6-82-002. Office of Toxic Substances. Office of Pesticides and Toxic Substances, U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR.

Walsh, G.E., K.M. Duke et R.B. Foster, 1982. Algae and crustaceans as indicators of bioactivity of industrial wastes. *Wat. Res.*, 16: 879-883.

Wehr, J.D., L.M. Brown et I.E. Vanderelst, 1986. Hydrogen ion buffering of culture media for algae from moderately acidic, oligotrophic waters. *J. Phycol.*, 22:88-94.

Whitton, B.A. et F.H.A. Shehata, 1982. Influence of cobalt, nickel, copper and cadmium on the blue-green alga Anacystis nidulans. *Environ. Pollut. (Series A)*, 27:275-281.

Wong, P.T.S. et P. Couture, 1986. Toxicity screening using phytoplankton, p.79-100. Dans: *Toxicity Testing using Microorganisms*, B.J. Dutka et G. Bitton (éds), Vol 2, CRC Press, Boca Raton, FLA.

Au total, 9 expériences se sont déroulées de juillet 1986 à juin 1987, et chacune d'elle présente des améliorations par rapport à la précédente. L'originalité de ces expériences tient du respect de l'intégrité à la fois des cellules algales et de la chimie du milieu. En effet, les milieux expérimentaux ne contiennent pas d'agents complexants significatifs mais leur force ionique est équivalente à celle qui prévaut dans le milieu de culture des algues. De plus, comme les milieux expérimentaux ne contiennent ni phosphore ni azote pouvant influencer la disponibilité et la spéciation des métaux, les cellules sont recueillies au début de leur phase exponentielle de croissance (lorsque les réserves intracellulaires sont élevées) de façon à permettre un suivi continu de croissance sans ces éléments nutritifs pendant une période de plusieurs jours.

Pour la mise au point du milieu expérimental, trois indicateurs de croissance ont été utilisés. Il s'agit de l'aspect visuel et qualitatif de la courbe de croissance, du taux maximal de croissance et de l'aire sous la courbe. Les moyennes et les écart type sont calculés sur 3 essais. La croissance est déterminée sur une période d'environ 4 jours et le pH mesuré régulièrement.

Les différences significatives entre les traitements sont testées par une analyse de variance à un seuil de 5%. L'hypothèse

principale que sous-tend cette analyse est l'égalité des moyennes ($H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$). L'hypothèse inverse (H_1) veut qu'au moins deux moyennes soient différentes. De plus, l'analyse de variance suppose l'égalité de variance et la normalité des populations d'origine. L'égalité des variances est vérifiée par un test de Bartlett. Si des différences significatives sont calculées (H_1 acceptée), on procède à un test de comparaisons multiples Duncan (Duncan's multiple range test) qui permet d'identifier les essais différents. Lorsque des comparaisons de moyennes sont effectuées entre 2 essais, le test t de Student est utilisé avec un seuil de signification de 5%.

Les systèmes de culture en batch sont utilisés dans la majorité des études de toxicité employant les algues, et les mesures sont souvent prises durant la période de croissance exponentielle. Il est connu que la toxicité d'un métal puisse varier selon l'âge et l'état physiologique de la culture (Gibson, 1972; Hutchinson et Stokes, 1975; De Fillippis et Pallaghy, 1976; Bates et al., 1983).

Morris et Glover (1974), Nalewajko et Lean (1978) ainsi que Bates (1981) ont démontré que des variations des taux de processus métaboliques donnés survenant durant les phases de latence, exponentielle et stationnaire résultaient en différentes compositions chimiques du phytoplancton (Sakshoug et Holm-Hansen,

1977) et possiblement à des seuils de sensibilité différents face à des stress chimiques.

De plus, la toxicité d'un métal peut varier selon l'étape du cycle de division cellulaire, ce qui s'avère important lorsque les cellules en culture batch se divisent de façon synchrone (Kanazawa et Kanazawa, 1969; Steemann-Nielsen et Kamp Nielsen, 1970; Hornung et al., 1981). C'est pourquoi on estime de plus, le pourcentage relatif du taux de croissance par rapport à un témoin afin de comparer les différentes expériences entre elles et éviter ainsi des comparaisons erronées dues à l'état physiologique différent des cultures. Les valeurs moyennes de la surface sous la courbe sont aussi présentées en pourcentage par rapport au témoin de façon à comparer les paramètres de croissance.

A.A Milieu AAP; pH 5 (NaOAc); pH 6(MES); pH 7 (PIPES) (0.01M)

La première expérience consistait à vérifier l'effet seul du pH sur le taux de croissance de Chlorella pyrenoidosa dans le milieu de culture AAP contenant un tampon (10 mM). Le PIPES (acide piperazine-N,N'-bis(2-éthanesulfonique) est utilisé pour maintenir le pH 7; le MES (acide 2-(N-morpholino-éthanesulfonique) pour le pH 6; et l'acétate de sodium (NaOAc) pour le pH 5. Dans ces conditions expérimentales, on observe une diminution du taux de croissance à pH 5.0 (figure A.A):

%relatif	Milieux	
	μ_{1-4}	(j ⁻¹)
AAP	0.77 ± 0.05	100
pH 7	0.77 ± 0.07	100
pH 6	0.71 ± 0.05	92
pH 5	0.01 ± 0.00	1* ¹

Les résultats de l'aire sous les courbes de croissance corroborent les résultats exprimés plus haut:

Milieux	Aire 10 ⁵ cell.·j·mL ⁻¹	% relatif
AAP	2.91 ± 1.68	100
pH 7	2.98 ± 0.14	102
pH 6	2.68 ± 0.59	92
pH 5	0.00 ± 0.00	0*

¹ * = différences significatives (p<0.05)

AAP-0.01M

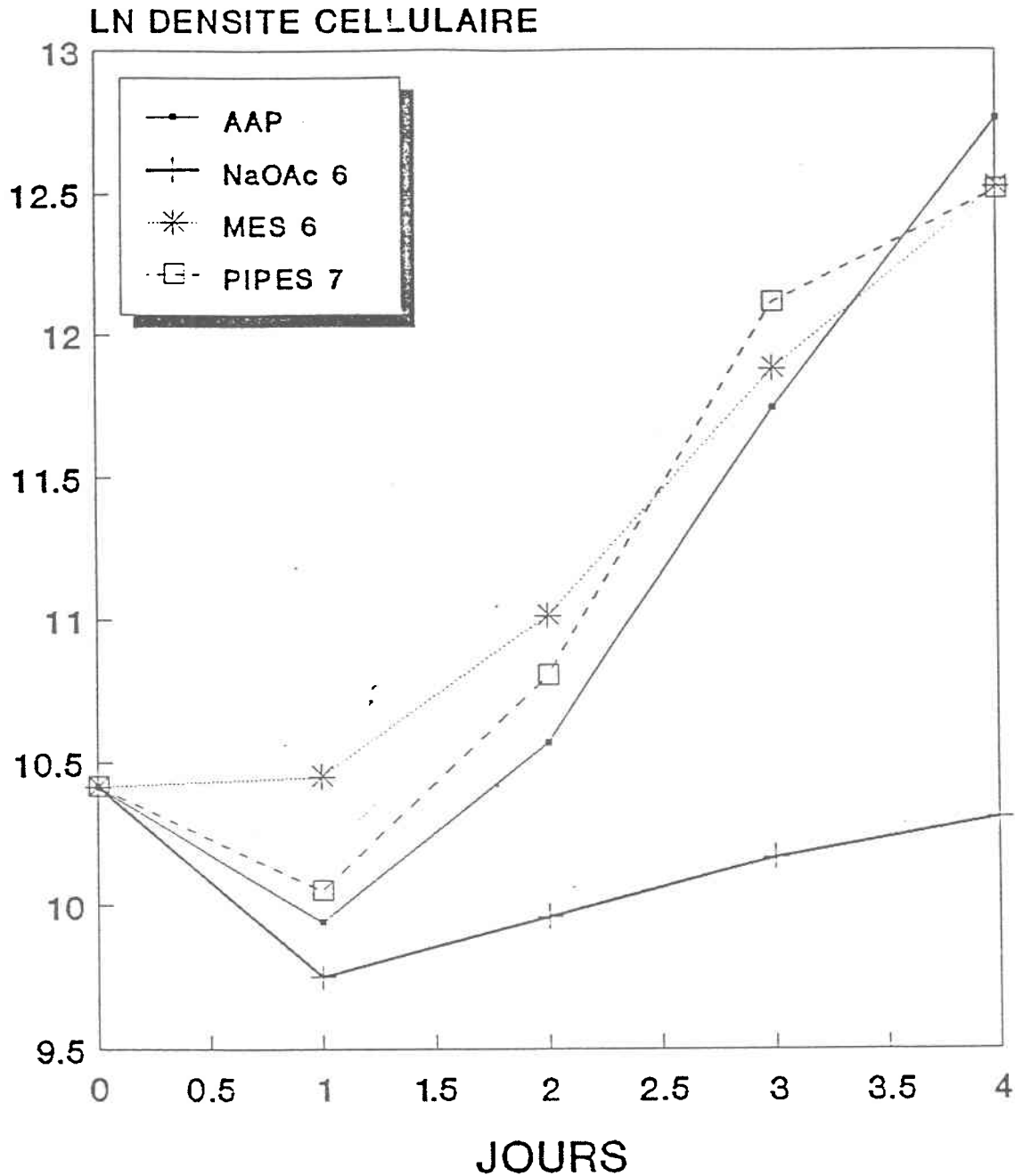


Figure A.A: Courbes de croissance de Chlorella pyrenoidosa dans un milieu AAP à différents pH tamponné avec NaOAc (pH 5), MES (pH 6) et PIPES (pH 7) 0.01M. Notons que le milieu "AAP" ne contient pas de tampon.

Etant donné que ces milieux étaient tamponnés et qu'ils contenaient du phosphore - ce qui serait inconcevable lors d'expériences avec l'aluminium - et étant donné que le taux de croissance mesuré à pH 5 était très faible et que ce pH en est un important dans l'étude de l'aluminium, l'expérience a été reprise en utilisant un milieu expérimental ne contenant ni agent complexant ni tampon, ainsi qu'en ajoutant un pH intermédiaire soit 5.5.

A.B Milieu AAP-T-MT; pH 5, 5.5, 6, 7

Dans ces conditions, on a observé une légère stimulation du taux de croissance à pH 5, quoique non significative.

Milieux	μ_{1-3} (j ⁻¹)	%relatif
pH 7	0.40 ± .08	100
pH 6	0.40 ± .07	100
pH 5.5	0.49 ± .09	123
pH 5	0.52 ± .07	148

On explique le fort taux de croissance observé à pH 5 par la forte diminution du nombre de cellules à t= 1 jour et à sa remontée rapide à t=3 jours (figure A.B). De plus, la mortalité initiale observée à pH 5 permet une plus grande disponibilité d'éléments nutritifs pour les cellules restantes, favorisant ainsi un taux de croissance plus élevé. Le calcul de l'aire sous les courbes de croissance pour chacun des pH, et pour une période de 4 jours, donne les résultats suivants:

Milieux	Aire ₀₋₄ 10 ⁴ cell.·j·mL ⁻¹	% relatif
pH 7	11.7 ± 0.9	
pH 6	17.1 ± 8.9	146
pH 5.5	9.9 ± 5.9	85
pH 5	2.3 ± 2.7	11*

Ces résultats très variables montrent effectivement que la densité cellulaire réelle des algues au cours de l'expérience est moindre à pH 5.

Il est à noter que l'algue étudiée ne semble pas apprécier outre mesure le nouveau milieu, puisque le taux de croissance à pH 7, par exemple, dans le milieu expérimental est beaucoup diminué comparativement à celui mesuré dans le milieu AAP dans l'expérience précédente (0.77-->0.40). Gensemer et Kilham (1984) ont observé le même phénomène avec Stephanodiscus hantzschii. Puisqu'on observe des variations de croissance aux différents pH et que l'absence de tampon ne permet pas le maintien du pH constant (tableau A.B), on a dû rejeter ce type de milieu expérimental.

Tableau A.B: Evolution du pH dans un milieu synthétique sans tampon, après une période d'incubation de 5 jours.

milieux	pH mesuré	
	t=0 j	t=5 j
pH 5	5.0	6.8
pH 5.5	5.5	6.8
pH 6	6.0	7.0
pH 7	7.0	6.9

On a repris l'expérience avec une faible concentration de tampon (0.001 M) pour contrôler chacun des pH.

AAP-P-MT SANS TAMPON

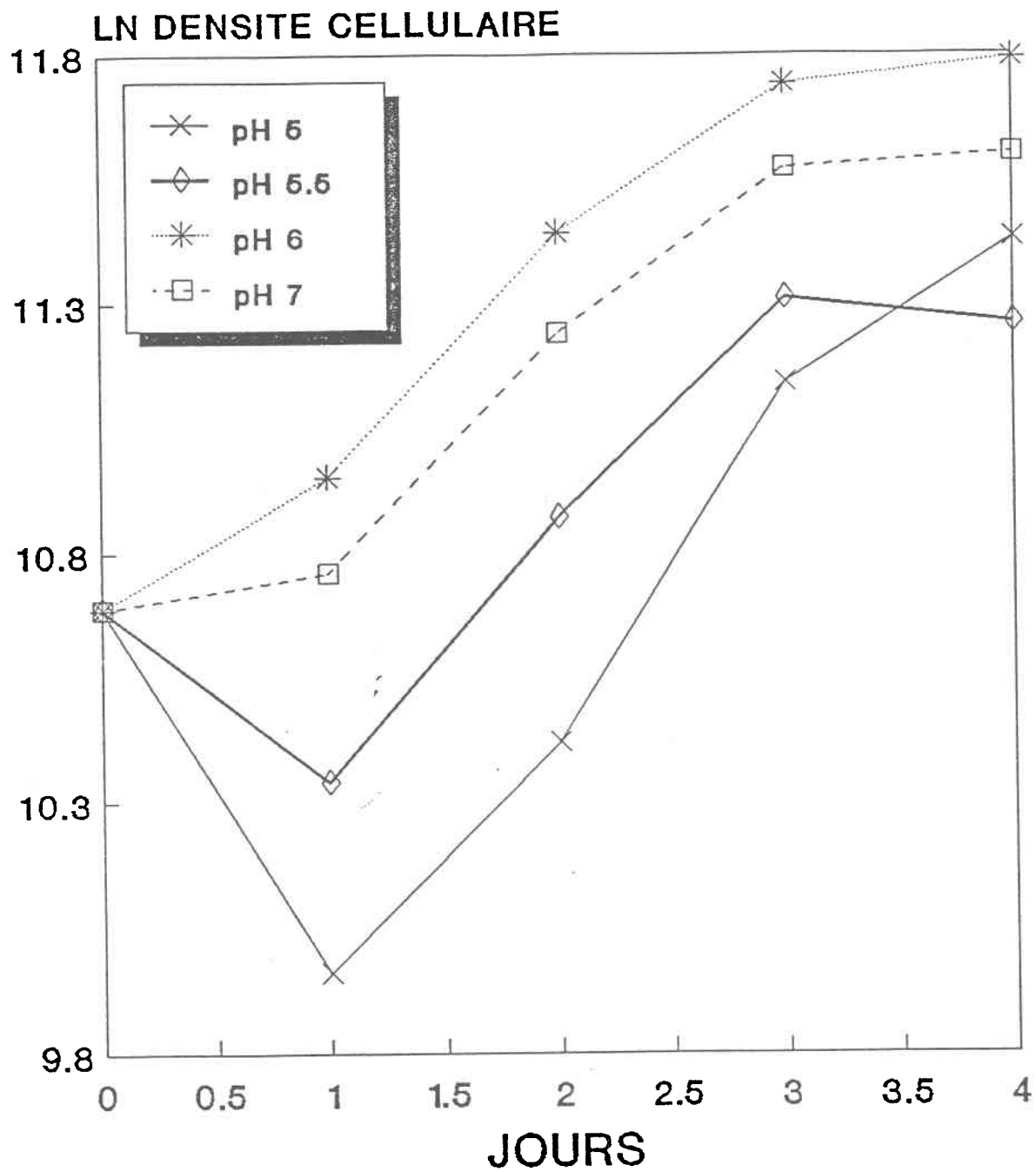


Figure A.B: Courbes de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* dans un milieu AAP ne contenant ni phosphore, ni métaux, ni tampons (Noter que le pH s'est avéré très variable).

A.C Milieu AAP-P-MT; pH 5 (NaOAc); pH 5.5, 6 (MES); pH 7 (PIPES)
(0.001M)

Dans ces conditions, à peu près les mêmes résultats qu'en A.B. sont observés: croissance légèrement plus élevée aux faibles pH (5.0, 5.5, 6.0) comparativement au pH de 7, mais les différences ne sont pas significatives:

Milieux	μ_{0-3} (j ⁻¹)	% relatif
pH 7	0.51 ± 0.16	100
pH 6	0.72 ± 0.12	141
pH 5.5	0.77 ± 0.04	151
pH 5.0	0.75 ± 0.18	147

Milieux	Aire ⁰⁻⁴ 10 ⁴ cell. · j · mL ⁻¹	% relatif
pH 7	23.9 ± 8.23	100
pH 6	20.7 ± 2.95	87
pH 5.5	21.4 ± 4.64	90
pH 5.0	32.0 ± 2.18	134

En général, la forme de la courbe de croissance est semblable pour tous les pH (figure A.C). Par contre, tout comme dans l'expérience précédente, les pH ne sont pas demeurés constants:

milieu	pH mesuré	
	t=0 j	t=5 j
pH 5	5.0	5.9
pH 5.5	5.5	5.95
pH 6	6.05	6.17
pH 7	7.07	7.3

La concentration du tampon (0.001 M) n'était pas assez élevée pour maintenir le pH constant.

AAP-P-MT, 0.001M

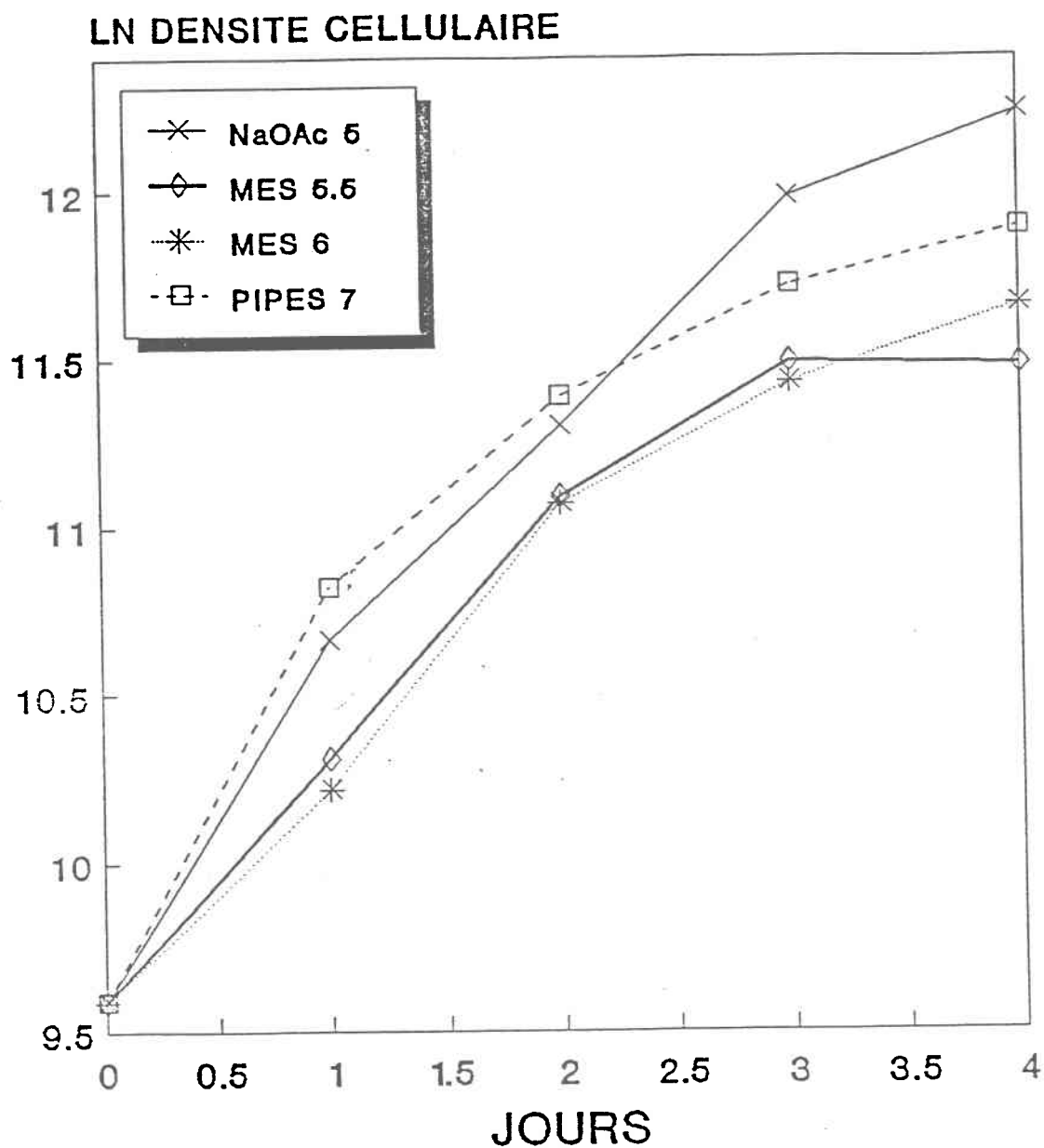


Figure A.C: Courbes de croissance de Chlorella pyrenoidosa dans un milieu AAP-P-MT à différents pH tamponné avec NaOAc (pH 5), MES (pH 5.5, pH 6) et PIPES (pH 7) 0.001M.

A.D Milieu AAP-P-MT; pH 5 (NaOAc); pH 5.5, 6 (MES); pH 7 (PIPES)
(0.01M)

On a recommencé l'expérience en présence de 10 mM de tampon au lieu de 1 mM. La figure A.D présente les courbes de croissance de Chlorella pyrenoidosa pendant 4 jours à différents pH. Chaque point correspond à la moyenne de 3 essais. Il est à noter que dans cette expérience, comme dans la dernière, qu'il n'y a pas de période de latence au début de la courbe de croissance. Selon Claesson et Tornqvist (1988), une phase lag signifie "un délai dans l'initiation de croissance" avant que le nombre de cellules ne commence à augmenter. En général, le type de courbe est similaire pour tous les pH à l'exception du pH 5, comme on l'avait observé dans la toute première expérience (A.A) où là aussi on avait tamponné le milieu à une concentration de 10 mM.

Le taux de croissance calculé entre le jour 1 et le jour 3 montre qu'il n'y a pas de différences de croissance entre les pH sauf pour le pH 5 où on n'obtient pas de croissance. Il en va de même pour l'aire sous la courbe.

Milieux	μ_{0-3} (j ⁻¹)	% relatif
pH 7	0.77 ± 0.03	100
pH 6	0.73 ± 0.06	95
pH 5.5	0.64 ± 0.11	83
pH 5.0	0	0

AAP-P-MT, 0.01M

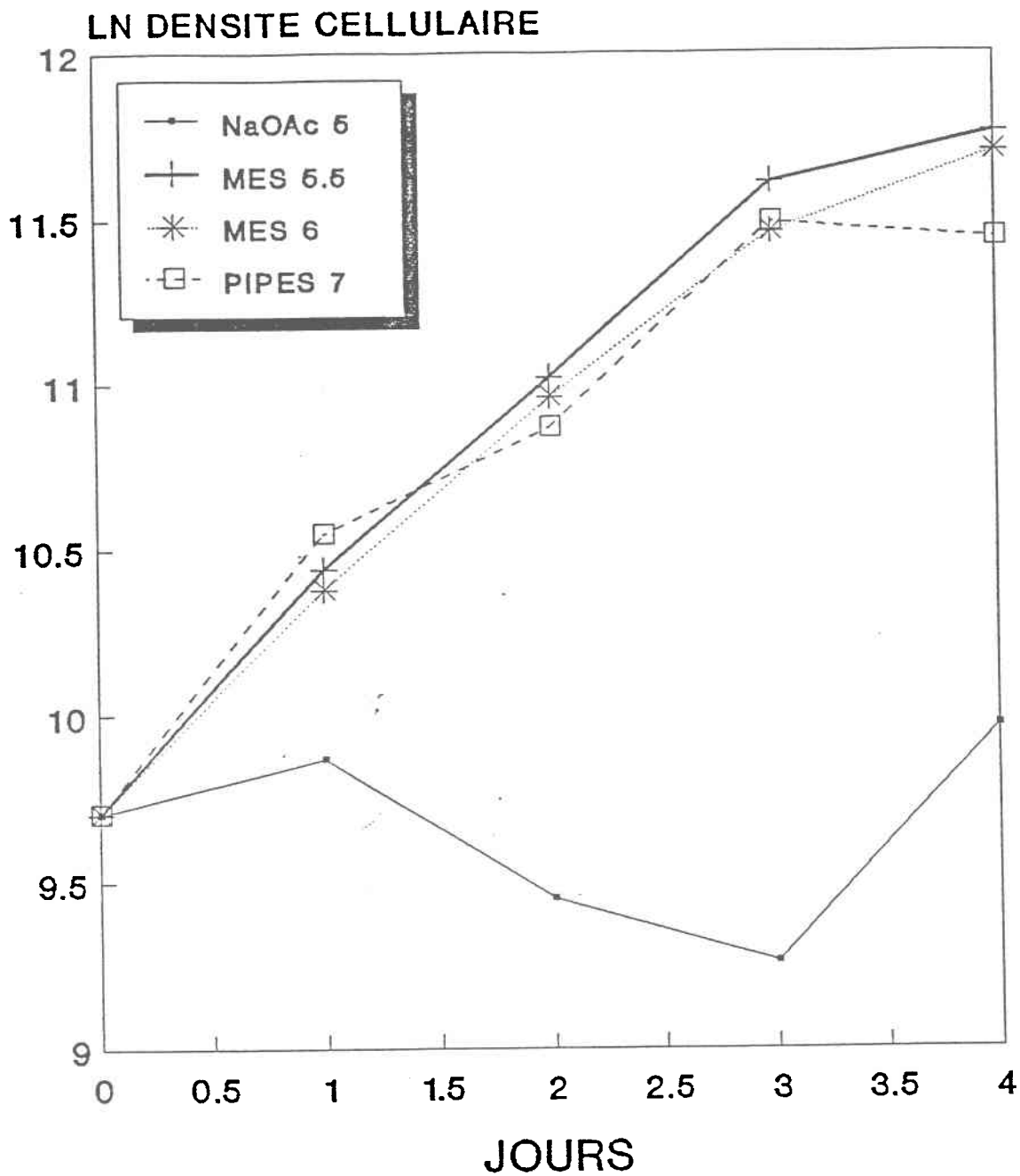


Figure A.D: Courbes de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* dans un milieu AAP-P-MT à différents pH tamponné avec NaOAc (pH 5), MES (pH 5.5, pH 6) et PIPES (pH 7) 0.01M.

Milieux	Aire ₀₋₄ 10 ⁵ cell.·j·mL ⁻¹	% relatif
pH 7	14.4 ± 1.1	
pH 6	20.9 ± 2.5	145*
pH 5.5	21.4 ± 4.6	149*
pH 5.0	0 ± 0.0	0*

Par ailleurs, contrairement aux expériences précédentes, à cette concentration de tampon, on n'observe pas de variations significatives du pH (tableau A.D).

Tableau A.D: Evolution du pH dans un milieu synthétique avec tampon (10⁻² M), pendant une période d'incubation de 4 jours.

		pH mesuré				
Jours	0	1	2	3	4	
<u>milieux</u>						
pH 5	5.03	5.25	5.22	5.21	5.21	
pH 5.5	5.41	5.43	5.43	5.42	5.42	
pH 6	6.08	6.10	6.07	6.07	6.04	
pH 7	7.07	7.08	7.07	7.07	7.05	

L'observation de l'effet négatif sur le taux de croissance d'un seul type de milieu, soit celui de pH 5 tamponné à 0.01 M avec l'acétate de sodium, a permis de mettre en doute la

non-toxicité du tampon utilisé. P. M. Stokes (Université de Toronto, Institut pour les Etudes environnementales: communication personnelle) a déjà observé que l'acétate de sodium avait une action toxique chez certaines algues. Comme le pH 5 est primordial dans l'exercice des expériences futures avec l'aluminium, le tampon MES a été testé pour son utilisation éventuelle afin de maintenir le pH 5 constant. De plus ce tampon ne présenterait pas de toxicité sur les algues lorsqu'utilisé aux pH 5.5 et 6.0 des expériences précédentes.

A.E Milieu AAP-P-MT; pH 5, 5.5, 6 (MES); pH 7 (PIPES) (0.01M)

Dans cette expérience on note que l'effet du pH sur le taux de croissance de Chlorella pyrenoidosa dans un milieu synthétique ne contenant ni phosphore, ni métaux, mais des tampons à 10 mM n'était significatif que pour le pH 5 ($\alpha \leq 0.001$; test de Kruskal-Wallis). Par contre lorsqu'on mesure l'aire sous la courbe on n'obtient pas de différences significatives entre les divers pH.

Milieux	μ_{1-3} (j^{-1})	% relatif
pH 7	1.00 ± .12	
pH 6	1.46 ± .44	146
pH 5.5	1.04 ± .06	104
pH 5	0.66 ± .05	66

Milieux	Aire $0-4$ $10^4 \text{ cell.} \cdot j \cdot \text{mL}^{-1}$	% relatif
pH 7	8.26 ± 1.38	
pH 6	6.99 ± 1.90	85
pH 5.5	6.10 ± 0.50	74
pH 5	7.23 ± 1.05	88

Les courbes de croissance sont aussi très similaires, indépendamment des pH (figure A.E).

AAP-P-MT; 0.01M

LN DENSITE CELLULAIRE

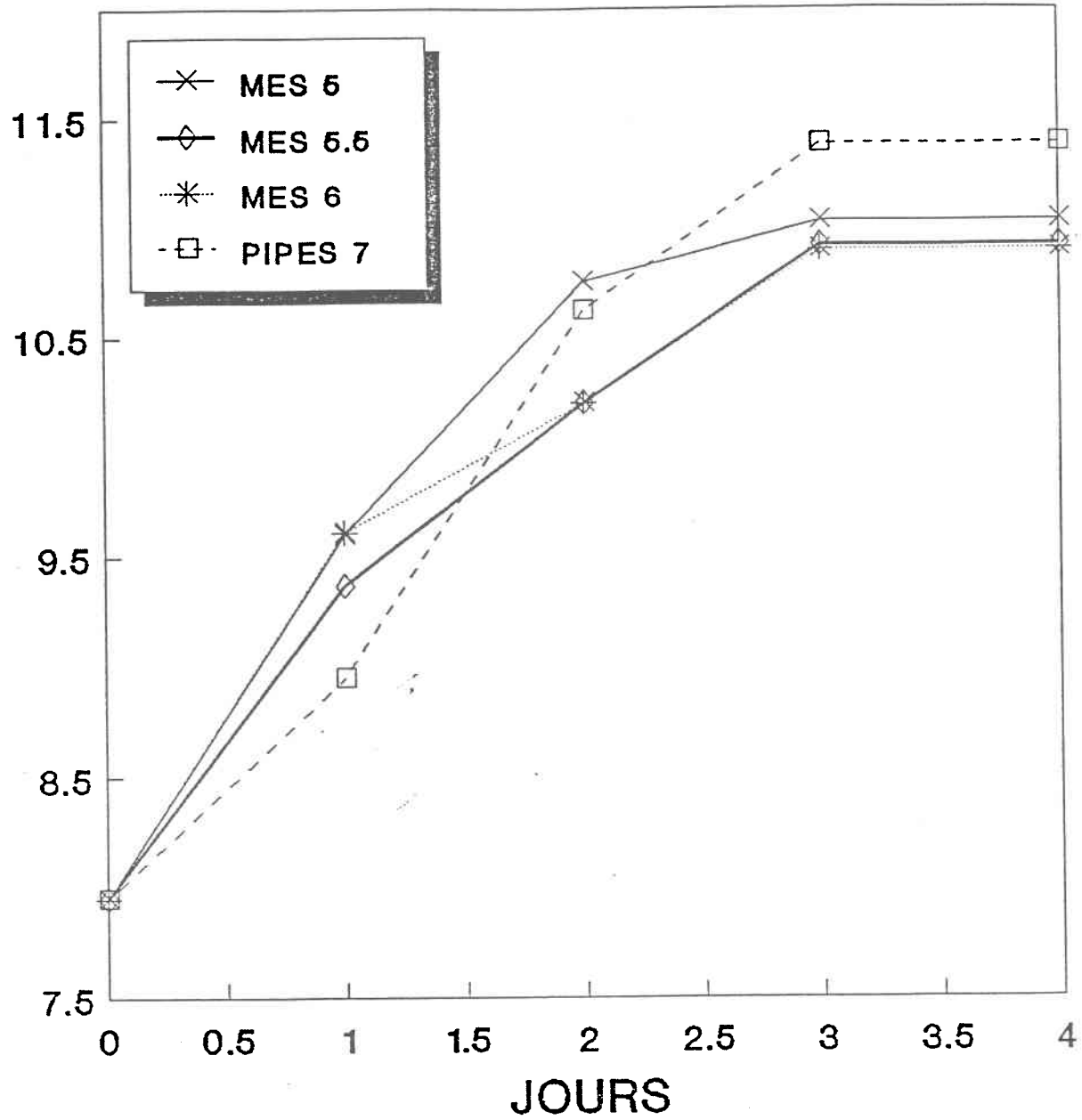


Figure A.E: Courbes de croissance de Chlorella pyrenoidosa dans un milieu AAP-P-MT à différents pH tamponné avec MES (pH 5, 5.5, 6) et PIPES (pH 7) 0.01 M.

A.F Milieu AAP-P-MT; pH 4, 4.5 (MES, NaOAc); pH 5, 5.5, 6 (MES);
pH 7 (PIPES); (0.01 M)

On a reproduit la même expérience que celle qui précède à l'exception qu'on a vérifié l'effet de pH plus bas sur la croissance (4.0 et 4.5). Pour valider le constat de l'expérience précédente, on a utilisé à la fois le tampon d'acétate de sodium et le MES pour maintenir les pH 4 et 4.5 constants. Pour les pH 5.0, 5.5 et 6.0 seul le tampon MES a été utilisé tandis que pour le pH 7.0, on a utilisé le PIPES. Les courbes de croissance obtenues sont présentées à la figure A.F. On remarque que la toxicité de l'acétate de sodium observée dans les expériences antérieures se répète ici. Pour les milieux tamponnés par le MES, les courbes sont similaires. Les taux de croissance calculés entre le jour 1 et le jour 4 donnent les résultats suivants:

	Milieux	U_{1-4} (j^{-1})	% relatif
PIPES	pH 7	0.48 ± 0.15	100*
	pH 6	0.68 ± 0.01	142
	pH 5.5	0.73 ± 0.07	152
MES	pH 5	0.66 ± 0.10	138
	pH 4.5	0.62 ± 0.04	129
	pH 4.0	0.85 ± 0.07	177
Acétate de sodium	pH 4.5	0.31 ± 0.02	65*
	pH 4.0	0.16 ± 0.06	33*

Milieux	Aire ₀₋₄ 10 ⁵ cell.·j·mL ⁻¹	% relatif	
PIPES	pH 7	3.28 ± 1.72	100*
	pH 6	7.47 ± 0.99	228
	pH 5.5	6.90 ± 0.18	210
MES	pH 5	7.00 ± 0.40	213
	pH 4.5	5.49 ± 0.48	167
	pH 4.0	6.63 ± 1.69	202
Acétate de sodium	pH 4.5	0.06 ± 0.01	18*
	pH 4.0	0.00 ± 0.00	0*

Les milieux à pH 4 et 4.5, tamponnés par l'acétate de sodium, sont démarqués autant par le faible taux de croissance maximum que par la faible aire sous la courbe. La même chose se produit à pH 7.0. Par contre, les milieux maintenus entre pH entre 4.0 et 6.0, tamponnés avec MES, ne montrent pas en général d'effet significatif sur le taux de croissance ni sur l'aire sous la courbe de croissance de Chlorella pyrenoidosa. Nous avons mesuré le pH dans les milieux de culture après 8 jours d'incubation avec les algues:

Tableau A.F: Evolution du pH dans un milieu synthétique avec tampon, sur une période d'incubation de 8 jours.

		pH mesuré	
milieux		t=0 j	t=8 j
Acétate sodium	pH 4.0	4.0	4.37
	pH 4.5	4.5	4.86
	pH 4.0	4.0	4.48
	pH 4.5	4.5	4.71
MES	pH 5	5.0	5.09
	pH 5.5	5.5	5.53
	pH 6	6.0	6.04
PIPES	pH 7	7.0	7.00

L'augmentation du pH peut sembler considérable mais il faut se rappeler que cette mesure a été prise après 8 jours d'incubation à cause de problèmes techniques alors que pour les autres expériences elle l'était après 4 ou 5 jours. Conséquemment, si ces milieux sont utilisés pour des expériences ultérieures les tests ne devront pas dépasser ce laps de temps afin d'éviter le plus possible les variations de pH.

AAP-P-MT; 0.01M

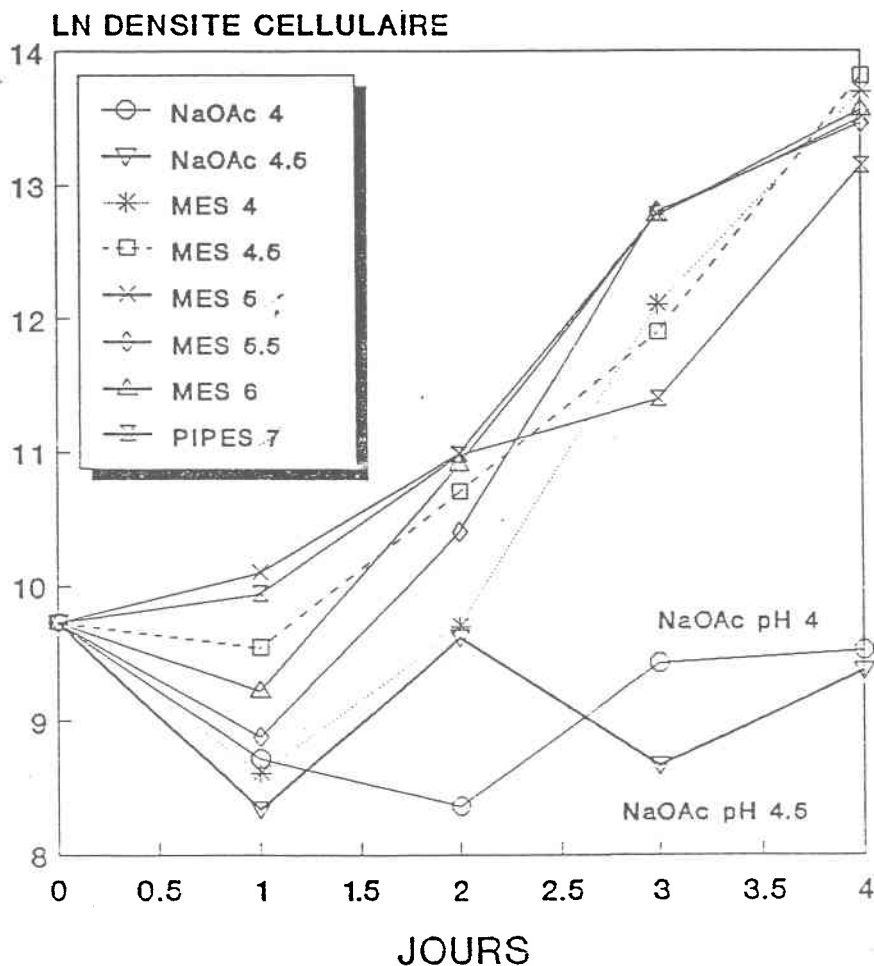


Figure A.F: Courbes de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* dans un milieu AAP-P-MT à différents pH tamponné avec de l'acétate de sodium (pH 4, 4.5), MES (pH 4, 4.5, 5, 5.5, pH 6) et PIPES (pH 7) 0.01 M.

A.G Milieu AAP-P-MT; pH 5, 5.5, 6 (MES); pH 7 (PIPES; HEPES);
(0.01M)

Pour évaluer la part de toxicité reliée au tampon par rapport à celle reliée au pH 7, nous avons repris l'expérience ci-dessus où le pH est maintenu constant par l'utilisation du tampon PIPES d'une part et du tampon HEPES d'autre part. Comme témoin, nous avons refait les pH 5, 5.5 et 6 avec le MES comme tampon (10 mM). Les résultats obtenus apparaissent à la figure A.G. Notons que la courbe de croissance la plus basse correspond au pH 7 avec PIPES comme dans l'expérience précédente à ce pH, et que pour le même pH mais avec de HEPES, la courbe est la plus élevée. Les calculs du taux de croissance maximum et de l'aire sous la courbe rendent compte aussi de ces observations qualitatives (tableau A.G). En effet, en général seul le pH 7 tamponné avec PIPES donne un taux de croissance et une aire sous la courbe plus faible. Notons par contre que le pH 7 (HEPES) donne des valeurs assez élevées de ces deux paramètres.

Milieux	Tampons	μ_{0-4} (j^{-1})	% relatif
pH 7	PIPES	0.43 ± 0.03	100
pH 7	HEPES	0.77 ± 0.05	179
pH 6	MES	0.59 ± 0.03	137
pH 5.5	MES	0.58 ± 0.12	135
pH 5	MES	0.75 ± 0.05	174

Milieux	Tampons	Aire ⁰⁻⁴ 10 ⁵ cell. · j · mL ⁻¹	% relatif
pH 7	PIPES	9.04 ± 0.84	100
pH 7	HEPES	19.81 ± 2.01	219
pH 6	MES	12.96 ± 1.82	143
pH 5.5	MES	11.83 ± 3.16	131
pH 5	MES	13.21 ± 0.77	146

AAP-P-MT; 0.01M

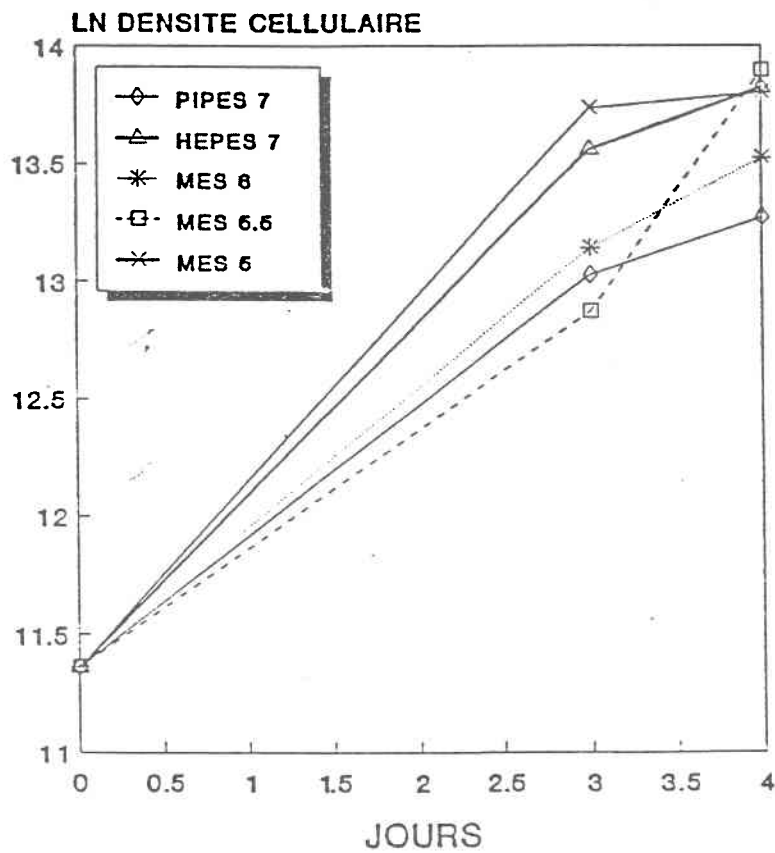


Figure A.G: Courbes de croissance de Chlorella pyrenoidosa dans un milieu AAP-P-MT à différents pH tamponné avec MES (pH 5, 5.5, pH 6), PIPES (pH 7) et HEPES (pH 7) 0.01M.

Les pH ont été mesurés au cours de cette expérience. Les résultats apparaissent au tableau suivant:

Tableau A.G: Evolution du pH dans un milieu synthétique avec tampon (10^{-2} M), pendant une période d'incubation de 7 jours.

milieu	t=0	j	t=1 j	<u>pH mesuré</u>			
				t=4 j	t=5 j	t=6 j	t=7 j
PIPES 7	7.08		7.04	7.15	7.13	7.19	7.18
HEPES 7	7.04		7.02	7.09	7.10	7.16	7.21
MES 6	6.05		6.04	6.06	6.11	6.17	6.20
MES 5.5	5.55		5.48	5.65	5.67	5.73	5.76
MES 5	5.13		5.09	5.32	5.36	5.45	5.49

Notons que l'augmentation du pH se fait surtout sentir après 4 jours d'incubation.

A.H Milieu AAP-P-MT; pH 4, 4.5 (MES, DMGA); (0.01 M)

Maintenant que le tampon du pH 7.0 est bien déterminé, nous avons voulu améliorer le milieu expérimental à bas pH (4.0 et 4.5) en utilisant un tampon dont le pK_a serait plus proche de ces valeurs de pH contrairement au MES, qui permet de forte dérivation de pH à bas pH (voir 3.3.6). Pour ce faire nous avons évalué l'effet du pH (4.0 et 4.5) ou du tampon (MES et DMGA) sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa. Les courbes de croissance obtenues pendant une période de 7 jours sont présentées à la figure A.H. Il n'y a pas eu de croissance à pH 4.0 dans le milieu tamponné avec du DMGA (10 mM). Les explications possibles à cette observation sont d'une part l'effet toxique du DMGA en milieu contaminé par des bactéries (Ferguson et al., 1980) ou d'autre part tout simplement un effet du pH. La première explication n'est pas vraiment plausible puisque les cultures ont été faites toutes de la même façon et on n'observe pas ce phénomène à pH 4.5. De plus, ce sont les mêmes résultats que l'on retrouve pour les trois réplicats. La deuxième explication pourrait s'avérer plus véritable puisqu'en effet c'est la première fois que le pH 4 est maintenu relativement constant tout au cours de l'expérience (tableau A.H), alors que dans les milieux contenant du MES les pH de ce niveau ont beaucoup augmenté pendant cette même période.

AAP-P-MT; 0.01M

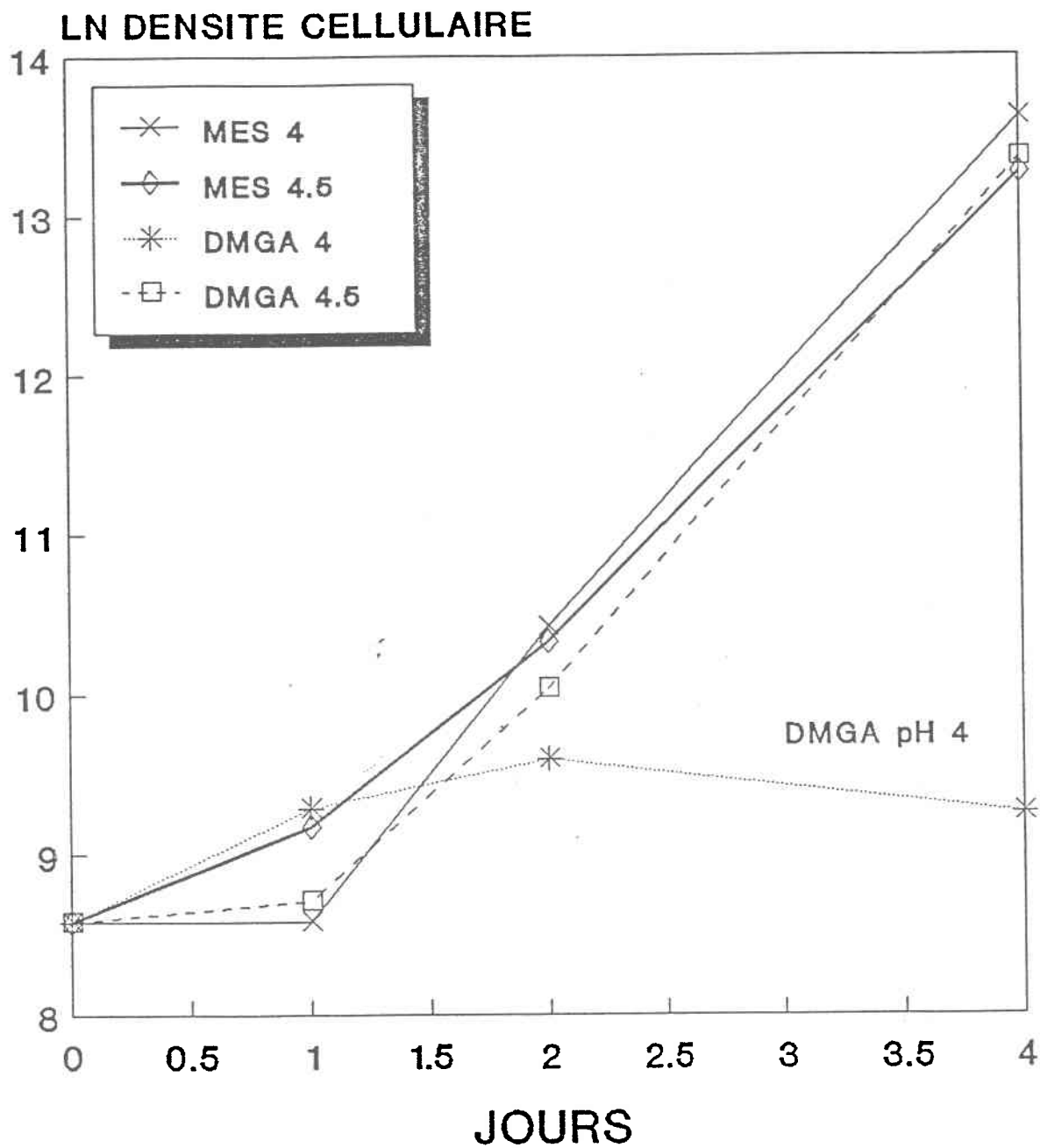


Figure A.H: Courbes de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* dans un milieu AAP-P-MT à différents pH tamponné avec MES (pH 4, 4.5) et DMGA (pH 4, 4.5) 0.01M.

Tableau A.H: Evolution du pH dans un milieu synthétique avec tampon (10^{-2} M), pendant une période d'incubation de 8 jours.

milieu	t=1 j	pH mesuré		t=8 j
		t=2 j	t=7 j	
MES 4.0	4.10	4.16	4.50	4.46
MES 4.5	4.62	4.90	5.09	5.10
DMGA 4.0	4.12	4.17	4.12	4.17
DMGA 4.5	4.63	4.70	4.85	4.90

Les valeurs du taux de croissance maximal et de l'aire sous la courbe nous montrent que les milieux de même pH mais tamponnés différemment n'agissent pas de la même façon sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa. Par contre, dans les milieux tamponnés avec MES les effets sont similaires autant pour la croissance maximale que pour l'aire sous la courbe:

Milieux	Tampons	μ_{1-4} (j ⁻¹)	% relatif
pH 4	MES	0.96 ± .09	100
pH 4	DMGA	0.01 ± .20	1
pH 4.5	MES	0.81 ± .04	84
pH 4.5	DMGA	0.96 ± .01	100

Milieux	Tampons	Aire $0-4$ 10^6 cell.·j·mL ⁻¹	% relatif
pH 4	MES	2.02 ± 0.53	100
pH 4	DMGA	0.00 ± 0.01	0
pH 4.5	MES	1.50 ± 0.19	74
pH 4.5	DMGA	3.26 ± 0.09	161

A.I Milieu AAP-P-TM; pH 4, 4.5 (DMGA); (0.01 M)

Pour s'assurer que dans l'expérience précédente les résultats obtenus n'étaient pas dus à une contamination, nous l'avons reprise et avons obtenu les mêmes résultats (figure A.I.). Effectivement, aucune croissance n'est observée à pH 4.0 quand le milieu est tamponné avec DMGA et au contraire, tout comme on l'a observé dans l'expérience A.H, la croissance à pH 4.5 s'avère très élevée. D'ailleurs les taux de croissance maximum ainsi que la surface sous la courbe reflètent ces résultats:

Milieux	μ_{1-4} (j ⁻¹)
pH 4.0	0.00 ± .08
pH 4.5	1.22 ± .04

Milieux	Aire 10 ⁶ cell. · j ⁻¹ · mL ⁻¹
pH 4.5	2.12 ± 0.17
pH 4.0	0.00 ± 0.01

AAP-P-MT; 0.01M

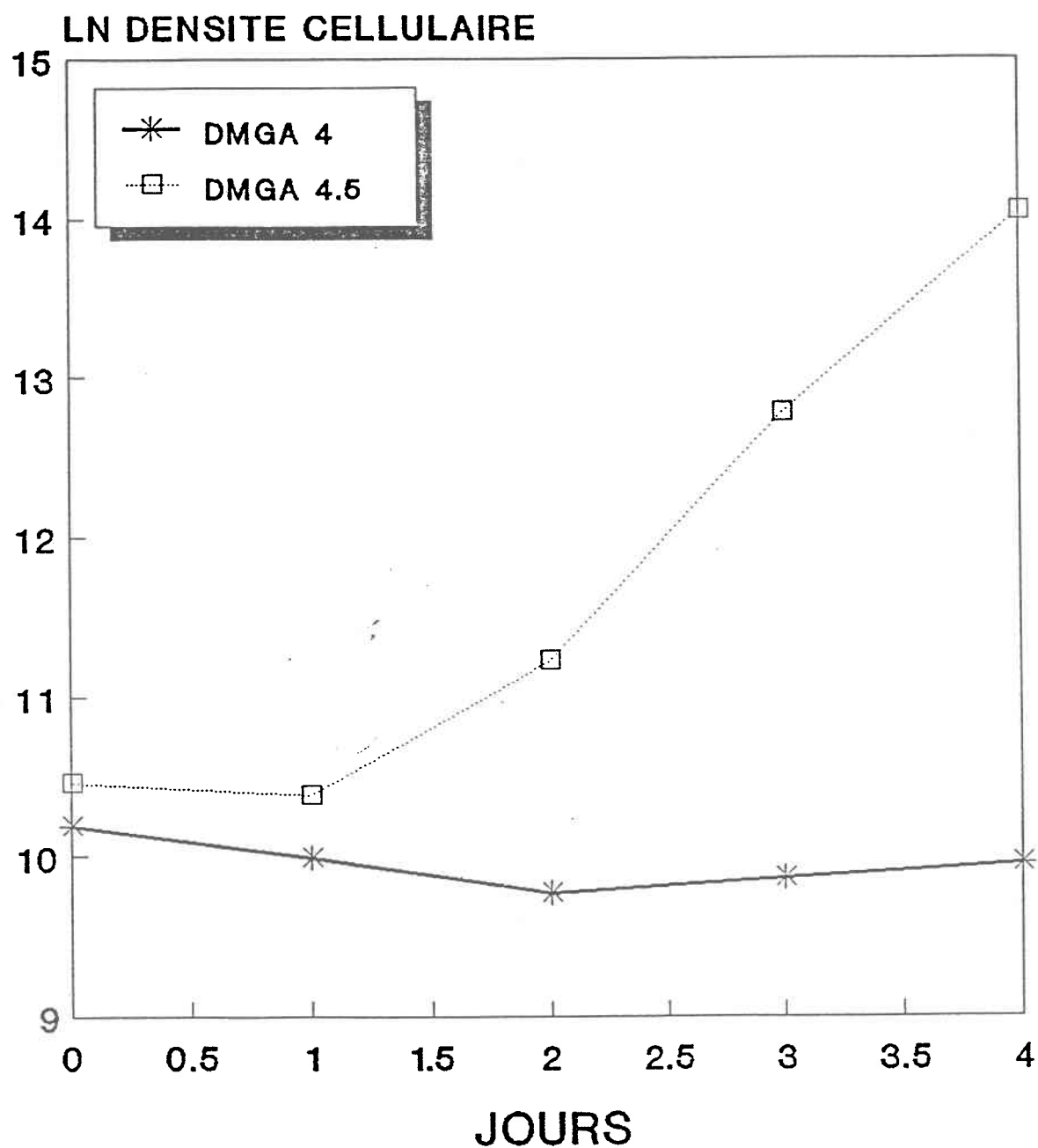


Figure A.I: Courbes de croissance de Chlorella pyrenoidosa dans un milieu AAP-P-MT à différents pH tamponné avec DMGA (pH 4, 4.5) 0.01M.

A la suite de toutes ces expériences, on a donc opté pour l'utilisation des tampons DMGA ($4.5 < \text{pH} < 5.0$); MES ($5.0 < \text{pH} < 6.0$) et HEPES ($6.0 < \text{pH} < 7.0$) dans une concentration de 0.01 M pour les expériences ultérieures en considérant que le pH seul n'aurait pas d'effet sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa.

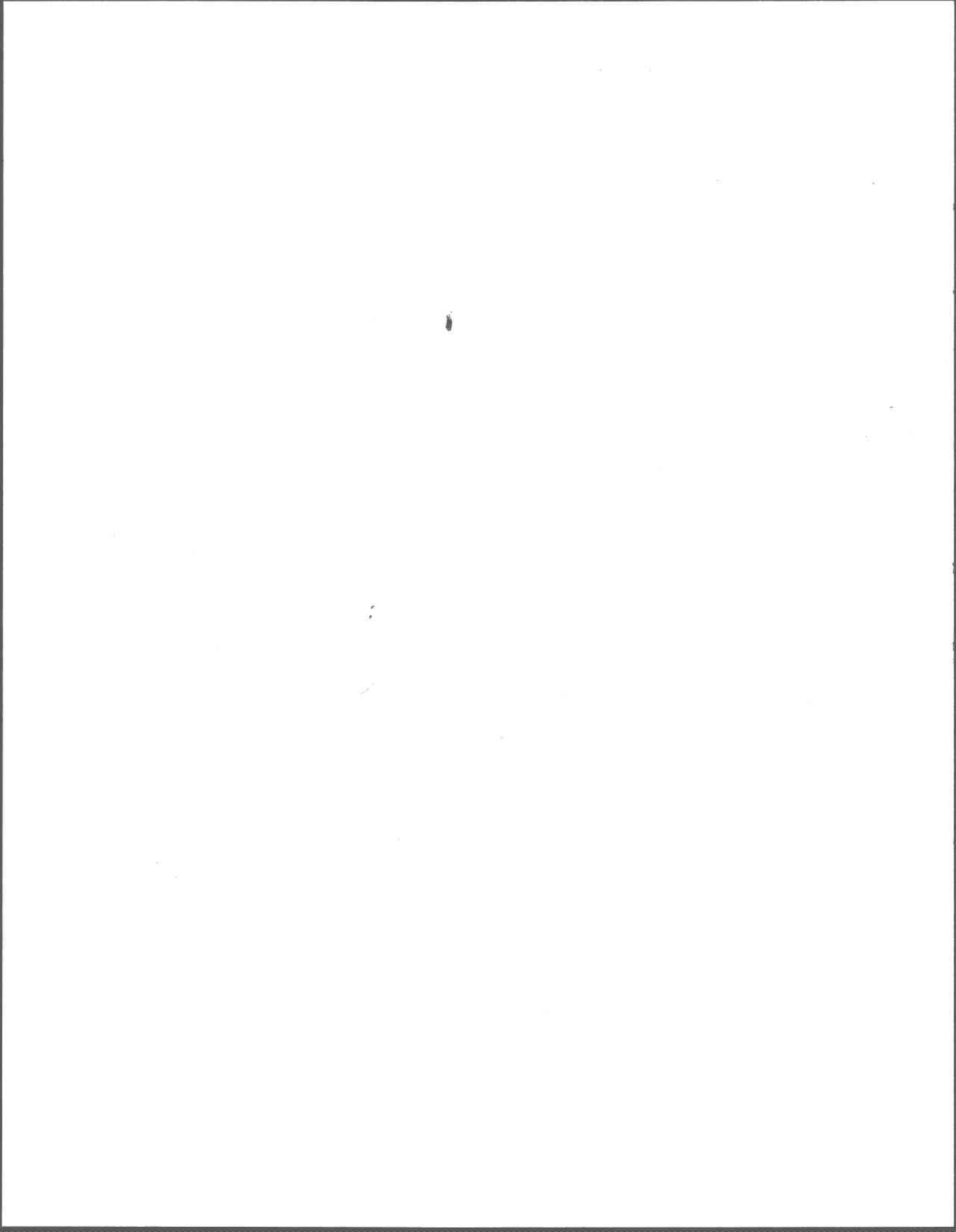
Références

- 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. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40: 895-904.
- Bates, S.S., 1981. Determination of the physiological state of marine phytoplankton by use of radiosulfate incorporation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 51: 219-239.
- Claesson, A. et L. Tornqvist, 1988. The toxicity of aluminium to two acido-tolerant green algae. *Wat. Res.*, 22: 977-983.
- De Fillippis, L.F. et C.K. Pallaghy, 1976. The effect of sub-lethal concentrations of mercury and zinc on Chlorella. III. Development and possible mechanisms of resistance to metals. *Z. Pflanzenphysiol.*, 79:323-335.
- Ferguson, W.J., K.I. Braunschweiger, W.R. Braunschweiger, J.R. Smith, J. Justin McCormick, C. C. Wasmann, N. P. Jarvis, D. H. Bell et N. E. Good, 1980. Hydrogen ion buffers for biological research. *Anal. Biochem.*, 104:300-310.
- Gensemer, R.W. et S.S. Kilham, 1984. Growth rates of five freshwater algae in well-buffered acidic media. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41: 1240-1243.
- Gibson, C.E., 1972. The algicidal effect of copper on a green and blue-green alga and some ecological implications. *J. Appl. Ecol.* 9:513-518.
- Hornung, U., H. von Witsh et F. Menke, 1981. Cadmium repression of the growth of Coelastrum proboscideum (Chlorococcales) and some counteraction factors. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 60 (Algol. Stud. 28): 298-312.
- Hutchinson, T.C. et P. M. Stokes, 1975. Heavy metal toxicity and algal bioassays, p. 320-643. Dans: *Spec. Tech. Publ.* 573. American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA.
- Kanazawa, T. et K. Kanazawa, 1969. Specific inhibitory effect of copper on cellular division in Chlorella. *Plant Cell Physiol.*, Tokyo 10:495-502.
- Morris, I. et H. E. Glover, 1974. Questions on the mechanism of temperature adaptation in marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, 24: 147-154.

Nalewajko, C. et D. R. S. Lean, 1978. Phosphorus kinetics-algal growth relationships in batch cultures. Mitt. Int. Verein. Limnol., 21:184-192.

Sakshoug, E., et O. Holm-Hansen, 1977. Chemical composition of Skeletonema costatum (Grev.) Cleve and Pavlova (Monochrysis) lutheri (Droop) Green as a function of nitrate-, phosphate- and iron-limited growth. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 29:1-34.

Steemann-Nielsen, E. et L. Kamp-Nielson, 1970. Influence of deleterious concentrations of copper on the growth of Chlorella pyrenoidosa. Physiol. Plant, 23:828-840.



CHAPITRE 4: EFFETS DU pH SUR LES INTERACTIONS MÉTAUX/SURFACE ALGALE

CHAPITRE 4: EFFETS DU pH SUR LES INTERACTIONS MÉTAUX/SURFACE ALGALE

	Page
4.1 Introduction.....	187
4.2 Titrage des algues.....	192
4.2.1 Introduction.....	192
4.2.2 Matériel et méthodes.....	196
4.2.3 Résultats.....	199
4.2.4 Discussion.....	211
4.3 Effet du pH sur l'adsorption du Mn.....	219
4.3.1 Introduction.....	219
4.3.2 Matériel et méthodes.....	220
4.3.3 Résultats.....	225
4.3.4 Discussion.....	229
4.4 Effet du pH sur la perméabilité membranaire.....	236
4.4.1 Introduction.....	236
4.4.2 Matériel et méthodes.....	239
4.4.3 Résultats.....	240
4.4.4 Discussion.....	243
4.5 Conclusion.....	244
4.6 Références.....	246

CHAPITRE 4: EFFETS DU pH SUR LES INTERACTIONS MÉTAUX/SURFACE ALGALE

4.1 Introduction

Généralités

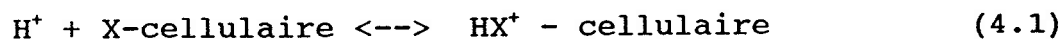
Depuis une quinzaine d'années, on a noté un intérêt marqué portant sur les effets possibles de l'acidification sur les écosystèmes aquatiques (Almer et al., 1978; NRCC, 1981). De plus, une attention particulière est portée sur les métaux traces, vu la mobilisation géochimique de certains métaux qui se produit en même temps que l'acidification des eaux de surface.

La problématique qui relie les métaux aux précipitations acides, ou tout simplement à l'acidification du milieu, est que l'abaissement du pH provoque une dissociation des complexes que forment les métaux et les ligands organiques et inorganiques, menant conséquemment à une augmentation des concentrations en ions métalliques libres (Campbell et Stokes, 1985). Une diminution de pH peut affecter à la fois la spéciation du métal en solution (tel que discuté dans le chapitre 1) et la sensibilité biologique au niveau de la surface cellulaire (Campbell et Stokes, 1985). Ces deux réponses à l'acidification sont antagonistes et ont le potentiel de s'annuler l'une l'autre: la réponse globale d'un organisme face à des changements de pH de 7 à 4, à une concentration totale constante de métal, peut alors s'avérer positive, négative ou nulle.

Effets biologiques possibles de l'acidification (algues)

A- Inhibition compétitive de la liaison des métaux traces aux sites superficiels.

Il existe sur les surfaces cellulaires plusieurs groupes fonctionnels ayant le potentiel de se lier avec un métal (Beveridge et Murray, 1980; Doyle et al., 1980; Crist et al., 1981; Nelson et al., 1981; Gonçalves et al., 1987). Ces liaisons peuvent impliquer des groupes fonctionnels individuels, ou une action d'ensemble entre les différents groupes fonctionnels, c'est-à-dire chélation. Il ne faut pas perdre de vue qu'il existe pour ces sites de liaison un potentiel à lier des cations autres que métalliques (M^{2+}), comme les ions hydrogène, H^+ , par exemple. Selon les valeurs de pK_a des groupes fonctionnels impliqués, des changements de pH pourraient alors affecter le degré de protonation de ces sites de liaison:



où X représente un site de liaison.

Dans un tel cas, le proton jouerait un rôle protectif analogue à celui que jouent les cations responsables de la dureté de l'eau

4.2 Filtrage des algues

4.2.1 Introduction

L'interaction d'un métal donné avec les murs cellulaires ou les membranes constitue le processus initial de son action biologique. Les surfaces algales contiennent des groupements fonctionnels variés, tels des groupements carboxyliques, aminés, thiols, hydroxo et carboxyliques, qui peuvent agir comme donneurs d'électrons et sont donc susceptibles de se lier à des espèces cationiques (Crist et al., 1981; Xue et al., 1988). Ces interactions sont à la base du phénomène d'adsorption, un processus complexe qui varie selon les propriétés des algues (le type, la taille, la forme, le stade de croissance), selon l'élément étudié (charge, forme chimique, concentration) et le type de milieu utilisé (pH, composition, concentration des métaux et des agents complexants). Certains de ces facteurs (pH, état chimique) peuvent varier sur une courte période expérimentale (Stary et al., 1983).

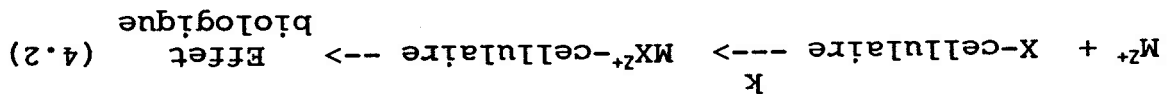
Au cours d'études portant sur la prise en charge de certains métaux toxiques (zinc, cadmium, mercure(II), chromium(III)(VI), arsenic(III)(V)), par une algue (*Chlorella kessleri*), Stary et Kratzer (1982) ont observé que les algues accumulaient fortement les ions hydrogène présents dans un milieu défini. Cette prise en charge d'ions H⁺ se manifestait par une augmentation du pH initial

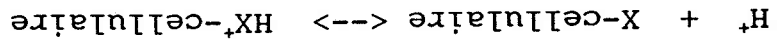
L'objectif principal des recherches élaborées dans ce chapitre est de caractériser les surfaces cellulaires chez une algue unicellulaire afin de mieux comprendre le rôle joué par les ions hydrogène au niveau des interactions métaux-membranes. Pour ce faire, nous procéderons d'une part, à la façon de Stary et Kratzer (1982), à la mesure directe de la prise en charge des ions hydrogène par les algues dans un milieu au pH défini. En deuxième lieu, nous vérifierons, à l'aide d'un métal (Mn) dont la spéciation ne change pas dans la gamme de pH étudié, l'effet du pH sur les interactions métaux-surface cellulaire. Dans un troisième temps nous vérifierons les effets du pH au niveau de la perméabilité membranaire chez les mêmes algues.

Considérant l'importance pour les métaux traces de passer passivement à travers la membrane cellulaire, il faut considérer comment des changements de pH pourraient affecter le potentiel membranaire. De façon à maintenir une charge négative sur la partie intérieure de la membrane, les protons sont "pompe" vers l'extérieur de la cellule (Raven, 1980). Plus le pH est bas, plus la tendance des ions H⁺ à entrer dans la cellule sera grande, et la pompe à proton agira de façon à maintenir la charge interne différentielle. Eventuellement, il y aura dépoliarisation de la membrane, reliée à la diminution du pH intracellulaire, ayant des effets conséquents sur le potentiel transmembranaire et sur la prise en charge des ions métalliques.

C- Perturbation du potentiel membranaire

Une diminution de pH devrait alors retarder la réponse biologique.





Si la réaction de M^{z+} à la surface cellulaire n'est pas réversible, c'est-à-dire, si la liaison de M^{z+} provoque une réponse biologique instantanée et irréversible, alors la protection que procure l'ion hydrogène (ou Ca^{2+} ou Mg^{2+}) ne serait que transitoire. En effet, une augmentation de la concentration des ions H^+ devrait diminuer la proportion des sites de liaison ne portant pas de protons, X-surface cellulaire, et réduirait ainsi le taux de formation des complexes biologiques pertinents M-X-cellulaire:

B- Réduction de la vitesse de réaction des métaux traces à la surface cellulaire (inhibition cinétique)

Le métal toxique d'intérêt. elle pourrait de cette façon altérer l'affinité de ces sites pour allostériques dans la conformation des sites de liaison de métal, ailleurs, une variation de pH pouvant aussi induire des changements dans la solution et le métal lié à la surface de la cellule. Par conséquent, il existe un état d'équilibre entre le métal présent dans la solution et le métal lié à la surface de la cellule. Par conséquent, on considère que les ions hydrogène peuvent jouer de tels rôles si on considère que le métal ou son ligand est utilisé comme élément nutritif. Les sites de liaison peuvent aussi avoir un rôle d'inhibition selon peut ajouter que les ions hydrogène jouent un rôle compétiteur pour disponibilité des sites de liaison pour les métaux toxiques. On (Ca²⁺, Mg²⁺) (Borgmann, 1983; Pagenkopf, 1983), réduisant ainsi la

de la solution. Les auteurs considéraient que cette accumulation d'ions hydrogène n'était due qu'à une adsorption à la surface cellulaire ou à un processus physico-chimique à la surface algale; ils semblent avoir écarté l'influence possible de processus physiologiques tels la photosynthèse, qui pourraient aussi provoquer des hausses de pH (Parent, 1985). Le processus par lequel les ions hydrogène étaient pris en charge ou échangés s'est avéré assez lent, des valeurs constantes de pH n'étant obtenues qu'après 2-3 heures d'agitation (Sary et Kratzer, 1982). Selon ces auteurs, la prise en charge de H^+ serait directement proportionnelle au nombre de cellules algales. Ces résultats corroborent des résultats déjà obtenus pour Scenedesmus obliquus (Sary et al., 1982a). Sary et al. (1983) ont de plus montré qu'à pH 6.2 les cellules algales étaient à demi saturées par les ions H^+ (Chlorella kessleri, Scenedesmus obliquus).

En 1984, les mêmes auteurs ont étudié les mécanismes de prise en charge de métaux cationiques par les murs cellulaires des algues (Sary et al., 1984). A partir de cellules séchées mais non désintégrées de Scenedesmus obliquus, ils ont montré que le mur cellulaire des algues se comportait de façon prédominante comme un échangeur ou un ligand polyfonctionnel ayant une forte affinité pour les espèces cationiques. D'après eux, l'existence de différents ligands présents à la surface cellulaire pourrait expliquer le pouvoir tampon des murs cellulaires. C'est de cette façon, en milieu acide, que les ions H^+ s'échangeraient avec des ions calcium

et des ions magnésium, augmentant ainsi le pH de la solution. Inversement, à un pH élevé, une prise en charge plus forte de Ca et de Mg provoquerait un relargage d'ions H⁺ dans la phase aqueuse.

Le but de la présente recherche est d'évaluer quantitativement l'affinité pour l'ion H⁺ des groupements présents à la surface cellulaire de Chlorella pyrenoidosa, et d'estimer la quantité d'ions H⁺ adsorbés par l'algue en question. En supposant dans un premier temps qu'il n'y a qu'un seul type de groupement fonctionnel à la surface de l'algue (Stary et al., 1982a), l'équation d'équilibre s'écrit de la façon suivante:



où L⁻ = algue déprotonée;

HL = algue protonée;

L_T = nombre total des sites liants.

La relation mathématique qui décrit la constante K s'énonce comme suit:

$$K = \frac{[HL]}{[H^+][L^-]} \quad (4.4)$$

Puisque, $[L^-] = L_T - [HL]$ (4.5)

on obtient de (4.4) et (4.5),

$$\begin{array}{rcl}
 [\text{HL}] & = & K [\text{H}^+] \quad \cdot \quad [\text{L}] & (4.6) \\
 \uparrow & & \uparrow & \\
 \text{quantité} & & \text{mesuré} & \\
 \text{de H}^+ \text{ pris} & & & \\
 \text{par les algues} & & & \\
 & & & \text{L}_T - \text{HL}
 \end{array}$$

$$[\text{HL}] + K \cdot [\text{H}^+] \cdot [\text{HL}] = K [\text{H}^+] L_T \quad (4.7)$$

$$[\text{HL}] (1 + K[\text{H}^+]) = K [\text{H}^+] L_T \quad (4.8)$$

$$[\text{HL}] = \frac{K [\text{H}^+] L_T}{1 + K[\text{H}^+]} \quad (4.9)$$

$$\frac{1}{[\text{HL}]} = \frac{1}{K[\text{H}^+] L_T} + \frac{1}{L_T} \quad (4.10)$$

Selon l'équation (4.10), le graphique de $1/[\text{HL}]$ en fonction de $1/[\text{H}^+]$ permettra d'obtenir L_T (= 1/ordonnée à l'origine) de même que la constante apparente d'équilibre K (= $1/L_T \cdot$ pente).

4.2.2 Matériel et méthodes

Les algues sont cultivées dans un milieu AAP (Algal Assay Procedure). Les cellules sont comptées à l'aide d'un compteur de particules (Coulter Counter, modèle TA). Au début de la phase exponentielle de croissance (10^5 cellules·mL⁻¹) la culture d'algues est centrifugée à 7000 tours·min⁻¹ (centrifugeuse Sorvall Rc2-B) pendant 10 minutes et les algues sont lavées et rincées 3 fois avec le milieu d'exposition. L'intégrité des cellules est vérifiée au microscope. Les expériences sont répétées avec des cellules mortes (tuées à 60°C pendant 60 minutes) et des cellules vivantes mais à la noirceur.

Titration en lot

Pour vérifier le pouvoir tampon effectif des algues nous avons procédé à l'expérience suivante: un volume connu d'une suspension d'algues est centrifugé et le surnageant est enlevé. Alors 20 mL d'un milieu synthétique connu (AAP-P-MT: NaNO₃: $3.0 \cdot 10^{-4}$ M; MgSO₄·7H₂O: $5.96 \cdot 10^{-5}$ M; MgCl₂·H₂O: $5.98 \cdot 10^{-5}$ M; CaCl₂·2H₂O: $3.01 \cdot 10^{-5}$ M) ayant une force ionique comparable au milieu de culture ($3 \cdot 10^{-4}$ M) et de pH initial=5.80, est acidifié avec de l'acide nitrique et purgé avec de l'azote gazeux (Azote Union Carbide UN 1066). On n'ajoute pas de NaHCO₃, qui apparaît normalement dans le milieu AAP, afin d'éviter une neutralisation chimique lors des titrages.

Les milieux préparés en triple ont des concentrations finales en HNO_3 égale à 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.5, 5.5, 7.5, 9.0 $\cdot 10^{-5}$ M; les acuvettes sont scellées et mises à agiter doucement pendant 3 heures. Mentionnons que, dans ce cas-ci, les algues sont tuées avant le début de l'expérience en les chauffant à 60°C pendant 60 minutes.

La concentration initiale en algues est de $4.5 \cdot 10^5$ cellules $\cdot \text{mL}^{-1}$ pour une concentration finale égale à $9 \cdot 10^6$ cellules titrées ou $2.96 \cdot 10^{-5}$ L d'algues. L'état morphologique des algues est observé au microscope après chaque manipulation. Après un temps défini (3 heures), la valeur moyenne (N=3) de pH à l'équilibre est mesurée et elle est comparée avec la valeur moyenne (N=3) de pH d'une autre solution agitée simultanément avec de l'acide nitrique de même concentration mais en absence de cellules algales, soit un contrôle en triple pour chaque $[\text{HNO}_3]$.

Titration à la burette

Afin de disposer de plus de points sur les courbes de titrage, une deuxième série de titrages est faite à la burette. Des aliquots de 50 mL d'algues concentrées sont récoltés. Les algues sont tuées par la chaleur. La densité cellulaire s'élève à $7 \cdot 10^6$ cellules $\cdot \text{mL}^{-1}$, c'est-à-dire environ 15 fois plus concentrée que dans l'expérience en lot, pour un volume algal de $3.26 \cdot 10^{-4}$ L. Les

milieux sont purgés à l'azote jusqu'à ce que le pH initial soit stable (pH-mètre Orion Research modèle 701 A/digital ionalyseur, calibré au 0.01 unité). Les milieux avec algues et sans algues sont ensuite titrés par HCl 0.001M (solution diluée de HCl 1N Anachemia R2830) et NaOH 0.001 M (solution diluée de NaOH Fisher SS266-1) (Burettes de 10 mL Kimax no 102 graduées au 0.05 mL), sous agitation et atmosphère d'azote constantes. Des mesures de carbone inorganique dissous sont faites en parallèle pour s'assurer de son absence. Des corrections sont apportées pour tenir compte du volume titré qui augmente lors du titrage.

La même expérience est répétée mais avec des algues vivantes et à la noirceur. La densité cellulaire est alors de $1.13 \pm 0.01 \cdot 10^6$ cellules \cdot mL⁻¹ soit un volume algale total de $6.92 \cdot 10^{-5}$ L.

4.2.3 Résultats

Expérience de titrage en lot

La première série d'expériences est réalisée en triple et le pH est mesuré après 3 heures d'agitation. Les algues sont tuées par la chaleur sans pour autant les faire éclater, pour ainsi éviter des augmentations de pH pouvant être dues à des mécanismes physiologiques plutôt qu'à des mécanismes purement physico-chimiques. Toutes les cellules sont visuellement intègres. Les résultats obtenus sont présentés aux figures 4.1, 4.2, 4.3 et 4.4.

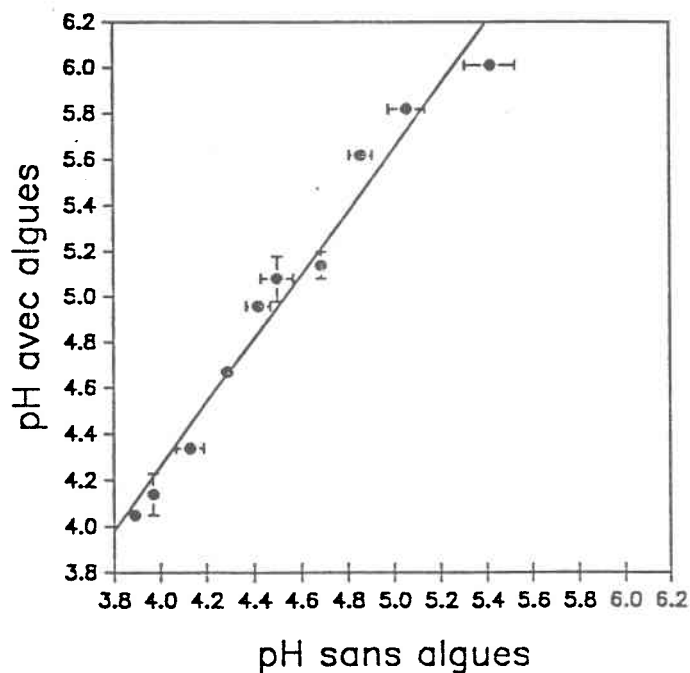


Figure 4.1: Evolution du pH des échantillons avec algues (*Chlorella pyrenoidosa*) vs les échantillons sans algues (les algues ont été tuées au préalable). Chaque point correspond à la moyenne de 3 essais avec son écart type.

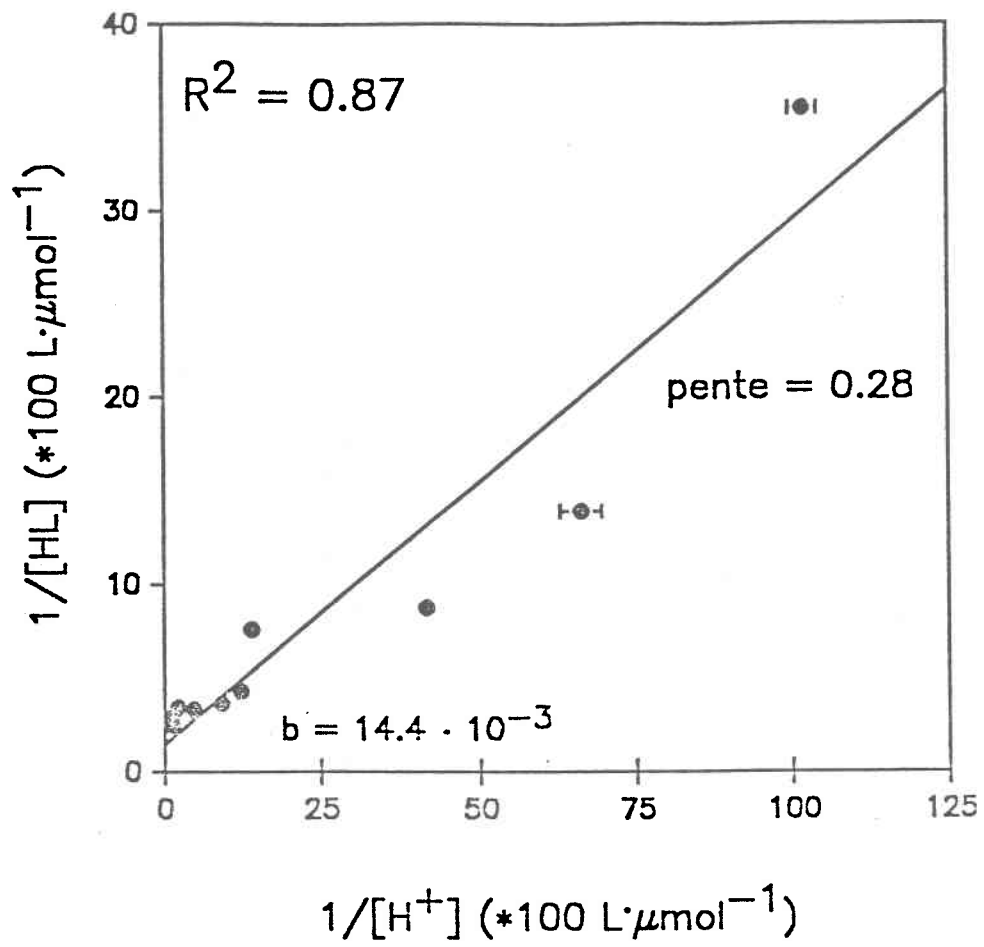


Figure 4.2: Relation entre $1/[HL]$ et $1/[H^+]$ pour l'expérience de titrage en lot de Chlorella pyrenoidosa et du milieu d'exposition (où les algues avaient été tuées au préalable). Chaque point correspond à la moyenne de 3 essais avec son écart type.

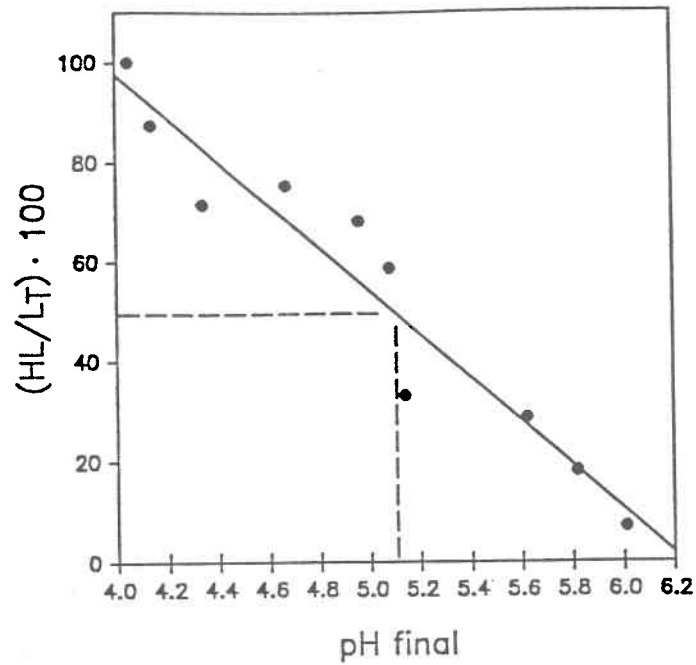


Figure 4.3: Relation entre $[HL]/L_T$ et le pH pour l'expérience de titrage en lot de Chlorella pyrenoidosa et du milieu d'exposition (où les algues avaient été tuées au préalable).

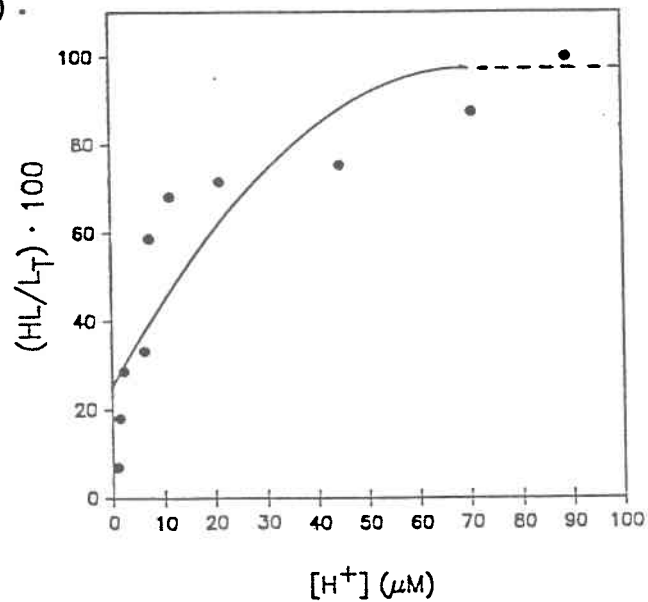


Figure 4.4: Relation entre $[HL]/L_T$ et la concentration en ions H^+ pour l'expérience de titrage en lot de Chlorella pyrenoidosa et du milieu d'exposition (où les algues avaient été tuées au préalable).

Les résultats servant à la construction de la figure 4.2 apparaissent au tableau 4.1.

Tableau 4.1: Résultats obtenus pour le titrage "en lot" de Chlorella pyrenoidosa.

Sol ⁿ	algue ¹ pH	AAP-algüe ² pH	[HL] μM	[H ⁺] μM	% HL/L _T
1	6.01±.01	5.42±.11	2.8	0.98	7
2	5.82±.02	5.06±.08	7.2	1.51	18
3	5.62± 0	4.86±.05	11.4	2.40	29
4	5.14±.06	4.69±.04	13.2	7.24	33
5	5.08±.10	4.50±.07	23.3	8.32	59
6	4.96±.03	4.42±.05	27.1	11.0	68
7	4.67±.02	4.29±.03	29.9	21.4	75
8	4.34±.01	4.13±.06	29.4	45.7	74
9	4.14±.09	3.97±.01	34.7	72.4	87
10	4.05± 0	3.89±.01	39.7	89.1	100

Il existe plusieurs façons d'évaluer la capacité de liaison de H⁺ par les algues (C_{A-H}) ainsi que la constante de demi-saturation K. Une façon consiste en l'utilisation de la valeur absolue mesurée de [HL] lorsque %HL/L_T = 100 (tableau 4.1) et à estimer visuellement K à partir du graphique de %HL/L_T vs pH (figure 4.3). Une autre façon consiste à extraire l'ordonnée à l'origine ainsi que la pente de la régression linéaire de 1/[HL] vs 1/[H⁺] et de transférer ces données dans l'équation 4.10.

¹ milieu avec algues

² milieu sans algues

Par exemple, pour $n=10$ et une régression de type $y=mx+b$, on obtient: $r^2 = 0.87$; $b = 14.4 \cdot 10^3$; $m = 0.28$. En se rappelant de l'équation 4.10,

$$1/[HL] = 1/(K[H^+]L_T) + 1/L_T$$

$$L_T = 1/1.44 \cdot 10^{-4} = 69 \mu\text{éq} \cdot \text{L}^{-1} \quad (\pm 10) = \frac{69 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{L}^{-1}}{20.96 \cdot 10^{-6} \text{ L d'algues}} \cdot (20/1000)$$

$$= 0.066 \text{ moles / L d'algues} \quad (\pm 0.009)$$

$$K = 1/(\text{pente} \cdot L_T) = \frac{1}{0.28 \cdot L_T} = \frac{1}{0.28 \cdot 69 \mu\text{éq} \cdot \text{L}^{-1}} = 0.056 \frac{\text{L} \cdot 10^6 \mu\text{éq}}{\mu\text{éq} \cdot \text{éq}}$$

$$\log K = \frac{5.59 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{éq}^{-1}}{4.75}$$

La proportion de sites liés aux ions hydrogène par rapport aux sites libres augmente en milieu acide (figure 4.3). Selon ce graphique, la demi-saturation des algues aurait lieu à $\text{pH} \approx 5.1$. On devrait atteindre un plateau de saturation autour du $\text{pH} 4.2$ ou $\approx 70 \mu\text{M}$ (figure 4.4).

Expérience de titrage à la burette

Les expériences ont été répétées deux fois. Les résultats apparaissent aux tableaux 4.2 et 4.3 et aux figures 4.5, 4.6 et 4.7. La quantité d'ions H^+ captés par les cellules est de l'ordre de 0.015 à 0.021 moles $\cdot \text{L}^{-1}$ d'algues lorsqu'évaluée selon les données brutes ou la régression linéaire respectivement. Les courbes représentant $1/[HL]$ vs $1/[H^+]$ pour les deux essais apparaissent à la figure 4.5. Pour ce même essai, on observe (figures 4.6 et 4.7) que les sites sont à demi saturés autour du $\text{pH} 5.2$ (selon l'estimation mathématique $\log K = 5.04$).

Tableau 4.2: Titrage de cellules mortes de Chlorella pyrenoidosa:
ions H⁺ liés et libres.
(essai 1: 7·10⁶ cellules·mL⁻¹)

Volume mL±0.03	algue pH	AAP-algüe pH	[HL] μM	[H ⁺] μM	% HL/L _t
0.00	6.10	5.43	2.92	0.79	3.1
0.20	6.05	5.24	4.86	0.89	5.1
0.40	6.01	5.09	7.15	0.98	7.5
0.60	5.94	4.86	12.66	1.15	13.3
0.80	5.84	4.76	15.93	1.45	16.7
1.00	5.76	4.66	20.14	1.74	21.1
1.20	5.66	4.57	20.73	2.19	25.9
1.40	5.58	4.51	28.27	2.63	29.6
1.60	5.51	4.45	32.39	3.09	33.9
1.80	5.44	4.40	36.18	3.63	37.9
2.00	5.38	4.36	39.48	4.17	41.4
2.20	5.30	4.32	42.85	5.01	44.9
2.40	5.24	4.29	45.53	5.75	47.7
2.60	5.18	4.26	48.35	6.61	50.7
2.80	5.13	4.23	51.47	7.41	53.9
3.00	5.08	4.21	53.34	8.32	55.9
3.20	5.02	4.20	53.55	9.55	56.1
3.40	4.99	4.17	57.38	10.23	60.1
3.60	4.93	4.16	57.43	11.75	60.2
3.80	4.90	4.13	61.54	12.59	64.5
4.00	4.86	4.10	65.63	13.8	68.8
4.20	4.83	4.08	68.39	14.79	71.7
4.40	4.78	4.05	72.53	16.6	76.0
4.60	4.75	4.03	75.54	17.78	79.2
4.80	4.71	4.01	78.23	19.5	82.0
5.00	4.67	4.00	78.62	21.38	82.4
5.20	4.64	3.99	79.42	22.91	83.2
5.40	4.60	3.97	82.03	25.12	86.0
5.60	4.58	3.95	85.90	26.3	90.0
6.00	4.52	3.92	90.03	30.2	94.3
6.40	4.47	3.90	92.01	33.88	96.4
6.80	4.40	3.88	92.01	39.81	96.4
7.20	4.33	3.85	94.48	46.77	99.0
7.60	4.28	3.83	95.43	52.48	100.0
8.00	4.24	3.82	93.81	57.54	98.3

Tableau 4.3: Titration de cellules mortes de Chlorella pyrenoidosa: ions H⁺ liés et libres.
(essai 2: 7·10⁶ cellules·mL⁻¹)

Volume mL±0.03	algue pH	AAP-algüe pH	[HL] μM	[H ⁺] μM	% HL/L _t
0.00	6.03	5.43	2.78	0.93	2.8
0.20	5.98	5.24	4.71	1.05	4.7
0.40	5.92	5.09	6.93	1.20	6.8
0.60	5.83	4.86	12.32	1.48	12.2
0.80	5.75	4.76	15.60	1.78	15.4
1.00	5.67	4.66	20.74	2.14	19.5
1.20	5.61	4.57	24.46	2.45	24.2
1.40	5.53	4.51	27.95	2.95	27.6
1.60	5.46	4.45	32.01	3.47	31.7
1.80	5.39	4.40	35.74	4.07	35.3
2.00	5.34	4.36	39.08	4.57	38.6
2.20	5.27	4.32	42.49	5.37	42.0
2.40	5.22	4.29	45.26	6.03	44.8
2.60	5.18	4.26	48.35	6.61	47.8
2.80	5.13	4.23	51.47	7.41	50.9
3.00	5.07	4.21	53.15	8.51	52.6
3.20	5.02	4.20	53.55	9.55	52.9
3.40	4.97	4.17	57.89	10.72	56.3
3.60	4.92	4.16	57.16	12.02	56.5
3.80	4.89	4.13	61.25	12.88	60.6
4.00	4.84	4.10	64.98	14.45	64.2
4.20	4.80	4.08	67.33	15.85	66.6
4.40	4.76	4.05	71.75	17.38	70.9
4.60	4.73	4.03	74.70	18.62	73.9
4.80	4.70	4.01	77.77	19.95	76.9
5.00	4.66	4.00	78.12	21.88	77.2
5.20	4.64	3.99	79.42	22.91	78.5
5.40	4.61	3.97	82.60	24.55	81.7
5.60	4.58	3.95	85.90	26.30	84.9
6.00	4.52	3.92	90.03	30.20	89.0
6.40	4.47	3.90	92.01	33.88	91.0
6.80	4.42	3.88	93.81	38.02	92.8
7.20	4.38	3.85	99.57	41.69	98.4
7.60	4.33	3.83	101.14	46.77	100.0
8.00	4.29	3.82	100.07	51.29	98.9

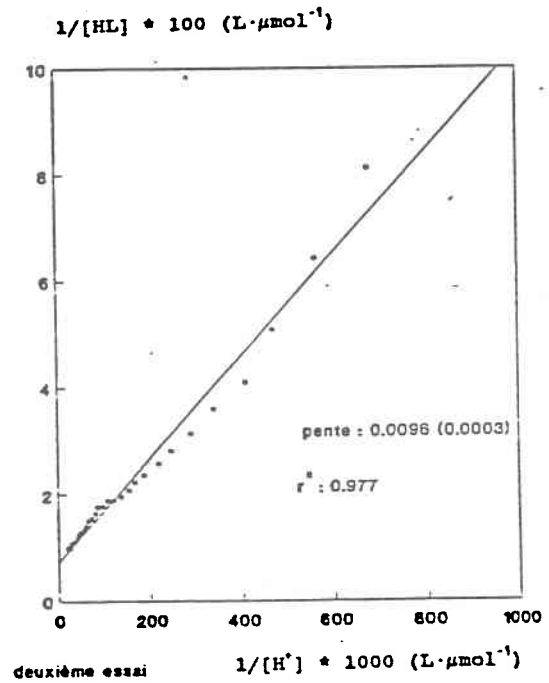
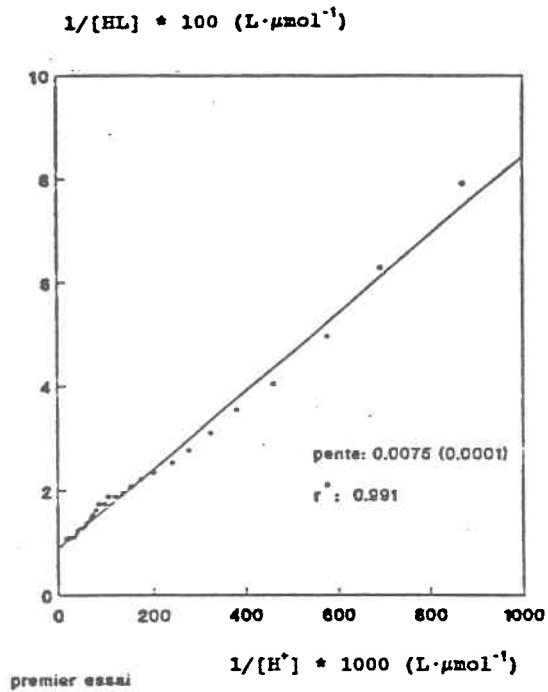
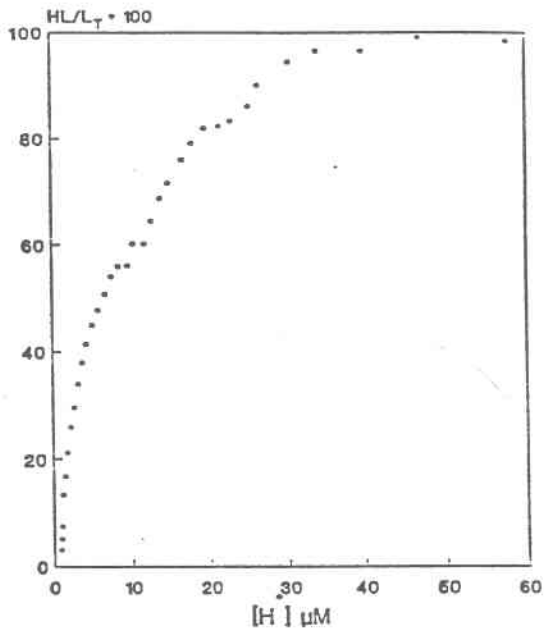
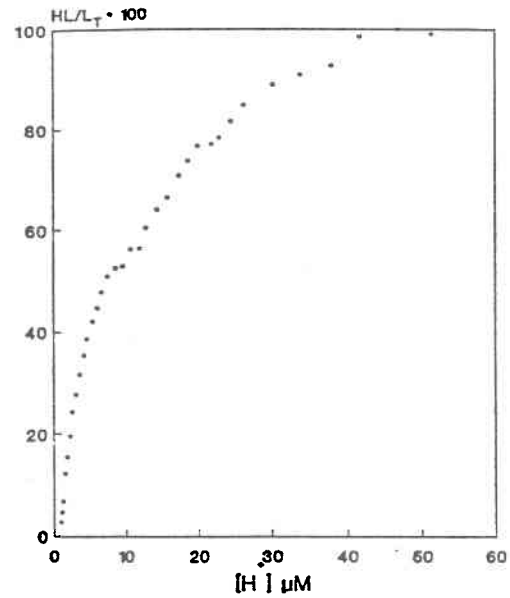


Figure 4.5: Relation entre $1/[HL]$ et $1/[H^+]$ pour l'expérience de titrage à la burette de Chlorella pyrenoidosa et du milieu d'exposition (où les algues avaient été tuées au préalable).

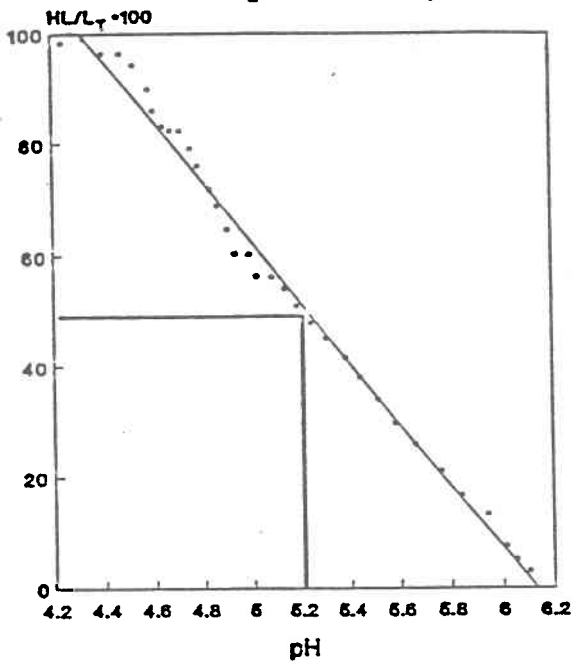


premier essai

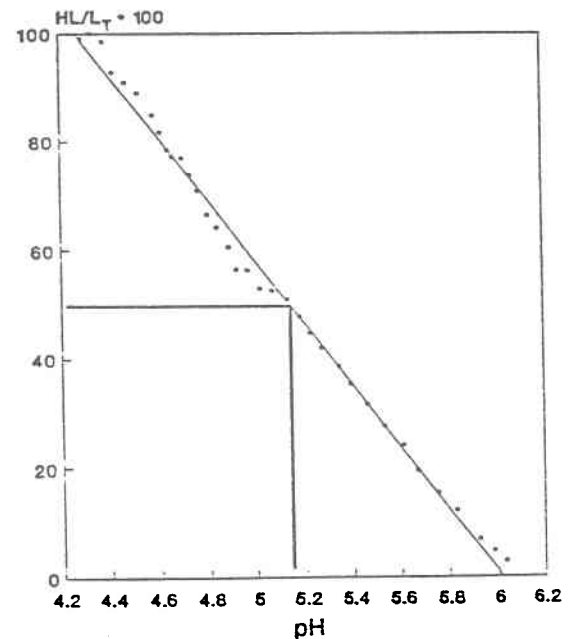


deuxième essai

Figure 4.6: Relation entre $[HL]/L_T$ et le pH pour l'expérience de titrage de Chlorella pyrenoidosa et du milieu d'exposition (où les algues avaient été tuées au préalable).



premier essai



deuxième essai

Figure 4.7: Relation entre $[HL]/L_T$ et la concentration en ions H^+ pour l'expérience de titrage de Chlorella pyrenoidosa et du milieu d'exposition (où les algues avaient été tuées au préalable).

Titration des algues vivantes

On a procédé au titrage d'algues vivantes à la noirceur. Les résultats apparaissant au tableau 4.4 montrent quelques irrégularités et variabilités quant à l'estimation du pourcentage de sites liés (*). Cependant, ces résultats laissent supposer que les algues vivantes n'adsorbent pas d'ions H^+ au delà du pH 5.3, comparativement aux algues mortes qui en adsorbaient jusqu'au pH 5.4 (tableaux 4.1, 4.2 et 4.3). Le pK_a des algues mortes est légèrement plus grand que celui des algues vivantes, cependant si on fixe le niveau de $1 \mu\text{mol} \cdot L^{-1} H^+$ comme seuil, on peut avancer que les algues vivantes se comportent sensiblement de la même façon que les algues mortes. Les données et le graphique qui ont servi à calculer C_{A-H} apparaissent au tableau 4.4 et à la figure 4.8 respectivement. Les C_{A-H} et $\log K$ ainsi évalués sont de l'ordre de 0.008 à $0.024 \text{ moles} \cdot L^{-1}$ de H^+ et $4.6-4.35$ selon l'estimation mathématique ou graphique. La relation existante entre les sites protonés et le pH et la concentration en H^+ est représentée aux figures 4.9 et 4.10.

Tableau 4.4: Titration de cellules vivantes de *Chlorella pyrenoidosa* à la noirceur: ions H^+ liés et libres. ($1.13 \cdot 10^6$ cellules $\cdot mL^{-1}$)

Volume mL ± 0.03	algue pH	AAP-algue pH	[HL] μM	[H^+] μM	% HL/ L_T
0.40	5.30	5.30	0.00	5.01	0.0
0.80	4.88	4.86	0.62	13.18	5.0
1.00	4.76	4.71	2.12	17.38	17.1
1.20	4.67	4.62	2.61	21.38	21.1
1.40	4.60	4.54	3.72	25.12	30.1
2.00	4.42	4.37	4.64	38.02	37.5
2.20	4.38	4.34	4.02	41.69	32.5
2.40	4.34	4.30	4.41	45.71	35.6
2.60	4.30	4.26	4.84	50.12	39.1
3.00	4.24	4.20	5.55	57.54	44.9
3.20	4.21	4.17	5.95	61.66	48.1
3.80	4.14	4.10	6.99	72.44	56.5
4.40	4.09	4.04	9.92	81.28	80.2*
4.60	4.07	4.03	8.21	85.11	66.4
4.80	4.05	4.00	10.87	89.13	87.9
5.00	4.04	3.99	11.13	91.20	89.9
5.20	4.02	3.98	9.21	95.50	74.5*
5.40	4.01	3.96	12.37	97.27	100.0

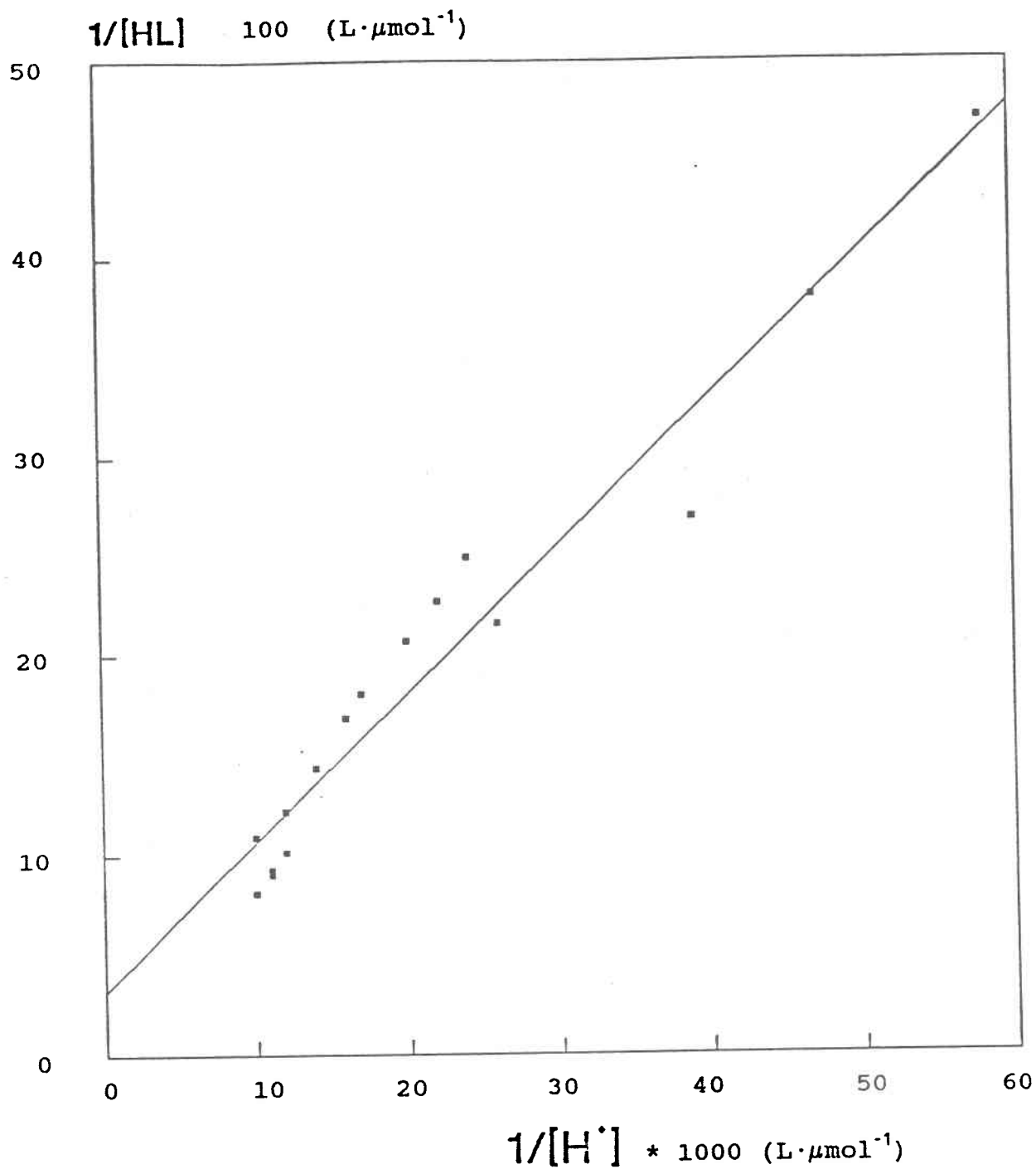


Figure 4.8: Relation entre $1/[HL]$ et $1/[H^+]$ pour l'expérience de titrage à la burette de Chlorella pyrenoidosa et du milieu d'exposition (où les algues sont vivantes).

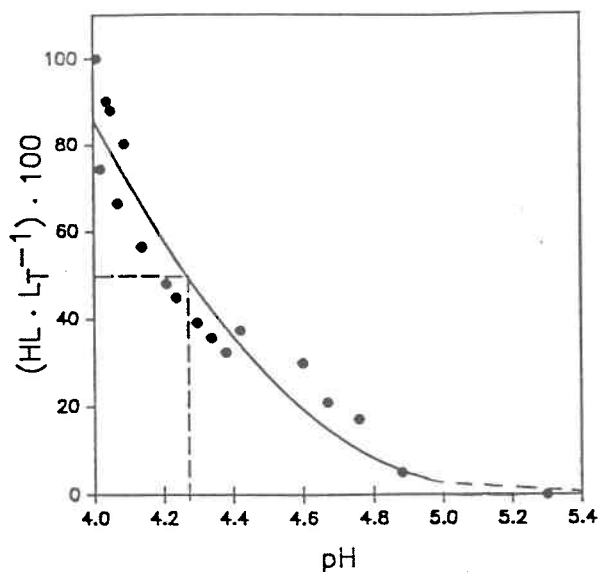


Figure 4.9: Relation entre $[HL]/L_T$ et le pH pour l'expérience de titrage de Chlorella pyrenoidosa et du milieu d'exposition (où les algues sont vivantes).

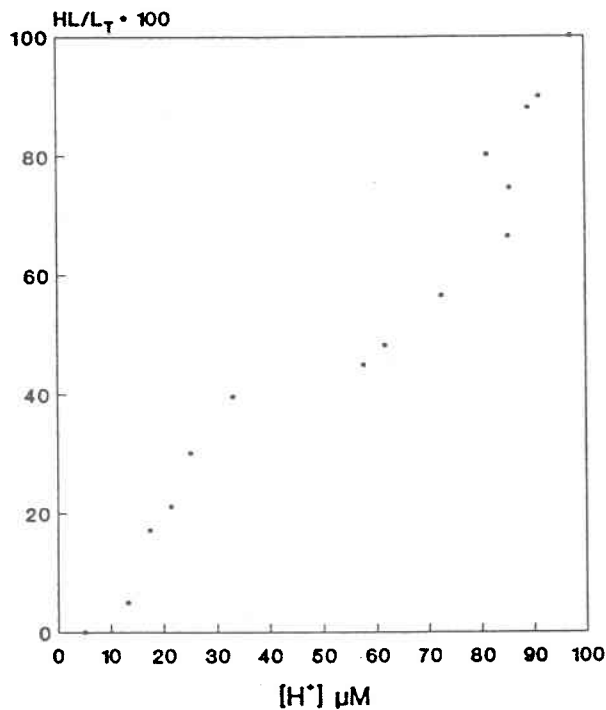


Figure 4.10: Relation entre $[HL]/L_T$ et la concentration en ions H^+ pour l'expérience de titrage de Chlorella pyrenoidosa et du milieu d'exposition (où les algues sont vivantes).

4.2.4 Discussion

Le bilan des expériences de titrage de Chlorella pyrenoidosa apparaît au tableau 4.5. Les valeurs de C_{A-H} exprimées en moles de H^+ captées par litre d'algues sont sensiblement les mêmes aux expériences 2 et 3, alors qu'on obtient le triple à la première expérience même si la densité cellulaire était moindre dans celle-ci comparativement aux deux autres expériences qui ont suivi. Il se peut que le titrage à la burette sous-estime la capacité des algues à lier les ions H^+ puisque seulement cinq minutes environ étaient allouées entre chaque ajout de titrant comparativement à trois heures dans la méthode en lot (voir exp.1 au tableau 4.5). Par contre, la période de 5 minutes avait été déterminée au préalable par le temps mesuré entre deux ajouts de titrant pour qu'il y ait stabilisation apparente du pH.

Même si Stary et al. (1983) ont observé que la prise en charge de H^+ et de $HgCl_2$ par des cellules vivantes était substantiellement plus lente que pour les cellules tuées par chaleur ($60^\circ C$), ce phénomène n'a pas été observé lors de nos expériences. Alors que Stary et al. (1983) mentionnent que les facteurs de concentration égaux entre les cellules vivantes et les cellules mortes ne sont atteints qu'après plusieurs heures d'agitation, on a obtenu des valeurs sensiblement identiques, qu'il s'agisse d'algues mortes ($0.021 \text{ moles} \cdot L^{-1}$), ou vivantes ($0.024 \text{ moles} \cdot L^{-1}$), et ce pour les mêmes périodes de stabilisation du pH. On dénote quand même une légère différence entre C_{A-H} pour les algues vivantes ($0.009 \text{ moles} \cdot L^{-1}$) et les algues mortes ($0.014 \text{ moles} \cdot L^{-1}$) lorsque ces valeurs sont obtenues par inspection graphique des données brutes.

Tableau 4.5: Bilan des expériences de titrage de Chlorella pyrenoidosa.

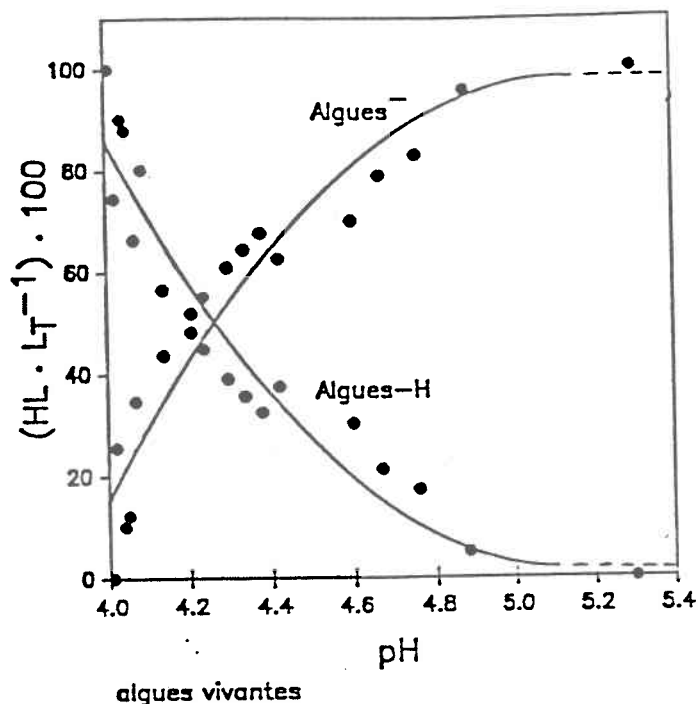
Exp. méthode vie lumière	Sol ⁿ Vol mL	Algues .densité (c.mL ⁻¹) .volume (L) .surface (m ²)	1		2	
			C _{A-H} .L ⁻¹ mol.m ⁻²	K 10 ⁵ L.ég ⁻¹ pK	C _{A-H} .L ⁻¹ mol.m ⁻²	K 10 ⁵ L.ég ⁻¹ pK
1 en lot non oui +azote	20	4.5.10 ⁵	(pH 4.05)	0.56	(pH 4.05)	1.28
		21.0.10 ⁻⁶	0.066	4.75	0.038	5.10
		1.8.10 ⁻³	76.8.10 ⁻⁵		43.9.10 ⁻⁵	
2 Burette non oui + azote	50	7.0.10 ⁶	(pH 4.28)	1.1	(pH 4.28)	1.60
		3.3.10 ⁻⁴	0.021	5.04	0.014	5.20
		3.5.10 ⁻²	19.0.10 ⁻⁵		14.2.10 ⁻⁵	
3 Burette oui non + azote	50	1.1.10 ⁶	(pH 4.01)	0.4	(pH 4.01)	0.22
		6.9.10 ⁻⁵	0.024	4.60	0.009	4.35
		6.7.10 ⁻³	25.0.10 ⁻⁵		9.2.10 ⁻⁵	

1- Evaluation mathématique à partir de la régression linéaire entre 1/[HL] et 1/[H⁺].

2- Evaluation à partir des données brutes et du graphique [HL]/L_T vs pH.

Nous devons de plus considérer les résultats obtenus avec les algues vivantes comme étant plus erratiques que ceux obtenus avec les algues tuées, à cause des phénomènes physiologiques qui viennent influencer le caractère purement physico-chimique de l'adsorption des ions H^+ à la surface cellulaire.

Lorsque Stary et al. (1982b) avaient étudié la prise en charge du chrome par des algues, ils avaient observé que la vitesse de prise en charge, le facteur d'accumulation ainsi que la capacité de l'algue à accumuler le Cr (III) étaient sensiblement les mêmes pour les algues mortes et vivantes. Ce résultat leur suggérait que la prise en charge du Cr était due principalement à l'adsorption chimique à la surface cellulaire. Parallèlement aux observations de Stary et al. (1982b) et à partir des résultats obtenus, nous pouvons avancer dans notre cas que la prise en charge de H^+ par les algues vivantes est principalement reliée à la capacité d'adsorption de la surface cellulaire. Nous pouvons représenter l'adsorption des ions H^+ à la surface des algues vivantes à différents pH de la façon suivante où le pH de demi-saturation égale environ 4.2-4.3.



Les cellules algales montrent une forte tendance à accumuler des ions H^+ (Crist et al., 1981; Stary et Kratzer, 1982; Stary et al., 1984). En déterminant la capacité des cellules algales à accumuler les ions hydrogène, Stary et al. (1983) ont obtenu des valeurs (C_{A-H}) égales à 0.4 - 1.2 moles·L⁻¹ de cellules algales (volume humide) et une constante de demi-saturation (pK_H) de 6.2, ce qui signifiait qu'à pH 6.2, les sites présents à la surface cellulaire étaient à demi saturés par les ions hydrogène. Les valeurs de C_{A-H} sont beaucoup plus élevées que celles obtenues dans la présente recherche soit $C_{A-H} = 0.021$ à 0.066 moles·L⁻¹, et leur valeur de pK_H est nettement plus élevée que nos valeurs qui se situent entre 4.4 et 5.2. Les auteurs, eux-mêmes, ont constaté que les valeurs de capacité d'accumulation des H^+ étaient très élevés pour les algues qu'ils ont étudiées, soient Chlorella kessleri et Scenedesmus obliquus.

Rappelons que Sary et al. (1983) tuaient les cellules algales (60°C pendant 60 minutes) avant de les suspendre dans une solution titrante acide et qu'aucune observation de l'intégrité des cellules n'est mentionnée dans leurs ouvrages. Si pour des raisons de déséquilibre osmotique, il y avait éclatement des cellules, les valeurs élevées de C_{A-H} qu'ils ont observées pourraient être expliquées par une sur-estimation due à la présence de murs cellulaires provenant des organites intracellulaires, augmentant ainsi la disponibilité des sites de liaison avec H^+ et biaisant l'estimation de C_{A-H} à la surface cellulaire (tableau 4.5).

Par ailleurs, Crist et al. (1981) ont déterminé le C_{A-H} sur des fragments de murs cellulaires (Vaucheria) et les valeurs obtenues ne dépassaient pas 1 mole·L⁻¹ de murs cellulaires séchés ce qui signifie qu'exprimées en moles·L⁻¹ de volume humide, ces valeurs seraient beaucoup plus faibles que celles que Sary et al. (1983) ont obtenues et donc se rapprocheraient des nôtres.

Gonçalves et al. (1987) ont pu caractériser d'une certaine façon le type de groupements de liaison sur la surface cellulaire d'une bactérie (Klebsiella pneumonia, traitée à la formaldéhyde) pouvant intervenir dans le captage des ions présents dans le milieu. Afin de réaliser leur expérience, ils ont procédé tout comme Sary et al. (1982a), au titrage d'une suspension bactérienne avec de l'acide nitrique et de l'hydroxyde de sodium. De cette

Tableau 4.6: Tableau comparatif des expériences visant à évaluer la capacité de liaison des ions hydrogène par les organismes unicellulaires.

Organisme	dimension (μm)	vie	gamme de pH	densité ($\text{cell} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$C_{\text{A-H}} \cdot \text{L}^{-1}$	Référence
<u>Scenedesmus obliquus</u>	1.7	non	3 - 7	2 à $24 \cdot 10^6$	0.4-1.2	Sary et al., 1983
<u>Vaucheria</u>		non			$\ll 1$	Crist et al., 1981
<u>Klebsiella pneumonia</u>	4.2	non	4 - 10	$2 \cdot 10^{10}$	$4.3 \cdot 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$	Gonçalves et al., 1987
<u>Chlamydomonas reinhardtii</u>	4 - 7	oui	3 - 9	$1.35 \cdot 10^6$	0.076	Xue et al., 1988
<u>Chlorella pyrenoidosa</u>	5-8	non	4 - 5.5	$5 \cdot 10^5$	0.066 ($77 \cdot 10^{-5}$ $\text{mole} \cdot \text{m}^{-2}$)	présente étude
		non	4 - 5.5	$7 \cdot 10^6$	0.021 ($19 \cdot 10^{-5}$ $\text{mole} \cdot \text{m}^{-2}$)	
		oui	4 - 5.5	$1 \cdot 10^6$	0.024 ($25 \cdot 10^{-5}$ $\text{mole} \cdot \text{m}^{-2}$)	

façon, ils ont fait ressortir deux points d'inflexion de la courbe autour des pH 4.7 et 7.8, ainsi qu'un plateau à un pH de 10.

A bas pH, ce sont les groupements d'acide carboxylique (similaires au $pK_a \approx 3$ et au $pK_a \approx 5$ de l'acide phthalique ou d'un $pK_a \approx 2.8$ de l'acide salicylique) qui ont été titrés. A des pH plus élevés, les acides aminés tels la glycine ($pK_a \approx 9.5$) ou les groupes phénoliques perdaient leur proton. Les auteurs ont mesuré une capacité de liaison d'ions hydrogène d'environ $7.4 \cdot 10^{-4}$ moles de H^+ par gramme de bactérie ou $4.3 \cdot 10^{-6}$ moles de H^+ par m^2 de surface de bactérie. Pour notre part, si on exprime la capacité de liaison des H^+ par Chlorella en moles $\cdot m^{-2}$, on obtient une capacité de liaison de $250 \cdot 10^{-6}$ moles $\cdot m^{-2}$ (à pH 4.0) ou $4.6 \cdot 10^{-6}$ moles $\cdot m^{-2}$ de surface algale (à pH 4.9), ce qui est supérieur à ce que Gonçalves et al. (1987) ont observé pour leur bactérie.

Xue et al. (1988) ont obtenu des valeurs de C_{A-H} de l'ordre de 0.076 moles $\cdot L^{-1}$ à pH 4.0 pour une algue vivante (Chlamydomonas reinhardii), ce qui se rapproche de nos valeurs obtenues pour Chlorella pyrenoidosa vivante. Tout comme nous, ces auteurs obtenaient une capacité de liaison de H^+ nulle à pH 7.0, ce qui suggère que la proportion des sites protonés à un pH donné, ainsi que le type de site à la surface cellulaire, diffèrent considérablement entre les algues et les bactéries, et que la capacité à lier les ions hydrogène (exprimée sur une base de superficie) est supérieure chez les algues.

Cet exercice a permis d'estimer la constante d'équilibre régissant la relation entre les algues et les ions hydrogène. Sa valeur se trouve entre 0.4 et $1.1 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{éq}^{-1}$ (voir le tableau 4.4). Par contre, la technique de la burette a pu sous-estimer les ligands totaux sur les algues puisque les lectures du pH se faisaient en dedans de 5 minutes comparativement à la technique en lot où les mesures se faisaient après 3 heures. De plus, on peut avancer que la capacité de liaison des algues se joue entre 0.02 et 0.07 moles $\text{H}^+ \cdot \text{L}^{-1}$. Ces résultats seront utilisés ultérieurement dans la discussion des résultats d'expériences portant sur l'effet du pH sur la prise en charge de l'Al et du Mn par Chlorella pyrenoidosa.

4.3 Effet du pH sur l'adsorption du Mn

4.3.1 Introduction

Afin de connaître l'effet du pH sur les interactions métaux/membrane on étudie l'influence du pH sur la prise en charge de manganèse à court terme par une algue unicellulaire, Chlorella pyrenoidosa, sous des conditions chimiques contrôlées.

Pour vérifier sans ambiguïté s'il y a compétition entre H^+ et M^{2+} à l'interface cellule/milieu, il faut que le protocole expérimental respecte certains critères (Campbell et Stokes, 1985):

- 1- La spéciation du métal en solution doit changer peu avec le pH (Ag, Cd, Co, Mn, Ni et Zn), afin que toute variation d'adsorption ou d'assimilation soit imputable à des processus se produisant à l'interface cellule/milieu.
- 2- On doit travailler avec un milieu d'incubation inorganique bien défini, ou sinon, un milieu organique défini ne contenant que des tampons faiblement complexants (pour minimiser les changements de spéciation se produisant dans la solution quand le pH est changé).
- 3- On doit utiliser des concentrations de métal qui se rapprochent de celles qu'on retrouve en milieu naturel.
- 4- Les incubations en présence du métal étudié doivent être de courtes durées pour minimiser la présence d'exudats dans le

milieu et pour empêcher des variations de pH dues à la croissance des algues.

Les expériences actuelles sont effectuées en respectant les critères ci-haut mentionnés.

4.3.2 Matériel et méthodes

Au cours des différentes expériences, on utilise un milieu inorganique (c'est-à-dire, qui ne contient pas d'agents chélateurs qui pourraient faire changer la spéciation du manganèse à différents pH) ne contenant pas d'autres métaux traces afin de minimiser les interactions entre ceux-ci et le manganèse.

Les algues sont mises en contact avec le Mn pendant une courte période de temps afin de diminuer le risque de contamination du milieu d'incubation par les exudats ou les produits extracellulaires provenant des algues mêmes. Des précautions appropriées sont prises afin d'éviter toute contamination ou perte de Mn (Schenck et al., 1988).

Conditions de croissance

Les cultures d'algues axéniques de Chlorella pyrenoidosa sont cultivées en semi-continu dans un milieu AAP dans une bouteille de Teflon^R de 2 L. Les cultures sont aérées et agitées continuellement dans un incubateur sous une luminosité constante de $115 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ produite par des tubes fluorescents froids et blancs (chapitre 2).

Prise en charge du manganèse

Au début de la phase exponentielle de croissance les algues sont centrifugées et lavées avec le milieu d'exposition (voir chapitre 2). Les algues sont alors transférées dans ce dernier milieu pour une période d'acclimatation de 12 heures afin d'éviter un choc osmotique durant les premiers moments d'exposition au métal.

On procède à deux expériences où la concentration nominale en manganèse est de $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($1.8 \mu\text{M}$) et où le pH est de 5.5 ou de 7.0. Au début de chacune des expériences, les algues sont récoltées et mises en suspension dans une bouteille en Teflon^R de 1 L contenant le milieu expérimental (3 répétitions). Les milieux sont continuellement agités, aérés, et sous luminosité constante ($115 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Le pH est maintenu constant à l'aide de tampons connus comme étant très peu complexants (MES et HEPES; 0.01 M)

choisis pour minimiser la complexation des métaux divalents dans le milieu expérimental (Schenck et al., 1988). Le Mn est ajouté sous la forme de MnCl_2 marqué avec du ^{54}Mn (New England Nuclear Corp; activité spécifique de $26200 \text{ cpm} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ Mn}$) 12 heures avant l'ajout des algues afin de permettre l'équilibration du radioisotope avec le manganèse "froid" (non radioactif). La radioactivité finale du milieu d'exposition mesurée est de $0.4 \text{ KBq} \cdot \text{L}^{-1}$ ($2.9 \cdot 10^6 \text{ dpm} \cdot \text{L}^{-1}$ - efficacité de comptage déterminée à partir de standards.)

A chaque période d'échantillonnage ($t=0, 0.25, 0.5, \text{ et } 4 \text{ h}$) trois sous-échantillons réels (provenant de 3 bouteilles différentes) sont filtrés sous faible pression ($< 100 \text{ mm Hg}$) sur des filtres Nuclepore de porosité de $0.4 \mu\text{m}$ jusqu'à succion visiblement complète du liquide. Les filtres ne sont pas rincés mais laissés à sécher quelques minutes. Les échantillons retenus sur les filtres sont digérés à l'acide nitrique ultrapur (voir chapitre 2), dilués et mesurés au compteur gamma. Des essais préliminaires ont montré que la géométrie du filtre affectait significativement le nombre de comptes. Pour cette raison, les algues sont digérées à l'acide nitrique avant le comptage, alors que seul le filtrat est compté directement, sans l'étape de digestion. La concentration de manganèse ainsi déterminée correspond à la prise en charge totale de manganèse $[\text{Mn}]_T$ et est exprimée en $\text{moles} \cdot \text{m}^{-2}$ de surface algale. En parallèle, des sous-échantillons sont traités à l'EDTA ($100 \mu\text{M}$) et au CaCl_2 ($600 \mu\text{M}$) pour respecter la force ionique. Après 20 minutes de contact, les

cellules sont filtrées et analysées comme ci-dessus. Cette extraction à l'EDTA permet de discriminer entre le manganèse cellulaire ($[Mn]_c$, non-extractible à l'EDTA) et le manganèse adsorbé ($[Mn]_a$, soit extractible à l'EDTA) (Schenck et al., 1988). Des blancs de filtration sont mesurés à partir de filtrations parallèles du milieu radioactif sans algues.

Tout au cours de l'expérience, des échantillons de milieu total et filtré sont mesurés pour vérifier les pertes possibles de Mn du milieu initial. La radioactivité de ^{54}Mn a été déterminée en utilisant un spectromètre gamma (LKB Wallac, model # 1982). Les cellules sont comptées par un compteur de particules (Coulter counter, modèle TA-II). La surface cellulaire est déduite des valeurs de volume cellulaire obtenues au compteur, lequel était calibré à partir de suspension d'algues pour lesquelles le diamètre avait été mesuré par micrométrie optique (voir chapitre 2).

Mesure du flux cellulaire

Pour comprendre l'influence de la concentration de métal externe sur la prise en charge du métal par la cellule, on doit prendre en considération le transport du métal jusqu'à la surface cellulaire et au travers de la membrane cellulaire.

Par exemple, une cellule algale peut être considérée comme une sphère possédant une couche de diffusion dont l'épaisseur dépend du mouvement relatif de la sphère et de l'eau. En l'absence d'espèce métallique liposoluble, le transport du métal à travers la membrane cellulaire va dépendre des sites de transport spécifique. Si la vitesse de transport d'un ion métallique libre à travers la membrane cellulaire est plus faible que sa diffusion à travers la couche de diffusion, il n'y aura pas de gradient de concentration de l'ion libre dans la couche de diffusion et conséquemment, pas de contribution mesurable de la part des métaux traces complexés au pool de métal libre qui est pris par l'algue. Dans ces conditions, la valeur du flux mesuré d'un métal trace donné vers l'intérieur d'une cellule algale, F_m , sera donc plus faible que le flux maximum calculé pour la diffusion du métal libre seul de la couche de diffusion vers la surface cellulaire F_c .

La quantité d'une substance qui diffuse dans une petite sphère en fonction du temps, Q ($\text{mole} \cdot \text{s}^{-1}$), est donnée par l'équation suivante (Crank, 1975):

$$Q = 4\pi D \frac{r_c \cdot r_d}{r_d - r_c} (C_b - C_s) \quad (4.11)$$

- où
- D: coefficient de diffusion moléculaire
 - C_s : concentration à la surface de la sphère
 - C_b : concentration dans la solution
 - r_c : rayon de la sphère
 - r_d : rayon de la sphère + l'épaisseur de la couche de diffusion

Le flux se calcule de la façon suivante :

$$F_c \text{ (mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}) = \frac{Q}{S} \quad (4.12)$$

où S = surface de la sphère.

Le flux peut alors être influencé par (Schenck et al., 1988):

- la constante de vitesse pour le transport du métal à travers la membrane;
- la concentration totale du métal dans la solution;
- le degré de complexation du métal en solution;
- les coefficients de diffusion des ions libres et complexés;
- les constantes de vitesse pour la dissociation de ces complexes.

4.3.3 Résultats

Les résultats obtenus sont représentés à la figure 4.11. Les courbes qui y sont tracées peuvent être divisées en deux phases bien distinctes: une phase initiale et rapide représentant l'adsorption du métal sur la surface cellulaire et une phase plus lente qui elle, serait associée à l'incorporation du métal dans les cellules algales (Schenck et al., 1988). On a pu distinguer ces deux phases en procédant au traitement à l'EDTA, tel que mentionné plus haut (tableau 4.7).

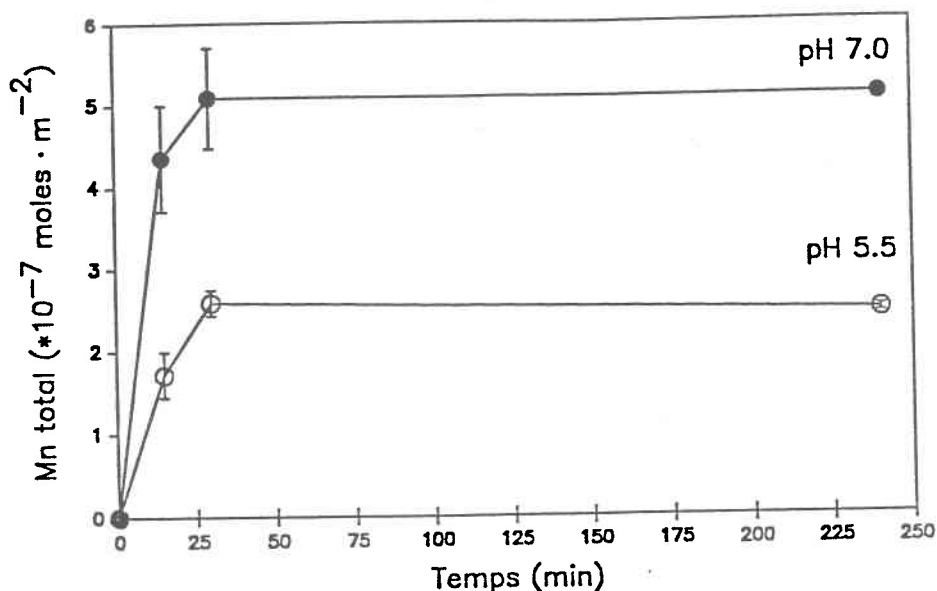


Figure 4.11: Prise en charge totale de Mn sur une période de 4 h par *Chlorella pyrenoidosa* à pH 5.5 et 7.0. La concentration initiale en Mn dissous du milieu était de 1.8 μM .

Tableau 4.7: Bioaccumulation du Mn par *Chlorella pyrenoidosa* en fonction du pH (4 h d'exposition),

[MANGANESE] ^A (10 ⁻⁷ moles · m ⁻²)	pH 5.5	pH 7.0
[Mn] _T	2.47 ± 0.04	5.09 ± 0.05
[Mn] _C	1.18 ± 0.16	1.17 ± 0.14
[Mn] _A	1.30 ± 0.19	3.92 ± 0.19

^A Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 essais à pH 7.0 et 2 essais à pH 5.5 et à une bioaccumulation nette, c.-à-d. [Mn]_A après 4 heures d'exposition - [Mn]_C initial.

Les résultats exprimés au tableau 4.7 et aux figures 4.11-4.13, montrent qu'à pH 5.5 la prise en charge totale de manganèse est plus faible qu'à pH 7.0. Ceci serait dû principalement à une diminution de l'adsorption du manganèse sur la surface algale à pH 5.5 (figure 4.13) puisque le flux du manganèse à travers la membrane cellulaire ne semble pas varier de façon appréciable selon les deux pH expérimentés (figure 4.12). On se doit de remarquer la prise en charge de Mn cellulaire rapide dans les 15 premières minutes alors qu'on s'attendait à une pente constante aux cours de l'exposition (Schenck et al., 1988). On pourrait supposer ici, une faible efficacité de l'EDTA à capter les cations Mn fortement liés à la surface cellulaire dans les premières minutes de l'exposition. Tel que mentionné dans Stary et al. (1983), les cations ont tendance à s'adsorber d'abord préférentiellement aux sites dont l'affinité est la plus grande.

Cette constatation pourrait aussi être due à un artefact introduit dans l'estimation du Mn associé aux algues alors que le Mn mesuré pourrait résulter à la fois du Mn relié aux algues mais aussi à la rétention de milieu radioactif par l'amas des algues sur le filtre qui ne serait pas nécessairement corrigée par le Mn retenu par un filtre vierge (blanc de filtration).

Notons de plus, qu'à part une perte significative d'environ 20% de Mn après 15 minutes d'exposition (figure 4.14), le Mn en solution ne varie pas de façon significative durant le reste de l'expérience.

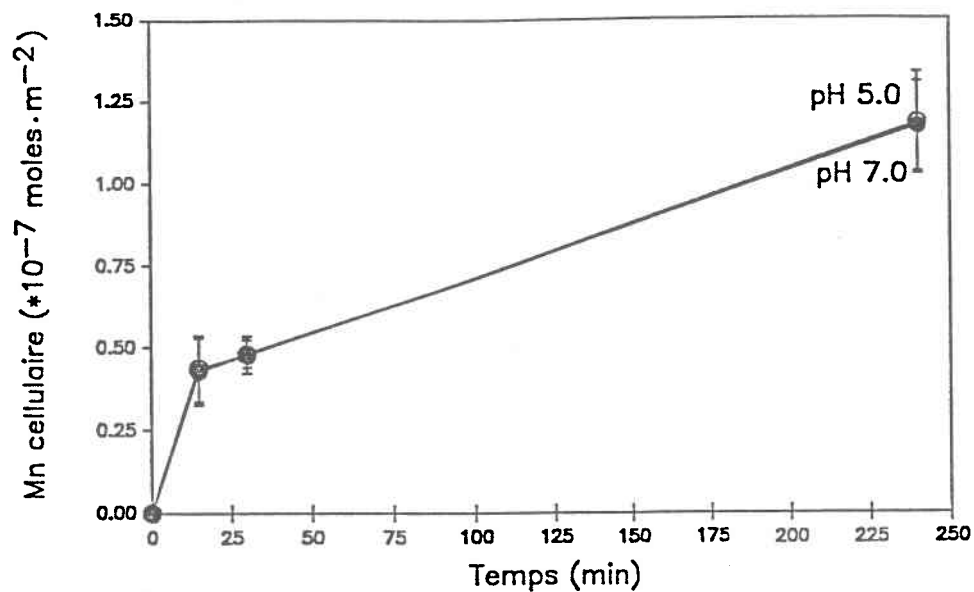


Figure 4.12: Prise en charge cellulaire de Mn pendant une période de 4 h par Chlorella pyrenoidosa à pH 5.5 et 7.0. La concentration initiale en Mn dissous du milieu était de 1.8 μ M.

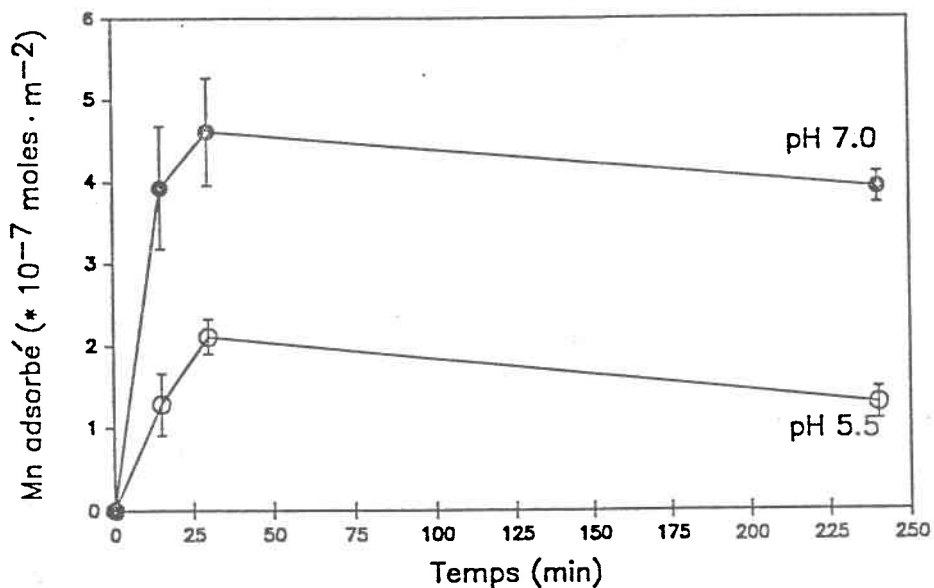


Figure 4.13: Adsorption de Mn pendant une période de 4 h par Chlorella pyrenoidosa à pH 5.5 et 7.0. La concentration initiale en Mn dissous du milieu était de 1.8 μ M.

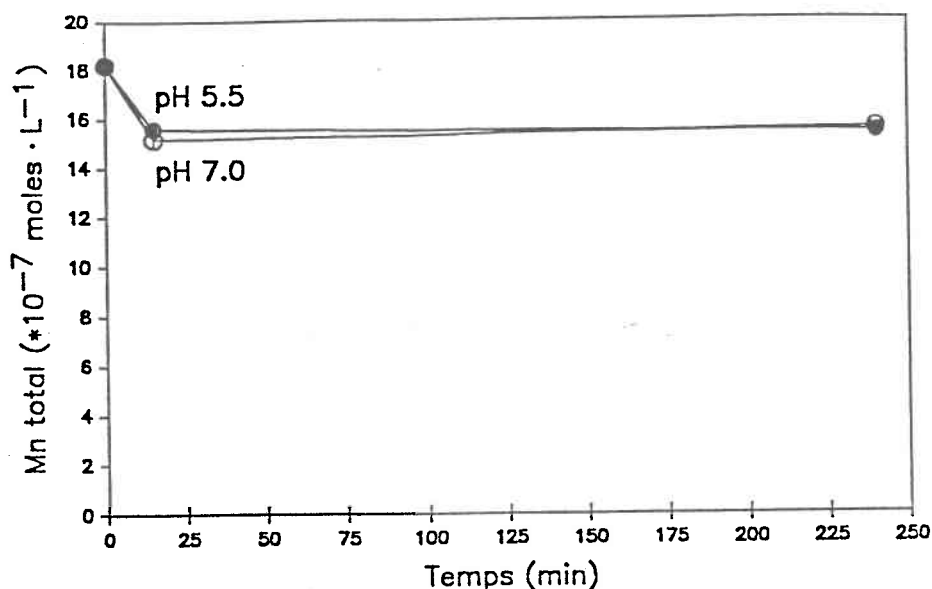


Figure 4.14: Evolution du de Mn dissous au cours de l'expérience de prise en charge cellulaire de Mn pendant une période de 4 h par *Chlorella pyrenoidosa* à pH 5.5 et 7.0. La concentration initiale en Mn dissous du milieu était de 1.8 μM .

4.3.4 Discussion

On a pu démontrer par cette expérience que la prise en charge de Mn était moindre dans un milieu acide, principalement à cause d'une diminution de l'adsorption à la surface cellulaire. Des résultats similaires ont déjà été observés avec d'autres algues unicellulaires. En effet, les résultats publiés dans la littérature montrent que lors d'une diminution de pH de 7 à 4, pour le Cd, le Mn, et le Zn, on observe une compétition évidente entre l'ion H^+ et l'ion métallique aqueux pour les sites de liaison de la surface cellulaire de l'algue ou de la bactérie, et ce déjà à des valeurs de pH souvent rencontrées dans les milieux naturels acides, c'est-

à-dire à pH>5 (Doyle et al., 1980; Crist et al., 1981; Bates et al., 1982; Stary et al., 1983; Lee et Walker, 1984; Harrison et al., 1986, Schenck et al., 1988).

Parmi ces exemples, c'est l'approche de ces derniers chercheurs qui ressemble le plus à celle adoptée dans l'expérience actuelle. En effet Schenck et al. (1988) ont étudié l'effet de variations de pH (7-->5) sur l'assimilation de fer et de manganèse par le phytoplancton, utilisant Chlamydomonas variabilis comme organisme test, et ont mesuré l'assimilation de ces métaux à court terme sous des conditions chimiques contrôlées. La prise en charge totale en manganèse variait selon le pH tout comme dans l'expérience actuelle. Cependant, dans leurs essais c'était la prise en charge du Mn intracellulaire qui s'est avéré sensible au changement du pH; l'adsorption du manganèse à la surface cellulaire ne dépendait pas du pH et atteignait rapidement un plateau. Rappelons que dans le cas présent les valeurs de Mn_A diminuent de 66% entre le pH 7 et le pH 5.5. Outre cette différence, il faut aussi signaler que la courbe de la prise en charge du Mn cellulaire est constituée de deux phases dont l'une rapide (dans les 15 premières minutes) et l'autre plus longue et linéaire jusqu'à la fin de l'expérience. Ceci diffère des résultats publiés par Schenck et al. (1988) qui n'observaient pas la première phase mais un flux cellulaire linéaire et constant dans le temps.

Il serait plausible de croire que le pH agit tout d'abord sur l'adsorption du métal à la surface algale puisque tel que mesuré par Gonçalves et al. (1987), l'affinité d'un métal sous forme cationique pour des groupes fonctionnels à la surface cellulaire est fortement dépendante du pH, et à un pH donné, diminue avec l'accumulation constante du métal sur la surface cellulaire d'une bactérie. Ceci indique que les cations se lient premièrement aux ligands de surface qui présentent la plus forte affinité et subséquemment aux autres ligands dont l'affinité est moindre. Si de tels ligands sont déjà associés aux ions H^+ (Stary et Kratzer, 1982), l'adsorption sera éventuellement moins élevée à bas pH. La prise en charge se ferait donc principalement par un processus physico-chimique à la surface cellulaire des algues.

Alors qu'à la partie 4.1 du présent chapitre, on observait que les sites à la surface de Chlorella pyrenoidosa vivante ou morte n'acceptaient pas de protons à des pH supérieurs à 5.5, il semble que les résultats de cette partie-ci démontrent au contraire qu'il y a encore place à une compétition H^+/Mn^{+2} aux pH ≥ 5.5 , celle-ci étant évidemment plus élevée à pH 5.5 qu'à pH 7.0. La capacité de liaison de Mn^{+2} à pH 5.5 (C_{A-Mn}) comparativement à pH 7.0 est de 66% inférieure ($2.6 \cdot 10^{-7}$ éq $Mn \cdot m^{-2}$ à pH 5.5 vs $7.8 \cdot 10^{-7}$ éq $Mn \cdot m^{-2}$ à pH 7.0 - voir $[Mn]_A$ au tableau 4.7). Ainsi les concentrations calculées en équivalents de Mn par surface cellulaire sont de beaucoup ($\approx 100x$) inférieures aux C_{A-H} calculés à la première partie de ce chapitre. L'évaluation de la capacité de Chlorella pyrenoidosa à

lier des ions hydrogène aux pH supérieurs à 5.5 a pu être biaisée par la faible sensibilité de la méthode de titrage. Par exemple, si la quantité d'ions H^+ liés à la surface cellulaire était la même que celle mesurée pour les ions Mn^{+2} (en $eq \cdot L^{-1}$ de cellules) à pH 5.5, soit $2.6 \cdot 10^{-7} eq \cdot m^{-2}$ ou $10 \cdot 10^{-9} eq \cdot L^{-1}$ de cellules, il aurait fallu, pour déceler une telle perte de H^+ de la solution, une précision du pH-mètre de 0.001 unités de pH, ce qui n'était pas le cas!

Dans le cas d'autres métaux (Cu, Sr), Crist et al. (1981) ont aussi observé une adsorption plus faible à bas pH. Les auteurs suggèrent qu'une diminution de prise en charge de métal à bas pH pourrait signifier une diminution de la toxicité du métal, ou encore, dans le cas d'un métal essentiel au métabolisme, une diminution de sa disponibilité comme oligoélément nutritif.

Les explications données pour les interactions antagonistes entre le manganèse et les ions hydrogène sont (telles que abordées dans l'Introduction (4.1)):

- 1- A cause de la faible perméabilité de la membrane lipidique au métal sous forme ionique, la prise biologique de l'ion métallique survient normalement par transport facilité. De cette façon les ions hydrogène peuvent compétitionner directement avec l'ion métallique pour ces sites de transport (Peterson et al., 1984).

- 2- Les différents pH peuvent affecter la conformation des sites de liaison métallique, changeant alors leur affinité pour certaines espèces métalliques.
- 3- Les différentes concentrations en ions hydrogène dans la solution peuvent mener à des changements du potentiel de la surface algale, qui peut alors affecter la répartition du métal entre la surface cellulaire et la solution (McLaughlin, 1979).
- 4- Les différents pH peuvent aussi affecter le potentiel transmembranaire (Smith et Raven, 1979), lequel influe sur le mouvement du métal de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule algale.

Tous ces mécanismes semblent offrir des explications plausibles pouvant aider à comprendre l'influence du pH sur la prise en charge du métal. D'un point de vue purement physico-chimique de l'état de la membrane, on peut considérer que ce sont les points 1 à 4 qui sont déterminants, de façon directe, du type d'interaction métal-membrane. Ces différentes altérations de la membrane peuvent survenir de façon complémentaire.

La quantité de Mn adsorbé à la surface cellulaire semble atteindre un plateau après 30 minutes d'incubation. Les calculs du pourcentage de revêtement de surface pour une cellule avec un ion

hydraté de Mn ($r = 3.56 \cdot 10^{-10}$ m; capacité de recouvrement d'un atome (πr^2) = $3.98 \cdot 10^{-19}$ m², où 100% de recouvrement de 1 m² d'algues serait atteint par $2.5 \cdot 10^{18}$ atomes ou $4.0 \cdot 10^{-6}$ moles de Mn⁺²) indiquent que pas plus de 3% ($1.3 \cdot 10^{-7}$ moles/ $4.04 \cdot 10^{-6}$ moles) de la surface est couverte à pH 5.5 comparativement à 10% à pH 7.0 ($3.92 \cdot 10^{-7}$ moles/ $4.04 \cdot 10^{-6}$ moles) lorsque la concentration en Mn de la solution = 1.8 μ M. Notons que la surface de la cellule est probablement sous-estimée puisque qu'on suppose ici une surface plane (Schenck et al., 1988). Les effets de saturation (100%) pourraient se manifester à des concentrations de Mn externe plus élevées, mais de telles concentrations excèderaient de beaucoup les concentrations en Mn retrouvées dans les milieux naturels (Davison et Woof, 1984). On doit conclure que le Mn se lie non pas de manière indiscriminée (ce qui donnerait un recouvrement de près de 100%) mais plutôt à des sites spécifiques à la surface algale.

Les facteurs de concentration ($Mn_A/Mn_{\text{solution}}$) sont de 0.07 L·m⁻² à pH 5.5 alors que Schenck et al. (1988) observaient un facteur de l'ordre de 0.05 L·m⁻² à pH 5.0. Ces derniers observaient une saturation de 2 % de la surface cellulaire à pH 5.0 pour une [Mn] = 1.8 μ M comparativement à 3% dans notre cas à pH 5.5, ce qui va dans le sens de nos observations quant à la compétition entre Mn⁺² et H⁺ à la surface cellulaire même s'il s'agit de deux espèces différentes.

Flux cellulaire

On a calculé le flux maximal de Mn, F_{\max} (Mn^{+2}) à travers la couche de diffusion. Le rayon de Chlorella pyrenoidosa est de 6 μm , sa surface spécifique ($4\pi r^2$) équivaut à $4.52 \cdot 10^{-10} m^2$, et le coefficient de diffusion moléculaire de Mn^{+2} est d'environ $6 \cdot 10^{-6} cm^2 \cdot sec^{-1}$ à 25°C (Li et Gregory, 1974). La couche de diffusion est évaluée à 10 μm d'épaisseur (Whitfield et Turner, 1979) et la concentration en Mn à la surface est considérée comme nulle ($C_s=0$). Cette option maximise le flux de diffusion calculé à la cellule.

Selon nos résultats, à pH 5.5 et à une concentration de 1.8 μM de Mn^{+2} , on calcule:

$$\begin{array}{l} F_{\text{ maximal }} = 3.15 \cdot 10^{-7} \text{ moles} \cdot m^{-2} \cdot sec^{-1} \\ \text{et un } F_{\text{ mesuré }} = 8.19 \cdot 10^{-12} \text{ moles} \cdot m^{-2} \cdot sec^{-1}; \end{array}$$

Le flux mesuré étant de loin inférieur au flux maximal, on peut croire que la concentration de Mn^{+2} en solution suffise à maintenir la prise en charge de manganèse par Chlorella pyrenoidosa.

4.4 Effet du pH sur la perméabilité membranaire

4.4.1 Introduction

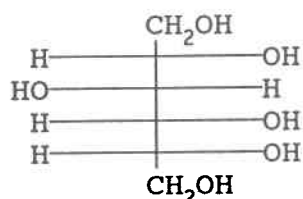
La membrane plasmique constitue la première barrière rencontrée par un agent toxique qui veut atteindre une cellule. Les caractéristiques de perméabilité sélective de la membrane plasmique sont vitales pour la régulation du volume cellulaire et de sa composition ionique, pour l'entrée d'éléments nutritifs et pour l'excrétion. La perméabilité membranaire dépend de l'arrangement hautement structuré des lipides et des protéines qui constituent les membranes biologiques individuelles (Kinter et Pritchard, 1977).

Il a déjà été observé qu'à bas pH, la prise en charge de certains métaux (Mn, Zn) était moindre qu'à pH plus élevé (section 4.3; Schenck et al., 1988). On explique cette plus faible biodisponibilité de plusieurs façons:

- 1 - protonation de la surface cellulaire et changement conséquent de son potentiel;
- 2 - changement de potentiel transmembranaire;
- 3 - protonation des sites de liaison;
- 4 - dépolarisation de la membrane;
- 5 - changements allostériques des sites de liaison;
- 6 - diminution de la perméabilité membranaire.

Le bien-fondé des explications 1 et 3 a été vérifié aux parties 4.2 et 4.3. L'effet du pH sur la perméabilité membranaire est évalué dans cette quatrième partie.

Pour ce faire, on utilise une molécule pour laquelle la membrane de Chlorella pyrenoidosa est perméable. La molécule en question doit être non métabolisable, stable, inerte et non sujette à un transport spécifique facilité (c'est-à-dire n'impliquant pas de perméases). On utilise un hexose, le sorbitol, dont la configuration chimique apparaît ci-dessous.



Colman et al. (1986) ont observé que la prise en charge d'hexoses par Chlorella pyrenoidosa se faisait par diffusion, et que ces hexoses n'étaient pas utilisés pour la croissance hétérotrophe. Selon ces auteurs, l'hexitol pénètre la membrane plasmique de 2 souches de Chlorella pyrenoidosa et l'équilibre entre les milieux internes et externes est atteint après 20-30 minutes d'incubation. Par contre, selon leurs résultats, même si le sorbitol passe par la membrane des deux souches de Chlorella pyrenoidosa, cette molécule ne peut supporter la croissance de l'algue à la noirceur. De plus, même si l'algue Chlorella pyrenoidosa est perméable au sorbitol et au mannitol, son taux de

respiration n'est pas significativement affecté par l'incubation en présence de concentrations élevées (100 mM) de ces deux composés.

Bien que le comportement physico-chimique du sorbitol ne soit pas le même que celui d'un ion métallique (M^{2+}), il constitue une sonde intéressante pour mesurer ou informer sur l'état ainsi que sur l'intégrité de la membrane. Par exemple, ce sucre, par ses caractéristiques qui lui permettent la diffusion au travers de la membrane de Chlorella pyrenoidosa, peut nous informer sur les effets des variations de pH sur la fluidité et la perméabilité membranaire.

Les effets possibles du pH sur la fluidité et/ou sur la perméabilité membranaire peuvent avoir une influence non négligeable sur la vitesse à laquelle un "transporteur" intramembranaire puisse transporter un métal de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule.

Les objectifs de ce travail sont donc de vérifier les effets du pH sur la perméabilité membranaire de Chlorella pyrenoidosa au sorbitol. La cinétique de la prise en charge du sorbitol par Chlorella est analysée au niveau de la pente (taux de prise en charge) ainsi que du plateau (à l'équilibre).

4.4.2 Matériel et méthodes

Les algues sont mises à pousser dans le milieu AAP jusqu'au début de leur phase exponentielle de croissance. Leur axénicité est testée avant l'expérience (chapitre 2). Elles sont alors centrifugées et suspendues dans du milieu expérimental libre de métaux et de phosphore, mais à pH différents maintenus constants par l'utilisation d'un tampon (MES 10^{-2} M). Les pH testés sont 4.0, 4.3, 5.0, 5.5, 6.0 et 6.5. Les algues sont ensuite agitées et acclimatées pendant 24 heures (densité cellulaire = $1.2 \cdot 10^6$ cellules \cdot mL $^{-1}$). Chaque test est réalisé trois fois.

La solution de D-(U- 14 C)-sorbitol (activité spécifique et concentration de la solution originale: 342 mCi \cdot mmol $^{-1}$ et 3.7 MBq \cdot mL $^{-1}$) provient de Amersham Radiochemical et est diluée avec du sorbitol froid. Au début de l'expérience, 1 mL de la solution de sorbitol (2.2 mM, marqué et froid) est ajouté à 20 mL du milieu expérimental contenant les algues pour obtenir une concentration finale de 100 μ M. Un mL de la solution est recueilli pour compter les algues et évaluer leur surface cellulaire. L'activité spécifique mesurée du milieu d'exposition est de 1.54 CPM \cdot mmol $^{-1}$.

Le taux de prise en charge de l'hexitol est déterminé en mesurant le taux d'incorporation de radioactivité dans les cellules algales à partir d'hexitol marqué dans le milieu. Les suspensions d'algues sont agitées et incubées à 22°C dans la noirceur avec le

sorbitol marqué. Après 5, 10, 15, 20 et 25 minutes de contact, 4 mL d'échantillon sont retirés, dilués avec 5 mL d'une solution du sorbitol non marqué (20 mM) pour arrêter l'accumulation du sorbitol marqué, et ensuite filtrés sur des filtres de porosité de 0.4 μm (Nuclepore), lesquels sont rapidement lavés (10-15 sec) avec 5 mL de la solution d'hexitol (20 mM) et 6 mL d'eau ultrapure Millipore. Toutes ces manipulations sont réalisées en moins d'une minute.

Les filtres sont ensuite placés dans des bouteilles de scintillation avec 1 mL de mélange: méthanol, acide acétique et eau (10:40:50), 10 mL de liquide à scintillation (Scintiverse 1, Fisher) et laissés au repos pendant une heure. La radioactivité des échantillons est déterminée par compteur à scintillation liquide LKB-Wallac-1215. L'efficacité relative du comptage est déterminée en comparant la radioactivité de 500 μL de la solution mère seule à celle du même volume de la solution mère avec un filtre (98%).

4.4.3 Résultats

Les résultats montrant la prise en charge du ^{14}C -sorbitol par Chlorella pyrenoidosa en fonction du pH apparaissent à la figure 4.15. Il s'agit de la moyenne de 3 essais à chaque pH avec leur écart type. Notons tout d'abord que la partie linéaire de la courbe se situe dans les 15-25 premières minutes pour tous les pH.

Celui-ci affecte le taux de prise en charge mais n'influe pas ou peu sur l'atteinte de l'équilibre du sorbitol à travers la membrane cellulaire (plateau). Ces résultats permettent de constater que le pH affecte la perméabilité membranaire. Les taux de prise en charge ont été calculés à partir de la partie linéaire des courbes de prise en charge et les résultats apparaissent ci-dessous:

pH	taux de prise en charge (10^{-2} moles \cdot m $^{-2}$ \cdot min $^{-1}$)
6.0	1.7
5.5	1.3
5.0	1.2
4.3	1.1
4.0	1.0

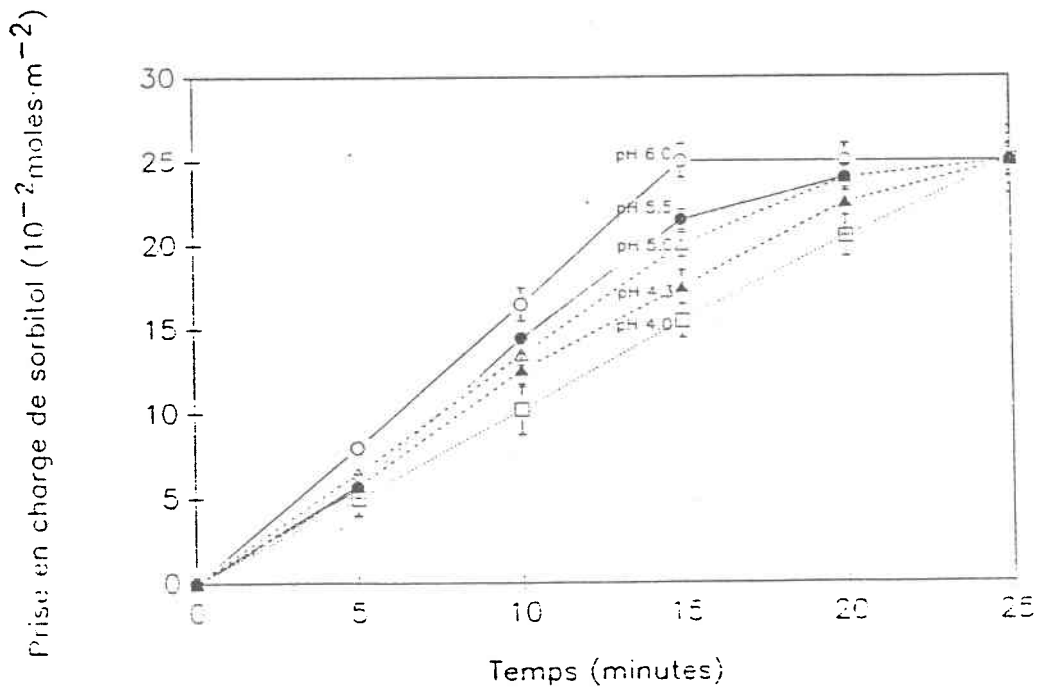


Figure 4.15: Prise en charge du ^{14}C -sorbitol par Chlorella pyrenoidosa en fonction du pH. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 essais à chaque pH avec l'écart type.

Afin d'illustrer l'effet du pH sur la perméabilité membranaire, les résultats du taux de prise en charge du sorbitol sont présentés à la figure 4.16. La perméabilité membranaire diminue avec le pH avec un $r^2 = 0.99$.

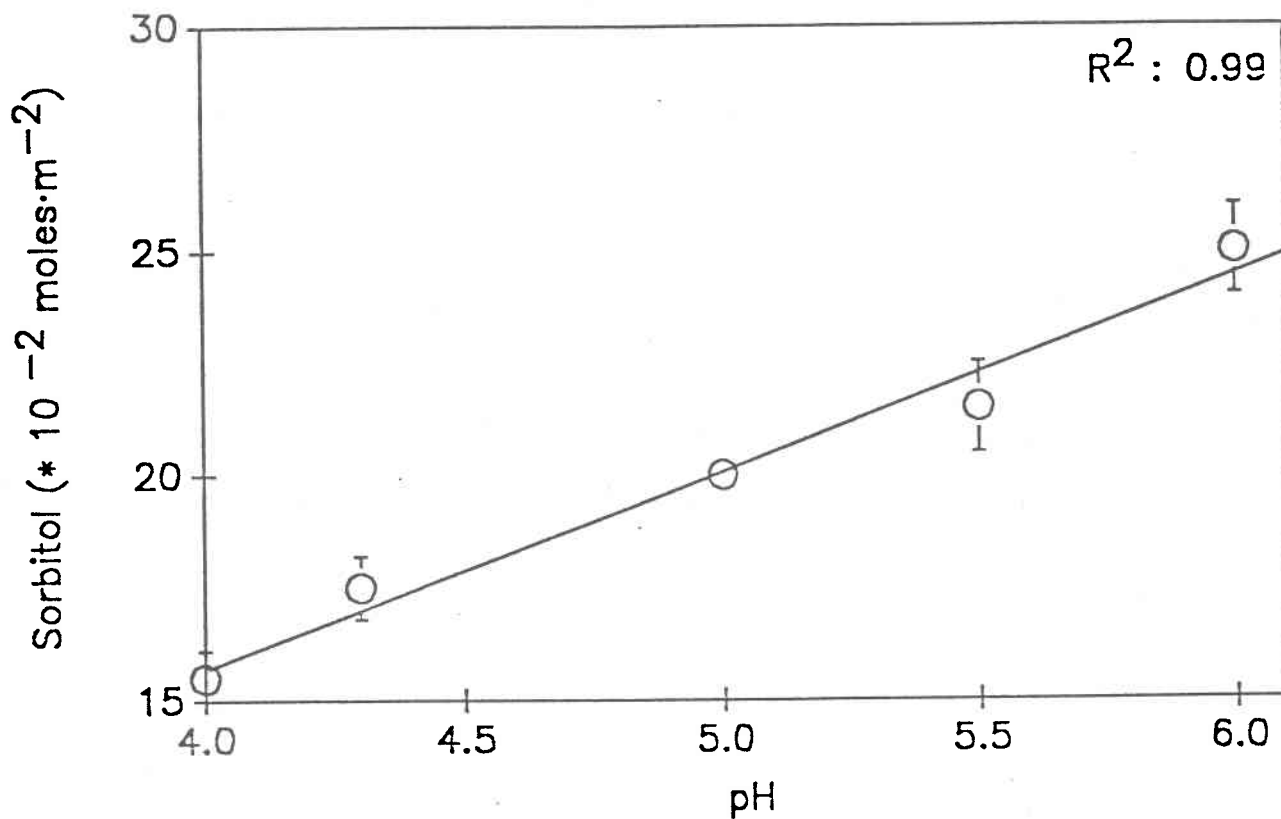


Figure 4.16: Prise en charge du ¹⁴C-sorbitol par Chlorella pyrenoidosa après 15 minutes d'incubation en fonction du pH. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 essais à chaque pH avec l'écart type.

4.4.4 Discussion

Les résultats obtenus dans cette partie ont montré une diminution de la perméabilité membranaire de Chlorella pyrenoidosa avec le pH. Colman et al. (1986) ont observé que le taux de prise en charge de sorbitol par Chlorella saccharophila diminuait de 30% à pH 6.0 comparativement à pH 8.0. Dans le cas présent on observe aussi une diminution significative de 30% à pH 6.0 comparativement à pH 6.5 pour Chlorella pyrenoidosa ainsi qu'une diminution de plus de 50% à pH 4.0 par rapport au pH 6.5.

Cette diminution de la perméabilité cellulaire à bas pH pourrait constituer une partie de l'explication d'une prise en charge plus faible de Mn à des pH moins élevés. Des changements de perméabilité membranaire (induits par des changements de pH) influenceront ainsi l'absorption du Mn, si le Mn est absorbé par simple diffusion ou encore si l'absorption du Mn implique des protéines transporteuses puisque leur efficacité peut aussi être influencée par la rigidité/fluidité de la membrane où elles se trouvent.

Le fait qu'on observe un effet des ions hydrogène sur la cinétique mais non pas sur le taux d'équilibre après 20-25 minutes d'incubation suggère une atteinte à l'équilibre à travers la membrane plasmique mais non pas d'accumulation progressive de ^{14}C avec le temps. A l'équilibre, l'activité de l'hexitol libre doit

être la même à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule algale. De plus, comme les changements de pH dans le milieu externe n'affectent pas le plateau, ceci suggère que les algues sont capables de résister à ces changements et de maintenir le métabolisme "normal" (voir chapitre 3). Si les conditions chimiques (notamment le pH) à l'intérieur de la cellule ne changent pas de manière significative en fonction du pH externe, il est plausible de trouver la même concentration en hexitol à l'intérieur de la cellule, à l'équilibre et indépendamment du pH.

4.5 Conclusion

Depuis la constatation d'une mise en circulation ("mobilisation") des métaux en milieu acide, il existe une incertitude quant à l'interprétation des effets de ce phénomène sur les organismes aquatiques. En effet, on a pu observer que même si la concentration en métaux chimiquement disponibles augmentait en milieu acidifié, leurs effets sur les organismes aquatiques n'en n'étaient pas nécessairement plus grands; en effet, la diminution du pH affecte à la fois la spéciation du métal en solution et la sensibilité biologique au niveau de la surface cellulaire (Campbell et Stokes, 1985).

Les résultats obtenus à partir des expériences décrites dans ce chapitre nous ont permis de démontrer:

- 1- que les algues ont le pouvoir d'adsorber les ions hydrogènes;
- 2- que le pH agit sur les capacités de bioaccumulation du Mn (qui est un métal qui ne devrait pas changer sa spéciation dans la gamme de pH utilisée ici -Campbell et Tessier, 1987);
- 3- qu'il semble y avoir compétition entre les ions H^+ et les ions Mn^{+2} pour les sites de liaisons à la surface cellulaire, ce qui pourrait expliquer la plus faible adsorption de Mn à bas pH;
- 4- que les ions hydrogène (pH) agissent sur la perméabilité membranaire en la diminuant.

Tous ces constats devront être considérés lorsqu'on interprétera des données provenant d'expérimentations où les variables principales (pH, [métal]) sont ajustées simultanément.

Ainsi, après avoir démontré dans le chapitre 3 que le pH n'influçait pas la croissance de Chlorella pyrenoidosa dans la gamme de pH étudiée (4.3-->7.0), les résultats obtenus dans ce chapitre-ci ont montré une légère diminution de la perméabilité membranaire à bas pH. Ces résultats, ainsi que ceux qui ont permis d'évaluer C_{A-H} et C_{A-Mn} , seront considérés lors de l'étude de l'effet du pH sur la toxicité et la prise en charge de l'aluminium qui sera élaborée aux chapitres 5 et 6.

4.6 Références

- Almer, B., W. Dickson, C. Ekstrom et E. Hornstrom, 1978. Sulphur pollution and the aquatic ecosystem, p. 293-295. Dans: Sulphur in the Environment, Part II: Ecological Impacts, J.O. Nriagu (éd), J. Wiley and Sons Inc., New York, NY.
- 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. J. Phycol., 18: 521-529.
- Beveridge, T.J. et R.G.E. Murray, 1980. Sites of metal deposition in the cell wall of Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 141:876-887.
- Borgmann, U., 1983. Metal speciation and toxicity of free metal ions to aquatic biota, p. 47-72. Dans: Aquatic Toxicology, J.O. Nriagu (éd.), J. Wiley and Sons Inc., New York, NY.
- Campbell, P.G.C. et P.M. Stokes, 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42: 2034-2049.
- Campbell P.G.C. et A. Tessier, 1987. Metal Speciation in Natural Waters: Influence of Environmental Acidification, p.185-207. Dans: Advances in Chemistry Series No. 216, Sources and Fates of Aquatic Pollutants, American Chemical Society, Washington, DC.
- Colman, B., P.C. Brickell et K.A. Gehl, 1986. The uptake of mannitol and sorbitol by a species of Chlorella (CHLOROPHYCEA). J. Phycol., 22: 436-440.
- Crank, J. 1975. The Mathematics of Diffusion, 2e édition, Clarendon,
- Crist, R.H., K. Oberholser, N. Shank et M. Nguyen, 1981. Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. Environ. Sci. Technol., 15:1212-1217.
- Davison, W. et C. Woof, 1984. A study of the cycling of manganese and other elements in a seasonally anoxic lake, Rostherne Mere, U.K. Wat. Res., 6: 727-734.
- Doyle, R.J., T.H. Matthews et U.N. Streips, 1980. Chemical basis for selectivity of metals ions by the Bacillus subtilis cell wall. J. Bacteriol., 143:471-480.

- Gonçalves, M.L.S., L. Sigg, M. Reutlinger et W. Stumm, 1987. Metal ion binding by biological surfaces: voltammetric assessment in the presence of bacteria. *Sci. Tot. Environ.*, 60:105-119.
- 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. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43: 687-693.
- Kinter, W. B. et J. B. Pritchard, 1977, (éds). Altered permeability of cell membranes, p. 563-576. Dans: Handbook of Physiology to Environmental Agents. Wilkins,
- Lee, A. et R.W. Walker, 1984. Toxicity and binding of cooper, zinc, and cadmium by the blue-green alga, Chroococcus parisi. *Water Air Soil Pollut.*, 23:129-139.
- Li, Y.-H. et S. Gregory, 1974. Diffusion of ions in seawater and in deep-sea sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 38:703-714.
- McLaughlin, S., 1979. Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces. *Curr. Topics Membr. Transp.*, 9:71-144.
- Nelson, P.O., A.K. Chung et M.C. Hudson., 1981. Factors affecting the fate of heavy metals in the activated sludge process. *J.Wat. Pollut. Control Fed.*, 53:1323-1333.
- NRCC, 1981. Acidification in the Canadian environment. National Research Council of Canada, Assoc. Committee Sci. Criteria Environ. Quality, NRCC Report No. 18475, 369 p.
- Pagenkopf, G.K., 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environ. Sci. Technol.*, 17: 347-352.
- Parent, L., 1985. Effets des acidifications à court et à long terme sur la productivité du périphyton d'un ruisseau du Bouclier-Canadien. Rapport de recherche, Sciences de l'Environnement, Université du Québec à Montréal, 188 p.
- Peterson, H.G., F.P. Healy et R. Wagemann. 1984. Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 974-979.
- Raven, J.A. 1980. Nutrient transport in microalgae, p. 47-226. Dans: *Adv. Microb. Physiol.*, A.H. Rose et J.G. Morris (éds), Vol. no 21, Academic Press, New York, NY.
- Schenck R.C., A. Tessier et P.G.C. Campbell, 1988. The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. *Limnol. Oceanogr.*, 33:538-550.

- Smith F.A. et J.A. Raven, 1979. Intracellular pH and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 30:289-311.
- Sary J. et K. Kratzer, 1982. The cumulation of toxic metals on algae. *J. Environ. Anal. Chem.*, 12:65-71.
- Sary, J., K. Kratzer et J. Prasilova, 1982a. The cumulation of methylmercury and phenylmercury species on alga. *J. Indian Chem. Soc.*, LIX:1329-1330.
- Sary, J., B. Havlik, A. Zeman, K. Kratzer, J. Prasilova et J. Hanusova, 1982b. Chromium (III) and chromium (VI) circulation in aquatic biocenoses. *Acta hydrochim. hydrobiol.*, 10:251-257.
- Sary, J., K. Kratzer et J. Prasilova, 1983. Systematic study of the cumulation of elements on alga. *Toxicol. Environ. Chem.*, - 7:47-61.
- Sary, J., K. Kratzer et J. Prasilova, 1984. Cumulation of anionic species on algal cells. *Toxicol. Environ. Chem.*, 9:109-113.
- Whitfield, M. et D.R. Turner, 1979. Critical assessment of the relationship between biological thermodynamic and electrochemical availability, p. 657-690. Dans: *Chemical Modeling in Aqueous Systems*, E.A. Jenne (éd.), ACS Adv. Chem. Ser. Symp. Ser. 93, ACS, Washington, DC.
- Xue, Han-Bin, W. Stumm et L. Sigg, 1988. The binding of heavy metals to algal surfaces. *Wat. Res.*, 22:917-926.

CHAPITRE 5: TOXICITE DE L'ALUMINIUM EN RELATION AVEC SA SPECIATION

CHAPITRE 5: TOXICITE DE L'ALUMINIUM EN RELATION AVEC SA SPECIATION

	Page
5.1 Introduction.....	251
5.2 Toxicité de l'aluminium monomère inorganique.....	257
5.2.1 Matériel et méthodes.....	257
5.2.2 Résultats.....	259
5.2.3 Discussion.....	268
5.3 Toxicité de l'aluminium polymère.....	283
5.3.1 Matériel et méthodes.....	285
5.3.2 Résultats.....	287
5.3.3 Discussion.....	291
5.4 Toxicité de l'aluminium organique.....	299
5.4.1 Matériel et méthodes.....	302
5.4.2 Résultats.....	305
5.4.3 Discussion.....	313
5.5 Conclusion.....	317
5.6 Références.....	319

CHAPITRE 5: TOXICITE DE L'ALUMINIUM EN RELATION AVEC SA SPECIATION

5.1 Introduction

La problématique des précipitations acides, et de la mise en circulation de certains métaux dans les milieux acidifiés, a orienté plusieurs recherches vers la modélisation de la toxicité des métaux lourds en milieu acide. Une telle modélisation vise à prédire la réponse toxique à partir de mesures directes du métal en milieu naturel selon sa forme physico-chimique.

En général, les expériences sur la toxicité des métaux lourds exécutées sur plusieurs organismes (algues, bactéries, benthos et poissons) indiquent que la toxicité d'un métal donné n'est pas corrélée à la concentration totale du métal mais plutôt à la concentration des ions métalliques libres, $M^{+z}(H_2O)_n$, laquelle dépend de la nature et de la concentration des ligands présents dans le milieu.

Ces observations, surtout pour les métaux bivalents (Cd, Cu, Pb, Zn), ont conduit à l'élaboration de modèles simples portant sur l'interaction des métaux avec des organismes vivants (Morel, 1983; Pagenkopf, 1983). On peut se demander si la toxicité de l'aluminium, à un pH donné, cadrerait avec ces modèles. Tel que mentionné au chapitre 1 (Introduction), il faut signaler qu'outre les travaux récents de Kinraide et Parker (1989), il n'existe dans

la littérature que très peu de données valables pour répondre à cette question: dans la presque totalité des études toxicologiques, on a négligé de considérer les caractéristiques chimiques de l'aluminium en solution aqueuse (ex.: sa solubilité limitée entre pH 5.5 et 7.0, la lenteur de certaines de ses réactions, sa tendance à former des espèces métastables, sa tendance à s'adsorber).

En ce qui concerne l'effet du pH sur la toxicité de l'aluminium, les études montrent plus d'inconsistance encore, notamment à cause de la difficulté à différencier entre les effets respectifs du pH sur la spéciation de l'Al et sur sa toxicité pour l'organisme. En effet, la concentration en ions H^+ peut affecter la solubilité de l'aluminium, sa spéciation en solution et sa prise en charge biologique (à cause de ses effets sur le potentiel membranaire et de la compétition cationique au niveau membranaire), et ces interactions respectives semblent complexes.

Beaucoup d'auteurs ont orienté leurs recherches vers la détermination des principales formes d'aluminium pouvant être toxiques pour les organismes aquatiques. Le bilan des résultats obtenus jusqu'à aujourd'hui ne nous permet pas de dégager de tendances claires concernant la "toxicité relative" de ces formes. Par exemple, Helliwell et al. (1983) préconisent que les hydroxo-complexes de l'aluminium ($Al(OH)^{2+}$, $Al(OH)_2^+$) sont "plus toxiques" que l'ion libre Al^{+3} pour Chlorella pyrenoidosa, alors que Kinraide et Parker (1989) observent le contraire pour certains plants de blé.

Tous les auteurs qui ont essayé de déterminer quelle était la toxicité respective des différentes formes d'aluminium monomère ont dû faire face aux contraintes suivantes, ce qui a limité énormément la portée de leurs travaux: (i) que de changer le pH d'exposition afin de faire varier la spéciation de l'aluminium en solution implique aussi que l'on doit considérer les effets de changements de pH sur l'organisme cible lui-même (ex.: effets toxiques de l'ion H^+ ; compétition entre l'ion H^+ et l'aluminium pour des sites de complexation, X-cellulaire); (ii) tel qu'exprimé par Neville et Campbell (1988), qu'il existe une cinétique rapide d'équilibre entre les différentes espèces monomères en solution (Plankey et al., 1986), ce qui rend difficile l'idée d'identifier une espèce en particulier comme étant plus toxique qu'une autre; (iii) que toutes ces espèces portant une ou plusieurs charges, donc hydrophiles, ne peuvent pas passer à travers les membranes biologiques par simple diffusion (Luoma, 1983). Une quatrième considération tient à ce que tous les auteurs (à l'exception de Kinraide et Parker, 1989) ont omis d'intégrer dans leurs modèles de toxicité les formes d'aluminium polymère pouvant être présentes dans leurs milieux d'exposition.

Cette tendance à négliger les formes polynucléaires d'aluminium est difficile à justifier. Même s'il y a peu de données concernant la présence de telles espèces dans les eaux naturelles, ces formes sont susceptibles de se manifester lorsque des eaux acides, riches en Al, se voient neutralisées, c'est-à-dire

lorsque le produit de solubilité de $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$ est dépassé. De plus, ces formes ont une tendance marquée à s'adsorber ou à s'associer à des surfaces, y compris les surfaces biologiques.

Pour ce qui est des formes organiques de l'aluminium, tous les chercheurs sont, en général, d'accord avec l'idée que la toxicité de l'aluminium diminue en présence de ligands organiques. Par contre aucun n'a pu évaluer l'effet réel de l'aluminium organique, c'est-à-dire, n'a pu discriminer entre la diminution de la toxicité de l'aluminium due à sa complexation avec la matière organique (baisse de la disponibilité de l'aluminium inorganique) et celle due à l'Al organique même (avec [Al] inorganique constante).

Objectif

L'objectif principal de cette recherche est de relier la spéciation de l'aluminium des eaux naturelles à sa toxicité, en utilisant comme organisme test une algue unicellulaire: Chlorella pyrenoidosa. Cet objectif est poursuivi afin d'améliorer le modèle simple d'interaction métal/organisme en évaluant la contribution des formes d'aluminium monomère, polymère et organique à la toxicité de ce métal.

Approche expérimentale

L'approche expérimentale retenue afin de répondre à cet objectif est schématisée à la figure 5.1. Chlorella pyrenoidosa est cultivée de façon axénique dans un milieu AAP où le pH est équivalent à celui du milieu expérimental employé (tampons: DMGA, MES, 10^{-2} M). Les cultures sont agitées et aérées dans une bouteille en polycarbonate de façon à éviter toutes contaminations en métaux préalables à l'expérience. Au début de la phase expérimentale (lorsque la densité cellulaire égale 10^5 cellules \cdot mL⁻¹), les algues sont centrifugées (7000 tours \cdot min⁻¹ * 20 min), lavées trois fois et mises en suspension dans un milieu AAP ne contenant ni phosphore ni métaux, durant une période d'acclimatation de 24 heures. L'aspect morphométrique des cellules est vérifié au microscope avant chaque expérience. Toute l'expérience est effectuée dans un incubateur où la température (20°C) et la lumière ($115 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, en continue) sont maintenues constantes. Les milieux d'exposition sont agités et aérés pour favoriser une bonne croissance et assurer une homogénéisation adéquate du milieu. On travaille avec trois répétitions réelles. La croissance des algues est évaluée en déterminant la densité cellulaire deux fois par jour pendant quatre jours à l'aide d'un compteur de particules. Le paramètre de croissance utilisé est l'aire sous la courbe de croissance (cellules \cdot jour \cdot mL⁻¹).

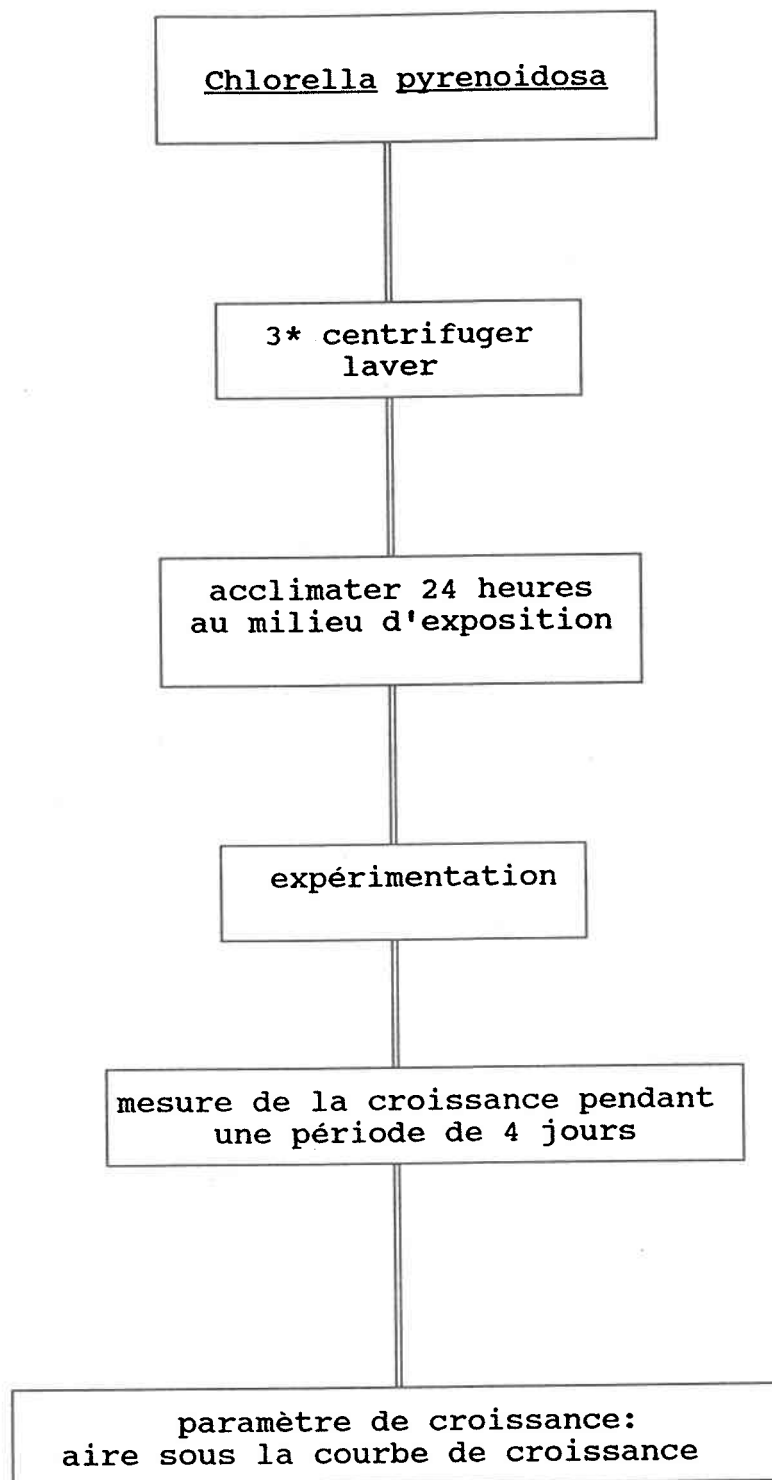


Figure 5.1: Schéma du protocole expérimental utilisé pour étudier la toxicité de l'aluminium envers Chlorella pyrenoidosa.

5.2 Toxicité de l'aluminium monomère inorganique

5.2.1 Matériel et méthodes

Pour vérifier les relations entre la spéciation de l'aluminium et sa toxicité, différentes concentrations en Al à différents pH (4.3-6.0) sont testées pour évaluer leur effet sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa.

Pour chacun des pH, à partir d'un programme de spéciation théorique (MINEQL) basé sur des équilibres thermodynamiques, la concentration maximale en aluminium monomère soluble est calculée. Les expériences sont réalisées en triple réel, i.e. trois bouteilles de Teflon^R par concentration d'Al. Chacun de ces tests est réalisé avec un témoin ($[Al] = 0$), une concentration théorique maximale monomère inorganique, et des concentrations en aluminium monomère inorganique intermédiaires. De cette façon, uniquement des solutions d'aluminium inorganique labile seront considérées. Il y a, par contre, deux exceptions, à pH 4.3 et pH 4.6, où la concentration maximale testée n'atteint pas la limite de solubilité. Notons que dans la gamme de pH 4.3-6.0, le pH seul n'a pas d'effet sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa (Chapitre 3). Les milieux d'exposition sont présentés au tableau 5.1. Les tampons utilisés sont le DMGA pour les pH 4.3 et 4.6; le MES pour les pH 4.8, 5.0, 5.2, 5.5 et 6.0 (10^{-2} M).

Tableau 5.1: Gamme de concentrations testées en Al monomère.

pH	4.3	4.6	4.8	5.0	5.2	5.5	6.0
[Al]	0	0	0	0	0	0	0
($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	25	100	200	25	100	8	8
	50	150	400	50		15	
	100	200		100		25	
	150	400		150		35	

Les cultures d'algues en phase d'acclimatation, dans le milieu AAP ne contenant ni phosphore ni métaux traces mais ajusté au même pH que le milieu d'exposition, sont réparties parmi les 15 (n) bouteilles de Teflon^R contenant 900 mL de milieu d'exposition (5 traitements en triple-sauf aux pH 4,8; 5,2 et 6.0 où n= 9, 6 et 6 respectivement). Notons qu'à ces derniers pH, l'expérience était modulée en fonction de l'évaluation de la toxicité de l'Al polymère, où seulement une (pH 5.2 et 6.0) ou deux concentrations d'Al monomère étaient testées (voir section 5.3). Les milieux d'exposition sont préparés au moins 24 heures avant le début de l'expérience afin de favoriser un équilibre parmi les formes d'aluminium. La croissance est suivie pendant une période de 4 jours et l'aluminium total, dissous et monomère est mesuré aux jours 0, 1, 2 et 4.

5.2.2 Résultats

Aluminium en solution

Il ne semble pas y avoir de baisse significative de l'aluminium monomère inorganique après l'ajout des algues sauf au pH 5.2 (figure 5.2). Cette baisse est suspecte (probablement due à une erreur technique de l'appareil de mesure) puisque les valeurs d'Al dissous et d'Al total dans ce même milieu ne variaient pas dans le temps. Pour sa part, le pH reste constant tout au long de l'expérience. La spéciation de l'aluminium inorganique monomère pour chacun des traitements a été déterminée par le programme MINEQL et apparaît au tableau 5.2.

Une représentation graphique de la spéciation de l'aluminium dans le milieu d'exposition apparaît à la figure 5.3; la spéciation s'avère très sensible à des changements de pH, surtout dans la gamme de 4.8 à 5.7. A des valeurs de pH < 4.7 l'ion libre Al^{+3} domine, alors que dans des solutions à pH > 5.7 c'est l'ion $Al(OH)_4^-$ qui l'emporte.

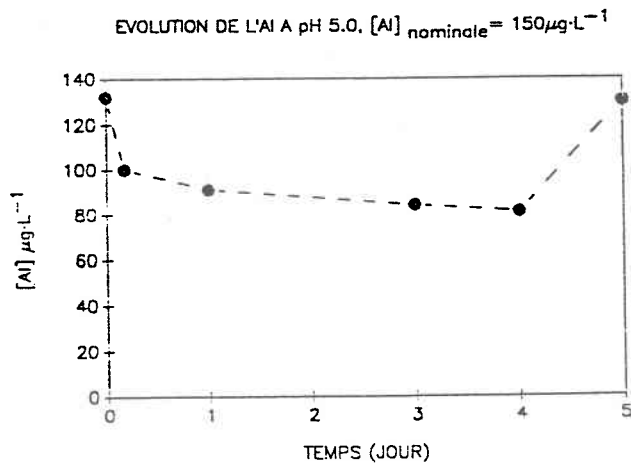
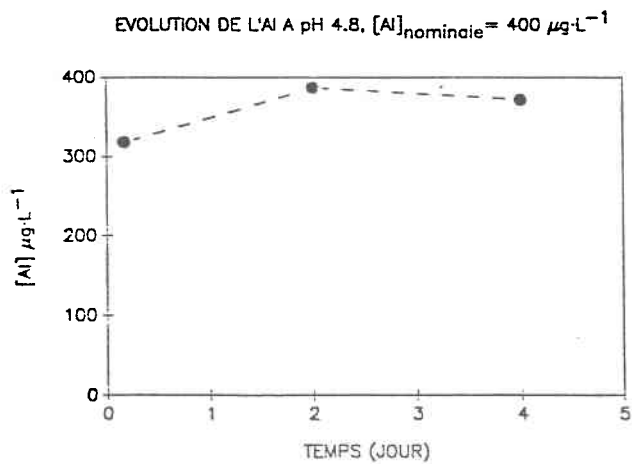
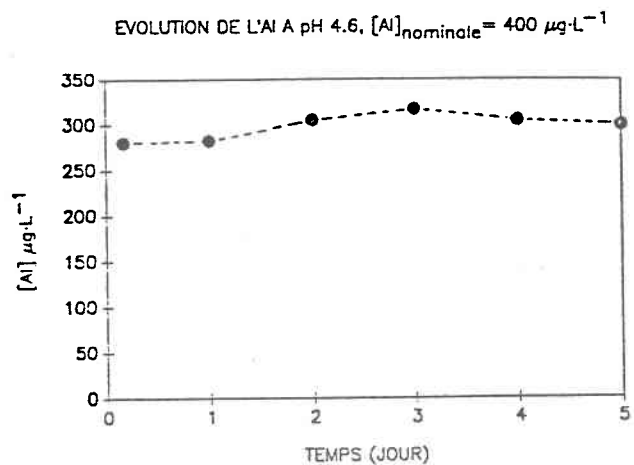
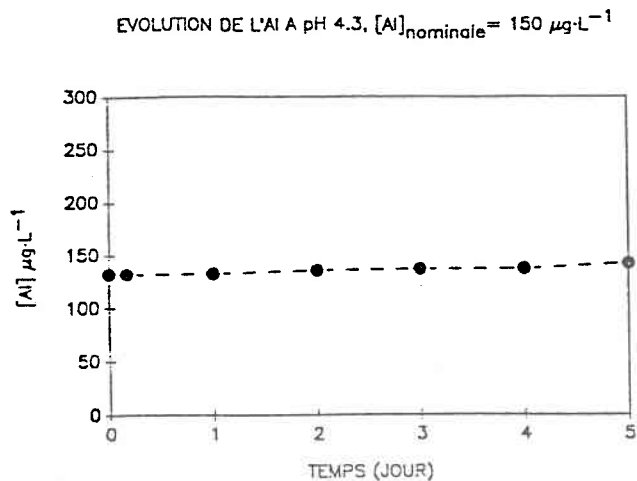


Figure 5.2: Evolution de l'aluminium monomère inorganique maximal à différents pH.

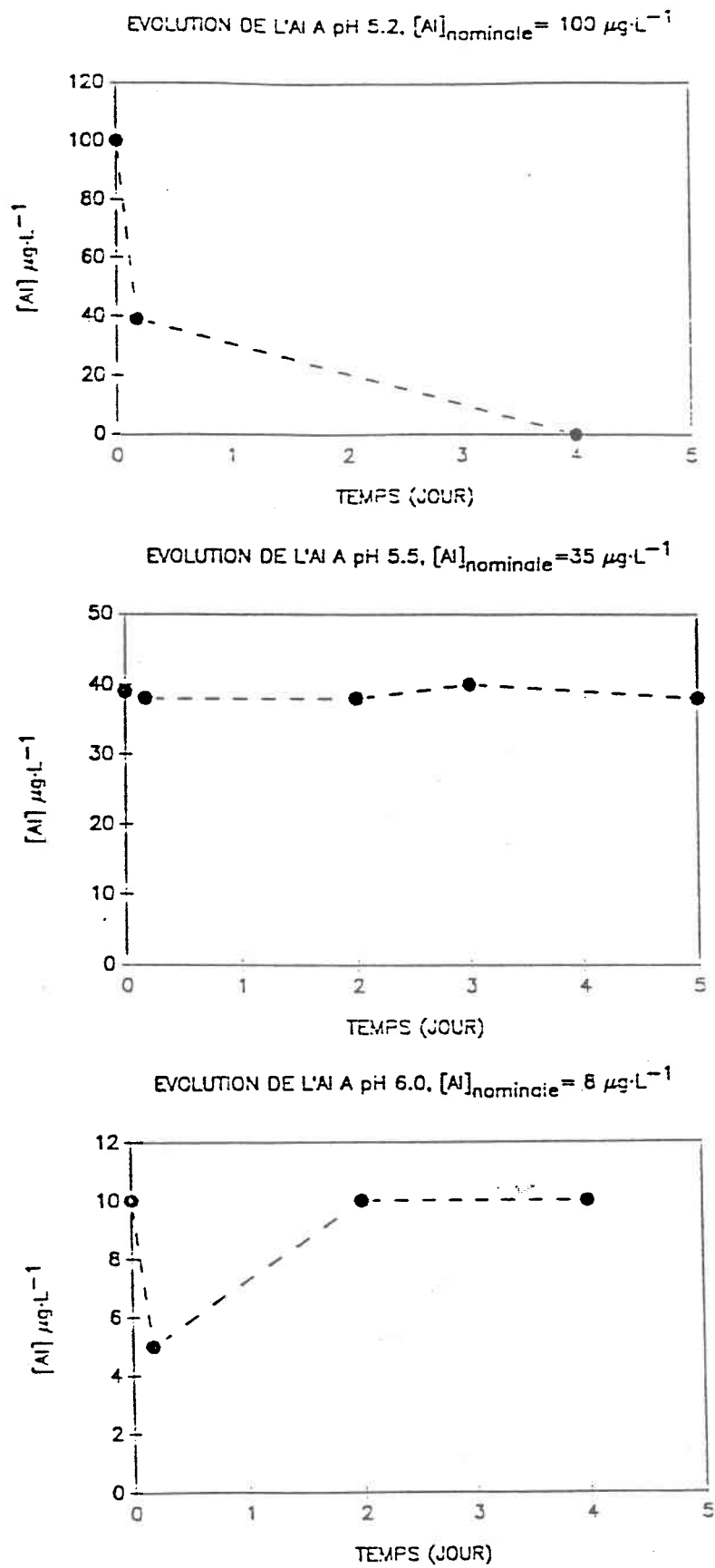


Figure 5.2: Evolution de l'aluminium monomère inorganique maximal à différents pH (suite).

Tableau 5.2: Spéciation de l'aluminium pour chacun des pH.
 Al_{T-N} : Aluminium total nominal; Al_T : aluminium total mesuré au jour 4 ou 5; Al_D : aluminium dissous mesuré; Al_{CV} : aluminium inorganique monomère mesuré; Al^{3+} , $Al(OH)^{2+}$, $Al(OH)_2^+$, déterminés par MINEQL à partir des concentrations nominales.

pH ¹	Al_{T-N}	Al_T	Al_D	Al_{CV}	Al^{3+}	$Al(OH)^{2+}$	$Al(OH)_2^+$
4.3	0	0	0	0	0	0	0
	25	15	20	27	20	4	1
	50	56	53	47	40	7	1
	100	127	139	109	80	14	2
	150	190	175	142	120	21	3
4.6	0	9	0	9	0	0	0
	100	127	118	119	66	24	6
	150	196	186	173	100	35	9
	200	325	330	250	130	47	13
	400	415	360	300	265	94	25
4.8	0	0	0	0	0	0	0
	200	180	---	175	107	60	25
	400	380	---	372	214	120	51
5.0	0	7.3	0	0	0	0	0
	25	30	19	27	7	7	5
	50	43	37	37	15	13	9
	100	76	80	95	32	28	19
	150	121	134	132	52	47	32
5.2	0	0	0	0	0	0	0
	100	73	70	0 ?	14	30	32
5.5	0	0	0	0	0	0	0
	8	11	11	10	0.5	1	0
	15	21	17	9	1	2	0
	25	25	25	31	3	8	17
	35	37	36	39	3	8	17
6.0	0	0	0	0	0	0	0
	8	8	8	9	0	0	2

¹ pH et [Al] à t=0, avant l'ajout des algues.

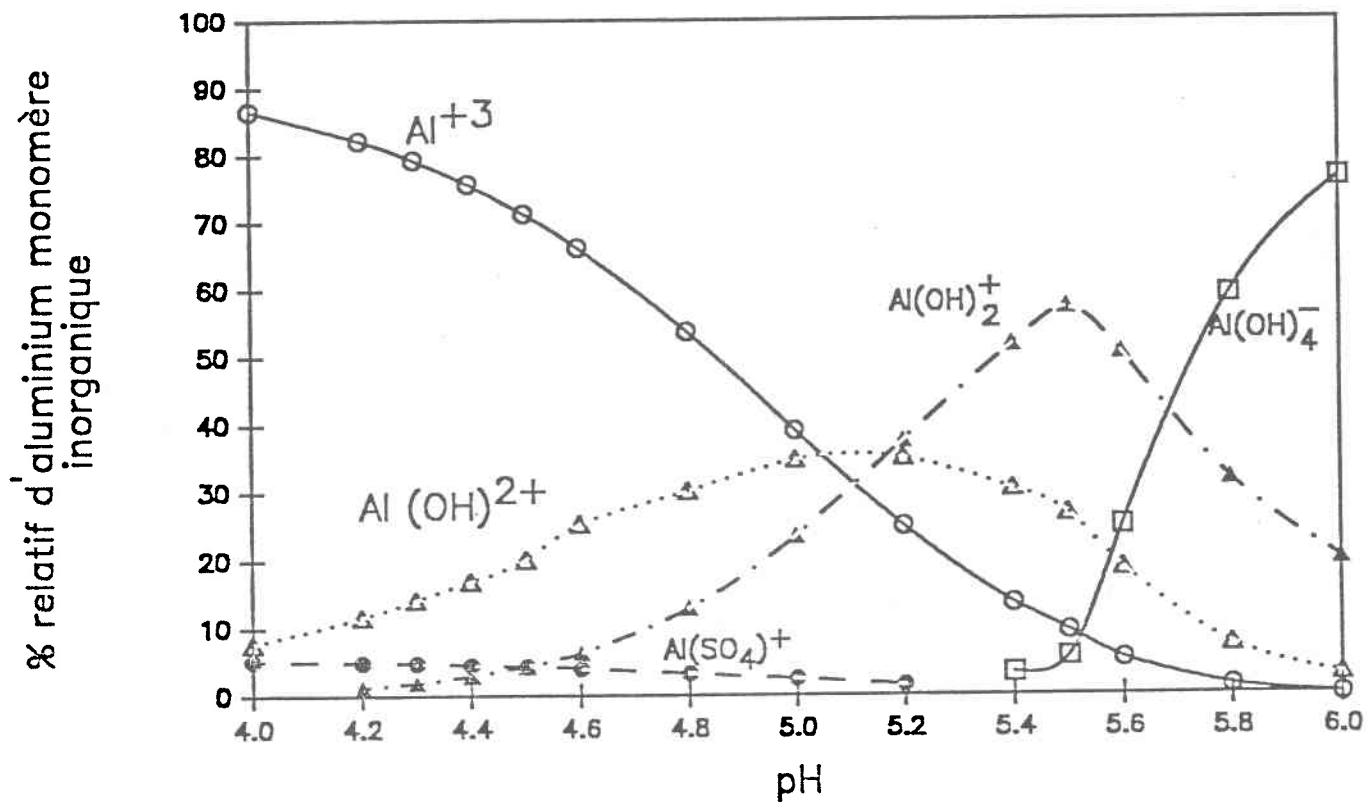


Figure 5.3:

Spéciation théorique de l'aluminium dans le milieu d'exposition calculée par le programme MINEQL. ($[Al] = 8 \mu g \cdot L^{-1}$, $0.3 \mu M$).

Croissance de *Chlorella pyrenoidosa*

Les courbes de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* pour différents traitements d'aluminium et à différents pH sont présentées à la figure 5.4. La comparaison entre l'allure générale de la courbe de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* dans un milieu contenant de l'aluminium par rapport à celle du milieu n'en contenant pas renseigne qualitativement sur l'effet de l'aluminium sur la croissance de l'algue test. L'aire sous la courbe de croissance (A) constitue un paramètre de croissance intégrateur des effets du traitement (Chapitre 3). Elle a été calculée pour chacun des traitements et une analyse de variance suivie d'un test de comparaison multiple ont été appliqués sur les données brutes pour vérifier si les différences entre le témoin et les différents traitements étaient significatives ($\alpha = 0.05$). Une analyse en composantes principales a montrée une variabilité significative entre les témoins des 7 expériences, principalement due au comportement des témoins de l'expérience à pH 4.8; c'est la raison pour laquelle les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (tableau 5.3).

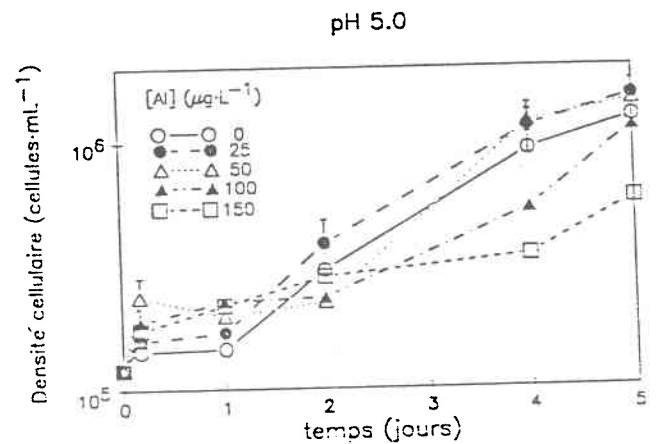
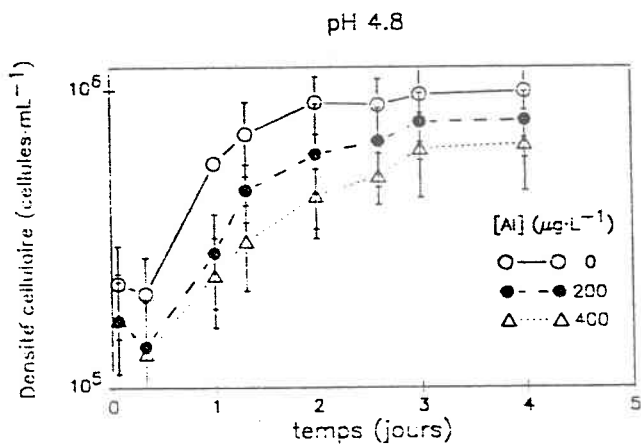
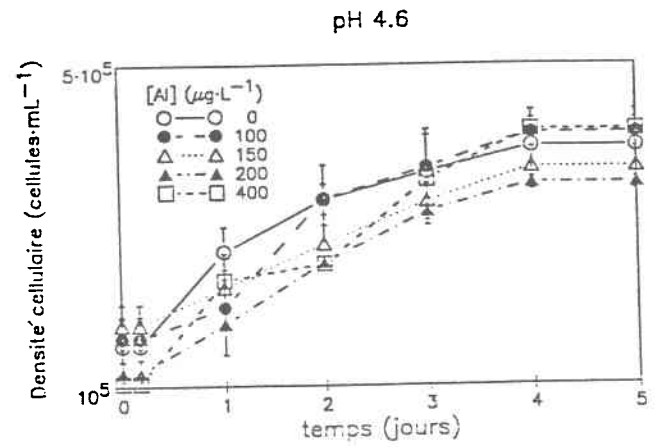
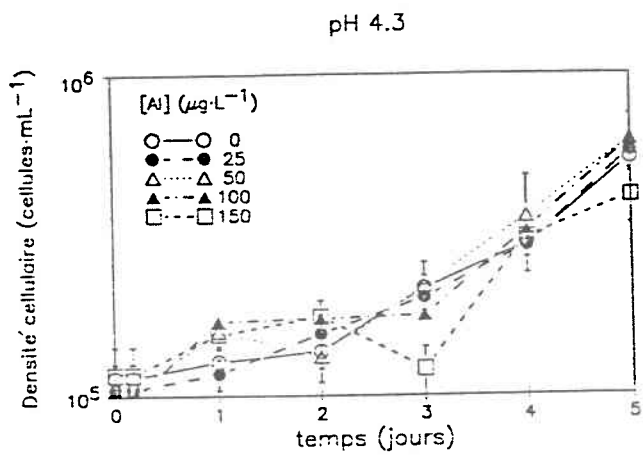


Figure 5.4:

Courbes de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* à différentes concentrations en aluminium inorganique monomère et à différents pH.

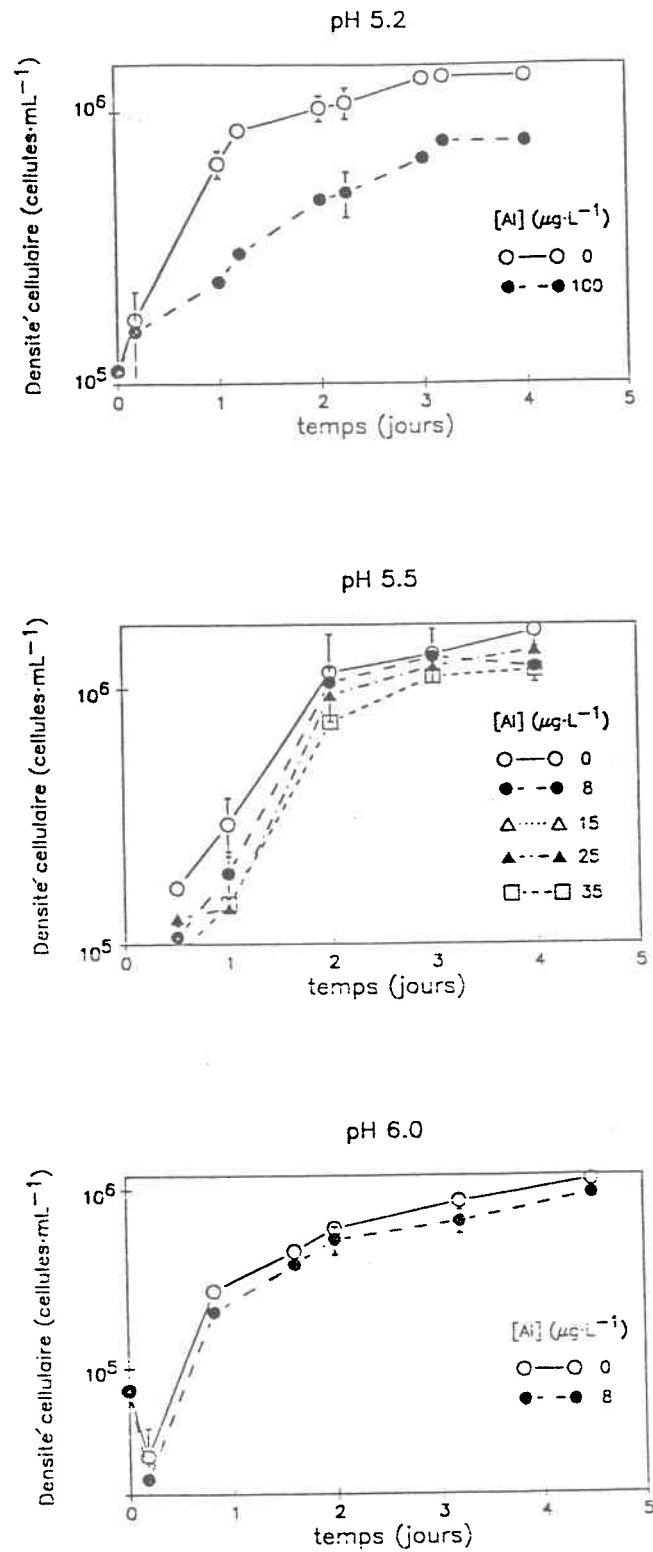


Figure 5.4:

Courbes de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* à différentes concentrations en aluminium inorganique monomère et à différents pH. (suite)

Tableau 5.3: Pourcentage de l'aire sous la courbe du témoin pour chacune des expériences. Les valeurs soulignées signifient qu'elles sont significativement différentes entre elles et par rapport aux autres valeurs non soulignées ($\alpha=0.05$), et ce, pour un même pH.

pH	4.3	4.6	4.8	5.0	5.2	5.5	6.0
[Al] _{CV} ⁻¹ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)							
0	100	100	100	100	100	100	100
8						90 ± 7	<u>76 ± 15</u>
15						100 ± 14	
25	100 ± 4			108 ± 24		87 ± 12	
35						<u>78 ± 7</u>	
50	112 ± 22			113 ± 10			
100	109 ± 7	<u>110 ± 4</u>		86 ± 10	<u>48 ± 4</u>		
150	92 ± 16	93 ± 3		<u>55 ± 6</u>			
200		84 ± 7	<u>80 ± 4</u>				
400		97 ± 11	<u>71 ± 6</u>				

5.2.3 Discussion

Les résultats analytiques ont montré que les concentrations en Al monomère inorganique mesurées correspondaient assez bien aux concentrations nominales. Dans tous les cas, les concentrations en Al se situaient en deçà des concentrations limites de solubilité. De plus, il semble que le désign expérimental choisi, en ce qui a trait à la densité cellulaire ainsi qu'aux contenants utilisés (Teflon^R), permettait de maintenir sensiblement constantes les concentrations en Al tout au cours de l'expérience. De même, les tampons utilisés se sont avérés efficaces pour le maintien du pH. Ainsi, l'évaluation des effets de l'aluminium sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa s'est déroulée sous des conditions constantes et contrôlées.

Au tableau 5.2, la spéciation de l'aluminium pour chacun des pH est calculée à partir de la concentration en Al nominale au temps = 0 et la spéciation théorique de l'Al est présentée à la figure 5.3. Même si les valeurs en Al_T correspondent assez bien aux valeurs en Al nominale (Al_N), il se doit d'être mentionné que les techniques analytiques aussi bien en spectrophotométrie avec four au graphite qu'à l'autoanalyseur Technicon par colorimétrie s'avèrent difficiles à mettre au point, d'autant plus que les concentrations en Al sont faibles. Les résultats présentés au tableau 5.2 résultent de la moyenne de trois échantillons réels qui ont été mesurés au moins trois fois ou jusqu'à ce que l'écart type

ne dépasse pas 15%. Malgré cette surveillance, certains résultats (ex.: pH 5.2 pour Al_{cv}) se sont avérés aberrants¹. L'effet de l'Al monomère inorganique sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa se révèle en général plus consistant et révélateur que la mesure chimique elle-même (figure 5.4)!

Même si on observe une certaine tendance en examinant les effets de l'Al sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa, on ne détecte pas de toxicité significative due à l'aluminium aux plus bas pH testés (4.3 et 4.6; figure 5.5) et ce, même à des concentrations largement supérieures aux concentrations retrouvées en milieu naturel. Comme on utilisait le tampon DMGA uniquement pour ces deux pH, on a d'abord douté de son faible pouvoir de complexation avec l'aluminium (Martell et Smith, 1977). On a alors testé s'il y avait complexation du DMGA et de l'Al en essayant d'extraire l'aluminium complexé au DMGA avec un solvant organique (alcool butylique). La concentration en aluminium dans la solution aqueuse a été déterminée avant et après l'extraction: aucune différence significative n'a été observée ($\alpha=0.05$), suggérant qu'il n'y avait pas de formation de complexes Al-DMGA.

¹ La disparition d'Al monomère inorganique au cours de cette dernière expérience (pH 5.2) n'est probablement pas due à la polymérisation puisque les concentrations sont en deçà des limites de solubilité. Cette disparition n'est autrement explicable que par un ennui technique puisque les concentrations en Al_{total} et $Al_{dissous}$ restent passablement constantes au cours de l'expérience.

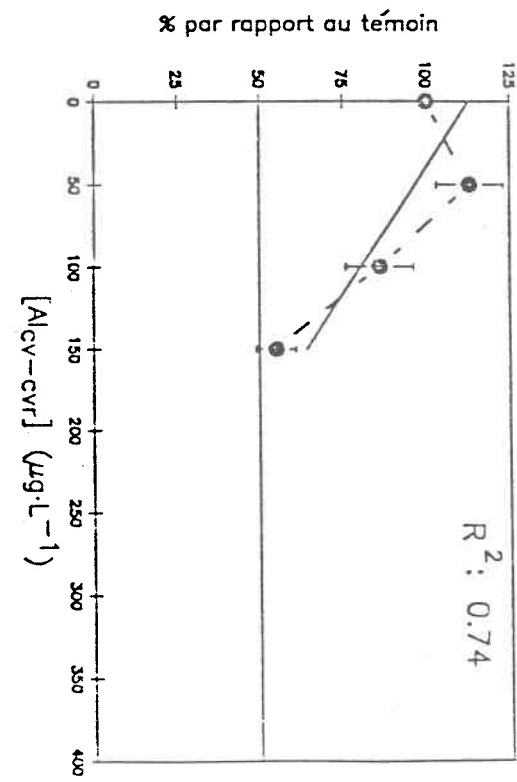
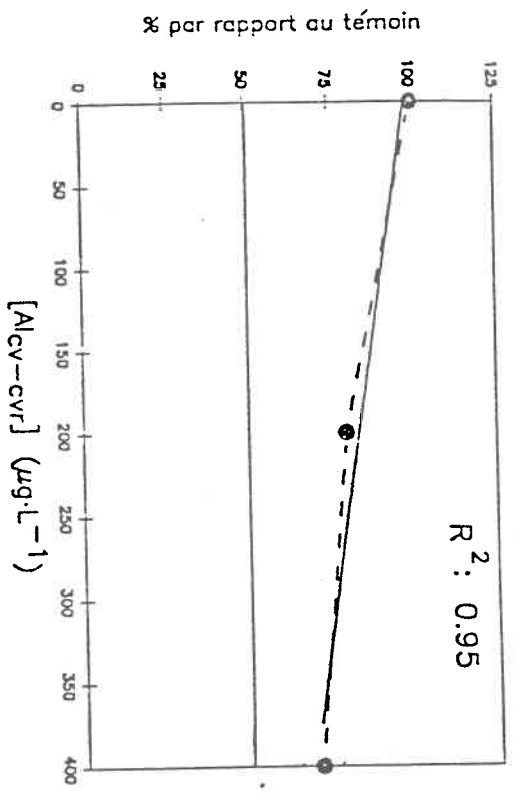
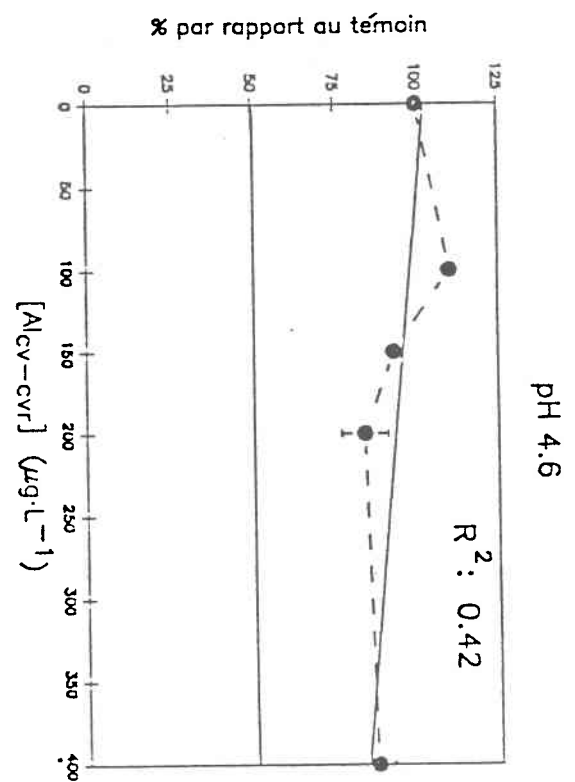
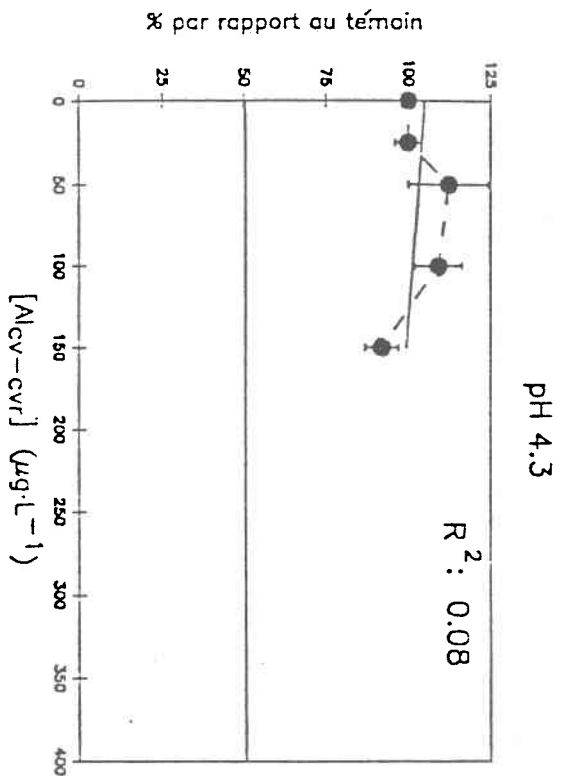


Figure 5.5: Graphique du pourcentage de l'aire sous la courbe de croissance du témoin en fonction de la concentration en aluminium monomère inorganique.

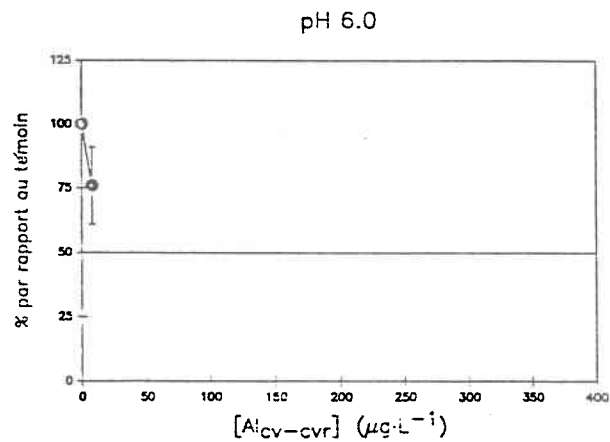
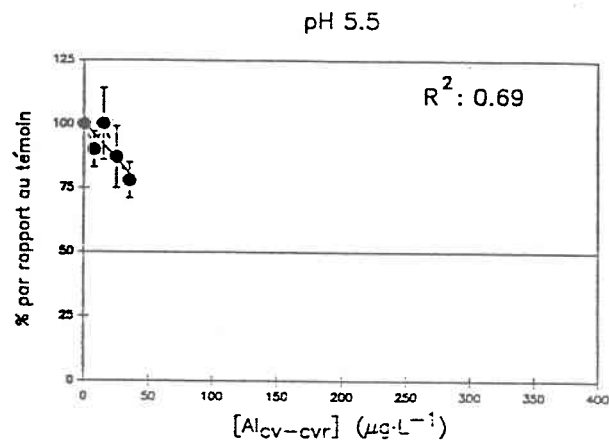
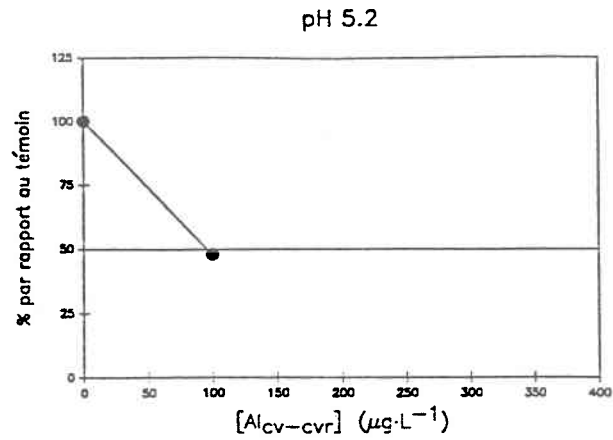


Figure 5.5 : Graphique du pourcentage de l'aire sous la courbe de croissance du témoin en fonction de la concentration en aluminium monomère inorganique. (suite)

L'aluminium, à des concentrations aussi élevées que 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, n'est donc pas toxique à $\text{pH} \leq 4.6$. Par contre aux pH plus élevés, on observe des baisses significatives de la croissance de Chlorella pyrenoidosa presque uniquement à la concentration maximale en aluminium monomère inorganique (tableau 5.3). Dans des conditions chimiques contrôlées, comme c'est le cas ici, il semble que l'aluminium soit peu toxique pour Chlorella pyrenoidosa et que les CI_{50} (concentrations nécessaires pour inhiber 50% de la croissance des algues) ne soient pas atteintes même à des concentrations en aluminium monomère inorganique maximales pour chacun des pH . Cependant, Helliwell et al. (1983) obtenaient des CI_{50} très en deçà des CI_{50} que l'on pourrait estimer à partir de nos résultats. Par exemple, le tableau ci-dessous montre les CI_{50} estimées à partir de nos résultats et celles de Helliwell et al. (1983) (même si ces valeurs ne correspondent pas à des valeurs mesurées, c'est-à-dire, que ces valeurs ne sont pas atteintes dans nos expériences et dépassent fréquemment les limites de solubilité de l'Al pour le pH considéré).

CI_{50} ($\mu\text{g Al}\cdot\text{L}^{-1}$)		
pH	Helliwell Parent et al.	
4.8	32	600
5.0	28	200
5.2	19	100
5.5	8	80
6.0	2	40

Les faibles CI_{50} déterminées par Helliwell et al. (1983) comparativement à celles estimées dans la présente recherche sont d'autant plus difficiles à expliquer que le milieu expérimental utilisé par Helliwell et al. en était un d'eau dure ($[Ca]= 700 \mu M$, soit >10 fois plus élevée que celles observées dans les eaux de surface acidifiées) et de force ionique plus élevée que dans la présente étude, ce qui pouvait engendrer un effet modérateur ou protecteur des effets de l'Al et donc générer des CI_{50} plus élevées. A première vue, une autre raison pouvant expliquer l'écart entre les deux séries de CI_{50} (Helliwell et al. vs Parent) serait que les algues utilisées par Helliwell et al. aient été plus sensibles que celles utilisées dans cette étude. Cependant, mentionnons que pour les fins de la présente expérience, Chlorella pyrenoidosa a été cultivée et repiquée uniquement dans des bouteilles et des fioles coniques en polycarbonate et en Teflon^R pour éviter toute contamination ou acclimatation à l'aluminium, ce qui aurait dû augmenter sa sensibilité à l'aluminium.

Lorsqu'on reprend, sur un même graphique, les droites obtenues à partir des régressions linéaires entre le pourcentage de croissance par rapport au témoin et les concentrations testées en aluminium monomère inorganique (figure 5.5), on observe à la fois un effet de concentration et un effet de pH sur la toxicité de l'aluminium (figure 5.6). Notez bien que sur ce graphique, les droites proviennent de régressions linéaires constituées par les points -pourcentage de l'aire sous la courbe de croissance de

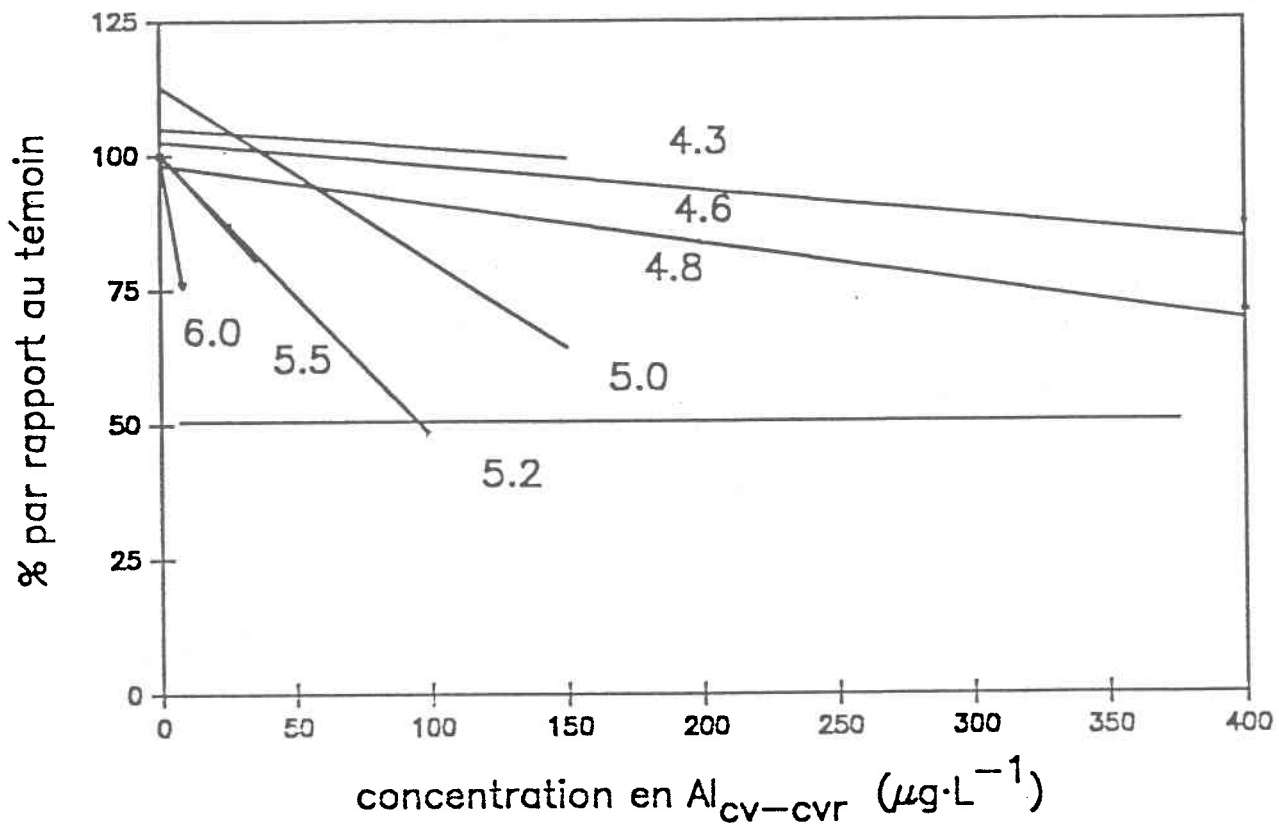


Figure 5.6: Graphique du pourcentage de l'aire sous la courbe de croissance du témoin en fonction de la concentration en aluminium monomère inorganique.

Chlorella par rapport aux bouteilles témoin vs [Al] monomère nominal. La concentration en Al monomère nécessaire pour abaisser la croissance diminue à mesure que le pH augmente. Par exemple, pour diminuer la croissance de 25% (% = 75) du témoin à pH 4.8, une concentration en Al de 325 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ est nécessaire alors qu'une concentration de seulement 8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ suffit à pH 6 (figure 5.6): la toxicité de l'Al augmente à pH plus élevé.

Peterson et al. (1984) ont observé le même phénomène avec l'algue verte Senedesmus quadricauda et le Cd^{2+} . Cependant, dans leur cas, la spéciation du Cd ne variait pas dans la gamme de pH considérée. La toxicité qui variait avec le pH ne pouvait donc pas être expliquée par des variations de la proportion des différentes espèces de Cd, mais plutôt par une compétition entre H^+ et Cd^{2+} pour des sites de liaison cellulaires.

Une autre façon de présenter les données obtenues dans la présente recherche est de cumuler les concentrations en aluminium labile nécessaire pour diminuer de 30 % la croissance de l'algue en relation avec le pH. La concentration nécessaire pour diminuer la croissance de 30 % par rapport au témoin augmente remarquablement sous pH 5.0 (figure 5.7). Si le modèle d'ion libre pour la toxicité des métaux s'appliquait ici sous sa plus simple expression, on anticiperait l'obtention d'une ligne horizontale, soit que la concentration en Al^{3+} nécessaire pour diminuer la croissance de l'algue soit la même, indépendamment du pH.

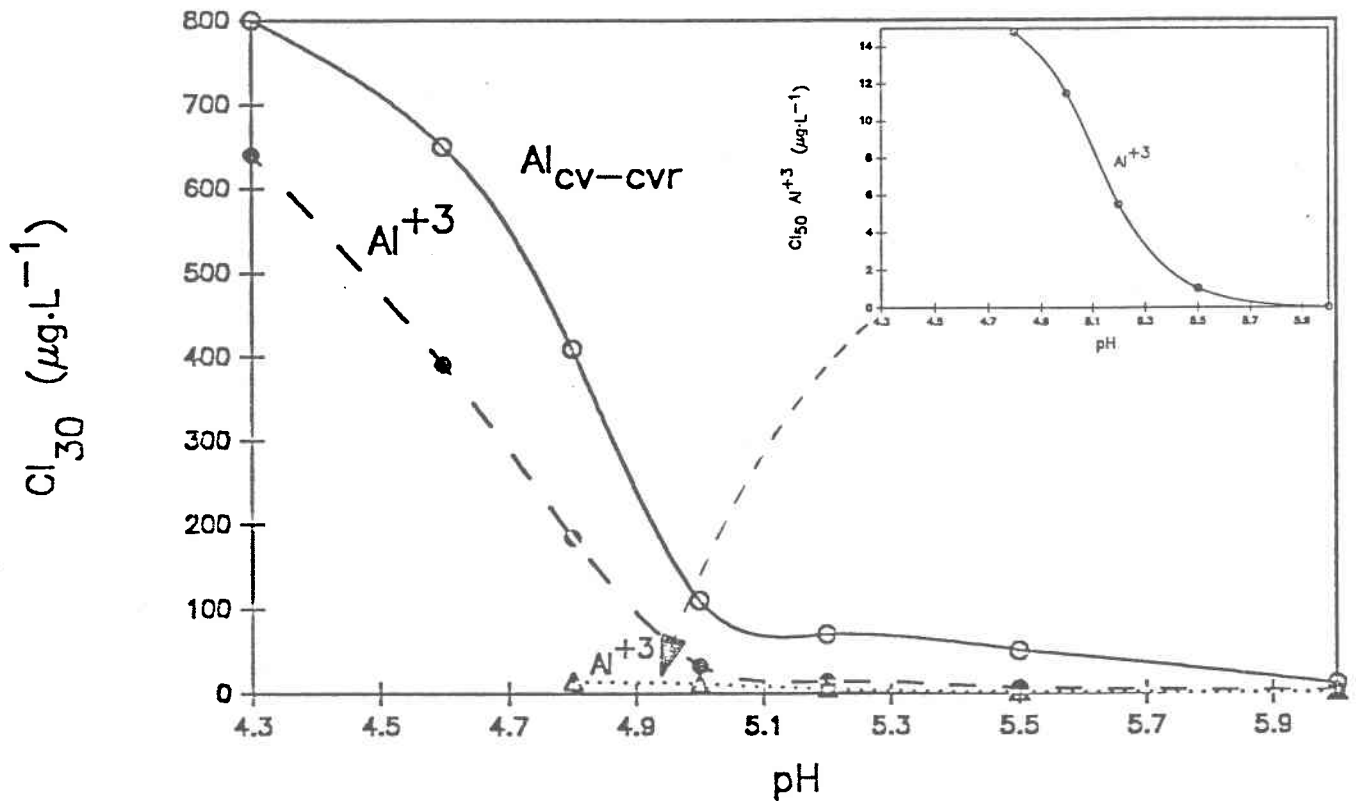


Figure 5.7: CI_{30} exprimée en Al monomère inorganique pour *Chlorella pyrenoidosa* en fonction du pH, (---: CI_{30} pour Al^{+3} calculé et: CI_{50} pour Al^{+3} calculé à partir des données de Helliwell et al. (1983) et repris en mortaise).

Par exemple, on devrait obtenir une toxicité similaire à $4 \mu\text{M}$ ($108 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) Al^{3+} indépendamment du pH. On obtient cependant une courbe (figure 5.7).

La relation entre le pH et la toxicité de l'aluminium est très forte: le logarithme de $[\text{Al}]$ qui provoque une inhibition de 30% de la croissance est relié linéairement avec le pH avec un coefficient de détermination (R^2) de 0.97 (figure 5.8 C). On peut alors penser que l'effet observé de l'augmentation de la toxicité avec l'augmentation du pH puisse être expliqué par la compétition entre H^+ et Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ et $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ pour les sites de liaison cellulaires, laissant Al^{3+} prendre place sur plus de sites et devenant plus toxique alors que la concentration en H^+ diminue. Gensemer (1991) a observé le même phénomène: la relation entre le taux de croissance et l'Al monomère inorganique était fortement fonction du pH. Pour une même concentration en Al monomère inorganique, la toxicité de l'Al pour une algue diatomé acidophile Asterionella ralfsii était plus élevée à pH 6 qu'à pH 5.

Si on se rapporte au Chapitre 4, où on a calculé la capacité d'adsorption des algues vivantes comme étant égale à $0.024 \text{ moles } \text{H}^+\cdot\text{L}^{-1}$ d'algues à pH 4.0 et qu'on juxtapose la courbe de saturation des algues en H^+ (figure 5.8 D) à celle de la toxicité de Al^{3+} (figure 5.8 B), on observe une forte similitude entre elles. Ceci s'expliquerait par la compétition existante aux pH inférieurs entre les cations H^+ et Al^{3+} . Plus l'algue est saturée en H^+ , plus la

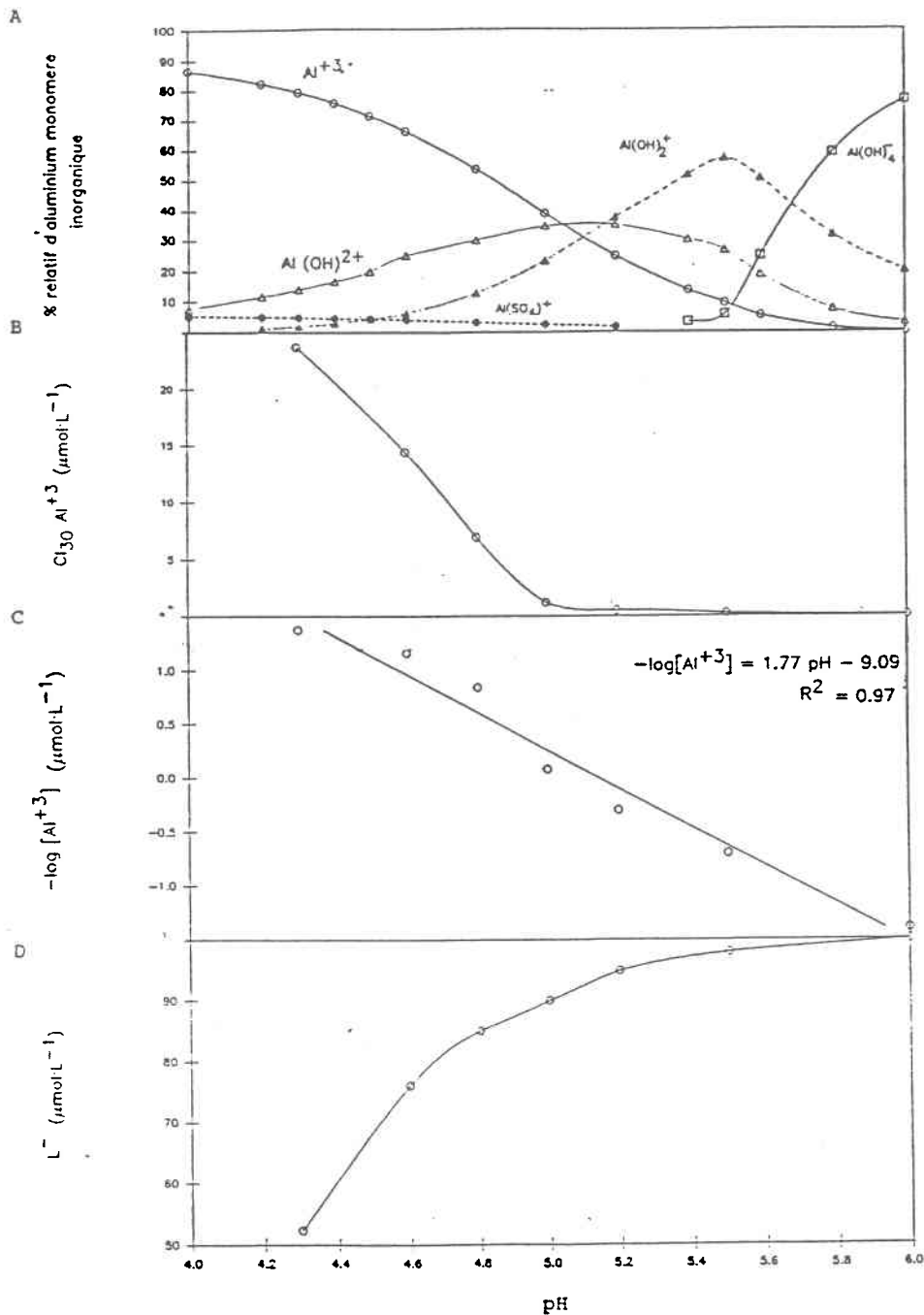
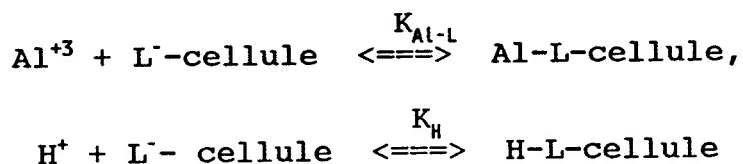


Figure 5.8: A- Pourcentage de différentes formes d'aluminium monomère inorganique en fonction du pH.
 B- Concentration en Al^{+3} susceptible de provoquer une diminution de croissance de 30% de Chlorella pyrenoidosa.
 C- Régression linéaire de $-\log CI_{30}$ (exprimée en Al^{+3}) en fonction du pH.
 D- Concentration en L^- à la surface cellulaire en fonction du pH.

concentration en Al^{+3} nécessaire pour obtenir une diminution de croissance de 30 % par rapport au témoin, sera élevée. Ces résultats seront plus facilement quantifiables en termes de bioaccumulation au Chapitre 6. En d'autres termes, et selon le modèle d'ion libre modifié pour tenir compte de la compétition du proton,



la toxicité observée est fonction à la fois de la concentration en Al^{+3} disponible dans le milieu et de la concentration en L^- disponible (libre) à la surface cellulaire. On a démontré plus haut que pour un même pH, alors que la concentration L^- -cellulaire est constante, une augmentation de la concentration en Al^{+3} provoque une augmentation de la réponse, soit une plus forte diminution de la croissance; ceci correspond qualitativement au modèle d'ion libre. Par ailleurs, lorsqu'on diminue le pH et que Al^{+3} reste constant, on observe une diminution de la réponse, c'est-à-dire que la toxicité diminue. On explique ce phénomène par une diminution des ligands à la surface cellulaire susceptibles de recevoir Al : c'est la capacité de la cellule à recevoir qui diminue à bas pH.

Selon cette approche, où l'inhibition de la croissance de Chlorella pyrenoidosa est fonction de la concentration du complexe $[Al-L\text{-cellulaire}]$, pour une inhibition donnée (30%) on s'attendrait à ce que le produit entre $[Al^{+3}]$ et $[L^- \text{-cellulaire}]_{\text{libre}}$ soit constant n'importe le pH.

$$[\text{Al-L-cellule}] = K_{\text{Al-L}} [\text{Al}^{+3}] [\text{L}^- \text{-cellulaire}] = \text{constante}$$

Cependant, lorsqu'on fait le produit entre les ligands susceptibles de lier Al (L⁻) et la [Al⁺³] provoquant une diminution de croissance de 30%, on obtient des valeurs qui diminuent linéairement avec le pH (R² = 0.96).

pH	[L ⁻] μmol · L ⁻¹	[Al ⁺³] μmol · L ⁻¹	[L ⁻] · [Al ⁺³]
4.3	65.85	17.11	1127
4.6	73.5	13.12	964
4.8	78.6	10.46	822
5.0	83.7	7.8	653
5.2	88.8	5.14	456
5.5	96.45	1.15	111
6.0	109.2	0.01	1

Plusieurs facteurs pourraient expliquer la non-constance du produit [Al⁺³] [L⁻]:

- (i) la constante d'équilibre, $K_{\text{Al-L}}$, varie avec le pH, c'est-à-dire, en fonction de la charge à la surface cellulaire.
- (ii) l'effet observé n'est pas directement relié avec le complexe Al-L (c'est-à-dire, que le modèle d'ion libre ne s'applique pas);
- (iii) l'évolution de [L⁻-cellule]_{libre} en fonction du pH, telle que déterminée par titrage, ne reflète pas les changements de concentration du ligand cellulaire spécifique qui réagit avec l'aluminium pour former le complexe [Al-L-cellule] (cf. les résultats pour l'adsorption du Mn en fonction du pH - chapitre 4).

Pour que le produit donne une constante, il faudrait que la variation de CI_{30} $[Al^{+3}]$ et $[L^-]$ en fonction du pH se fasse sur une même échelle et réponde à la même équation;

ex:	$[Al^{+3}]$	$[L^-]$
	1	4
	2	2
	4	1

ce qui n'est vraisemblablement pas le cas ici (gamme de variation de $[Al^{+3}]$ beaucoup plus large que pour $[L^-]$).

En influençant la spéciation de l'Al, le pH affecte la toxicité de deux façons: la première directement, par la compétition avec les ions métalliques libres pour les sites cellulaires, et la seconde indirectement, en déterminant la taille ou la disponibilité des ions Al libres. Les effets directs et indirects de H^+ ont été étudiés pour développer une meilleure compréhension de la toxicité des métaux pour les organismes vivants. On a minimisé les effets des variables autres que le pH (à la façon de Peterson et al., 1984) dans ces expériences, et la toxicité observée devrait être le reflet des effets de la concentration en H^+ .

Tel que démontré dans ce chapitre, la compétition entre les ions H^+ et les ions Al pour la liaison à la surface cellulaire constitue une explication raisonnable de la diminution de la toxicité de l'Al à des valeurs de bas pH, laquelle est compatible avec le modèle de toxicité de l'ion libre qui a été développé pour d'autres métaux. Il est essentiel de noter qu'on a considéré uniquement les espèces d'aluminium présentes et mesurées dans le milieu d'expositon. Une cellule peut par contre générer un courant de H^+ vers l'intérieur lequel alcaliniserait l'espace libre et la microcouche autour des cellules. Conséquemment, l'identité quantitative des espèces d'aluminium qui entrent en contact avec la membrane plasmique reste inconnue. Finalement, pour la détermination de la toxicité de l'aluminium en solution aqueuse, l'activité de l'ion libre et le pH de la solution sont de bons indices de la toxicité de la solution.

5.3 Toxicité de l'aluminium polymère

Dans la partie précédente (5.2) de ce chapitre, nous avons évalué la participation des espèces d'aluminium monomère (et plus précisément de l'ion Al^{+3}) à la toxicité de l'aluminium. La figure 5.6 présente les résultats obtenus lors de tests à différents pH et à différentes concentrations en Al monomère inorganique visant l'évaluation de l'effet de l'aluminium sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa. Dans tous les cas, à l'exception du pH 5.2, la CI_{50} n'est pas atteinte, et ce pour des concentrations en Al monomère inorganique n'excédant ni la limite de solubilité maximale ni les concentrations normalement retrouvées dans le milieu naturel.

Par contre, des chercheurs australiens (Helliwell et al., 1983) ont obtenu des CI_{50} aussi faibles que $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à pH 6 (figure 5.9), en utilisant la même algue, Chlorella pyrenoidosa, comme algue test. Selon ces mêmes auteurs, la présence d'Al polymère dans leur milieu n'avait aucun effet sur la croissance des algues. On peut se demander si le rôle joué par des formes polymères de type Al_{13} ($\text{Al}_{13}(\text{OH})_{327+}$, $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{247+}$) a été sous-estimé dans ces bioessais.

Afin de vérifier la toxicité des espèces polymères, nous avons repris le même type d'expériences que celles décrites ci-dessus, soit $[\text{Al}]$ monomère maximale, qui devient le témoin, et différentes

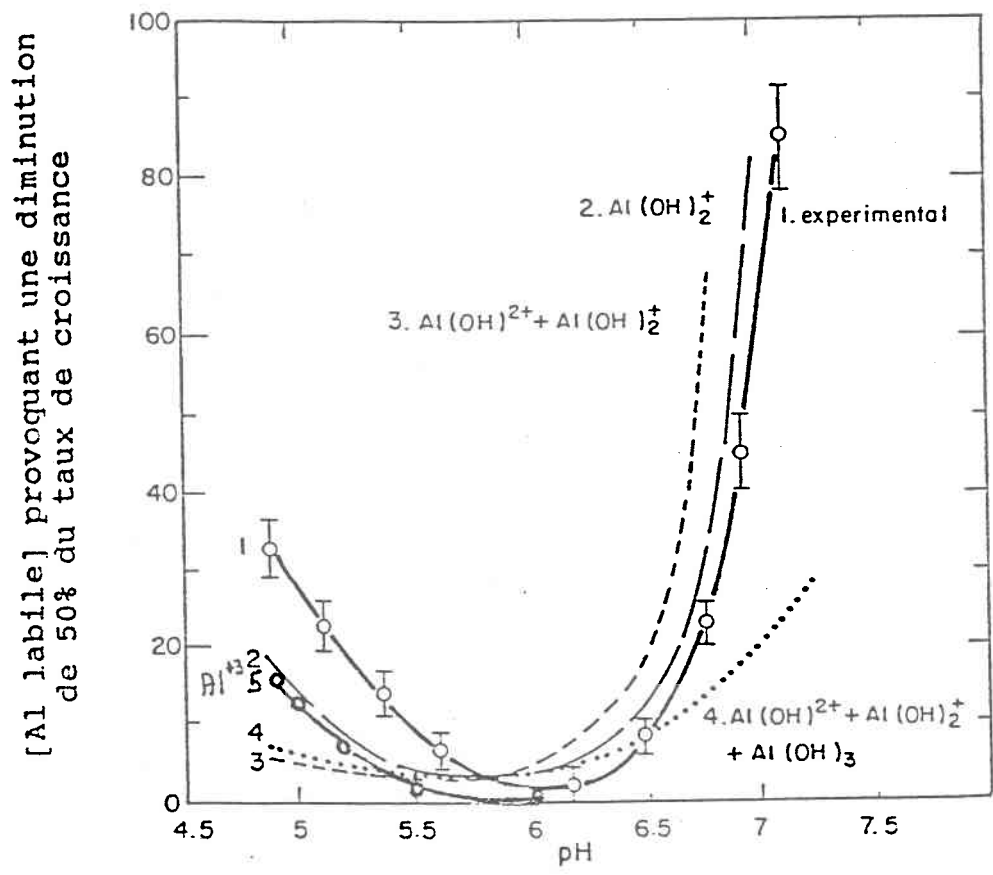


Figure 5.9: Concentration en Al labile provoquant une diminution de 50% du taux de croissance ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Tiré de Helliwell et al., 1983).

concentrations en Al polymère qui deviennent les essais. L'Al polymère est produit selon la méthode décrite dans Bertsch (1987) et reprise par Kinraide et Parker (1989). La présence de cette forme dans le filtrat est quantifiée en soustrayant la concentration en aluminium monomère inorganique mesurée par colorimétrie de la concentration en aluminium dissous mesurée par spectrophotométrie d'absorption atomique au four de graphite. Les calculs de la solubilité maximum de l'Al à l'aide du modèle MINEQL, servent à valider les mesures de Al polymère.

5.3.1 Matériel et méthodes

Des expériences sont effectuées aux pH 4.8, 5.2, 5.5 et 6.0. Le tampon utilisé pour maintenir le pH constant au cours des expériences est le MES. Pour chacun des pH, la concentration maximale d'aluminium soluble est calculée à partir d'un programme de spéciation théorique (MINEQL). On travaille en triple, c'est-à-dire avec trois bouteilles de Teflon[®] par concentration d'aluminium. Pour tous les tests, on a un témoin ($[Al] = 0$), une concentration maximale monomère inorganique ($[Al] = Al_{cv-cvr}^{max}$), et des concentrations nominales en Al polymère de 200, 300, 500; de 100, 200; de 165, 365; de 192 et 392 $\mu g \cdot L^{-1}$ pour les pH 4.8, 5.2, 5.5 et 6.0 respectivement. Ces concentrations nous permettent de discriminer entre les effets dus aux formes mono-et polymères (tableau 5.4).

Tableau 5.4: Conditions expérimentales pour vérifier les effets de l'Al polymère sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa. Les valeurs soulignées indiquent la concentration maximale en Al monomère pour chacun des pH tandis que les valeurs entre parenthèse signifient les valeurs nominales en Al polymère.

pH	4.8	5.2	5.5	6.0
[Al _T] ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0	0	0	0
	<u>400</u> (0)	<u>100</u> (0)	<u>35</u> (0)	<u>8</u> (0)
	600(200)	200(100)	200(165)	200(192)
	700(300)	300(200)	400(365)	400(392)
	900(500)			

Les solutions d'Al polymère sont produites selon la méthode de Kinraide et Parker (1989) et Bertsch (1987) qui minimise la formation d'Al(OH)₃ précipité. A l'aide d'une autoburette reliée à une pompe péristaltique, on ajoute lentement à une solution mère d'AlCl₃·6H₂O (0.01 M) une solution standardisée de NaOH (0.05 M) (0.5 mL·min⁻¹) pour obtenir un rapport NaOH/Al=2.0, de façon à maintenir tout l'aluminium en solution. Le NaOH est injecté dans la solution d'aluminium par un tube immergé près du point de mélange optimum (bas du vortex). Le pH initial de la solution est de 1.83, le pH final est de 5.13 et la concentration finale en Al_{total} est d'environ 7 mM. Toutes les manipulations sont réalisées sous une atmosphère d'azote. Pendant ce temps, la solution est vigoureusement agitée pour minimiser l'accumulation de base localement (Smith et Hem, 1972; Bertsch, 1987). La solution est ensuite filtrée sur une membrane Nuclepore en polycarbonate de 0.2 μm de porosité et diluée avec du milieu d'exposition de même pH et de même [Al-monomère] pour obtenir les concentrations voulues en Al.

Mentionnons que plus l'ajout de NaOH est rapide, et plus la solution est vieille, plus la fraction polymère réactive (Al_{13}) diminue (Parker et al., 1988b) alors que la fraction d'Al précipité augmente. Lorsque des solutions en Al sont partiellement neutralisées, la fraction d'Al mononucléaire est relativement uniforme pour un rapport molaire OH/Al donné (Parker et al., 1988b), mais la nature des autres espèces formées est hautement dépendante des conditions de synthèse. Les quantités nécessaires en Al polymère sont alors ajoutées aux milieux contenant de l'Al monomère inorganique maximal pour chacun des pH testés afin d'obtenir les concentrations en Al polymère voulues. Mentionnons que les concentrations mère en Al polymère contenaient aussi la concentration maximale en Al_{cv-cvr} , donc cette forme d'aluminium n'était pas diluée dans le milieu d'exposition par l'ajout de la solution concentrée contenant Al polymère d'autant plus que vue la forte concentration seulement un faible volume était ajouté.

Les solutions en aluminium sont agitées et barbottées pour 24 heures dans leur contenant expérimental. Avant l'ajout des algues et après 2 et 4 jours de contact avec les algues, la spéciation de l'aluminium est mesurée ainsi que le pH. La densité cellulaire est mesurée à l'aide d'un compteur de particules et la surface cellulaire algale est aussi estimée par le même appareil deux fois par jour.

5.3.2 Résultats

Les concentrations en aluminium retrouvées pour chacun des pH testés à temps=0 sont présentées au tableau 5.5.

Tableau 5.5: Concentrations moyennes mesurées en aluminium pour chacun des pH au temps = 0.

($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

pH	[Al] _{total} nominal	Al _{Total}	Al _{Dissous}	Al _{CV}	Al _{>0.4μm}	Al _{polymère}
4.8	0	0	0	0	0	0
	400	419	359	336	60	23
	600	632	578	281	54	297
	700	780	685	285	95	400
	900	973	961	356	12	605
5.2	0	0	0	0	0	0
	100	70	60	100	10	0
	200	152	139	79	13	60
	300	373	400	79	0	321
5.5	0	0	0	0	0	0
	35	29	24	37	5	0
	200	178	149	32	29	117
	400	380	251	42	129	209
6.0	0	0	0	0	0	0
	8	8	8	8	10	0
	200	176	127	10	49	117
	400	354	302	10	52	292

Les concentrations en Al et le pH sont restés constantes au cours des expériences. Très peu d'Al précipité n'a été estimé ($Al_{total} - Al_{dissous}$) dans les solutions initiales sauf au pH 5.5. Par ailleurs, la concentration en Al-polymère est déterminée par différence ($Al_{dissous} - Al_{cv}$); ces deux concentrations étant elles-mêmes entâchées d'une certaine imprécision, la valeur estimée pour $[Al_{polymère}]$ n'est connue qu'approximativement. De plus, vu le pouvoir extrêmement élevé des polymères à s'adsorber sur les filtres lors des filtrations (Thomassin, 1985), la mesure de l'Al dissous peut être sous-estimée et indirectement celle de l'Al polymère aussi, alors que la mesure de l'Al particulaire ($>0.4\mu m$) aurait été sur-estimée. Une expérience parallèle a démontré une perte continue en Al dissous lors de filtrations successives (résultats non présentés). Pour tenter de contourner cette difficulté, on a procédé à une centrifugation (7000 tours $\cdot m^{-1}$ · 20 minutes) pour séparer l'aluminium précipité de l'aluminium soluble, mais cette modification n'a pas amélioré l'estimation de l'aluminium polymère. On explique ce fait, en partie, par l'adsorption de telles formes sur n'importe quelle surface y compris les embouts de pipette.

Croissance

Les courbes de croissance de Chlorella pyrenoidosa pour chacun des tests sont présentées à la figure 5.10. Dans tous les cas, la croissance est diminuée significativement par rapport aux témoins (1 contrôle où $Al=0$: témoin sur la figure 5.10 et 1 milieu contenant la concentration maximale d'aluminium monomère : Al_{cv} sur

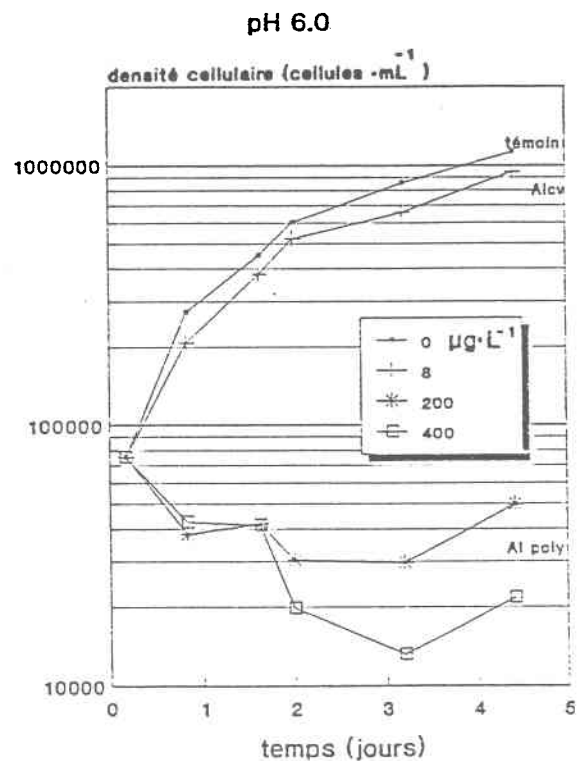
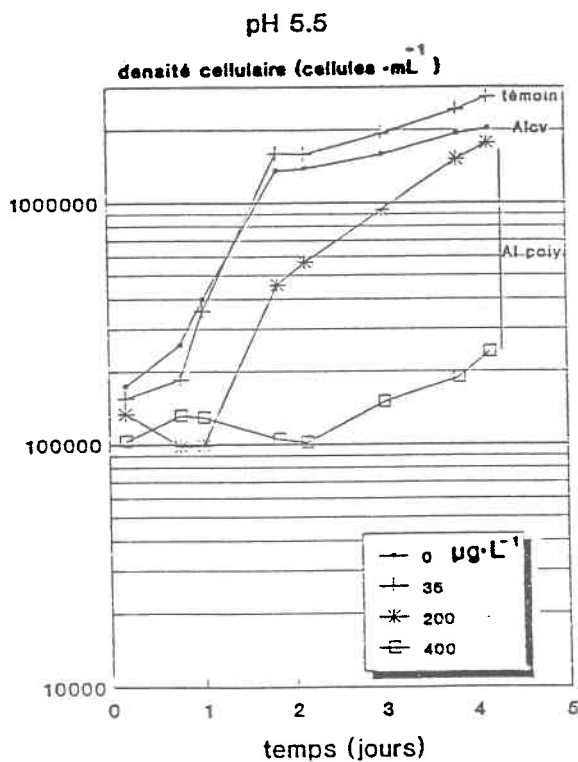
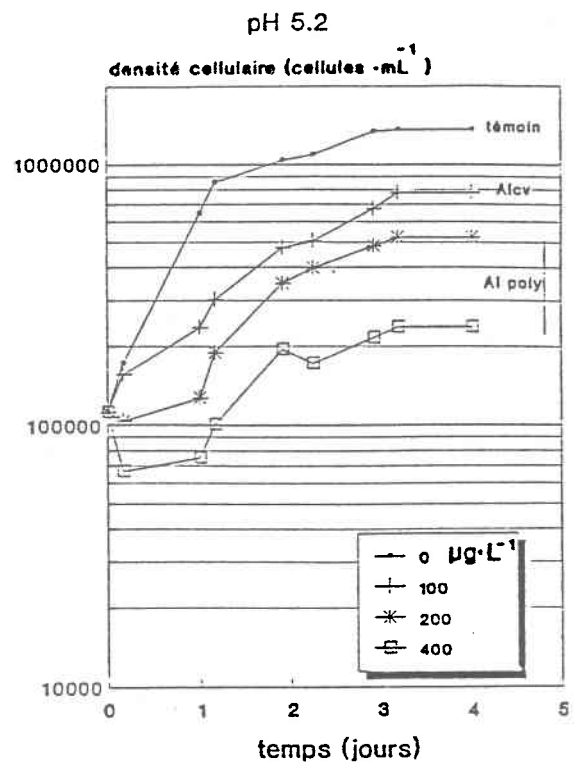
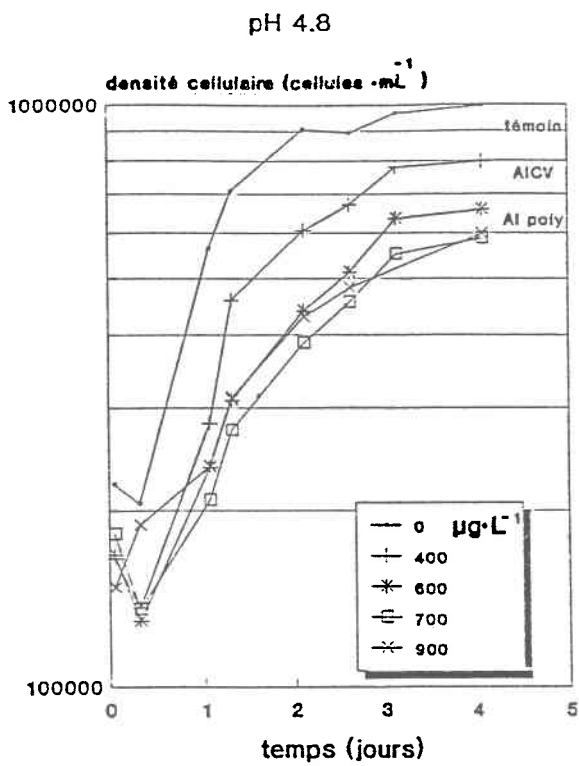


Figure 5.10: Courbes de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* à différentes concentrations en aluminium inorganique monomère et polymère et à différents pH.

la figure 5.10). La présence d'aluminium polymère ajoute à la toxicité de l'aluminium monomère et son action est proportionnelle à sa concentration; plus la concentration en Al polymère est élevée, plus son effet se fait sentir (figure 5.11). Sur cette figure, on observe effectivement un effet additif de l'Al polymère sur la toxicité de l'Al monomère. Les points à 100% correspondent à la croissance d'un témoin où la concentration en Al monomère du milieu était maximale. A pH 6, la droite reliant les deux premiers points est indiquée en pointillé à cause du manque de points intermédiaires.

5.3.3 Discussion

Dans cette partie de ce chapitre, on a démontré la phytotoxicité de l'Al polymère, une observation presque sans précédent dans la littérature sur la toxicité de l'Al en milieu d'eau douce. Les chercheurs australiens Helliwell et al. (1983), par exemple, ont exclu les formes polynucléaires d'aluminium dans leur modèle de toxicité due à l'Al pour Chlorella pyrenoidosa. Pour leur part, Leivestad et al. (1987) ont observé pour le saumon atlantique que le stress induit par l'aluminium (mortalité, régulation ionique perturbée) était corrélé avec l'aluminium monomère alors que les formes précipitées de $Al(OH)_3$ provoquaient une toxicité très faible. Blamey et al. (1983) ont suggéré qu'une ou plusieurs espèces d'aluminium monomère étaient responsables de

% de l'aire sous la courbe du témoin (Al_{cv-cvr}^{max})

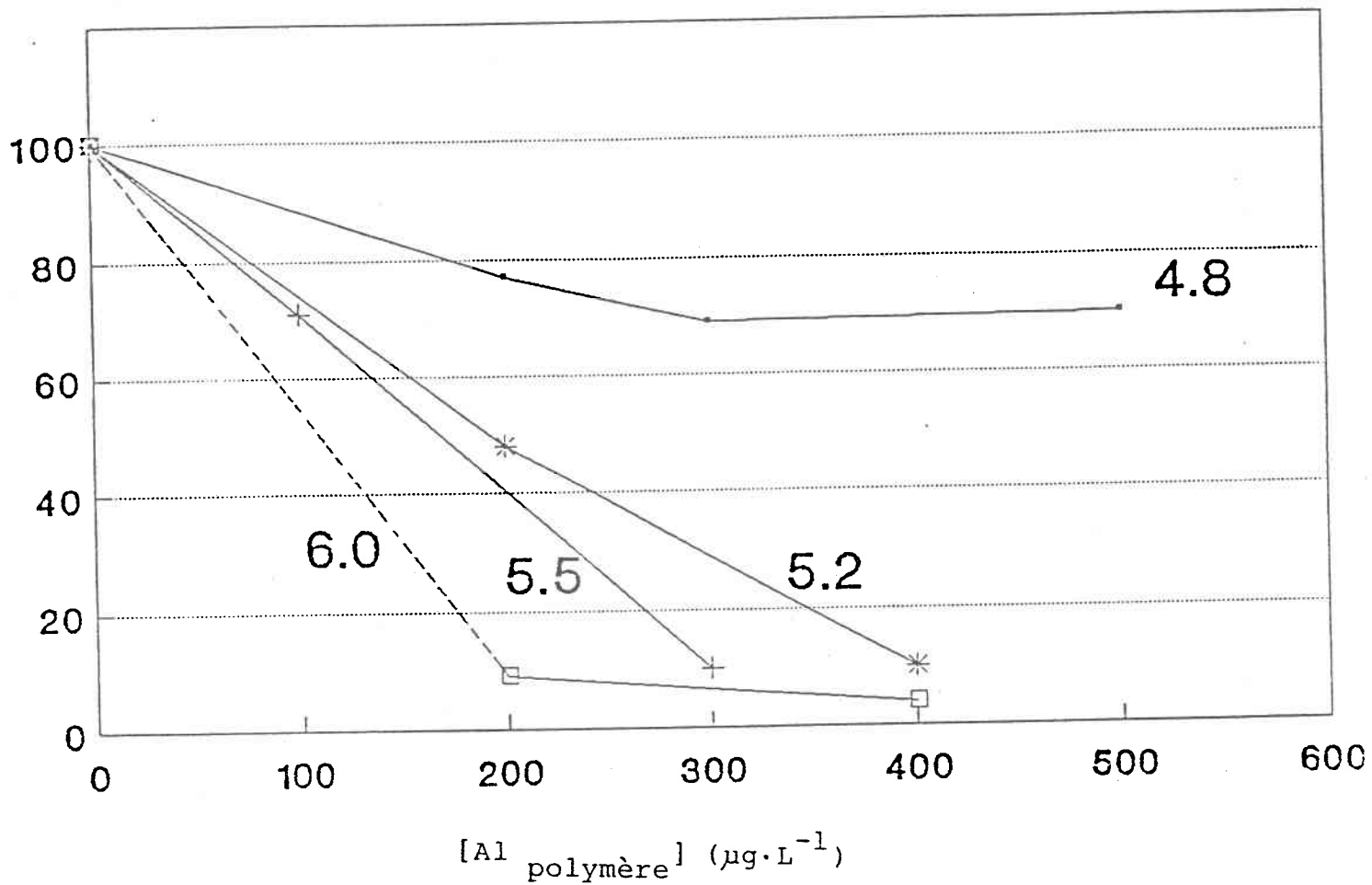


Figure 5.11: Pourcentage de l'aire sous la courbe du témoin en fonction de l'aluminium polymère nominale.

sa toxicité sur la croissance des racines de fève de soya, alors que l'ajout de OH ou de P diminuait la toxicité en diminuant la [Al] monomère en solution, en provoquant la polymérisation ou la précipitation.

Helliwell et al. (1983) ainsi que Pettersson et al. (1985a) ont observé une plus forte toxicité de l'Al près du pH 6 pour deux espèces d'algues (Chlorella pyrenoidosa et Anabaena cylindrica). Ces auteurs ont conclu qu'une telle toxicité était expliquée par la présence d'hydroxo-complexes d'aluminium, mais ils n'ont pas envisagé que la formation d'espèces polymères à ce pH puisse y jouer un rôle.

Parallèlement à ces observations sur la non-toxicité de l'Al polymère, les mesures d'aluminium en milieu naturel n'ont jamais pu confirmer la présence d'espèces polynucléaires. Par exemple, même si on observe parfois une différence appréciable entre l'aluminium dissous et l'aluminium monomère (ex.: Campbell et al., (1989) dans les eaux des rivières de la Côte Nord du Québec), il se peut qu'il s'agisse en fait d'aluminium monomère lié à de la matière organique, lequel complexe serait réfractaire au catéchol violet. Par contre, on peut facilement imaginer la formation transitoire d'espèces d'aluminium polymère lors du mélange des eaux d'un ruisseau acidifié au printemps ayant une charge élevée en aluminium et des eaux d'un lac au pH plus élevé.

Lors de la présente expérience, les concentrations en Al monomère inorganique contribuaient relativement peu à la toxicité (< 50%) même si l'inhibition de croissance de Chlorella pyrenoidosa était bien corrélée avec l'Al monomère inorganique (figure 5.5). Par contre, la présence d'Al polymère ajoutait de beaucoup à la toxicité de l'Al monomère inorganique. On peut graphiquement (figures 5.6 et 5.5) vérifier pour une même concentration, laquelle des formes mono ou polymère est plus toxique. Par exemple, selon nos résultats, à pH 5.2, une concentration de $75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'Al monomère inorganique provoque 50% d'inhibition alors qu'une concentration de $175 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'Al polymère provoque aussi 50 % d'inhibition.

Mentionnons aussi, que dans les essais avec l'Al polymère, même si le % de croissance par rapport au témoin est évalué en fonction d'un témoin contenant l'Al monomère inorganique maximal pour chacun des pH testés, les cellules sont déjà affectées d'une façon ou d'une autre et que la toxicité mesurée est additive. Pour évaluer statistiquement laquelle des 2 formes était la plus toxique, il aurait fallu que les essais avec l'Al polymère contiennent uniquement l'Al polymère sans Al monomère inorganique. C'est peut-être aussi la raison pour laquelle les relations du pourcentage de l'aire sous la courbe du témoin en fonction de l'Al polymère nominal semblent saturer aux plus fortes concentrations.

Alors que $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($3.7 \mu\text{M}$) d'Al polymère diminue la croissance d'environ 75 % de Chlorella pyrenoidosa, des concentrations de 3 à 4 μM en Al polymère étaient requises pour inhiber la croissance des racines de blé dans les expériences de Parker et al. (1988a). Selon ces derniers auteurs, toutes les plantes testées étaient considérablement plus tolérantes à Al^{+3} qu'à l'Al polymère, ce qui suggère des différences physiologiques fondamentales de la toxicité de ces deux types d'Al (Nous essaierons d'éclaircir ce dernier point au cours du prochain chapitre). Cette conclusion fut supportée par l'observation de tolérance différente de deux types de blé pour Al^{+3} , mais non pour Al_{13} .

La toxicité de l' Al_{13} a été récemment démontrée lors de bioessais avec les racines de blé en solution (Parker et al., 1988a). Ces observations corroborent celles de Wagatsuma et Ezoé (1985) et de Wagatsuma et Kaneko (1987), mais par contre elles contrastent nettement avec d'autres études qui lient la toxicité de l'Al uniquement aux espèces monomères (Blamey et al., 1983; Helliwell et al., 1983; Alva et al., 1986a, b).

Contrairement à la discussion 5.2, où nous avons rejeté l'idée d'une "espèce toxique" dans le cas de l'Al monomère, dans le cas de l' Al_{13} on peut parler d'espèce toxique puisque les transformations Al monomère \leftrightarrow Al_{13} ne sont pas rapides. Par ailleurs, accorder à Al_{13} un rôle spécifique implique un site d'action extracellulaire,

un polymère de la dimension de l'espèce Al_{13} ne pouvant vraisemblablement pas traverser la membrane cellulaire. Si le mécanisme de toxicité se fait au niveau intracellulaire, on ne peut penser à des différences de toxicité impliquant des formes mono et/ou polymères. Par contre si la toxicité se joue au niveau de la membrane cellulaire, il se peut qu'il y ait des différences entre les deux types d'espèces. En effet, un polymère (tel que Al_{13}) pourrait agir comme un énorme cation se fixant sur les sites de liaison et provoquant des déséquilibres chimiques, électriques ou bien physiques plus élevés que ne pourrait le faire un simple "petit cation monomère".

Parker et al. (1988b) ont tenté de déterminer la taille, la charge et la structure des espèces polynucléaires. Ces auteurs préparaient Al_{13} de la même façon que dans cette expérience, et ont rapporté que l'Al polymère formé était composé premièrement d'un polymère seul ou d'une suite de polymères de même taille également réactifs aux ferron. Ils ont suggéré que l'Al polymère était petit et possédait une charge positive substantielle. Selon Parthasarathy et Buffle (1985), la forme $Al_{13}O_4(OH)_{24}^{7+}$ (Al_{13}) semble petite, stable et très peu dissociable.

En comparant les essais menés à différents pH, on note que la tendance observée pour une toxicité plus élevée à pH élevé avec les espèces monomères se continue avec les espèces polymères. Il y a lieu de suggérer encore une fois des effets antagonistes des ions

hydrogène sur les interactions aluminium-surface cellulaire. Signalons qu'il ne semble pas y avoir eu de dépolymérisation de Al_{13} selon les mesures de la spéciation des solutions. Rappelons que malgré la variabilité temporelle dans les mesures de l'Al polymère, il n'existe pas de tendance temporelle de diminution et que ces mesures montrent qu'après 96 heures les milieux contenaient toujours de l'Al polymère.

Evolution de l'Al polymère

[Al _{total}] nominal	Temps (heures)			
	0	4	48	96
pH 4.8				
400	23	18	0	0
600	297	334	361	175
700	400	416	393	361
900	605	446	693	609
pH 5.2				
0	0	0	0	0
100	0	19	40	22
200	60	24	114	130
400	321	371	321	318
pH 6.0				
0	0	0	0	0
10	0	33	0	0
200	117	122	151	158
400	292	277	253	314

Les résultats actuels, et surtout l'interprétation qu'on leur donne, contrastent nettement avec l'étude de Helliwell et al. (1983) (figure 5.9). Ces derniers auteurs ne considèrent pas la présence de l' Al_{13} . Puisque ces auteurs utilisaient une solution mère contenant $420 \mu g \cdot L^{-1}$ d'aluminium, ils travaillaient probablement en présence de l'aluminium polynucléaire, lequel, selon nos résultats, s'avère très toxique. Il s'ensuit que la

toxicité aiguë qu'ils ont observée autour du pH 5.5-6.0 était probablement due à la forme polymère et non aux "hydroxo-complexes mononucléaires".

La toxicité de l'aluminium pourrait se manifester à différents niveaux selon la présence de différentes formes. Ceci pourrait expliquer la grande variabilité des résultats provenant d'expériences visant à identifier "la forme responsable" de la toxicité. Par exemple, selon l'organisme indicateur utilisé et ses besoins en éléments nutritifs, les formes monomères en Al peuvent compétitionner au niveau membranaire avec d'autres éléments nutritifs tels le Ca et le Mg et induire ainsi des symptômes de toxicité. A un autre niveau, les espèces polymères pourraient induire des changements physiques de la membrane empêchant son bon fonctionnement.

Il semble important de vérifier si la toxicité de l'Al polymère est significative en milieu naturel. Dans les milieux acides qui ont subi un chaulage, on a souvent observé une diminution de la croissance du phytoplancton associée à une déficience en micronutriments (Pearson, 1975; Farina et al., 1980). Cependant, on peut invoquer la possibilité de formation de Al polymère qui engendrait une toxicité insoupçonnée.

5.4 Toxicité de l'aluminium organique

L'aluminium peut former de forts complexes avec la matière organique dissoute, comme les acides fulviques et humiques, pour produire de l'aluminium monomère organique. Plusieurs auteurs ont mis en évidence des corrélations évidentes entre le carbone organique et la concentration en Al organique dans les eaux de surface tant en Nouvelle Angleterre (Driscoll, 1984); en Ontario (LaZerte, 1984); qu'au Québec (Campbell et al., 1984).

La quantité d'Al complexé varie avec le type d'acides organiques présent (Neville et al., 1988) et augmente à pH plus élevé. Au moins $0.025 \text{ mg Al} \cdot \text{mg C}^{-1}$ ($0.9 \text{ } \mu\text{mol Al} \cdot \text{mg C}^{-1}$) peut être complexé à pH 4.5 (Neville, 1985), et en absence d'autres métaux, autant que $0.270 \text{ mg Al} \cdot \text{mg C}^{-1}$ ($10 \text{ } \mu\text{mol Al} \cdot \text{mg C}^{-1}$) peut être complexé à pH 5.5-6.5 (Oliver et al., 1983).

En présence de fortes concentrations en carbone organique dissous, la concentration en Al monomère inorganique diminue puisque l'Al se lie à la matière organique. Ce processus permet des augmentations considérables en Al dissous sans, pour autant, donner lieu à des concentrations élevées en Al monomère inorganique. D'ailleurs, il constitue le facteur le plus significatif pour expliquer le manque de concordance dans les résultats portant sur la toxicité de l'aluminium, puisque les complexes d'aluminium organiques monomères sont assez stables et ne

relâchent pas facilement l'aluminium lié. Alors, lorsque les concentrations en carbone organique dissous sont élevées, l'utilisation des concentrations totales en Al confond plus souvent qu'autrement l'interprétation des données de toxicité de l'Al.

Des expériences récentes avec Allium cepa en solution de culture, en présence de substances humiques, ont révélé que les espèces d'aluminium monomère inorganique labile constituaient la "fraction toxique" (Berggren et Fiskesjö, 1987). Ceci supporte l'idée qu'en absence d'espèces polymères, seul Al monomère inorganique est toxique pour la croissance des racines (Blamey et al., 1983; Ulrich, 1983; Alva et al., 1986a, b). Les acides humiques semblent aussi prévenir la toxicité de l'Al pour la luzerne (Medicago sativa) dans des milieux de culture (Brogan, 1967). Hornstrom et al. (1984) ont aussi observé que la présence d'humus diminuait les effets de l'Al sur le phytoplancton par sa capacité à réduire le taux de précipitation du phosphore dans le milieu de culture.

Hue et al. (1986) ont démontré que l'activité de l'Al⁺³, ou la phytotoxicité de l'Al, était aussi affectée par la présence d'acides organiques de faible poids moléculaire. Dans un milieu expérimental avec du coton (Gossypium hirsutum), les acides organiques se sont groupés en trois catégories selon leur capacité à détoxifier Al (1) fort (citrique, oxalique, tartarique) (2) intermédiaire (malique, malonique, salicylique), et (3) faible

(succinique, lactique, formique, acétique, phthalique) (Hue et al., 1986). De plus la présence de citrate dans le milieu a semblé prévenir la toxicité de l'Al sur le maïs (Bartlett et Riego, 1972), le riz et le blé (Kinraide et al., 1985). Par ailleurs, certains agents chélateurs synthétiques (EDDHA, EDTA) semblent détoxifier l'Al (Clarkson, 1966; Rost-Siebert, 1984).

Pour ce qui est des formes organiques de l'aluminium, tous les chercheurs sont généralement d'accord pour relier une diminution de la toxicité de l'aluminium à la présence de ligands organiques. Par contre aucun n'a pu évaluer l'effet réel de l'aluminium organique, c'est-à-dire, n'a pu discriminer entre les effets imputables à la complexation de l'aluminium avec la matière organique (baisse de la disponibilité de l'aluminium inorganique) et ceux dus à l'Al organique même (avec [Al] inorganique constante).

Les objectifs de cette partie de la recherche sont d'identifier le rôle joué par l'Al-organique sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa et de vérifier ainsi, si le modèle d'ion libre s'applique en présence d'un réservoir de MOD, soit en présence d'Al-organique. L'approche expérimentale consiste à maintenir le pH et la concentration en Al^{3+} constants et d'augmenter la concentration en Al-organique. Pour ce faire, les concentrations en matière organique et en Al total devrait être augmentées parallèlement afin de maintenir Al^{3+} constant.

5.4.1 Matériel et méthodes

Pour améliorer davantage le modèle toxicologique de l'aluminium, on a voulu connaître l'effet réel de l'aluminium organique sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa. Pour ce faire, 4 séries de milieux d'exposition différents mais de même pH (5.0, MES 10^{-2} M), sont utilisés en triple, dans des bouteilles de Teflon^R transparentes de 1 L:

- 1- témoin (AAP-P-M);
- 2- témoin d'acide fulvique (AAP-P-M, + 20 mg·L⁻¹ acide fulvique filtré);
- 3- 150 µg·L⁻¹ d'Al monomère inorganique (AAP-P-M + 150 µg·L⁻¹ Al_T = 150 µg·L⁻¹ Al_{CV-CVR});
- 4- 150 µg·L⁻¹ d'Al monomère inorganique + 350 µg·L⁻¹ d'Al monomère organique (AAP-P-M + 20 mg·L⁻¹ acide fulvique filtré + 500 µg·L⁻¹ Al_T; 150 µg·L⁻¹ Al_{CV-CVR} + 350 µg·L⁻¹ Al_{CVR}).

L'acide fulvique a été obtenu de l'Université Concordia, du département de Chimie, et correspond à l'acide fulvique isolé et étudié grandement par Schnitzer et Khan, 1978. Le pH, la concentration en acide fulvique ainsi que la concentration en Al monomère inorganique ont été choisis parce-qu'ils représentent des valeurs retrouvées en milieu naturel au Québec (Dupont, 1988). Ainsi, une concentration de 20 mg·L⁻¹ d'acide fulvique équivaut à environ 9 mg·L⁻¹ de carbone organique. De plus, la toxicité de l'Al ([Al]=150 µg·L⁻¹) à pH 5.0 a été déterminée plusieurs fois et elle est assez bien connue dans ces conditions. Les milieux sont agités

pendant au moins 24 heures pour leur permettre de s'équilibrer; leurs concentrations en Al total, Al dissous, Al monomère total et Al monomère organique sont ensuite déterminées.

Ce même type d'expérience a été repris à pH 5 et à une concentration en Al monomère inorganique constante, soit $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mais où la concentration en Al-organique variait pour vérifier s'il y avait un effet de gamme de l'aluminium organique sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa.

Le désign expérimental apparaît ci-dessous:

- A- témoin (AAP-P-M);
- B- $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'Al monomère inorganique (AAP-P-M + $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Al_T ; $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}_{\text{CV-CVR}}$);
- C- témoin d'acide fulvique ($20 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$);
- D- $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'Al monomère inorganique + $350 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'Al monomère organique (AAP-P-M + $20 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ acide fulvique filtré + $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Al_T ; $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}_{\text{CV-CVR}}$ + $350 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Al_{CVR}); milieu équivalent au milieu #4 ci-dessus;
- E- témoin d'acide fulvique ($2.25 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$);

F- 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'Al monomère inorganique + 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'Al monomère organique (AAP-P-M + 2.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ acide fulvique filtré + 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Al_T ; 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ + 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Al_{cvr});

G- 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'Al monomère inorganique + 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'Al monomère organique (AAP-P-M + 5.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ acide fulvique filtré + 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Al_T ; 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ + 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Al_{cvr});

H- 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'Al monomère inorganique + 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'Al monomère organique (AAP-P-M + 11.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ acide fulvique filtré + 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Al_T ; 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ + 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Al_{cvr}).

Une fois les conditions expérimentales établies, une portion de la suspension d'algues concentrée est ajoutée dans chacune des bouteilles contenant les milieux expérimentaux. Les algues sont comptées deux fois par jour jusqu'à l'atteinte de la phase plateau.

5.4.2 Résultats

Concentration en Al dans le milieu

Des expériences préliminaires ont été réalisées afin de vérifier quelle était la concentration en aluminium monomère nécessaire à combiner avec $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ d'acide fulvique pour obtenir $150 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ d'aluminium monomère inorganique. Les essais préliminaires ont montré à deux reprises que dans le milieu AAP-P-M contenant $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ d'acide fulvique filtré, on devait ajouter $500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ d'Al total pour retrouver $150 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ d'Al monomère inorganique (tableau 5.6), soit une fixation de $17.5 \text{ } \mu\text{g Al} \cdot \text{mg C}^{-1}$. Oliver et al. (1983) avaient observé une capacité de complexation de $25 \text{ } \mu\text{g Al} \cdot \text{mg C}^{-1}$ à pH plus élevé: 5.5-6.5. Même si lors de la première expérience on obtient des valeurs d' $\text{Al}_{\text{CV-CVR}}$ de l'ordre de 150-200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, c'est-à-dire légèrement supérieures aux valeurs visées, l'important est d'obtenir les mêmes valeurs de $\text{Al}_{\text{CV-CVR}}$ dans les deux milieux (3 et 4). Les valeurs de pH n'ont pas montré de variations durant l'expérimentation.

Les concentrations en Al mesurées au cours des expériences sont présentées aux tableaux 5.7 et 5.8. L'évaluation de l' Al_{CVR} par colorimétrie s'avère assez difficile en présence de fortes concentrations en MOD. C'est pour cette raison que certaines

Tableau 5.6: Essais préliminaires - évolution de l'Al en solution ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en présence ou pas d'acide fulvique ($20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Ac. fulv.: acide fulvique; Al_T : Al total; Al_D : Al dissous; Al_{CV} : Al monomère total; Al_{CVR} : Al monomère organique; Al_I : Al monomère inorganique.

Ac. fulv. $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Al_T nominal ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Al_T	Al_D	Al_{CV}	Al_{CVR}	Al_I
			mesuré ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)			
20	0	11	15	86	25	61
0	<u>150</u>	157	151	221	1	<u>220</u>
20	150	188	188	180	118	62
20	300	325	376	312	191	121
20	400	400	411	366	199	167
20	<u>500</u>	480	501	482	280	<u>202</u>

données sont quelque peu aberrantes, surtout lors du premier essai (tableau 5.7). Il semble y avoir interférence dans la lecture de l' Al_{CV} due à la couleur même de la matière organique. Par exemple, on obtient des valeurs apparentes de l'ordre de $90\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'aluminium monomère total dans le milieu contenant de l'acide fulvique mais dans lequel on n'a pas ajouté d'aluminium (milieu 2). Chose certaine, la concentration en Al total initiale correspondait assez bien à la concentration nominale pour les milieux 3 et 4 ($143\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et $512\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Al total).

Tableau 5.7: Concentration en aluminium dans les différents milieux d'exposition à pH 5.0 (expérience no 1).
 Al_T : Al total; Al_D : Al dissous; Al_{CV} : Al monomère;
 Al_{CVR} : Al monomère organique; $Al_{CV} - Al_{CVR}$: Al monomère inorganique.

milieux	Al_T	Al_D	Al_{CV}	Al_{CVR}	$Al_{CV} - Al_{CVR}$
temps=0					
1	0	0	6	0	0
2	14	14	(89)	72	17
3	143	144	150	1	149
4	512	480	510	382	128
temps=4 heures					
1	4	0	20	2	18
2	20	18	(38)	32	6
3	102	102	180	30	150
4	531	436	540	360	180
temps=2 jours					
3	138	175	154	2	152
4	476	411	416	251	165
temps=4 jours					
3	228	146	184	2	182
4	476	456	381	278	103

Pour la deuxième série d'expériences, le tableau 5.8 présente les valeurs en aluminium monomère organique et inorganique nominales et mesurées au temps=0; la concordance entre les valeurs nominales et mesurées s'avère très satisfaisante.

Tableau 5.8: Concentrations initiales ($\mu\text{g Al}\cdot\text{L}^{-1}$) en aluminium monomère inorganique ($\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$) et organique (Al_{cvr}) pour la deuxième série expérimentale. (N: nominal; M: mesuré).

milieux	$[\text{Al}_{\text{cv}}]$		$[\text{Al}_{\text{cvr}}]$		$[\text{Al}_{\text{cv-cvr}}]$	
	N	M	N	M	N	M
A	0	0	0	0	0	0
B	150	167	0	0	150	167
C	0	0	0	0	0	0
D	500	481	350	316	150	165
E	0	0	0	0	0	0
F	200	188	50	26	150	162
G	250	251	100	99	150	152
H	300	312	150	151	150	161

Toxicité de l'aluminium

Si le modèle d'ion libre s'appliquait en présence de la MOD, et pour une même concentration en Al-monomère inorganique $[Al_{cv-cvr}]$, on s'attendrait à obtenir le même effet en présence ou en absence d'Al-organique $[Al_{cvr}]$.

Les courbes de croissance de Chlorella pyrenoidosa en présence ou non de $150 \mu g \cdot L^{-1}$ de Al monomère inorganique, et avec ou sans acide fulvique, sont présentées à la figure 5.12. Selon l'allure générale des courbes de croissance, on peut observer que ce n'est qu'en présence d'aluminium seul que la croissance de l'algue est diminuée. En effet, en présence d'acide fulvique, l'aluminium ne semble pas avoir d'effets négatifs sur Chlorella pyrenoidosa, même s'il est toujours présent à une concentration de $150 \mu g \cdot L^{-1}$ (Al-monomère)! Ainsi le calcul de l'aire sous la courbe de croissance ne vient que corroborer ces observations puisqu'on a évalué le nombre de cellules pour une période d'incubation de 6.27 jours comme étant égal à (figure 5.13):

témoin:	2.14 ± 0.14	$(\cdot 10^8 \text{ cellules} \cdot j \cdot mL^{-1})$
ac.fulvique:	2.02 ± 0.07	
Al ($150 \mu g \cdot L^{-1}$):	1.61 ± 0.12	
Al + ac. fulvique:	2.16 ± 0.16	

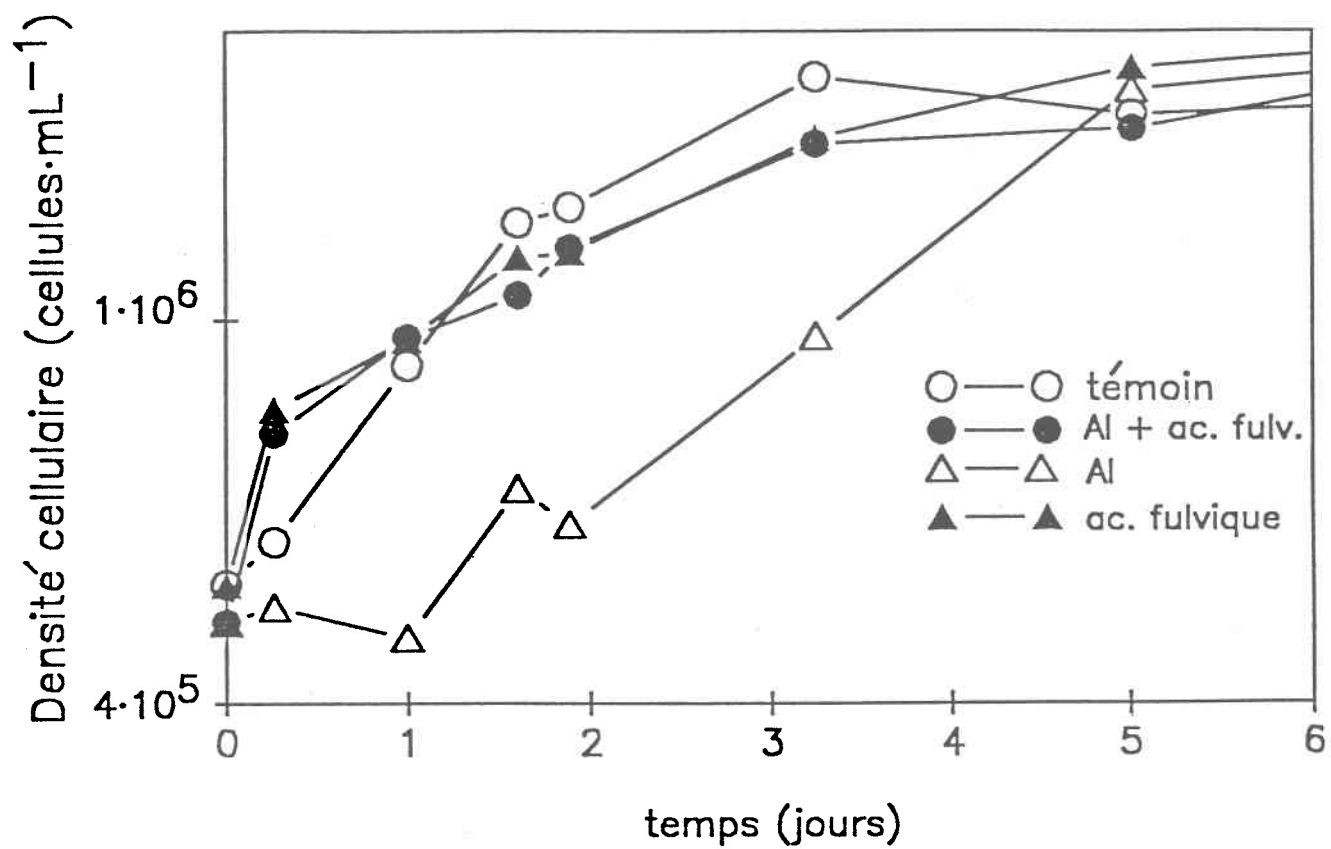


Figure 5.12: Courbes de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* à différentes concentrations en aluminium inorganique et organique monomère à pH 5.0.

Afin de vérifier s'il y avait un effet de gamme dû à Al_{cvt} , on a procédé à une deuxième série d'expériences tel que décrite plus haut. Les courbes de croissance pour les 8 milieux expérimentaux testés apparaissent à la figure 5.13. L'aire sous la courbe de croissance est représentée à la figure 5.14.

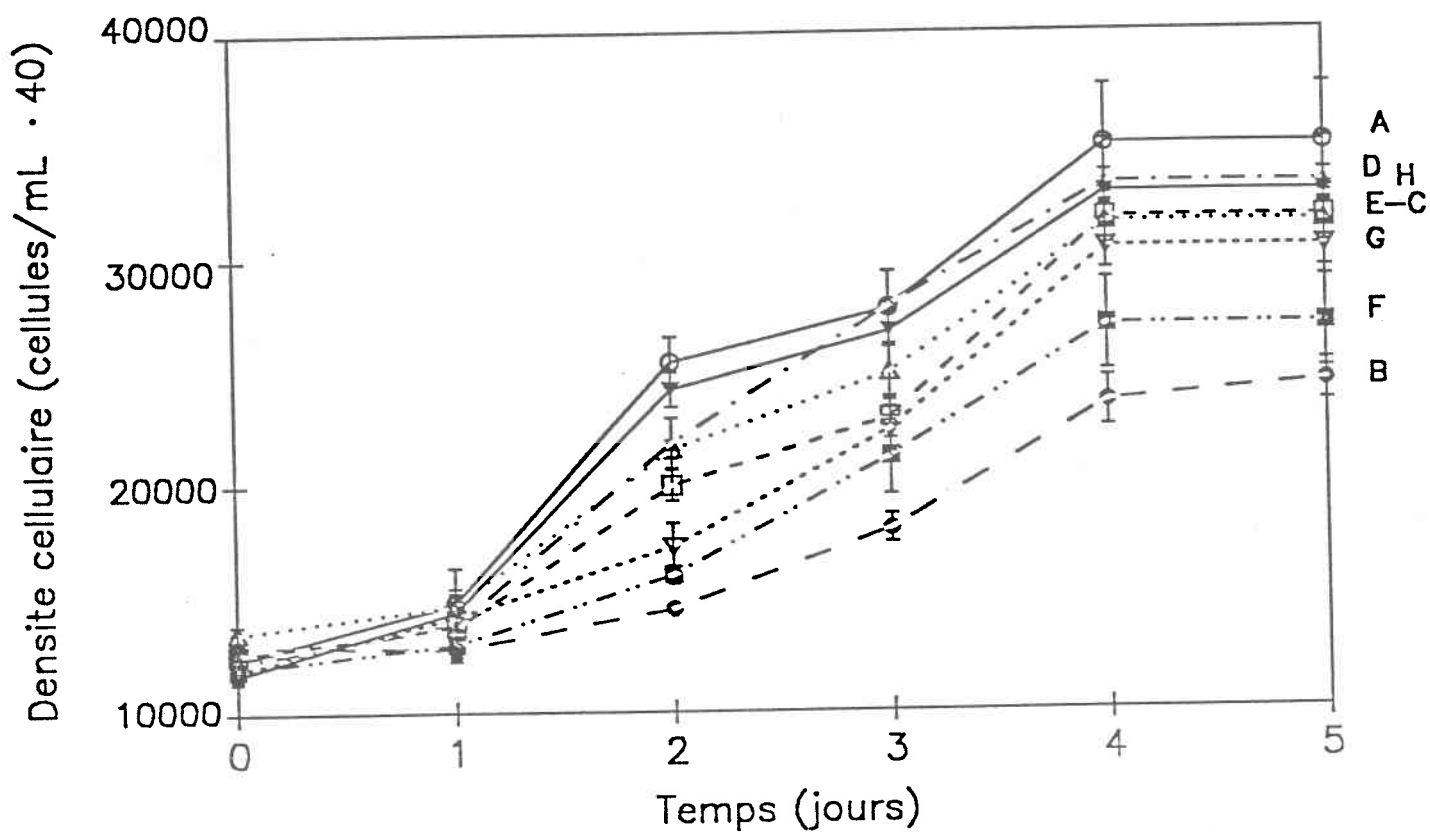


Figure 5.13: Courbes de croissance de Chlorella pyrenoidosa à différentes concentrations en aluminium inorganique et organique monomère à pH 5.0. La composition des milieux A à G est décrite dans la section 5.4.1.

AIRE SOUS LA COURBE (CELLULES·mL⁻¹·j)

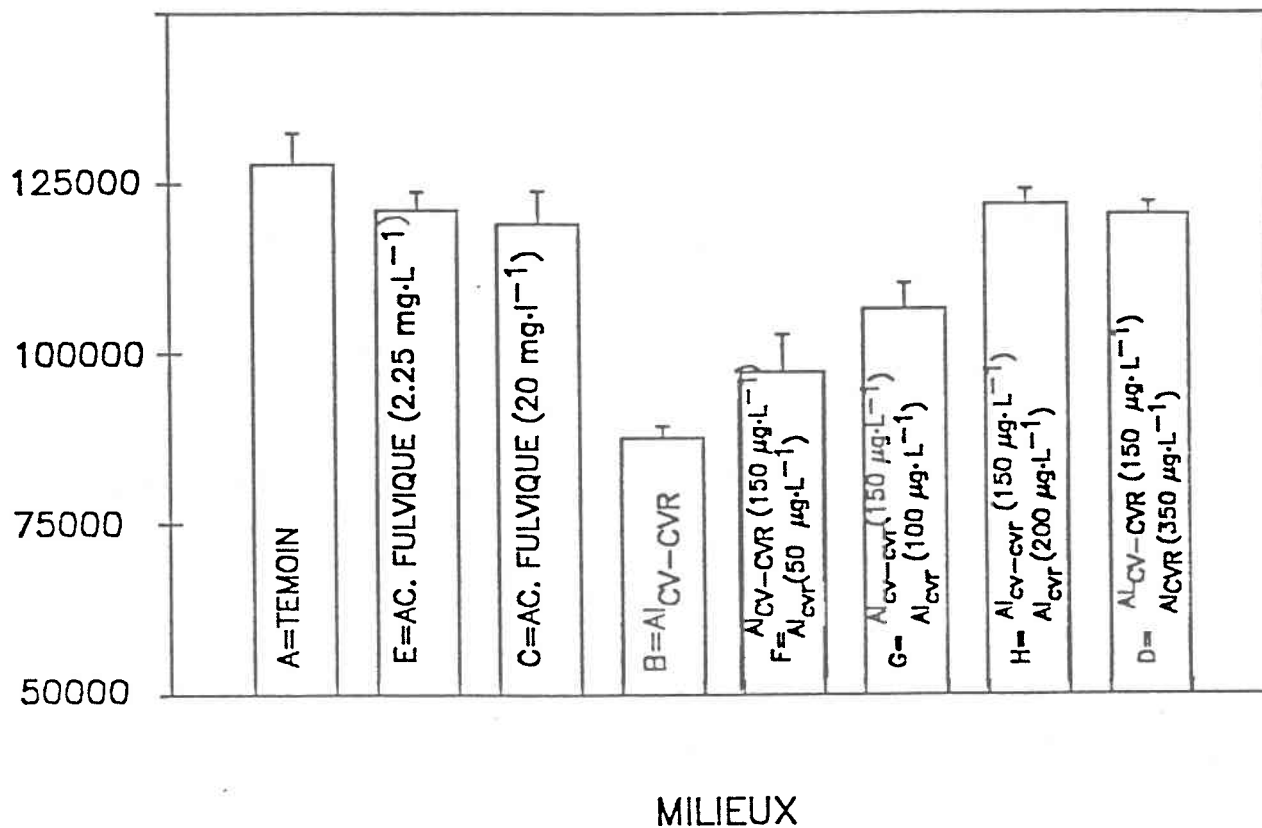


Figure 5.14: Moyenne (et écart type; n=3) de l'aire sous la courbe de croissance de *Chlorella pyrenoidosa* pour différents traitements. La composition des milieux A à G est décrite dans la section 5.4.1.

5.4.3 Discussion

Les résultats obtenus dans cette série d'expériences sont inattendus: les concentrations en Al_{cv-cvr} dans les milieux d'exposition contenant Al étaient constantes mais la toxicité de l'aluminium diminuait au fur et à mesure que le réservoir d'Al-organique augmentait. Selon le modèle d'ion libre, on se serait attendu à observer une toxicité égale en présence d'aluminium lié à de la matière organique, et non pas à une annulation de l'effet provoqué par l'aluminium inorganique monomère. En d'autres termes, on observe une amélioration de la toxicité en présence d'acide fulvique et d'aluminium organique, même si $[Al^{+3}]$ demeurerait constante. On observe un effet de protection de l'acide fulvique face à l'aluminium monomère inorganique (figure 5.15).

Signalons que Helliwell et al. (1983), ont également rapporté une amélioration de la toxicité de l'Al due à l'acide fulvique lorsque, dans un milieu d'exposition contenant initialement 30 μg Al·L⁻¹, ils ont ajouté 10 mg·L⁻¹ d'acide fulvique; le taux de croissance de Chlorella pyrenoidosa est passé de 48% à 85% par rapport au témoin, même si les [Al] labile mesurées étaient sensiblement les mêmes (17 vs 20.5 μg ·L⁻¹) dans les deux milieux (tableau 1.3). Ces auteurs n'ont cependant pas commenté leurs résultats.

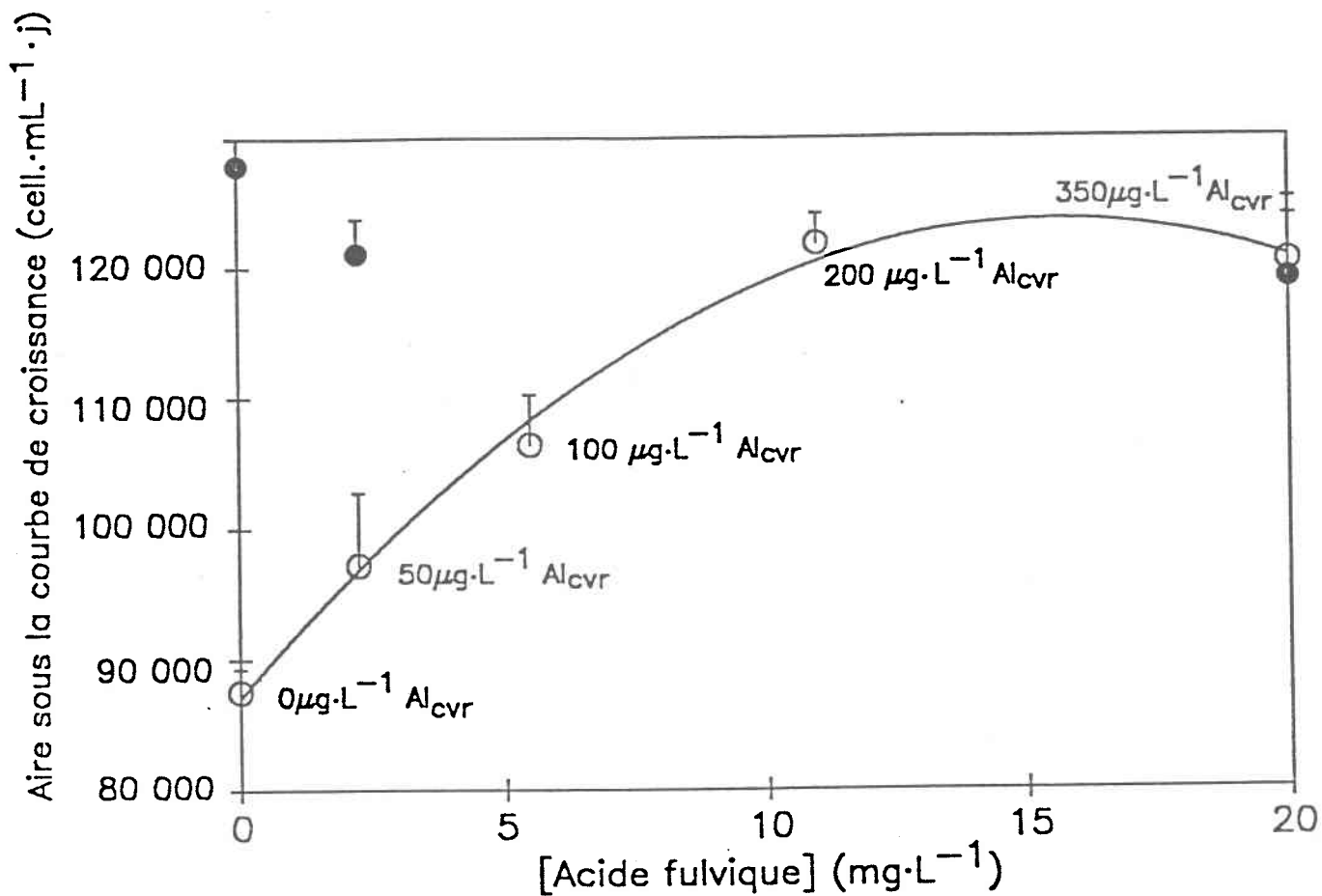


Figure 5.15: Aire sous la courbe de croissance en fonction de la concentration en acide fulvique associé avec Al (○) et où $Al_{cv-cvr} = 150 \mu g \cdot L^{-1}$. Les points noirs (●) représente l'aire sous la courbe dans les milieux ne contenant pas d'aluminium.

On doit alors imputer un effet bénéfique non pas à l'aluminium organique comme tel, mais plutôt à l'acide fulvique non complexé avec l'aluminium, puisque lorsque la concentration en Al organique était augmentée, la concentration en acide fulvique libre l'était aussi. Ainsi, l'acide fulvique inhibait la toxicité de l' Al_{cv-cvr} proportionnellement à sa concentration jusqu'à saturation, soit à environ $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ d'acide fulvique (figure 5.15). Il semble donc que la concentration en acide fulvique libre exerce un effet bénéfique direct sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa, par exemple en agissant au niveau membranaire et en atténuant les effets de l'aluminium inorganique.

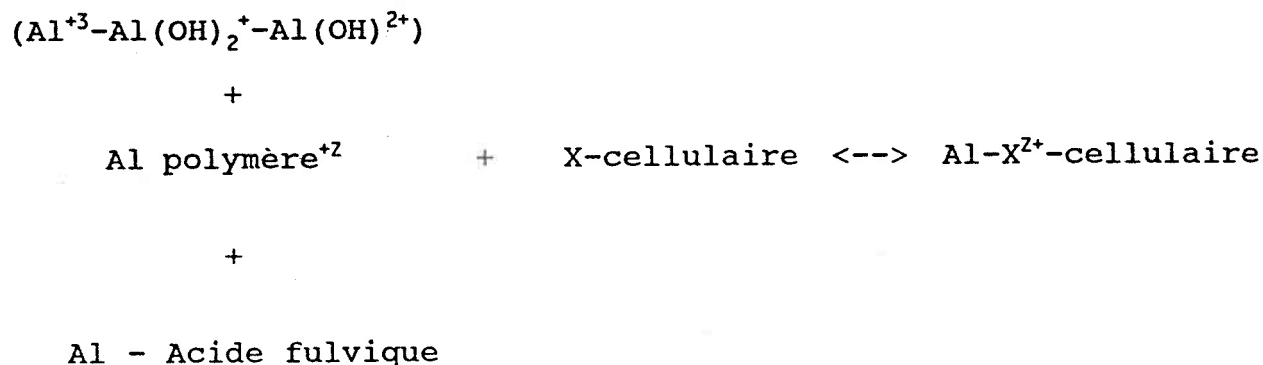
Pour qu'il y ait annulation de l'effet de l'Al, on peut suggérer que l'acide fulvique contenait quelques cations non délétères pour notre algue mais compétitifs avec l'aluminium, ou bien que l'acide fulvique lui-même a un effet bénéfique pour l'algue. Rueter et al. (1987) avaient observé que la réponse toxique due à l'Al sur Scenedesmus était en fait due à des interactions chimiques indirectes qui résultaient en une activité en Cu plus élevée conséquemment au déplacement $\text{Cu-AH} + \text{Al} \text{ <---> } \text{Al-AH} + \text{Cu}$. On a dosé Ca, Mg et Cu dans les filtrats à $t=4$ heures, pour vérifier si les concentrations en Ca, Mg et Cu étaient les mêmes en présence et en absence d'acide fulvique; aucune différence n'a été observée. De plus Gensemer (1991) a observé dans ses expériences, que même si l'ajout d'Al augmentait l'activité des ions libres Al^{+3} , Fe^{+3} et Cu^{+2} , l'activité des ions libres Fe^{+3} et Cu^{+2} n'atteignait pas des niveaux toxiques.

Il est connu que l'acide fulvique diminue la toxicité de plusieurs métaux en les complexant et en diminuant ainsi leur biodisponibilité, mais l'effet même de l'acide fulvique sur l'interaction métal-organisme reste encore obscure et on tentera de l'expliquer dans le prochain chapitre.

Une façon de discriminer l'effet de la matière organique sur la membrane cellulaire de son effet sur la chimie de l'aluminium serait de procéder à une expérience où les algues seraient incubées dans un sac à dialyse maintenu ouvert par le haut dans un récipient contenant de l' $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ et de l' Al_{cvr} . De cette façon, seul l' $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ pourrait entrer en contact avec les cellules puisque Al_{cvr} serait trop gros pour passer à travers le sac. Ainsi, si l'inhibition de croissance était la même en présence ou non d' Al_{cvr} on pourrait avancer que la non toxicité observée auparavant était réellement due à des interactions acide organique-membrane. Par contre, si avec ces sacs à dialyse la toxicité est inhibée, ce serait dû à un processus chimique qui se jouerait au niveau des interactions acide organique et autres cations (compétition entre Al^{+3} et Cu^{+2} pour l'acide fulvique, par exemple).

5.5 Conclusion

En conclusion, la contribution de différentes formes d'aluminium doit être considérée pour améliorer le modèle des interactions métal-organisme. Nous pouvons considérer la participation des différentes formes d'aluminium suivantes au modèle de toxicité de métaux-organismes:



Premièrement, en absence d'aluminium polymère et en absence d'aluminium organique naturel, le modèle d'ion libre s'applique en autant qu'on prenne en considération la compétition entre H^+ et Al.

Deuxièmement, lorsque l'aluminium polymère est présent, cette dernière forme contribue de façon non négligeable à la toxicité de

l'aluminium. Le mécanisme de toxicité reste par contre à être élucidé. Il en sera question dans le prochain chapitre.

Troisièmement, en absence de formes polymères mais en présence d'acides organiques naturels, le modèle d'ion libre ne s'applique pas de façon adéquate. Il semble que l'acide fulvique annule les effets toxiques de l'Al monomère par une voie autre que la simple complexation. Ce phénomène aurait avantage à être élucidé en vérifiant à la fois les effets des acides fulviques sur la chimie de l'Al mais aussi les actions de l'acide fulvique même sur la physiologie des algues (l'intégrité membranaire, par exemple).

5.5 Références bibliographiques

- Alva, A.K., D.G. Edwards, C.J. Asher et F.P.C. Blamey, 1986a. Effect of phosphorus/aluminum molar ratio and calcium concentration on plant response to aluminum toxicity. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 50:133-137.
- Alva, A.K., D.G. Edwards, C.J. Asher et F.P.C. Blamey, 1986b. Relationships between root length of soybean and calculated activities of aluminium monomers in nutrient solution. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 50: 959-962.
- Baker, J.P. et C. Schofield, 1982. Aluminum toxicity to fish in acidic waters. *Wat. Air Soil Pollut.*, 18:289-309.
- Bartlett, R.L. et D.C. Riego, 1972. Effect of chelation on the toxicity of aluminum. *Plant and Soil*, 37:419-423.
- Berggren, D. et G. Fiskesjö, 1987. *Environ. Toxic. Chem.*, 6:771.
- Bertsch, P.M., 1987. Conditions for Al_{13} polymer formation in partially neutralized solutions. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 51:825-828.
- Blamey, F.P.C., D.G. Edwards et C.J. Asher, 1983. Effects of aluminum, OH:Al and P:Al molar ratios, and ionic strength on soybean root elongation in solution culture. *Soil Sci.*, 136:197-207.
- Brogan, J.C., 1967. International Congress of Soil Science 8. Bucharest 3:227 .
- Campbell, P.G.C., R. Bougie, A. Tessier et J.-P. Villeneuve, 1984. Aluminum speciation in surface waters on the Canadian Pre-Cambrian Shield. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 22:371-375.
- Campbell, P.G.C., B. Dubreuil et H.J. Hansen, 1989. Comportement géochimique de l'aluminium dans quelques rivières à saumon de la Côte-Nord (golfe du Saint-Laurent). *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.*, no. 1697: X + 63 p.
- Clarkson, D.T., 1966. Aluminum tolerance in species within the genus Agrostis. *J. Ecol.*, 54:167-178.
- Driscoll, C.T., 1984. A procedure for the fractionation of aqueous aluminium in dilute acidic waters. *Int. J. Env. Anal. Chem.*, 16:267-283.

- Dupont, J., 1988. Etat de l'acidité des lacs de la région hydrographique de l'Outaouais, Ministère de l'Environnement du Québec, report PA-29, 98p.
- Foy, C.D., 1984. Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicities in acid soil. Dans: Soil Acidity and Liming. F.Adams (éd.), 2ième éd. Agronomy, 12:57-97.
- Gensemer, R.W., 1991. The effects of pH and aluminum on the growth of the acidophilic diatom Asterionella ralfsii var. americana. Limnol. Oceanogr., 36: 123-131.
- Helliwell, S., G.E. Batley, T.M. Florence et B.G. Lumsden, 1983. Speciation and toxicity of aluminium in a model fresh water. Environ. Technol. Lett., 4: 141-144.
- Hörnström, E., C. Ekström et M.O. Duraini, 1984. Effects of pH and different levels of aluminium on lake plankton in the Swedish West Coast area. Dans: L. Nyman et B. Ericsson (éds), Inst. of Freshwater Research, Report 61:115-127. Drottingholm, Suède.
- Hue, N.V., G.R. Craddock et F. Adams, 1986. Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. Soil Sci. Soc. Am. J., 50:28-34.
- Hsu, P.H., 1968. Interactions between aluminum and phosphate in aqueous solution. ACS Adv. Chem. Ser. 73:115-127.
- Kinraide, T.B. et D. R. Parker, 1989. Assessing the phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum. Soil Sci. Soc. Am. J., 53:789-796.
- Kinraide, T.B., R.C. Arnold et V.C. Baligar, 1985. A rapid assay for aluminium phytotoxicity at submicromolar concentrations. Physiol. Plant, 65:245-250.
- Leivestad, H., E. Jensen, H. Kjartansson et L. Xingfu, 1987. Aqueous speciation of aluminium and toxic effects on Atlantic salmon, p 387-398. Dans: H. Witters et O. Vanderborcht (éds). Ecophysiology of Acid Stress in Aquatic Organisms, Annls Soc. r. zool. Belg, Vol. 117, supplement 1.
- Luoma, S.N., 1983. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms-a review. Sci. Tot. Env, 28:1-22.
- Martell, A.E. et R.M. Smith, 1977. Critical Stability Constants, Vol. 3, Plenum Press, NY. 271 p.
- Morel, F.M.M., 1983. Principles of Aquatic Chemistry, J. Wiley and Sons, New York, NY., pp. 300-308.

- Neville, C.M., B.D. LaZerte et J.G. Ralston, 1988. Scientific Criteria Document for Development of Provincial Water Quality Objectives and Guidelines-Aluminum. Pour le Ministère de l'environnement de l'Ontario, Division des ressources en eaux, 62 p. + annexe.
- Neville, C.M. et P.G.C. Campbell, 1988. Proposed mechanisms of aluminium toxicity in a dilute, acidic environment to fingerlings and older life stages of salmonids. *Wat. Air Soil Pollut.*, 42:311-327.
- Oliver, B.G., E.M. Thurman et R.L. Malcolm, 1983. The contribution of humic substances to the acidity of coloured natural waters. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 47:2031-2035.
- Pagenkopf, G.K., 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environ. Sci. Technol.*, 17: 347-352.
- Parker, D.R., T.B. Kinraide et L.W. Zelazny, 1988a. Aluminum speciation and phytotoxicity in dilute hydroxy-aluminum solutions. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 52:438-445.
- Parker, D.R., L.W. Zelazny et T.B. Kinraide, 1988b. Comparison of three spectrophotometric methods for differentiating mono- and polynuclear hydroxy-aluminum complexes. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 52:67-75.
- Parthasarathy, N. et J. Buffle, 1985. Study of polymeric aluminium (III) hydroxide solutions for application in waste water treatment. Properties of the polymer and optimal conditions of preparation. *Wat. Res.*, 19:25-36.
- Peterson H.G., F.P. Healey et R. Wagemann, 1984. Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41:974-979.
- Pettersson, A., L. Kunst, B. Bergman et G.M. Roomans, 1985a. Accumulation of aluminium by *Anabaena cylindrica* into polyphosphate granules and cell walls: an X-ray energy-dispersive microanalysis study. *J. gen. microbiol.*, 131:2545-2548.
- Plankey, B.J., H.H. Patterson et C.S. Cronan, 1986. Kinetics of aluminum fluoride complexation in acidic waters. *Environ. Sci. Technol.*, 20:160-165.
- Rai, L.C., J.P. Gaur et H.D. Kumar. 1981.b. Phycology and heavy-metal pollution. *Biol. Rev.*, 56:99-151.

- Rost-Siebert, K., 1984. Aluminium Toxicity in Seedlings of Norway Spruce (Picea abies Karst.) and Beech (Fagus sylvatica L.), Contribution to the Workshop on Aluminum Toxicity to Trees Held in Uppsala, May 14-16, Stencil.
- Rueter, J.G., Jr., K.T. O'Reilly et R.R. Peterson, 1987. Indirect aluminum toxicity to the green alga Scenedesmus through increased cupric ion activity. Environ. Sci. Technol., 21:435-438.
- Schnitzer, M. et S.U. Khan, 1978 (éds). Soil Organic Matter, Developments in Soil Science 8, Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 319 p.
- Smith, R.W. et J.D. Hem, 1972. Chemistry of aluminium in natural water: Effect of aging on aluminum hydroxide complexes in dilute aqueous solutions. U.S. Geol. Surv. Water Supply Paper 1827-D, 51 p.
- Thomassin, D., 1985. Détermination de la spéciation de l'aluminium dans les eaux naturelles en voie d'acidification. Mémoire de maîtrise, INRS-eau, mars 1985, 137 p. + annexes.
- Ulrich, B., 1983. Soil acidity and its relation to acid deposition, pp 127-146. Dans: Effects of Accumulation of Air Pollutants in Forest Ecosystems. B. Ulrich et J. Pankrath (éds). D. Reidel Pub. Co.
- Wagatsuma, T. et Y. Ezoé, 1985. Effect of pH on ionic species of aluminum in medium and on aluminum toxicity under solution culture. Soil Sci. Plant Nutr., 31:547-561.
- Wagatsuma, T. et M. Kaneko, 1987. High toxicity of hydroxy-aluminum polymer ions to plants roots. Soil Sci. Plant Nutr., 33:57-67.

CHAPITRE 6: BIOACCUMULATION DE L'ALUMINIUM PAR CHLORELLA
PYRENOIDOSA EN RELATION AVEC LE pH

CHAPITRE 6: BIOACCUMULATION DE L'ALUMINIUM PAR CHLORELLA
PYRENOIDOSA EN RELATION AVEC LE PH

	Page
6.1 Introduction.....	325
6.2 Prise en charge de l'aluminium.....	325
6.2.1 Introduction.....	325
6.2.2 Matériel et méthodes.....	330
6.2.3 Résultats et discussion.....	332
6.2.3.1 Al monomère.....	339
6.2.3.2 Al polymère.....	359
6.2.3.3 Al organique.....	363
6.2.3.4 Mesure du flux cellulaire.....	369
6.2.4 Discussion.....	377
6.3 Relation entre l'Al intracellulaire et le P cellulaire..	388
6.3.1 Introduction.....	388
6.3.2 Matériel et méthodes.....	389
6.3.3 Résultats.....	390
6.3.4 Discussion.....	400
6.4 Effet de l'Al sur la perméabilité membranaire.....	405
6.4.1 Introduction.....	405
6.4.2 Matériel et méthodes.....	406
6.4.3 Résultats.....	408
6.4.4 Discussion.....	413
6.5 Références.....	416
Annexe B.1 Extraction de l'aluminium adsorbé sur une algue (Chlorella pyrenoidosa) par EDTA (10^{-3} M) selon le pH de la solution extractante.....	422
Annexe B.2 Evaluation du temps de contact optimal de l'EDTA avec les algues pour désorber tout Al.....	427

CHAPITRE 6: BIOACCUMULATION DE L'ALUMINIUM PAR CHLORELLA PYRENOIDOSA EN RELATION AVEC LE PH

6.1 Introduction

Nous avons observé au chapitre précédent que la toxicité de l'aluminium due aux formes monomères et polymères était supérieure aux pH plus élevés (pH 6---»4.3). En termes physico-chimiques, nous avons expliqué cette toxicité accrue par une compétition moins intense entre les cations H^+ et $Al(OH)_n^{(3-n)+}$ pour des sites à la surface cellulaire. Nous tenterons dans le présent chapitre d'expliquer cette toxicité par des phénomènes d'ordre biologique, c'est-à-dire que nous évaluerons si la toxicité de l'aluminium peut être expliquée en partie ou en totalité par sa prise en charge, par son flux cellulaire, par ses interactions possibles avec les réserves en phosphore intracellulaire, par son effet sur la perméabilité membranaire et par ses effets indirects sur la division cellulaire.

6.2 Prise en charge de l'Al

6.2.1 Introduction

L'observation d'une plus forte toxicité de l'aluminium (pour une même concentration) à pH faiblement acide (pH 6) comparativement à des pH plus acides suscite certaines hypothèses

explicatives. L'une d'entre elles est que ces résultats puissent être interprétés par une biodisponibilité accrue de l'aluminium pour Chlorella pyrenoidosa, c'est-à-dire, une biodisponibilité qui impliquerait à la fois une disponibilité chimique de l'aluminium, une disponibilité des sites cellulaire (plus facilement atteignables) et un passage accru de l'aluminium à l'intérieur de la cellule, ce qui résulterait en une bioaccumulation totale supérieure d'aluminium (tableau 6.1).

Disponibilité chimique et biodisponibilité

Dans le chapitre précédent, à partir de tests portant sur la toxicité de l'aluminium pour une algue unicellulaire, on a observé que la biodisponibilité relative de l'Al diminuait progressivement entre pH 6.0 et 4.3. Cette influence du pH sur la biodisponibilité de l'Al s'exprime selon trois niveaux (tableau 6.1). Le premier concerne la disponibilité chimique de l'aluminium, c'est-à-dire sa présence sous différentes formes pouvant atteindre la cellule (forme ionique, dissoute, labile) et à des concentrations absolues et relatives (par rapport à d'autres cations présents en solution) suffisamment élevées pour avoir un effet sur la cellule algale. Le deuxième se rapporte à la disponibilité des sites cellulaires pouvant accepter ces cations. Tous les aspects qui touchent à la compétition cationique, aux variations du potentiel de membrane, ainsi qu'à la conformation des sites de liaison (effets allostériques) influencent la disponibilité des sites de surface.

Tableau 6.1: Relations entre biodisponibilité et bioaccumulation.

BIODISPONIBILITÉ

----->

BIOACCUMULATION

en solution:

- Disponibilité chimique de Al
 - . forme ionique
 - . concentration
 - . compétition avec autres cations pour ligands en solution

à l'interface:

- Disponibilité des sites
 - . compétition
 - . potentiel transmembranaire
 - . conformation des sites

- adsorption

possibilité de traverser la membrane et d'avoir un effet intracellulaire:

- . perméabilité membranaire
- . activité enzymatique
- . protéines
- . sites intracellulaires:
 - détoxication/immobilisation

- absorption

Le troisième niveau de disponibilité se rapporte à la "traversée" de la membrane et à la présence de cibles intracellulaires où la toxicité de l'aluminium pourrait se jouer directement ou indirectement.

La disponibilité des sites intracellulaires et intramembranaires est fonction à la fois de la perméabilité membranaire, de l'activation ou de l'inactivation enzymatique (Bryan, 1971), de l'accessibilité des protéines de transfert (ex. calmoduline; Siegel et Haug, 1983a et 1983b; Suhayda et Haug, 1984; Weis et Haug, 1987; Roy et al., 1988) et de la présence ou non de vésicules pouvant accumuler l'aluminium. Ces dernières peuvent constituer des sites d'exclusion pour la détoxification ou des sites d'entreposage où l'aluminium est immobilisé.

Comme nous l'avons observé dans les deux chapitres précédents, ces trois niveaux de biodisponibilité sont influencés par le pH de la solution. La disponibilité chimique de l'aluminium en relation avec le pH est assez bien connue; par contre, sa biodisponibilité, c'est-à-dire la possibilité d'une prise en charge par une cellule vivante (bioaccumulation) est assez peu connue. Une façon d'évaluer cette biodisponibilité est de pratiquer des expériences cinétiques, c'est-à-dire d'évaluer si la prise en charge intra et/ou extra-cellulaire de l'Al peut expliquer la toxicité observée au Chapitre 5. Ce type de mesures renseigne à la fois sur le taux de prise en charge ainsi que sur l'évolution de la courbe de prise en charge en fonction du temps, et dans ce cas-ci en fonction de la croissance de Chlorella pyrenoidosa.

Bioaccumulation

La bioaccumulation de Al par Chlorella pyrenoidosa peut être évaluée de la même façon qu'on l'a fait pour le Mn (Chapitre 4.3). Parallèlement aux expériences de toxicité, les algues sont récoltées à $t=0$, 4 heures, 2 et 4 jours, filtrées et digérées. Les solutions résultantes sont alors diluées avec de l'eau ultrapure et les concentrations en Al sont mesurées. Cette technique permet d'évaluer la prise en charge totale de l'Al par Chlorella pyrenoidosa. Pour discriminer entre l'Al cellulaire et l'Al adsorbé, on procède à une extraction partielle avec de l'EDTA. Cette dernière technique est basée sur l'efficacité de l'EDTA à compétitionner avec les sites présents à la surface cellulaire de façon à lier tout l'aluminium libre et adsorbé mais non "incorporé" par la cellule.

Cette méthode, qui permet la distinction entre l'aluminium adsorbé et l'aluminium (intra) cellulaire, informe d'avantage sur les mécanismes qui influencent l'accumulation et/ou la tolérance à l'aluminium, qu'une simple mesure de l'Al total associé à la cellule entière. De plus, une telle distinction permet une analyse de l'adsorption et du transport du métal, d'où on peut évaluer un taux (k_c) de transport du métal et une constante d'équilibre (K_{Al-L}) pour l'adsorption de l'aluminium sur la surface cellulaire.

La surface cellulaire agit comme barrière chimique et physique en réglant le transport des éléments traces en empêchant par exemple l'atteinte de sites sensibles dans la cellule par les ions métalliques (Foster, 1976; Butler et al. 1980). La grande surface cellulaire trouvée chez le phytoplancton (Davis, 1978) suggère de plus, que l'adsorption sur cette surface joue un rôle important dans la prise en charge des métaux traces par les algues (Bates et al., 1982).

Des expériences préliminaires ont été effectuées pour déterminer le temps et les concentrations en EDTA nécessaires pour maximiser l'efficacité de la désorption. De plus, on s'est assuré que l'efficacité de l'EDTA à désorber l'Al lié à la surface cellulaire n'était pas fonction du pH (voir annexes B.1 et B.2).

6.2.2 Matériel et méthodes

Les bioessais ont été réalisés en milieu synthétique défini, les mêmes que ceux décrits dans le chapitre précédent.

Des expériences préliminaires portant sur la prise en charge de l'aluminium ($[Al] = 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) par Chlamydomonas variabilis ont permis de démontrer qu'une densité cellulaire de $8 \cdot 10^5$ (cellules $\cdot \text{mL}^{-1}$) était suffisante pour faire diminuer de 60% la quantité d'aluminium présent dans la solution expérimentale dès les

premières minutes de contact avec les algues. Afin d'éviter de telles pertes de l'Al de la solution (conditions d'exposition à l'Al trop variables), nous avons travaillé avec des concentrations d'algues $< 10^5$ cellules·mL⁻¹. De plus, les précautions nécessaires ont été prises afin de faire pousser les algues dans des bouteilles de plastic (Teflon[®]) puisque l'apport d'aluminium par le verre ne semblait pas négligeable. Par exemple, des algues ayant poussé initialement dans des contenants en verre n'ont pas démontré de prise en charge significative d'aluminium lorsque par la suite elles étaient mises en présence de 100 µg·L⁻¹ d'aluminium (R. Schenck: communication personnelle).

Les algues sont mises à pousser dans un milieu AAP, dans une bouteille de Teflon[®] de 2 litres sous luminosité constante. Le milieu contenant les algues est aéré et agité. Les cellules sont récoltées tôt pendant la phase exponentielle de croissance (réserves intracellulaires en éléments nutritifs suffisamment élevées pour permettre une croissance soutenue dans le milieu contenant l'aluminium, qui ne peut contenir ni de phosphate ni de silicate), centrifugées et lavées trois fois avec un milieu synthétique défini de même force ionique que le milieu AAP. L'aluminium est ajouté au milieu d'exposition 24 heures avant l'ajout des algues afin de permettre un équilibre entre les différentes formes d'aluminium.

L'approche méthodologique est décrite au Chapitre 2 et est schématisée à la figure 2.2. Des sous-échantillons (50-100 mL) de cellules en suspension sont récoltés à temps sélectionnés après le début de l'expérience et filtrés sous faible pression (<100 mm Hg) sur filtre 0.4 μm Nuclepore. Aux mêmes temps sélectionnés, la densité cellulaire est mesurée à l'aide d'un compteur à particules (Coulter Counter) calibré pour connaître la surface totale des cellules présentes dans le milieu. Ainsi, lorsque l'on détermine la concentration de métal total pris en charge par l'algue, on peut l'exprimer en $\mu\text{mole}\cdot\text{m}^{-2}$ de surface d'algue. En parallèle, on ajoute de l'EDTA (1 mM: concentration optimale d'EDTA pour désorber l'Al lié à la surface de la cellule, selon Pettersson et al., 1986) et CaCl_2 ($6\cdot 10^{-4}$ M: pour le maintien de la force ionique) à une autre série d'échantillons de la suspension cellulaire pris aux mêmes temps. Après 20 minutes de contact avec l'EDTA, les sous-échantillons sont filtrés. Cette mesure donne la concentration de métal cellulaire ($\mu\text{mole}\cdot\text{m}^{-2}$) soit la concentration de métal non-extractible à l'EDTA. La concentration du métal extractible ou associé à la surface cellulaire est calculée par la différence entre la concentration totale et la concentration cellulaire en métal.

6.2.3 Résultats et discussion

La prise en charge de l'aluminium inorganique monomère et polymère a été mesurée à plusieurs pH. Les résultats de bioaccumulation totale, cellulaire et par adsorption après 4 jours

d'incubation apparaissent au tableau 6.2. La raison pour laquelle on illustre la prise en charge après 4 jours est qu'elle était quelquefois très faible, voire sous la limite de détection, après seulement 4 heures d'incubation, surtout aux faibles concentrations en Al_{total} dans les milieux d'incubation et aux bas pH. Il s'agit de moyennes de trois essais en parallèle (à partir de trois bouteilles différentes).

Ces mêmes résultats, pour ce qui est de la prise en charge totale, sont représentés à la figure 6.1 avec les écart type à la moyenne, pour chacun des pH testés. Les coefficients de corrélation ont été calculés pour chacun des pH.

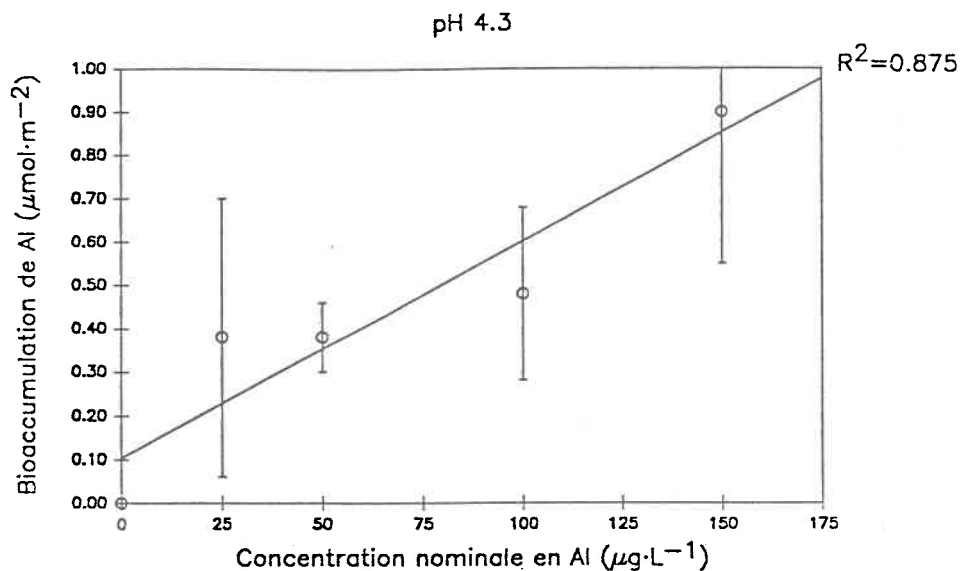
Notons que les concentrations nominales en Al sont les concentrations en Al total, c'est-à-dire qui comprennent à la fois Al monomère et Al polymère dans certains cas (pH 4.8, 5.2, 5.5 et 6.0). Dans tous les cas, la bioaccumulation totale semble assez linéaire avec la concentration totale en aluminium en solution, et dans aucun cas on atteint une saturation évidente. Notons de plus que la plus faible corrélation observée à pH 4.3 entre la prise en charge totale et la concentration en Al dans le milieu est peut-être due en partie aux très faibles concentrations d'Al mesurées à ce pH chez les algues.

Tableau 6.2: Bioaccumulation de l'Al par Chlorella pyrenoidosa après 4 jours de contact avec une solution contenant de l'aluminium dissous à différents pH. ([Al]total= bioaccumulation totale de l'Al; [Al]cell.= aluminium non extractible à l'EDTA; [Al]ads.= [Al]total-[Al] cell.; % : pourcentage d'Al adsorbé; *= inhibition de croissance significative par rapport au témoin; ND: [Al] <0).

Bioaccumulation de Al par Chlorella pyrenoidosa après 4 jours de contact

pH	[Al] en solution ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		[Al] dans les algues ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$)				
	[Al]total	[Al]poly.	[Al]total	[Al]cellulaire	[Al]adsorbé	%	
4.3	0	0	ND	ND	ND	0	
	25	0	0.38	0.46	< 0	0	
	50	0	0.38	0.45	< 0	0	
	100	0	0.48	0.33	0.15	31	
	150	0	0.90	0.53	0.37	41	
4.6	0	0	ND	ND	ND	0	
	100	0	4.50	2.10	2.40	53	
	150	0	4.80	2.00	2.80	58	
	200	0	6.80	3.80	3.00	44	
	400	0	24.00	7.30	16.70	70	
4.8	0	0	ND	ND	ND	0	
	* 200	0	6.40	4.76	1.63	26	
	* 400	0	53.80	47.50	6.26	12	
	* 600	200	76.10	58.10	18	24	
	* 700	300	84.00	65.20	18.90	23	
	* 900	500	87.50	64.40	23.10	26	
	5.0	0	0	ND	ND	ND	0
25	0	4.30	1.85	2.45	57		
50	0	9.79	3.73	6.05	62		
100	0	22.30	13.00	9.34	42		
* 150	0	30.90	19.60	11.30	37		
5.2	0	0	ND	ND	ND	0	
	* 100	0	36.30	25.90	10.40	29	
	* 200	100	46.40	30.80	15.50	33	
	* 400	300	64.00	54.00	10.00	16	
5.5	0	0	ND	ND	ND	0	
	8	0	4.79	4.35	0.47	10	
	15	0	5.91	4.81	1.10	19	
	25	0	8.93	6.47	2.46	28	
	30	0	9.14	7.19	1.95	21	
	* 35	0	14.30	6.60	7.70	53	
	* 200	165	48.32	40.39	7.93	16	
	* 400	365	85.80	71.00	14.80	17	
	6.0	0	0	0.33	1.00	< 0	0
		* 8	0	6.20	0.65	5.55	90
* 200		192	51.00	33.00	18.00	35	
* 400		392	140.00	130.00	10.00	7	

A.



B.

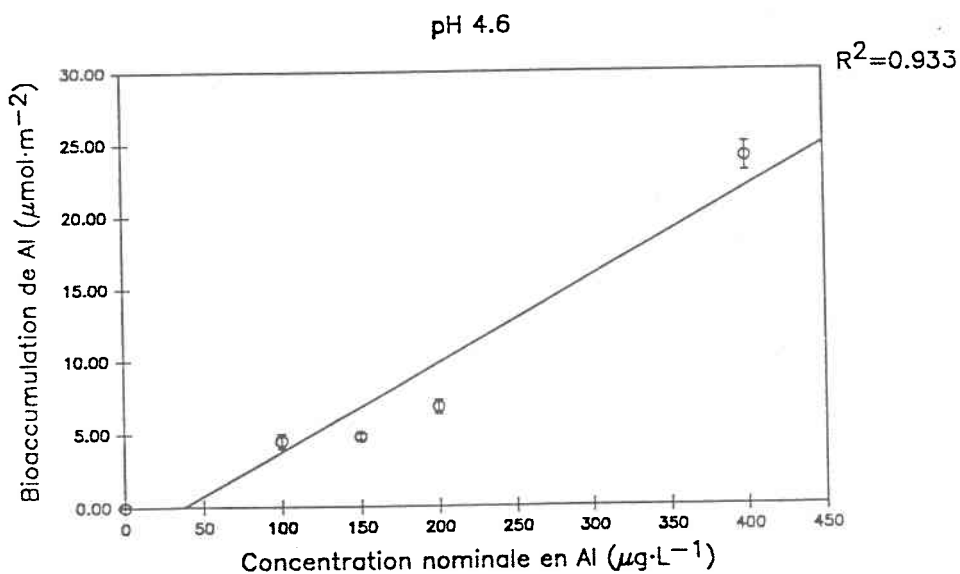
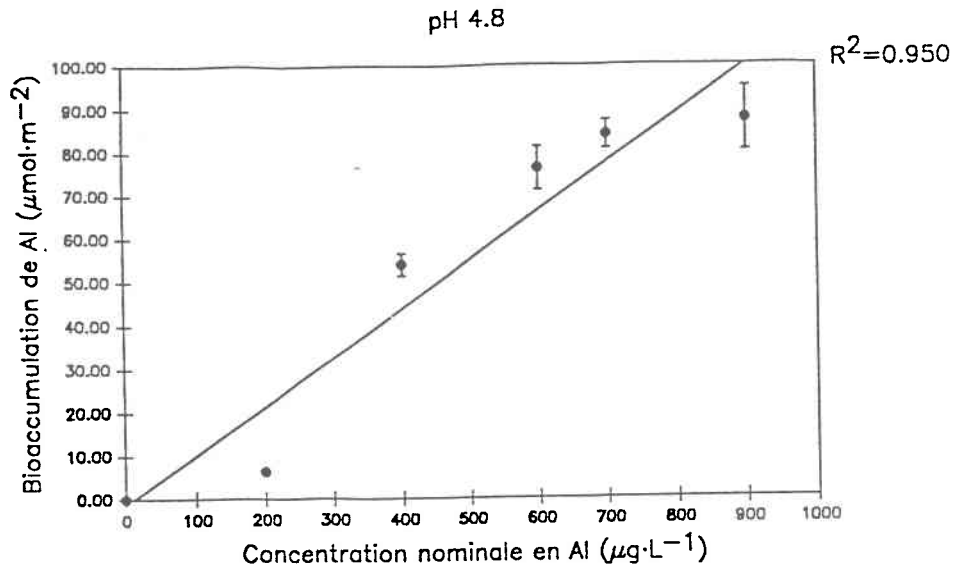


Figure 6.1: Bioaccumulation totale par *Chlorella pyrenoidosa* d'Al après 4 jours de contact avec différentes concentrations totales en aluminium comprenant des formes monomères uniquement (pH 4.3, 4.6). Les coefficients de corrélation ont été calculés pour chacun des pH.

C.



D.

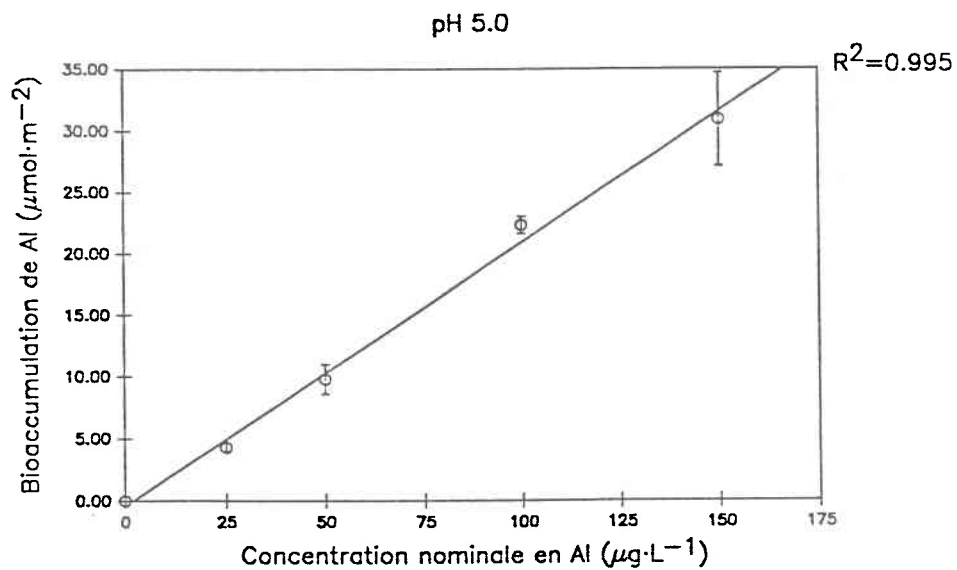
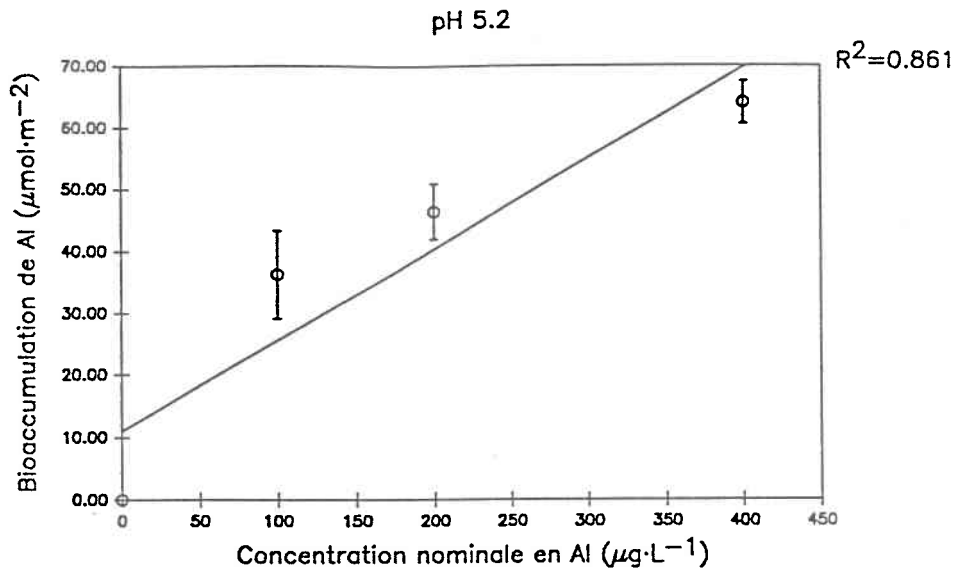


Figure 6.1: Bioaccumulation totale par *Chlorella pyrenoidosa* d'Al après 4 jours de contact avec différentes concentrations totales en aluminium comprenant des formes monomères uniquement (pH 5.0) et des formes monomères et polymères (pH 4.8). Les coefficients de corrélation ont été calculés pour chacun des pH.

E.



F.

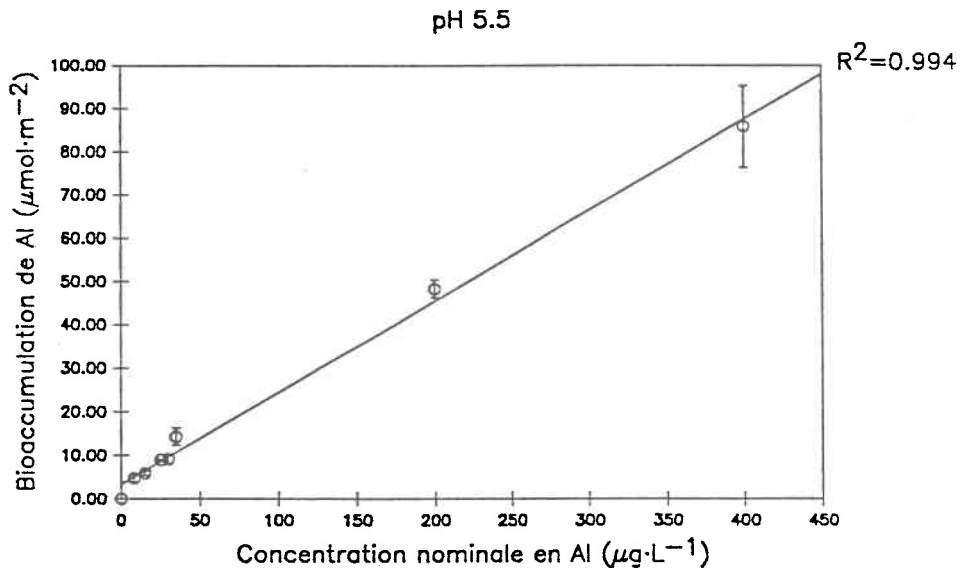


Figure 6.1: Bioaccumulation totale par *Chlorella pyrenoidosa* d'Al après 4 jours de contact avec différentes concentrations totales en aluminium comprenant des formes monomères et polymères (pH 5.2, 5.5). Les coefficients de corrélation ont été calculés pour chacun des pH.

G.

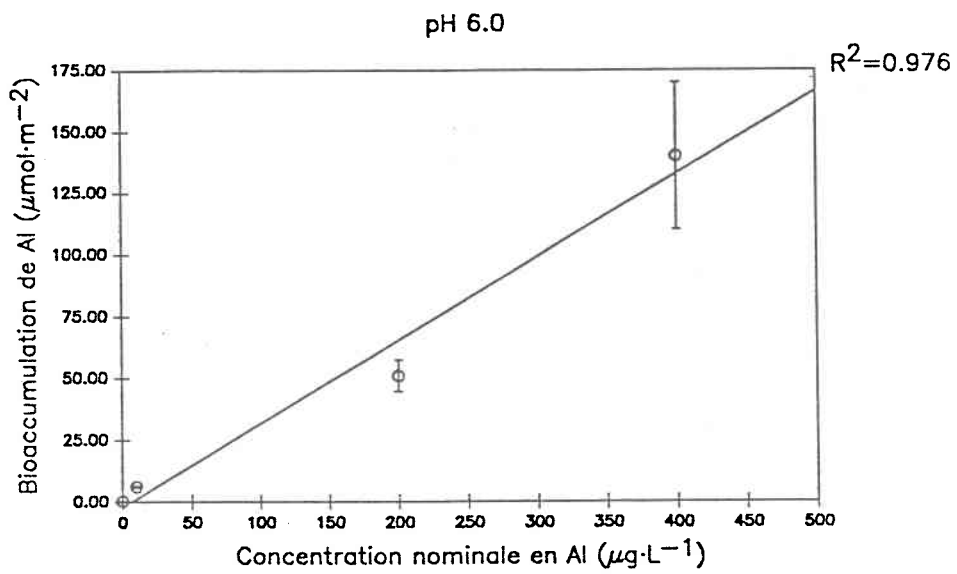


Figure 6.1: Bioaccumulation totale par Chlorella pyrenoidosa d'Al après 4 jours de contact avec différentes concentrations totales en aluminium comprenant des formes monomères et polymères (pH 6.0). Les coefficients de corrélation ont été calculés pour chacun des pH.

6.2.3.1 Al monomère

Résultats

La bioaccumulation totale de l'Al monomère par Chlorella pyrenoidosa en relation avec le pH est présentée à la figure 6.2. On observe, tout comme c'était le cas pour la toxicité, que la bioaccumulation de Al_{cv-cvr} est supérieure aux pH plus élevés. De même, pour les pH où la bioaccumulation a été mesurée pour plus de deux concentrations en Al_{cv-cvr} (pH 4.3, 4.6, 5.0 et 5.5) la prise en charge est corrélée linéairement avec Al_{cv-cvr} disponible dans le milieu. Freda et McDonald (1990) ont aussi observé de façon très évidente que la prise en charge de l'Al par des têtards de grenouilles de trois semaines augmentait avec le pH et la concentration en Al dans le milieu.

Les résultats de l'évolution temporelle de la prise en charge totale, cellulaire et adsorbé pour $[Al_{cv-cvr}]$ maximale testée pour chacun des pH apparaissent à la figure 6.3. On se doit de remarquer la faible proportion de l'Al adsorbé par rapport à l'Al cellulaire ou non extractible à l'EDTA; même si cette proportion varie entre 5 et 90% après 4 jours d'incubation selon le pH expérimental (tableau 6.2), la moyenne est d'environ 33 %. Pour les pH 5.0 et 5.5, les courbes de prise en charge de l'aluminium pour $[Al_{cv-cvr}]$ ayant un effet significatif sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa sont superposées aux courbes de prise en

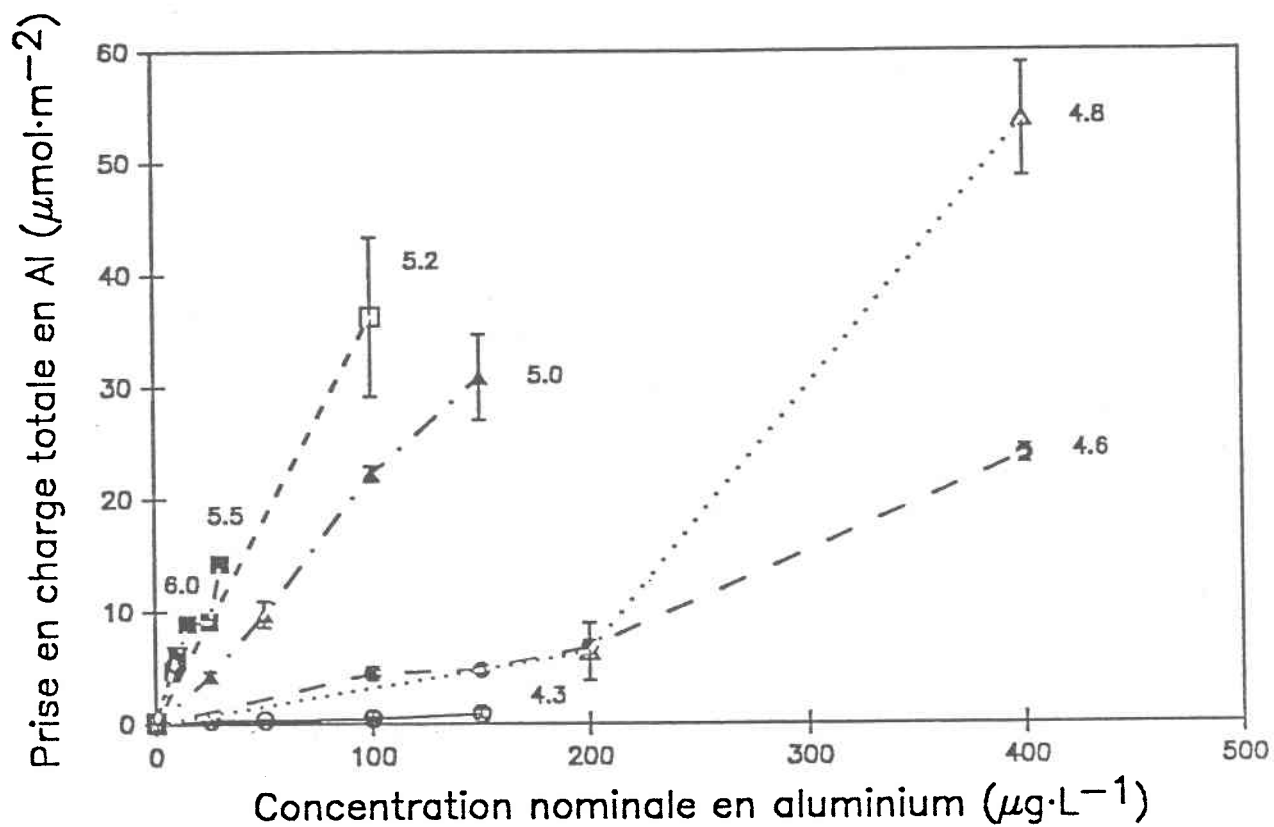


Figure 6.2: Bioaccumulation totale d'Al monomère par *Chlorella pyrenoidosa* après 4 jours de contact. (Moyennes et écart type pour chacune des concentrations nominales en $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ pour différents pH: pH 4.3 (0, 25, 50, 100, 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 4.6 (0, 100, 150, 200, 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 4.8 (0, 200, 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 5.0 (0, 25, 50, 100, 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 5.2 (0, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 5.5 (0, 8, 15, 25, 30, 35 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 6.0 (0, 8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

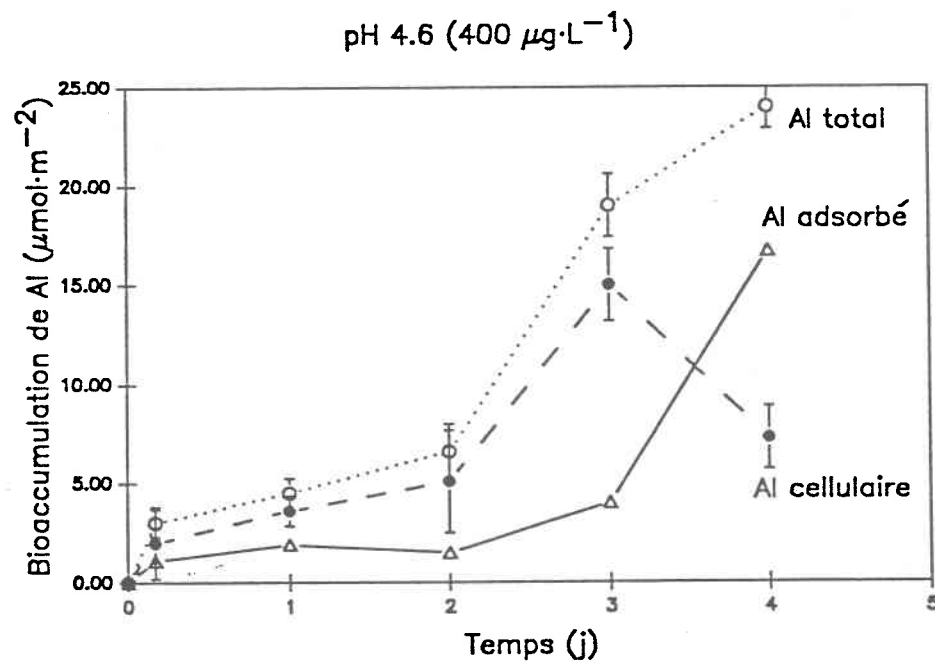
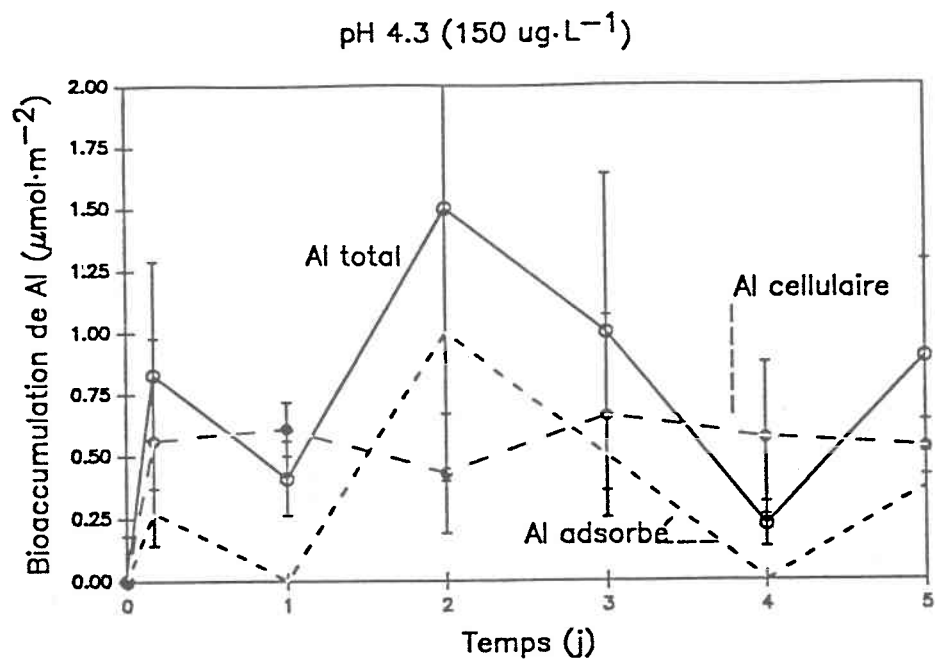


Figure 6.3: Evolution de la bioaccumulation de $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ maximal pour chacun des pH. (Moyennes et écart type de trois essais simultanés; Al total: concentration totale en Al chez les algues; Al cellulaire: Al non extractible à l'EDTA; Al adsorbé = Al total - Al cellulaire).

pH 4.8 ($200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

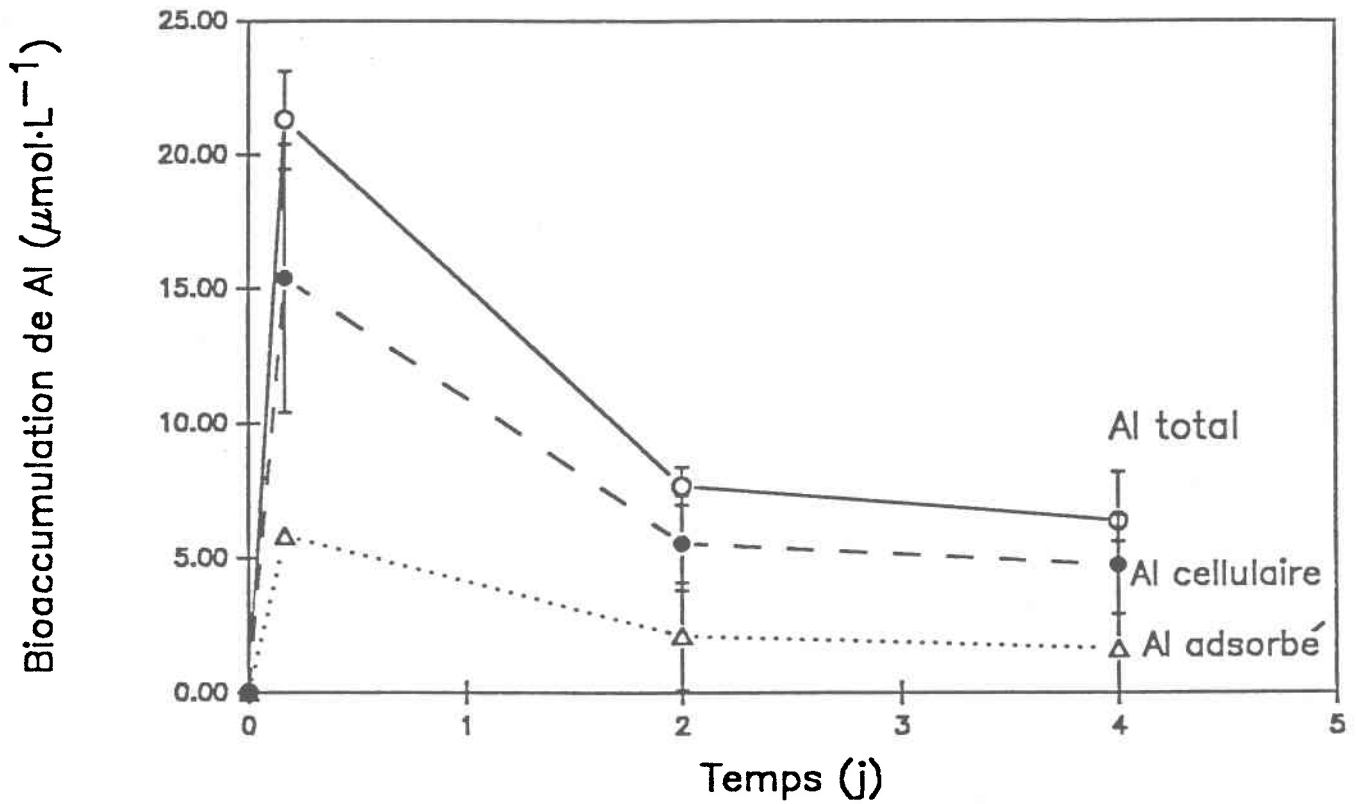
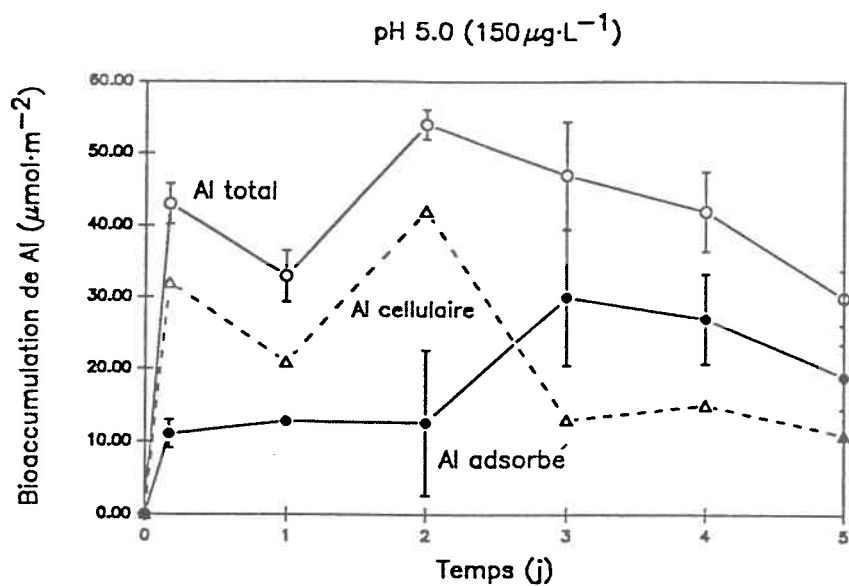


Figure 6.3: Evolution de la bioaccumulation de $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ maximal pour chacun des pH. (Moyennes et écart type de trois essais simultanés; Al total: concentration totale en Al chez les algues; Al cellulaire: Al non extractible à l'EDTA; Al ads.= Al total - Al cellulaire).



(effet significatif sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa)

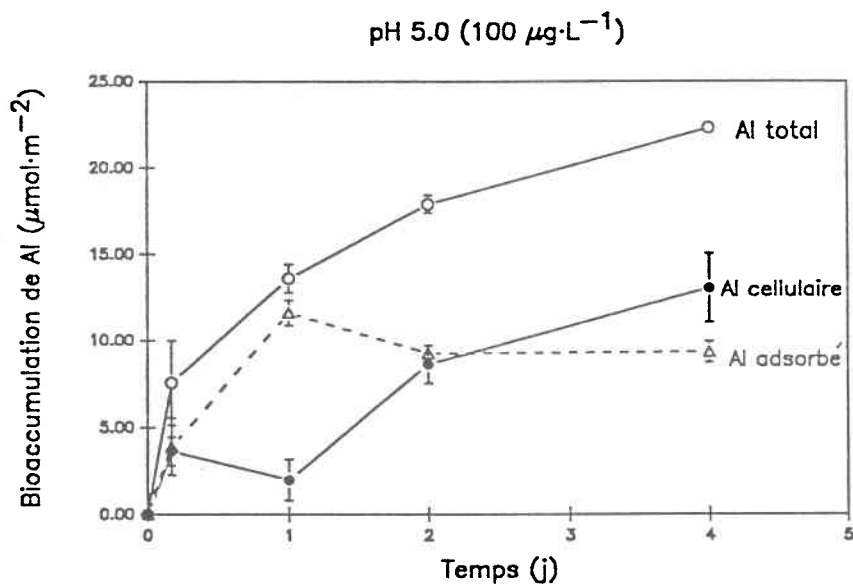
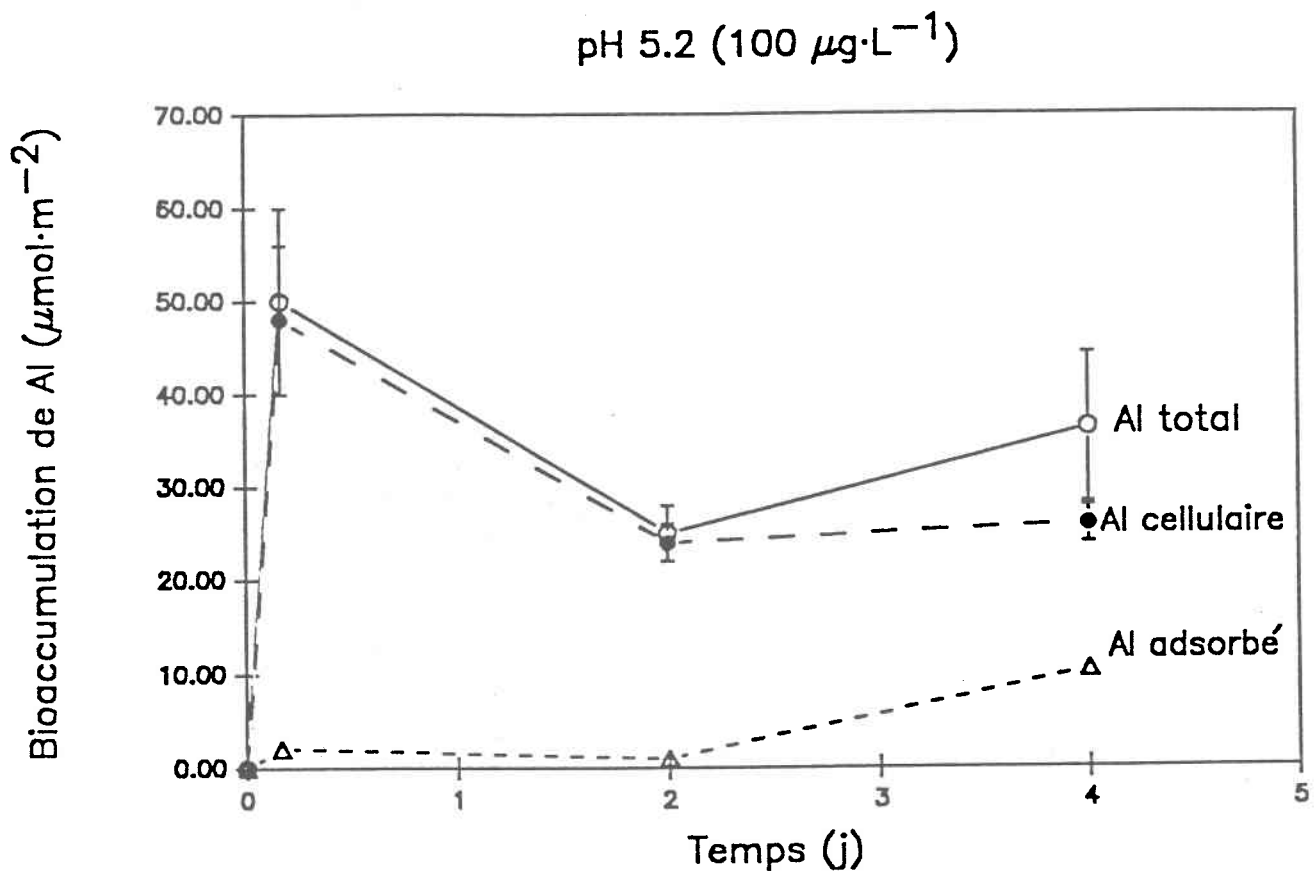


Figure 6.3: Evolution de la bioaccumulation de $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ maximal pour chacun des pH. (Moyennes et écart type de trois essais simultanés; Al total: concentration totale en Al chez les algues; Al cellulaire: Al non extractible à l'EDTA; Al ads.= Al total - Al cellulaire).



(Effet significatif sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa)

Figure 6.3: Evolution de la bioaccumulation de $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ maximal pour chacun des pH. (Moyennes et écart type de trois essais simultanés; Al total: concentration totale en Al chez les algues; Al cellulaire: Al non extractible à l'EDTA; Al ads.= Al total - Al cellulaire).

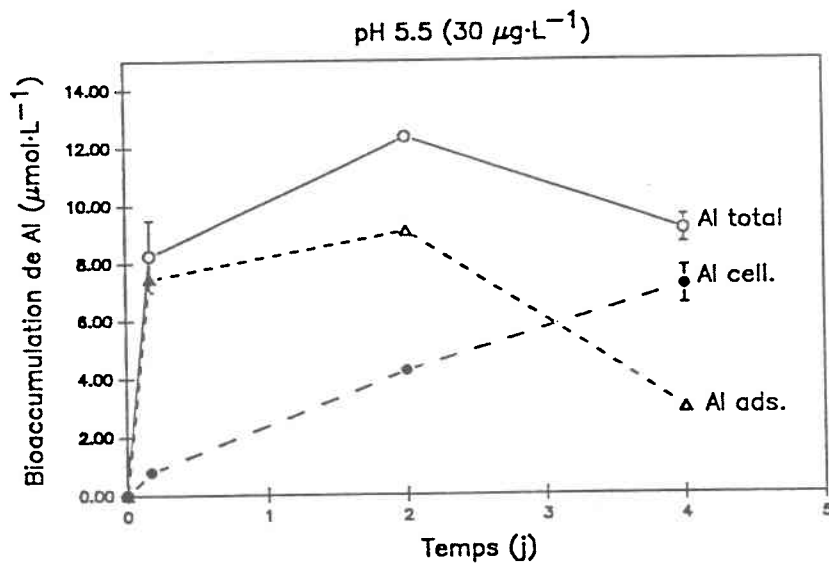
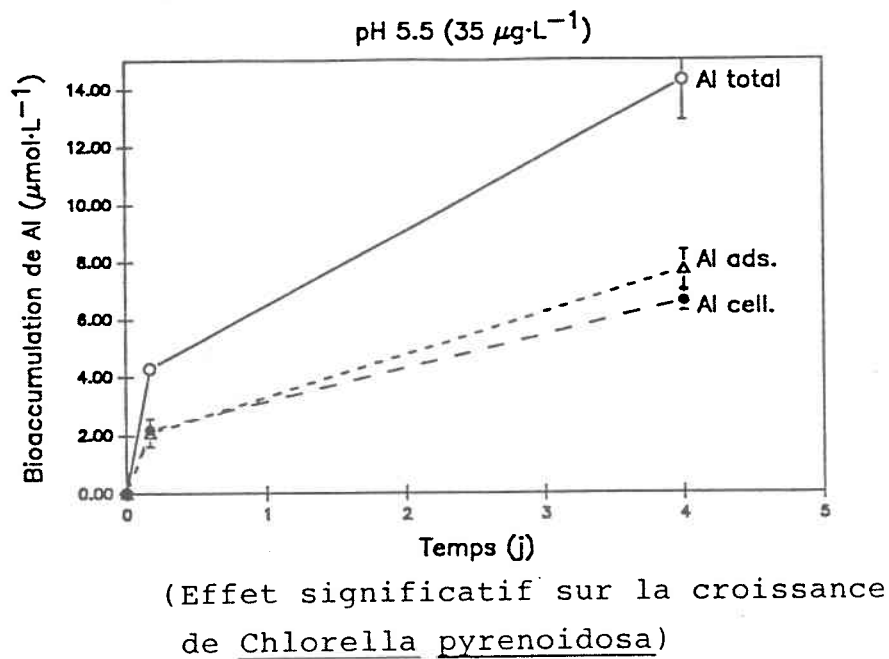
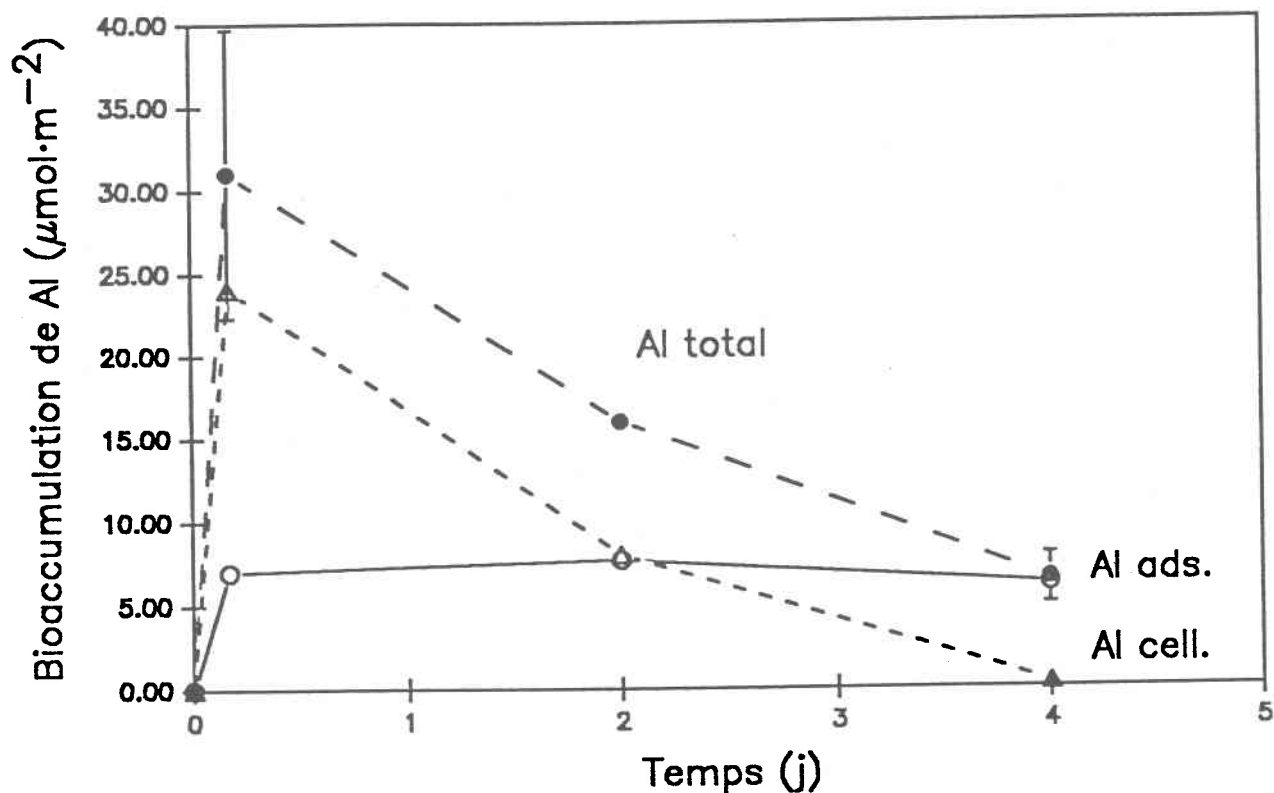


Figure 6.3: Evolution de la bioaccumulation de $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ maximal pour chacun des pH. (Moyennes et écart type de trois essais simultanés; Al total: concentration totale en Al chez les algues; Al cellulaire: Al non extractible à l'EDTA; Al ads.= Al total - Al cellulaire).

pH 6.0 ($8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)



(Effet significatif sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa)

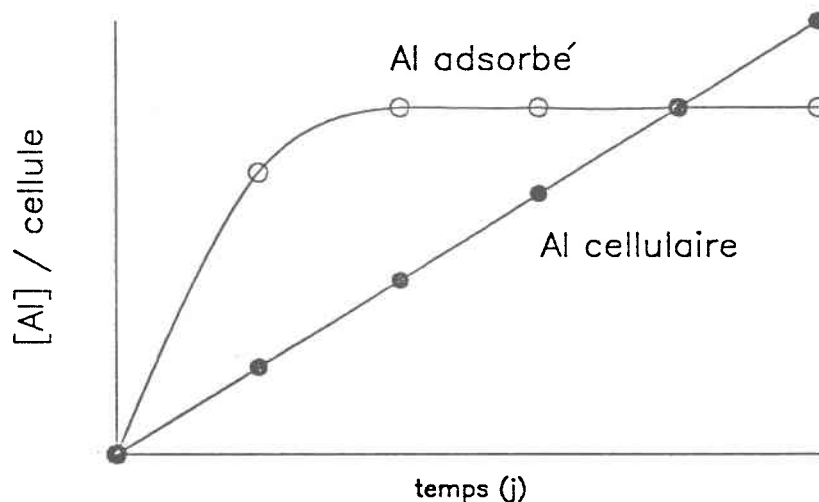
Figure 6.3: Evolution de la bioaccumulation de $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ maximal pour chacun des pH. (Moyennes et écart type de trois essais simultanés; Al total: concentration totale en Al chez les algues; Al cellulaire: Al non extractible à l'EDTA; Al ads. = Al total - Al cellulaire).

charge de l'aluminium pour une $[Al]_{cv-cvr}$ qui ne provoquait pas de diminution de croissance significative par rapport au témoin.

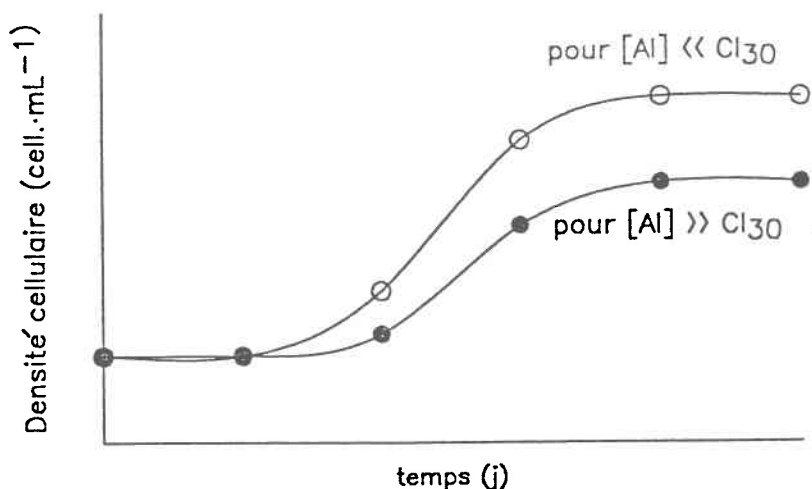
Discussion

. facteurs à considérer

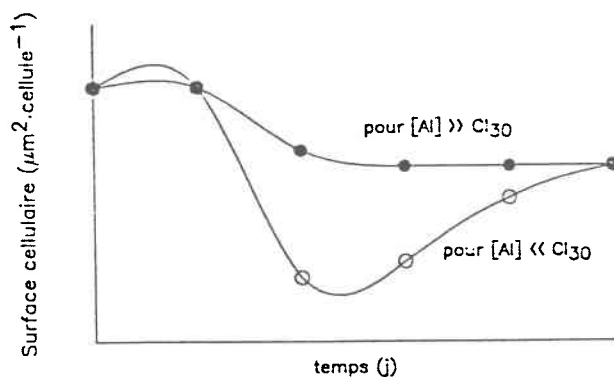
On se doit de considérer plusieurs facteurs lorsqu'on évalue la cinétique de prise en charge de l'aluminium par du matériel vivant (Chlorella pyrenoidosa). Puisqu'on étudie des algues dont la croissance varie de façon exponentielle avec le temps, la façon d'exprimer la prise en charge peut être erronée. Normalement, pour un nombre constant de cellules, on devrait obtenir ce type de courbe:



Cependant, tel que démontré dans le chapitre précédent, à cause de la toxicité de l'aluminium, la concentration en cellules n'est pas constante et varie avec le temps:

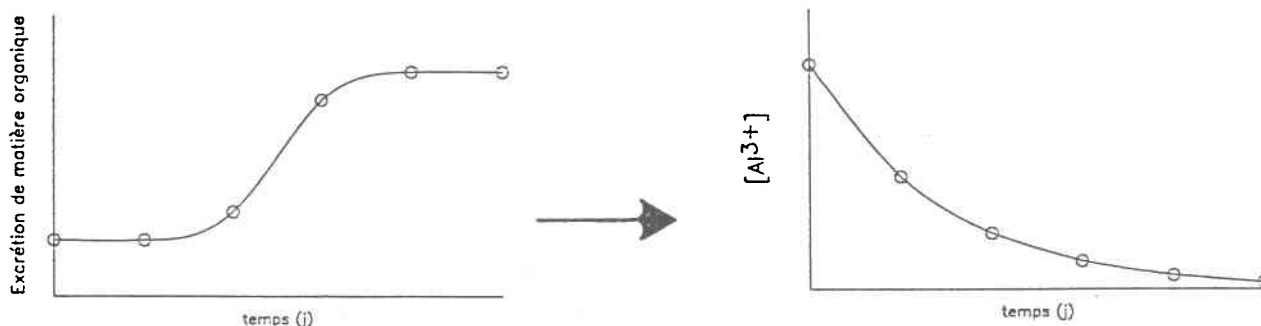


Ainsi, les caractéristiques physico-chimiques de la cellule qui est mise en contact avec l'Al varient avec le temps. De plus, la superficie algale peut aussi varier dans le temps et en fonction de la toxicité de l'Al et agir sur l'estimation de la prise en charge de l'Al par unité de surface.



De plus, il ne faut pas oublier que même si le protocole expérimental a été conçu afin de prévenir l'excrétion de la matière organique par les algues, ceci peut quand même survenir avec le temps et ainsi jouer sur la spéciation de l'aluminium en complexant l'Al monomère inorganique. Cependant, les résultats en Al_{cv-cvr} mesurés à la fin de l'expérimentation n'ont pas montré de disparition significative de l' Al_{cv-cvr} (voir Chapitre 5). Il s'en

suit que s'il y a formation de tels complexes Al-matière organique dissous, ils doivent être labiles et plus faibles que le complexe Al-pyrocatechol violet.



. extraction à l'EDTA

Il faut souligner que l'extraction d'Al sur la cellule s'est avérée assez difficile et on a obtenu quelquefois des résultats difficilement interprétables (ex: Al cellulaire > Al total, pH 4.8, pH 5.2; figure 6.3). En effet, il semble que les liens entre l'aluminium et la surface cellulaire soient très forts et que l'action de l'EDTA ne soit pas aussi efficace que prévu. Pour d'autres métaux (Zn, Mn) (Bates et al., 1983; Schenck et al., 1988), l'adsorption était supérieure à l'accumulation intracellulaire dans les premières heures d'incubation. Dans notre cas, il semble que l'aluminium soit capté très fortement à la surface cellulaire ou incorporé dans la cellule presque instantannément-cette dernière explication est peu

plausible. Des résultats similaires ont été obtenus avec des alevins vésiculés (Parent et al., 1988). De plus, des résultats d'extraction de l'Al par EDTA sur des branchies de saumon ont aussi montré une concentration en Al extractible très faible, suggérant que la plus grande partie de l'Al était incorporée dans les cellules. Cependant, un examen ultérieur de ces branchies au microscope électronique a dévoilé que l'aluminium était bel et bien associé aux membranes cellulaires (Yves Roy, Ecorecherche Ltée, Montréal: communication personnelle, 1990). Il semble en effet que la liaison entre l'Al et certains groupements présents à la surface cellulaire soit très forte et difficilement défaisable. Cependant, il reste que l'extraction à l'EDTA peut nous instruire qualitativement de la capacité de liaison des surfaces cellulaires pour Al à différents pH.

Selon les équilibres thermodynamiques (MINEQL), on a calculé antérieurement à ces expériences que la concentration de 0.1 mM d'EDTA devait être adéquate pour lier tout Al adsorbé sur les cellules et libre dans le milieu. Que l'effet complexant de l'EDTA ne semble pas aussi efficace que prévu pour cette expérience est peut-être dû à ce que le modèle ne tient pas compte des sites de liaison (carboxyles entre autres) présents sur la surface cellulaire. Signalons que des expériences subséquentes avec une solution plus concentrée en EDTA (10^{-3} M) ne s'avéraient pas plus efficaces; l'inefficacité apparente de l'extraction avec l'EDTA ne semble donc pas être le résultat d'une concentration trop faible de l'agent complexant.

Des études similaires sur les effets physiologiques de l'Al sur une algue bleu-verte, Anabaena cylindrica, ont aussi démontré que l'aluminium était rapidement incorporé dans les cellules et accumulé dans les vésicules de polyphosphates. L'aluminium était aussi observé dans les membranes cellulaires mais n'était pas détecté dans le cytoplasme (Pettersson et al., 1985b). Selon ces auteurs, qui travaillaient avec de très fortes concentrations en Al et en P ($[Al]=190\mu M$; $[P]=180\mu M$), l'accumulation de l'aluminium dans ces structures peut agir comme mécanisme de détoxification. De plus, ces auteurs ont démontré que le traitement à l'aluminium d'une durée de 24 heures ne causait aucun changement significatif dans la composition élémentaire des granules de polyphosphates et des murs cellulaires. Mentionnons cependant que la paroi/membrane d'une algue bleue verte n'est pas la même que celle d'une algue verte et que les observations de Pettersson et al. (1985b) ne s'appliquent peut-être pas dans notre cas.

Bioaccumulation de l'aluminium monomère inorganique

L'observation qualitative des courbes de prise en charge à pH 4.8, 5.0 et 5.5 laisse à penser que la proportion mesurée d'aluminium cellulaire pourrait être reliée avec la toxicité observée. En effet, dans ces trois cas, on observe que dans les milieux où la croissance de Chlorella pyrenoidosa n'était pas (ou peu) affectée significativement, l'aluminium intracellulaire était faible par rapport aux milieux où il y avait un effet significatif.

Ainsi, la toxicité pourrait être expliquée indirectement par l'incorporation de l'aluminium dans la cellule algale à moins que l'accumulation intracellulaire de l'Al soit dû à un déséquilibre membranaire initial qui laisserait l'Al entrer dans la cellule. Dans ce dernier cas, l'aluminium pénètre dans la cellule comme conséquence de la toxicité et non pas comme une cause.

Exemple:

pH	[Al] ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	% de croissance	Quota cellulaire moyen d'Al après 4 jours d'incubation
4.8	400	71 *	47.50
	200	80 *	4.76
5.0	150	55 *	19.60
	100	86	13.00
5.5	35	78 *	6.60
	25	87	6.47

où * = inhibition de croissance significative par rapport au témoin.

Indirectement, on peut supposer que les cellules algales qui n'ont pas subi d'effets significatifs de l'Al, sont des cellules relativement saines qui se divisent et qui ont ainsi une plus grande capacité d'adsorption (Bates et al., 1983) et de barrière empêchant de cette façon l'incorporation intracellulaire de l'Al.

Si on ne considère que les milieux contenant uniquement de l'Al_{cv-cvr} (tableau 6.2), on observe, pour une période de 4 jours,

une augmentation de l'aluminium désorbable en fonction de la concentration en Al_{cv-cvr} dans le milieu et ce pour des concentrations en Al qui n'affectent pas significativement la croissance de Chlorella pyrenoidosa. Cependant, lorsqu'on examine l'adsorption de l'Al après seulement 4 heures de contact, on ne peut discerner un tel résultat sauf à pH 5.0. Peut-être est-ce dû aux faibles concentrations en Al adsorbé aux pH < 5.0?

pH	4.3		4.6		5.0	
	$[Al_{cv-cvr}]$ ($\mu g \cdot L^{-1}$)	$[Al_{adsorbé}]$ ($\mu mol \cdot m^{-2}$)	$[Al_{cv-cvr}]$ ($\mu g \cdot L^{-1}$)	$[Al_{adsorbé}]$ ($\mu mol \cdot m^{-2}$)	$[Al_{cv-cvr}]$ ($\mu g \cdot L^{-1}$)	$[Al_{adsorbé}]$ ($\mu mol \cdot m^{-2}$)
	0	0	0	0	0	0
	25	0.44	150	1.9	25	2.0
	50	0.70	200	1.3	50	2.6
	100	0.24	400	1.0	100	3.2
	150	0.34			150	11.0

Puisque l'accumulation de l'Al cellulaire se déroule normalement à plus long terme, nous pouvons vérifier l'effet des concentrations en Al_{cv-cvr} sur la concentration en Al cellulaire après 4 jours de contact (tableau 6.2). Pour les pH et les $[Al_{cv-cvr}]$ où il n'y avait pas d'effet significatif sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa on observe effectivement un effet de gamme dû à la $[Al_{cv-cvr}]$, c'est-à-dire que l'accumulation intracellulaire augmente avec la concentration en Al_{cv-cvr} dans le milieu sauf encore une fois au pH 4.3 où les $[Al_{cellulaire}]$ sont très faibles.

. Effet du pH sur la concentration en Al adsorbé et cellulaire

Afin de vérifier si le pH avait un effet à la fois sur l'adsorption et sur l'accumulation intracellulaire d'Al, nous avons comparé les valeurs obtenues d' $Al_{\text{adsorbé}}$ et d' $Al_{\text{cellulaire}}$ pour une même $[Al_{\text{cv-cvr}}]$ n'ayant pas d'effet significatif sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa (sauf *) selon les différents pH testés.

	pH	t=4 heures [$Al_{\text{adsorbé}}$] ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$)	t=4 jours [$Al_{\text{cellulaire}}$] ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$)
25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $Al_{\text{cv-cvr}}$	4.3	0.44	0.46
	5.0	0.65	4.30
	5.5	7.47	8.93
100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $Al_{\text{cv-cvr}}$	4.3	0.24	0.48
	4.6	2.25	4.50
	5.0	2.67	22.30
	5.2*	1.26	46.4

Comme on l'on avait observé avec le Mn (Chapitre 4), l'adsorption de l'aluminium semble augmenter en fonction du pH. Puisque l'estimation de l'aluminium adsorbé est fonction des concentrations en aluminium mesurées avant et après extraction, et considérant la difficulté des mesures de l'Al, il se peut que des variations élevées camouflent un peu cette tendance. De plus, pour ce qui est de l' $Al_{\text{adsorbé}}$ les estimations ont été réalisées après 4 heures de contact et les $[Al_{\text{adsorbé}}]$ mesurées sont assez faibles. L'évolution de la croissance de Chlorella pyrenoidosa aurait pu amener aussi un biais dans l'évaluation de l'Al adsorbé.

. Évolution temporelle

Si on compare les proportions relatives de l'aluminium adsorbé et de l'aluminium cellulaire après 4 heures (4 h) de contact et après 4 jours de contact (4 j), il semble qu'en général le pourcentage d'aluminium extractible à l'EDTA augmente avec le temps; la surface cellulaire devient-elle moins adsorbante, donc moins compétitrice avec EDTA? Il ne faut pas oublier qu'à l'exception du pH 5.2, la croissance des algues n'était pas affectée significativement à la concentration d'aluminium ($Al_{cv-cvr} = 100 \mu g \cdot L^{-1}$)

pH	[Al] _{sol} ($\mu g \cdot L^{-1}$)	[Al] _{tot.} ($\mu mol \cdot m^{-2}$) 4h	[Al] _{cell.} ($\mu mol \cdot m^{-2}$)		[Al] _{ads.} ($\mu mol \cdot m^{-2}$)			
			4h	% 4j	4h	% 4j		
4.3	150	0.8	0.6	69	59	0.35	44	41
4.6	400	3	2.0	67	30	1.00	33	70
4.8	400	105	100	95	74	5	5	12
5.0	150	43	32	74	63	11	26	37
5.2	100	50	50	100	71	0	0	29
5.5	35	8.2	7.6	93	46	6	7	53
6.0	8	31	24	77	10	7	23	7

Notons que dans presque tous les cas où il y a un effet de l'Al très significatif sur la croissance, les concentrations en aluminium total, cellulaire ou adsorbé (toutes exprimées en $\mu mol \cdot m^{-2}$ de surface algale) diminuent entre $t = 4 h$ et $t = 4 j$. Ce phénomène a déjà été observé par Bates et al. (1983) pour le zinc. Ces

auteurs, qui travaillaient aussi avec une algue verte unicellulaire, ont observé que les concentrations en zinc extractible à l'EDTA et le flux de zinc à travers la membrane cellulaire diminuaient tous deux à mesure que la culture d'algues vieillissait. Ces auteurs ont aussi montré, à partir d'incubations de courtes durées d'algues dans des solutions contenant du Zn, que la capacité des cellules à accumuler des métaux à différentes étapes de leur cycle de croissance diminuait à mesure que les cultures d'algues vieillissaient. Les constantes de taux de transport du zinc diminuaient légèrement avec l'âge de la culture. Le nombre de sites de fixation par unité de surface des cellules diminuait de façon marquée avec l'âge de la culture, comme c'était le cas pour les valeurs obtenues pour le zinc adsorbé.

Les groupements fonctionnels différents, présents à la surface cellulaire et ayant des caractéristiques de liaison différentes (Crist et al., 1981), peuvent varier en importance selon l'étape de la croissance. Les groupements fonctionnels peuvent changer conséquemment à la variation de la composition chimique de la cellule lors des différents stages du cycle de croissance. Ainsi, Lukiewicz et Korohoda (1965) ont montré que la migration électrophorétique de Chlorella variait durant sa croissance; les cellules en pleine croissance montraient une forte densité de charges négatives à la surface cellulaire, alors que la densité des charges négatives diminuait avec une diminution du taux

de croissance. Ces changements de la densité des charges étaient attribués aux altérations des protéines et des polysaccharides constituant la membrane cellulaire, au cours de la croissance de Chlorella.

Une telle diminution de la densité des charges négatives avec le vieillissement de la culture en batch indique que la surface de la membrane est modifiée durant la croissance: la diminution de l'adsorption d'aluminium à la surface cellulaire (figure 6.3) est peut-être reliée à ce type de changement de structure.

L'excrétion de matière organique dans le milieu de culture durant différents stades de croissance peut aussi jouer un rôle dans l'évolution temporelle des valeurs d' Al_{total} , d' $Al_{cellulaire}$ et d' $Al_{adsorbé}$ (McKnight et Morel, 1979; Butler et al., 1980; Laube et al., 1980), tout comme une perte de métaux des cellules durant la phase stationnaire (Hayward, 1969; Davies, 1973; Skaar et al. 1974; Cossa, 1976; Schulz-Baldes et Lewin, 1976; Butler et al. 1980; Laube et al. 1980). D'une autre façon, les changements de la composition chimique de la population du phytoplancton durant son cycle de croissance en culture en lot (Healey, 1973) peuvent influencer le degré d'accumulation des métaux traces (Davies 1973; Skaar et al., 1974). Les métaux traces par eux mêmes peuvent

affecter la composition chimique des cellules algales à tout temps durant le cycle de croissance en interférant directement ou indirectement avec la prise de nutriments (Rana et Kumar, 1974; Cloutier-Mantha et Harrison, 1980; Rueter et Morel, 1981; Rueter, 1983) ou le métabolisme (Conway, 1978).

6.2.3.2 Al polymère

La bioaccumulation totale de l'Al polymère après quatre jours d'exposition est exprimée à la figure 6.4 (moyenne de trois essais en parallèle). Encore une fois la prise en charge de Al par Chlorella pyrenoidosa augmente avec le pH. Notons que les résultats présentés sur cette figure correspondent à la bioaccumulation attribuable à l'aluminium polymère; pour chacun des pH testés la bioaccumulation d'aluminium à partir de l'aluminium monomère (Al_{cv-cvr}) a été soustraite de la valeur de la bioaccumulation totale.

Les courbes de prise en charge de l'aluminium polymère sont présentées à la figure 6.5 pour la concentration en Al polymère maximale testée. Notons qu'à ces concentrations, l'inhibition de croissance de Chlorella pyrenoidosa était très élevée. Comme c'était le cas avec l'aluminium monomère, la portion d'aluminium adsorbé ou extractible à l'EDTA est généralement mineure par rapport à l'aluminium cellulaire. Si on retourne au tableau 6.2, et qu'on compare les quantités d'aluminium extractible à l'EDTA pour les concentrations en Al polymère testées, on observe que l'estimation de la quantité d'Al adsorbé n'augmente pas en fonction de l'Al polymère dans le milieu. On peut penser ici, soit que l'Al-polymère ne s'associe pas ou peu à la surface des algues (ce qui semble peu probable), soit que l'Al polymère s'y associe mais que l'extraction à l'EDTA s'avère inefficace parce que les liens Al_{13} -cellule sont trop forts.

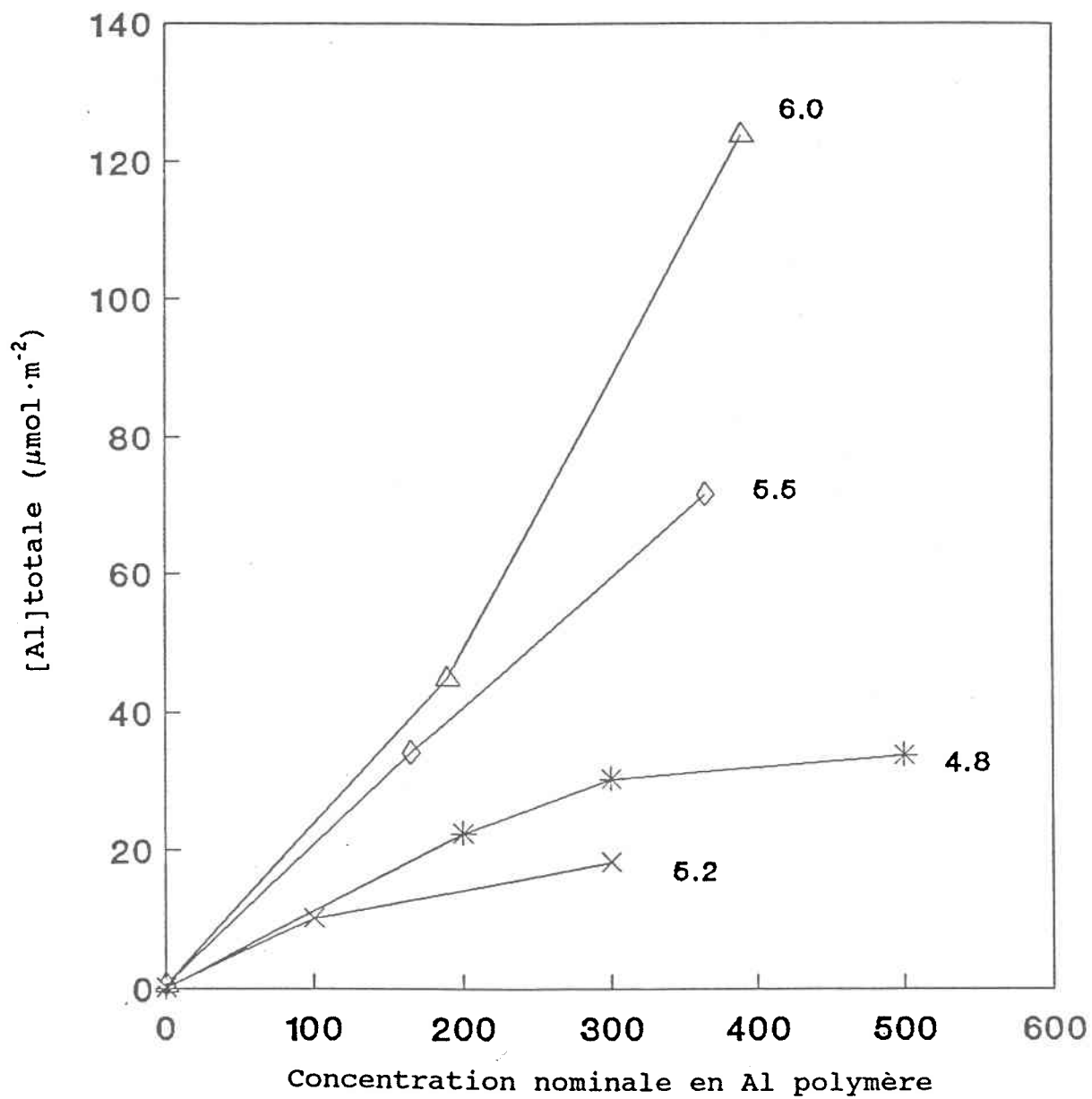


Figure 6.4: Bioaccumulation totale d'Al polymère par Chlorella pyrenoidosa après 4 jours de contact. (Moyennes pour chacune des concentrations nominales en Al_{polymère} pour différents pH).

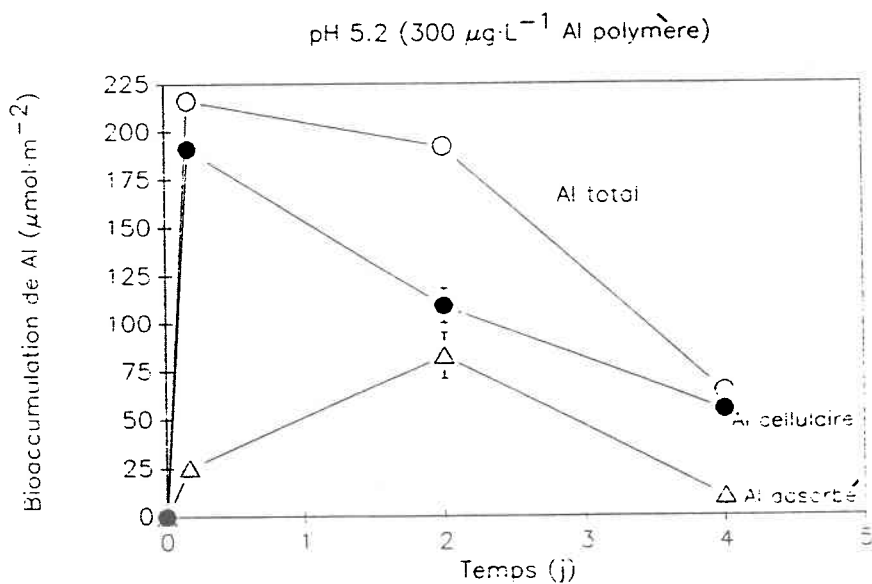
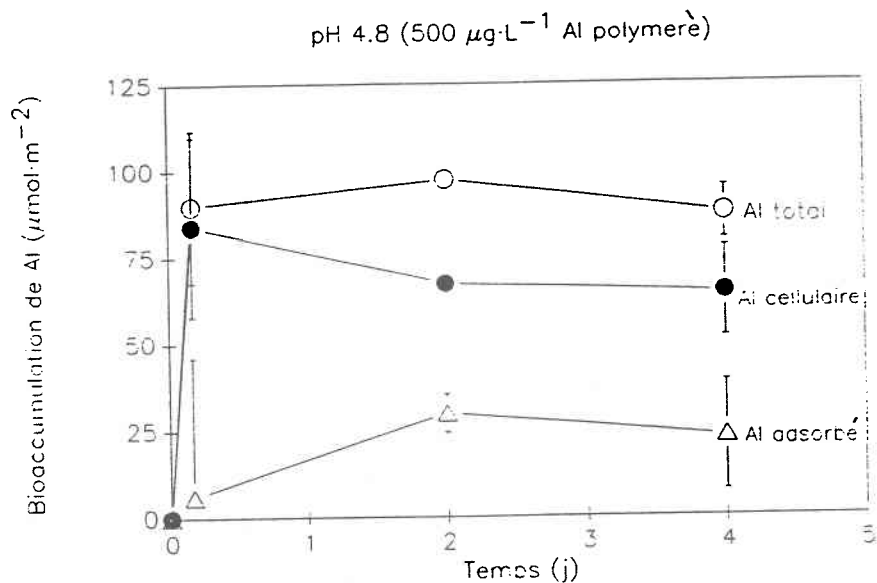


Figure 6.5: Courbes de prise en charge de l'aluminium polymère par *Chlorella pyrenoidosa*. (Moyennes et écart type pour chacune des concentrations maximales en $\text{Al}_{\text{polymère}}$ testées pour différents pH).

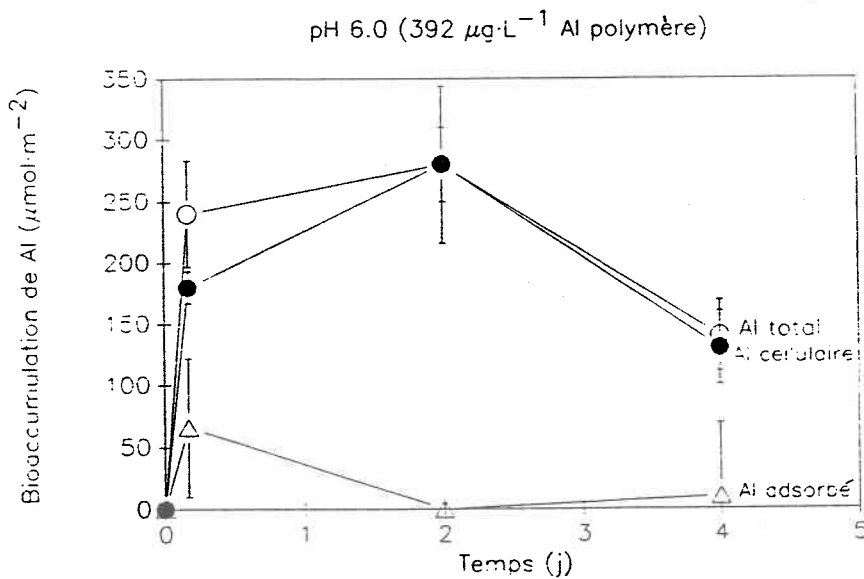
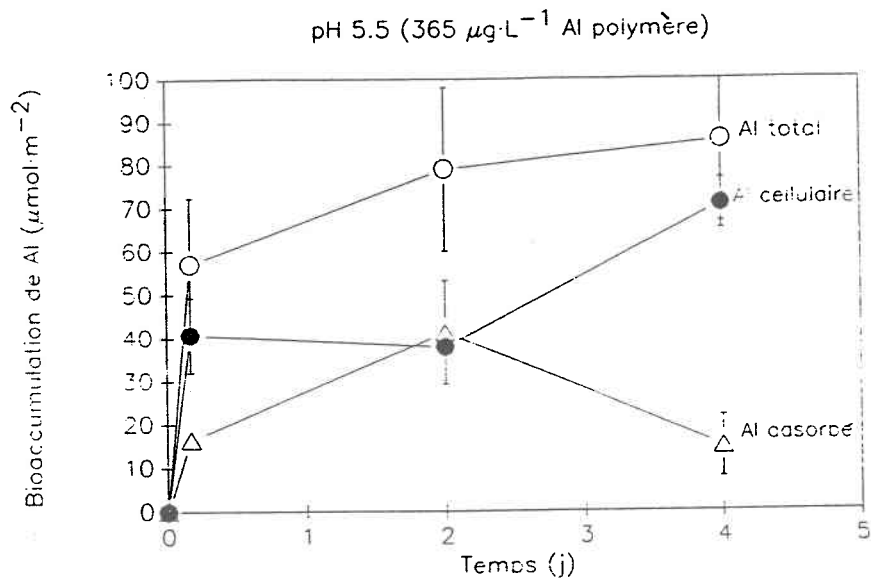


Figure 6.5: Courbes de prise en charge de l'aluminium polymère par Chlorella pyrenoidosa. (Moyennes et écart type pour chacune des concentrations maximales en $\text{Al}_{\text{polymère}}$ testées pour différents pH).

6.2.3.3 Al organique

La prise en charge d'aluminium en milieu organique est présentée à la figure 6.6; pour fin de comparaison, la prise en charge en milieu inorganique (avec la même concentration nominale en Al-monomère inorganique) y est aussi illustrée. L'adsorption de l'Al est similaire dans les deux types de milieux mais la bioaccumulation totale et la bioaccumulation cellulaire de l'Al sont sensiblement plus élevées dans le milieu inorganique après quatre jours d'incubation. La cinétique d'accumulation s'avère elle aussi différente: la bioaccumulation totale et cellulaire est supérieure dans le milieu organique après 4 heures d'incubation mais atteint une saturation jusqu'à la fin des expériences, alors que dans le milieu inorganique, ces deux valeurs continuent à augmenter et éventuellement dépassent les concentrations finales mesurées dans le milieu organique.

Cette expérience a été reprise une deuxième fois et les résultats apparaissent à la figure 6.7. Cette fois-ci, on a représenté séparément la prise en charge totale, cellulaire et par adsorption pour les deux milieux. La cinétique mesurée s'est avérée semblable soit une prise en charge totale et cellulaire plus élevée après 4 heures de contact dans le milieu organique que dans celui contenant uniquement de l'Al inorganique mais un renversement de la situation survient après 72 heures (3 jours). Rappelons ici

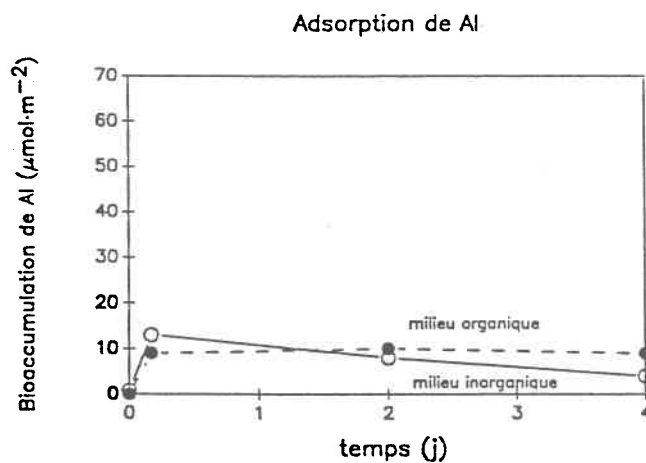
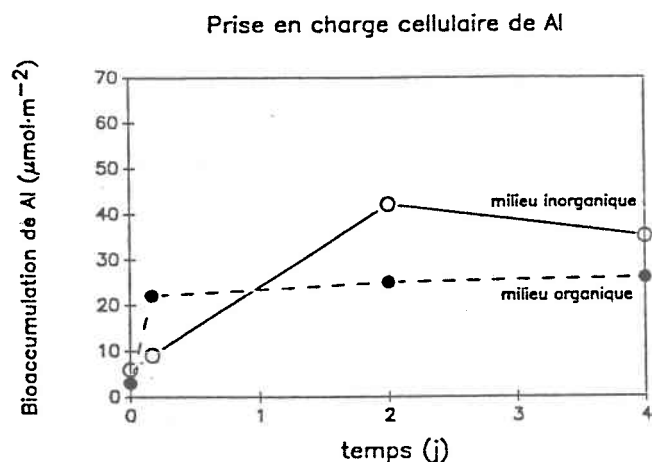
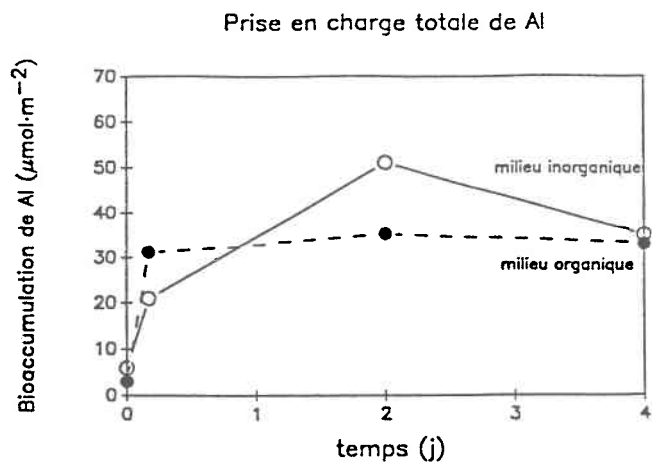


Figure 6.6: Evolution de la bioaccumulation de Al_{cv-cvr} ($150 \mu g \cdot L^{-1}$) et Al_{cvr} ($350 \mu g \cdot L^{-1}$) à pH 5.0. (Moyennes et écart type de trois essais simultanés; Al total: concentration totale en Al chez les algues; Al cellulaire: Al non extractible à l'EDTA; Al ads.= Al total - Al cellulaire).

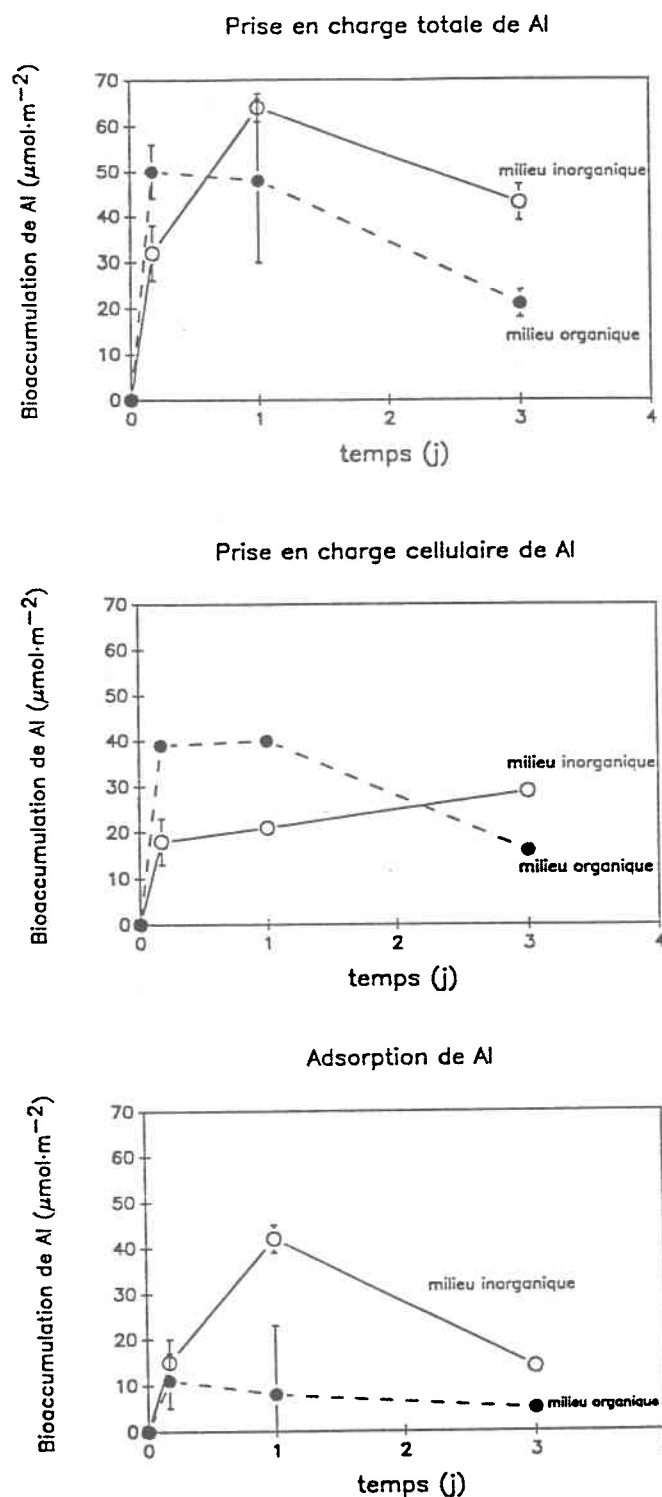


Figure 6.7: Evolution de la bioaccumulation de Al_{cv-cvr} (150 µg·L⁻¹) et Al_{cvr} (350 µg·L⁻¹) à pH 5.0. (Moyennes et écart type de trois essais simultanés; Al total: concentration totale en Al chez les algues; Al cellulaire: Al non extractible à l'EDTA; Al ads.= Al total - Al cellulaire).

que la croissance de Chlorella pyrenoidosa était diminuée significativement dans le milieu inorganique (<25%) par rapport à la culture témoin alors qu'elle ne différait pas du témoin dans le milieu organique (20 mg·L⁻¹ d'acide fulvique) (figures 5.14 et 5.15 du Chapitre 5: B vs D).

Suhayda et Haug (1984) ont démontré qu'un chélateur fort tel que le citrate pouvait prévenir la liaison de l'aluminium à la calmoduline lorsque le citrate était présent dans la solution avant qu'il y ait liaison entre l'aluminium et la protéine, et qu'il était en excès par rapport aux ions d'aluminium. Par contre une fois que l'aluminium est complexé avec la calmoduline, l'efficacité du citrate n'est que partielle dans la restauration de la calmoduline à sa structure initiale. Selon les mêmes auteurs, à des concentrations micromolaires, le citrate formerait probablement des chélates mononucléaires avec l'aluminium. La constante de stabilité pour le chélate mononucléaire citrate-aluminium est d'à peu près 10^8 M^{-1} , ce qui est un ordre de grandeur plus élevé que ce qui est mesuré pour le premier ion d'aluminium lié à la calmoduline. Les raisons apportées pour expliquer l'incapacité du citrate de restaurer complètement la calmoduline sont que: (a) après la liaison avec les ions d'Al, la calmoduline subit un changement de structure faisant en sorte que certains ions liés à la protéine deviennent inaccessibles à la chélation du citrate; (b) la liaison de l'aluminium change l'équilibre entre les

conformations hélicales de la calmoduline à cause du bris induit par le métal des liens hydrogènes intramoléculaires préexistants.

Freda et al. (1990) ont étudié le rôle de la complexation organique sur la toxicité de l'aluminium pour deux amphibiens: Rana pipiens et Bufo americanus. Dans des tests de toxicité impliquant des acides humiques et fulviques purifiés, Freda et al. (1990) ont observé que ces composés par eux mêmes ne pouvaient pas être des agents toxiques dans l'eau d'étang à teneur élevée en carbone organique dissous. Ces auteurs ont montré que les composés organiques se liaient aux membranes embryonnaires. De telles molécules organiques peuvent compétitionner avec les sites de liaison pour l'Al ou influencer la perméabilité de la membranaire vitelline. Tout comme nous, ces auteurs considèrent que la prise en charge d'aluminium en milieu organique ne s'avère pas un bon indicateur de la toxicité. Par ailleurs, Winner et Gauss (1986) n'ont pas non plus observé de corrélation positive entre la bioaccumulation par daphnie et la toxicité du Cu, du Cd et du Zn en présence d'acide humique. Selon nos résultats présentés au Chapitre 5, si la toxicité était fonction de la prise en charge on aurait dû obtenir une plus forte prise en charge dans le milieu inorganique que dans l'autre milieu ce qui n'est le cas qu'après 2-3 jours.

Il est difficile de concevoir le mécanisme de toxicité ou de détoxification dû à l'aluminium organique. En effet, selon les

courbes de croissance présentées à la figure 5.12, à aucun moment, n'a-t-on observé d'effet négatif de l'Al-organique sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa. Au contraire, la population d'algue croissait comme si le milieu était libre de tout aluminium. Pourtant les mesures de la prise en charge montrent que l'Al était effectivement disponible dans le milieu en question; en effet, la cinétique d'accumulation s'avère différente dans les deux milieux mais les quantités totales accumulées après 1 j d'exposition (avant que la croissance d'algues dans le milieu organique ne commence à se différencier de celle dans le milieu inorganique - voir figure 5.13) sont assez semblables (figures 6.7). Nos résultats suggèrent donc que la matière organique agit par un autre mécanisme sur le maintien du métabolisme et de la division cellulaire de Chlorella pyrenoidosa. Les prochaines parties de ce chapitre nous éclaireront sur ces mécanismes.

6.2.4.1 Mesure du flux cellulaire

Les bases biochimiques expliquant les interactions métaux-organismes sont assez complexes dues à une grande variété de réactions pouvant survenir aux niveaux moléculaire et cellulaire. Les espèces chimiques spécifiques pouvant être responsables des divers effets toxiques, ou étant impliquées dans la prise en charge, sont généralement les formes chimiques les plus actives, ce qui les rend alors plus difficiles à identifier et à quantifier (Folsom et al., 1986). Afin de vérifier quelle était la participation de la forme ionique libre d'aluminium (Al^{+3}) à sa prise en charge par une algue unicellulaire, nous avons mesuré le flux métallique dans une cellule ($\delta[Al]$ cellulaire après 4 heures d'incubation) selon la méthode décrite au Chapitre 4 pour le manganèse (tableau 6.3). De même, on a calculé le flux maximal de l'Al, $F_{max}(Al^{+3})$ à travers la couche de diffusion. Le rayon de Chlorella pyrenoidosa est de 6 μm , sa surface spécifique ($4\pi r^2$) équivaut à $4.52 \cdot 10^{-10} m^2$, et le coefficient de diffusion moléculaire de l' Al^{+3} est d'environ $5.59 \cdot 10^{-6} cm^2 \cdot s^{-1}$ à 25°C (Li et Gregory, 1974). La couche de diffusion est évaluée à 10 μm d'épaisseur (Whitfield et Turner, 1979) et la concentration en Al à la surface est considérée comme nulle ($C_s=0$). Cette option maximise le flux de diffusion calculé à la cellule.

Tableau 6.3: Mesure du flux cellulaire de Al^{+3} pour Chlorella pyrenoidosa et calcul du flux théorique maximal pour Al^{+3} .

pH	[Al] en solution ($\mu g \cdot L^{-1}$)			[Al] dans les algues	
	[Al] _{cv-cvr}	[Al ⁺³]	[Al ⁺³] (mol · m ⁻³)	flux _{théorique} (mol · m ⁻² · sec ⁻¹)	flux _{mesuré}
4.3	00	0	0	0	0
	25	20	$7.33 \cdot 10^{-8}$	$7.29 \cdot 10^{-8}$	$1.50 \cdot 10^{-11}$
	50	40	$1.47 \cdot 10^{-3}$	$1.46 \cdot 10^{-7}$	$3.19 \cdot 10^{-11}$
	100	79	$2.94 \cdot 10^{-3}$	$2.92 \cdot 10^{-7}$	$6.30 \cdot 10^{-11}$
	150	119	$4.41 \cdot 10^{-3}$	$4.38 \cdot 10^{-7}$	$4.16 \cdot 10^{-11}$
4.6	0	0	0	0	0
	100	66	$2.45 \cdot 10^{-3}$	$2.44 \cdot 10^{-7}$	$1.45 \cdot 10^{-10}$
	150	99	$3.68 \cdot 10^{-3}$	$3.66 \cdot 10^{-7}$	$1.39 \cdot 10^{-10}$
	200	166	$6.13 \cdot 10^{-3}$	$6.10 \cdot 10^{-7}$	$2.64 \cdot 10^{-10}$
	400	331	$1.23 \cdot 10^{-2}$	$1.22 \cdot 10^{-6}$	$5.07 \cdot 10^{-10}$
4.8	0	0	0	0	0
	200	108	$3.98 \cdot 10^{-3}$	$3.96 \cdot 10^{-7}$	$1.04 \cdot 10^{-9}$
	400	215	$7.96 \cdot 10^{-3}$	$7.92 \cdot 10^{-7}$	$6.94 \cdot 10^{-9}$
5.0	0	0	0	0	0
	25	10	$3.63 \cdot 10^{-4}$	$3.61 \cdot 10^{-8}$	$1.28 \cdot 10^{-10}$
	50	20	$7.26 \cdot 10^{-4}$	$7.22 \cdot 10^{-8}$	$2.59 \cdot 10^{-10}$
	100	39	$1.45 \cdot 10^{-3}$	$1.44 \cdot 10^{-7}$	$9.02 \cdot 10^{-10}$
	150	59	$2.17 \cdot 10^{-3}$	$2.16 \cdot 10^{-7}$	$1.36 \cdot 10^{-9}$
5.2	0	0	0	0	0
	100	21	$7.78 \cdot 10^{-4}$	$7.74 \cdot 10^{-8}$	$3.33 \cdot 10^{-9}$
5.5	0	0	0	0	0
	8	0.8	$2.96 \cdot 10^{-5}$	$2.92 \cdot 10^{-9}$	$3.02 \cdot 10^{-10}$
	15	1.6	$5.92 \cdot 10^{-5}$	$5.84 \cdot 10^{-9}$	$3.34 \cdot 10^{-10}$
	25	2.4	$7.80 \cdot 10^{-5}$	$8.76 \cdot 10^{-9}$	$4.49 \cdot 10^{-10}$
	30	3.2	$1.84 \cdot 10^{-4}$	$1.07 \cdot 10^{-8}$	$4.99 \cdot 10^{-10}$
	35	3.5	$1.11 \cdot 10^{-4}$	$1.11 \cdot 10^{-8}$	$5.58 \cdot 10^{-10}$
6.0	0	0	0	0	0
	8	0	$2.96 \cdot 10^{-6}$	$2.94 \cdot 10^{-10}$	$1.67 \cdot 10^{-9}$

Selon nos résultats (tableau 6.3), pour tous les pH, les flux mesurés sont inférieurs aux flux théoriques calculés à l'exception du pH 6.0 où $[Al^{+3}]$ est très petite. Le flux mesuré étant de loin inférieur au flux théorique maximal, on peut croire que la concentration de l'ion Al libre en solution suffise à maintenir la prise en charge de l'Al par Chlorella pyrenoidosa. A pH 6.0, le flux mesuré étant supérieur au flux calculé peut être expliqué par la contribution d'autres espèces d'aluminium en équilibre dans le milieu (cf. Schenck et al., 1988).

On a représenté à la figure 6.8, le flux cellulaire mesuré à différents pH en fonction de la concentration nominale initiale en Al dans les milieux d'exposition. Ces résultats démontrent que le flux cellulaire de l'Al en fonction de l'Al monomère inorganique (Al_{cv-cvr}) augmente avec le pH, et semble linéaire avec la concentration en Al_{cv-cvr} . Notons qu'aux faibles pH, cette linéarité n'est pas si évidente mais ce résultat serait peut-être dû aux très faibles concentrations mesurées après seulement 4 heures d'incubation. Il en va de même pour les concentrations en Al^{+3} (figure 6.9).

La diminution du pH de l'eau augmente la concentration des ions métalliques hydratés. Au même moment, cependant, il y a augmentation de la concentration des protons, lesquels peuvent compétitionner avec l'aluminium pour les molécules de transport dans la phase lipidique ayant pour résultat une plus faible prise en charge intracellulaire.

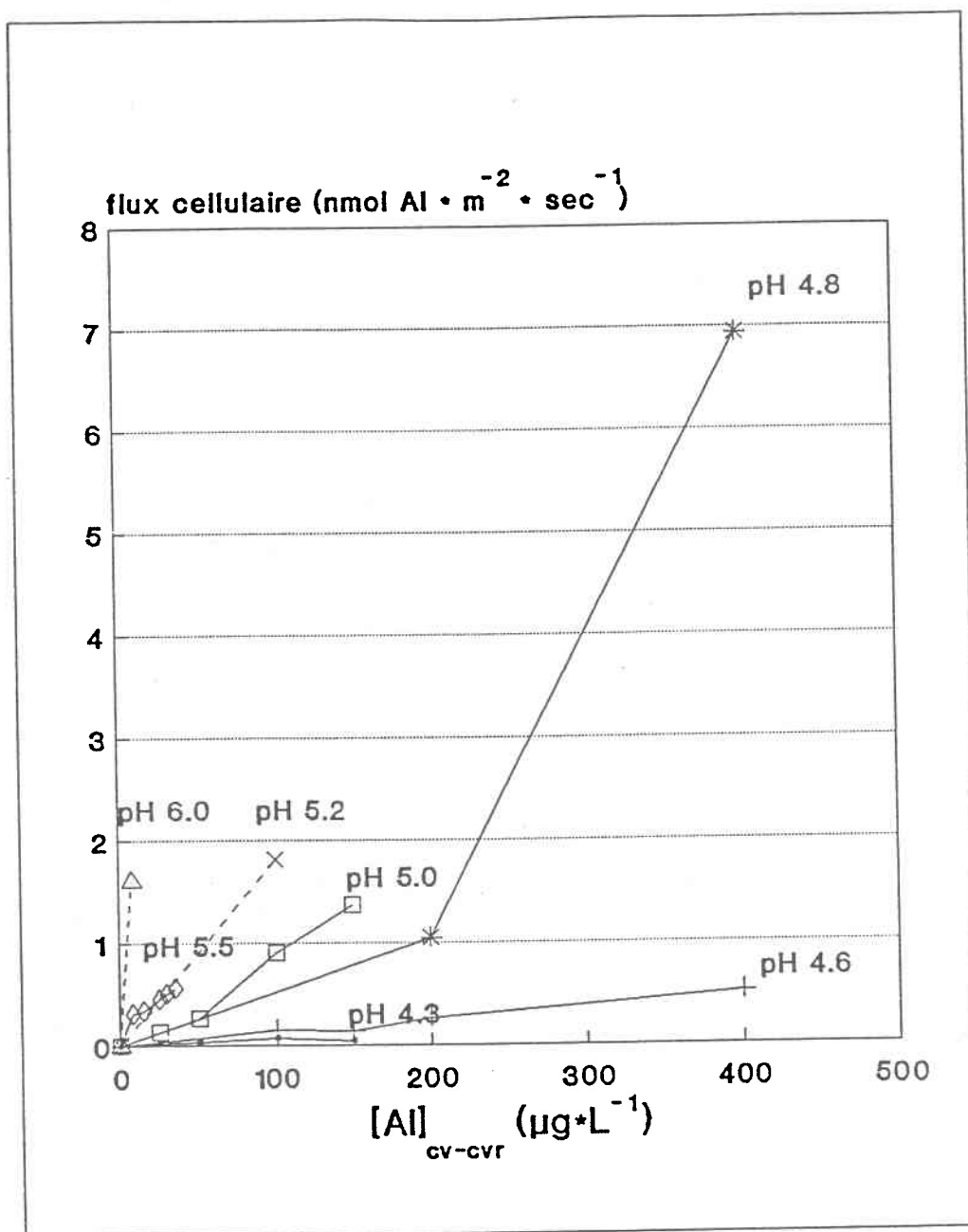


Figure 6.8: Flux cellulaire ($t = 0 \rightarrow 4h$) de Al mesuré à différents pH en fonction de la concentration nominale initiale en Al_{cv-cvr} dans les milieux d'exposition.

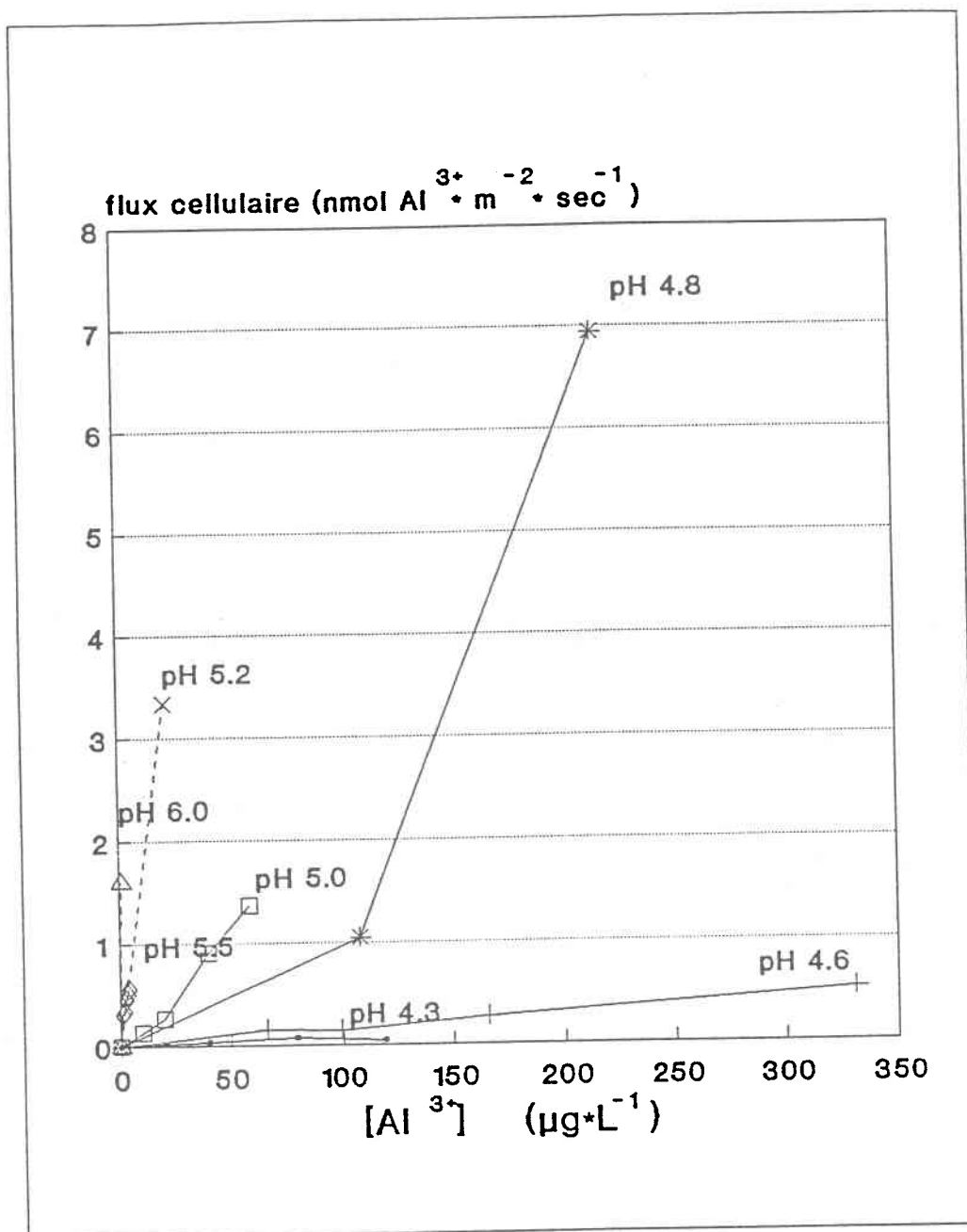
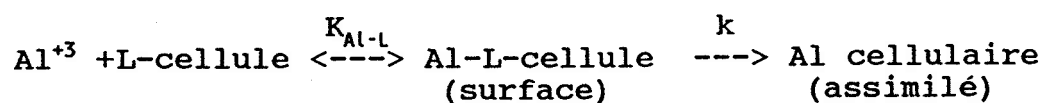


Figure 6.9: Flux cellulaire ($t=0 \rightarrow 4h$) de Al mesuré à différents pH en fonction de la concentration nominale initiale en Al^{3+} dans les milieux d'exposition.

Considérant la relation suivante:



où la bioaccumulation est fonction de la concentration en Al^{+3} et en ligands cellulaires disponibles, nous pouvons avancer que le flux cellulaire est fonction de la concentration du complexe Al-L-cellule:

$$\text{flux cellulaire} = k [\text{Al-L-cellule}]$$

$$\text{flux cellulaire} = kK_{\text{Al-L}} [\text{Al}] [\text{L-cellule}]$$

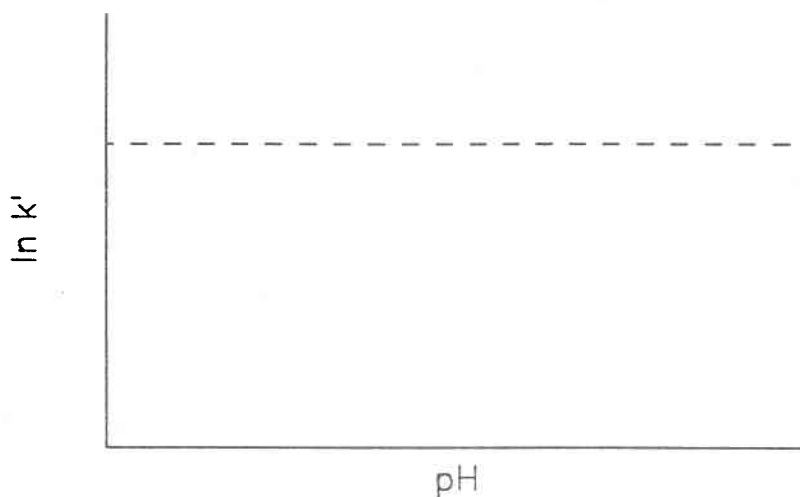
$$\text{où } [\text{Al-L-cellule}] = K_{\text{Al-L}} [\text{Al}][\text{L-cellule}]$$

$$\text{Ce qui devient: } \quad \text{flux cellulaire} = k' [\text{Al}] [\text{L-cellule}]$$

Le tableau suivant est construit pour évaluer k' pour chaque pH.

pH	flux mesuré (0--->4h) ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$)	$[\text{Al}^{+3}]$ calculée ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$)	$[\text{L}]$ calculé ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$)	$\ln k'$ ($\text{m}^4 \cdot \text{sec} \cdot \text{mol}^{-1}$)
4.3	$1.50 \cdot 10^{-11}$	$7.33 \cdot 10^{-4}$	0.066	15.98
4.6	$1.45 \cdot 10^{-10}$	$2.45 \cdot 10^{-3}$	0.074	15.03
4.8	$1.04 \cdot 10^{-9}$	$3.98 \cdot 10^{-3}$	0.079	13.62
5.0	$9.02 \cdot 10^{-10}$	$1.45 \cdot 10^{-3}$	0.084	12.81
5.2	$3.33 \cdot 10^{-9}$	$7.78 \cdot 10^{-4}$	0.089	10.94
5.5	$5.58 \cdot 10^{-10}$	$1.11 \cdot 10^{-4}$	0.096	10.86
6.0	$1.67 \cdot 10^{-9}$	$2.96 \cdot 10^{-6}$	0.110	6.27

Cette constante varie avec le pH avec un $R^2 = 0.964$. Lorsque cette valeur k' est exprimée en fonction du pH, on obtient la relation de la figure 6.10 où pour une même concentration en Al^{+3} et en L^- la prise en charge augmente avec le pH. Si l'effet du pH était purement d'ordre "chimique", c'est-à-dire, s'il agissait uniquement au niveau de la solution, et/ou des groupements L^- , on obtiendrait une droite indépendante du pH de ce type:



Le type de courbe obtenu ajoute aux considérations des effets du pH sur la membrane cellulaire. Il faut aussi noter que le calcul de $k' [Al^{+3}] \cdot [L^-]$ nécessite le calcul de la $[Al^{+3}]$ à chaque pH et puisque ce dernier calcul tient compte du pH, il se peut qu'on ait affaire à une corrélation partiellement fictive puisque le pH influence les 2 axes. Néanmoins, ces résultats laissent entendre que l'influence du pH sur la prise en charge d'aluminium est encore plus subtile que l'on aurait pu penser. Il se peut que le comportement acide-base des ligands cellulaires responsables du transport de

l'aluminium vers l'intérieur de la cellule diffère du comportement global de la surface algale (c'est-à-dire, que la variation en $[L]$ indiquée dans le tableau ci-haut ne reflète pas adéquatement l'influence du pH sur les groupements transporteurs de l'Al). Il est également possible que le pH influence directement la cinétique même du transport, c'est-à-dire qu'il affecte la valeur de la constante de vitesse "k".

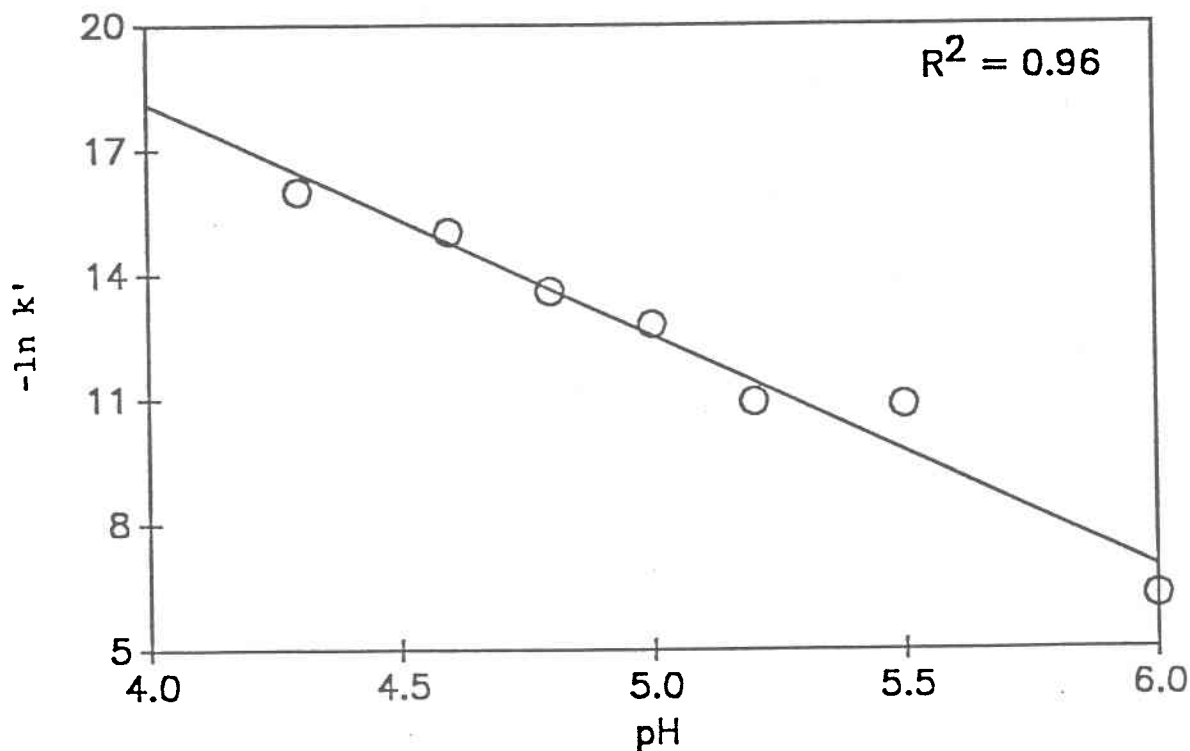


Figure 6.10: Relation entre le logarithme naturel de la constante de prise en charge de Al^{+3} et le pH, où $k' = \frac{\text{flux cellulaire}}{[Al^{+3}] [L]}$

6.2.4 Discussion générale

On a essayé dans ce chapitre d'expliquer la toxicité de l'aluminium observée au Chapitre 5 par sa prise en charge. On a étudié la toxicité de l'aluminium et la cinétique de sa prise en charge par une algue verte Chlorella pyrenoidosa, en utilisant un système qui nous permettait de contrôler la spéciation de l'aluminium dans le milieu et l'état physiologique des algues.

L'évaluation de la prise en charge de l'aluminium pour expliquer sa toxicité implique plusieurs problèmes logistiques. Tel que mentionné dans Simkiss et Taylor (1989), le métal qui entre dans une cellule peut à la fois agir sur une variété de réactions biochimiques ou bien tout simplement être détoxifié. Cependant, il est évident que le premier site d'interaction de l'aluminium est la membrane cellulaire. L'aluminium peut réagir directement avec des sites sensibles associés à la membrane ou peut passer à travers celle-ci et avoir son effet toxique dans le cytoplasme. Les interactions Al-membrane cellulaire sont donc toujours le premier indice déterminant de la toxicité de l'aluminium.

Pour comprendre la physiologie de la prise en charge de l'aluminium il faut connaître les voies d'entrée potentielles dans la cellule. La membrane cellulaire consiste en un assemblage de protéines, carbohydrates et lipides. Les lipides, lesquels comptent pour 25 à 80 % du poids de la membrane, sont

amphipathiques, c'est-à-dire qu'ils contiennent à la fois des régions hydrophobes et hydrophiles et sont arrangées en bicouches. Les régions hydrophiles sont orientées sur les surfaces libres de la membrane alors que les régions hydrophobes forment le centre de la couche. Les types de lipides présents dans la membrane varient beaucoup entre différentes cellules et organelles mais consistent principalement en phosphatidyl sérine, phosphatidyl choline, spingomyéline, des glycolipides et cholestérol. Une couche continue de ces lipides forme une barrière résistante pour le passage de tout ion hydraté (à cause des fortes interactions entre l'ion et les molécules d'eau) et demande la nécessité de déshydrater l'ion avant son passage dans la membrane.

Ces membranes contiennent aussi une variété de protéines. Dans le modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicholson (1972), ces protéines sont intégrées dans la bicouche lipidique. Ces protéines intégrées peuvent contenir des régions nonpolaires dans le coeur hydrocarboné de la bicouche lipidique et des régions polaires débouchant à la surface hydrophile. L'implication de cet arrangement est que les molécules protéiniques peuvent servir de voie de passage de faible énergie, laquelle peut favoriser le mouvement des molécules hydrophiles à travers la barrière hydrophobe de la bicouche lipidique.

La prise en charge de l'aluminium par les algues peut impliquer divers types d'interaction avec les membranes

biologiques. Par exemple, les lipides qui constituent la membrane comprennent des groupes phosphatés et carboxylés qui peuvent former des liaisons de coordination avec l'aluminium. Des interactions peuvent aussi se faire avec des protéines. Jusqu'à ce jour deux constituantes membranaires importantes ont été étudiées pour leurs interactions avec l'aluminium: la ferrichrome et la calmoduline (Haug, 1984). Plusieurs microorganismes produisent des agents chélateurs de fer appelés sidérophores (dont la ferrichrome), lesquels participent au transport du fer et sont probablement responsable de la solubilisation du fer extracellulaire. Une fois à l'intérieur de la cellule, le fer est relâché du ferrichrome par une réduction du Fe(III) au Fe(II). Alors le ligand libre du métal peut être réexcrété pour une autre prise de Fe. L'aluminium peut aussi former des chélates avec certains ferrichromes; ce type de chélate est également pris par les cellules mais la cellule ne peut pas dissocier le métal du cyclohexapeptide puisque l'aluminium ne peut être réduit à une forme bivalente.

Récemment on a émis l'hypothèse que le complexe formé entre la calmoduline et l'aluminium peut être une clé explicative de lésion qui expliquerait la toxicité de l'aluminium (Siegel et Haug, 1983a). A cause qu'une partie des effets toxiques de l'aluminium sont connus pour impliquer des interférences avec le métabolisme du calcium, et puisque la calmoduline est reconnue comme un peptide multifonctionnel dépendant du calcium et régulatrice pour une variété de réponses cellulaires, des changements induits par l'Al

de la structure et des fonctions de la calmoduline devraient avoir des répercussions sévères sur une multitude de fonctions cellulaires.

Afin de mieux comprendre le rôle joué par les différentes formes de l'aluminium (Al_{cv-cvr} , $Al_{polymère}$, $Al_{organique}$), on a calculé des facteurs de bioconcentration (FBC) après 4 jours de contact en fonction du pH et ce, pour chacune des concentrations en Al testées:

$$FBC = \frac{[Al]_{total \text{ dans les algues}}}{[Al]_{disponible}}$$

pH	FBC (m^{-2})		
	Al_{cv-cvr}	$Al_{polymère}$	$Al_{organique}$
4.3	0.13 à 0.41	-----	-----
4.6	0.86 à 1.62	-----	-----
4.8	0.86 à 3.63	1.82 à 3.01	-----
5.0	4.62 à 7.74	-----	1.62 à 2.53
5.2	9.8	2.49 à 2.73	-----
5.5	8.3 à 15.97	5.28 à 5.58	-----
6.0	20.67	6.3 à 9.21	-----

Le facteur de bioconcentration augmente avec le pH et est supérieur en milieu contenant uniquement de l'Al monomère inorganique. Quoique la bioconcentration de l'Al organique soit plus faible que l'Al_{cv-cvr} (même si elle a été corrigée pour l'Al_{cv-cvr}), il reste qu'elle n'est pas négligeable. Mentionnons de plus que la bioconcentration de l'Al polymère a été calculée en soustrayant la concentration de l'Al_{cv-cvr} de la concentration mesurée et en divisant le résultat par la concentration en Al polymère. Ainsi, les cellules en contact avec l'Al polymère étaient aussi en contact avec Al monomère inorganique. Tout comme il l'a été montré pour la toxicité au chapitre précédent, la bioaccumulation de l'Al polymère s'ajoute à celle de l'Al monomère inorganique et n'est pas négligeable.

A partir des CI₃₀ mesurées et estimées* au chapitre précédent, on a associé une bioaccumulation à partir de la figure 6.1 puisque les [Al]_{total} accumulées par les cellules varient linéairement avec la concentration en Al nominale en solution.

pH	CI ₃₀ (μg · L ⁻¹)	[Al] _{total} (μmol · m ⁻²)
4.3	1000*	7
4.6	700*	10
4.8	400	45
5.0	130	22
5.2	70	23
5.5	50	13
6.0	10	13

On peut donc suggérer que peu importe le pH, la concentration totale en Al accumulé par Chlorella pyrenoidosa provoquant une inhibition de croissance de 30% par rapport au témoin se situe autour de $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$.

Nous avons observé à partir de nos résultats que la prise en charge de l'Al se faisait très rapidement. Pettersson et al. (1985a) ont observé le même phénomène pour une algue bleu-verte (Anabaena cylindrica) et ont vérifié que l'aluminium était rapidement accumulé dans les vésicules de polyphosphates (4 h). Cependant une partie de l'aluminium était adsorbée sur les groupements négativement chargés de la membrane cellulaire. Ces auteurs ont amené l'hypothèse que puisqu'ils travaillaient dans des milieux riches en phosphates, le contenu en phosphate des murs cellulaires augmentait, ce qui expliquerait les niveaux élevés d'Al qui s'y trouvaient. Selon ces mêmes auteurs, les membranes semblent aussi un site important pour la toxicité de l'aluminium puisqu'ils ont observé la dégradation des thylakoides et la lyse des cellules.

Afin de mettre en évidence l'association entre la toxicité et la bioaccumulation, on a dressé le pourcentage de croissance de Chlorella pyrenoidosa par rapport au témoin en ordonnée et la bioaccumulation totale en abscisse (figure 6.11) pour chacun des pH en se servant des données du tableau 5.3 et du tableau 6.2.

A l'examen de la figure 6.11, on observe qu'à des pH > 4.8, la bioaccumulation de Al_{cv-cvr} explique bien ($R^2 = 0.65$) la toxicité de Al observée au Chapitre 5. Par contre la bioaccumulation de l'Al organique, quoique légèrement inférieure à l'Al inorganique, contraste nettement avec l'absence de toxicité observée au Chapitre 5.

Les expériences et les résultats décrits dans ce chapitre indiquent qu'en milieu inorganique la bioaccumulation de l'Al par Chlorella pyrenoidosa explique bien la toxicité de l'Al. Cependant, en présence de matière organique, la bioconcentration n'explique pas nécessairement l'absence de toxicité. On explique mal ce phénomène: il semble que même si l'Al est pris en charge par Chlorella pyrenoidosa en présence de la matière organique, qu'il n'ait pas d'effet délétère sur la cellule.

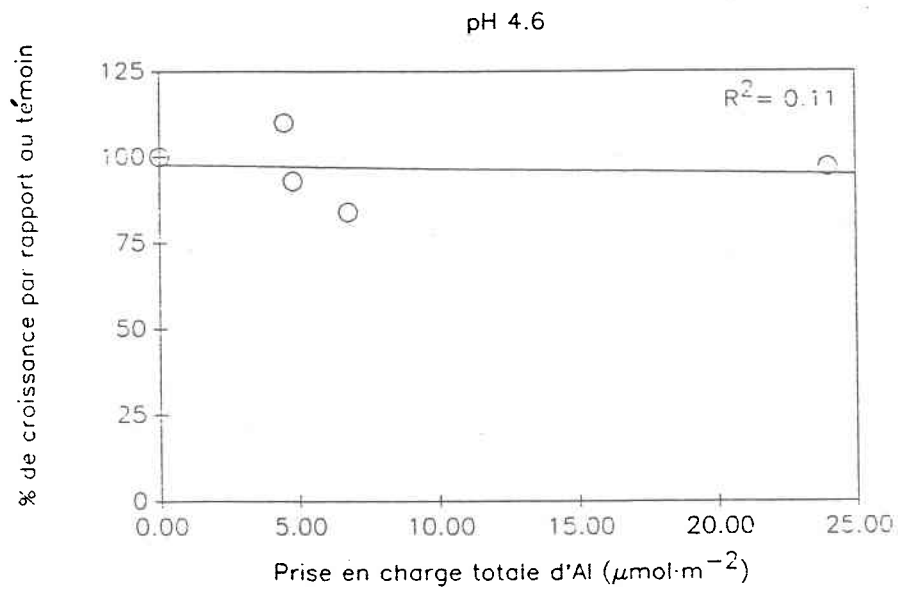
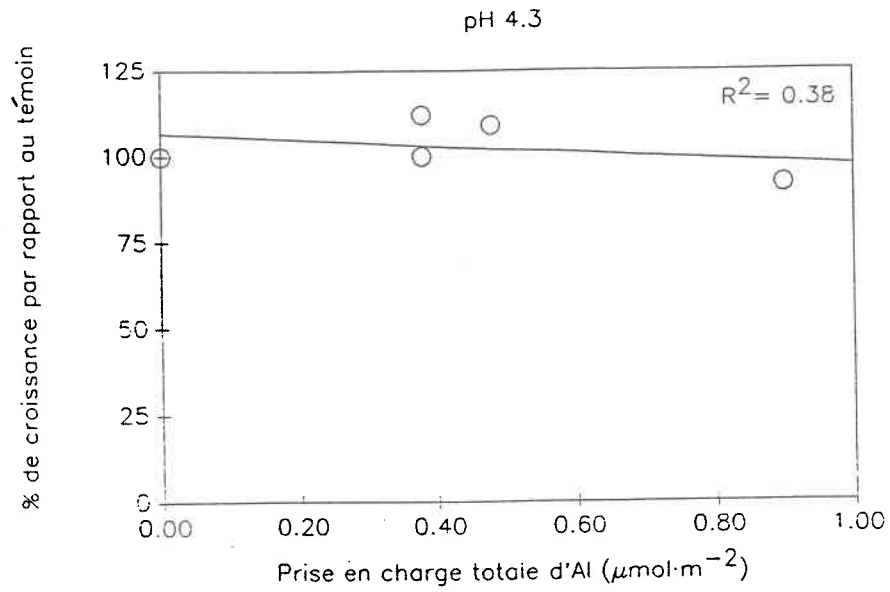


Figure 6.11: Pourcentage de croissance de Chlorella pyrenoidosa en relation avec la prise en charge d'aluminium pour chacun des pH testés.

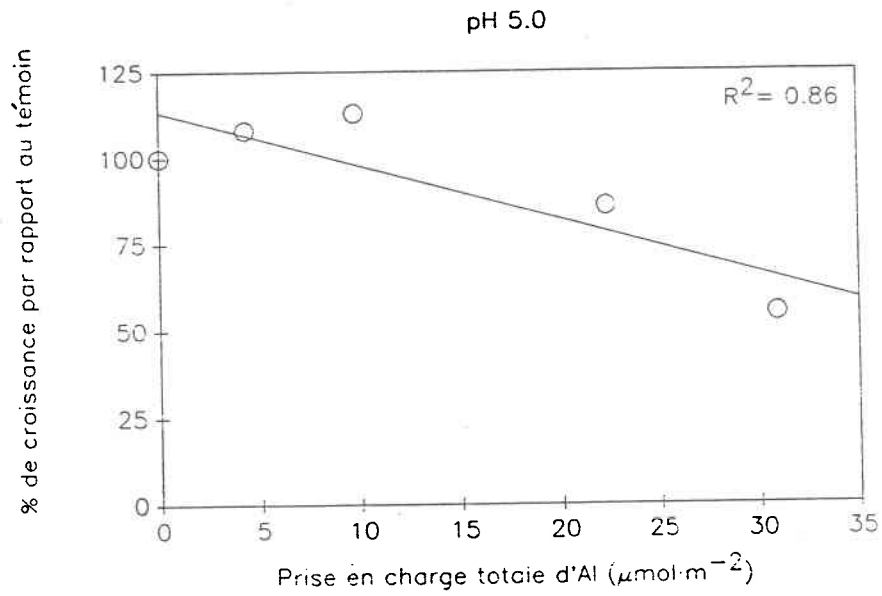
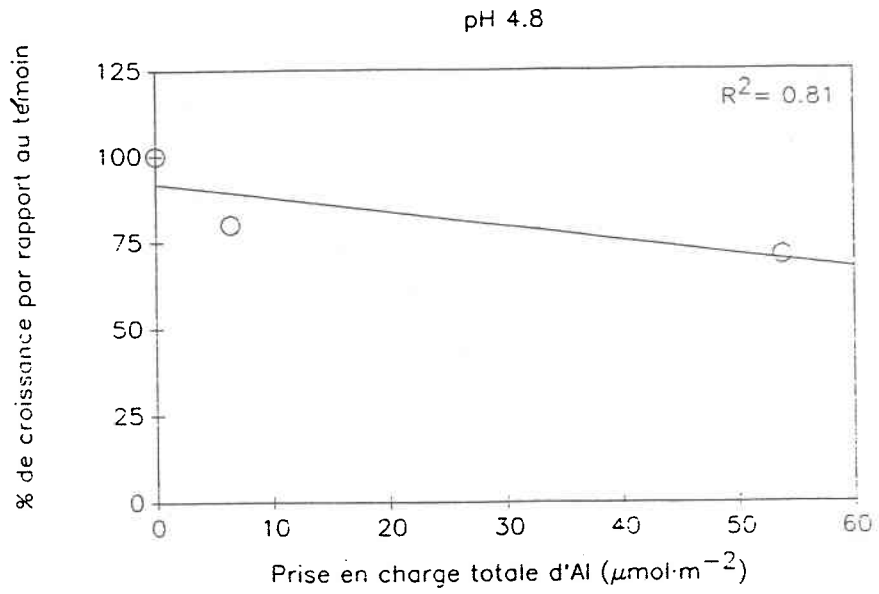


Figure 6.11: Pourcentage de croissance de Chlorella pyrenoidosa en relation avec la prise en charge d'aluminium pour chacun des pH testés.

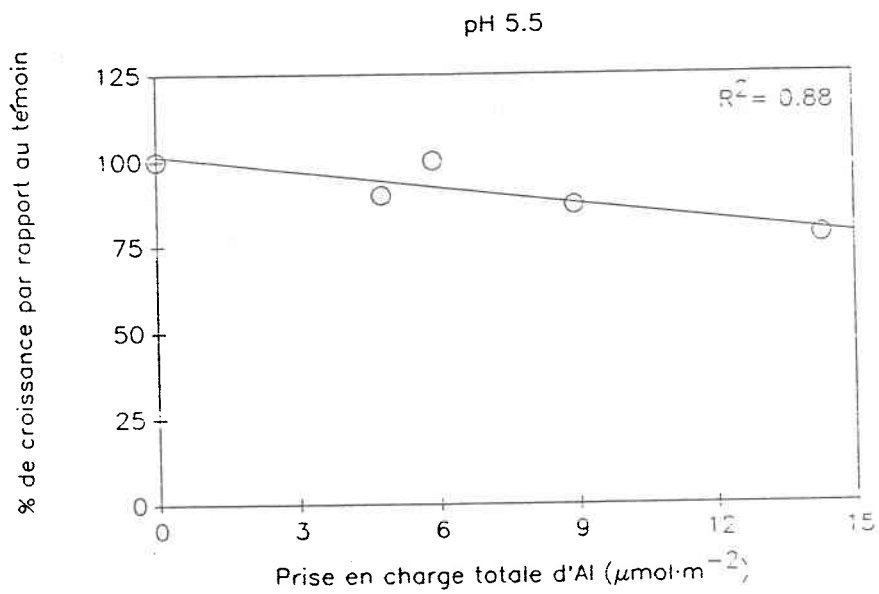
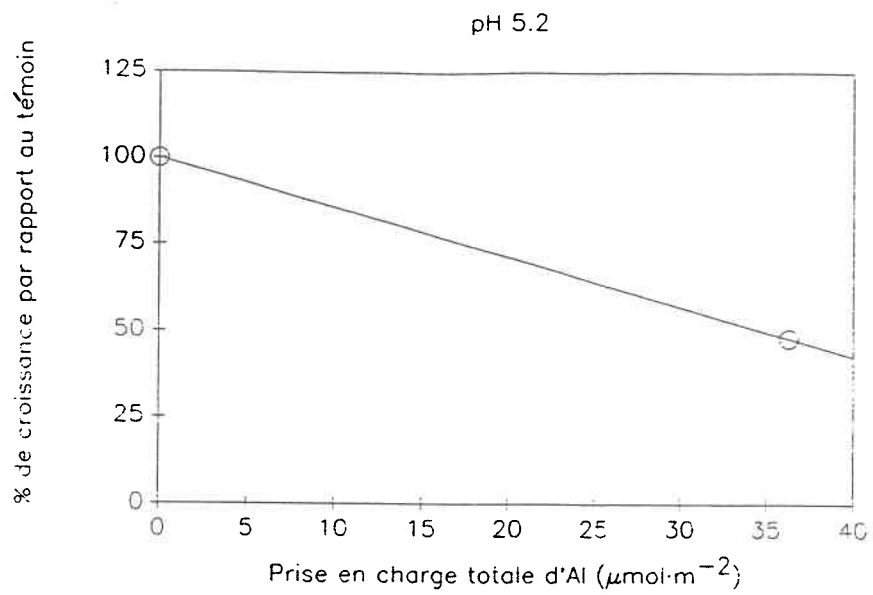


Figure 6.11: Pourcentage de croissance de Chlorella pyrenoidosa en relation avec la prise en charge d'aluminium pour chacun des pH testés.

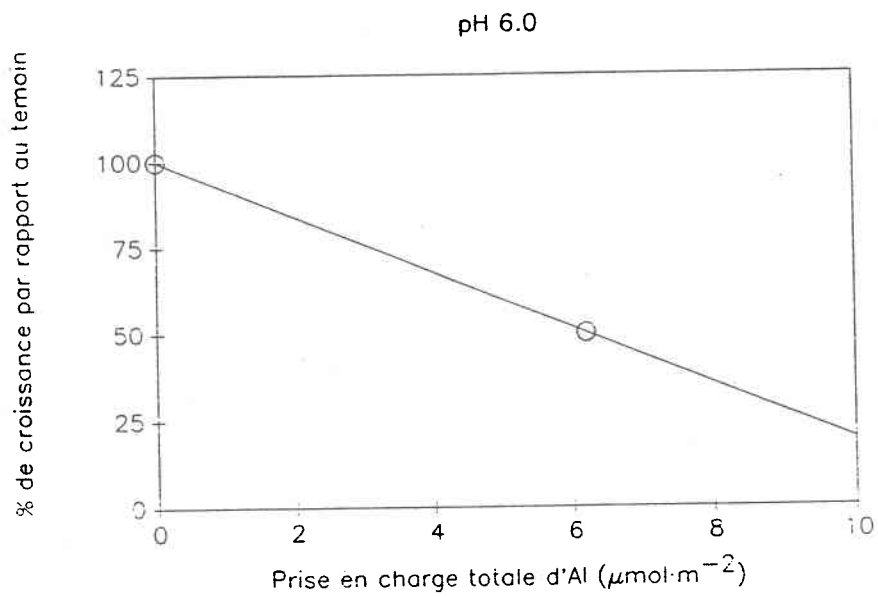


Figure 6.11: Pourcentage de croissance de Chlorella pyrenoidosa en relation avec la prise en charge d'aluminium pour chacun des pH testés.

6.3 Relation entre Al intracellulaire et P cellulaire

6.3.1 Introduction

Le but de cette partie est d'étudier le rôle des interactions Al-phosphore intracellulaire dans la régulation du taux de division cellulaire et de la densité cellulaire finale pour des cultures en lot de Chlorella pyrenoidosa.

Au chapitre 5, nous avons vérifié à différents pH, les effets de l'aluminium monomère inorganique, de l'aluminium monomère organique et de l'aluminium polymère sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa. Lorsque la période expérimentale était suffisamment longue, on a constaté que l'aluminium agissait non seulement sur le taux de division cellulaire mais aussi sur la biomasse finale, c'est-à-dire sur la densité cellulaire résultante à la phase plateau. Ce phénomène a déjà été documenté par Jensen et al. (1982) pour plusieurs espèces phytoplanctoniques.

Tout comme cela a déjà été observé par Bates et al. (1983) pour le zinc, nous amenons l'hypothèse que les polyphosphates cellulaires s'associent avec l'aluminium intracellulaire et que lorsque la concentration en polyphosphates cellulaires diminue avec l'âge de la culture, une partie de l'aluminium intracellulaire qui y était lié, est relâché dans la cellule jusqu'à dépasser un niveau

critique qui affecte le métabolisme du phosphore, interfère avec la division cellulaire et diminue la biomasse finale.

Nous tenterons de vérifier dans cette partie, si les diminutions de la croissance de Chlorella pyrenoidosa sont reliées à une baisse des concentrations en phosphore disponible due à une association phosphore-Al dans la cellule (précipitation) ou à un effet toxique direct de l'Al lorsque les polyphosphates cellulaires sont utilisés et que l'aluminium intracellulaire est relâché dans la cellule.

6.3.2 Matériel et méthodes

Tel que présenté au chapitre 2, le phosphore particulaire total (qui correspond au phosphore cellulaire) était mesuré à la dernière journée expérimentale (4 j) selon la méthode de Stainton et al. (1974). Il est exprimé en $\mu\text{g P}\cdot\text{cellule}^{-1}$ et en % par rapport aux cellules témoins. Les algues sont acclimatées dans un milieu ne contenant pas de phosphore. A ce moment cette privation n'affecte pas le métabolisme algal, car les algues utilisent le phosphore présent dans les réservoirs d'orthophosphates et de polyphosphates.

6.3.3 Résultats

Al monomère inorganique

Les taux de division cellulaire maximale (μ -max) de Chlorella pyrenoidosa n'étaient que très légèrement diminués, dans certains cas, par la présence d'aluminium monomère inorganique (figure 5.4, tableau 6.4). Ce n'est qu'à la concentration en Al_{cv-cvr} maximale employée qu'on observe une certaine baisse du taux maximal de croissance (pH 4.3, 5.0, 5.2 et 5.5). Au contraire, pour ce qui est des concentrations intermédiaires, on a observé quelques fois des taux de croissance plus élevée que le témoin (figure 6.12). Stauber et Florence (1989), qui ont étudié l'effet du cuivre et du plomb sur le taux de division cellulaire de Chlorella pyrenoidosa, ont au contraire mesuré une baisse de μ -max à des concentrations intermédiaires de plomb et une hausse à des concentrations supérieures. Ces auteurs expliquent cette diminution de toxicité par la précipitation du plomb dans leur milieu expérimental. Dans notre cas, les concentrations en Al_{cv-cvr} restaient sensiblement constantes tout au long de l'expérience.

Dans la majorité des cas, même où le taux de croissance n'était pas affecté par Al_{cv-cvr} , la densité cellulaire mesurée au début de la phase stationnaire diminuait aux concentrations en Al élevées (figure 6.13). L'atteinte de la phase plateau est

Tableau 6.4: Mesure du taux maximal de division cellulaire, du volume cellulaire moyen, de la densité cellulaire et du phosphore cellulaire à la phase stationnaire de croissance pour Chlorella pyrenoidosa.

pH	[Al]	μ_{max}	%	Volume m ³ /cell.	%	densité cellulaire	%	P/cellule $\mu\text{g}/\text{cell.}$	%
4.3	0	0.47		1.47E-15		544535		2.35E-08	
	25	0.44	94	1.57E-15	107	572560	105	2.30E-08	98
	50	0.51	109	1.45E-15	99	621207	114	2.49E-08	106
	100	0.42	89	1.46E-15	99	616387	113	2.27E-08	97
	150	0.29	62	1.45E-15	99	414307	76	3.18E-08	135
4.6	0	0.28		1.39E-15		290507		1.63E-08	
	100	0.26	93	1.86E-15	134	296927	102	2.16E-08	133
	150	0.20	71	1.87E-15	135	250707	86	1.66E-08	102
	250	0.25	89	1.90E-15	136	238427	82	3.04E-08	187
	500	0.31	111	1.48E-15	106	279300	96	2.23E-08	137
4.8	0	0.55		5.82E-16		993293		6.75E-08	
	400	0.61	111	7.49E-16	129	791573	80	8.46E-08	125
	600	0.56	102	7.73E-16	133	658800	66	1.31E-07	194
	700	0.50	91	8.12E-16	140	587213	59	1.29E-07	192
	900	0.38	69	8.57E-16	147	598587	60	1.30E-07	193
5	0	0.54		4.82E-16		1240000		9.49E-08	
	25	0.56	104	4.03E-16	83	1520000	123	7.74E-08	82
	50	0.50	93	4.12E-16	85	1450000	117	9.34E-08	98
	100	0.42	78	4.06E-16	84	1130000	91	1.32E-07	139
	150	0.20	37	8.73E-16	181	559000	45	2.34E-07	247
5.2	0	0.83		4.54E-16		1406427		5.62E-08	
	100	0.60	72	4.39E-16	97	833547	59	8.40E-08	150
	200	0.47	57	4.68E-16	103	525507	37	6.47E-08	115
	400	0.00	0	1.40E-16	31	272400	19	2.50E-07	444
5.5	0	0.54		1.43E-14		1240000		8.25E-08	
	8	0.69	128	1.01E-14	71	1220000	98	7.95E-07	964
	15	0.72	133	1.13E-14	79	1320000	106	7.50E-07	909
	25	0.76	141	1.17E-14	82	1150000	93	1.04E-06	1261
	35	0.50	93	1.07E-14	75	1080000	87	7.84E-07	950
5.5	0	0.55		4.12E-16		2001520		6.25E-08	
	35	0.51	93	3.77E-16	92	2854600	143	5.71E-07	914
	200	0.96	175	7.89E-16	192	1792000	90	7.48E-07	1198
	400	0.21	38	1.75E-15	425	233880	12	5.00E-07	801
6	0	0.84		1.66E-16		1125867		7.11E-08	
	10	0.85	101	1.70E-16	102	942013	84	7.86E-08	111
	200	0.09	11	1.61E-16	97	49653	4	1.05E-06	1474
	400	0.00	0	1.84E-16	111	21773	2	3.86E-06	5429
5	0	0.57		3.82E-16		1399560		4.85E-08	
	ac.fulvique	0.51		4.36E-16		1260080		5.41E-08	
	150	0.20	35	4.88E-16	128	942080	67	1.46E-07	300
	150+350org.	0.58	114	4.21E-16	96	1330040	106	4.57E-08	84

Taux maximal de croissance
en fonction de Al

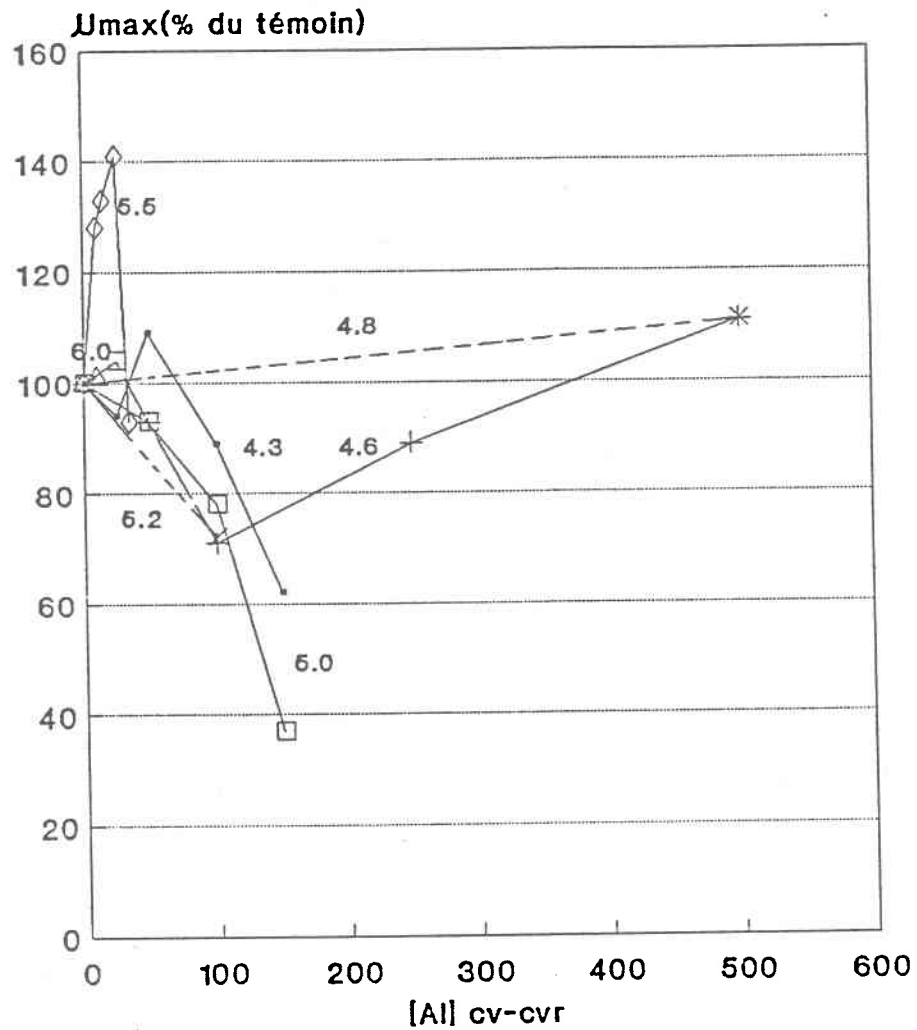


Figure 6.12: Taux maximal de croissance de Chlorella pyrenoidosa en fonction de la concentration en Al_{cv-cvr} et selon le pH (% par rapport aux cultures témoins).

Densité cellulaire au t=4 jours

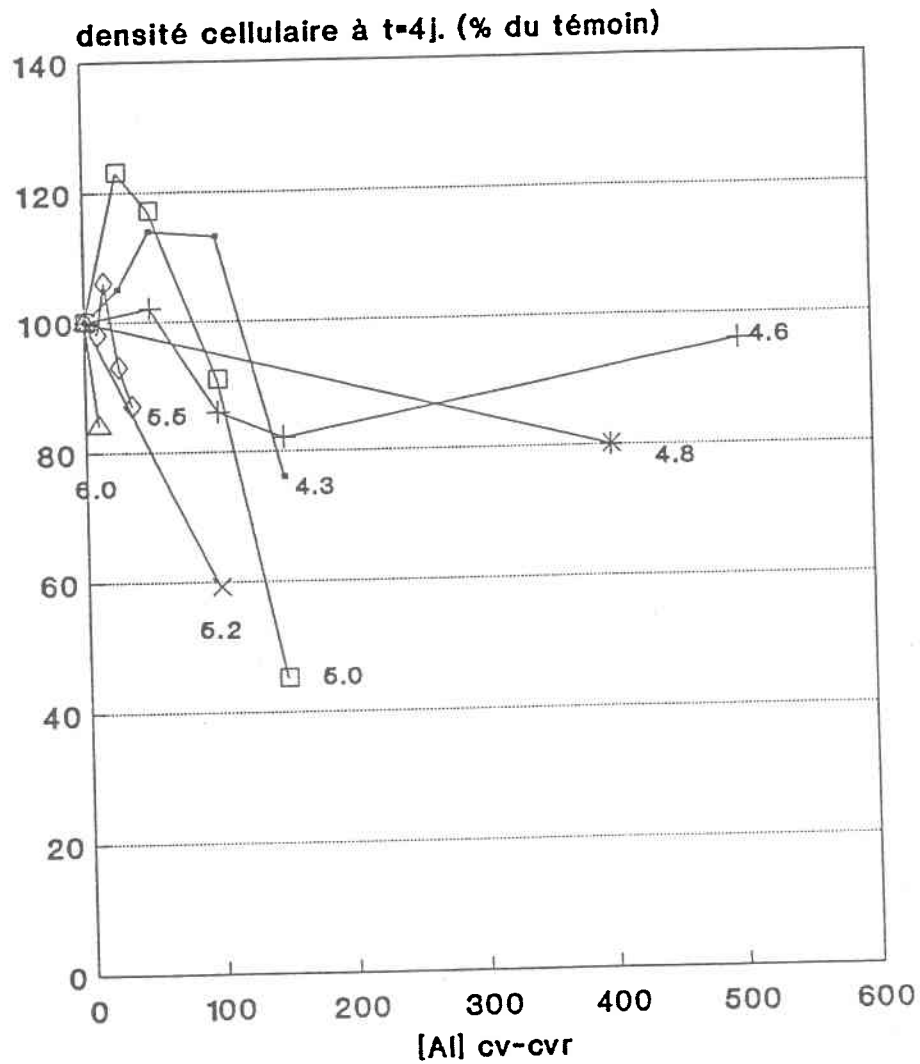


Figure 6.13: Densité cellulaire de Chlorella pyrenoidosa au temps= 4 jours, en fonction de la concentration en Al_{cv-cvr} et selon le pH (% par rapport aux cultures témoins).

souvent associée à un appauvrissement du milieu de culture en éléments nutritifs ou à une carence en phosphore. Cette carence en phosphore pourrait être expliquée par un épuisement des réserves intracellulaires en polyphosphates ou à une non disponibilité de ces réserves.

La concentration en phosphore particulaire total a été déterminée au jour 4 de l'exposition, ce qui correspondait souvent au début de la phase stationnaire. Dans tous les cas, les cellules exposées aux plus fortes concentrations en Al contenaient plus de phosphore particulaire total que les cellules témoins (figure 6.14).

A l'aide d'une microsonde à rayons X couplée à un microscope électronique à balayage on a tenté de vérifier si l'aluminium était entreposé dans les vésicules de polyphosphates ou dans la membrane ou dans le cytoplasme. Quoiqu'on obtenait un pic correspondant à l'aluminium pour l'ensemble de la cellule, les concentrations d'aluminium dans une vésicule s'avéraient trop faibles pour être distinguées. Pettersson et al. (1985b) n'avaient pas non plus obtenu de réponse pour des algues incubées dans un milieu ayant une concentration en Al de $19 \mu\text{M}$ ($513 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Par contre ces mêmes auteurs, à des concentrations dix fois plus élevées, ne détectaient pas d'Al dans le cytoplasme. Au contraire, les auteurs ont pu distinguer de l'aluminium dans les murs cellulaires et les vésicules de polyphosphates après 4 heures de contact. Des

Phosphore cellulaire au jour=4

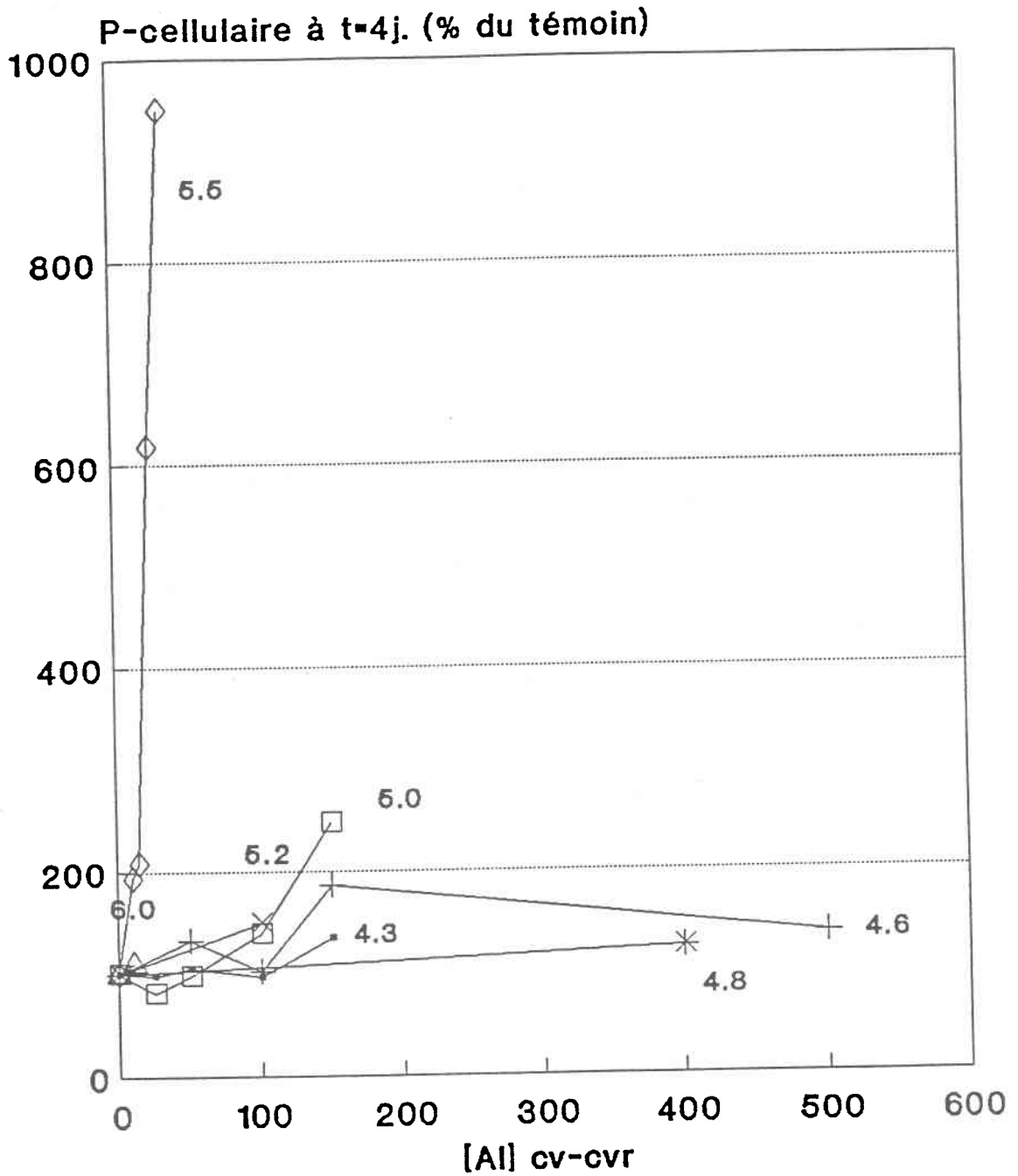


Figure 6.14: Phosphore cellulaire de Chlorella pyrenoidosa au temps= 4 jours, en fonction de la concentration en Al_{cv-cvr} et selon le pH (% par rapport aux cultures témoins).

incubations sous les mêmes conditions pour 24 heures ont résulté en une forte accumulation de l'Al dans les murs cellulaires mais pas dans les vésicules de polyphosphates.

Jensén et al. (1989) ont, pour leur part, observé que des plants de hêtre (Fagus sylvatica L.) exposés à l'aluminium (1.0 mM; pH 4.2) augmentaient, dans un premier temps, leur concentration en P inorganique dans les vacuoles. Cette augmentation était due apparemment à une diminution de la fixation métabolique des phosphates dans le cytoplasme et à un transfert subséquent des phosphates inorganiques aux vacuoles.

Al polymère

Contrairement à ce qui avait été observé pour l' $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$, le taux maximal de croissance est fortement influencé par l'Al polymère. Le taux maximal de croissance diminue avec la concentration en Al polymère (figure 6.15; témoin= $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ max). L'effet observé est drastique. Il semble en effet que l'Al polymère soit important et que l'effet se fasse sentir directement, peut-être, au niveau de la division des cellules. Tout comme le taux de croissance maximal, la densité finale cellulaire est très affectée par l'Al polymère de même que le phosphore intracellulaire (figure 6.16).

Al organique

Alors que le taux de division cellulaire est affecté un peu par $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ ($150 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) à pH 5.0, la présence d'Al organique ($350 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) diminue ces effets (tableau 6.4). En fait, pour tous les paramètres mesurés (μ -max, volume cellulaire, densité cellulaire et P cellulaire) il semble que la présence d'Al organique vienne contrer en totalité les effets de l'Al inorganique. Pour contrer tous ces effets, on peut supposer que l'action bénéfique se joue au niveau de la membrane cellulaire.

Taux maximal de croissance
en fonction de Al

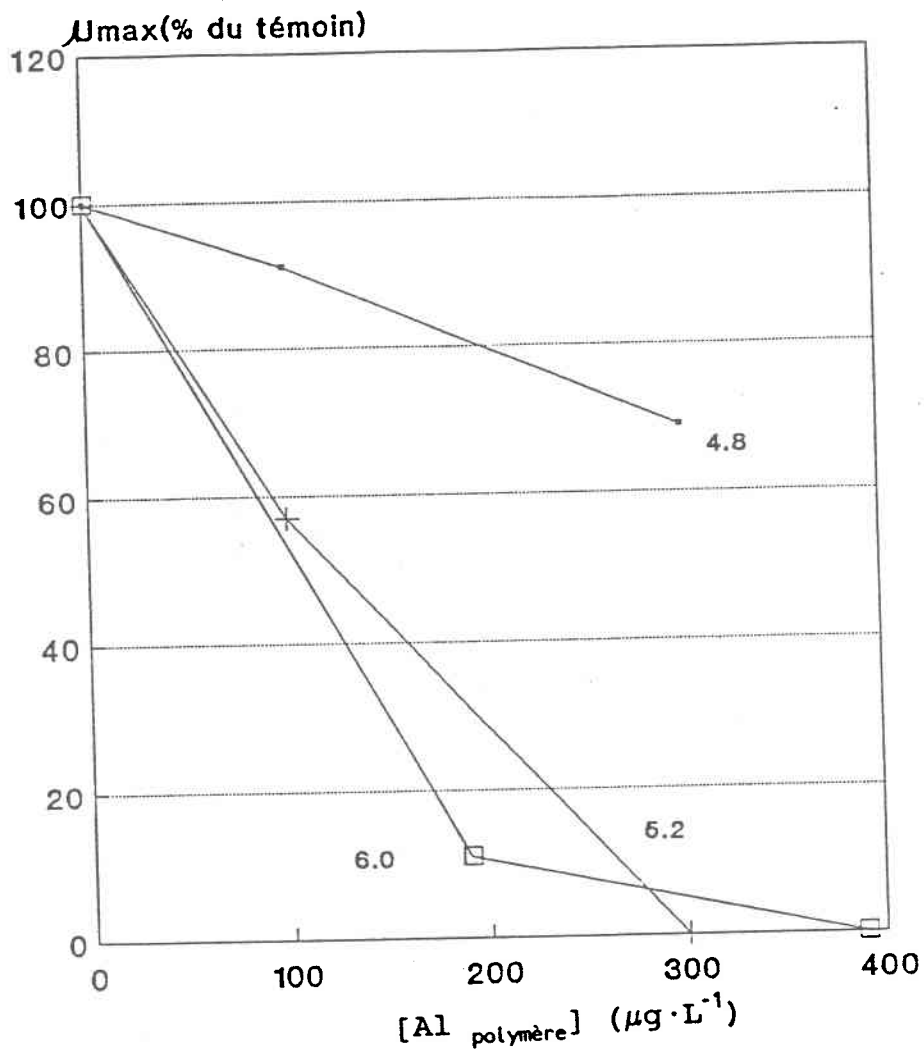


Figure 6.15: Taux maximal de croissance de Chlorella pyrenoidosa en fonction de la concentration en $\text{Al}_{\text{polymère}}$ et selon le pH (% par rapport aux cultures témoins $\text{Al}_{\text{cv-cvr max}}$).

Phosphore cellulaire en fonction de [Al]

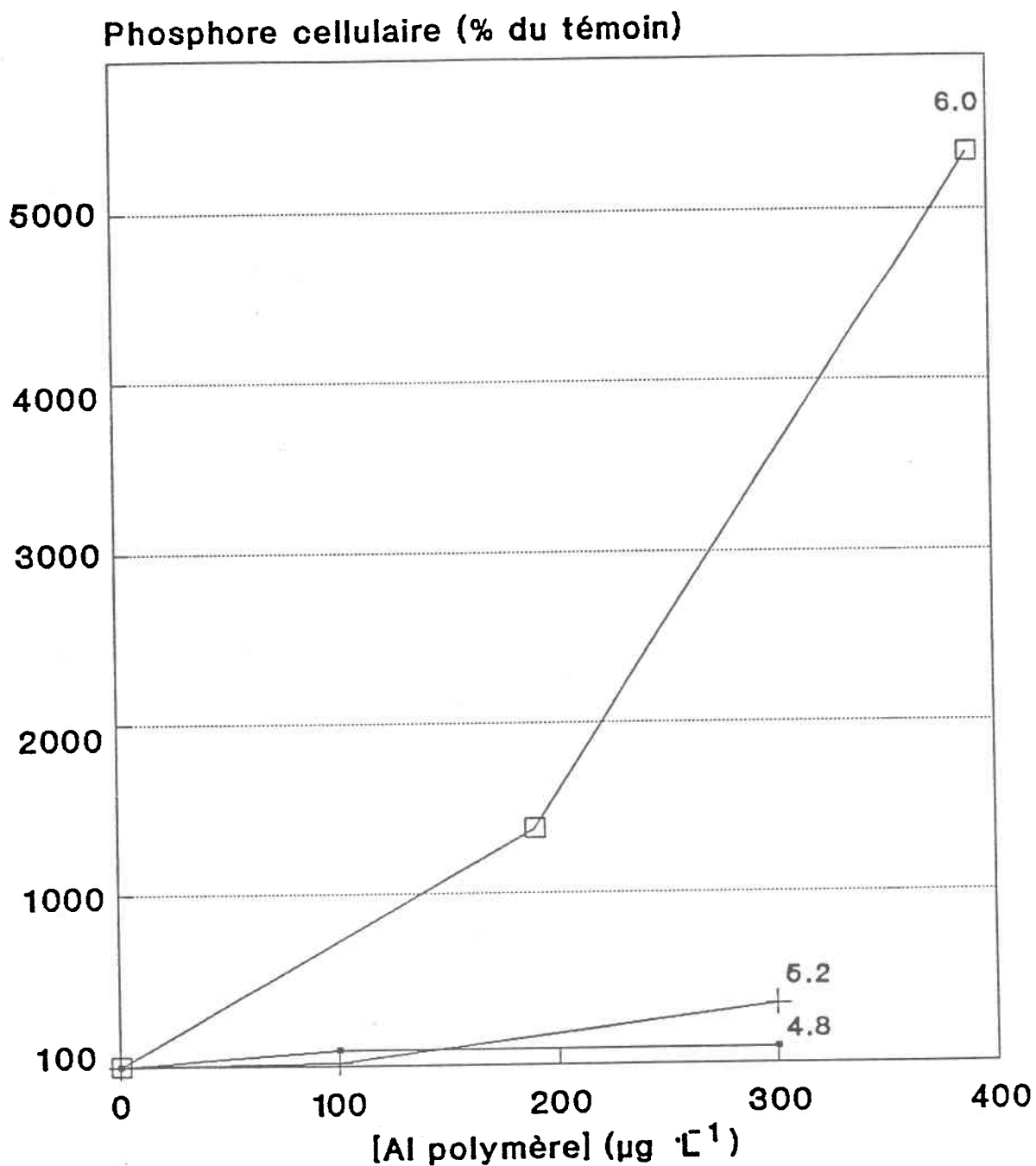


Figure 6.16: Phosphore cellulaire de *Chlorella pyrenoidosa* au temps= 4 jours, en fonction de la concentration en $\text{Al}_{\text{polymère}}$ et selon le pH (% par rapport aux cultures témoins $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ max).

6.3.4 Discussion

Al monomère inorganique

Des interactions possibles entre l'aluminium libre et le métabolisme du phosphore ont été examinées. On amène l'hypothèse qu'à de faibles concentrations en Al_{cv-cvr} les polyphosphates libres dans la cellule captent et détoxifient l'aluminium intracellulaire permettant le déroulement normal de la division cellulaire. Cependant, alors que la division cellulaire continue, le phosphore cellulaire diminue à cause de la mobilisation des polyphosphates pour la croissance cellulaire. Cette diminution peut relarguer l'aluminium qui avait déjà été lié à l'intérieur de la cellule, en empêchant ainsi la détoxification de tout autre Al transporté à l'intérieur de la cellule. Alors que l'Al cellulaire continue à augmenter, le niveau d'Al intracellulaire non lié peut devenir toxique et interférer avec la division cellulaire en ayant, par exemple, des effets inhibiteurs sur la phosphorylation (Clarkson, 1966).

Pour les concentrations en Al plus élevées, l'inhibition de l'Al sur la division cellulaire se fait plus tôt durant le cycle de croissance, c'est-à-dire, il affecte le taux de division durant la phase exponentielle de croissance. Il est possible que la précipitation de l'Al dans les vésicules de polyphosphates soit telle que le phosphore n'est tout simplement pas disponible pour

assurer la croissance cellulaire, ou que cet effet se joue au niveau de la membrane directement (rigidification par exemple).

Les vésicules de polyphosphates sont connues pour accumuler l'aluminium et elles augmentent apparemment leur nombre et leur taille sous des conditions de stress dues à l'exposition à un métal, en laboratoire et en milieu naturel (Bates et al., 1983). Jensen et al. (1982) suggèrent qu'ils agissent comme sites d'accumulation pour les métaux traces à de faibles concentrations et comme site de détoxification quand les métaux traces sont à un niveau toxique. La compartimentalisation des métaux lourds dans la membrane cellulaire et dans les granules de polyphosphates est bien connue pour les cyanobactéries (Jensen et al., 1982) et les algues marines (Pedersén et al., 1981). Si l'aluminium est localisé dans les vésicules de polyphosphates ça peut influencer la génération de phosphates d'énergie et engendrer la translocation d'autres ions. De plus, l'aluminium peut aussi être relâché et devenir toxique lorsque les vésicules de polyphosphates sont métabolisées.

D'après Rhee (1973), les polyphosphates règlent directement ou indirectement le taux de croissance. Les polyphosphates constituent en effet un réservoir de P essentiel (peuvent aussi être un réservoir énergétique). En effet, lors de déficiences en phosphates, tous les polyphosphates sont mobilisés pour la synthèse de macromolécules cellulaires (ADN, ARN, protéines). On a montré une relation hyperbolique entre le P-ARN et le taux de croissance,

ce qui permet de dire que les polyphosphates peuvent être des composés principaux contrôlant le taux de croissance, ainsi que la synthèse d'ARN ou d'autres composés cellulaires.

L'existence de poly-P, au $t=0$, indique la présence d'une concentration de P fonctionnelle dans l'algue, c'est-à-dire qui maintient la viabilité de la cellule sans nécessairement permettre la division cellulaire. Ce P fonctionnel peut être utilisé sous forme d'énergie (ATP) pour maintenir les hauts gradients de concentration des solutés internes ainsi que le turnover continu du matériel cellulaire (Rhee, 1973).

Al polymère

La toxicité de l'Al polymère sur le taux de croissance maximale peut être due premièrement à un "plaquage" de la surface de l'algue par l'aluminium lequel, on le sait, est largement chargé sous forme polymère. De plus, on peut croire à une forte association entre cet aluminium et le phosphore cellulaire, tel que démontré par nos résultats. L'aluminium fortement chargé semble agir directement sur les protéines et les lipides membranaires (Haug, 1984) affectant à la fois la perméabilité et le système de transport ionique membranaire. Il a été montré dans la littérature qu'il existe généralement un pourcentage en phosphore plus élevé dans les racines de végétaux supérieurs traités à l'Al comparativement à des racines non traitées (Mugwira et al. 1980;

Thornton et al., 1986; Bengtsson et al., 1988). Cependant, la plus grande partie de ce phosphore semble être inactivé par la précipitation de composés Al-PO₄ dans les murs cellulaires ou à la surface des racines (Wright et Donahu, 1953; Clarkson, 1967; McCormick et Borden, 1974). Cette inactivation peut amener une déficience en phosphore pour les réactions métaboliques. Une forte liaison de l'Al à la membrane cellulaire peut amener aussi une inhibition des enzymes qui y sont liés, comme l'ATPase-H⁺ (Caldwell et Haug, 1982), influençant alors le métabolisme cellulaire.

Al organique

Pour ce qui est de l'Al organique, les résultats suggèrent que cette forme atténue l'effet de l'Al_{CV-CVR} au niveau des mécanismes de division cellulaire. Mentionnons que dans la solution contenant de l'aluminium organique il existe aussi des acides fulviques libres de type "H-OOC-organique" et "OOC-organique" qui, par leurs effets potentiels (H-A) et (A) au niveau de la membrane algale, expliqueraient peut-être l'élimination de la toxicité de l'Al-inorganique.

La mesure des fonctions cellulaires spécifiques, comme le métabolisme du phosphore, suggère un rôle possible des macronutriments dans la régulation de la toxicité des métaux traces chez le phytoplancton. Les effets physiologiques proposés pour l'Al comprennent des interactions avec l'ADN (Karlik et al., 1980),

le déséquilibre du métabolisme des phosphates (Viola et al., 1980), les interactions avec les murs cellulaires et autres membranes (Bradley et Parker, 1968; Vierstra et Haug, 1978; Haug, 1984) et l'induction d'une déficience en calcium (Nyholm, 1981; Siegel et Haug, 1983b).

Nous avons pu démontrer par ces résultats que la toxicité de l'aluminium peut se jouer à plusieurs niveaux. A de faibles concentrations en Al_{cv-cvr} la toxicité est indirectement reliée à la disponibilité de P intracellulaire. L'algue a une certaine marge de manoeuvre pour détoxifier l'Al pris en charge. Par contre, à de plus fortes concentrations, le mécanisme même de division cellulaire est affecté. D'un autre côté, les concentrations en Al polymère testées affectaient directement la division cellulaire et s'avèraient très toxiques. Pour sa part, le rôle de l'Al organique sur la détoxification de Al_{cv-cvr} n'est pas clairement défini.

6.4 Effet de l'aluminium sur la perméabilité membranaire

6.4.1 Introduction

On a observé qu'à bas pH, la prise en charge de métaux (Mn, Zn, Al) était moindre qu'à pH plus élevé. On pourrait expliquer cette plus faible biodisponibilité de plusieurs façons:

- compétition ionique
- changement de potentiel transmembranaire
- protonation des sites de liaison
- dépolarisation de la membrane
- changements allostériques des sites de liaison

et

- diminution de la perméabilité membranaire.

Les objectifs de ce travail sont de vérifier quels sont les effets de l'aluminium sur la perméabilité membranaire de Chlorella pyrenoidosa selon le pH, et selon la présence d'acide fulvique. Pour vérifier ces effets, nous avons incubé Chlorella pyrenoidosa dans différents milieux expérimentaux, et nous avons mesuré la perméabilité au sorbitol de l'algue.

Colman et al. (1986) ont observé que la prise en charge d'hexoses par Chlorella pyrenoidosa se faisait par diffusion mais que ces sucres n'étaient pas utilisés pour la croissance

hétérotrophe. Selon ces auteurs, l'hexitol pénètre la membrane plasmique de 2 souches de Chlorella pyrenoidosa et l'équilibre est atteint après 20-30 minutes d'incubation. Par contre, même si le sorbitol et le mannitol passent par la membrane des deux souches de Chlorella pyrenoidosa, aucun des deux composés ne peut supporter la croissance de l'algue à la noirceur. De plus, le taux de respiration de Chlorella pyrenoidosa n'est pas significativement affecté par une incubation en présence de sorbitol ou de mannitol (100 mM), même si l'algue est perméable à ces deux composés.

6.4.2 Matériel et méthodes

Les algues sont mises à pousser dans les milieux AAP jusqu'au début de leur phase exponentielle de croissance. Elles sont alors récoltées par centrifugation ou filtration et resuspendues dans du milieu expérimental libre de métaux et de phosphore mais à pH différents maintenus constants par l'utilisation de tampons dits biologiques (MES). Les algues sont ainsi agitées et acclimatées pendant 24 heures. Au temps $t=0$, les algues sont ajoutées dans les milieux expérimentaux préalablement préparés (24 heures avant le début de l'expérience) tel que décrit au Chapitre 5. Les premières solutions testées sont les suivantes: pH 4.3, pH 5.0 et pH 6.0 sans et avec aluminium, où la concentration en aluminium correspond à la concentration maximale en Al monomère inorganique soit 500, 150 et $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. La deuxième série de solutions testées visent à évaluer

l'effet de l'aluminium organique sur la perméabilité membranaire. Les solutions utilisées sont décrites au Chapitre 5. La perméabilité membranaire en présence d'aluminium organique a été mesurée dans des milieux expérimentaux à pH 5: un milieu témoin, deux milieux contenant uniquement de l'acide fulvique (2.25 et 20 mg·L⁻¹), un milieu contenant uniquement de l'aluminium monomère inorganique (150 µg·L⁻¹) et dans quatre milieux contenant à la fois de l'aluminium inorganique et de l'aluminium organique (150 µg·L⁻¹ Al inorganique et 50, 100, 200, 350 µg·L⁻¹ Al organique; soit 1.1, 2.25, 5.5, 11 et 20 mg·L⁻¹ d'acide fulvique). Les algues sont incubées pendant 4 heures dans ces milieux.

Au début de l'expérience de la perméabilité membranaire au sorbitol, 1 mL d'une solution de sorbitol marqué (2.2 mM) est ajouté à 21 mL du milieu expérimental contenant les algues pour obtenir une concentration finale de 100 µM. Une portion de la solution (1 mL) est recueillie pour compter les algues et évaluer leur surface cellulaire. Le taux de prise en charge de l'hexitol est déterminé en mesurant le taux d'incorporation de radioactivité dans les cellules algales à partir d'hexitol marqué dans le milieu (voir Chapitre 4, effet du pH sur la perméabilité membranaire).

6.4.3 Résultats

Al monomère

Les résultats apparaissent à la figure 6.17. Aux trois pH testés (4.3, 5.0 et 6.0), on dénote un effet négatif de l'aluminium sur la perméabilité membranaire soit une diminution du taux de prise en charge de 13% à pH 4.3 ($[Al]=500 \mu g \cdot L^{-1}$), de 25% à pH 5.0 ($[Al]=150 \mu g \cdot L^{-1}$) et de 30% à pH 6.0 ($[Al]=10 \mu g \cdot L^{-1}$).

Al organique

Les résultats montrant les effets de l'aluminium organique sur la perméabilité membranaire apparaissent à la figure 6.18. L'ajout d'acide fulvique seul ($20 \text{ mg} \cdot L^{-1}$) augmente la perméabilité membranaire de 17% alors que l'ajout d'acide fulvique et d'aluminium diminue la perméabilité de 15 à 0 % selon la concentration en acide fulvique ajoutée. L'ajout d'aluminium seul diminue fortement la perméabilité par rapport au témoin, soit de 25%.

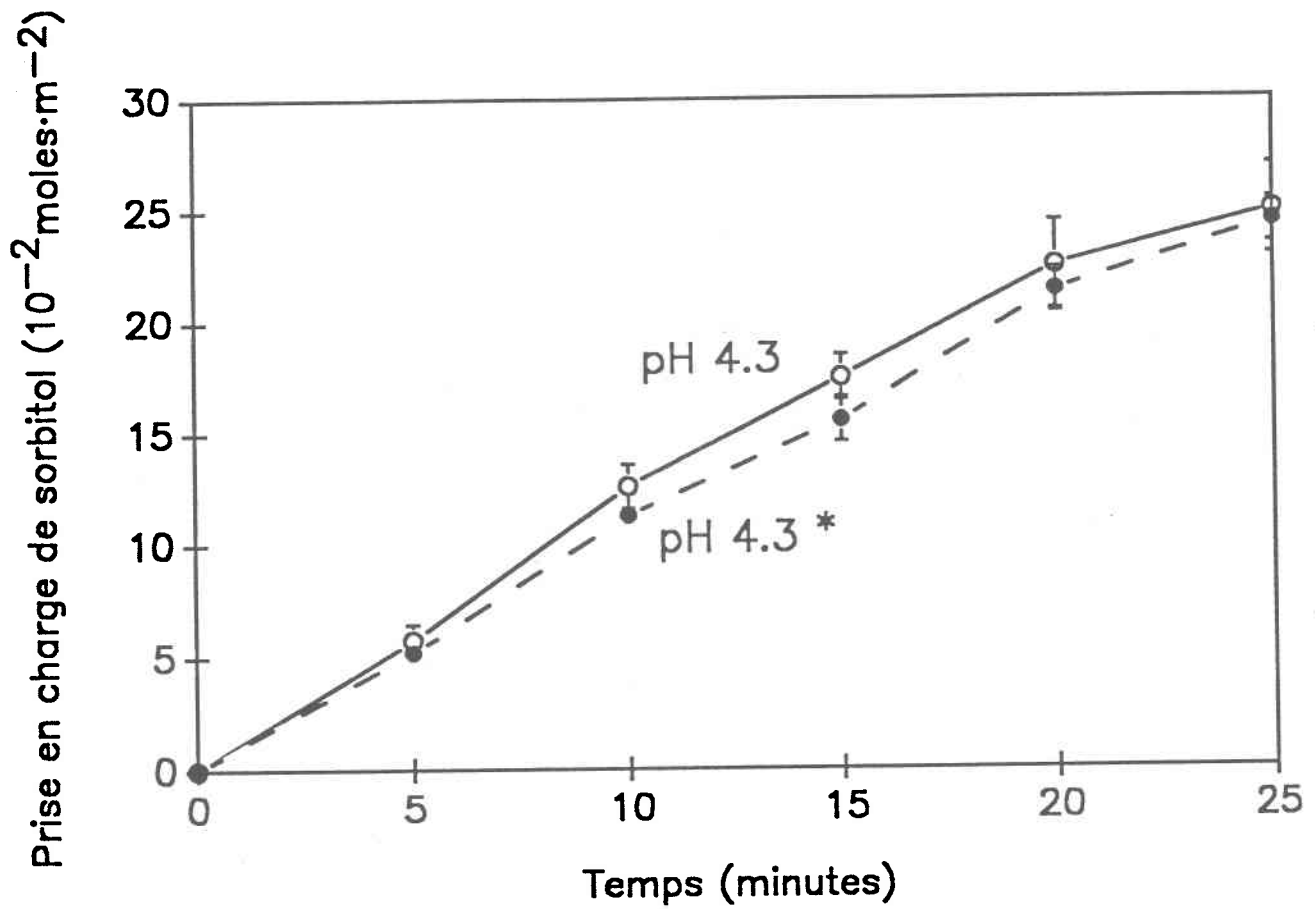


Figure 6.17: Effet de l'aluminium sur la perméabilité membranaire de *Chlorella pyrenoidosa* à l'hexitol. (pH 4.3*, 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

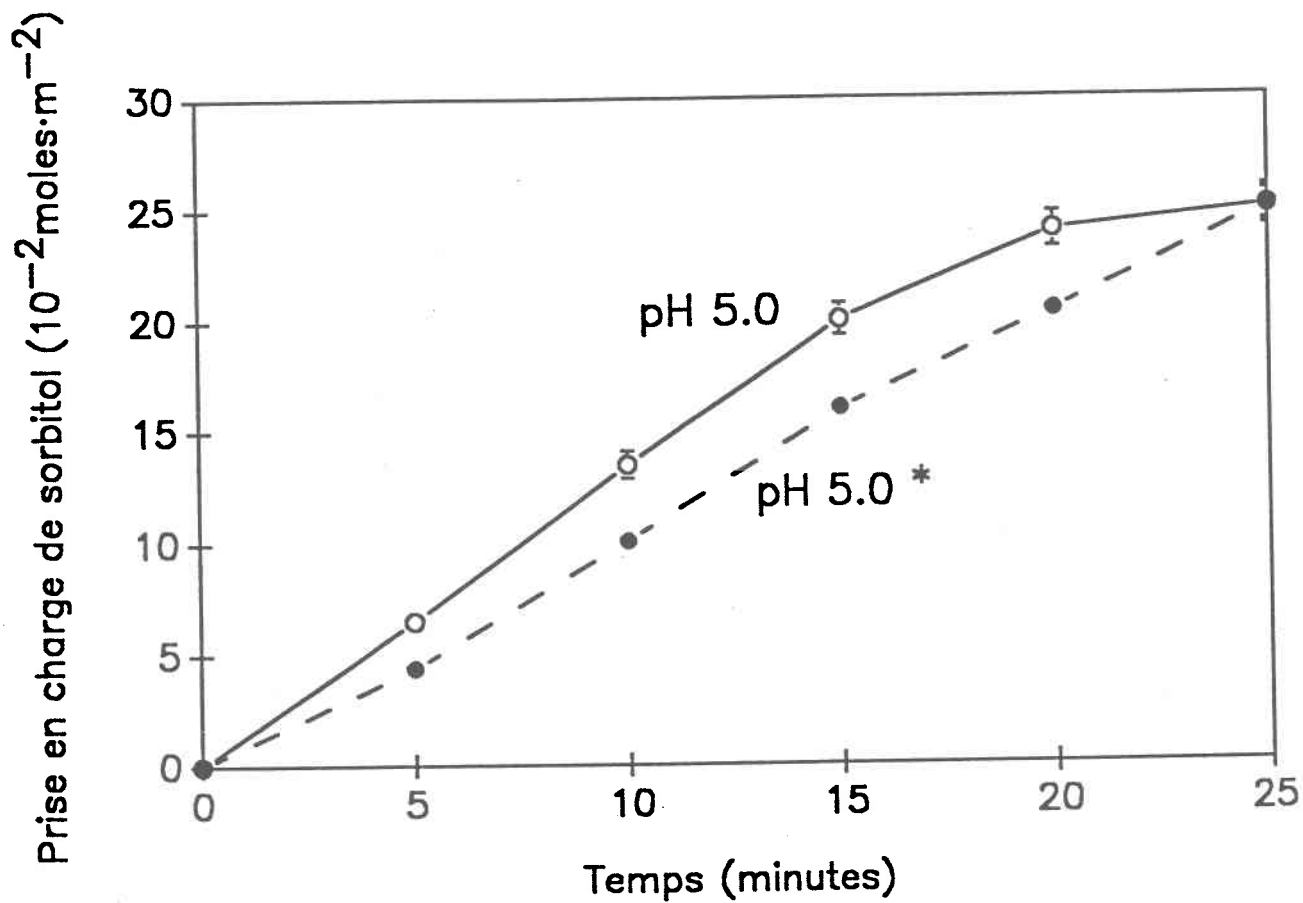


Figure 6.18: Effet de l'aluminium sur la perméabilité membranaire de *Chlorella pyrenoidosa* à l'hexitol. (pH 5.0*, 150 μ g \cdot L $^{-1}$).

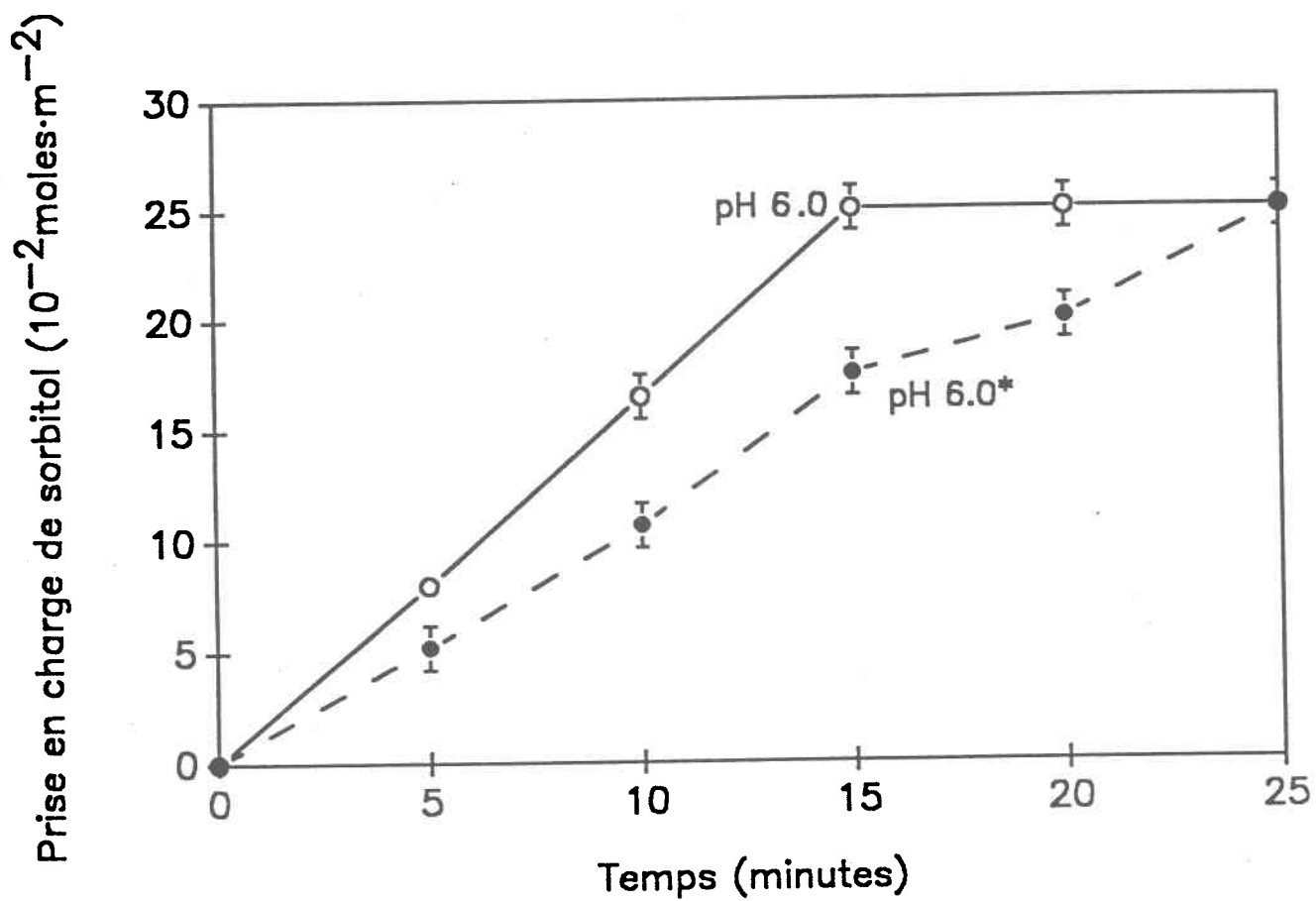


Figure 6.19: Effet de l'aluminium sur la perméabilité membranaire de *Chlorella pyrenoidosa* à l'hexitol. (pH 6.0*, 10 µg·L⁻¹).

Prise en charge de sorbitol (10^{-2} moles·m⁻²)
après 15 minutes de contact

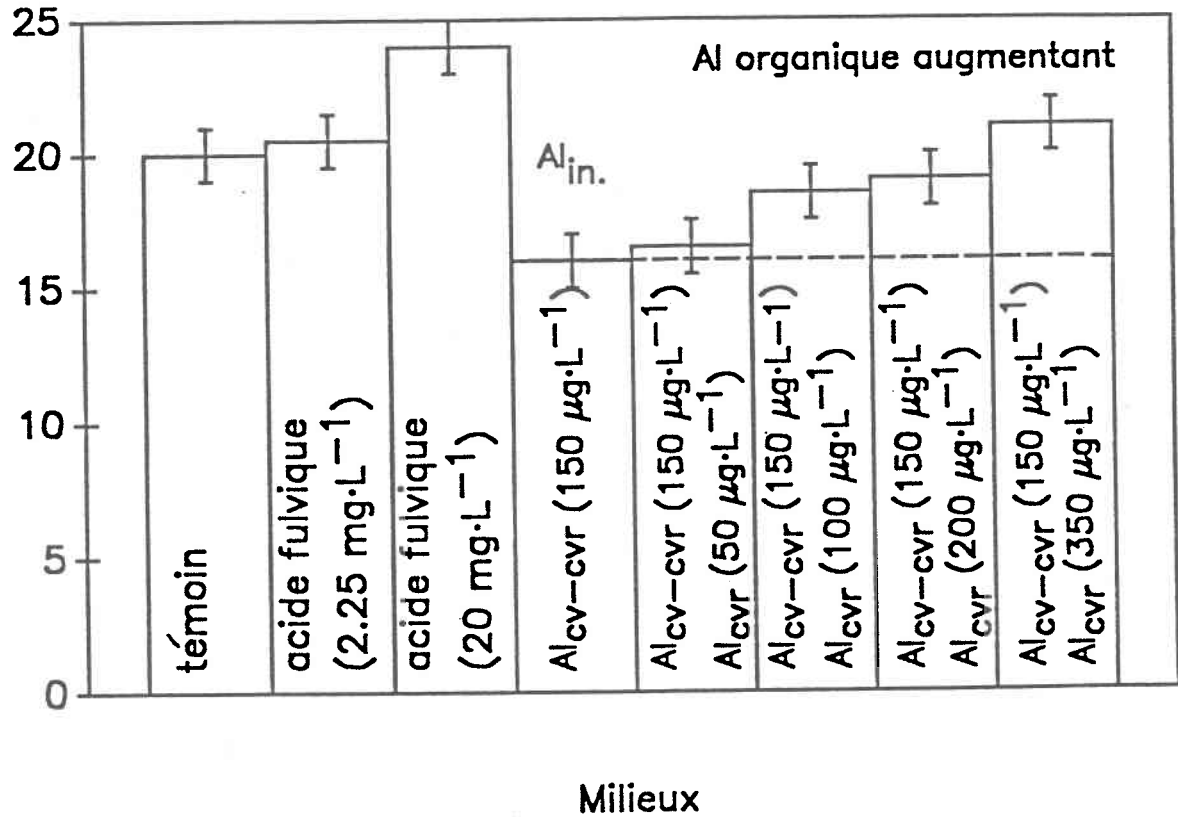


Figure 6.20: Effet de l'aluminium inorganique et organique sur la perméabilité membranaire de Chlorella pyrenoidosa à l'hexitol au pH 5.0. (Al_{cv-cvr} = Aluminium inorganique; Al_{cvr} = Aluminium organique)

6.4.4 Discussion

Les résultats obtenus nous permettent d'avancer que l'aluminium seul à différents pH diminue la perméabilité membranaire de Chlorella pyrenoidosa à l'hexose. L'action de l'acide humique seul vient contrer cet effet en augmentant légèrement cette perméabilité. Dans un milieu contenant à la fois de l'Al inorganique ($[Al]_{cv-cvr}$ maximale au pH testé) et de l'Al organique, la matière organique par elle-même vient contrer et annuler presque totalement l'effet de l'aluminium sur la perméabilité membranaire. Rappelons aussi que les ions H^+ seuls (chapitre 4) diminuaient aussi la perméabilité membranaire au sorbitol.

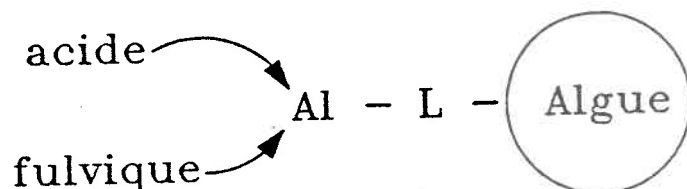
Dans sa revue de littérature sur la toxicité et la tolérance à l'aluminium des plantes vasculaires, Anderson (1988) soutient que les premiers symptômes de la toxicité de l'aluminium apparaissent habituellement dans les racines qui deviennent endomagées structurellement et fonctionnellement et inefficaces dans l'absorption de l'eau et des éléments nutritifs. Ceci peut être dû à un dérangement de la mitose et de la perméabilité des membranes des racines. Plusieurs effets biochimiques de l'Al chez les plantes supérieures sont probablement dus aux changements dans la structure et la fonction des membranes de racines (Hecht-Buchholz et Foy, 1981; Zhao et al., 1987). Selon le pH, l'Al peut se lier soit aux protéines soit aux lipides de la membrane (Foy, 1984).

L'aluminium diminue la perméabilité des racines (Aimi et Murakami, 1964). Cette diminution de la perméabilité diminue la prise en charge de l'eau et des éléments nutritifs (Foy et al., 1978; Zhao et al., 1987). L'aluminium peut se combiner avec les sels colloïdaux ou se lier avec des protéines adjacentes, rendant peut-être le mur cellulaire plus rigide.

Petersen et Persson (1987) ont observé qu'en milieu acide, l'acide humique agit directement sur la toxicité à cause de son effet sur l'augmentation de la lipophilicité. En général, il a été trouvé qu'en présence d'acide humique l'effet est positif pour les organismes aquatiques (Thurman, 1984). Le mécanisme de l'interaction acide humique - membrane est probablement l'augmentation de la solubilité lipidique et de la perméabilité membranaire.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont permis de vérifier que pour une concentration constante en Al^{+3} (pH 5.0), la matière organique utilisée éliminait la toxicité de l'Al. Cependant, la matière humique n'influence guère la prise en charge de l'aluminium pendant les premières heures de contact. Après quelques jours de contact, l'interprétation des résultats de prise en charge de l'Al peut être confondue avec l'état de croissance des algues qui diffère beaucoup entre le milieu inorganique et le milieu organique.

Par contre, l'acide fulvique utilisé dans ces expériences élimine l'effet de l'aluminium sur la perméabilité membranaire progressivement, tout comme dans le cas de la toxicité. Ceci suggère alors que l'aluminium pris en charge par l'algue reste à la surface cellulaire, sous forme de complexe mixte (Wilkinson et al., 1990)



et que la perturbation normalement provoquée par l'Al au niveau membranaire est supprimée. Les exigences de coordination de l'Al sont ainsi satisfaites par l'acide fulvique laissant les groupements fonctionnels sensibles présents dans la membrane intacts.

6.6 Références

- Aimi, R. et T. Murakami, 1964. Cell physiological studies on the effect of aluminum on the growth of crop plants. Nat. Inst. Agr. Sci. Bull., Ser., 11:331-392.
- Anderson, M., 1988. Toxicity and tolerance of aluminium in vascular plants. Wat. Air Soil Pollut., 39:439-462.
- 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. J. Phycol., 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. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 40:895-904.
- Bengtsson, B., H. Asp, P. Jensen et D. Berggren, 1988. Influence of aluminium on phosphate and calcium nutrition in beech (Fagus sylvatica L.) grown in nutrient solution and soil solution. Physiol. Plant., 74:299-305.
- Bradley, T.J. et M.S. Parker, 1968. Binding of aluminium ions by Staphylococcus aureus 893. Experientia, 24:1175-1176.
- Bryan, G.W., 1971. The effects of heavy metals (other than mercury) on marine and estuarine organisms. Proc. Roy. Soc. Lond., B. 177: 389-410.
- Butler M., A.E.J. Haskeew et M.M. Young, 1980. Copper tolerance in the green alga Chlorella vulgaris. Plant Cell Environ., 3:119-126.
- Caldwell, C.R. et A. Haug, 1982. Divalent cation inhibition of barley root plasma membrane-bound Ca^{2+} -ATPase activity and its reversal by monovalent cations. Physiol. Plant., 54: 112-116.
- Clarkson, D.T., 1966. Effect of aluminium on the uptake and metabolism of phosphorus by barley seedlings. Plant Physiol., 41:165-172.
- Clarkson, D.T., 1967. Interactions between aluminium and phosphorus on root surfaces and cell wall material. Plant Soil, 27:347-356.
- Cloutier-Mantha, L. et P.J. Harrison, 1980. Effects of sublethal concentrations of mercuric chloride on ammonium-limited Skeletonema costatum. Mar. Biol., 5:219-231.

- Colman, B., P.C. Brickell et K.A. Gehl, 1986. The uptake of mannitol and sorbitol by a species of Chlorella (CHLOROPHYCEA). J. Phycol., 22: 436-440.
- Conway, H.L. 1978. Sorption of arsenic and cadmium and their effects on growth, micronutrient utilization, and photosynthetic pigment composition of Asterionella formosa. J. Fish. Res. Board Can., 35:286-294.
- Cossa, D. 1976. Sorption du cadmium par une population de la diatomée Phaeodactylum tricornutum en culture. Mar. Biol., 34:163-167.
- Crist, R.H., K. Oberholser, N. Shank et M. Nguyen, 1981. Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. Environ. Sci. Technol., 15:1212-1217.
- Davies, A.G., 1973. The kinetics of and a preliminary model for the uptake of radio-zinc by Phaeodactylum tricornutum in culture, pp. 403-420. Dans: Radioactive Contamination of the Marine Environment, International Atomic Energy Agency, Vienna, Autriche.
- Davis, A.G., 1978. Pollution studies with marine plankton. Part II. Heavy metals. Adv. Mar. Biol., 15:381-508.
- Folsom B.R., N.A. Popescu et J.M. Wood, 1986. Comparative study of aluminum and copper transport and toxicity in an acid-tolerant freshwater green alga. Environ. Sci. Technol., 20:616-620.
- Foster, P., 1976. Concentrations and concentration factors of heavy metals in brown algae. Environ. Pollut., 10:45-53.
- Foy, C.D., 1984. Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicities in acid soil. Dans: Soil Acidity and Liming, F. Adams (éd.) US Dept. Agriculture. Agronomy Monograph 12 (2nd éd.), 12:57-97.
- Foy, C.D., Chaney, R.L. et White, M.C., 1978. The physiology of metal toxicity in plants. Annual Review of Plant Physiology, 29:511-523.
- Freda J. et D. G. McDonald, 1990. Effects of aluminium on the leopard frog, Rana pipiens: Life stage comparisons and aluminum uptake. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 47:210-216.
- Freda J., V.Cavdek et D. G. McDonald, 1990. Role of organic complexation in the toxicity of aluminum to Rana pipiens embryos and Bufo americanus tadpoles. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 47:217-224.

- Haug, A., 1984. Molecular aspects of aluminum toxicity. CRC Crit. Rev. Plant Sci., 4:345-373.
- Hayward, J., 1969. Studies on the growth of Phaeodactylum tricorutum. V. The relationship to iron, manganese and zinc. J.Mar. Biol. Assoc. U.K., 49:439-446.
- Healey, F.P., 1973. Inorganic nutrient uptake and deficiency in algae. CRC Crit. Rev. Microbiol., 3: 69-113.
- Hecht-Buchholz, C. et C.D. Foy, 1981. p.343. Effect of aluminum toxicity on root morphology, Plant Soil, 63:93-106.
- Jensen, T.E., M. Baxter, J. W. Rachlin et V. Jani, 1982. Uptake of heavy metals by Plectonema boryanum (Cyanophyceae) into cellular components, especially polyphosphate bodies: an X-ray energy dispersive study. Environ. Pollut. Ser. A, 27:119-127.
- Jensén, P., S. Pettersson, T. Drakenberg et H. Asp, 1989. Aluminium effects on vacuolar phosphorus in roots of beech. J. Plant Physiol., 134:37-42.
- Karlik, S.J., Eichhorn, G.L. et E.R. Crapper McLachlan, 1980. Molecular interactions of aluminium with DNA. Neurotoxicology, 1:83-88.
- Laube, V.F.M., C.N. McKenzie et D.J. Kushner, 1980. Strategies of response to copper, cadmium, and lead by a blue-green alga. Can. J. Microbiol., 26: 1300-1311.
- McCormick, L. H. et F.Y. Borden, 1974. The occurrence of aluminium phosphate precipitation in plant roots. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 38:931-934.
- McKnight, D.M. et F.M.M. Morel, 1979. Release of weak and strong copper-complexing agents by algae. Limnol. Oceanogr., 24:823-837.
- Mugwira, L.M., S.U. Patel et A.L. Fleming, 1980. Aluminium effects on growth and Al, Ca, Mg, K et P levels in triticale, wheat and rye. Plant Soil, 57:467-470.
- Nyholm, N.E.I. 1981. Evidence of involvement of aluminium in causation of defective formation of eggshells and of impaired breeding in wild passerine birds. Environ. Res., 26:363-371.
- Parent, L., P. Couture, P.G.C. Campbell et B. Dubreuil, 1988. Sensibilité des alevins vésiculés du saumon atlantique à l'acidité en présence et en absence d'aluminium. Water poll. Res. J. of Can., 23:227-242.

- Pedersén, M., Roomans, G.M., Andrén, M., Lignell, A., Lindahl, G., Wallstrom, K. et A. Forsberg, 1981. X-ray microanalysis of metals in algae—a contribution to the study of environmental pollution. *Scanning Electron Microscopy II*, 499-509.
- Petersen, R.C. Jr et U. Persson, 1987. Comparison of the biological effects of humic materials under acidified conditions. *Sci. Tot. Environ.*, 62: 387-398.
- Pettersson, A., L. Kunst, B. Bergman et G. M. Roomans, 1985b. Accumulation of aluminium by Anabaena cylindrica into polyphosphate granules and cell walls: an X-ray energy-dispersive microanalysis study. *J. Gen. Microbiol.*, 131:2545-2548.
- Pettersson, A., L. Hällbom et B. Bergman, 1986. Aluminium uptake by Anabaena cylindrica. *J. of Gen. Microbiol.*, 132:1771-1774.
- Rana, B.C. et H.D. Kumar, 1974. The toxicity of zinc to Chlorella vulgairs et Plectonema boryanum and its protection by phosphate. *Phykos*, 13:60-66.
- Rhee, G.-Y., 1973. A continuous culture study of phosphorus uptake, growth rate and polyphosphate in Scenedesmus sp., *J. Phycol.*, 9:449-506.
- Roy, A. K., A. Sharma et G. Talukder, 1988. Some aspects of aluminum toxicity in plants. *Bot. Rev.*, 54: 145-178.
- Rueter, J.G. Jr. 1983. Effect of copper on growth, silicic acid uptake and soluble pools of silicic acid in the marine diatom, Thalassiosira weissflogii (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 19:101-104.
- Rueter, J.G. Jr. et F.M.M. Morel, 1981. The interaction between zinc deficiency and copper toxicity as it affects the silicic acid uptake mechanisms in Thalassiosira pseudonana. *Limnol. Oceanogr.*, 26:67-73.
- Schenck R.C., A. Tessier et P.G. C. Campbell, 1988. The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. *Limnol. Oceanogr.*, 33:538-550.
- Schulz-Baldes, M. et R.A. Lewin, 1976. Lead uptake in two marine phytoplankton organisms. *Biol. Bull.*, 150: 118-127.
- Siegel, N. et A. Haug, 1983a. Calmodulin dependent formation of membrane potential in barley root plasma membrane vesicles: A biochemical model of aluminium toxicity in plants. *Physiol. Plant*, 59:285-291.

- Siegel, N. et A. Haug, 1983b. Al interaction with calmodulin. *Biochim. Biophys. Acta*, 744: 36-45.
- Simkiss K. et M.B. Taylor, 1989. Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms. *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.*, 1: 173-188.
- Singer, S.J. et G.L. Nicholson, 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membrane. *Science*, 175:720-731.
- Skaar, H., B.Ryustad et A. Jensen. 1974. The uptake of ^{63}Ni by the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Physiol. Plant.*, 32: 353-358.
- Stainton, M.R., M.J. Capet et F.A.J. Armstrong, 1974. The chemical analysis of fresh water. *Can. Dept. Environ. Fish., Mar. Serv. Res. Dev. Dir., Misc. Spec. Publ. No. 25.*, Ottawa, Ontario, 47 p.
- Stauber, J.L. et T.M. Florence, 1989. The effect of culture medium on metal toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* and the freshwater green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Wat. Res.*, 23:907-977.
- Suhayda C.G. et A.Haug, 1984. Organic acids prevent aluminum-induced conformational changes in calmodulin. *Biochem. Biophys. Res.*, 119:376-381.
- Thornton, F.C., M. Schaedle, S.J. Raynal et C. Zipperer, 1986. Effects of aluminium on honeylocust (*Gleditsia triacanthos* L.) seedlings in solution culture. *J. Exp. Bot.*, 37:775-785.
- Thurman, E.M. 1984. *Organic Geochemistry of Natural Waters*, Martinus Nijhoff, Dordrecht, Pays Bas, 497 p.
- Vierstra, R. et A. Haug, 1978. The effect of Al^{+3} on the physical properties of membrane lipids in *Thermoplasma acidophilum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84:138-143.
- Viola, R.E., J.F. Morrison. et W.W.Cleland, 1980. Interactions of metal (III)-adenosine 5'-triphosphate complexes with yeast hexokinase. *Biochem.*, 19:3131-3137.
- Weis, C. et A. Haug, 1987. Aluminum-induced conformational changes in calmodulin alter the dynamics of interaction with melittin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 254:304-312.
- Wilkinson, K.J., P.G.C. Campbell et P. Couture, 1990. Effect of fluoride complexation on aluminum toxicity towards juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47:1446-1452.

Winner, R.W. et J.D. Gauss, 1986. Relation between chronic toxicity and bioaccumulation of copper, cadmium and zinc as affected by water hardness and humic acid. *Aquat. Tox.*, 8:149-161.

Wright, K.E. et B.A. Donahue, 1953. Aluminium toxicity studies with radioactive phosphorus. *Plant Physiol.*, 28:674-680.

Zhao, X.J., E. Sucoff et E.J. Stadelmann, 1987. Al^{3+} and Ca^{2+} alteration of membrane permeability of Quercus rubra root cortex cells. *Plant Physiol.*, 83:159-162.

Extraction de l'aluminium adsorbé sur une algue (*Chlorella pyrenoidosa*) par EDTA (10^{-3} M) selon le pH de la solution d'extraction

Des mesures de prise en charge de l'Al à différents pH ont été effectuées (pH 4.3, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.5, 6.0). Les concentrations en Al adsorbé et Al cellulaire étaient discriminées par une extraction à l'EDTA (10^{-3} M) au même pH que celui du milieu expérimental correspondant (pH 4.3, 5.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.5, 6.0). Dans plusieurs cas, lorsque la prise en charge de l'aluminium par *Chlorella pyrenoidosa* était mesurée sur une période de 4 jours, l'aluminium désorbable par l'EDTA était de beaucoup inférieur à l'aluminium non-désorbable considéré comme étant intracellulaire. L'interprétation de ce résultat est que d'une part tout l'aluminium est incorporé dans la cellule et/ou d'autre part, l'aluminium est fortement lié à la surface cellulaire. Etant donné que le pH affecte la protonation des sites cellulaires sur la membrane, on a voulu vérifier si l'efficacité de désorption de l'EDTA variait en fonction du pH de la solution d'extraction.

Selon des calculs d'équilibre (modèle MINEQL), une concentration en EDTA de 10^{-3} M est suffisante pour complexer 100% de Al dans les milieux expérimentaux indépendamment du pH, et ceci en supposant que le pH n'influence pas l'atteinte d'équilibre (donc

ce n'est pas l'efficacité de la molécule EDTA qui est mise en jeu). A partir de cet énoncé nous pouvons supposer que pour une expérience de prise en charge de Al par Chlorella pyrenoidosa à un pH déterminé (ex.: pH 5), l'extraction de Al adsorbé sur les algues ne devrait pas varier avec le pH de l'extraction.

Nous tenterons donc de vérifier si le pH de l'extraction agit sur la capacité d'extraction de l' EDTA (exemple: effet sur la membrane, ce qui ne peut pas être calculé par MINEQL).

HYPOTHESE: L'efficacité de l'EDTA à extraire l'Al est favorisée à bas pH par l'effet même du pH sur la membrane, le rendant plus "désorbable". L'Al adsorbé pourrait être sousestimé à pH plus élevé et de même l'Al cellulaire surestimé.

MATERIEL ET METHODES

1. Chlorella pyrenoidosa est cultivée en milieu stérile (AAP, pH 5.0- MES 10^{-2} M).
2. La culture est maintenue à la phase exponentielle (début: $\sim 10^5$ cellules \cdot mL $^{-1}$) pendant 5 jours à température (20°C) et luminosité ($100 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) constantes.

3. Les algues sont centrifugées et lavées 3 fois avec AAP-PO₄-TM à pH 5.
4. Les algues sont acclimatées à leur milieu expérimental pendant 24 heures (barbottées et agitées).
5. A temps=0, un aliquot de ces algues concentrées est ajouté au milieu expérimental (AAP-PO₄-TM, pH 5+135 µg·L⁻¹ Al) (en équilibre depuis 24 h).
6. Après 30 minutes de contact avec l'Al, 4 échantillons de 100 mL sont récoltés et filtrés sur filtres Nucléopore (0.4 µm) en polycarbonate préalablement lavés à l'acide afin de mesurer la concentration en Al totale prise par les algues.
7. Au même moment, 4·100 mL, sont aussi filtrés («5 mm Hg) et le filtre est déposé dans une bouteille contenant 10⁻³ M EDTA à pH défini (4.5, 5.0, 5.5, 6.0). La bouteille est agitée de façon à extraire tout l'Al adsorbé sur les algues.
8. Après 20 minutes d'extraction, la solution de EDTA + filtre est filtrée.
9. Tous les filtres sont digérés dans les "Tuff tainers" en Teflon^R par 0.5 mL HNO₃ Ultrex concentré, 20 minutes dans un bain marie à 100°C.
10. Une fois refroidies, ces solutions digérées sont diluées dans 10 mL H₂O Millipore.
11. Le tout est dosé par absorption atomique au four graphite.

Cette méthode nous permet d'évaluer la concentration totale en Al et la concentration cellulaire en Al dans les algues. La

différence entre ces deux concentrations nous donne la concentration en Al adsorbé ou extractible à l'EDTA. Des blancs et des standards (feuilles de citronnier) de digestion sont mesurés parallèlement.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les concentrations en Al_{total} , $Al_{cellulaire}$ et $Al_{adsorbé}$ ($\mu g \cdot L^{-1}$) sont présentées ci-dessous. Les valeurs sont exprimées en $\mu g \cdot L^{-1}$ -valeurs mesurées directement dans la solution résultante de la digestion des algues- afin de faciliter la compréhension des résultats.

pH de l'extraction	N=4			
	4.5	5.0	5.5	6.0
Al_T	115 ± 8	106 ± 15	97 ± 12	88 ± 17
Al_c	77 ± 5	77 ± 20	80 ± 6	80 ± 9
Al_a	39 ± 9	32 ± 25	19 ± 16	11 ± 11
%extrait	33 ± 6	28 ± 22	17 ± 14	10 ± 11

La prise en charge en Al_{Total} a été mesurée en quadruple avant chaque extraction à l'EDTA (voir tableau 1, ligne Al_T). Même si cette expérience de prise en charge s'est déroulée au pH 5.0, avec $135 \mu g \cdot L^{-1}$ de Al et en moins de 2 heures, il existe des différences, quoique non significatives, entre les dosages d' Al_T . Ces

variations peuvent agir sur l'estimation de Al_A puisque ce dernier est calculé par la différence entre Al_T et Al_c . Notons que les moyennes de Al_c sont toutes similaires (77 à 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Al).

Ces résultats suggèrent que l'efficacité de l'EDTA à extraire l'Al adsorbé sur la membrane cellulaire de Chlorella pyrenoidosa n'est pas influencée par le pH (dans la gamme testée 4.5-6.0) puisque $Al_{\text{cellulaire}}$ mesuré reste le même.

Annexe B.2: Evaluation du temps de contact optimal de l'EDTA avec les algues pour désorber tout Al

INTRODUCTION

Des mesures de prise en charge de Al à différents pH ont été effectuées (pH 4.3, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.5, 6.0). Les concentrations en Al adsorbé et Al cellulaire étaient discriminées par une extraction à l'EDTA (10^{-3} M) au même pH que celui du milieu expérimental correspondant (pH 4.3, 5.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.5, 6.0). Afin de s'assurer que le contact de l'EDTA avec les algues était optimum pour la désorption de Al adsorbé à la surface cellulaire, on a procédé à l'extraction de Al après 20, 30 et 40 minutes de contact avec EDTA.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les cellules algales étaient incubées préalablement dans une solution contenant $150 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Al}_{\text{CV-CVR}}$, à pH 5.0 pour une période de 30 minutes. Au moment de procéder à l'extraction, un échantillon est filtré, digéré et dosé pour en connaître la concentration en Al totale. L'extraction se fait sur un échantillon en parallèle. Après 20, 30 et 40 minutes de contact avec EDTA (avec agitation constante), un échantillon est récolté, filtré, digéré et dosé. Cette expérience est réalisée en triple.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Un temps de contact de 20 minutes avec EDTA (10^{-3} M) était suffisant pour obtenir une concentration de Al extractible à l'EDTA stable, puisque après 30 et 40 minutes de contact, on ne réussissait pas à désorber davantage d'aluminium lié aux algues (figure 6.b).

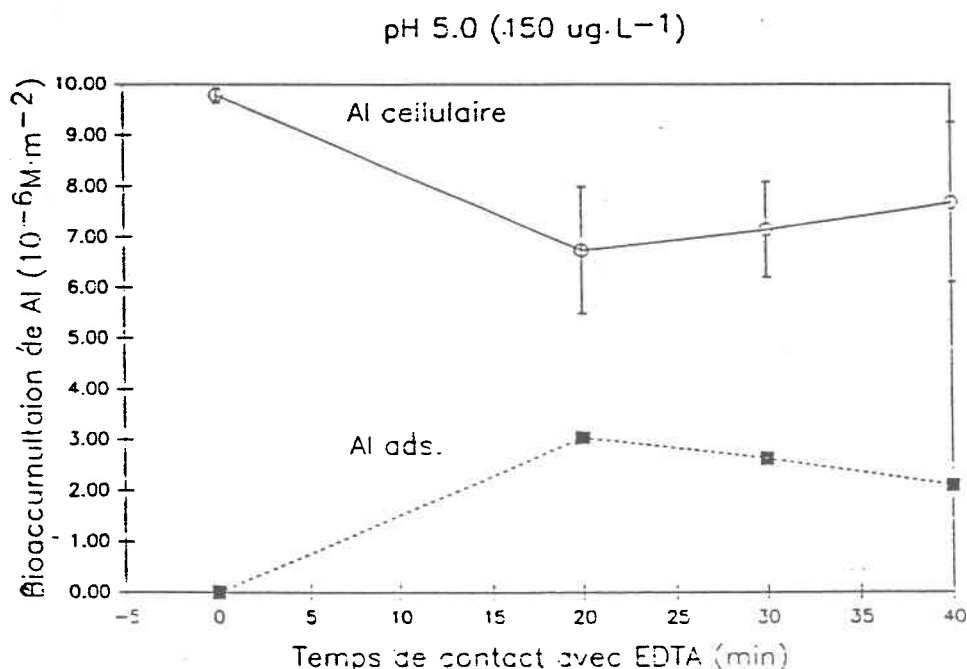


Figure 6.b: Effet du temps de contact avec 10^{-3} M EDTA sur la concentration de Al extrait de la surface cellulaire (■) de *Chlorella pyrenoidosa* et ce qui reste de Al après cette extraction (Al cellulaire) (○); incubation des cellules avec $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Al monomère inorganique à pH 5.0 dans le milieu expérimental pour une période de 30 minutes; concentration cellulaire initiale = $5\cdot 10^4$ cellules $\cdot\text{mL}^{-1}$.

CHAPITRE 7 : SYNTHÈSE ET CONCLUSION

CHAPITRE 7 : SYNTHÈSE ET CONCLUSION

	Page
7.1 Biodisponibilité de l'aluminium en milieu acide.....	431
7.2 Effets biologiques.....	431
7.3 Disponibilité.....	436
7.4 Modélisation.....	446
7.5 Conclusion.....	448
7.6 Références.....	449

CHAPITRE 7 : SYNTHÈSE ET CONCLUSION

7.1 Biodisponibilité de l'aluminium en milieu acide

L'objectif de cette thèse était d'évaluer la biodisponibilité de l'aluminium en milieu acide et de réussir à la modéliser. A partir de la mesure de l'Al en solution ou dans les organismes aquatiques, on pensait être en mesure d'évaluer le potentiel toxique du milieu. Pour y arriver, on devait établir une relation entre la toxicité de l'Al et sa mesure en solution et dans l'organisme test.

Pour connaître la biodisponibilité de l'Al pour un organisme vivant il faut vérifier tout d'abord s'il se produit un effet sur le système biologique. On a mesuré cet effet en considérant la variation ou la différence de croissance entre des algues témoin et des algues en contact avec l'Al. La disponibilité pour sa part nous a permis d'étudier certains mécanismes explicatifs des effets observés sur l'organisme test.

7.2 Effets biologiques

. Rappel méthodologique

De façon à pouvoir évaluer la biodisponibilité de l'aluminium en milieu acidifié, on a choisi une composante biologique vivante, ce qui implique qu'il existe des interactions intra-extra

cellulaires. Evidemment, on exclut ici tous les particules inertes telles les oxydes, quoique des modèles de membrane de type vésicules sont souvent utilisés pour connaître les interactions métaux-membrane. Pour choisir un organisme indicateur, il fallait considérer le type d'exposition qu'on voulait tester. Il s'agissait d'un contact direct. On a choisi ce qui représente la plus simple expression de la vie: la cellule et plus précisément une algue verte: Chlorella pyrenoidosa, considérant de plus que les algues microscopiques (phytoplancton) forment la base de la chaîne alimentaire dans le milieu aquatique. Ces organismes emmagasinent l'énergie par la photosynthèse et agissent comme producteurs primaires dans l'environnement aquatique. Il est important que les conditions optimales prévalent pour leur croissance et leur reproduction puisque des changements d'abondance ou de diversité peuvent affecter les animaux qui utilisent les algues comme source de nourriture.

Cette espèce est connue pour être sensible à l'Al et les tests qu'on a effectués pour déterminer l'influence du pH sur sa croissance ne montraient aucun effet; des variations de pH (gamme 4.3-7.0) n'affectaient pas significativement la croissance de Chlorella pyrenoidosa. Cette caractéristique a permis de discriminer les effets dus à l'Al de ceux imputables aux ions hydrogène. De plus, cette espèce était assez résistante pour survivre et croître normalement quelques jours dans un milieu expérimental qui ne contenait ni phosphore, ni oligoéléments

nutritifs. On se servait d'un tampon (0.01 M) de façon à maintenir le pH constant pendant toute l'expérience.

De façon à pouvoir évaluer les effets de l'Al sur Chlorella pyrenoidosa il a fallu choisir un paramètre indicateur. Ce paramètre devait estimer le plus précisément possible la gamme de concentration de l'Al qui produirait une réponse donnée, rapidement observable et quantifiable, sous des conditions de laboratoire contrôlées. Ce paramètre devait être utilisé pour comparer les organismes exposés à ceux qui ne l'étaient pas. Parmi les paramètres indicateurs des effets sublétaux aigus, soit le μ -max, le μ -moyen, l'aire sous la courbe de croissance et la biomasse finale, on a choisi la surface sous la courbe. Ce paramètre nous permettait d'intégrer les effets dus à l'Al à tous les niveaux de la courbe de croissance de Chlorella pyrenoidosa.

Pour ce qui est des indicateurs des effets chroniques, on a considéré les variations de la surface cellulaire (m^2), du volume cellulaire (m^3), du métabolisme du phosphore et de la perméabilité membranaire. De plus, le choix d'un indicateur de quantité d'Al pris en charge par les organismes s'avérait essentiel pour l'étude du transport et de la distribution de l'Al dans l'organisme. Les paramètres utilisés pour décrire la bioaccumulation de l'Al sont la prise en charge - totale, adsorbée, cellulaire (flux cellulaire), et le facteur de bioconcentration, soit le rapport de la concentration moyenne de l'Al accumulé dans l'algue dans des

conditions d'équilibre et de la concentration moyenne mesurée dans l'eau d'exposition.

. Discussion

Trois formes d'aluminium ont été testées pour connaître leur potentiel de toxicité.

1-) L'aluminium monomère inorganique pour vérifier si le modèle d'ion libre (M^{2+}) pourrait expliquer les résultats obtenus avec Al^{3+} .

2-) L'aluminium polymère, $Al_{13}O_4(OH)_{24}^{7+}$, puisque dans la littérature on peut trouver des indications tout à fait contradictoires concernant la toxicité de cette forme métastable vis-à-vis des producteurs primaires. De plus, considérant la possibilité de sa présence dans des milieux en récupération (augmentation du pH après acidification naturelle ou artificielle), il nous semblait important de connaître le potentiel toxique de cette forme.

3-) L'aluminium organique, Al-acide fulvique, puisque même si les effets qualitatifs de la matière organique sur la toxicité des métaux sont assez bien connus, rares sont les expériences où on a vérifié quantitativement si le modèle de l'ion libre s'applique en présence de la matière organique naturelle.

Pour mesurer la sévérité de la réponse résultant de l'exposition à l'Al on a produit des graphiques mettant en relation la concentration de l'Al et la réponse observée, soit le % de croissance par rapport au témoin. De cette façon, on a pu observer un effet de gamme important, mais qui variait aussi avec le pH.

La pente de la relation concentration-effet est un indice de la sensibilité des algues à l'Al. Une pente plus douce peut aussi indiquer une lente absorption, une excrétion rapide ou une détoxification, ou un délai de l'expression de la toxicité (Rand et Pétrocelli, 1985). Une pente plus raide indique une absorption plus rapide et des effets plus rapidement sentis. Même si la droite seule n'est pas un indicateur direct des mécanismes de toxicité, c'est un paramètre utile et doit toujours être considéré avec ses limites de confiance.

Ainsi, on a pu démontrer une toxicité significative, surtout à la concentration en aluminium monomère inorganique (Al_{cv-cvr}) maximale, pour chacun des pH testés. De plus, pour une concentration en Al^{+3} donnée, cette toxicité augmentait avec le pH. La droite résultante de la régression linéaire du % de l'aire sous la courbe de croissance en fonction de la concentration en Al_{cv-cvr} devenait de plus en plus plane à faible pH, ce qui nous suggère qu'il y avait compétition ionique entre les cations Al et H^+ . La même relation a été observée pour les tests avec l'aluminium polymère, alors que cette dernière forme a toujours été considérée, jusqu'à récemment (1990), comme étant non toxique. Plus surprenant

encore furent les résultats des effets de l'aluminium organique sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa en présence d'aluminium monomère inorganique. En effet les différentes expériences portant sur l'effet de l'Al organique (en présence d'Al inorganique) sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa ont montré un effet inhibiteur des effets dus à Al_{cv-cvr} menant à une amélioration de la croissance.

7.3 Disponibilité

Après avoir vérifié que différentes formes d'aluminium avaient un effet sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa, on a voulu expliquer ces effets généraux par des observations plus spécifiques reliées au métabolisme cellulaire, soit des effets sur la surface algale, le biovolume, la perméabilité membranaire cellulaire, ainsi que sur le métabolisme du phosphore. De plus, on a voulu relier ces effets à la bioaccumulation de l'Al. La relation qui existe entre la biodisponibilité et la bioaccumulation est celle de la capacité de donner et celle de recevoir. Pour qu'il y ait bioaccumulation il faut une biodisponibilité à la fois du donneur de l'Al (le milieu ambiant) et du receveur chez la cible biologique, en l'occurrence l'algue.

Nous avons observé que la toxicité de l'aluminium due aux formes monomères et polymères était supérieure aux pH plus élevés. En termes physico-chimiques, nous avons expliqué cette toxicité accrue par l'augmentation de la perméabilité membranaire à pH plus élevé et par une compétition moins intense entre les cations H^+ et $Al(OH)_n^{(3-n)+}$ pour les sites accepteurs présents à la surface cellulaire. Nous avons évalué si la toxicité de l'aluminium peut être expliquée en partie ou en totalité par sa prise en charge, par son flux cellulaire, par son effet sur la perméabilité membranaire, par ses interactions possibles avec les réserves en phosphore intracellulaire et par ses effets indirects sur la division cellulaire (surface et volume cellulaire).

L'observation d'une plus forte toxicité de l'aluminium (pour une même concentration en Al^{+3}) à pH faiblement acide comparativement à des pH plus acides suscite certaines hypothèses explicatives. L'une d'entre elles est que ces résultats puissent être interprétés par une biodisponibilité accrue de l'aluminium pour Chlorella pyrenoidosa, c'est-à-dire, une biodisponibilité qui impliquerait à la fois une disponibilité chimique de l'aluminium, une disponibilité des sites cellulaire (plus facilement atteignables) et un transport accru de l'aluminium à l'intérieur de la cellules, ce qui résulterait en une bioaccumulation totale supérieure d'aluminium.

A partir de tests portant sur la toxicité de l'aluminium pour notre algue unicellulaire, on a observé que la biodisponibilité (toxicité) relative de l'Al diminuait progressivement entre pH 6.0 et 4.3. Cette influence du pH sur la biodisponibilité (toxicité) de l'Al s'exprime selon trois niveaux (tableau 7.1).

Tableau 7.1: Relations entre biodisponibilité et bioaccumulation - Influence de changements de pH.

BIODISPONIBILITÉ	----->	BIOACCUMULATION
<u>en solution:</u>		
<ul style="list-style-type: none"> - Disponibilitilté chimique de l'Al <li style="padding-left: 20px;">forme ionique: monomère (Al⁺³); polymère (Al₁₃) <li style="padding-left: 20px;">concentration <li style="padding-left: 20px;">compétition avec autres cations <li style="padding-left: 40px;">pour ligands en solution 		
<u>à l'interface:</u>		
<ul style="list-style-type: none"> - Disponibilité des sites <li style="padding-left: 20px;">compétition <li style="padding-left: 20px;">potentiel transmembranaire <li style="padding-left: 20px;">conformation des sites 		- adsorption
<u>possibilité de traverser la membrane et d'avoir un effet intracellulaire:</u>		- absorption
<ul style="list-style-type: none"> perméabilité membranaire activité enzymatique protéines sites intracellulaires: <li style="padding-left: 20px;">détoxication/immobilisation 		

Le premier concerne la disponibilité chimique et physique de l'aluminium, c'est-à-dire sa présence sous différentes formes pouvant atteindre la cellule (structure de la molécule: monomère, polymère, organique; forme ionique, dissoute, labile) et à des concentrations absolues et relatives (par rapport à d'autres

cations présents en solution; force ionique, compétition avec d'autres cations pour les ligands en solution) suffisamment élevées pour avoir un effet délétère sur la cellule algale.

Le deuxième se rapporte à la disponibilité des sites cellulaires pouvant accepter ces cations. Tous les aspects qui touchent à la compétition cationique, aux variations du potentiel de membrane, à la conformation des sites de liaison (effets allostériques) influencent la disponibilité des sites de surface.

Le troisième niveau de disponibilité concerne la "traversée" de la membrane et à la présence de cibles intracellulaires où la toxicité de l'aluminium pourrait se jouer directement ou indirectement. La disponibilité des sites intracellulaires et intramembranaires est fonction à la fois de la perméabilité membranaire, de l'activation d'enzymes, de l'accessibilité de protéines et de la présence ou non de vésicules pouvant accumuler l'aluminium.

Comme nous l'avons vu dans les chapitres 4 et 5, ces trois niveaux de biodisponibilité sont influencés par le pH de la solution. La disponibilité chimique de l'aluminium en relation avec le pH est assez bien connue; par contre, sa bio-disponibilité, c'est-à-dire la possibilité d'une prise en charge par une cellule vivante (bioaccumulation) est assez mal connue. Une façon d'évaluer cette biodisponibilité est de pratiquer des expériences cinétiques, c'est-à-dire d'évaluer si la prise en charge intra et/ou extra-cellulaire de l'Al peut expliquer la toxicité observée au chapitre 5.

. Approche expérimentale

L'extaction à l'EDTA nous a permis de différencier entre l'aluminium adsorbé (ou désorbable par l'EDTA) et l'aluminium intra-cellulaire (non désorbable). La mesure de l'Al intracellulaire a aussi servi à vérifier si le flux cellulaire observé pouvait être expliqué par la concentration en Al^{+3} en solution.

L'étude de la protonation de la membrane cellulaire (Chapitre 4) a permis d'évaluer l'état de la membrane en fonction du pH, dans le but de construire un modèle qui tienne compte à la fois de la spéciation de l'aluminium en solution (capacité de donner) et de la quantité de ligands cellulaires disponibles pour capter des ions libres. Notons que ces deux paramètres varient inversement avec le pH. De plus, la mesure du phosphore intracellulaire au début de la phase stationnaire de croissance de Chlorella pyrenoidosa a apporté des indications sur la disponibilité potentielle du phosphore comme paramètre de détoxification ou d'immobilisation de l'Al intracellulaire.

. Résultats et discussion

L'effet du pH sur la toxicité de l'aluminium observée au Chapitre 5 s'est retrouvé au Chapitre 6 dans l'évaluation de la prise en charge. L'influence des ions hydrogène se faisait sentir

à tous les niveaux étudiés soit, la perméabilité membranaire, l'adsorption et l'absorption de l'Al, son flux cellulaire et le facteur de bioconcentration. Cependant, après avoir tenu compte de l'effet du pH sur la concentration en $[Al^{+3}]$ disponible et sur les ligands cellulaires $[L^-]$ libres, on observe toujours un effet du pH, de quoi soupçonner la sous-évaluation des effets du pH sur l'intégrité et le métabolisme membranaire. De fait, contrairement à ce que laisserait supposer le modèle d'ion libre, l'évaluation seule de $[Al^{+3}]$ et de $[L^-]_{libre}$ ne suffit pas à expliquer la tendance observée.

Pour ce qui est des réponses obtenues pour les trois formes d'aluminium testées, on peut penser à des mécanismes de toxicité différents. On a vu que la toxicité de l'aluminium monomère inorganique sur Chlorella pyrenoidosa se faisait sentir surtout à la fin de la croissance exponentielle, soit par une biomasse finale moins élevée que le témoin. Cette toxicité était évidente surtout aux plus fortes concentrations en aluminium. Les dosages de phosphore intracellulaire ont suggéré que l'Al à de faibles concentrations était capté dans les vésicules de polyphosphate, permettant ainsi un taux maximal de croissance normal. Cependant, après quelques jours (3-4), alors que la demande en phosphore devenait plus critique pour assurer le maintien et la croissance des cellules, celui-ci n'était plus disponible puisqu'associé à l'Al dans les vésicules; la croissance de la population algale était alors arrêtée prématurément.

Lorsque les algues étaient incubées dans un milieu contenant des concentrations en Al_{cv-cvr} élevées, il se peut que le mécanisme de toxicité soit quelque peu différent. Par exemple, selon la disponibilité des vésicules de polyphosphate, la détoxification pouvait être déficiente. En effet, on a montré qu'une concentration d'environ $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ d'aluminium total suffisait à provoquer une diminution de croissance de Chlorella pyrenoidosa de 30% par rapport au témoin. On peut se demander si ce n'est qu'une fraction de ce quota cellulaire qui provoquait (ou résultait) de la dite toxicité, laquelle fraction serait libre dans le cytoplasme et non emmagasiné dans les vacuoles.

Le même mécanisme pourrait s'appliquer pour les formes polymères, mais de façon plus drastique. On a montré au Chapitre 5 que pour une même concentration en Al (Al_{cv-cvr} et $Al_{\text{polymère}}$) l'inhibition de croissance (aire sous la courbe) était supérieure pour les formes Al_{cv-cvr} . Il en était de même pour les facteurs de bioconcentration. Par ailleurs, il ne faut pas oublier, que même si l'effet dû à Al_{cv-cvr} était soustrait de l'effet total dû à Al_{cv-cvr} et $Al_{\text{polymère}}$, il reste que les cellules avaient déjà subi un traumatisme maximal par la forme Al_{cv-cvr} disponible. On a alors conclu que l'Al polymère avait un effet additif non négligeable sur la toxicité de Al_{cv-cvr} .

Lorsque les courbes de croissance étaient décortiquées pour en tirer les taux de croissance maximum, la biomasse finale ainsi que le volume cellulaire moyen (indirectement), on a montré que l'effet

de l'aluminium polymère se faisait sentir plus rapidement que l' $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ sur la croissance de Chlorella pyrenoidosa, c'est-à-dire en agissant rapidement sur la division exponentielle de croissance. Puisqu'il s'agit de molécules fortement chargées (+7), on a supposé que l'effet premier de l'aluminium polymère s'exerçait sur la membrane même, soit en "plaquant" littéralement la cellule et l'empêchant ainsi de se diviser.

Quoique l'extraction de l'Al adsorbé sur la cellule par l'EDTA ait suggéré qu'une forte proportion de l'aluminium soit incorporée dans la cellule, il se peut que l'extraction par l'EDTA ait été biaisée par la forte adsorption de Al^{+7} sur les ligands cellulaires, laquelle ne permettait pas la désorption par l'EDTA. En effet, on s'attendrait à ce que le caractère même lipophile d'une telle molécule chargée empêche celle-ci de pénétrer facilement dans la cellule.

Pour ce qui est de l'aluminium organique, les résultats sont d'autant plus surprenant, qu'on se serait attendu à une toxicité équivalente ou supérieure en comparant une solution contenant à la fois de l'Al organique et de l'Al inorganique par rapport à un milieu contenant uniquement de l'Al inorganique. Au contraire, on a pu démontrer qu'en présence d'acide fulvique de faible poids moléculaire, l'Al inorganique qui reste libre en solution n'a plus les mêmes effets qu'il avait auparavant. Cette observation constitue un échec majeur du modèle de l'ion libre.

Depuis près de trente ans maintenant, les chimistes qui s'intéressent à l'environnement prétendent que les acides organiques diminuent la toxicité des métaux en les complexant, ce qui les rend moins disponibles. Cependant, l'idée que les acides, par leurs groupements libres HOOC et COO puissent intervenir au niveau cellulaire et physiologique, a été laissée de côté, peut-être un peu prématurément. De fait, nous avons démontré par nos observations que l'acide fulvique de faible poids moléculaire venait contrer l'effet négatif de Al_{CV-CVF} sur la perméabilité membranaire. Considérant que la perméabilité membranaire est un indicateur de la bonne intégrité membranaire et indirectement du bon métabolisme cellulaire, puisque critique dans les échanges intra/extracellulaires, on ne peut négliger cet aspect. Par contre, les résultats de prise en charge ne peuvent expliquer la non toxicité observée en présence d' Al_{CV-CVF} et d' Al_{CV} . En effet, la prise en charge similaire dans les deux cas, suggère que la cellule a "vu" et a incorporé à peu près la même quantité d'Al. Se peut-il que l'aluminium reste lié à l'acide fulvique lors de son adsorption et soit non métabolisable?

Une façon de discriminer l'effet de la matière organique sur la membrane cellulaire de son effet sur la chimie de l'aluminium serait de procéder à une expérience où les algues seraient incubées dans un sac à dialyse maintenu ouvert par le haut et suspendu dans une solution contenant de l' Al_{CV-CVF} et de l' $Al_{organique}$. De cette façon, seul l' Al_{CV-CVF} pourrait entrer en contact avec les cellules

puisque $Al_{\text{organique}}$ serait trop gros pour pénétrer à l'intérieur du sac. Ainsi, si l'inhibition de croissance était la même en présence ou non d' $Al_{\text{organique}}$ on pourrait avancer que la non toxicité observée auparavant était réellement due à des interactions acide organique-membrane. Par contre, si avec ces sacs à dialyse la toxicité est inhibée, ce serait dû à un processus chimique qui se jouerait au niveau des interactions acide organique et autres cations (compétition entre Al^{+3} et Cu^{+2} pour l'acide fulvique, par exemple).

7.4 Modélisation

De façon à pouvoir gérer et légiférer efficacement l'environnement aquatique, il serait intéressant, à la lueur des résultats obtenus dans cette recherche, de modéliser la toxicité de l'aluminium.

Avant de quantifier un tel modèle, on se doit de se rappeler que les tests ont été effectués en laboratoire à l'aide d'une algue qu'on ne retrouve pas nécessairement dans les eaux douces du Québec. De fait, le protocole expérimental était conçu de façon à bien contrôler tous les paramètres (simplifier le système) pour bien mettre en évidence les processus physico-chimico-biologiques. On se rappellera que les cultures étaient asynchrones, axéniques, cultivées en lots, dans des milieux simplifiées ne contenant ni phosphore ni agents complexants et compétitifs. Le pH était

maintenu constant par l'utilisation de tampons. Ce protocole nous a permis d'évaluer individuellement la part de toxicité de 3 formes différentes d'aluminium définies techniquement: Al monomère inorganique, Al polymère et Al organique.

Il va de soi qu'en milieu naturel, on peut retrouver conjointement ces formes ainsi que d'autres formes non testées dans notre protocole telles $Al-F^{2+}$, $AlSO_4^-$, ... Par contre, une fois les limites de notre modèle bien établies, nous pouvons concevoir les principes suivants:

- 1) Le pH est le paramètre primordial à considérer lorsqu'on évalue la toxicité de l'aluminium. Ainsi, plus le pH est élevé (pH 4.0 ---> 6.0) plus l'aluminium est toxique et ce à des concentrations retrouvées en milieu naturel.
- 2) La concentration en Al^{+3} nécessaire à inhiber 30% la croissance de Chlorella pyrenoidosa peut s'exprimer de la façon suivante:
 $-\log [Al^{+3}] = 1.77 \text{ pH} - 9.09$
- 3) Le quota cellulaire provoquant (ou résultant de) l'inhibition de croissance de 30% est évalué à $20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ d'Al, exprimé par rapport à la surface algale.
- 4) L'aluminium polymère a une toxicité additive sur l'aluminium monomère inorganique de l'ordre de 50% de celle de $Al_{\text{CV-CVR}}$.

- 5) La présence d'acide fulvique ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ COD}$), sous forme d'acide fulvique libre et de complexe Al-acide fulvique, à pH 5.0 est suffisante pour inhiber la toxicité de $150 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Al}_{\text{cv-cvr}}$ (Al libre).

Afin de bien concevoir la biodisponibilité de l'aluminium en milieu naturel, nous recommandons de mesurer l'aluminium dissous (non acidifié), l'aluminium qui réagit au catéchol violet (Al_{cv}), l'aluminium qui réagit au catéchol violet après avoir passé par une colonne échangeuse d'ion (Al_{cvr}), et à partir de l'estimation de l'aluminium monomère inorganique ($\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$) d'évaluer à l'aide d'un modèle thermodynamique (MINEQL, MINTEQ...) la part des formes libres d'aluminium (Al^{+3} , $\text{Al}(\text{OH})^{+2}$, $\text{Al}(\text{OH})_2^{+1}$, etc.).

7.5 Conclusion

Cette thèse a permis d'élucider certains aspects de la toxicité de l'aluminium à l'aide d'un protocole expérimental bien défini qui a permis de contrôler tous les paramètres mesurés. Tout d'abord, il existait une controverse quant au rôle joué par différentes espèces d' $\text{Al}_{\text{cv-cvr}}$ (Al^{+3} , $\text{Al}(\text{OH})^{+2}$, $\text{Al}(\text{OH})_2^{+1}$...). Tel que discuté aux Chapitres 1 et 5, certains auteurs ont associé statistiquement la forte proportion d'une espèce à un pH donné à l'effet toxique observé à ce même pH. Nous avons démontré qu'une telle interprétation nécessite l'adoption d'un modèle cinétique de

toxicité, plutôt qu'un modèle d'équilibre (ex.: le modèle d'ion libre). Pour qu'un modèle cinétique s'applique, il faudrait que la vitesse à laquelle la toxicité s'exprime chez l'algue soit plus rapide que la vitesse à laquelle l'Al s'équilibre avec la surface cellulaire. C'est la situation inverse qui prévaut: l'équilibre entre l'Al et la surface cellulaire semble atteint après 30 minutes, alors que l'effet toxique de l'Al monomère ne se fait sentir qu'après 24 heures. Dans de telles circonstances il faut éviter de parler d'une (ou des) "espèce (s) toxique(s)" d'aluminium (Neville et Campbell, 1988).

De plus, on a aussi pu expliquer que la forte toxicité observée à des pH intermédiaires (5.5-6.0), et imputée à des formes monomères d'hydroxy aluminium par Helliwell et al. (1983), était probablement due en fait à l'Al polymère. Ainsi, alors que cette forme n'a jamais été considérée comme étant toxique envers les algues, on a pu par nos résultats démontrer le contraire. Considérant que cette forme puisse devenir de plus en plus problématique, il va de soit qu'elle doit faire partie intégrante des modèles de toxicité, et donc être évaluée dans le réseaux de surveillance, surtout dans les milieux (lacs et rivières) où la concentration d'Al total est élevée et où le pH a déjà été acide mais se neutralise avec le temps. Il en va de même pour les effluents municipaux et industriels où l'alun est ajouté à de fortes concentrations et que le milieu récepteur est à un pH près de 6.

Pour ce qui est de l'aluminium organique, nos résultats ont pu vérifier ce qui était déjà connu qualitativement, soit une diminution de la toxicité de l'Al en présence d'acide fulvique. Cependant, les effets bénéfiques de l'acide fulvique ont dépassé l'amélioration attendue. En effet, l'aluminium inorganique qui restait en équilibre avec l'acide fulvique n'avait plus l'effet toxique anticipé. On a expliqué ces observations non plus chimiquement (puisque la chimie était bien contrôlée) mais biologiquement, en démontrant l'effet bénéfique même de la matière organique sur l'intégrité cellulaire.

Enfin, pour conclure, nous pouvons avancer que la mesure des trois formes d'aluminium: Al_{cv-cvr} , $Al_{polymère}$, $Al_{organique}$ est nécessaire pour bien gérer et contrôler la biodisponibilité de l'aluminium en milieu aquatique.

7.6 Références

- Neville, C.M. et P.G.C. Campbell, 1988. Proposed mechanisms of aluminium toxicity in a dilute, acidic environment to fingerlings and older life stages of salmonids. *Water Air Soil Pollut.*, 42:311-327.
- Rand, G. M. et S. R. Pétrocelli, 1985. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Washington, Hemisphere publishing corporation, 666p.

