Institut National de la Recherche Scientifique

INRS-Eau, Terre et Environnement

# ÉTUDE DES EFFETS DE L'ALUMINIUM SUR L'ALGUE VERTE *CHLORELLA PYRENOIDOSA* DANS DES MILIEUX D'EXPOSITION CONTENANT DES FLUORURES

Par

Gérald Côté

Mémoire présenté

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

Jury d'évaluation

| | |
|---|---|
| Examinateur externe | François Caron<br>Université Laurentienne |
| Examinateur interne | Isabelle Laurion<br>INRS-ETE |
| Directeur de recherche | Peter G.C. Campbell<br>INRS-ETE |

©droits réservés de Gérald Côté, 2003

« Rien de grand ne se fait sans passion. »

- Friedrich Hegel

© Gérald Côté 2003

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, M. Peter Campbell, pour son expertise et son professionnalisme qui ont été déterminants dans le cheminement de mes travaux. Malgré son horaire assez chargé, il a su trouver le temps pour répondre à mes questions et pour me donner certaines suggestions sur les tâches à réaliser. En plus de mon directeur, merci à tout le personnel de l'INRS, au Complexe Scientifique, pour leur patience et leur aide précieuse.

Je veux aussi remercier un ami, Amiel Boullemant, qui m'a beaucoup aidé dans mon apprentissage dans le monde de la chimie analytique et dans toutes les facettes de mon travail. Sans sa disponibilité et sa compétence, je n'aurais pas pu terminer ce projet de recherche. En plus de cet ami et collègue de travail, je tiens à remercier un groupe d'amis(ies) qui m'a permis de vivre de très beaux moments à Québec depuis trois ans (Anne Gosselin, Renaud Patry, François Bilodeau, Alexandre Poulain, Patrice Tremblay, Gillaume Dufresne, Claire Adam, Céline Porcher, Marina Mourot, Karine Gingras, Karelle Bergeron et Annie Larochelle).

Aussi, je veux dire un gros merci à ma famille sans qui je n'aurais pas pu réaliser ces études, je vous remercie grandement pour vos encouragements et votre amour inconditionnel. Enfin, je te remercie Geneviève d'être là et de m'encourager dans les moments difficiles.

# RÉSUMÉ

Pour un bassin versant situé sur le Bouclier canadien et soumis à des précipitations acides, on note souvent une mobilisation des métaux du milieu terrestre vers le milieu aquatique (Mn, Zn et surtout Al). Cette mise en circulation est généralement de nature épisodique, suite à des événements hydrologiques particuliers (ex. : fonte de la neige, crue automnale). Au Québec, le phénomène est le même, puisqu'on note une augmentation des concentrations en aluminium dissous au printemps dans l'eau des rivières à saumons. D'après des mesures expérimentales réalisées en laboratoire ainsi que des calculs thermodynamiques, les formes prédominantes de l'aluminium dans les cours d'eau pendant cette période critique sont les fluoro-complexes d'aluminium ($AlF^{2+}$ et $AlF_2^+$). Il importe alors de déterminer la toxicité de ces complexes pour les organismes aquatiques.

Selon le modèle de l'ion libre, approche couramment employée pour prédire la toxicité des métaux dissous, les fluoro-complexes d'aluminium ne devraient pas s'avérer toxiques. Cependant, des recherches réalisées à l'INRS-Eau sur le saumon atlantique (juvénile) ont démontré que ces complexes pouvaient contribuer à la réponse toxique de l'aluminium. L'objectif du présent projet était donc de vérifier si cette conclusion s'applique à d'autres cibles aquatiques, en l'occurrence le phytoplancton d'eau douce. Pour évaluer la toxicité des complexes Al-$F_n$, on a suivi leur effet sur la croissance de l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa*. Ces expériences ont été réalisées en milieux synthétiques définis (variables = $[Al_T]$ et $[F_T]$), en contrôlant le pH à 5.5 et la spéciation du métal dans le milieu d'exposition. De plus, la cinétique de bioaccumulation de l'aluminium en présence de fluorures a été suivie pendant des périodes de temps variables (i.e., 0, 25, 50 et 90 minutes), dans des conditions où les concentrations en aluminium et en fluorures variaient (0 à 1.6 µM pour l'Al et 0 à 5 µM pour les F).

Les résultats obtenus ont confirmé que l'aluminium était très toxique pour l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa*. En ajoutant conjointement de l'aluminium et des fluorures pour que la concentration de l'ion libre $Al^{3+}$ reste constante dans tous les traitements, les résultats ont montré que les fluoro-complexes d'aluminium pouvaient avoir un effet toxique (i.e., diminution de croissance) sur *Chlorella* aux plus fortes concentrations appliquées (1.6 µM d'Al et 5 µM de F), mais pas aux concentrations intermédiaires. Ces résultats représentent une exception au modèle de l'ion libre. Dans des conditions donnant lieu à une toxicité accrue de l'aluminium (i.e., présence de fortes concentrations en aluminium et en fluorure), les résultats de prise en charge ne montrent pas davantage d'accumulation de l'aluminium. Cependant, le dosage même de l'aluminium bio-accumulé s'est avéré difficile, avec une variabilité analytique appréciable; de faibles augmentations dans la prise en charge de l'aluminium en présence des fluorures auraient été difficiles à détecter.

Les résultats de cette étude montrent donc que les fluoro-complexes d'aluminium peuvent être toxiques sur l'algue, mais seulement à la concentration la plus élevée en aluminium (1.6 µM) et en fluorures (5 µM). Il semble y avoir un seuil d'effet de toxicité pour les fluoro-complexes d'aluminium, c'est-à-dire qu'en dessous d'une certaine concentration en Al et en F complexés, il n'y a pas de toxicité mesurable autre que celle de l'ion libre. Ces résultats contredisent le modèle de l'ion libre, mais on ne peut pas conclure sur les mécanismes de toxicité de ces complexes, que ce soit via des réactions de complexation à la surface des algues ou plutôt via la prise en charge intracellulaire simultanée de l'aluminium et du fluorure.

Gérald Côté (Étudiant)

P.G.C. Campbell (Directeur de Recherche)

# TABLE DES MATIÈRES

**REMERCIEMENTS** ..... **III**
**RÉSUMÉ** ..... **V**
**TABLE DES MATIÈRES** ..... **VII**
**LISTE DES TABLEAUX** ..... **XI**
**LISTE DES FIGURES** ..... **XIII**
**LISTE DES ABBRÉVIATIONS** ..... **XV**
**CHAPITRE 1: INTODUCTION** ..... **1**
1.1 PROBLÉMATIQUE ..... 1
*1.1.1 Précipitations acides : lessivage d'aluminium dans les cours d'eau* ..... *1*
*1.1.2 Alumineries : rejet d'aluminium et de fluorures* ..... *1*
1.2 SPÉCIATION DE L'ALUMINIUM ..... 2
*1.2.1 Spéciation de l'aluminium en fonction du pH* ..... *2*
*1.2.2 Complexes impliquant l'aluminium* ..... *3*
*1.2.3 Affinité de l'aluminium pour le fluorure à pH 5.5* ..... *4*
1.3 INTERACTIONS MÉTAUX-ALGUES (MODÈLE DE L'ION LIBRE) ..... 5
1.4 ASPECTS TOXICOLOGIQUES ..... 7
*1.4.1 Toxicité de l'aluminium seul* ..... *7*
*1.4.2 Toxicité du fluorure seul* ..... *8*
*1.4.3 Toxicité des fluoro-complexes d'aluminium* ..... *9*
1.4.3.1 Revue de la littérature: pas de consensus ..... 9
1.4.3.2 Cas des saumons Atlantique juvéniles ..... 10
1.5 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES À TESTER ..... 11
**CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES** ..... **13**
2.1 ORGANISME À L'ÉTUDE ..... 13
*2.1.1 Caractéristiques générales* ..... *13*
*2.1.2 Choix de cette algue* ..... *13*
2.2 PRODUITS, RÉACTIFS ET EAU ULTRA-PURE ..... 14
2.3 MILIEU DE CULTURE UTILISÉ ..... 14
*2.3.1 Composition chimique du milieu* ..... *14*
*2.3.2 Méthodes* ..... *15*
2.4 CALCULS THÉORIQUES ..... 16
*2.4.1 Modèle MINEQL +* ..... *16*
*2.4.2 Milieux d'exposition* ..... *17*
2.5 BIODISPONIBILITÉ DE L'ALUMINIUM ..... 18

2.6 PARTIE A : TOXICITÉ DES FLUORO-COMPLEXES D'ALUMINIUM ..... 19
*2.6.1 Culture des algues* ..... *19*
*2.6.2 Filtration des algues* ..... *20*
*2.6.3 Préparation des milieux d'exposition* ..... *20*
*2.6.4 Exposition des algues et mesure journalière de la biomasse* ..... *20*
*2.6.5 Dosage de l'$Al_{mono\ total}$ et l'$Al_{mono\ organique}$ à l'ICP-AES* ..... *21*
*2.6.6 Résine échangeuse d'ions* ..... *21*
2.7 PARTIE B : PRISE EN CHARGE DE L'ALUMINIUM EN PRÉSENDE DE FLUORURES ..... 24
*2.7.1 Culture des algues* ..... *24*
*2.7.2 Centrifugation des algues* ..... *24*
*2.7.3 Préparation des milieux d'exposition* ..... *25*
*2.7.4 Exposition des algues* ..... *25*
*2.7.5 Récolte et traitement à l'EDTA* ..... *25*
*2.7.6 Digestion des algues à l'acide nitrique ($HNO_3$ 70%)* ..... *25*
*2.7.7 Dosage de l'$Al_{total}$ et de l'$Al_{cellulaire}$ à l'ICP-AES* ..... *26*
2.8 ANALYSES STATISTIQUES ..... 26
**CHAPITRE 3: RÉSULTATS ..... 27**
3.1 COURBES DE CROISSANCE OBTENUES AVEC *CHLORELLA PYRENOIDOSA* ..... 27
3.2 PARTIE A : TOXICITÉ DES FLUORO-COMPLEXES D'ALUMINIUM ..... 30
*3.2.1 Expériences avec aluminium seul* ..... *30*
*3.2.2 Expériences avec aluminium et fluorures* ..... *31*
*3.2.3 Conditions expérimentales durant l'exposition (jour 0 et jour 4)* ..... *33*
3.3 PARTIE B : PRISE EN CHARGE DE L'ALUMINIUM EN PRÉSENCE DE FLUORURES ..... 36
*3.3.1 Expériences avec aluminium seul* ..... *36*
*3.3.2 Expériences avec aluminium et fluorures* ..... *38*
**CHAPITRE 4: DISCUSSION ..... 43**
4.1 ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES ..... 43
4.2 COMPARAISON DES RÉSULTATS AVEC LA LITTÉRATURE ..... 44
*4.2.1 Partie A : Toxicité des fluoro-complexes d'aluminium* ..... *44*
4.2.1.1 Expériences avec aluminium seul ..... 45
4.2.1.2 Expériences avec aluminium et fluorures ..... 49
*4.2.2 Conditions expérimentales durant l'exposition* ..... *50*
*4.2.3 Partie B : Prise en charge de l'aluminium en présence de fluorures* ..... *53*
4.2.3.1 Expériences avec aluminium seul ..... 53
4.2.3.2 Expériences avec aluminium et fluorures ..... 55
4.3 APPLICABILITÉ OU NON DU MODÈLE DE L'ION LIBRE (LIGANDS INORGANIQUES ET ORGANIQUES MONO). 57
**5. CONCLUSIONS ..... 59**
**6. PERSCEPTIVES D'AVENIR ..... 61**

**7. RÉFÉRENCES** ..... **63**
**8.ANNEXES** ..... **69**
8.1 SIMULATIONS MINEQL+ ..... 69
8.2 TAUX DE CROISSANCE MOYEN ..... 70
8.3 CONCENTRATION D'ALUMINIUM DANS LES TÉMOINS ..... 70

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Composition du milieu de culture AAP (Algal Assay Procedure) modifié par Chiaudani et Vighi (1978). ..... 16

Tableau 2.2 : Conditions expérimentales utilisées lors des différentes expériences. ..... 18

Tableau 3.1 : Numéro d'expérience pour chacune des figures du projet ..... 29

Tableau 3.2 : Résultats du dosage de l'aluminium total, organique et inorganique au début et à la fin des expériences de la partie A : Toxicité de l'aluminium avec et sans fluorures. ..... 33

Tableau 3.3 : Tableau récapitulatif des statistiques de la figure 3.7 pour les jours 2, 3 et 4. Les différences significatives entre deux points ($P < 0,05$) sont représentées par *, celles non-significatives par X. ..... 35

Tableau 3.4 : Tableau récapitulatif des statistiques de la figure 3.9 pour les concentrations 0.3, 0.6 et 1.3 µM. Les différences significatives entre deux points ($P < 0,05$) sont représentées par *, celles non-significatives par X. ..... 38

Tableau 3.5 : Tableau récapitulatif des statistiques de la figure 3.11 pour les concentrations 0.3, 0.6 et 1.6 µM. Les différences significatives entre deux points ($P < 0,05$) sont représentées par *, celles non-significatives par X. ..... 40

Tableau 3.6 : Résultats du dosage de l'aluminium total à la fin des expériences de la partie B : Prise en charge de l'aluminium avec et sans fluorures ..... 41

Tableau 4.1 : Spéciation de l'aluminium dans les différentes expériences 3A et 4A sur la toxicité de l'aluminium avec des fluorures (calculé à partir du logiciel MINEQL+ 4.5) ..... 52

Tableau 4.2 : Évaluation de la toxicité des fluoro-complexes d'aluminium dans différentes études publiées ..... 53

Tableau 8.1 : Calcul de la spéciation de l'aluminium avec le logiciel MINEQL+ 4.5 pour les conditions 1 du projet (voir tableau 2.2). ..... 69

Tableau 8.2 : Calcul de la spéciation de l'aluminium avec le logiciel MINEQL+ 4.5 pour les conditions 2 du projet (voir tableau 2.2). ..... 69

Tableau 8.3 : Taux de croissance moyen de *Chlorella pyrenoidosa* dans les témoins des différentes expériences sur la toxicité de l'aluminium avec et sans fluorures. ..... 70

Tableau 8.4 : Concentration d'aluminium intracellulaire dans les témoins des différentes expériences sur la prise en charge de l'aluminium avec et sans fluorures. ..... 70

# LISTE DES FIGURES


Figure 1.1 : Simulation de la spéciation de l'aluminium avec MINEQL+ (Schecher et McAvoy, 2001). La simulation suivante a été réalisée à 15°C en utilisant une concentration totale en Al de 4 µM, avec une force ionique de 1 mM et en faisant varier le pH entre 4 et 10. De plus, la valeur du produit de solubilité ($K_{so}$) utilisée pour la gibbsite micro-crystalline est de $10^{-9.35}$. ..... 2

Figure 1.2 : Complexes impliquant l'aluminium en milieu aquatique. ..... 3

Figure 1.3 : Simulation de la spéciation de l'aluminium avec MINEQL+ (Schecher et McAvoy, 2001) en utilisant cinq espèces d'aluminium dissous en plus de la gibbsite, et en faisant varier le pH entre 4 et 7. De plus, la simulation a été réalisée en utilisant une concentration totale d'Al de 4 µM, une concentration totale de F de 1 µM ainsi qu'une force ionique de 1 mM à 15°C. ..... 5

Figure 1.4 : Modèle conceptuel de l'interaction métal-algue. $M^{Z+}$ représente l'ion métallique libre et ML le métal complexé en solution ; M-X-cellule représente le complexe métallique à la surface de la cellule et $K_C$ la constante de formation du complexe ML ; $K_1$ et $K_2$ représentent les deux constantes de formation de M-X-cellule (Campbell, 1995; Campbell et al., 2002).. ..... 7

Figure 1.5 : Courbes de mortalité chez le saumon Atlantique juvénile : Mortalité après 7 jours d'exposition en fonction de la concentration de l'ion libre ($Al^{3+}$). Les symboles ouverts représentent les expériences sans l'ajout de fluorures et les symboles fermés représentent les expériences avec ajout de fluorures (Wilkinson et al., 1990) ..... 10

Figure 2.1 : Photographie au microscope optique de l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* dans le milieu de culture synthétique AAP modifié (grossissement de 1000X). ..... 13

Figure 2.2 : Réponse biologique d'une algue en fonction de la concentration totale en Al. ..... 18

Figure 2.3 : Schéma du montage des expériences sur la toxicité des fluoro-complexes d'aluminium. ..... 19

Figure 2.4 : Schéma du montage de la résine échangeuse de cations sous forme sodique. ..... 22

Figure 2.5 : Schéma analytique pour déterminer la spéciation de l'aluminium (adaptée de Patent (1991)). ..... 23

Figure 2.6 : Schéma du montage des expériences sur la prise en charge de l'aluminium avec des fluorures. ..... 24

Figure 3.1 : Courbe de croissance typique de *Chlorella pyrenoidosa* dans le milieu AAP modifié, aéré et agité (N = 3). Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de la période de développement ..... 28

Figure 3.2 : Croissance de l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* dans le milieu de culture simplifié AAP-MT-P, aéré et agité. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. Chaque courbe est un réplicat du même test (N = 3). ..... 29

Figure 3.3 : Croissance de *Chlorella pyrenoidosa* en présence de différentes concentrations d'Al seul. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par centrifugation lors de leur phase exponentielle de croissance. Pour une même journée, tous les points sont significativement différents entre chaque concentration ($P < 0,0001$). ..... 30

Figure 3.4 : Croissance de *Chlorella pyrenoidosa* en présence de différentes concentrations d'Al seul. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par filtration lors de leur phase exponentielle de croissance. Au jour 4, tous les points sont significativement différents ($P \leq 0,007$)..... 31

Figure 3.5 : Croissance de *Chlorella pyrenoidosa* en présence de différentes concentrations d'aluminium et de fluorures. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. La concentration de l'ion libre, $Al^{3+}$, était maintenue constante (31 nM). Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par filtration lors de leur phase exponentielle de croissance. Au jour 4, les lettres attribuées à chaque groupe de points changent pour des différences significatives ($P < 0,05$). Les deux graphes correspondent à deux expériences distinctes..... 32

Figure 3.6 : Croissance de *Chlorella pyrenoidosa* en présence de différentes concentrations d'Al seul. Cette expérience a été menée en triplicata (N = 3). Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par filtration lors de leur phase exponentielle de croissance..... 35

Figure 3.7 : Prise en charge nette de l'aluminium seul en fonction du temps d'exposition. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. La concentration de l'ion libre ($Al^{3+}$) était ajustée à 31 nM et la concentration totale en Al à 0.3 µM. Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par centrifugation lors de leur phase exponentielle de croissance. Cette expérience a été menée en triplicata (N = 3). Les points de l'aluminium intracellulaire à 50 et 90 minutes (i.e., les carrés) sont significativement différents (P = 0,032). Tous les autres points ne sont pas significativement différents entre eux ($P > 0,280$); le point d'origine n'est pas considéré dans cette comparaison, puisqu'il représente le témoin..... 36

Figure 3.8 : Prise en charge nette de l'aluminium en fonction de différentes concentrations d'aluminium seul. Cette expérience a été menée en triplicata (N = 3) sur une période de 90 minutes. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par centrifugation lors de leur phase exponentielle de croissance..... 37

Figure 3.9 : Prise en charge nette de l'aluminium en fonction de différentes concentrations d'aluminium et de fluorures. Cette expérience a été menée en triplicata (N = 3) sur une période de 90 minutes. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. La concentration de l'ion libre, $Al^{3+}$, était maintenue constante (31 nM). Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par centrifugation lors de leur phase exponentielle de croissance. Tous les points ne sont pas significativement différents entre eux (P = 1,000), mis à part le point d'origine qui représente le témoin..... 39

Figure 3.10 : Prise en charge nette de l'aluminium en fonction de différentes concentrations d'aluminium et de fluorures. Cette expérience a été menée en triplicata (N = 3) sur une période de 90 minutes. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. La concentration de l'ion libre, $Al^{3+}$, était maintenue constante (31 nM). Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par centrifugation lors de leur phase exponentielle de croissance..... 40

Figure 4.1 : Aire sous la courbe (A) des témoins de chacune des expériences portant sur la toxicité des fluoro-complexes d'aluminium sur l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* à pH 5.5 (inoculum égal à 100000 cellules/mL). La dernière bande correspond à l'aire sous la courbe obtenue par Parent (1991) sous les mêmes conditions de croissance..... 47

Figure 4.2 : Inhibition de la croissance algale à pH 5.5 en fonction de la croissance totale nominale d'aluminium. L'inhibition est exprimée en pourcentage de croissance par rapport à un contrôle..... 48

Figure 4.3 : Cinétique de bioaccumulation théorique d'un métal par une algue (adaptée de Parent, 1991)..... 54

# LISTE DES ABBRÉVIATIONS

| | |
|---|---|
| AAP | Algal Assay Procedure |
| AAP-P-MT | Milieu de culture AAP sans phosphate ni métaux traces |
| $AlF_n$ | Fluoro-complexe d'aluminium |
| ATP | Adénosine Tri-Phosphate |
| BLM | Modèle du Ligand Biotique |
| $CE_{30}$ | Concentration effective où 30% des individus exposés sont affectés |
| $CL_{50}$ | Concentration létale où 50% des individus exposés sont morts |
| FEP | Téflon de type éthylène propylène fluoré |
| HDPE | Polyéthylène de haute densité |
| ICP-AES | Spectrométrie d'Émission Atomique - Source Plasma à Couplage Inductif |
| K | Constante d'équilibre |
| L | Ligand |
| MES | Acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique |
| MIL | Modèle de l'Ion libre |
| MOD | Matière organique (naturelle) dissoute |
| $M^{z+}$ | Ion métallique libre en solution |
| PC | Polycarbonate |
| PP | Polypropylène |
| RCOOH | Acides organiques |
| UTCC | University of Toronto Culture Collection |
| X-cellule | Site de complexation à la surface de la cellule |

# CHAPITRE 1: INTODUCTION

## 1.1 Problématique

### 1.1.1 Précipitations acides : lessivage d'aluminium dans les cours d'eau

La physico-chimie des lacs et des rivières situés sur le Bouclier canadien dépend grandement des conditions présentes au niveau de leur bassin versant. Lorsqu'il y a des précipitations acides, certains métaux (comme le manganèse, le zinc et surtout l'aluminium) sont mobilisés et lessivés du milieu terrestre vers le milieu aquatique (Campbell et al., 1983; Campbell et al., 1984; Driscoll, 1985; NRCC, 1986; Campbell et al., 1992). Cette mise en circulation est généralement de nature épisodique, suite à des événements hydrologiques particuliers (ex. : fonte de la neige, crue automnale) (Driscoll et al., 1980; NRCC, 1986; Driscoll et Schecher, 1990). En effet, l'abaissement du pH augmente la solubilité de l'aluminium, ce qui favorise son entrée dans les cours d'eau. Dans la majorité des cas, l'acidification des lacs et des rivières résulte d'une augmentation de la concentration des anions acides ($SO_4^{2-}$, $NO_3^-$) accompagnée d'une faible proportion des cations majeurs ($Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Na^+$, $K^+$) présents dans ces cours d'eau; parfois, il peut y avoir une augmentation des acides organiques (RCOOH), ce qui favorise une augmentation des ions $H^+$ en solution, et du même coup, une chute du pH (Driscoll et al., 1980; Driscoll, 1985; Driscoll et Schecher, 1990). Puisque les cours d'eau du Bouclier canadien possèdent un faible pouvoir tampon (faible alcalinité, jumelée à de faibles concentrations de cations majeurs en solution), ils sont très vulnérables à une acidification sévère lors d'événements hydrologiques importants (Driscoll et al., 1980; Campbell et al., 1992).

### 1.1.2 Alumineries : rejet d'aluminium et de fluorures

Au Québec, il existe plusieurs usines de production d'aluminium dont l'entreprise Alcan International limitée qui opère plusieurs installations au Saguenay-Lac-Saint-Jean. Malgré le traitement de leurs eaux usées, ces usines relarguent des concentrations assez importantes d'aluminium dans le milieu environnant. Ces concentrations en aluminium varient entre 1 et 7 mg/L pour l'aluminium total dans les effluents d'usines (Roy et al., 2000). Généralement, l'aluminium retrouvé dans les eaux résiduaires est accompagné du ligand fluorure, qui lui est utilisé

en grande quantité lors du procédé d'électrolyse de l'alumine. Dans les effluents de ces alumineries, on peut retrouver jusqu'à 8 mg/L de fluorure total qui est rejeté dans les cours d'eau avoisinants.

Outre ces rejets aqueux sous forme d'eaux résiduaires, les alumineries rejettent aussi des quantités importantes de fluorures sous forme gazeuse dans le milieu environnant (NRCC, 1977; Jones, 1983; Ouellet, 1983); cependant, les quantités d'aluminium rejetées vers l'atmosphère sont négligeables comparées à celles rejetées dans les eaux résiduaires (NRCC, 1986).

# 1.2 Spéciation de l'aluminium

## 1.2.1 Spéciation de l'aluminium en fonction du pH

L'aluminium est le métal le plus abondant sur la terre et le troisième élément du tableau périodique en importance. Lorsque l'aluminium se dissout dans l'eau en l'absence d'anions complexant, l'ion métallique ($Al^{3+}$) s'hydrate en coordonnant six molécules d'eau selon une orientation d'octaèdre (Driscoll et Schecher, 1988). Cependant, la solubilité de ce métal à l'équilibre avec sa phase solide $Al(OH_3)$ dépend grandement du pH présent en solution (figure 1.1).

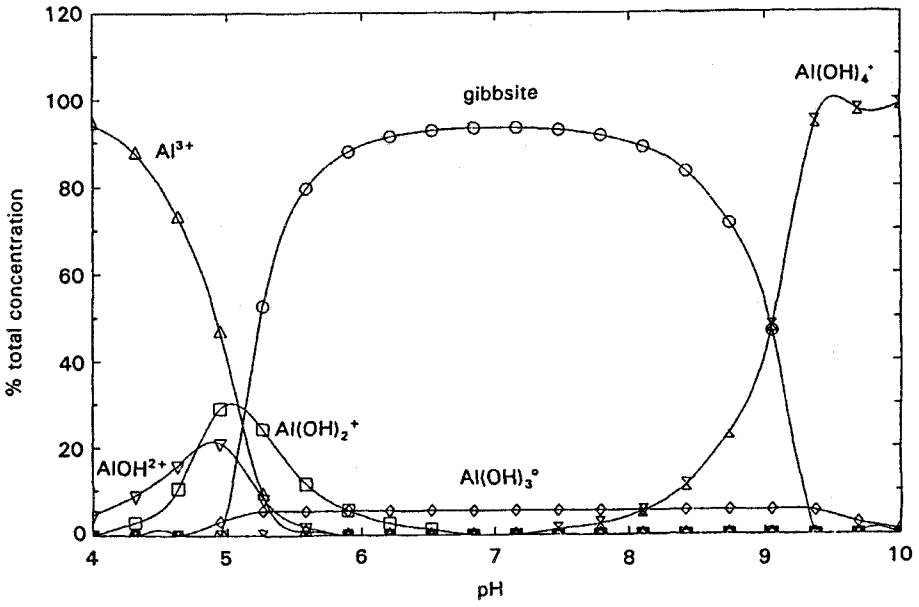


Figure 1.1 : Simulation de la spéciation de l'aluminium avec MINEQL+ (Schecher et McAvoy, 2001). La simulation suivante a été réalisée à 15°C en utilisant une concentration totale en Al de 4 µM, avec une force ionique de 1 mM et en faisant varier le pH entre 4 et 10. De plus, la valeur du produit de solubilité ($K_{so}$) utilisée pour la gibbsite micro-crystalline est de $10^{-9.35}$.

L'aluminium est relativement insoluble à un pH circumneutre (i.e., entre 6 et 8, la zone de formation de la gibbsite ($Al(OH)_3$ (s)), mais la solubilité de ce dernier augmente à des pH plus acide et plus alcalin, lorsqu'il y a présence de ligands complexant (MOD) et à de faibles températures (NRCC, 1986; Driscoll et Schecher, 1990).

La simulation MINEQL+ ci-haut a été réalisée avec 4 µM d'aluminium total à 15°C. De plus, des concentrations de 1 mM en Ca, Cl, Na et $NO_3$ ont été utilisées avec un système ouvert à l'atmosphère (Gensemer et Playle, 1999).

## 1.2.2 Complexes impliquant l'aluminium

Sous des conditions acides, l'aluminium est relâché dans les eaux interstitielles du sol où il s'équilibre en de nombreuses espèces chimiques qui dépendent de la présence de ligands pour ce dernier (figure 1.2). Les espèces mononucléaires d'aluminium qui peuvent ainsi se développer comprennent $Al^{3+}$, $AlOH^{2+}$, $Al(OH)^+_2$, $AlF^{2+}$, $AlF_2^+$, $AlF_3$, et beaucoup d'autres incluant des complexes organiques (notamment avec les acides humiques et fulviques). Toutes ces espèces mononucléaires sont en équilibre en solution, mais leur formation dépend du pH, de la concentration des ligands organiques et inorganiques présents en solution, de la force ionique et de la température de l'eau (Driscoll et Schecher, 1988 ; Driscoll et Schecher, 1990).

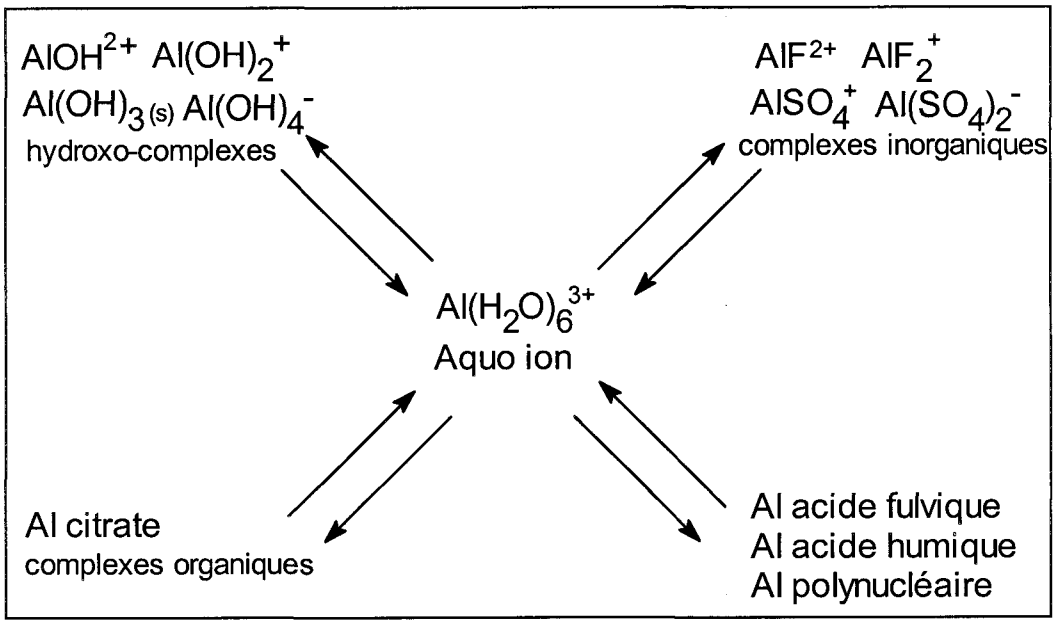


Figure 1.2 : Complexes impliquant l'aluminium en milieu aquatique.

Les fluoro-complexes d'aluminium peuvent devenir importants dans les eaux douces, surtout à des valeurs de pH acides (pH 4 – 5.5). On retrouve les formes monofluorées ($AlF^{2+}$) jusqu'aux formes hexafluorées ($AlF_6^{3-}$) lorsque les concentrations en fluorures augmentent. Dans la plupart des eaux naturelles, ce sont les formes $AlF^{2+}$ et $AlF_2^+$ qui sont présentes (Driscoll et Schecher, 1988).

### 1.2.3 Affinité de l'aluminium pour le fluorure à pH 5.5

La plupart des lacs du Bouclier canadien ont un pH acide (entre 5.2 et 6; Dupont, 1992), car ce sont des plans d'eau ne possédant pas un très grand pouvoir tampon. Lors d'événements hydrologiques particuliers, comme la fonte printanière ou la crue automnale, ces bassins versants reçoivent une quantité importante d'ion $H^+$, ce qui provoque une mobilisation de métaux (comme l'aluminium) vers les cours d'eau (Driscoll et al., 1980). Les dépôts acides ont un effet important sur le transport et la spéciation de l'aluminium dissous, et par conséquent sur sa toxicité. En effet, la toxicité de l'aluminium en solution semble être fortement liée à la spéciation de ce dernier et à la présence de ligands complexants, tel que le fluorure. Des calculs thermodynamiques indiquent que les complexes « aluminium-fluorure » peuvent être très importants en milieu naturel. En effet, des études sur le terrain dans le nord-est de l'Amérique du nord confirment que les complexes « aluminium-fluorure » dominent parfois la spéciation de l'aluminium inorganique, notamment au printemps et lors de crues automnales importantes (LaZerte et Dillon, 1984; Campbell et al., 1992), ainsi que dans certains lacs du Québec où le pH peut descendre jusqu'à 5.2 (Dupont, 1992).

À partir d'un logiciel de spéciation chimique (MINEQL+; Schecher et McAvoy (2001)), il est possible de simuler la spéciation de l'aluminium en présence de fluorures en fonction du pH (figure 1.3). Ces simulations nous donnent une idée de base du comportement de l'aluminium en solution avant de se lancer dans des expériences en laboratoire ou sur le terrain.

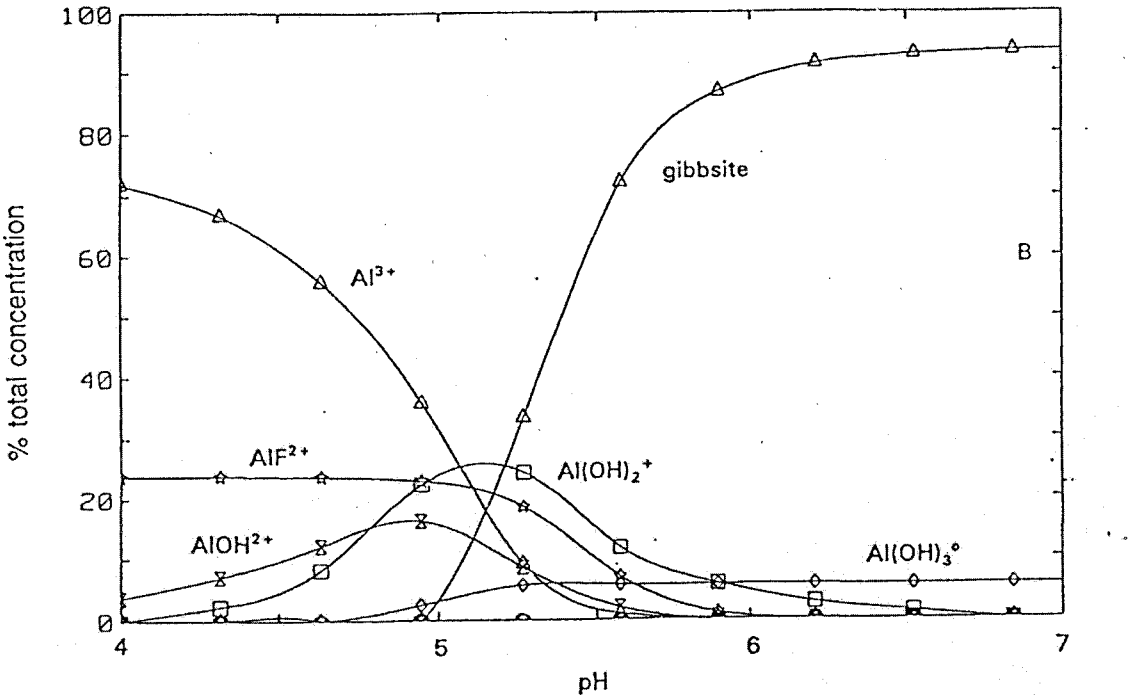


Figure 1.3 : Simulation de la spéciation de l'aluminium avec MINEQL+ (Schecher et McAvoy, 2001) en utilisant cinq espèces d'aluminium dissous en plus de la gibbsite, et en faisant varier le pH entre 4 et 7. De plus, la simulation a été réalisée en utilisant une concentration totale d'Al de 4 µM, une concentration totale de F de 1 µM ainsi qu'une force ionique de 1 mM à 15°C.

## 1.3 Interactions métaux-algues (Modèle de l'ion libre)

La présence de métaux toxiques, comme le cadmium, l'argent et l'aluminium, peut compromettre la qualité de l'habitat aquatique. Pour un organisme cible, telle une algue d'eau douce, les effets physiologiques et toxiques d'un métal dépendront de sa spéciation (laquelle sera déterminée en grande partie par la concentration totale du métal, le pH, la salinité, et la concentration de ligands complexants) et aussi de divers facteurs environnementaux (ex. : pH, dureté, température) (Pagenkopf, 1983; Tessier et al., 1994 ; Campbell, 1995; Twiss et al., 2001).

D'après Morel (1983), l'ion métallique libre ($M^{Z+}$) ou l'aquo-ion (voir figure 1.2), joue un rôle central dans la détermination de la prise en charge, de la nutrition et de la toxicité de tous les métaux traces présents sous forme cationique. Selon le modèle de l'ion libre (MIL), récemment renommé « modèle du ligand biotique », ou BLM, la réponse biologique d'un organisme cible serait proportionnelle à la concentration de la forme libre du métal ($M^{Z+}$) en solution (Campbell, 1995). Pour qu'il y ait réponse biologique, le métal doit interagir avec la membrane cellulaire de

l'organisme (figure 1.4). Cette interaction du métal avec la membrane cellulaire peut impliquer l'ion libre ($M^{Z+}$) ou une forme réactive ($ML_n^{Z+}$) (Campbell, 1995) :

$$M^{Z+} + \text{X-cellule} \overset{K_1}{\Leftrightarrow} \text{M-X-cellule} \quad (1)$$

$$ML_n^{Z+} + \text{X-cellule} \overset{K_2}{\Leftrightarrow} \text{M-X-cellule} + nL \quad (2)$$

où $K_1$ et $K_2$ sont les constantes d'équilibre et L est le ligand en solution. La réponse biologique est proportionnelle à la concentration du complexe à la surface de l'organisme cible (M-X-cellule), où X-cellule est un site de complexation à la surface de la cellule (Campbell, 1995). Les équations suivantes indiquent que la réponse biologique varie en fonction de la concentration de $[M^{Z+}]$ (selon les résultats obtenus dans les nombreuses études réalisées par W.G. Sunda, F.M.M. Morel et leurs collègues – une synthèse de ces résultats à été effectué par Campbell (1995)):

si l'équation (1) s'applique ($M^{z+}$ = l'espèce réactive) :

$$\text{M-X-cellule} = K_1(\text{X-cellule})[M^{Z+}] \quad (3)$$

si l'équation (2) s'applique ($ML_n^{z+}$ = l'espèce réactive) :

$$\text{M-X-cellule} = \frac{K_2(\text{X-cellule})[ML]}{[L]} \quad (4)$$

$$[ML] / [L] = K_c \bullet [M^{z+}] \quad (5)$$

Donc, on peut introduire l'équation (5) dans l'équation (4) et on obtient :

$$\text{M-X-cellule} = K_2 \bullet K_c\ (\text{X-cellule})\ [M^{Z+}] \quad (6)$$

Dans les deux cas (équations (3) et (6)), on note une dépendance directe entre [M-X-cellule] et $[M^{z+}]$.

La plupart des expériences menant à la formulation du modèle de l'ion libre ont été réalisées sur des organismes marins où la salinité et le pH sont élevés. Dans ces conditions, les concentrations de $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ et de $H^+$ varient très peu, contrairement à la situation qui prévaut en milieu d'eau douce où la variation de ces paramètres doit être évaluée avec attention (Campbell, 1995). En effet, ce modèle a été conçu pour l'étude des interactions entre « métaux-organismes » en milieu marin et non pas en milieu d'eau douce, ce qui peut amener un biais au niveau de l'interprétation de ces phénomènes en eau douce (Campbell et al., 2002), notamment en ce qui concerne les effets de la dureté.

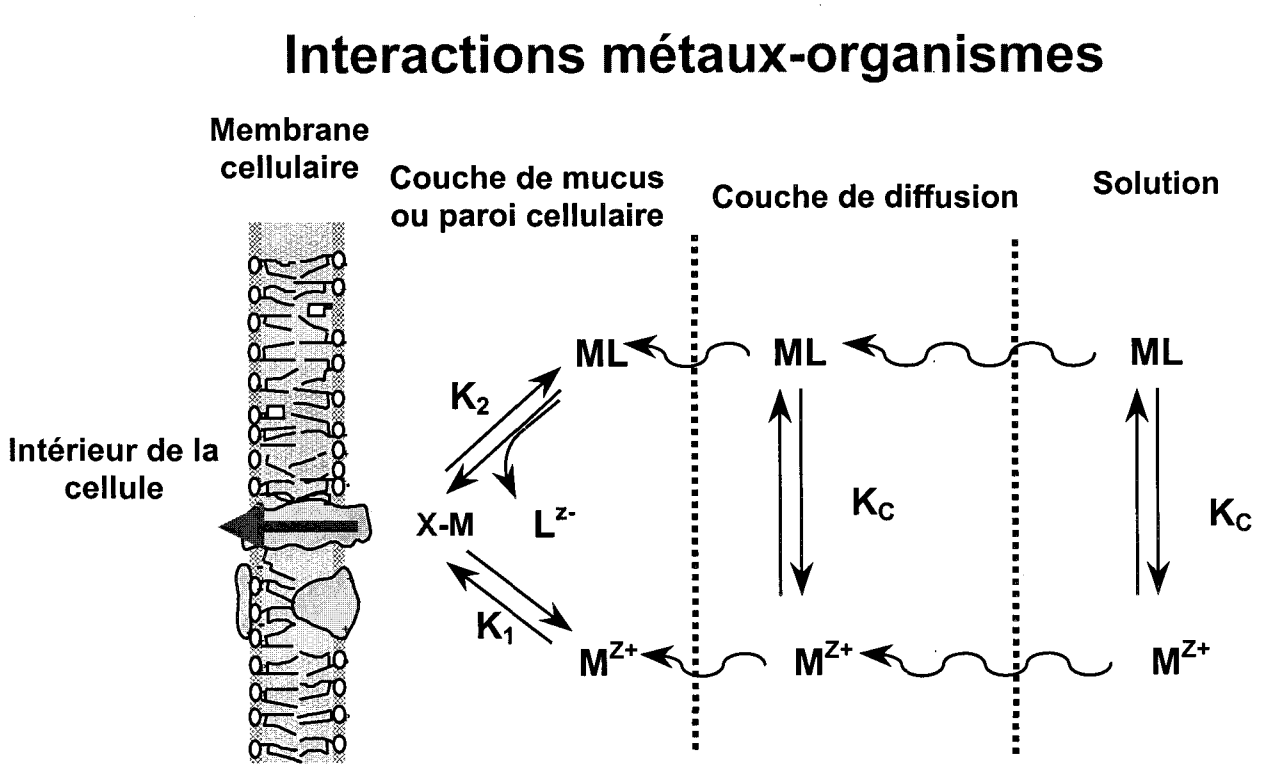


Figure 1.4 : Modèle conceptuel de l'interaction métal-algue. $M^{Z+}$ représente l'ion métallique libre et ML le métal complexé en solution ; M-X-cellule représente le complexe métallique à la surface de la cellule et $K_C$ la constante de formation du complexe ML ; $K_1$ et $K_2$ représentent les deux constantes de formation de M-X-cellule (Campbell, 1995; Campbell et al., 2002).

## 1.4 Aspects toxicologiques

### 1.4.1 Toxicité de l'aluminium seul

La toxicité d'un métal en solution dépend beaucoup du pH et de la présence ou non de ligands en solution. Dans des expériences réalisées avec l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa,* Parent et Campbell (1994) ont montré que l'aluminium est plus toxique à pH 6 qu'à pH acide (entre 4.3 et 5.5), puisque l'ion $H^+$ joue un rôle de compétiteur à l'aluminium pour les sites de liaison à la surface de l'algue. Dans un milieu de culture synthétique, Helliwell et ses collaborateurs (1983) ont montré qu'une concentration aussi faible que 0.19 µM d'aluminium à pH 6.1 pouvait diminuer de moitié le taux de croissance de l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* ($CE_{50}$), alors qu'une concentration de 0.56 µM d'Al était nécessaire à pH 5.4. Dans la même veine, Parent et Campbell (1994) ont démontré qu'une concentration de 0.26 µM d'aluminium à pH 6 pouvait inhiber de 30% la croissance de *Chlorella pyrenoidosa* ($CE_{30}$), comparativement à une concentration de 1.96 µM d'Al à pH 5.5. D'autre part, plusieurs expériences antérieures sur la toxicité de l'aluminium ont sous-estimé le pouvoir toxique de ce métal puisque ces expériences ont été réalisées en laboratoire

avec des milieux de culture contenant de grandes quantités de sels ajoutés (silicates, hydroxydes ferriques colloïdaux, citrate, phosphate, etc.) pouvant former des complexes ou des précipités avec l'aluminium et en diminuer sa toxicité (Gensemer et Playle, 1999). Selon le MIL, l'aluminium complexé n'est pas biodisponible pour les organismes aquatiques, et donc dans de telles conditions, il faut augmenter la concentration totale en aluminium pour voir apparaître un effet toxique sur l'organisme.

Chez les plantes supérieures, beaucoup d'études ont démontré que l'effet toxique de l'aluminium sur l'élongation des racines pouvait être diminué par la présence en solution de ligands complexants, comme le sulfate ($SO_4^{2-}$) et les fluorures ($F^-$) (Kinraide et al., 1985; Cameron et al., 1986; Kinraide et Parker, 1987). De plus, certaines études ont montré que la présence de cations majeurs, tels que le calcium ($Ca^{2+}$) et le magnésium ($Mg^{2+}$), pouvait aussi contribuer à diminuer l'effet toxique de l'aluminium sur la croissance de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) et du blé (*Triticum aestivum* L.) (Kinraide et al., 1985; Uhlen, 1985). De plus, il est important de souligner que la concentration de l'$Al_T$ n'est pas un bon indicateur de la toxicité de l'aluminium, mais que ce serait la concentration de l'aluminium libre $Al^{3+}$ qui serait un meilleur prédicteur de la toxicité du métal en solution ou dans les sols (Campbell, 1995; Gensemer et Playle, 1999; Twiss et al., 2001). Cependant, certaines études ont montré que l'espèce polynucléaire « $Al_{13}$ » ($AlO_4Al_{12}(OH)_{24}(H_2O)_{12}^{7+}$) peut contribuer à l'effet toxique de l'aluminium lorsque des solutions initialement acides sont neutralisées par l'ajout de solutions alcalines (Parker et al., 1988; Kinraide et Parker, 1989; Parker et al., 1989; Parent et Campbell, 1994).

## 1.4.2 Toxicité du fluorure seul

La toxicité des fluorures tend à varier beaucoup d'un organisme à l'autre puisqu'ils n'ont pas la même tolérance face aux fluorures, tout comme pour l'aluminium. En milieu aquatique, les organismes d'eau douce sont significativement plus sensibles que les organismes marins à une exposition aux fluorures, puisque l'ion $F^-$ entre en compétition avec l'ion $Cl^-$ dans les milieux salins, ce qui rend l'ions $F^-$ moins disponibles pour les organismes présents (Camargo et Tarazona 1991).

Les tests de toxicité du fluorure ont montré que les microalgues d'eau douce sont généralement plus tolérantes que les invertébrés ou les poissons. Les algues ont un très faible facteur de bioaccumulation, comparativement aux invertébrés et aux poissons, ce qui les rend plus tolérantes à ce polluant (WQPB, 1986). Cependant, des tests en laboratoire ont montré que les fluorures pouvaient retarder la croissance de l'algue *Synechococcus leopoliensis* (Racib.) de manière

significative (concentrations variant entre 0.26 µM et 7.90 µM, à pH variable) (Nichol et al., 1987). En effet, ces auteurs ont montré que les fluorures provoquaient chez cette algue une inhibition de la photosynthèse, une diminution de la production d'ATP et une inhibition de la prise en charge du phosphate. Cependant, Nichol et ces collaborateurs (1987) n'ont pas observé d'effets nocifs des fluorures sur la croissance de l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa*. Dans la même voie, Samencka-Cymermann et Kempers (1990) ont montré que la plante aquatique *Scapania undulata* (L.) Dum. était tolérante à une exposition de 5290 µM de $F^-$ pendant 16 j. Cette concentration en fluorures était inoffensive pour la plante. Dans cette même étude, les auteurs ont trouvé une $CL_{100}$ moyenne après 48 h de 22500 µM de $F^-$ pour l'espèce *Scapania undulata* (L.) Dum., ce qui est une concentration assez considérable. Dans une dernière étude, Stevens et ses collaborateurs (1998) ont montré que les fluorures peuvent être toxiques pour la tomate (*Lycopersicon esculentum*) à une concentration en $F^-$ correspondant à une activité plus grande que 1500 µM. De plus, ils ont démontré que la tomate est beaucoup plus sensible aux fluorures que l'avoine (*Avena sativa*), car la croissance des racines et de la tige des plants d'avoine n'était pas affectée par une activité aussi grande que 5130 µM de fluorures.

## 1.4.3 Toxicité des fluoro-complexes d'aluminium

### 1.4.3.1 Revue de la littérature: pas de consensus

L'ion fluorure a beaucoup d'affinité avec l'aluminium. En effet, ces deux ions forment des complexes stables en milieu acide (figure 1.3; Plankley et Patterson, 1986). Cependant il n'existe pas de consensus dans la littérature sur la toxicité de ces complexes. Premièrement, Cameron et ses collaborateurs (1986) ont montré que l'aluminium complexé aux fluorures ne provoquait aucun effet toxique sur l'orge (*Hordeum vulgare*). De plus, une étude menée sur le blé (*Triticum aestivum* L.) a montré que les fluorures enrayent ou diminuent fortement la toxicité de l'aluminium lorsque ces deux éléments sont complexés (MacLean et al., 1992). D'un autre côté, plusieurs études ont montré que les fluorures menaient à une atténuation partielle de la toxicité de l'aluminium pour la truite mouchetée (*Salvelinus fontinalis*, Mitchill) (Driscoll et al., 1980), pour le saumon Atlantique juvénile (*Salmo salar*) (Hamilton et Haines, 1995; Wilkinson et al., 1990), pour la tomate (*Lycopersicon esculentum*) et pour l'avoine (*Avena sativa*) (Stevens et al., 1997). D'autre part, Clark et LaZerte (1985) ont démontré que les fluoro-complexes d'aluminium étaient aussi toxiques que l'ion libre $Al^{3+}$ chez les œufs et les larves de deux espèces d'amphibiens à différents pH, soit le crapaud américain (*Bufo americanus*) et la grenouille des bois (*Rana sylvatica*).

### 1.4.3.2 Cas des saumons Atlantique juvéniles

Les fluoro-complexes d'aluminium sont très présents dans les cours d'eau du Québec au printemps, lors de l'acidification des lacs et des rivières. À cette période de l'année, les saumons Atlantique juvéniles (*Salmo salar*) sont aussi présents dans les cours d'eau et sont donc exposés à l'aluminium sous cette forme ($AlF^{2+}$, $AlF_2^+$). Plusieurs expériences ont montré que l'aluminium inorganique seul est toxique en milieu acide pour le saumon Atlantique et qu'il pouvait causer des problèmes importants au niveau de l'osmorégulation de l'organisme, provoquant notamment des baisses de concentration en sodium plasmatique (Lacroix et Townsend, 1987; Roy et al., 1997; Gensemer et Playle, 1999). De plus, des chercheurs se sont intéressés récemment à l'effet de la complexation de l'aluminium par les fluorures sur la toxicité de l'aluminium sur le saumon Atlantique juvénile (*Salmo salar*) (Wilkinson et al., 1990; Wilkinson, 1993). Cette dernière étude a montré que l'aluminium complexé aux fluorures était moins toxique pour les saumons juvéniles que l'aluminium seul ($Al^{3+}$); cependant les complexes $Al(F)_x$ ont induit une toxicité résiduelle significative non-attendue chez ce salmonidé (figure 1.5), ce qui va à l'encontre du modèle de l'ion libre. Le mécanisme de toxicité des fluoro-complexes d'aluminium est semblable à celui de l'aluminium seul, c'est-à-dire qu'il provoque un dérèglement au niveau du système osmorégulateur de l'organisme et une réduction de la concentration en sodium plasmatique (Wilkinson et al. 1990; Wilkinson, 1993).

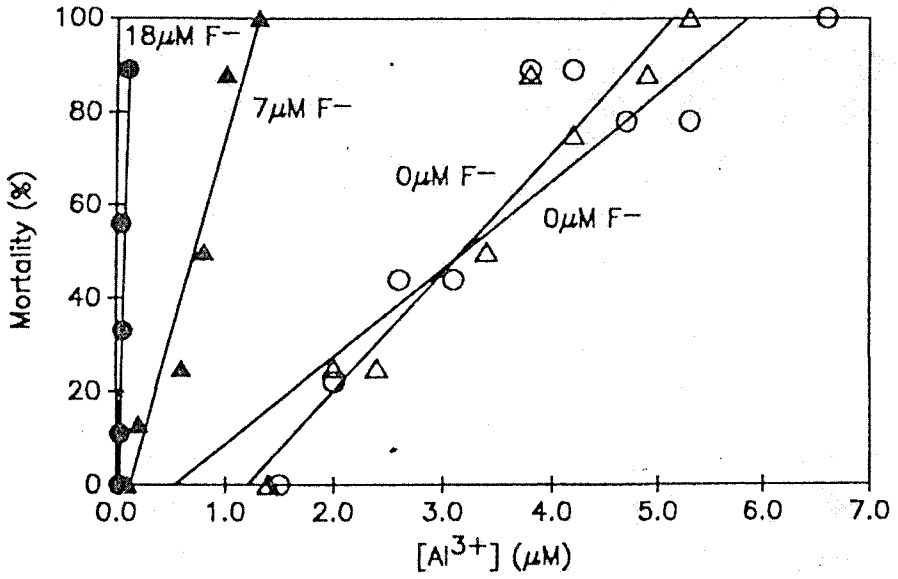


Figure 1.5 : Courbes de mortalité chez le saumon Atlantique juvénile : Mortalité après 7 jours d'exposition en fonction de la concentration de l'ion libre ($Al^{3+}$). Les symboles ouverts représentent les expériences sans l'ajout de fluorures et les symboles fermés représentent les expériences avec ajout de fluorures (Wilkinson et al., 1990).

Les données toxicologiques recueillies dans cette étude montrent l'implication apparente de complexes ternaires (Al-$F_n$-branchie) dans l'expression de la toxicité de l'aluminium associé aux fluorures chez le saumon Atlantique juvénile. Wilkinson et al. (1990) ont proposé que les complexes Al-$F_n$ se lient avec un ligand à la surface de la branchie et provoquent des dérèglements importants au niveau de l'osmorégulation et de la concentration en sodium plasmatique du poisson. De façon mathématique, la concentration du complexe ternaire (Al-F-branchie) est proportionnelle à la concentration du fluoro-complexe d'aluminium ($AlF^{2+}$) en solution (Wilkinson, 1993; Wilkinson et al., 1993) :

$$Al^{3+} + F^- \Leftrightarrow AlF^{2+} \qquad (\log K_1 = 7.0) \tag{7}$$

$$[AlF^{2+}] = K_1[Al^{3+}][F^-] \tag{8}$$

$$\{F\text{-}Al\text{-}L\text{-}Branchie\} = K_2[Al^{3+}][F^-][L\text{-}Branchie] \tag{9}$$

$$\{F\text{-}Al\text{-}L\text{-}Branchie\} = K_{12}[\mathbf{AlF^{2+}}][L\text{-}Branchie] \tag{10}$$

ce qui expliquerait la toxicité apparente de l'espèce $AlF^{2+}$.

## 1.5 Objectifs et hypothèses à tester

Les deux grands objectifs de cette recherche sont :

1) d'évaluer la toxicité des fluoro-complexes d'aluminium chez une algue unicellulaire d'eau douce, *Chlorella pyrenoidosa* ;

2) d'évaluer la prise en charge des fluoro-complexes d'aluminium chez une algue unicellulaire d'eau douce, *Chlorella pyrenoidosa*.

Outre ces deux objectifs principaux, cette étude vise à vérifier la capacité du modèle de l'ion libre à expliquer la toxicité et la prise en charge de l'aluminium chez *C. pyrenoidosa*, en présence de fluorures. L'approche expérimentale implique des mesures en parallèle de spéciation d'aluminium et de biodisponibilité d'aluminium (biaccumulation/toxicité) dans des solutions synthétiques de composition connue (pH, force ionique, nutriments) où on fera varier $[Al]_T$ et $[F]_T$.

Malgré l'utilisation d'un organisme plus simple et différent de celui de l'étude de Wilkinson et al. (1990), nous émettons les hypothèses suivantes : i) la réponse toxique de l'aluminium chez l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* varie en fonction de l'ion libre $Al^{3+}$; ii) la prise en charge de l'aluminium chez cette algue se fait uniquement sous forme d'ion libre $Al^{3+}$; iii) les fluoro-

complexes d'aluminium n'interviennent pas dans la prise en charge et la toxicité de l'aluminium chez *C. pyrenoidosa*.; iv) et dernièrement, le modèle de l'ion libre peut s'appliquer à ce cas particulier.

# CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 2.1 Organisme à l'étude

### 2.1.1 Caractéristiques générales

L'organisme qui a été utilisé pour cette étude est l'algue unicellulaire *Chlorella pyrenoidosa* (UTCC 89), fréquemment employée en laboratoire. Il s'agit d'une algue verte (Chlorophyta) de la classe des chlorococcacea (algue non-motile de forme sphérique). Cette algue est solitaire ou agrégée en solution; son diamètre peut varier entre 6 et 12 µm (figure 2.1). C'est une algue acidophile pouvant croître dans des milieux où le pH est très faible, tel que 4.5 (Parent, 1991). La reproduction de cette algue se fait de manière asexuée à partir du protoplaste de la cellule mère pour former quatre cellules filles rondes agrégées (Wehr et Sheath, 2003).

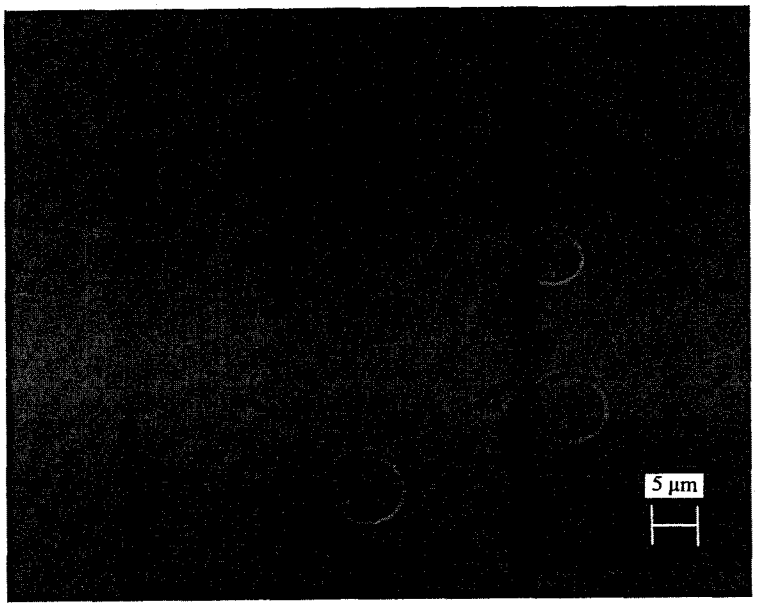


Figure 2.1 : Photographie au microscope optique de l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* dans le milieu de culture synthétique AAP modifié (grossissement de 1000X).

### 2.1.2 Choix de cette algue

L'algue verte *Chlorella pyrenoidosa*, retenue pour cette étude, a la capacité de croître dans des milieux où le pH peut être acide, comme celui rencontré dans des lacs du Bouclier canadien

(Parent, 1991; Wehr et Sheath, 2003). C'est une algue facile à cultiver en laboratoire. De plus, elle est bien connue dans le domaine de la recherche et a été largement utilisée en laboratoire dans des tests de toxicité sur les métaux traces (Helliwell et al., 1983; Parent et Campbell, 1994; Olguin et al., 2000).

## 2.2 Produits, réactifs et eau ultra-pure

Tous les contenants utilisés pour la réalisation et la conservation des solutions de travail étaient en polypropylène (PP) ou en Teflon® (FEP). Avant d'être utilisés, ces contenants étaient minutieusement lavés sept fois à l'eau ultra-pure après avoir trempé 24 h dans un bain d'acide nitrique (10-15 % v/v). L'eau ultra-pure provenait d'un système commercial de purification pour usage analytique (résistivité ~ 18 megohms-cm). Ce système comprend des résines échangeuses d'ions, des colonnes d'adsorption au charbon et des membranes filtrantes de 0.2 µm de porosité (Parent, 1991; Fortin, 1996). Après le rinçage à l'eau ultra-pure, l'équipement était rangé dans une armoire avec de l'eau ultra-pure ou mis à sécher sous une hotte à flux laminaire afin d'éviter une contamination par la poussière. Chaque manipulation subséquente a été réalisée sous cette même hotte à flux laminaire pour que tout reste propre et stérile.

Chaque solution a été conçue à partir de réactifs sélectionnés pour leur pureté, l'acide nitrique ($HNO_3$) et l'hydroxyde de sodium (NaOH) utilisés étant de grade « ACS ». Dans la préparation des solutions de travail, deux microbalances de type *Sartorius* et *DeltaRange*® ont été utilisées pour peser tous les sels constitutifs alors que les volumes de réactifs utilisés ont été mesurés avec des pipettes micrométriques de marque *Eppendorf*, *VWR* et *Rainin* (*Mandel Scientific*). De plus, le pH des milieux de culture et d'exposition a été mesuré à partir d'un pH-mètre de marque *MeterLab*® et d'une électrode de marque *Orion*®. Le calibrage de cet appareil a été réalisée à partir de deux tampons à pH 4 et 7 (*Fisher Scientific*).

## 2.3 Milieu de culture utilisé

### 2.3.1 Composition chimique du milieu

L'algue verte *C. pyrenoidosa* a été cultivée dans un milieu synthétique couramment utilisé en laboratoire, le milieu AAP modifié par Chiaudani et Vighi (1978) dont la composition chimique est présentée au tableau 2.1. C'est un milieu standard où les nutriments sont en excès et où le pH est ajusté à pH 5.5 avec le tampon MES (acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique). Ce tampon est

couramment utilisé pour ajuster et tamponner le pH entre 5 et 6.5. De plus, c'est un tampon reconnu pour être très peu complexant pour les métaux ajoutés en solution (Martell et Smith, 1977; Parent, 1991).

## 2.3.2 Méthodes

La méthodologie employée s'inspire de celle utilisée couramment dans les laboratoires de l'INRS-Eau, Terre et Environnement pour l'étude des interactions métaux-algues (Parent, 1991; Parent et Campbell, 1994). À partir des concentrations données dans le tableau 2.1, les quatre solutions suivantes (macronutriments, phosphate, tampon MES et métaux traces) ont été préparées en excès (solutions mères) dans des ballons jaugés de 1L, 500 mL et 250 mL en polypropylène. Par la suite, chaque solution a été filtrée sur un filtre en polycarbonate de 0.2 µm (*Osmonics, Fisher Scientific*) afin d'enlever toutes les particules plus grosses que 0.2 µm présentes dans les solutions mères et toutes les bactéries pouvant s'y retrouver. Ensuite, chaque solution filtrée a été entreposée dans une bouteille propre et mise au réfrigérateur (bouteilles en PP ou en téflon (FEP) préalablement lavées à l'acide nitrique 10% et autoclavées à 121°C pendant 15 minutes).

Après avoir préparé les solutions mères, il a été possible de préparer les milieux de culture qui ont servi à faire croître l'algue verte *C. pyrenoidosa*. D'abord, 5 mL de la solution de macronutriments est placé dans un ballon jaugé de 1L propre. Ensuite, 0.25 mL de la solution de phosphate ainsi que 20 mL de la solution de MES y sont ajoutés. Le volume du ballon jaugé est alors complété à 1L avec de l'eau ultra-pure. À partir d'un cylindre gradué, 100 mL de la solution finale est versé dans 10 fioles Erlenmeyers en polycarbonate (PC) de 250 mL lavés à l'acide. Enfin, les 10 fioles Erlenmeyers sont autoclavées et placées sous la hotte à flux laminaire pour empêcher une contamination avec la poussière. Lorsque les fioles Erlenmeyers sont refroidies, 0.10 mL de la solution de métaux traces est ajouté dans chaque fiole et ces dernières sont laissées 24 h sous la hotte à flux laminaire. Les métaux traces sont seulement ajoutés au milieu de culture après l'étape de stérilisation pour empêcher la précipitation des oxydes de fer à haute température. Finalement, le pH des milieux de culture est ajusté à 5.5 avec du NaOH 0,5 M en sacrifiant une fiole Erlenmeyer pour déterminer la quantité de NaOH à ajouter. La même démarche est utilisée pour préparer des milieux de culture de 500 mL dans des fioles Erlenmeyers de 1L.

Tableau 2.1 : Composition du milieu de culture AAP (Algal Assay Procedure) modifié par Chiaudani et Vighi (1978).

| COMPOSÉS | CONCENTRATION FINALE (M) |
|---|---|
| MACRONUTRIENTS | |
| $NaNO_3$ | $3.00x10^{-4}$ |
| $MgCl_2$ | $5.99x10^{-5}$ |
| $MgSO_4$ | $1.23x10^{-4}$ |
| $CaCl_2$ | $3.00x10^{-5}$ |
| $NaHCO_3$ | $1.79x10^{-4}$ |
| PHOSPHATE | |
| $K_2HPO_4$ | $6.00x10^{-6}$ |
| ÉLÉMENTS TRACES | |
| $H_3BO_3$ | $3.00x10^{-6}$ |
| $MnCl_2$ | $2.10x10^{-6}$ |
| $ZnCl_2$ | $2.50x10^{-9}$ |
| $CoCl_2$ | $1.20x10^{-9}$ |
| $CuCl_2$ | $5.00x10^{-11}$ |
| $Na_2MoO_4$ | $3.00x10^{-8}$ |
| $FeCl_3$ | $1.00x10^{-6}$ |
| $Na_2EDTA$ | $8.00x10^{-7}$ |
| TAMPON | |
| MES | $1.00x10^{-2}$ |

## 2.4 Calculs théoriques

### 2.4.1 Modèle MINEQL +

L'approche expérimentale prônée dans l'étude de la toxicité et de la prise en charge de l'aluminium et des fluorures chez l'algue verte *C. pyrenoidosa* implique des mesures parallèles de spéciation de l'aluminium et de biodisponibilité de l'aluminium dans des solutions synthétiques de composition connue (variables : $[Al]_T$, $[F]_T$).

D'abord, la spéciation de l'aluminium est déterminée selon deux approches complémentaires, soit avec une approche expérimentale, soit selon des calculs d'équilibre (Parent, 1991). La première approche consiste à doser en laboratoire les différentes fractions (totale dissoute (inorganique et organique) et totale particulaire) du métal étudié. À partir de ces résultats, il est possible d'évaluer et de suivre les conditions expérimentales tout au long de l'expérience. Pour

déterminer la spéciation de l'aluminium de cette manière, il existe plusieurs techniques expérimentales, telles que la filtration (Campbell et al., 1983), l'échange ionique (Rogeberg et Hendrikson, 1985) et la colorimétrie (Prokopy, 2001).

La deuxième approche consiste à utiliser un logiciel informatique pouvant faciliter les calculs thermodynamiques d'équilibres chimiques afin de déterminer la spéciation théorique de l'aluminium, soit la distribution de l'aluminium parmi ses différentes formes inorganiques ($Al^{3+}$, $Al(OH)_x$, $AlF_n$, $Al(SO_4)_x$). Il existe plusieurs modèles mathématiques pouvant faire ces calculs, tels que MINTEQ, HYDRAQL et MINEQL. Parmi ces modèles, nous avons choisi d'utiliser MINEQL+ version 4.5 (Schecher et McAvoy, 2001), puisque ce dernier est facile d'utilisation et que les constantes thermodynamiques utilisées dans ce modèle ont été mises à jour récemment.

## 2.4.2 Milieux d'exposition

Le milieu d'exposition de base qui a été utilisé dans cette étude est sensiblement le même que le milieu de croissance (voir tableau 2.1), sauf que le phosphate ainsi que les métaux traces en sont exclus. Le pH a été ajusté à 5.5 avec l'ajout de NaOH 0.5 M et a été maintenu constant par l'utilisation du tampon MES (acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique). Selon Parent (1991), le tampon MES est le plus efficace pour maintenir constant le pH à 5.5 sur une période de quatre jours d'exposition.

Il est très important de ne pas ajouter de phosphate dans le milieu d'exposition, car ce nutriment essentiel pour les algues a une grande affinité avec l'aluminium et il peut le faire précipiter de la solution sous forme de phosphate insoluble ($AlPO_4$). De plus, les métaux traces ne devaient pas être incorporés au milieu d'exposition, parce qu'ils sont susceptibles d'interférer avec l'aluminium au niveau des sites d'entrée à la surface des algues lors de l'exposition (Parent, 1991).

Les deux variables étudiées dans ce travail étaient les concentrations totales en aluminium (Al) et en fluorure (F) ajoutées. Malgré la variation des concentrations totales de ces deux éléments, la concentration d'aluminium libre ($Al^{3+}$) a été fixée à 31 nM après avoir fait plusieurs simulations avec le modèle de spéciation chimique MINEQL+ version 4.5 (Schecher et McAvoy, 2001) (voir annexe 8.1). Le tableau suivant montre les différents traitements utilisés lors des différentes expériences.

Tableau 2.2 : Conditions expérimentales utilisées lors des différentes expériences.

| **Conditions 1** | | **Conditions 2** | |
|---|---|---|---|
| $[Al(NO_3)_3]$ (µM) (µg/L) | [NaF] (µM) | $[Al(NO_3)_3]$ (µM) (µg/L) | [NaF] (µM) |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.3 (8) | 0 | 0.3 (8) | 0 |
| 0.6 (15) | 0 | 0.6 (15) | 1.5 |
| 0.9 (25) | 0 | 0.9 (25) | 2.5 |
| 1.3 (35) | 0 | 1.6 (44) | 5.0 |

## 2.5 Biodisponibilité de l'aluminium

Le cheminement suivi pour l'étude de la toxicité et de la bioaccumulation de l'aluminium chez une algue unicellulaire se décrit en quatre points :

- Fixer la durée d'exposition (4 j pour la toxicité et quelques minutes à une heure pour la prise en charge).
- Établir la réponse de l'algue test à une concentration connue d'$Al^{3+}$ libre, sans ligand (Conditions 1).
- Fixer la $[Al^{3+}]$ à ce niveau et faire varier en même temps $[Al]_T$ et $[F]_T$ (les concentrations en $AlF^{2+}$ et $AlF_2^+$ augmentent, sans que $[Al^{3+}]$ ne change) (Conditions 2).
- Suivre la "réponse" biologique (ex. : prise en charge ou toxicité).

Selon le modèle de l'ion libre, la réponse biologique de l'algue serait proportionnelle à la concentration de l'ion libre ($Al^{3+}$) en solution (figure 2.2) :

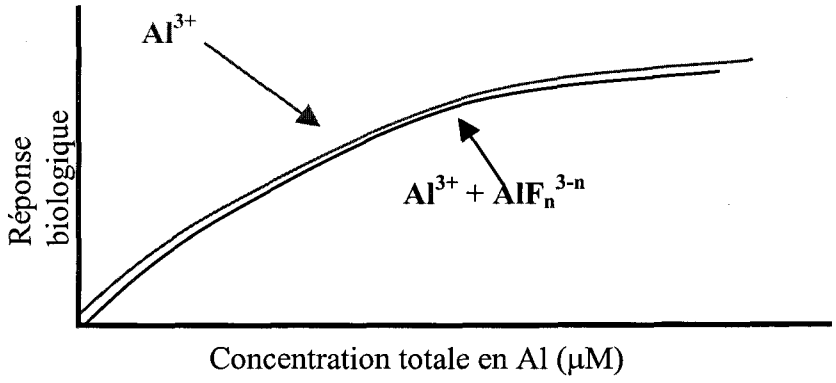


Figure 2.2 : Réponse biologique d'une algue en fonction de la concentration totale en Al.

## 2.6 Partie A : Toxicité des fluoro-complexes d'aluminium

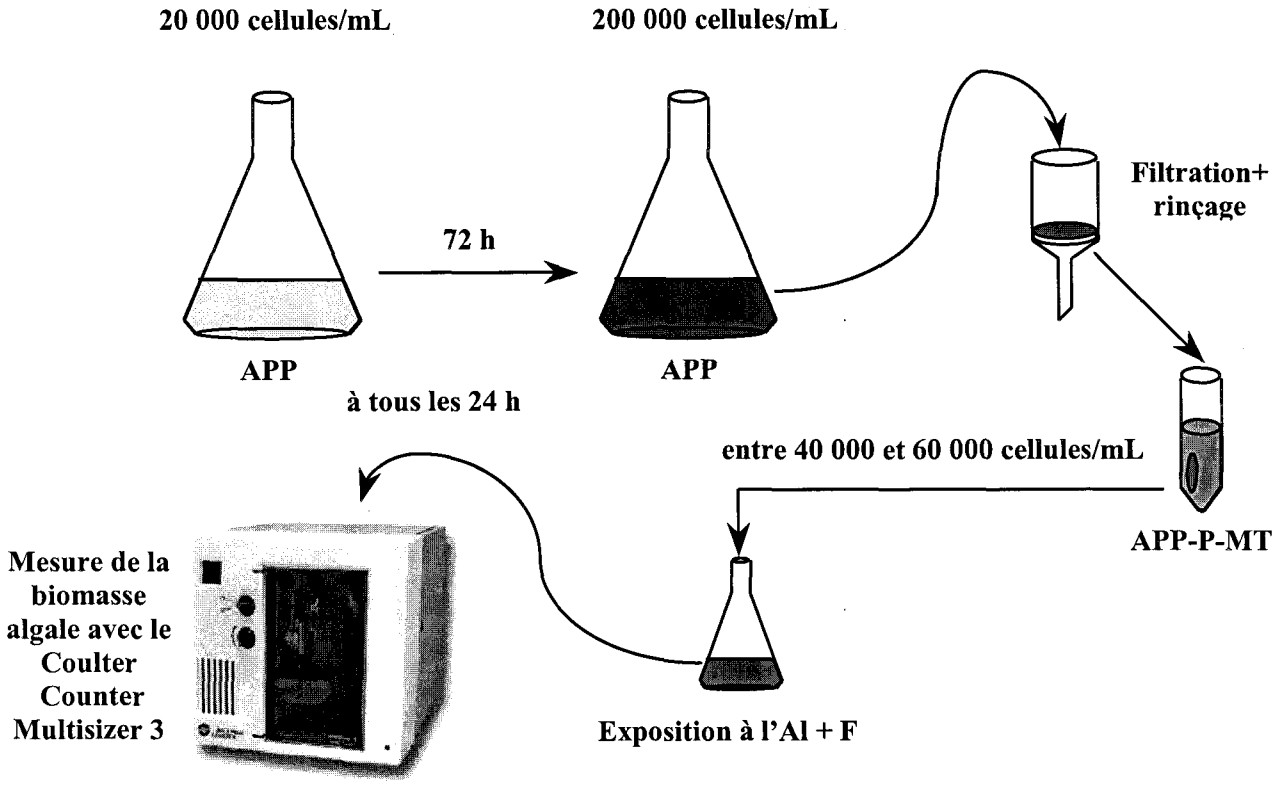


Figure 2.3 : Schéma du montage des expériences sur la toxicité des fluoro-complexes d'aluminium.

### 2.6.1 Culture des algues

Les cultures axéniques de *C. pyrenoidosa* sont placées dans une chambre de croissance de type *Conviron* où la température est maintenue à 20°C ± 1°C et la luminosité est maintenue à 130 µmol·photons·$m^{-2}$ par des tubes fluorescents blancs de marque Philips (85 watts).

Les algues sont cultivées en milieu semi-continu; c'est-à-dire que le milieu de culture est changé à tous les quatre jours d'incubation en transférant un nombre connu d'algues (20 000 cellules·$mL^{-1}$) dans un milieu de culture frais, afin de maintenir la culture en phase exponentielle de croissance (à environ 100 000 cellules·$mL^{-1}$). Pour obtenir une biomasse importante, les algues sont maintenues pendant quatre jours dans une fiole Erlenmeyer d'une capacité d'un litre contenant 500 mL de milieu de culture standard. Les algues sont comptées juste avant une expérience, ou juste

avant le transfert des ces dernières dans un nouveau milieu de culture, à l'aide d'un compteur de particules (*Coulter Counter Multisizer 3*).

L'axénicité des cultures algales a été testée à quelques reprises durant l'étude afin de contrôler la contamination possible en bactéries. La présence de bactéries dans les cultures algales pourrait biaiser les résultats de toxicité et de prise en charge. Ce contrôle est réalisé en prélevant des aliquotes dans les cultures algales et en les incubant pendant quelques jours sur des géloses nutritives, préparées à partir d'agar et de milieu de culture AAP modifié par Chiaudani et Vighi (1978).

### 2.6.2 Filtration des algues

Après quatre jours d'incubation, les algues sont prêtes à être utilisées, car leur réserve interne en phosphate est optimale, alors elles peuvent supporter une croissance soutenue pendant au moins quatre jours d'exposition dans un milieu exempt d'éléments nutritifs. À ce moment, les algues en phase exponentielle de croissance sont filtrées sur un filtre en polycarbonate de 2.0 µm (*Osmonics, Fisher Scientific*). Après ce traitement, les algues sont rincées et refiltrées à trois reprises avec une solution de rinçage (AAP-P-MT) à pH 5.5 afin de s'assurer que ni phosphate, ni métaux traces ne soient introduits dans les milieux expérimentaux. Le culot final est resuspendu dans une fiole Erlenmeyer de 25 mL en polycarbonate contenant 15 mL du milieu simplifié (AAP-P-MT).

### 2.6.3 Préparation des milieux d'exposition

Une journée avant l'expérience, les milieux d'exposition sont préparés en triplicata pour chacune des concentrations dans des fioles Erlenmeyers en polycarbonate de 250 mL (méthode mentionnée ci-haut à la section 2.4.2). Chaque milieu est autoclavé pendant 15 minutes à 115°C et le pH est ajusté avec du NaOH 0.5 M. Par la suite, les milieux sont placés pendant toute une nuit sous la hotte à flux laminaire pour que l'équilibre chimique soit atteint dans chacune des fioles.

### 2.6.4 Exposition des algues et mesure journalière de la biomasse

Au début de chaque expérience, le culot concentré d'algues (suite à la filtration) est mesuré au compteur de particules afin de déterminer le volume de cette solution concentrée qui sera ajoutée dans chacune des fioles pour que la biomasse initiale se situe entre 40 000 et 60 000 cellules·mL$^{-1}$. La croissance algale est suivie sur une période de 4 j (96 h) afin que les tests de toxicité effectués relatent bien l'effet toxique du métal à l'étude et non pas le manque d'éléments nutritifs ou d'autres

facteurs limitant; pour des périodes dépassant 4 j d'exposition, les échantillons témoins peuvent être affectés (Parent, 1991). À chaque jour, la croissance des algues est comptée trois fois, pour chaque échantillon, à l'aide du compteur de particules. La concentration effective qui diminue la biomasse finale de 30% par rapport au témoin (i.e., $CE_{30}$) a été calculée à partir du programme statistique ICp., version 2.0, par interpolation linéaire (Norberg-King, 1993). Nous avons décidé de mesurer la $CE_{30}$ au lieu de la $CE_{50}$, afin de pouvoir comparer nos résultats avec ceux de l'étude de Parent (1991).

### 2.6.5 Dosage de l'$Al_{total}$ et l'$Al_{organique}$ à l'ICP-AES

Pour s'assurer que les conditions expérimentales soient constantes tout au long de l'expérience, l'aluminium total, l'aluminium inorganique et l'aluminium organique sont dosés au début et à la fin de l'expérience. Cette étape est essentielle pour déterminer si la concentration d'aluminium inorganique de départ ajoutée reste la même tout au long de l'expérience (i.e., une exposition constante à l'$Al^{3+}$ pendant 4 j). Au début de chaque expérience, avant l'ajout des algues, un volume de 10 mL de chacun des traitements est pipeté et placé dans un *Dilu-Vial*® de 10 mL. Ces échantillons sont entreposés dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à la fin de l'expérience pour le dosage de l'aluminium total initial. À la fin de l'expérience, un volume de 15 mL de solution dans chaque fiole Erlenmeyer est récupéré et filtré sur 0.2 µm pour le dosage de l'aluminium total et organique. D'abord, 10 mL de solution est placé dans un *Dilu-Vial*® de 10 mL pour le dosage de l'aluminium total au jour 4 et ensuite 5 mL de solution est passé dans une résine échangeuse d'ions (cations); cette étape capte l'aluminium inorganique, mais laisse passer l'aluminium organique (voir section suivante). Finalement, chaque solution est acidifiée à l'acide nitrique 0.2% (v/v) et dosée à l'ICP-AES (*Varian*). Des étalons sont préparés à partir d'un standard d'aluminium (*SCP Science* 1000 µg/mL, 4% HCl) afin d'établir la courbe étalon de l'appareil (i.e., la calibration).

### 2.6.6 Résine échangeuse d'ions

Pour être en mesure de doser l'aluminium total et organique, une technique utilisant une résine échangeuse d'ions cationiques a été développée. D'abord, la méthode s'inspire de celle utilisée pour les techniques de colorimétrie avec le catéchol violet (Prokopy, 2001). Cependant, la méthode par colorimétrie n'est pas assez sensible pour doser l'aluminium à d'aussi faibles concentrations. Pour résoudre ce problème, la résine a été isolée du montage de la colorimétrie et les solutions récoltées ont été dosées à l'ICP-AES. La colonne mesurait 20 cm de long et elle possédait un diamètre de 10 mm. Elle a été remplie avec une résine échangeuse de cations (i.e., Amberlite® IR-

120 (plus), forme sodique; Aldrich). La quantité de résine ajoutée dans la colonne correspondait à environ 3 cm de la hauteur de cette même colonne. Par la suite, la résine a été humidifiée avec de l'eau ultra-pure. Pour tenir compte du volume mort présent dans la colonne, un volume de 5 mL d'eau ultra-pure a été passé après chaque échantillon afin de récupérer en totalité ce dernier (dilution de 50 % de la concentration de l'échantillon).

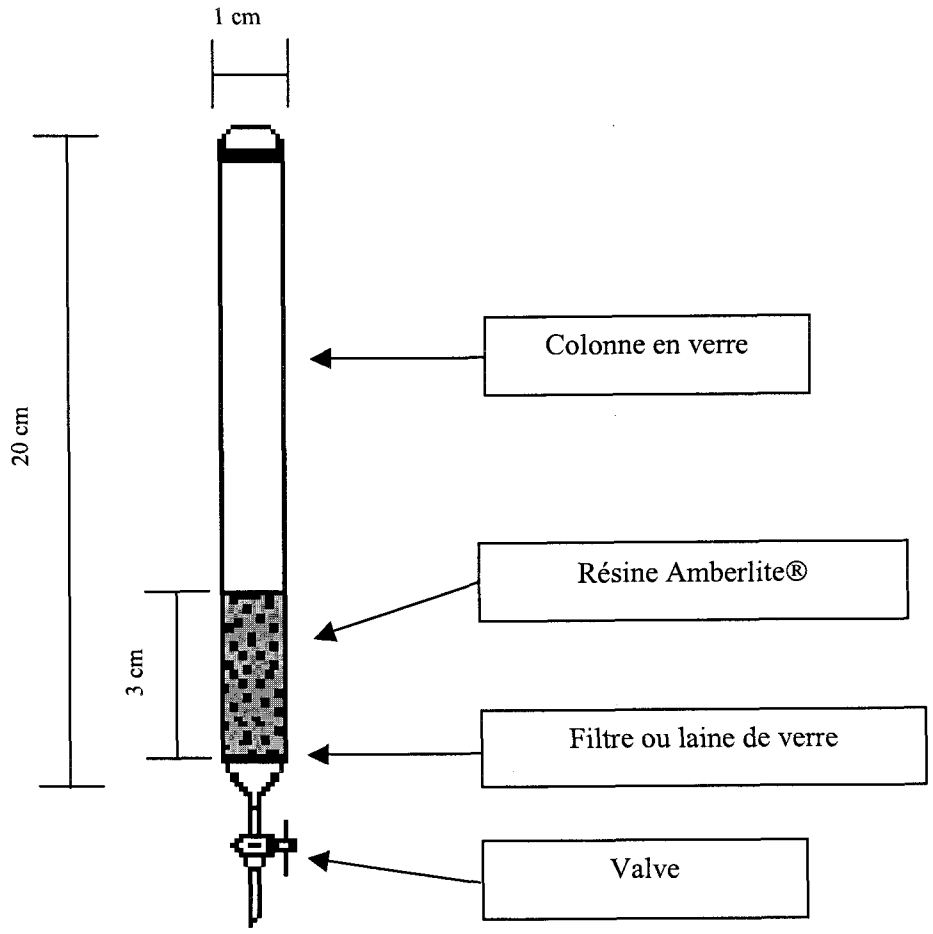


Figure 2.4 : Schéma du montage de la résine échangeuse de cations sous forme sodique.

Avant chaque expérience, un volume de 10 mL de chacune des solutions d'expérience a été conservé pour être dosé à la fin. Au dernier jour de l'expérimentation (jour 4), un volume de 5 mL de chaque échantillon a été filtré sur 0.2 µm et passé dans la résine échangeuse de cations afin de pouvoir doser la fraction organique de l'aluminium, c'est-à-dire celle qui n'est pas captée par la résine. Entre chaque échantillon, 30 mL d'eau ultra-pure est passé dans la colonne pour la

nettoyer. De plus, un volume de 10 mL de chacun des échantillons a été conservé, sans être passé dans la colonne, pour le dosage de l'aluminium dissous total. Finalement, l'aluminium total est dosé à l'ICP-AES au jour 0 et au jour 4 et l'aluminium organique est dosé au jour 4. En soustrayant la concentration d'aluminium organique à l'aluminium total, il a été possible de connaître la concentration d'aluminium inorganique dans chaque traitement à la toute fin de l'expérience (figure 2.5). L'efficacité de la résine a été testée à chaque fois que cette dernière a été utilisée. Un étalon d'aluminium inorganique ($[Al]_T$ = 3.7 µM) a été passé dans la résine et a été dosé à l'ICP-AES par la suite. À chaque reprise, l'appareil n'a pas pu détecter d'aluminium, ce qui veut dire que la résine était assez efficace pour retenir la totalité de l'aluminium inorganique présent dans les milieux d'exposition à la fin des expériences.

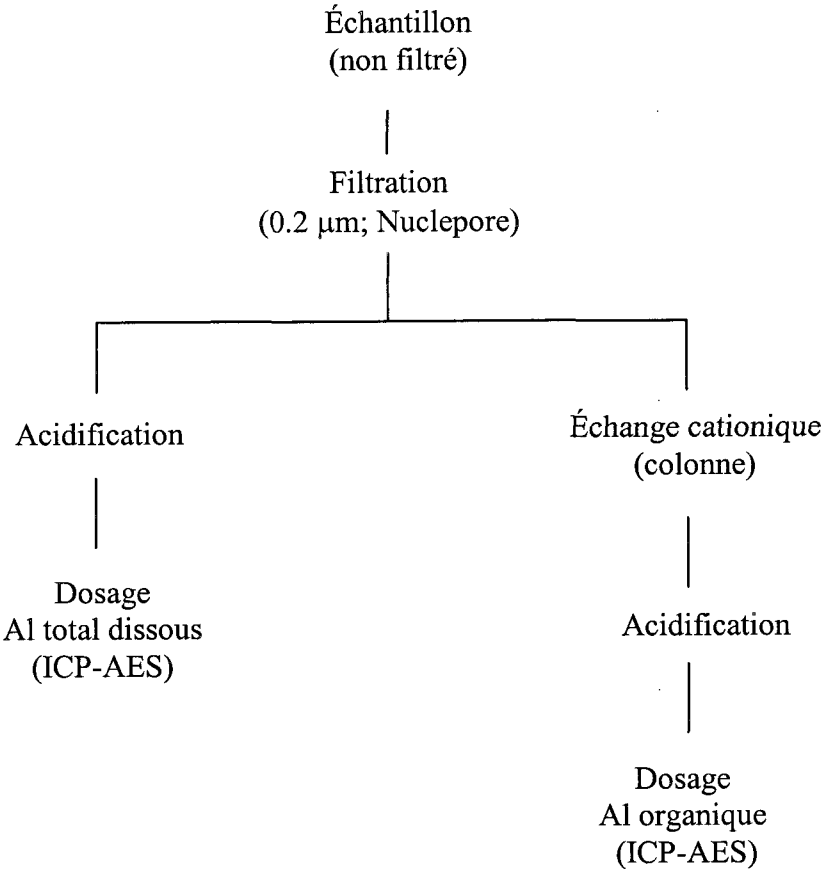


Figure 2.5 : Schéma analytique pour déterminer la spéciation de l'aluminium (adapté de Parent (1991)).

## 2.7 Partie B : Prise en charge de l'aluminium en présence de fluorures

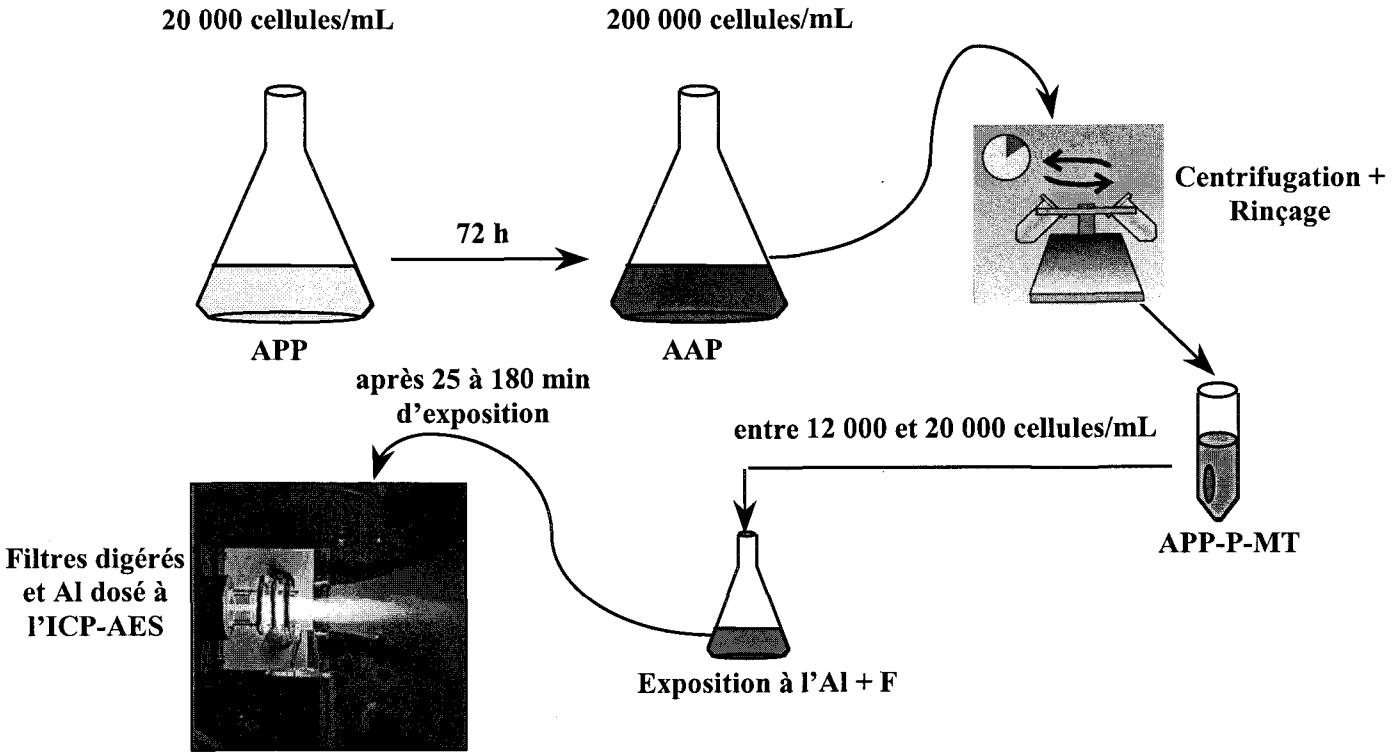


Figure 2.6 : Schéma du montage des expériences sur la prise en charge de l'aluminium avec des fluorures.

### 2.7.1 Culture des algues

Les algues sont utilisées pendant leur phase exponentielle de croissance, c'est-à-dire à 3-4 jours de croissance pour *C. pyrenoidosa*. La méthode utilisée pour faire croître cette algue est expliquée à la section 2.6.1.

### 2.7.2 Centrifugation des algues

Après quatre jours d'incubation, les algues en phase exponentielle de croissance sont centrifugées à 9 000 G pendant 10 min dans douze tubes en PC, dans une centrifugeuse de marque *Sorvall*® (RC 5C *Plus*). Après ce traitement, les algues sont rincées et centrifugées à trois reprises pendant 5 min à 9 000 G dans une solution de rinçage (AAP-P-MT) à pH 5.5, afin d'enlever le phosphate, les métaux traces et les exsudats présents dans le milieu de culture. Ces éléments doivent être enlevés, car ils pourraient interagir avec l'aluminium durant l'expérience et causer un

biais au niveau des résultats (spéciation erronée). Le culot final est resuspendu dans deux tubes en PC dans 10 mL de milieu simplifié (AAP modifié).

### 2.7.3 Préparation des milieux d'exposition

Les milieux d'exposition sont préparés une journée avant l'expérience pour favoriser l'atteinte de l'équilibre physico-chimique. Chaque milieu est préparé en triple; la méthode de préparation de ces milieux d'exposition est expliquée à la section 2.4.2.

### 2.7.4 Exposition des algues

Les expériences de prise en charge sont réalisées avec une biomasse algale qui se situe entre 12 000 et 20 000 cellules·mL$^{-1}$. Les algues sont exposées aux conditions expérimentales décrites plus haut (tableau 2.2) dans des fioles Erlenmeyers de 250 mL contenant 150 mL du milieu d'exposition. Les durées d'exposition ont varié entre 25 min et 3 h. Il est à noter que toutes les expériences sur la prise en charge de l'aluminium ont été réalisées à la lumière (i.e., avec 130 µmol·photons·m$^{-2}$).

### 2.7.5 Récolte et traitement à l'EDTA

Après l'exposition, un volume de 50 mL de la solution d'exposition est filtré sur deux filtres superposés en polycarbonate de 2,0 µm (*Osmonics, Fisher Scientific*) et ces derniers sont rincés trois fois avec une solution de rinçage (AAP-P-MT) afin d'enlever la solution d'aluminium, avec et sans fluorures. Un autre volume de 50 mL est filtré de la même manière, mais seulement après un pré-traitement pendant 10 min avec une solution d'ETDA (concentration finale $10^{-4}$ M) afin de déloger l'aluminium adsorbé au niveau de la surface des algues. Ensuite, les algues sont rincées trois fois avec 10 mL de la solution de rinçage (AAP-P-MT) mentionnée ci-haut. Chaque condition d'exposition est réalisée en triple et pour chaque triplicata, un sous-échantillon du filtrat de la solution d'exposition est recueilli avant les étapes de rinçage pour ensuite doser l'aluminium total à l'ICP-AES. De plus, une portion de 10 mL de chacun des milieux d'exposition est recueillie au début de l'expérience afin d'évaluer la concentration initiale à laquelle les algues sont exposées.

### 2.7.6 Digestion des algues à l'acide nitrique ($HNO_3$ 70%)

Lorsque les filtrations sont terminées, les filtres sont mis à sécher à l'étuve à 60 °C pendant 3 j. Par la suite, chaque filtre est placé dans un tube en PP de 7 mL pour la digestion. On utilise 200 µL

d'acide nitrique concentrée ($HNO_3$ 70%) et 25 µL de peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$) pour digérer les algues. Les digestions sont faites sur une période de 2 h à 100 °C dans un bain-marie à la paraffine. Pour chaque digestion, des filtres sans algues sont digérés afin d'établir le blanc. Lorsque les algues sont digérées, 1.8 mL d'eau ultra-pure est ajouté à la solution pour avoir un volume final de 2 mL par échantillon.

### 2.7.7 Dosage de l'$Al_{total}$ et de l'$Al_{cellulaire}$ à l'ICP-AES

Tous les échantillons sont dosés à l'ICP-AES, dans des solutions acidifiées à 10% d'$HNO_3$. Des étalons sont également préparés à partir d'un standard d'aluminium (*SCP Science* 1000 $\mu g \cdot mL^{-1}$, 4% HCl) afin d'établir la courbe étalon de l'appareil. Les échantillons non-traités à l'EDTA sont dosés pour connaître la concentration totale en aluminium associée aux algues et les échantillons traités à l'EDTA sont dosés pour déterminer la concentration cellulaire en aluminium (i.e., à l'intérieur des algues). En soustrayant la concentration cellulaire de la concentration totale en aluminium associée aux algues, il est donc possible de déterminer la concentration en aluminium adsorbé à la surface des algues. Tous les résultats sont donnés sous forme de concentrations nettes d'aluminium, puisque la concentration d'aluminium retrouvée dans les témoins (voir annexe 8.3) est soustraite de chacune des valeurs d'aluminium retrouvé dans les différents traitements.

## 2.8 Analyses statistiques

Des analyses statistiques ont été nécessaires afin de comparer les points issus des divers traitements (en présence ou non de fluorures, suivant la concentration en aluminium) et de déterminer s'il existe une différence significative entre lesdits points. Pour ce faire, nous avons utilisé le logiciel SYSTAT (2000, version 10 de SPSS Science), en procédant par analyse de variance à une voie (ANOVA). Ce test sous-tend au préalable que certaines conditions soient respectées : la normalité des données (test de Kolmogorov-Smirnov) et l'homogénéité des variances. Le cas échéant et si des différences significatives étaient rencontrées, le test *a posteriori* SNK (Student-Newman-Keuls) était appliqué afin de déterminer quels étaient les points significativement différents.

# CHAPITRE 3: RÉSULTATS

Avant d'aborder la partie « Résultats », il importe de souligner que plusieurs expériences préliminaires ont échoué, parce que l'algue *C. pyrenoidosa* n'a pas pu être récoltée en quantités suffisantes pour réaliser les expériences de toxicité ou de prise en charge. À l'INRS-ETE, les algues *Chlamydomonas reinhardtii* et *Selenastrum capricornutum* sont régulièrement utilisées en laboratoire et elles sont très faciles à cultiver et à récolter par la technique de centrifugation, tandis que *Chlorella* s'avère très difficile à récolter puisqu'elle sécrète beaucoup d'exsudats et s'adhère aux parois des tubes lors de la centrifugation. En situation de stress, *Chlorella* est une algue qui relargue une quantité importante de déchets organiques pouvant adhérer aux surfaces chargées (Jean-Christian Auclair, communication personnelle, 2003). Plusieurs tubes de différentes grandeurs et de différentes constitutions (PP, HDPE et PC) ont été testés pour la centrifugation des algues, mais à chaque fois, ces dernières se sont collées aux parois du tube sans qu'il ne soit possible de récolter une assez grande biomasse pour réaliser une expérience. Pour résoudre ce problème, nous avons décidé d'utiliser la filtration pour récolter les algues lors des tests de toxicité (partie A du projet). Cependant, les tests sur la prise en charge de l'aluminium (partie B) ont été réalisés en utilisant une version modifiée du protocole de centrifugation. Nous avons fortement abaissé la force de rotation du rotor de la centrifugeuse (force G), nous avons utilisé des tubes en téflon (FEP) et nous avons changé la tête de rotor pour favoriser la formation d'un culot concentré au fond des tubes. Ces manipulations ont nécessité beaucoup de travail et beaucoup de temps pour arriver à une méthode fiable et obtenir des résultats reproductibles.

## 3.1 Courbes de croissance obtenues avec *Chlorella pyrenoidosa*

Chaque expérience a été réalisée avec des algues dans leur phase exponentielle de croissance où leur réserve en éléments nutritifs est importante. La phase exponentielle correspond à la troisième ou quatrième journée de croissance pour *C. pyrenoidosa* (figure 3.1). Le début de cette phase de croissance correspond à une densité cellulaire d'environ $10^5$ cellules par mL. Dans cette figure, les écarts types sont calculés sur trois échantillons différents (N= 3).

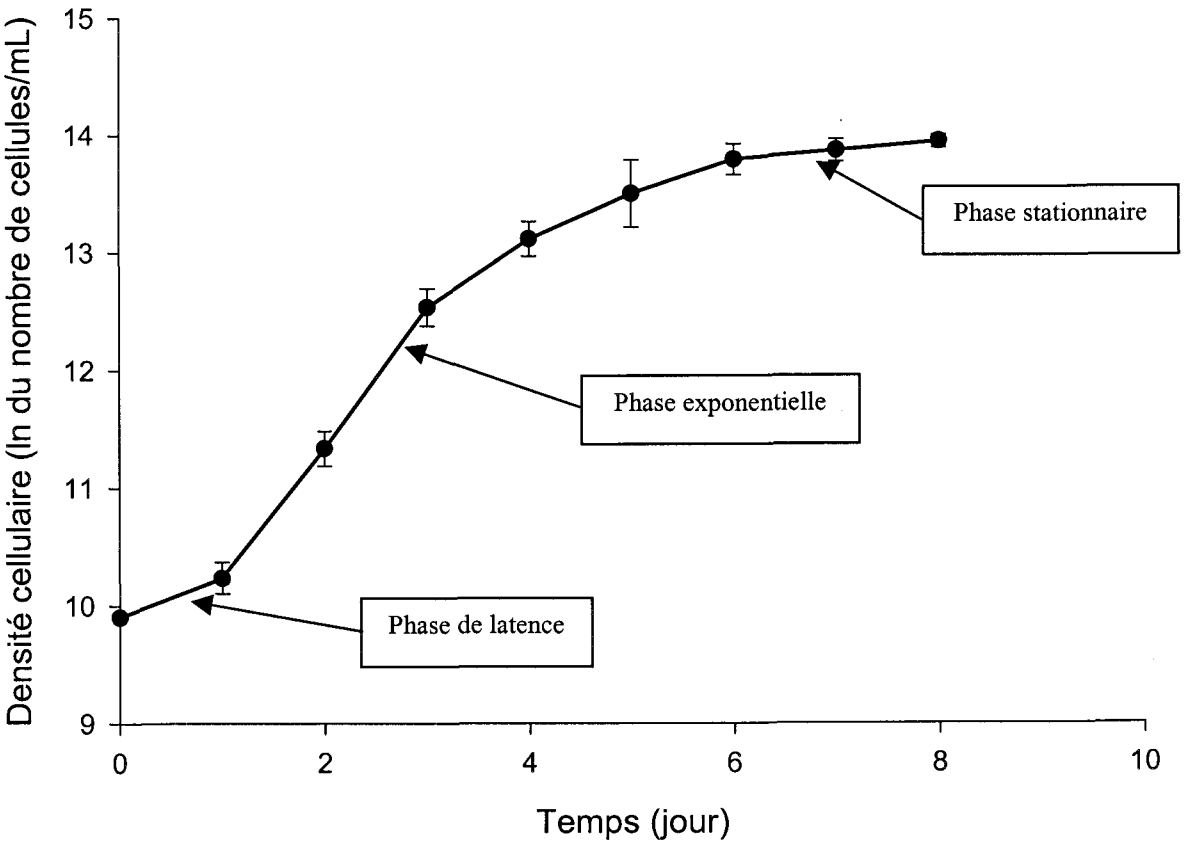


Figure 3.1 : Courbe de croissance typique de *Chlorella pyrenoidosa* dans le milieu AAP modifié, aéré et agité (N = 3). Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de la période de développement.

La figure 3.2 présente les résultats d'une expérience menée en triplicata portant sur la croissance de l'algue *C. pyrenoidosa* dans un milieu de culture sans phosphate et sans métaux traces (AAP-MT-P). En récoltant les algues à leur troisième jour croissance (i.e., phase exponentielle de croissance), on peut voir que ces dernières peuvent maintenir une croissance cellulaire soutenue pendant 4 jours dans un milieu exempt de phosphate. En effet, ces résultats montrent que les algues peuvent vivre sur leur réserve interne de phosphore durant 4 jours sans montrer de baisse au niveau de leur développement.

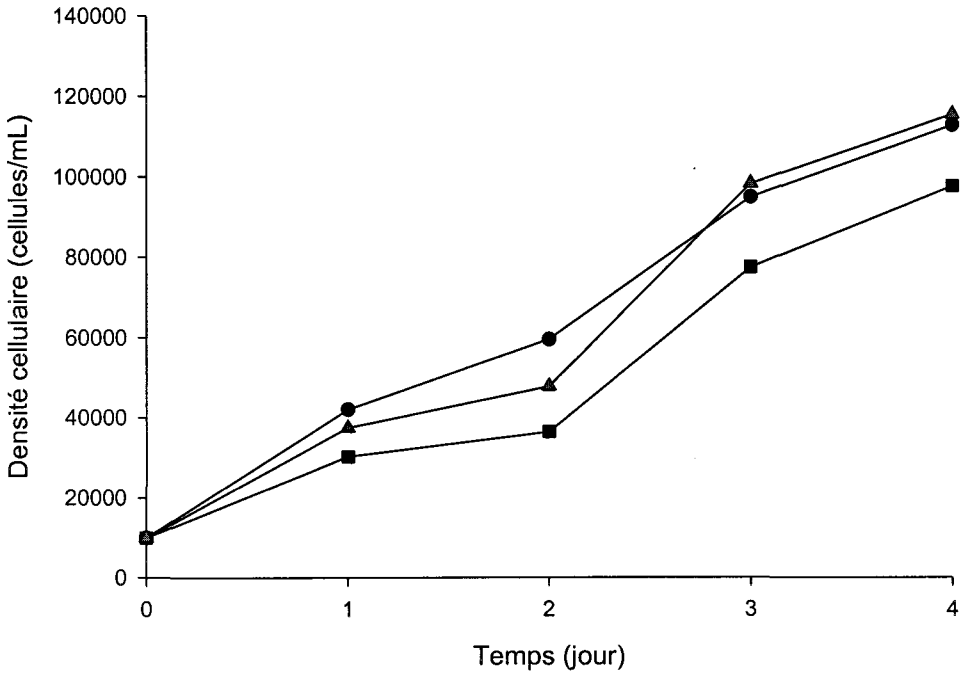


Figure 3.2 : Croissance de l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* dans le milieu de culture simplifié AAP-MT-P, aéré et agité. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. Chaque courbe est un réplicat du même test (N = 3).

Le tableau 3.1 est un aide mémoire pour bien identifier l'expérience qui correspond aux concentrations mesurées en aluminium total et organique pour les deux parties du projet ((A)toxicité et (B)prise en charge). Chaque figure a reçu un numéro d'expérience.

Tableau 3.1 : Numéro d'expérience pour chacune des figures du projet.

| Numéro de figure | Numéro d'expérience |
|---|---|
| Figure 3.3 | Expérience 1A |
| Figure 3.4 | Expérience 2A |
| Figure 3.5A | Expérience 3A |
| Figure 3.5B | Expérience 4A |
| Figure 3.6 | Expérience 5A |
| Figure 3.7 | Expérience 1B |
| Figure 3.8 | Expérience 2B |
| Figure 3.9 | Expérience 3B |
| Figure 3.10 | Expérience 4B |

# 3.2 Partie A : Toxicité des fluoro-complexes d'aluminium

## 3.2.1 Expériences avec aluminium seul

La première partie des résultats portent sur l'étude de toxicité de l'aluminium, avec et sans fluorures, sur l'algue verte *C. pyrenoidosa*. Les deux premières figures présentent la toxicité de l'aluminium seul sur cette algue à pH 5.5. Dans la figure 3.3, les algues ont été recueillies par centrifugation avant le début de l'expérience, tandis que dans la figure 3.4, les algues ont été recueillies par filtration sur des membranes de porosité 0.2 µm avant l'expérience. Ces deux graphiques montrent que l'aluminium est toxique, peu importe la façon par laquelle les algues ont été recueillies. En effet, plus la concentration de l'aluminium augmente, plus la croissance de l'algue diminue. À une concentration correspondant à 0.9 et 1.3 µM d'aluminium seul, on peut constater que la croissance cellulaire de *C. pyrenoidosa* est faible. Une $CE_{30}$ a été calculée pour la figure 3.4 et la valeur obtenue est de 18 (15 – 20) µg/L d'Al pour une exposition de 96 h (i.e., $CE_{30}$ égal à 0.66 µM d'aluminium (intervalles de confiance = 0.55 – 0.74)).

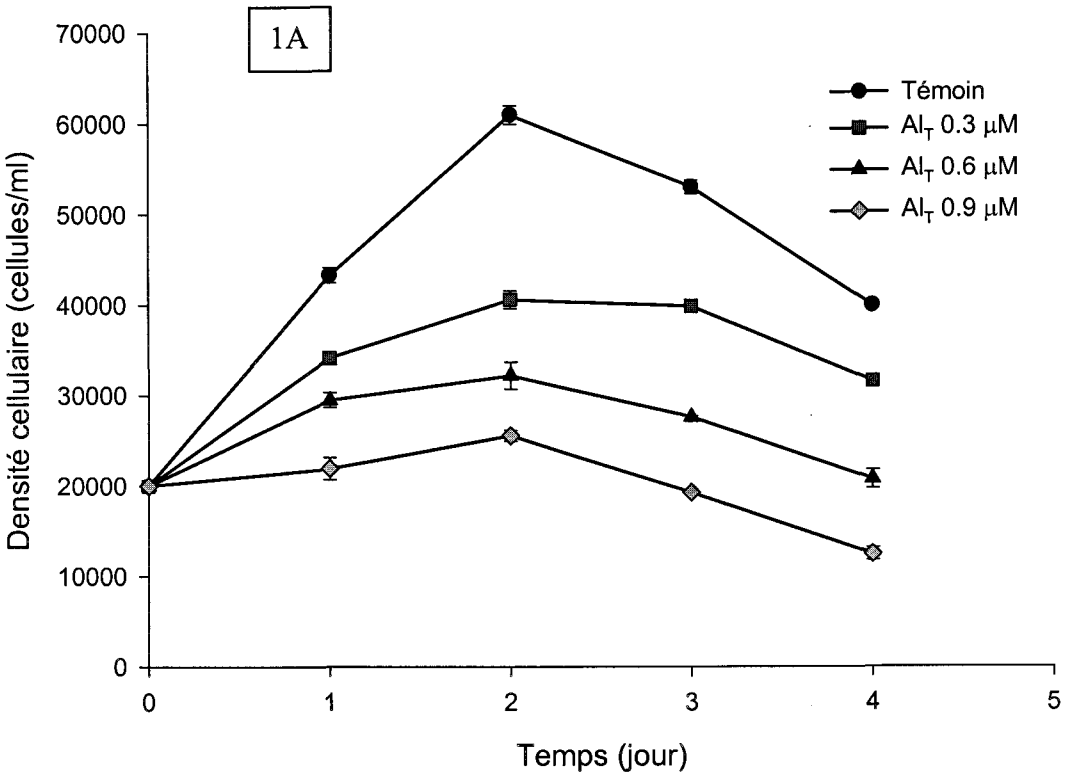


Figure 3.3 : Croissance de *Chlorella pyrenoidosa* en présence de différentes concentrations d'Al seul. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par centrifugation lors de leur phase exponentielle de croissance. Pour une même journée, tous les points sont significativement différents entre chaque concentration ($P < 0.0001$).

À partir du modèle de spéciation chimique MINEQL+ 4.5, il a été possible de calculer la concentration d'ions libres présents pour 0.3 µM d'aluminium en l'absence de fluorures. Les simulations ont donné une valeur de 31 nM d'aluminium libre en solution, concentration à laquelle l'ion libre a été fixé tout au long des expériences subséquentes.

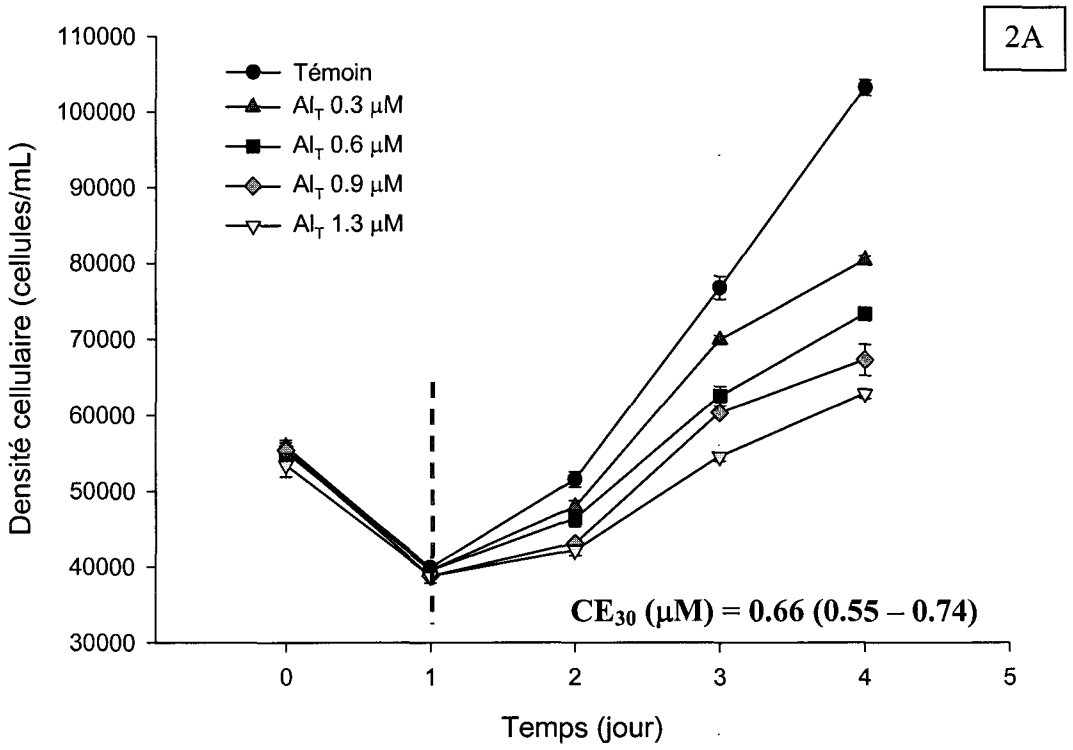


Figure 3.4 : Croissance de *Chlorella pyrenoidosa* en présence de différentes concentrations d'Al seul. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par filtration lors de leur phase exponentielle de croissance. Au jour 4, tous les points sont significativement différents ($P \leq 0.007$).

## 3.2.2 Expériences avec aluminium et fluorures

Les deux prochaines figures présentent les expériences 3A et 4A qui ont été réalisées avec une concentration correspondant à 31 nM d'aluminium libre, où les concentrations totales en aluminium et en fluorures augmentaient conjointement. Les figures 3.5A et 3.5B, aux jours 2, 3 et 4, montrent que seul l'ion libre cause un effet toxique pour la cellule à tous les traitements. Cependant, les deux figures montrent aussi que les fluoro-complexes d'aluminium peuvent avoir un effet toxique sur l'algue, mais seulement à la concentration la plus élevée en aluminium (1.6 µM) et en fluorures (5 µM). Il semble donc y avoir un seuil de toxicité pour les fluoro-complexes d'aluminium, et qu'en dessous d'une certaine concentration en Al et en F complexés, il n'y a pas de toxicité mesurable autre que celle de l'ion libre.

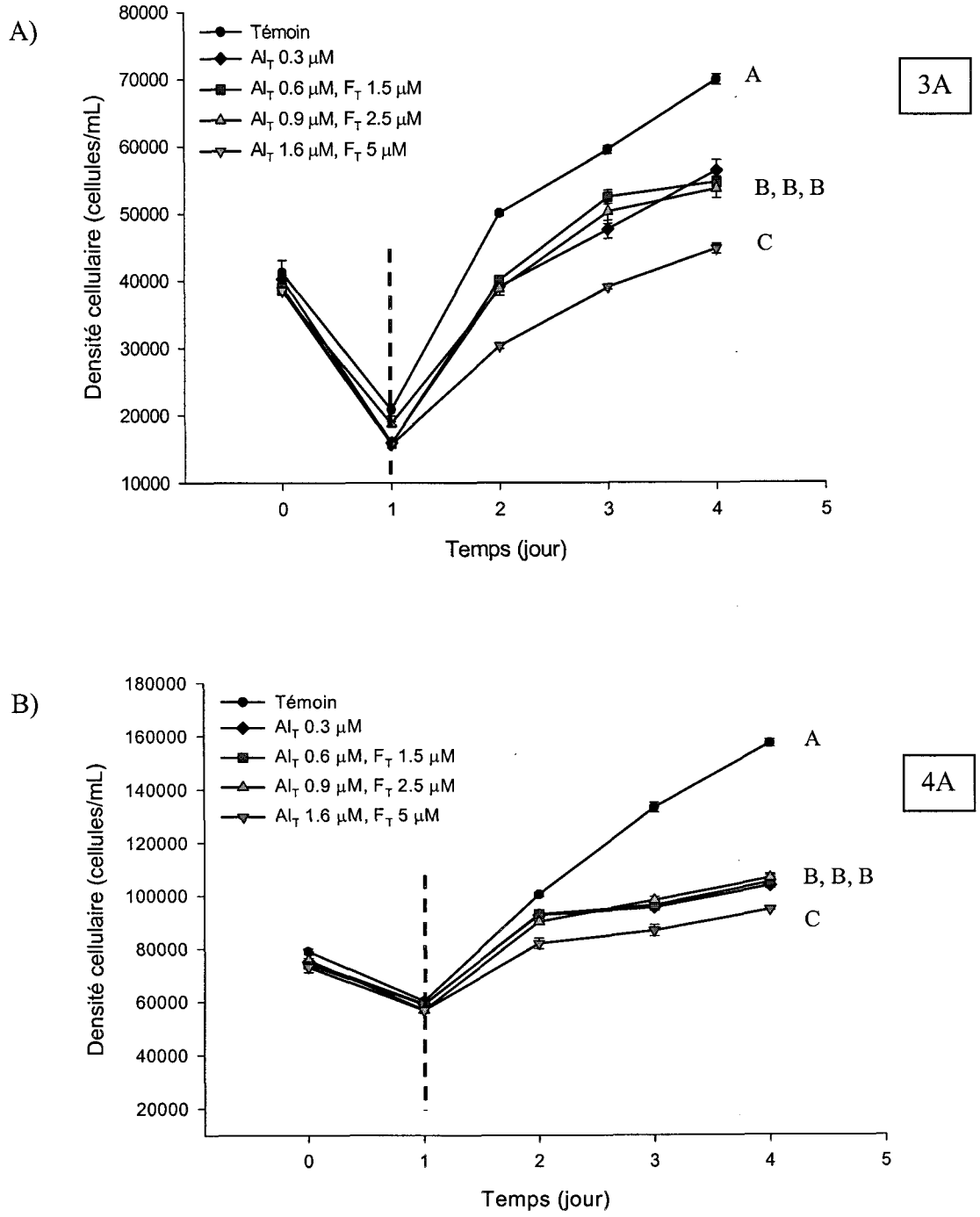


Figure 3.5 : Croissance de *Chlorella pyrenoidosa* en présence de différentes concentrations d'aluminium et de fluorures. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. La concentration de l'ion libre, $Al^{3+}$, était maintenue constante (31 nM). Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par filtration lors de leur phase exponentielle de croissance. Au jour 4, les lettres attribuées à chaque groupe de points changent pour des différences significatives ($P < 0.05$). Les deux graphes correspondent à deux expériences distinctes.

### 3.2.3 Conditions expérimentales durant l'exposition (jour 0 et jour 4)

Le tableau suivant présente les résultats obtenus à l'ICP-AES pour les concentrations d'aluminium total, organique et inorganique lors des expériences de toxicité de l'aluminium sur l'algue verte *C. pyrenoidosa*. Le tableau 3.2 montre que les concentrations en Al demeurent relativement constantes du début jusqu'à la fin des expériences; les concentrations mesurées en aluminium total au jour 4 correspondent sensiblement aux concentrations d'aluminium total mesurées au début de l'expérience. De plus, l'aluminium semble rester majoritairement sous la forme inorganique à la fin de l'expérience, puisque les concentrations mesurées en aluminium organique sont très faibles au jour 4. Il faut également noter que les concentrations mesurées au début des expériences (i.e. concentrations au jour 0) correspondent bien aux concentrations nominales (seule l'expérience 2A montre des écarts appréciables entre les concentrations nominales et mesurées).

Tableau 3.2 : Résultats du dosage de l'aluminium total, organique et inorganique au début et à la fin des expériences de la partie A : Toxicité de l'aluminium avec et sans fluorures.

| | | Jour 0 | Jour 4 | Jour 4 | Jour 4 |
|---|---|---|---|---|---|
| | Échantillon | Al total µM | Al total µM | Al organique µM | Al inorganique µM |
| **Expérience 1A** | Témoin | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 0.3 µM | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.1 |
| | 0.6 µM | 0.6 | 0.4 | 0.0 | 0.4 |
| | 0.9 µM | 0.9 | 0.6 | 0.0 | 0.6 |
| **Expérience 2A** | Témoin | 0.0 | 0.0 | ------- | ------- |
| | 0.3 µM | 0.2 | 0.2 | ------- | ------- |
| | 0.6 µM | 0.4 | 0.3 | ------- | ------- |
| | 0.9 µM | 0.5 | 0.5 | ------- | ------- |
| | 1.3 µM | 0.9 | 0.9 | ------- | ------- |
| **Expérience 3A** | Témoin | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 0.3 µM | 0.3 | 0.3 | 0.0 | 0.3 |
| | 0.6 µM | 0.6 | 0.5 | 0.1 | 0.4 |
| | 0.9 µM | 0.9 | 0.9 | 0.1 | 0.8 |
| | 1.6 µM | 1.6 | 1.6 | 0.2 | 1.4 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Expérience 4A** | Témoin | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.1 |
| | 0.3 µM | 0.4 | 0.3 | 0.0 | 0.3 |
| | 0.6 µM | 0.8 | 0.8 | 0.1 | 0.7 |
| | 0.9 µM | 1.0 | 1.0 | 0.1 | 0.9 |
| | 1.6 µM | 1.8 | 1.7 | 0.3 | 1.4 |
| **Expérience 5A** | Témoin A | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | Témoin B | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | Témoin C | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 0.6 µM | 0.8 | 0.8 | 0.0 | 0.8 |
| | 0.6 µM | 0.7 | 0.7 | 0.0 | 0.7 |
| | 0.6 µM | 0.6 | 0.6 | 0.0 | 0.6 |

* *Limite de détection de l'appareil : 1 µg/L (37 nM)*

***Limite de quantification de l'appareil : 5 µg/L (185 nM)*

La figure 3.6 est présentée pour montrer la reproductibilité des résultats obtenus pour la partie A de l'étude : Toxicité de l'aluminium envers *C. pyrenoidosa*. Même à une concentration aussi faible que 0.6 µM d'aluminium (15 µg/L), on peut voir qu'il y a une diminution significative de la croissance cellulaire durant 4 jours d'exposition. Le tableau 3.3 montrent les résultats statistiques obtenus à partir du logiciel SYSTAT pour les valeurs de densité cellulaire de la figure 3.6. Ces résultats confirment qu'il y a différence significative entre les deux courbes de cette figure. De plus, ces résultats montrent qu'il y une différence significative entre les points de la courbe témoin, mais qu'il n'y pas de différence significative entre les différents points de la courbe à 0.6 µM d'aluminium (15 µg/L), ce qui veut dire qu'il n'y a plus de croissance cellulaire significative pour le traitement à 0.6 µM d'aluminium pour les jours 2, 3 et 4.

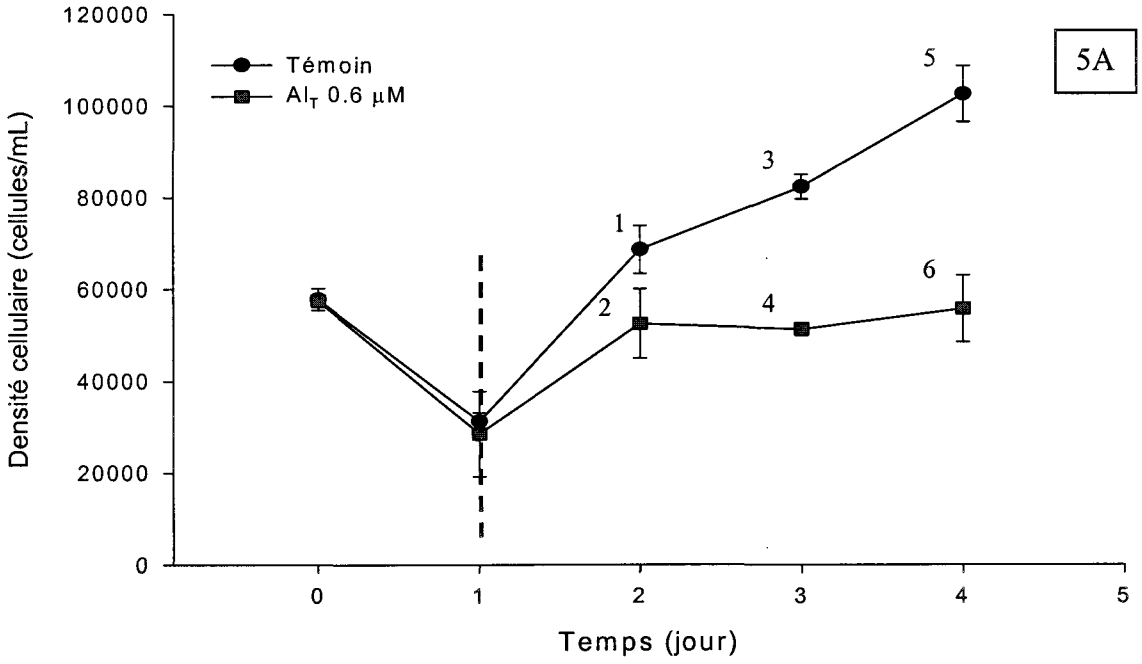


Figure 3.6 : Croissance de *Chlorella pyrenoidosa* en présence de différentes concentrations d'Al seul. Cette expérience a été menée en triplicata (N = 3). Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par filtration lors de leur phase exponentielle de croissance.

Tableau 3.3 : Tableau récapitulatif des statistiques de la figure 3.6 pour les jours 2, 3 et 4. Les différences significatives entre deux points ($P < 0.05$) sont représentées par *, celles non-significatives par X.

| point | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | | | | | |
| 2 | * | | | | | |
| 3 | * | * | | | | |
| 4 | * | X | * | | | |
| 5 | * | * | * | * | | |
| 6 | X | X | * | X | * | |

## 3.3 Partie B : Prise en charge de l'aluminium en présence de fluorures

### 3.3.1 Expériences avec aluminium seul

La figure 3.7 présente les résultats obtenus pour la cinétique de bioaccumulation de l'aluminium seul (0.3 µM) à pH 5.5. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre la prise en charge totale d'aluminium (les ronds) et la prise en charge intracellulaire d'aluminium (les carrés). En d'autres termes, on ne peut détecter d'aluminium adsorbé à la paroi des cellules même après 90 minutes d'exposition. Les résultats montrent également qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes périodes de prise en charge d'aluminium (i.e., 25, 50 et 90 minutes), sauf entre la prise en charge intracellulaire à 50 minutes et à 90 minutes. À partir de ces résultats, et en tenant compte de ceux obtenus par Parent (1991), j'ai choisi un temps d'exposition de 90 minutes.

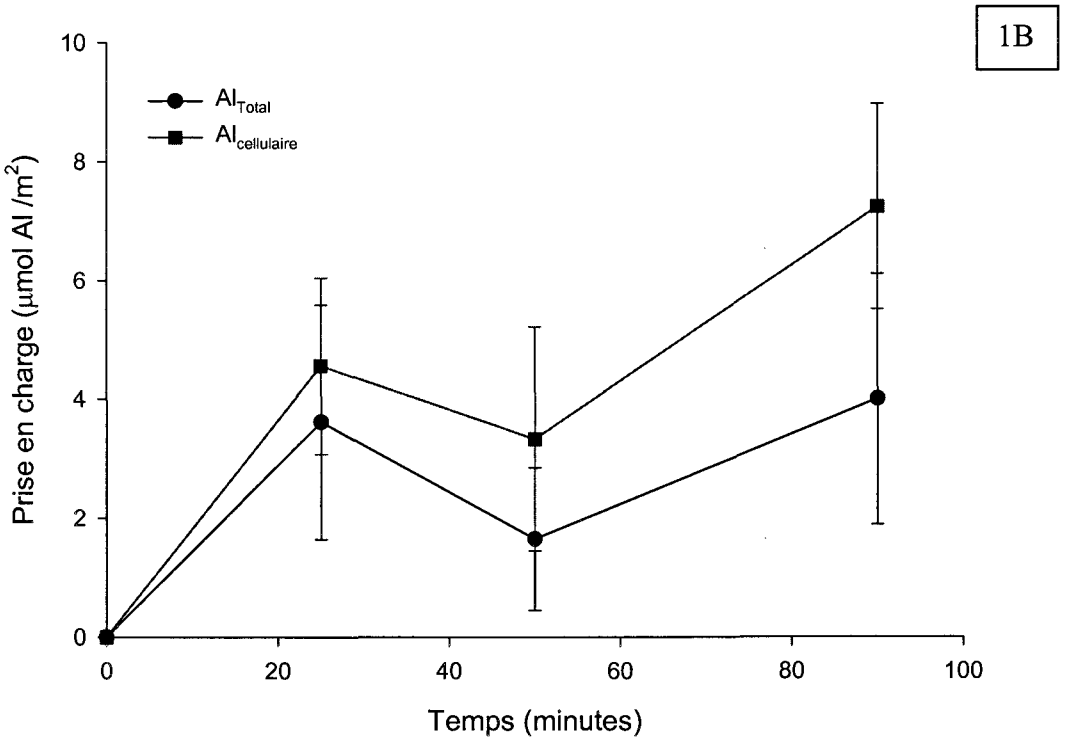


Figure 3.7 : Prise en charge nette de l'aluminium seul en fonction du temps d'exposition. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. La concentration de l'ion libre ($Al^{3+}$) était ajustée à 31 nM et la concentration totale en Al à 0.3 µM. Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par centrifugation lors de leur phase exponentielle de croissance. Cette expérience a été menée en triple (N = 3; trois fioles sacrifiées à chaque pas de temps). Les points de l'aluminium intracellulaire à 50 et 90 minutes (i.e., les carrés) sont significativement différents (P = 0.032). Tous les autres points ne sont pas significativement différents entre eux (P >0.280); le point d'origine n'est pas considéré dans cette comparaison, puisqu'il représente le témoin.

La figure 3.8 présente les résultats obtenus lors d'une expérience de prise en charge à différentes concentrations d'aluminium seul à pH 5.5 après 90 min d'exposition. Les résultats montrent que la prise en charge totale d'aluminium est significativement supérieure à la prise en charge intracellulaire. En fait, il y a une concentration mesurable d'aluminium adsorbé au niveau des parois cellulaires pour cette expérience (i.e., adsorbé = total - cellulaire). De plus, les résultats montrent que les algues bioaccumulent davantage d'aluminium à une exposition de 1.3 µM qu'à une concentration de 0.6 µM ou 0.3 µM d'aluminium seul (le point 6 présente une barre d'erreur exagérée, puisqu'une des valeurs obtenues est aberrante (presque zéro)). Le tableau 3.4 présente les résultats des analyses statistiques relatifs à la figure 3.8.

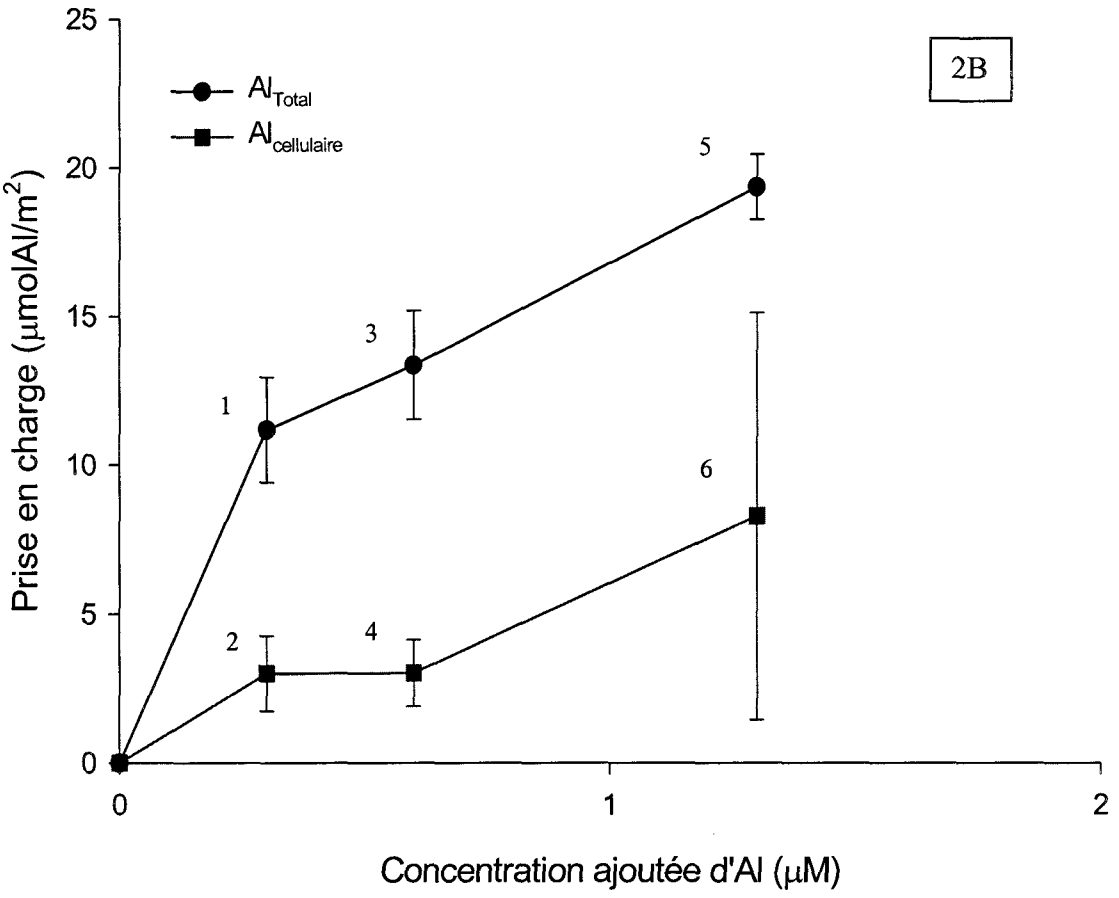


Figure 3.8 : Prise en charge nette de l'aluminium en fonction de différentes concentrations d'aluminium seul. Cette expérience a été menée en triplicata (N = 3; trois fioles sacrifiées à chacune des concentrations appliquées) sur une période de 90 minutes. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par centrifugation lors de leur phase exponentielle de croissance.

Tableau 3.4 : Tableau récapitulatif des statistiques de la figure 3.8 pour les concentrations 0.3, 0.6 et 1.3 µM. Les différences significatives entre deux points (P< 0.05) sont représentées par *, celles non-significatives par X.

| point | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | | | | | |
| 2 | * | | | | | |
| 3 | X | * | | | | |
| 4 | * | X | * | | | |
| 5 | * | * | * | * | | |
| 6 | X | X | X | X | * | |

## 3.3.2 Expériences avec aluminium et fluorures

La figure 3.9 montre que les algues ne semblent pas bioaccumuler les fluoro-complexes d'aluminium, puisque les trois niveaux d'exposition de cette expérience correspondent à 31 nM d'aluminium libre et les deux derniers niveaux de contamination impliquent en plus des fluoro-complexes d'aluminium (0.9 µM d'Al avec 2.5 µM de F et 1.6 µM d'Al et 5 µM de F). En effet, il n'y a pas d'augmentation significative de la bioaccumulation d'aluminium dans le dernier niveau de contamination de cette expérience, où les concentrations en Al et en F correspondent à la plus forte diminution de croissance lors des tests de toxicité (voir figures 3.5A et 3.5B). De plus, les résultats suggèrent qu'il n'y ait pas de différence significative entre la prise en charge totale d'aluminium et la prise en charge intracellulaire d'aluminium, ce qui pourrait laisser croire qu'il n'y a pas eu d'aluminium adsorbé dans cette expérience. Cependant, les barres d'erreur sont très grandes comparativement à celles de la figure 3.8 où il y avait différence significative entre l'$Al_{Total}$ et l'$Al_{Cellulaire}$, donc les résultats ne peuvent pas être concluants quant à la présence d'$Al_{Adsorbé}$ sur la paroi cellulaire des algues.

La figure 3.10 présente une répétition de cette expérience de prise en charge de l'aluminium par l'algue *Chlorella*, avec et sans fluorures. D'abord, il n'y a pas de différence significative au niveau de la bioaccumulation d'aluminium de tous les traitements. Encore une fois, la hausse de la concentration des fluoro-complexes d'aluminium ne semble pas mener à une augmentation

mesurable de la prise en charge d'aluminium. Cependant, les résultats montrent qu'il y a une différence significative ($p < 0.05$) entre la prise en charge totale d'aluminium et la prise en charge intra-cellulaire d'aluminium pour le premier et le dernier niveau de contamination. Le tableau 3.5 présente finalement les résultats des calculs statistiques obtenus avec le logiciel SYSTAT relatif à la figure 3.10.

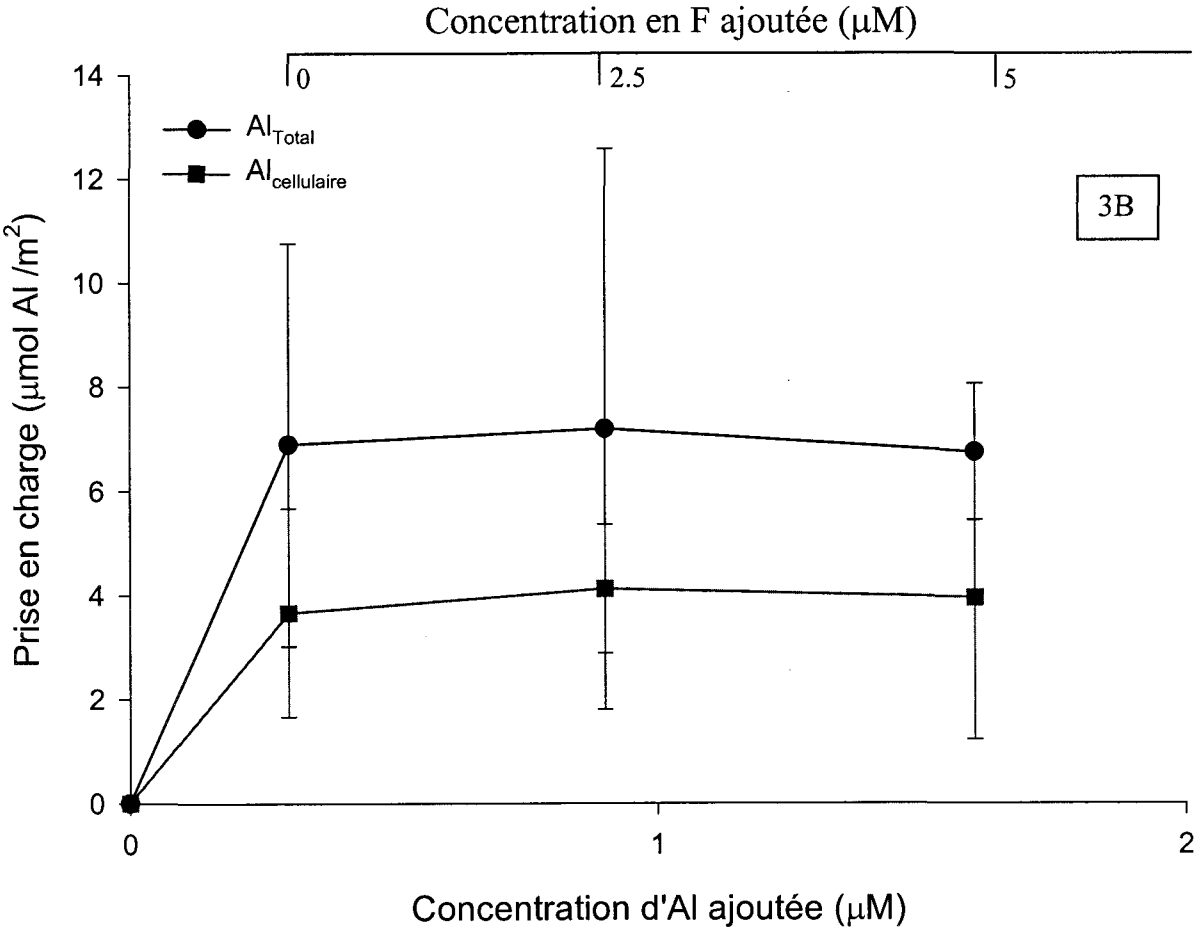


Figure 3.9 : Prise en charge nette de l'aluminium en fonction de différentes concentrations d'aluminium et de fluorures. Cette expérience a été menée en triplicata (N = 3) sur une période de 90 minutes. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. La concentration de l'ion libre, $Al^{3+}$, était maintenue constante (31 nM). Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par centrifugation lors de leur phase exponentielle de croissance. Tous les points ne sont pas significativement différents entre eux (P = 1.000), mis à part le point d'origine qui représente le témoin.

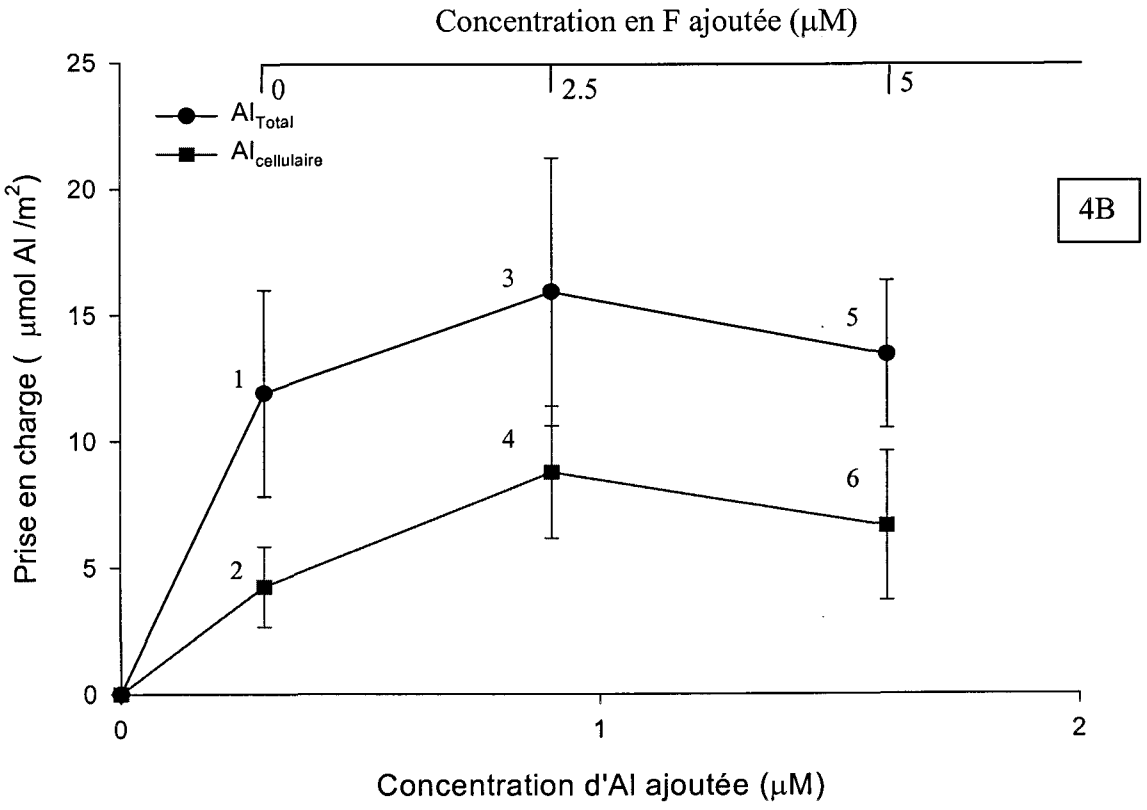


Figure 3.10 : Prise en charge nette de l'aluminium en fonction de différentes concentrations d'aluminium et de fluorures. Cette expérience a été menée en triplicata (N = 3) sur une période de 90 minutes. Le pH était ajusté à 5.5 une journée avant le début de l'expérience. La concentration de l'ion libre, $Al^{3+}$, était maintenue constante (31 nM). Pour chacun des traitements, les algues ont été récoltées par centrifugation lors de leur phase exponentielle de croissance.

Tableau 3.5 : Tableau récapitulatif des statistiques de la figure 3.10 pour les concentrations 0.3, 0.6 et 1.6 µM. Les différences significatives entre deux points ($P < 0.05$) sont représentées par *, celles non-significatives par X.

| point | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | | | | | |
| 2 | * | | | | | |
| 3 | X | * | | | | |
| 4 | X | X | X | | | |
| 5 | X | * | X | X | | |
| 6 | X | X | * | X | * | |

Le tableau 3.6 présente les concentrations d'aluminium total dissous mesurées suite aux expériences de prise en charge de l'aluminium seul et avec fluorures. Les résultats montrent que les concentrations mesurées à l'expérience 1B sont semblables aux concentrations nominales (0.3 µM pour les trois temps : 25, 50 et 90 min). Pour le reste des résultats, les concentrations mesurées sont légèrement inférieures aux concentrations désirées; cependant, cette légère diminution de concentration en Al par rapport à la concentration nominale est observée pour tous les traitements.

Tableau 3.6 : Résultats du dosage de l'aluminium total dissous à la fin des expériences de la partie B : Prise en charge de l'aluminium avec et sans fluorures.

| | | Concentration mesurée à la fin |
|---|---|---|
| | Échantillon | Al total µM |
| **Expérience 1B** | Témoin A | 0.0 |
| | Témoin B | 0.0 |
| | Témoin C | 0.0 |
| | Temps 1 A | 0.3 |
| | Temps 1 B | 0.2 |
| | Temps 1 C | 0.3 |
| | Temps 2 A | 0.3 |
| | Temps 2 B | 0.3 |
| | Temps 2 C | 0.3 |
| | Temps 3 A | 0.3 |
| | Temps 3 B | 0.2 |
| | Temps 3 C | 0.3 |
| **Expérience 2B** | Témoin A | 0.1 |
| | Témoin B | 0.0 |
| | Témoin C | 0.0 |
| | 0.3 µM A | 0.3 |
| | 0.3 µM B | 0.2 |
| | 0.3 µM C | 0.3 |
| | 0.6 µM A | 0.5 |
| | 0.6 µM B | 0.4 |
| | 0.6 µM C | 0.4 |
| | 1.3 µM A | 1.0 |
| | 1.3 µM B | 1.0 |
| | 1.3 µM C | 1.0 |

| | | |
|---|---|---|
| **Expérience 3B** | Témoin A | 0.0 |
| | Témoin B | 0.0 |
| | Témoin C | 0.0 |
| | 0.3 µM A | 0.2 |
| | 0.3 µM B | 0.2 |
| | 0.3 µM C | 0.2 |
| | 0.9 µM A | 0.7 |
| | 0.9 µM B | 0.7 |
| | 0.9 µM C | 0.7 |
| | 1.6 µM A | 1.3 |
| | 1.6 µM B | 1.3 |
| | 1.6 µM C | 1.2 |
| **Expérience 4B** | Témoin A | 0.0 |
| | Témoin B | 0.0 |
| | Témoin C | 0.0 |
| | 0.3 µM A | 0.2 |
| | 0.3 µM B | 0.2 |
| | 0.3 µM C | 0.3 |
| | 0.9 µM A | 0.8 |
| | 0.9 µM B | 0.8 |
| | 0.9 µM C | 1.0 |
| | 1.6 µM A | 1.3 |
| | 1.6 µM B | 1.3 |
| | 1.6 µM C | 1.4 |

* *Limite de détection de l'appareil : 1 µg/L (37 nM)*

***Limite de quantification de l'appareil : 5 µg/L (185 nM)*

# CHAPITRE 4: DISCUSSION

## 4.1 Aspects méthodologiques

Dans cette étude, il y a eu plusieurs modifications au protocole afin d'optimiser la fiabilité des résultats. D'abord, nous avons eu certains problèmes avec la procédure de lavage et de récolte des algues par centrifugation (procédure utilisée dans le travail de Parent (1991)). Nos premiers essais avec la centrifugation ont donné des rendements variables et souvent très faibles. Nous avons réussi à faire une expérience de toxicité avec des algues récoltées par centrifugation (figure 3.3), mais ensuite il a fallu adopter la technique par filtration (figures 3.4 → 3.6) pour les autres expériences de toxicité (partie A).

Pour être en mesure de suivre la prise en charge de l'aluminium chez *C. pyrenoidosa* (partie B), il nous faillait une méthode plus douce que la filtration utilisée dans la partie A de cette étude. Nous avons investi beaucoup de temps à développer un protocole de centrifugation qui ne menait pas à des pertes de biomasse importantes. Les modifications clés ont été d'appliquer une plus faible vitesse de rotation (force de G moindre), de changer le rotor de la centrifugeuse afin de permettre aux tubes d'atteindre un angle horizontal de 180 degrés, ce qui minimisait les pertes d'algues sur les parois des tubes, et finalement de changer la nature même des tubes (i.e., favoriser les tubes en Téflon).

Grâce à ces changements, la centrifugation est redevenue la méthode la plus appropriée pour récolter de grandes biomasses algales. Si on compare les figures 3.3 (centrifugation préalable) et 3.4 (filtration préalable), on note que la centrifugation semble plus « douce » comme technique de pré-concentration, c'est-à-dire que les algues n'ont montré aucune phase de latence au début de leur croissance dans les milieux témoins. Dans le cas de la filtration préalable (figure 3.4), on note une baisse considérable du nombre d'algues au cours de la première journée, témoignant d'un certain stress associé à l'étape de filtration. Signalons, cependant, qu'après cette baisse initiale, les algues « survivant » à la filtration ont poussé aussi bien que celles récoltées par centrifugation (cf. figure 4.1).

De plus, la méthode analytique standard par autoanalyse à flux continu et colorimétrie au catéchol violet (méthode servant à doser l'aluminium monomère total et monomère organique) n'a pas pu être utilisée dans cette étude, parce que les limites de détection obtenues avec nos solutions de travail n'étaient pas assez basses pour nos besoins. En effet, la méthode par colorimétrie procure beaucoup d'informations au niveau de la spéciation de l'aluminium, mais les concentrations utilisées dans cette étude étaient trop faibles pour qu'on puisse les doser avec cet appareil. Pour résoudre ce problème, une méthode « artisanale » a été élaborée à partir d'une colonne avec une résine échangeuse d'ions jumelée manuellement à un appareil ICP-AES pour le dosage de l'aluminium total et organique (voir figure 2.4). Cette méthode a permis de doser l'aluminium total dissous et l'aluminium non-échangeable dans les différents milieux d'exposition. Des expériences antérieures (Campbell et al., 1984; Driscoll et Schecher, 1990) ont montré que l'aluminium dissous non-échangeable correspond normalement à l'aluminium organique, fortement complexé.

Au niveau des tests de toxicité, plusieurs expériences ont été réalisées pour obtenir une bonne reproductibilité des résultats, puisque les concentrations utilisées lors des tests étaient très faibles (i.e., à des concentrations traces) et *Chlorella* elle-même était difficile à utiliser, étant très sensible aux différentes manipulations. En fait, plusieurs expériences préliminaires ont donné des résultats intraitables, ce qui a rallongé la durée du projet.

## 4.2 Comparaison des résultats avec la littérature

### 4.2.1 Partie A : Toxicité des fluoro-complexes d'aluminium

Dans la littérature, plusieurs indicateurs de croissance sont utilisés dans les expériences de toxicité avec les algues. Parmi les plus fréquemment utilisés, on retrouve la biomasse finale (cellules/mL), le taux de croissance maximal ($\mu$ max) et l'aire sous la courbe de croissance (A). Chacun de ces paramètres de croissance intègre des processus physiologiques qui sont souvent différents (Nyholm, 1985).

Le paramètre de croissance le plus utilisé est la biomasse finale (cellules/mL), puisque c'est un paramètre facile à obtenir, il est sensible et il permet de calculer la concentration effective qui diminue la biomasse finale d'un pourcentage choisi (ex. 50 ou 30%) par rapport au témoin (Nyholm, 1985). Par contre, le paramètre de biomasse après 4 jours d'incubation n'est pas tellement reproductible. Pour cette raison, il n'a pas été utilisé comme indicateur de croissance absolu pour la suite de l'interprétation des résultats.

Le taux de croissance maximal (μ max) est préférable à la biomasse algale finale en raison du caractère spécifique du mode exponentiel de croissance des algues. En effet, le taux de croissance maximal est spécifique d'une espèce à l'autre. Il rend compte des caractéristiques de croissance intrinsèque à une espèce. En fait, il se mesure facilement en laboratoire sous des conditions optimales et contrôlées. Cependant, Nyholm (1985) estime qu'il existe une grande incertitude associée aux transformations log des faibles densités cellulaires. C'est pourquoi il suggère de ne pas transformer en log les densités cellulaires initiales.

L'indicateur de croissance utilisé dans ce travail est l'aire sous la courbe (A). Cette méthode intègre le stress subit par les algues sur toute la période de croissance. La procédure utilisée s'inspire de celle mentionnée dans Wong et Couture (1986), en additionnant l'aire entre les points successifs d'une courbe. L'aire sous la courbe est calculée par l'intégration de trapézoïdes successifs qui équivalent à la construction d'une courbe de croissance en liant les points avec une ligne. C'est un paramètre très sensible et pour des fins de comparaison avec la littérature, nous avons utilisé cet indicateur de croissance.

#### 4.2.1.1 Expériences avec aluminium seul

Les mécanismes de toxicité de l'aluminium changent en fonction des concentrations présentes dans le milieu d'exposition. À de faibles concentrations en aluminium, l'algue a tendance à séquestrer l'aluminium intracellulaire dans des vésicules de polyphosphate comme processus de détoxication. Après quelques jours de croissance (3 – 4), la demande en phosphore devient plus critique pour assurer le maintien et la croissance des algues, puisque le phosphore interne n'est plus disponible, étant associé à l'aluminium dans les vésicules (Parent, 1991). Ce phénomène implique une diminution de l'utilisation du phosphore interne pour certaines activités biochimiques vitales (i.e., réduction de l'activité de l'acide phosphatase, inhibition de la synthèse d'ATP) (Gensemer et Playle, 1999).

De façon générale, l'aluminium a été très toxique pour l'algue verte *C. pyrenoidosa*. Peu importe la façon de recueillir les algues, l'aluminium a causé un effet toxique mesurable sur le développement cellulaire subséquent de cette algue unicellulaire. Dans la littérature, il y a plusieurs études qui ont démontré l'effet toxique de l'aluminium seul sur différents producteurs primaires (Kinraide et Parker, 1987; Parker et al., 1988; Kinraide et Parker, 1989; Parent et Campbell, 1994). Selon Parent et Campbell (1994), la concentration à laquelle la croissance de *C.*

*pyrenoidosa* diminue de 30% ($CE_{30}$ après 96 heures) est égale à 53 µg/L d'aluminium monomère (2.0 µM) à pH 5.5. Dans notre étude, la valeur de la $CE_{30}$ en absence de fluorures est égale à 18 µg/L d'aluminium dissous (limites de confiance à 95% de 15 à 20 µg/L) pour le même pH (i.e., 0.66 (0.55 – 0.74) µM d'Al dissous). La valeur de la $CE_{30}$ obtenue dans cette étude est semblable à celle obtenue par Helliwell et al. (1983) où une concentration de 15 µg/L d'aluminium dissous (i.e., 0.60 µM d'Al dissous) à pH 5.4 inhibait de 50% la croissance des algues en solution. Dans notre cas, les algues utilisées ont montré une plus grande sensibilité que dans l'étude de Parent et Campbell (1994). Il se peut que ce soit parce que l'ensemble des tests de toxicité de cette étude a été réalisé à partir d'une toute nouvelle souche d'algues de l'Université de Toronto (UTCC 89) et qu'aucun processus d'acclimatation à l'aluminium n'a pu se produire. En effet, *Chlorella* a été cultivée et transférée uniquement dans des fioles Erlenmeyers en polycarbonate pour éviter toute contamination ou acclimatation à l'aluminium, ce qui pourrait expliquer une plus grande sensibilité des algues dans notre cas. Deuxièmement, les algues utilisées dans les expériences de croissance de Parent (1991) étaient centrifugées au lieu de filtrées comme dans notre cas; il était donc plausible que les algues des expériences de Parent (1991) étaient moins stressées que celles utilisées dans notre projet de recherche. Cependant, la figure 4.1 montre que l'aire sous la courbe (A) obtenue dans nos expériences est légèrement plus élevée que celle obtenu par Parent (1991), ce qui indique que la filtration préalable n'a pas causé d'inhibition ou de stress à long terme.

Cette analyse de la croissance algale confirme que malgré un taux de croissance légèrement supérieur pour nos expériences, nos algues ont été plus sensibles à l'aluminium que celles de Parent (1991). En fait, la figure 4.1 confirme que c'est vraiment la sensibilité des algues, et non pas des différences de croissance algale entre les témoins, qui expliquerait la différence au niveau des valeurs de $CE_{30}$ à pH 5.5 après 96 h d'exposition. Par ailleurs, Parent (1991) a utilisé la centrifugation comme technique de pré-concentration contrairement à la filtration dans notre cas. Vraisemblablement, il devait y avoir davantage d'exsudats transférés dans le milieu d'exposition et davantage de complexation dans le cas de Parent (1991), car la centrifugation enlève moins bien les exsudats que la filtration lors de l'étape de pré-concentration des algues. Cette plus grande quantité d'exsudats et une plus grande complexation de l'Al ($[Al^{3+}] \downarrow$) dans les milieux d'exposition de Parent (1991) auraient eu aussi pour effet de « diminuer la biodisponibilité du métal en solution ».

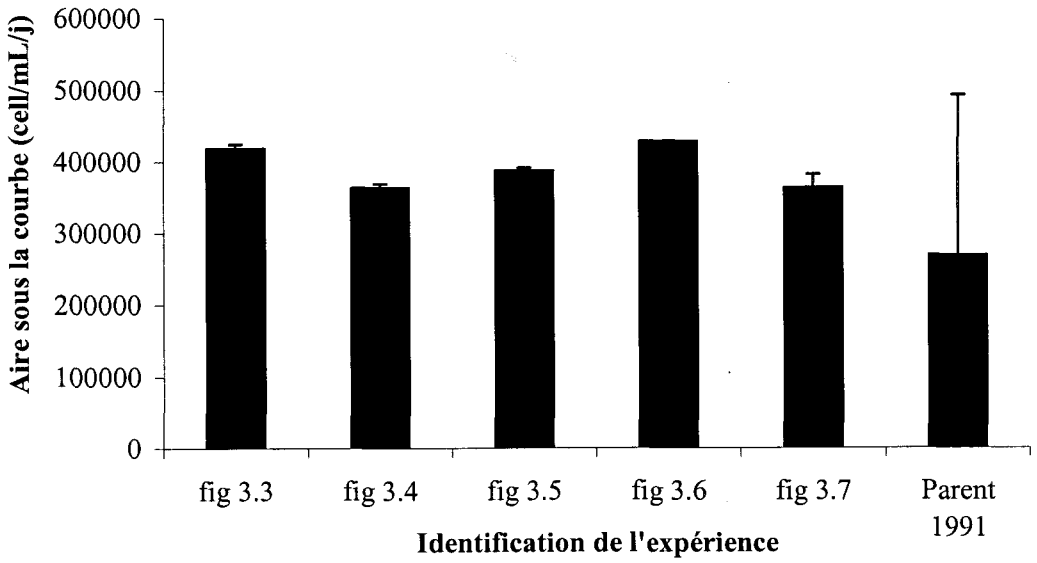


Figure 4.1 : Aire sous la courbe (A) des témoins de chacune des expériences portant sur la toxicité des fluoro-complexes d'aluminium sur l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* à pH 5.5 (inoculum égal à 100000 cellules/mL). La dernière bande correspond à l'aire sous la courbe obtenue par Parent (1991) sous les mêmes conditions de croissance.

Gensemer et Playle (1999) ont fait une revue de littérature exhaustive sur la biodisponibilité et la toxicité de l'aluminium en milieu aquatique et ils arrivent à la conclusion que les *Chlorophyceae* (dont *C. pyrenoidosa*) sont des algues relativement sensibles à l'aluminium. À des pH entre 5.5 et 6, la toxicité est forte puisque la proportion d'aluminium présente sous forme d'$Al^{3+}$ est appréciable (ex. 10% à pH 5.5) et la compétition de ce métal avec l'ion $H^+$ est relativement faible. En fait, la toxicité de l'aluminium est surtout dépendante du pH, puisque le proton compétitionne avec l'aluminium pour les sites de complexation au niveau de la membrane cellulaire des algues à bas pH, et à pH élevé, la spéciation de l'aluminium dissous change et sa toxicité (exprimée en terme d'Al-dissous) diminue (Parent et Campbell, 1994; Gensemer et Playle, 1999).

Dans la figure 3.3, la réponse toxique des algues à la présence d'aluminium a été plus grande que la réponse toxique de ces dernières dans la figure 3.4. De plus, on note une diminution marquée de la croissance cellulaire après 2 jours d'exposition, même dans le témoin. Cette chute de croissance cellulaire précoce peut s'expliquer par le fait que les algues utilisées dans cette expérience ont été récoltées un peu tard dans leur phase exponentielle de croissance (i.e., au jour 5); donc, leur réserve intracellulaire de phosphore était probablement insuffisante pour soutenir une croissance algale pendant cinq jours. En effet, les algues ont été récoltées au cinquième jour de croissance, parce que nous avions besoin d'une biomasse suffisante dans les milieux de culture avant le début des tests. Malgré cette carence en phosphore occasionnée par une récolte tardive des

algues, l'expérience 1A (figure 3.3) a néanmoins donné des résultats utiles, lesquels ont été confirmés par ceux de l'expérience 2A (figure 3.4). Dans cette seconde expérience, la croissance algale a chuté considérablement au jour 1 pour remonter par la suite, conséquence de la filtration des algues avant l'exposition. La procédure de filtration semble provoquer un grand stress pour ces algues, malgré les précautions que nous avons prises (pression < que 130 mm de Hg, algues gardées humides sur les filtres, etc.). Cependant, la population de *C. pyrenoidosa* a récupéré rapidement suite à ce stress. Donc, la technique par filtration s'est avérée le meilleur compromis pour recueillir et rincer les algues avant le début des expériences de toxicité de l'aluminium, puisque la technique par centrifugation utilisée à cette époque ne fonctionnait pas.

La figure 4.2 montre que l'aluminium a eu un impact plus grand sur la croissance de l'algue dans l'expérience 1A que dans l'expérience 2A. Cette différence au niveau de la croissance serait expliquée par le fait que les algues utilisées à l'expérience 1A étaient plus vieilles (i.e., récolte tardive au niveau de leur phase exponentielle de croissance) et moins aptes à tolérer cette exposition à l'aluminium.

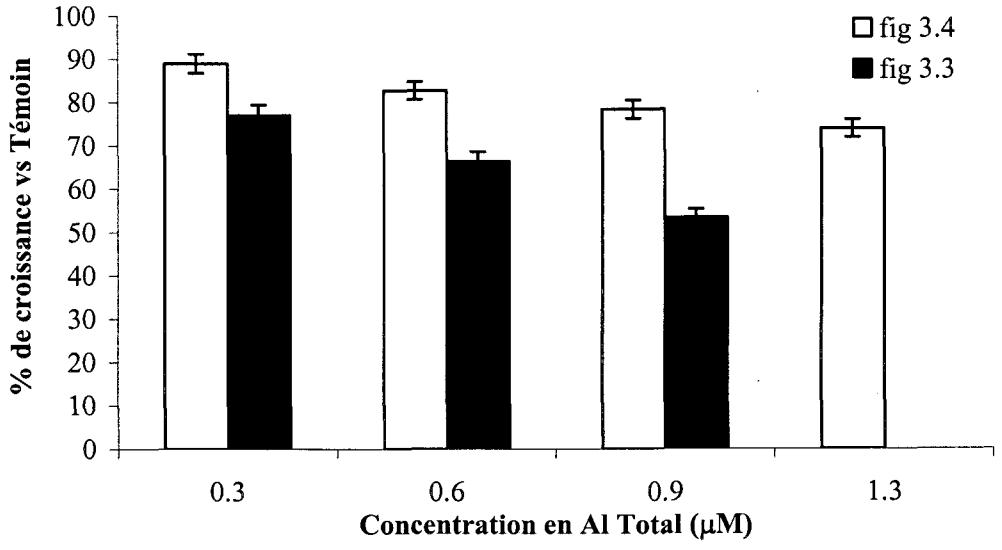


Figure 4.2 : Inhibition de la croissance algale à pH 5.5 en fonction de la concentration totale nominale d'aluminium. L'inhibition est exprimée en pourcentage de croissance par rapport au contrôle.

### 4.2.1.2 Expériences avec aluminium et fluorures

Les résultats de toxicité obtenus avec l'aluminium et les fluorures vont dans le même sens que les résultats obtenus par Wilkinson et al. (1990). À une certaine concentration en aluminium (1.6 μM) et en fluorures (5 μM), on peut voir une toxicité attribuable aux fluoro-complexes d'aluminium sur la croissance des algues. Selon Wilkinson et ses collaborateurs (1990), les fluoro-complexes d'aluminium causeraient un effet toxique mesurable sur le saumon Atlantique juvénile, mais moindre que celle de l'aluminium seul. Les expériences 4A et 5A ont montré qu'avec une concentration constante d'aluminium libre (égale à 31 nM), la toxicité de l'aluminium était fonction de l'ion libre $Al^{3+}$, sauf dans le cas où la concentration en fluoro-complexes d'aluminium dans le milieu était la plus élevée. En fait, ces résultats ont montré que l'ion $F^-$ peut atténuer partiellement l'effet toxique de l'aluminium sur l'algue verte *C. pyrenoidosa*, puisque l'ajout conjoint d'aluminium et de fluorures n'a pas d'effet sur la croissance de l'algue à de faibles concentrations. Cependant, les fluoro-complexes d'aluminium ont montré une certaine toxicité à de plus fortes concentrations en Al et en F complexés.

Pour les plantes terrestres exposées à l'aluminium, deux études ont montré que l'ion F avait un effet protecteur, pour le blé (Maclean et al., 1992) et pour l'orge (Cameron et al., 1986). Les concentrations en $AlF_n^{(3-n)}$ dans ces expériences variaient entre 0 et 100 μM d'$Al_T$ et entre 0 et 200 μM de $F_T$. Ces auteurs affirment que les fluoro-complexes d'Al n'ont pas d'effet sur la croissance de ces deux plantes. Cependant, Kinraide (1997) a montré que les fluoro-complexes d'aluminium pouvaient causer une certaine toxicité pour le blé (*Triticum aestivum* L.), mais que la toxicité était plus faible que celle de l'ion libre $Al^{3+}$. Du même avis, Stevens et al. (1997) ont démontré qu'il y avait une atténuation de la toxicité de l'aluminium en présence de fluorures, mais que les fluoro-complexes d'aluminium pouvaient néanmoins contribuer à l'effet toxique sur la tomate et sur l'avoine. Une autre étude sur les plantes, mais en milieu aquatique cette fois-ci, a montré que les fluoro-complexes d'aluminium contribuaient à la prise en charge de l'aluminium chez les espèces suivantes : le potamot (*Potamogeton oakesianus*), le myriophylle (*Myriophyllum exalbescens*), la quenouille (*Typha latifolia*) et le rubanier (*Sparganium* sp.). Cette étude ne portait cependant pas sur la toxicité des fluoro-complexes d'aluminium, mais sur la séquestration de ce métal par des plantes aquatiques pour réduire la teneur en Al dans les effluents d'aluminerie (Gallon et al., article sous presse).

Ces résultats sont généralement en accord avec ceux de Wilkinson et al. (1990), qui ont démontré que les fluoro-complexes d'aluminium pouvaient amener une toxicité résiduelle en plus de celle de l'ion libre chez des tacons (âge 1 an et plus) du saumon Atlantique. De même, dans leur étude de la toxicité de l'Al envers des alevins de saumon Atlantique, Hamilton et Haines (1995) ont montré que l'ajout d'une faible concentration de fluorures à une solution d'aluminium avait un effet protecteur sur l'évaluation de la toxicité de l'aluminium à pH acide et à faible alcalinité. Cependant, un plus grand ajout de fluorures ne diminuait pas la toxicité de l'aluminium dans leurs expériences, ce qui laisse croire qu'une grande quantité de fluoro-complexes d'aluminium provoquerait un effet toxique en plus de la toxicité de l'ion $Al^{3+}$ libre.

Pour les amphibiens, il y a peu d'études qui ont porté sur le sujet. Cependant, l'étude de Clark et LaZerte (1985) a montré que les fluoro-complexes d'aluminium étaient tout aussi toxiques que l'ion libre $Al^{3+}$ chez les œufs et les larves du crapaud américain (*Bufo americanus*) et de la grenouille des bois (*Rana sylvatica*). Ces résultats montrent que les fluoro-complexes d'aluminium pourraient peut-être avoir un plus grand effet sur les amphibiens que sur les poissons.

À la lumière de cet examen de la littérature, il n'y a pas de consensus à propos de la toxicité des fluoro-complexes d'aluminium. Cependant, il y a une tendance qui montre que les fluorures atténueraient partiellement la toxicité de l'aluminium, mais que les fluoro-complexes d'aluminium montreraient une certaine toxicité pour différents niveaux trophiques (i.e., algues, plantes terrestres, poissons, amphibiens) lorsque présents à de fortes concentrations. Les résultats obtenus aux expériences 3A et 4A (figures 3.5A et 3.5B) vont dans le même sens, c'est-à-dire que les fluoro-complexes d'aluminium ont été toxiques à de fortes concentrations en Al et en F (i.e., au-delà d'un certain seuil de concentration). Signalons que la chute marquée de la croissance algale après une journée d'exposition (figures 3.5A et 3.5B) a été provoquée par la filtration des algues avant le début de l'expérience.

## 4.2.2 Conditions expérimentales durant l'exposition

Le tableau 3.1 a montré que les concentrations mesurées en aluminium total correspondaient bien aux concentrations nominales fixées au départ. En effet, les concentrations en aluminium variaient très peu du début jusqu'à la fin des expériences, ce qui veut dire que l'exposition a été constante dans toutes les expériences de la partie A de cette étude. Un manque de constance au niveau des concentrations en Al aurait pu influencer la spéciation de ce métal et du même coup

biaiser la réponse toxique. Cependant, les résultats ont montré que les concentrations nominales en Al ont été respectées et la spéciation de l'aluminium aussi, ce qui augmente la validité des résultats. Pour les expériences 1A et 2A, les résultats de toxicité et de dosage de l'aluminium ont montré que la croissance de l'algue décline avec une augmentation de l'aluminium mesuré. L'expérience 5A montre que les résultats pouvaient être reproduits lorsque les conditions expérimentales étaient constantes tout au long de l'expérience. Même à une très faible concentration en aluminium (i.e., 0.6 μM), on peut voir que l'aluminium a un effet toxique marqué sur la croissance de cette algue.

Avec l'ajout de fluorures (i.e., expériences 3A et 4A), les résultats toxicologiques et chimiques (spéciation de l'aluminium) ont montré qu'il existe un seuil de toxicité pour les fluoro-complexes d'aluminium sur la croissance de *Chlorella*. En effet, ces résultats confirment que les quantités d'Al ajoutées étaient conformes à ce qui avait été fixé au départ, que les conditions expérimentales étaient constantes pendant les quatre jours d'exposition et qu'il y avait très peu d'aluminium organique au jour 4. Il aurait été intéressant de doser les concentrations ajoutées en fluorures durant ces expériences, mais les concentrations en F étaient trop faibles pour la sensibilité des appareils disponibles (i.e., électrodes sélectives, chromatographie ionique, ...).

Le tableau 4.1 présente les concentrations des différents complexes $AlF_n^{(3-n)}$ présents dans les milieux d'exposition en fonction des concentrations ajoutées en Al et en F. D'abord, il est à noter que la concentration de l'ion libre $Al^{3+}$ présent dans le milieu d'exposition était constant pour tous les traitements ($Al^{3+} \approx 31$ nM). Cependant, en ajoutant conjointement Al et F aux milieux, tout en gardant la concentration d'$Al^{3+}$ constante, on assiste à des changements importants dans les proportions relatives des différents complexes $AlF_n^{(3-n)}$. D'abord, la concentration en $AlF^{2+}$ est celle qui varie le moins, de 235 nM à 660 nM (i.e., par un facteur de 2.8x), et sa contribution à la spéciation de l'aluminium dissous demeure à peu près constante (39-43%). La concentration en $AlF_2^+$ varie davantage, de 83 nM à 633 nM (i.e., par un facteur de 7.7x), et sa contribution à la spéciation de l'aluminium dissous augmente progressivement de 14 à 40%. Finalement, la concentration en $AlF_3$ demeure très faible dans les traitements 2 et 3 (i.e., inférieure à 4 nM et inférieure à 1% en $Al_{dissous}$), mais augmente au traitement 4 (i.e., par un facteur de 5.25x), tout en demeurant relativement peu important comme espèce contribuant à l'aluminium dissous (1%).

Peut-on relier ces changements de spéciation aux résultats de toxicité? D'abord, la proportion d'$Al_{dissous}$ sous la forme $AlF^{2+}$ ne changent pas beaucoup entre les traitements 2, 3 et 4, alors que la toxicité des fluoro-complexes augmente en passant du traitement 3 au traitement 4. Cependant, la concentration du complexe $AlF^{2+}$ augmente considérablement entre les traitements 3 et 4 (i.e., de

387 nM à 659 nM), ce qui veut dire que ce fluoro-complexe d'Al peut très bien contribuer à l'augmentation de la toxicité de l'Al sur *C. pyrenoidosa*. D'autre part, les deux autres complexes $AlF_n^{(3-n)}$ ($AlF_2^+$ et $AlF_3$) montrent des changements plus importants entre les traitements 2, 3 et 4, ce qui porte à croire que l'un ou l'autre de ces complexes pourrait également se trouver à l'origine de la toxicité accrue observée au traitement 4. Il est à noter que le complexe $AlF_3$ est électrochimiquement neutre; à première vue, on pourrait peut-être penser que cette forme neutre traverserait la membrane cellulaire de l'algue et exercerait directement sa toxicité sans devoir passer pas un transporteur. Cependant, même si le complexe $AlF_3$ est neutre, il n'est certainement pas lipophile; les liaisons entre les ions $F^-$ et l'$Al^{3+}$ gardent un caractère ionique et le complexe $AlF_3$ demeure très hydrophile. L'étude réalisée par Kinraide (1997) a montré que le complexe $AlF_3^0$ n'est pas toxique pour différentes espèces de plantes terrestres (i.e., orge (*Hordeum vulgare*), blé (*Triticum aestivum*) et autres), ce qui laisse croire que les complexes $AlF^{2+}$ et $AlF_2^+$ seraient les principaux acteurs au niveau de l'effet toxique des complexes $AlF_n^{(3-n)}$ dans cette étude.

Tableau 4.1 : Spéciation de l'aluminium dans les expériences 3A et 4A portant sur la toxicité de l'aluminium avec et sans fluorures (calculé à partir du logiciel MINEQL+ 4.5).

| Traitement 1 | | Traitement 2 | | | Traitement 3 | | | Traitement 4 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $Al_T$ 0.3 µM | | $Al_T$ 0.6 µM, $F_T$ 1.5 µM | | | $Al_T$ 0.9 µM, $F_T$ 2.5 µM | | | $Al_T$ 1.6 µM, $F_T$ 5 µM | | |
| Nom | [ ], nM | Nom | [ ], nM | % | Nom | [ ], nM | % | Nom | [ ], nM | % |
| $Al^{3+}$ | 31 | $Al^{3+}$ | 29 | 5 | $Al^{3+}$ | 32 | 4 | $Al^{3+}$ | 30 | 2 |
| | | $Al(OH)^{+2}$ (+2) | 72 | 12 | $Al(OH)^{+2}$ (+2) | 77 | 9 | $Al(OH)^{+2}$ (+2) | 74 | 5 |
| | | $Al(OH)_2^+$ (+1) | 160 | 26 | $Al(OH)_2^+$ (+1) | 170 | 19 | $Al(OH)_2^+$ (+1) | 162 | 10 |
| | | **$AlF^{+2}$ (+2)** | **235** | **39** | **$AlF^{+2}$ (+2)** | **387** | **43** | **$AlF^{+2}$ (+2)** | **659** | **41** |
| | | $AlF_2^+$ (+1) | 83 | 14 | $AlF_2^+$ (+1) | 208 | 23 | **$AlF_2^+$ (+1)** | **633** | **40** |
| | | $AlF_3$ (aq) | 1 | <1 | $AlF_3$ (aq) | 4 | <1 | $AlF_3$ (aq) | 21 | 1 |
| Al Total | 0.3 µM | Al Total | 0.6 µM | | Al Total | 0.9 µM | | Al Total | 1.6 µM | |
| F Total | ------- | F Total | 1.5 µM | | F Total | 2.5 µM | | F Total | 5 µM | |

Le tableau 4.2 répertorie les principales études portant sur la toxicité des fluoro-complexes d'aluminium. Ces résultats semblent montrer que le complexe $AlF^{2+}$ serait le plus toxique, suivi du complexe $AlF_2^+$. Nos résultats montrent que ce serait les complexes $AlF^{+2}$ et / ou $AlF_2^+$ qui contribueraient à la toxicité de l'aluminium pour l'algue verte *C. pyrenoidosa*.

Tableau 4.2 : Évaluation de la toxicité des fluoro-complexes d'aluminium dans différentes études publiées.

| Référence | Organisme à l'étude | Complexe(s) causant la toxicité selon les auteurs |
|---|---|---|
| Notre étude | Algue verte (*Chlorella pyrenoidosa)* | $AlF^{+2}$ , $AlF_2^+$ |
| Wilkinson et al. (1990) | Saumon Atlantique (*Salmo salar*) | $AlF^{+2} > AlF_2^+$ |
| Hamilton et Haines (1995) | Saumon Atlantique (*Salmo salar*) | $AlF_2^+$ |
| Clark et LaZerte (1985) | Crapaud américain (*Bufo americanus*) et grenouille des bois (*Rana sylvatica*) | $Al(F)_x$ spéciation non-déterminée |
| Kinraide (1997) | Orge (*Hordeum vulgare*) | $AlF^{+2} > AlF_2^+$ |

Après avoir montré que les fluoro-complexes d'aluminium peuvent être toxiques pour l'algue verte *C. pyrenoidosa*, passons à l'étude de la cinétique de bioaccumulation de l'aluminium avec les fluorures

## 4.2.3 Partie B : Prise en charge de l'aluminium en présence de fluorures

### 4.2.3.1 Expériences avec aluminium seul

La figure 4.3 présente, à titre indicatif, des courbes de cinétique théoriques pour la bioaccumulation d'un métal par une algue d'eau douce. En fait, le métal se fixe à la surface des algues en suspension jusqu'à ce que les sites de complexation de surface soit saturés (i.e., après quelques heures). Lorsqu'il y a saturation des sites d'adsorption au niveau de la surface cellulaire, un plateau est atteint et la seule prise en charge possible est par absorption du métal à l'intérieur de la cellule (i.e., courbe pleine). La concentration totale de métal bioaccumulé est égale à la concentration intracellulaire plus la concentration adsorbée à la surface cellulaire des algues (Parent 1991). Les résultats présentés à la figure 3.7 montrent que la prise en charge était rapide et qu'après 20 minutes, les sites de complexation au niveau de la paroi cellulaire étaient saturés,

puisqu'il y a présence d'un plateau au niveau de la courbe (figure 3.7). Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude de Parent (1991), qui a montré que la cinétique de bioaccumulation de l'aluminium était très rapide et qu'après les premières heures d'exposition, la bioaccumulation était négligeable. De plus, Parent (1991) a montré que la prise en charge en aluminium était très faible (i.e., inférieure à 10 µmol/m$^2$) à pH 5.5 pour une exposition à 0.3 µM d'Al pendant 4 heures, ce qui est comparable aux résultats obtenus à l'expérience 1B.

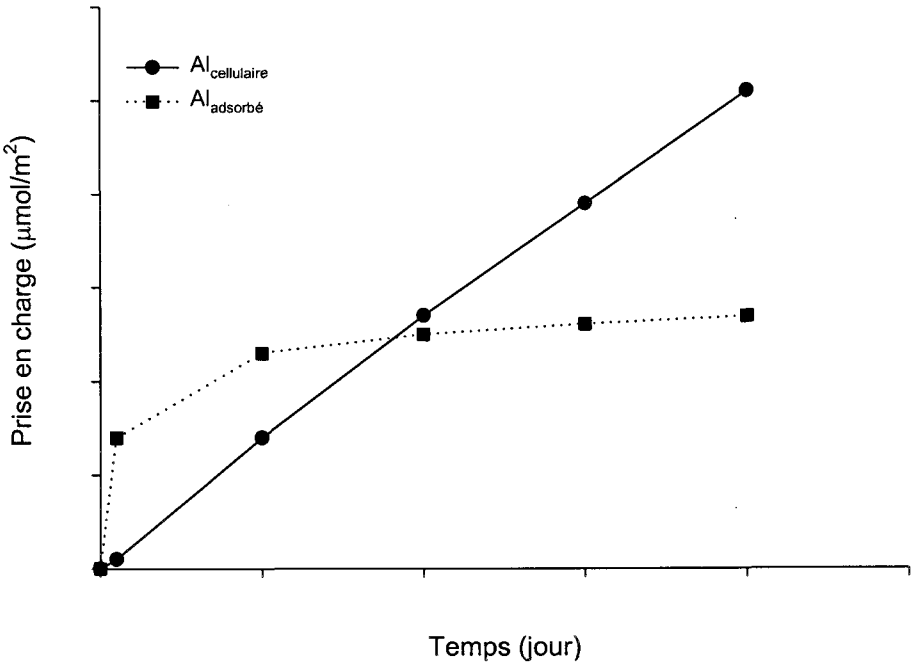


Figure 4.3 : Cinétique de bioaccumulation théorique d'un métal par une algue (adaptée de Parent, 1991).

Les résultats de la présent étude ont également montré une faible prise en charge d'aluminium (inférieure à 20 µmol/m$^2$ d'Al) pour des expositions supérieures à 0.3 µM d'Al (i.e., entre 0.6 et 1.3 µM d'Al total). Si on compare les figures 3.7 et 3.8 entre elle, on peut voir que la valeur de prise en charge après 90 minutes d'exposition à une concentration de 0.3 µM d'Al est légèrement inférieure à la figure 3.7 par rapport à la valeur obtenue à la figure 3.8. La spéciation de l'aluminium ne peut pas expliquer cette variation au niveau de la prise en charge, puisque l'aluminium mesuré en laboratoire correspond à l'aluminium nominal fixé avant les tests. Même dans l'étude de Parent (1991), la valeur de prise en charge d'Al variait grandement; il ne faut pas oublier que ces expériences ont été réalisées avec des organismes vivants et que l'état

physiologique des algues peut faire varier significativement la prise en charge de ce métal. En effet, les algues de la figure 3.7 peuvent avoir subi un plus grand stress que celles de la figure 3.8 lors des multiples manipulations d'une même expérience.

Au niveau de l'aluminium adsorbé aux cellules algales (i.e., Al total – Al cellulaire), on peut voir que la prise en charge sous cette forme est négligeable à la figure 3.7, tandis qu'elle ne l'est pas à la figure 3.8. L'erreur analytique peut être une des raisons pour laquelle on ne distingue pas de différences significatives entre l'Al total et l'Al intracellulaire à la figure 3.7. En comparant le dernier point de la figure 3.7 avec le premier de la figure 3.8 (i.e., une exposition à 0.3 µM d'aluminium pendant 90 min), on peut voir que les résultats se ressemblent, mais que les barres d'erreur sont beaucoup plus grandes à la figure 3.7. En effet, les résultats obtenus par Parent (1991) ont montré qu'il y avait une grande variabilité entre ses expériences, la valeur d'aluminium adsorbé pouvant être élevée ou presque nulle, comme c'est le cas dans nos expériences.

La décision d'utiliser une durée de 90 minutes d'exposition pour l'ensemble des expériences de prise en charge fait suite à l'analyse des résultats obtenus dans l'étude de Parent (1991). La prise en charge d'aluminium est assez rapide, puisque après 4 heures, la bioaccumulation d'aluminium plafonne (tout comme le démontre l'apparition d'un plateau à la figure 3.7). À pH 5.5, le proton n'interfèrerait pas trop au niveau de la prise charge, ce qui fait que le processus est rapide. Il est important de noter que tous les résultats obtenus dans la section prise en charge font abstraction de la croissance algale; donc, nous avons pris pour acquis que la densité cellulaire ne variait pas entre le début et la fin de l'expérience (i.e., 90 min d'exposition au total).

### 4.2.3.2 Expériences avec aluminium et fluorures

Selon l'étude de Wilkinson et ses collaborateurs (1990) réalisée avec des tacons de saumon Atlantique, les fluoro-complexes d'aluminium n'entrent pas dans les cellules, mais se lient à la membrane apicale des cellules de branchies, provoquent des dérèglements importants au niveau de l'osmorégulation et réduisent la concentration en sodium plasmatique du poisson. Donc, on aurait pu s'attendre à un phénomène semblable avec *C. pyrenoidosa*, c'est-à-dire que les fluoro-complexes d'aluminium aurait pu s'adsorber fortement à la paroi cellulaire des algues et nuire à leur développement. En effet, les deux organismes possèdent une membrane cellulaire formée de plusieurs constituants communs, comme les lipides et les différentes protéines (de transport, périphériques et intégrales) qui constituent une membrane. D'un point de vue biochimique, les

deux organismes ont des points en commun, donc on aurait pu s'attendre à des phénomènes toxicologiques semblables.

L'ajout conjoint de fluorures et d'aluminium dans les expériences de prise en charge a fait que les concentrations en aluminium libre ($Al^{3+}$) étaient constantes pour tous les traitements des expériences 3B et 4B (voir tableau 4.1). En analysant ces résultats, on peut voir qu'il n'y a pas eu de prise en charge d'aluminium accrue pour le traitement qui a causé une toxicité attribuable aux fluoro-complexes d'aluminium dans la partie A du projet de recherche (voir figures 3.5A et 3.5B). En d'autres termes, la toxicité des fluoro-complexes d'aluminium (traitement 1.6 µM d'Al et 5 µM de F) ne serait pas attribuable à une plus grande prise en charge d'aluminium.

Les analyses chimiques ont démontré que les concentrations mesurées en Al (environ 1.3 µM) étaient inférieures à la concentration nominale en aluminium égale à 1.6 µM pour les tests sur la prise en charge. Au niveau des fluorures, les concentrations étaient trop faibles pour qu'on puisse les mesurer. À la partie A, les conditions expérimentales ont été respectées, c'est-à-dire que la valeur d'aluminium mesurée était la même que celle fixée avant l'expérience. À la partie B, cependant, la concentration mesurée en Al total était plus faible que la concentration attendue; ce « manque » d'aluminium pourrait expliquer le fait que la prise en charge ne soit pas supérieure pour le traitement nominal le plus élevé en Al et F aux figures 3.9 et 3.10. En d'autres termes, les différences au niveau des concentrations et de la spéciation de l'aluminium entre les expériences de la partie A et la partie B de l'étude pourraient être une raison pour laquelle on ne décèle pas d'accumulation accrue de l'aluminium dans le dernier traitement ($[Al]_T$ = 1.6 µM, $[F]_T$ = 5 µM). Cependant, compte tenu de la variabilité des concentrations d'aluminium accumulées pour un traitement donné, il aurait fallu que les différences de concentration en Al bioaccumulé soient plutôt importantes pour être mesurables. Autrement dit, la méthode utilisée pour analyser la prise en charge de l'aluminium n'est pas assez reproductible pour détecter des différences significatives au niveau de la bioaccumulation de l'aluminium à d'aussi faibles concentrations d'aluminium et de fluorures ajoutées. En effet, il aurait fallu un plus grand écart entre les quantités d'aluminium ajoutées afin de pouvoir le détecter. Par contre, il est possible que les complexes $AlF_n$ extracellulaire aient pu affecter certaines fonctions associées au transport membranaire sans qu'il y ait une augmentation d'Al pris en charge. De plus, il est possible que l'augmentation des complexes $AlF_n$ induit une augmentation de la prise en charge de F seulement (i.e., qu'il y est scission de la molécule lors du passage à travers la membrane). Néanmoins, les résultats obtenus ne nous permettent pas de statuer sur la question.

## 4.3 Applicabilité ou non du modèle de l'ion libre (ligands inorganiques et organiques monomères)

D'après Morel (1983), l'ion métallique libre ($M^{Z+}$) ou l'aquo-ion joue un rôle central dans la détermination de la prise en charge, de la nutrition et de la toxicité de tous les métaux traces présents sous forme cationique. Selon le modèle l'ion libre (récemment renommé modèle du ligand biotique, ou BLM), la réponse biologique d'un organisme cible serait proportionnelle à la concentration de la forme libre du métal ($M^{Z+}$) en solution (Campbell, 1995). Ce modèle a été développé pour les milieux marins, où le pH et la dureté ne varient pas beaucoup. En l'appliquant aux eaux douces, on s'est rapidement rendu compte qu'il fallait aussi tenir compte des effets compétitifs provoqués par l'ion [$H^+$] et les cations majeurs ([$Ca^+$] et [$Mg^{2+}$]) - voir Campbell et Stokes (1985), Croteau et al. (1998), Meyer et al. (1999). En effet, dans les eaux acides ou dans les eaux dures, les métaux traces s'avèrent moins biodisponibles que prévu, grâce à une compétition entre les ions $H^+$, $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, et l'ion métallique libre $M^{z+}$.

Outre ces effets de compétition entre cations, il y a aussi d'autres « exceptions » au modèle de l'ion libre. D'abord, des études avec des ligands biologiquement assimilables ($L_a$) ont montré que les complexes de type $ML_a$ pouvaient participer, dans une certaine mesure, à l'accumulation totale d'un métal. Dans de tels cas, la prise en charge du métal est alors plus élevée que prévue par le modèle de l'ion libre (i.e., MIL), mais à des concentrations équivalentes, le complexe reste toutefois moins disponible que l'ion métallique libre (exemples de ligands assimilables, de faible poids moléculaire, tels que les acides aminés ou bien le citrate (Errécalde et al., 1998 ; Errécalde et Campbell, 2000; Campbell et al., 2002)). De plus, certains chercheurs ont démontré que les complexes métalliques lipophiles ne suivent pas le modèle de l'ion libre. En effet, les complexes organiques lipophiles sont beaucoup plus biodisponibles que le métal libre et leur présence augmente de façon drastique la prise en charge d'un métal par les organismes. On pense ici à des ligands tels le diéthyldithiocarbamate, les xanthates ou bien les oxines (Poldoski, 1979; Florence et Stauber, 1986; Phinney et Bruland, 1994, 1997a et 1997b; Croot et al., 1999).

Au niveau des fluoro-complexes d'aluminium, l'étude de Wilkinson et al. (1990) est aussi un bel exemple d'exception au modèle de l'ion libre. Dans le même sens, l'article de Kinraide (1997) montre que les fluoro-complexes d'aluminium sont toxiques, mais moins que l'ion libre pour la croissance racinaire du blé (*Triticum aestivum* L.). Une autre étude sur les plantes vasculaires (i.e., la tomate (*Lycopersicon esculentum*) et l'avoine (*Avena sativa*)) arrive aux mêmes conclusions,

c'est-à-dire que les fluoro-complexes d'aluminium montrent une toxicité additionnelle à celle de l'ion libre (Stevens et al., 1997).

Les résultats obtenus dans la présente étude montrent encore une fois que le modèle de l'ion libre comporte des incertitudes en milieu d'eau douce. En effet, l'ion fluorure forme des complexes stables avec l'aluminium à pH 5.5 et, au-dessus d'un certain seuil, ces complexes causent une toxicité résiduelle sur l'algue verte *C. pyrenoidosa*. La toxicité des complexes $AlF^{2+}$, $AlF_2^+$ et/ou $AlF_3$ est moindre que celle de l'ion libre $Al^{3+}$(chute de croissance algale occasionnée principalement par l'ion libre), mais ces résultats constituent néanmoins une exception au modèle de l'ion libre. En effet, le dosage de l'aluminium et les simulations MINEQL+ confirment que la toxicité additionnelle à de fortes concentrations en Al et en F correspond à une augmentation des concentrations des fluoro-complexes d'aluminium, quoique la présence de ces complexes n'augmente pas la prise en charge de l'Al.

# 5. CONCLUSIONS

Les précipitations acides sont responsables de la mobilisation et du lessivage de certains métaux (comme l'aluminium) du milieu terrestre vers le milieu aquatique. L'abaissement du pH augmente la solubilité de l'aluminium, ce qui favorise son entrée dans les cours d'eau. Cet apport d'aluminium a des effets néfastes mesurables sur la faune et la flore aquatiques. En plus des précipitations acides, les alumineries rejettent des concentrations assez importantes d'aluminium et de fluorures dans l'environnement immédiat des usines. Ces deux éléments se retrouvent en solution dans le milieu naturel et se complexent sous des conditions acides (pH optimal = 5.5); il est donc important de savoir si ces complexes ($AlF^{2+}$, $AlF_2^+$, $AlF_3$) peuvent avoir un effet toxique sur les organismes aquatiques.

Cette étude avait pour but d'étudier la toxicité et la prise en charge de l'aluminium avec et sans fluorures chez l'algue verte *C. pyrenoidosa*. Plus précisément, on visait à déterminer si les fluoro-complexes d'aluminium pouvaient avoir un effet sur la croissance d'une algue verte et à voir si ces complexes étaient bioaccumulés par cette dernière. En plus, on se devait d'étudier cette problématique en relation avec le modèle de l'ion libre (i.e., MIL), afin de voir si ce modèle de prédiction de la toxicité d'un métal sur le biote s'appliquait à l'aluminium.

Les résultats ont montré que la toxicité de l'aluminium seul dépendait de la concentration de l'ion libre $Al^{3+}$, ce qui est en accord avec le modèle de l'ion libre. Il ne faut cependant pas oublier que les expériences réalisées avec l'Al seul (à pH constant) ont impliqué la variation de la concentration de l'ion libre $Al^{3+}$ ainsi que la variation de la concentration des différentes espèces inorganiques d'aluminium (i.e., $AlOH^{2+}$, $Al(OH)_2^+$, et autres) qui ont pu également jouer un rôle au niveau de la toxicité de l'aluminium. Les résultats des expériences avec l'aluminium et les fluorures ([$Al^{3+}$] constante) ont montré que les fluoro-complexes d'aluminium avaient un effet toxique sur l'algue verte *C. pyrenoidosa* aux plus fortes concentrations appliquées (1.6 µM d'Al et 5 µM de F). Ces résultats sont en contradiction avec le modèle de l'ion libre, puisque ce n'est pas seulement la concentration de l'ion libre qui explique en totalité la toxicité de l'aluminium. Au niveau des expériences de prise en charge, les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure sur l'impact que peut avoir les fluoro-complexes d'aluminium sur la bioaccumulation de l'aluminium chez *Chlorella* puisque ces complexes ne semblaient pas se retrouver dans les cellules.

Par conséquent, le mécanisme impliqué dans l'expression d'une toxicité accrue en présence de concentrations élevées en $AlF_n^{(3-n)}$ demeure obscur.

Au niveau de la prise en charge de l'aluminium en présence de fluorures, nous ne pouvons conclure si le modèle de l'ion libre s'applique ou non. D'autre part, selon les résultats des tests d'inhibition de croissance, il est clair que le MIL sous-estime la toxicité aux plus fortes concentrations en $AlF_n^{(3-n)}$. Il faut cependant admettre que cette « exception » ne se manifeste qu'aux plus fortes concentrations en fluorures. On peut se demander si de telles conditions sont susceptibles de se manifester dans le milieu récepteur. Par exemple, en aval d'un rejet d'effluent d'aluminerie, les complexes $AlF_n^{(3-n)}$ ne sont présents qu'à de faibles concentrations, puisque que le pH élevé (entre 7 et 8) favorise la formation d'hydroxo-complexes d'aluminium (i.e., $Al(OH)_2^+$ et $Al(OH)_3$ (aq)) et la formation d'un précipité (i.e., la gibbsite), ce qui protège la faune et la flore présentes dans ce milieu. Cependant, une baisse marquée du pH (provoquée, par exemple, par les précipitations acides) aurait pour effet d'augmenter la proportion des complexes $AlF_n^{(3-n)}$ en solution et de recréer les mêmes conditions que dans la présente étude.

# 6. PERSPECTIVES D'AVENIR

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche en laboratoire où toutes les conditions de départ étaient contrôlées (pH, milieux de culture et d'exposition synthétiques, concentrations en Al et en F connues, et autres). Les résultats obtenus ont montré que les fluoro-complexes d'aluminium pouvaient causer un effet toxique sur l'algue verte *C. pyrenoidosa*, ce qui est une exception au modèle de l'ion libre.

Pour compléter ce travail réalisé en laboratoire, il faudrait doser les fluorures dans les algues lors d'expériences de prise en charge, afin de déterminer si les fluorures s'accumulent dans les algues en présence des complexes $AlF_n^{(3-n)}$. Ce serait intéressant d'utiliser d'autres espèces d'algues pour évaluer leur sensibilité aux fluoro-complexes d'aluminium. De plus, il faudrait augmenter davantage les concentrations de fluorures dans les milieux d'exposition, afin de favoriser la formation du complexe $AlF_3$ et de déterminer si la toxicité envers *C. pyrenoidosa* continue à augmenter. Ces expériences auraient pour but d'évaluer le pouvoir toxique du complexe $AlF_3$ comparativement à celui du complexe $AlF_2^+$. Il serait aussi important de pouvoir doser les concentrations de fluorures ajoutées dans les différents milieux d'exposition pour s'assurer de la spéciation de l'aluminium et des conditions expérimentales tout au long des expériences.

Finalement, il serait pertinent de réaliser des tests sur la mobilité électrophorétique de *C. pyrenoidosa*. La mobilité électrophorétique se traduit par la vitesse de mouvement des cellules algales exposées à un champ électrique. D'abord, il faudrait réaliser des expériences en faisant varier uniquement le pH, ensuite en faisant varier la $[Al]_T$ tout en gardant le pH constant et finalement, en faisant varier la $[AlF_n^{(3-n)}]$ tout en maintenant la concentration d'$Al^{3+}$ constante. Ces expériences devraient permettre de déterminer si les complexes $AlF_n^{(3-n)}$ se fixent à la surface algale ou entrent dans les cellules (cf. expériences de Wilkinson et al. (1993) avec les cellules de branchie du saumon Atlantique).

Après avoir démontré la toxicité des fluoro-complexes d'aluminium sans toutefois évaluer d'une manière fiable leur prise en charge sur une algue d'eau douce (i.e., problèmes analytique ou autres), il serait intéressant d'étudier cette problématique à grande échelle, au-delà de l'étude en laboratoire où les conditions sont contrôlées. En effet, il serait pertinent de mener une étude dans des rivières recevant des apports importants d'aluminium et de fluorures (i.e., tout près d'une aluminerie) et où le pH des cours d'eau favoriseraient la solubilisation de l'aluminium et sa

complexation avec les fluorures. Cette étude pourrait porter sur d'autres organismes, comme par exemple le saumon Atlantique, et étudier d'autres ligands comme la matière organique dissoute (MOD). Il existe quelques études qui ont porté sur cette problématique, mais rares sont celles qui ont été réalisées en milieu naturel. Ce qu'il faut comprendre, c'est que les expériences en laboratoire amènent beaucoup d'informations sur les mécanismes de toxicité et de prise en charge des métaux, puisque les conditions expérimentales sont contrôlées et seulement un ou deux paramètres varient. En milieu naturel, l'interprétation est plus complexe, mais les résultats obtenus sont plus près de la réalité.

Une étude récente a montré que l'aluminerie Alcan International Limitée rejète des concentrations assez importantes d'aluminium dans leurs eaux usées. Ces concentrations varient entre 1 et 7 mg/L pour l'aluminium total et entre 22 et 88 µg/L pour l'aluminium monomère inorganique (Roy et al., 2000). Ces concentrations sont non-négligeables, et selon les critères de qualité de l'eau pour le milieu aquatique elles sont susceptibles d'avoir un effet direct sur les organismes vivants aux alentours des alumineries. De plus, ces usines relarguent des quantités importantes de fluorures qui peuvent se complexer avec l'aluminium dans les cours d'eau où le pH est acide. En effet, ces complexes sont importants au printemps dans les cours d'eau du Bouclier canadien, donc il serait important d'évaluer leurs impacts sur l'écosystème aquatique.

# 7. RÉFÉRENCES


Auclair, J.C. 2003. Communication personnelle. INRS-ETE. Université du Québec. Sainte-Foy.

Camargo, J.A. et J.V. Tarazona. 1991. Short-term toxicity of fluoride ion ($F^-$) in soft water to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and brown trout (*Salmo trutta fario*). Fluoride 24 : 76-83.

Cameron, R.S., Ritchie, G.S. et A.D. Robson. 1986. Relative toxicities of inorganic aluminium complexes to barley. Soil Sci. Soc. Am. J. 50 : 1231-1236.

Campbell, P.G.C., Bisson, M., Bougie, R., Tessier, A. et J.P. Villeneuve. 1983. Speciation of aluminium in acidic freshwaters. Anal. Chem. 55 : 2246-2252.

Campbell, P.G.C., Bougie, R., Tessier, A. et J.P. Villeneuve. 1984. Aluminium speciation in surface waters on the Canadian Pre-Cambrian Shield. Verh. Internat. Verein. Limnol. 22 : 371-375.

Campbell, P.G.C. et P.M. Stokes. 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42 : 2034-2049.

Campbell, P.G.C., Hansen, H.J., Dubreuil, B. et W.O. Nelson. 1992. Geochemistry of Quebec North Shore salmon rivers during snowmelt: Organic acid pulse and aluminium mobilization. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49 : 1938-1952.

Campbell, P.G.C. 1995. Interactions between trace metal and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. Dans : Tessier, A., Turner, D.R., eds, Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. John Wiley & Sons, Chichester, UK. pp. 45-102.

Campbell, P.G.C., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V.P. et B. Vigneault. 2002. Metal bioavailability to phytoplankton : Applicability of the Biotic Ligand Model. Review. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 133 :185-202.

Chiaudani, G. et M. Vighi. 1978. The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies. Mitt. Internat. Verein. Limnol. 21 : 316-329.

Clark, K.L. et B. LaZerte. 1985 A laboratory study of the effects of aluminium and pH on amphibian eggs and tadpoles. Can. J. Fish. Aquat. Sci.42 : 1544-1551.

Croot, P.L., Karlson, B., Van Elteren, J.T. et J.J. Kroon. 1999. Uptake of $^{64}$Cu-oxine by marine phytoplankton. Environ. Sci. Technol. 33 : 3615-3621.

Croteau, M.-N., Hare, L. et A. Tessier. 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. Environ. Sci. Technol. 32 : 1348-1353.

Driscoll, C.T. 1985. Aluminium in acidic surface waters: chemistry, transport, and effects. Environmental Health Perspectives 63 : 93-104.

Driscoll, C.T., Baker, J.P., Bisogni, J.J. et C.L. Schofield. 1980. Effect of aluminium speciation on fish in dilute acidified waters. Nature 284 : 161-164.

Driscoll, C.T. et W.D. Schecher. 1988. Aluminium in the environment. Dans: Aluminium and its role in biology. Metal ions in biological systems. Vol. 24. édité par H. Sigel et A. Sigel. Marcel Dekker Inc. New York, NY. pp. 59-122.

Driscoll, C.T. et W.D. Schecher. 1990. The chemistry of aluminium in the environment. Environ. Geochem. Health. 12 : 28-49.

Dupont, J. 1992. Quebec lake survey: I. Statistical assessment of surface water quality. Water, Air and Soil Pollution. 61: 107-124.

Errécalde, O., Seidl, M. et P.G.C. Campbell. 1998. Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum* : an exception to the free-ion model. Water Res. 32 : 419-429.

Errécalde, O. et P.G.C. Campbell. 2000. Cadmium and zinc bioavailability to *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae): accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate. J. Phycol. 36 : 473-483.

Florence, T.M. et J.L. Stauber. 1986. Toxicity of copper complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*. Aquat. Toxicol. 8 : 11-26.

Fortin, C. 1996. Méthode analytique de mesure de l'ion métallique libre ($Cd^{2+}$, $Zn^{2+}$) par échange ionique. Mémoire de maîtrise. INRS-Eau. Université du Québec. Sainte-Foy.

Gallon, C., Munger, C., Prémont, S., Goulet, R.R. et P.G.C. Campbell. 2003. Hydroponic study of aluminium accumulation by aquatic plants : Effects of fluoride and pH. Water Air and Soil Pollution. Article sous presse.

Gensemer, R.W. et R.C. Playle. 1999. The bioavailability and toxicity of aluminium in aquatic environments. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 29 : 315-450.

Hamilton, S.J. et T.A. Haines. 1995. Influence of fluoride on aluminium toxicity to Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52 : 2432-2444.

Helliwell, S., Batley, G.E., Florence, T.M. et B.G. Lumsden. 1983. Speciation and toxicity of aluminium in a model fresh water. Environ. Technol. Let. 4 : 141-144.

Jones, H.G. 1983. Les fluorures dans l'environnement. Rapport interne no 87. Institut national de la recherche scientifique (INRS-Eau). Sainte-Foy, Québec. 35 p.

Kinraide, T.B., Arnold, R.C. et V.C. Baligar. 1985. A rapid assay for aluminium phytotoxicity at submicromolar concentrations. Physiol. Plant. 65 : 245-250.

Kinraide, T.B. et D.R. Parker. 1987. Non-phytotoxicity of the aluminium sulfate ion, $AlSO_4^+$. Physiologia Plantarum 71 : 207-212.

Kinraide, T.B. et D.R. Parker. 1989. Assessing the phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminium. Plant Cell Environ. 12 : 479-487.

Kinraide, T.B. 1997. Reconsidering the rhizotoxicity of hydroxyl, sulphate, and fluoride complexes of aluminium. J. Exp. Botany 48 : 1115-1124.

Lacroix, G.L. et D.R. Townsend. 1987. Responses of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) to episodic increases in acidity of Nova Scotia rivers. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45 : 1475-1484.

LaZerte, B.D. et P.J. Dillon. 1984. The relative importance of anthropogenic versus natural sources of acid in lakes and streams of central Ontario. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 41 : 1664-1677.

MacLean, D.C., Hansen, K.S. et R.E. Schneider. 1992. Amelioration of aluminium toxicity in wheat by fluoride. New Phytol. 121 : 81-88.

Martell, A.E. et R.M. Smith. 1977. Critical Stability Constants. Vol. 3, Plenum Press. New York, NY. 271 p.

Meyer, J.S., Santore, R.C., Bobbitt, J.P., Debrey, L., Boese, C.J., Paquin, P.R., Allen, H.E., Bergman, H.L., et D.M. Di Toro. 1999. Binding of nickel and copper to fish gills predicts toxicity when water hardness varies, but free-ion activity does not. Environ. Sci. Technol. 33 : 913-916.

Morel, F.M.M. 1983. Principles of Aquatic Chemistry. Wiley-Interscience, New York, NY. 301 p.

Nichol, B.E., Budd, K., Palmer, G.R. et J.D. MacArthur. 1987. The mechanisms of fluoride resistance in *Synechococcus leopoliensis* (cyanophyceae). J. Phycol. 23 : 535-541.

Norberg-King, T.J. 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity, the inhibition concentration (ICp) approach (Version 2.0). National Effluent Toxicity Assessment Center. Technical report 03-93. USEPA.

Nyholm, N. 1985. Response variable in algal growth inhibition tests – Biomass or growth rate? Water Res. 19 : 273-279.

NRCC. 1977. Environmental fluorides. National Research Council Canada. Ottawa, Canada. No. 16081. 151 p.

NRCC. 1986. Aluminium in the Canadian environment. National Research Council Canada. Ottawa, Canada. No. 24759. 331 p.

Olguin, H.F., Salibian, A. et A. Puig. 2000. Comparative sensitivity of *Scenedesmus acutus* and *Chlorella pyrenoidosa* as sentinel organisms for aquatic ecotoxicity assessment: Studies on a highly polluted urban river. Environ. Toxicol. 15 : 14-22.

Ouellet, M. 1983. Reduction of airborne fluoride emissions from Canadian aluminium smelters as revealed by snow chemistry. The Science of Total Environment 66 : 65-72.

Pagenkopf, G.K. 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH and water hardness. Environ. Sci. Technol. 17 : 342-347.

Parent, L. 1991. Biodisponibilité de l'aluminium dans les eaux douces en relation avec les pluies acides. Thèse de doctorat. INRS-Eau. Université du Québec. Sainte-Foy.

Parent, L. et P.G.C. Campbell. 1994. Aluminium bioavailability to green alga *Chlorella pyrenoidosa* in acidified synthetic soft water. Environ. Toxicol. Chem. 13 : 587-598.

Parker, D.R., Kinraide, T.B. et L.W. Zelazny. 1988. Aluminium speciation and phytotoxicity in dilute hydroxy-aluminium solutions. Soil Sci. Soc. Am. J. 52 : 438-444.

Parker, D.R., Kinraide, T.B. et L.W. Zelazny. 1989. On the phytotoxicity of polynuclear hydroxy-aluminium complexes. Soil Sci. Soc. Am. J. 53 : 789-796.

Phinney, J.T. et K.W. Bruland. 1994. Uptake of a lipophilic organic Cu, Cd and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. Environ. Sci. Technol. 28 : 1781-1790.

Phinney, J.T. et K.W. Bruland. 1997a. Trace metal exchange in solution by the fungicides Ziram and Maneb (dithiocarbamates) and subsequent uptake of lipophilic organic zinc, copper and lead complexes into phytoplankton cells. Environ. Toxicol. Chem. 16 : 2046-2053.

Phinney, J.T. et K.W. Bruland. 1997b. Effects of dithiocarbamate and 8-hydroxyquinoline additions on algal uptake of ambient copper and nickel in south San Francisco bay water. Estuaries 20 : 66-76.

Plankey, B.J. et H.H. Patterson. 1986. Kinetics of aluminium fluoride complexation in acidic waters. Environ. Sci. Technol. 20 : 160-165.

Poldoski, J.E. 1979. Cadmium bioaccumulation assays. Their relationship to various ionic equilibria in Lake Superior. Environ. Sci. Technol. 13 : 701-706.

Prokopy, W.R. 2001. Determination of non-exchangeable reactive aluminium in waters by flow injection analysis. QuikChem® Method 10-113-34-1-B. Milwaukee, WI, USA. 13 p.

Rogeberg, E.J.S. et A. Henriksen. 1985. An automated method for fractionation and determination of aluminium species in freshwaters. Vatten 41 : 48-53.

Roy, R.L. et P.G.C. Campbell. 1997. Decreased toxicity of Al to juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) in acidic soft water containing natural organic matter: a test of the free-ion model. Environ. Toxicol. Chem. 16 : 1962-1969.

Roy, R.L., Campbell, P.G.C., Prémont, S. et J. Labrie. 2000. Geochemistry and toxicity of aluminium in the Saguenay river, Québec, Canada, in relation to discharges from aluminium smelter. Environ. Toxicol. Chem. 19 : 2457-2466.

Samecka-Cymerman, A., et A.J. Kempers. 1990. Tolerance of *Scapania undulata* (L.) Dum. to fluoride. Aquatic Botany 37 : 163-170.

Schecher, W.D. et D.C. McAvoy. 2001. MINEQL+: A chemical equilibrium modeling system, version 4.5 for Windows. Environmental Research Software. Hallowell, ME, USA.

Stevens, D.P., McLaughlin, M.J. et A.M. Alston. 1997. Phytotoxicity of aluminium-fluoride complexes and their uptake from solution culture by *Avena sativa and Lycopersicon esculentum*. Plant and Soil 192 : 81-93.

Stevens, D.P., McLaughlin, M.J. et A.M. Alston. 1998. Phytotoxicity of fluoride ion and its uptake from solution culture by *Avena sativa and Lycopersicon esculentum*. Plant and Soil 200 : 119-129.

SYSTAT, Version 10. 2000. SPSS Science Marketing Department, Chicago, IL, USA.

Tessier, A., Buffle, J. et P.G.C. Campbell. 1994. Uptake of trace metals by aquatic organisms. Dans : Buffle, J. et R.R. DeVitre (éds), *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems*. Lewis Publ., Boca Raton, FL, USA, pp. 199-232.

Twiss, M.R., Errécalde, O., Fortin, C., Campbell, P.G.C., Jumarie, C., Denizeau, F., Berkelaar, E., Hale, B. et K. Van Rees. 2001. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. Chem. Speciation Bioavail. 13 : 9-24.

Uhlen, G. 1985. The toxic effects of aluminium on Barley plants in relation to ionic composition of the nutrient solution. Acta Agric. Scand. 35 : 265-270.

Wehr, J.D. et R.G. Sheath. 2003. Freshwater algae of North America. Ecology and classification. Academic press. Boston, MA, USA. 918 p.

Wilkinson, K.J., Campbell, P.G.C. et P. Couture. 1990. Effect of fluoride complexation on aluminium toxicity towards juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47 : 1446-1452.

Wilkinson, K.J., Bertsch, P.M., Jagoe, C.H. et P.G.C. Campbell. 1993. Surface complexation of aluminum on isolated fish gill cells. Environ. Sci. Technol. 27 : 1132-1138.

Wilkinson, K.J. 1993. Bioaccumulation de l'aluminium inorganique ($Al^{3+}$, $Al(OH)_x^{(3-x)+}$, $Al(F)_y^{(3-y)+}$) chez le saumon atlantique en relation avec l'acidification du milieu aquatique. Thèse de doctorat. INRS-Eau. Université du Québec. Sainte-Foy.

Wong, P.T.S. et P. Couture. 1986. Toxicity screening using phytoplankton, pp. 79-100. Dans : Toxicity testing using microorganisms. B.J. Dutka et G. Bitton (éds). Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

WQPB. 1986. North Carolina water quality standards documentation: Toxicity of fluoride to freshwater biota. Water Quality Planning Branch, Div. Env. Manage., N.C. Dept. Nat. Resour. Commun. Devel. Rep. #86-01. 29 p.

# 8.ANNEXES

## 8.1 Simulations MINEQL+

Tableau 8.1 : Calcul de la spéciation de l'aluminium avec le logiciel MINEQL+ 4.5 pour les conditions 1 du projet (voir tableau 2.2).

| $Al_T$ 0.3 µM | | $Al_T$ 0.6 µM | | $Al_T$ 0.9 µM | | $Al_T$ 1.3 µM | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nom | [ ] en M | Nom | [ ] en M | Nom | [ ] en M | Nom | [ ] en M |
| **$Al^{3+}$** | **3,10E-08** | **$Al^{3+}$** | **6,28E-08** | **$Al^{3+}$** | **9,42E-08** | **$Al^{3+}$** | **1,36E-07** |
| $Al(OH)_2^+$ (+1) | 1,73E-07 | $Al(OH)_2^+$ (+1) | 3,52E-07 | $Al(OH)_2^+$ (+1) | 5,27E-07 | $Al(OH)_2^+$ (+1) | 7,62E-07 |
| $Al(OH)_3$ (aq) | 1,05E-08 | $Al(OH)_3$ (aq) | 2,13E-08 | $Al(OH)_3$ (aq) | 3,20E-08 | $Al(OH)_3$ (aq) | 4,62E-08 |
| $Al(OH)_4^-$ (-1) | 2,17E-09 | $Al(OH)_4^-$ (-1) | 4,40E-09 | $Al(OH)_4^-$ (-1) | 6,60E-09 | $Al(OH)_4^-$ (-1) | 9,53E-09 |
| $AlOH^{+2}$ (+2) | 6,46E-08 | $AlOH^{+2}$ (+2) | 1,31E-07 | $AlOH^{+2}$ (+2) | 1,96E-07 | $AlOH^{+2}$ (+2) | 2,84E-07 |
| $AlSO_4^+$ (+1) | 1,43E-08 | $AlSO_4^+$ (+1) | 2,89E-08 | $AlSO_4^+$ (+1) | 4,34E-08 | $AlSO_4^+$ (+1) | 6,27E-08 |
| $Al(SO4)_2^-$ (-1) | 1,57E-11 | $Al(SO4)_2^-$ (-1) | 3,17E-11 | $Al(SO4)_2^-$ (-1) | 4,76E-11 | $Al(SO4)_2^-$ (-1) | 6,87E-11 |
| Al Total | 2,96E-07 | Al Total | 6,00E-07 | Al Total | 9,00E-07 | Al Total | 1,30E-06 |

Tableau 8.2 : Calcul de la spéciation de l'aluminium avec le logiciel MINEQL+ 4.5 pour les conditions 2 du projet (voir tableau 2.2).

| $Al_T$ 0.3 µM | | $Al_T$ 0.6 µM, $F_T$ 1.5 µM | | $Al_T$ 0.9 µM, $F_T$ 2.5 µM | | $Al_T$ 1.6 µM, $F_T$ 5 µM | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nom | [ ] en M | Nom | [ ] en M | Nom | [ ] en M | Nom | [ ] en M |
| **$Al^{3+}$** | **3,10E-08** | **$Al^{3+}$** | **2,94E-08** | **$Al^{3+}$** | **3,15E-08** | **$Al^{3+}$** | **3,00E-08** |
| $Al(OH)_2^+$ (+1) | 1,73E-07 | $Al(OH)_2^+$ (+1) | 1,65E-07 | $Al(OH)_2^+$ (+1) | 1,76E-07 | $Al(OH)_2^+$ (+1) | 1,68E-07 |
| $Al(OH)_3$ (aq) | 1,05E-08 | $Al(OH)_3$ (aq) | 9,99E-09 | $Al(OH)_3$ (aq) | 1,07E-08 | $Al(OH)_3$ (aq) | 1,02E-08 |
| $Al(OH)_4^-$ (-1) | 2,17E-09 | $Al(OH)_4^-$ (-1) | 2,06E-09 | $Al(OH)_4^-$ (-1) | 2,21E-09 | $Al(OH)_4^-$ (-1) | 2,10E-09 |
| $AlOH^{+2}$ (+2) | 6,46E-08 | $AlOH^{+2}$ (+2) | 6,13E-08 | $AlOH^{+2}$ (+2) | 6,56E-08 | $AlOH^{+2}$ (+2) | 6,25E-08 |
| $AlSO_4^+$ (+1) | 1,43E-08 | **$AlF_2^+$ (+1)** | **8,25E-08** | **$AlF_2^+$ (+1)** | **2,08E-07** | **$AlF_2^+$ (+1)** | **6,33E-07** |
| $Al(SO4)_2^-$ (-1) | 1,57E-11 | **$AlF_3$ (aq)** | **1,02E-09** | **$AlF_3$ (aq)** | **3,94E-09** | **$AlF_3$ (aq)** | **2,14E-08** |
| | | **$AlF^{+2}$ (+2)** | **2,35E-07** | **$AlF^{+2}$ (+2)** | **3,87E-07** | **$AlF^{+2}$ (+2)** | **6,59E-07** |
| | | $AlF_4^-$ (-1) | 5,46E-13 | $AlF_4^-$ (-1) | 3,25E-12 | $AlF_4^-$ (-1) | 3,15E-11 |
| | | $AlSO_4^+$ (+1) | 1,36E-08 | $AlSO_4^+$ (+1) | 1,45E-08 | $AlSO_4^+$ (+1) | 1,38E-08 |
| | | $Al(SO4)_2^-$ (-1) | 1,49E-11 | $Al(SO4)_2^-$ (-1) | 1,59E-11 | $Al(SO4)_2^-$ (-1) | 1,51E-11 |
| Al Total | 2,96E-07 | Al Total | 6,00E-07 | Al Total | 9,00E-07 | Al Total | 1,60E-06 |
| F Total | ------- | F Total | 1,50E-06 | F Total | 2,50E-06 | F Total | 5,00E-06 |

## 8.2 Taux de croissance moyen

Tableau 8.3 : Taux de croissance moyen de *Chlorella pyrenoidosa* dans les témoins des différentes expériences sur la toxicité de l'aluminium avec et sans fluorures.

| Numéro de l'expérience | Taux de croissance moyen (μ moyen) |
|---|---|
| | Divisions·j $^{-1}$ |
| 1A | 0,34 |
| 2A | 0,32 |
| 3A | 0,40 |
| 4A | 0,32 |
| 5A | 0,40 |

## 8.3 Concentrations d'aluminium dans les témoins

Tableau 8.4 : Concentration d'aluminium intracellulaire dans les témoins des différentes expériences sur la prise en charge de l'aluminium avec et sans fluorures.

| Expérience | Aluminium intracellulaire dans les témoins (μmol/m$^2$) | |
|---|---|---|
| | Moyenne | Écart type |
| 1B | 2.84 | 0.18 |
| 2B | 2.47 | 0.16 |
| 3B | 4.19 | 0.33 |
| 4B | 4.48 | 0.49 |