Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique Centre Eau Terre Environnement

Toxicité de deux lanthanides (La, Ce) sur l'algue verte *Chlorella fusca*

Par

Cédrick Beaubien

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

Jury d'évaluation

Président du jury et Landis Hare examinateur interne INRS-ETE

Examinateur externe Davide Vignati

LIEC UMR7360

Université de Lorraine

Directeur de recherche Claude Fortin

INRS-ETE

Codirecteur de recherche Peter G. C. Campbell

INRS-ETE

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche Claude Fortin sans qui je n'aurais pas eu l'opportunité de réaliser mon projet de maîtrise. J'aimerais également souligner son souci du travail bien fait et son appui dans les différentes étapes de la réalisation de mon projet. J'aimerais aussi remercier mon co-directeur, Peter G. C. Campbell, pour son aide et ses conseils.

Les membres du personnel du soutien technique en laboratoire de l'INRS ont aussi eu un rôle important dans la réalisation de mon projet. Je tiens à remercier personnellement Julie Perrault, Anissa Bensadoune et Jean-François Dutil pour le support avec l'ICP-MS.

Je voudrais aussi remercier mes collègues avec qui j'ai partagé le laboratoire tout au long de mes études. Je remercie Vincent Laderriere, Kim Racine, Louise-Emmanuelle Paris, Sandra Kim Tiam, Fengjie Liu, Camille Guilleux, Isabelle Lavoie et Caroline Doose. Je tiens à remercier spécialement Sébastien Leguay pour son aide avec la spéciation chimique et ses nombreux conseils.

Je remercie également tous les étudiants et stagiaires avec qui j'ai passé de bons moments : Romain Léonard, Jade Bergeron, Antony Laberge, Cindy Beaulieu, Éloïse Lemaire et Alice Vidal. Je remercie mes amis les plus proches et membres du bureau 1307 : Louis-Philippe Théroux, Isabelle Fournier, Cindy Cormier et Marjorie Allaire-Verville.

Je remercie les membres de ma famille sans qui la réalisation de cette maîtrise n'aurait pas pu être possible. Je vous remercie pour votre support inconditionnel dans tous les grands projets que j'ai entrepris.

La dernière personne, et non la moindre, que j'aimerais remercier est ma copine Catherine Pagé Labelle qui m'a supporté tout au long de mes études malgré la distance qui nous séparait. Merci d'avoir relu l'ensemble de mon mémoire.

RÉSUMÉ

Avec l'augmentation de l'utilisation et de l'exploitation des lanthanides, une augmentation de la concentration environnementale de ces métaux est anticipée. L'exploitation minière de ces éléments convoités dans les écosystèmes nordiques du Canada rend l'évaluation adéquate du risque environnemental de plus en plus pressante. Dans ce travail, la toxicité et l'applicabilité du modèle de l'ion libre pour prédire la toxicité du lanthane et du cérium ont été étudiées ainsi que l'effet protecteur du calcium. L'alque verte unicellulaire Chlorella fusca a été sélectionnée pour réaliser cette étude à l'aide d'exposition chronique d'une durée de 120 h. Le pH du milieu d'exposition utilisé était de 5.5 et les concentrations nominales de La et Ce étaient comprises entre 10 et 100 000 nM. Les concentrations expérimentales ont été mesurées par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) et la spéciation des métaux dans les milieux d'exposition a été modélisée à l'aide du logiciel MINEQL+. La densité cellulaire a été mesurée à tous les 24 h à l'aide d'un compteur de particules et elle a été utilisée comme paramètre de détermination de la toxicité. Une diminution du rendement final a été observée dans le cas des deux métaux étudiés. En absence de tampon, des concentrations efficaces médianes (CE₅₀) de 490 ± 70 nM et de 430 ± 60 nM de lanthane ont été obtenues, selon que celles-ci soient exprimées en fonction de la concentration totale ou libre, respectivement. Dans le cas du cérium, ces valeurs étaient de 190 ± 70 nM et 170 ± 60 nM respectivement. Pour le cérium, un effet d'hormèse a été observé a des concentrations <500 nM. L'utilisation de plusieurs tampons (acide iminodiacétique, IDA; acide malique; acide nitrilotriacétique, NTA) a permis de démontrer que l'ion libre était un bon indicateur de risque de toxicité. En présence de 10⁻⁴ M d'acide malique, des CE₅₀ de 3 800 ± 500 nM et de 260 ± 30 nM de lanthane ont été obtenues, selon que celles-ci soient exprimées en fonction de la concentration totale ou libre, respectivement. Pour le cérium, ces valeurs étaient de 6 000 ± 1 000 nM et 270 ± 60 nM respectivement. Ceci démontre que la caractérisation du milieu d'exposition est très importante lors des tests de toxicité. La détermination des concentrations intracellulaires en lanthanides a également permis de démontrer que l'inhibition de la croissance de l'organisme était liée à l'internalisation de ces métaux dans les cellules peu importe le ligand utilisé. Des expériences en présence de différentes concentrations de calcium ont aussi démontré que le calcium induisait un effet protecteur sur l'algue étudiée en réduisant la quantité de lanthanide internalisé dans les cellules.

Mots-clés: algues vertes, *Chlorella fusca*, écotoxicité, lanthane, cérium, internalisation, calcium, phosphate, ion libre

ABSTRACT

With the increase in the use and exploitation of lanthanides, an increase in the environmental concentrations of these metals is anticipated. Before authorizing the development of new mines in northern Canadian ecosystems for these valuable elements, environmental regulators must carry out adequate environmental risk assessments. Such assessments require data on the potential toxicity of these elements in the receiving waters downstream from the mines. In the present work, the toxicity of lanthanum and cerium was studied, as well as the protective effect of calcium, and the ability of the free ion activity model to predict the observed toxicity was tested. The unicellular green alga Chlorella fusca was selected for this chronic exposure study. which was extended to a period of 120 h. The pH of the exposure media used was 5.5 and the nominal concentrations of La and Ce were between 10 and 100,000 nM. The experimental concentrations were measured by Inductively Coupled Mass Spectrometry (ICP-MS) and the equilibrium speciation of the metals in the exposure media was modeled using MINEQL+ software. Cell densities were measured every 24 hours using a particle counter and were used to assess the effects of the lanthanides on algal growth. A decrease in the final algal yield was observed in the case of the two studied metals. In the absence of buffer, half maximal effective concentrations (EC₅₀) of 490 \pm 70 nM of total lanthanum, 430 \pm 60 nM of free lanthanum, 190 \pm 70 nM of total cerium and 170 ± 60 nM of free cerium were obtained. In the case of cerium, an hormesis effect was observed at concentrations <500 nM. The utilization of buffers (iminodiacetic acid, IDA; malic acid; nitrilotriacetic acid, NTA) demonstrated that the calculated free ion concentration was a good indicator of toxicity. In the presence of 10⁻⁴ M of malic acid, EC₅₀ of 3 800 \pm 500 nM of total lanthanum, 260 \pm 30 nM of free lanthanum, 6 000 \pm 70 nM of total cerium and 270 ± 60 nM of free cerium were obtained. This shows that the characterization of the exposure medium is very important in toxicity testing. The inhibition of algal growth was also correlated with the intracellular lanthanide concentrations, regardless of the ligand used. Increasing the ambient calcium concentration protected the test algae by reducing the amount of lanthanide internalized into the cells.

Keywords: green algae, *Chlorella fusca*, toxicity, lanthanum, cerium, internalization, calcium, phosphate, free ion

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIE	MENTS	i
RÉSUMÉ		iii
ABSTRACT	Γ	v
TABLE DES	S MATIÈRES	vii
LISTE DES	TABLEAUX	xi
LISTE DES	FIGURES	xiii
CHAPITRE	1 : INTRODUCTION	1
1.1 Le	es lanthanides	1
1.1.1	Caractéristiques	1
1.1.2	Exploitation et extraction	3
1.1.3	Le marché mondial et son évolution	5
1.1.4	Utilisations	7
1.2 Co	ontamination environnementale	9
1.3 Do	onnées écotoxicologiques	13
1.1.1	Algues	13
1.1.2	Daphnies	14
1.1.3	Autres organismes aquatiques	15
1.4 Ob	ojectifs de recherche	19
CHAPITRE	2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	21
2.1 Or	ganisme d'étude	21
2.1.1	Chlorella fusca	21
2.1.2	Culture et entretien des algues	22
2.2 Le	es modèles d'équilibre de spéciation chimique	22
2.3 Mi	lieux de culture et d'exposition	26

	2.3.	.1	Produits, réactifs et solutions intermédiaires	27
	2.3	.2	Milieu de culture	27
	2.3.	.3	Milieu d'exposition au La	30
	2.3.	.4	Milieu d'exposition au Ce	30
	2.3.	.5	Milieu d'exposition à concentration variable de calcium	31
	2.3.	.6	Milieu de rinçage	31
2	.4	Ess	ais d'écotoxicité	31
	2.4.	.1	Matériel de laboratoire	31
	2.4.	.2	Pré-inoculation	32
	2.4.	.3	Exposition des algues	32
	2.4.	.4	Décompte cellulaire	33
	2.4.	.5	Récolte des algues	34
	2.4.	.6	Digestion	34
2	5	Ana	llyse des lanthanides	36
	2.5.	.1	Analyse par ICP-MS	36
	2.5.	.2	Paramètres de l'ICP-MS	37
2	6	Trai	tements des données	38
	2.6	.1	Détermination des CE ₅₀	38
	2.6	.2	Lanthanides intracellulaires	39
	2.6	.3	Analyse statistique	39
CH	APIT	RE 3	B : EXPOSITION DE <i>C. FUSCA</i> AU LANTHANE: RÉSULTATS ET DISCUSSION	141
3	3.1	Spé	ciation du La	41
3	3.2	Con	nportement du La dans le milieu d'exposition	42
3	3.3	Ехр	osition au La en absence de tampon	45
	3.3	.1	Effet sur la croissance	45
3	4	Fxn	osition au La en présence du tampon NTA	48

	3.4	.1	Effet sur la croissance	48
;	3.5	Ехр	osition au La en présence du tampon IDA	50
	3.5	.1	Effet sur la croissance	50
;	3.6	Ехр	osition au La en présence du tampon acide malique	51
	3.6	.1	Effet sur la croissance	52
;	3.7	Cor	npilation des données obtenues	54
	3.7	.1	Ion libre	55
	3.7	.2	Internalisation	57
;	3.8	Influ	uence de la concentration en calcium	60
CH	IAPIT	RE 4	: EXPOSITION DE <i>C. FUSCA</i> AU CÉRIUM: RÉSULTATS ET DISCUSSION	. 65
	4.1	Spé	eciation du Ce	65
	4.2	Cor	nportement du Ce dans le milieu d'exposition	65
4	4.3	Ехр	osition au Ce en absence de tampon	68
	4.3	.1	Effet sur la croissance	68
	4.4	Ехр	osition au Ce en présence d'acide malique	71
	4.4	.1	Effet sur la croissance	71
4	4.5	Cor	npilation des données obtenues	74
	4.5	.1	Ion libre	75
	4.5	.2	Internalisation	76
4	4.6	Influ	uence de la concentration en calcium	79
CH	IAPIT	RE 5	5 : CONCLUSION	. 83
CH	IAPIT	RE 6	S:RÉFÉRENCES	. 87
ΑN	INEX	E A		. 93
ΑN	INEX	ΕВ		. 95
ΑN	INEX	E C		. 97
۸۸	INEY	ΕD		aa

ANNEXE E	101
ANNEXE F	107

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Concentrations en lanthanides dans la croûte terrestre. Tiré de Cotton (2006)2
Tableau 1.2 : Rayon atomique et ionique des lanthanides. Tiré de Cotton (2006)2
Tableau 1.3 : Liste des applications des terres rares. Adapté de EPA (2012)8
Tableau 1.4 : Compilation des données de concentrations environnementales de terres rares dans différentes eaux douces et marines trouvées dans la littérature
Tableau 1.5 : Compilation de données écotoxicologiques trouvées dans la littérature17
Tableau 2.1 : Constantes de formation de différents ligands avec le lanthane et le cérium d'après la base de données 46 de NIST version 8.0 (I = 0,1 M et T = 25 °C)24
Tableau 2.2 : Constantes de formation des complexes de La et Ce (tirées de MINEQL+)26
Tableau 2.3 : Solutions intermédiaires et leur composition détaillée
Tableau 2.4 : Concentrations des espèces dans chacun des milieux
Tableau 2.5 : Concentrations en lanthane et cérium dans les échantillons de référence <i>Citrus Leaves</i> (NIST 1572, valeurs non certifiées) et <i>Aquatic Plant</i> (BCR 670, valeurs certifiées) 36
Tableau 3.1 : CE ₅₀ de La pour <i>C. fusca</i> en absence de tampon et leurs écarts-types déterminés à différents temps d'expositions
Tableau 3.2 : CE ₅₀ de La pour <i>C. fusca</i> en présence d'acide malique et leurs écarts-types déterminés à différents temps d'expositions
Tableau 4.1 : CE ₅₀ de Ce pour <i>C. fusca</i> en absence de tampon et leurs écarts-types déterminés à différents temps d'expositions
Tableau 4.2 : CE ₅₀ de Ce pour <i>C. Fusca</i> en présence d'acide malique et leurs écarts-types déterminés à différents temps d'expositions

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : District minier de Bayan Obo en 2006. Tirée de NASA earth observatory. Reproduction autorisée. (http://earthobservatory.nasa.gov/IOTD/view.php?id=77723&src=eoaiotd)
Figure 1.2 : Schéma de traitement du minerai de bastnäsite extrait du gisement de Bayan Obo. Adapté de (British Geological Survey, 2011)4
Figure 1.3 : Évolution du marché des terres rares (1949-2009). Tirée de Tu (2010)5
Figure 1.4: Matériaux critiques identifiés par la commission européenne (http://ec.europa.eu/growth/ sectors/raw-materials/specific-interest/critical/index_en.htm)7
Figure 2.1 : Visualisation de <i>Chlorella fusca</i> au microscope optique à 1000x21
Figure 2.2 : Log K du cérium en fonction du log K du lanthane pour un même ligand25
Figure 2.3 : Photo de l'intérieur d'un spectromètre de masse XSeries 2 (photo prise par Cédrick Beaubien le 14 avril 2015)
Figure 3.1 : Concentration de lanthane en solution relativement à la concentration au temps initial (a) en absence d'algues et de tampon, (b) en présence d'algues et en absence de tampon, (c) en présence d'algues et d'acide malique dans les échantillons Stab (stabilité) (les symboles vides représentent la concentration obtenue lors de la filtration à 120 h)
Figure 3.2 : Courbes de croissance de <i>C. fusca</i> exposée à différentes concentrations de La. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures
Figure 3.3 : Densités cellulaires relatives aux témoins après 120 h d'exposition en fonction de la concentration moyenne de La mesurée en solution
Figure 3.4 : Courbes de croissance de <i>C. fusca</i> exposée à différentes concentrations de La en présence de (a) NTA (10 ⁻⁴ M) et (b) NTA (8,0×10 ⁻⁵ M). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur trois mesures à l'exception des échantillons de la figure (a) dont l'écart-type a été calculé sur deux mesures.
Figure 3.5 : Courbes de croissance de <i>C. fusca</i> exposée à différentes concentrations de La en présence d'IDA (10 ⁻⁴ M). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur deux mesures51

Figure 3.6 : Courbes de croissance de <i>C. fusca</i> exposée à différentes concentrations de La en
présence d'acide malique (10 ⁻⁴ M). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures (six pour les témoins et trois pour les échantillons)
Figure 3.7 : Densités cellulaires relatives aux témoins après 120 h d'exposition en présence d'acide malique (10 ⁻⁴ M) en fonction de la concentration moyenne de La mesurée en solution.53
Figure 3.8 : Compilation des rendements cellulaires après 120 h d'exposition en fonction de la concentration moyenne de La en solution. La courbe tracée correspond à la courbe dose réponse obtenue à la figure 3.3 en absence de tampon
Figure 3.9 : Compilation des rendements cellulaires après 120 h d'exposition en fonction de la concentration d'ion libre de La en solution. La courbe tracée correspond à la courbe dose réponse obtenue à la figure 3.3 en absence de tampon exprimée en fonction de l'ion libre56
Figure 3.10 : Compilation des rendements cellulaires après 120 h d'exposition en fonction de la concentration intracellulaire de La. La courbe tracée correspond à la courbe dose réponse en absence de tampon (expérience digestion totale) exprimée en fonction de la concentration intracellulaire
Figure 3.11 : Compilation des concentrations intracellulaires en La après 120 h d'exposition en fonction de la concentration moyenne de La en solution
Figure 3.12 : Compilation des concentrations intracellulaires en La après 120 h d'exposition en fonction de la concentration d'ion libre La en solution
Figure 3.13 : Courbes de croissance de <i>C. fusca</i> exposée à différentes concentrations de Ca en présence de La (3,5 μM) et d'acide malique (10 ⁻⁴ M). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur cinq mesures.
Figure 3.14 : Densité cellulaire et [La] intracellulaire après 120 h en fonction de la concentration de calcium dans les milieux
Figure 3.15 : Résultat de la régression linéaire effectuée à l'aide du logiciel SigmaPlot afin de déterminer la constante K _{Ca} pour le lanthane
Figure 4.1: Concentration de cérium en solution relativement à celle au temps initial (a) en absence d'algues et tampon, (b) en présence d'algues et en absence de tampon, (c) en présence d'algues et d'acide malique dans les échantillons Stab (stabilité) (les symboles vides représentent la concentration obtenue lors de la filtration à 120 h)

Figure 4.2 : Courbes de croissance de C. fusca exposée à différentes concentrations de Ce. Les
barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures (cinq pour les témoins et trois pour les échantillons)
Figure 4.3 : Densités cellulaires relatives aux témoins après 120 h d'exposition en fonction de la concentration moyenne de Ce mesurée en solution. La ligne pointillé à une densité cellulaire relative de 1 correspond à la valeur de CE ₅₀ déterminée par régression non linéaire et celle à 0,4 à la valeur attendue
Figure 4.4 : Courbes de croissance de <i>C. fusca</i> exposée à différentes concentrations de Ce en présence d'acide malique (10 ⁻⁴ M). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures (six pour les témoins et trois pour les échantillons)
Figure 4.5 : Densités cellulaires relatives aux témoins après 120 h d'exposition en présence d'acide malique (10 ⁻⁴ M) en fonction de la concentration moyenne de Ce mesurée en solution. 73
Figure 4.6 : Compilation des rendements cellulaires après 120 h d'exposition en fonction de la concentration moyenne de Ce en solution
Figure 4.7 : Compilation des rendements cellulaires après 120 h d'exposition en fonction de la concentration d'ion libre de Ce en solution
Figure 4.8 : Compilation des rendements cellulaires après 120 h d'exposition en fonction de la concentration intracellulaire de Ce
Figure 4.9 : Compilation des concentrations intracellulaires en Ce après 120 h d'exposition en fonction de la concentration moyenne de Ce en solution
Figure 4.10 : Compilation des concentrations intracellulaires en Ce après 120 h d'exposition en fonction de la concentration d'ion libre Ce en solution
Figure 4.11 : Courbes de croissance de <i>C. fusca</i> exposée à différentes concentrations de Ca el présence de Ce (6,0 μM) et d'acide malique (10 ⁻⁴ M). Les barres d'erreurs représentent l'écart type sur cinq mesures.
Figure 4.12 : Densité cellulaire et [Ce] intracellulaire après 120 h en fonction de la concentration de calcium dans les milieux8
Figure 4.13 : Résultat de la régression linéaire effectuée à l'aide du logiciel SigmaPlot afin de déterminer la constante K _{Ca} pour le cérium82

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1 Les lanthanides

Dans la sixième rangée du tableau périodique, on retrouve les lanthanides appartenant au groupe IIIb. Il y a 15 éléments dans la série des lanthanides : le lanthane (La), le cérium (Ce), praséodyme (Pr), le néodyme (Nd), le proméhium (Pm), le samarium (Sm), l'europium (Eu), le gadolinium (Gd), le terbium (Tb), le dysprosium (Dy), l'holmium (Ho), l'erbium (Er), le thulium (Th), le ytterbium (Yb) et le lutécium (Lu). Les lanthanides sont souvent appelés terres rares. Il faut noter que les terres rares comprennent aussi le scandium (Sc) et l'yttrium (Y). Les terres rares, malgré ce que leur appellation suggère, ont une abondance comparable à celle d'autres métaux dans la croûte terrestre. Le cérium, par exemple, est plus abondant que le cuivre dans la croûte terrestre (Castor & Hedrick, 2006).

1.1.1 Caractéristiques

Les lanthanides se retrouvent généralement sous l'état d'oxydation 3+, mais il est possible de les retrouver sous l'état d'oxydation 2+ (Sm, Eu, Tm, Yb) et 4+ (Ce, Pr, Tb) (Habashi, 1997). L'appellation terres rares provient du fait qu'elles ont été isolées au 18^e et 19^e siècle sous forme d'oxydes en provenance de minéraux rares (Castor & Hedrick, 2006). De plus, la séparation de ces éléments n'a pas été possible avant le 20^e siècle dû à leur réactivité ainsi que leur similarité chimique (Castor & Hedrick, 2006). Cette similarité est causée par l'ajout d'électron sur la couche électronique interne 4f lorsque le numéro atomique augmente plutôt que sur les couches électroniques externes. Les orbitales 4f ne participent alors pas aux liaisons chimiques, car elles sont blindées par les orbitales 5s et 5p (Cotton, 2006, Schijf, 1992). Les lanthanides sont classés parmi deux sous-groupes : les terres rares légères (Light Rare Earth Elements, LREEs) qui incluent les éléments allant du lanthane au gadolinium et les terres rares lourdes (Heavy Rare Earth Elements, HREEs) qui comprennent les éléments allant du terbium au lutécium. Les lanthanides légers ont seulement des électrons non pairés sur la couche électronique 4f tandis que des électrons sont pairés dans le cas des lanthanides lourds (Gambogi, 2011). L'yttrium est souvent classé parmi les terres rares lourdes puisqu'il ressemble physiquement et chimiquement à celles-ci tandis que le scandium n'est pas classé parmi les lanthanides légers ou lourds (Castor & Hedrick, 2006). De plus, les géologues excluent le scandium des terres rares puisque son rayon ionique est beaucoup plus petit que les autres terres rares (Chakhmouradian & Wall, 2012). Les lanthanides légers sont plus abondants dans la croûte terrestre que les lanthanides lourds. De plus, les lanthanides avec un numéro atomique pair sont plus abondants que leur voisin dont le numéro atomique est impair. Ce type de variation en forme de dents de scie est appelée effet d'Oddo-Harkins qui stipule que les éléments avec un numéro atomique pair ont une stabilité relative du noyau plus grande que les éléments avec un numéro atomique impair (Chakhmouradian & Wall, 2012, Nikanorov, 2009). Pour mieux illustrer cet effet, les concentrations en lanthanides dans la croûte terrestre sont présentées au tableau 1.1.

Tableau 1.1 : Concentrations en lanthanides dans la croûte terrestre. Tiré de Cotton (2006)

	La	Се	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Но	Er	Tm	Yb	Lu
Conc. (ppm)	35	66	9,1	40	7	2,1	6,1	1,2	4,5	1,3	3,5	0,5	3,1	0,8

Le rayon ionique des lanthanides diminue lorsque l'on se déplace de gauche à droite dans la série (voir tableau 1.2). Cette réduction du rayon est appelée la contraction des lanthanides et est causée par l'écrantage moins efficace du noyau par les orbitales 4f. Lorsque le numéro atomique augmente, l'ajout d'électrons 4f ne procure pas un écrantage suffisant comparativement à l'augmentation de la charge du noyau, ce qui provoque une augmentation de l'attraction du noyau sur les électrons des couches externes 5s² et 5p⁶ (Cotton, 2006, Schijf, 1992).

Tableau 1.2 : Rayon atomique et ionique des lanthanides. Tiré de Cotton (2006)

Rayon	La	Се	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Er	Yb	Lu
Atomique	187,7	182,5	182,8	182,1	180,2	204,2	180,2	178,2	175,7	194,0	173,4
Ionique	103,2	101,0	99,0	98,3	95,8	94,7	93,8	92,3	89,0	86,8	86,1

1.1.2 Exploitation et extraction

Environ 200 minéraux sont connus actuellement pour contenir des terres rares, mais seulement une faible partie d'entre eux sont viables à l'exploitation (British Geological Survey, 2011). Chaque année, environ cinq nouveaux minerais de terres rares sont découverts (Chakhmouradian & Wall, 2012). Les minerais les plus riches en terres rares exploités sont : la bastnäsite, la monazite et la xénotime (British Geological Survey, 2011). La bastnäsite et la monazite contiennent principalement des terres rares légères, tandis que la xénotime contient principalement des terres rares lourdes (British Geological Survey, 2011). Il est important de souligner que la monazite peut contenir de fortes concentrations en thorium. Le thorium est un élément radioactif connu pour ses impacts environnementaux associés à l'exploitation des terres rares (voir section 1.2). C'est d'ailleurs pour cette raison que les dépôts dans les placers à monazites ne sont plus exploités (Castor & Hedrick, 2006). On retrouve aussi de fortes concentrations en terres rares dans des minerais où le cation majeur a été substitué par une terre rare dont le rayon et la charge sont semblables à celui-ci (Chakhmouradian & Wall, 2012).

La majorité des terres rares extraites proviennent de Chine, principalement du gisement Bayan Obo situé en Mongolie-Intérieure (Kynicky *et al.*, 2012). Le fer et les terres rares qui s'y trouvent sont extraits de deux grandes mines à ciel ouvert avant d'être acheminé à Baotou, 150 km plus loin, par transport ferroviaire (Castor & Hedrick, 2006). Ce qui caractérise le gisement de Bayan Obo des autres gisements c'est la forte association des terres rares avec le fer qui est exploité parallèlement aux terres rares (Castor, 2008). Le gisement de Bayan Obo contient des quantités approximativement équivalentes de monazite et de bastnäsite (Castor, 2008). Toutefois, les terres rares proviennent de minerais de bastnäsite, extrait sélectivement, qui se retrouve dans certaines zones d'extraction minière (Castor & Hedrick, 2006). Une photo satellite du site minier où se trouve le gisement Bayan Obo est présentée à la figure 1.1.



Figure 1.1 : District minier de Bayan Obo en 2006. Tirée de NASA earth observatory. Reproduction autorisée. (http://earthobservatory.nasa.gov/IOTD/view.php?id=77723&src=eoa-iotd).

Suite à l'extraction minière du minerai riche en terre rare, celui-ci subit de multiples transformations chimiques et physiques. À titre d'exemple, le schéma de traitement du minerai de bastnäsite du gisement de Bayan Obo est présenté à la figure 1.2.

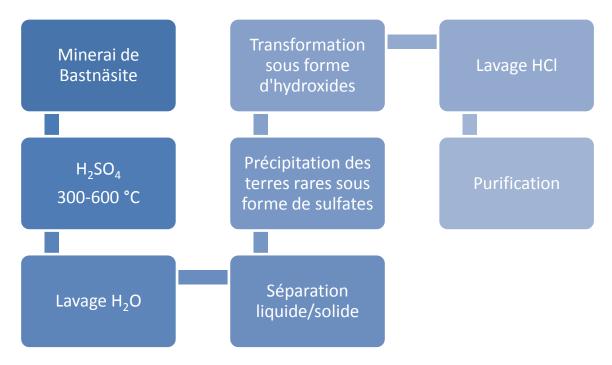


Figure 1.2 : Schéma de traitement du minerai de bastnäsite extrait du gisement de Bayan Obo. Adapté de (British Geological Survey, 2011).

En raison de la cooccurrence des éléments dans la croute terrestre (cf. tableau 1.1) et d'une disparité dans la demande industrielle parmi les lanthanides, certains se retrouvent produit en excès. Dans les années 1980, la mine de Mountain Pass a réussi à vendre la majorité de ses oxydes de cérium, de samarium et d'europium. Par contre, le lanthane, n'étant pas en forte demande, était stocké. Ce n'est que dans les années 1990, lors d'une forte demande en lanthane de haute pureté pour les convertisseurs catalytiques automobiles, le craquage catalytique et les aimants, que les stocks commencèrent à s'écouler (Castor, 2008).

1.1.3 Le marché mondial et son évolution

Ce n'est que dans les années 1940 que les lanthanides deviennent disponibles commercialement (Castor & Hedrick, 2006). Entre 1965 et 1985, la majorité des lanthanides étaient extraits de la mine de Mountain Pass en Californie d'un dépôt de carbonatite contenant du minerai de bastnäsite (Castor, 2008). L'Australie était aussi un producteur majeur de lanthanides jusqu'aux années 1990. Dans les années 1980, la Chine prend place dans le marché des lanthanides et devient un producteur majeur avec plus de 80 % de la production mondiale en 1998 (Castor & Hedrick, 2006). La figure 1.3 permet de mieux visualiser l'évolution du marché des terres rares jusqu'à 2009.

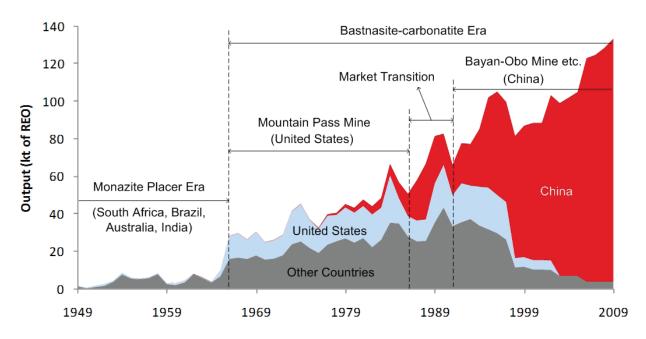


Figure 1.3 : Évolution du marché des terres rares (1949-2009). Tirée de Tu (2010).

Plusieurs pays décident de cesser leur exploitation des terres rares à cause de la dominance du marché par la Chine et ses prix compétitifs en plus des nombreux problèmes environnementaux (voir section 1.2) qu'entraîne l'exploitation des terres rares (Castor, 2008, Chakhmouradian & Wall, 2012). La mine de Mountain Pass n'est pas épargnée par cette nouvelle tendance et ferme ses portes en 2002 (Hedrick, 2003).

Au début des années 2000, la Chine introduit des quotas sur l'exportation des terres rares. En 2010, ces quotas sont réduits significativement, ce qui entraine une hausse significative du prix des terres rares à l'extérieur de la Chine (Simandl, 2014). De plus, la Chine coupe ses exportations en direction du Japon suite à une querelle diplomatique (Folger, 2011). L'instabilité du marché des terres rares amène le monde à se lancer à la recherche de nouvelles sources de terres rares et de nouveaux moyens pour réduire leur consommation. En 2012, la mine de Mountain Pass en Californie rouvre ses portes afin d'y exploiter à nouveau les terres rares qui s'y trouvent (Gambogi, 2012). Le prix des terres rares chute significativement dans la même année suite aux efforts de la communauté internationale. Par exemple, le prix des oxydes de lanthane a chuté de 80 % et celui des oxydes de cérium de 74 % (Gambogi, 2012). Toutefois, les tensions que soulève le monopole de la Chine sur le marché des terres rares sont toujours palpables. En août 2014, l'Organisation Mondiale du Commerce (OMC) a donné raison aux États-Unis, l'Union européenne et au Japon qui accuse la Chine de transgresser les règles commerciales à l'égard de l'imposition de quotas d'exportation sur les terres rares (USGS, 2015). De son côté, la Chine défend sa position en affirmant vouloir mieux contrôler l'exploitation des terres rares dans le but de mieux protéger l'environnement et conserver les ressources pour sa propre industrie qui consomme environ 60 % des terres rares produites (Folger, 2011, USGS, 2015, Wübbeke, 2013).

Actuellement, les lanthanides sont utilisés dans plusieurs technologies émergentes dont la demande ne cesse d'augmenter. La croissance démographique et le développement des pays en voie d'émergence sont des facteurs qui accentuent la demande pour les lanthanides (Grégoire, 2014). D'ailleurs, les terres rares sont classées parmi les ressources « critiques » (Chakhmouradian & Wall, 2012, Commission Européenne, 2014, DOE, 2011). Lorsqu'une ressource est dite « critique », cela signifie qu'elle est économiquement importante et que la demande risque de surpasser l'offre. Dans le cas des lanthanides, plus particulièrement les lanthanides lourds, le facteur de risque est principalement associé à l'approvisionnement puisque la production est limitée à certains pays. On peut voir sur la figure 1.4 les 20 matériaux ayant été identifiés comme critique par la commission européenne.

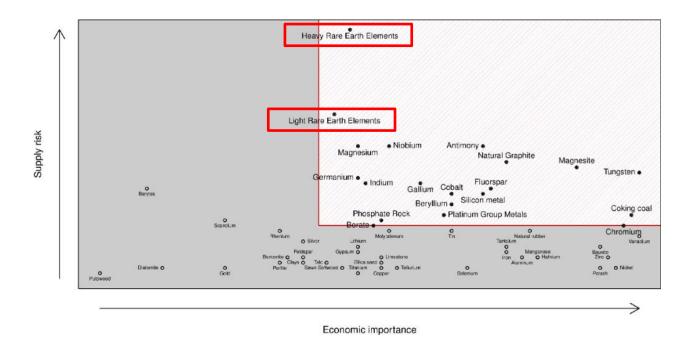


Figure 1.4: Matériaux critiques identifiés par la commission européenne (http://ec.europa.eu/growth/sectors/raw-materials/specific-interest/critical/index_en.htm).

1.1.4 Utilisations

Les lanthanides sont utilisés dans de multiples procédés et produits tous les jours. Ils sont utilisés dans des domaines tels que les énergies renouvelables, la médecine, l'agronomie, la défense militaire, les automobiles, etc. En 2008, l'oxyde de lanthane et l'oxyde de cérium comptaient pour 60 % de l'utilisation totale des oxydes de terres rares (Goonan, 2011). Une augmentation de la demande en terres rares est prédite dans le cas de certaines utilisations telles que les convertisseurs catalytiques pour les automobiles, les aimants permanents et la fibre optique (Castor & Hedrick, 2006). Toutefois, une diminution de l'utilisation des lanthanides est prédite dans le cas des luminophores utilisés dans les écrans cathodiques avec l'augmentation de l'utilisation des écrans plats (Castor & Hedrick, 2006). Une augmentation de l'utilisation des terres rares dans le secteur des énergies vertes comme les véhicules électriques et les éoliennes est présentement observée (Binnemans *et al.*, 2013). Cependant, il est important de souligner qu'une très faible quantité des terres rares utilisées est recyclée (Binnemans *et al.*, 2013, Goonan, 2011), mais des efforts ont été déployés afin de trouver des façons de les récupérer (Dodson *et al.*, 2012). Une liste exhaustive des différentes applications des terres rares tirée de EPA (2012) est présentée au tableau 1.3.

Tableau 1.3 : Liste des applications des terres rares. Adapté de EPA (2012)

Éléments	Utilisations							
La	Batteries, catalyseur pour le raffinement du pétrole, pellicules photographiques des rayons X, lasers, appareils de communications, applications médicales							
Ce	Catalyse, polissage, alliages, polisseurs de lentilles (lunette, télévision, miroir, microprocesseur en silicone et lecteur de disque), applications médicales							
Pr	Résistance à la corrosion des aimants, pigments, projecteurs, filtres photographiques							
Nd	Aimants, lasers, fracturation catalytique, moteurs électriques, appareils de communications							
Pm	Source de radiation bêta, craquage catalytique							
Sm	Aimants à haute température, barres de contrôle des réacteurs nucléaires, moteurs électriques							
Eu	Écran à cristaux liquides (LCD), éclairage fluorescent, additifs de verre, appareils de communication							
Gd	Agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), additifs de verre							
Tb	Lumière fluorescente (éclairage et affichage), moteurs électriques							
Dy	Aimants à hautes performances, lasers, moteurs électriques							
Но	Aimants à hautes performances							
Er	Lasers, colorant à verre							
Tm	Aimants à hautes performances							
Yb	Fibre optique, panneaux solaires, alliages, lasers, source de radiation pour les unités portables de rayons X							
Lu	Fluorescence des rayons X							

1.2 Contamination environnementale

Avec l'augmentation de l'exploitation et de l'utilisation des lanthanides, une augmentation des concentrations environnementales en lanthanides (82 % d'origines anthropogéniques) a été observée dans le fleuve Rhin (Kulaksiz & Bau, 2013). La valeur de bruit de fond de la somme des terres rares couramment utilisée en Chine est de 188 mg/kg de poids sec (Xiaofei Li et al., 2013). Une étude effectuée à proximité d'un barrage de résidus minier solide de la ville de Baotou en Chine a démontré que la concentration de terres rares totales dans le sol pouvait atteindre des valeurs de 28 g/kg de poids sec (Jinxia Li et al., 2010). Les concentrations en lanthanides dans les sols peuvent atteindre des valeurs très élevées à cause de leur faible mobilité (Gonzalez et al., 2014). Cette faible mobilité est associée à l'adsorption des lanthanides sur les particules de sol, plus particulièrement à la matière organique ainsi que les oxydes de fer et de manganèse, qui s'y retrouvent (Xinde et al., 2000). Cette affinité est aussi observée dans le cas des sédiments (Sneller et al., 2000). Dans les cours d'eau, les sédiments pourraient agir comme puits à lanthanides. Davranche et al. (2011) ont observé que sous des conditions réductrices, la matière organique était une source importante de terres rares dans la colonne d'eau. De plus, des facteurs de bioconcentration dynamiques pour les lanthanides dans les plantes aquatiques pouvant atteindre 46 000 L/kg de poids sec ont été rapportés (Weltje et al., 2002).

Bau *et al.* (1997) ont effectué un échantillonnage de l'eau dans la région est de la mer Méditerranée et ont mesuré des concentrations dissoutes¹ en terres rares d'environ 10 pmol/kg d'eau. En 2003, Bau *et al.* (2006) ont échantillonné différents cours d'eau (lac Ontario, lac Érié, rivière Niagara) à une profondeur de 5 m afin de déterminer les concentrations dissoutes en terres rares qui s'y retrouvaient. Les concentrations dissoutes observées varient entre 1 pM et 1 000 pM (Bau *et al.*, 2006). Dans l'estuaire du fleuve Elimbah en Australie, des concentrations dissoutes en lanthanides variant entre 0,01 et 1,7 nmol/kg ont été rapportées (Lawrence & Kamber, 2006). Dans l'océan Pacifique, des concentrations dissoutes de 0,1 à 36 pmol/kg ont été mesurées et une augmentation de la concentration en lanthanides a été observée lorsque l'échantillon était prélevé à une plus grande profondeur jusqu'à concurrence de 3 000 m (Wang & Yamada, 2006). Möller *et al.* (2002) ont effectué l'analyse des cours d'eau à proximité de la ville de Prague en République Tchèque. Des concentrations dissoutes de 1 à 500 pM en

¹ Lorsque l'on parle de concentration dissoute, cela signifie que l'échantillon a été filtré sur une membrane de 0,45 μm.

lanthanides ont été mesurées. Zhu et al. (1998) ont fait l'analyse de l'eau de surface du port de Rotterdam aux Pays-Bas et ils ont mesurés des concentrations dissoutes de lanthanides se situant entre 0,5 (Dy) et 12 (Ce) nM. Dans leur étude, de Boer et al. (1996) ont effectué l'analyse des lanthanides se retrouvant dans l'eau d'approvisionnement de six stations de production d'eau potable aux Pays-Bas ainsi que dans l'eau du fleuve Meuse et du fleuve Rhin. Dans deux des quatre sites des stations utilisant l'eau souterraine pour s'approvisionner, 50 % des lanthanides mesurés sont associés avec des particules. Dans les deux autres sites, la totalité des lanthanides mesurés était sous forme dissoute. On note que dans les sites d'approvisionnement des stations où les lanthanides se retrouvent sous forme dissoute, le pH et la concentration totale en carbonate y sont plus faibles que dans les sites d'approvisionnement des stations où les lanthanides sont associés avec des particules. Une concentration totale de cérium de 215 nM a été mesurée à l'un des sites d'une station où les lanthanides se retrouvaient sous forme dissoute. Dans les deux fleuves analysés, des concentrations totales de lanthanides entre 66 pM (Eu) et 4,8 nM (Ce) ont été mesurées. Lors d'un projet d'étude à l'INRS, des concentrations dissoutes en lanthanides ont été mesurées dans plusieurs cours d'eau (voir ANNEXE A). Les concentrations de lanthanides mesurées oscillent entre 10 nM et 1 μM. Les concentrations les plus élevées ont été observées sur d'anciens sites miniers où il y avait présence de drainage minier acide.

Tableau 1.4 : Compilation des données de concentrations environnementales de terres rares dans différentes eaux douces et marines trouvées dans la littérature

Location	Type d'eau	Profondeur	Composition ^a	рН	Type de conc.	[Ln]	Référence
Méditerranée	Saline	100 à 3 400 m	50 à 220 mS/cm	-	Dissoute	1 à 180 pmol/kg	(Bau <i>et al.</i> , 1997)
Rivière Susquehanna (Mifflinville)	Douce	5 m	[Ca] = 0.95 mM [Mg] = 0.60 mM	8,2	Dissoute	10 à 1 000 pM	(Bau <i>et al.</i> , 2006)
Rivière Niagara	Douce	5 m	[Ca] = 0.85 mM $[Mg] = 0.37 mM$	8,2	Dissoute	1 à 94 pM	(Bau <i>et al.</i> , 2006)
Lac Érié	Douce	5 m	[Ca] = 0,82 mM [Mg] = 0,37 mM	8,4	Dissoute	1 à 105 pM	(Bau <i>et al.</i> , 2006)
Lac Ontario	Douce	5 m	[Ca] = 0.80 mM $[Mg] = 0.37 mM$	8,5	Dissoute	1 à 170 pM	(Bau <i>et al.</i> , 2006)
Estuaire du fleuve Elimbah	Douce et saline	5 à 50 cm	0,7 à 33 ‰	6,3 à 8,1	Dissoute	0,01 à 1,7 nmol/kg	(Lawrence & Kamber, 2006)
Océan pacifique (équateur)	Saline	0 à 5 000 m	34 à 36 ‰	-	Dissoute	0,1 à 36 pmol/kg	(Wang & Yamada, 2006)
Rivière Berounka	Douce	Surface	-	-	Dissoute	4 à 170 pM	(Möller <i>et al.</i> , 2002)
Rivière Jizera	Douce	Surface	-	-	Dissoute	10 à 670 pM	(Möller et al., 2002)

Tableau 1.4 : Compilation des données de concentrations environnementales de terres rares dans différentes eaux douces et marines trouvées dans la littérature (suite)

Location	Type d'eau	Profondeur	Composition ^a	рН	Type de conc.	[Ln]	Référence
Port de Rotterdam	-	Surface	-	-	Dissoute	0,5 à 12 nM	(Zhu <i>et al.</i> , 1998)
Approvisionnement en eau (Pays-Bas)	Souterraine	-	Carbonate tot. = 71 mg/L	7,1	Totale	1 à 50 nM	(de Boer <i>et al.</i> , 1996)
Approvisionnement en eau (Pays-Bas)	Souterraine	-	-	-	Dissoute	0,5 à 23 nM	(de Boer <i>et al.</i> , 1996)
Fleuve Meuse (Pays- Bas)	-	Surface	-	-	Totale	66 pM à 2,5 nM	(de Boer <i>et al.</i> , 1996)
Fleuve Rhin (Pays-Bas)	-	Surface	-	-	Totale	0,1 à 48 nM	(de Boer <i>et al.</i> , 1996)

^a Conductivié (mS/cm) et Salinité (‰).

L'augmentation des concentrations environnementales en terres rares n'est pas le seul problème qu'entraîne l'exploitation des terres rares. L'association de celles-ci avec des éléments radioactifs tels que le thorium et l'uranium provoque des déchets radioactifs lors de l'extraction et le raffinement (Kynicky *et al.*, 2012). De plus, le raffinement requiert généralement de très grandes quantités d'acide sulfurique et d'acide fluorhydrique (Kynicky *et al.*, 2012). La séparation d'une tonne de terres rares d'un concentré d'une pureté de 92 % requiert une quantité équivalente de bicarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃) (Kynicky *et al.*, 2012). Chaque année, les mines à proximité de Baotou produisent environ dix millions de tonnes d'eaux usées acides et/ou qui contiennent des concentrations élevées d'éléments radioactifs et dont la grande majorité n'est pas traitée (Folger, 2011). La contamination en terres rares sur de longues distances en raison du transport aérien de formes particulaires a été observée dans le cas de la mine de Bayan Obo qui est situé en milieu semi-aride (Kynicky *et al.*, 2012).

1.3 Données écotoxicologiques

Lorsqu'il est question d'évaluer la toxicité d'un métal, la spéciation de celui-ci est importante. De plus, les conditions expérimentales des études doivent être détaillées afin de pouvoir effectuer des comparaisons inter-études sur la toxicité d'un métal. La composition des milieux d'exposition doit également être sélectionnée avec précaution pour éviter la précipitation des lanthanides étudiés, connus pour leur faible solubilité en présence de carbonates et de phosphates. La formation de précipités a été observée dans plusieurs études de toxicité sur les lanthanides (Barry & Meehan, 2000, González et al., 2015, Lurling & Tolman, 2010, Stauber & Binet, 2000). Dans leur étude de l'effet du lanthane sur l'algue Pseudokirchneriella subcapitata (Selenastrum capricornutum), Stauber et Binet (2000) concluent que la réduction de la croissance de l'espèce étudiée est probablement due à la limitation en nutriment provoquée par la précipitation des phosphates. Barry et Meehan (2000) ont observé une différence significative sur la toxicité du lanthane sur Daphnia carinata en fonction du milieu d'exposition utilisé. Les concentrations en calcium et en carbonates ont été identifiées comme étant les facteurs ayant pu induire cette variation (Barry & Meehan, 2000).

1.1.1 Algues

Stauber et Binet (2000) ont rapporté une CE₅₀ de 3,3 µM sur l'algue verte *Pseudokirchneriella* subcapitata (Selenastrum capricornutum) après 72 h d'exposition. L'auteur précise que la

toxicité observée est probablement causée par la précipitation des phosphates en solution. Dans l'étude de Tai et al. (2010), des CE₅₀ similaires (28 à 30 µM) ont été obtenues avec la diatomée marine Skeletonema costatum (t = 72 h) pour l'ensemble des lanthanides testés. Par contre, peu de précisions ont été fournies en ce qui concerne la méthodologie pour les expositions, ce qui ne permet pas de conclure à la possible précipitation des lanthanides étudiés. De plus, il n'est pas indiqué si les concentrations de lanthanide en solution ont été mesurées, donc les concentrations nominales ont possiblement été utilisées afin de déterminer les valeurs de CE₅₀. Fujiwara et al. (2008) ont évalué l'inhibition du lanthane et de l'europium sur la croissance de l'algue Chorella kessleri (t = 96 h). Une CL_{50} de 313 μM pour le lanthane et un CL₅₀ de 287 µM pour l'europium ont été rapportées à partir des concentrations nominales. La concentration d'ion libre a été estimée aux CL₅₀ de chacun des éléments à l'aide du logiciel Visual MINTEQ. La CL₅₀ pour le lanthane en fonction de l'ion libre est de 59 μM et de 54 μM pour l'europium. Les auteurs précisent toutefois qu'une agrégation et précipitation des algues sont observées avant l'apparition d'effets toxiques. Blaise et al. (2008) ont effectué des expériences de toxicité à l'aide de nanoparticules (filtré afin de retirer les nanoparticules en solution) de terres rares (Sm, Ho, Er) sur l'algue Pseudokirchneriella subcapitata à l'intérieur de micro plaques. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de CL₂₅ après 72 h d'exposition et les valeurs rapportées se situent entre 6,5 et 65 µM. González et al. (2015) ont déterminés des valeurs de CE_{50} (t = 72 h) pour le cérium (45 μ M), le gadolinium (14 μ M) et le lutécium (12 μM) en mesurant la fluorescence algale de Pseudokirchneriella subcapitata pour déterminer l'effet des lanthanides sur la croissance de l'espèce étudiée. Les auteurs mentionnent cependant que les phosphates en solution ont été complexés par les lanthanides d'exposition, ce qui pourrait avoir favorisé l'inhibition de la croissance à cause d'un manque de nutriments.

1.1.2 Daphnies

Dans la littérature, on retrouve plusieurs études sur les daphnies. Cependant, plusieurs auteurs rapportent que la majorité, voir même la totalité, du lanthanide étudié a précipité lors des expériences. Barry et Meehan (2000) rapportent une CE_{50} de 0,31 μ M de lanthane après 48 h d'exposition dans l'eau douce du robinet et une CE_{50} de 8,5 μ M de lanthane après 48 h dans l'eau dure d'ASTM pour l'espèce *Daphnia carinata*. Les auteurs de l'étude n'ont pas observé de formation de précipité, mais l'écart entre les concentrations nominales et les concentrations mesurées indique qu'une précipitation du lanthane a probablement eu lieu. Stauber et Binet (2000) ont obtenu une CE_{50} de 36 μ M (IC95 % [22; 58 μ M]) de lanthane pour l'espèce

Ceriodaphnia dubia lors d'une exposition de 48 h. Cependant, les auteurs précisent que le lanthane en solution a précipité sous forme d'espèces carbonatées et que la toxicité observée aurait pu en fait provenir du lanthane particulaire bien que les auteurs n'ont pas suggéré d'hypothèse sur le mécanisme de toxicité. L'expérience a été répétée avec des concentrations totales initiales de lanthane plus faibles en solution et une période d'exposition de 7 jours. Dans ces conditions, aucune formation de précipités n'a été observée. Stauber et Binet (2000) ont obtenu une CE $_{50}$ de 3,7 μ M (IC95 % [3,0 ; 4,5 μ M]) de lanthane. Lurling et Tolman (2010) ont effectué des expériences de toxicité avec le lanthane sur le cladocère Daphnia magna en présence et en absence de phosphate. Aucune valeur de CE₅₀ n'est rapportée, toutefois, des effets sur les caractéristiques du cycle de vie (croissance, reproduction, taille) ont été observés dans les milieux en présence de phosphate où la précipitation du lanthane a été observée. D'ailleurs, une forte réduction de la concentration de nourriture en suspension dans les milieux en présence de phosphates a été notée. L'hypothèse d'une co-précipitation entre les algues données comme nourriture aux daphnies et les complexes de lanthane avec les phosphates est soulevée par les auteurs. González et al. (2015) n'ont pas observé de toxicité (immobilisation) sur Daphnia magna suite à une période d'exposition de 48 h à un lanthanide (Ce, Gd ou Lu) malgré l'utilisation de concentrations nominales de 6 400 µg L-1. L'étude précise que les concentrations mesurées à la fin de l'expérience étaient de 0 à 10 % de celles mesurées au début et qu'en conséquences les données obtenues ne peuvent pas être utilisées afin de conclure sur la toxicité des lanthanides étudiées.

1.1.3 Autres organismes aquatiques

Dans l'étude de Weltje et al. (2004) sur la bactérie Vibrio fisheri en présence de lutécium, les valeurs de CE₅₀ (t_∞²), exprimées en fonction de la concentration de l'ion libre Lu³⁺, obtenues sont de 0,5 à 2 µM. En présence de ligands, les valeurs de CE₅₀ exprimées en fonction de la concentration totale de lutécium divergent des valeurs de CE₅₀ obtenues en absence de ligands. Lorsque les résultats sont plutôt exprimés en fonction de la concentration de l'ion libre Lu³⁺, les valeurs de CE₅₀ convergent. Weltje et al. (2004) concluent que le modèle de l'ion libre est valide pour le lutécium et probablement pour l'ensemble des lanthanides. McCloskey et al. (1996) ont effectué des expériences de toxicité avec le lanthane sur la même espèce bactérienne et dans les mêmes conditions expérimentales que l'étude de Weltje et al. (2004). Une valeur de CE₅₀ de 322 µM de La³⁺ a été obtenue, ce qui est environ 185 fois plus grand que la valeur de CE₅₀

 $^{^{2}}$ CE₅₀ déterminée à l'aide d'expositions de t = 7,5; 15; 22,5; 30 min.

obtenue par Weltje *et al.* (2004) avec le Lu³+. Stauber et Binet (2000) ont effectué une expérience de toxicité de 96 h sur un poisson australien dulcicole, *Melenotaenia duboulayi*. Toutefois, la totalité des concentrations testées a provoqué la mort de tous les spécimens. Les auteurs n'ont donc pu conclure sur la valeur précise de CE₅0, mais ils précisent que celle-ci est inférieure à 4,3 µM. Lors d'exposition de la lentille d'eau *Lemna minor L*. au lanthane, Weltje *et al.* (2002) n'ont pas observé de toxicité à des concentrations nominales totales de 10 nM (La³+ 12 pM). Le milieu utilisé contenait de l'EDTA et 99,9 % du lanthane était complexé d'après les calculs effectués par les auteurs avec le logiciel CHEAQS. Une compilation des données d'écotoxicité retenues dans la littérature est présentée au tableau 1.5.

Tableau 1.5 : Compilation de données écotoxicologiques trouvées dans la littérature

Organisme	Espèce	Élément	Concentration ^a	Précip.	Terminaison	Effet	Toxicité	Référence
Algue	S. capricornutum	La	T, M (t = 0)	Oui	72 h CE ₅₀	Croissance	3,3 μΜ	(Stauber & Binet, 2000)
Algue	S. costatum	La	ND	-	72 h CE ₅₀	Croissance	29,19 µM	(Tai <i>et al.</i> , 2010)
Algue	S. costatum	Се	ND	-	72 h CE ₅₀	Croissance	29,68 µM	(Tai <i>et al.</i> , 2010)
Algue	C. kessleri	La	T, N	-	96 h CL ₅₀	Croissance	313 µM	(Fujiwara <i>et al.</i> , 2008)
Algue	C. kessleri	La	IL, N	-	96 h CL ₅₀	Croissance	59 µM	(Fujiwara <i>et al.</i> , 2008)
Algue	C. kessleri	Eu	T, N	-	96 h CL ₅₀	Croissance	287 µM	(Fujiwara <i>et al.</i> , 2008)
Algue	C. kessleri	Eu	IL, N	-	96 h CL ₅₀	Croissance	54 μM	(Fujiwara <i>et al.</i> , 2008)
Algue	P. subcapitata	Sm (NP ^b)	M, D	-	72 h CL ₂₅	Croissance	6,5-65 μM	(Blaise et al., 2008)
Algue	P. subcapitata	Er (NP ^b)	M, D	-	72 h CL ₂₅	Croissance	6,5-65 μM	(Blaise et al., 2008)
Algue	P. subcapitata	Се	M, D	Oui	72 h CE ₅₀	Croissance	45 μM	(González et al., 2015)
Algue	P. subcapitata	Lu	M, D	Oui	72 h CE ₅₀	Croissance	12 µM	(González et al., 2015)
Cladocère	D. carinata	La	M, D	Oui	48 h CE ₅₀	Mortalité	0,31 μΜ	(Barry & Meehan, 2000)
Cladocère	D. carinata	La	M, D	Oui	48 h CE ₅₀	Mortalité	8,5 µM	(Barry & Meehan, 2000)

Tableau 1.5: Compilation de données écotoxicologiques trouvées dans la littérature (suite)

Organisme	Espèce	Élément	Concentration ^a	Précip.	Terminaison	Effet	Toxicité	Référence
Cladocère	C. dubia	La	T, M (t = 0)	Oui	48 h CE ₅₀	Immobilisation	36 µM	(Stauber & Binet, 2000)
Cladocère	C. dubia	La	T, M (t = 0)	-	7 j CE ₅₀	Immobilisation	3,7 μΜ	(Stauber & Binet, 2000)
Cladocère	D. magna	La	T, N	Non	14 j NOEC	Croissance	7,2 µM	(Lurling & Tolman, 2010)
Bactérie	V. fisheri	Lu	T, N	Non	t _∞ CE ₅₀	Luminescence	1,41 µM	(Weltje <i>et al.</i> , 2004)
Bactérie	V. fisheri	Lu	IL, N	Non	t _∞ CE ₅₀	Luminescence	1,35 µM	(Weltje <i>et al.</i> , 2004)
Bactérie	V. fisheri	Lu	T, N	Non	t _∞ CE ₅₀	Luminescence	21,4 μM ^c	(Weltje et al., 2004)
Bactérie	V. fisheri	Lu	IL, N	Non	t _∞ CE ₅₀	Luminescence	0,55 μM ^c	(Weltje et al., 2004)
Bactérie	V. fisheri	La	T, N	Non	15 min CE ₅₀	Luminescence	1693 µM	(McCloskey et al., 1996)
Bactérie	V. fisheri	La	IL, N	Non	15 min CE ₅₀	Luminescence	322 µM	(McCloskey et al., 1996)
Poisson	M. duboulayi	La	M, D	Non	96 h CE ₅₀	Mortalité	> 4,3 µM	(Stauber & Binet, 2000)
Plante	L. minor L.	La	T, N	Non	9 j CE ₅₀	Croissance	< 10 nM	(Weltje <i>et al.</i> , 2002)
Plante	L. minor L.	La	IL, N	Non	9 j CE ₅₀	Croissance	< 12 pM	(Weltje et al., 2002)

^a Type de concentration du métal d'exposition utilisée pour déterminer la toxicité : T = totale, IL = ion libre, D = dissoute, M = mesurée en solution, N = nominale, ND = non disponible.

^b Nanoparticules.

^c En présence du tampon organique malate.

1.4 Objectifs de recherche

L'augmentation de l'utilisation et de l'exploitation des terres rares risquent d'accroître les concentrations environnementales de ces métaux fortement convoités. Pour l'instant, très peu de données sur l'écotoxicité des lanthanides sont disponibles, ce qui ne permet pas d'établir une évaluation des risques écologiques robuste. De plus, plusieurs études utilisent des conditions expérimentales où les lanthanides ne sont pas solubles et ces études ne tiennent pas compte de la spéciation du métal étudié. Avec l'arrivée de projets d'exploitation minière dans les écosystèmes nordiques du Canada, l'évaluation des risques environnementaux que posent les terres rares devient de plus en plus importante.

Ce projet de recherche fait partie d'un ensemble d'études financées par Environnement Canada sur les métaux où peu de données sur la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité sont disponibles pour le moment (*data poor metals*). Il s'agit du premier travail effectué en laboratoire à l'INRS sur les lanthanides à utiliser comme approche le retrait complet du phosphore dans les milieux d'exposition afin d'évaluer la toxicité du lanthane et du cérium. Le retrait du phosphore du milieu d'exposition permet d'obtenir des conditions expérimentales dans lesquelles le risque de précipitation des métaux d'exposition est réduit au maximum. Le lanthane et le cérium ont été sélectionnés dans cette première étude puisqu'ils font partie des lanthanides que l'on retrouve en plus grande concentration dans les milieux environnementaux. De plus, le lanthane et le cérium sont les lanthanides pour lesquels on retrouve le plus grand nombre d'études (Gonzalez *et al.*, 2014). Un plus grand nombre de données thermodynamiques pour le lanthane et le cérium sont également disponibles, ce qui nous permet d'effectuer des calculs de spéciation chimique avec un meilleur degré de confiance.

Les objectifs de ce projet de recherche sont les suivants :

- Le développement d'un milieu d'exposition pour les lanthanides dans lequel aucune trace de phosphore n'est présente et où le pH est légèrement acide, afin de minimiser le risque de précipitation des métaux étudiés.
- L'évaluation de la toxicité du lanthane et du cérium afin de comparer les résultats obtenus à ceux déjà présents dans la littérature.
- L'évaluation de l'efficacité du modèle du ligand biotique (BLM) dans la prédiction de la toxicité des lanthanides en présence de différents ligands (acide iminodiacétique (IDA), acide nitrilotriacétique (NTA) et acide malique).

 Détermination de l'effet de la concentration de calcium dans les milieux d'exposition, ce cation ayant déjà été identifié comme un compétiteur potentiel du lanthane au niveau de l'internalisation dans des cellules algales.

Nous posons comme hypothèse que la toxicité des lanthanides étudiés dans cette étude sera plus grande que celle observée dans la littérature. De plus, nous croyons que la toxicité du lanthane et du cérium sera similaire à cause de leur ressemblance physico-chimique. D'après les résultats observés dans la littérature, une bonne prédiction de la toxicité par le modèle de l'ion libre est attendue (Weltje *et al.*, 2004). Une réduction de la toxicité observée à des concentrations plus élevées de calcium dans les milieux d'exposition est également prévue (Barry & Meehan, 2000, Korotkov *et al.*, 2014).

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Organisme d'étude

Une algue verte a été sélectionnée afin de réaliser les objectifs de recherche présentés à la section 1.4. Le choix de cet organisme découle de nombreuses raisons. Tout d'abord, les algues sont omniprésentes sur notre planète. On les retrouve en milieu terrestre comme en milieu aquatique. De plus, ce sont des producteurs primaires qui se retrouvent au bas de la chaîne trophique. La contamination de cet organisme pourrait avoir un impact indirect sur tous les organismes qui se retrouvent dans les maillons supérieurs de la chaîne. Au laboratoire, ce sont des organismes qui se cultivent et se manipulent aisément. D'ailleurs, leur vitesse de reproduction permet d'appréhender rapidement les effets chroniques d'une contamination à un métal. Les algues vertes peuvent être cultivées et exposées dans des milieux relativement simples, ce qui permet de déterminer relativement facilement la spéciation du métal étudié. Il s'agit là d'un avantage important lorsqu'il est question d'exposition aux lanthanides puisque l'on retrouve peu de constantes thermodynamiques pour ceux-ci, sans compter que les lanthanides sont peu solubles en présence de carbonates ou de phosphates.

2.1.1 Chlorella fusca

L'algue verte qui a été retenue pour les expériences de toxicité est Chlorella fusca, anciennement connue sous le nom Chlorella pyrenoidosa. C. fusca possède une forme ellipsoïdale et mesure environ 5,5 à 12 µm de longueur et 3,5 à 11 µm de largeur. Les cellules sont plus larges dans un milieu inorganique, ce qui leur confère une forme quasi sphérique. Elle a été isolée pour la première fois en 1923 d'un tronc d'arbre à Philadelphie par le Dr Emerson (Shihira & Krauss, 1965). Dans la présente étude, l'algue C. fusca a spécifiquement été sélectionnée pour sa capacité à croître sur des réserves de phosphore dans un milieu en absence de phosphate. Cette habileté connue sous le nom de « luxury uptake » avait déjà été exploitée auparavant par au microscope optique à 1000x.



Figure 2.1 : Visualisation de Chlorella fusca

Lise Parent lors de ses travaux de doctorat qui portaient sur l'aluminium (1991). De plus, il s'agit d'une algue acidophile qui peut croître à des pH aussi faibles que 4,5 (Parent, 1991, Wehr & Sheath, 2003).

La souche utilisée dans la présente étude provient du Canadian Phycological Culture Centre (CPCC) à l'Université de Waterloo. La souche utilisée est *Chlorella fusca* var. *vacuolata* Shihira et Krauss (CPCC#89). Les algues commandées arrivaient dans un tube de verre contenant 15 mL d'algues dans le milieu *Bold's Basal Medium* (BBM). Lors de la réception des algues, environ 1 mL a été transféré dans un erlenmeyer en verre de 250 mL contenant 100 mL du milieu *Modified High Salt Medium* (MHSM-1, tableau 2.3) stérile.

2.1.2 Culture et entretien des algues

Afin de conserver *C. fusca* dans un bon état physiologique, environ 1 mL d'une culture précédente était transféré dans un erlenmeyer en verre de 250 mL contenant 100 mL de milieu MHSM-1 stérile. Les transferts étaient effectués à une fréquence hebdomadaire ou lorsque la densité cellulaire³ de la culture était jugée élevée. Le transfert était fait en milieu stérile sous une hotte à flux laminaire à proximité d'une flamme. Les erlenmeyers étaient ensuite placés sur un agitateur orbital ajusté à 60 rotations par minute à l'intérieur d'une chambre de croissance (Conviron CMP 4030) à 20,0 ± 0,1 °C et à une luminosité de 100 ± 10 μE m⁻² s⁻¹ (éclairage fluorescent blanc froid étalonné à l'aide d'un luminomètre tous les 6 mois). Les algues étaient incubées sur une photopériode de 24 h. Une vérification mensuelle des cultures d'algues au microscope était effectuée pour identifier toute anomalie possible. De plus, une incubation des algues à 30°C en absence de lumière sur un gel d'Agar (DIFCO 211665) a permis de vérifier la présence de bactéries non désirées dans les milieux de culture.

2.2 Les modèles d'équilibre de spéciation chimique

Comme il a été discuté à la section 1.3, la spéciation des éléments dans le milieu d'exposition est importante afin de prédire la toxicité d'un métal. Pour déterminer la spéciation des éléments présents dans les milieux d'exposition, le programme MINEQL+, un logiciel de modèle d'équilibre de spéciation chimique, a été utilisé. Les constantes de formation (log K) utilisées

.

³ Dans ce mémoire, le terme « densité cellulaire » veut dire le nombre de cellules algales par unité de volume (ex. : 15 000 cellules par mL).

proviennent en quasi-totalité de la base de données 46 de NIST version 8.0. Puisque MINEQL+ utilise les constantes de formation à force ionique nulle, les constantes qui n'étaient pas disponibles à une force ionique de 0 étaient corrigées à l'aide de l'équation de Davies (2.1), où I est la force ionique à laquelle la constante de formation a été déterminée, z la charge de l'espèce i et γ le coefficient d'activité de l'espèce i.

$$\log \gamma_i = -0.512 z_i^2 \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0.2I \right)$$
 (2.1)

On obtient alors la constante corrigée à l'aide de l'équation (2.2), où cK est la constante de formation à force ionique donnée, $\gamma_{i,i+1}$ le coefficient d'activité du complexe formé de i et i+1 à force ionique donnée et aK la constante corrigée.

$$aK = \frac{\gamma_{i,i+1}}{\gamma_i \gamma_{i+1}} cK \tag{2.2}$$

Certaines constantes nécessaires à la modélisation de la spéciation chimique des milieux de culture n'étaient pas disponibles dans la base de données NIST. Premièrement, aucune constante de formation du tampon acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique (MES) avec les lanthanides n'était disponible. Les constantes de formation du lanthane et du cérium avec le MES ont été trouvées dans l'article de Anwar et Azab (2001). Cependant, des expériences utilisant la technique d'échange ionique, conduite en laboratoire par Sébastien Leguay, ont démontré que la complexation des lanthanides par le MES a largement été surestimé par Anwar et Azab (2001). Effectivement, lors de l'utilisation d'une résine afin de déterminer le coefficient de distribution du lanthane et du cérium, on constate une complexation des lanthanides par le MES qui n'excède pas plus de 10 %. Dû à cette faible complexation, il n'a pas été possible de déterminer des constantes de formation fiables. Pour cette raison, la complexation des lanthanides par le MES a été négligée lors des simulations de modélisation de la spéciation chimique.

Deuxièmement, la constante de formation de l'acide malique (MA) avec le cérium n'était pas disponible. Une constante a donc été estimée à l'aide de *Linear Free Energy Relationships* (LFER). Cette approche consiste à utiliser les constantes de formation d'un métal avec des ligands semblables au ligand dont la constante de formation n'est pas disponible. Les constantes du métal d'intérêt et celles d'un métal semblable sont mises en relation. Le lanthane a été sélectionné comme homologue au cérium.

Le tableau 2.1 contient toutes les constantes thermodynamiques utilisées pour effectuer l'extrapolation à une force ionique de 0,1 M et une température de 25 °C.

Tableau 2.1 : Constantes de formation de différents ligands avec le lanthane et le cérium d'après la base de données 46 de NIST version 8.0 (I = 0.1 M et T = 25 °C)

Ligand	log K		
Ligand	La	Се	
Acide fumarique	2,47	2,80	
Acide tartrique D	3,40	3,58	
Acide malique	4,37	-	
Acide oxalique	4,71	4,90	
Acide iminodiacétique	5,88	6,18	
Acide citrique	7,17	7,41	

Un graphique des log K du cérium en fonction des log K du lanthane a été tracé à partir des constantes de formations présentées au tableau 2.1. Une régression linéaire a permis de déterminer l'équation nécessaire à la détermination du log K du cérium avec l'acide malique comme ligand. Les log K du cérium en fonction des log K du lanthane pour le même ligand ainsi que la régression linéaire sont présentés à la figure 2.2.

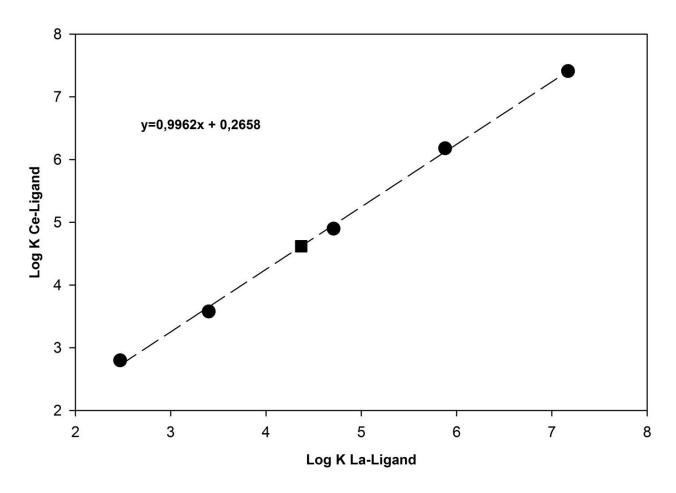


Figure 2.2 : Log K du cérium en fonction du log K du lanthane pour un même ligand.

On remplace alors « x » dans l'équation de la courbe par le log K du lanthane avec l'acide malique (4,37) et on obtient le log K du cérium avec l'acide malique (4,62). Le résultat est représenté par un carré sur la figure 2.2. Ensuite, la constante est corrigée à l'aide de l'équation de Davies pour obtenir un log K à une force ionique égale à zéro pour les éventuelles modélisations par MINEQL+.

L'intégralité des constantes utilisées pour les calculs de modélisation sont présentées au tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Constantes de formation des complexes de La et Ce (tirées de MINEQL+)

Complexe de La	Constante de formation log β	Complexe de Ce	Constante de formation log β
LaOH ²⁺	-8,49	CeOH ²⁺	-8,34
LaOH₃(s)	-21,7	Ce ₂ OH ₂ ⁴⁺	-15,766
LaCO₃⁺	6,98	Ce ₃ OH ₅ ⁴⁺	-33,485
La(CO ₃) ₂ -	11,86	Ce(OH)₃(s)	-20,791
La ₂ (CO ₃) ₃ (s)	34,4	CeCO₃ ⁺	7,31
LaHCO ₃ ²⁺	12,349	Ce(CO ₃) ₂ -	12,32
LaSO₄⁺	3,64	CeHCO ₃ ²⁺	12,279
La(SO ₄) ₂ -	5,30	CeSO₄ ⁺	3,64
LaNO ₃ ²⁺	0,58	Ce(SO ₄) ₂ -	5,10
La(IDA)⁺	7,233	CeNO₃	0,69
La(IDA) ₂	11,39	CeNTA	12,73
LaNTA	12,408	CeMA	5,972
La(NTA) ₂ ³⁻	19,778		
La(OH)NTA ⁻	4,31		
LaMA⁺	5,723		
La(MA) ₂ -	8,964		
LaHMA ₂ ⁺	7,992		

2.3 Milieux de culture et d'exposition

Dans cette section il sera question du milieu de culture utilisé pour cultiver les algues et les différents milieux d'exposition utilisés en fonction de l'expérience.

2.3.1 Produits, réactifs et solutions intermédiaires

Les solutions intermédiaires, utilisées pour la préparation du milieu de culture et des milieux d'exposition, sont préparées à partir de produits de pureté égale ou supérieure à 95 % et d'eau Milli-Q. La liste exhaustive des produits utilisés est présentée au tableau 2.3. Les solutions préparées, excluant la solution de NaOH, sont filtrées sur une membrane Millipore en polycarbonate d'une porosité de 0,2 µm. La solution de NaOH est plutôt filtrée sur une membrane en polysulfone d'une porosité de 0,2 µm préalablement immergée dans l'eau Milli-Q 24 h à l'avance. Les solutions préparées sont conservées à 4 °C dans des flacons opaques et à l'obscurité.

2.3.2 Milieu de culture

Le milieu de culture *Modified High Salt Medium* (MHSM-1, tableau 2.3) a été utilisé pour cultiver l'algue *Chlorella fusca*. Ce milieu de culture est une adaptation, faite par Claude Fortin lors de ses travaux de doctorat (2000), du milieu MHSM utilisé par Macfie *et al.* (1994). Les concentrations en phosphate et ammonium ont été réduites par rapport au milieu d'origine afin de réduire les risques de précipitations du métal d'exposition sans affecter le rendement de croissance de l'espèce étudiée (Fortin, 2000). Le milieu MHSM-1 a été utilisé lors des travaux de maîtrise de Gabrielle Roy (2009) et Guillaume Tétrault (2014) afin de cultiver l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.

Pour préparer un litre du milieu MHSM-1, il suffit d'ajouter 5 mL de la solution Ammonium, 4,13 mL de la solution Nitrate, 250 µL de la solution Phosphate et 100 mL de la solution MES à une fiole jaugée de 1 000 mL. Le volume est complété à 1 L avec de l'eau Milli-Q. Le pH est ensuite ajusté à 5,5 à l'aide de la solution NaOH 1 M, puis la solution est autoclavée à 121 °C pendant 15 minutes. Après avoir été autoclavé, le milieu est placé sous une hotte à flux laminaire jusqu'à ce que la solution soit refroidie à la température de la pièce. Une fois le milieu refroidi, 1 mL de la solution AAP est ajouté. Le pH est vérifié de nouveau pour s'assurer que les manipulations subséquentes à l'ajustement de celui-ci n'ont pas provoqué de variation du pH. Le milieu est conservé à 4 °C au réfrigérateur à l'abri de la lumière. La composition finale du milieu de culture est présentée au tableau 2.4.

Tableau 2.3 : Solutions intermédiaires et leur composition détaillée

Utilisation	Solution	Produit	Fournisseur	Pureté	Concentration
MHSM-1	Ammonium	NH ₄ NO ₃	Alfa Aesar	≥95 %	15,0 g·L ⁻¹
		Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	Sigma Aldrich	99 %	3,2 g·L ⁻¹
		MgSO₄·7H₂O	Caledeon	98-102 %	4,0 g·L ⁻¹
	Nitrate	KNO ₃	Fisher	≥99 %	101,1 g·L ⁻¹
	Phosphate	KH ₂ PO ₄	Fisher	99,6 %	29,6 g·L ⁻¹
		K₂HPO₄	Fisher	99 %	57,6 g·L ⁻¹
	AAP	H ₃ BO ₃	Sigma Aldrich	≥99,5 %	186 mg·L ⁻¹
		Na ₂ EDTA·2H ₂ O	Sigma Aldrich	98,5-101,5 %	300 mg·L ⁻¹
		MnCl ₂ ·4H ₂ O	Fisher	98-101 %	415 mg·L ⁻¹
		Fe (10 g L ⁻¹)	SCP Science	-	160 mg·L ⁻¹
		Zn (1 g L ⁻¹)	SCP Science	-	1,59 mg·L ⁻¹
		Co (1 g L ⁻¹)	SCP Science	-	0,64 mg·L ⁻¹
		Cu (1 g L ⁻¹)	SCP Science	-	4,47 μg·L ⁻¹
		Mo (1 g L ⁻¹)	SCP Science	-	2,88 mg·L ⁻¹
Tampon	MES	MES	Fluka	99 %	21,3 g·L ⁻¹
	NTA	NTA	Sigma Aldrich	99 %	23,5 g·L ⁻¹
	IDA	IDA	Sigma Aldrich	ND ^a	13,3 g·L ⁻¹
	Acide malique	Acide malique	Acros Organics	99 %	13,4 g·L ⁻¹
Ajustement du pH	NaOH	NaOH	Sigma Aldrich	≥97 %	40,0 g·L ⁻¹
Exposition ^b	La	LaNO₃·6H₂O	Acros Organics	99,999 %	43,3 g·L ⁻¹
	Ce	CeNO ₃ ·6H ₂ O	Alfa Aesar	99,99 %	43,4 g·L ⁻¹

^a Information non disponible.

^b Les solutions contenant des lanthanides sont conservées dans l'acide nitrique 2 % et dosées à l'ICP-MS.

Tableau 2.4 : Concentrations des espèces dans chacun des milieux

Espèces	MHSM-1 M	MHSM-2 M	MHSM-Ca M
B(OH) ₃	3,01×10 ⁻⁶	-	-
Ca	6,80×10 ⁻⁵	6,80×10 ⁻⁵	1,00×10 ⁻⁶ à 1,00×10 ⁻³
CI	4,20×10 ⁻⁶	-	
Co	1,09×10 ⁻⁶	-	
CO ₃	atm ^a	atm ^a	atm ^a
Cu	7,04×10 ⁻¹¹	-	
EDTA	8,06×10 ⁻⁷	-	
Fe	5,92×10 ⁻⁷	-	
K	4,35×10 ⁻³	4,13×10 ⁻³	1,44×10 ⁻³ à 4,35×10 ⁻³
Mg	8,12×10 ⁻⁵	8,12×10 ⁻⁵	8,12×10 ⁻⁵
Mn	2,10×10 ⁻⁶	-	-
MoO ₄	3,00×10 ⁻⁸	-	
Na	3,10×10 ^{-3 b}	variable ^c	2,80×10 ⁻³
NH4	9,37×10 ⁻⁴	9,37×10 ⁻⁴	9,37×10 ⁻⁴
NO3	5,21×10 ⁻³	5,21×10 ⁻³	4,38×10 ⁻³ à 5,29×10 ⁻³
PO ₄	1,37×10 ⁻⁴	-	-
SO ₄	8,12×10 ⁻⁵	8,12×10 ⁻⁵	8,12×10 ⁻⁵
Zn	2,43×10 ⁻⁸	-	-
MES	1,00×10 ⁻²	1,00×10 ⁻²	1,00×10 ⁻²
NTA ^d	-	8,00×10 ⁻⁵ et 1,00×10 ⁻⁴	-
IDA ^d	-	1,00×10 ⁻⁴	-
Acide malique ^d	-	1,00×10 ⁻⁴	1,00×10 ⁻⁴

^a À l'équilibre avec l'atmosphère.

^b Valeur approximative en fonction du volume de NaOH utilisé pour l'ajustement du pH à 5,5.

^c En fonction du tampon à métal utilisé.

^d En fonction de l'expérience.

2.3.3 Milieu d'exposition au La

Lors d'une exposition aux lanthanides, il faut s'assurer qu'aucun élément présent en solution ne risque de provoquer la précipitation des lanthanides. Les phosphates sont connus pour provoquer la précipitation des lanthanides. Pour cette raison bien précise, aucun phosphate n'est présent dans le milieu d'exposition MHSM-2. Le milieu d'exposition pour le lanthane est préparé de façon identique au milieu de culture, sans ajout des solutions Phosphate et AAP. Tout d'abord, 5 mL de la solution ammonium, 4,13 mL de la solution nitrate et 100 mL de la solution MES sont ajoutés à une fiole jaugée de 1 000 mL. Le volume est complété à 1 L avec de l'eau Milli-Q. Le pH est ensuite ajusté à 5,5 à l'aide de la solution NaOH 1 M, puis la solution est ensuite autoclavée à 121 °C pendant 15 minutes. Après avoir été autoclavé, le milieu est placé sous une hotte à flux laminaire jusqu'à ce qu'il ait refroidi. Une fois refroidi, le milieu est conservé à 4 °C au réfrigérateur à l'abri de la lumière. Le lanthane est ajouté à chaque erlenmeyer qui sera utilisé pour les expositions. La solution mère de 0,1 M de lanthane présentée au tableau 2.3 ainsi que des solutions diluées préparées à partir de la solution mère sont utilisées pour l'ajout du lanthane. Lorsque nécessaire, le pH est corrigé à l'aide de NaOH 1 M.

Des expositions en présence de 8×10⁻⁵ M et 10⁻⁴ M d'acide nitrilotriacétique (NTA), 10⁻⁴ M d'acide iminodiacétique (IDA) ou 10⁻⁴ M de L(–)-acide malique comme tampon ont aussi été effectuées pour moduler la concentration de lanthane sous forme d'ion libre en solution. Lors de la préparation du milieu d'exposition contenant un tampon, 1 mL de la solution mère (0,8 mL pour 8×10⁻⁵ M NTA) du tampon NTA, de l'IDA ou de l'acide malique a été ajouté avant de compléter le volume de la fiole jaugé. Les concentrations finales en lanthane total en solution sont présentées au chapitre 3 pour chacune des expériences.

2.3.4 Milieu d'exposition au Ce

Le milieu d'exposition du cérium et sa méthode de préparation sont identiques à ceux du lanthane (voir 2.3.3). Dans le cas du cérium, une seule exposition en présence de 10^{-4} M de L(-)-acide malique a eu lieu. Les concentrations finales en cérium total en solution sont présentées au chapitre 4 pour chacune des expériences.

2.3.5 Milieu d'exposition à concentration variable de calcium

L'effet du calcium sur la toxicité du lanthane et du cérium a été évalué à partir du milieu MHSM-2 renommé MHSM-Ca dont la concentration en calcium est variable. Afin de conserver une force ionique constante, lorsque la concentration en calcium d'un milieu était élevée par l'ajout de $Ca(NO_3)_2$, la concentration en KNO_3 était réduite et vice versa. La concentration en KNO_3 nécessaire pour conserver une force ionique identique entre chaque milieu a été déterminée à l'aide de calculs par titrage faits à partir du logiciel MINEQL+. Les concentrations sélectionnées de calcium sont de 1 μ M, 68 μ M et 1 mM avec une concentration respective de KNO_3 de 4,4 mM, 4,1 mM et 1,4 mM. La concentration du lanthane et celle du cérium ont été sélectionnées de façon à obtenir une concentration d'ions libres en solution située aux environs de la concentration où la croissance de *Chlorella fusca* était inhibée de 50 % (CE_{50}) après 120 h d'exposition. La concentration totale de lanthane en solution était de 3,5 μ M et celle du cérium de 6,0 μ M. Chacune des conditions a été testée avec cinq réplications (n=5) en présence d'acide malique (10^{-4} M).

2.3.6 Milieu de rinçage

Un milieu de rinçage était utilisé afin de retirer les lanthanides adsorbés à la surface des algues. Ce milieu était utilisé lors de la récupération des algues par filtration. Il était composé uniquement de Ca(NO₃)₂ (68 µM) et d'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA, 1 mM).

2.4 Essais d'écotoxicité

Cette section abordera la façon dont les algues ont été manipulées avant leur inoculation dans les milieux d'exposition jusqu'à leur récupération pour l'analyse de leur contenu en lanthane ou en cérium lors des essais de toxicité.

2.4.1 Matériel de laboratoire

Des erlenmeyers Thermo Scientific™ Nalgene™ de 250 mL en polycarbonate ont été utilisés pour les expositions aux lanthanides. Les erlenmeyers en polycarbonate ont été sélectionnés pour les expositions à cause de leur plus faible capacité d'adsorption pour les métaux en solution comparativement aux erlenmeyers en verre utilisés pour la culture des algues.

Les erlenmeyers ont été préalablement trempés dans un bain d'acide nitrique 10 % sur une période de 24 h puis rincés quatre fois à l'eau déminéralisée puis quatre fois à l'eau Milli-Q. Il est important de ne pas laisser tremper plus longtemps que 24 h les erlenmeyers dans l'acide et de s'assurer qu'ils sont bien rincés à l'intérieur comme à l'extérieur sinon un jaunissement prématuré de ceux-ci peut se produire. Suite au rinçage, les erlenmeyers ont été autoclavés à 121 °C pendant 15 minutes puis placés sous une hotte à flux laminaire jusqu'à ce qu'ils soient secs.

2.4.2 Pré-inoculation

Les algues utilisées pour l'exposition ont été transférées à deux reprises sur des intervalles de 48 h pour s'assurer qu'elles étaient en phase exponentielle lors de leur inoculation.

La journée précédant l'exposition, sous une hotte à flux laminaire, 100 mL de la solution d'exposition désirée ont été versés dans chacun des erlenmeyers autoclavés qui ont été utilisés lors de l'expérience. Le métal d'exposition sélectionné a été ajouté en quantité nécessaire, à partir d'une solution préalablement préparée, dans chacun des erlenmeyers à l'exception des témoins. Le délai entre l'ajout du métal d'exposition et l'inoculation des algues permet l'atteinte de l'équilibre des espèces en solution avant l'inoculation des algues. Comme la solution contenant le métal est acidifiée à 2 % d'acide nitrique, il fallait s'assurer que le volume ajouté était négligeable (<100 µL) pour éviter toute variation du pH préalablement ajusté à 5,5. Les erlenmeyers ont été conservés légèrement ouverts sous une hotte à flux laminaire afin de favoriser les échanges gazeux avec l'atmosphère et l'équilibre des espèces en solution sur une période de 24 h.

2.4.3 Exposition des algues

La journée du lancement de l'exposition, une aliquote de chaque milieu a été prélevée et acidifiée avec de l'acide nitrique de grade *Trace metal*. Ces échantillons ont permis de déterminer la concentration exacte du métal d'exposition en solution au début de l'expérience (voir le chapitre 3 et le chapitre 4 pour la gamme de concentration nominale utilisée en lanthane et cérium respectivement). Le pH a été vérifié à nouveau dans un seul erlenmeyer de chaque concentration.

Le milieu contenant les algues en phase exponentielle a été filtré sur une membrane Millipore en polycarbonate de 2,0 µm. Les algues filtrées ont été rincées trois fois avec 10 mL de la

solution d'exposition MHSM-2 contenant le tampon désiré afin de retirer le maximum de phosphate qui aurait pu se trouver sur la surface des algues. Le filtre a ensuite été placé dans un récipient de 50 mL contenant 20 mL de la solution d'exposition afin de resuspendre les algues. Un échantillon a alors été prélevé puis mesuré au compteur de particules pour déterminer la densité cellulaire dans le récipient de 50 mL. Le volume nécessaire à ajouter aux erlenmeyers d'exposition a été déterminé à partir de cette mesure afin d'obtenir une densité initiale de 10 000 à 15 000 cellules par mL. La densité initiale sélectionnée est une suggestion de Guillaume Tétrault (2014) qui souligne qu'une population importante de cellules dans un milieu d'exposition pourrait affecter la spéciation du milieu (Franklin *et al.*, 2002) et que la limite de détection du compteur de particules se situe aux environs de 10 000 cellules par mL (Roy, 2009). Une fois l'inoculation terminée, les erlenmeyers ont été incubés dans une chambre de croissance sous les mêmes conditions que celles utilisées lors de la culture des algues.

2.4.4 Décompte cellulaire

Afin de suivre la croissance cellulaire, un compteur de particules *Coulter Counter Multisizer III* de la compagnie Beckman Coulter a été utilisé. Le compteur de particules utilisé était muni d'un tube possédant une ouverture de 70 µm dans lequel l'échantillon était forcé de passer. Lorsqu'une particule traverse le tube, une variation de la résistance entre les deux électrodes se produit, ce qui provoque une impulsion électrique de courte durée d'une amplitude proportionnelle à la taille de la particule. La somme de ces impulsions permet de déterminer le nombre de particules ayant passé dans le tube sur une période de temps connue ou un volume donné (Coulter, 1996).

Afin de déterminer la densité cellulaire des milieux d'exposition tous les 24 h pour une durée de 120 h⁴, une aliquote de volume variant de 100 μL à 2 mL (déterminé en fonction de la densité cellulaire estimée) a été prélevée de chacun des erlenmeyers suite à une agitation vigoureuse préalable. Chacune des aliquotes a été placée dans une cuvette contenant le volume nécessaire de solution saline Isoton® II (disponible chez Beckman Coulter) afin d'obtenir un volume final de 10 mL. L'appareil a été réglé pour prélever un volume fixe de 500 μL lors des analyses. De plus, l'appareil a été réglé pour effectuer un rinçage avant et après chaque mesure. Avant de débuter l'analyse des échantillons, un blanc contenant uniquement de la

-

⁴ Un temps d'exposition de 120 h a été sélectionné pour s'assurer que la phase stationnaire était bien atteinte à la fin de l'expérience.

solution Isoton® II a été analysé. À partir du décompte de particules pour un échantillon, il est possible de déterminer la densité cellulaire de celui-ci à partir de l'équation suivante :

densité cellulaire (cells.
$$mL^{-1}$$
) =
$$\frac{\left(mesure(cells./0,5mL) - blanc(cells./0,5mL)\right)}{dilution}$$
 (2.3)

Le blanc correspond à l'échantillon d'Isoton® II analysé avant le passage des échantillons et la dilution à la dilution de l'échantillon effectuée (ex : 1/10).

2.4.5 Récolte des algues

Après la période d'exposition de 120 h, les algues de chacun des milieux d'expositions ont été récupérées. Pour ce faire, le volume total de chacun des erlenmeyers a été filtré à l'aide d'une pompe manuelle en s'assurant de ne pas appliquer une pression supérieure à 10 psi. La méthode utilisée pour la récupération des algues pour chacun des erlenmeyers est la suivante : tout d'abord, le contenu de l'erlenmeyer a été versé dans une tulipe Nalgene® en polycarbonate de 250 mL sur laquelle deux filtres en polycarbonate de porosité de 2 µm de marque Millipore avaient préalablement été déposés. Ensuite, le contenu de la tulipe a été filtré et le filtrat a été récupéré. Le filtrat est conservé afin de déterminer la concentration en métal dans le milieu d'exposition à la toute fin de l'expérience. Les algues ont ensuite été rincées par trois rinçages consécutifs de 10 mL de la solution d'exposition sans métal d'exposition puis elles ont été rincées par 10 mL de la solution de rinçage (contenant de l'EDTA) dans laquelle elles ont trempé pendant 10 minutes avant d'appliquer à nouveau un vide pour retirer la solution de rinçage. Finalement, les algues ont de nouveau été rincées par deux rinçages consécutifs de 10 mL de la solution d'exposition sans métal. Ces rinçages ont permis de retirer un maximum de métal d'exposition adsorbé à la surface des cellules et des filtres. Le filtre supérieur, sur lequel se retrouvent les algues, a été conservé afin de déterminer la quantité de métal d'exposition intracellulaire. Le filtre inférieur a été conservé afin de s'assurer que l'adsorption du métal d'exposition sur celui-ci est négligeable.

2.4.6 Digestion

Lors de la première expérience de toxicité, les algues ont été digérées par la méthode de digestion utilisée par Guillaume Tétrault (2014). Cette méthode consistait à digérer à froid 48 h les algues dans l'acide nitrique concentré. Toutefois, une expérience de digestion avec des échantillons de références (Moss (BCR® 61) et sédiments lacustres (LKSD-4)) a démontré

ultérieurement que cette méthode ne peut pas être utilisée pour les lanthanides à cause de son faible taux de récupération. La méthode de digestion totale écrite par R.M. Couture a été modifiée et utilisée pour effectuer les digestions subséquentes (voir ANNEXE B). Des échantillons certifiés et des blancs ont aussi été digérés par cette méthode de digestion. L'échantillon certifié *Citrus Leaves* (NIST 1572) avec des concentrations non certifiées en lanthane et en cérium (tableau 2.5) a été utilisé pour contrôler les premières digestions effectuées (expériences d'exposition antérieures à l'utilisation du tampon acide malique). Lors de sa mise en marché en Amérique, l'échantillon de référence *Aquatic Plant* (*Lemna minor*, BCR® 670) ayant des concentrations certifiées en lanthane et en cérium a été utilisé plutôt que l'échantillon de référence *Citrus Leaves* (expériences d'exposition en présence d'acide malique). Les concentrations non certifiées de *Citrus Leaves* et certifiées de *Aquatic Plant* pour le lanthane et le cérium sont présentées au tableau 2.5.

Lors de la digestion des échantillons d'une expérience de toxicité, les filtres supérieurs et inférieurs de chacun des échantillons ont été placés dans des béchers en Téflon. Un volume de 10 mL d'acide nitrique de grade Trace metal a été ajouté dans chaque bécher et un verre de montre a été posé sur ceux-ci. Les béchers ont ensuite été placés sur une plaque chauffante à environ 100 °C sous une hotte à acide perchlorique et chauffé sous reflux pour 1 heure. Une heure plus tard, les verres de montre ont été retirés et les échantillons ont été évaporés à sec. Après avoir évaporé à sec les échantillons, les béchers ont été retirés de la plaque chauffante. Un volume de 4 mL d'acide perchlorique de grade Trace métal a été ajouté aux béchers et les verres de montre ont à nouveau été déposés sur les béchers. Les béchers ont été replacés sur la plaque chauffante pour chauffer à reflux pendant 2 heures. Ils ont ensuite été retirés de la plaque chauffante et laissés sous la hotte pour la nuit. Le lendemain, les échantillons ont été évaporés à sec. Le solide a été dissout par 1 mL d'acide nitrique de grade trace métal en chauffant légèrement sur la plaque chauffante. Le contenu du bécher a été transféré dans un tube gradué en polycarbonate pour ICP-MS de 50 mL de la compagnie Sarstedt. Le bécher a été rincé à trois reprises avec de l'eau Milli-Q et son contenu ajouté au tube de 50 mL. Le volume a ensuite été complété à 20 mL.

Tableau 2.5 : Concentrations en lanthane et cérium dans les échantillons de référence *Citrus Leaves* (NIST 1572, valeurs non certifiées) et *Aquatic Plant* (BCR 670, valeurs certifiées)

Échantillon	La µg/g	Се µg/g
Citrus Leaves (NIST 1572)	0,19	0,28
Aquatic Plant (BCR 670)	$0,487 \pm 0,020$	$0,99 \pm 0,04$

2.5 Analyse des lanthanides

La sélection d'une méthode d'analyse dépend de nombreux paramètres tels que le temps d'analyse, le coût d'analyse, la matrice de l'échantillon, etc. L'article de Matharu *et al.* (2011) met en évidence de plusieurs techniques (gravimétrie, potentiométrie, activation neutronique, etc.) utilisées pour analyser les lanthanides dans différentes matrices et présente les avantages et désavantages de celles-ci.

2.5.1 Analyse par ICP-MS

La méthode d'analyse qui a été retenue pour la détermination de lanthanides dans les échantillons pour ce projet est la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). La sensibilité, la versatilité et le large domaine de linéarité de l'analyse par ICP-MS en font une technique de choix pour la détermination des lanthanides dans le cadre de ce projet (Su *et al.*, 2014). La complexité d'une matrice provenant d'un échantillon environnemental peut complexifier l'analyse par ICP-MS, mais les échantillons analysés lors de ce projet provenaient d'une matrice synthétique dont les éléments qui s'y retrouvaient étaient contrôlés. Quelques éléments peuvent provoquer une interférence lors de l'analyse du cérium et du lanthane à l'ICP-MS. Par exemple, dans le cas de la mesure du (139 La) le (123 Sb16O) et le (124 Te16O) peuvent interférer sur la mesure obtenue. Pour ce qui est du (140 Ce) ce sont le (124 Sn16O) et le (124 Te16O) qui pourraient interférer. Les interférents mentionnés précédemment n'ont toutefois pas causé de problèmes lors de l'analyse des échantillons puisqu'ils ne se retrouvaient pas dans les échantillons synthétiques et qu'une attention particulière a été portée afin d'éviter toute contamination par des sources de métaux externes.



Figure 2.3 : Photo de l'intérieur d'un spectromètre de masse XSeries 2 (photo prise par Cédrick Beaubien le 14 avril 2015).

2.5.2 Paramètres de l'ICP-MS

L'appareil qui a été utilisé pour analyser les lanthanides tout au long de ce projet est un ICP-MS XSeries 2 fabriqué par la compagnie Thermo Scientific. La torche utilisée est en quartz avec un injecteur de diamètre interne de 1,8 mm. Le nébuliseur utilisé est de type *micro-flow* et la chambre de nébulisation de type cyclonique en quartz est refroidie à 4 °C par un dispositif Peltier afin d'obtenir une meilleure nébulisation. Le spectromètre de masse est muni de lentilles et d'un hexapole qui permet une diminution du bruit de fond et une meilleure focalisation des ions sélectionnés avant leur passage dans le quadrupole. Le détecteur est de type multiplicateur d'électrons et les cônes sont en nickel.

Le bon fonctionnement de l'ICP-MS était vérifié avant chaque analyse à l'aide d'une solution multi-élémentaire de référence (Li, Be, Co, In, Ba, Ce et U) préparée à l'aide de solution étalons certifiées PlasmaCal distribuées par la compagnie SCP Science. L'indium et l'uranium étaient utilisés comme indicateur de sensibilité et stabilité du signal. Leur signal devait être supérieur à 80 000 coups par seconde et leur coefficient de variation suite à 10 lectures ne devait pas dépasser 1 %. De plus, la formation d'oxydes était suivie à l'aide de la mesure du ratio CeO/Ce qui était maintenu en dessous de 0,02. La formation d'espèces doublement ionisées était suivie par le ratio Ba²⁺/Ba qui était maintenu sous 0,05. L'optimisation de l'analyse était effectuée en ajustant le voltage appliqué sur les lentilles, la position de la torche et si nécessaire la pression appliquée pour nébuliser l'échantillon.

La courbe d'étalonnage était composée de plusieurs lanthanides (La, Ce, Nd, Eu) et leur concentrations variaient de 0,02 à 2 µg L⁻¹. Elle a été fabriquée à l'aide de solutions étalons certifiées PlasmaCal distribuées par la compagnie SCP Science. La courbe a été validée à partir

d'étalons certifiés PlasmaCal C00-061-406 (5 % HNO $_3$; 10 µg L $^{-1}$ La ; 9,98 µg L $^{-1}$ Ce ; 10,03 µg L $^{-1}$ Nd; 10,05 µg L $^{-1}$ Eu) et C00-061-401 (5 % HNO $_3$; 0,1 % HF ; 5,04 µg L $^{-1}$ La; 10,04 µg L $^{-1}$ Ce). La limite de quantification a été déterminée en multipliant par dix l'écart-type sur dix mesures de l'étalon de 0,02 µg L $^{-1}$ et elle était d'environ 0,005 µg L $^{-1}$ pour tous les lanthanides présents dans la courbe.

Chaque échantillon était lu quatre fois par mesure et la mesure était suivie d'un rinçage de l'échantillonneur par l'acide nitrique 2 % pendant 30 secondes. Les étalons internes utilisés pour corriger la dérive de l'appareil tout au long de la séquence d'analyse étaient le ¹⁰³Rh et le ¹⁸⁷Re. De plus, deux échantillons d'étalons certifiés étaient passés à tous les dix à vingt échantillons pour permettre la correction de la variation des mesures. Comme les échantillons provenaient de milieux synthétiques, la concentration de ceux-ci était toujours supérieure à 0,1 µg L⁻¹.

2.6 Traitements des données

La détermination de certains paramètres obtenus à partir de différentes mesures effectuées lors des expositions est décrite dans les sous-sections présentées ci-dessous.

2.6.1 Détermination des CE₅₀

Afin de déterminer les concentrations efficaces médianes (CE₅₀), la densité cellulaire finale de chacun des échantillons (t=5 j) a été normalisée par la densité cellulaire moyenne des témoins sans métal d'exposition (t=5 j). Le logiciel SigmaPlot version 11.0 de Systat Software a été utilisé pour déterminer la CE₅₀ à partir de la fonction intégrée de régression non linéaire. L'équation sélectionnée pour effectuer la régression est la suivante :

$$y = min + \frac{(max - min)}{1 + (x/CE_{50})^{-HS}}$$
 (2.4)

où min correspond à la valeur au bas de la courbe, max la valeur en haut de la courbe et HS la pente de la courbe au point médian. L'incertitude sur la CE₅₀ obtenue correspond à l'erreur type obtenue.

2.6.2 Lanthanides intracellulaires

À partir des résultats obtenus lors de l'analyse des échantillons minéralisés à l'ICP-MS, il a été possible de déterminer la quantité de lanthanides intracellulaires. Pour ce faire, le signal mesuré du filtre inférieur a été soustrait au signal du filtre supérieur. Cette opération a permis d'éliminer la mesure du bruit de fond causé par l'adsorption de lanthanides sur le filtre, qui était normalement négligeable. Ensuite, le nombre de cellules digérées a été déterminé à partir de la densité mesurée au compteur de particules à la fin de l'exposition et le volume filtré. La concentration en lanthanide par cellule a alors été déterminée par l'équation suivante :

Concentration (mol/cellules) = conc. (mol/L) × 20 mL ×
$$\frac{1 L}{1 000 mL}$$
 × $\frac{1}{nb}$ cellules (2.5)

2.6.3 Analyse statistique

Afin de déterminer s'il y avait une différence significative entre les différents traitements, le logiciel SigmaPlot version 11.0 de Systat Software a été utilisé. La méthode d'analyse de variance à deux voies (ANOVA) avec mesures répétées a été utilisée. Le test de Tukey a été appliqué afin de déterminer s'il y avait une différence significative entre les traitements (P < 0,05).

CHAPITRE 3 : EXPOSITION DE *C. FUSCA* AU LANTHANE: RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Spéciation du La

Afin de connaître sous quelle forme le lanthane se retrouvait en solution lors des expériences de toxicité, le logiciel de modélisation de spéciation chimique MINEQL+ a été utilisé. Les simulations ont été effectuées à un pH de 5,5 et l'option système ouvert à l'atmosphère était activée. Les concentrations totales des espèces en solution utilisées pour effectuer les calculs sont les mêmes que celles présentées dans le tableau 2.4.

En absence de tampon, les résultats démontrent que la majorité du lanthane en solution se retrouve sous forme d'ion libre. Lorsque l'on effectue un calcul à une concentration totale de lanthane de 1×10^{-6} M, on obtient que 8.9×10^{-7} M (89.2 %) du lanthane est sous forme d'ion libre. L'espèce majoritaire suivante est le LaSO₄ avec une concentration de 9.7×10^{-8} M (9.7 %) suivie de LaNO₃ avec une concentration de 1.0×10^{-8} M (1.0 %). Les espèces d'hydroxydes et de carbonates se retrouvent à des proportions inférieures à 0.1 %.

Lorsque le NTA est utilisé comme tampon, la majorité du lanthane en solution se retrouve complexé par celui-ci. Deux expériences ont été conduites à deux concentrations différentes de NTA. Dans la première expérience, les algues étaient exposées au lanthane dans le milieu MHSM-2 avec une concentration de 10^{-4} M de NTA. Pour une concentration de NTA de $1,0\times10^{-4}$ M et une concentration de La de $1,0\times10^{-6}$ M, $9,0\times10^{-10}$ M (0,1 %) du lanthane se retrouve sous la forme d'ion libre. Le lanthane en solution se retrouve majoritairement sous forme de La(NTA) à une concentration de $9,5\times10^{-7}$ M (95,0 %) et La(NTA)₂³⁻ à une concentration de $5,1\times10^{-8}$ M (5,1 %). Dans la deuxième expérience, la concentration de NTA a été réduite à $8,0\times10^{-5}$ M. Cette réduction change légèrement la spéciation du lanthane en solution. En effet, $1,1\times10^{-9}$ M (0,1 %) du lanthane se retrouve sous la forme d'ion libre, $9,6\times10^{-7}$ M (96,0 %) sous la forme de La(NTA) et à $4,1\times10^{-8}$ M (4,1 %) sous la forme de La(NTA)₂³⁻.

Lorsque l'IDA est utilisé comme tampon, la majorité du lanthane se retrouve sous forme d'ion libre. Une seule expérience a été faite avec l'IDA à une concentration de 10^{-4} M. À cette concentration d'IDA et une concentration de 1×10^{-6} M de La, $8,6\times10^{-7}$ M (86,0 %) du La en solution est sous forme d'ion libre. La deuxième espèce de La en importance en solution est le

LaSO₄ avec une concentration de 9.4×10^{-8} M (9.4 %). Seulement 3.2×10^{-8} M (3.2 %) de La est complexé par l'IDA.

Avec l'acide malique comme tampon, le lanthane est majoritairement complexé par celui-ci. Cependant, le lanthane est complexé de façon moins importante que dans le cas où le NTA est utilisé comme tampon. Pour une concentration d'acide malique de $1,0\times10^{-4}$ M et une concentration de lanthane de 1×10^{-6} M, on retrouve $6,9\times10^{-8}$ M (6,9~%) du La sous forme d'ion libre. Les deux espèces majoritaires de lanthane que l'on retrouve en solution sont le La(malate) à une concentration de $8,5\times10^{-7}$ M (85,0~%) et le La(malate)₂ à une concentration de $7,4\times10^{-8}$ M (7,4~%).

La distribution des espèces de lanthane, sur la gamme de concentration utilisée dans les différentes expériences (en absence et en présence de tampon (NTA, IDA ou acide malique)), est présentée en annexe (ANNEXE C) sous forme graphique.

3.2 Comportement du La dans le milieu d'exposition

Afin de s'assurer que la concentration de lanthane en solution demeurait stable tout au long des expositions, des expériences de stabilité ont été conduites en présence et en absence d'algues. La première expérience a été de mesurer la concentration en lanthane dans des erlenmeyers où il n'y avait pas d'algue sur une période de 120 h. Une aliquote était prélevée à toutes les 24 h et acidifiée pour ensuite être analysée à l'ICP-MS. Cette expérience a permis de s'assurer que l'adsorption du lanthane sur les parois des erlenmeyers était négligeable. L'expérience a ensuite été répétée en présence d'algues sans tampon et avec de l'acide malique. Une aliquote était prélevée à toutes les 24 h puis centrifugée (5000 rpm, 5 min). Le surnageant était prélevé, acidifié et analysé à l'ICP-MS. Après les 120 h d'exposition, le milieu était filtré et le filtrat récupéré pour déterminer la concentration de lanthane en solution afin de comparer la valeur obtenue avec celle obtenue par centrifugation.

Les résultats obtenus ont permis d'observer que l'adsorption du lanthane sur les parois des erlenmeyers est négligeable. Cependant, les concentrations de lanthane obtenues suite à une filtration étaient inférieures à celles obtenues par prélèvement sans centrifugation. Cette diminution peut atteindre 30 % lorsque la concentration de lanthane en solution est faible. En présence d'algues et en absence de tampon, une diminution jusqu'à 40 % de la concentration du lanthane en solution est observée. De plus, comme pour l'expérience en absence d'algues,

la filtration entraîne un biais apparent sur la mesure de la concentration du lanthane en solution. Lorsque l'acide malique est utilisé comme tampon, la concentration de lanthane tout au long de l'expérience demeure stable. Toutefois, la filtration introduit toujours un biais apparent sur la mesure de la concentration en lanthane. Les résultats des expériences de stabilité sont présentés à la figure 3.1.

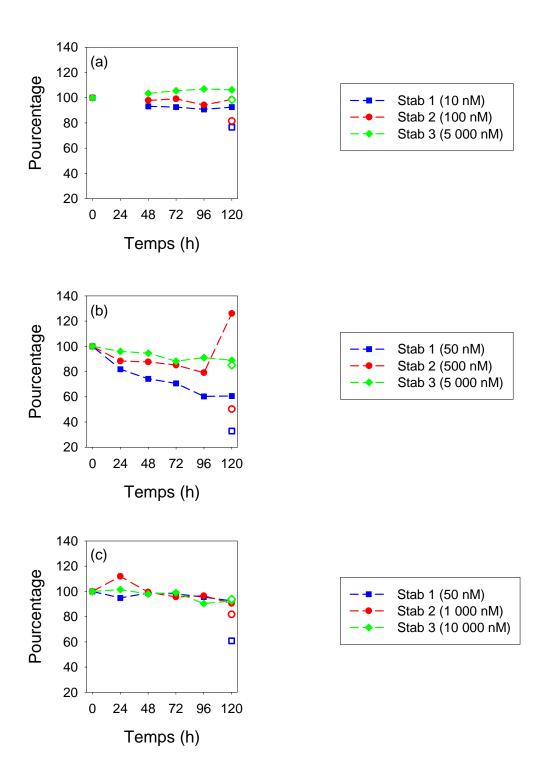


Figure 3.1: Concentration de lanthane en solution relativement à la concentration au temps initial (a) en absence d'algues et de tampon, (b) en présence d'algues et en absence de tampon, (c) en présence d'algues et d'acide malique dans les échantillons Stab (stabilité) (les symboles vides représentent la concentration obtenue lors de la filtration à 120 h).

3.3 Exposition au La en absence de tampon

La première expérience consistait à exposer les algues au lanthane en absence de tampon. Le milieu MHSM-2 à un pH de 5,5 a été utilisé comme milieu d'exposition. Les concentrations totales de lanthane testées étaient de 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 000 nM, 5 000 nM. Chaque concentration était testée à trois reprises et il y avait trois témoins qui ne contenaient pas de lanthane. La densité cellulaire cible au lancement de l'exposition était de 10 000 cellules mL⁻¹.

3.3.1 Effet sur la croissance

Les courbes de croissance obtenues sont présentées à la figure 3.2. Chaque point correspond à la moyenne de la croissance des échantillons de même concentration de lanthane et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de ces mesures.

Après 24 h d'exposition, on remarque qu'il y a une réduction de la densité cellulaire comparativement à la journée précédente pour les échantillons dont la concentration de lanthane est de 1 000 et 5 000 nM. Cette chute de densité cellulaire peut être causée par la proximité des mesures à la limite de détection du compteur de particules. Il est aussi possible qu'à ces concentrations de lanthane, une fraction des cellules exposées meure ou éclate. De plus, ce type de réponse de *C. fusca* était fréquent lorsque les algues inoculées n'étaient pas parfaitement en phase exponentielle. Après 24 h d'exposition, les échantillons à 5 000 nM sont les seuls à être statistiquement différents des témoins. Après 48 h d'exposition, les échantillons dont la concentration de lanthane est égale ou supérieure à 500 nM sont différents des témoins. Après 72 h et 96 h d'exposition, les échantillons de 100 nM deviennent eux aussi statistiquement différents des témoins. Toutefois, après 120 h d'exposition, les échantillons de 100 nM ne sont plus statistiquement différents des témoins. Les résultats de l'expérience démontrent que lorsque la concentration de lanthane atteint un certain seuil, celui-ci commence à avoir un effet sur la croissance de *C. fusca*. Lorsque ce seuil est atteint, plus la concentration de lanthane en solution est élevée, plus la croissance de *C. fusca* est affectée.

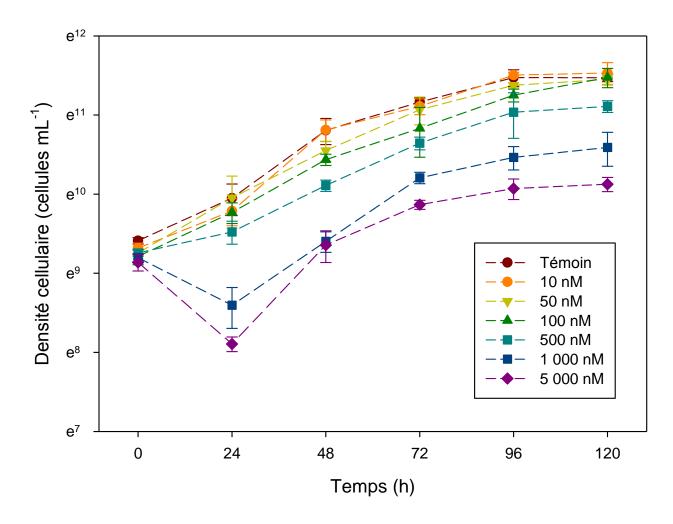


Figure 3.2 : Courbes de croissance de *C. fusca* exposée à différentes concentrations de La. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures.

À partir des densités cellulaires obtenues après 120 h d'exposition, il a été possible de déterminer la CE_{50} du lanthane à l'aide d'une régression non linéaire. La concentration moyenne⁵ de lanthane en solution a été utilisée comme axe des abscisses. Le résultat de la régression est présenté à la figure 3.3. La CE_{50} obtenue est de 490 \pm 70 nM⁶.

⁵ Déterminée à l'aide de la concentration de lanthane en solution mesurée au départ et à la fin de l'expérience.

⁶ Dans ce mémoire, lorsqu'un résultat est suivi d'une incertitude sous forme de ±, il s'agit d'un écart-type.

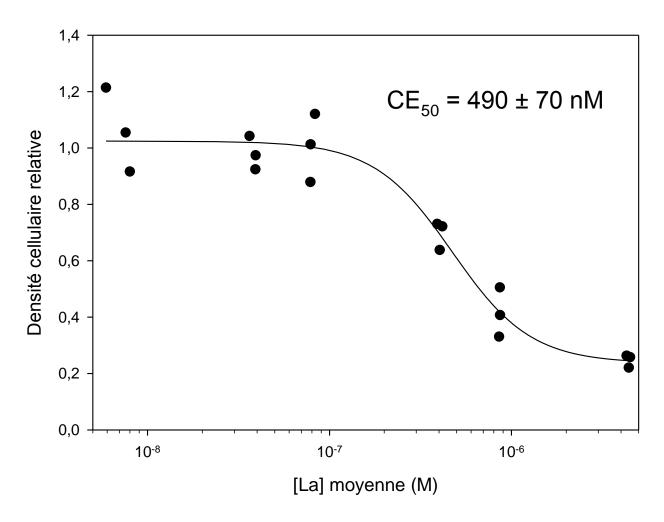


Figure 3.3 : Densités cellulaires relatives aux témoins après 120 h d'exposition en fonction de la concentration moyenne de La mesurée en solution.

Des CE₅₀ de lanthane pour *Chlorella fusca* à différents temps d'expositions ont également été calculées. Les CE₅₀ calculées ainsi que leur écart-type respectif sont présentés au tableau 3.1.

Tableau 3.1 : CE₅₀ de La pour *C. fusca* en absence de tampon et leurs écarts-types déterminés à différents temps d'expositions

Terminaison	48 h	72 h	96 h	120 h
Concentration (nM)	90 ± 60	300 ± 200	400 ± 200	490 ± 70

Habituellement, la CE_{50} diminue avec l'augmentation du temps (Nyholm, 1990). Il est surprenant de constater que la valeur de CE_{50} augmente avec le temps. À partir de 72 h, les valeurs de CE_{50} obtenues s'approchent de celle déterminée à 120 h et une diminution des coefficients de variation est observée (66 % à 14 %). La variation au niveau de la densité cellulaire des

échantillons est à l'origine de l'observation de coefficients de variation plus élevés pour les CE₅₀ précédant le point de terminaison de 120 h. Cette variation à travers les échantillons de même concentration d'exposition pourrait être une conséquence du fait que les cellules n'ont toujours pas atteint une phase stationnaire.

3.4 Exposition au La en présence du tampon NTA

Afin de stabiliser la concentration de lanthane en solution tout au long des expositions, deux expériences en présence de NTA ont été conduites. Le milieu MHSM-2 à un pH de 5,5 a été utilisé comme milieu d'exposition. Dans la première expérience, la concentration de NTA dans le milieu MHSM-2 était de 10⁻⁴ M. Pour la deuxième expérience, la concentration de NTA dans le milieu MHSM-2 a été réduite à 8,0×10⁻⁵ M. Les concentrations totales de lanthane testées étaient de 1 000 nM, 10 000 nM et 55 000 nM. Chaque concentration était testée à deux reprises pour la première expérience et à trois reprises pour la deuxième expérience. Dans les deux expériences, il y avait trois témoins qui ne contenaient pas de lanthane. La densité cellulaire cible au lancement des expositions était de 15 000 cellules mL⁻¹.

3.4.1 Effet sur la croissance

Les courbes de croissance en présence de 10⁻⁴ M de NTA sont présentées à la figure 3.4. Chaque point correspond à la moyenne de la croissance des échantillons de même concentration de lanthane et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de ces mesures. Les analyses statistiques ont démontré qu'il n'y avait aucune différence significative entre la densité cellulaire de chacun des échantillons malgré l'augmentation de la concentration de lanthane totale en solution.

Pour l'expérience suivante, la concentration de NTA en solution a été réduite à 8,0×10⁻⁵ M. Les courbes de croissance obtenues sont également présentées à la figure 3.4. Chaque point correspond à la moyenne de la croissance des échantillons de même concentration de lanthane et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de ces mesures. À partir de 48 h, les échantillons de 55 000 nM sont les seuls dont la densité cellulaire est statistiquement différente des témoins.

Il n'a pas été possible de déterminer une CE₅₀ à partir de ces données puisqu'aucune concentration de lanthane testée n'induisait une inhibition significative de la croissance. Le NTA

est un tampon qui complexe fortement le lanthane; afin d'obtenir une inhibition de la croissance permettant de tracer une courbe dose réponse, il aurait fallu exposer *C. fusca* à des concentrations de lanthane très élevées.

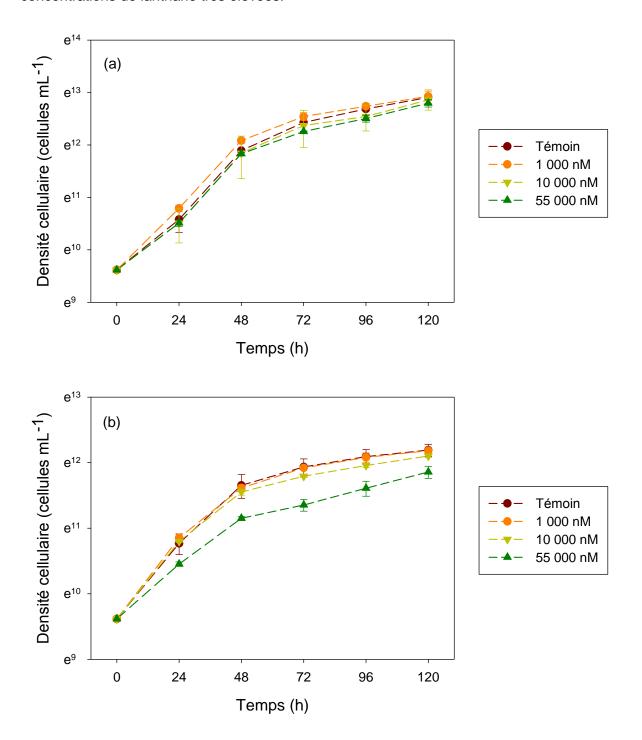


Figure 3.4 : Courbes de croissance de *C. fusca* exposée à différentes concentrations de La en présence de (a) NTA (10⁻⁴ M) et (b) NTA (8,0×10⁻⁵ M). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur trois mesures à l'exception des échantillons de la figure (a) dont l'écart-type a été calculé sur deux mesures.

3.5 Exposition au La en présence du tampon IDA

Une expérience en présence du tampon IDA (10⁻⁴ M) a été faite afin d'évaluer si le tampon IDA pouvait être utilisé pour les expériences de toxicité pour les lanthanides malgré qu'il ne les complexe pas fortement. Le milieu MHSM-2 à pH 5,5 a été utilisé comme milieu d'exposition et les concentrations totales de lanthane testées étaient de 1 000 nM, 10 000 nM, 55 000 nM et 100 000 nM. Chaque concentration ainsi que les témoins étaient testés à deux reprises. La densité cellulaire cible au lancement des expositions était de 15 000 cellules mL⁻¹.

3.5.1 Effet sur la croissance

Les courbes de croissances en présence de l'IDA à une concentration de 10⁻⁴ M sont présentées à la figure 3.5. Certaines valeurs de densité cellulaire n'ont pas pu être utilisées pour tracer les courbes de croissance puisque le signal au compteur de particules était plus faible que la limite de détection. C'est pour cette raison que certaines valeurs sont manquantes à la figure 3.5.

Les résultats obtenus démontrent que la présence d'IDA en solution n'influence pas la croissance de *C. fusca* due à une très faible complexation du lanthane par celui-ci. La spéciation du lanthane en solution est donc quasiment identique à celle obtenue en absence de ce tampon. Des courbes de croissance similaires à celles obtenues en absence de tampon ont donc été obtenues.

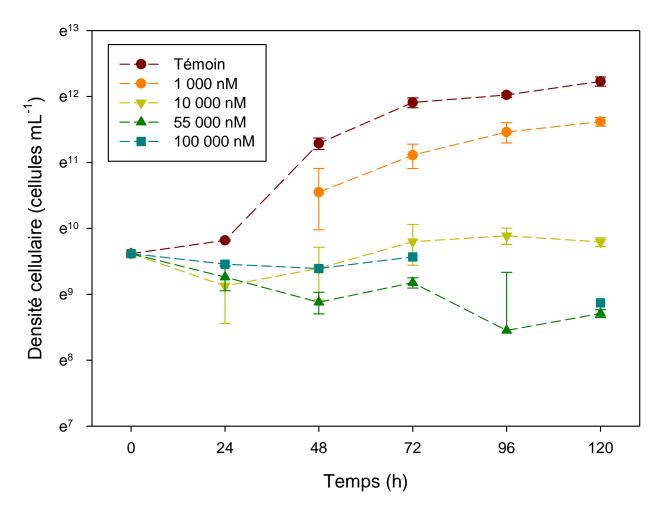


Figure 3.5 : Courbes de croissance de *C. fusca* exposée à différentes concentrations de La en présence d'IDA (10⁻⁴ M). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur deux mesures.

3.6 Exposition au La en présence du tampon acide malique

Une expérience en présence de 10⁻⁴ M de tampon acide malique a été faite afin d'évaluer si le tampon acide malique était un bon candidat pour stabiliser les concentrations de lanthane en solution. De plus, la capacité du malate à complexer le lanthane est intermédiaire à celle de l'IDA et du NTA. L'utilisation de l'acide malique pourrait alors permettre de maintenir des concentrations stables de lanthane en solution tout en permettant l'obtention de courbes de croissance exploitables pour déterminer une valeur de CE₅₀. Le milieu MHSM-2 à pH 5,5 a été utilisé comme milieu d'exposition et les concentrations totales de lanthane testées étaient de 50 nM, 150 nM, 500 nM et 1 200 nM, 3 500 nM, 10 000 nM, 40 000 nM, 70 000 nM. Chaque concentration a été testée à trois reprises et les témoins à six reprises. La densité cellulaire cible au lancement des expositions était de 15 000 cellules mL⁻¹.

3.6.1 Effet sur la croissance

Les courbes de croissance obtenues sont présentées à la figure 3.6. Chaque point correspond à la moyenne de la croissance des échantillons exposés à la même concentration de lanthane et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de ces mesures.

Après 24 h d'exposition, aucune des concentrations testées ne donne une densité cellulaire différente des témoins. Après 48 h d'exposition, les échantillons dont la concentration de lanthane est égale ou supérieure à 10 000 nM sont différents des témoins. Après 72 h d'exposition, les échantillons de 3 500 nM deviennent eux aussi statistiquement différents des témoins. Après 96 h et 120 h d'exposition, aucun autre échantillon additionnel ne se démarque des témoins.

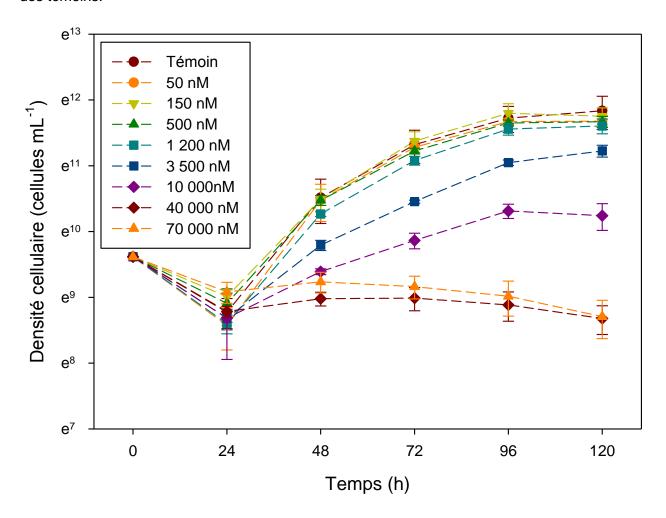


Figure 3.6 : Courbes de croissance de *C. fusca* exposée à différentes concentrations de La en présence d'acide malique (10⁻⁴ M). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures (six pour les témoins et trois pour les échantillons).

À partir des densités cellulaires obtenues après 120 h d'exposition, il a été possible de déterminer la CE_{50} du lanthane en présence de 10^{-4} M d'acide malique à l'aide d'une régression non linéaire. La concentration moyenne de lanthane en solution a été utilisée comme axe des abscisses. Le résultat de la régression est présenté à la figure 3.7. La CE_{50} obtenue est de $3\,800\,\pm\,500\,$ nM.

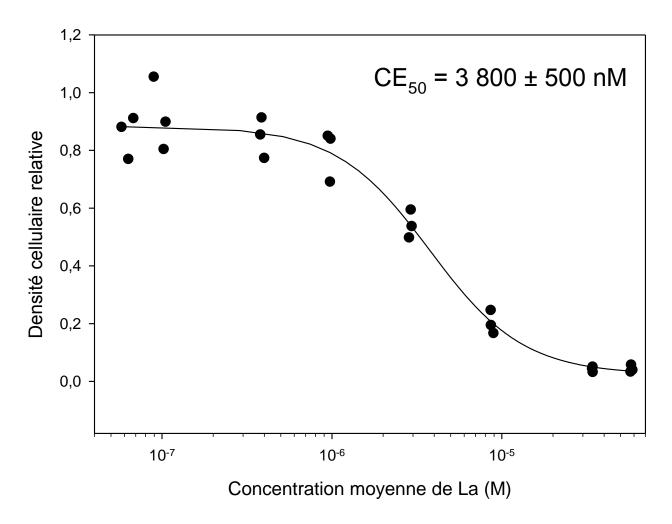


Figure 3.7 : Densités cellulaires relatives aux témoins après 120 h d'exposition en présence d'acide malique (10⁻⁴ M) en fonction de la concentration moyenne de La mesurée en solution.

Des CE₅₀ de lanthane pour *Chlorella fusca* à différents temps d'expositions ont également été calculées. Les CE₅₀ calculées sont présentées au tableau 3.2.

Tableau 3.2 : CE₅₀ de La pour *C. fusca* en présence d'acide malique et leurs écarts-types déterminés à différents temps d'expositions

Terminaison	72 h	96 h	120 h
Concentration (nM)	2 000 ± 300	2 900 ± 400	3 800 ± 500

La CE₅₀ après 48 h d'exposition n'a pu être tracée. Les CE₅₀ obtenue à 72 h d'exposition et plus sont relativement semblables et les coefficients de variation se situent aux alentours de 13-15 %. Pour l'expérience en absence de tampon, une diminution des coefficients de variation avait été notée au cours du temps. Dans l'expérience en absence de tampon une chute de densité cellulaire est observée après 24 h d'exposition pour les échantillons dont la concentration de lanthane est supérieure à 1 000 nM tandis que pour l'expérience en présence d'acide malique cette chute est visible dans le cas de tous les échantillons incluant les témoins. Cette différence du comportement de la croissance de *Chlorella fusca* pourrait être à l'origine de la différence observée entre les coefficients de variation des deux expériences.

3.7 Compilation des données obtenues

À partir des résultats obtenus, on remarque que la présence de tampon dans le milieu d'exposition a un effet sur la toxicité du lanthane. Cette influence attendue est observable simplement en comparant la CE_{50} obtenue en absence de tampon qui est de 490 \pm 70 nM à celle en présence d'acide malique qui est de 3 800 \pm 500 nM. L'effet de la présence de tampon sur le rendement cellulaire après 120 h d'exposition est illustré à la figure 3.8.

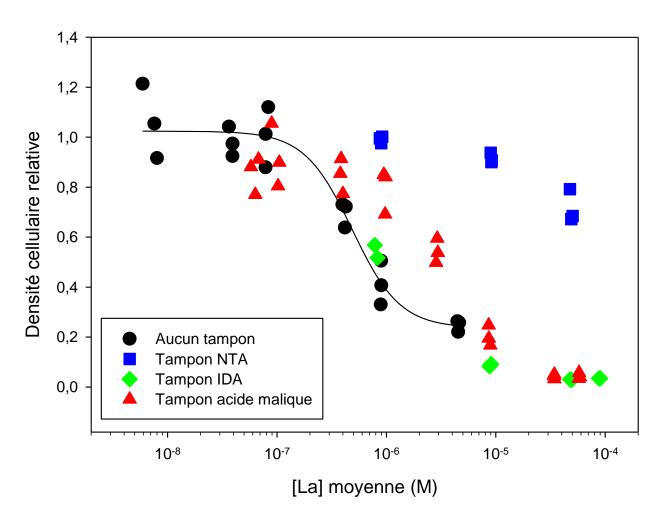


Figure 3.8 : Compilation des rendements cellulaires après 120 h d'exposition en fonction de la concentration moyenne de La en solution. La courbe tracée correspond à la courbe dose réponse obtenue à la figure 3.3 en absence de tampon.

3.7.1 Ion libre

Afin d'évaluer l'applicabilité du BLM, les rendements cellulaires ont été rapportés en fonction de la concentration de l'ion libre La³⁺ en solution plutôt que de la concentration moyenne totale de lanthane en solution. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.9.

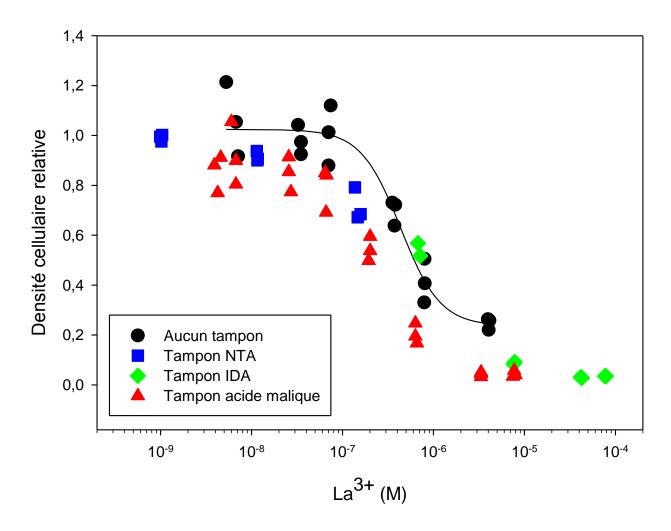


Figure 3.9 : Compilation des rendements cellulaires après 120 h d'exposition en fonction de la concentration d'ion libre de La en solution. La courbe tracée correspond à la courbe dose réponse obtenue à la figure 3.3 en absence de tampon exprimée en fonction de l'ion libre.

La CE_{50} en absence de tampon en fonction de l'ion libre est de 430 \pm 60 nM et celle en présence d'acide malique de 260 \pm 30 nM. Par rapport aux CE_{50} obtenues sur la base des concentrations moyennes totales de La, celles obtenues avec les concentrations libres moyennes sont plus faibles. Relativement aux CE_{50} déterminées en fonction de la concentration totale de lanthane en solution, une faible réduction de la CE_{50} en absence de tampon est observée (12 %), tandis qu'en présence d'acide malique une forte réduction de la CE_{50} est observée (93 %). Cette réduction plus marquée en présence d'acide malique est causée par une plus faible proportion de lanthane sous forme d'ion libre due à la complexation du lanthane par l'acide malique comme il a été indiqué à la section 3.1. Le rapprochement des points sur la courbe de CE_{50} en absence de tampon démontre une bonne estimation de la toxicité du lanthane par l'ion libre lorsque les conditions d'exposition sont semblables. Cependant, les densités cellulaires relatives pour les échantillons exposés en présence de tampon se

retrouvent en dessous des densités cellulaires relatives en absence de tampon. Cette différence indique que la concentration effective de La³+ dans les milieux tamponnés est plus grande que celle du milieu non tamponné. Cette observation indique que la diminution de la concentration de lanthane au cours du temps dans le milieu non tamponné est non négligeable, donc ceci démontre que l'utilisation de tampon dans ce type d'expérience est importante. Yang *et al.* (2014) ont observé une augmentation du flux d'internalisation (j_{int}) à de faibles concentrations d'ion libre d'europium sur l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. Les auteurs ont proposé que le complexe Eu-Malate puisse être internalisé. Cependant, ce scénario est peu probable dans notre cas car nos résultats avec ce ligand recoupent ceux où le NTA, un ligand qui ne peut être assimilé, a été utilisé. Les valeurs de CE_{50} du lanthane, obtenues sur un organisme d'étude similaire (algues), trouvées dans la littérature se situent entre 3,3 μ M et 313 μ M (tableau 1.5). Ces valeurs de CE_{50} sont jusqu'à 1 000 fois plus élevées que celles obtenues dans la présente étude. Plusieurs facteurs peuvent être la cause de cet écart, dont la formation d'espèces non solubles de lanthane en solution qui a été observée dans l'étude de Stauber et Binet (2000).

3.7.2 Internalisation

Les rendements cellulaires ont également été rapportés en fonction de la concentration intracellulaire de lanthane. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.10. Les données utilisées pour tracer la série « aucun tampon » à la figure 3.10 ne sont pas les mêmes que celles utilisées à la section 3.3. La méthode de digestion qui a été utilisée pour l'expérience présentée à la section 3.3 est celle qui consistait à digérer les algues 48 h dans l'acide nitrique tandis que pour les autres expériences (NTA et acide malique) la méthode de digestion totale a été utilisée. Afin d'obtenir des résultats homogènes, l'expérience en absence de tampon a été répétée, mais cette fois la méthode de digestion totale a été utilisée. Ce sont ces résultats qui sont présentées à la figure 3.10.

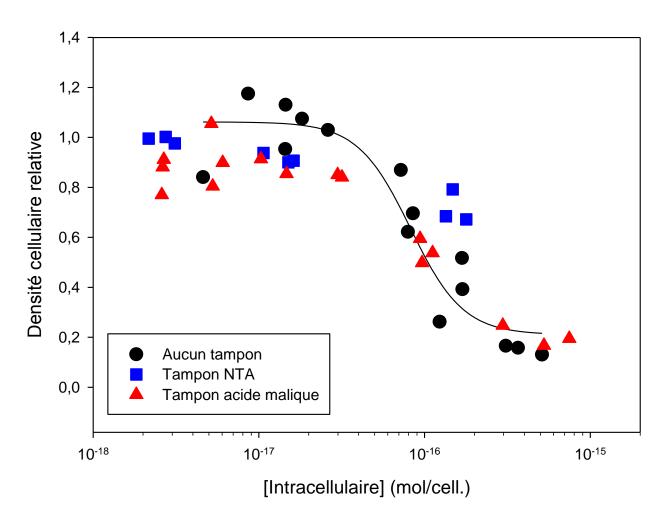


Figure 3.10 : Compilation des rendements cellulaires après 120 h d'exposition en fonction de la concentration intracellulaire de La. La courbe tracée correspond à la courbe dose réponse en absence de tampon (expérience digestion totale) exprimée en fonction de la concentration intracellulaire.

Les résultats obtenus s'apparentent à ceux obtenus lorsque la concentration d'ion libre est utilisée comme variable indépendante pour représenter la courbe dose-réponse. Cette ressemblance nous porte à croire que l'internalisation du lanthane dans les cellules est la cause de la réduction de la densité cellulaire chez C. fusca. Les CE_{50} en absence de tampon ainsi qu'en présence d'acide malique ont été déterminées à titre indicatif. La CE_{50} en absence de tampon est de 100 ± 20 amol/cell. et en présence d'acide malique de 140 ± 20 amol/cell.

Les concentrations intracellulaires en lanthane ont également été rapportées en fonction de la concentration totale de lanthane en solution. Les résultats de cette comparaison sont présentés à la figure 3.11.

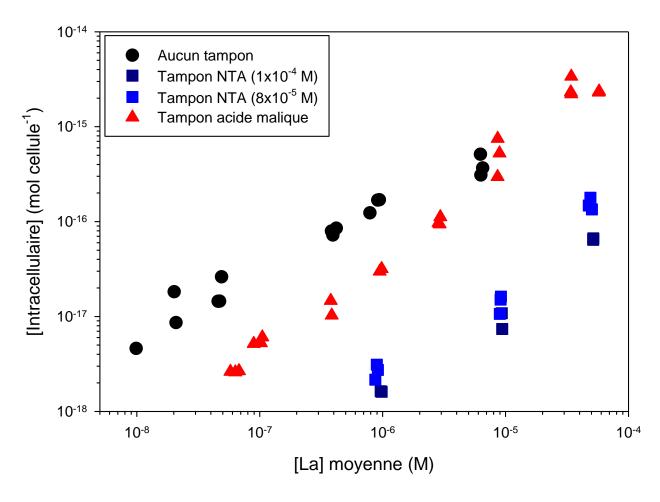


Figure 3.11 : Compilation des concentrations intracellulaires en La après 120 h d'exposition en fonction de la concentration moyenne de La en solution.

Aucune corrélation apparente n'est observée entre les différentes expériences effectuées. Les concentrations intracellulaires en lanthane ont également été rapportées en fonction de la concentration d'ion libre en solution. Les résultats de cette comparaison sont présentés à la figure 3.12. Une meilleure corrélation est observée entre les différentes expériences. Cependant, aux concentrations d'ion libre supérieures à 10⁻⁶ M, une divergence des points est observée. Une étude plus approfondie des mécanismes d'internalisation du lanthane dans les cellules de *Chlorella fusca* pourrait permettre d'identifier la source de cette divergence.

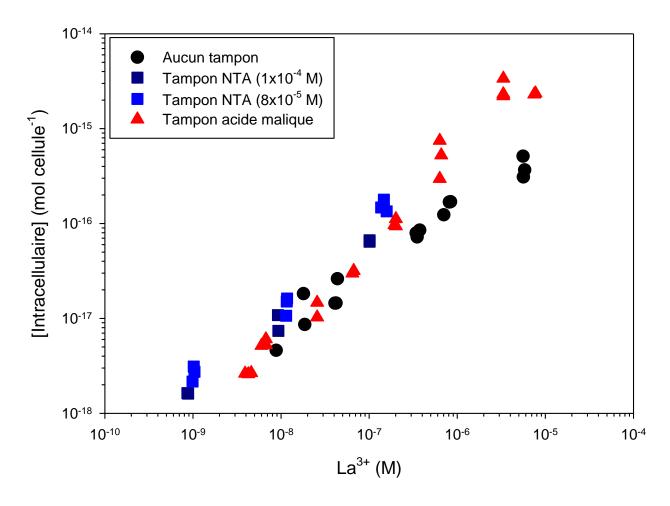


Figure 3.12 : Compilation des concentrations intracellulaires en La après 120 h d'exposition en fonction de la concentration d'ion libre La en solution.

3.8 Influence de la concentration en calcium

Les lanthanides ont déjà été identifiés comme étant de potentiels inhibiteurs des transporteurs de calcium (Korotkov *et al.*, 2014, Reed & Bygrave, 1974). De plus, Ishikawa *et al.* (1996) ont observé une diminution de l'internalisation du calcium dans les racines du pois cultivé, *Pisum sativum*, en présence de lanthane. Nous nous sommes alors intéressés à l'effet de la concentration en calcium sur la croissance de *C. fusca* dans le milieu d'exposition en présence de 3,5 μ M de lanthane. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites dans la section 2.3.5. La proportion de La³⁺ est similaire dans les trois milieux d'exposition (1 μ M Ca = 7 % La³⁺, 68 μ M Ca = 7 % La³⁺, 1 mM Ca = 8 % La³⁺). Les courbes de croissance obtenues sont présentées à la figure 3.13.

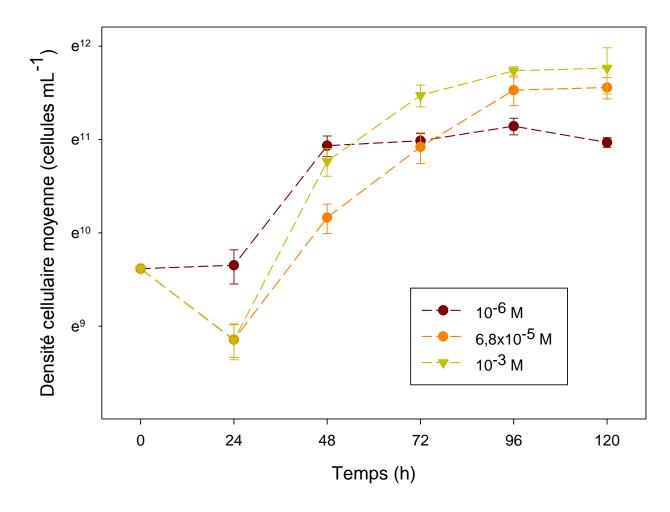


Figure 3.13 : Courbes de croissance de *C. fusca* exposée à différentes concentrations de Ca en présence de La $(3.5 \mu M)$ et d'acide malique $(10^{-4} M)$. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur cinq mesures.

Une analyse statistique à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs avec mesures répétées a permis de déterminer qu'après 96 h d'exposition les densités cellulaires observées aux trois concentrations de calcium testées sont statistiquement différentes. Toutefois, après 120 h ce n'est plus le cas entre la concentration de calcium de 1 mM et celle de 68 μ M dû à une plus grande incertitude sur les densités cellulaires mesurées. Le calcium semble donc avoir un effet protecteur sur *C. fusca*. On remarque aussi qu'une légère variation de la concentration de calcium entre 1 μ M et 68 μ M provoque un effet démesurément plus grand par rapport à la l'effet du changement de concentration de calcium entre 68 μ M et 1 mM.

Afin de d'appuyer l'hypothèse que le calcium procure un effet protecteur sur l'espèce étudiée, les concentrations intracellulaires de lanthane ont également été déterminées. Les résultats de cette analyse sont présentés à la figure 3.14 et ils ont mis en évidence avec la densité cellulaire finale.

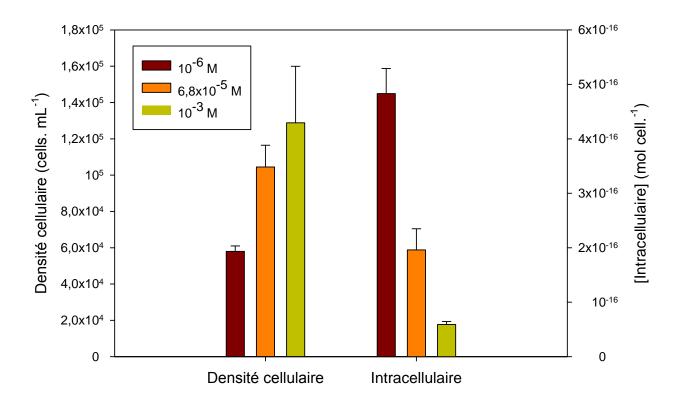


Figure 3.14 : Densité cellulaire et [La] intracellulaire après 120 h en fonction de la concentration de calcium dans les milieux.

Les résultats obtenus démontrent que plus la concentration en calcium dans les milieux d'exposition augmente, plus la concentration intracellulaire de lanthane diminue. Le calcium procure donc un effet protecteur à l'espèce étudiée et cette protection provient d'une diminution de l'internalisation du lanthane. Pour l'instant, il n'est pas possible d'identifier le mécanisme de protection, toutefois la compétition entre le calcium et le lanthane pour les mêmes transporteurs pourrait être à l'origine de cette protection.

La constante d'affinité du calcium avec les transporteurs empruntés par le lanthane (K_{Ca}) a été déterminée à l'aide d'un modèle de type Michaelis-Menten (3.1) utilisé dans l'étude de François et al. (2007) :

$$\left[\text{int racell.}\right] = \frac{A}{1 + K_{Ca} \left[\text{Ca}^{2+}\right]}$$
 (3.1)

où [intracell.] est la concentration intracellulaire mesurée de lanthane en amol/cell. et $[Ca^{2+}]$ est la concentration mesurée de calcium dans le milieu d'exposition en μ mol/L. Il a été possible de déterminer la constante K_{Ca} à l'aide d'une régression non-linéaire (Rational, 2 Parameter II) faite

à partir du logiciel SigmaPlot version 11.0 de Systat Software. La constante K_{Ca} obtenue est de $4 \pm 2 \times 10^4$. La régression non-linéaire est présentée à la figure 3.15.

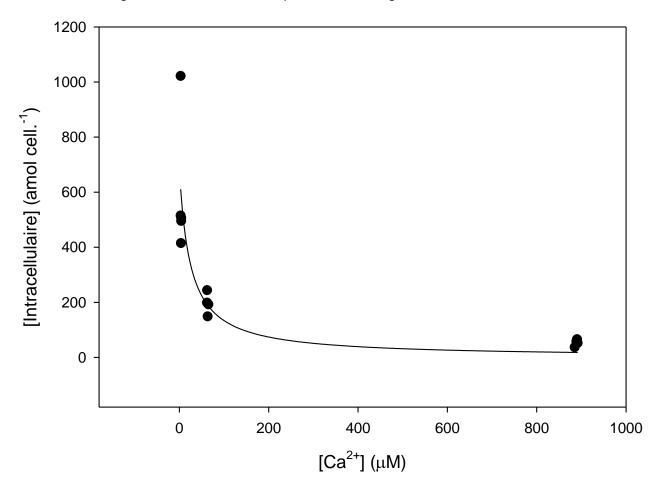


Figure 3.15 : Résultat de la régression linéaire effectuée à l'aide du logiciel SigmaPlot afin de déterminer la constante K_{Ca} pour le lanthane.

CHAPITRE 4 : EXPOSITION DE *C. FUSCA* AU CÉRIUM: RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Spéciation du Ce

Comme pour le lanthane, le logiciel de modélisation de spéciation chimique MINEQL+ a été utilisé afin de connaître sous quelle forme le cérium se retrouvait en solution lors des expériences d'exposition. Les simulations ont été effectuées à un pH de 5,5 et l'option système ouvert à l'atmosphère était activée. Les concentrations des espèces en solution utilisées pour effectuer les calculs sont les mêmes que celles présentées dans le tableau 2.4. Les résultats de spéciation avec le cérium sont similaires à ceux obtenus avec le lanthane.

En absence de tampon, les résultats démontrent que la majorité du cérium en solution se retrouve sous forme d'ion libre. Lorsque l'on effectue un calcul à une concentration totale de cérium de 1×10^{-6} M, on obtient que 8.9×10^{-7} M (88.9 %) du cérium est sous forme d'ion libre. L'espèce suivante en importance est le CeSO₄ avec une concentration de 9.7×10^{-8} M (9.7 %) suivis de CeNO₃ avec une concentration de 1.3×10^{-8} M (1.3 %). Les espèces d'hydroxydes et de carbonates se retrouvent à des proportions inférieures à 0.1 %.

Avec l'acide malique comme tampon, le cérium se retrouve majoritairement complexé par celuici. Pour une concentration d'acide malique de 10^{-4} M et une concentration de cérium de 1×10^{-6} M, on retrouve $4,3\times10^{-8}$ M (4,3%) du Ce sous forme d'ion libre. L'espèce majoritaire de cérium que l'on retrouve en solution est le Ce(malate) à $9,5\times10^{-7}$ M (95,2%).

4.2 Comportement du Ce dans le milieu d'exposition

Comme pour le lanthane, des expériences de stabilité ont été conduites en présence et en absence d'algues afin de s'assurer que la concentration demeurait stable tout au long des expositions. La première expérience a été de mesurer la concentration en cérium dans des erlenmeyers où il n'y avait pas d'algue ni tampon sur une période de 120 h. Une aliquote était prélevée à tous les 24 h et acidifiée pour ensuite être analysée à l'ICP-MS. Cette expérience a permis de s'assurer que l'adsorption du cérium sur les parois des erlenmeyers était négligeable. L'expérience a ensuite été répétée en présence d'algues sans et avec acide malique. Une

aliquote était prélevée à tous les 24 h puis centrifugée (5000 rpm, 5 min). Le surnageant était prélevé, acidifié et analysé à l'ICP-MS. Après les 120 h d'expositions, le milieu a aussi été filtré et le filtrat a été récupéré pour déterminer la concentration de cérium en solution afin de la comparer avec celle obtenue par centrifugation.

Les résultats obtenus ont permis d'observer que l'adsorption du cérium sur les parois des erlenmeyers est négligeable. Cependant, les concentrations de cérium obtenues suite à une filtration sont inférieures à celles obtenues par un simple prélèvement. Cette diminution atteint 70 % lorsque la concentration en cérium en solution est faible. En présence d'algues et en absence de tampon, une diminution jusqu'à 45 % de la concentration de cérium en solution est observée. De plus, comme pour l'expérience en absence d'algues, la filtration entraîne un biais apparent sur la mesure de la concentration de cérium en solution. Lorsque l'acide malique est utilisé comme tampon, la concentration en cérium tout au long de l'expérience demeure beaucoup plus stable. Toutefois, la filtration introduit toujours un biais apparent sur la mesure de la concentration de cérium en solution. Les résultats des expériences de stabilité sont présentés à la figure 4.1.

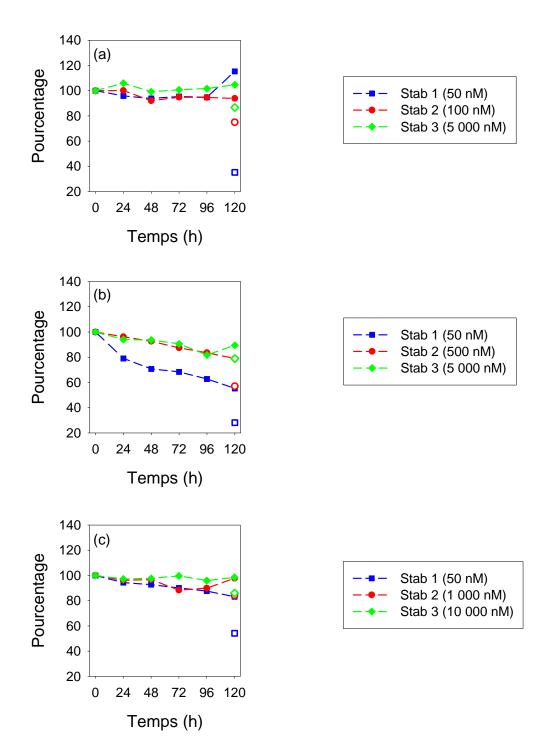


Figure 4.1 : Concentration de cérium en solution relativement à celle au temps initial (a) en absence d'algues et tampon, (b) en présence d'algues et en absence de tampon, (c) en présence d'algues et d'acide malique dans les échantillons Stab (stabilité) (les symboles vides représentent la concentration obtenue lors de la filtration à 120 h).

4.3 Exposition au Ce en absence de tampon

La première expérience avec le cérium consistait à exposer les algues en absence de tampon. Le milieu MHSM-2 à un pH de 5,5 a été utilisé comme milieu d'exposition. Les concentrations totales de cérium testées sont de 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 000 nM et 5 000 nM. Chaque concentration était testée à trois reprises et il y avait cinq témoins qui ne contenaient pas de cérium. La densité cellulaire cible au lancement de l'exposition était de 15 000 cellules mL⁻¹.

4.3.1 Effet sur la croissance

Les courbes de croissance obtenues sont présentées à la figure 4.2. Chaque point correspond à la moyenne de la croissance des échantillons de même concentration de cérium et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de ces mesures.

Après 24 h d'exposition, on remarque qu'il y a une réduction de la densité cellulaire, comparativement à la journée précédente, pour les échantillons dont la concentration de cérium est de 500 nM et plus. Comme il a été mentionné précédemment dans le chapitre 3, cette chute de densité cellulaire peut être causée par la proximité des mesures à la limite de détection du compteur de particules. Il est aussi possible qu'à ces concentrations de cérium, une fraction des cellules exposées meure ou éclate. Aucun échantillon ne se démarque des témoins après 24 h d'exposition. Après 48 h d'exposition, tous les échantillons deviennent statistiquement différents des témoins à l'exception de ceux dont la concentration en cérium est de 100 nM. Aucune autre différence n'est observée après 72 h d'exposition. Toutefois, après 96 h d'exposition, les échantillons de 100 nM deviennent statistiquement différents des témoins tandis que ceux de 500 nM ne le sont plus. Comme pour le lanthane, on observe que lorsque la concentration en cérium atteint un certain seuil, celui-ci commence à avoir un effet sur la croissance de C. fusca. Lorsque ce seuil est atteint, plus la concentration de cérium en solution est élevée, plus le rendement de la croissance est affecté. Il est aussi observé que certains échantillons (10, 50 et 100 nM) ont une densité cellulaire supérieure à celle des témoins. Cet effet a déjà été identifié dans la littérature et il est identifié comme étant un effet d'hormèse (Pagano et al., 2015, Yuguan et al., 2009). L'hormèse est un processus dans lequel une exposition à une faible dose d'un produit chimique ou un facteur environnemental induit un effet d'adaptation bénéfique sur des cellules ou un organisme, malgré qu'il soit dommageable à doses plus élevées (Mattson, 2008). Par ailleurs, cet effet est exploité par la Chine qui utilise les terres rares pour augmenter le rendement de certaines de ses cultures (Pang *et al.*, 2002). Cependant, la cause exacte de l'effet bénéfique du cérium à faible dose n'est pas bien connue pour le moment.

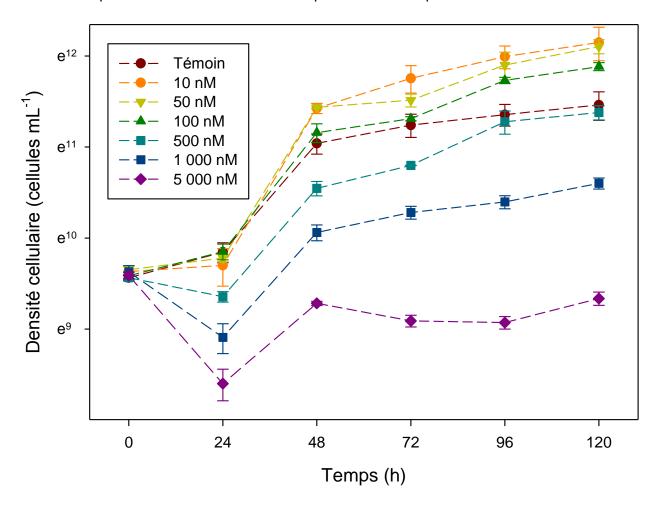


Figure 4.2 : Courbes de croissance de *C. fusca* exposée à différentes concentrations de Ce. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures (cinq pour les témoins et trois pour les échantillons).

À partir des densités cellulaires obtenues après 120 h d'exposition, il a été possible de déterminer la CE_{50} du cérium à l'aide d'une régression non linéaire. La concentration moyenne de cérium en solution est présentée en abscisse (moyenne entre la concentration mesurée à t=0 et celle mesurée à t=120 h). Le résultat de la régression est présenté à la figure 4.3. La CE_{50} obtenue est de 190 \pm 70 nM, exprimée en termes de Ce dissous.

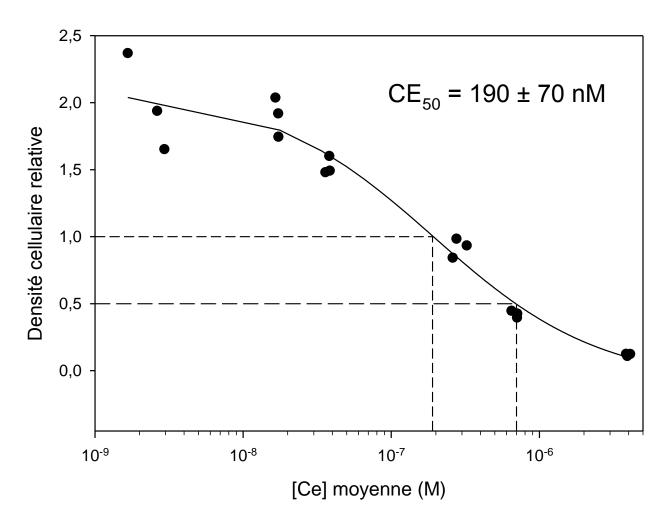


Figure 4.3 : Densités cellulaires relatives aux témoins après 120 h d'exposition en fonction de la concentration moyenne de Ce mesurée en solution. La ligne pointillé à une densité cellulaire relative de 1 correspond à la valeur de CE₅₀ déterminée par régression non linéaire et celle à 0,5 à la valeur attendue.

Certains échantillons avaient une densité cellulaire relative supérieure à 1. Ceci est dû au fait que les échantillons dont la concentration nominale de Ce était \leq 100 nM avaient une densité cellulaire après 120 h supérieure à celle des témoins. La valeur de CE $_{50}$ obtenue se situe donc à une densité cellulaire relative de 1, comme l'indiquent les lignes pointillées sur la figure 4.3. La valeur de CE $_{50}$ obtenue est discutable puisqu'elle ne tient pas en compte qu'un effet d'hormèse a été observé. La concentration moyenne en cérium qui correspond à une densité cellulaire relative de 0,5 est d'environ 700 nM.

Des CE₅₀ de cérium pour *Chlorella fusca* à différents temps d'expositions ont également été calculées. Les CE₅₀ calculées sont présentées au tableau 4.1.

Tableau 4.1 : CE₅₀ de Ce pour *C. fusca* en absence de tampon et leurs écarts-types déterminés à différents temps d'expositions

Terminaison	48 h	72 h	96 h	120 h
Concentration (nM)	130 ± 30	50 ± 50	220 ± 90	190 ± 70

4.4 Exposition au Ce en présence d'acide malique

Une expérience en présence de 10⁻⁴ M de tampon acide malique a été faite afin d'évaluer si le malate était également un bon candidat pour maintenir les concentrations de cérium en solution stables. Le milieu MHSM-2 à pH 5,5 a été utilisé comme milieu d'exposition et les concentrations de cérium testées sont de 50 nM, 150 nM, 500 nM et 1 200 nM, 3 500 nM, 10 000 nM, 40 000 nM, 70 000 nM. Chaque concentration a été testée à trois reprises et les témoins à 6 reprises. La densité cellulaire cible au lancement des expositions était de 15 000 cellules mL⁻¹.

4.4.1 Effet sur la croissance

Les courbes de croissance obtenues sont présentées à la figure 4.4. Chaque point correspond à la moyenne de la croissance des échantillons exposés à la même concentration de cérium et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de ces mesures.

Après 24 h d'exposition, une différence de la densité cellulaire des échantillons de 40 000 et 70 000 nM vis-à-vis des témoins est notée. Après 48 et 72 h d'exposition, les échantillons dont la concentration nominale en cérium était égale ou supérieure à 3 500 nM sont différents des témoins. Après 96 h d'exposition, les échantillons exposés à 3 500 nM redeviennent non statistiquement différents des témoins. Toutefois, après 120 h ces échantillons redeviennent statistiquement différents des témoins.

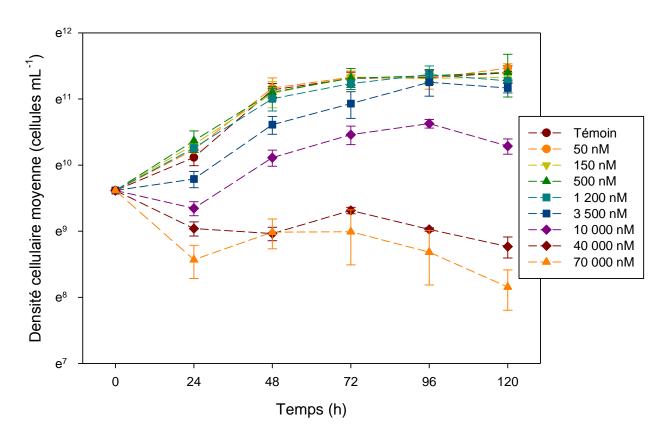


Figure 4.4 : Courbes de croissance de *C. fusca* exposée à différentes concentrations de Ce en présence d'acide malique (10⁻⁴ M). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures (six pour les témoins et trois pour les échantillons).

À partir des densités cellulaires obtenues après 120 h d'exposition, il a été possible de déterminer la CE_{50} du cérium en présence de 10^{-4} M d'acide malique à l'aide d'une régression non linéaire. L'abscisse représente la concentration moyenne de cérium en solution. Le résultat de la régression est présenté à la figure 4.5. La CE_{50} obtenue est de 6 000 \pm 1 000 nM.

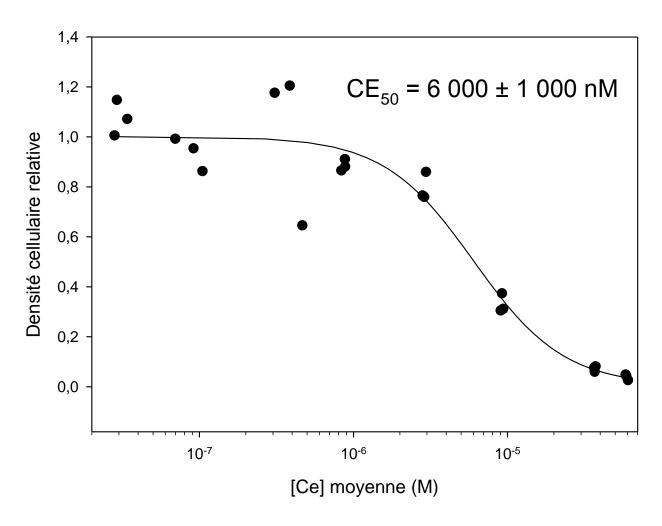


Figure 4.5 : Densités cellulaires relatives aux témoins après 120 h d'exposition en présence d'acide malique (10^{-4} M) en fonction de la concentration moyenne de Ce mesurée en solution.

Des CE₅₀ de cérium pour *Chlorella fusca* à différents temps d'expositions ont également été calculées. Les CE₅₀ calculées sont présentées au tableau 4.2.

Tableau 4.2 : CE₅₀ de Ce pour *C. Fusca* en présence d'acide malique et leurs écarts-types déterminés à différents temps d'expositions

Terminaison	48 h	72 h	96 h	120 h
Concentration (nM)	4 000 ± 1 000	6 000 ± 2 000	9 000 ± 1 000	6 000 ± 1 000

4.5 Compilation des données obtenues

À partir des résultats obtenus, on remarque que la présence de tampon dans le milieu d'exposition a un effet sur la toxicité du Ce sur la base de sa concentration totale moyenne. Cette influence est observable simplement en comparant la CE_{50} obtenue en absence de tampon de 190 ± 70 nM à celle en présence d'acide malique de $6\,000 \pm 1\,000$ nM. L'effet de la présence du tampon acide malique sur le rendement cellulaire après $120 \, h$ d'exposition est illustré à la figure $4.6 \, h$

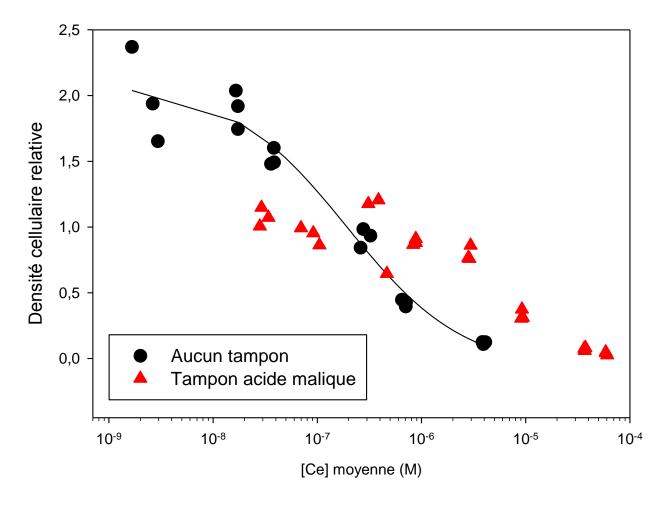


Figure 4.6 : Compilation des rendements cellulaires après 120 h d'exposition en fonction de la concentration moyenne de Ce en solution.

4.5.1 Ion libre

Afin d'évaluer l'applicabilité du BLM, les rendements cellulaires ont été rapportés en fonction de la concentration de l'ion libre Ce³⁺ en solution plutôt que de la concentration moyenne totale de Ce en solution. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4.7.

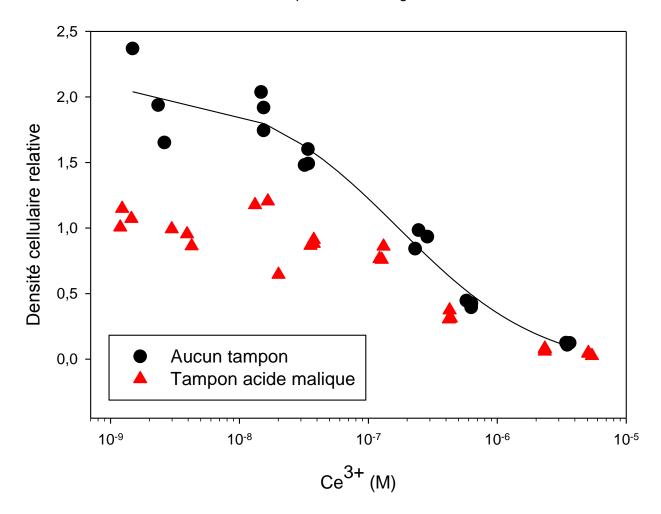


Figure 4.7 : Compilation des rendements cellulaires après 120 h d'exposition en fonction de la concentration d'ion libre de Ce en solution.

La CE_{50} en absence de tampon en fonction de l'ion libre de cérium est de 170 \pm 60 nM et celle en présence d'acide malique de 270 \pm 60 nM. Par rapport aux CE_{50} obtenues en fonction de la concentration totale de cérium en solution, une faible réduction de la CE_{50} en absence de tampon est observée (11 %), tandis qu'en présence d'acide malique une forte réduction de la CE_{50} est observée (96 %). Cette réduction plus marquée en présence d'acide malique est causée par une plus faible proportion de cérium sous forme d'ion libre due à la complexation du cérium par l'acide malique comme il a été indiqué à la section 4.1. Le rapprochement des points

aux concentrations plus grandes que 10⁻⁷ M de Ce³⁺ sur la courbe de CE₅₀ en absence de tampon démontre une bonne estimation de la toxicité du cérium lorsque les conditions d'exposition sont telles que les pertes de Ce au cours de l'exposition soient peu importantes par rapport à la concentration initiale (c'est-à-dire, à des concentrations élevées comme celles trouvées à la droite de la figure 4.7). Par contre, pour les concentrations inférieures à 10⁻⁷ M de Ce³⁺, une divergence des points est observée. Cet écart entre les points en absence de tampon et en présence d'acide malique est causé par l'effet d'hormèse observé uniquement en absence de tampon. Toutefois, une expérience préliminaire en absence de tampon n'a pas révélée la présence d'un effet d'hormèse tel qu'illustré à la figure 4.2. Les résultats de cette expérience n'ont pas été retenus dans cette section puisqu'une forte variation de la densité cellulaire des témoins a été observée (200 000 ± 100 000 cellules mL⁻¹). Cette variation ne permettait pas l'obtention de valeurs de CE₅₀ fiables. Les résultats de cette expérience préliminaire sont tout de même présentés en annexe (ANNEXE D). Comme pour le lanthane, les densités cellulaires relatives pour les échantillons exposés en présence de tampon se retrouvent en dessous des densités cellulaires relatives en absence de tampon. Comme pour le lanthane, les valeurs de CE₅₀ pour le cérium rapportées dans la littérature (tableau 1.5) sont plus élevées (jusqu'à 100 fois) que celles obtenues dans la présente étude. Les mêmes facteurs que pour le lanthane peuvent être la cause de cet écart, dont la formation d'espèces non solubles de cérium en solution qui a été observée dans l'étude de González et al. (2015).

4.5.2 Internalisation

Les rendements cellulaires ont également été rapportés en fonction de la concentration intracellulaire de cérium. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4.8.

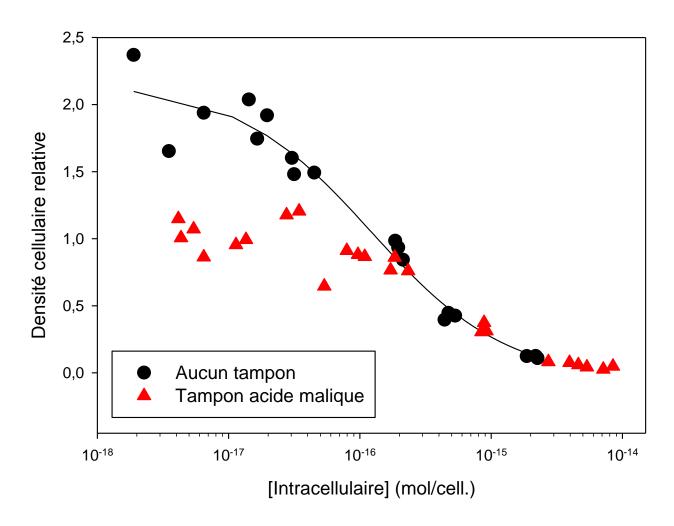


Figure 4.8 : Compilation des rendements cellulaires après 120 h d'exposition en fonction de la concentration intracellulaire de Ce.

Les courbes obtenues de densités cellulaires relatives en fonction de la concentration intracellulaire en cérium s'apparentent à celles obtenues en fonction de l'ion libre de cérium. Donc, comme pour le lanthane, l'internalisation du cérium pourrait être à l'origine de la diminution de la croissance de C. fusca. Il est également intéressant de noter que l'effet d'hormèse se produit de manière indépendante à la bioaccumulation du cérium dans les cellules. Les CE_{50} ont aussi été déterminées à titre indicatif. La CE_{50} en absence de tampon est de 140 ± 40 amol/cell. et en présence d'acide malique de 500 ± 100 amol/cell., mais cette comparaison est faussée par l'effet d'hormèse qui ne s'est produit qu'en absence de l'acide malique.

Les concentrations intracellulaires en cérium ont aussi été rapportées en fonction de la concentration totale de cérium en solution. Les résultats de cette comparaison sont présentés à la figure 4.9.

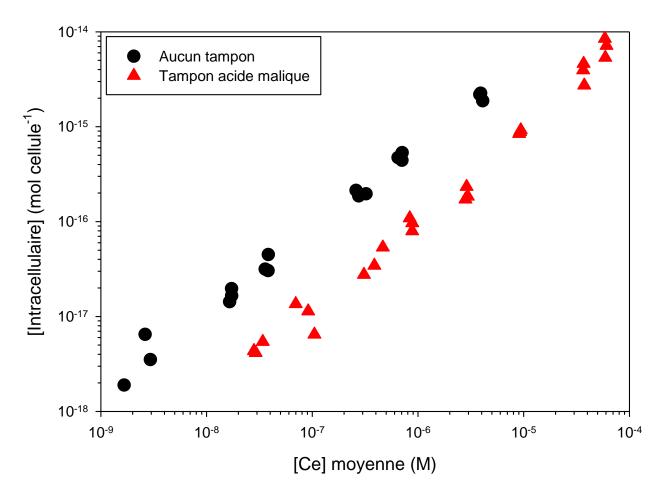


Figure 4.9 : Compilation des concentrations intracellulaires en Ce après 120 h d'exposition en fonction de la concentration moyenne de Ce en solution.

Aucune corrélation apparente n'est observée entre l'expérience en absence de tampon et celle en présence d'acide malique. Les concentrations intracellulaires en cérium ont également été rapportées en fonction de la concentration d'ion libre en solution. Les résultats de cette comparaison sont présentés à la figure 4.10. Une meilleure corrélation est observée entre les deux expériences. Contrairement au lanthane, aux concentrations d'ion libre supérieures à 10^{-6} M, aucune divergence notable n'est observée.

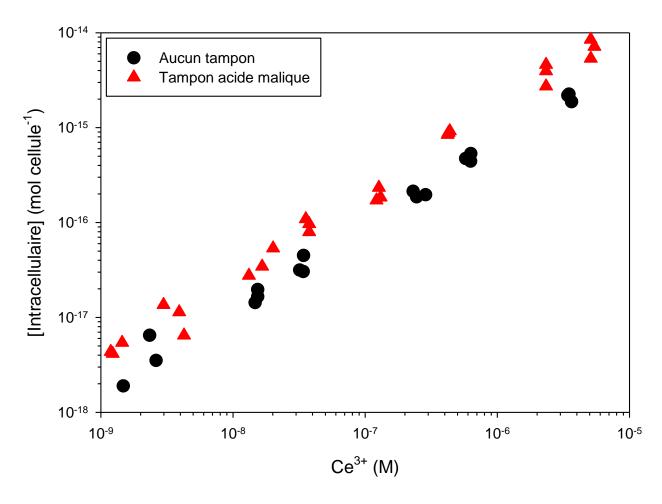


Figure 4.10 : Compilation des concentrations intracellulaires en Ce après 120 h d'exposition en fonction de la concentration d'ion libre Ce en solution.

4.6 Influence de la concentration en calcium

Nous nous sommes aussi intéressés à l'effet de la concentration en calcium sur la croissance de C. fusca dans le milieu d'exposition en présence de $6,0~\mu\text{M}$ de cérium. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites dans la section 2.3.5. La proportion de Ce^{3+} est similaire dans les trois milieux d'exposition ($1~\mu\text{M}$ Ca = 5~% Ce^{3+} , $68~\mu\text{M}$ Ca = 5~% Ce^{3+} , 1~mM Ca = 6% Ce^{3+}). Les courbes de croissance obtenues sont présentées à la figure 4.11.

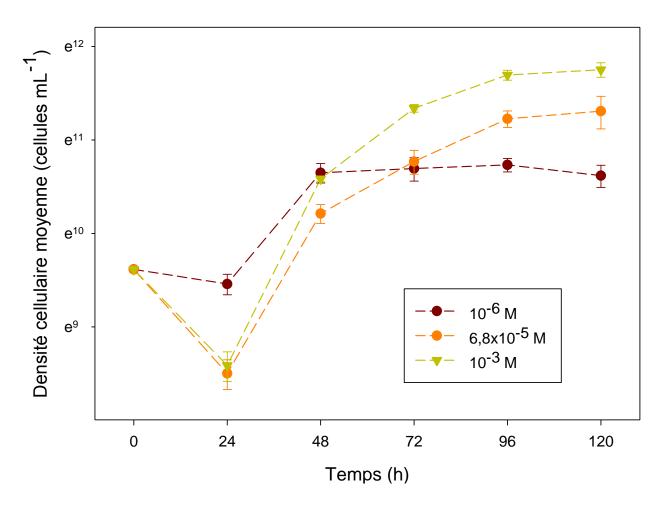


Figure 4.11 : Courbes de croissance de *C. fusca* exposée à différentes concentrations de Ca en présence de Ce (6,0 μM) et d'acide malique (10⁻⁴ M). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur cinq mesures.

Une analyse statistique à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs avec mesures répétées a permis de déterminer qu'après 96 et 120 h d'exposition les trois concentrations de calcium testées sont statistiquement différentes. Le calcium semble donc aussi avoir un effet protecteur sur *C. fusca* lors des expositions en présence de cérium. On remarque aussi que les courbes de croissance lors de l'exposition au cérium (figure 4.11) suivent la même tendance que celles observées lors des expositions au lanthane (figure 3.13).

Afin de supporter l'hypothèse que le calcium procure un effet protecteur sur l'espèce étudiée, les concentrations intracellulaires en cérium ont également été déterminées. Les résultats de cette analyse sont présentés à la figure 4.12 et ils sont mis en évidence avec la densité cellulaire finale.

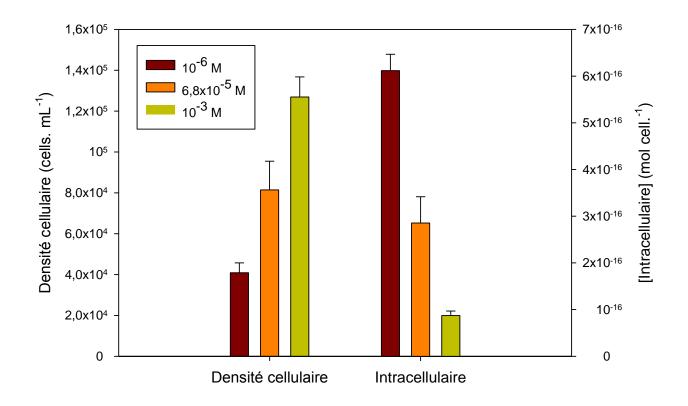


Figure 4.12 : Densité cellulaire et [Ce] intracellulaire après 120 h en fonction de la concentration de calcium dans les milieux.

Les résultats obtenus démontrent que plus la concentration en calcium dans les milieux d'exposition augmente, plus la concentration intracellulaire en cérium diminue. Le calcium procure donc un effet protecteur à l'espèce étudiée et cette protection provient d'une diminution de l'internalisation du cérium. Comme pour le lanthane, il n'est pas possible d'identifier le mécanisme de protection, toutefois la compétition entre le calcium et le cérium pour les mêmes transporteurs pourrait aussi être à l'origine de cette protection.

La constante d'affinité du calcium pour les transporteurs empruntés par le cérium (K_{Ca}) a été déterminée de la même façon que celle du lanthane (section 3.8). La constante K_{Ca} a également été déterminée à l'aide d'une régression non-linéaire (Rational, 2 Parameter II) faite à partir du logiciel SigmaPlot 11.0. La constante K_{Ca} obtenue est de 1,8 ± 0,3×10⁴. La régression non-linéaire est présentée à la figure 4.13.

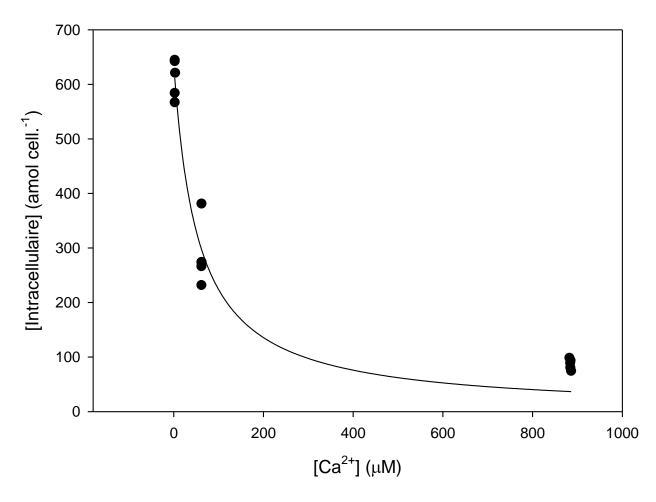


Figure 4.13 : Résultat de la régression linéaire effectuée à l'aide du logiciel SigmaPlot afin de déterminer la constante K_{Ca} pour le cérium.

CHAPITRE 5: CONCLUSION

Les propriétés physico-chimiques qui caractérisent les lanthanides les rendent très intéressants dans le développement des technologies émergentes. On les retrouve maintenant dans plusieurs domaines tels que les énergies renouvelables, la médecine, l'agronomie, la défense militaire, les automobiles, etc. Leur utilisation et leur exploitation continuent d'augmenter d'année en année, ce qui risque forcément d'entraîner une augmentation des concentrations environnementales en lanthanides. Des concentrations élevées en lanthanides ont été mesurées à proximité des sites d'extraction de lanthanides et de la contamination par transport aérien sur de longues distances a été observée dans le cas de la mine à ciel ouvert de Bayan Obo situé en milieu semi-aride en Mongolie-Intérieure. De plus, l'extraction des lanthanides provoque le rejet de quantité non négligeable de thorium radioactif et d'eau acidifiée. Avec l'arrivée de projets d'exploitation minière dans les écosystèmes nordiques du Canada, l'évaluation des risques environnementaux que posent les terres rares devient de plus en plus importante.

La complexité de la composition des milieux aquatiques rend le processus d'évaluation des risques environnementaux laborieux. Plusieurs paramètres comme le pH, la dureté et la matière organique dissoute peuvent influencer la toxicité des lanthanides introduits dans le milieu. Il est donc important de cerner les paramètres qui risquent d'affecter le risque environnemental de l'introduction de lanthanides dans les cours d'eau. Dans cette étude, nous avons démontré que l'ion libre était un bon indicateur pour prédire l'apparition d'un effet toxique. Toutefois, l'influence de la matière organique n'a pas été explorée malgré qu'elle risque de jouer un rôle important sur la toxicité des lanthanides.

La première partie de ce projet était d'évaluer la toxicité du lanthane et du cérium sur l'algue verte unicellulaire *Chlorella fusca*. Les CE_{50} pour le lanthane et le cérium ont été déterminées dans des conditions où la quasi-totalité du métal d'exposition se retrouvait sous forme d'ion libre. Des CE_{50} de 490 ± 70 nM et 190 ± 70 nM ont été déterminés pour le lanthane et le cérium respectivement. Les ligands NTA, IDA, et malate ont ensuite été utilisés lors des expositions afin de tamponner l'ion libre. Les courbes doses réponses tracées ont démontrées que la concentration totale dissoute du métal étudié n'était pas un bon indicateur de toxicité. Les résultats obtenus ont été rapportés sous forme d'ion libre et une nette amélioration de la convergence des courbes doses réponses a été obtenue. Les CE_{50} qui ont été obtenues pour le lanthane libre sont de 430 ± 60 nM et 260 ± 30 nM en absence et en présence d'acide malique

respectivement. L'écart entre les CE_{50} en absence et en présence d'acide malique est causé par une plus grande concentration effective de La^{3+} dans les milieux tamponnés. Cette observation démontre l'importance de l'utilisation de tampon pour ce type d'expérience. Pour le cérium libre, les CE_{50} qui ont été obtenues sont de 170 ± 60 nM et 270 ± 60 nM en absence et en présence d'acide malique respectivement. Il est important de noter qu'un effet d'hormèse a été observé dans le cas de l'exposition au cérium en absence de tampon, tandis que ce phénomène n'a pas été observé dans le cas de l'exposition au cérium en présence d'acide malique. Cette différence de comportement de la croissance de *Chlorella fusca* complexifie la comparaison des CE_{50} dans le cas du cérium.

La quantité de lanthanide internalisée dans les cellules d'algues a aussi été explorée pour la prédiction de la toxicité des métaux étudiés. Une bonne convergence des différentes courbes dose-réponse a démontré que l'internalisation des lanthanides est à l'origine de leur toxicité.

La deuxième partie du projet a été d'évaluer si le calcium procurait un effet protecteur à l'espèce exposée, plus précisément si le calcium réduisait la quantité de lanthanide internalisé dans les cellules. Pour les deux lanthanides étudiés, plus la quantité de calcium dans le milieu d'exposition augmentait (à force ionique et à concentration d'ion libre égales), plus la quantité de lanthanide intracellulaire diminuait. De plus, la densité cellulaire était inversement proportionnelle à la quantité de lanthanide intracellulaire. Le calcium procurerait donc un effet protecteur à l'algue unicellulaire *Chlorella fusca* en diminuant la quantité de lanthanide internalisé. Cependant, le mécanisme à l'origine de cette diminution n'a pas été identifié dans la présente étude. Il a également été possible de déterminer la constante d'affinité du calcium avec les transporteurs empruntés par le lanthane et le cérium (K_{Ca}) à l'aide d'un modèle de type Michaelis-Menten. Les constantes K_{Ca} obtenues sont de 4 \pm 2×10 4 et 1,8 \pm 0,3×10 4 pour le lanthane et le cérium respectivement.

Lorsque l'on compare les résultats obtenus avec le lanthane et le cérium, on remarque une similarité dans les résultats obtenus. Les deux métaux étudiés ont des CE₅₀ ainsi que des niveaux d'accumulation similaires. Pour les expériences avec des concentrations d'exposition variable de calcium, l'augmentation de la concentration de calcium dans le milieu réduit l'internalisation du métal d'exposition et vice versa. Le seul point qui différencie ces deux métaux dans la présente étude est que le cérium en absence de tampon a induit un effet d'hormèse sur l'espèce *Chlorella fusca*, tandis que ce phénomène n'a pas été observé pour le lanthane.

Dans la présente étude, la toxicité du lanthane et du cérium est de 10 à 1 000 fois plus élevée que les données observées dans la littérature i.e. les CE₅₀ obtenues sont 10 à 1 000 fois plus faibles. Cette différence peut être provoquée par plusieurs facteurs dont :

- La non-considération de la spéciation du métal en solution
- La formation d'espèces non solubles du métal d'exposition dans certains milieux d'exposition, notamment en présence de phosphates
- La présence d'espèces chimiques « protectrices » tel le calcium en plus grande concentration dans certains milieux d'expositions
- La variabilité au niveau de la sensibilité des espèces

Les résultats obtenus dans la présente étude pourraient être utilisés dans l'évaluation du risque environnemental. Cependant, une caractérisation des milieux où la contamination pourrait avoir lieu est primordiale puisque le risque de toxicité associé à une contamination est fortement lié à la composition du milieu contaminé. Une caractérisation rigoureuse d'un milieu permettrait d'évaluer la forme sous laquelle le contaminant se retrouverait, ce qui permettrait une évaluation beaucoup plus robuste du risque environnemental.

Plusieurs points restent à explorer pour les lanthanides afin d'évaluer réellement le risque d'une contamination de ces métaux dans l'environnement. L'influence de la matière organique sur la toxicité de ces métaux est un facteur important dans l'évaluation d'un risque environnemental pour lequel peu d'études sont disponibles. De plus, les lanthanides sont présents en cooccurrence dans la croute terrestre, donc une contamination d'un seul lanthanide est peu probable. Il serait judicieux d'effectuer une étude dans laquelle plusieurs lanthanides se retrouvent dans le milieu d'exposition afin d'évaluer quel est l'effet de la cooccurrence de ces éléments sur la toxicité (synergie ou compétition). Une exploration plus approfondie de l'effet des éléments protecteurs comme le calcium pourrait également fournir de l'information pertinente sur le mécanisme de toxicité qu'induisent les lanthanides. L'utilisation de la méthode de fractionnement subcellulaire sur l'algue verte unicellulaire *Chlorella fusca* permettrait d'identifier dans quelle fraction les lanthanides se retrouvent et d'identifier l'effet du calcium sur la répartition des lanthanides dans les cellules. Pour terminer, la détermination de constantes thermodynamiques pour les lanthanides avec différents tampons permettrait d'évaluer avec plus de précision l'applicabilité de l'ion libre dans l'évaluation de la toxicité de ces métaux.

CHAPITRE 6 : RÉFÉRENCES

- Anwar ZM & Azab HA (2001) Ternary complexes formed by trivalent lanthanide ions, nucleotides, and biological buffers. *Journal of Chemical & Engineering Data* 46(3):613-618.
- Barry MJ & Meehan BJ (2000) The acute and chronic toxicity of lanthanum to *Daphnia carinata*. *Chemosphere* 41(10):1669-1674.
- Bau M, Knappe A & Dulski P (2006) Anthropogenic gadolinium as a micropollutant in river waters in Pennsylvania and in Lake Erie, northeastern United States. *Chemie der Erde Geochemistry* 66(2):143-152.
- Bau M, Möller P & Dulski P (1997) Yttrium and lanthanides in eastern Mediterranean seawater and their fractionation during redox-cycling. *Marine Chemistry* 56(1–2):123-131.
- Binnemans K, Jones PT, Blanpain B, Van Gerven T, Yang Y, Walton A & Buchert M (2013) Recycling of rare earths: a critical review. *Journal of Cleaner Production* 51:1-22.
- Blaise C, Gagne F, Ferard JF & Eullaffroy P (2008) Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environmental toxicology* 23(5):591-598.
- British Geological Survey (2011) *Rare earth elements.* Profile British geological survey, MineralsUK, United Kingdom. 54 p
- Castor SB (2008) Rare earth deposits of North America. Resource Geology 58(4):337-347.
- Castor SB & Hedrick JB (2006) Rare earth elements. *Industrial Minerals volume, 7th edition:* Society for Mining, Metallurgy, and Exploration, Littleton, Colorado:769-792.
- Chakhmouradian AR & Wall F (2012) Rare earth elements: minerals, mines, magnets (and more). *Elements* 8(5):333-340.
- Commission Européenne (2014) Report on critical raw material for the EU. Critical materials profiles. 205 p
- Cotton S (2006) Lanthanide and actinide chemistry. John Wiley & Sons LTD, West Sussex, United Kingdom. 263 p
- Coulter (1996) Fine particle applications notes for Coulter counter® instruments 9900266-F. Coulter, Mississauga, Canada
- Davranche M, Grybos M, Gruau G, Pédrot M, Dia A & Marsac R (2011) Rare earth element patterns: A tool for identifying trace metal sources during wetland soil reduction. *Chemical Geology* 284(1-2):127-137.
- de Boer JLM, Verweij W, van der Velde-Koerts T & Mennes W (1996) Levels of rare earth elements in Dutch drinking water and its sources. Determination by inductively coupled plasma mass spectrometry and toxicological implications. A pilot study. *Water research* 30(1):190-198.
- Dodson JR, Hunt AJ, Parker HL, Yang Y & Clark JH (2012) Elemental sustainability: Towards the total recovery of scarce metals. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 51:69-78.
- DOE (2011) Critical materials strategy. in *Critical materials strategy*, Édit Energy USDO (U.S. department of energy, U.S.), p 196.

- EPA (2012) Rare earth elements: a review of production, processing, recycling, and associated environmental issues. EPA 600/R-12/572. US Environmental Protection Agency, US. 135 p
- Folger T (2011) The secrets ingredients of everything. National Geographic Magazine.
- Fortin C (2000) Mécanismes de prise en charge et toxicité et l'argent chez une algue verte en relation avec la spéciation chimique. Thèse de doctorat (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Québec). 179 p
- François L, Fortin C & Campbell PGC (2007) pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga Chlamydomonas reinhardtii through non-competitive interactions: Implications for an algal BLM. *Aquatic Toxicology* 84(2):123-132.
- Franklin NM, Stauber JL, Apte SC & Lim RP (2002) Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(4):742-751.
- Fujiwara K, To YM, Kawakami H, Aoki M & Tuzuki M (2008) Evaluation of metal toxicity in *Chlorella kessleri* from the perspective of the periodic table. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 81(4):478-488.
- Gambogi J (2011) Rare earths. Minerals Yearbook. USGS, États-Unis. 13 p
- Gambogi J (2012) Rare earths. Minerals Yearbook. USGS, Étas-Unis. 14 p
- Gonzalez V, Vignati DAL, Leyval C & Giamberini L (2014) Environmental fate and ecotoxicity of lanthanides: Are they a uniform group beyond chemistry? *Environment international* 71(0):148-157.
- González V, Vignati DAL, Pons M-N, Montarges-Pelletier E, Bojic C & Giamberini L (2015) Lanthanide ecotoxicity: First attempt to measure environmental risk for aquatic organisms. *Environmental pollution* 199:139-147.
- Goonan TG (2011) Rare earth elements-end use and recyclability. USGS, Étas-Unis. 22 p
- Grégoire N (2014) Minéraux et métaux stratégiques des signaux d'alarme... et des opportunités à saisir? Le point en ressources naturelles 2(2):54-61.
- Habashi F (1997) Handbook of extractive metallurgy, vol 3. Wiley-VCH, Toronto. 1759 p
- Hedrick JB (2003) Rare earths. (US Geological Survey Reston, VA , 60.1 60.15, Minerals Yearbook 2003).
- Ishikawa S, Wagatsuma T & Ikarashi T (1996) Comparative toxicity of Al³⁺, Yb³⁺, and La³⁺ to root-tip cells differing in tolerance to high Al³⁺ in terms of ionic potentials of dehydrated trivalent cations. *Soil science and plant nutrition* 42(3):613-625.
- Korotkov S, Konovalova S, Emelyanova L & Brailovskaya I (2014) Y³⁺, La³⁺, and some bivalent metals inhibited the opening of the TI⁺-induced permeability transition pore in Ca²⁺-loaded rat liver mitochondria. *Journal of Inorganic Biochemistry* 141(0):1-9.
- Kulaksiz S & Bau M (2013) Anthropogenic dissolved and colloid/nanoparticle-bound samarium, lanthanum and gadolinium in the Rhine River and the impending destruction of the natural rare earth element distribution in rivers. *Earth and Planetary Science Letters* 362:43-50.
- Kynicky J, Smith MP & Xu C (2012) Diversity of eare earth deposits: The key example of China. *Elements* 8(5):361-367.

- Lawrence MG & Kamber BS (2006) The behaviour of the rare earth elements during estuarine mixing—revisited. *Marine Chemistry* 100(1-2):147-161.
- Li J, Hong M, Yin X & Liu J (2010) Effects of the accumulation of the rare earth elements on soil macrofauna community. *Journal of Rare Earths* 28(6):957-964.
- Li X, Chen Z, Chen Z & Zhang Y (2013) A human health risk assessment of rare earth elements in soil and vegetables from a mining area in Fujian Province, Southeast China. *Chemosphere* 93(6):1240-1246.
- Lurling M & Tolman Y (2010) Effects of lanthanum and lanthanum-modified clay on growth, survival and reproduction of Daphnia magna. *Water research* 44(1):309-319.
- Macfie SM, Tarmohamed Y & Welbourn PM (1994) Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27(4):454-458.
- Matharu K, Mittal SK & Ashok Kumar SK (2011) A novel method for the determination of individual lanthanides using an inexpensive conductometric technique. *Analytical Methods* 3(6):1290.
- Mattson MP (2008) Hormesis defined. Ageing research reviews 7(1):1-7.
- McCloskey JT, Newman MC & Clark SB (1996) Predicting the relative toxicity of metal ions using ion characteristics: Microtox® bioluminescence assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(10):1730-1737.
- Möller P, Paces T, Dulski P & Morteani G (2002) Anthropogenic Gd in surface water, drainage system, and the water supply of the city of Prague, Czech Republic. *Environmental Science & Technology* 36(11):2387-2394.
- Nikanorov AM (2009) The Oddo-Harkins rule and distribution of chemical elements in freshwater ecosystems. *Doklady Earth Sciences* 426(1):600-604.
- Nyholm N (1990) Expression of results from growth inhibition toxicity tests with algae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19(4):518-522.
- Pagano G, Guida M, Tommasi F & Oral R (2015) Health effects and toxicity mechanisms of rare earth elements-Knowledge gaps and research prospects. *Ecotoxicol Environ Saf* 115:40-48
- Pang X, Li D & Peng A (2002) Application of rare-earth elements in the agriculture of China and its environmental behavior in soil. *Environ Sci & Pollut Res* 9(2):143-148.
- Parent L (1991) Biodisponibilité de l'aluminium dans les eaux douces en relation avec les pluies acides. Thèse de doctorat (Université du Québec. Institut national de la recherche scientifique, Québec). 450 p
- Reed KC & Bygrave FL (1974) The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and Ruthenium Red. *Biochemical Journal* 140(2):143-155.
- Roy G (2009) Les éléments du groupe platine (Pd, Pt et Rh) dans les eaux de surface et leur toxicité chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii. Mémoire de maîtrise (Université du Québec. Institut national de la recherche scientifique, Québec). 145 p
- Schijf J (1992) Aqueous geochemistry of the rare earth elements in marine anoxic basins. *Geologica Ultraiectina* 85:1-256.
- Shihira I & Krauss RW (1965) *Chlorella: physiology and taxonomy of forty-one isolates.* University of Maryland,

- Simandl GJ (2014) Geology and market-dependent significance of rare earth element resources. *Mineralium Deposita* 49(8):889-904.
- Sneller FEC, Kalf DF, Weltje L & Van Wezel AP (2000) Maximum permissible concentrations and negligible concentrations for rare earth elements (REEs). (National Institute Of Public Health And The Environment).
- Stauber J & Binet M (2000) Canning river Phoslock field trials—Ecotoxicity testing final report. (CSIRO Centre for Advanced Analytical Chemistry Energy Techniology. Report no. ET317R. Prepared for CSIRO Land and Water and the WA Water and Rivers Commission).
- Su S, Chen B, He M, Hu B & Xiao Z (2014) Determination of trace/ultratrace rare earth elements in environmental samples by ICP-MS after magnetic solid phase extraction with Fe₃O₄@SiO₂@polyaniline-graphene oxide composite. *Talanta* 119:458-466.
- Tai P, Zhao Q, Su D, Li P & Stagnitti F (2010) Biological toxicity of lanthanide elements on algae. *Chemosphere* 80(9):1031-1035.
- Tétrault G (2014) Influence de la physico-chimie du milieu (pH, NH₄⁺, Ca²⁺) sur l'internalisation et la toxicité du platine et du palladium chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii. Mémoire de maîtrise (Université du Québec. Institut national de la recherche scientifique, Québec). 110 p
- Tu J (2010) An economic assessment of China's rare earth policy. ChinaBrief 10(2).
- USGS (2015) Mineral commodity summaries.
- Wang Z-L & Yamada M (2006) Geochemistry of dissolved rare earth elements in the Equatorial Pacific Ocean. *Environmental Geology* 52(4):779-787.
- Wehr JD & Sheath RG (2003) Freshwater algae of North America: Ecology and classification. 1-918 p. http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84902220458&partnerID=40&md5=2ccea404ba412e51f2d9fb89aced387d
- Weltje L, Brouwer AH, Verburg TG, Wolterbeek HT & de Goeij JJM (2002) Accumulation and elimination of lanthanum by duckweed (*Lemna minor L.*) As influenced by organism growth and lanthanum sorption to glass. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(7):1483-1489.
- Weltje L, Verhoof LRCW, Verweij W & Hamers T (2004) Lutetium speciation and toxicity in a microbial bioassay: Testing the free-ion model for lanthanides. *Environmental Science & Technology* 38(24):6597-6604.
- Wübbeke J (2013) Rare earth elements in China: Policies and narratives of reinventing an industry. *Resources Policy* 38(3):384-394.
- Xinde C, Xiaorong W & Guiwen Z (2000) Assessment of the bioavailability of rare earth elements in soils by chemical fractionation and multiple regression analysis. *Chemosphere* 40(1):23-28.
- Yang G, Tan Q-G, Zhu L & Wilkinson KJ (2014) The role of complexation and competition in the biouptake of europium by a unicellular alga. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33(11):2609-2615.
- Yuguan Z, Min Z, Luyang L, Zhe J, Chao L, Sitao Y, Yanmei D, Na L & Fashui H (2009) Effects of cerium on key enzymes of carbon assimilation of spinach under magnesium deficiency. *Biol Trace Elem Res* 131(2):154-164.

Zhu W, de Leer EWB, Kennedy M & Alaerts GJFR (1998) Study of the preconcentration and determination of ultratrace rare earth elements in environmental samples with an ion exchange micro-column. *Fresenius J Anal Chem* 360(1):74-80.

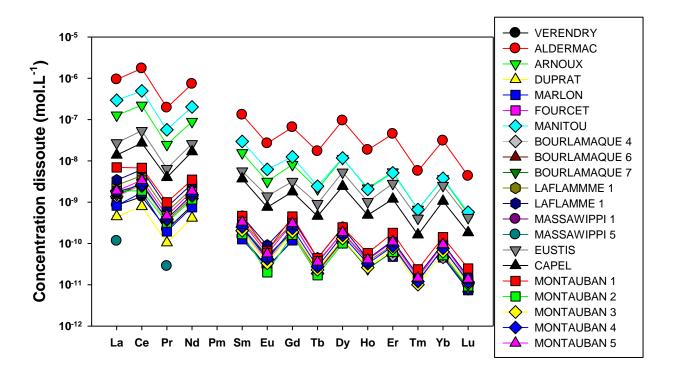


Figure A1 : Concentrations dissoutes ($<0,45~\mu m$) en lanthanides déterminées par ICP-MS dans différents cours d'eau (données non-publiées).

ANNEXE B

Méthode digestion totale 0,25 g et 2,66 % HNO₃ R.M. Couture (Modifiée)

- Allumer la plaque chauffante en position 3 (100 à 140 °C).
- Mettre les algues et les filtres (dans lesquels elles sont contenues) utilisés lors de la filtration dans des béchers en téflon de 125 mL.
- Préparer deux blancs et deux échantillons certifiés (BCR® 670).
- Ajouter 10 ml d'acide nitrique trace metal et chauffer sous reflux 1 heure avec des verres de montres en téflon.
- Retirer les verres de montres en téflon et évaporer à sec.
- Nettoyer les verres de montre en téflon.
- Ajouter 4 mL d'acide perchlorique trace metal et chauffer 1 à 2 heures sous reflux avec les verres de montres en téflon.
- Retirer les verres de montres en téflon et évaporer à sec.
- Laisser refroidir.
- Reprendre le solide avec 1 mL d'acide nitrique trace metal en chauffant légèrement sur la plaque.
- Transvider tous les échantillons dans un tube gradué de 50 mL à l'aide de rinçage avec de l'eau Milli-Q.
- Compléter le volume des échantillons à 20 mL avec de l'eau Milli-Q.

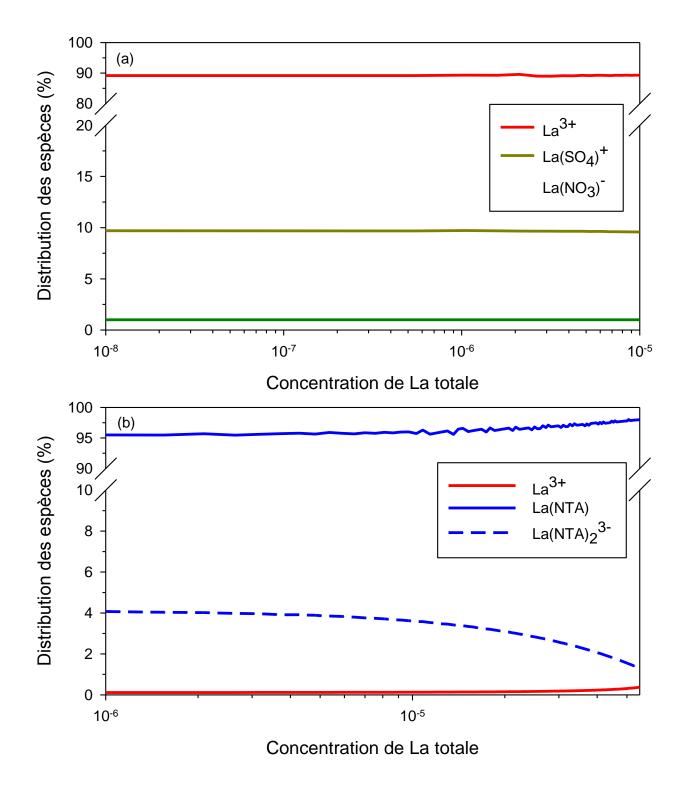


Figure C1 : Distribution des espèces majoritaires en solution en fonction de la concentration totale de lanthane en (a) absence de tampon et (b) en présence du tampon NTA $(8 \times 10^{-5} \text{ M})$.

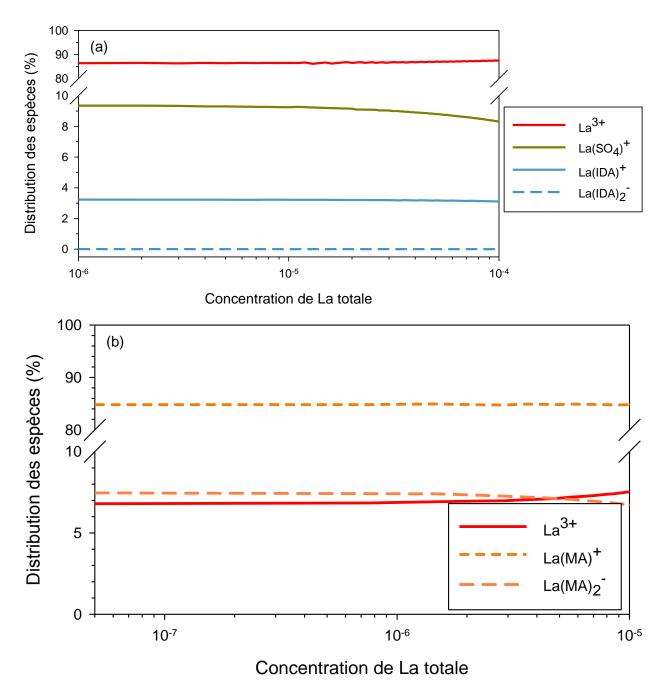


Figure C2 : Distribution des espèces majoritaires en solution en fonction de la concentration totale de lanthane en présence de tampon (a) IDA $(1\times10^{-4} \text{ M})$ et (b) Acide malique $(1\times10^{-4} \text{ M})$.

ANNEXE D

Les densités cellulaires relatives de l'expérience préliminaire (#1) après 120 h d'exposition ont été ajoutées aux densités cellulaires relatives de l'expérience finale (#2) présentée à la section 4.3. Une forte variation des témoins a été observée (200 000 ± 100 000 cellules mL⁻¹) lors de l'expérience préliminaire qui incluait trois témoins. Les densités cellulaires de l'expérience préliminaire ont donc été normalisées par la densité cellulaire moyenne des témoins de l'expérience finale afin d'obtenir une nouvelle densité cellulaire relative. Les résultats obtenus sont présentés à la figure d1.

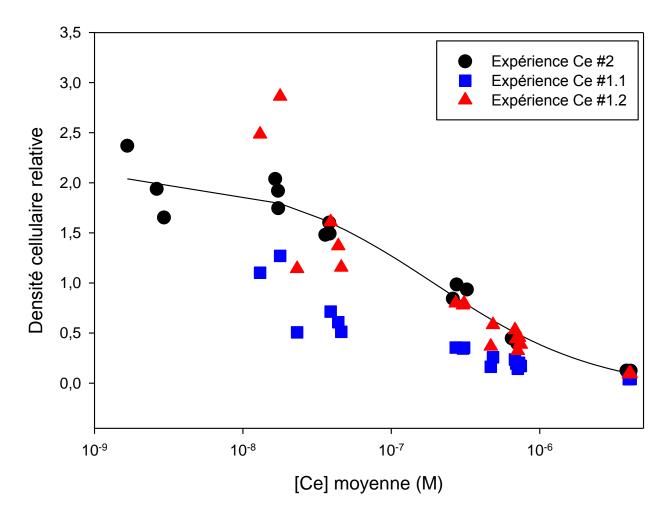


Figure D1: Densités cellulaires relatives aux témoins après 120 h d'exposition en fonction de la concentration moyenne de Ce mesurée en solution. Les triangles rouges (Ce #1.2) correspondent aux nouveaux points obtenus en normalisant les densités cellulaires par la moyenne des témoins de l'expérience finale (Ce #2).

ANNEXE E

Tableau E1 : Données expérimentales de l'exposition au lanthane en absence de tampon (section 3.3)

Échantillon	[Solution t ₀]	[Solution t] _f	[Moyenne] M	[lon libre] M	Densité cell. cells./mL	[Intracell.] ^a mol/cell.
Témoin 1	3,6×10 ⁻¹⁰	7,2×10 ⁻¹¹	2,2×10 ⁻¹⁰	-	97 200	<ld< th=""></ld<>
Témoin 2	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>90 800</th><th>4,5×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>90 800</th><th>4,5×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>90 800</th><th>4,5×10⁻¹⁹</th></ld<>	-	90 800	4,5×10 ⁻¹⁹
Témoin 3	<ld< th=""><th>3,6×10⁻¹¹</th><th>-</th><th>-</th><th>99 600</th><th>2,7×10⁻¹⁹</th></ld<>	3,6×10 ⁻¹¹	-	-	99 600	2,7×10 ⁻¹⁹
10 nM 1	9,3×10 ⁻⁹	5,9×10 ⁻⁹	7,6×10 ⁻⁹	6,8×10 ⁻⁹	101 080	1,9×10 ⁻¹⁸
10 nM 2	8,8×10 ⁻⁹	3,0×10 ⁻⁹	5,9×10 ⁻⁹	5,3×10 ⁻⁹	116 360	1,7×10 ⁻¹⁸
10 nM 3	9,6×10 ⁻⁹	6,4×10 ⁻⁹	8,0×10 ⁻⁹	7,1×10 ⁻⁹	87 840	1,5×10 ⁻¹⁸
50 nM 1	4,6×10 ⁻⁸	3,2×10 ⁻⁸	3,9×10 ⁻⁸	3,5×10 ⁻⁸	88 600	7,3×10 ⁻¹⁸
50 nM 2	4,4×10 ⁻⁸	2,9×10 ⁻⁸	3,6×10 ⁻⁸	3,3×10 ⁻⁸	99 920	5,9×10 ⁻¹⁸
50 nM 3	5,1×10 ⁻⁸	2,7×10 ⁻⁸	3,9×10 ⁻⁸	3,5×10 ⁻⁸	93 360	7,3×10 ⁻¹⁸
100 nM 1	9,3×10 ⁻⁸	6,4×10 ⁻⁸	7,9×10 ⁻⁸	7,0×10 ⁻⁸	97 080	1,2×10 ⁻¹⁷
100 nM 2	9,4×10 ⁻⁸	6,4×10 ⁻⁸	7,9×10 ⁻⁸	7,0×10 ⁻⁸	84 280	6,8×10 ⁻¹⁸
100 nM 3	9,8×10 ⁻⁸	6,8×10 ⁻⁸	8,3×10 ⁻⁸	7,4×10 ⁻⁸	107 400	1,4×10 ⁻¹⁹
500 nM 1	4,6×10 ⁻⁷	3,4×10 ⁻⁷	4,0×10 ⁻⁷	3,7×10 ⁻⁷	61 160	7,0×10 ⁻¹⁷
500 nM 2	4,6×10 ⁻⁷	3,2×10 ⁻⁷	3,9×10 ⁻⁷	3,5×10 ⁻⁷	70 040	5,0×10 ⁻¹⁷
500 nM 3	4,6×10 ⁻⁷	3,7×10 ⁻⁷	4,2×10 ⁻⁷	3,8×10 ⁻⁷	69 200	6,7×10 ⁻¹⁷
1 000 nM 1	9,4×10 ⁻⁷	8,0×10 ⁻⁷	8,7×10 ⁻⁷	8,0×10 ⁻⁷	39 040	1,1×10 ⁻¹⁶
1 000 nM 2	9,5×10 ⁻⁷	7,6×10 ⁻⁷	8,6×10 ⁻⁷	7,9×10 ⁻⁷	31 680	1,7×10 ⁻¹⁶
1 000 nM 3	9,3×10 ⁻⁷	7,9×10 ⁻⁷	8,6×10 ⁻⁷	8,0×10 ⁻⁷	48 420	7,8×10 ⁻¹⁷
5 000 nM 1	4,6×10 ⁻⁶	4,2×10 ⁻⁶	4,4×10 ⁻⁶	4,1×10 ⁻⁶	21 140	3,5×10 ⁻¹⁶
5 000 nM 2	4,6×10 ⁻⁶	4,4×10 ⁻⁶	4,5×10 ⁻⁶	4,1×10 ⁻⁶	24 720	2,4×10 ⁻¹⁶
5 000 nM 3	4,5×10 ⁻⁶	4,1×10 ⁻⁶	4,3×10 ⁻⁶	4,0×10 ⁻⁶	25 220	2,2×10 ⁻¹⁶

^a Données obtenues par la méthode de digestion 48 h HNO₃.

 $^{^{\}star}$ t_0 = temps initial, t_f = temps final.

Tableau E2 : Données expérimentales de l'exposition au lanthane en absence de tampon (section 3.7.2)

Échantillon	[Solution t ₀]	[Solution t _f]	[Moyenne] M	[lon libre] M	Densité cell. cells./mL	[Intracell.] mol/cell.
Témoin 1	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>143 840</th><th>-</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>143 840</th><th>-</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>143 840</th><th>-</th></ld<>	-	143 840	-
Témoin 2	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>140 020</th><th>-</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>140 020</th><th>-</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>140 020</th><th>-</th></ld<>	-	140 020	-
Témoin 3	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>140 560</th><th>-</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>140 560</th><th>-</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>140 560</th><th>-</th></ld<>	-	140 560	-
Témoin 4	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>147 240</th><th>-</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>147 240</th><th>-</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>147 240</th><th>-</th></ld<>	-	147 240	-
Témoin 5	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>273 480</th><th>-</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>273 480</th><th>-</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>273 480</th><th>-</th></ld<>	-	273 480	-
50 nM 1	1,5×10 ⁻⁸	4,8×10 ⁻⁹	9,9×10 ⁻⁹	8,8×10 ⁻⁹	120 200	4,6×10 ⁻¹⁸
50 nM 2	3,1×10 ⁻⁸	9,0×10 ⁻⁹	2,0×10 ⁻⁸	1,8×10 ⁻⁸	153 600	1,8×10 ⁻¹⁷
50 nM 3	3,2×10 ⁻⁸	1,0×10 ⁻⁸	2,1×10 ⁻⁸	1,9×10 ⁻⁸	167 900	8,6×10 ⁻¹⁸
100 nM 1	6,9×10 ⁻⁸	2,5×10 ⁻⁸	4,7×10 ⁻⁸	4,2×10 ⁻⁸	161 580	1,4×10 ⁻¹⁷
100 nM 2	6,9×10 ⁻⁸	2,3×10 ⁻⁸	4,6×10 ⁻⁸	4,1×10 ⁻⁸	136 280	1,4×10 ⁻¹⁷
100 nM 3	7,4×10 ⁻⁸	2,4×10 ⁻⁸	4,9×10 ⁻⁸	4,4×10 ⁻⁸	147 160	2,6×10 ⁻¹⁷
500 nM 1	5,3×10 ⁻⁷	3,1×10 ⁻⁷	4,2×10 ⁻⁷	3,8×10 ⁻⁷	99 500	8,5×10 ⁻¹⁷
500 nM 2	5,2×10 ⁻⁷	2,7×10 ⁻⁷	3,9×10 ⁻⁷	3,5×10 ⁻⁷	124 240	7,2×10 ⁻¹⁷
500 nM 3	5,0×10 ⁻⁷	2,7×10 ⁻⁷	3,8×10 ⁻⁷	3,4×10 ⁻⁷	88 900	7,9×10 ⁻¹⁷
1 000 nM 1	1,1×10 ⁻⁶	7,4×10 ⁻⁷	9,1×10 ⁻⁷	8,2×10 ⁻⁷	73 940	1,7×10 ⁻¹⁶
1 000 nM 2	1,1×10 ⁻⁶	7,6×10 ⁻⁷	9,4×10 ⁻⁷	8,4×10 ⁻⁷	56 080	1,7×10 ⁻¹⁶
1 000 nM 3	1,0×10 ⁻⁶	5,4×10 ⁻⁷	7,9×10 ⁻⁷	7,0×10 ⁻⁷	37 480	1,2×10 ⁻¹⁶
5 000 nM 1	6,7×10 ⁻⁶	5,9×10 ⁻⁶	6,3×10 ⁻⁶	5,6×10 ⁻⁶	23 680	3,1×10 ⁻¹⁶
5 000 nM 2	7,0×10 ⁻⁶	6,0×10 ⁻⁶	6,5×10 ⁻⁶	5,8×10 ⁻⁶	22 560	3,7×10 ⁻¹⁶
5 000 nM 3	7,0×10 ⁻⁶	5,6×10 ⁻⁶	6,3×10 ⁻⁶	5,6×10 ⁻⁶	18 680	5,1×10 ⁻¹⁶

 $^{^{\}star}$ t_0 = temps initial, t_f = temps final.

Tableau E3 : Données expérimentales de l'exposition au lanthane en présence de 10⁻⁴ M de NTA (section 3.4)

Échantillon	[Solution t ₀]	[Solution t _f]	[Moyenne] M	[lon libre] M	Densité cell. cells./mL	[Intracell.] mol/cell.
Témoin 1	<ld< th=""><th>6,2×10⁻¹⁰</th><th>-</th><th>-</th><th>419 133</th><th>2,5×10⁻¹⁹</th></ld<>	6,2×10 ⁻¹⁰	-	-	419 133	2,5×10 ⁻¹⁹
Témoin 2	<ld< th=""><th>6,1×10⁻¹⁰</th><th>-</th><th>-</th><th>379 067</th><th>2,9×10⁻¹⁹</th></ld<>	6,1×10 ⁻¹⁰	-	-	379 067	2,9×10 ⁻¹⁹
Témoin 3	<ld< th=""><th>5,7×10⁻¹⁰</th><th>-</th><th>-</th><th>410 600</th><th>4,5×10⁻¹⁹</th></ld<>	5,7×10 ⁻¹⁰	-	-	410 600	4,5×10 ⁻¹⁹
1 000 nM 1	9,8×10 ⁻⁷	9,5×10 ⁻⁷	9,6×10 ⁻⁷	8,6×10 ⁻¹⁰	448 800	1,6×10 ⁻¹⁸
1 000 nM 2	1,0×10 ⁻⁶	9,6×10 ⁻⁷	9,8×10 ⁻⁷	8,8×10 ⁻¹⁰	373 533	1,6×10 ⁻¹⁸
10 000 nM 1	9,4×10 ⁻⁶	9,4×10 ⁻⁶	9,4×10 ⁻⁶	9,3×10 ⁻⁹	431 600	7,4×10 ⁻¹⁸
10 000 nM 2	9,3×10 ⁻⁶	9,3×10 ⁻⁶	9,3×10 ⁻⁶	9,2×10 ⁻⁹	336 133	1,1×10 ⁻¹⁷
55 000 nM 1	5,2×10 ⁻⁵	5,1×10 ⁻⁵	5,2×10 ⁻⁵	1,0×10 ⁻⁷	378 333	6,7×10 ⁻¹⁷
55 000 nM 2	5,2×10 ⁻⁵	5,2×10 ⁻⁵	5,2×10 ⁻⁵	1,0×10 ⁻⁷	342 800	6,4×10 ⁻¹⁷

^{*} t_0 = temps initial, t_f = temps final.

Tableau E4 : Données expérimentales de l'exposition au lanthane en présence de 8.0×10^{-5} M de NTA (section 3.4)

Échantillon	[Solution t ₀]	[Solution t] _f	[Moyenne] M	[lon libre] M	Densité cell. cells./mL	[Intracell.] mol/cell.
Témoin 1	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>209 400</th><th>2,8×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>209 400</th><th>2,8×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>209 400</th><th>2,8×10⁻¹⁹</th></ld<>	-	209 400	2,8×10 ⁻¹⁹
Témoin 2	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>175 700</th><th>3,5×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>175 700</th><th>3,5×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>175 700</th><th>3,5×10⁻¹⁹</th></ld<>	-	175 700	3,5×10 ⁻¹⁹
Témoin 3	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>205 780</th><th>4,5×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>205 780</th><th>4,5×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>205 780</th><th>4,5×10⁻¹⁹</th></ld<>	-	205 780	4,5×10 ⁻¹⁹
1 000 nM 1	9,3×10 ⁻⁷	9,0×10 ⁻⁷	9,2×10 ⁻⁷	1,0×10 ⁻⁹	197 380	2,7×10 ⁻¹⁸
1 000 nM 2	9,4×10 ⁻⁷	8,0×10 ⁻⁷	8,7×10 ⁻⁷	9,9×10 ⁻¹⁰	196 020	2,2×10 ⁻¹⁸
1 000 nM 3	9,3×10 ⁻⁷	8,7×10 ⁻⁷	9,0×10 ⁻⁷	1,0×10 ⁻⁹	192 220	3,1×10 ⁻¹⁸
10 000 nM 1	9,2 × 10 ⁻⁶	9,0×10 ⁻⁶	9,1×10 ⁻⁶	1,2×10 ⁻⁸	177 320	1,5×10 ⁻¹⁷
10 000 nM 2	9,2×10 ⁻⁶	8,8×10 ⁻⁶	9,0×10 ⁻⁶	1,1×10 ⁻⁸	184 720	1,1×10 ⁻¹⁷
10 000 nM 3	9,2 × 10 ⁻⁶	9,1×10 ⁻⁶	9,2×10 ⁻⁶	1,2×10 ⁻⁸	178 660	1,6×10 ⁻¹⁷
55 000 nM 1	5,0×10 ⁻⁵	4,8×10 ⁻⁵	4,9×10 ⁻⁵	1,5×10 ⁻⁷	132 320	1,8×10 ⁻¹⁶
55 000 nM 2	5,0 × 10 ⁻⁵	5,1×10 ⁻⁵	5,0×10 ⁻⁵	1,6×10 ⁻⁷	134 800	1,3×10 ⁻¹⁶
55 000 nM 3	4,8×10 ⁻⁵	4,7×10 ⁻⁵	4,8×10 ⁻⁵	1,4×10 ⁻⁷	155 980	1,5×10 ⁻¹⁶

^{*} t_0 = temps initial, t_f = temps final.

Tableau E5 : Données expérimentales de l'exposition au lanthane en présence de 10⁻⁴ M d'IDA (section 3.5)

Échantillon	[Solution t ₀]	[Solution t _f]	[Moyenne] M	[lon libre] M	Densité cell. cells./mL
Témoin 1	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>194 520</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>194 520</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>194 520</th></ld<>	-	194 520
Témoin 2	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>214 680</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>214 680</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>214 680</th></ld<>	-	214 680
1 000 nM 1	8,9×10 ⁻⁷	6,8×10 ⁻⁷	7,8×10 ⁻⁷	6,8×10 ⁻⁷	116 220
1 000 nM 2	9,2×10 ⁻⁷	7,4×10 ⁻⁷	8,3×10 ⁻⁷	7,2×10 ⁻⁷	105 860
10 000 nM 1	9,5×10 ⁻⁶	8,6×10 ⁻⁶	9,0×10 ⁻⁶	7,8×10 ⁻⁶	18 740
10 000 nM 2	9,4×10 ⁻⁶	8,2×10 ⁻⁶	8,8×10 ⁻⁶	7,6×10 ⁻⁶	17 060
55 000 nM 1	4,7×10 ⁻⁵	4,9×10 ⁻⁵	4,8×10 ⁻⁵	4,2×10 ⁻⁵	6 300
55 000 nM 2	4,8×10 ⁻⁵	5,0×10 ⁻⁵	4,9×10 ⁻⁵	4,3×10 ⁻⁵	5 800
100 000 nM 1	8,7×10 ⁻⁵	8,8×10 ⁻⁵	8,8×10 ⁻⁵	7,7×10 ⁻⁵	7 120
100 000 nM 2	9,1×10 ⁻⁵	8,9×10 ⁻⁵	9,0×10 ⁻⁵	7,9×10 ⁻⁵	7 120

^{*} t_0 = temps initial, t_f = temps final.

Tableau E6 : Données expérimentales de l'exposition au lanthane en présence de 10⁻⁴ M d'acide malique (section 3.6)

Échantillon	[Solution t ₀]	[Solution t _f]	[Moyenne] M	[lon libre] M	Densité cell. cells./mL	[Intracell.] mol/cell.
Témoin 1	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>164 720</th><th>2,7×10⁻²⁰</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>164 720</th><th>2,7×10⁻²⁰</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>164 720</th><th>2,7×10⁻²⁰</th></ld<>	-	164 720	2,7×10 ⁻²⁰
Témoin 2	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>115 500</th><th>2,6×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>115 500</th><th>2,6×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>115 500</th><th>2,6×10⁻¹⁹</th></ld<>	-	115 500	2,6×10 ⁻¹⁹
Témoin 3	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>173 580</th><th>2,2×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>173 580</th><th>2,2×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>173 580</th><th>2,2×10⁻¹⁹</th></ld<>	-	173 580	2,2×10 ⁻¹⁹
Témoin 4	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>82 200</th><th>1,0×10⁻²³</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>82 200</th><th>1,0×10⁻²³</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>82 200</th><th>1,0×10⁻²³</th></ld<>	-	82 200	1,0×10 ⁻²³
Témoin 5	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>154 240</th><th>1,2×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>154 240</th><th>1,2×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>154 240</th><th>1,2×10⁻¹⁹</th></ld<>	-	154 240	1,2×10 ⁻¹⁹
Témoin 6	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>137 240</th><th><ld< th=""></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>137 240</th><th><ld< th=""></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>137 240</th><th><ld< th=""></ld<></th></ld<>	-	137 240	<ld< th=""></ld<>
50 nM 1	7,6×10 ⁻⁸	3,9×10 ⁻⁸	5,8×10 ⁻⁸	3,9×10 ⁻⁹	121 520	2,6×10 ⁻¹⁸
50 nM 2	7,5×10 ⁻⁸	5,2×10 ⁻⁸	6,3×10 ⁻⁸	4,3×10 ⁻⁹	106 200	2,6×10 ⁻¹⁸
50 nM 3	7,8×10 ⁻⁸	5,7×10 ⁻⁸	6,8×10 ⁻⁸	4,6×10 ⁻⁹	125 700	2,7×10 ⁻¹⁸
150 nM 1	1,3×10 ⁻⁷	8,2×10 ⁻⁸	1,0×10 ⁻⁷	6,7×10 ⁻⁹	124 000	6,0×10 ⁻¹⁸
150 nM 2	1,2×10 ⁻⁷	8,6×10 ⁻⁸	1,0×10 ⁻⁷	6,7×10 ⁻⁹	110 940	5,3×10 ⁻¹⁸
150 nM 3	1,2×10 ⁻⁷	6,0×10 ⁻⁸	8,9×10 ⁻⁸	6,0×10 ⁻⁹	145 480	5,2×10 ⁻¹⁸
500 nM 1	4,5×10 ⁻⁷	3,1×10 ⁻⁷	3,8×10 ⁻⁷	2,6×10 ⁻⁸	117 860	1,5×10 ⁻¹⁷
500 nM 2	4,4×10 ⁻⁷	3,6×10 ⁻⁷	4,0×10 ⁻⁷	2,7×10 ⁻⁸	106 720	2,7×10 ⁻¹⁸
500 nM 3	4,4×10 ⁻⁷	3,3×10 ⁻⁷	3,8×10 ⁻⁷	2,6×10 ⁻⁸	126 040	1,0×10 ⁻¹⁷
1 200 nM 1	1,0×10 ⁻⁶	9,3×10 ⁻⁷	9,7×10 ⁻⁷	6,6×10 ⁻⁸	95 360	1,2×10 ⁻¹⁶
1 200 nM 2	1,1×10 ⁻⁶	8,3×10 ⁻⁷	9,5×10 ⁻⁷	6,5×10 ⁻⁸	117 280	3,0×10 ⁻¹⁷
1 200 nM 3	1,1×10 ⁻⁶	8,6×10 ⁻⁷	9,8×10 ⁻⁷	6,7×10 ⁻⁸	115 900	3,2×10 ⁻¹⁷
3 500 nM 1	3,2×10 ⁻⁶	2,5×10 ⁻⁶	2,8×10 ⁻⁶	1,9×10 ⁻⁷	68 710	9,7×10 ⁻¹⁷
3 500 nM 2	3,1×10 ⁻⁶	2,8×10 ⁻⁶	2,9×10 ⁻⁶	2,0×10 ⁻⁷	74 160	1,1×10 ⁻¹⁶
3 500 nM 3	3,0×10 ⁻⁶	2,8×10 ⁻⁶	2,9×10 ⁻⁶	2,0×10 ⁻⁷	82 060	9,4×10 ⁻¹⁷
10 000 nM 1	9,4×10 ⁻⁶	7,8×10 ⁻⁶	8,6×10 ⁻⁶	6,3×10 ⁻⁷	34 100	3,0×10 ⁻¹⁶
10 000 nM 2	9,4×10 ⁻⁶	7,9×10 ⁻⁶	8,6×10 ⁻⁶	6,3×10 ⁻⁷	26 860	7,5×10 ⁻¹⁶
10 000 nM 3	9,2×10 ⁻⁶	8,6×10 ⁻⁶	8,9×10 ⁻⁶	6,6×10 ⁻⁷	23 080	5,3×10 ⁻¹⁶
40 000 nM 1	3,6×10 ⁻⁵	3,2×10 ⁻⁵	3,4×10 ⁻⁵	3,3×10 ⁻⁶	4 500	3,4×10 ⁻¹⁵
40 000 nM 2	3,6×10 ⁻⁵	3,2×10 ⁻⁵	3,4×10 ⁻⁵	3,3×10 ⁻⁶	6 120	2,3×10 ⁻¹⁵
40 000 nM 3	3,6×10 ⁻⁵	3,3×10 ⁻⁵	3,4×10 ⁻⁵	3,3×10 ⁻⁶	6 990	2,2×10 ⁻¹⁵
70 000 nM 1	5,6×10 ⁻⁵	6,0×10 ⁻⁵	5,8×10 ⁻⁵	7,7×10 ⁻⁶	7 950	2,4×10 ⁻¹⁵
70 000 nM 2	6,0×10 ⁻⁵	5,8×10 ⁻⁵	5,9×10 ⁻⁵	8,0×10 ⁻⁶	5 510	4,6×10 ⁻¹⁵
70 000 nM 3	5,9×10 ⁻⁵	5,5×10 ⁻⁵	5,7×10 ⁻⁵	7,5×10 ⁻⁶	4 650	2,3×10 ⁻¹⁵

^{*} t_0 = temps initial, t_f = temps final.

Tableau E7 : Données expérimentales de l'exposition au lanthane à concentration variable en calcium et en présence de 10^{-4} M dacide malique (section 3.8)

Échantillon	[Solution t ₀]	[Solution t _f]	[Moyenne] M	[lon libre] M	Densité cell. cells./mL	[Intracell.] mol/cell.
10 ⁻⁶ M 1	4,3×10 ⁻⁶	3,8×10 ⁻⁶	4,1×10 ⁻⁶	2,3×10 ⁻⁷	61 210	4,1×10 ⁻¹⁶
10 ⁻⁶ M 2	4,4×10 ⁻⁶	4,0×10 ⁻⁶	4,2×10 ⁻⁶	2,4×10 ⁻⁷	54 690	5,1×10 ⁻¹⁶
10 ⁻⁶ M 3	4,3×10 ⁻⁶	3,9×10 ⁻⁶	4,1×10 ⁻⁶	2,3×10 ⁻⁷	56 420	5,0×10 ⁻¹⁶
10 ⁻⁶ M 4	4,2×10 ⁻⁶	3,8×10 ⁻⁶	4,0×10 ⁻⁶	2,3×10 ⁻⁷	59 750	5,2×10 ⁻¹⁶
10 ⁻⁶ M 5	4,2×10 ⁻⁶	4,0×10 ⁻⁶	4,1×10 ⁻⁶	2,3×10 ⁻⁷	27 580	1,0×10 ⁻¹⁵
6,8×10 ⁻⁵ M 1	4,4×10 ⁻⁶	3,9×10 ⁻⁶	4,1×10 ⁻⁶	2,4×10 ⁻⁷	94 960	1,9×10 ⁻¹⁶
6,8×10 ⁻⁵ M 2	4,3×10 ⁻⁶	3,8×10 ⁻⁶	4,0×10 ⁻⁶	2,3×10 ⁻⁷	121 820	1,5×10 ⁻¹⁶
6,8×10 ⁻⁵ M 3	4,4×10 ⁻⁶	4,0×10 ⁻⁶	4,2×10 ⁻⁶	2,4×10 ⁻⁷	102 800	2,4×10 ⁻¹⁶
6,8×10 ⁻⁵ M 4	4,3×10 ⁻⁶	3,9×10 ⁻⁶	4,1×10 ⁻⁶	2,4×10 ⁻⁷	98 400	2,0×10 ⁻¹⁶
6,8×10 ⁻⁵ M 5	4,2×10 ⁻⁶	3,4×10 ⁻⁶	3,8×10 ⁻⁶	2,2×10 ⁻⁷	9 660	3,3×10 ⁻¹⁵
10 ⁻³ M 1	4,3×10 ⁻⁶	4,0×10 ⁻⁶	4,2×10 ⁻⁶	3,1×10 ⁻⁷	180 840	3,7×10 ⁻¹⁷
10 ⁻³ M 2	4,3×10 ⁻⁶	4,1×10 ⁻⁶	4,2×10 ⁻⁶	3,2×10 ⁻⁷	124 000	5,2×10 ⁻¹⁷
10 ⁻³ M 3	4,3×10 ⁻⁶	4,1×10 ⁻⁶	4,2×10 ⁻⁶	3,1×10 ⁻⁷	101 480	6,0×10 ⁻¹⁷
10 ⁻³ M 4	2,8×10 ⁻⁶	4,1×10 ⁻⁶	3,5×10 ⁻⁶	3,2×10 ⁻⁷	108 480	5,8×10 ⁻¹⁷
10 ⁻³ M 5	4,2×10 ⁻⁶	3,9×10 ⁻⁶	4,1×10 ⁻⁶	3,0×10 ⁻⁷	129 160	6,6×10 ⁻¹⁷

^{*} t_0 = temps initial, t_f = temps final.

ANNEXE F

Tableau F1 : Données expérimentales de l'exposition au cérium en absence de tampon (4.3)

Échantillon	[Solution t ₀]	[Solution t _f]	[Moyenne] M	[lon libre] M	Densité cell. cells./mL	[Intracell.] mol/cell.
Témoin 1	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>97 800</th><th>1,1×10⁻¹⁸</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>97 800</th><th>1,1×10⁻¹⁸</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>97 800</th><th>1,1×10⁻¹⁸</th></ld<>	-	97 800	1,1×10 ⁻¹⁸
Témoin 2	<ld< th=""><th>1,3×10⁻¹⁰</th><th>-</th><th>-</th><th>115 840</th><th>1,8×10⁻¹⁸</th></ld<>	1,3×10 ⁻¹⁰	-	-	115 840	1,8×10 ⁻¹⁸
Témoin 3	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>99 840</th><th>1,2×10⁻¹⁸</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>99 840</th><th>1,2×10⁻¹⁸</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>99 840</th><th>1,2×10⁻¹⁸</th></ld<>	-	99 840	1,2×10 ⁻¹⁸
Témoin 4	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>82 380</th><th>1,3×10⁻¹⁸</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>82 380</th><th>1,3×10⁻¹⁸</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>82 380</th><th>1,3×10⁻¹⁸</th></ld<>	-	82 380	1,3×10 ⁻¹⁸
Témoin 5	<ld< th=""><th>9,0×10⁻¹⁰</th><th>-</th><th>-</th><th>79 320</th><th>1,3×10⁻¹⁸</th></ld<>	9,0×10 ⁻¹⁰	-	-	79 320	1,3×10 ⁻¹⁸
10 nM 1	3,1×10 ⁻⁹	2,2×10 ⁻¹⁰	1,7×10 ⁻⁹	1,5×10 ⁻⁹	225 180	1,9×10 ⁻¹⁸
10 nM 2	4,7×10 ⁻⁹	1,2×10 ⁻⁹	2,9×10 ⁻⁹	2,6×10 ⁻⁹	157 080	3,5×10 ⁻¹⁸
10 nM 3	4,7×10 ⁻⁹	5,4×10 ⁻¹⁰	2,6×10 ⁻⁹	2,3×10 ⁻⁹	184 200	6,5×10 ⁻¹⁸
50 nM 1	2,9×10 ⁻⁸	5,0×10 ⁻⁹	1,7×10 ⁻⁸	1,5×10 ⁻⁸	182 420	2,0×10 ⁻¹⁷
50 nM 2	2,8×10 ⁻⁸	4,8×10 ⁻⁹	1,7×10 ⁻⁸	1,5×10 ⁻⁸	193 620	1,4×10 ⁻¹⁷
50 nM 3	2,8 x 10 ⁻⁸	6,3×10 ⁻⁹	1,7×10 ⁻⁸	1,5×10 ⁻⁸	165 860	1,7×10 ⁻¹⁷
100 nM 1	6,1×10 ⁻⁸	1,5×10 ⁻⁸	3,8×10 ⁻⁸	3,4×10 ⁻⁸	152 280	3,0×10 ⁻¹⁷
100 nM 2	5,6×10 ⁻⁸	1,6×10 ⁻⁸	3,6×10 ⁻⁸	3,2×10 ⁻⁸	140 720	3,2×10 ⁻¹⁷
100 nM 3	6,1×10 ⁻⁸	1,6×10 ⁻⁸	3,8×10 ⁻⁸	3,4×10 ⁻⁸	141 820	4,5×10 ⁻¹⁷
500 nM 1	3,7×10 ⁻⁷	1,8×10 ⁻⁷	2,8×10 ⁻⁷	2,5×10 ⁻⁷	93 560	1,9×10 ⁻¹⁶
500 nM 2	2,8×10 ⁻⁷	2,4×10 ⁻⁷	2,6×10 ⁻⁷	2,3×10 ⁻⁷	80 060	2,1×10 ⁻¹⁶
500 nM 3	4,0×10 ⁻⁷	2,5×10 ⁻⁷	3,2×10 ⁻⁷	2,9×10 ⁻⁷	88 780	2,0×10 ⁻¹⁶
1 000 nM 1	8,4×10 ⁻⁷	5,8×10 ⁻⁷	7,1×10 ⁻⁷	6,3×10 ⁻⁷	37 590	4,4×10 ⁻¹⁶
1 000 nM 2	7,5×10 ⁻⁷	5,5×10 ⁻⁷	6,5×10 ⁻⁷	5,8×10 ⁻⁷	42 430	4,7×10 ⁻¹⁶
1 000 nM 3	8,4×10 ⁻⁷	5,8×10 ⁻⁷	7,1×10 ⁻⁷	6,3×10 ⁻⁷	40 450	5,3×10 ⁻¹⁶
5 0000 nM 1	4,2×10 ⁻⁶	3,5×10 ⁻⁶	3,8×10 ⁻⁶	3,4×10 ⁻⁶	11 880	2,2×10 ⁻¹⁵
5 000 nM 2	4,1×10 ⁻⁶	3,8×10 ⁻⁶	3,9×10 ⁻⁶	3,5×10 ⁻⁶	10 390	2,3×10 ⁻¹⁵
5 000 nM 3	4,4×10 ⁻⁶	3,8×10 ⁻⁶	4,1×10 ⁻⁶	3,7×10 ⁻⁶	11 760	1,9×10 ⁻¹⁵

^{*} t_0 = temps initial, t_f = temps final.

Tableau F2 : Données expérimentales de l'exposition au cérium en présence de 10⁻⁴ M d'acide malique (4.4)

Échantillon	[Solution t₀] M	[Solution t _f]	[Moyenne] M	[lon libre] M	Densité cell. cells./mL	[Intracell.] mol/cell.
Témoin 1	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>94 560</th><th>1,3×10⁻¹⁸</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>94 560</th><th>1,3×10⁻¹⁸</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>94 560</th><th>1,3×10⁻¹⁸</th></ld<>	-	94 560	1,3×10 ⁻¹⁸
Témoin 2	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>75 200</th><th><ld< th=""></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>75 200</th><th><ld< th=""></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>75 200</th><th><ld< th=""></ld<></th></ld<>	-	75 200	<ld< th=""></ld<>
Témoin 3	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>83 420</th><th><ld< th=""></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>83 420</th><th><ld< th=""></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>83 420</th><th><ld< th=""></ld<></th></ld<>	-	83 420	<ld< th=""></ld<>
Témoin 4	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>94 720</th><th><ld< th=""></ld<></th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>94 720</th><th><ld< th=""></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>94 720</th><th><ld< th=""></ld<></th></ld<>	-	94 720	<ld< th=""></ld<>
Témoin 5	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>83 320</th><th>1,5×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>83 320</th><th>1,5×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>83 320</th><th>1,5×10⁻¹⁹</th></ld<>	-	83 320	1,5×10 ⁻¹⁹
Témoin 6	<ld< th=""><th><ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>102 160</th><th>2,4×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th><ld< th=""><th>-</th><th>102 160</th><th>2,4×10⁻¹⁹</th></ld<></th></ld<>	<ld< th=""><th>-</th><th>102 160</th><th>2,4×10⁻¹⁹</th></ld<>	-	102 160	2,4×10 ⁻¹⁹
50 nM 1	3,6×10 ⁻⁸	2,0×10 ⁻⁸	2,8×10 ⁻⁸	1,2×10 ⁻⁹	89 380	4,3×10 ⁻¹⁸
50 nM 2	4,3×10 ⁻⁸	2,5×10 ⁻⁸	3,4×10 ⁻⁸	1,5×10 ⁻⁹	95 240	5,4×10 ⁻¹⁸
50 nM 3	3,5×10 ⁻⁸	2,3×10 ⁻⁸	2,9×10 ⁻⁸	1,2×10 ⁻⁹	102 040	4,1×10 ⁻¹⁸
150 nM 1	1,3×10 ⁻⁷	8,0×10 ⁻⁸	1,0×10 ⁻⁷	4,3×10 ⁻⁹	76 720	6,5×10 ⁻¹⁸
150 nM 2	1,1×10 ⁻⁷	7,2×10 ⁻⁸	9,2×10 ⁻⁸	3,9×10 ⁻⁹	84 800	1,1×10 ⁻¹⁷
150 nM 3	1,1×10 ⁻⁷	2,8×10 ⁻⁸	7,0×10 ⁻⁸	3,0×10 ⁻⁹	88 220	1,4×10 ⁻¹⁷
500 nM 1	4,3×10 ⁻⁷	5,1×10 ⁻⁷	4,7×10 ⁻⁷	2,0×10 ⁻⁸	57 380	5,4×10 ⁻¹⁷
500 nM 2	4,3×10 ⁻⁷	3,4×10 ⁻⁷	3,9×10 ⁻⁷	1,7×10⁻ ⁸	107 100	3,4×10 ⁻¹⁷
500 nM 3	3,8×10 ⁻⁷	2,3×10 ⁻⁷	3,1×10 ⁻⁷	1,3×10 ⁻⁸	104 580	2,8×10 ⁻¹⁷
1 200 nM 1	9,5×10 ⁻⁷	7,2×10 ⁻⁷	8,3×10 ⁻⁷	3,6×10 ⁻⁸	76 960	1,1×10 ⁻¹⁶
1 200 nM 2	1,0×10 ⁻⁶	7,7×10 ⁻⁷	8,8×10 ⁻⁷	3,8×10 ⁻⁸	78 300	9,7×10 ⁻¹⁷
1 200 nM 3	9,9×10 ⁻⁷	7,8×10 ⁻⁷	8,8×10 ⁻⁷	3,8×10 ⁻⁸	80 960	8,0×10 ⁻¹⁷
3 500 nM 1	3,1×10 ⁻⁶	2,5×10 ⁻⁶	2,8×10 ⁻⁶	1,2×10 ⁻⁷	68 020	1,7×10 ⁻¹⁶
3 500 nM 2	3,1×10 ⁻⁶	2,6×10 ⁻⁶	2,9×10 ⁻⁶	1,3×10 ⁻⁷	67 490	2,3×10 ⁻¹⁶
3 500 nM 3	3,1×10 ⁻⁶	2,8×10 ⁻⁶	3,0×10 ⁻⁶	1,3×10 ⁻⁷	76 430	1,8×10 ⁻¹⁶
10 000 nM 1	1,0×10 ⁻⁵	8,7×10 ⁻⁶	9,4×10 ⁻⁶	4,4×10 ⁻⁷	27 700	9,2×10 ⁻¹⁶
10 000 nM 2	1,0×10 ⁻⁵	7,9×10 ⁻⁶	9,1×10 ⁻⁶	4,2×10 ⁻⁷	27 130	8,4×10 ⁻¹⁶
10 000 nM 3	1,0×10 ⁻⁵	8,3×10 ⁻⁶	9,2×10 ⁻⁶	4,3×10 ⁻⁷	33 230	8,8×10 ⁻¹⁶
40 000 nM 1	3,8×10 ⁻⁵	3,7×10 ⁻⁵	3,7×10 ⁻⁵	2,3×10 ⁻⁶	7 240	2,7×10 ⁻¹⁵
40 000 nM 2	4,0×10 ⁻⁵	3,3×10 ⁻⁵	3,7×10 ⁻⁵	2,3×10 ⁻⁶	6 730	4,0×10 ⁻¹⁵
40 000 nM 3	4,1×10 ⁻⁵	3,3×10⁻⁵	3,7×10 ⁻⁵	2,3×10 ⁻⁶	5 290	4,6×10 ⁻¹⁵
70 000 nM 1	6,8×10 ⁻⁵	5,3×10 ⁻⁵	6,1×10 ⁻⁵	5,4×10 ⁻⁶	2 330	7,1×10 ⁻¹⁵
70 000 nM 2	6,6×10 ⁻⁵	5,3×10 ⁻⁵	5,9×10 ⁻⁵	5,1×10 ⁻⁶	3 810	5,4×10 ⁻¹⁵
70 000 nM 3	6,7×10 ⁻⁵	5,0×10 ⁻⁵	5,9×10 ⁻⁵	5,1×10 ⁻⁶	4 310	8,5×10 ⁻¹⁵

 $^{^{\}star}$ t_0 = temps initial, t_f = temps final.

Tableau F3 : Données expérimentales de l'exposition au lanthane à concentration variable en calcium et en présence de 10^{-4} M d'acide malique (4.6)

Échantillon	[Solution t ₀]	[Solution t _f]	[Moyenne] M	[lon libre] M	Densité cell. cells./mL	[Intracell.] mol/cell.
10 ⁻⁶ M 1	5,2×10 ⁻⁶	4,8×10 ⁻⁶	5,0×10 ⁻⁶	2,0×10 ⁻⁷	41 910	6,4×10 ⁻¹⁶
10 ⁻⁶ M 2	5,3×10 ⁻⁶	4,9×10 ⁻⁶	5,1×10 ⁻⁶	2,0×10 ⁻⁷	43 370	6,2×10 ⁻¹⁶
10 ⁻⁶ M 3	5,0×10 ⁻⁶	5,1×10 ⁻⁶	5,0×10 ⁻⁶	2,0×10 ⁻⁷	45 840	5,7×10 ⁻¹⁶
10 ⁻⁶ M 4	5,3×10 ⁻⁶	4,9×10 ⁻⁶	5,1×10 ⁻⁶	2,0×10 ⁻⁷	40 210	5,8×10 ⁻¹⁶
10 ⁻⁶ M 5	5,2×10 ⁻⁶	4,9×10 ⁻⁶	5,0×10 ⁻⁶	2,0×10 ⁻⁷	33 050	6,4×10 ⁻¹⁶
6,8×10 ⁻⁵ M 1	5,2×10 ⁻⁶	4,8×10 ⁻⁶	5,0×10 ⁻⁶	2,0×10 ⁻⁷	82 840	2,7×10 ⁻¹⁶
6,8×10 ⁻⁵ M 2	5,1×10 ⁻⁶	5,0×10 ⁻⁶	5,1×10 ⁻⁶	2,0×10 ⁻⁷	79 100	2,7×10 ⁻¹⁶
6,8×10 ⁻⁵ M 3	5,0×10 ⁻⁶	5,1×10 ⁻⁶	5,0×10 ⁻⁶	2,0×10 ⁻⁷	82 100	2,7×10 ⁻¹⁶
6,8×10 ⁻⁵ M 4	5,2×10 ⁻⁶	5,1×10 ⁻⁶	5,1×10 ⁻⁶	2,0×10 ⁻⁷	101 360	2,3×10 ⁻¹⁶
6,8×10 ⁻⁵ M 5	5,1×10 ⁻⁶	4,8×10 ⁻⁶	5,0×10 ⁻⁶	2,0×10 ⁻⁷	61 840	3,8×10 ⁻¹⁶
10 ⁻³ M 1	5,0×10 ⁻⁶	4,9×10 ⁻⁶	5,0×10 ⁻⁶	2,5×10 ⁻⁷	121 640	8,1×10 ⁻¹⁷
10 ⁻³ M 2	5,2×10 ⁻⁶	5,0×10 ⁻⁶	5,1×10 ⁻⁶	2,5×10 ⁻⁷	118 740	8,9×10 ⁻¹⁷
10 ⁻³ M 3	5,3×10 ⁻⁶	5,1×10 ⁻⁶	5,2×10 ⁻⁶	2,6×10 ⁻⁷	130 160	9,4×10 ⁻¹⁷
10 ⁻³ M 4	5,2×10 ⁻⁶	5,1×10 ⁻⁶	5,1×10 ⁻⁶	2,6×10 ⁻⁷	142 720	7,5×10 ⁻¹⁷
10 ⁻³ M 5	5,1×10 ⁻⁶	5,2×10 ⁻⁶	5,2×10 ⁻⁶	2,6×10 ⁻⁷	121 380	9,8×10 ⁻¹⁷

^{*} t_0 = temps initial, t_f = temps final.