

Université du Québec
INRS-Eau, Terre et Environnement

**BIOACCUMULATION DU CADMIUM PAR DES ALGUES VERTES
UNICELLULAIRES : INFLUENCE DES LIGANDS ORGANIQUES, DU pH
ET DES SUBSTANCES HUMIQUES**

Par
Amiel Boullemant

Thèse présentée pour l'obtention
du grade Philosophiæ doctor (Ph.D.)
en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur externe

Laura Sigg
EAWAG

Examineur externe

Sébastien Sauvé
Université de Montréal

Examineur interne

Isabelle Laurion
INRS-ETE

Codirecteur de recherche

Claude Fortin
INRS-ETE

Directeur de recherche

Peter G.C. Campbell
INRS-ETE



«L'esprit de recherche et de conquête est l'âme permanente de l'évolution.»

- Pierre Teilhard de Chardin -

RÉSUMÉ

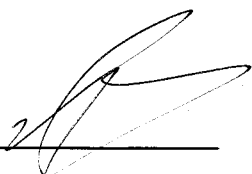
Dans le cadre de ce doctorat, nous avons étudié la prise en charge de complexes du Cd neutres et lipophiles ($\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$, $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ et $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$; DDC = diéthyl-dithiocarbamate, XANT = éthyl-xanthate et Ox = 8-hydroxyquinoline), dans une gamme de pH représentative des eaux de surface naturelles (entre 5,5 et 7), en présence ou non de substances humiques dissoutes (acides humiques, acides fulviques et matière organique naturelle non fractionnée), le tout par des algues vertes unicellulaires d'eaux douces (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlorella pyrenoidosa*). La prise en charge de tels complexes neutres représente une exception au modèle du ligand biotique (ou BLM) puisqu'ils sont beaucoup plus bioaccumulés (par diffusion passive) que le métal libre seul (par des transporteurs à la surface des membranes biologiques). En outre, il n'existe pas de consensus dans la littérature à propos des effets des substances humiques sur la prise en charge (augmentation, aucun effet, diminution) des métaux libres par des organismes aquatiques. Quant aux effets des substances humiques sur la bioaccumulation des complexes neutres, les recherches sont quasi inexistantes. Cette étude visait donc à combler ce manque.

Nos travaux démontrent que la bioaccumulation des complexes neutres $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ (L = DDC, XANT ou Ox) est plus élevée que celle du Cd^{2+} seul, quelque soit le pH et l'espèce algale considérée ; il s'agit donc d'un phénomène général. Cependant, cette augmentation est nettement plus limitée à pH 5,5 que 7, le pH influençant probablement la perméabilité membranaire des algues. L'ajout de substances humiques (SH) diminue la prise en charge à l'état stationnaire des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ à pH 7 quelle que soit l'espèce algale. L'association entre les acides humiques (AH) et les complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$, dans la solution d'exposition, explique en partie cette diminution. Cette association constitue le premier effet des SH ; elle découle de la formation de complexes ternaires impliquant le Cd, les SH et le ligand L. A pH 5,5 la prise en charge à l'état stationnaire n'est pas modifiée en présence des SH voire, dans certains cas, elle est augmentée et ce malgré l'association entre

les AH et les complexes $Cd(L)_2^0$. Il s'agit ici d'un second effet des SH, à savoir leur action de perméabiliser les membranes biologiques vis à vis de solutés neutres et lipophiles. L'insertion des AH dans les membranes biologiques est un des phénomènes qui peut expliquer ces résultats. En ce qui concerne la constante d'internalisation des complexes $Cd(L)_2^0$, elle est le plus souvent augmentée en présence des SH et ce aux deux pH, mais les explications font appel à plusieurs phénomènes simultanés (fluidité de la membrane, insertion des AH dans la membrane, perméabilisation de la membrane due à l'excès de ligand).

D'un point de vue général, la prise en charge de complexes neutres $Cd(L)_2^0$ est influencée par : l'espèce algale, le pH, le coefficient de partage octanol-eau des complexes $Cd(L)_2^0$, la présence de SH (association $Cd(L)_2^0 + SH$; insertion des SH dans la membrane cellulaire), et par l'excès de ligand organique L en solution (effet perméabilisant les membranes biologiques).

Enfin, concernant l'influence des SH sur la bioaccumulation de complexes neutres, nos résultats ont démontré des effets duaux : i) en liant les complexes neutres à pH 7 (la nouvelle molécule est alors non biodisponible) et ii) en augmentant la perméabilité membranaire, surtout à pH acide, probablement par insertion dans la membrane biologique. Suivant la fraction des SH et l'espèce algale des différences apparaissent.



Étudiant



Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Une thèse de doctorat est l'accomplissement de plusieurs années de travail hardi qui nécessite bien évidemment un entourage disponible. Celui-ci est tout d'abord scientifique, à ce titre, les conseils, les idées et le transfert des connaissances de la part de mes directeurs de recherche s'avère le bien scientifique le plus précieux auquel j'ai eu droit durant mon doctorat. Je remercie donc ici officiellement Peter Campbell et Claude Fortin pour tout cela mais aussi pour m'avoir donné ma chance à mon arrivée au Canada. Les échanges et débats d'idées étaient un réel plaisir, je vous en remercie. En outre, du point de vue expérimental, l'aide des techniciens de laboratoire de l'INRS-ETE est tout à fait remarquable en ce sens qu'ils sont toujours disponibles et que leur compétence peut parfois être salvatrice dans les moments délicats. Je ne peux que tous les citer et les remercier tant pour l'aspect scientifique de nos échanges que pour les bons moments de «placotage» (!) : Michelle Bordeleau, Sébastien Duval, Pauline Fournier, Stéphane Prémont, Lise Rancourt et René Rodrigue.

L'entourage dont je parlais plus haut est aussi social : les amis, les étudiants de l'INRS-ETE, la famille. Je ne vous nommerai pas tous, vous vous reconnaîtrez, que nous ayons ensemble bu, mangé, discuté, travaillé, dansé, etc. Mais plus proche de moi, mon papa et ma maman, mes frères et ma sœur (Lionel, Sylvain, Louvian, Florent et Amélie) doivent apparaître ici pour leur soutien moral indéfectible. Ma belle-famille aussi a su être derrière moi tout le long de ce doctorat. Enfin et non des moindres, ma femme Marina qui m'a supporté dans mes accès de folie, dans mon travail acharné, dans mes insomnies, je dois te tirer mon chapeau, la fin est proche, la libération n'en sera que plus belle. Et que dire de la plus belle création de ce doctorat : Arnaud et Alric, deux petits diabolins qui me rendent tellement heureux. Merci à vous mes proches, cette thèse vous appartient un peu aussi.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	v
REMERCIEMENTS	vii
TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTES DES FIGURES	xv
LISTES DES TABLEAUX	xxv
GLOSSAIRE	xxvi
1. Introduction _____	1
1.1 Contexte général _____	1
1.2 Le modèle de l'ion libre ou «Biotic Ligand Model» _____	1
1.3 Les substances humiques aquatiques _____	6
1.3.1 Généralités, formation et structures _____	6
1.3.2 Propriétés chimiques _____	8
1.3.3 Propriétés biologiques _____	13
1.4 Les effets possibles des substances humiques sur le BLM _____	16
1.5 Les complexes neutres : une exception au BLM _____	18
1.5.1 Le diéthyl-dithiocarbamate _____	18
1.5.2 L'oxine _____	19
1.5.3 L'éthyl-xanthate _____	20
1.5.4 Prise en charge de complexes neutres _____	21
1.6 Le métal étudié : le cadmium _____	27
1.7 Les algues étudiées _____	29
1.8 Le pH variable de choix _____	30
1.9 Théorie de la fluorescence _____	32

2. Problématique et objectifs	35
3. Matériels et méthodes	39
3.1 Les réactifs	40
3.2 La culture des algues	43
3.3 Les expériences de toxicité avec les algues vertes	45
3.4 Les expériences de prise en charge	46
3.5 La radiochimie (comptage)	51
3.6 Les expériences de mesure de tension de surface	53
3.7 Les expériences d'association entre le Cd, les Cd(L)_2^0 et les acides humiques par dialyse	55
3.8 La spectrométrie de fluorescence	56
3.8.1 <i>Mode opératoire</i>	56
3.8.2 <i>Titrage des substances humiques par le cadmium</i>	57
3.8.3 <i>Corrections spectrales à intégrer</i>	58
3.9 Dosage du cadmium libre inorganique en présence de ligands organiques (électrode sélective au cadmium)	60
3.10 Détermination des coefficients de partage octanol/eau des complexes neutres	61
3.11 Analyses statistiques	63
4. Propriétés des substances humiques et des complexes neutres	65
4.1 Les résultats des mesures de tension de surface	65
4.2 Constantes de stabilité conditionnelles pour la formation de complexes entre le cadmium et les acides humiques	73
4.3 Les résultats des expériences d'équilibre Cd(L)_2^0 avec les substances humiques	76
4.4 Association entre le cadmium et les différents ligands organiques	82
4.4.1 <i>Approche avec l'électrode sélective au cadmium</i>	82
4.4.2 <i>Polarographie afin d'évaluer l'association Cd-Ox à pH 5,5</i>	89
4.4.3 <i>Approche indirecte d'estimation des constantes de stabilité Cd(L)_2^0</i>	92
4.4.3.1 Cas du DDC	93

4.4.3.2	Cas du XANT	95
4.4.3.3	Cas de l'Ox	95
4.4.4	<i>Spéciation du cadmium en présence ou non des acides humiques</i>	98
4.5	Détermination des coefficients globaux de partage octanol-eau (D_{ow})	101

5. Comportement de fluorescence des substances humiques en présence de Cd, de ligands organiques et de complexes neutres

	$Cd(L)_2^0$	109
5.1	Remarques préliminaires	109
5.2	Spectres de fluorescence des substances humiques en fonction de leur nature, du pH et de leur concentration	110
5.2.1	<i>Remarques générales</i>	110
5.2.2	<i>Effet de pH</i>	112
5.2.3	<i>Effet de concentration</i>	113
5.2.4	<i>Effet du type de substances humiques</i>	117
5.3	Spectres de fluorescence des substances humiques en présence de Cd	117
5.4	Influence des ligands organiques d'intérêt et du pH sur la fluorescence des substances humiques	129
5.4.1	<i>En présence du DDC</i>	129
5.4.2	<i>En présence de XANT</i>	133
5.4.3	<i>En présence d'Ox</i>	136
5.4.4	<i>Synthèse des interactions L-SH</i>	138
5.5	Influence des complexes «métal-ligand organique» et du pH sur la fluorescence des substances humiques	140
5.5.1	<i>Comportement de fluorescence des SH en présence de $Cd(L)_2^0$</i>	140
5.5.2	<i>Interactions possibles entre $Cd(L)_2^0$ et les SH</i>	145
5.5.2.1	Considérations générales	145
5.5.2.2	Étude des résultats	146
5.5.2.3	Interactions possibles $Cd(L)_2^0$ -SH d'après les résultats	151
5.5.2.4	Vérification de l'hypothèse des interactions hydrophobes $Cd(L)_2^0$ -SH	152

5.5.2.5	Conclusion	154
5.5.3	Mise en relation de la fluorescence des systèmes SH-Cd-L avec les expériences de dialyse et de prise en charge	155
6.	Résultats et discussion des expériences de prise en charge par <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en absence de substances humiques	157
6.1	Potentiel toxique des ligands et des substances humiques envers <i>C. reinhardtii</i>	157
6.1.1	Potentiel toxique des ligands organiques	157
6.1.2	Potentiel toxique des substances humiques	159
6.2	Coefficients de diffusion et d'intérialisation	161
6.3	Bioaccumulation du cadmium libre	164
6.4	Modélisation de la bioaccumulation des complexes neutres	166
6.5	Prise en charge et élimination des complexes Cd(L) ₂ ⁰ par <i>C. reinhardtii</i> à pH 7	174
6.6	Prise en charge et élimination des complexes Cd(L) ₂ ⁰ par <i>C. reinhardtii</i> à pH 5,5	180
6.7	Comparaison de la prise en charge des complexes Cd(L) ₂ ⁰ par <i>C. reinhardtii</i> entre pH 7 et pH 5,5	182
6.8	Cas particulier de la bioaccumulation du complexe Cd(Ox) _n	192
6.8.1	Rappel de la spéciation du Cd dans le système Cd-Ox	192
6.8.2	Constantes d'élimination du Cd dans le système Cd-Ox	193
6.8.3	Prise en charge du Cd sous forme Cd(Ox) _n	193
6.8.3.1	Constatations	193
6.8.3.2	Détermination de la proportion de Cd(Ox) ₂ ⁰ par l'intermédiaire du D _{ow}	194
6.8.3.3	Détermination de la proportion de Cd(Ox) ₂ ⁰ par comparaison des k _i issus d'autres études	197
6.8.3.4	Synthèse	200
6.9	Synthèse à propos de la bioaccumulation des complexes neutres Cd(L) ₂ ⁰ par <i>C. reinhardtii</i> aux pH 7 et 5,5	201

7. Résultats et discussion des expériences de prise en charge de complexes neutres $Cd(L)_2^0$ par <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en présence de substances humiques	203
7.1 Prise en charge du Cd dans les systèmes Cd-L-SH par <i>C. reinhardtii</i> : observations générales	204
7.2 Comparaison de la prise en charge dans les systèmes Cd-L-AH avec les systèmes $Cd(L)_2^0$	212
7.2.1 Discussion sur la prise en charge sur le plateau «a»	213
7.2.2 Discussion sur la constante d'internalisation k_i	216
7.3 Comparaison de la prise en charge dans les systèmes Cd-L-(AF ou MON) avec les systèmes $Cd(L)_2^0$	222
7.3.1 Discussion de la prise en charge sur le plateau «a»	225
7.3.2 Discussion sur la vitesse initiale de prise en charge k'_i	225
7.4 Synthèse des effets des SH	226
8. Prise en charge du complexe $Cd(DDC)_2^0$ par trois algues vertes unicellulaires en absence de substances humiques	229
8.1 Coefficients de diffusion et d'internalisation	230
8.2 Prise en charge du Cd^{2+} par les algues vertes étudiées	231
8.3 Paramètres de modélisation de la bioaccumulation du $Cd(DDC)_2^0$ par les algues	234
8.4 Prise en charge du complexe $Cd(DDC)_2^0$ par rapport à celle du Cd^{2+} seul	237
8.5 Prise en charge du complexe $Cd(DDC)_2^0$ en absence de SH – comparaison entre les trois algues vertes	242
8.5.1 Analyse des résultats	242
8.5.2 Effet du pH sur la prise en charge du $Cd(DDC)_2^0$	243
8.6 Acclimatation au $CO_2(g)$ ou culture directe à pH acide	247
8.7 Synthèse de l'effet de l'espèce algale en absence de SH	250
9. Prise en charge du complexe $Cd(DDC)_2^0$ par trois algues vertes unicellulaires en présence de substances humiques	251

9.1	Prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par trois algues vertes : observations générales _____	251
9.2	Modélisation de la prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ en présence des AH _____	254
9.3	Comparaison de la prise en charge dans le système Cd-DDC-AH avec le système $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par trois algues vertes _____	257
9.3.1	<i>Discussion sur la prise en charge sur le plateau «a»</i> _____	257
9.3.2	<i>Discussion sur la constante d'internalisation k_i</i> _____	260
9.4	Comparaison de la prise en charge dans les systèmes Cd-L-(AF ou MON) avec les systèmes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ _____	264
9.4.1	<i>Discussion sur la prise en charge sur le plateau «a»</i> _____	265
9.4.2	<i>Discussion sur la vitesse initiale de prise en charge k'_i</i> _____	266
9.5	Synthèse des effets des SH _____	266
10.	Synthèse _____	269
10.1	Les hypothèses _____	269
10.2	Les interactions _____	270
10.3	Les influences _____	271
10.4	Les implications pratiques _____	273
10.5	Les perspectives _____	274
RÉFÉRENCES.....		277

LISTES DES FIGURES

Figure 1.1 : Modèle conceptuel des interactions algues-métaux, tiré et modifié de Campbell <i>et al.</i> (2002). M est un métal, L un ligand et X un site actif. Pour l'explication des constantes, voir le texte.....	3
Figure 1.2 : Inhibition compétitive théorique de la prise en charge du métal M, due au pH ou à une concentration croissante (de 1 à 3) d'un autre cation N, le flux de transport maximal V_{\max} demeure le même mais le pH ou [N] influencent le nombre de sites de transport disponibles.	4
Figure 1.3 : Adsorption des acides fulviques de la rivière Suwannee (10 mg AF·L ⁻¹) à la surface biologique de la cyanobactérie <i>S. leopoliensis</i> en fonction du pH, tiré de Campbell <i>et al.</i> (1997).	12
Figure 1.4 : Adsorption à pH 5,0 des acides fulviques de la rivière Suwannee à la surface biologique de la cyanobactérie <i>S. leopoliensis</i> en fonction de leur concentration, tiré de Campbell <i>et al.</i> (1997).....	12
Figure 1.5 : Schéma conceptuel du BLM. Interactions des SH avec (i) le métal M de valence z+, (ii) et (iii) la membrane plasmique d'un organisme aquatique. L est un ligand.....	17
Figure 1.6 : Schéma de la réaction d'association entre deux molécules de carbamate et le cadmium. R ₁ et R ₂ peuvent être des chaînes alkyles.....	19
Figure 1.7 : Schéma de la réaction d'association entre deux molécules d'oxine et le cadmium.....	20
Figure 1.8 : Schéma de la réaction d'association entre deux molécules d'éthyl-xanthate et le cadmium.	20
Figure 1.9 : Bioaccumulations théoriques d'un complexe neutre d'un métal quelconque en fonction du temps. Les cas 1 et 2 représentent différents cas de figure suivant quelle est l'étape limitant la prise en charge, pour les détails voir le texte.	25
Figure 1.10 : Diagramme explicatif sur la théorie de la fluorescence	34

Figure 1.11 : Diagramme simplifié de Jablonski indiquant les niveaux énergétiques moléculaires reliés au phénomène de fluorescence, (1) représente l'excitation, (2) la relaxation et (3) l'émission.	34
Figure 2.1 : Schéma récapitulatif des méthodes expérimentales et des chapitres qui s'y rapportent. L'introduction du chapitre 3 revient sur les objectifs reliés aux types d'expériences.....	38
Figure 3.1 : Schéma du protocole expérimental pour les expériences de prise en charge par les algues vertes.	48
Figure 3.2 : Courbes étalons de l'absorbance UV à 254 nm des AH aux pH 7 et 5,5.	51
Figure 3.3 : Mesure de la tension de surface, schématisation du phénomène de ménisque par la méthode Du Nouy en mode dit «pull».	54
Figure 3.4 : Calibrage de l'électrode sélective au Cd^{2+} aux pH 7 et 5,5 en fonction de la concentration de cadmium libre.	61
Figure 4.1: Tension de surface pour différentes concentrations des acides fulviques de la rivière Suwannee à pH 7 et à deux forces ioniques, $T = 23^{\circ}C$. Des lettres différentes désignent des valeurs significativement différentes ($P < 0,05$), $N = 33$; ANOVA : $P < 0,0001$ pour tous les points. La droite rouge indique la tension de surface de la solution témoin (en absence des acides humiques).	66
Figure 4.2 : Tension de surface pour différentes concentrations des acides humiques de la rivière Suwannee à pH 7 et à deux forces ioniques, $T = 23^{\circ}C$. Des lettres différentes désignent des valeurs significativement différentes ($P < 0,05$), $N = 33$; ANOVA : $P < 0,0001$ pour tous les points. Les tirets rouges indiquent la tension de surface de la solution témoin (en absence des acides humiques).	67
Figure 4.3 : Tension de surface différentielle des substances aux pH 7 et 5,5. La droite $y = 0$ représente une absence d'effet tensioactif.....	71
Figure 4.4 : Évolution dans le temps de la tension de surface d'un même échantillon des acides humiques de la rivière Suwannee à pH 7, mesuré à des temps différents, pour une forte force ionique et à $23^{\circ}C$, $[AH] = 225 \text{ mg } C \cdot L^{-1}$	72

Figure 4.5 : Complexation du Cd avec les AH de la rivière Suwannee à pH 7 et 5,5 comparée avec les résultats obtenus avec le logiciel WHAM6 en tenant compte du contenu en métaux des AH.....	75
Figure 4.6 : Exemple de l'atteinte de l'équilibre pour l'expérience de dialyse entre le Cd-DDC-AH à pH 7 avec tampon. [DDC] = 1,0 μ M, [AH] = 6,5 mg C·L ⁻¹ . [Cd] _{Total} = 0,39 nM (essai 1) ; 0,14 nM (essai 2) et 0,09 nM (essai 3). Chaque point représente une mesure prise dans les systèmes de dialyse 1, 2 ou 3.....	78
Figure 4.7 : Association du Cd(DDC) ₂ ⁰ avec les AH de la rivière Suwannee à pH 7 en présence ou non de tampon pH HEPES.....	79
Figure 4.8 : Association des complexes neutres Cd(L) ₂ ⁰ avec les acides humiques de la rivière Suwannee aux pH 7 et 5,5. Des lettres différentes indiquent des différences significatives soit P < 0,05 (ANOVA à une voie avec test post-hoc NSK).....	81
Figure 4.9 : Calibrage de l'électrode sélective au Cd ²⁺ et zone de linéarité correspondante aux pH 7 et 5,5.....	82
Figure 4.10 : Potentiels mesurés à l'électrode sélective au Cd ²⁺ en fonction du ratio ligand/cadmium total à pH 5,5. La concentration de ligand est constante (3,2 mM de DDC ; 3,1 mM d'Ox et 3,2 mM de XANT) et celle en cadmium varie entre 1,0 μ M et 340 μ M.	85
Figure 4.11 : Potentiels mesurés à l'électrode sélective au Cd ²⁺ en fonction du ratio ligand/cadmium total à pH 7. La concentration de ligand est constante (3,0 mM de DDC ; 7,9 mM d'Ox et 3,2 mM de XANT) et celle en cadmium varie entre 1,0 μ M et 340 μ M.	86
Figure 4.12 : Titrage fictif du DDC 3,14 mM par le cadmium et indication du cadmium libre obtenu en considérant log β_2 (Cd-DDC) = 16,0.	88
Figure 4.13 : Concentration du cadmium libre calculée d'après le Cd labile (aire sous la courbe) et MINEQL+ en fonction du cadmium total, dans MHSM1 _t à pH 5,5 en présence d'oxine à 61 μ M, déterminée par SWASV.	90

Figure 4.14 : Polarogramme du système Cd+Ox à pH 5,5, [Ox] = 61 μ M et [Cd] _T = 0,6 μ M. Ceci a été réalisé avec le logiciel BAS100W v2 (Bioanalytical Systems Inc., IN, USA).....	92
Figure 4.15 : Relation log K ₁ ou β_2 (Pb) face à log K ₁ ou β_2 (Cd) pour divers ligands à force ionique nulle et pour T = 298°K.	94
Figure 4.16 : Relation log K ₁ ou β_2 (Cu) face à log K ₁ ou β_2 (Cd) pour divers ligands à force ionique nulle et pour T = 298°K.....	96
Figure 4.17 : Spéciation de l'oxine en fonction du pH pour une concentration totale en oxine de 79 μ M dans un milieu MSHM1 _t	97
Figure 4.18 : Coefficient de partage octanol/eau du système Cd-DDC tel qu'affecté par le pH. Le DDC passe quasi totalement en phase octanol lors de l'extraction à pH 5,5 et ne permet pas une extraction du Cd de la même phase aqueuse ajustée à pH 7. Nous avons indiqué la valeur du D _{ow} pour une extraction directe de la phase aqueuse à pH 7.	104
Figure 4.19 : Comparaison de l'effet du pH sur l'association AH + Cd(L) ₂ ⁰ face à l'effet du pH sur le D _{ow} de chaque complexe neutre. Les deux axes sont en échelle logarithmique. L'effet est calculé pour les valeurs à pH 7 sur celles à pH 5,5.	105
Figure 5.1 : Spectre en MEE des acides humiques de la rivière Suwannee à pH 7 et 5,5. Les flèches indiquent le déplacement des zones d'intensités maximales du graphique de droite par rapport à celui de gauche. Ici la zone B a disparue. Les unités sur l'axe des z sont en 1000·unités Raman·nm ⁻¹ ; [AH] = 6,5 mg C·L ⁻¹	112
Figure 5.2 : Spectres en MEE des acides humiques de la rivière Suwannee à pH 5,5 pour différentes concentrations. Les flèches indiquent le déplacement des zones d'intensités maximales par rapport au graphe de référence à 7,0 mg C·L ⁻¹	115
Figure 5.3 : Spectres en MEE des substances humiques (6,5 mg C·L ⁻¹) de la rivière Suwannee à pH 7.....	116

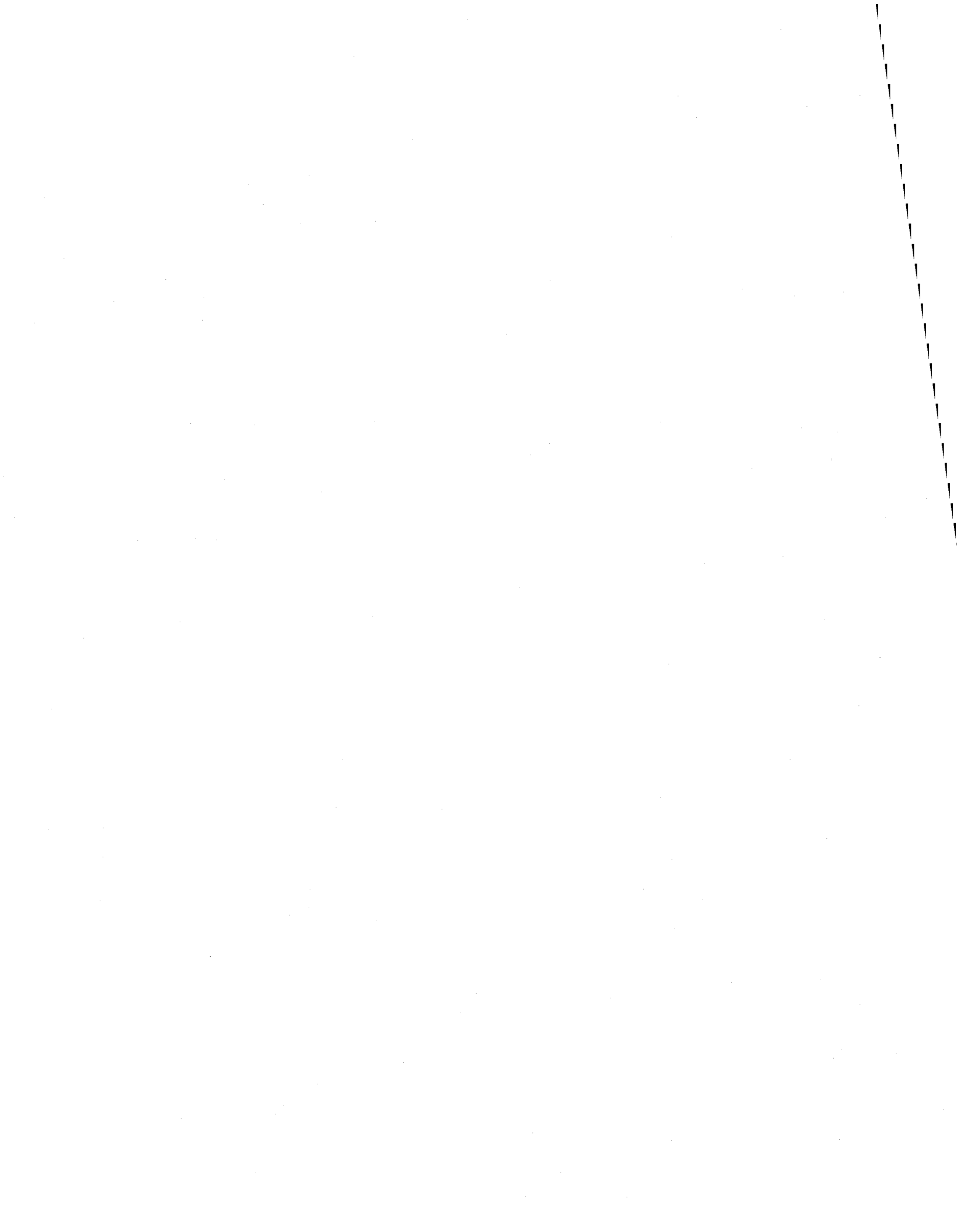
Figure 5.4 : Spectres en MEE pour les acides humiques de la rivière Suwannee ([AH] = 6,5 mg C·L ⁻¹) à pH 7 (A) sans ajout de Cd ; (B) en présence de Cd à 0,1 nM ; (C) de Cd à 10 nM ; (D) et de Cd à 10 μM.	118
Figure 5.5 : Intensité de fluorescence de l'aire A des trois fractions de SH telle qu'influencée par le titrage au Cd à pH 7 ; 100% représente l'intensité de fluorescence de chaque SH en absence de Cd.	120
Figure 5.6 : Indice de changement de fluorescence ICF pour les titrages des SH par le Cd. Les courbes représentent les régressions non linéaires ($r^2 > 0,95$). L'encadré à pH 7 montre le même graphique pour une échelle log en abscisse.....	123
Figure 5.7 : Valeurs des paramètres «a» et «b» issues des régressions non linéaires pour chaque système Cd+SH aux deux pH ; pour chaque paramètre, les lettres indiquent les valeurs statistiquement différentes les unes des autres (ANOVA à une voie, test post hoc NSK, P < 0,05).....	124
Figure 5.8 : Résultats des ICF lors du titrage des AF par le Cd à pH 7 ouvert à l'atmosphère ou sous atmosphère N ₂ (g).	127
Figure 5.9 : Spectres en MEE des acides humiques de la rivière Suwannee à pH 7 en présence (B) ou non (A) de DDC (1 μM). Les déplacements des zones d'intensités maximales sont indiqués le cas échéant par des flèches.	131
Figure 5.10 : Spectres en MEE des acides humiques de la rivière Suwannee à pH 7 en présence (B) ou non (A) de XANT (0,1 mM). Les déplacements des zones d'intensités maximales sont indiqués le cas échéant par des flèches. ...	135
Figure 5.11 : Spectres en MEE des acides fulviques de la rivière Suwannee à pH 7 en présence (B) ou non (A) d'oxine (79 μM). Les déplacements des zones d'intensités maximales sont indiqués le cas échéant par des flèches.	137
Figure 5.12 : Indice de changement de fluorescence (%) des systèmes SH+L tels que titrés par le Cd à pH 7. Les lignes noires représentent les régressions non linéaires (voir le texte pour plus de détails). ICF est calculé par rapport au système de référence SH+L.	141
Figure 5.13 : Indice de changement de fluorescence (%) des systèmes SH+L tels que titrés par le Cd à pH 5,5. Les lignes noires représentent les régressions	

non linéaires (voir le texte pour plus de détails). ICF est calculé par rapport au système de référence SH+L.	142
Figure 5.14 : Spectres en MEE des acides fulviques de la rivière Suwannee à pH 7 (A) en absence de DDC, (B) en présence de DDC 1,0 μM et de $[\text{Cd}] = 0 \text{ nM}$, (C) DDC 1,0 μM et $[\text{Cd}] = 2,4 \text{ nM}$ et (D) DDC 1,0 μM et $[\text{Cd}] = 162 \text{ nM}$..	144
Figure 5.15 : Influence du titrage avec le Cd sur le comportement de fluorescence des systèmes SH-L. Le tableau 5.5 donne les différences statistiques observées pour cette figure permettant ainsi de l'alléger. L'explication des zones I, II et III se trouve dans le texte.	147
Figure 6.1: Effet des ligands organiques sur la croissance de l'algue <i>C. reinhardtii</i> à pH 7 (96 h) ; $[\text{Ox}] = 79 \mu\text{M}$; $[\text{XANT}] = 100 \mu\text{M}$ et $[\text{DDC}] = 1 \mu\text{M}$. Les valeurs rapportées sont calculées par rapport au témoin et les barres d'erreurs représentent l'écart-type expérimental en tenant compte de la propagation des erreurs (N = 6). Les étoiles indiquent des différences statistiquement significatives par rapport au témoin (P < 0,05 ; test t non pairé de Student).....	159
Figure 6.2 : Effets des trois fractions de substances humiques de la rivière Suwannee sur la croissance de l'algue <i>C. reinhardtii</i> (96 h) ; $[\text{SH}] = 6,5 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$. Les valeurs rapportées sont calculées par rapport au témoin et les barres d'erreurs représentent l'écart-type expérimental en tenant compte de la propagation des erreurs (N = 6). Les étoiles indiquent des différences statistiquement significatives par rapport au témoin (P < 0,05 ; test t non pairé de Student).....	160
Figure 6.3 : Schéma explicitant les flux de diffusion (J_{dif}) et d'internalisation maximale observé (J_{obs}) du cadmium libre pour une algue.....	161
Figure 6.4 : Prise en charge intracellulaire du Cd^{2+} libre à pH 5,5 et 7 par <i>C. reinhardtii</i> exposée à 0,38 nM de Cd total. Les lignes représentent les régressions non linéaires appliquées aux deux groupes de points.....	164
Figure 6.5 : Schéma de la bioaccumulation du Cd en présence de ligands organiques ($\text{Cd}(\text{L})_2^0$) par une algue verte unicellulaire. Les constantes k_i et k_e sont respectivement pour l'internalisation et l'élimination du Cd ; le «Cd non	

labile» correspond au Cd qui se trouve à l'intérieur de la cellule et qui ne participe pas à l'élimination.....	166
Figure 6.6 : Expériences d'élimination : concentrations en Cd demeurant dans les cellules algales (<i>C. reinhardtii</i>) aux pH 7 et 5,5 en fonction du temps. A titre d'exemple, nous illustrons ici par la ligne en pointillée la signification expérimentale de $[Cd]_{nl}$, la quantité de Cd non labile dans le cas du Cd-DDC à pH 7 (cf. le modèle pour plus de détails).....	170
Figure 6.7 : Schéma de l'élimination du Cd suivant un comportement analogue à un composé organique lipophile (cas 1) ou suivant un comportement comparable à celui du Cd^{2+} (cas 2).	172
Figure 6.8 : Cinétiques de prise en charge des complexes $Cd(L)_2^0$ à pH 7 par <i>C. reinhardtii</i> accompagnées de leur régression non linéaire (équation 6.2). Les neuf points pour chaque système sont issus de trois expériences indépendantes avec chacune trois points.	174
Figure 6.9 : Prise en charge expérimentale (points noirs) et théorique calculée en fonction de k_i et k_e (ligne noire) du complexe $Cd(DDC)_2^0$ par <i>C. reinhardtii</i> aux pH 7 et 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.	177
Figure 6.10 : Prise en charge expérimentale (triangles blancs) et théorique calculée en fonction de k_i et k_e (ligne noire) du complexe $Cd(XANT)_2^0$ par <i>C. reinhardtii</i> aux pH 7 et 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.	178
Figure 6.11 : Prise en charge expérimentale (carrés gris) et théorique calculée en fonction de k_i et k_e (ligne noire) du complexe $Cd(Ox)_2^0$ par <i>C. reinhardtii</i> aux pH 7 et 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.....	179
Figure 6.12 : Cinétiques de prise en charge des complexes $Cd(L)_2^0$ à pH 5,5 par <i>C. reinhardtii</i> accompagnées de leur régression non linéaire (équation 6.2). Les neuf points pour chaque système sont issus de trois expériences indépendantes avec chacune trois points.	181

Figure 6.13 : Prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par <i>C. reinhardtii</i> à pH 7 pour des concentrations croissantes de Cd ($R = L/M = 3\ 000 = \text{constant}$), mesurée à $t = 30$ min.....	189
Figure 6.14 : Prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par <i>C. reinhardtii</i> à pH 5,5 pour des concentrations croissantes de Cd ($R = L/M = 3\ 000 = \text{constant}$), mesurée à $t = 30$ min.....	190
Figure 6.15 : Prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par <i>C. reinhardtii</i> à pH 7 pour deux concentrations de DDC (1 μM et 50 μM) et la même concentration de Cd (0,38 nM).....	192
Figure 6.16 : Spéciation et extraction par l'octanol du Pb et du Cu en présence d'oxine. Les lignes représentent la spéciation en % de chaque espèce métallique. Les carrés noirs représentent la fraction de métal extraite par l'octanol. Figure tirée de Turner et Mawji (2004).....	196
Figure 7.1 : Prise en charge expérimentale des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ par <i>C. reinhardtii</i> en absence (symboles noirs) et en présence des SH (symboles de couleurs) à pH 7.....	205
Figure 7.2 : Prise en charge expérimentale des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ par <i>C. reinhardtii</i> en absence (symboles noirs) et en présence des SH (symboles de couleurs) à pH 5,5.....	206
Figure 7.3 : Prises en charge expérimentales (symboles) et théoriques (lignes noires) des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ en présence des AH par <i>C. reinhardtii</i> à pH 7. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.	208
Figure 7.4 : Prises en charge expérimentales (symboles) et théoriques (lignes noires) des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ en présence des AH par <i>C. reinhardtii</i> à pH 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.....	209
Figure 7.5 : Prise en charge expérimentale à pH 5,5 du Cd sous forme $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ comparée à celle calculée par le modèle en faisant varier C (se référer au texte pour plus de détails).....	212
Figure 8.1 : Prise en charge du Cd^{2+} (0,38 nM) par les trois algues vertes aux pH 7 et 5,5.....	233

Figure 8.2 : Quantité de Cd^{2+} demeurant dans les cellules algales de <i>P. subcapitata</i> et <i>C. pyrenoïdosa</i> aux pH 7 et 5,5 en présence de DDC.....	235
Figure 8.3 : Prise en charge expérimentale (points noirs) et théorique (ligne noire) du complexe $Cd(DDC)_2^0$ par <i>C. reinhardtii</i> aux pH 7 et 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.	239
Figure 8.4 : Prise en charge expérimentale (losanges noirs) et théorique (ligne noire) du complexe $Cd(DDC)_2^0$ par <i>P. subcapitata</i> aux pH 7 et 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.	240
Figure 8.5 : Prise en charge expérimentale (triangles inversés noirs) et théorique (ligne noire) du complexe $Cd(DDC)_2^0$ par <i>C. pyrenoïdosa</i> aux pH 7 et 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.	241
Figure 8.6 : Prise en charge du $Cd(DDC)_2^0$ à pH 5,5 par (A) <i>C. reinhardtii</i> , (B) <i>P. subcapitata</i> et (C) <i>C. pyrenoïdosa</i> , après des cultures algales acclimatées au $CO_2(g)$ ou directement cultivées à pH 5,5.....	249
Figure 9.1 : Prise en charge expérimentale du complexe $Cd(DDC)_2^0$ par <i>C. reinhardtii</i> (A), <i>P. subcapitata</i> (B) et <i>C. pyrenoïdosa</i> (C) en absence (symboles noirs) et en présence des SH (symboles de couleurs) à pH 7.	252
Figure 9.2 : Prise en charge expérimentale du complexe $Cd(DDC)_2^0$ par <i>C. reinhardtii</i> (A), <i>P. subcapitata</i> (B) et <i>C. pyrenoïdosa</i> (C) en absence (symboles noirs) et en présence des SH (symboles de couleurs) à pH 5,5.	253
Figure 9.3 : Prises en charge expérimentales (symboles) et théoriques (lignes noires) du $Cd(DDC)_2^0$ en présence des AH par <i>C. reinhardtii</i> (A), <i>P. subcapitata</i> (B) et <i>C. pyrenoïdosa</i> (C) à pH 7. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.....	255
Figure 9.4 : Prises en charge expérimentales (symboles) et théoriques (lignes noires) du $Cd(DDC)_2^0$ en présence des AH par <i>C. reinhardtii</i> (A), <i>P. subcapitata</i> (B) et <i>C. pyrenoïdosa</i> (C) à pH 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.....	256
Figure 10.1 : Schéma conceptuel synthétisant les interactions entre les composés en solution et leurs influences concernant la prise en charge de complexes neutres par des algues vertes.....	275



LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Propriétés chimiques des substances humiques et processus biogéochimiques reconnus qui y sont associés, adapté de Campbell <i>et al.</i> (1997).	10
Tableau 1.2 : Récapitulatif des expériences menées sur la prise en charge des métaux traces en présence de ligands formant des complexes neutres lipophiles.	23
Tableau 3.1 : Concentrations molaires du milieu normal et modifié à haute teneur en sels pour la culture des algues, MHSM (Macfie <i>et al.</i> 1994).	45
Tableau 4.1 : Modèle des acides humiques comme polyélectrolytes en fonction du pH et de la force ionique. Les dessins représentent la forme (en pelote ou dispersée) des AH. Adapté de Ghosh et Schnitzer (1980).	69
Tableau 4.2 : Concentrations des principaux métaux en nM dans les substances humiques de la rivière Suwannee (6,5 mg C·L ⁻¹) dosés par ICP-AES. LD signifie limite de détection.	76
Tableau 4.3 : Conditions du premier test de détermination des constantes conditionnelles de stabilité entre le cadmium et les ligands organiques.	84
Tableau 4.4 : Récapitulatif des constantes thermodynamiques utilisées pour calculer la spéciation du Cd ; pK_{a1} et $p\beta_{a2}$ sont les constantes d'acidité de chaque ligand ; $\log K_1$ et $\log \beta_2$ sont les constantes de complexation entre le Cd et chaque ligand. Toutes ces réactions (avec leurs constantes respectives) ont été ajoutées aux logiciels MINEQL+ et WHAM6.	99
Tableau 4.5 : Spéciation calculée du Cd en présence des ligands DDC, Ox ou bien XANT ainsi qu'en présence ou non des AH de la rivière Suwannee, pour les pH 7 et 5,5. Si la spéciation du Cd en présence des AF est différente à celle en présence des AH, elle est indiquée entre parenthèses en italique.	100
Tableau 4.6 : Moyenne (m) et écart-type (sd) du D_{ow} pour chaque complexe neutre.	102

Tableau 4.7 : Valeurs du D_{ow} pour le complexe $Cd(DDC)_2^0$ à pH 5,5 pour des concentrations croissantes de DDC. $[DDC]_0 = 1 \mu M$	103
Tableau 4.8 : Comparaison des données sur l'association Cd-L-AH et les D_{ow} (\pm représente l'écart-type).....	107
Tableau 5.1 : Valeurs des paramètres «a» et «b» issues des régressions non linéaires pour chaque système Cd+SH aux deux pH (N = 6 ; P < 0,0009 que ce soit pour le paramètre «a» et «b») ; \pm représente l'intervalle de confiance à 95% pour chaque valeur. Pour la comparaison statistique des valeurs des paramètres «a» et «b», voir la figure 5.9.....	122
Tableau 5.2: Pourcentage (%) de changement d'intensité de fluorescence (ICF) de chaque fluorophore des substances humiques en présence de DDC (1,0 μM) aux pH 5,5 et 7.	132
Tableau 5.3 : Pourcentage (%)de changement d'intensité de fluorescence (ICF) de chaque fluorophore des substances humiques en présence de XANT (0,1 mM) aux pH 5,5 et 7.....	134
Tableau 5.4 : Pourcentage (%) de changement d'intensité de fluorescence (ICF) de chaque fluorophore des substances humiques en présence d'Ox (79 μM) aux pH 5,5 et 7.....	138
Tableau 5.5 : Différences statistiques (P < 0,05) sur les paramètres «a» et «b» dans les systèmes Cd-SH-L aux pH 7 et 5,5.	148
Tableau 5.6 : Données numériques ayant servi à réaliser la figure 5.17. Les codes de couleurs représentent les zones (I en rouge, II en bleu et III en vert). Se référer au texte pour plus de détails.....	149
Tableau 5.7 : Compilation des différences statistiques (indiqué par un oui) induites par le pH sur les titrages par le Cd des systèmes SH-L (P < 0,05 ; test non pairé de Student). Se référer au texte pour plus de détails.	151
Tableau 5.8 : Constante théorique de distribution K_{om} entre un complexe $Cd(L)_2^0$ sorbé sur les AH et ce même complexe libre en solution calculée à partir du D_{ow} aux pH 7 et 5,5.	154
Tableau 6.1 : Résultats des flux de diffusion et d'internalisation du Cd chez <i>C. reinhardtii</i> aux pH 5,5 et 7 en présence ou non de ligands organiques.....	163

Tableau 6.2 : Compilation des paramètres «a» et «b» pour la prise en charge du Cd libre par <i>C. reinhardtii</i> aux pH 7 et 5,5.....	165
Tableau 6.3 : Compilation des constantes C (équation 6.11) , k_c (équation 6.8), «a» (équation 6.2 appliquée à la prise en charge des $Cd(L)_2^0$) et k_i (équation 6.10) pour <i>C. reinhardtii</i> aux pH 7 et 5,5 (\pm l'erreur-type).	173
Tableau 6.4 : Coefficients «a» et k_i (\pm erreur-type) pour les cinétiques de prise en charge des complexes $Cd(L)_2^0$ à pH 7 par <i>C. reinhardtii</i> et indication du D_{ow} (\pm écart-type).....	175
Tableau 6.5 : Coefficients «a» et k_i (\pm erreur-type) pour les cinétiques de prise en charge des complexes $Cd(L)_2^0$ à pH 5,5 par <i>C. reinhardtii</i> et indication du D_{ow} (\pm écart-type).....	182
Tableau 6.6 : Effet de l'acidification du milieu sur les constantes k_e , k_i et «a» (ratio des valeurs à pH 7 sur celles à pH 5,5) pour <i>C. reinhardtii</i> (\pm l'erreur-type en tenant compte de la propagation des erreurs).	182
Tableau 6.7 : Perméabilité membranaire observée pour des complexes métal-ligand organique (1) dans notre étude, (2) dans Phinney et Bruland (1994) et (3) dans Croot <i>et al.</i> (1999). P_{obs} (équation 6.14) est exprimée en 10^{-4} $cm \cdot s^{-1}$ et k_{bio} (équation 6.15) est exprimée en $10^{-9} \cdot L \cdot cell^{-1} \cdot h^{-1}$; ces deux paramètres sont normalisés pour $[m\acute{e}tal] = 1$ nM.....	186
Tableau 6.8 : Coefficients k_i et «a» pour la prise en charge du Cd (0,38 nM) à pH 7 par <i>C. reinhardtii</i> en présence de deux concentrations différentes de DDC (1 et 50 μ M).....	191
Tableau 6.9 : Constantes d'internalisation du Cd aux pH 7 et 5,5 obtenues avec l'approche des D_{ow} . Entre parenthèses figurent les valeurs pour 100% de complexe $Cd(Ox)_2^0$	197
Tableau 6.10 : Constantes d'élimination k_{bio} et de perméabilité P_{obs} aux pH 7 et 5,5 pour le complexe $Cd(Ox)_2^0$ chez <i>C. reinhardtii</i> obtenues avec l'approche des D_{ow} . Entre parenthèses figurent les valeurs pour 100% de complexe $Cd(Ox)_2^0$	197

Tableau 6.11 : Constantes d'internalisation du Cd aux pH 7 et 5,5 d'après nos travaux, ceux de Phinney et Bruland (1994) et ceux de Croot <i>et al.</i> (1999). Les calculs sont réalisés de la même manière qu'expliquée à la section 6.4.	198
Tableau 6.12 : Constantes d'élimination k_{bio} et de perméabilité P_{obs} aux pH 7 et 5,5 pour le complexe $Cd(Ox)_2^0$ chez <i>C. reinhardtii</i> obtenues avec l'approche des D_{ow} . Entre parenthèses figurent les valeurs pour 100% de complexe $Cd(Ox)_2^0$	200
Tableau 6.13 : Comparaison pour les complexes $Cd(L)_2^0$ à pH 7 et 5,5 des perméabilités observées (P_{obs}), des coefficients de partage octanol-eau (D_{ow}) et de la fraction non labile de Cd intracellulaire, chez <i>C. reinhardtii</i>	202
Tableau 7.1 : Compilation des paramètres k_i et k_e pour les systèmes Cd-L-AH à pH 7 et 5,5 tels que déterminés dans la section 6.4 pour les systèmes $Cd(L)_2^0$ en absence des AH (\pm représente l'erreur-type sur la valeur). k'_i est calculée selon l'équation 7.1.	210
Tableau 7.2 : Variations sur la fraction labile de Cd (C) permettant d'améliorer la modélisation de la prise en charge dans les systèmes Cd-L-AH (\pm est l'erreur-type en tenant compte de la propagation des erreurs, N = 9).	211
Tableau 7.3 : Compilation des paramètres «a» et k_i pour les systèmes $Cd(L)_2^0$ et Cd-L-AH à pH 7 et 5,5 (\pm représente l'erreur-type sur la valeur).	213
Tableau 7.4 : Effet dans les systèmes $Cd(L)_2^0$ de la présence des AH sur le paramètre «a» et sur la constante k_i aux pH 7 et 5,5 ; \pm représente l'erreur-type sur les valeurs en tenant compte de la propagation des erreurs.....	215
Tableau 7.5 : Compilation des possibles effets des AH et des ligands organiques sur la perméabilité membranaire de <i>C. reinhardtii</i> aux pH 7 et 5,5. Pour les détails se référer au texte.	221
Tableau 7.6 : Compilation des paramètres «a» issu des régressions non linéaires (N = 9) et k'_i expérimental (N = 3) pour les systèmes Cd-L-SH à pH 7 (\pm représente l'erreur type sur la valeur).	223

Tableau 7.7 : Compilation des paramètres «a» issu des régressions non linéaires (N = 9) et k'_i expérimental (N = 3) pour les systèmes Cd-L-SH à pH 5,5 (\pm représente l'erreur type sur la valeur).	224
Tableau 8.1 : Quelques caractéristiques concernant les trois algues étudiées.	229
Tableau 8.2 : Résultats des flux de diffusion et d'internalisation du Cd chez <i>C. reinhardtii</i> , <i>P. subcapitata</i> et <i>C. pyrenoïdosa</i> aux pH 5,5 et 7 pour Cd^{2+} et $Cd(DDC)_2^0$ en présence ou non de SH.	230
Tableau 8.3 : Influence du pH sur les paramètres de prise en charge du Cd^{2+} (k_i et «a») pour les trois algues vertes étudiées aux pH 7 et 5,5 (\pm l'erreur-type).	232
Tableau 8.4 : Compilation des constantes «a», k_e et C (déterminées par régression non linéaire), k_i (déterminées expérimentalement) pour la prise en charge par trois algues verte unicellulaires du complexe $Cd(DDC)_2^0$ aux pH 7 et 5,5 (\pm l'erreur-type).	234
Tableau 8.5 : Pourcentage de quelques acides gras composant la membrane biologique de <i>C. reinhardtii</i> et <i>P. subcapitata</i>	236
Tableau 8.6 : Influence du DDC sur la prise en charge du Cd par rapport au Cd^{2+} seul pour les paramètres k_i et «a» pour les trois algues vertes étudiées aux pH 7 et 5,5 (\pm l'erreur-type).	238
Tableau 8.7 : Effet du pH (ratio des valeurs à pH 7 sur celles à pH 5,5) sur les paramètres «a» et k_i caractérisant la prise en charge du Cd en présence de DDC par les trois algues vertes étudiées.	244
Tableau 8.8 : Perméabilité membranaire observée pour des complexes métal-ligand organique (1) dans notre étude, (2) dans Phinney et Bruland (1994) et (3) dans Croot <i>et al.</i> (1999). P_{obs} (équation 6.14) est exprimée en $10^{-4} \cdot cm \cdot s^{-1}$ et k_{bio} (équation 6.15) est exprimée en $10^{-9} \cdot L \cdot cell^{-1} \cdot h^{-1}$; ces deux paramètres sont normalisés pour $[m\acute{e}tal] = 1 \text{ nM}$	245
Tableau 9.1 : Compilation des constantes k_i , k_e et C pour la prise en charge du $Cd(DDC)_2^0$ à pH 7 et 5,5 tels que déterminés dans la section 8 en absence des AH (\pm représente l'écart-type sur la valeur). k'_i est calculée selon l'équation 7.1.	254

Tableau 9.2 : Compilation des paramètres «a» et k_i pour le système $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ en présence ou non des AH à pH 7 et 5,5 (\pm représente l'erreur-type sur la valeur).....	258
Tableau 9.3 : Influence de l'ajout des AH sur le paramètre «a» et la constante k_i aux pH 7 et 5,5 ; \pm représente l'erreur-type sur les valeurs en tenant compte de la propagation des erreurs.....	259
Tableau 9.4 : Compilation des effets possibles des AH et du DDC^- sur la perméabilité membranaire de <i>C. reinhardtii</i> , <i>P. subcapitata</i> et <i>C. pyrenoidosa</i> aux pH 7 et 5,5. Pour les détails se référer au texte.....	262
Tableau 9.5 : Compilation des possibles effets des AH et des ligands organiques sur la perméabilité membranaire de <i>C. reinhardtii</i> aux pH 7 et 5,5. Pour les détails se référer au texte.....	263
Tableau 9.6 : Compilation des paramètres «a» et k'_i pour le système Cd-DDC-SH à pH 5,5 chez trois algues vertes (\pm représente l'erreur-type sur la valeur). PDS signifie «pas de différences statistiques».....	264
Tableau 9.7 : Compilation des paramètres «a» et k'_i pour le système Cd-DDC-SH à pH 7 chez trois algues vertes (\pm représente l'erreur-type sur la valeur). PDS signifie «pas de différences statistiques».....	265

GLOSSAIRE

AF : Acides Fulviques.

AH : Acides Humiques.

BLM : Biotic Ligand Model (Modèle du Ligand Biotique).

DDC : Diéthyl-dithiocarbamate.

Densité cellulaire : nombre de cellules algales contenues dans 1 mL.

DMDC : Diméthyl-dithiocarbamate.

D_{ow} : Coefficient global de répartition octanol/eau (octanol/water).

DTPA : Acide DiéthylèneTriaminePentaAcétique.

EDTA : Acide EthylèneDiamineTétraAcétique.

FIM : Free Ion Model (Modèle de l'Ion Libre).

FRAQUIL : milieu de culture censé représenter les eaux douces.

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineethanesulfonique.

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute Performance).

K_{ow} : Coefficient de répartition octanol/eau (octanol/water).

MES : Acide 2-(N-morpholino)-ethanesulfonique.

MHSM : Modified High Salt Medium (Milieu en haute teneur en sels modifié).

MON : Matière Organique Naturelle non fractionnée et dissoute.

NTA : Acide nitrilotriacétique.

RP-HPLC : Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inversée).

SH : Substances Humiques.

XANT : Ethyl-xanthate.

MOTS CLES :

Cadmium, ligands organiques forts, complexes lipophiles, algues unicellulaires, prise en charge, pH, substances humiques, type de SH.

Définition de quelques termes employés le long de cette thèse.

Spéciation : il s'agit de la distribution d'un élément parmi les espèces chimiques définies d'un système (Templeton *et al.* 2000).

Biodisponibilité : fraction d'une substance disponible pour l'absorption par un organisme en considérant une voie spécifique d'exposition. [définition issue du Winnipeg Ecotox Workshop organisé par G. R. B. Webster, University of Manitoba, Winnipeg, Canada, 16-19 juin 1996]

Prise en charge : entrée d'une substance dans le corps, un organe, un tissu, une cellule ou bien dans les fluides corporels par le passage à travers une membrane ou par le biais d'autres voies (Duffus 1993).

Association(s) supramoléculaire(s) : association de deux ou plus entités moléculaires tenues ensemble et organisées par le biais d'interactions de liaisons intermoléculaires, c'est à dire non covalentes (Muller 1994).

Espèces labiles : ce terme est utilisé pour désigner des espèces chimiques instables ou de transition; il peut aussi décrire dans certains cas des espèces stables mais réactives (Muller 1994).

1. Introduction

1.1 Contexte général

Les métaux sont intimement liés à la civilisation des hommes. Depuis la révolution du fer en passant par l'art pictural ou bien les canalisations en plomb de la Grande Rome, les métaux ont permis aux hommes leur développement et leur rayonnement. Cependant l'Humanité a oublié de prendre garde aux effets néfastes d'une sur-utilisation de ces métaux pour sa propre santé mais aussi pour son environnement. Les premiers cas documentés d'intoxication aux métaux étaient le fait de contaminations ponctuelles, par exemple au cadmium dans les années 30 chez des ouvriers (Nordberg 2004). Ces contaminations ont entraîné progressivement une prise de conscience des possibles effets délétères de l'exposition aux métaux, chez l'homme d'abord, puis pour l'ensemble des organismes vivants. Petit à petit les contaminations ponctuelles ont été mieux contrôlées voire dans certains cas éliminées. Cependant la société fait face désormais à des contaminations surtout diffuses touchant tous les écosystèmes (dépôts atmosphériques, pluies acides etc.) et qui rendent plus difficile le lien de cause à effet pour la toxicité des métaux chez les organismes vivants.

1.2 Le modèle de l'ion libre ou «Biotic Ligand Model»

Jusque dans les années 1970 l'accent des recherches sur la toxicité des métaux envers les organismes aquatiques était mis sur l'organisme cible plutôt que sur le milieu d'exposition. Au début des années 70, l'approche expérimentale évolua grâce à l'introduction de logiciels accessibles au plus grand nombre permettant de calculer la spéciation des métaux dans les milieux d'exposition. Ainsi l'appréciation des phénomènes de complexation des métaux dans les milieux d'exposition s'est améliorée, et les chercheurs se sont rendus compte de

l'importance de réaliser des tests de toxicité ou des bioessais dans des milieux d'exposition bien définis, avec des ligands synthétiques aux constantes de stabilité connues.

De nombreuses expériences montrèrent que la concentration de l'ion métallique libre était primordiale dans l'estimation de la réponse biologique d'un organisme. Cela mena à la formulation du modèle de l'ion libre ou FIM (Morel 1983) que l'on appelle actuellement «Biotic Ligand Model» ou modèle du ligand biotique (BLM). Les hypothèses de base du modèle sont les suivantes (illustration figure 1.1) :

- 1) La membrane cellulaire est le site primaire pour l'interaction d'un métal M avec un organisme vivant et ce par le biais de sites de surface sensibles X (sites de transport membranaires ; sites physiologiquement actifs où la complexation d'un métal avec ces sites perturbent le métabolisme de l'organisme cible). Le métal M est aussi en équilibre avec d'autres ligands en solution (K_1 est par exemple la constante de formation d'un complexe ML, avec L un ligand).
- 2) L'interaction du métal M avec la membrane biologique peut être représentée par la formation d'un complexe de surface [M-X-cellule] de constante k_f (ou k'_f s'il s'agit de l'interaction du complexe ML avec la membrane ; notons que k_d et k'_d sont les constantes de dissociation du complexe de surface).
- 3) La réaction de complexation à la surface biologique se déroule rapidement (plus vite que la réponse biologique) ; un pseudo-équilibre s'établit entre les espèces en solution et celles à la surface biologique. Cet équilibre n'est atteignable que si l'internalisation du métal à travers la membrane biologique (k_{int}) est l'étape limitante comparé au transfert du composé de la solution vers la membrane (k_s) (soit $k_{int} \ll k_f$ et k_s , cf. figure 1.1).
- 4) La réponse biologique (prise en charge, micro-nutrition, toxicité) est proportionnelle à la concentration du complexe [M-X-cellule] (cf. figure 1.1).
- 5) Dans la gamme étudiée de concentrations du métal, les variations de [M-X-cellule] suivent celles de $[M^{z+}]$.
- 6) Il faut tenir compte des compétiteurs des métaux dans la réaction de complexation de surface (H^+ et Ca^{2+} par exemple), on parle alors d'inhibition compétitive de la prise en charge du métal M. Dans ce cas, le flux de transport maximal V_{max} pour M

en présence d'un compétiteur N, demeure le même mais il est atteint à des concentrations différentes en métal M^{Z+} libre (en fait avec un excès de M^{Z+}), par rapport au cas en absence de N, en fonction de la concentration de N ou de la nature de N (cf. figure 1.2).

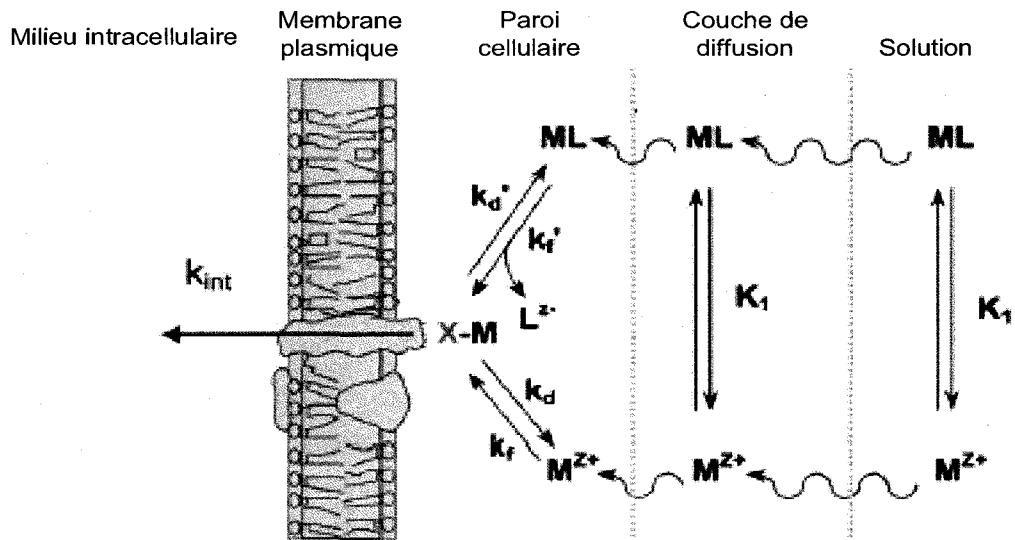


Figure 1.1 : Modèle conceptuel des interactions algues-métaux, tiré et modifié de Campbell *et al.* (2002). M est un métal, L un ligand et X un site actif. Pour l'explication des constantes, voir le texte.

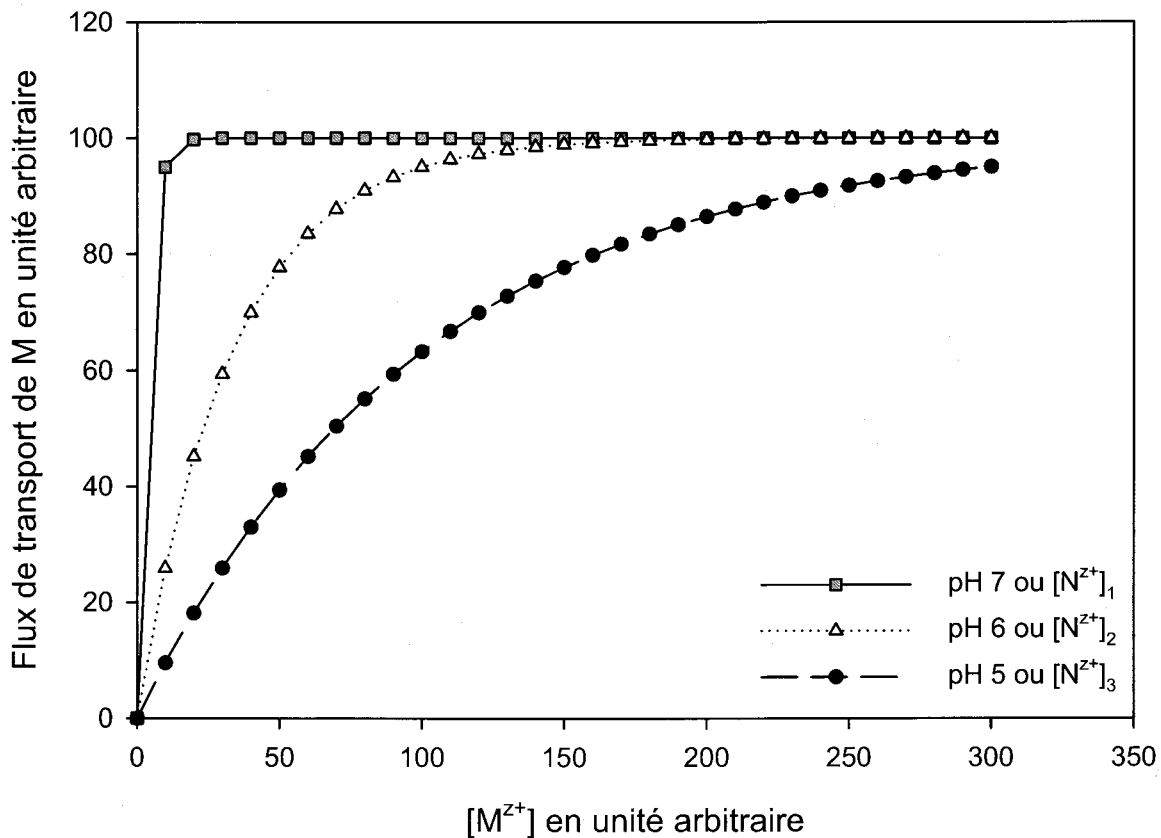


Figure 1.2 : Inhibition compétitive théorique de la prise en charge du métal M, due au pH ou à une concentration croissante (de 1 à 3) d'un autre cation N, le flux de transport maximal V_{max} demeure le même mais le pH ou [N] influencent le nombre de sites de transport disponibles.

Remarquons que si le point 3 n'est pas satisfait (c'est à dire le taux de transfert de la solution vers la membrane biologique devient l'étape limitante, lorsque par exemple la bioaccumulation d'un métal entraîne une diminution importante de la concentration du métal en solution) alors la prise en charge d'un métal sera reliée non plus uniquement à la concentration de son ion libre mais aussi à ses espèces mobiles et labiles (Fortin et Campbell 2000 ; Hassler *et al.* 2004b).

Par ailleurs, il existe d'autres exceptions au BLM. Jusqu'à présent on peut distinguer trois catégories de complexes qui influent sur la spéciation et la biodisponibilité d'un métal (Block et Pärt 1986) :

- les complexes non disponibles pour les organismes (complexes hydrophiles et non assimilables) tels que ceux impliquant l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA), l'acide nitrilotriacétique (NTA) ou bien l'acide diéthylène triamine pentaacétique (DTPA) (Sunda *et al.* 1978 ; Allen et Hansen 1996) ;
- les complexes qui participent dans une certaine mesure à l'accumulation totale d'un métal dans la cellule ; dans de tels cas la prise en charge du métal est alors plus élevée que prévu par le BLM mais normalement le complexe reste moins biodisponible que l'ion métallique libre (exemples : des ligands assimilables, de faible poids moléculaire, tels que les acides aminés, le citrate ou bien le thiosulfate (Errécalde *et al.* 1998 ; Errécalde et Campbell 2000 ; Fortin et Campbell 2001) ;
- les complexes lipophiles qui sont beaucoup plus biodisponibles que le métal libre ; leur présence augmente de façon drastique la prise en charge d'un métal par les organismes ; on pense ici à des ligands tels le diéthylthiocarbamate, les xanthates ou bien les oxines (Phinney et Bruland 1997a ; Phinney et Bruland 1997b).

Mais au-delà de ces exceptions causées par des ligands (Campbell 1995 ; Campbell *et al.* 2002), se pose la question majeure de l'influence des substances humiques sur la biodisponibilité des métaux traces dans l'environnement.

1.3 Les substances humiques aquatiques

1.3.1 Généralités, formation et structures

Les substances humiques (SH), ubiquistes sur notre planète, sont de plus en plus étudiées dans les nombreux champs d'investigation des processus écologiques. La communauté scientifique pense à ce titre que les SH seraient reliées d'une façon ou d'une autre à certains problèmes environnementaux majeurs telle la désertification que les SH pourraient aider à combattre (Zsolnay 2003). Dans cette étude, nous nous pencherons plus particulièrement sur les substances humiques aquatiques (extraites de la rivière Suwannee aux États-Unis) afin d'être le plus proche possible de ce qui se déroule en milieu d'eau douce.

La matière organique dissoute (MOD) dans les eaux naturelles est constituée principalement (de 50 à 80%) de substances humiques composées des acides fulviques et des acides humiques (Buffle 1988 ; Beckett 1990) le reste étant des acides aminés, des peptides, des protéines, des sucres neutres hydrolysables (glucose et galactose par exemple), des lipides, des résines et des pigments qui sont généralement labiles et donc rapidement utilisés par les bactéries (Wetzel 2001). Les acides humiques et fulviques sont majoritairement responsables de la coloration brune des eaux naturelles ; ils y sont présents à des concentrations variables, en général de 1 à 15 mg C·L⁻¹ dans les eaux douces. Les proportions généralement établies entre les acides fulviques et humiques sont de 9 pour 1 respectivement et ces proportions semblent peu variables (Thurman 1985). Les processus de formation des substances humiques (humification) ne sont pas encore totalement élucidés. Néanmoins certaines théories indiquent qu'elles se forment par des dégradations dues aux microbes ou aux champignons de la cellulose, de la lignine (précurseur le plus important de l'humus) ou bien des membranes cellulaires (matière organique morte). Mais il y a aussi polymérisation d'une partie des produits de décomposition à faible poids moléculaire, par oxydation la plupart du temps (McKnight et Aiken 1998). Que ce soit dans les sols ou les eaux, les substances humiques contenues dans la MOD existent sous divers degrés d'humification simultanément (Simpson 2002 ; Ohno 2002) : actif (moins d'un an de temps de roulement), intermédiaire (de quelques années à quelques siècles) et passif (les

SH sont alors réfractaires pour des milliers d'années). Dans les eaux douces l'origine des substances humiques est avant tout exogène, on parle alors de MOD allochtone – elles sont donc amenées par lessivage du bassin versant. Mais dans certains cas - luminosité limitée par les sédiments en suspension (Findlay et Sinsabaugh 2002) - la production des exsudats par les algues peut compter pour près de 100% de la matière organique dissoute comme par exemple dans une rivière de l'Antarctique (McKnight et Tate 1997), on parle ici de MOD autochtone.

Les acides humiques et fulviques sont définis d'un point de vue opérationnel ce qui va plutôt à l'encontre de la définition traditionnelle des molécules en chimie-physique. En effet les acides fulviques sont solubles à tout pH tandis que les acides humiques le sont aux pH basiques, et enfin la fraction appelée humine est insoluble mais cette fraction n'existe que dans les sols (Stevenson 1994) ; les substances humiques sont donc la somme de ces fractions. Le premier modèle développé pour rendre compte des propriétés des substances humiques est celui dit du «modèle polymère» établissant que les substances humiques sont des hétéropolymères dont le poids moléculaire apparent varie entre moins de 1000 et plus de 100 000 g·mol⁻¹ (Schnitzer 1976) et que les substances humiques sont des assemblages de macromolécules de formes allongées à pH basique ou à faible force ionique, ou bien sous formes de pelotes à pH acide ou forte force ionique (Stevenson 1994 ; Swift 1999). Cela constitue un point de vue traditionnel concernant le poids moléculaire, la taille et la forme des SH comme le pense Swift (1999). Toutefois, il convient de mentionner aussi les récents points de vue développés qui ont bénéficié des dernières techniques à la pointe :

- Les SH forment des associations moléculaires constituées de molécules de petite taille maintenues ensemble par des forces d'interactions faibles (Piccolo 2001).
- Les SH sont des molécules de petite taille qui forment des structures micellaires (aggrégats de molécules surfactantes) ou pseudomicellaires en solution (Wershaw 1999).

Désormais une grande partie de la communauté scientifique s'intéressant aux substances humiques semblent s'accorder sur une nouvelle vision définissant les substances humiques comme une association supramoléculaire dans laquelle de petites molécules organiques

chimiquement variées forment des assemblages liés par des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes avec pour corollaire la possibilité de former des structures micellaires (Sutton et Sposito 2005).

Les substances humiques possèdent des structures complexes formées à partir de cycles benzéniques et de chaînes aliphatiques, ce qui donne des groupements de type hydrophobe. Viennent se rajouter des groupements carboxyliques protonables (propriétés d'un acide organique faible caractérisant les acides humiques et fulviques), phénoliques, des cétones et des thiols (Leenheer *et al.* 1995 ; Thurman et Malcolm 1995) formant ainsi des groupes de type hydrophile. Le pH, qui sera une variable maîtresse dans cette étude, aura une grande influence sur les structures moléculaires microscopiques des SH (cf. section 1.7). Par ailleurs, la présence de liaisons doubles conjuguées et de cycles aromatiques permet l'absorption de radiations visibles ou ultraviolettes, entraînant ensuite des processus radiatifs telle que la fluorescence (Provenzano *et al.* 2004). Ces fractions des SH qui sont optiquement actives sont appelées des chromophores. Ce sont eux qui fluorescent pour la partie humique de la MOD, l'autre composante majeure fluorescent est la fraction protéique de la MOD (Stedmon *et al.* 2003). Ces propriétés des SH font de la spectrométrie de fluorescence un outils important pour déterminer les interactions entre les SH et les métaux ou les composés organiques (Green *et al.* 1992) . Puisque une des problématiques de cette thèse sera de comprendre les interactions entre les SH, un métal (le Cd) et des ligands organiques, nous utiliserons la spectrométrie de fluorescence pour y parvenir. Une introduction sur la théorie de la fluorescence est proposée à la section 1.9.

1.3.2 Propriétés chimiques

Du point de vue chimique, les substances humiques sont bien connues pour leur capacité à complexer les métaux. Cela a bien évidemment une influence considérable sur la biodisponibilité et le transport de ces métaux dans les eaux de surface tout comme dans les sols. Nous parlerons ici brièvement du cas du cadmium puisqu'il s'agit du métal d'intérêt dans notre étude. Par exemple, Otto *et al.* (2001) ont montré par la résonance magnétique nucléaire du cadmium 113 que le cadmium se lie fortement avec les groupements carboxyliques R-COO⁻ des acides fulviques et ce de façon polydente (diverses fonctions

carboxylates se lient au cadmium via plusieurs atomes donneurs). Cette étude toutefois s'est déroulée à pH fixe 6,4 et pour des ratios métal/ligand (M/L) élevés, entre 0,16 et 3,2. Or il convient de bien prendre garde aux conditions expérimentales puisque celles-ci induisent des changements au niveau de la conformation des SH et donc des liaisons subséquentes avec un métal. L'étude d'Hertkorn *et al.* (2004), réalisée sur le cadmium et la matière organique naturelle de la rivière Suwannee (M/L de $6 \cdot 10^{-4}$ à $6 \cdot 10^{-3}$), toujours par résonance magnétique nucléaire du cadmium 113, a indiqué ainsi qu'à tous les pH (3,5 – 11) le cadmium se lie préférentiellement aux groupements contenant de l'oxygène ; néanmoins un tiers du cadmium se lie aux groupements azotés aux pH basiques. Par ailleurs, Karlsson *et al.* (2005) démontrèrent que la MON de la rivière Suwannee complexe aussi le cadmium via de fortes liaisons avec les groupements thiols -SH. Datta *et al.* (2001) ont relié la complexation du cadmium avec les acides humiques aux groupements phénoliques (-OH) de ces derniers mais pour des M/L extrêmement élevés, entre 2 et 10. Au niveau des constantes de complexation mesurées, la littérature n'offre pas de valeurs identiques mais plutôt une gamme de constantes conditionnelles très large. Les valeurs des log K s'étalent de 4 à 13 mais il est très important de prendre chaque valeur avec prudence (Lee *et al.* 1993 ; Xue et Sigg 1999 ; Datta *et al.* 2001). En effet, à l'heure actuelle, toutes les études de complexation entre un métal et les substances humiques ne peuvent offrir de constante de complexation thermodynamique, c'est-à-dire valable dans n'importe quelles conditions. Nous ne pouvons donc parler ici que de constantes conditionnelles de complexation. De façon explicite, comme nous l'avons déjà introduit un peu plus haut, ces constantes sont conditionnelles au pH, à la force ionique, au rapport métal/ ligand (M/L), à la présence d'autres cations (pouvant entrer en compétition avec le métal principal pour la complexation), à la méthode analytique (électrochimique, spectrométrie ultrafiltration, dialyse, etc.) et enfin au type de substances humiques (rivière, lac, sol, commercial, acides fulviques ou bien humiques, etc.). Dans le cadre de ce doctorat nous avons mesuré les constantes de complexation pour nos conditions de travail (pH 5,5 et 7 ; force ionique de l'ordre du millimolaire ; M/L de $7 \cdot 10^{-6}$).

La coexistence des domaines hydrophiles et hydrophobes au sein d'une même (supra)molécule de substance humique, confère à cette molécule la propriété de surfactant.

L'ionisation différente des groupements, hydrophiles en particulier, des SH suivant le pH aura une influence directe sur la charge globale de la molécule (cf. tableau 1.1). De plus, le pH influencera largement la complexation des métaux avec les SH comme nous l'avons vu précédemment mais aussi leur propriété de s'accumuler aux interfaces air/eau et eau/particule.

Tableau 1.1 : Propriétés chimiques des substances humiques et processus biogéochimiques reconnus qui y sont associés, adapté de Campbell *et al.* (1997).

<u>Propriétés chimiques</u>	<u>Processus biogéochimiques</u>
<ul style="list-style-type: none"> • acides faibles (groupements carboxyliques et phénoliques) • polyfonctionnels • polyélectrolytes 	<ul style="list-style-type: none"> • contrôle du pH de certaines eaux de surface • complexation des métaux • complexation du P, complexes ternaires avec le Fe • complexation et stabilisation d'exoenzymes
<ul style="list-style-type: none"> • surfactants 	<ul style="list-style-type: none"> • contrôle des charges superficielles de particules inorganiques
<ul style="list-style-type: none"> • domaines hydrophobes (chaînes aliphatiques et noyaux aromatiques) • domaines hydrophiles coexistant avec ceux hydrophobes au sein de la molécule 	<ul style="list-style-type: none"> • association avec des composés organiques hydrophobes
<ul style="list-style-type: none"> • accepteurs d'électrons (groupements quinones) 	<ul style="list-style-type: none"> • (photo)réduction de métaux, Fe et Mn
<ul style="list-style-type: none"> • chromophores (électrons π excitables) 	<ul style="list-style-type: none"> • (photo)oxydation d'autres molécules organiques (photosensibilisation) • atténuation de la lumière dans les eaux de surface

Il faut voir dans cette accumulation eau/particule, l'idée d'accumulation des substances humiques à l'interface eau/surface biologique. L'adsorption des substances humiques sur les surfaces minérales a été bien démontrée et plus ou moins caractérisée (Edwards *et al.*, 1996, par exemple) et il est aussi bien connu que les SH influencent l'adsorption des métaux sur les phases minérales (Chen et Schnitzer 1976 ; Frimmel et Huber 1996). Toutefois, les études avec les surfaces biologiques demeurent peu nombreuses. Ces études ont tout de même montré que les substances humiques pouvaient s'adsorber sur les surfaces biologiques. L'effet principal serait alors de modifier la perméabilité et la fluidité membranaire des cellules, influençant possiblement la cinétique de prise en charge des métaux (Campbell *et al.* 1997). Il est à noter que l'adsorption des substances humiques dépend de leur propre concentration ainsi que du pH (Zhou et Banks 1992 ; Campbell *et al.* 1997). L'adsorption des acides fulviques de la rivière Suwannee à la surface de la cyanobactérie *Synechococcus leopoliensis* décroît avec le pH (figure 1.3), ce qui pousse à croire que les interactions sont de type hydrophobes ; en effet le pH s'acidifiant, les acides fulviques se protonent tout comme les membranes biologiques. Par suite les répulsions électrostatiques diminuent entre les acides fulviques et la surface biologique (les surfaces biologiques sont chargées négativement à pH 7).

Par ailleurs pour cette même cyanobactérie, à un pH constant de 5,0, quand la concentration des acides fulviques augmentent, l'adsorption sur la surface biologique augmente aussi comme l'indique la figure 1.4. Toutefois cette adsorption atteint un plateau une fois un seuil de concentration dépassé, ce qui correspondrait à la saturation des sites de surface de la cyanobactérie pour l'adsorption des acides fulviques (Campbell *et al.* 1997).

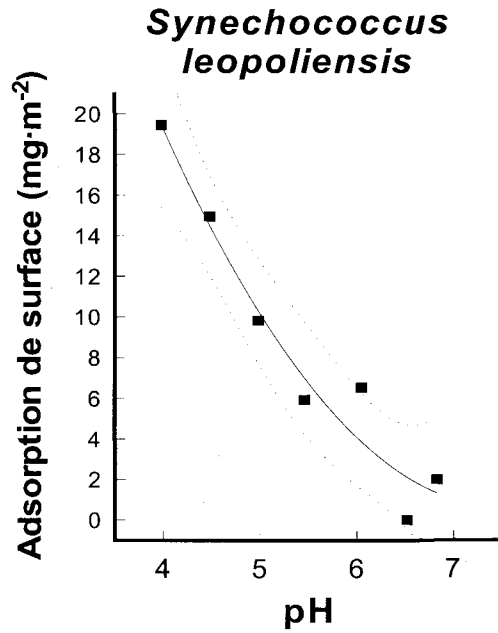


Figure 1.3 : Adsorption des acides fulviques de la rivière Suwannee ($10 \text{ mg AF}\cdot\text{L}^{-1}$) à la surface biologique de la cyanobactérie *S. leopoliensis* en fonction du pH, tiré de Campbell *et al.* (1997).

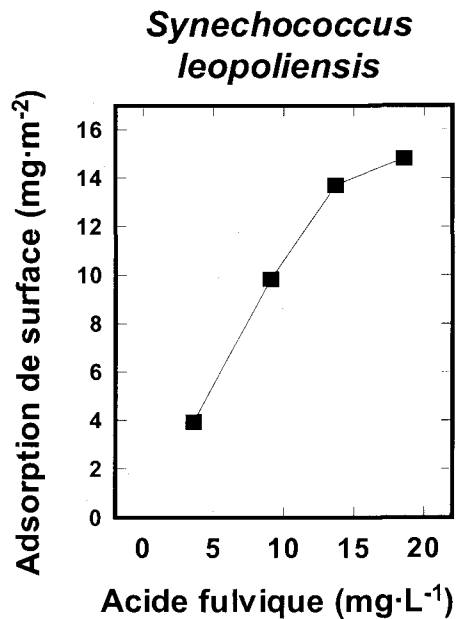


Figure 1.4 : Adsorption à pH 5,0 des acides fulviques de la rivière Suwannee à la surface biologique de la cyanobactérie *S. leopoliensis* en fonction de leur concentration, tiré de Campbell *et al.* (1997).

Les travaux dans notre laboratoire de Vigneault *et al.* (2000) ont aussi démontré que des substances humiques s'adsorbent à la surface de l'algue verte unicellulaire d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* (anciennement *Selenastrum capricornutum*) et influencent aussi la perméabilité membranaire de cette algue. L'étude a été réalisée aux pH 5,0 et 7 pour des concentrations en acides fulviques ou humiques de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et la perméabilité membranaire a été suivie par le biais de la sonde moléculaire FDA (diacétate de fluoresceine). La présence des acides humiques ou fulviques entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire envers la sonde FDA à pH 5,0 mais non à pH 7. Ce dernier résultat est important pour nous car nous travaillons avec des algues de ce type, dans une gamme de pH entre 5,5 et 7. De plus la sonde est prise en charge par diffusion passive comme les complexes neutres du cadmium que nous étudierons, d'où l'utilité de ces résultats dans notre étude.

Il est extrêmement important de tenir compte de ces deux propriétés des substances humiques : complexation des métaux et adsorption aux surfaces des membranes biologiques. En effet, dans la présente étude nous chercherons en particulier à déterminer les effets des substances humiques sur la prise en charge de complexes neutres. Ainsi nous éliminerons la propriété de complexation des substances humiques avec le cadmium (par la présence d'un excès de ligands forts du cadmium) afin, en théorie, de pouvoir observer uniquement les effets des SH sur les membranes biologiques (cf. section 2 hypothèse 1).

1.3.3 Propriétés biologiques

Outre que les substances humiques contrôlent de nombreux processus dans les eaux de surface (tableau 1.1), elles ont des effets qui paraissent souvent contradictoires quand des organismes aquatiques y sont directement exposés. Par exemple, Gédziorowska *et al.* (1984) ont rapporté que les SH stimulaient la croissance d'algues vertes microscopiques de la mer Baltique alors que Petersen et Persson (1987) ont montré que pour des eaux douces (au niveau alcalinité) et à des pH de 5 à 7, les taux de croissance et de survie de daphnés diminuaient en présence de SH. Les travaux de Pflugmacher *et al.* (2001) ont pu montrer que la présence des acides fulviques et d'un contaminant organique, le 3-chlorobiphényle, entraînait l'activation d'une enzyme de détoxification alors que ce n'était pas le cas pour ce

contaminant organique seul et ce pour trois organismes aquatiques très différents : un macrophyte, une moule zébrée et un grammaride. Ce genre de résultat mène à se poser la question si les substances humiques aquatiques peuvent être prises en charge par des organismes aquatiques ou bien si elles peuvent agir comme des hormones (Steinberg *et al.* 2004).

Sur ce dernier point on a d'abord étudié de façon extensive les substances humiques des sols en tant que principal constituant de la matière organique du sol et donc comme source possible de carbone organique pour les végétaux. Ainsi dans un souci de productivité agricole toujours plus élevée, nous connaissons désormais beaucoup mieux les multiples rôles que les SH jouent aux niveaux de la chimie des sols, de la fertilité, de la physiologie végétale et bien sûr des sciences environnementales (Tan 1998). Elles peuvent largement être bénéfiques pour la croissance des plantes et leur rendement dans le domaine de l'agriculture. De plus, une étude de Visser (1985) a démontré que la présence de SH dans les sols augmentait la prolifération de microbes. Visser proposait la membrane cellulaire comme «cible» des SH pour leurs effets sur la physiologie des organismes.

En ce qui concerne les SH aquatiques et leurs effets sur la physiologie des organismes aquatiques, les études sont encore rares. Par exemple, Roditi *et al.* (2000) ont montré une assimilation du carbone organique produit par des diatomées chez la moule zébrée d'eau douce. Le carbone organique dissous pourrait servir ici de source de carbone pour des organismes supérieurs tels que les moules, qui sont des filtreurs. Le carbone organique serait probablement assimilable par phagocytose et des métaux associés au carbone organique pourraient alors s'accumuler indirectement. Cependant rien ne dit qu'une fois stockés dans les vacuoles, les métaux soient libérés puis assimilés par la moule.

Il est nécessaire à ce niveau de la discussion des effets des SH sur les organismes aquatiques, de mentionner que certains paramètres ne sont pas pris suffisamment en compte dans l'ensemble des études. En particulier, la photoréactivité des SH engendrent la formation de radicaux libres supplémentaires déjà présents intrinsèquement dans les fractions solides extraites donnant les AH, les AF ou la MON (Paul *et al.* 2006). Or, ces

radicaux libres peuvent oxyder les membranes cellulaires des organismes aquatiques, le facteur luminosité prendrait alors tout son sens dans les différentes études.

Pour conclure cette section, une récente revue de la littérature à propos des effets directs et indirects des substances humiques sur les organismes aquatiques d'eau douce est proposée par Steinberg et ses collaborateurs (Steinberg *et al.* 2006). À ce titre, quelques points très importants doivent être mentionnés :

- De manière indirecte, les SH allochtones (terrestres) fournissent de l'énergie et des nutriments pour les microorganismes hétérotrophes des eaux douces. Ainsi, le carbone fixé leur est rendu disponible par l'action de la lumière sur les parties chromophoriques des SH. Par ailleurs, les SH peuvent aussi prévenir des dérèglements ionorégulateur chez les poissons.
- De manière directe, les SH semblent bioaccumulables par les organismes d'eau douce (taille d'environ 0,5 kDa pour les blocs constitutifs – cf. la théorie de l'assemblage supramoléculaire à la section 1.3.1 par Piccolo, 2001). Une fois les SH prises en charge par un organisme, deux types d'effets sont envisageables. Premièrement, des effets non spécifiques doivent être considérés, tels que l'irritation membranaire du point de vue chimique et physique, l'induction et l'altération de l'activité de biotransformation, l'induction de protéines de défense chimique, et le développement d'un stress oxydatif interne par la production de radicaux libres et de composés réactifs de l'oxygène («reactive oxygen species», ROS) conduisant à l'oxydation de lipides et à l'induction d'enzymes de défense contre les ROS. Secondement, les effets spécifiques sont la réduction de la production d'oxygène issu de la photosynthèse, oestrogénicité, ou encore l'attraction chimique.

Il en ressort, comme nous l'avons vu au début de cette section, que notre compréhension du rôle des SH dans les écosystèmes d'eau douce n'en est qu'à ses balbutiements.

1.4 Les effets possibles des substances humiques sur le BLM

Dans le cas où la matière organique serait adsorbée ou lorsqu'elle complexerait les métaux, l'applicabilité du BLM (Ryan *et al.* 2004) resterait à démontrer ; la prise en charge des métaux pourrait être grandement affectée par la présence de substances humiques qui se trouvent en grande quantité dans le micro-environnement (phycosphère) de l'algue, eu égard à ce que l'on a dit précédemment (Campbell *et al.* 1997).

La figure 1.5 est un schéma conceptuel des influences des substances humiques (SH) sur le BLM et ses exceptions connues. Comme on l'a dit, les propriétés complexantes des SH peuvent influencer directement la concentration de l'ion métallique libre et donc les prédictions du BLM.

La complexation des métaux par les ligands naturels, en particulier les substances humiques, est donc importante à considérer si l'on veut bien estimer la spéciation d'un métal dans les eaux de surface.

S'ajoutent à cela les propriétés de surfactant des SH et son accumulation à l'interface surface cellulaire/milieu aqueux des organismes vivants. Ceci influe sur l'activité de surface des algues et donc sur la prise en charge d'un métal par l'intermédiaire des sites de complexation de surface (X) mais aussi sur la prise en charge de complexes neutres. Dernièrement, les travaux de Cook (Cook R.L. 2006, communication personnelle, Département de Chimie, Louisiana State University) vont encore plus loin dans une étude des effets des SH et du pH sur des membranes artificielles, utilisées comme modèle de membranes biologiques. Ils suggèrent que les interactions entre les SH et les membranes requièrent deux étapes. Tout d'abord une étape d'adsorption a lieu, celle-ci est d'autant plus efficace que le pH est acide. Ensuite les groupements hydrophobes des SH s'insèrent dans la couche bilipidique via des interactions hydrophobes, on peut parler d'étape «d'absorption». Il est évident qu'une telle insertion perturberait l'organisation des phospholipides au sein de la membrane.

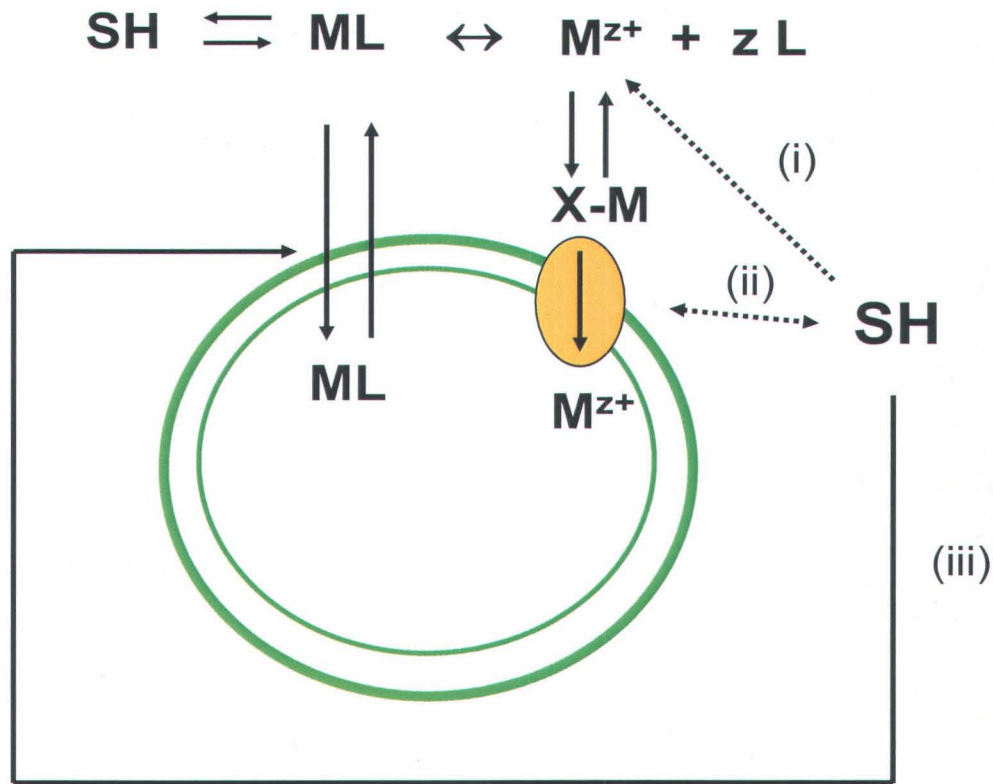


Figure 1.5 : Schéma conceptuel du BLM. Interactions des SH avec (i) le métal M de valence z^+ , (ii) et (iii) la membrane plasmique d'un organisme aquatique. L est un ligand.

Ces propriétés énumérées nous concernent au plus haut point pour notre projet de recherche, en particulier dans le cadre de complexes lipophiles de métaux. En effet la présence de substances humiques pourrait rendre plus perméable les membranes algales par le biais des propriétés de surfactant et s'il y a insertion dans la membrane.

Jusqu'à présent peu d'expériences quantitatives ont permis de démontrer la validité du BLM pour les eaux naturelles en présence de substances humiques (Campbell 1995 ; Campbell *et al.* 2002). Au contraire, les quelques expériences rapportées dans la littérature donnent des résultats plutôt contradictoires (liste non exhaustive) :

- Aucun effet des substances humiques (SH) hormis celui de complexer le métal en solution, validant ainsi le BLM (Sunda et Lewis 1978 ; Poldoski 1979 ; Van Ginneken *et al.* 2001 ; Vigneault et Campbell 2005). Par ailleurs des efforts sont actuellement réalisés afin d'affiner le BLM en tenant compte des différences liées aux origines diverses des SH (De Schamphelaere *et al.* 2004).
- La bioaccumulation et/ou la toxicité du métal sont augmentées en présence des SH (Giesy *et al.* 1983 ; Winner 1984 ; Sauvant *et al.* 2000 ; Slaveykova *et al.* 2003 ; Klinck *et al.* 2005). Dans la plupart des cas cet état de fait est relié à une biodisponibilité du complexe métal-substances humiques.
- La présence des SH augmente la protection vis-à-vis de la toxicité du métal comparé à ce qu'aurait prédit le BLM (Roy et Campbell 1997 ; Erickson *et al.* 1998 ; Koukal *et al.* 2003).
- Les substances humiques n'ont aucun effet contrairement aux prédictions du BLM (Winner 1984 ; Winch *et al.* 2002 ; Zimmermann *et al.* 2004), les faibles constantes de complexation entre les métaux étudiés et les SH sont alors proposées comme explication.

1.5 Les complexes neutres : une exception au BLM

1.5.1 Le diéthyl-dithiocarbamate

Le diéthyl-dithiocarbamate ou DDC est un ligand qui fait partie de la famille des carbamates. Il s'agit de composés organosulfurés contenant des groupements hétéropolaires (ou liaisons ioniques comme dans les sels) comme le montre la figure 1.6. Les carbamates sont utilisés en tant que catalyseurs dans l'industrie du caoutchouc et comme pesticides dans l'agriculture et ce en très grande quantité (Gottofrey 1990). Le DDC fut utilisé comme médicament dans les cures de désintoxication des alcooliques mais aussi comme médicaments aidant les patients atteints du SIDA à lutter contre les infections opportunes (Scappaticci *et al.* 1990).

complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ empruntait une voie de bioaccumulation différente des autres complexes de son étude et de l'ion libre.

Les études subséquentes (tableau 1.2) abondèrent dans ce sens et montrèrent chaque fois une augmentation de la prise en charge du métal en présence du ligand DDC (Ahsanullah et Florence 1984 ; Block et Pärt 1986 ; Florence et Stauber 1986 ; Gottofrey *et al.* 1988a ; Gottofrey *et al.* 1988b). Des travaux portant sur la prise en charge de métaux en présence des ligands oxines et xanthates, qui sont eux-aussi des ligands conférant un caractère lipophile aux complexes formés, montrent le même genre de résultat (Ahsanullah et Florence 1984 ; Block et Pärt 1986 ; Florence et Stauber 1986 ; Gottofrey *et al.* 1988a ; Gottofrey *et al.* 1988b). En revanche, toutes les expériences avec les xanthates et des métaux n'ont pas toujours montré une augmentation de prise en charge par rapport aux métaux seuls (Gottofrey *et al.* 1988a ; Gottofrey *et al.* 1988b). D'après les auteurs, cela s'expliquerait par des degrés de lipophilicité des complexes différents, les complexes les plus lipophiles entraînant la plus grande augmentation de prise en charge.

D'autres auteurs se sont intéressés plus aux fongicides, à base de carbamates et ont montré une toxicité plus importante des métaux traces (Cu, Cd) en présence de ces fongicides sans pour autant élucider le mécanisme de prise en charge par les micro-organismes (Vasseur *et al.* 1988 ; Bonnemain et Dive 1990 ; Sekkat *et al.* 1992). Block et Glynn (1992) tentent de préciser les choses par l'étude de l'influence des xanthates sur la truite arc-en-ciel et la vandoise eurasiennne. Il apparaît que l'hydrophobicité du complexe cadmium-xanthate associé à la concentration de ce ligand influe sur la disponibilité du cadmium.

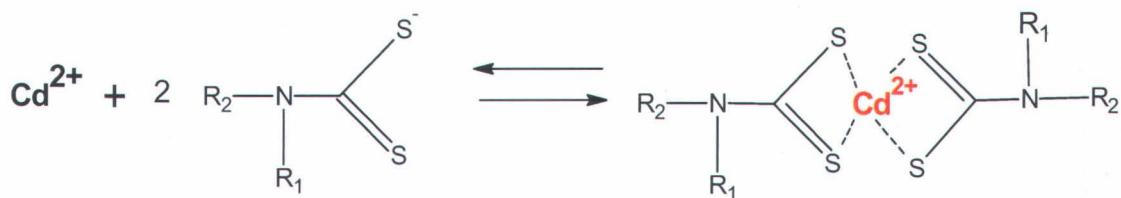


Figure 1.6 : Schéma de la réaction d'association entre deux molécules de carbamate et le cadmium. R₁ et R₂ peuvent être des chaînes alkyles.

Le DDC est connu pour former, avec les métaux, des composés hydrophobes. Aussi il est utilisé dans l'extraction-concentration des métaux puisque le DDC possède avec de nombreux métaux une constante d'association très élevée (Fang *et al.* 1994).

Du point de vue environnemental, le problème causé par les carbamates provient du fait qu'ils persistent dans la nourriture et le fourrage. Ces résidus sont hautement mobiles dans les sols et donc ils peuvent atteindre facilement les eaux souterraines. Il s'en suit de possibles risques toxicologiques pour les organismes vivants (Malik et Faubel 1999).

1.5.2 L'oxine

Les oxines se retrouvent dans de nombreux fongicides, désinfectants et le complexe cuivre-oxine est largement utilisé en tant que pesticide sur les terrains de golf au Japon (Ahsanullah et Florence 1984 ; Croot *et al.* 1999). Par ailleurs la quinoline et ses dérivés sont des anti-inflammatoires au mécanisme d'action inconnu mais dont des effets secondaires génotoxiques ont été découverts il y a peu (He et Jurs 2005). Ainsi se présente un grand intérêt environnemental et de santé humaine à étudier ce type de composé quand on sait que l'on peut les retrouver dans les eaux. Nous nous sommes concentrés sur un composé en particulier de la famille des oxines : le 8-hydroxyquinoline. Cependant par souci de clarté nous parlerons toujours d'oxine (Ox). Il s'agit d'un composé phénolique (figure 1.7) et tout comme le DDC, l'oxine est largement utilisée en chimie analytique afin d'extraire les métaux et de pouvoir plus facilement les doser (Hasan *et al.* 1996).

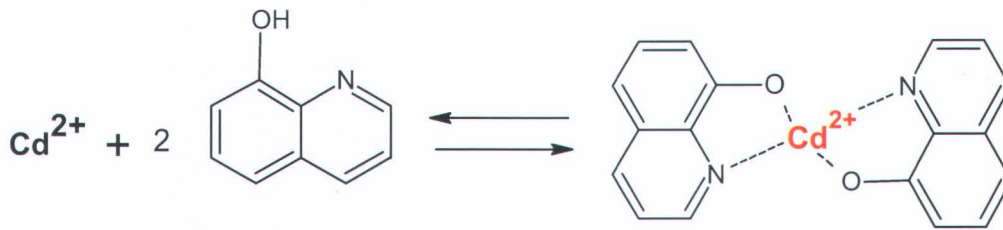


Figure 1.7 : Schéma de la réaction d'association entre deux molécules d'oxine et le cadmium.

1.5.3 L'éthyl-xanthate

Les xanthates, en particulier l'éthyl-xanthate que nous noterons XANT, sont utilisés dans l'industrie minière comme agent de flottaison dans la récupération des métaux sous forme de sulfures (Grez *et al.* 2005). Ce sont des molécules hétéropolaires comprenant une chaîne carbonée de longueur dépendante du type de xanthate et un groupement polaire sulfuré (figure 1.8).

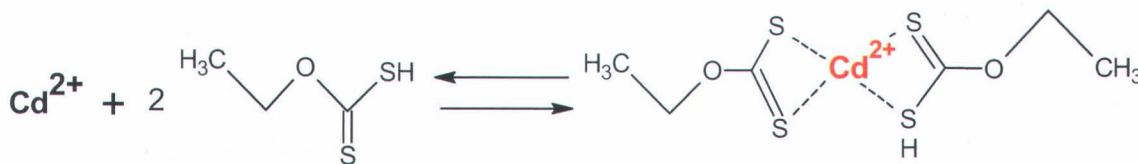


Figure 1.8 : Schéma de la réaction d'association entre deux molécules d'éthyl-xanthate et le cadmium.

Le fait que ces composés soient utilisés dans l'industrie minière amène à penser qu'ils peuvent se retrouver dans les eaux de surface par lessivage ou simple écoulement des effluents miniers.

Il n'apparaît donc pas inopportun de considérer une éventuelle présence simultanée d'un de ces trois ligands et de métaux dans les eaux de surface. Plus précisément, la formation de complexes neutres est tout à fait envisageable, conduisant ainsi à un véritable intérêt environnemental.

1.5.4 Prise en charge de complexes neutres

Comme nous l'avons dit à la section 1.2, certains complexes métal-ligand inorganique peuvent être assimilables, contredisant ainsi le BLM. Une étude importante de Mason *et al.* (1996), portant sur le mercure, a montré que les espèces neutres inorganiques du mercure, HgCl_2 et $\text{Hg}(\text{OH})_2$, étaient bioaccumulées passivement (par diffusion simple, non facilitée) par une diatomée marine, et ce en fonction de leur valeur de D_{ow} ($D_{ow} = K_{ow}$ «global» de toutes les espèces dans une solution donnée, le K_{ow} étant le coefficient de partage octanol-eau, traduisant la propension d'un composé à traverser les membranes lipidiques (Turner et Williamson 2005)). Ils ont ensuite étudié les complexes organométalliques (avec liaison covalente) du Hg : CH_3HgCl et $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$; ceux-ci étaient aussi pris en charge mais leur bioaccumulation ne pouvait être entièrement prédite grâce à leur D_{ow} . Notons que ces complexes neutres du mercure sont beaucoup plus bioaccumulés que le mercure ionique inorganique Hg^{2+} (Smith et Green 1975 ; Röderer 1983). Mason *et al.* (1996) proposèrent que chaque forme neutre de Hg possédait sa propre réactivité envers les ligands intracellulaires. Autrement dit, certaines espèces, telles que HgCl_2 , $\text{Hg}(\text{OH})_2$ et CH_3HgCl , étaient bioaccumulées en fonction non seulement de leur D_{ow} mais aussi de leur force à se lier aux ligands intracellulaires. Si les espèces neutres se liaient aux ligands intracellulaires, alors leur prise en charge était plus grande que les espèces $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ et Hg^0 qui ne s'y liaient pas. Cette explication est reprise plus en détail ci-après dans cette même section, puisqu'elle semble aussi s'appliquer aux complexes neutres métaux-ligands organiques.

La première étude d'importance sur la prise en charge de métaux en présence de ligands organiques, en dehors des complexes organométalliques, est celle de Poldoski (1979). Il ouvra alors la voie de la recherche à proprement parler sur les complexes organiques métalliques neutres à caractère lipophile. Son étude porta sur la bioaccumulation du cadmium chez *Daphnia magna* en présence ou non de ligands. Sans agents complexants un état stationnaire (concentration interne indépendante du temps) était vite atteint entre l'ion Cd^{2+} libre et le cadmium bioaccumulé. L'ajout de ligands organiques synthétiques (NTA, EDTA) ou naturels (acides humiques) diminuait la prise en charge du cadmium alors qu'en présence de DDC elle augmentait très significativement. De là, Poldoski concluait que le

Tableau 1.2 : Récapitulatif des expériences menées sur la prise en charge des métaux traces en présence de ligands formant des complexes neutres lipophiles.

Etude	Organisme	Métal	Concentration	Ligand organique	Concentration
(Poldoski 1979)	Daphnie	Cd	89 nM	DDC	10 et 50 µM
(Ahsanullah et Florence 1984)	Crustacé amphipode	Cu	0,5 à 3,2 µM	Ox	1,0 µM
				XANT	1,0 µM
(Block et Pärt 1986)	Truite arc-en-ciel	Cd	9,0 µM	DDC	10 et 100 µM
				Isopropyl-xanthate	100 µM
				XANT	
(Florence et Stauber 1986)	Diatomée marine	Cu	80 nM	Ox, auxines	0,1 µM
(Borg <i>et al.</i> 1988)	Truite brune	Hg	0,5 nM	XANT	0,3 µM
				Isopropyl-xanthate	
				DMDC	0,3 µM
DDC					
(Gottofrey <i>et al.</i> 1988a)	Truite brune	Cd	8,9 nM	Isopropyl-xanthate	44 et 225 nM
				Amyl-xanthate	
				DDC	
(Gottofrey <i>et al.</i> 1988b)	Truite brune	Ni	1,7 nM et 0,2µM	XANT	43 nM et 4,3 µM
				DDC	43 nM et 4,3 µM
(Vasseur <i>et al.</i> 1988)	Bactérie et protozoaire	Cu	0,1 à 4,3 µM	Maneb (carbamate)	36 nM à 16 µM
				Carbaryl (carbamate)	0,4 à 2,9 µM
				Zineb (carbamate)	0,3 à 29 µM
(Bonnamain et Dive 1990)	Protozoaire cilié	Cu	1,4 à 2,8 µM	Sept dithio-carbamates	9,2 nM à 42 µM
(Block et Glynn 1992)	Truite arc-en-ciel et vandoise	Cd	0,2 nM	XANT	0,1 µM à 0,1 mM
				Amyl-xanthate	
(Florence <i>et al.</i> 1992)	Diatomée marine	Cu	31 nM	Ox et 2 auxines	62 nM

(Sekkat <i>et al.</i> 1992)	Protozoaire cilié	Cd	0,2 à 0,5 μM	Ferbam (carbamate)	0,4 μM à 0,7 μM
		Cu	0,1 à 0,3 μM		
(Phinney et Bruland 1994)	Phytoplancton	Cu	5,0 à 15 nM	Ox ou DDC	5,0 à 100 μM
		Cd	9,0 nM		
		Pb	5,0 nM		
(Phinney et Bruland 1997a)	Phytoplancton	Cu	39 nM	Ox	100 μM
		Ni	40 nM	DDC	0,1 μM
(Phinney et Bruland 1997b)	Phytoplancton	Pb	5,0 nM	Ziram (carbamate)	0,3 et 3,3 μM
		Cu	5,0 nM	Maneb (carbamate)	2,0 μM
(Rouleau <i>et al.</i> 1998)	Insecte aquatique	Zn	2,0 nM	DDC	50 nM
		Cd			
		Hg			
		CH ₃ Hg			
(Croot <i>et al.</i> 1999)	Phytoplancton	Cu	10 nM	Oxine	100 nM

Du point de vue de la modélisation de la bioaccumulation et du devenir intracellulaire des complexes neutres, plusieurs idées se dégagent. Dans le cas où le complexe ML_n^0 se dissocie une fois accumulé, le métal libéré peut se lier à des ligands intracellulaires (phytochélatines par exemple). Alors la prise en charge en fonction du temps sera linéaire (cas 1 figure 1.9) et elle dépendra de la vitesse de diffusion à travers la membrane cellulaire (déterminée en partie par le D_{ow}). En effet, si les ligands intracellulaires déplacent l'équilibre du métal avec le ligand organique alors cela permet au complexe neutre de pénétrer en continu puisque l'équilibre entre le milieu interne de la cellule et son milieu externe n'est pas atteint pour le complexe neutre. A l'inverse, si le complexe une fois bioaccumulé subit peu la compétition des ligands intracellulaires, alors il se crée un équilibre entre la concentration du complexe intracellulaire et celui dans la solution et le taux de prise en charge diminue avec le temps (cas 2 figure 1.9).

Ainsi des prédictions de prise en charge de ces complexes lipophiles par les microorganismes ne peuvent se faire simplement en utilisant le coefficient de perméabilité des complexes.

Phinney et Bruland (1994) suggèrent alors l'utilisation d'une constante globale k_{bio} qui traduit le transport et la chélation intracellulaire du métal en incorporant l'aire de la surface cellulaire et la perméabilité. Ces mêmes auteurs précisent (1997a) le devenir de complexes du Zn, Cu et Pb avec des dithiocarbamates dans des cellules phytoplanctoniques. Dans le cas du complexe $Cu(DMDC)_2^0$, une fois dans le cytoplasme, il y aurait dissociation du complexe et le Cu pourrait se lier aux ligands intracellulaires (phytochélatines). Le Cu pourrait alors passer de l'état +II à celui de +I grâce aux groupements thiols intracellulaires. Le Cu(I) étant un cation de type B, il se lierait préférentiellement aux groupes -SH des phytochélatines par exemple (Phinney et Bruland 1997a), la complexation par les phytochélatines étant un mécanisme important de détoxification intracellulaire. Croot *et al.* (1999) confirmèrent les travaux de Phinney et Bruland en étudiant la prise en charge du complexe lipophile Cu-oxine par du phytoplancton marin. La prise en charge du complexe Cu-oxine était accrue, eu égard au cuivre inorganique seul, mais elle était limitée par le nombre de sites de liaison intracellulaires du cuivre.

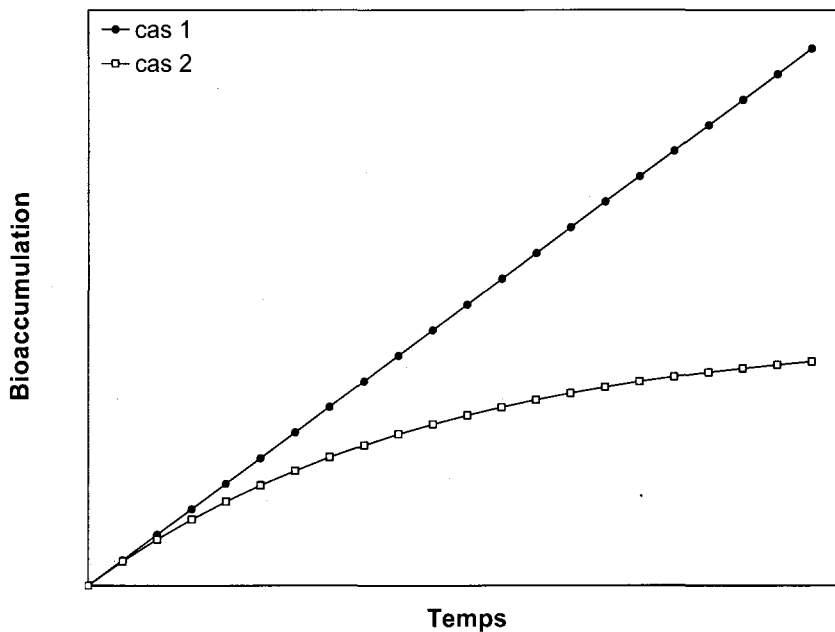


Figure 1.9 : Bioaccumulations théoriques d'un complexe neutre d'un métal quelconque en fonction du temps. Les cas 1 et 2 représentent différents cas de figure suivant quelle est l'étape limitant la prise en charge, pour les détails voir le texte.

On peut toutefois noter une étude (Rouleau *et al.* 1998) qui ne trouve pas d'amplification de la bioaccumulation des métaux Zn et Cd en présence du DDC. Ces auteurs justifient leurs résultats par le fait que le rapport DDC/métal dans leurs expériences n'était que de 25 alors qu'il a été rapporté que les complexes lipophiles du Cd avec le DDC ou les xanthates ne sont significatifs que pour un rapport supérieur à 100. Cependant, dans la présente revue de la littérature nous avons recensé des expériences réalisées avec des rapports inférieurs à 100, qui montraient des effets importants du DDC sur la prise en charge des métaux (Poldoski 1979 ; Block et Pärt 1986 ; Gottofrey *et al.* 1988a ; Gottofrey *et al.* 1988b) obligeant à nuancer l'explication de Rouleau *et al.* (1998).

Au final, Phinney et Bruland (1997b) ont développé un modèle conceptuel assez complet, semble-t-il, pour la prise en charge d'un métal trace en présence du DDC :

- (i) complexation $M^{n+} + n L^- \leftrightarrow ML_n^0$,
- (ii) diffusion du complexe vers la membrane cellulaire ou la surface algale,
- (iii) équilibre entre ML_n^0 dans la phycosphère et ML_n^0 diffusant dans la membrane bilipidique,
- (iv) le complexe ML_n^0 pénètre dans le milieu intracellulaire,
- (v) ML_n^0 se dissocie si les ligands intracellulaires sont forts ; dans ce cas ces derniers complexent à leur tour le métal M ; ou bien ML_n^0 dans le cytosol ne se dissocie pas et atteint un équilibre avec le milieu extérieur.

En outre, même si ce genre de complexe lipophile ne représentait qu'une faible fraction des «espèces métalliques» présentes dans une eau naturelle donnée, il pourrait néanmoins contribuer au transport du métal dans les organismes de manière importante, voire disproportionnée, même pour de faibles concentrations de l'ion métallique libre (Phinney et Bruland 1994).

1.6 Le métal étudié : le cadmium

Dans notre étude nous nous sommes penchés sur le métal cadmium, un élément généralement considéré comme non essentiel et toxique à bien des égards. Chimiquement le cadmium est considéré comme un métal de classe intermédiaire-ambivalente dans la classification de Nieboer et Richardson (1980). Ainsi le cadmium pourra très bien montrer des affinités pour les donneurs d'atomes d'oxygène (métaux de classe A) comme pour les donneurs d'atomes d'azote et de soufre (métaux de classe B). Le cadmium figure sur la liste des polluants prioritaires dans le «Clean Water Act» pour l'Agence environnementale américaine (US EPA). Par ailleurs on le retrouve sur 388 listes nationales pour les polluants prioritaires sur les 1300 identifiés par l'US EPA (Adhiya *et al.* 2002).

Le cadmium existe de façon naturelle dans les sols, les sédiments et les eaux naturelles et sa spéciation dépendra de ses interactions avec les composés inorganiques et organiques des milieux dans lequel on le trouve. Selon Hoffman (1994), les concentrations de cadmium peuvent varier de 0,09 à 4,4 nM dans les eaux douces. Par exemple, au Québec dans la rivière Yamaska, des concentrations de cadmium dissous s'échelonnant entre 0,10 et 0,32 nM ont été mesurées par filtration et dialyse durant l'été 2005 ; dans les lacs de la région de Rouyn-Noranda les concentrations de cadmium mesurées par dialyse varient entre 0,06 et 9 nM (Claude Fortin, professeur à l'INRS-ETE, communication personnelle). Du point de vue anthropique, les principales utilisations du cadmium sont : stabilisateur du P.V.C. (polychlorure de vinyle), pigment dans les verres et les plastiques, protecteur de corrosion des aciers, composé de divers alliages, et matériau des électrodes dans les piles nickel-cadmium (Wilson 1988). Les sources de cadmium aquatique sont principalement des mines de métaux non ferreux (en général de zinc). La contamination peut survenir des eaux de drainage minier, des processus miniers, des eaux de ruissellement des zones minières ainsi que des raffineries (dépôts atmosphériques de cadmium) de façon générale. Les mines en friches depuis plusieurs années participent aussi à une contamination en continue des cours d'eau adjacents (Cain *et al.* 2000). En outre, Nelson et Campbell (1991) dans une revue de la littérature ont établi que les concentrations de cadmium dans les eaux de surface augmentaient en réponse à l'acidification du milieu.

La prise en charge du cadmium dans l'eau par les organismes aquatiques est très variable et dépend de sa spéciation (laquelle est déterminée en grande partie par la salinité, le pH et la concentration en matière organique) ainsi que des conditions environnementales telles que la dureté de l'eau, le pH et la température. La majorité des agents chélateurs font diminuer la prise en charge du cadmium (par rapport à la prise en charge du Cd^{2+} libre), mais certains tels que les carbamates ou les xanthates l'augmentent – voir la section 1.5.4.

Du point de vue de la toxicité, le cadmium entre en compétition avec le calcium pour les sites de liaisons des branchies des poissons et des mollusques. En effet, le Cd^{2+} possède un rayon ionique proche de celui du Ca^{2+} , lui permettant ainsi d'être pris en charge par les transporteurs membranaires du calcium. De là, il peut causer divers dérèglements physiologiques chez le poisson tels que l'ionorégulation et certaines activités enzymatiques (Baldisserotto *et al.* 2005). Selon Dobson (1992) qui a référencé de nombreuses données sur le cadmium, la valeur la plus faible enregistrée de LC_{50} à 96 h (LC_{50} = concentration létale qui cause la mortalité de 50% d'une population) est de 0,14 μM pour la crevette adulte *Mysidopsis bahia*. Un niveau nominal où aucun effet n'est observé (NOEL) de 5,8 nM de Cd a été trouvé pour *Daphnia magna*, le taux de reproduction étant le paramètre le plus sensible. Les résultats disponibles indiquent que les stades larvaires et embryonnaires des organismes aquatiques sont plus sensibles que les stades adultes. Des malformations spinales sont induites par des expositions au cadmium supérieures à 80 nM pour des poissons (Muramoto 1981). En plus de causer des effets sur la reproduction, le cadmium influence le comportement des organismes aquatiques. À de faibles concentrations le cadmium inhibe les systèmes de transport ionique (89 nM Cd) et provoque la synthèse de métallothionéine (< 8,9 nM Cd) pour les poissons d'eaux douces (Dobson 1992).

Concernant l'effet du Cd^{2+} sur des organismes qui nous intéressent, les algues vertes, Faller *et al.* (2005) ont démontré que le Cd^{2+} entre en compétition avec les sites du Ca^{2+} sur le photosystème II. Par suite, la photosynthèse via l'évolution de l'oxygène en est modifiée, ce qui entraîne une toxicité par une diminution de la reproduction cellulaire.

De façon générale, le Cd s'accumule chez les mammifères en priorité dans les reins et le foie, causant une toxicité chronique (Kamenosono *et al.* 2002). Chez l'homme la première manifestation la plus documentée fut la maladie «Itai-itai» qui toucha la région de Toyama au Japon durant une grande partie du XX^{ème} siècle. Le Cd relargué par une mine d'argent dans une rivière servant d'irrigation pour les rizières entraîna une augmentation de la concentration de cadmium dans le riz. La population subît alors des déformations du squelette ainsi que des fractures spontanées. Le département américain de santé humaine considère le cadmium et les composés du cadmium comme cancérigènes. Les fumeurs sont largement concernés par l'accumulation du cadmium dans le corps puisque chaque cigarette contient environ 1-2 µg de cadmium, ce qui ajoute encore du poids au problème de santé publique de la cigarette et de la fumée secondaire (Arancibia *et al.* 2004).

Même si l'amélioration des procédés industriels depuis les dernières décennies a eu pour effet de diminuer les rejets de cadmium, l'emploi du cadmium est amené à augmenter (Roskill information services Ltd. 1995). Le choix du cadmium dans notre étude se justifie donc par l'aspect actuel des rejets en augmentation du cadmium, sa bioaccumulation et ses effets délétères chez les organismes aquatiques en particulier et finalement par son cheminement le long de la chaîne trophique (Seebaugh *et al.* 2005) et même sa bioamplification démontrée pour la première fois très récemment (Croteau *et al.* 2005) qui conduit à l'homme avec tous les dangers mentionnés plus tôt.

1.7 Les algues étudiées

Le phytoplancton est la base de la chaîne alimentaire aquatique. À ce titre, les organismes phytoplanctoniques sont sensibles aux contaminants et polluants de toutes natures, mais ils sont aussi, à leur insu, le point de départ du transfert des contaminants le long de la chaîne trophique. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler avec ces organismes et plus particulièrement les algues vertes de la famille des Chlorophyceae qui sont importantes dans les communautés planctoniques, benthiques et épiphytiques d'eau douce (Bold *et al.* 1980 ; Sze 1986).

Les algues utilisées dans nos expériences de prise en charge sont donc des algues vertes unicellulaires d'eau douce. Elles ont été choisies car elles sont faciles à cultiver et sont souvent utilisées dans les tests de toxicité, ce qui permet donc de réaliser des comparaisons avec la littérature. Plus précisément, nous utiliserons des souches issues des collections de culture de l'Université de Toronto pour *Pseudokirchneriella subcapitata* (UTCC 37), *Chlamydomonas reinhardtii* (UTCC 11) et *Chlorella pyrenoidosa* (UTCC 89). Ces algues ont un diamètre moyen de 3 µm pour *P. subcapitata*, de 5 µm pour *C. reinhardtii* et de 7 µm pour *C. pyrenoidosa*.

1.8 Le pH variable de choix

Pour terminer, le pH sera une des variables clés de l'étude présentée. En effet, d'un point de vue abiotique, le pH contrôle la spéciation des espèces chimiques en solution ainsi que certains paramètres physico-chimiques tels que la précipitation des métaux (Stumm et Morgan 1996). À ce titre, il est donc primordial de tenir compte du pH dans toute étude de toxicité et de biodisponibilité des métaux (Twiss *et al.* 2001). Le pH aura aussi des effets sur les substances humiques. En effet les SH sont des molécules amphiphiles (cf. section 1.3.2) contenant de nombreux groupements fonctionnels ionisables (hydroxyles, carboxyles, amides) qui font que les SH sont chargées différemment selon le pH et par suite leur conformation est aussi dépendante du pH. Ainsi, suivant l'hypothèse que les SH sont des polyélectrolytes, pour un pH inférieur à 7 le processus d'agrégation est dominant, les SH étant regroupées sur elles-mêmes telle une pelote alors que pour des pH supérieurs à 7 les molécules de SH sont pratiquement totalement dissociées (structure linéaire), dues à des niveaux différents de répulsion électrostatique intramoléculaire (Lead *et al.* 2000b ; Patel-Sorrentino *et al.* 2002). Selon la théorie des SH en tant qu'agencement supramoléculaire, aux pH plutôt acides les molécules de SH formeront un agglomérat tandis que pour des pH de plus en plus basiques, les molécules de SH se «sépareront» (Sutton et Sposito 2005).

Enfin un autre point nous intéresse directement. Il s'agit de l'influence du pH sur la prise en charge des métaux par les organismes aquatiques. Cela a d'abord été étudié en raison des pluies acides, ces dernières pouvant entraîner des modifications de la spéciation des métaux en solution. Ainsi Campbell et Stokes dans une revue de la littérature (1985) ont identifié

les deux effets opposés que peut avoir l'acidification d'une eau : (i) une compétition accrue entre l'ion métallique libre et le proton pour les sites de liaison à la surface cellulaire (ce qui devrait conduire à une plus faible biodisponibilité du métal) ; (ii) la dissociation des complexes M-L et l'augmentation de la proportion de l'ion métallique libre (ce qui devrait mener cette fois à une biodisponibilité plus élevée du métal). Pour quatre des dix métaux étudiés ces auteurs ont pu documenter un effet cohérent du pH. Deux catégories semblent alors émerger. Dans la première catégorie, avec une acidification de pH 7 à 4, les métaux Cd, Cu et Zn augmentent peu leur proportion de métal libre inorganique et se lient peu aux surfaces biologiques. La résultante est une atténuation de la toxicité avec cette diminution de pH, les protons entrant en compétition avec les sites sensibles de surface (voir section 1.2) et/ou affectant le potentiel des surfaces biologiques ; ces tendances sont prédites par le BLM. Dans la seconde catégorie où figure uniquement le plomb, c'est l'inverse qui se produit et cela va à l'encontre du BLM. En effet, une baisse du pH entraîne une plus grande proportion de Pb libre inorganique et le métal se lie de façon importante aux surfaces biologiques, le tout rendant le métal plus biodisponible.

D'autres études ont pu montrer des exceptions au BLM inhérentes à des changements de pH. Ainsi Meador (1991), De Schampelaere *et al.* (2002) tous deux avec le cuivre, et Slaveykova et Wilkinson (2003) avec le plomb, ont démontré qu'avec une augmentation du pH, la prise en charge ou bien la toxicité augmente suggérant la participation de complexes inorganiques (hydroxo ou carbonato) de ces métaux dans la bioaccumulation, ne vérifiant bien évidemment pas le BLM. Mierle et Stokes (1976), Harrison *et al.* (1986) et Parent et Campbell (1994) ont montré respectivement pour le cuivre, le zinc et l'aluminium mais tous trois pour des algues phytoplanctoniques, qu'une acidification du milieu provoquait une baisse de bioaccumulation et/ou de la toxicité conformément au BLM. Notons toutefois que Parent et Campbell, s'ils confirment bien une tendance en accord avec le BLM, ont aussi démontré une incompatibilité entre l'effet du pH sur la bioaccumulation d'une part, et l'effet du pH sur le nombre de sites de liaison à la surface algale d'autre part (voir section 1.2 point 1). Plus précisément, ils ont titré la surface de l'algue *Chlorella pyrenoidosa* en fonction du pH (5,5 à 3,5) pour obtenir la capacité de liaison des protons de l'algue, ce qui revient à connaître le nombre total de sites de liaison à la surface de l'algue. De plus, ils ont

fait des tests d'inhibition de croissance sur cette algue en fonction du pH. L'effet du pH sur cette inhibition ne s'explique qu'en partie si l'on tient compte de la concentration en Al^{3+} (elle-même variant avec le pH). En fait, l'effet du pH sur le nombre de sites de liaison est plus grand que l'effet du pH sur la concentration en Al^{3+} . D'après le BLM, la réponse de l'algue devrait être proportionnelle au nombre de sites sensibles à sa surface. Ainsi le produit de la concentration en aluminium libre par le nombre de sites sensibles disponibles demeurerait constant si l'on étudie un taux d'inhibition en particulier (dans leur article il s'agit de la concentration d'aluminium entraînant une inhibition de 30% de la croissance de l'algue). Or, ce produit n'est pas constant sur la gamme de pH étudié, il existe donc une dépendance au pH que ces auteurs qualifient de «résiduelle». Une des explications avancées proviendrait du fait que le titrage de la surface algale donne un nombre total de sites qui ne rendrait pas compte du nombre réel de sites sensibles en rapport avec Al^{3+} .

Il apparaît donc très important dans notre étude de bien caractériser les effets possibles du pH sur 1) la prise en charge des complexes neutres, 2) l'association entre les complexes neutres et les substances humiques, 3) les membranes biologiques.

1.9 Théorie de la fluorescence

Cette introduction est inspirée d'un livre de référence en spectrométrie de fluorescence (Lakowicz 1983). Une molécule contenant un ou des fluorophores possède la propriété de fluorescer. Ainsi, lorsque cette molécule absorbe de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation, figure 5.1 étape 1), elle se trouve dans un état électroniquement excité qui dure en moyenne 10 nsec (figure 5.1 étape 2). Dans le cas de la fluorescence cet état excité est généralement un état singulet, que l'on note S'_1 (figure 5.2) pour lequel les électrons sont dits pairés c'est-à-dire que leur orientation du spin est opposée entre l'état excité et fondamental. Notons qu'il existe aussi l'état triplet, dans ce cas les électrons sont dits non pairés puisqu'ils ont la même orientation du spin aux deux états. Le retour à l'état fondamental S_0 peut alors se faire de différentes manières comme l'émission de chaleur. Une autre façon est l'émission d'un photon, c'est le phénomène de fluorescence (lumière d'émission, figure 5.1 étape 3) dans laquelle les électrons pairés retournent à l'état

fondamental singulet. La longueur d'onde réémise par la molécule excitée peut être de même longueur d'onde (fluorescence de résonance) ou de longueur d'onde plus grande. Le fait que la longueur d'onde d'émission soit plus grande provient du fait que, dans les milieux liquide en particulier, la molécule retourne à l'état fondamental à partir du niveau de vibration le plus bas de l'état excité (Règle de Kasha). Cette différence est appelée déplacement de Stokes.

Ce déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées, décrit par la loi de Stokes, est essentiel pour la séparation et la détection de la lumière de fluorescence, signal spécifique délivré par le fluorophore. Ces derniers correspondent normalement à des groupements fonctionnels ayant des orbitales de liaisons π , par exemple des noyaux aromatiques ou des groupements carbonyles/quinones. De plus chaque fluorophore se caractérise par un ou plusieurs spectres d'excitation-émission, ce qui rend cette méthode sensible et sélective.

Du point de vue du type de mesure en fluorescence, il en existe quatre :

- une lecture simple à une seule paire de longueurs d'onde d'émission et d'excitation ;
- une longueur d'onde d'excitation (ou d'émission) est fixée, le spectre d'émission (ou d'excitation) est alors balayé ;
- la fluorescence dite synchrone, où il s'agit du balayage simultané des spectres d'émission et d'excitation avec un écart constant entre les deux appelé $\Delta\lambda$. Cette technique s'applique notamment pour des mélanges de composés pour isoler chacun d'entre eux sur le spectre synchrone (Patra et Mishra 2002) ;
- et les matrices d'excitation-émission (MEE) qui permettent de réaliser une «empreinte» de la réponse en fluorescence d'un composé par un balayage à la fois du spectre d'excitation et celui d'émission. Cela permet donc de visualiser la réponse de tous les fluorophores d'un même composé (s'il en a plusieurs, comme c'est le cas des SH). C'est cette dernière approche que nous utiliserons au Chapitre 5.

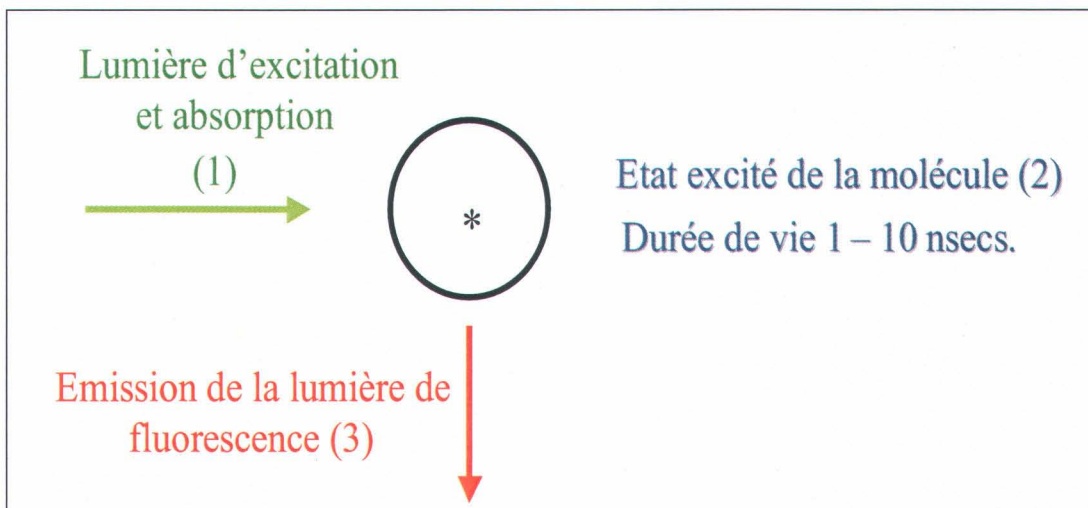


Figure 1.10 : Diagramme explicatif sur la théorie de la fluorescence

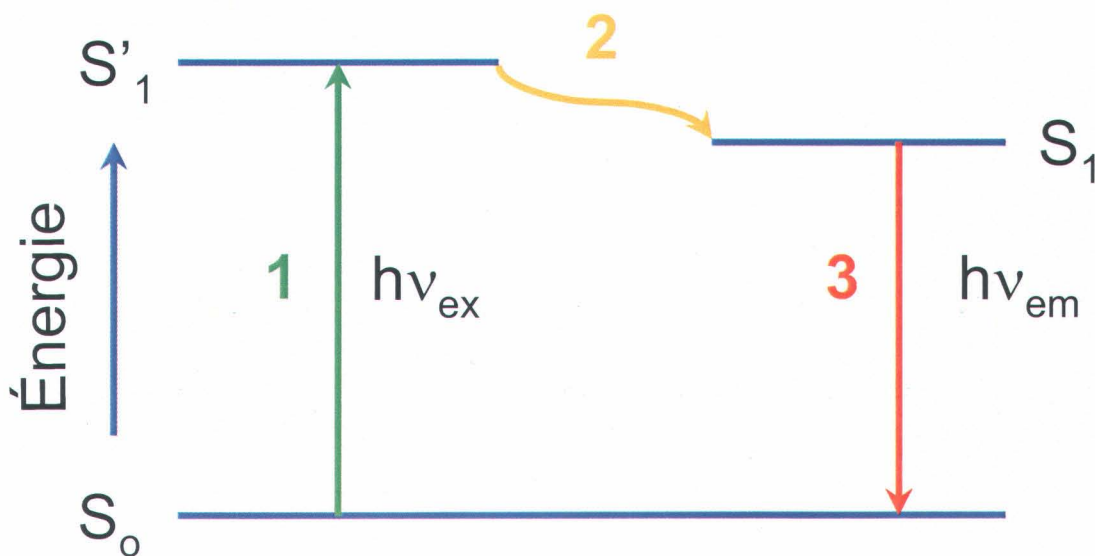


Figure 1.11 : Diagramme simplifié de Jablonski indiquant les niveaux énergétiques moléculaires reliés au phénomène de fluorescence, (1) représente l'excitation, (2) la relaxation et (3) l'émission.

2. Problématique et objectifs

Dans le contexte du Modèle de l'Ion Libre et de son application aux eaux naturelles, une question majeure se pose : les substances humiques ont-elles d'autres rôles aussi influents pour la toxicité des métaux que celui de les complexer ? Pour y répondre nous avons décidé de travailler avec le cadmium et des algues vertes unicellulaires d'eau douce, pour des pH représentatifs des eaux de surface.

Dans la section 1.2 nous avons posé que le pH influence la prise en charge de l'espèce libre d'un métal. Or, notre étude tend à supprimer cette voie de prise en charge du Cd libre en ajoutant un très grand excès de ligand organique. Par ailleurs, le flux d'accumulation intracellulaire de complexes neutres par diffusion passive (Croot *et al.* 1999 ; Xia et Onyuksel 2000) ne dépend pas explicitement du pH (nous reviendrons sur ce flux à la section 6.7). Nous nous attendons donc à observer que :

Hypothèse 1 : le pH n'influencera pas la prise en charge des complexes neutres $Cd(L)_2^0$.

Les composés hydrophobes dans les sols et le milieu aquatique peuvent s'associer aux substances humiques par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes (Stevenson 1994 ; Campbell *et al.* 1997 ; Vigneault *et al.* 2000). Si les complexes neutres étudiés sont suffisamment hydrophobes alors :

Hypothèse 2 : les complexes $Cd(L)_2^0$ pourraient s'associer aux substances humiques formant de «nouvelles» molécules de trop grande taille, et cela diminuerait alors la prise en charge de ces complexes par les algues vertes microscopiques.

Il a déjà été montré que des surfactants synthétiques modifiaient la perméabilité membranaire (en l'augmentant le plus souvent), cet effet étant utilisé dans le domaine pharmaceutique (Xia et Onyuksel 2000). Puisque les SH s'accumulent aux interfaces eau/surfaces biologiques (dans la phycosphère), qu'elles augmentent la perméabilité membranaire d'une algue verte pour une sonde lipophile FDA (Vigneault *et al.* 2000) et qu'elles possèdent des propriétés de surfactant, on peut donc penser que :

Hypothèse 3 : les SH augmenteront la perméabilité membranaire des algues étudiées pour les complexes lipophiles Cd(L)₂⁰.

Nous savons aussi que les substances humiques s'adsorbent aux surfaces cellulaires (Campbell *et al.* 1997) et qu'ainsi elles pourraient s'insérer en partie dans la couche bilipidique de la membrane cellulaire (Cook R.L. 2006, communication personnelle, Département de Chimie, Louisiana State University). Par ailleurs les substances humiques ont tendance à devenir plus hydrophobes à mesure que le pH diminue en raison d'une protonation de leurs divers groupements ionisés.

Hypothèse 4 : les SH verront leur effet perméabilisant des surfaces biologiques augmenter avec une diminution du pH.

Par ailleurs nous allons faire en sorte que la concentration en cadmium libre soit négligeable dans nos expériences (< 0,1% du cadmium total en solution). Autrement dit nous minimiserons l'importance de la voie de prise en charge du cadmium libre par transport facilité. Pour parvenir à cette fin nous avons choisi de travailler avec des ligands qui complexent fortement le cadmium : le diéthylthiocarbamate (DDC), le 8-hydroxyquinoline (Ox) et l'éthyl-xanthate (XANT) décrits dans l'Introduction. L'intérêt réside dans le fait que nous minimisons ainsi la complexation du cadmium libre avec les substances humiques. Cela permet alors de viser un seul type d'effet des substances humiques et d'éviter la superposition de plusieurs effets qui influeraient sur la prise en charge du cadmium. Outre les interactions en solution des SH avec les complexes neutres,

les SH devraient donc avoir une influence uniquement et directement au niveau de la surface biologique des algues.

Une fois ces hypothèses posées nous pouvons énumérer les objectifs spécifiques du doctorat.

- Confirmer l'augmentation de la prise en charge du cadmium en présence de ligands organiques «L» conférant un caractère lipophile et neutre au complexe ainsi formé $Cd(L)_2^0$.
- Caractériser les effets des SH sur la prise en charge des complexes lipophiles étudiés.
- Déterminer l'influence de la nature des SH sur la prise en charge des complexes étudiés (acides fulviques, acides humiques ou encore matière organique naturelle non fractionnée).
- Déterminer l'influence de la nature des algues sur la prise en charge du complexe $Cd(DDC)_2^0$ (surface spécifique différente, formes variées).
- Evaluer l'effet du pH, s'il existe, sur la prise en charge du complexe lipophile en absence de SH. En effet si des études ont bien montré l'effet du pH sur la toxicité de l'ion libre, c'est à dire une diminution de la toxicité par le fait d'une compétition plus grande avec les protons H^+ (Campbell et Stokes 1985 ; Parent et Campbell 1994), en revanche aucune étude n'a montré un effet du pH sur la prise en charge d'un métal sous forme de complexe neutre.
- Appréhender l'influence du pH sur les effets des substances humiques pour la prise en charge de $Cd(L)_2^0$.
- Tenter de corréler les propriétés des substances humiques déjà connues ou bien expérimentées lors du doctorat aux effets constatés sur la prise en charge des complexes lipophiles étudiés.
- Quantifier l'association Cd-L-SH.
- Caractériser le type d'interaction entre les SH et la surface cellulaire des algues et évaluer l'impact du pH.

Au final, nous intégrerons tous ces paramètres (pH, présence ou non de substances humiques, type de SH, espèce d'algue) dans le but de tenter de modéliser les phénomènes rencontrés. La figure 2.1 indique toutes les interactions auxquelles nous nous attendons ou que nous voulons vérifier, en plus des techniques expérimentales qui s'y rapportent (l'introduction de la section 3 y reviendra en détail).

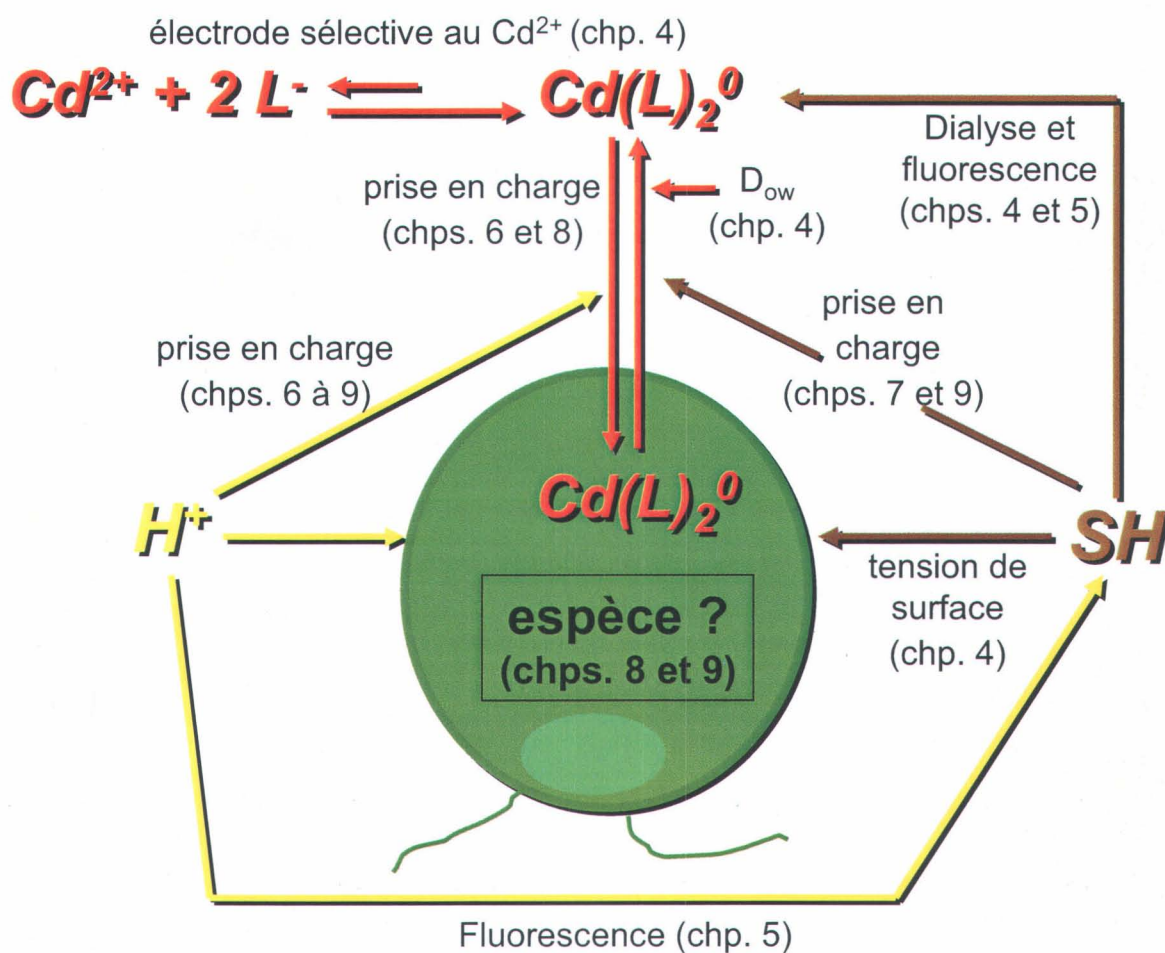


Figure 2.1 : Schéma récapitulatif des méthodes expérimentales et des chapitres qui s'y rapportent. L'introduction du chapitre 3 revient sur les objectifs liés aux types d'expériences.

3. Matériels et méthodes

Si nous nous référons de nouveau à la figure 2.1, nous allons ici introduire succinctement les objectifs qui nous conduisent à réaliser chaque type d'expérience. Nous cherchons tout d'abord à étudier si la prise en charge plus élevée de complexes neutres (telle que le montre la littérature, cf. section 1.5.4) est généralisable pour trois complexes neutres et trois algues vertes unicellulaires d'eau douce dans une gamme de pH 5,5-7. Ainsi, nous réaliserons des expériences de prise en charge du Cd en présence ou non des ligands organiques, de prise en charge des complexes neutres Cd(L)_2^0 en présence ou non des substances humiques, aux pH 5,5 et 7; cela fait référence aux sections 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 et 3.5 qui suivent.

Ensuite, nous cherchons à caractériser les propriétés surfactantes des substances humiques par des mesures de tension de surface (section 3.6). L'hypothèse est que ces propriétés pourraient avoir un effet sur la perméabilité membranaire des algues et par conséquent sur la prise en charge de complexes neutres.

En outre, si les interactions entre les SH des sols avec les composés hydrophobes existent aussi en milieu aqueux, il faut les quantifier (par dialyse, section 3.7) puis connaître les interactions qui régissent les éventuelles associations Cd(L)_2^0 avec les SH (par fluorescence, section 3.8). Ces associations sont importantes à estimer car si elles ont lieu, les nouvelles molécules formées seraient non biodisponibles pour les algues, ce qui diminuerait la prise en charge des complexes neutres.

Il est aussi important de vérifier que nous n'avons pas de présence significative de Cd^{2+} libre lors de l'ajout des ligands organiques, puisqu'il s'agit d'une hypothèse majeure qui sous-tend toute l'étude (expériences avec l'électrode sélective au Cd^{2+} , section 3.9).

Enfin, chaque complexe neutre sera caractérisé aux pH 5,5 et 7 selon son D_{ow} , ce qui permettra de déterminer l'hydrophobicité relative des complexes neutres et de relier cela ou non à leur bioaccumulation par les algues vertes.

3.1 Les réactifs

La vaisselle en verre et en polycarbonate est rincée selon les procédures bien établies à l'INRS : la vaisselle baigne durant 24 h dans de l'acide HNO₃ 10% v/v (grade métaux traces, Fisher) et elle est ensuite rincée sept fois avec de l'eau ultra pure (Résistivité > 18 MΩ·cm, Milli-Q3RO/Milli-Q2 system, Bedford, MA, USA) pour finalement être séchée sous une hotte à flux laminaire. Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau ultra pure. Tous les réactifs utilisés sont de grade analytique ou supérieur.

Nous utilisons du cadmium radioactif en tant que sonde, ce qui nous permet de suivre aisément le cadmium intracellulaire pris en charge par les algues. La solution mère de cadmium provient d'Amersham Biosciences pour une concentration de 1 mCi·mL⁻¹ et un volume d'environ 1 mL. Cette solution mère est utilisée pour les expériences de prise en charge à pH 5,5 car le rapport isotopique ¹⁰⁹Cd/¹¹²Cd doit être suffisamment élevé (environ 18% dans notre cas) afin qu'un signal soit détectable au compteur à radioactivité en fonction de notre protocole expérimental (faible concentration de Cd, faible concentration d'algues, faible volume d'exposition). En revanche, pour toutes les autres expériences qui ne nécessitent pas un tel rapport isotopique, nous utilisons des solutions de Cd radioactif intermédiaires composées de cadmium radioactif (ou cadmium «chaud») issu de la solution mère et de cadmium stable (ou cadmium «froid») issu d'un étalon ICP (1 g·L⁻¹) ; nous avons alors un rapport isotopique d'environ 0,2% pour des activités spécifiques d'environ 0,8 μCi·mmol⁻¹. Les algues sont exposées le plus souvent à 0,38 nM de cadmium dissous total mais quelques expériences ont été réalisées à des concentrations plus fortes.

Le choix de l'agent complexant du cadmium s'est porté sur le pesticide diéthylthiocarbamate (DDC) dans un premier temps puisque les constantes de complexation rapportées dans la littérature sont relativement élevées avec ce métal : $K[\text{Cd}(\text{DDC})_2^0] \sim 17$ par exemple (Labuda *et al.* 1984 ; Hayashi *et al.* 1986). Le sodium diéthyl-dithiocarbamate trihydraté (pureté > 99%) est acheté chez Sigma Aldrich. Suivant la procédure préconisée par Phinney et Bruland (1997a ; 1997b), le DDC sous forme de sel sodique (40 mg) est préparé dans 100 mL de méthanol ultra pur grade HPLC (Fisher

Scientific) afin de permettre une dissolution complète du DDC, et ce quelques heures avant la préparation des milieux d'exposition afin d'éviter la dégradation du DDC dans le temps (Scharfe *et al.* 1973). Les expériences se déroulent à une concentration de 1,0 μM de DDC. Cela donne donc un rapport métal/ligand de près de 1/2600, proche des rapports utilisés par Vigneault (Vigneault 2000) et par Phinney et Bruland (1994 ; 1997a ; 1997b).

Nous avons par ailleurs travaillé avec le 8-hydroxyquinoline, que nous appellerons indifféremment Ox ou bien oxine (Sigma Aldrich). Comme l'oxine est assez stable dans le temps, des solutions stocks de quelques millimolaires sont réalisées chaque mois dans du méthanol ultra pur grade HPLC, l'oxine étant très peu soluble dans l'eau (Bardez *et al.* 1997). La faible solubilité de l'oxine, $4,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ à pH 7 et à $T = 25^\circ\text{C}$ (Bardez *et al.* 1997) nous oblige cependant à ne pas dépasser des concentrations de 0,06 g dans 100 mL de méthanol (soit $[\text{Ox}] = 2,7 \text{ mM}$). Afin de s'assurer de la complète dissolution de l'oxine, les solutions stocks sont agitées pour au moins 24 heures. Les expériences se déroulent à une concentration de 79,2 μM d'Ox, ce qui donne un rapport métal/ligand d'environ $1/2 \cdot 10^5$.

Enfin nous avons utilisé le potassium éthyl-xanthate ou XANT (pureté 98%, Alfa Aesar, MA, USA). Encore une fois la solubilité moyenne du XANT nous oblige à ne pas dépasser des concentrations de 0,05 g dans 100 mL de méthanol. Les expériences se déroulent à une concentration de 0,1 mM de XANT, ce qui donne un rapport métal/ligand d'environ $1/3 \cdot 10^5$.

Les concentrations en méthanol dans nos milieux d'exposition (découlant de l'introduction des ligands organiques) sont de $1/10^4$, $1/10^3$ et $1/5 \cdot 10^2$ en v/v respectivement dans les cas du DDC, de l'Ox et du XANT. De telles dilutions du méthanol ne devraient donc pas influencer la perméabilité membranaire des algues.

En ce qui concerne la spéciation qui découle de ces concentrations de ligands organiques utilisées, nous en parlerons dans la section 4.4.4.

Les substances humiques employées sont issues de l'International Humic Substances Society (IHSS). Nous utilisons des acides fulviques (AF) et humiques (AH) extraits de la rivière Suwannee (Géorgie et Floride, USA) par la procédure désormais bien établie issue de Thurman et Malcolm (1981) ainsi que de la matière organique dite naturelle non fractionnée (MON, extraite par simple osmose inverse). Les concentrations d'exposition sont normalement de 6,5 mg C·L⁻¹, concentration représentative des eaux de surface au Québec pour les AF et la MON. En ce qui concerne les AH, cette concentration est un peu élevée mais le choix d'une concentration identique pour les trois fractions se justifie pour pouvoir comparer les effets de chacune d'entre elles. Les solutions stocks sont préparées dans de l'eau ultra pure à pH 9 pour les AH et la MON, et à pH 5 pour les AF. Après 24 h d'équilibre les solutions stocks des trois fractions sont filtrées sur des membranes Nuclepore en polycarbonate de porosité 0,22 µm (Poretics, GE Osmonics) afin de retirer toute forme particulaire des substances humiques. Les concentrations finales de ces solutions stocks sont déterminées par combustion et analyse du CO₂ (Analyseur de carbone organique total, TOC-5000A, Shimadzu) donnant des concentrations d'environ 1 g C·L⁻¹ pour chacune des substances humiques étudiées.

Les milieux d'exposition contiennent le tampon HEPES (N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[acide 2-éthanesulfonique] pureté > 99,5% ; Sigma Aldrich) pour le pH 7 et le tampon MES (2-[N-morpholino] acide éthanesulfonique pureté > 99,5% ; Sigma Aldrich) pour le pH 5,5 à la concentration de 10⁻² M tout comme dans les milieux de culture (cf. section 3.2). Les tampons utilisés ont une très faible capacité complexante pour les métaux (Wehr *et al.* 1986) et en particulier envers le cadmium aux concentrations que nous utilisons (Soares *et al.* 1999 ; Soares et Conde 2000). Une étude récente de Ceretti *et al.* (2006) démontre, par polarographie, que le cadmium ne se lie pas aux tampons MES et HEPES. Seules deux études ont montré des effets surfactants de ces tampons sur la prise en charge par les algues qui pourraient augmenter la biodisponibilité des métaux étudiés (Vasconcelos *et al.* 1996 ; Vasconcelos *et al.* 2000). Comme nous les utilisons dans toutes nos expériences, que ce soit celles d'équilibres chimiques ou bien celles de prises en charge, les résultats expérimentaux demeurent alors comparables.

3.2 La culture des algues

Le milieu de culture pour *P. subcapitata*, *C. pyrenoidosa* et *C. reinhardtii* est MHSM1 («modified high salt medium»), milieu modifié en haute teneur en sels adapté de Macfie *et al.* (1994). La composition en sels de ce milieu est donnée dans le tableau 3.1. En pratique, les milieux de culture sont préparés à partir de solutions stock d'ammonium, de phosphate, de KNO₃ et d'eau ultra pure puis le tout est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. Les métaux traces sont alors rajoutés après l'autoclavage afin d'éviter toute précipitation puis le pH est ajusté avec du HNO₃ 1,5 M et du NaOH 0,5 M.

Le milieu de culture habituel contient en plus le tampon HEPES à 10⁻² M pour le pH 7. D'autre part, lorsque l'on veut cultiver les algues à pH 5,5 ou 6, on emploie le tampon MES à une concentration de 10⁻² M. Les pK_a sont pour HEPES et MES respectivement de 7,5 et 6,1 à 25 °C. L'emploi de ces tampons se justifie par le besoin de bien contrôler les pH dans nos expériences. De nombreuses études montrent qu'ils sont inoffensifs envers les algues vivantes et qu'ils n'altèrent pas leur division cellulaire (Wehr *et al.* 1986).

Les algues se développent dans des contenants Erlenmeyer en polycarbonate de 250 mL placés dans un incubateur Conviron à 20,0 °C ± 0,2 °C, sous une lumière continue fournie par des tubes à fluorescence blanche (130 μmol photons·m⁻²·s⁻¹) et une agitation de 100 rpm. Nous nous assurons de conserver des cultures en santé en ne les laissant pas vieillir. Ainsi nous faisons des «repiquages» en prenant régulièrement un aliquot de 1 mL de la culture d'algue (tous les 4 à 5 jours au maximum) que nous réinjectons dans un milieu de culture frais. Les cultures algales sont maintenues axéniques et l'absence de contamination par des bactéries est vérifiée à l'occasion par placage sur agar nutritif (*Difco-Bacto agar*). Lors des expériences, les milieux d'exposition sont en fait les milieux de culture mais simplifiés appelés MHSM1_t, c'est à dire qu'ils ne contiennent pas de métaux traces ni d'EDTA afin qu'il n'y ait pas de compétition entre les métaux traces, l'EDTA et le cadmium que nous ajoutons pour la prise en charge par les algues. Le même milieu simplifié est utilisé pour les rinçages des algues lors des expériences de prise en charge mais en l'absence de tampon cette fois-ci (cf. section 3.4).

Les algues destinées à servir d'inoculum pour les expériences sont pipetées pendant leur phase exponentielle de croissance, ce qui correspond à un état physiologique similaire pour toutes les cellules algales, permettant ainsi d'éviter un biais dû à des différences d'état biologique pour les algues.

Les comptages des nombres de cellules sont effectués avec un compteur électronique de particules (Multisizer™ 3 Coulter Counter®, Beckman, Hialeah, FL, USA) en diluant 1 mL du milieu de culture dans 9 mL d'Isoton III. Nous comptons habituellement sur une plage de taille entre 1,98 et 10,04 μm et avec une électrode d'orifice de 70 μm .

Tableau 3.1 : Concentrations molaires du milieu normal et modifié à haute teneur en sels pour la culture des algues, MHSM (Macfie *et al.* 1994).

Elément	HSM	MHSM1 pour la culture d'algues	MHSM1 _t pour les rinçages et l'exposition
NH ₄	$9.35 \cdot 10^{-3}$	$9.37 \cdot 10^{-4}$	$9.37 \cdot 10^{-4}$
Cl	$9.49 \cdot 10^{-3}$	$5.98 \cdot 10^{-6}$	$5.98 \cdot 10^{-6}$
K	$2.20 \cdot 10^{-2}$	$4.22 \cdot 10^{-3}$	$4.22 \cdot 10^{-3}$
PO ₄	$2.37 \cdot 10^{-2}$	$1.37 \cdot 10^{-4}$	$1.37 \cdot 10^{-4}$
CO ₃	ouvert à l'atmosphère	idem	idem
NO ₃	-	$5.07 \cdot 10^{-3}$	$5.07 \cdot 10^{-3}$
SO ₄	$9.35 \cdot 10^{-3}$	$8.12 \cdot 10^{-5}$	$8.12 \cdot 10^{-5}$
Mg	$9.35 \cdot 10^{-3}$	$8.12 \cdot 10^{-5}$	$8.12 \cdot 10^{-5}$
Ca	$9.35 \cdot 10^{-3}$	$6.80 \cdot 10^{-5}$	$6.80 \cdot 10^{-5}$
Na	$9.35 \cdot 10^{-3}$	$1.02 \cdot 10^{-4}$	$1.02 \cdot 10^{-4}$
BO ₃	$3.01 \cdot 10^{-6}$	$3.01 \cdot 10^{-6}$	-
Mn	$2.10 \cdot 10^{-6}$	$2.10 \cdot 10^{-6}$	-
EDTA	$8.06 \cdot 10^{-7}$	$8.06 \cdot 10^{-7}$	-
Fe	$5.92 \cdot 10^{-7}$	$5.92 \cdot 10^{-7}$	-
MoO ₄	$3.00 \cdot 10^{-8}$	$3.00 \cdot 10^{-8}$	-
Zn	$2.43 \cdot 10^{-8}$	$2.43 \cdot 10^{-8}$	-
Co	$1.09 \cdot 10^{-8}$	$1.09 \cdot 10^{-8}$	-
Cu	$7.04 \cdot 10^{-8}$	$7.04 \cdot 10^{-8}$	-

3.3 Les expériences de toxicité avec les algues vertes

Nous avons testé la toxicité possible des trois ligands organiques et des trois fractions de substances humiques envers les algues vertes étudiées. Pour ce faire, les milieux d'exposition sont répartis comme suit : 3 x 100 mL de milieu de culture MHSM1 sans

aucun autre ajout (témoin) ; 3 x 100 mL de MHSM1 avec ajout d'un ligand organique ou d'une fraction de substances humiques (traitement). Les concentrations sont celles utilisées dans les expériences de prise en charge soit [DDC] = 1,0 μM ; [Ox] = 79,2 μM ; [XANT] = 0,1 mM ; [SH] = 6,5 mg C·L⁻¹.

Chaque fiole de 100 mL est inoculée à 40 000 cell·mL⁻¹ à partir d'une culture en phase exponentielle de croissance de l'algue désirée. Le suivi s'effectue durant 96 h dans le cas de *C. reinhardtii* et 120 h pour *P. subcapitata* et *C. pyrenoïdosa*.

À la fin des expériences nous calculons les rendements relatifs ainsi que les taux de croissance relatifs aux témoins. Le rendement relatif se calcule au maximum de croissance de l'algue soit le plateau de la courbe de croissance, ce dernier étant généralement proche de 90 h quelque soit l'algue. Le résultat est donc la densité cellulaire à 90 h pour le traitement sur celui du témoin exprimé en pourcentage. Un résultat supérieur à 100% indique un effet bénéfique du composé ajouté dans le milieu de culture et inversement si c'est inférieur à 100%.

En ce qui concerne le taux de croissance relatif, il se calcule au niveau de la pente maximale de croissance de l'algue soit dans nos cas entre 22 et 72 h. Voici la formule explicitée :

$$\mu = [\text{Ln} (\text{densité cellulaire à 72 h}) - \text{Ln} (\text{densité cellulaire à 22 h})] / (72 - 22)$$

Ensuite, il faut exprimer en pourcentage le rapport μ du traitement sur le μ du témoin. L'interprétation est la même que pour le rendement relatif.

3.4 Les expériences de prise en charge

Plusieurs types d'expériences sont réalisés : à un temps fixe ou bien par une cinétique de prise en charge ; à pH 7 ou bien 5,5 ; en présence ou non de substances humiques. Dans tous les cas nous choisissons de travailler sur des expériences à court terme, c'est à dire

avec un temps d'exposition inférieur à 40 min. Ce choix se justifie ici par le fait que nous voulons minimiser l'effet des exsudats relargués par les algues, ceux-ci pouvant influencer la spéciation de nos milieux expérimentaux (Kola *et al.* 2004), mais aussi parce qu'il est important de pouvoir estimer les vitesses initiales de prise en charge (k'_i) d'un métal par les algues.

Le protocole expérimental qui suit est bien éprouvé dans nos laboratoires et a montré son efficacité à mesurer la prise en charge de métaux par des algues vertes (Errécalde et Campbell 2000 ; Boullemant *et al.* 2004). Il est résumé très schématiquement à la figure 3.1.

Les milieux d'exposition sont préparés 24 h avant l'expérience dans des bouteilles en Téflon de 1 L avec le milieu MHSM1_t et les quantités appropriées de ligand L (préparé dans le méthanol) et de Cd (issu de la solution mère ou intermédiaire suivant les nécessités). La préparation se fait 24 h à l'avance pour laisser la solution s'équilibrer, le tout à température ambiante du laboratoire soit environ 23°C. Si le milieu d'exposition doit contenir des substances humiques, alors le volume nécessaire issu de la solution stock est introduit dans la bouteille en Téflon de 1 L afin d'atteindre une concentration finale de 6,5 mg C·L⁻¹, et le milieu d'exposition est laissé à l'obscurité pour s'équilibrer afin d'éviter toute photo-oxydation des substances humiques (Stevenson 1994). Les milieux d'exposition sont ensuite filtrés sur des membranes Nuclepore en polycarbonate de porosité 0,22 µm (Poretics, GE Osmonics) quelques heures avant l'expérience dans le but d'éviter toute phase particulaire qui aurait pu se former durant l'équilibre, puis les filtrats sont répartis dans des contenants Erlenmeyer de 250 mL en polycarbonate à raison de 100 mL chacun. Enfin une aliquote de 2 mL est prélevée de tous les contenants de 100 mL afin de mesurer le Cd dissous total initial avant inoculation des algues. Cela nous permet de faire un bilan de masse avec le Cd dissous total final après exposition aux algues (voir ci-après).

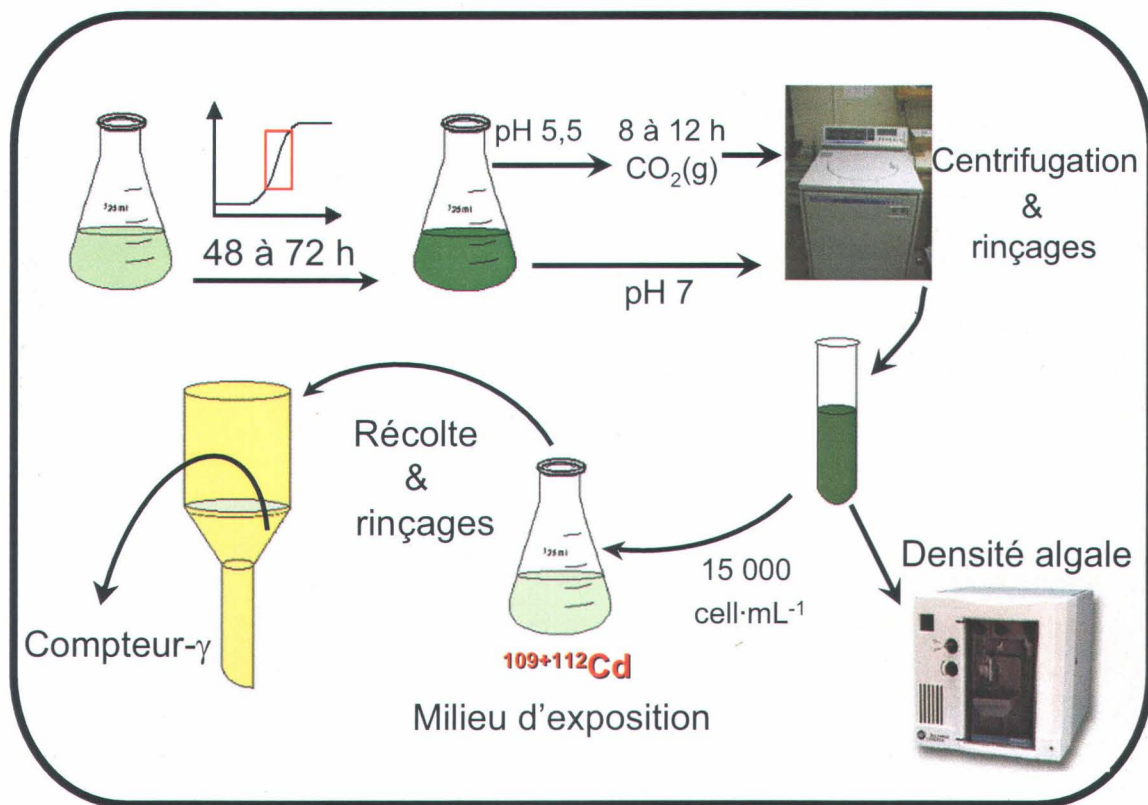


Figure 3.1 : Schéma du protocole expérimental pour les expériences de prise en charge par les algues vertes.

Pour les expériences de prise en charge à pH 7, une culture d'algues est démarrée quelques jours avant l'expérience pour que la récolte soit faite au moment où les algues sont en phase exponentielle de croissance (2 j avant pour *C. reinhardtii*, 3 j avant pour *P. subcapitata* et *C. pyrenoidosa*). Pour les expériences de prise en charge à pH 5,5 une culture d'algues à pH 7 est aussi démarrée 2 ou 3 j avant l'expérience mais la récolte n'est pas effectuée à ce moment là. Nous acclimatons, dans le même contenant, les algues durant 8 ou 12 h de plus (suivant l'espèce algale) au pH désiré par l'intermédiaire d'un ajusteur de pH fonctionnant par bullage de CO₂(g). Le choix de cette technique se justifie car elle rend compte d'évènements de changement de pH brusque comme lors de la fonte des neiges au Canada ou bien dans des zones où les pH proche de la neutralité diminuent occasionnellement pour diverses raisons (fortes pluies acides, rejets industriels irréguliers, etc.). En revanche, nos

expériences pour un pH de 5,5 ne reflètent pas réellement ce qui se passe pour des algues vivant dans des eaux de surface continuellement à ce pH. Nous avons mené quelques expériences complémentaires avec des cultures d'algues qui ont poussé directement à pH 5,5, afin de vérifier l'effet du CO₂ (g) sur les algues (cf. section 8.6).

Après la croissance des algues de 2 ou 3 j à pH 7 (plus 8 à 12 h à pH 5,5 en présence de CO₂ (g)), les algues sont récoltées et centrifugées pendant 10 min à 20 000 g. Le surnageant est retiré et le culot resuspendu dans environ 10 mL de MHSM1_t, sans tampon puis de nouveau centrifugé à 20 000 g mais pendant 5 min. Il s'agit de l'étape de rinçage que nous répétons deux autres fois. Ces rinçages ont pour but d'éliminer les exsudats relargués par les algues, l'exsudation étant un phénomène bien documenté qui soulève la possibilité d'interactions avec les métaux (Grassi et Mingazzini 2001 ; Kola *et al.* 2004), ce qui évidemment viendrait modifier la spéciation du cadmium dans nos expériences. Le culot final est resuspendu dans 10 mL de MHSM1_t, compté avec le compteur de particules (densité algale > 10⁶ cellules·mL⁻¹). Les milieux d'exposition sont alors inoculés avec ces algues pour donner une densité algale initiale de 15 000 cellules·mL⁻¹.

Les algues sont exposées pour des temps entre 3 et 40 min ; trois temps d'exposition sont étudiés chaque fois en triplicata soit 9 contenants de 98 mL par traitement plus 9 contenants de 98 mL pour le témoin quand il est nécessaire (absence de substances humiques). À chaque temps d'exposition et avant la filtration, une portion de 2 mL de chaque contenant est sous échantillonnée afin de mesurer le nombre d'algues réel (cellules·mL⁻¹) ainsi que la surface algale en μm², ce qui permet d'obtenir la surface totale des algues dans la solution d'exposition (nombre d'algues fois surface algale, résultat en m²). Ensuite le reste du contenant, soit 96 mL, est passé sur deux filtres de polycarbonate de 0,4 μm de porosité, le premier filtre servant à récolter les algues, le second servant à mesurer le bruit de fond de la radioactivité (adsorption sur le filtre plus solution d'exposition résiduelle). La filtration s'effectue sous un vide léger ne dépassant pas les 13 kPa dans le but d'éviter le bris des cellules algales. Après cela les filtres sont rincés trois fois avec 10 mL du milieu MHSM1_t. Dans le cas d'expériences sans ligand organique, les filtres retenant les cellules algales sont rincés avec du Na₂EDTA à 10⁻⁴ M pendant 10 min pour retirer le cadmium qui aurait pu

s'adsorber aux surfaces algales (paroi / membrane cellulaire) (Xue *et al.* 1988 ; Kola *et al.* 2004). Cette étape n'est pas nécessaire dans les expériences de prise en charge avec les ligands organiques car les complexes neutres sont accumulés par diffusion passive et ne s'adsorbent donc pas aux surfaces cellulaires.

Chaque filtre est ensuite introduit dans une bouteille de volume 4 mL avec en plus 2 mL d'eau ultra pure, ce qui permet un compte radioactif plus précis en évitant les déformations géométriques du filtre sans eau. Les bouteilles sont alors placées dans un compteur à rayonnement gamma (Compugamma Model 1282, LBK Wallac). Les calculs nous permettant d'obtenir le cadmium accumulé par les algues sont expliqués à la section 3.5.

Pour terminer, les filtrats sont récupérés dans des contenants en polypropylène de 125 mL (filtrats non dilués, récupérés avant l'étape de rinçage des algues). Cela nous permet de mesurer la concentration de Cd dissous total et la concentration de substances humiques après l'exposition aux algues. Pour ce faire, un sous-échantillon de 2 mL des 96 mL de chaque filtrat est mesuré au compteur gamma. Les pertes de Cd ne dépassent jamais les 5%, ce qui signifie que les algues sont exposées durant toute l'expérience à la même concentration de cadmium. Un autre sous-échantillon du filtrat passe au spectromètre UV-visible, à la longueur d'onde de 254 nm, afin de s'assurer que les pertes (par photolyse par exemple) en SH sont minimales. Cette longueur d'onde est largement utilisée dans la littérature pour confirmer la présence de matière organique dissoute naturelle (Abbt-Braun *et al.* 2004). Au préalable, deux courbes étalons furent réalisées à pH 7 et 5,5 avec les acides humiques (cf. figure 3.2), fulviques et la matière organique naturelle non fractionnée dans un milieu MHSM1_t + Cd + ligand organique + des concentrations en SH allant de 0 à 15 mg C·L⁻¹. Cette méthode nous permet de détecter des variations de concentration en substances humiques de l'ordre de 0,15 mg C·L⁻¹ ce qui revient à des variations de 2% pour une concentration de 6,5 mg C·L⁻¹. Les concentrations des substances humiques ne diminuent jamais plus de 10%.

Au final, les résultats de prise en charge sont exprimés en nmol Cd·m⁻². En effet, cette normalisation par mètre carré permet des comparaisons entre les trois espèces d'algues

puisqu'elle affranchit les variations de surface cellulaire entre les trois espèces d'algues. La densité algale ainsi que les dimensions de ces cellules (surface, diamètre, surface cellulaire) sont obtenues grâce au compteur électronique de particules.

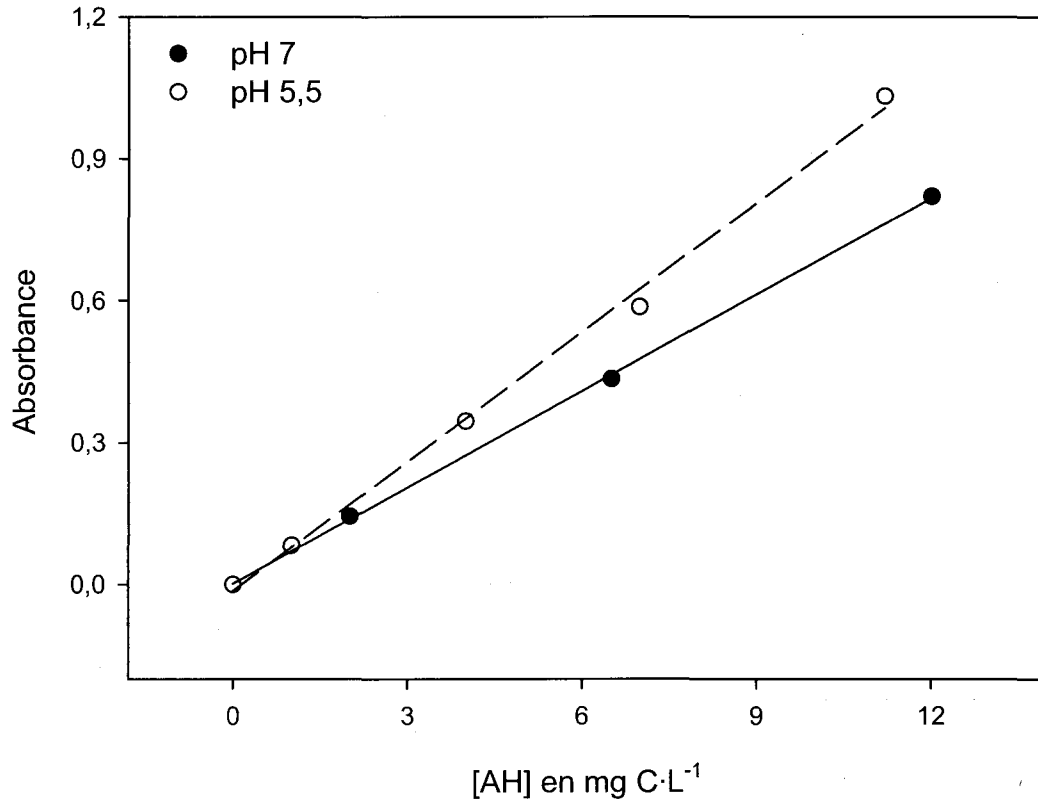


Figure 3.2 : Courbes étalons de l'absorbance UV à 254 nm des AH aux pH 7 et 5,5.

3.5 La radiochimie (comptage)

La fenêtre de comptage pour le cadmium-109 se situe entre 16 et 32 keV avec un pic d'intensité maximal se trouvant à 22 keV. Le temps de comptage est de 2 000 s et/ou avec un maximum de 100 000 comptes. La concentration de cadmium est ensuite calculée comme suit :

- Les CPM (comptes par minute) donnés par le compteur gamma pour le filtre du dessous (bruit de fond) sont soustraits de ceux du filtre du dessus.
- Le résultat est divisé par l'efficacité de comptage du compteur ($35,2 \pm 3,5\%$) pour donner les DPM (désintégrations par minute).
- Les DPM sont transformés en DPS (désintégration par seconde) en les divisant par 60.
- On divise ensuite par $1,777 \cdot 10^{-8}$ (constante de radioactivité du Cd obtenue en divisant $\ln 2$ par le temps de demi-vie du Cd en secondes) afin d'avoir le nombre de noyaux de ^{109}Cd .
- En divisant par le nombre d'Avogadro ($6,023 \cdot 10^{23}$) on a le nombre de moles de ^{109}Cd .
- Après cela on divise par le rapport isotopique du jour et l'on obtient le nombre de moles de cadmium total.
- Pour les expériences de prise en charge, on divise ce dernier résultat par la surface totale des algues calculée un peu plus haut et l'on obtient la prise en charge des algues en $\text{nmol Cd} \cdot \text{m}^{-2}$. Sinon pour toute autre expérience on divise le nombre de moles de cadmium total par le volume dans le flacon qui a été introduit dans le compteur gamma afin d'obtenir une concentration molaire.

Le rapport isotopique du jour tient compte de la décroissance de la radioactivité du ^{109}Cd et des spécifications de la solution mère de cadmium fournies par le fabricant (activité spécifique, volume, date de certification en particulier), de la dilution le cas échéant avec du cadmium «froid» et enfin avec la date du jour de l'expérience (c'est-à-dire le nombre de jours écoulés depuis la date de certification). La formule (équation 3.1) suivante permet de tenir compte de la désintégration naturelle du cadmium-109 :

$$(3.1) \quad N = N_0 \cdot e^{\frac{-\ln 2 \cdot t}{462,3}}$$

où t est le nombre de jours écoulés entre la date de certification et la date de l'expérience, N_0 est l'activité spécifique à la date de certification, N est l'activité spécifique le jour de l'expérience et enfin 462,3 jours représente le temps de demi-vie du cadmium 109.

3.6 Les expériences de mesure de tension de surface

La tension superficielle est l'énergie qui existe à l'interface entre deux phases (liquides, solides ou gazeuses). Cette tension est due au fait que les molécules, à la limite de séparation, ne sont pas soumises aux mêmes forces de Van der Waals de la part de toutes leurs voisines et que les molécules tendent naturellement à minimiser l'énergie de liaison. La tension de surface est alors la résultante des forces s'exerçant sur les molécules de la surface et dirigée vers l'extérieur d'un liquide. En physique par exemple, il s'agit d'un effet au sein d'un liquide qui amène la surface à se déformer comme une membrane élastique (Briant et Ténèbre 1989). Les substances humiques pourraient, de par leur propriété amphiphile (cf. section 1.3.2), abaisser la tension de surface de l'eau, et nous avons émis l'hypothèse que ce résultat serait en relation avec une modification de la perméabilité des surfaces biologiques.

Ces mesures de tension de surface se font, dans notre cas, par la méthode de l'anneau de Du Nouy en mode dit «pull», grâce à un tensiomètre KSV Sigma 70 (Helsinki, Finlande). L'anneau en platine est de format standardisé afin de pouvoir incorporer des corrections mathématiques. L'anneau est plongé dans le liquide testé et vient se placer juste en dessous de l'interface liquide/air. L'anneau est ensuite remonté doucement vers la phase gazeuse formant alors un ménisque avec le liquide. Le volume et la force exercée passent par un maximum puis diminuent quand l'anneau amorce une nouvelle plongée lente dans le liquide. Ces actions sont répétées jusqu'à atteindre le temps souhaité d'analyse de l'échantillon. La figure 3.3 montre les résultats d'une expérience typique.

- 1) L'anneau est au-dessus de la surface et la force exercée est zéro.
- 2) L'anneau touche la surface et une légère force positive en découle due à la force adhésive entre l'anneau et la surface liquide.
- 3) L'anneau est poussé dans le liquide causant une légère force négative.

- 4) L'anneau brise la surface causant une faible force positive due aux fils tenant l'anneau.
- 5) En remontant l'anneau, la force commence à augmenter.
- 6) Cela se poursuit ...
- 7) Jusqu'à ce que le maximum de la force soit atteint.
- 8) Ensuite la force diminue jusqu'à ce que le ménisque se casse.

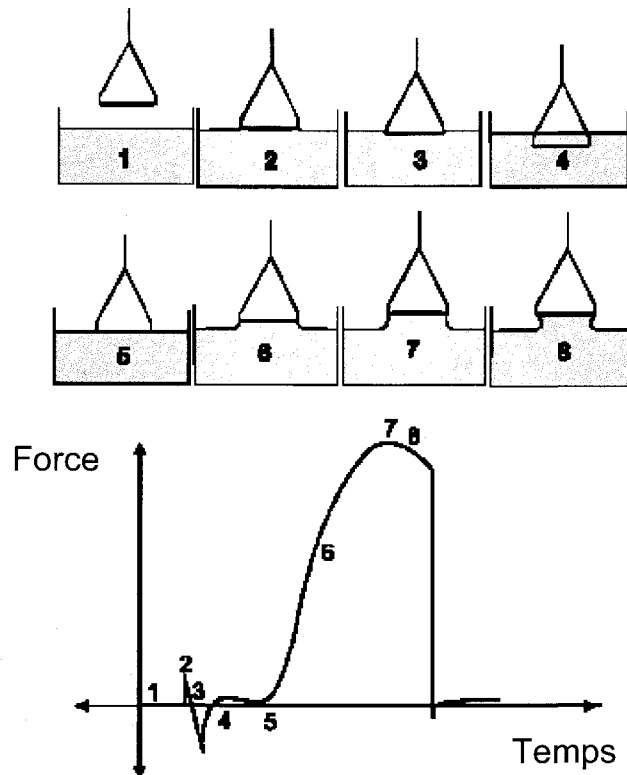


Figure 3.3 : Mesure de la tension de surface, schématisation du phénomène de ménisque par la méthode Du Nouy en mode dit «pull».

Le calcul de la tension de surface par cette méthode se base sur ce maximum atteint et sur l'hypothèse que l'anneau est de diamètre infini. Par ailleurs, cela ne considère pas un volume additionnel de liquide qui est élevé à cause de la proximité des côtés de l'anneau.

Des corrections mathématiques basées sur les travaux de Huh et Mason (1975) compensent pour ce volume supplémentaire et elles sont intégrées dans le logiciel du tensiomètre. Le calibrage de l'appareil s'effectue avec du méthanol ultra pur grade HPLC pour une température réglée à 30 °C grâce à un thermostat.

3.7 Les expériences d'association entre le Cd, les Cd(L)_2^0 et les acides humiques par dialyse

Plusieurs de nos expériences se déroulent avec les complexes neutres Cd(L)_2^0 et les substances humiques présentes dans le même milieu d'exposition. L'association en solution entre les SH et les solutés hydrophobes étant bien connue (McCarthy et Zachara 1989), il importe de vérifier le degré d'association entre nos complexes lipophiles «types» et les substances humiques IHSS. Pour vérifier ce point, nous avons réalisé des expériences avec des membranes à dialyse en cellulose sur plusieurs jours. Les membranes utilisées proviennent de la société Spectra/Por, Spectrum (Houston, TX, USA) et empêchent le passage des molécules de poids moléculaire supérieur à 500 Da. Cela ne devrait donc pas poser de difficultés avec les acides humiques pour lesquels le poids moléculaire apparent est de $M_w = 3400$ Da (valeur issue des données compilées par Perdue et Ritchie, 2004 page 291). En revanche les acides fulviques qui ont une taille plus petite, pourraient diffuser à travers le sac à dialyse et fausser les résultats. Nous nous sommes donc concentrés sur l'association des acides humiques avec les complexes neutres pour la méthode par dialyse. Pour ce qui est des acides fulviques et de la matière organique naturelle, nous avons préféré travailler en fluorescence (cf. section 3.8).

Dans le dispositif expérimental de dialyse, le milieu extérieur au sac à dialyse (900 mL) et celui intérieur (40 mL), c'est à dire dans le sac à dialyse, ont la même concentration initiale de Cd (0,38 nM) et de ligand ([DDC] = 1,0 μM ; [Ox] = 79,2 μM ; [XANT] = 0,1 mM). Au milieu intérieur nous ajoutons 6,5 mg $\text{C}\cdot\text{L}^{-1}$ des acides humiques. Le tout est étudié en triplicata et les trois essais sont agités en permanence sur trois plaques agitatrices grâce à un barreau aimanté introduit dans chacun des trois béciers de 1 L en Téflon. Le suivi se fait jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint, au maximum en 5 j dans nos cas ; le bilan de masse

pour le dispositif de dialyse est réalisé en mesurant à la fin de l'expérience la quantité de soluté adsorbé sur la membrane à dialyse en introduisant le sac à dialyse dans un flacon (Williams *et al.* 1999), le volume et la concentration en Cd de la solution à l'intérieur du sac à dialyse, ainsi que le volume et la concentration en Cd dans la solution externe. Le suivi se fait à l'aide du radio-isotope cadmium-109. Les calculs permettant d'obtenir les concentrations de cadmium lorsque l'on travaille avec un radio-isotope sont expliqués à la section 3.5.

Exactement le même protocole permet d'extraire des constantes conditionnelles de complexation entre les acides humiques et le cadmium (cf. section 4.2). La seule exception est l'absence de tout ligand organique autre que les SH dans les milieux à l'extérieur et à l'intérieur du sac à dialyse. Les concentrations de Cd et des acides humiques demeurent à 0,38 nM et 6,5 mg C·L⁻¹ respectivement.

3.8 La spectrométrie de fluorescence

Dans l'optique où les expériences de dialyse (section précédente) démontrent effectivement des interactions entre les AH et les complexes neutres, alors il convient non seulement de vérifier ce phénomène pour les AF et la MON mais aussi de tenter de déterminer les types d'interactions qui régiraient ces associations SH+Cd(L)₂⁰. La spectrométrie de fluorescence, par l'intermédiaire de la présence de chromophores au sein des fractions de SH, permet de mesurer les variations d'intensité ainsi que les déplacements des pics d'intensité maximales pour les SH en présence d'un composé ajouté (ici les complexes neutres).

3.8.1 Mode opératoire

Les échantillons sont préparés dans 50 mL de MHSM1₁ (cf. tableau 3.1) au pH étudié (7 ou 5,5). Les concentrations de Cd, des ligands organiques et des substances humiques demeurent les mêmes que dans les expériences de prise en charge afin de pouvoir relier les résultats observés pour la prise en charge des complexes neutres du cadmium par les algues vertes avec les résultats de fluorescence. Nous avons donc [Cd] = 0,38 nM et [SH] = 6,5

mg C·L⁻¹ puis un des trois ligands suivant : [DDC] = 1,0 μM ; [Ox] = 79,2 μM ; ou bien [XANT] = 0,1 mM. Les échantillons s'équilibrent durant 24 h dans le noir pour éviter la photo-oxydation des substances humiques et sous une agitation de 100 rpm avant les mesures en fluorescence, le tout à température ambiante (23°C).

Les mesures sont réalisées avec un spectromètre de fluorescence Cary Eclipse (Varian Inc., CA, USA) avec des cellules de quartz pouvant contenir jusqu'à 4 mL d'échantillon. Les matrices d'excitation-émission de fluorescence (MEE) sont réalisées à température du laboratoire (près de 23°C). Afin de déterminer les zones «intéressantes» d'études, des travaux exploratoires ont été réalisés sur les acides humiques en utilisant les conditions suivantes : une vitesse de balayage de 1 200 nm·min⁻¹, un pas d'incrément de 20 nm pour l'excitation et de 10 nm pour l'émission, des longueurs d'ondes (λ) balayées entre 200 et 800 nm pour l'émission et l'excitation, et enfin des fentes d'excitation et d'émission fixées à 15 nm. Typiquement, tous les autres spectres sont réalisés de la manière suivante : la vitesse de balayage est de 600 nm·min⁻¹ pour un pas de 5 nm pour l'excitation (220 < λ < 360 nm) et de 1 nm pour l'émission (380 < λ < 580 nm). Les fentes d'excitation et d'émission sont fixées à 5 nm et le voltage du spectrofluorimètre est placé à la valeur «moyenne». Les spectres sous forme de carte «topographique» sont réalisés grâce au logiciel Sigma Plot 8.02 (SPSS, USA).

3.8.2 *Titrage des substances humiques par le cadmium*

Dans des bouteilles en Téflon, chaque fraction de substances humiques (6,5 mg C·L⁻¹) est étudiée dans 500 mL du milieu MHSM1. Une première MEE était alors réalisée faisant office de référence. A partir de là, six concentrations croissantes de cadmium (entre 0,1 nM et 10,0 μM par pas de facteur 10) sont ajoutées au milieu précédant et une autre MEE est enclenchée. Plus précisément le cadmium rajouté est issu d'un étalon ICP (1 g·L⁻¹) ou bien d'une solution diluée (1 mg·L⁻¹), le pH est ajusté (7 ou 5,5) après chaque ajout de Cd avec du HNO₃ 1,5 M et du NaOH 0,5 M et nous laissons équilibrer la solution pendant 10 min.

Nous avons aussi réalisé le même genre de titrage en présence des ligands organiques. Ainsi nous réalisons une MEE de SH à pH 7 ou bien 5,5 ; puis une autre MEE avec ajout

d'un ligand (DDC, XANT ou bien Ox) dans la même bouteille ; enfin nous titrons avec le Cd (concentrations entre 0,38 et 162 nM).

3.8.3 Corrections spectrales à intégrer

Des biais instrumentaux sont inhérents au type d'appareil utilisé et au fait que la lampe au xénon émet moins aux longueurs d'ondes basses qu'aux longueurs d'ondes élevées (McKnight *et al.* 2001). Il faut donc corriger pour cela. Plusieurs possibilités existent, telles que la correction à la rhodamine B concentrée dans du glycérol qui absorbe la lumière incidente entre 220 et 600 nm (le rendement quantique et le maximum d'émission sont indépendants de ces longueurs d'ondes d'excitation) ou bien le sulfate de quinine pour les longueurs d'ondes d'excitation 220 à 340 nm (Lakowicz 1983).

De plus, les données spectrales que nous obtenons doivent être corrigées pour les premiers (PIFE) et seconds effets de filtres internes (SIFE) ou «Inner Filter Effects». Ces effets se produisent pour des échantillons dont la dilution n'est pas suffisante, soit une absorption supérieure à $0,01 \text{ cm}^{-1}$ quelle que soit la longueur d'onde (Tucker *et al.* 1992). En effet, il y a alors absorption d'une partie de la lumière incidente utilisée pour l'excitation de fluorescence entre son trajet et la zone de l'échantillon (PIFE) et/ou réabsorption d'une partie de la lumière de fluorescence avant de quitter l'échantillon (SIFE) (Zimmermann *et al.* 1999). Un facteur de correction exact pour ces effets de filtres passe par des mesures d'absorbance en UV sur chaque échantillon étudié, il se calcule de la façon suivante :

$$A_{\text{excit}} = 0,5 \cdot A(\lambda_i)$$

$$A_{\text{emit}} = 0,5 \cdot A(\lambda_i)$$

$$A_{\text{total}} = A_{\text{excit}} + A_{\text{emit}}$$

$$f_{\text{corr}} = 10^{-A_{\text{total}}}$$

où $A(\lambda_i)$ est l'absorbance à une longueur d'onde donnée. On considère en général que pour une cuvette de 1 cm de largeur le spectromètre d'émission ne «voit» qu'une petite partie du volume central de la cuvette impliquant un trajet optique réel ou efficace de la lumière d'excitation de 0,5 cm. De plus le trajet optique de la lumière de fluorescence passant par

l'échantillon vers le monochromateur d'émission est aussi fixé à 0,5 cm. Voilà pourquoi les coefficients de 0,5 cm sont employés dans le calcul de A_{excit} et A_{emit} (Tucker *et al.* 1992 ; Zimmermann *et al.* 1999 ; McKnight *et al.* 2001).

Les différents articles traitant de ce sujet démontrent clairement l'importance de ces corrections. Dans le cas d'expériences de «quenching» on surestimerait la diminution du signal de fluorescence (Zimmermann *et al.* 1999) ou bien si l'on étudiait un composé à différentes concentrations on pourrait observer des déplacements de pics d'intensité erronés (Mobed *et al.* 1996).

D'un point de vue des données elles-mêmes, nous procédons de la manière suivante. Nous réalisons une matrice d'excitation-émission d'un milieu MHSM1_t (simplifié) au pH de travail (5,5 ou 7), ce qui constitue notre blanc, corrigée pour les PIFE, SIFE et les biais instrumentaux qui ont été préalablement enregistrés en usine pour notre fluorimètre (validité d'une année). Nous normalisons ensuite le blanc du milieu étudié ainsi que toutes les matrices MEE des échantillons par l'aire mesurée sous le pic Raman à la longueur d'onde d'excitation de 350 nm (Stedmon *et al.* 2003). La matrice de données du blanc est alors à soustraire des données corrigées de chaque échantillon et les valeurs négatives arbitrairement fixées à zéro (McKnight *et al.* 2001 ; Stedmon *et al.* 2003). Cela permet de diminuer les bandes Raman et Raleigh que l'on observe sur tous les spectres. Ainsi, les données pour un échantillon se trouvent corrigées pour les effets de filtres internes, les biais instrumentaux et normalisés pour un blanc, ce qui donne des unités de fluorescence en unités Raman fois 1000 par nm.

Tous les spectres dans nos travaux sont présentés de la même manière : l'axe des abscisses représente le spectre d'émission, celui des ordonnées le spectre d'excitation et l'axe z en 3^{ème} dimension représente l'intensité de fluorescence.

3.9 Dosage du cadmium libre inorganique en présence de ligands organiques (électrode sélective au cadmium)

Afin de vérifier que dans les milieux contenant des ligands organiques auxquels sont exposés les algues, plus de 99,9% du cadmium se trouve sous forme complexée, nous avons utilisé l'électrode sélective au cadmium ionique (Orion, Waltham, MA, USA). Cette dernière permet de mesurer l'activité du cadmium libre Cd^{2+} en solution, en utilisant l'équation de Debye-Huckel qui tient compte de la force ionique on peut remonter à la concentration du Cd^{2+} libre. Autrement dit, si les constantes de stabilité choisies d'après la littérature entre le cadmium et les trois ligands organiques d'études sont valides, alors le Cd^{2+} mesuré avec l'électrode ne devrait pas représenter plus que 0,1% du cadmium total en solution. Par ailleurs, lorsque cela était possible, nous avons calculé les constantes conditionnelles de stabilité entre le cadmium et chacun des ligands organiques (pour les détails se référer à la section 4.4.1).

D'un point de vue pratique nous avons utilisé une électrode sélective au cadmium accompagnée d'une électrode de référence. Les courbes étalons et tous les échantillons sont préparés dans les milieux MHSM1_t sans métaux ni EDTA (cf. section 3.2) aux deux pH d'études 7 et 5,5 et avec les tampons adéquats (HEPES et MES respectivement). Les deux courbes étalons pour chaque pH s'étalent dans la gamme de concentration 10^{-8} à 10^{-4} M de Cd total, le potentiel en mV étant lu via un pH-mètre. Tous les échantillons s'équilibrent durant 24 h et leur pH est ajusté de nouveau si nécessaire quelques heures avant la mesure par l'électrode sélective, avec du NaOH 1,0 M et/ou du HNO₃ 1,5 M.

Les courbes étalons obtenues pour chaque pH (cf. figure 3.4) rendent bien compte de la relation linéaire qui existe entre le potentiel en mV et la concentration de Cd^{2+} dans la gamme de concentration 10^{-6} M à 10^{-4} M à pH 7 et de $5 \cdot 10^{-6}$ M à 10^{-4} M à pH 5,5. Les pentes calculées par régression linéaire dans cette gamme de concentration (26,53 et 26,90 respectivement à pH 5,5 et 7) sont alors très proches de celle connue pour le cadmium, dite pente nertsienne de 27 mV pour des températures entre 20 et 25°C. Cependant les valeurs en deçà de 10^{-6} M ne figurent plus dans la zone de linéarité, quelque soit le pH. Ces points

nous seront tout de même utiles dans notre discussion des résultats. Il est aussi à noter que le temps pour obtenir un potentiel à l'équilibre (valeur lue stable pendant au minimum 2 min) peut varier de quelques minutes (fortes concentrations de Cd^{2+}) à plusieurs heures ($[\text{Cd}^{2+}] < 10^{-7} \text{ M}$).

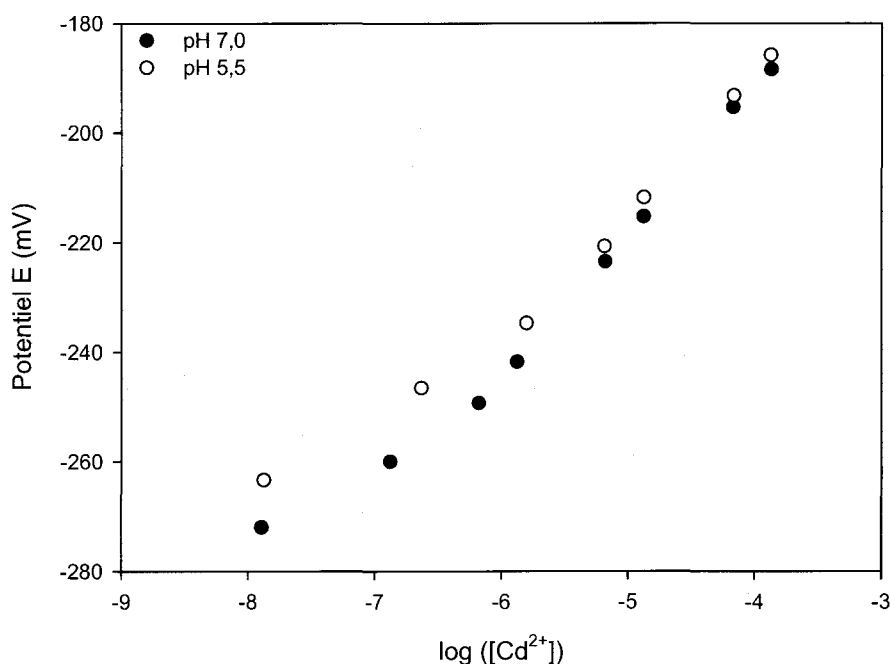


Figure 3.4 : Calibration de l'électrode sélective au Cd^{2+} aux pH 7 et 5,5 en fonction de la concentration de cadmium libre.

3.10 Détermination des coefficients de partage octanol/eau des complexes neutres

Dans le but d'avoir le plus possible de données utiles pour comprendre mais aussi modéliser les résultats de prise en charge des complexes neutres par les algues vertes, il nous est apparu important de connaître le comportement hydrophobe de ces complexes. Le paramètre le plus répandu qui traduit cette propriété est le coefficient de partage octanol/eau ou D_{ow} . Il est largement employé pour caractériser les composés organiques dans les études environnementales et en particulier pour estimer la bioaccumulation et la répartition de tels composés chez les organismes vivants (Finizio *et al.* 1997). Diverses

méthodes existent pour déterminer ce paramètre : forte agitation, faible agitation, RP-HPLC (chromatographie liquide haute performance en phase inversée) (Finizio *et al.* 1997) mais nous utiliserons celle de l'agitation ; il est aussi possible par des calculs théoriques d'obtenir une estimation du D_{ow} d'un composé. En effet, l'agitation est la méthode la plus facile à mettre en œuvre et elle est bien adaptée pour des composés ayant des valeurs de $\log D_{ow} < 6$ (Finizio *et al.* 1997), ce que nous pensons obtenir dans notre cas. L'autre méthode simple, qui demandait l'utilisation de logiciels, s'est révélée inadéquate puisque sur plus de six logiciels que l'on peut trouver en ligne (programme ALOGPS 2.1 qui compare tous les logiciels disponibles en ligne, adresse Internet :

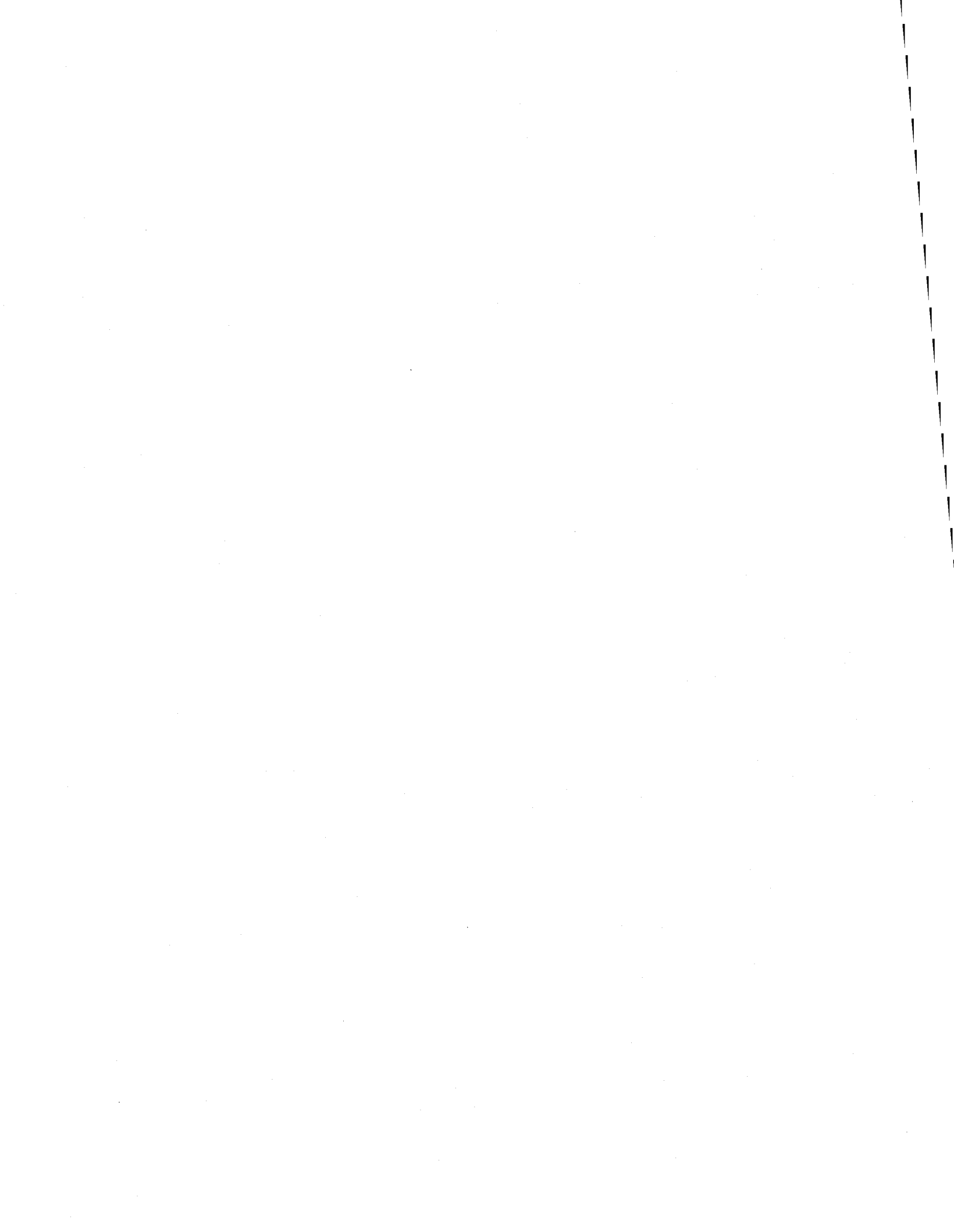
<http://146.107.217.178/lab/alogsps/start.html>), il n'était pas possible d'obtenir les mêmes tendances avec tous les programmes. Il est fort possible que ces logiciels ne soient pas conçus pour prédire des D_{ow} de complexes métaux-composés organiques.

D'un point de vue pratique, nous préparons des triplicatas de 100 mL chacun dans des bouteilles en Téflon, avec la solution MSHM1_t et le tampon du pH désiré (7 ou bien 5,5). Les solutions contiennent du $[Cd] = 38,0 \text{ nM}$ avec du $[DDC] = 10^{-4} \text{ M}$, du $[Ox] = 7,9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ou bien du $[XANT] = 10^{-2} \text{ M}$ avec des rapports ligands/cadmium identiques à ceux des expériences de prise en charge. Le cadmium est introduit via une solution intermédiaire radioactive de rapport isotopique proche de 0,12% et les solutions mères de ligands sont préparées dans du méthanol (pour plus de précisions, voir section 3.1). Les solutions ainsi préparées sont laissées à l'équilibre pendant 24 h.

Ensuite une aliquote de 2 mL est prise dans chacun des trois essais afin de s'assurer de la concentration réelle de cadmium juste avant la détermination du D_{ow} . Dans des contenants transparents de 50 mL sont introduits 15 mL de chacun des essais plus 5 mL de 1-octanol (grade ACS, pureté > 99,6%, Sigma, Saint-Louis, MO, USA). Les contenants sont agités durant 20 min puis laissés reposer pendant 1 h (Paschke *et al.* 2004). Après cela, 4 mL de la phase octanol ainsi que 4 mL de la phase aqueuse sont récupérés puis leur contenu en Cd est mesuré au compteur gamma. Pour le détail des calculs de radioactivité se référer à la section 3.5.

3.11 Analyses statistiques

Des analyses statistiques sont nécessaires afin de comparer les points issus de nos divers traitements (en présence ou non de SH, suivant le pH, suivant l'espèce d'algue) et de déterminer s'il existe une différence significative entre lesdits points. Pour ce faire, nous avons utilisé le logiciel GraphPad Prism version 4.00 (2003) pour Windows (GraphPad software, San Diego, CA, USA) 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) s'appliquait afin de déterminer quels étaient les points significativement différents. Autrement dit, le test NSK permet de comparer statistiquement plus de trois valeurs entre elles. Deux autres tests sont aussi utilisés le long de cette thèse : le test t non pairé de Student pour comparer deux valeurs entre elles et le test de Dunnett pour comparer au moins trois valeurs face à une valeur dite de référence.



4. Propriétés des substances humiques et des complexes neutres*

4.1 Les résultats des mesures de tension de surface

Ces mesures se justifient par le fait que les propriétés tensioactives des substances humiques sont susceptibles d'influencer la perméabilité membranaire des algues. Nous avons donc voulu étudier les effets du pH, de la force ionique et de la concentration en substances humiques sur la tension de surface de solutions aqueuses. Nous avons travaillé aux pH 7 et 5,5 pour deux forces ioniques, l'une dite forte (environ 0,05 M) et l'autre dite faible ($< 10^{-4}$ M) et enfin à des concentrations de substances humiques de 6,5, 100 et 225 mg C·L⁻¹. Même si ces deux dernières concentrations ne sont pas pertinentes d'un point de vue environnemental, il n'en demeure pas moins intéressant de travailler dans cette gamme dans un but purement chimique et théorique. En effet cela nous permettra de vérifier nos théories sur les résultats observés puisque certaines propriétés des SH ne se manifestent qu'à de fortes concentrations. Il est à noter que la température est un facteur très important dans les variations de tension de surface ; c'est pourquoi toutes nos expériences ont toutes été réalisées à la température de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ (Briant et Ténèbre 1989 ; Theander et Pugh 2001).

Les expériences menées à pH 7 (cf. figures 4.1 et 4.2) montrent clairement un effet de concentration des substances humiques ainsi qu'un effet de force ionique. La tension de

* Dans toutes les sections qui suivent, quand nous utiliserons la notation $X \pm Y$, Y fait référence à un écart-type pour un nombre d'échantillons de 3, à moins que nous précisions si cela est différent.

surface de l'eau ultra pure de notre laboratoire ($[MOD] < 0,5 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$) ajustée à pH 7 est de $71,31 \pm 0,06 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ($N = 33$) et $71,59 \pm 0,03 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ($N = 33$) à 23°C respectivement pour la faible et la forte force ionique (valeurs différentes statistiquement, $P < 0,0001$ par le test t non païré de Student) ; plus une tension de surface est en deçà de cette valeur, plus l'effet tensioactif est grand. Ainsi nos résultats confirment bien les propriétés tensioactives des acides fulviques et humiques puisque quelles que soient la force ionique et la concentration, les tensions de surface sont en dessous du seuil référence de tension de surface de l'eau.

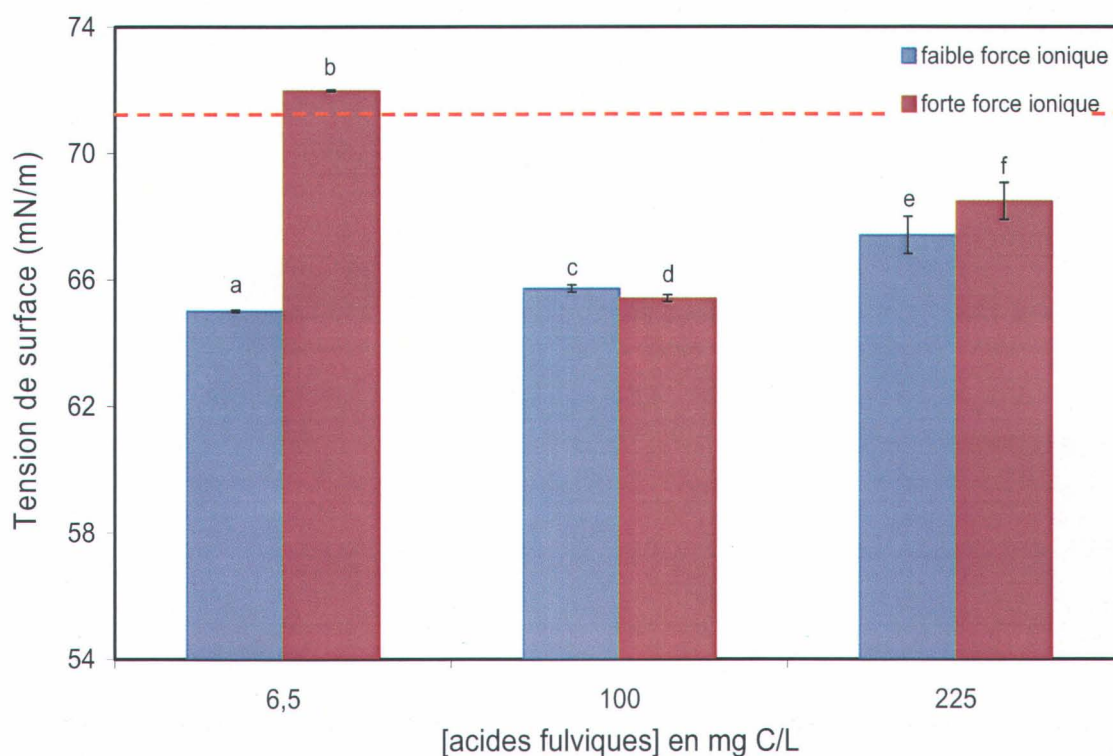


Figure 4.1: Tension de surface pour différentes concentrations des acides fulviques de la rivière Suwannee à pH 7 et à deux forces ioniques, $T = 23^\circ\text{C}$. Des lettres différentes désignent des valeurs significativement différentes ($P < 0,05$), $N = 33$; ANOVA : $P < 0,0001$ pour tous les points. La droite rouge indique la tension de surface de la solution témoin (en absence des acides humiques).

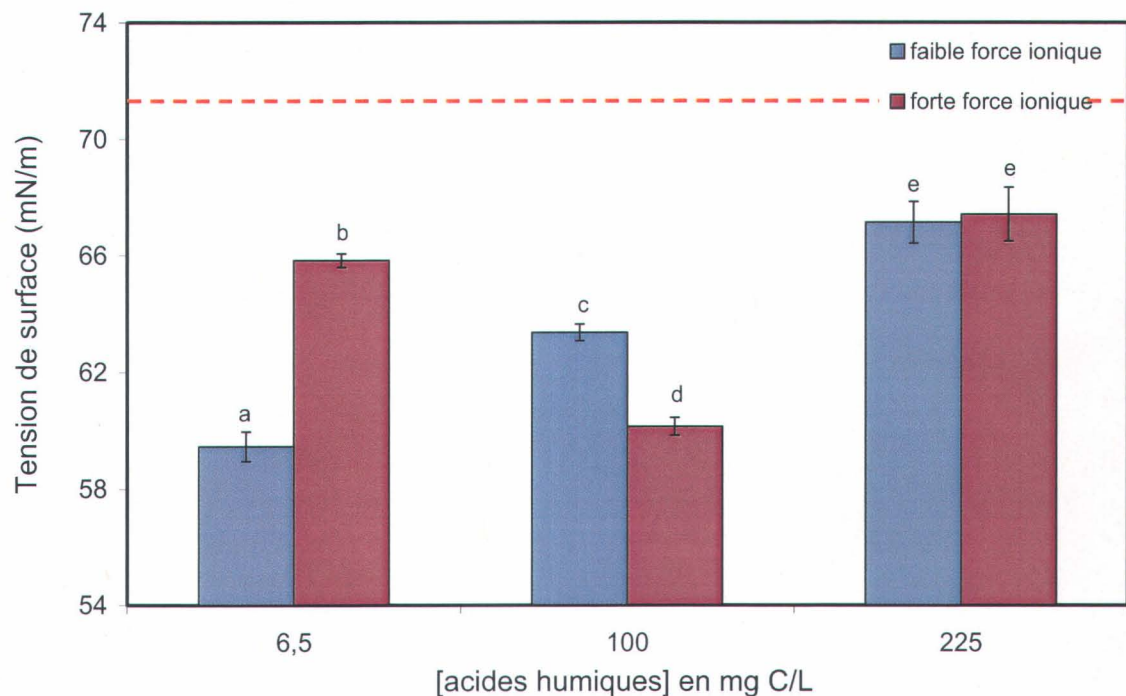










Figure 4.2 : Tension de surface pour différentes concentrations des acides humiques de la rivière Suwannee à pH 7 et à deux forces ioniques, T = 23°C. Des lettres différentes désignent des valeurs significativement différentes (P < 0,05), N = 33 ; ANOVA : P < 0,0001 pour tous les points. Les tirets rouges indiquent la tension de surface de la solution témoin (en absence des acides humiques).

D'après nos résultats, que ce soit avec les acides humiques ou fulviques, à faible force ionique, à faible concentration et à pH 7 les tensions de surface sont les plus basses, autrement dit l'effet surfactant est au maximum. En revanche à la plus forte concentration en SH les tensions de surface sont les plus fortes pour les acides humiques et parmi les plus fortes pour les acides fulviques (autrement dit l'effet tensioactif est faible). Ce résultat semble confirmer les observations de deux études (Ghosh et Schnitzer 1980 ; Chen et Schnitzer 1989), qui ont montré que les substances humiques étaient complètement dispersées à faible concentration, à faible force ionique et à pH neutre ou élevé, mais que dans les mêmes conditions à de concentrations élevées elles pouvaient s'agglomérer. En

effet pour une même concentration, plus un composé est dispersé plus il a un pouvoir tensioactif et inversement s'il s'associe à lui-même, par exemple en prenant une forme sphérique. Cela s'explique par le fait que la forme sphérique permet de minimiser la surface de la molécule donc l'énergie de liaison et par suite la tension de surface augmente (Briant et Ténèbre 1989). Précisons que ce raisonnement s'applique en référence au modèle des SH comme polyélectrolytes (Swift 1999) mais il resterait aussi valable dans le modèle d'association supramoléculaire. En effet dans ce dernier, aux $\text{pH} > 7$ les molécules de SH sont dissociées et donc de nombreuses molécules de SH peuvent participer à la baisse de la tension de surface de la solution alors qu'aux $\text{pH} < 7$ ces molécules associées ne le peuvent que beaucoup moins.

A l'examen de la figure 4.1 on note que l'influence de la force ionique sur la tension de surface n'est importante qu'à la concentration la plus faible en acides fulviques ($6,5 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$). On peut donc penser que pour l'effet sur la tension de surface, la présence des acides fulviques prévaut sur la force ionique quand la concentration en SH est supérieure à un certain seuil. En revanche, à faible concentration en substances humiques et à forte force ionique, l'influence des SH sur le pouvoir tensioactif de la solution est grandement diminuée eu égard aux valeurs à faible force ionique. Selon Ghosh et Schnitzer (1980), une force ionique élevée favorise par des effets de sels («salting out effect») les interactions inter- et intra- moléculaires et donc la formation de micelles (cf. tableau 4.1), ce qui aurait pour effet de diminuer le pouvoir tensioactif des substances humiques. Quant aux acides humiques de la figure 4.2, les mêmes observations peuvent se faire aux concentrations $6,5$ et $225 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$: la force ionique influe sur la tension de surface à faible concentration des SH mais il n'y a pas de grandes différences à forte concentration quelle que soit la force ionique. Par contre les résultats à $100 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$ pour les acides humiques à forte force ionique ne confirment pas les dernières observations – ce résultat s'est avéré reproductible et demeure inexpliqué pour le moment.

Tableau 4.1 : Modèle des acides humiques comme polyélectrolytes en fonction du pH et de la force ionique. Les dessins représentent la forme (en pelote ou dispersée) des AH. Adapté de Ghosh et Schnitzer (1980).

AH				
[AH]	Force ionique		pH	
	faible	forte	neutre	basique
faible				
forte				

Notons que les résultats obtenus pour les acides humiques et fulviques à la concentration $6,5 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$ (concentration que l'on peut retrouver dans la nature pour les acides fulviques et la matière organique naturelle) sont probablement ceux qui sont les plus pertinents sur le plan environnemental. Il sera intéressant de tenter de relier ces résultats avec ceux de prise en charge des complexes neutres $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ par les algues vertes (cf. section 6).

Si nous synthétisons les résultats des trois fractions de substances humiques aux deux pH étudiés, mais cette fois-ci en exprimant la tension de surface par une tension différentielle γ (tension de surface du blanc moins celle de l'échantillon pour les mêmes conditions de pH et de force ionique), d'autres idées majeures apparaissent. En effet si nous calculons la tension de surface différentielle :

$$\gamma = \gamma(\text{blanc pH}_j) - \gamma_i(\text{pH}_j) \quad \text{où } i \text{ est un échantillon de substances humiques, } j = 7 \text{ ou } 5,5.$$

nous obtenons alors un effet très clair de pH (figure 4.3). Notons que des valeurs positives indiquent que la présence des substances humiques provoque une baisse de la tension superficielle de la matrice aqueuse tandis que l'inverse suggère une absence d'effet voire une augmentation de la tension superficielle de la matrice. Nous constatons ainsi, en dehors de toute considération de force ionique et de type de substances humiques, que la présence d'une des trois fractions de SH à pH 7 provoque un effet tensioactif plus élevé qu'à pH 5,5. Autrement dit, il semble que les substances humiques se comportent comme des agents tensioactifs à pH 7 mais que cette propriété s'estompe à pH 5,5. Il apparaît tout de même des différences liées au type de fraction de substances humiques. Par exemple, il est très clair que la MON, que ce soit à pH 7 ou 5,5, ne fait quasiment pas varier le pouvoir tensioactif de la solution. Cela démontre encore à quel point la MON reste à être caractérisée pour expliquer de telles divergences dans les comportements par rapport à ceux des acides fulviques et humiques (Ritchie et Perdue 2003). En revanche, dans des conditions environnementales réalistes telles qu'entourées à la figure 4.3 (faible force ionique et faible concentration de substances humiques), les seuls systèmes à influencer de façon très importante la tensioactivité de la matrice aqueuse sont ceux pour un pH neutre (7) et en présence des acides humiques ou fulviques.

Ces résultats confirment la littérature dans laquelle on observe la même évolution, à la baisse, du pouvoir tensioactif des substances humiques en fonction du pH (Rauen *et al.* 2002). En outre ces résultats coïncideraient avec les changements de conformation rapportés pour les substances humiques avec le pH. Ainsi, par exemple, selon Chen et Schnitzer (1976) les acides humiques ont tendance à s'agglomérer quand le pH diminue et au contraire ils deviennent filamenteux aux pH élevés. Dès lors une conformation linéaire des substances humiques (pH neutre) induirait un pouvoir tensioactif sur la matrice aqueuse plus élevé que pour la conformation «en pelote» des SH (pH plus faibles). Par ailleurs, des études de tension de surface sur des bitumes (Brûlé *et al.* 2001), des solutions d'oléate de sodium (Theander et Pugh 2001) et des membranes bilipidiques synthétiques (Petelska et Figaszewski 2002) ont explicitement démontré des effets du pH sur la tension de surface.

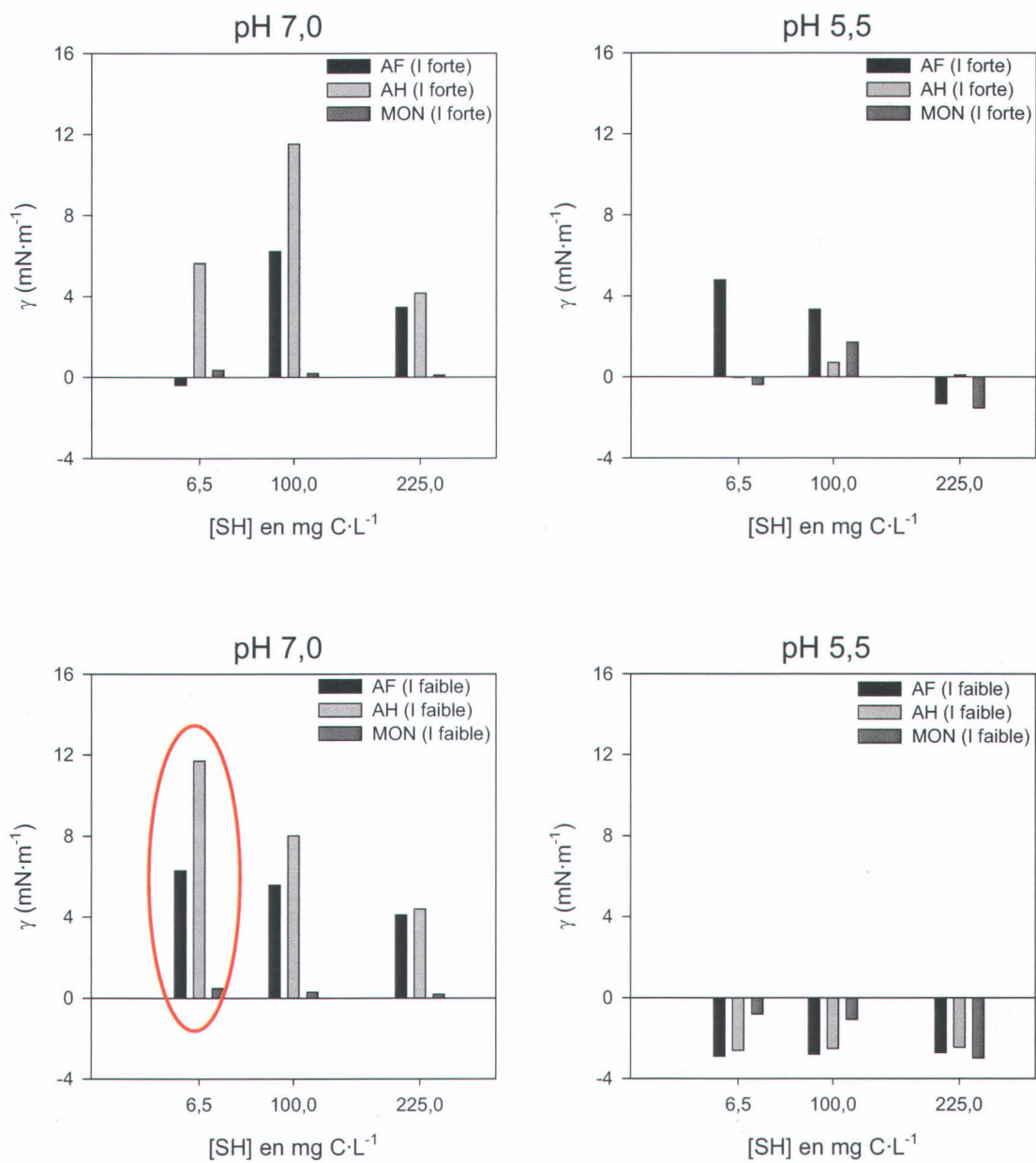


Figure 4.3 : Tension de surface différentielle des substances aux pH 7 et 5,5. La droite $y = 0$ représente une absence d'effet tensioactif.

Il est à noter que lors des expériences à la plus forte concentration en acides humiques (225 mg C·L⁻¹) à pH 7, nous avons observé un effet de diminution de la tension de surface dans le temps, ce phénomène étant beaucoup moins marqué pour une même concentration en

acides fulviques. Ceci est illustré avec la figure 4.4. Dans ce cas, la tension de surface était arbitrairement choisie comme la valeur de l'ordonnée à l'origine issue de la régression linéaire 1 comme illustrée à la figure 4.4.

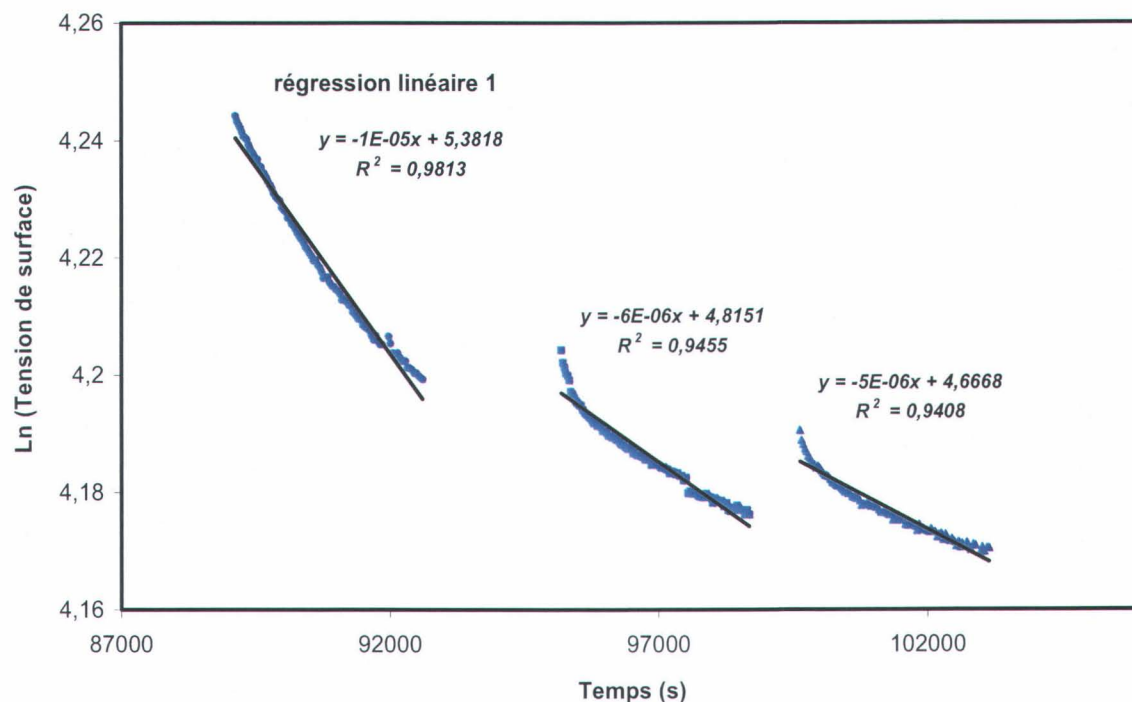


Figure 4.4 : Évolution dans le temps de la tension de surface d'un même échantillon des acides humiques de la rivière Suwannee à pH 7, mesuré à des temps différents, pour une forte force ionique et à 23 °C, [AH] = 225 mg C·L⁻¹.

Ce phénomène a aussi été observé par Brûlé *et al.* (2001) qui ont travaillé sur différents bitumes dissous dans du toluène (phase organique) et introduits dans une phase aqueuse (acide chlorhydrique dilué dans de l'eau distillée). Ils expliquent la dérive dans le temps par le fait que l'anneau de platine utilisé dans la méthode de Du Nouy en mode «pull» devient hydrophobe par adsorption. Il se forme alors un ménisque de bitume stable en solution lorsque l'anneau est dans la phase aqueuse. Sachant que les acides humiques ont plutôt un caractère hydrophobe nous pourrions adapter cette idée à nos observations. Les auteurs suggèrent pour éviter une telle dérive dans le temps d'utiliser la méthode de l'anneau dite «push». Dans ce cas l'anneau est poussé dans la phase aqueuse contenant le composé étudié

et non plus tiré vers la surface de cette phase aqueuse. Malheureusement les auteurs n'ont pas testé leur proposition.

4.2 Constantes de stabilité conditionnelles pour la formation de complexes entre le cadmium et les acides humiques

Dans le but de bien estimer la spéciation du cadmium en présence de ligands organiques mais aussi de substances humiques, il nous apparaît pertinent, dans un premier temps, de quantifier l'association entre le cadmium et les SH. Puisque nous faisons cette expérience par dialyse (cf. section 3.7) nous n'étudions que les acides humiques, les acides fulviques pouvant diffuser à travers la membrane du sac à dialyse.

Le calcul des constantes conditionnelles de stabilité entre le Cd et les AH se fait suivant l'équation 4.1 :

$$(4.1) \quad K_{cond} = \frac{[Cd - AH]}{[Cd_{inorganique}] \cdot [AH]}$$

avec $[AH] = 6,5 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$, $[Cd_{inorganique}] = [Cd]_T = 0,38 \text{ nM}$ à l'extérieur du sac à dialyse et $[Cd - AH] = [Cd]_T$ à l'intérieur du sac à dialyse moins $[Cd]_T$ à l'extérieur du sac à dialyse. Ceci se justifie car nous supposons que le cadmium dans le sac à dialyse est la résultante du Cd lié aux AH et du Cd inorganique, tandis que le cadmium à l'extérieur du sac à dialyse, comme il n'y a pas de perte d'AH de l'intérieur vers l'extérieur du sac à dialyse, représente le Cd inorganique. Ainsi à l'équilibre, les concentrations de Cd inorganique à l'intérieur et à l'extérieur du sac à dialyse sont les mêmes. Précisons que nous parlons bien de Cd inorganique puisque nous n'avons pas mesuré le Cd^{2+} libre. Les simulations MINEQL+ donnant 97,7% du Cd total sous forme Cd^{2+} libre en absence de tout ligand, par la suite nous parlerons donc de Cd^{2+} au lieu de Cd inorganique.

Si nous prenons un poids moléculaire M_w moyen de 3400 Da ($[AH] = 3,8 \text{ } \mu\text{M}$) pour les acides humiques de la rivière Suwannee (issu des valeurs compilées par Perdue et Ritchie, 2004 page 291) alors nous obtenons les valeurs suivantes de constantes de complexation

conditionnelle entre le cadmium et les acides humiques de la rivière Suwannee calculées selon l'équation 4.1 :

- pH 7 et force ionique = 1 mM : $\log K (\text{Cd-AH}) = 5,93 \pm 0,01$ (N = 3, écart-type)
- pH 5,5 et force ionique = 1 mM : $\log K (\text{Cd-AH}) = 5,59 \pm 0,01$ (N = 3, écart-type)

La légère augmentation du pouvoir de complexation entre le Cd et les AH avec une augmentation de pH pourrait être reliée au fait que les AH sont plus ionisés à pH plus élevé, autorisant donc une plus forte complexation avec Cd^{2+} . Cela a déjà été rapporté dans la littérature (Campbell et Tessier 1987).

Ainsi pour une concentration de $6,5 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$ des acides humiques (concentration plus grande que celles normalement retrouvées dans les eaux naturelles mais il s'agit de pouvoir se comparer avec les tests avec les AF et la MON dans le reste de la thèse ; pour ces derniers, cette concentration est environnementalement réaliste (Thurman 1985)) et pour une concentration constante de cadmium de $0,38 \text{ nM}$ nous obtenons : environ 38% et 57% du cadmium sous forme de Cd^{2+} à pH 7 et 5,5 respectivement. Les simulations avec le logiciel de spéciation WHAM6 (Windermere Humic Aqueous Model, Tipping 1994) sont en accord avec les tendances observées dans nos expériences de dialyse (figure 4.5) pour le système AH-Cd à pH 5,5 (5,4% Cd^{2+}) et à pH 7 (0,4% Cd^{2+}). Les expériences de dialyse n'ont pas été réalisées avec les AF et la MON à cause de possibles pertes à travers les sacs à dialyse. Les simulations avec WHAM6 prédisent des concentrations de Cd^{2+} plus grandes dans le système AF-Cd qu'en présence des AH : 1,2% et 8,3% à pH 7 et 5,5 respectivement. Néanmoins, en ce qui concerne les valeurs brutes de la complexation Cd-AH déterminées par dialyse face aux prédictions du logiciel WHAM6, il est évident que les valeurs de cadmium libre mesurées sont beaucoup plus fortes que les valeurs prédites par WHAM6.

Le dosage des éléments métalliques présents dans les substances humiques par ICP-AES révèle que les AF, les AH et la MON contiennent des concentrations non négligeables de métaux (cf. tableau 4.2). Ainsi, si nous rapportons ces dosages à une concentration de $6,5 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$ en substances humiques, le fer et l'aluminium apparaissent comme des

éléments majeurs susceptibles de se complexer avec les substances humiques avant le cadmium. Si nous intégrons les concentrations de ces éléments métalliques dans WHAM6, les résultats se rapprochent davantage de ceux de la dialyse entre les AH et le Cd : 6,4% et 26,6% de cadmium libre aux pH 7 et 5,5 respectivement. Par ailleurs, notons que WHAM6 prédit dans le cas des AF-Cd 3,2% et 14,5% de cadmium libre toujours aux pH 7 et 5,5 respectivement lorsque les concentrations du fer et de l'aluminium sont entrées dans le modèle. Si la plus grande complexation du Cd par les AF que par les AH, telle que prédite par WHAM6, est contre intuitive, cela provient du fait que les AF contiennent moins de métaux que les AH, ce qui implique qu'il existe moins de compétition avec le Cd pour se lier aux substances humiques (tableau 4.2). Vigneault et Campbell (2005) avaient déjà noté une telle surestimation de WHAM6 concernant la complexation du Cd avec les acides humiques de la rivière Suwannee par rapport à leurs résultats obtenus avec une résine échangeuse d'ions. Par ailleurs, l'écart entre WHAM6 et leurs valeurs était beaucoup plus grand à pH 7 qu'à pH 5, ce qui se confirme avec notre étude puisque les résultats de WHAM6 sont plus proches de ceux de la dialyse à pH 5,5 (facteur 2 de différence) qu'à pH 7 (facteur 6) en tenant compte du contenu en métaux (cf. figure 4.5).

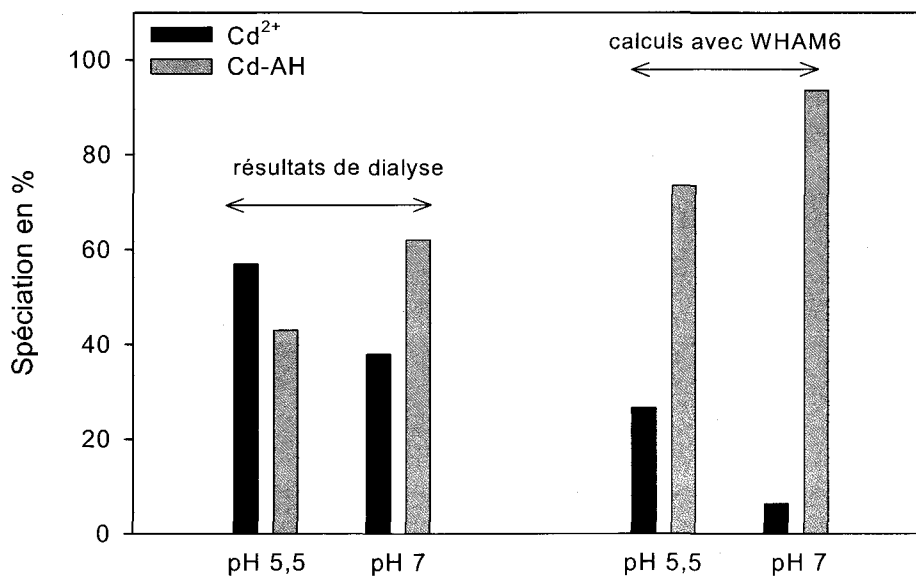


Figure 4.5 : Complexation du Cd avec les AH de la rivière Suwannee à pH 7 et 5,5 comparée avec les résultats obtenus avec le logiciel WHAM6 en tenant compte du contenu en métaux des AH.

Tableau 4.2 : Concentrations des principaux métaux en nM dans les substances humiques de la rivière Suwannee (6,5 mg C·L⁻¹) dosés par ICP-AES. LD signifie limite de détection.

en nM	AF	AH	MON
[Al]	34	160	600
[Ca]	22	140	180
[Cu]	0,70	6,4	1,1
[Fe]	20	300	600
[K]	86	280	1 mM
[Mg]	11	38	76
[Mn]	0,60	0,71	1,6
[Na]	700	0,4 mM	1 mM
[Ni]	< 0,1	1,5	2,4
[Zn]	2,1	35	21

Les valeurs calculées par WHAM6 en tenant compte des concentrations en métaux des SH restent tout de même encore éloignées de celles de la dialyse. Il est possible que les propriétés des AH intégrées dans le logiciel surestiment cette complexation (rayon, nombre de sites participant aux interactions métaux-SH, les pK_a des AH et des AF, etc.).

4.3 Les résultats des expériences d'équilibre Cd(L)₂⁰ avec les substances humiques

Comme en section 4.2, il est important de bien connaître la répartition des espèces chimiques présentes dans les milieux d'exposition lors des mesures de la prise en charge des complexes neutres par les algues vertes. Le fait qu'un complexe de type hydrophobe Cd(L)₂⁰ (remarquons que la dialyse ne discrimine pas entre les complexes neutres et chargés qui s'associeraient aux AH) soit en présence de substances humiques, avec leurs propriétés plus ou moins hydrophobes, peut amener à penser qu'une association entre ces

deux solutés est probable (Powell et Town 1991 ; Haitzer *et al.* 1998), menant à une diminution du complexe neutre «libre». Afin de déterminer jusqu'à quel point les substances humiques lient les complexes neutres étudiés, nous réalisons des expériences de dialyse à pH 7 et 5,5 avec les acides humiques provenant de la rivière Suwannee. Ces expériences visent à établir un équilibre entre le milieu intérieur d'un sac à dialyse, contenant les complexes Cd(L)_2^0 et les AH (les sacs à dialyse ayant une porosité de porosité 500 Da, les AH ne peuvent diffuser vers l'extérieur du sac), et le milieu extérieur ne contenant que les complexes Cd(L)_2^0 .

Encore une fois, nous n'étudions que les AH pour éviter des pertes en SH du milieu intérieur vers le milieu extérieur du sac à dialyse. En outre les AH étant connus pour être plus hydrophobes que les AF, nous pouvons donc nous attendre à davantage d'interactions avec les complexes neutres que dans le cas des AF (Stevenson 1994), à condition que nous n'ayons pas affaire à des complexes ternaires (association entre trois entités moléculaires différentes, l'une centrale de charge opposée aux deux autres, permettant des interactions électrostatiques). Dans ce dernier cas les AF, contenant plus de groupements ionisables, offriraient plus de possibilités pour réaliser de tels complexes ternaires AF-Cd-L_n (cf. section 5.6).

Nous avons utilisé les résultats des expériences de dialyse au bout de 120 h, temps pour lequel l'équilibre est atteint (cf. figure 4.6). A ce moment-là il est possible d'écrire :

$$(4.2) \quad [\text{Cd(L)}_2^0]_{\text{intérieur libre}} = [\text{Cd(L)}_2^0]_{\text{extérieur libre}}$$

$$(4.3) \quad [\text{Cd-Total}]_{\text{intérieur}} = [\text{Cd(L)}_2^0]_{\text{intérieur libre}} + [\text{Cd-L-AH}]_{\text{intérieur}}$$

$$(4.4) \quad \text{Donc : } [\text{Cd-L-AH}]_{\text{intérieur}} = [\text{Cd-Total}]_{\text{intérieur}} - [\text{Cd(L)}_2^0]_{\text{extérieur libre}}$$

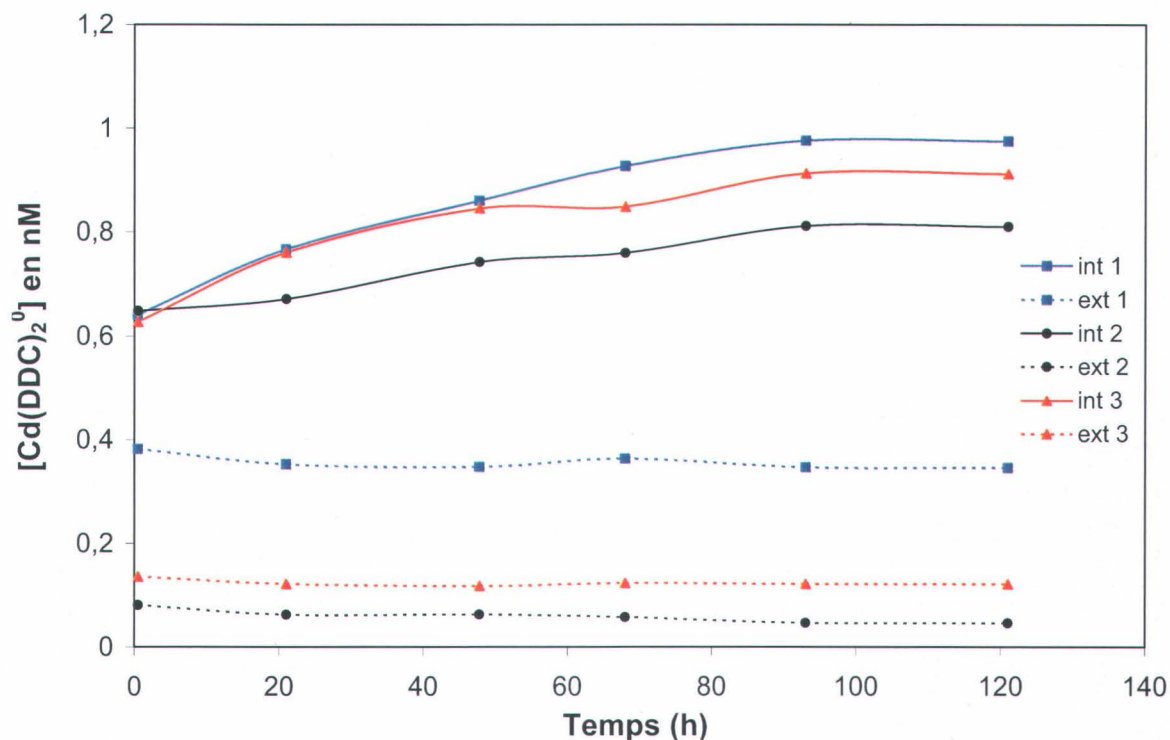


Figure 4.6 : Exemple de l'atteinte de l'équilibre pour l'expérience de dialyse entre le Cd-DDC-AH à pH 7 avec tampon. [DDC] = 1,0 μ M, [AH] = 6,5 mg C·L⁻¹. [Cd]_{Total} = 0,39 nM (essai 1) ; 0,14 nM (essai 2) et 0,09 nM (essai 3). Chaque point représente une mesure prise dans les systèmes de dialyse 1, 2 ou 3.

Nous avons aussi testé, mais uniquement pour le complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$, l'effet de la présence ou non de tampon pH sur l'association $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0 + \text{AH}$ (figure 4.7). Sur cette dernière, en absence ou en présence de tampon HEPES pour le pH 7, presque tout le complexe qui se trouve à l'intérieur des sacs à dialyse est lié aux acides humiques sans qu'aucune différence significative n'apparaisse (test t non pairé de Student, $P > 0,05$).

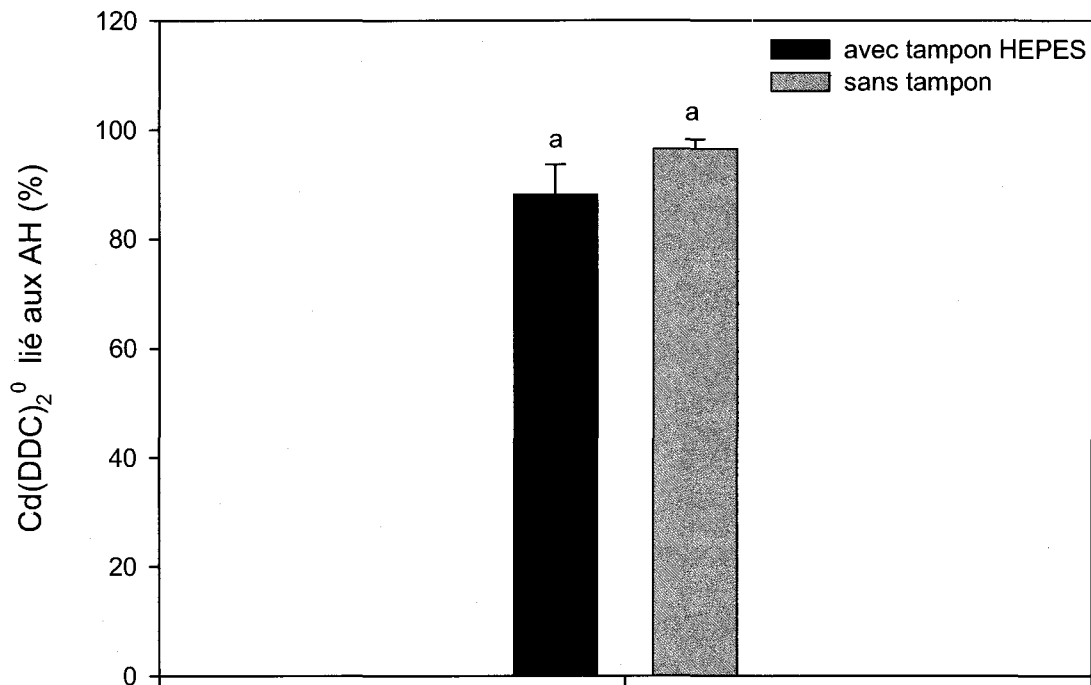


Figure 4.7 : Association du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ avec les AH de la rivière Suwannee à pH 7 en présence ou non de tampon pH HEPES.

Précisons que dans notre méthode nous mesurons du Cd radioactif (à l'intérieur et à l'extérieur du sac à dialyse) et non directement le complexe $\text{Cd}(\text{L})_2^0$. Nous supposons que le Cd mesuré à l'intérieur du sac à dialyse (donc lié aux AH) est en réalité du Cd sous forme $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ associé aux AH. En effet les simulations avec WHAM6 confirment qu'en présence de cadmium, des ligands organiques et des AH, l'équilibre $\text{Cd} + 2\text{L} \leftrightarrow \text{Cd}(\text{L})_2^0$ n'est pas déplacé en faveur de la réaction $\text{Cd} + \text{AH} \leftrightarrow \text{Cd-AH}$ (cf. section 4.6.4).

Le fait que les acides humiques de la rivière Suwannee «attirent» le complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ ou comme le suggèrent Florence *et al.* (1992), que les AH et le Cd forment un complexe ternaire AH-Cd-DDC, amène à penser que les substances humiques pourraient diminuer la biodisponibilité de complexes métalliques neutres (ML_n^0), en considérant que le complexe SH-ML_n^0 ne soit pas disponible aux concentrations rencontrées ou utilisées. Dans la section 5 qui traite de la fluorescence, nous étudierons s'il s'agit réellement de complexes ternaires

qui se forme ou d'un autre type d'interactions entre les SH et les complexes Cd(L)_2^0 . Les interactions des SH avec les complexes Cd(L)_2^0 sont un point important à retenir dans l'explication de nos résultats des expériences de prise en charge des complexes neutres du cadmium en présence de substances humiques.

Si nous nous intéressons maintenant aux deux autres ligands étudiés, des différences majeures apparaissent. En effet si le complexe Cd(DDC)_2^0 associé aux AH montrait une dépendance marquée au pH, celle-ci est très faible pour le complexe Cd(Ox)_2^0 et semble inexistante pour le Cd(XANT)_2^0 . En effet, les taux d'association sont de près de 22% et 14% à pH 7 et 5,5 respectivement dans le cas Cd-Ox-AH et de 72% pour le système Cd-XANT-AH, quelque soit le pH (figure 4.8). Les systèmes Cd-(XANT ou DDC)-AH à pH 7 présentent donc une forte association que l'on pourrait relier à la réactivité du soufre (dans la liaison C-S⁻ du DDC et du XANT) avec les groupements R-O⁻ ou R-COO⁻, par exemple, des substances humiques qui mènerait alors à la formation d'un complexe ternaire AH-Cd-(DDC ou XANT).

L'effet du pH (ou son absence d'effet !) semble moins évident à expliquer. Selon Ghosh et Schnitzer (1980), à pH neutre les AH ont une conformation plutôt linéaire et ils ont tendance à s'agglomérer à mesure que le pH diminue. On aurait pu alors penser que sous forme linéaire, plus de sites d'interactions sont accessibles, autorisant plus d'association avec les complexes neutres. Cette explication s'adapte bien au cas du système Cd-DDC-AH mais pas du tout pour les deux autres systèmes. Si des interactions hydrophobes sont soupçonnées entre les AH et les complexes neutres, il se peut que le D_{ow} des complexes (coefficient global de partage octanol-eau) influence fortement ces interactions (cf. section 4.5) ou alors les interactions ne sont pas de type hydrophobe (cf. section 5.6).

Dans les trois cas étudiés ici, l'association entre le complexe Cd(L)_2^0 et les AH devrait rendre le complexe Cd(L)_2^0 moins biodisponible pour les algues vertes étant donnée la taille du système ternaire formé, 3400 Da + Cd + L₂ ; 3400 Da étant la taille moyenne des AH (Perdue et Ritchie 2004). Si le pH n'influence pas la perméabilité membranaire des algues, nous devrions donc nous attendre dans les expériences de prise en charge par les

algues à voir une diminution de la prise en charge des complexes Cd(L)_2^0 comparable au taux d'association Cd-L-AH pour chaque pH considéré, ce qui confirmerait l'hypothèse 2.

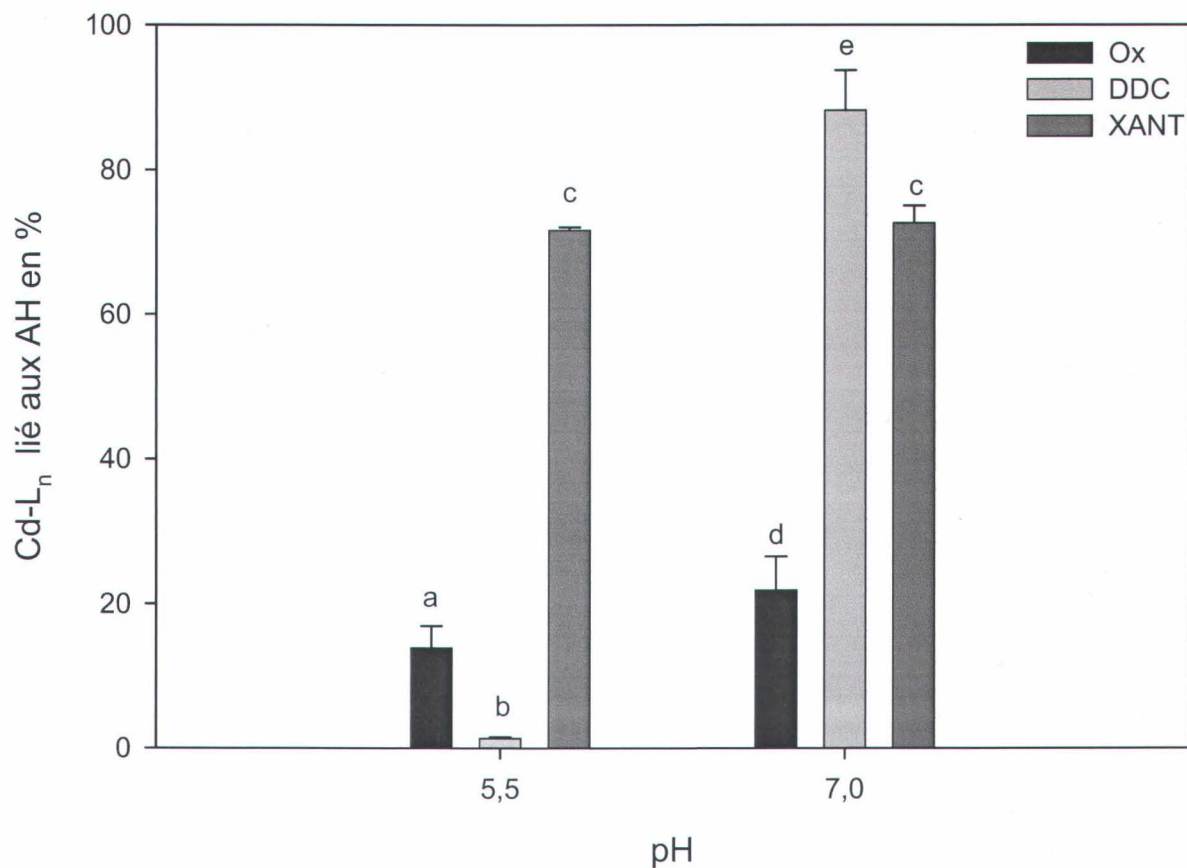


Figure 4.8 : Association des complexes neutres Cd(L)_2^0 avec les acides humiques de la rivière Suwannee aux pH 7 et 5,5. Des lettres différentes indiquent des différences significatives soit $P < 0,05$ (ANOVA à une voie avec test post-hoc NSK).

4.4 Association entre le cadmium et les différents ligands organiques

4.4.1 Approche avec l'électrode sélective au cadmium

La complexation entre le cadmium et les trois ligands organiques (DDC, Ox, XANT) est quantifiée aux pH 7 et 5,5 en utilisant l'électrode sélective au Cd^{2+} . Cette technique, comme son nom l'indique, dose le cadmium libre en solution. À la section 3.9 nous avons déjà expliqué la calibration de l'électrode qui, brièvement, donne une relation linéaire entre le potentiel lu (en mV) et la concentration de Cd^{2+} , soit pour des valeurs de $E > -249$ et -235 mV aux pH 7 et 5,5 respectivement (cf. figure 4.9).

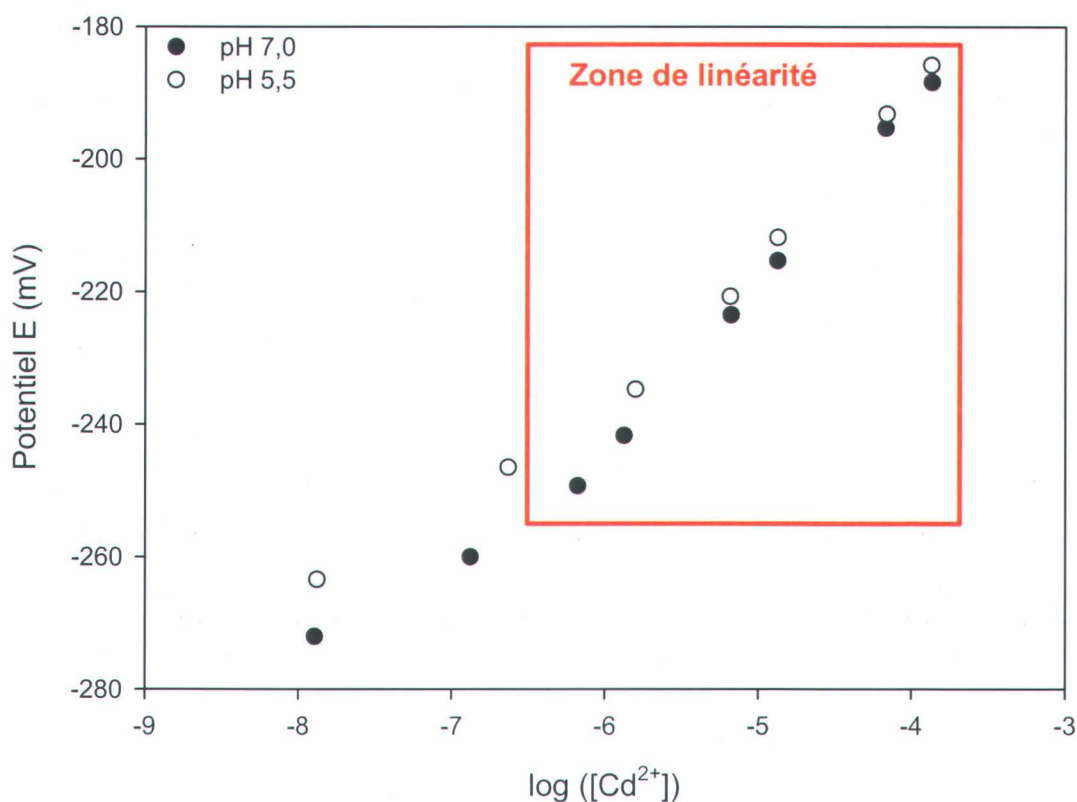


Figure 4.9 : Calibration de l'électrode sélective au Cd^{2+} et zone de linéarité correspondante aux pH 7 et 5,5.

À partir de la figure 4.9, dans les systèmes Cd-L si une lecture de potentiel est dans la zone de linéarité, alors il est possible d'en déduire la concentration en Cd^{2+} dans le milieu étudié et donc de calculer les constantes conditionnelles de complexation. Notons que les légères différences entre les courbes de calibration à pH 5,5 et 7 pourraient être dues à la présence en concentrations importantes (10^{-2} M) de deux tampons différents, MES à pH 5,5 et HEPES à pH 7.

De là, nous obtenons par différence le Cd lié au ligand par la relation $[Cd(L)_2^0] = [Cd]_{total} - [Cd^{2+}]$; les deux derniers termes étant connus (le cadmium total est la concentration de Cd que nous ajoutons, la concentration en cadmium libre provient de la lecture du potentiel E). Ensuite nous obtenons la concentration en ligand libre pour chaque concentration de Cd ajouté par : $[L] = [L]_{total} - [Cd(L)_2^0]$. Remarquons que nous pouvons ici discriminer entre le Cd lié à 1 ou 2 ligands. Ce que nous calculons est alors une constante conditionnelle de stabilité $Cd(L)_2^0$ dite β_2 :

$$(4.5) \quad \log \beta_2 = \frac{[Cd - L]}{[Cd^{2+}] \cdot [L]^2}$$

Le premier test consiste à utiliser une concentration constante de ligand organique et nous faisons varier les concentrations de cadmium total de 1,0 μ M à 0,3 mM pour obtenir des ratios ligand/métal typique de nos milieux d'exposition pour les expériences de prise en charge par les algues vertes (cf. tableau 4.3).

Tableau 4.3 : Conditions du premier test de détermination des constantes conditionnelles de stabilité entre le cadmium et les ligands organiques.

ligand organique étudié	ratio ([ligand] _{total} /[Cd] _{total}) dans les expériences de prise en charge	gamme de ratios utilisés avec l'électrode sélective au Cd ²⁺ à pH 5,5	gamme de ratios utilisés avec l'électrode sélective au Cd ²⁺ à pH 7
DDC	3 000	9 à 3 000	9 à 3 000
Oxine	208 000	1 à 300	23 à 8 000
XANT	263 000	9 à 3 000	10 à 3 000

Les figures 4.10 et 4.11 montrent les potentiels mesurés respectivement à pH 5,5 et 7 pour différents ratios, $R = [\text{ligand}]_{\text{total}}/[\text{cadmium}]_{\text{total}}$ (cf. tableau 4.3). Il apparaît clairement deux effets : 1) les potentiels n'excèdent jamais -250 mV quel que soit le pH, ce qui est donc en dehors de la zone de linéarité comme indiqué sur la figure 4.9 ; 2) un seuil semble apparaître le long de l'augmentation de R, seuil en deçà duquel le potentiel diminue fortement pour de faibles augmentation de R et au-delà duquel le potentiel demeure stable (excepté pour le système Cd-XANT à pH 5,5). Tout ceci mène à dire que pour des R grands le potentiel est stable et très faible suggérant des concentrations en cadmium libre à leur tour très faibles. Cependant, d'un point de vue quantitatif, si nous sommes en dehors de la zone de linéarité, il n'est pas justifié de calculer de constantes conditionnelles de stabilité.

Un des systèmes étudiés, Cd+Ox à pH 5,5, fut difficile à étudier en raison de précipitation rapide dans le milieu d'exposition. Puisque nous n'avons pas pu travailler pour des R grands et le fait que la détection du cadmium libre n'est pas fiable (temps d'équilibre trop court ?), nous avons réalisé un autre type d'expérience, par polarographie (cf. section 4.4.2).

Il faut aussi noter que le pH semble peu modifier la capacité de complexation de deux ligands organiques (DDC et XANT) vis-à-vis du cadmium puisque les valeurs de potentiel demeurent comparables entre les deux pH. Par ailleurs, eu égard aux figures 4.10 et 4.11, l'ordre de complexation entre les ligands et le cadmium s'établit comme suit : DDC > Ox > XANT à pH 7 et DDC > XANT > Ox à pH 5,5. Comme nous l'avons dit ci-dessus, puisque nous ne pouvons pas extraire les constantes conditionnelles de stabilité, nous avons réalisé un second test.

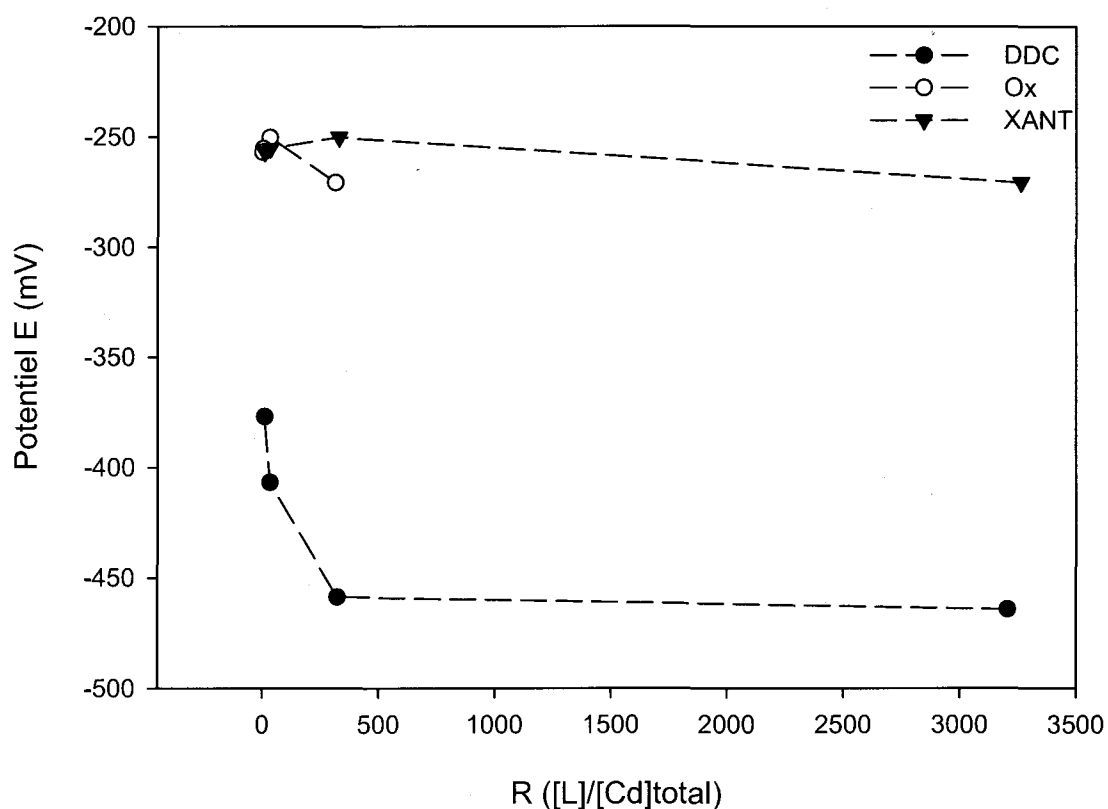


Figure 4.10 : Potentiels mesurés à l'électrode sélective au Cd^{2+} en fonction du ratio ligand/cadmium total à pH 5,5. La concentration de ligand est constante (3,2 mM de DDC ; 3,1 mM d'Ox et 3,2 mM de XANT) et celle en cadmium varie entre 1,0 μM et 340 mM.

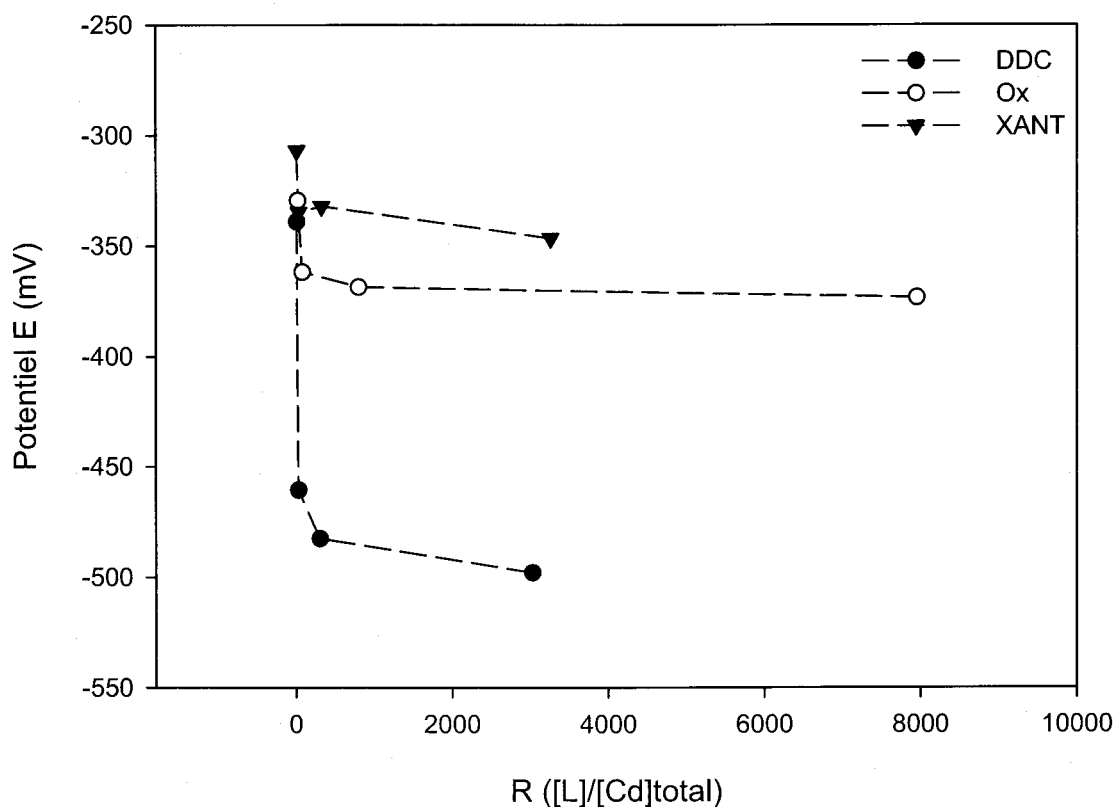


Figure 4.11 : Potentiels mesurés à l'électrode sélective au Cd^{2+} en fonction du ratio ligand/cadmium total à pH 7. La concentration de ligand est constante (3,0 mM de DDC ; 7,9 mM d'Ox et 3,2 mM de XANT) et celle en cadmium varie entre 1,0 μM et 340 mM.

Ce second test avait pour but de mesurer des potentiels liés à des concentrations de cadmium libre se trouvant dans la zone de linéarité, cela nous permettant de calculer les constantes conditionnelles de stabilité. Pour ce faire, nous avons cette fois-ci fixé la concentration de cadmium total à près de 10,0 μM et nous faisons varier la concentration de ligand ajouté (de 40,0 nM à 0,1 mM). Cependant si les potentiels E se situaient la plupart du temps dans la zone de linéarité, les calculs permettant d'obtenir la constante conditionnelle de stabilité K se sont avérés impossibles. En effet, les concentrations de ligands libres calculées (avec l'hypothèse que le complexe est de 2 ligands pour

l cadmium) ne sont pas fiables (valeurs négatives) du fait que nous nous trouvons dans la zone pour laquelle l'ajout de ligand n'entraîne pas de diminution significative du cadmium libre (calculé avec les courbes de calibration). De plus, à partir d'un certain point du titrage, l'ajout supplémentaire de ligand provoque une diminution drastique du potentiel lu qui alors se trouve en dehors de la zone de linéarité, aucun calcul n'étant alors possible comme nous l'avons dit plus haut.

L'échec des deux tests afin d'extraire les constantes conditionnelles de stabilité pour le cadmium avec les trois ligands est explicité à la figure 4.12. Cette figure est une simulation d'un dosage du DDC (3,14 mM) par le cadmium en considérant une constante de stabilité fictive (mais proche de ce que l'on retrouve dans la littérature) $\log \beta_2 (\text{Cd-DDC}) = 16,0$.

Dans la partie I le potentiel E correspondant à la concentration de Cd^{2+} est trop bas pour être dans la zone de linéarité ; c'est le problème auquel nous avons fait face dans le premier test. Dans la partie III le potentiel E est bien dans la zone de linéarité mais le DDC libre calculé est trop faible et se trouve dans la zone d'erreur des nombres ; cela correspond à notre deuxième test. Dans la partie II il devrait donc être possible de déterminer les constantes conditionnelles de stabilité. Néanmoins il est clair que dans cette zone le moindre ajout de Cd entraîne des changements brutaux de potentiel E rendant délicat les manipulations et les calculs subséquents.

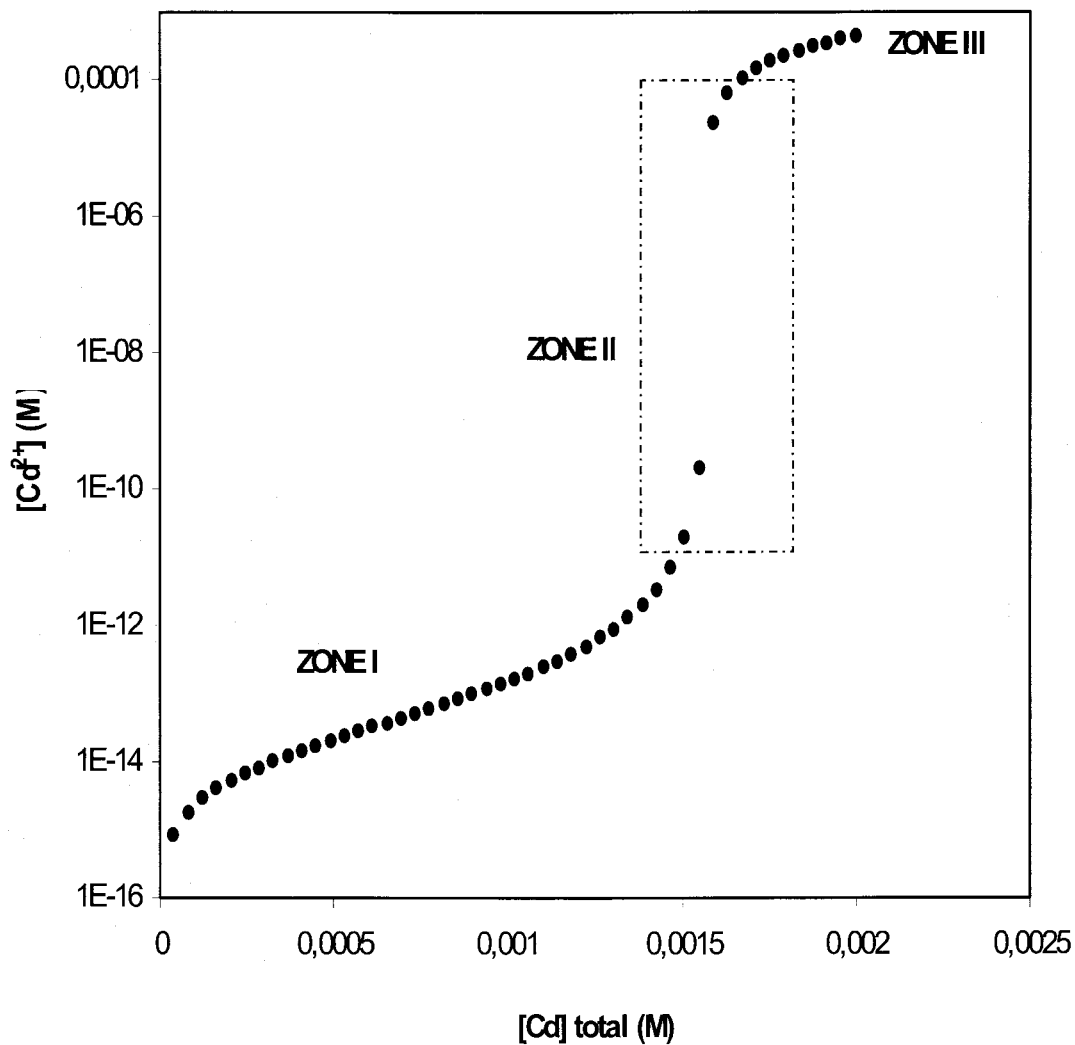


Figure 4.12 : Titration fictif du DDC 3,14 mM par le cadmium et indication du cadmium libre obtenu en considérant $\log \beta_2 (\text{Cd-DDC}) = 16,0$.

Afin de pouvoir établir la spéciation du cadmium dans nos systèmes, il est nécessaire d'avoir des constantes de complexation. Ces dernières sont introduites dans les logiciels de spéciation utilisés en absence de substances humiques, MINEQL+ v4.5 (Schecher 2001) ou bien en présence de substances humiques, WHAM6 (Lofts et Tipping 2001). Dans cette section, nous avons démontré que l'électrode sélective au Cd^{2+} ne permet pas de calculer les constantes de stabilité du cadmium avec le DDC, l'Ox et le XANT. Pour obtenir ces

constantes de complexation, nous avons utilisé une alternative à l'électrode sélective, certes moins satisfaisante, qui permet de déduire de telles constantes. C'est ce que nous développons à la section 4.4.3.

4.4.2 Polarographie afin d'évaluer l'association Cd-Ox à pH 5,5

Pour être certain de bien évaluer la proportion de Cd libre dans le système Cd-Ox à pH 5,5 nous testons la polarographie et plus précisément la «Square Wave Anodic Stripping Voltammetry» (SWASV). Cette méthode a été utilisée avec succès pour doser le Cd²⁺ dans des milieux de culture avec le même tampon MES à pH 5,5 que nous (Ceretti *et al.* 2006) et aussi pour doser le Cd²⁺ en présence d'oxine (Arancibia *et al.* 2004).

Du point de vue expérimental, nous préparons tous nos échantillons dans des cellules de 10 mL avec MHSM1_t à pH 5,5 (cf. section 3.4). Pour la courbe de calibrage les ajouts de cadmium se font directement dans la cellule (nous tenons compte de la dilution) à partir de solutions stocks de cadmium à 1,6 µM – 8,7 µM ou bien 8,7 mM (étalon ICP). La solution dans la cellule de 10 mL est désoxygénée par un bullage de N₂(g) puis la technique implique une goutte de mercure dite «pendante». Cette goutte de mercure est changée à chaque nouvelle mesure.

La préconcentration sur la goutte de mercure se fait au potentiel de -700 mV ou bien -1300 mV face à une électrode de référence au KCl saturé, le tout pendant 10 sec. Ce temps peut paraître court mais Ceretti *et al.* (2006) utilisent aussi des temps de déposition courts entre 15 et 120 sec et dans notre cas, la préconcentration était suffisante pour les mesures. Ensuite le balayage s'effectue des deux mêmes potentiels de préconcentration vers -100 mV dans les deux cas. La fréquence utilisée est de 50 Hz. La courbe de calibration est réalisée entre 44 nM et 345 nM de cadmium libre. Dans les échantillons propres au système Cd-Ox à pH 5,5, nous introduisons une concentration en oxine de 61 µM et nous titrons le tout avec du Cd de 0 à 4,8 µM.

Le choix des potentiels de départ (-700 ou -1300 mV) provient de ce que nous désirons mesurer. Ainsi un potentiel très réducteur (-1300 mV) est suffisamment négatif pour

déstabiliser et réduire les complexes $\text{Cd}(\text{Ox})_n$. Dans ce cas, nous observons et mesurons les pics de l'oxine et du cadmium total. Si au contraire le potentiel de départ est moins réducteur (-700 mV), les complexes $\text{Cd}(\text{Ox})_n$ ne sont pas réduits et nous ne mesurons que le cadmium labile inorganique, ce qui est notre objectif.

Le titrage de la solution d'Ox par le Cd permet la mesure du Cd labile. Afin d'atteindre la concentration en Cd^{2+} libre et inorganique, nous avons introduit dans MINEQL+ les valeurs de Cd labile et calculé le Cd^{2+} pour un milieu MHSM1_t à pH 5,5 (cf. figure 4.13). Pour toute la gamme de concentrations où nous obtenons de Cd labile, 97,7% du Cd total est présent sous forme de Cd^{2+} libre. Cela permet donc de calculer la concentration de Cd qui est complexée à l'oxine (CdOx^+ et CdOx_2) en retranchant simplement la concentration de cadmium libre à celle de Cd total.

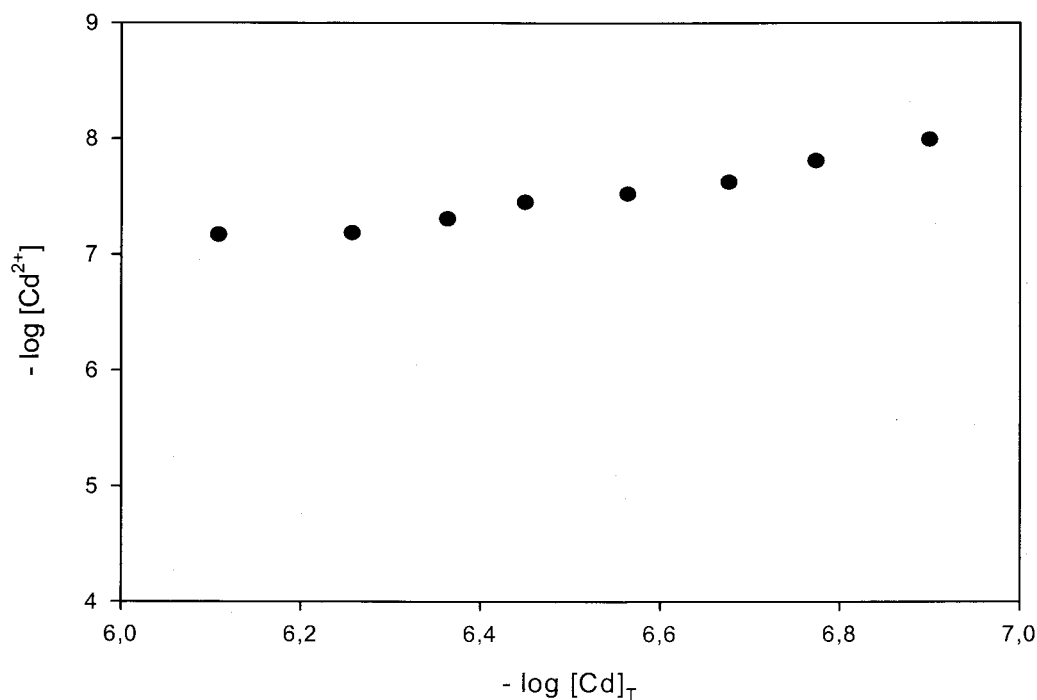


Figure 4.13 : Concentration du cadmium libre calculée d'après le Cd labile (aire sous la courbe) et MINEQL+ en fonction du cadmium total, dans MHSM1_t à pH 5,5 en présence d'oxine à 61 μM , déterminée par SWASV.

Afin d'extraire une constante thermodynamique de stabilité entre le cadmium et l'oxine, nous avons utilisé le logiciel Grfit (Ludwig 1992). Il apparaît clairement que le problème s'explique uniquement par la constante K_1 du système Cd-Ox. En effet le problème converge uniquement en introduisant l'équation reliée à K_1 (4.2) et non en introduisant les relations (4.3) et (4.4) que nous présentons ci-après :



Ainsi, avec Grfit nous obtenons $\log K_1 = 9,58 \pm 0,02$ ($r^2 = 0,98$) pour une force ionique nulle et $\text{pH} = 5,5$. Notons que le fait que le problème s'explique par K_1 seulement, confirme des simulations préliminaires avec MINEQL+. Dans ce logiciel, nous avons introduit les constantes choisies à la section 4.4.3.3 (cf. plus bas) et les résultats indiquent bien qu'à $\text{pH} 5,5$ il n'y pas de présence significative du complexe Cd(Ox)_2^0 . Ce dernier point a d'ailleurs permis de faciliter l'interprétation des pics obtenus dans cette étude polarographique (cf. figure 4.14).

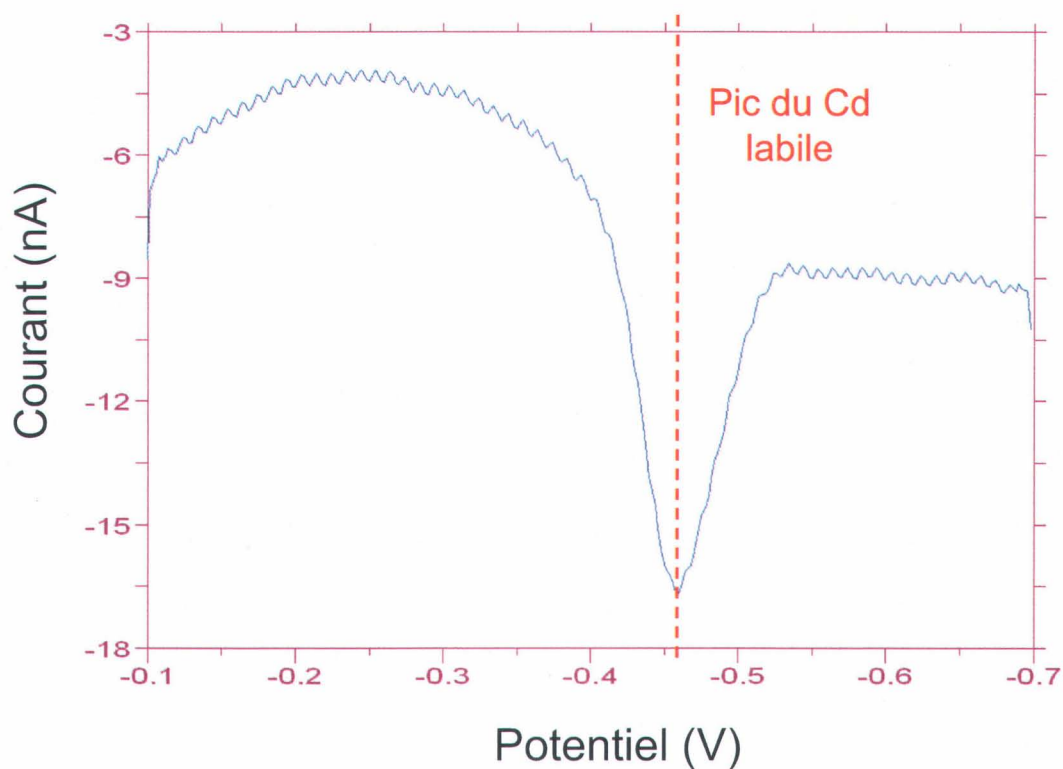


Figure 4.14 : Polarogramme du système Cd+Ox à pH 5,5, [Ox] = 61 μ M et [Cd]_T = 0,6 μ M. Ceci a été réalisé avec le logiciel BAS100W v2 (Bioanalytical Systems Inc., IN, USA).

4.4.3 Approche indirecte d'estimation des constantes de stabilité Cd(L)₂⁰

Cette approche pose l'hypothèse que les constantes conditionnelles d'un métal avec des ligands sont linéairement proportionnelles à celles d'un autre métal avec les mêmes ligands (Tipping 1994). Une fois une régression linéaire optimisée pour les données, il suffit d'appliquer l'équation de régression pour la constante d'un métal avec un ligand donné pour obtenir ainsi la constante pour l'autre métal avec ce même ligand. Cette méthode est intéressante quand on ne connaît pas la constante d'association entre un métal et un ligand mais que celle-ci est connue pour un autre métal. Bien sûr cela permet aussi d'obtenir une constante de complexation pour un système métal-ligand dans le cas où l'expérimentation ne permet pas de l'extraire, ce qui est notre cas ici.

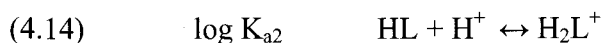
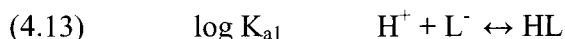
La terminologie concernant les constantes de stabilité fait référence aux équations suivantes.



$$(4.12) \quad \log \beta_2 = \log K_1 + \log K_2$$

Pour réaliser les graphiques nous avons employé les données issues de la banque de données IUPAC (Pettit et Powell 2001) et MINEQL+ pour des ligands aussi bien inorganiques qu'organiques. Les formes des métaux sélectionnés dans la base de données sont «libres» (non associés à des protons ou à des hydroxyles) et les constantes sont rapportées à une force ionique nulle et à une température de 25°C. Par ailleurs pour chaque ligand nous introduisons leur(s) constante(s) d'acidité, pK_a car celle-ci est importante pour bien estimer la spéciation.

La notion de pK_a se définit comme suit :



$$(4.16) \quad \log \beta_{a2} = \log K_{a1} + \log K_{a2}$$

4.4.3.1 Cas du DDC

Comme constante d'acidité nous avons choisi $\text{pK}_a = 3,38$ puisque nous retrouvons cette valeur déterminée en milieu aqueux dans deux études (Scharfe *et al.* 1973 ; Hayashi *et al.* 1986). Nous avons mis sous forme graphique les constantes de stabilité thermodynamique $\log K_1$ (N = 25) et $\log \beta_2$ (N = 17) pour le plomb face au cadmium (figure 4.15). Les résultats des régressions linéaires sont établis avec le logiciel SigmaPlot 8.0 ; notons que nous parlons ici d'erreur-type sur nos résultats obtenue statistiquement et par la propagation des erreurs, à moins d'avis contraire.

$$(4.17) \quad \log K_1 (\text{Cd}) = (1,08 \pm 0,06) \cdot \log K_1 (\text{Pb}) - (1,07 \pm 0,51) \quad R^2 = 0,937$$

$$(4.18) \quad \log \beta_2 (\text{Cd}) = (1,07 \pm 0,06) \cdot \log \beta_2 (\text{Pb}) - (1,26 \pm 0,52) \quad R^2 = 0,949$$

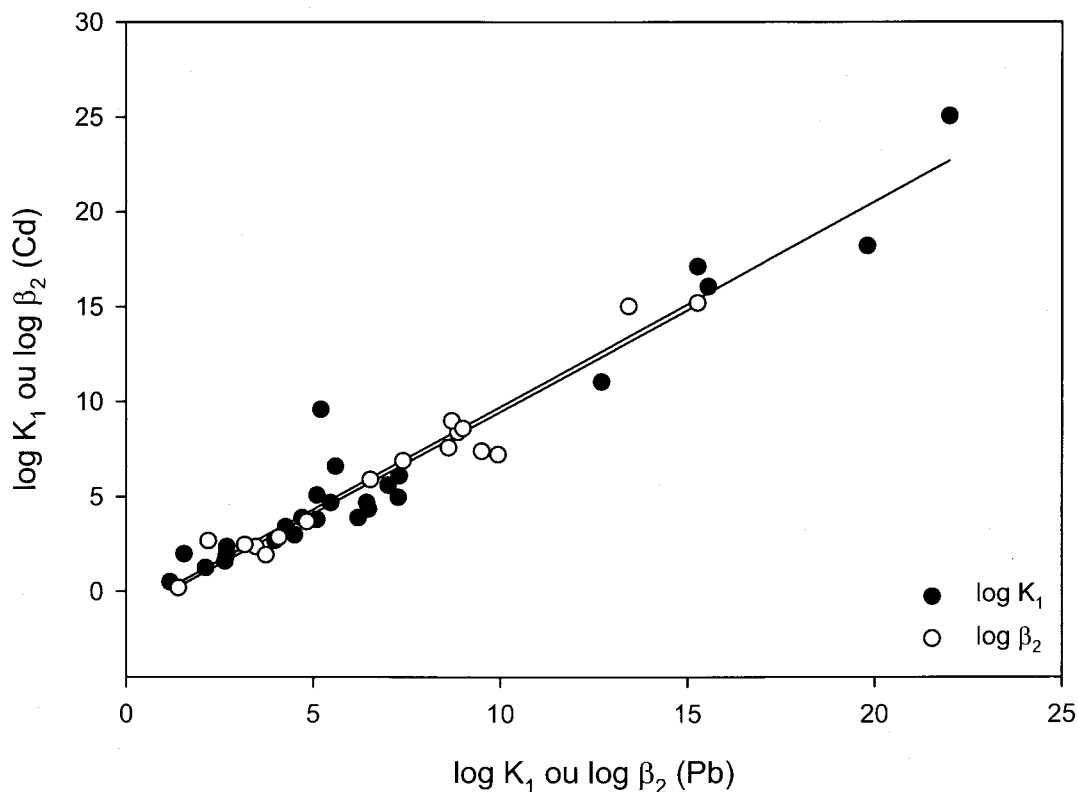


Figure 4.15 : Relation $\log K_1$ ou β_2 (Pb) face à $\log K_1$ ou β_2 (Cd) pour divers ligands à force ionique nulle et pour $T = 298^\circ\text{K}$.

Pour nos critères de sélection (milieu aqueux), la banque de constantes IUPAC donne deux constantes $\log \beta_2$ pour le complexe $\text{Pb}(\text{DDC})_2^0$, la moyenne est de $18,45 \pm 0,12$. Si on introduit cette valeur dans l'équation 4.18 alors nous obtenons $\log \beta_2 (\text{Cd}(\text{DDC})_2^0) = 18,54 \pm 1,10$; nous fixons $\log \beta_2 (\text{Cd}(\text{DDC})_2^0) = 17,44$ qui est le cas le plus défavorable ($17,44 = 18,54 - 1,10$; le dernier terme étant l'erreur-type). Cependant il n'y a pas de valeur de K_1 disponible en milieux aqueux. Si nous regardons les travaux de Labuda *et al.* (1984), effectués dans les solvants méthanol et diméthylsulfoxyde, les constantes de stabilité K_1 des systèmes Cd-DDC et Pb-DDC sont presque identiques soit $\log K_1 = 8,3$. Si nous demeurons

conservateurs à propos des constantes de complexation, nous pouvons dès lors fixer $\log K_1$ (Cd-DDC) = 8,0.

A titre d'information, la littérature fournit des constantes de stabilité $\log \beta_2$ entre le Cd et le DDC très variables à savoir de 12,5 à 29 (N = 3) selon les méthodes employées et les milieux étudiés (Pettit et Powell 2001) !

4.4.3.2 Cas du XANT

Encore une fois nous utilisons la relation entre le plomb et le cadmium. Néanmoins les données sont très rares et nous avons choisi finalement de travailler avec un dérivé du XANT : le butyl-éthyl-xanthate. Ce ligand comporte une chaîne alkyle ayant deux carbones de plus que le XANT. La base de données IUPAC donne une constante $\log \beta_2 = 13,29$; une fois incorporée dans l'équation 4.18 de la section 4.4.3.1 nous obtenons alors $\log \beta_2$ (Cd-ButylXANT) = $13,00 \pm 0,81$.

Si nous décidons d'être conservateur et de nous placer dans des conditions défavorables quant à la complexation du Cd avec le XANT, alors nous pouvons réduire d'un ordre de grandeur pour chaque groupement carbone de plus que le XANT. Cela donne alors $\log \beta_2$ (Cd(XANT)₂⁰) = 11,00. Par ailleurs, selon Block (1991), nous savons que la famille des xanthates ferait partie des rares ligands avec un comportement tel que $\beta_2 = K_1^2$. Dans ce cas, le $\log K_1$ (Cd-XANT) serait de 5,5.

Concernant la constante d'acidité, une seule étude de Hayashi *et al.* (1984) donne $pK_a = 2,20$ mais elle a été conduite dans un milieu 1:1 v/v H₂O/DMF (N,N-diméthylformamide). Nous utiliserons faute de mieux cette donnée.

4.4.3.3 Cas de l'Ox

Ici nous avons préféré mettre sous forme graphique les constantes de stabilité thermodynamique $\log K_1$ (N = 33) et $\log \beta_2$ (N = 23) pour le cuivre face au cadmium (figure 4.16) puisque les constantes pour le système Cu-Ox sont plus nombreuses. Nous obtenons alors les relations linéaires suivantes :

$$(4.19) \quad \log K_1 (\text{Cd}) = (0,69 \pm 0,05) \cdot \log K_1 (\text{Cu}) + (0,04 \pm 0,54) \quad R^2 = 0,851$$

$$(4.20) \quad \log \beta_2 (\text{Cd}) = (0,52 \pm 0,04) \cdot \log \beta_2 (\text{Cu}) + (0,79 \pm 0,54) \quad R^2 = 0,888$$

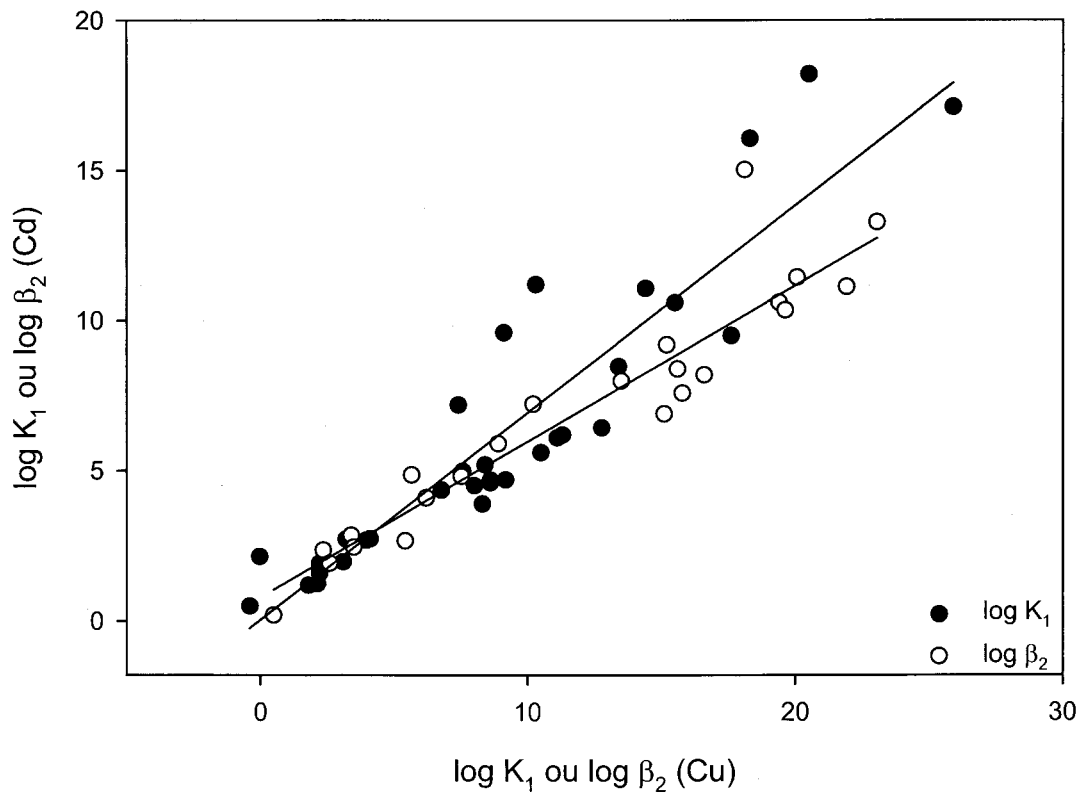


Figure 4.16 : Relation $\log K_1$ ou β_2 (Cu) face à $\log K_1$ ou β_2 (Cd) pour divers ligands à force ionique nulle et pour $T = 298^\circ\text{K}$.

Des équations 4.19 et 4.20 nous extrayons les constantes pour le système Cd-Ox en utilisant les moyennes de 7 constantes (pour K_1 et β_2) du système Cu-Ox (valeurs issues de IUPAC). Donc on obtient :

$$\log K_1 = 8,78 \pm 0,88$$

$$\log \beta_2 = 13,13 \pm 1,15$$

De ces deux dernières valeurs nous n'utilisons que β_2 ; K_1 sera issu de l'expérience de polarographie qui nous a fourni une constante thermodynamique soit $\log K_1 = 9,58 \pm 0,02$ (cf. section 4.4.2). Remarquons que cette dernière valeur déterminée par polarographie se trouve quand même dans la gamme du $\log K_1 = 8,78 \pm 0,88$ déterminée par la méthode indirecte, soit $8,78 + 0,88 = 9,66$.

Des valeurs de pK_a issues de la base de données IUPAC 2001 sont disponibles pour l'oxine. Seules les données pour lesquelles on pouvait corriger la force ionique ont été utilisées. Les pK_a de l'Ox sont importants car ils influencent fortement la spéciation du Cd. On obtient alors pour $I = 0 \text{ M}$ et $T = 25^\circ\text{C}$ ($N = 9$) :

$$pK_{a1} = 9,63 \pm 0,44$$

$$p\beta_{a2} = 14,52 \pm 0,83 \quad (p\beta_{a2} = pK_{a1} + pK_{a2})$$

Cela signifie qu'à pH 7 le ligand est à plus de 99,9% sous la forme neutre HOx et à pH 5,5 il se répartit entre 78% pour HOx et 22% H_2Ox^+ comme cela est indiqué à la figure 4.17.

À titre informatif, les constantes de stabilité trouvées dans la littérature pour le système Cd-Ox sont assez disparates pour $\log K_1$: 7,8 ; 8,22 ; 9,4 et 10,7 ; mais aussi pour $\log \beta_2$: 11,6 ; 15,22 ; 17,1 et 20,22 (Whealy et Bland 1962 ; Quentel *et al.* 1978 ; Pettit et Powell 2001 ; Arancibia *et al.* 2004).

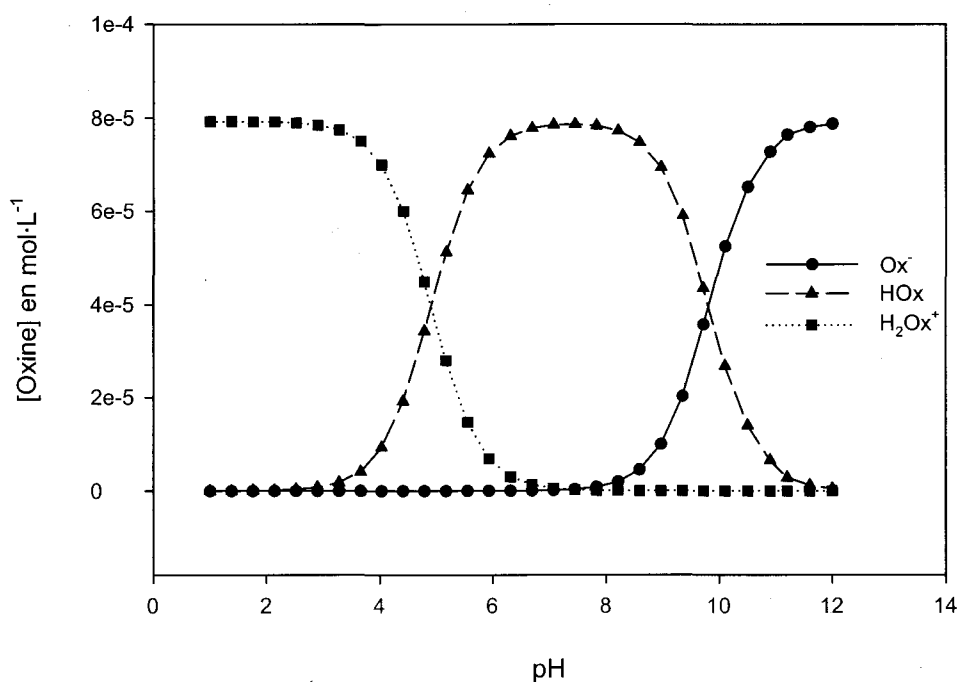


Figure 4.17 : Spéciation de l'oxine en fonction du pH pour une concentration totale en oxine de 79 μM dans un milieu MSHM1_t.

4.4.4 Spéciation du cadmium en présence ou non des acides humiques

Dans cette section nous effectuons les calculs de spéciation permettant d'identifier les concentrations nécessaires en ligands organiques pour que la présence de Cd libre soit négligeable, soit inférieur à 0,1%, mais aussi avec une concentration du Cd sous forme neutre Cd(L)_2^0 importante, soit supérieure à 95% (cf. section 2 objectifs du doctorat).

Pour les calculs de spéciation en présence ou non de substances humiques, nous utilisons les constantes issues des résultats des sections précédentes (tableau 4.4) et la spéciation est compilée dans le tableau 4.5. Les calculs en absence des AH ou des AF se font avec le logiciel MINEQL+ v4.5 (Schecher 2001) tandis qu'en présence des AH ou des AF nous utilisons WHAM6 (Lofts et Tipping 2001) en tenant compte en plus de leurs concentrations intrinsèques en métaux (cf. section 4.2). Nous avons donc dû modifier les bases de données de MINEQL+ et WHAM6 pour intégrer nos ligands organiques, les constantes d'acidité qui leurs sont reliées et les constantes de stabilité avec le Cd.

Les simulations MINEQL+ et WHAM6 confirment bien notre hypothèse que dans la plupart des cas le Cd^{2+} libre est en quantité négligeable aux deux pH dans les systèmes Cd(L)_2^0 en absence des acides humiques de la rivière Suwannee. La présence des acides humiques ou fulviques n'entraîne pas de modifications notables de la spéciation pour les systèmes Cd(L)_2^0 où L = DDC et XANT.

Dans le cas de l'Ox et aux deux pH, les calculs indiquent que la majorité du Cd est présent sous forme CdOx^+ tandis que le complexe neutre n'est pas présent de façon significative. De plus une partie non négligeable de l'équilibre du Cd est déplacée à la faveur du complexe Cd-AH ou Cd-AF en présence des l'une de ces fractions (tableau 4.5).

Concernant le système Cd-Ox, l'absence du complexe neutre compromet son intégration aux objectifs du doctorat. Cependant, un grand intérêt s'est révélé a posteriori pour ce système, avec l'étude des résultats de prise en charge, puisque le complexe CdOx^+ est pris en charge contre toute attente même si le Cd^{2+} libre inorganique n'est pas significativement présent. Une discussion à ce sujet sera présentée à la section 6.8 (présence de Cd(Ox)_2^0 ?).

Pour la suite, nous parlerons des formes $\text{Cd}(\text{Ox})_n$ tant que nous n'aurons pas de certitude quant à la spéciation du Cd en présence d'Ox.

Tableau 4.4 : Récapitulatif des constantes thermodynamiques utilisées pour calculer la spéciation du Cd ; pK_{a1} et $\text{p}\beta_{a2}$ sont les constantes d'acidité de chaque ligand ; $\log K_1$ et $\log \beta_2$ sont les constantes de complexation entre le Cd et chaque ligand. Toutes ces réactions (avec leurs constantes respectives) ont été ajoutées aux logiciels MINEQL+ et WHAM6.

	DDC	XANT	Ox
pK_{a1}	3,38	2,20	9,63
$\text{p}\beta_{a2}$	non applicable	non applicable	14,52
$\log K_1$	8,0	5,5	9,58
$\log \beta_2$	17,44	11,0	13,13

Tableau 4.5 : Spéciation calculée du Cd en présence des ligands DDC, Ox ou bien XANT ainsi qu'en présence ou non des AH de la rivière Suwannee, pour les pH 7 et 5,5. Si la spéciation du Cd en présence des AF est différente à celle en présence des AH, elle est indiquée entre parenthèses en italique.

<i>En absence d'acides humiques (AH)</i>				
		Cd+DDC	Cd+Ox	Cd+XANT
pH 7	Cd ²⁺	< 0,1%	0,3%	< 0,1%
	CdL ⁺	< 0,1%	99,7%	3,5%
	Cd(L) ₂ ⁰	99,9%	< 0,1%	96,5%
pH 5,5	Cd ²⁺	< 0,1%	6,4%	< 0,1%
	CdL ⁺	< 0,1%	93,5%	3,5%
	Cd(L) ₂ ⁰	99,9%	< 0,1%	96,5%
<i>En présence des AH ou des AF</i>				
pH 7	Cd ²⁺	< 0,1%	0,2%	< 0,1%
	CdL ⁺	< 0,1%	97,8% (96,6%)	3,4%
	Cd(L) ₂ ⁰	99,9%	0,1%	94,7%
	Cd-AH ou AF	< 0,1%	1,9% (3%)	1,4%
pH 5,5	Cd ²⁺	< 0,1%	6,0% (5,7%)	< 0,1%
	CdL ⁺	< 0,1%	84,5% (79,7%)	3,5%
	Cd(L) ₂ ⁰	99,9%	< 0,1%	96,5%
	Cd-AH ou AF	< 0,1%	9,5% (15%)	< 0,1%

4.5 Détermination des coefficients globaux de partage octanol-eau (D_{ow})

Ce paramètre traduit le partage d'un composé entre une phase aqueuse et une phase octanol. Notons tout de suite que nous parlons bien de D_{ow} et non de K_{ow} car le premier traduit un coefficient de partage octanol-eau global, autrement dit pour toutes les espèces hydrophobes en solution, tandis que le deuxième ne s'applique que pour un seul composé (Turner et Williamson 2005). Dans ce dernier cas, il n'est pas évident dans notre type de matrice d'affirmer sans ambiguïté qu'un seul composé participe au passage de la phase aqueuse vers celle hydrophobe (l'octanol). Le D_{ow} est par ailleurs censé représenter la propension d'un composé à pénétrer les membranes biologiques (Vaes *et al.* 1998) puisque l'octanol possède une permittivité électrique proche de celle des membranes bilipidiques (Turner et Mawji 2004).

Le cadmium inorganique seul montre des propriétés hydrophobes extrêmement faibles mais avec quand même un effet de pH important (facteur 10 de moins entre pH 7 et 5,5). Le contraste avec les complexes neutres est évident : à pH 7 ces complexes sont beaucoup plus hydrophobes que le cadmium inorganique. A pH 5,5 l'effet est moins flagrant dans le cas du $Cd(DDC)_2^0$ puisque le facteur d'augmentation du pouvoir hydrophobe du Cd induit par la présence du DDC n'est plus que de 10 fois ; nous reviendrons sur ce point plus bas. En revanche pour les deux autres complexes, ce facteur demeure encore très élevé : $4 \cdot 10^3$ et $1 \cdot 10^5$ respectivement pour le $Cd(Ox)_n$ et le $Cd(XANT)_2^0$ face au Cd^{2+} (cf. tableau 4.6).

Quoiqu'il en soit, les résultats des D_{ow} obtenus indiquent que les complexes neutres d'intérêt, dans ce projet doctoral, sont moyennement hydrophobes ($\log D_{ow} < 6$) à pH 7. À l'opposé, une diminution de pH entraîne une chute drastique de l'hydrophobicité apparente du $Cd(DDC)_2^0$, une baisse importante pour le $Cd(Ox)_n$ mais moindre que le précédent et enfin le complexe $Cd(XANT)_2^0$ ne montre pas d'effet significatif du pH sur ses propriétés hydrophobes (cf. tableau 4.6).

Tableau 4.6 : Moyenne (m) et écart-type (sd) du D_{ow} pour chaque complexe neutre.

D_{ow}	Cd^{2+}		$Cd(DDC)_2^0$		$CdOx^+$		$Cd(XANT)_2^0$	
	m	sd	m	sd	m	sd	m	sd
pH 7	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	270	28	66	5	56	1
pH 5,5	$5 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-5}$	* ($5 \cdot 10^{-3}$)	$1 \cdot 10^{-3}$	2,0	0,1	60	4

*** indique que le lecteur doit prendre cette valeur avec précaution, il s'agit d'un D_{ow} apparent, les valeurs pour le complexe $Cd(DDC)_2^0$ au tableau 4.7 sont plus adaptées.**

Le changement d'hydrophobicité apparente pour le complexe $Cd(DDC)_2^0$ entre pH 7 et 5,5 apparaît si brutal que nous nous sommes demandés si le complexe n'était pas dégradé à pH acide. Pour tester cette hypothèse nous avons laissé une solution de $Cd(DDC)_2^0$ à l'équilibre 24 h à pH 7 puis ajusté le pH à 5,5 et laissé encore une fois à l'équilibre 24 h avant finalement de réajuster le pH à 7 et de laisser reposer la solution 24 h. Après ces manipulations nous avons effectué l'extraction à l'octanol. Le résultat obtenu ($D_{ow} = 260 \pm 20$) est comparable à celui à pH 7 ce qui signifie qu'il n'y a pas eu de dégradation significative du complexe neutre à pH 5,5. Ainsi il se produit un phénomène chimique qui change radicalement les propriétés hydrophobes du $Cd(DDC)_2^0$ entre les pH 7 et 5,5.

Nous avons testé alors une autre hypothèse qui tient compte du caractère hydrophobe du ligand lui-même. Ainsi, le DDC pourrait être beaucoup plus hydrophobe à pH 5,5 et donc être extrait par l'octanol. Ceci empêcherait alors le DDC de complexer le Cd et de l'entraîner en phase octanol. Pour vérifier ce point, nous avons fait des extractions octanol-eau à pH 5,5 comme précédemment mais en plus nous avons récupéré la phase aqueuse. Nous avons ajusté le pH de cette dernière de 5,5 vers 7 et effectué une nouvelle extraction octanol-eau. Les résultats montrent clairement (cf. figure 4.18) que le coefficient de partage

D_{ow} est très faible à pH 5,5 pour le système Cd-DDC, comme nous le savons déjà. Une extraction subséquente de la même phase aqueuse (le pH passant de 5,5 à 7) indique un D_{ow} encore plus faible qu'à pH 5,5. Cela signifie que le DDC est totalement extrait à pH 5,5 ; il n'en reste donc plus en phase aqueuse. Dans ce cas, une autre extraction menée à pH 7, condition la plus favorable pour extraire le Cd-DDC (D_{ow} très élevé), ne donne rien non plus. Remarquons que l'on pourrait penser que le pK_a (3,38) du DDC est plus élevé que ce que nous avons trouvé dans la littérature (cf. section 4.4.3.1). En effet, si tout le DDC passe en phase octanol, il s'agit probablement de l'espèce HDDC.

Nous avons alors mené une dernière expérience pour tenter d'obtenir un D_{ow} traduisant les réelles propriétés hydrophobes du complexe $Cd(DDC)_2^0$. Pour ce faire, nous avons effectué des extractions octanol-eau avec des concentrations en DDC plus grandes (10 et 100 fois) que lors de la première expérience. Ainsi, pour une concentration en DDC 100 fois plus grande, nous obtenons un D_{ow} comparable à celui à pH 7 (cf. tableau 4.7). Ceci signifie donc que la concentration en DDC est suffisamment élevée pour que le complexe $Cd(DDC)_2^0$ passe en phase octanol. Autrement dit, ce complexe neutre est fortement hydrophobe aux pH 5,5 et 7, ce qui est conforme à la spéciation calculée aux deux valeurs de pH (cf. section 4.4.4).

Tableau 4.7 : Valeurs du D_{ow} pour le complexe $Cd(DDC)_2^0$ à pH 5,5 pour des concentrations croissantes de DDC. $[DDC]_0 = 1 \mu M$.

pH 5,5	$[DDC]_0$	$[DDC]_0 \times 10$	$[DDC]_0 \times 100$
D_{ow}	$5 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$7,6 \pm 0,6$	481 ± 73

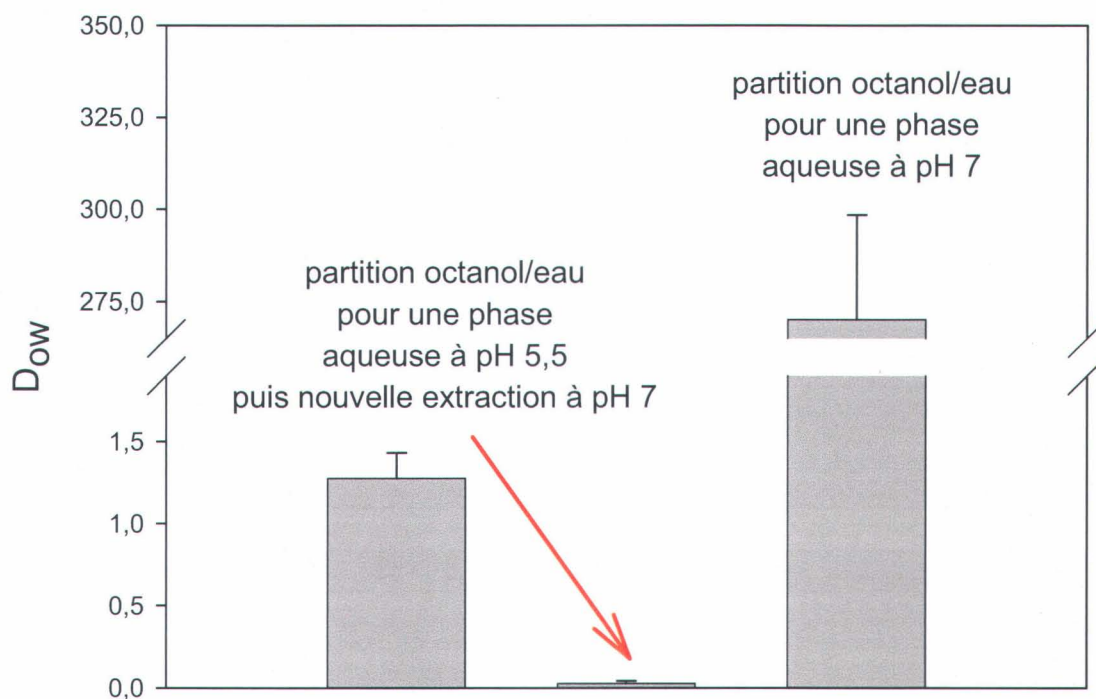


Figure 4.18 : Coefficient de partage octanol/eau du système Cd-DDC tel qu'affecté par le pH. Le DDC passe quasi totalement en phase octanol lors de l'extraction à pH 5,5 et ne permet pas une extraction du Cd de la même phase aqueuse ajustée à pH 7. Nous avons indiqué la valeur du D_{ow} pour une extraction directe de la phase aqueuse à pH 7.

Quoiqu'il en soit, si nous considérons les AH comme des molécules plutôt hydrophobes, leur association avec ces complexes neutres devrait être corrélée positivement au D_{ow} des complexes neutres. Ce n'est pas tout à fait ce que nous observons à la figure 4.19. Tout d'abord, le D_{ow} du complexe $Cd(XANT)_2^0$ ne montre aucun effet de pH dans les deux cas : D_{ow} et association avec les AH soit un couple (1:1) sur le graphique. Autrement dit, ce complexe s'associe de façon semblable aux deux pH en corrélation à la fois avec ses propriétés hydrophobes et la présence majoritaire (>96%, cf. tableau 4.4) de l'espèce neutre $Cd(XANT)_2^0$, quelque soit le pH. Par ailleurs son D_{ow} à pH 7 est légèrement inférieur à celui du $Cd(DDC)_2^0$ entraînant une association avec les AH du complexe $Cd(XANT)_2^0$ à son tour un peu plus faible que celle du complexe $Cd(DDC)_2^0$.

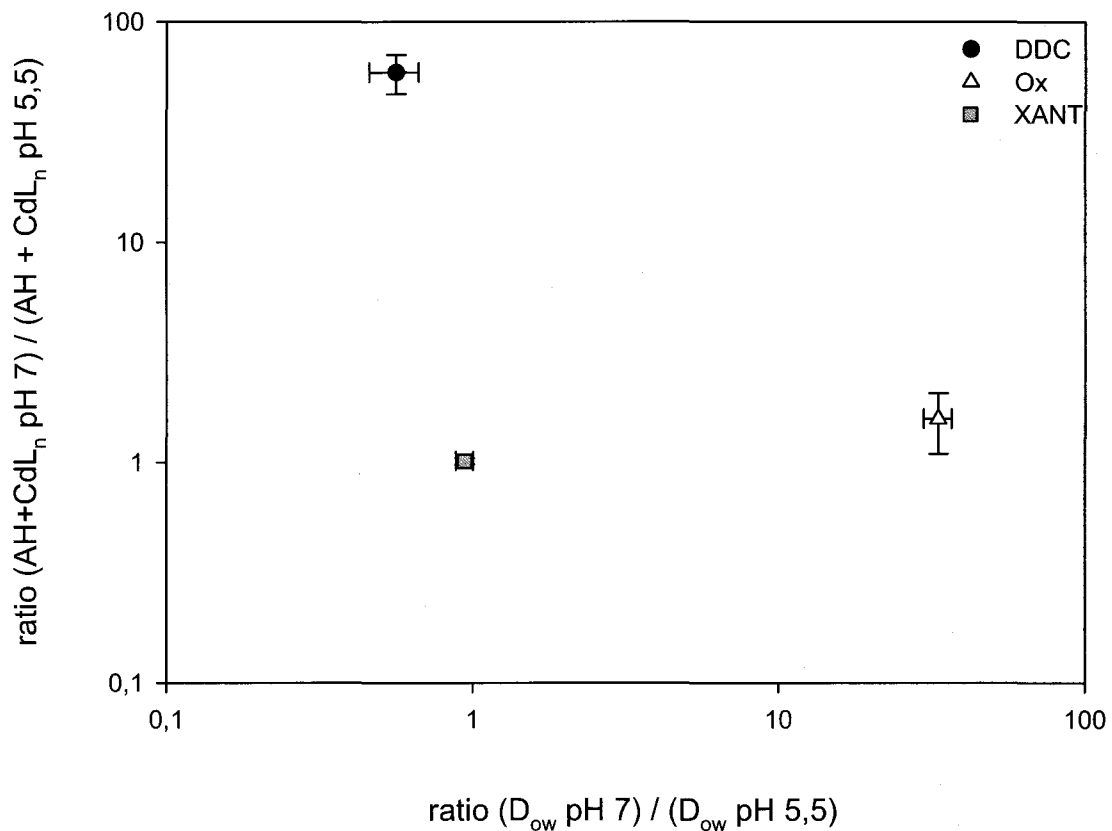
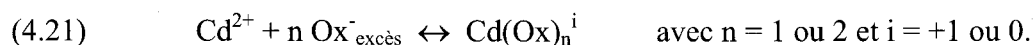


Figure 4.19 : Comparaison de l'effet du pH sur l'association $AH + Cd(L)_2^0$ face à l'effet du pH sur le D_{ow} de chaque complexe neutre. Les deux axes sont en échelle logarithmique. L'effet est calculé pour les valeurs à pH 7 sur celles à pH 5,5.

Quant au complexe $Cd(DDC)_2^0$, il a des propriétés hydrophobes qui sont semblables aux deux pH, si nous considérons toutefois comme valable le D_{ow} obtenu avec une concentration 100 fois plus forte que la normale à pH 5,5. En parallèle, l'association avec les acides humiques diminue largement avec le pH. Une telle divergence entre, d'une part un D_{ow} élevé et d'autre part, une faible association avec les AH à pH 5,5 est difficilement explicable. Cependant, les expériences de fluorescence (section suivante) offrent une explication à ce comportement.

Dans le cas des complexes $Cd(Ox)_n$, le lien entre le pouvoir hydrophobe et l'association avec les AH est décelable bien que faible. En effet le D_{ow} diminue de façon importante entre le pH neutre et celui acide, alors que l'association avec les AH montre un faible effet de pH. De plus, le D_{ow} des formes $Cd(Ox)_n$ est relativement semblable à celui du $Cd(XANT)_2^0$ (1,82 face à 1,75) tandis que leurs associations respectives avec les AH ne sont pas comparables (22% face à 73%). Pour comprendre ce résultat, il faut se rappeler que les formes neutres du cadmium $Cd(L)_2^0$ sont les plus susceptibles de passer de la phase aqueuse vers l'octanol lors des expériences de détermination des D_{ow} ; les formes chargées telle que $CdOx^+$ ne devraient pas être extrait par la phase octanol (Turner et Mawji 2004). Or, d'après nos calculs de spéciation, le complexe chargé $CdOx^+$ est dominant, il faut donc considérer la possibilité de la présence non négligeable du complexe neutre $Cd(Ox)_2^0$.

Ce dernier point est envisageable si nous tenons compte de l'incertitude et/ou des erreurs des constantes ($\log \beta_2 = 13,13 \pm 1,15$). Par exemple, en gardant $\log K_1 = 9,58$, la présence de 3% de $Cd(Ox)_2^0$ se traduit par $\log \beta_2 = 14,85$ ce qui est proche de $\log \beta_2 = 13,13 \pm 1,15$ fixé à la section 4.4.3.3 (soit 14,28 dans le cas le plus défavorable : $13,13 + 1,15$). Cette présence de complexe neutre est donc probable car une légère variation de la constante β_2 fait apparaître l'espèce $Cd(Ox)_2^0$ dans les simulations de spéciation. A partir de là, nous pouvons avoir affaire à une extraction progressive du Cd en présence d'un excès d'Ox selon le principe de Le Châtelier et l'équation 4.21.



D'un point de vue comparatif, nos recherches bibliographiques sur les D_{ow} n'ont révélé qu'une seule étude traitant du Cd et de ligands organiques. Block (1991) a déterminé par la même méthode d'agitation à pH 7,1 les D_{ow} du Cd à 10^{-6} M en présence de DDC ou bien de XANT en quantités variables. Si l'on se place pour des ratios comparables aux nôtres, soit $Cd/DDC = 2,6 \cdot 10^3$ et $Cd/XANT = 2,6 \cdot 10^5$, alors l'auteur obtient $\log D_{ow}$ entre 2,08 et 2,80 pour le Cd+DDC et entre 1,60 et 1,89 pour le Cd+XANT ; nos résultats entrent bien dans ces deux gammes. Toutefois, Block n'a pas fait varier le pH dans ses systèmes.

Ces résultats de D_{ow} viennent donc, en partie, expliquer l'association AH-Cd-L aux deux pH si nous étudions le tableau 4.8. En effet, toujours en considérant que les interactions dominantes sont de natures hydrophobes, les coefficients de partage octanol-eau des complexes $Cd(XANT)_2^0$ et $Cd(Ox)_2^0$ semblent reliés à leur association avec les AH. Ainsi, une augmentation du D_{ow} favorise une plus grande association de ces complexes avec les AH. En revanche ce résultat n'est pas applicable dans le cas du $Cd(DDC)_2^0$, pour un même coefficient D_{ow} aux pH acide et neutre, l'association Cd-L-AH diminue fortement avec une acidification du milieu suggérant la formation de complexes ternaires sensibles à la compétition avec les protons. Les expériences de fluorescence à la section suivante viendront préciser ces interactions $Cd(L)_2^0$ avec les SH.

Tableau 4.8 : Comparaison des données sur l'association Cd-L-AH et les D_{ow} (\pm représente l'écart-type).

	pH	$Cd(DDC)_2^0$	$Cd(XANT)_2^0$	$CdOx^+$
D_{ow}	5,5	$481 \pm 73^*$	60 ± 4	$2 \pm 0,1$
	7	270 ± 28	56 ± 1	66 ± 5
Association Cd-L-AH en %	5,5	$1 \pm 0,2$	$72 \pm 0,4$	14 ± 3
	7	88 ± 6	73 ± 2	22 ± 5

* valeur issue du tableau 4.7.

Toutes ces données (propriétés hydrophobes D_{ow} , tension de surface, constantes conditionnelles de stabilité $Cd(L)_2^0$, association $Cd(L)_2^0$ avec les acides humiques) seront extrêmement importantes dans le cadre de la modélisation mais aussi de l'interprétation des résultats des expériences de prise en charge de complexes métalliques neutres par les algues vertes unicellulaires d'eau douce.

5. Comportement de fluorescence des substances humiques en présence de Cd, de ligands organiques et de complexes neutres Cd(L)_2^0

5.1 Remarques préliminaires

Les expériences de dialyse, réalisées pour estimer quantitativement l'association entre les complexes Cd(L)_2^0 et les acides humiques, ne sont pas envisageables avec les acides fulviques pour des raisons de fuites possibles des AF à travers la membrane à dialyse. La fluorescence en matrice d'excitation-émission est un outil puissant et relativement simple d'utilisation pour évaluer l'association entre des composés fluorescents (les substances humiques) et des composés qui ne fluorescent pas (les complexes Cd(L)_2^0 , voir les remarques ci-après). Nous évitons ainsi tout problème de perte de SH, et cela nous permet d'étudier beaucoup plus de systèmes qu'avec la dialyse.

Tel que mentionné plus haut, il est primordial de noter que les ligands organiques monomères utilisés dans cette étude ne fluorescent pas significativement en milieu aqueux dans nos conditions de travail. Dans le cas de l'oxine, cette absence de fluorescence paraît peu évidente de prime abord étant donné la présence de deux noyaux aromatiques. En fait l'absence de fluorescence de l'oxine en milieu aqueux et dans nos gammes de pH est mal comprise. Une étude explique cela par une réaction de tautomérisation photo-induite suivie d'une désexcitation du tautomère de façon non radiative (Bardez *et al.* 1997). Nous avons pu confirmer l'absence de fluorescence de l'oxine aux pH 7 et 5,5 lors des mesures dans nos conditions.

De la même manière les complexes neutres du cadmium avec les trois ligands organiques étudiés (Cd(L)_2^0) ne fluorescent pas non plus. À partir de là, le choix de spectres de référence devenait évident, chaque matrice spectrale d'une fraction de substances humiques (acides humiques ou fulviques ou bien matière organique naturelle) est le point de référence dans ces systèmes (présence ou non de Cd, L ou Cd(L)_2^0).

Pour les acides humiques de référence à pH 7 nous avons répété cinq mesures de matrice afin d'extraire un intervalle de confiance à 95% pour l'intensité de fluorescence à une paire de longueurs d'onde (excitation-émission) données. La valeur ainsi obtenue ($\pm 3\%$) permet donc de discriminer entre des variations négligeables (variation $< 3\%$; $P > 0,05$ avec un test t non pairé de Student) et celles réelles (variation $> 3\%$; $P < 0,05$ avec un test t non pairé de Student) pour deux matrices de fluorescence d'excitation-émission que nous voudrions comparer.

Pour rappel, les données pour un échantillon se trouvent corrigées pour les effets de filtres internes, les biais instrumentaux et normalisés pour un blanc, ce qui donne des unités de fluorescence sur l'axe des z, présentées en unités Raman fois 1000 par nm (cf. section 3.8).

5.2 Spectres de fluorescence des substances humiques en fonction de leur nature, du pH et de leur concentration

5.2.1 Remarques générales

La zone principale et réputée comme telle d'étude du comportement de fluorescence des substances humiques (SH) se trouve entre la bande Rayleigh de premier ordre (correspondant à $\lambda_{\text{ém}} = \lambda_{\text{exc}} + 15 \text{ nm}$, soit le coin en haut à droite de chaque spectre) et celle de second ordre appelée bande Raman (correspondant à $\lambda_{\text{exc}} = \lambda_{\text{émi}} / 2$, dans le coin en bas à gauche de chaque spectre). Ces bandes Rayleigh sont dues aux interactions entre les molécules d'eau et la lumière d'excitation (Zepp *et al.* 2004).

Les spectres des substances humiques montrent dans leur matrice d'excitation-émission (MEE) deux à trois pics que nous appellerons ici A, B et C. Ils sont localisés pour les paires de longueurs d'ondes d'excitation-émission (en nm) suivantes (figure 5.3 par exemple) :

- A = 245-255 nm/430-465 nm,
- B = 280 nm/430-443 nm,
- C = 315-335 nm/430-460 nm.

Notons que ces gammes ne sont pas valables pour les matrices de la figure 5.4 car elles sont réalisées dans des conditions expérimentales différentes de toutes les autres matrices. Précisons aussi que nous parlerons indifféremment de zone, aire ou de fluorophore, ces trois termes désignant la même chose.

Nous donnons des gammes pour chaque aire un peu large car les zones de fluorescence d'intensité maximale dépendent du pH et du type de substances humiques. Quoiqu'il en soit les zones susmentionnées sont suffisamment séparées pour facilement distinguer les aires A, B ou C dans les cas où aucun autre composé n'est ajouté. Les zones A et C sont largement citées dans la littérature concernant les substances humiques aquatiques et elles semblent à cet égard plutôt universelles d'un point de vue de leur récurrence et de leur emplacement (Coble 1996 ; Westerhoff *et al.* 2001 ; Patel-Sorrentino *et al.* 2002 ; Alberts et Takacs 2004). A propos de la zone B, peu d'études rapportent sa présence et aucune d'entre elles ne tentent de comprendre sa présence aléatoire (Patel-Sorrentino *et al.* 2002). Ces trois zones sont identifiées comme des composantes des substances humiques absorbants dans l'UV (A & B) et le visible (C) (Stedmon *et al.* 2003).

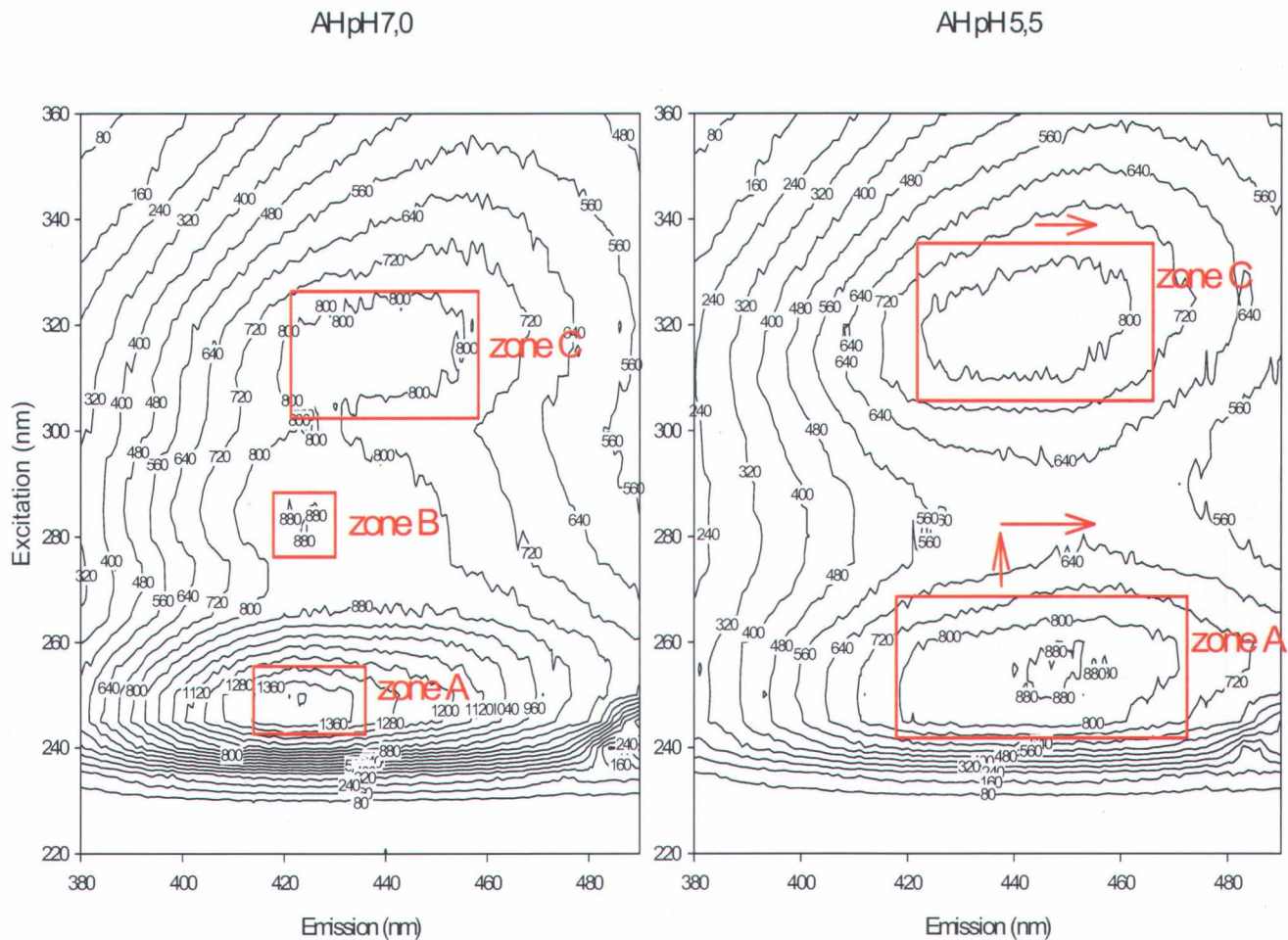


Figure 5.1 : Spectre en MEE des acides humiques de la rivière Suwannee à pH 7 et 5,5. Les flèches indiquent le déplacement des zones d'intensités maximales du graphique de droite par rapport à celui de gauche. Ici la zone B a disparue. Les unités sur l'axe des z sont en 1000·unités Raman·nm⁻¹ ; [AH] = 6,5 mg C·L⁻¹.

5.2.2 Effet de pH

Pour une concentration donnée en SH, quelque soit le fluorophore (A, B ou C), l'intensité de fluorescence augmente quand le pH augmente et les zones d'intensités maximales demeurent dans la même gamme de longueurs d'onde entre les deux pH (exemple avec les

acides humiques : figure 5.3). Cela confirme ce que nous pouvons trouver dans la littérature (Pullin et Cabaniss 1995 ; Mobed *et al.* 1996 ; Patel-Sorrentino *et al.* 2002) et signifie que les fluorophores ne sont pas altérés quand le pH varie si la concentration de SH est fixe. En tant que molécules amphiphiles avec un fort degré de groupements ionisables (principalement carboxyliques et phénoliques), les SH sont chargées différemment avec le pH et leur conformation est aussi dépendante du pH. Il est ainsi communément admis qu'à mesure que le pH diminue en deçà de 7 le processus d'agrégation devient de plus en plus important alors que pour des pH plutôt basiques, les molécules de SH sont pratiquement toutes dissociées à cause de niveaux différents de répulsion électrostatique intramoléculaires (Lead *et al.* 2000b). Ainsi le transfert intramoléculaire de proton à l'état excité (acronyme anglais : ESIPT) sera fonction du pH dans une matrice aqueuse (Henry et Fahrni 2002) et ce transfert variable suivant le pH pourrait expliquer les différences observées d'intensité pour les trois fluorophores entre les pH 5,5 et 7.

5.2.3 Effet de concentration

L'augmentation de la concentration des SH provoque la diminution de l'intensité de fluorescence des zones A et C, ce que l'on nomme dans la littérature «quenching» ou atténuation (figure 5.4). Cela est valide pour les trois fractions de SH et aux deux pH (7 et 5,5). Une explication pourrait encore provenir du phénomène d'agrégation/désagrégation qui gouverne la conformation des SH. Deux études démontrèrent à ce propos que les SH sont totalement dispersées aux faibles concentrations et forces ioniques, tandis qu'aux fortes concentrations elles s'aggloméreraient (Chen et Schnitzer 1989 ; Pranzas *et al.* 2003). En d'autres termes, en augmentant la concentration des SH leur réorganisation interne s'activera probablement plus, entraînant de fait une diminution du comportement de fluorescence. Dans une autre étude (Mobed *et al.* 1996) les concentrations des AH et AF de la rivière Suwannee entre 2,5 et 50 mg C·L⁻¹ à pH 6 (en considérant 50% de carbone organique par fraction de substances humiques) ne montrèrent aucun effet sur le spectre de fluorescence pour une force ionique de 10 mM (1 mM dans nos conditions). À l'inverse, les travaux de Lochmüller et Saavedra (1986) précisèrent des changements pour des acides fulviques commerciaux à des concentrations entre 5 et 75 mg C·L⁻¹ à pH 6 et pour une force ionique de 100 mM (toujours en considérant 50% de carbone organique dans la fraction). Il

est évident que la force ionique a une influence et pourrait expliquer l'absence de consensus entre les deux dernières études, mais dans la notre, nous observons des effets de la concentration en SH à faible force ionique (1 mM). Nous n'avons pas pour le moment d'explications pour de telles différences au sein de la littérature. En tout état de cause, nous avons choisi de travailler à $6,5 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$ pour tous les échantillons contenant des SH, cette concentration étant pertinente d'un point de vue environnemental.

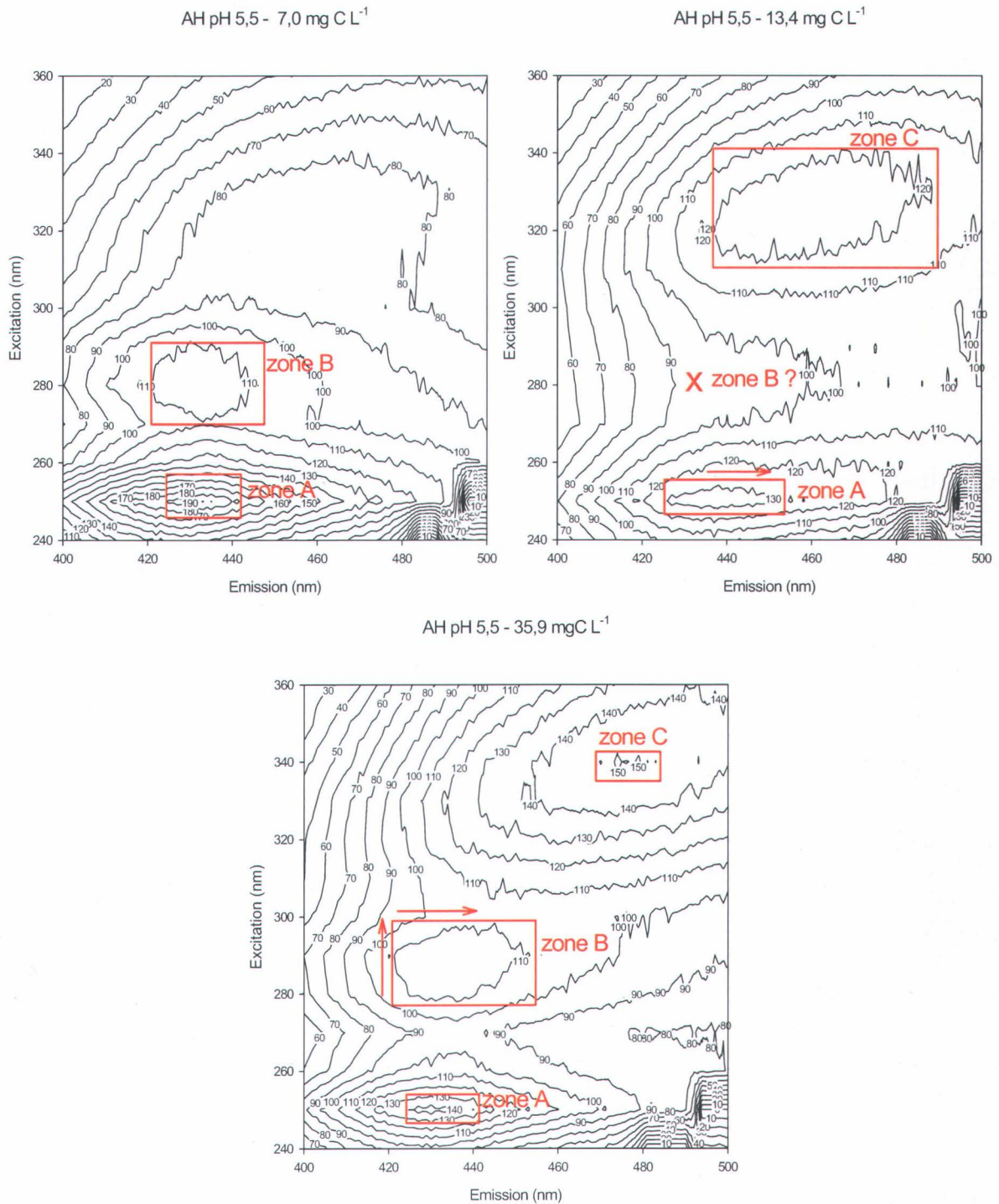


Figure 5.2 : Spectres en MEE des acides humiques de la rivière Suwannee à pH 5,5 pour différentes concentrations. Les flèches indiquent le déplacement des zones d'intensités maximales par rapport au graphe de référence à 7,0 mg C·L⁻¹.

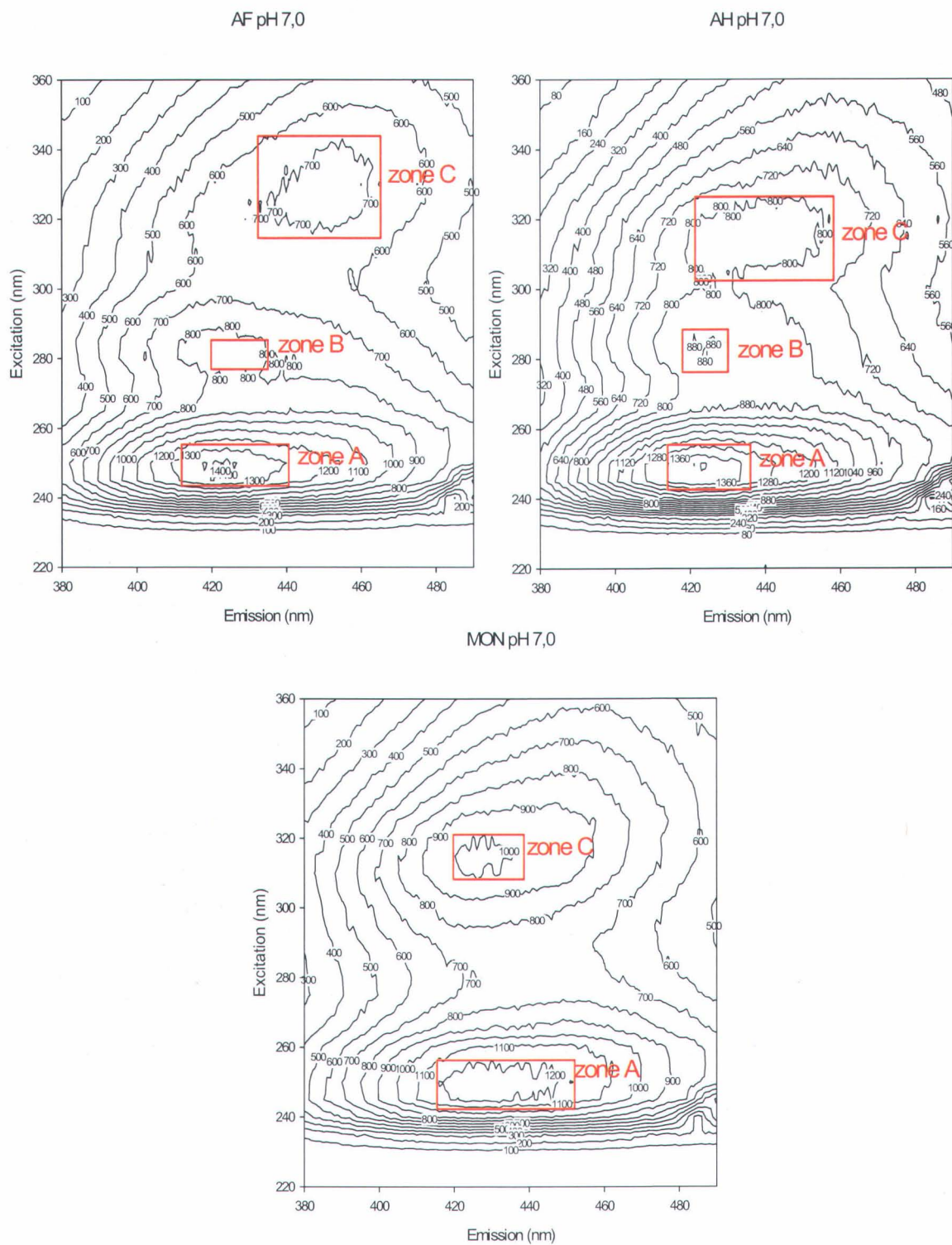


Figure 5.3 : Spectres en MEE des substances humiques ($6,5 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$) de la rivière Suwannee à pH 7.

5.2.4 Effet du type de substances humiques

Puisque les trois types de SH ont subi des protocoles d'extraction différents (AF et AH extraits sur une résine XAD-8, MON extrait par osmose inverse) et/ou des traitements chimiques différents (pour la séparation des AF et des AH), il n'est pas étonnant d'observer des différences d'intensité pour un même fluorophore et même de légers déplacements des zones d'intensité maximale (figure 5.5). Par ailleurs, les matrices de fluorescence d'excitation-émission sont employées car elles permettent de distinguer et de caractériser la matière organique dissoute d'origines diverses (Alberts et Takacs 2004 ; Sierra *et al.* 2005). Il est aussi bien connu que les trois fractions que nous étudions contiennent des taux variables de groupements fonctionnels pour une quantité de carbone donnée : par exemple les groupements carboxyliques et phénoliques sont en plus grandes concentrations respectivement dans les AF puis les AH, la MON présentant des concentrations intermédiaires pour ces deux groupements (site Internet IHSS : <http://www.ihss.gatech.edu>). En comparaison des fractions AF et MON, l'intensité de fluorescence est la plus forte pour les AH, quelque soit le fluorophore et aux deux pH, ce que nous pourrions relier à son contenu en groupements phénoliques plus élevé.

5.3 Spectres de fluorescence des substances humiques en présence de Cd

Avant de présenter les résultats, notons que la réponse «habituelle» en fluorescence traduisant les interactions métaux-SH est une diminution d'intensité par rapport aux SH en absence de métaux (Ryan et Weber 1982a ; Ryan et Weber 1982b ; Luster *et al.* 1996 ; Nagao *et al.* 2001 ; Larrivee *et al.* 2003 ; Provenzano *et al.* 2004 ; Wu *et al.* 2004). En général les métaux paramagnétiques (Cu^{2+} , Ag^+) atténue la fluorescence des SH tandis que les métaux diamagnétiques (Al^{3+}) peuvent l'atténuer, ne pas la modifier ou bien l'augmenter (Elkins et Nelson 2002). A pH 7 et pour les trois fractions de SH, l'ajout de Cd (métal diamagnétique) augmente la fluorescence du pic A (et du pic B s'il est présent) avec en général un déplacement concomitant vers le bleu pour les trois pics des MEE (figure 5.6).

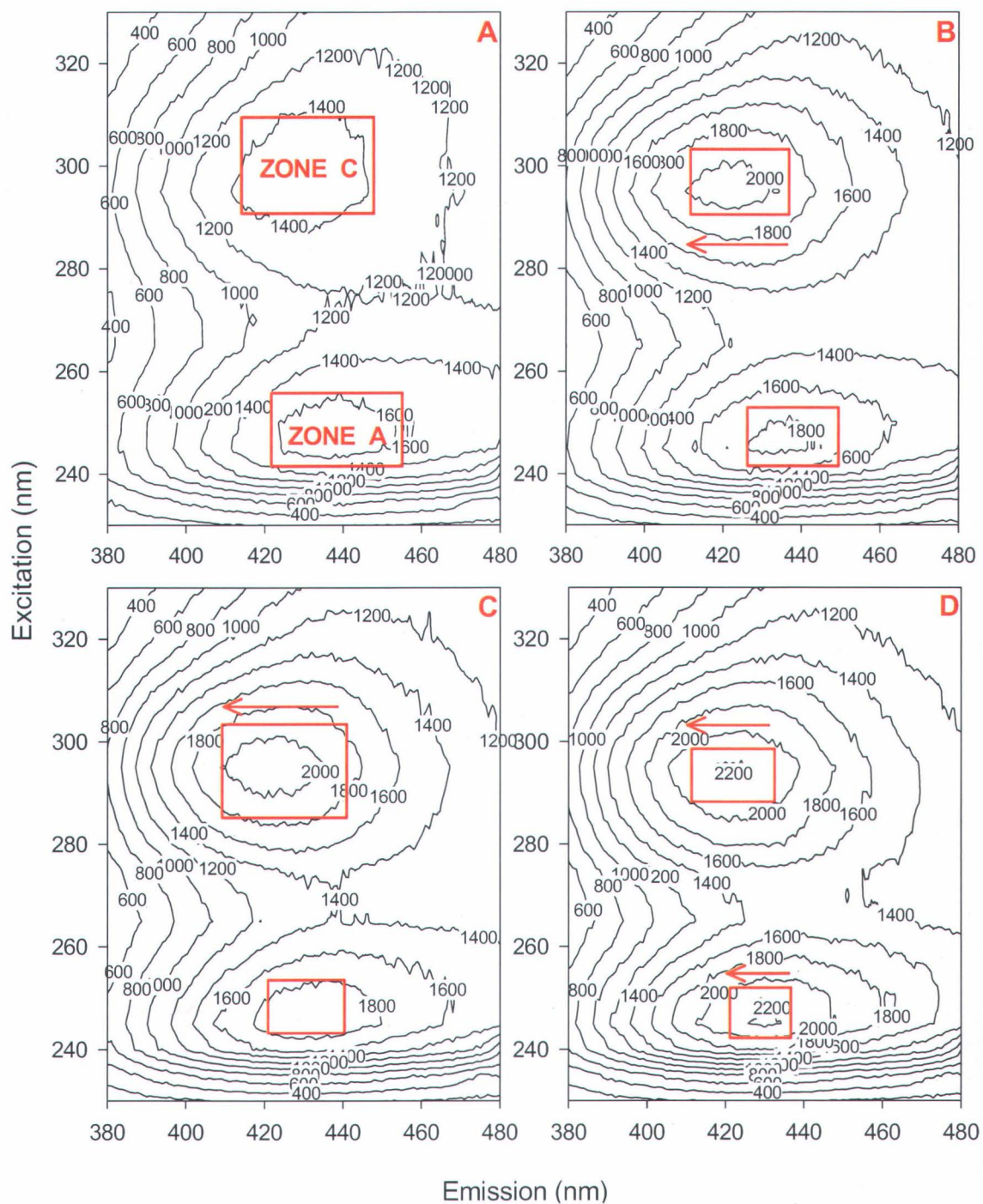


Figure 5.4 : Spectres en MEE pour les acides humiques de la rivière Suwannee ($[AH] = 6,5 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$) à pH 7 (A) sans ajout de Cd ; (B) en présence de Cd à $0,1 \text{ nM}$; (C) de Cd à 10 nM ; (D) et de Cd à $10 \text{ }\mu\text{M}$.

Par analogie avec d'autres études sur les interactions métaux-SH (Cabaniss 1992 ; Plaza *et al.* 2006) nous pouvons attribuer les déplacements observés à une altération de la géométrie moléculaire des fluorophores due à la liaison avec le Cd. Quant à l'augmentation de fluorescence, elle est attribuée, dans les rares études montrant une augmentation d'intensité de fluorescence, à deux mécanismes possibles : i) une rigidité accrue de la structure moléculaire des SH en présence du métal ; et ii) une modification du fluorophore favorisant la fluorescence des domaines hydrophobes (Lakowicz 1983 ; Cabaniss 1992 ; Elkins et Nelson 2002). Les déplacements vers le bleu des spectres d'émission indiquent la participation des groupements phénoliques dans le processus de complexation entre le métal et les substances humiques (Elkins et Nelson 2002). À pH 5,5 l'ajout de Cd augmente aussi l'intensité de fluorescence et, comme vu à pH 7, nous observons des déplacements vers le bleu de tous les fluorophores et en particulier dans le cas du spectre d'émission (les spectres d'excitation proposent des déplacements faibles voire négligeables vers le bleu). Notons que les trois fractions de SH se comportent aussi de la même manière au pH acide.

À pH 7, à mesure que la concentration de Cd augmente, l'intensité de fluorescence (mesurée à la paire de longueurs d'onde correspondant au pic d'intensité de la zone A, B ou C pour la fraction de SH de référence, la valeur 100% leur est attribuée) de la zone A s'accroît (jusqu'à 193%, 168% et 127% respectivement pour les AF, la MON et les AH, cf. figure 5.7 pour un exemple de la zone A pour les trois SH à pH 7) ainsi que pour celle de la zone B (jusqu'à 186% et 159% respectivement pour les AF et la MON ; cette zone n'existe pas pour les AH à pH 7). Ce schéma demeure valable à pH 5,5 mais dans une moindre mesure pour la zone A (jusqu'à 132%, 121% et 116% respectivement pour les AH, AF et la MON) et la zone B (jusqu'à 125% pour les AF ; l'aire n'est pas présente pour les AH et la MON à pH 5,5). En ce qui concerne le fluorophore C, il montre une variation significative de son intensité de fluorescence de référence que dans le cas des AH à pH 7 où nous observons une augmentation d'intensité jusqu'à 41%. De telles différences entre les fluorophores A, B et C suggèrent des mécanismes de complexation différents entre le Cd et le fluorophore C d'une part, et entre le Cd et les fluorophores A et B, d'autre part.

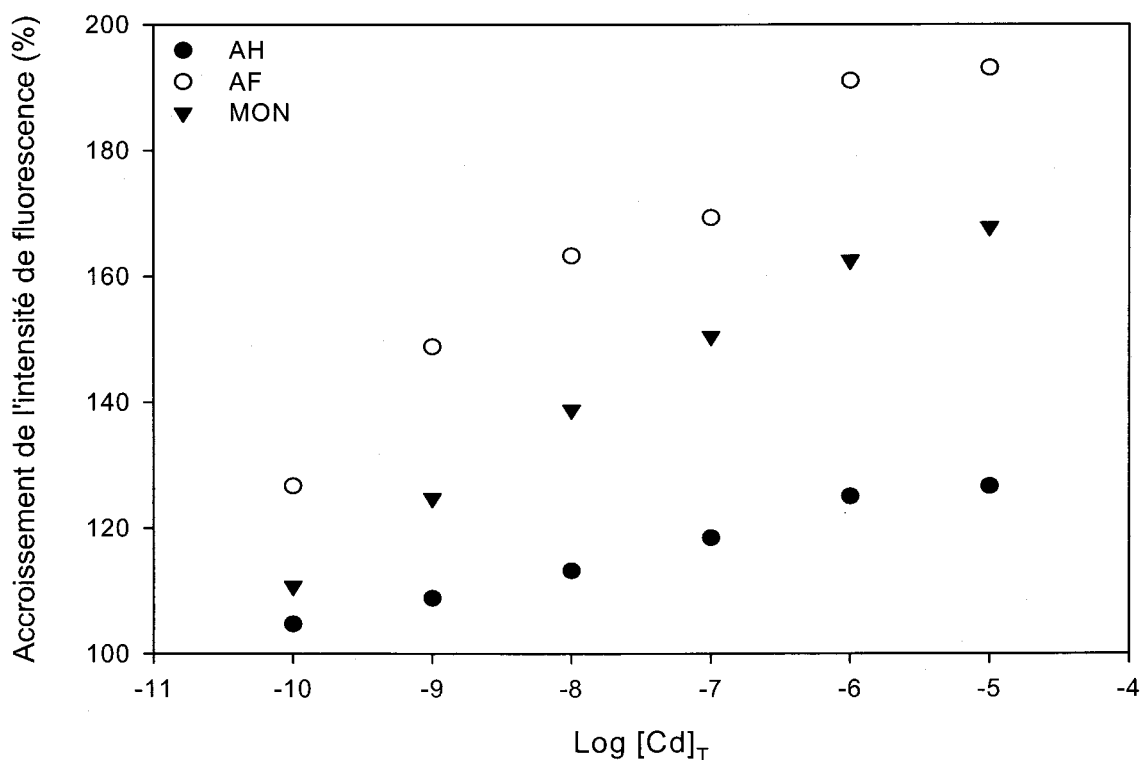


Figure 5.5 : Intensité de fluorescence de l'aire A des trois fractions de SH telle qu'influencée par le titrage au Cd à pH 7 ; 100% représente l'intensité de fluorescence de chaque SH en absence de Cd.

Par ailleurs, le fait que deux fluorophores, voire trois dans un cas (AH + Cd à pH 7), soient impliqués dans les interactions entre les SH et le Cd nous amène à considérer plusieurs sites distincts de liaisons avec le cadmium. Nous avons essayé de modéliser nos résultats par l'équation développée par Ryan et Weber (1982b) puis modifiée par Luster *et al.* (1996). Cependant, cette équation considère une interaction 1:1, c'est-à-dire entre un seul site de complexation sur les substances humiques et le cadmium. L'échec de la modélisation (absence de convergence) pourrait s'expliquer par l'implication d'au moins deux sites de complexation avec le cadmium. Remarquons que l'application de l'équation de Ryan et Weber pour un seul fluorophore à la fois ne converge pas non plus. Hayes et ses collaborateurs (2003 ; 2004) ont développé une équation dérivée de celle de Ryan et Weber, en impliquant justement deux sites de liaisons sur les substances humiques pour

complexer les métaux. Néanmoins, en appliquant leur modèle, il n'a pas été possible non plus de faire converger vers une solution unique. Ce que nous observons, une augmentation de fluorescence des SH en présence de Cd, est donc tout à fait nouveau mais non modélisable avec les équations développées jusqu'ici.

Afin de pouvoir comparer non seulement les trois fractions de SH mais aussi l'effet du pH, il est apparu intéressant d'intégrer les données issues de tous les fluorophores. Dans cette optique nous avons utilisé un indice de changement de fluorescence (ICF) qui pondère l'atténuation ou l'augmentation d'intensité de fluorescence pour tous les fluorophores d'un système (un type de SH, présence ou non de Cd, de ligands organiques) comparé à la référence (même type de SH, même pH, aucun autre composé ajouté). Le calcul est le suivant (équation 5.1) :

$$(5.1) \quad ICF = 100 \cdot \frac{\sum_{i=A}^C \frac{I_i}{I_{i,0}}}{\sum_{i=A}^C \frac{I_{i,0}}{I_{i,0}}} - 100$$

où I_i est l'intensité de fluorescence pour le fluorophore i à une paire de longueurs d'onde donnée (A, B ou C) et $I_{i,0}$ celle de la référence (dans cette section en absence de Cd ajouté). Notons que si l'indice ICF est positif alors nous avons une augmentation de l'intensité de fluorescence alors qu'une valeur négative indique une atténuation.

Si nous traçons les graphiques de l'indice ICF face au $[Cd]_T$ pour les deux pH (figure 5.8), des régressions non linéaires de type $(ICF = \langle a \rangle \cdot \ln([Cd]_T) + \langle b \rangle)$ donnent de bons résultats ($N = 6$ et $r^2 > 0,95$). Plus les paramètres $\langle a \rangle$ et $\langle b \rangle$ sont grands, plus l'atteinte du plateau de l'indice ICF est lente et plus ce plateau est de valeur élevée (on pourrait spéculer qu'il s'agit alors de la saturation des sites de liaison pour la fraction de SH considérée). En se référant au tableau 5.1 et aux figures 5.8 et 5.9, on se rend compte que les paramètres

«a» et «b» extraits par les régressions non linéaires suivent quasiment la même tendance concernant l'effet du Cd sur l'intensité de fluorescence :

- sur «a» : AF pH 7 > MON pH 7 > AH pH 7 ~ AF pH 5,5 > AH pH 5,5 > MON pH 5,5 ;
- sur «b» : AF pH 7 > MON pH 7 > AH pH 7 > AH pH 5,5 > AF pH 5,5 > MON pH 5,5.

Tableau 5.1 : Valeurs des paramètres «a» et «b» issues des régressions non linéaires pour chaque système Cd+SH aux deux pH (N = 6 ; P < 0,0009 que ce soit pour le paramètre «a» et «b») ; ± représente l'intervalle de confiance à 95% pour chaque valeur. Pour la comparaison statistique des valeurs des paramètres «a» et «b», voir la figure 5.9.

	pH 5,5			pH 7		
	AH	AF	MON	AH	AF	MON
«a»	1,4 ± 0,2	1,70 ± 0,04	0,8 ± 0,1	1,8 ± 0,2	3,8 ± 0,4	3,1 ± 0,2
«b»	33 ± 3	28 ± 1	17 ± 1	56 ± 3	105 ± 7	79 ± 3
r ²	95,2%	99,4%	95,6%	98,1%	96,2%	98,4%

Un effet plus grand du Cd à pH neutre (plus de complexation) par rapport au pH acide est en accord avec le concept de compétition entre les protons et le Cd²⁺ pour les sites de liaison disponibles des SH (Larrivee *et al.* 2003), concept intégré dans le logiciel WHAM6 pour lequel le Cd complexe plus les AF que les AH à pH 7 et 5,5. L'idée qui précède (si l'effet du Cd augmente alors la complexation augmente) découle de l'hypothèse que les changements d'intensité de fluorescence induits par le Cd reflètent un mécanisme de complexation entre le Cd et les SH.

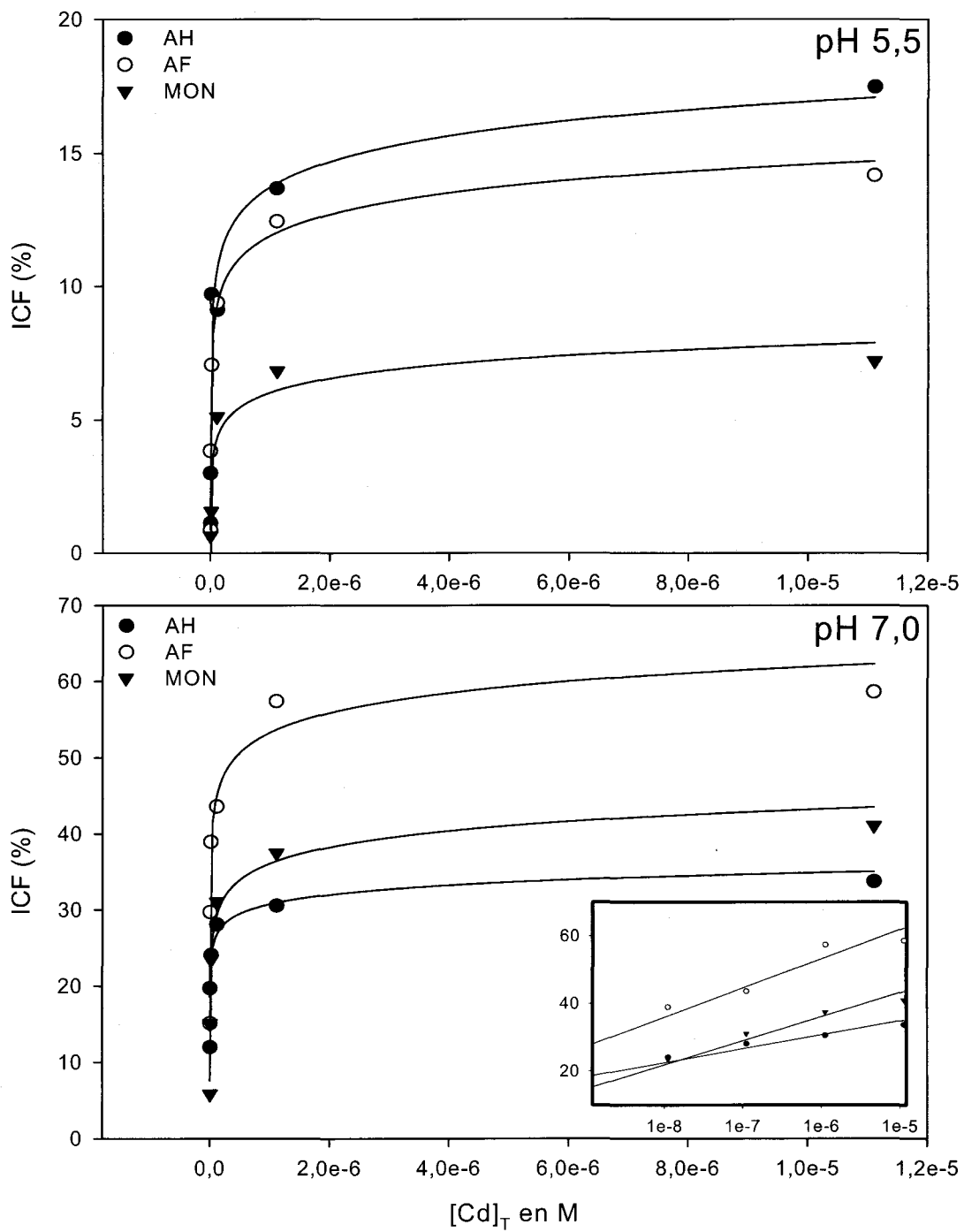


Figure 5.6 : Indice de changement de fluorescence ICF pour les titrages des SH par le Cd. Les courbes représentent les régressions non linéaires ($r^2 > 0,95$). L'encadré à pH 7 montre le même graphique pour une échelle log en abscisse.

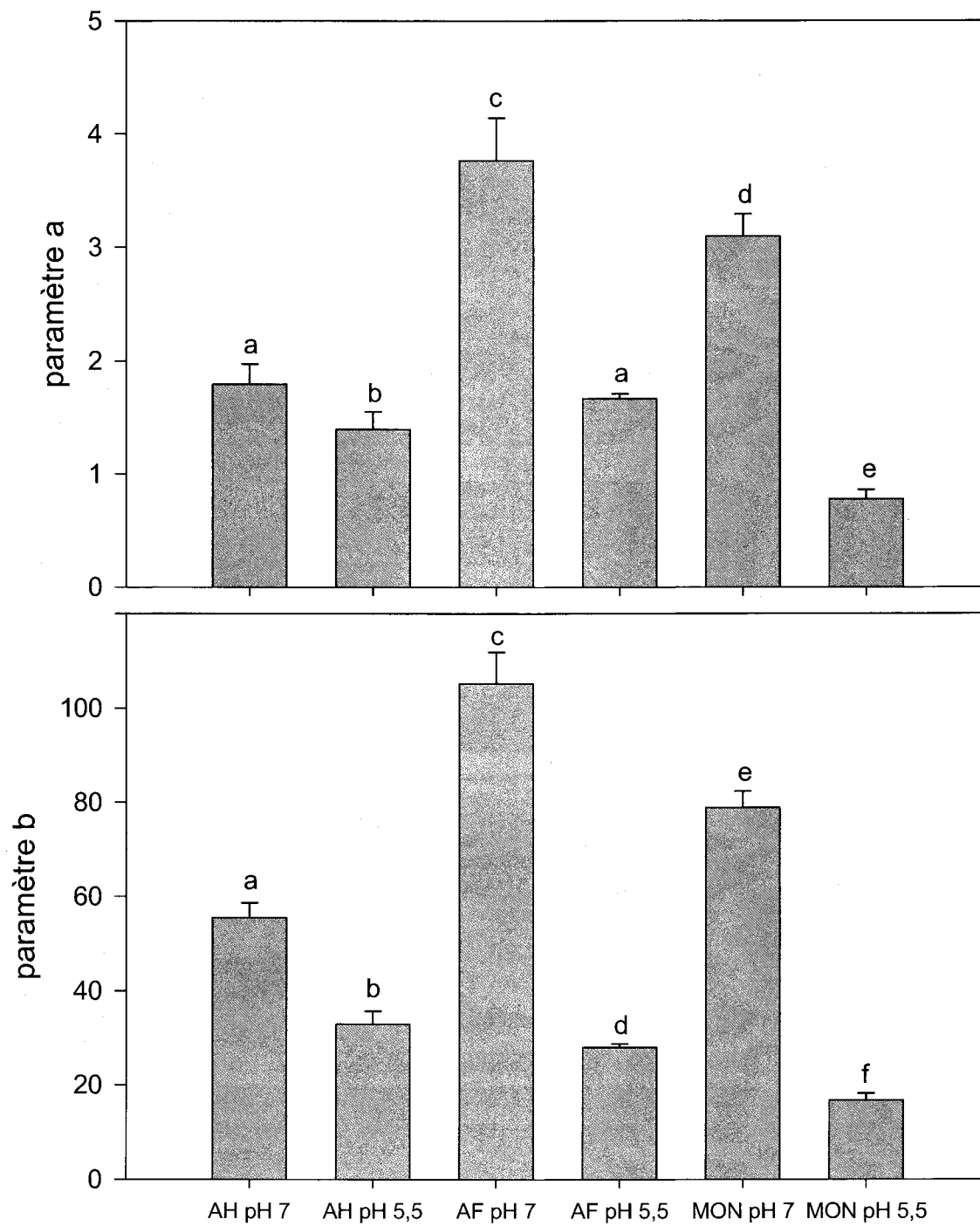


Figure 5.7 : Valeurs des paramètres «a» et «b» issues des régressions non linéaires pour chaque système Cd+SH aux deux pH ; pour chaque paramètre, les lettres indiquent les valeurs statistiquement différentes les unes des autres (ANOVA à une voie, test post hoc NSK, P < 0,05).

En ce qui concerne l'ordre trouvé pour l'association du Cd avec chaque fraction de SH, à pH 7 l'ordre décroît à mesure que leur contenu en groupements carboxyliques diminue (site Internet IHSS : <http://www.ihss.gatech.edu>), ce qui mène à penser que ces groupements pourraient être largement responsables de la complexation tout du moins à pH neutre. En revanche, à pH acide l'ordre est moins évident à expliquer si nous nous référons uniquement aux quantités des groupements phénoliques et carboxyliques dans chacune des fractions.

Comme nous l'avons mentionné au tout début de cette section, la réponse habituellement observée lors d'interactions entre un métal et une fraction de substances humiques, est une atténuation de l'intensité de fluorescence corrélée à l'ajout du métal. Les métaux provoquant une telle réponse d'atténuation sont de type paramagnétique, tels que le Pd^{2+} , Eu^{3+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} (Ryan et Weber 1982a ; Ryan et Weber 1982b ; Luster *et al.* 1996 ; Nagao *et al.* 2001 ; Larrivee *et al.* 2003 ; Provenzano *et al.* 2004 ; Wu *et al.* 2004) tandis que l'aluminium, rapporté pour augmenter l'intensité de fluorescence quand il est ajouté aux SH, est diamagnétique (Luster *et al.* 1996 ; Elkins et Nelson 2002). Cet effet de l'Al a été attribué à son très fort indice ionique combiné à un indice de covalence relativement bas dans la classification de Nieboer et Richardson (Elkins et Nelson 2002).

Concernant l'augmentation de l'intensité de fluorescence des SH en présence de Cd, à notre connaissance aucune étude n'a jamais démontré un tel effet. Il faut toutefois mentionner l'étude de Grassi et Daquino (2005) qui ont pu observer une augmentation de l'intensité de fluorescence pour les AF, eux aussi de la rivière Suwannee, mais pour une concentration en AF de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ titré avec des concentrations de Cd échelonnées entre 1,3 et 64 mM ! Dans cette étude, la présence de Cd avec les AF entraînait un phénomène de précipitation dans le milieu expérimental. Il est probable que la précipitation-coagulation des AF en présence de Cd augmente la diffusion Rayleigh, provoquant alors une augmentation apparente d'intensité de fluorescence (Ryan et Weber 1982a). Quoiqu'il en soit, les études des interactions Cd-SH sont somme toute rares. Par exemple, Plaza *et al.* (2006) ont pu mettre en lumière un effet d'atténuation de la fluorescence en titrant des boues de stations d'épuration par le cadmium mais pour des concentrations très grandes de Cd, jusqu'à 200

μM . De leur côté, Elkins et Nelson (2002) examinèrent le titrage des AF de la rivière Suwannee par le cadmium mais ne décelèrent pas d'effet sur l'intensité de fluorescence. Cependant leur étude était menée à pH 4,0 et la détection pour une seule paire de longueurs d'onde $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 344/448 \text{ nm}$. En effet avec les AF l'effet d'atténuation diminue avec le pH (voir ci-dessus) et la paire de longueurs d'onde qu'ils choisirent n'était pas dans la zone où l'intensité est maximale pour le fluorophore C d'après nos résultats. Cela pourrait donc expliquer l'absence d'effet observé du cadmium sur les AF dans leur étude.

Comme cette augmentation de fluorescence pour ce métal est inédite, nous avons voulu nous assurer que cela n'était pas un artefact dû :

- 1) au fait que nous ne travaillons pas sous atmosphère inerte $\text{N}_2(\text{g})$, comme certaines études ont pu le faire lors de titrage de SH par des métaux. Cette technique permet d'éviter la formation, en présence d' O_2 , de radicaux issus des SH qui pourraient fluorescer (Giannakopoulos *et al.* 2005);
- 2) à l'agrégation des SH en présence d'un métal. Du point de vue de la fluorescence cela provoque l'effet largement documenté de diffusion Rayleigh.

Voici les réponses à ces interrogations.

- 1) Il n'y a pas dans la littérature de consensus quant à l'approche expérimentale à privilégier pour le titrage des SH par les métaux. Certaines études travaillent sous atmosphère inerte d'autres non. Nous avons travaillé sous atmosphère $\text{N}_2(\text{g})$ sur le système AF titré avec le Cd à pH 7, car il s'agit de celui qui montrait le plus d'augmentation de l'intensité de fluorescence. Les tendances sont restées les mêmes : les fluorophores A et B présentaient une augmentation importante de fluorescence, jusqu'à 30%, tandis que le fluorophore C n'était pas altéré par la présence du Cd (cf. figure 5.10). En comparaison avec le titrage (fait au préalable) des mêmes échantillons sans $\text{N}_2(\text{g})$, l'augmentation de fluorescence est identique statistiquement ($P = 0,09$; test non pairé de Student sur les paramètres «a» et «b» des régressions non linéaires de chacune des courbes).
- 2) À notre connaissance seules deux études, de Ryan et Weber (1982a ; 1982b), ont démontré l'importance du phénomène d'agrégation pour le Cu en présence des AF et en particulier à pH 7. Leurs travaux indiquent que la diffusion Rayleigh devient significative

au-delà de 30 μM de Cu, alors que nous ne dépassons pas, dans le titrage Cd-SH, 11 μM . Du point de vue expérimental, nous avons mesuré la diffusion Rayleigh aux paires de longueurs d'ondes 400/400 et 500/500 (en nm) pour le système AF + Cd (concentrations de Cd de 0,1 nM à 20 μM), à pH 7 puisque c'était le cas le plus favorable à la coagulation dans les travaux de Ryan et Weber (1982a). Nous n'avons pas mesuré de variations significatives de l'intensité de fluorescence par rapport à la référence AF en absence de Cd ; d'autre part, il est bien connu que le Cu se lie plus fortement aux SH que le Cd ce qui nous permet d'éliminer la coagulation (diffusion Rayleigh) comme explication de l'augmentation de fluorescence.

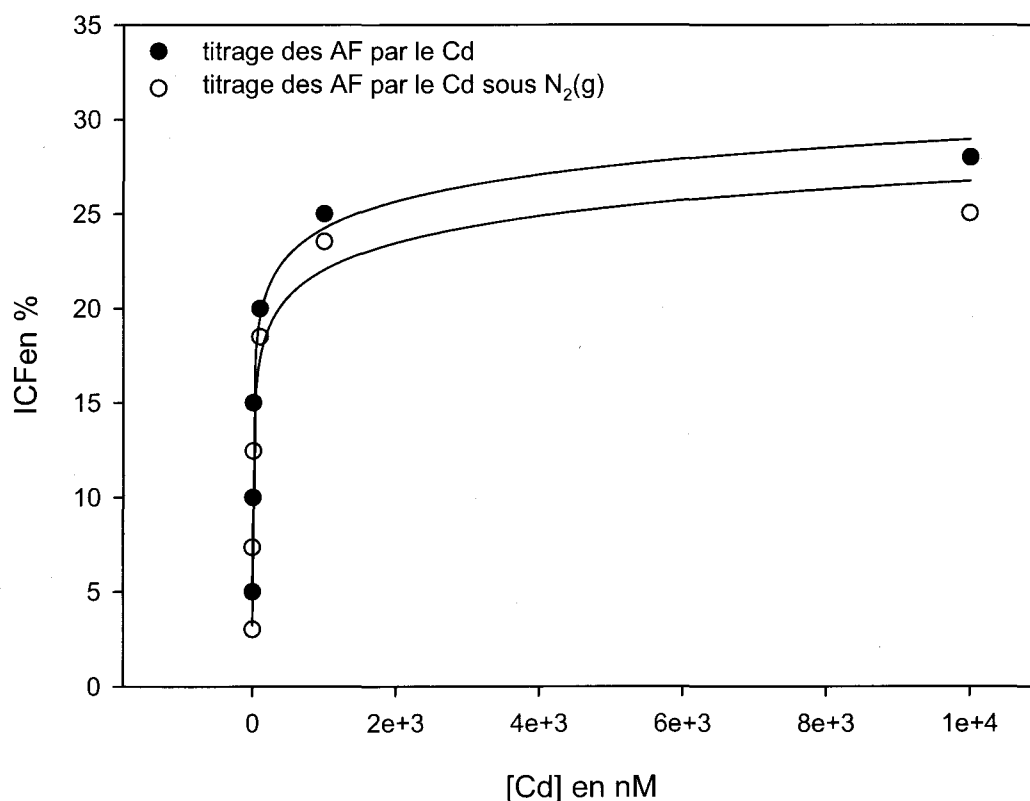


Figure 5.8 : Résultats des ICF lors du titrage des AF par le Cd à pH 7 ouvert à l'atmosphère ou sous atmosphère N₂(g).

Il semblerait donc que l'augmentation d'intensité de fluorescence en présence de Cd soit belle et bien réelle. Par ailleurs, il est à remarquer que nous observons des variations d'intensité de fluorescence significative à partir de concentrations de Cd assez faibles eu égard à la littérature.

Les causes expliquant une telle augmentation de l'intensité de fluorescence des substances humiques en présence de Cd pourraient être les suivantes, telles que proposées par Cabaniss (Cabaniss 1992):

- l'ajout d'un métal (ici le Cd^{2+}) pourrait rigidifier la structure des SH, ce qui diminuerait la probabilité d'occurrence des phénomènes non radiatifs («intersystem crossing» et conversion interne) en faveur du phénomène d'émission (donc de fluorescence),
- la modification de conformation de fluorophores due à la présence du Cd, ce qui pourrait entraîner un mouvement de ces fluorophores vers de zones des SH favorables à la fluorescence (zones hydrophobes en particulier).

Nous avons donc fait une première démonstration via les matrices d'excitation-émission en fluorescence de la complexation du cadmium avec trois fractions de substances humiques aquatiques de la rivière Suwannee et ce à deux valeurs de pH. Cela confirme nos expériences de dialyse (cf. section 4.2) ainsi que la littérature qui a déjà démontré et quantifié par d'autres méthodes l'association Cd-SH aquatiques (Lee *et al.* 1993 ; Xue et Sigg 1999 ; Otto *et al.* 2001).

5.4 Influence des ligands organiques d'intérêt et du pH sur la fluorescence des substances humiques

5.4.1 En présence du DDC

Pour les trois types de substances humiques et aux deux pH, le DDC (1,0 μM) ne montre aucun effet sinon une augmentation de l'intensité de fluorescence (figure 5.11). La présence de DDC ne montre pas de déplacements notables (> 5 nm) pour les fluorophores A, B et C dans le cas des AH aux deux pH. En ce qui concerne la MON, à pH 7 le fluorophore A voit son spectre d'émission déplacé vers le bleu tandis qu'à pH 5,5 ses spectres d'émission et d'excitation se déplacent vers le rouge. Finalement, les AF à pH 5,5 voient les spectres d'émission des zones A et C se déplacer vers le bleu alors qu'à pH 7 le spectre d'émission de la zone A se déplace vers le rouge. Fait remarquable, à pH 7 pour les AF en absence de DDC, il n'apparaît pas de maximum dans la zone que nous appelons B, mais avec l'ajout de DDC se dégage un pic maximal dans cette zone. Dans ce cas, et ce sera valable par la suite pour toutes les aires, si une aire apparaît ou bien disparaît, nous procédons comme suit dans les calculs de l'ICF :

- l'aire X disparaît/apparaît à la paire de longueurs d'onde Y/Z (excitation/émission en nm) lors du ième ajout de Cd ($i = 1$ à 6 pour le titrage des SH par le Cd, $i = 1$ à 5 pour le titrage des SH par les complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$) ;
- si l'aire X apparaît alors nous prenons en compte l'intensité de fluorescence d'une aire X fictive à l'ajout ième - 1 de Cd (si $i = 0$ il s'agit de la matrice référence de SH) et à la paire de longueurs d'onde Y/Z ;
- si l'aire X disparaît alors nous prenons en compte l'intensité de fluorescence d'une aire X fictive à l'ajout ième et à tous les ajouts qui suivent de Cd à la paire de longueurs d'onde Y/Z.

Les calculs de l'indice de changement de fluorescence (ICF) révèlent des comportements assez similaires parmi les trois types de SH (tableau 5.2). Effectivement, il semble qu'à pH acide les SH subissent peu d'effet au niveau de la fluorescence de leurs fluorophores après l'ajout de DDC. En revanche, à pH neutre l'association avec le DDC est plus grande qu'à

pH 5,5 suggérant des interactions non hydrophobes entre les trois fractions de SH et le DDC. De telles interactions entre le DDC et les SH sont les plus évidentes pour le fluorophore A, avec près de 40% d'augmentation à pH 7 et bien évidemment aussi avec l'aire B (dont le pic apparaît dans le cas des AH) ; cela mène à croire que les interactions principales ont lieu à leur niveau. Bien que les interactions DDC-SH soient dépendantes du pH, l'effet sur le fluorophore A suit quand même une tendance identique aux deux pH soit $AF > (AH \text{ ou } MON)$.

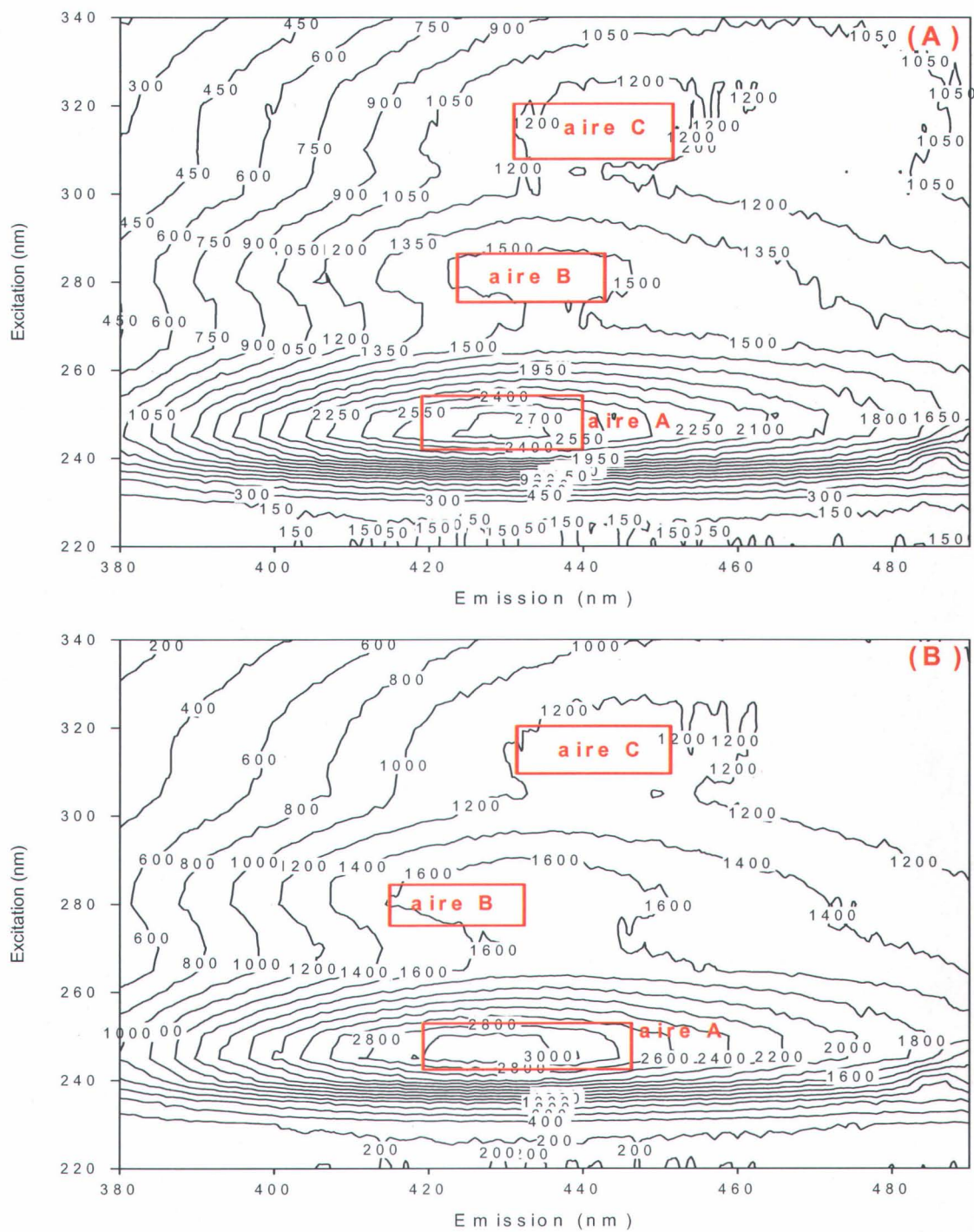


Figure 5.9 : Spectres en MEE des acides humiques de la rivière Suwannee à pH 7 en présence (B) ou non (A) de DDC (1 μ M). Les déplacements des zones d'intensités maximales sont indiqués le cas échéant par des flèches.

Tableau 5.2: Pourcentage (%) de changement d'intensité de fluorescence (ICF) de chaque fluorophore des substances humiques en présence de DDC (1,0 μ M) aux pH 5,5 et 7.

	Fluorophore	AH+DDC	AF+DDC	MON+DDC
pH 5,5	A	<i>négligeable</i>	+10	<i>négligeable</i>
	B	<i>aire non présente</i>		
	C	<i>négligeable</i>	<i>négligeable</i>	<i>négligeable</i>
	ICF	<i>négligeable</i>	+4	<i>négligeable</i>
pH 7	A	+13	+38	+14
	B	+8	+27	+10
	C	<i>négligeable</i>	-4	<i>négligeable</i>
	ICF	+7	+20	+7

La plus grande augmentation de fluorescence à pH 7 par rapport à pH 5,5 pour ces SH pourrait être reliée aux processus d'agrégation/désagrégation. À pH neutre pour lequel les interactions avec le DDC ($pK_a = 3.38$; Martell et Smith 2004) sont les plus fortes, les SH et le DDC sont tous deux majoritairement sous forme déprotonées en comparaison avec leur spéciation à pH acide. Avec l'augmentation du pH les SH deviennent moins sphériques et plus allongées (Lead *et al.* 2000a). De là nous pourrions spéculer sur le fait que l'ouverture de ces molécules rendrait de nouveaux sites (groupes carboxyliques et hydroxyles, hétérocycles azotés) disponibles pour interagir avec l'espèce anionique DDC^- (via des liaisons hydrogènes ?) conduisant à une association plus grande entre SH-DDC à pH neutre. Notons par ailleurs que cette théorie semble être confirmée par l'ordre avec lequel l'ajout de DDC induit des effets. Ainsi les AF présentent la plus grande augmentation de fluorescence en présence de DDC et cette fraction est bien connue pour être la plus hydrophile et contenant le plus de groupements ionisables des trois.

Des interactions entre des composés organiques anioniques et des substances humiques ne sont pas sans précédents. Par exemple Pacheco *et al.* (2003) rapportent que le mercurochrome et un métabolite de pesticide (les deux chargés négativement) peuvent se lier aux AH par l'intermédiaire de liaisons $\text{COO}^- - \text{NH}_4^+$ et $\text{COO}^- - \text{H}^+$ respectivement. En outre, Schulten et Schnitzer (1998) rapportent que les acides humiques contiennent de nombreux composés azotés (macrocycles et macropolycycles) qui peuvent lier des anions.

5.4.2 En présence de XANT

Contrairement au DDC, ici le XANT atténue le signal de fluorescence ($\text{ICF} < 0$). L'effet le plus marqué du XANT se situe au niveau du fluorophore C, qui subit jusqu'à 40% d'atténuation de fluorescence (cf. tableau 5.3) et en plus un déplacement de ses spectres d'émission et d'excitation vers le rouge (cf. figure 5.12), le tout aux deux pH et pour les trois fractions de SH. L'indice de changement de fluorescence ne montre pas d'effet de pH marqué pour les AH et les AF, mais cet effet apparaît plus nettement avec la MON. Par ailleurs, cet indice indique que l'effet du XANT sur la fluorescence des substances humiques est (en termes absolus) plus grand que celui du DDC de façon générale.

Tout comme le DDC, le XANT est majoritairement sous forme ionisée XANT^- aux deux pH étudiés eu égard à son pK_a qui est de 2,20 (Hayashi *et al.* 1984). On peut donc s'attendre au même type d'interactions hydrophiles (avec toutefois des ICF de signes différents dans le cas du DDC par rapport au XANT) que nous avons suggérées précédemment et c'est bien ce que nous observons. Répétons toutefois que l'effet de pH est nettement moins marqué que dans le cas du DDC. Ce dernier point suggère tout comme les mesures de D_{ow} (section 4.5), que le pK_a du DDC serait plus élevé que 3,38 qui est la valeur issue de la littérature. En outre, malgré la similitude des ligands DDC et XANT, ce dernier semble agir plutôt au niveau du fluorophore C alors que le DDC agit sur le fluorophore A. Ceci nous porte à croire que l'atome N au sein du DDC interagirait préférentiellement avec les fluorophore A alors que l'atome O au sein du XANT réagirait plutôt au niveau du fluorophore C probablement via des liaisons hydrogène.

Notons tout de même que les comparaisons entre les ligands sont à prendre avec précaution, car les concentrations introduites dans les milieux d'exposition sont très différentes (100 μ M de XANT face à 1 μ M de DDC).

Tableau 5.3 : Pourcentage (%) de changement d'intensité de fluorescence (ICF) de chaque fluorophore des substances humiques en présence de XANT (0,1 mM) aux pH 5,5 et 7.

	Fluorophore	AH+XANT	AF+XANT	MON+XANT
pH 5,5	A	-7	-3	-8
	B	<i>aire non présente</i>		
	C	-36	-9	-31
	ICF	-21	-6	-7
pH 7	A	-7	-12	-3
	B	<i>aire non présente</i>		
	C	-40	-9	-10
	ICF	-23	-11	-7

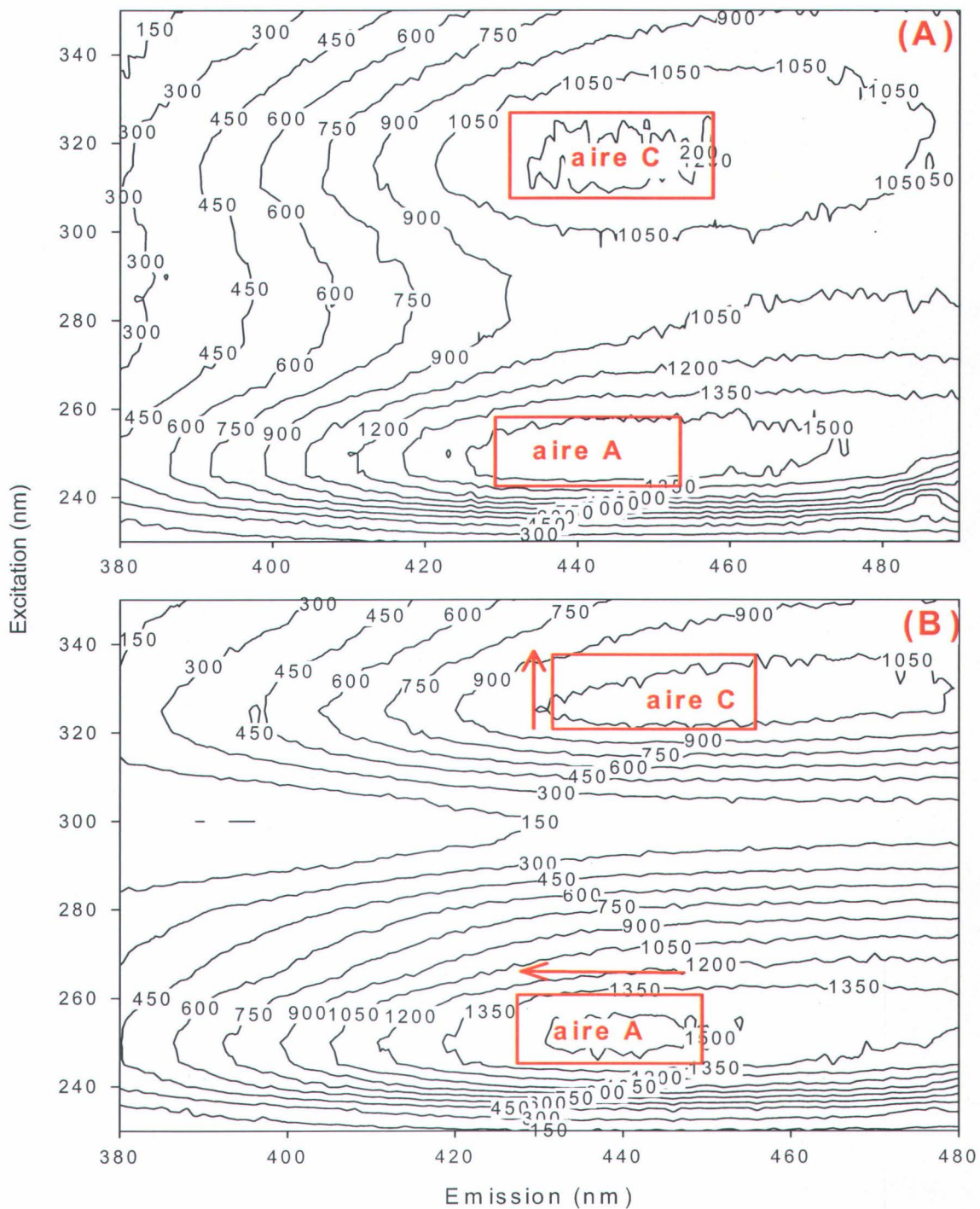


Figure 5.10 : Spectres en MEE des acides humiques de la rivière Suwannee à pH 7 en présence (B) ou non (A) de XANT (0,1 mM). Les déplacements des zones d'intensités maximales sont indiqués le cas échéant par des flèches.

5.4.3 En présence d'Ox

Encore une fois, à l'inverse du système SH + DDC, la présence d'Ox diminue l'intensité de fluorescence de la matrice contenant des SH. De plus, l'addition d'oxine (79 μM) conduit le plus souvent aux deux pH et pour les trois fractions de SH à des déplacements des spectres d'émission et d'excitation vers le rouge. La seule exception provient des AF à pH 7 pour lesquels les deux spectres se déplacent vers le bleu (Figure 5.13). Pour le fluorophore C, l'intensité de fluorescence est réduite d'environ 18% à pH 5,5 et pour les trois fractions de SH (tableau 5.4). Quant à la zone A, les interactions sont ici les plus fortes (jusqu'à 78% d'atténuation) mais avec un effet plus grand à pH acide par rapport au pH neutre. À l'inverse du XANT, cela nous amène à considérer des interactions hydrophobes puisque les interactions ligand-SH augmentent avec une diminution de pH.

Les valeurs de pK_a pour le 8-hydroxyquinoline ($\text{pK}_{a1} = 9,63$ et $\text{pK}_{a2} = 4,89$ tels qu'établis à la section 4.4.3.3 (Pettit et Powell 2001)), font que plus de 70% de l'Ox est présente sous forme neutre HOx sur notre gamme de pH d'étude, ce qui conforte l'idée d'interactions hydrophobes entre l'Ox et les SH.

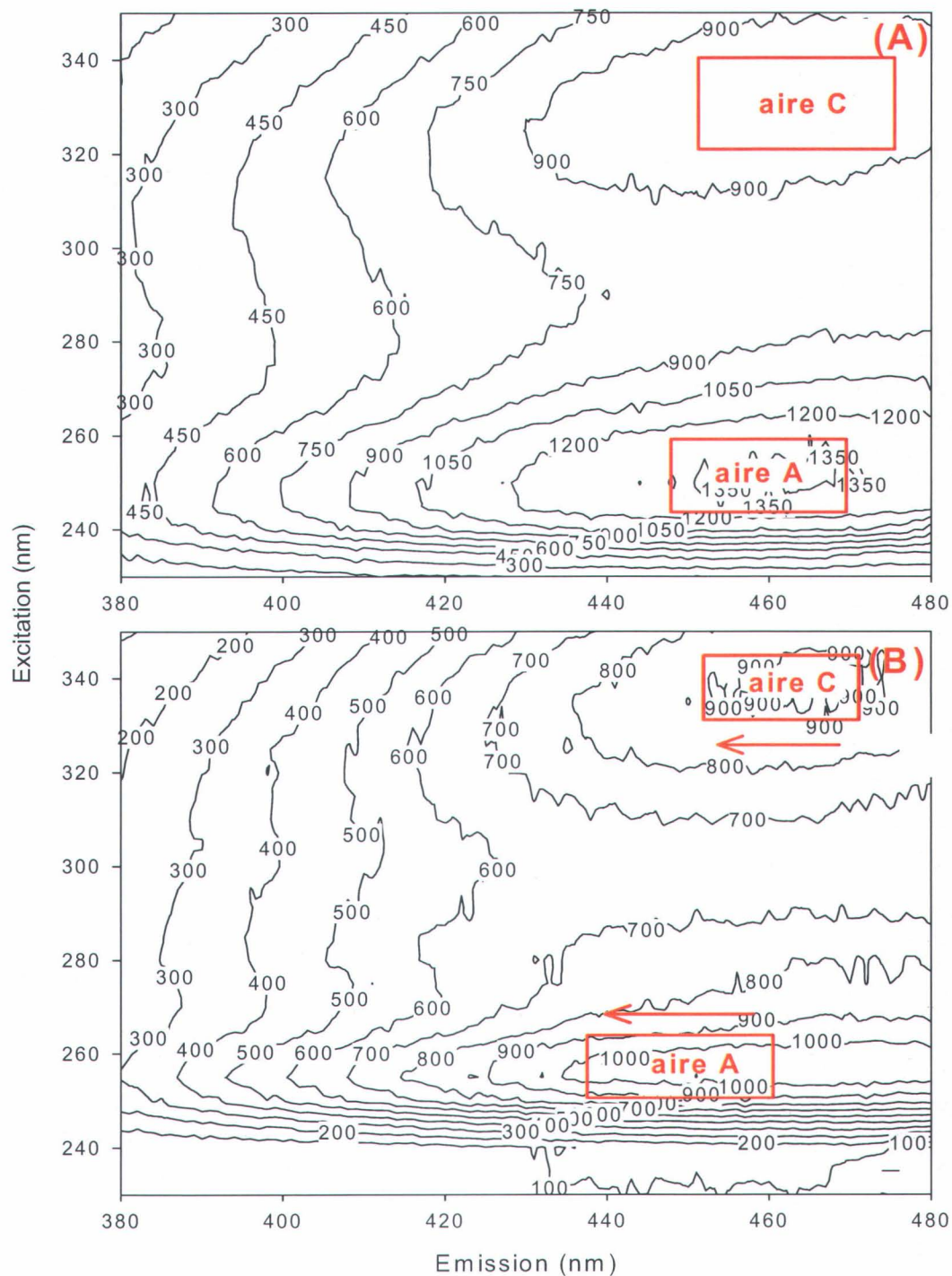


Figure 5.11 : Spectres en MEE des acides fulviques de la rivière Suwannee à pH 7 en présence (B) ou non (A) d'oxine (79 μM). Les déplacements des zones d'intensités maximales sont indiqués le cas échéant par des flèches.

Tableau 5.4 : Pourcentage (%) de changement d'intensité de fluorescence (ICF) de chaque fluorophore des substances humiques en présence d'Ox (79 µM) aux pH 5,5 et 7.

	Fluorophore	AH+Ox	AF+Ox	MON+Ox
pH 5,5	A	-47	-43	-78
	B	<i>aire non présente</i>		
	C	-18	-18	-17
	ICF	-32	-31	-48
pH 7	A	-31	-23	-45
	B	<i>aire non présente</i>		
	C	-22	-11	-17
	ICF	-27	-17	-26

5.4.4 Synthèse des interactions L-SH

Le XANT est principalement présent sous forme anionique dans la gamme de pH 5,5 à 7 utilisée dans notre étude. En revanche l'Ox se présente essentiellement sous la forme neutre HOx sur cette même gamme de pH. Concernant le DDC, il semble d'après les mesures de fluorescence et de D_{ow} qu'à pH 5,5 le DDC soit principalement sous la forme HDDC avant d'être graduellement ionisé en DDC^- à pH 7. Ces différences de spéciation des ligands peuvent expliquer les types d'interactions différents entre ces ligands et les SH. Par ailleurs, l'Ox et le XANT atténuent la réponse en fluorescence des SH tandis que le DDC l'augmente, suggérant deux mécanismes différents d'association entre les SH et ces trois ligands.

Les interactions entre des composés organiques apolaires et les substances humiques dans les sols sont largement documentées dans la littérature (Stevenson 1994) et les systèmes

aquatiques (Haitzer *et al.* 1998) et il est communément acquis que ces interactions sont de natures hydrophobes. À l'opposé, les interactions entre des molécules organiques hydrophiles sont beaucoup moins étudiées. Les mécanismes possibles pour de telles interactions entre des SH, plutôt chargées négativement, et des composés organiques ionisés comprendraient : i) des liaisons électrostatiques dans le cas de composés organiques chargés positivement ; ii) des liaisons hydrogènes en présence de composés neutres, hydrophobes ou non ; iii) et des complexes ternaires dans le cas de composés organiques anioniques tels que le DDC⁻ et le XANT⁻ (Larrivee *et al.* 2003). Nous avons testé la possibilité de la formation de complexes ternaires en augmentant par 10 la concentration de cations (Ca²⁺ ou Mg²⁺) qui pourraient participer à former des «ponts» entre les SH et les ligands anioniques étudiés ici. Les interactions DDC-SH à pH 7 n'ont pas été affectées dans cette expérience, suggérant donc que la formation de complexes ternaires n'est pas responsable de ces interactions DDC ou XANT avec les SH.

Au final, nous pouvons penser que, d'une part, de façon la plus probable, les liaisons N quaternaires ou les groupements donneurs d'électrons (N ou O) sont en mesure de former des liaisons hydrogènes au sein des molécules de SH avec les molécules organiques ionisées, liaisons du type O⁻ ... H⁺ ... L⁻ (ici L = DDC⁻ et XANT⁻ à pH 7). Pour expliquer pourquoi ces interactions sont plus fortes à pH 7 qu'à pH 5,5 nous avons évoqué des changements de conformation permettant la libération de nouveaux sites de liaison à pH 7. D'autre part, l'Ox participerait logiquement à des interactions hydrophobes avec les trois fractions de SH puisque ces interactions sont plus élevées à pH acide plutôt qu'à pH neutre. Ces interactions hydrophobes sont d'autant plus probables que le D_{ow} de l'oxine est relativement élevé soit 78 sous sa forme HOx (Florence et Stauber 1986), qui est la forme majoritaire dans nos expériences.

5.5 Influence des complexes «métal-ligand organique» et du pH sur la fluorescence des substances humiques

5.5.1 Comportement de fluorescence des SH en présence de $Cd(L)_2^0$

Du point de vue de la spéciation, l'ajout de Cd au système binaire SH-L entraîne pour les deux pH (7 et 5,5) la formation de complexes neutres $Cd(L)_2^0$ dans les cas du DDC (> 99,9%) et du XANT (près de 95%) et ce tout le long du titrage par le cadmium (simulations avec WHAM6, cf. section 4.4.4 pour plus de détails). Le système SH-Ox est particulier comme nous l'avions mentionné dans la section 4.4.4 puisque seul le complexe chargé, $CdOx^+$, semble être présent en concentrations significatives (environ 88%) aux deux pH.

L'ajout de cadmium aux systèmes substances humiques + ligands organiques augmente, dans tous les cas, l'intensité de fluorescence de chacune des zones A, C et B quand cette dernière existe ($ICF > 0$, cf. figures 5.14 et 5.15). Ce résultat conduit à dire que les changements observés sont bien dus à des interactions avec les substances humiques, les complexes $Cd(L)_2^0$ n'étant pas fluorescents. En outre, les comparaisons entre les systèmes binaires L + SH et ternaires Cd + L + SH sont valides puisque les concentrations en Cd^{2+} sont très faibles quand L = XANT ou DDC (< 0,1%), ou assez faibles si L = Ox (< 6%) (cf. section 4.4.4) ; à ces concentrations le Cd^{2+} n'affecte pas la fluorescence des substances humiques directement.

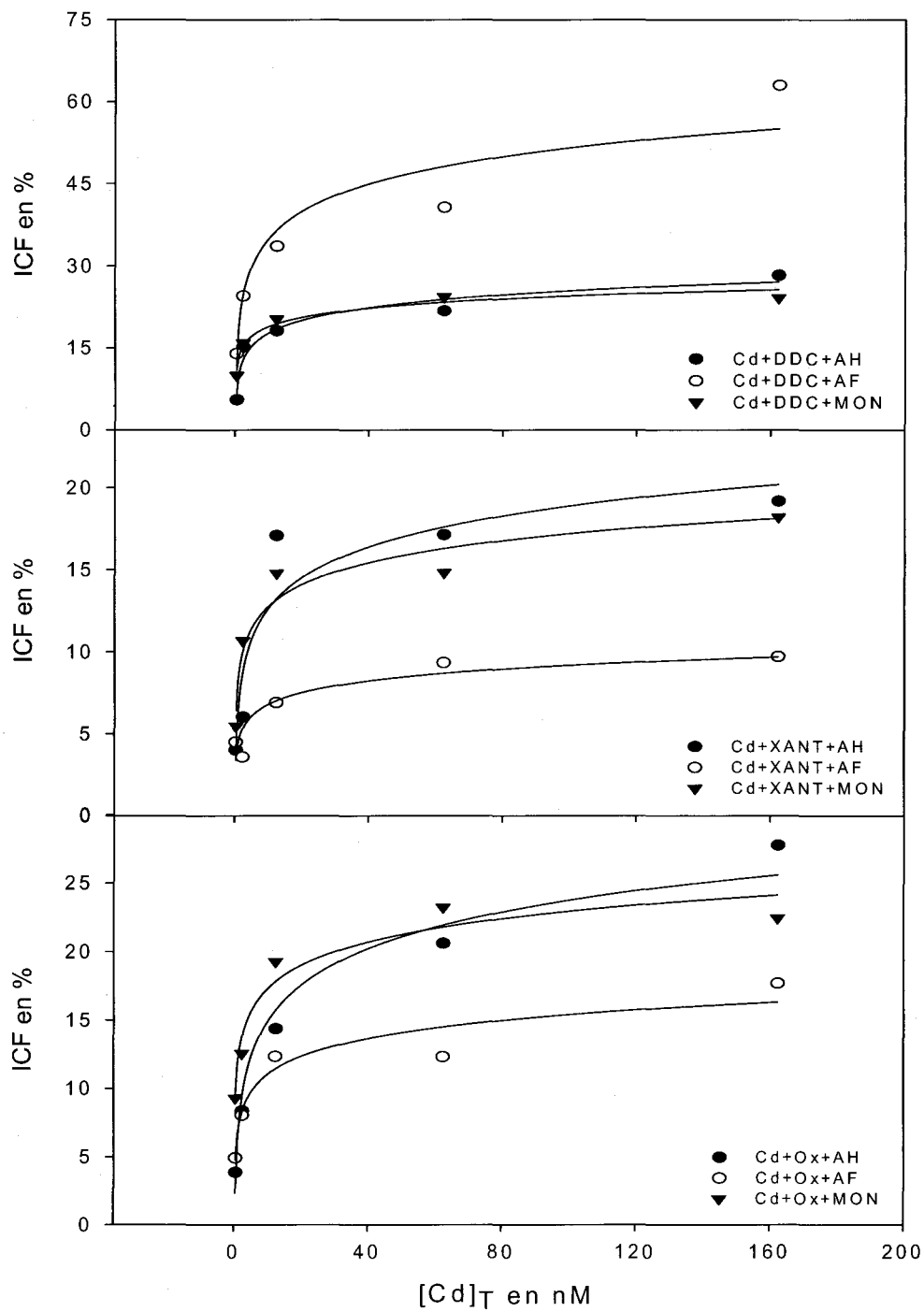


Figure 5.12 : Indice de changement de fluorescence (%) des systèmes SH+L tels que titrés par le Cd à pH 7. Les lignes noires représentent les régressions non linéaires (voir le texte pour plus de détails). ICF est calculé par rapport au système de référence SH+L.

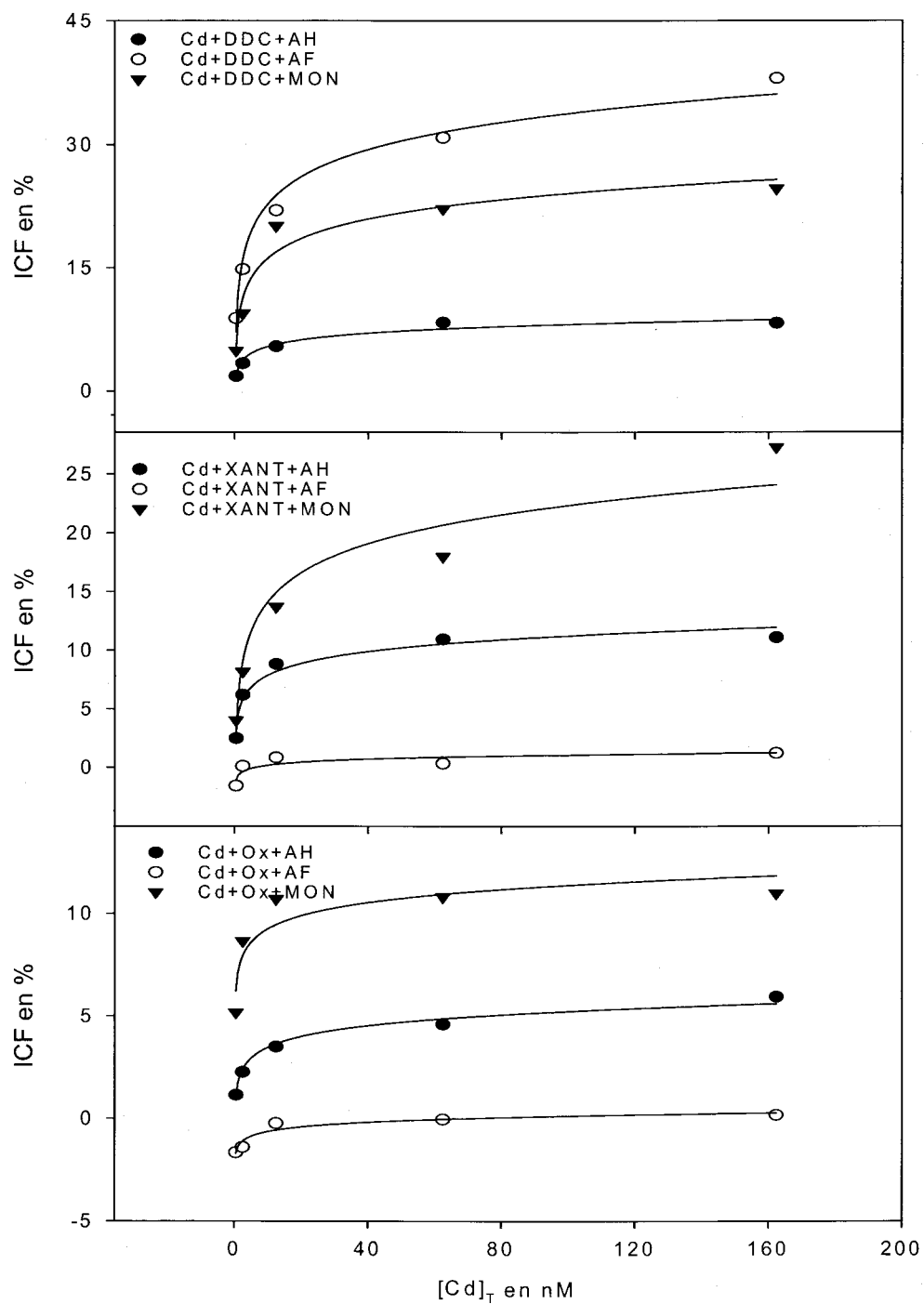


Figure 5.13 : Indice de changement de fluorescence (%) des systèmes SH+L tels que titrés par le Cd à pH 5,5. Les lignes noires représentent les régressions non linéaires (voir le texte pour plus de détails). ICF est calculé par rapport au système de référence SH+L.

Il faut aussi noter que sur les 18 cas possibles (Cd + L + SH pour deux pH, trois fractions de SH et 3 ligands organiques), six révèlent une zone B qui était absente dans les systèmes SH et L + SH. Ces six cas sont : (AH et AF) + Ox à pH 7, AF + DDC à pH 7, MON + Ox à pH 5,5, et (AF et MON) + DDC à pH 5,5. Cette observation laisse entendre que dans ces six cas, les interactions entre les trois composantes du système Cd-L-SH sont plus fortes que pour les 12 autres cas ; nous étudierons ces interactions plus loin. Par ailleurs, de ces six cas, les systèmes AF + DDC + Cd aux deux pH démontrent les interactions les plus fortes en se basant sur les paramètres «a» et «b» issus des régressions non linéaires (cf. section 5.4) ; nous en reparlons ci-après.

De façon globale, quand nous ajoutons le Cd au système L + SH, ce sont les fluorophores A et B (quand ce dernier est présent ou bien apparaît) qui sont impliqués dans l'augmentation de l'intensité de fluorescence. Concernant le fluorophore C, il ne démontre jamais de variations significatives d'intensité de fluorescence malgré des déplacements du spectre d'excitation (vers le rouge) ; cette observation suggère que les complexes $Cd(L)_2^0$ interagissent peu à son niveau.

Du point de vue des déplacements des spectres, l'ajout progressif de cadmium de 0,38 à 162 nM entraîne des déplacements relativement semblables dans tous les systèmes. Ainsi, les spectres d'émission et d'excitation de la zone A se déplacent vers le bleu dans quasiment tous les cas tandis que le spectre d'excitation de la zone C se déplace vers le rouge dans tous les systèmes (cf. figure 5.16). Une exception touche le système Cd-Ox-SH à pH 5,5 où le spectre d'émission se déplace vers le rouge au lieu de se déplacer vers le bleu comme dans les autres cas. Par ailleurs, un déplacement vers le bleu peut indiquer l'implication des groupements phénoliques dans les interactions (Elkins et Nelson 2002), ce qui suggère que la zone de fluorescence A est plutôt associée à des groupes phénoliques. Il est à remarquer que dans le système Cd + SH + DDC à pH 7, les spectres d'émission et d'excitation des zones A et C ne subissent aucun changement significatif (> 5 nm) de leur emplacement.

Il est remarquable de constater que nous observons des changements de fluorescence significatifs (> 3%) pour des concentrations de cadmium qui sont au minimum 6, 500 et 600 fois moindres (pour $[Cd]_T = 163 \text{ nM}$) que les concentrations en DDC, Ox et XANT respectivement. Dans le même ordre d'idée, la concentration en substances humiques est nettement plus élevée que celle en cadmium (~ 20 fois toujours pour $[Cd]_T = 163 \text{ nM}$, en se basant sur les poids moléculaires moyens 1800, 3400 et 1600 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour les AF, AH et la MON respectivement ; moyennes calculées issues de *Perdue et al.*, 2004).

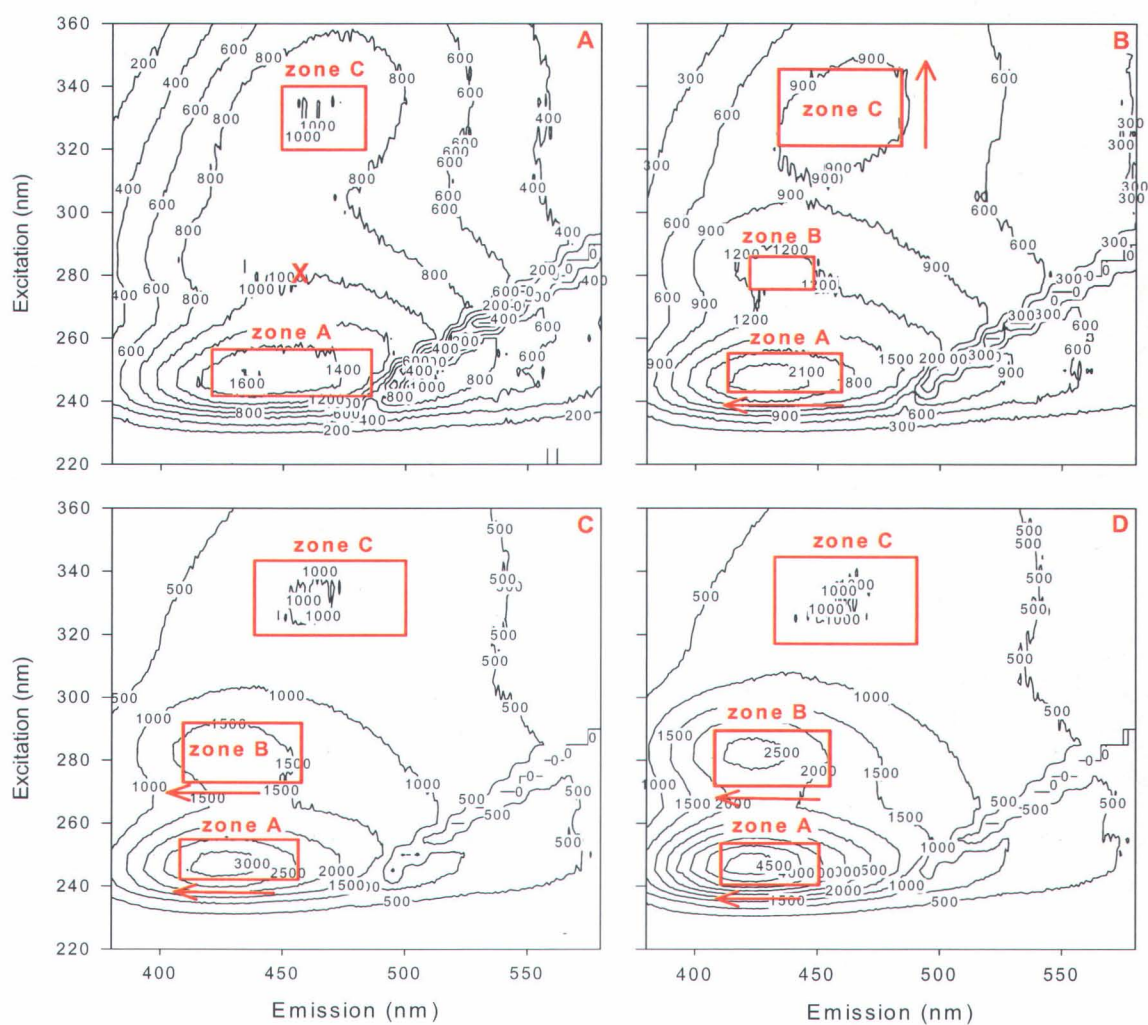


Figure 5.14 : Spectres en MEE des acides fulviques de la rivière Suwannee à pH 7 (A) en absence de DDC, (B) en présence de DDC 1,0 μM et de $[Cd] = 0 \text{ nM}$, (C) DDC 1,0 μM et $[Cd] = 2,4 \text{ nM}$ et (D) DDC 1,0 μM et $[Cd] = 162 \text{ nM}$.

5.5.2 Interactions possibles entre $Cd(L)_2^0$ et les SH

5.5.2.1 Considérations générales

Afin de déterminer quelles étaient les interactions entre les complexes présents et les substances humiques, nous avons émis deux hypothèses de mécanismes pouvant avoir lieu dans les systèmes ternaires Cd-SH-L. Tout d'abord, la littérature suggère que le cadmium pourrait servir de «pont» entre les ligands organiques et les substances humiques, formant ainsi un complexe ternaire SH-Cd-L (Powell et Town 1991 ; Larrivee *et al.* 2003). D'un autre côté, si nous considérons la lipophilicité des complexes étudiés (telle que démontrée par les mesures de D_{ow} , cf. section 4.5) et leurs constantes thermodynamiques de stabilité plutôt élevées, ces complexes pourraient directement interagir avec les noyaux hydrophobes des substances humiques. Si le premier mécanisme était effectif, alors une diminution de pH de 7 vers 5,5 augmenterait la compétition entre les protons H^+ et le Cd^{2+} libre pour se lier aux SH et aux L, conduisant par suite à une baisse en parallèle de la concentration du complexe ternaire et de l'effet sur l'intensité de fluorescence (augmentation ou atténuation) du système binaire de référence. À l'inverse, le deuxième mécanisme, qui implique des interactions hydrophobes, provoquerait un effet sur l'intensité de fluorescence qui augmenterait avec une baisse de pH de 7 vers 5,5 puisque les SH sont plus hydrophobes à mesure que le pH diminue (protonation).

Remarquons que la formation de complexes ternaires L-métal-SH pourrait aussi avoir lieu par l'intermédiaire du contenu en métaux des SH combiné à l'excès de ligand organique. Cependant, si un tel phénomène s'appliquait, il serait constant tout le long du titrage par le Cd des systèmes SH-L (puisque la concentration en SH demeure constante). Ainsi, le fait de titrer avec le Cd les systèmes SH-L permet d'observer seulement des changements de fluorescence dues à l'ajout de Cd.

5.5.2.2 Étude des résultats

Pour analyser l'effet de l'ajout de cadmium sur le comportement de fluorescence des substances humiques en présence de ligands organiques monomères, nous utilisons une fois de plus les paramètres issus des régressions non linéaires de type :

$$\text{ICF} = \langle a \rangle \ln([\text{Cd}]_T) + \langle b \rangle \quad \text{avec pour chaque problème } N = 5 \text{ et } r^2 > 0,84$$

En diminuant le pH, le paramètre «b» (valeur du plateau dans la modélisation mathématique) diminue lui aussi, et le paramètre «a» (pente initiale) diminue dans quasiment tous les cas à l'exception des systèmes Cd-(DDC et XANT)-MON dans lesquels le paramètre «a» augmente légèrement. Ces résultats signifient qu'en abaissant le pH, l'influence du Cd sur le comportement de fluorescence des systèmes binaires SH-L est à son tour diminué.

Par ailleurs, en se rapportant à la figure 5.17 et au tableau 5.6, et en se focalisant sur le paramètre «b» (plus ICF est grand, plus «b» est grand, autrement dit plus le Cd influence la fluorescence des systèmes SH-L), alors il se dégage trois zones qui traduisent des niveaux d'indice de changement de fluorescence différents.

Ces trois zones sont les suivantes :

- zone I : elle est indiquée en rouge dans le tableau 5.6 ; ce sont les interactions les plus fortes induites par le Cd sur le système SH-L et en particulier pour la fraction AF aux deux pH et le ligand DDC (quatre cas sur cinq) ;
- zone II : elle est indiquée en bleu dans le tableau 5.6 ; ce sont des interactions moyennes, il s'agit de la majorité des cas ;
- zone III : elle est indiquée en vert dans le tableau 5.6 ; ce sont des interactions faibles voire négligeables. Elles impliquent surtout l'oxine aux deux pH mais aussi les AF + XANT aux deux pH.

Notons aussi que la MON est la fraction qui, quelque soit le pH et le ligand, offre des interactions toujours fortes ou moyennes avec le Cd d'après l'étude du paramètre «b»

(zones I et II). Le contenu en métaux est le plus important dans cette fraction (cf. tableau 4.2 section 4.2), en particulier pour les cations majeurs (K^+ , Na^+), augmentant ainsi la force ionique initialement prévue (1 mM) beaucoup plus que pour les deux autres fractions (AH et AF). Or, une augmentation de force ionique favorise une contraction et une agglomération des substances humiques (Lochmüller et Saavedra 1986), soit ici la MON. Cependant, une telle agglomération ne devrait pas favoriser l'association SH-Cd-L, ce qui laisse entendre que des propriétés de la MON sont certainement encore inconnues.

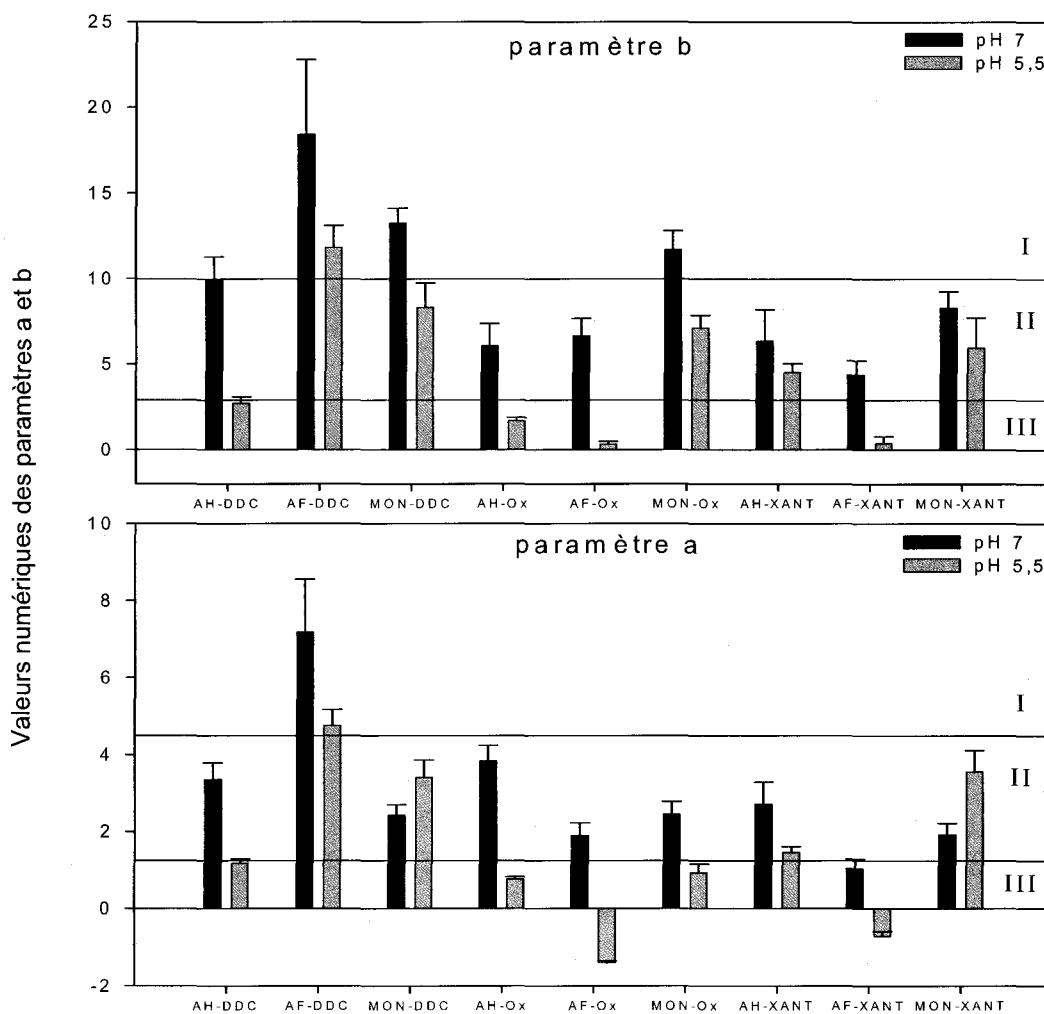


Figure 5.15 : Influence du titrage avec le Cd sur le comportement de fluorescence des systèmes SH-L. Le tableau 5.5 donne les différences statistiques observées pour cette figure permettant ainsi de l'alléger. L'explication des zones I, II et III se trouve dans le texte.

Tableau 5.5 : Différences statistiques ($P < 0,05$) sur les paramètres «a» et «b» dans les systèmes Cd-SH-L aux pH 7 et 5,5.

Test statistique	Paramètre	pH	Complexe étudié	Différence statistique avec le(s) complexe(s) :
Dunnett	a	pH 7	Cd-DDC-AF	tous
Dunnett	b	pH 7	Cd-DDC-AF	tous sauf Cd-DDC-MON et Cd-Ox-MON
Dunnett	a	pH 5,5	Cd-DDC-AF	tous
Dunnett	b	pH 5,5	Cd-DDC-AF	tous sauf Cd-DDC-MON
Newman-Keuls	a	pH 7	Cd-XANT-AF	Cd-(DDC et Ox et XANT)-AH
Newman-Keuls	b	pH 7	Cd-XANT-AF	Cd-DDC-(AH et MON) ; Cd-Ox-MON
Newman-Keuls	a	pH 7	Cd-Ox-AH	Cd-Ox-AF ; Cd-XANT-MON
Newman-Keuls	b	pH 7	Cd-DDC-MON	Cd-Ox-(AH et AF) ; Cd-XANT-(AH et MON)
Newman-Keuls	b	pH 7	Cd-Ox-MON	Cd-Ox-(AH et AF) ; Cd-XANT-AH
Newman-Keuls	a	pH 5,5	Cd-DDC-MON	Cd-(DDC et Ox)-MON ; Cd-XANT-AF ; Cd-(DDC et Ox et XANT)-AH
Newman-Keuls	a	pH 5,5	Cd-XANT-AF	Cd-(Ox et XANT)-MON ; Cd-(DDC et XANT)-AH ; Cd-Ox-AF
Newman-Keuls	a	pH 5,5	Cd-XANT-AF	Cd-(Ox et XANT)-MON ; Cd-(DDC et Ox et XANT)-AH
Newman-Keuls	a	pH 5,5	Cd-XANT-MON	Cd-Ox-(AF et MON) ; Cd-(DDC et XANT)-AH
Newman-Keuls	b	pH 5,5	Cd-DDC-MON	Cd-(Ox et XANT)-AF ; Cd-(DDC et Ox et XANT)-AH
Newman-Keuls	b	pH 5,5	Cd-Ox-MON	Cd-(Ox et XANT)-AF ; Cd-(DDC et Ox)-AH
Newman-Keuls	b	pH 5,5	Cd-XANT-MON	Cd-(DDC et Ox)-AH ; Cd-(Ox et XANT)-AF
Newman-Keuls	b	pH 5,5	Cd-XANT-AH	Cd-(Ox et XANT)-AF

Tableau 5.6 : Données numériques ayant servi à réaliser la figure 5.17. Les codes de couleurs représentent les zones (I en rouge, II en bleu et III en vert). Se référer au texte pour plus de détails.

		Valeurs de a		
		<i>Cd + DDC</i>	<i>Cd + Ox</i>	<i>Cd + XANT</i>
pH 7	<i>AH</i>	3,4 ± 0,4	3,8 ± 0,4	2,7 ± 0,6
	<i>AF</i>	7,2 ± 1,4	1,9 ± 0,3	1,0 ± 0,3
	<i>MON</i>	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,3	1,9 ± 0,3
pH 5,5	<i>AH</i>	1,2 ± 0,1	0,77 ± 0,06	1,5 ± 0,2
	<i>AF</i>	4,8 ± 0,4	-1,4 ± ,01	-0,71 ± 0,12
	<i>MON</i>	3,4 ± 0,4	0,9 ± 0,2	3,6 ± 0,6
		Valeurs de b		
		<i>Cd + DDC</i>	<i>Cd + Ox</i>	<i>Cd + XANT</i>
pH 7	<i>AH</i>	9,9 ± 1,3	6,1 ± 1,3	6,4 ± 1,8
	<i>AF</i>	18 ± 4,4	6,6 ± 1,0	4,4 ± 0,8
	<i>MON</i>	13 ± 0,9	12 ± 1,1	8,3 ± 0,9
pH 5,5	<i>AH</i>	2,7 ± 0,4	1,7 ± 0,2	4,5 ± 0,5
	<i>AF</i>	12 ± 1,3	0,33 ± 0,17	0,38 ± 0,40
	<i>MON</i>	8,3 ± 1,4	7,1 ± 0,8	6,0 ± 1,8

Le tableau 5.6 permet aussi de constater que pour une même fraction, le complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ influence le plus la fluorescence des SH, suivi des formes $\text{Cd}(\text{Ox})_n$ puis du $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ à pH 7. Quand le pH diminue jusqu'à 5,5 il n'y a pas d'ordre évident qui apparaît comme à pH neutre.

En résumé, du tableau 5.6 nous pouvons noter les points suivants :

- 1) à pH neutre et acide, le complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ réagit le plus (en combinant l'étude des paramètres «a» et «b») avec les AF, alors que les complexes $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ et $\text{Cd}(\text{Ox})_n$, quant à eux, interagissent davantage avec la MON ;
- 2) à pH neutre et acide, les AF réagissent plus fortement avec le $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ qu'avec les deux autres complexes (paramètres «a» et «b» les plus élevés) ;
- 3) à pH neutre, les AH réagissent le plus fortement avec le complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ alors qu'à pH acide ils réagissent le plus avec le complexe $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$;
- 4) à pH neutre la MON réagit le plus avec deux complexes, $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ et $\text{Cd}(\text{Ox})_n$;
- 5) à pH acide l'étude conjointe des paramètres «a» et «b» ne permet pas de dégager de tendance quant aux interactions les plus fortes de la MON avec un complexe en particulier.

Considérons maintenant les points suivants issus du tableau 5.7 :

- 6) l'étude des ratios pH 7 sur pH 5,5 pour chacun des paramètres «a» et «b» permet de conclure que les interactions SH-Cd-Ox sont significativement affectées par le pH, tout comme dans les systèmes AH-Cd-DDC et AF-Cd-XANT ;
- 7) deux cas voient un des deux paramètres diminuer significativement avec une baisse de pH mais pas l'autre, il s'agit des systèmes MON-Cd-DDC et MON-Cd-XANT ;
- 8) deux cas ne présentent aucune variation significative de leurs paramètres «a» et «b» quand le pH diminue ; il s'agit des systèmes AH-Cd-DDC et AF-Cd-XANT ;

Et finalement tenons compte des propriétés générales connues :

- 9) les D_{ow} des complexes $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ et $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ ne sont pas affectés par une variation de pH ; ce sont deux complexes hydrophobes ($\log D_{ow} > 1,7$) à l'inverse des formes $\text{Cd}(\text{Ox})_n$;

- 10) les substances humiques sont réputées être plus hydrophobes à pH acide que neutre puisqu'elles sont alors plus protonées (Stevenson 1994).

Tableau 5.7 : Compilation des différences statistiques (indiqué par un oui) induites par le pH sur les titrages par le Cd des systèmes SH-L ($P < 0,05$; test non pairé de Student). Se référer au texte pour plus de détails.

		Paramètre a		
		<i>Cd + DDC</i>	<i>Cd + Ox</i>	<i>Cd + XANT</i>
Effet du pH	<i>AH</i>	Oui	Oui	Oui
	<i>AF</i>	Non	Oui	Non
	<i>MON</i>	Non	Oui	Oui
		Paramètre b		
		<i>Cd + DDC</i>	<i>Cd + Ox</i>	<i>Cd + XANT</i>
Effet du pH	<i>AH</i>	Non	Oui	Non
	<i>AF</i>	Oui	Oui	Oui
	<i>MON</i>	Non	Oui	Non

5.5.2.3 Interactions possibles $Cd(L)_2^0$ -SH d'après les résultats

Selon les points 6 et 9, un abaissement du pH s'accompagne d'un abaissement des interactions entre les trois fractions de SH et les formes $Cd(Ox)_n$, cet abaissement étant corrélé à une diminution du D_{ow} de ce complexe. Ces observations suggèrent que le mécanisme 1, soit la formation de complexes ternaires serait prépondérant dans les systèmes SH-Cd-Ox. En outre, les points 4 et 5 indiquent que la MON interagit plus que les deux autres fractions avec les formes $Cd(Ox)_n$. Sachant que le contenu en métaux est beaucoup plus élevé dans la fraction MON que pour les AF ou les AH (pour une même concentration de carbone organique, cf. section 4.2), l'hypothèse de la formation de

complexes ternaires se précise puisque les métaux pourraient eux aussi participer à ces complexes ternaires avec l'excès d'oxine dans le milieu.

Dans les systèmes SH-Cd-(DDC ou XANT), une baisse de pH n'entraîne pas d'augmentation des valeurs de «a» ou «b» ; au contraire nous avons affaire à une absence d'effet voire à une diminution. Le fait que tantôt l'acidification du milieu n'ait aucun effet sur «a» et «b», alors que tantôt elle diminue leur valeur, nous amène à penser que la formation de complexes ternaires n'est pas le seul mécanisme impliqué. Il est envisageable que les mécanismes 1 et 2 aient cours simultanément entre ces deux complexes neutres hydrophobes et les SH. Ainsi les interactions de nature hydrophobe entre les SH et les complexes neutres (le $Cd(DDC)_2^0$ et le $Cd(XANT)_2^0$ ont des D_{ow} moyennement élevés), compenseraient la formation de complexes ternaires quelque soit le pH.

5.5.2.4 Vérification de l'hypothèse des interactions hydrophobes $Cd(L)_2^0$ -SH

Un moyen de vérifier que le mécanisme 2 n'est pas complètement exclu dans les interactions entre les complexes neutres et les substances humiques, est l'utilisation d'une relation empirique développée par Schwarzenbach *et al.* (1993). Cette relation (équation 5.2) relie le coefficient de partage d'un composé hydrophobe entre la matière organique (ici les SH) et la phase aqueuse (coefficient noté K_{om}), avec le coefficient de partage octanol-eau (D_{ow} , déterminé à la section 4.5).

$$(5.2) \quad \log K_{om} = 0,82 \cdot \log D_{ow} + 0,14$$

La relation 5.2 est valable pour des SH de toute taille, or dans notre étude nous avons filtré tous nos échantillons, autrement dit les SH sont de nature colloïdale. La distribution des complexes $Cd(L)_2^0$ qui se lient aux SH est donnée par la relation 5.3 :

$$(5.3) \quad K_{com} = \frac{[Cd(L)_2^0]_{coll}}{[Cd(L)_2^0]_{libre} \cdot [SH]}$$

où K_{com} (en $L \cdot kg^{-1}$) est le coefficient de partage entre le complexe $Cd(L)_2^0$ sorbé sur les SH ($[Cd(L)_2^0]_{coll}$ en $mol \cdot L^{-1}$) et le complexe $Cd(L)_2^0$ libre en solution ($[Cd(L)_2^0]_{libre}$ en $mol \cdot L^{-1}$), $[SH]$ est la concentration des SH en solution (en $kg \cdot L^{-1}$).

La conservation de masse pour le complexe $Cd(L)_2^0$ donne l'équation 5.4 :

$$(5.4) \quad [Cd(L)_2^0]_{total} = [Cd(L)_2^0]_{coll} + [Cd(L)_2^0]_{libre}$$

En combinant les équations 5.3 et 5.4 et en considérant que $K_{om} = K_{com}$ alors nous obtenons la relation 5.5 :

$$(5.5) \quad [Cd(L)_2^0]_{libre} = \frac{[Cd(L)_2^0]_{total}}{1 + K_{om} \cdot [SH]}$$

Le tableau 5.8 donne les résultats obtenus pour les trois complexes étudiés aux deux pH et pour l'exemple des AH (les résultats sont sensiblement les mêmes avec les AF et la MON). La concentration en AH est de $6,5 \text{ mg C} \cdot L^{-1}$ dans nos milieux d'exposition, ce qui donne en considérant 52,6% de carbone organique dans les AH de la rivière Suwannee (site Internet IHSS : <http://www.ihss.gatech.edu>) $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ kg AH} \cdot L^{-1}$. La concentration de $Cd(L)_2^0$ totale est de $0,38 \text{ nM}$ multiplié par la proportion de complexe $Cd(L)_2^0$, telle que déterminée à la section 4.4.4.

Tableau 5.8 : Constante théorique de distribution K_{om} entre un complexe $Cd(L)_2^0$ sorbé sur les AH et ce même complexe libre en solution calculée à partir du D_{ow} aux pH 7 et 5,5.

pH	$Cd(L)_2^0$	D_{ow}	K_{om} ($L \cdot kg^{-1}$)	$[AH]$ ($kg \cdot L^{-1}$)	$[Cd(L)_2^0]_{libre}$ (nM)	$[Cd(L)_2^0]_{coll}$ (% de $[Cd(L)_2^0]_{total}$)
5,5	$Cd(DDC)_2^0$	481	218	$1,2 \cdot 10^{-5}$	0,38	0,27
	$Cd(XANT)_2^0$	60	40	$1,2 \cdot 10^{-5}$	0,37	0,05
	$Cd(Ox)_2^0$	2	2	$1,2 \cdot 10^{-5}$	0,38	0,003
7	$Cd(DDC)_2^0$	270	136	$1,2 \cdot 10^{-5}$	0,38	0,17
	$Cd(XANT)_2^0$	56	37	$1,2 \cdot 10^{-5}$	0,36	0,05
	$Cd(Ox)_2^0$	66	43	$1,2 \cdot 10^{-5}$	0,38	0,05

Comme nous pouvons le constater, en faisant l'hypothèse d'interactions uniquement hydrophobes entre les complexes $Cd(L)_2^0$ et les SH, l'association est très faible dans tous les cas (moins de 0,3% du $Cd(L)_2^0$ total en solution).

5.5.2.5 Conclusion

La section 5.6.2 nous enseigne que les trois complexes neutres semblent largement interagir par l'intermédiaire de complexes ternaires avec les SH. Cependant, quand le pH diminue, les interactions entre les complexes $Cd(DDC)_2^0$ ou $Cd(XANT)_2^0$ avec les SH ne sont pas modifiées, voire sont légèrement diminuées. Nous pouvons alors évoquer la participation, limitée probablement, des interactions hydrophobes dans les mécanismes d'interactions $Cd(L)_2^0$ -SH qui compenseraient dans une certaine mesure la formation moins importante de complexes ternaires à pH 5,5 notamment.

5.5.3 Mise en relation de la fluorescence des systèmes SH-Cd-L avec les expériences de dialyse et de prise en charge

À des fins de comparaison, les expériences de dialyse menées avec les AH montrent (cf. section 4.3) que dans le cas du DDC, 70% du Cd est présent sous la forme d'un complexe SH-Cd-DDC non dialysable à pH 7 comparé à moins de 5% à pH 5,5. Une tendance semblable mais moins prononcée est observable pour les formes $\text{Cd}(\text{Ox})_n$ (22% d'association à pH 7 face à 14% à pH 5,5). A l'inverse, le $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ s'associe de manière identique aux deux pH (environ 72%). C'est bien ce que nous observons, qualitativement du moins, dans le titrage avec le Cd du système AH-Ox et nous pouvons expliquer cette diminution d'association AH-Cd-L entre le pH neutre et acide par une diminution de la probabilité de formation de complexes ternaires (compétition avec les protons accrue).

Dans les cas du DDC et du XANT, l'effet du pH en fluorescence ne permet pas de dégager une tendance générale (le paramètre «b» ne varie pas significativement avec une baisse du pH, cf. tableau 5.7). Ceci n'est pas en contradiction avec les résultats de dialyse pour l'association XANT-Cd-AH (absence d'effet de pH), mais dans le cas du DDC-Cd-AH la comparaison n'est pas évidente (effet marqué de l'acidification du système). Toutefois, il ne faut pas perdre de vue que ces deux techniques ne mesurent pas exactement la même chose. En effet, la dialyse discrimine entre les espèces dialysables ou non (autrement dit qui peuvent ou ne peuvent pas passer à travers la membrane à dialyse) tandis que les changements de fluorescence d'un système sont reliés à des changements de conformation des fluorophores en grande partie. Il est donc possible qu'une baisse de pH pour le système DDC-Cd-AH entraîne effectivement des modifications des interactions, mais que ces dernières ne soient pas décelables par la fluorescence en matrice d'excitation-émission.

Du point de vue des expériences de prise en charge des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ par des algues vertes, nous pouvons émettre certaines hypothèses quant aux effets de la présence de substances humiques. Ainsi, l'association entre les complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ que nous mesurons par dialyse et fluorescence signifie que le nouvel «ensemble» SH-Cd-L sera de taille trop grande pour être bioaccumulé par des algues microscopiques. Plus le paramètre «b» sera

grand, plus l'influence du Cd sur le comportement de fluorescence des systèmes SH-L sera grande. Ceci nous suggère que l'ensemble SH-Cd-L sera moins biodisponible pour des «b» grands, conduisant parallèlement à une prise en charge diminuée. Par ailleurs, d'après nos résultats de fluorescence il semblerait que l'association soit plus faible dans tous les cas à pH 5,5 par rapport à pH 7, ce qui nous mène à penser que la présence des SH à pH 5,5 aura moins d'effets sur la prise en charge qu'à pH 7. Ce point est cependant à nuancer puisqu'il faudra aussi le relier aux mesures de D_{ow} et aux effets des SH sur les membranes biologiques.

6. Résultats et discussion des expériences de prise en charge par *Chlamydomonas reinhardtii* en absence de substances humiques*

Avant d'étudier la bioaccumulation du Cd libre, du Cd en présence de ligands organiques et/ou de substances humiques chez *C. reinhardtii*, il est nécessaire d'étudier l'influence de ces ligands organiques ainsi que des substances humiques sur la croissance de cette algue verte. En effet, si l'ajout d'un L ou de SH affectait la croissance de l'algue, alors il serait délicat d'interpréter les résultats de bioaccumulation du Cd (prise en charge réelle ou bien due à un stress ?).

6.1 Potentiel toxique des ligands et des substances humiques envers *C. reinhardtii*

6.1.1 Potentiel toxique des ligands organiques

La figure 6.1 indique que pour une croissance étudiée sur 96 h, l'algue verte *C. reinhardtii* se comporte très différemment suivant le ligand organique ajouté. L'ajout de DDC n'influence pas significativement la croissance des algues (taux de croissance relatif = $116 \pm 18\%$) mais le rendement relatif, qui représente la densité algale maximale atteinte, est légèrement affecté (rendement relatif = $88 \pm 6\%$). Le XANT quant à lui paraît stimuler de façon significative et importante la croissance de cette algue (taux de croissance relatif = $130 \pm 11\%$ et rendement relatif = $172 \pm 19\%$). En ce qui concerne l'Ox, son effet saute aux yeux car il empêche toute croissance de l'algue (taux de croissance relatif = $-5 \pm 3\%$ et rendement relatif = $2,1 \pm 0,3\%$). En revanche ces observations ne permettent pas de

* sauf avis contraire, les barres d'erreurs sur les graphiques des sections 6 à 9 représentent un écart-type (N = 3).

conclure s'il s'agit d'un effet algistatique (les algues ne se reproduisent plus mais peuvent reprendre leur croissance dans un milieu exempt d'oxine) ou algicide (la présence d'oxine entraîne la mort des algues). Pour vérifier ce point nous avons mené une autre expérience de croissance de *C. reinhardtii* : 48 h de croissance pour une densité cellulaire initiale de 40 000 cell·mL⁻¹, récupération par centrifugation et 3 rinçages avec du milieu simplifié pour nettoyer les algues de leurs exsudats, exposition à 40 000 cell·mL⁻¹ pendant 30 min dans un milieu MHSM1 simplifié contenant [Ox] = 79 µM ; nouvelle étape de récupération par centrifugation et 3 rinçages avec du milieu simplifié pour finalement inoculer à 40 000 cell·mL⁻¹ un milieu de croissance «normal» et suivre la croissance sur 96 h. Cette manipulation a été réalisée en triplicata avec en parallèle un triplicata témoin (exposition 30 min dans MHSM1 simplifié sans Ox). Les résultats ont montré que *C. reinhardtii*, qu'elle soit exposée ou non à l'oxine pendant 30 min, reprenait sa croissance normalement, signifiant ainsi un effet algistatique de l'Ox sur l'algue.

Des expositions de 30 min aux ligands organiques DDC et XANT, comme lors des expériences de prise en charge, devrait avoir des effets minimes sur l'état physiologique de *C. reinhardtii*. En ce qui concerne l'Ox, le pouvoir algistatique de ce ligand devrait, pour un temps d'exposition court, avoir une influence relativement faible sur la physiologie des algues ; si l'Ox s'était avéré algicide, cela aurait été plus problématique.

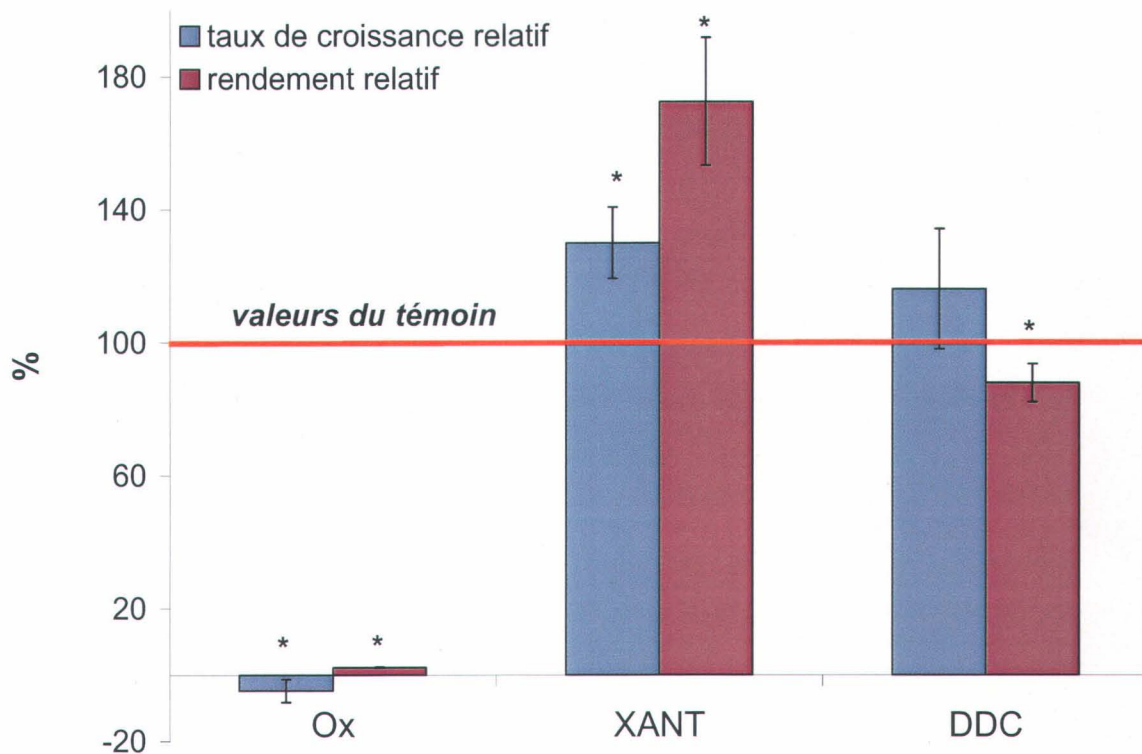


Figure 6.1: Effet des ligands organiques sur la croissance de l'algue *C. reinhardtii* à pH 7 (96 h) ; [Ox] = 79 μM ; [XANT] = 100 μM et [DDC] = 1 μM . Les valeurs rapportées sont calculées par rapport au témoin et les barres d'erreurs représentent l'écart-type expérimental en tenant compte de la propagation des erreurs (N = 6). Les étoiles indiquent des différences statistiquement significatives par rapport au témoin (P < 0,05 ; test t non pairé de Student).

6.1.2 Potentiel toxique des substances humiques

À la vue de la figure 6.2, il apparaît très clairement que les trois fractions de substances humiques n'ont pas d'effets négatifs sur la croissance de l'algue *C. reinhardtii* puisque le taux de croissance et le rendement relatif sont tous deux au-delà de 100%. Il semblerait même que la fraction MON stimule légèrement la croissance de cette algue car les deux paramètres étudiés sont significativement supérieurs à 100%. Ce dernier résultat pourrait

s'expliquer par la présence beaucoup plus importante d'éléments inorganiques dans la fraction MON par rapport aux fractions AH et AF (contenu appréciable en «cendres»). On parle ici de cations divers (par exemple : Ca, Mg, Na, Fe, K) et possiblement d'anions (par exemple PO_4^{2-}).

L'ajout de substances humiques ne devrait donc pas entraîner de perturbations sur la croissance des algues. En effet, pour une croissance de 96 h nous n'observons pas d'effets nuisibles alors que nos expériences de prise en charge n'excèdent pas 30 min. En revanche, tel que décrit dans l'introduction, il faut considérer la probabilité que les SH affectent la perméabilité de la membrane cellulaire.

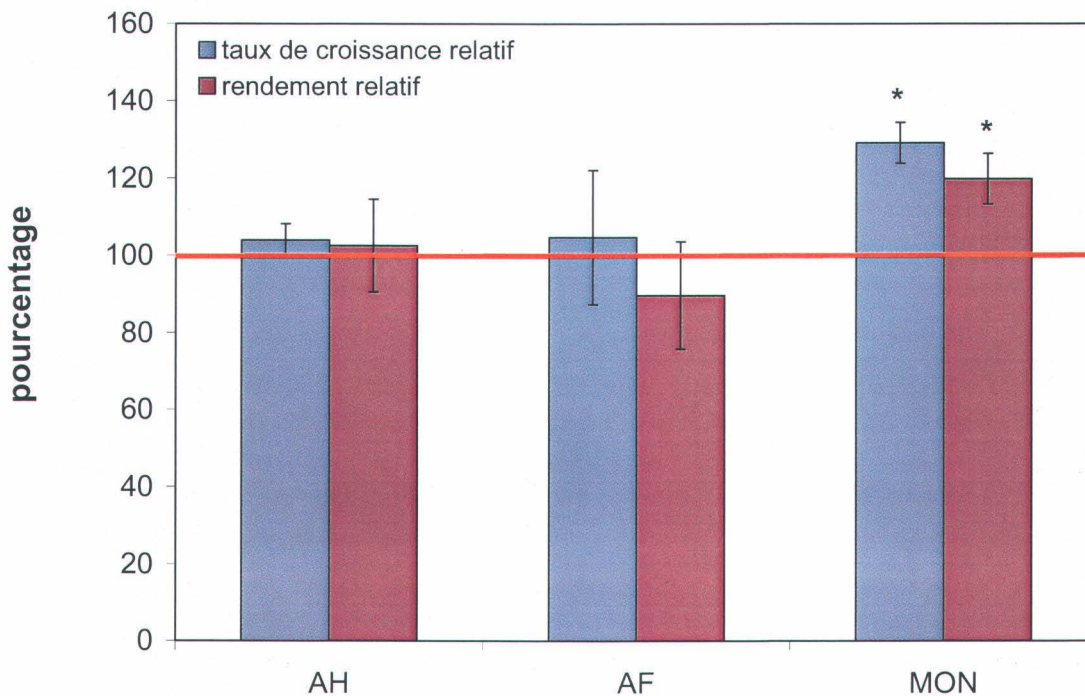


Figure 6.2 : Effets des trois fractions de substances humiques de la rivière Suwannee sur la croissance de l'algue *C. reinhardtii* (96 h) ; [SH] = 6,5 mg C·L⁻¹. Les valeurs rapportées sont calculées par rapport au témoin et les barres d'erreurs représentent l'écart-type expérimental en tenant compte de la propagation des erreurs (N = 6). Les étoiles indiquent des différences statistiquement significatives par rapport au témoin (P < 0,05 ; test t non païré de Student)

6.2 Coefficients de diffusion et d'internalisation

Le fait que nous travaillons avec une très faible concentration de Cd (0,38 nM) nous oblige à vérifier que nous n'avons pas de diminution de la concentration de Cd dans la phycosphère (zone non mélangée de quelques micromètres de largeur entourant la cellule) ; nous parlerons pour simplifier de perte de Cd. En effet, si de telles pertes de Cd avaient lieu, l'internalisation observée du Cd (représentée par J_{obs}) ne serait plus l'étape limitante. Cette dernière deviendrait l'apport du Cd de la phycosphère vers la surface cellulaire (représenté par J_{dif}), tel qu'illustré à la figure 6.3 (Lee *et al.* 2005). L'interprétation des résultats de bioaccumulation du Cd en présence des ligands organiques serait alors plus complexe puisqu'il faudrait tenir compte d'un gradient de concentration du Cd qui se formerait dans la phycosphère ainsi que de la participation des espèces labiles et non labiles à la prise en charge.

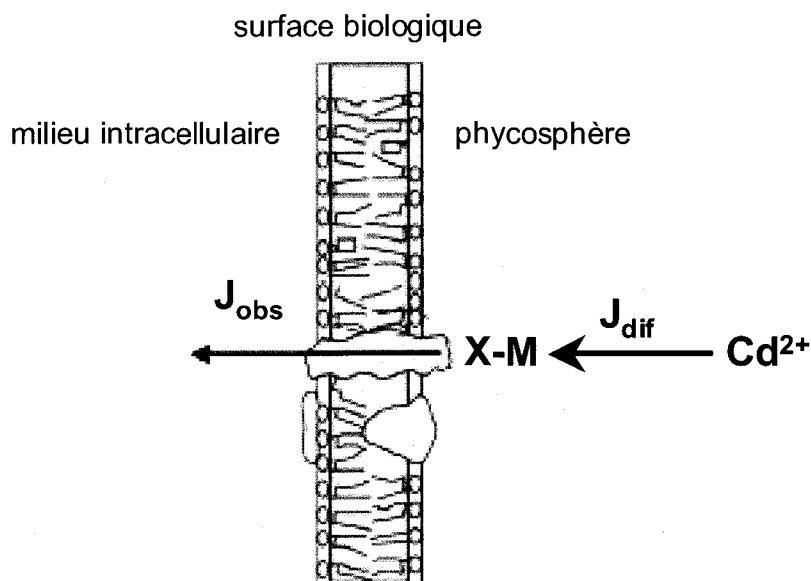


Figure 6.3 : Schéma explicatif des flux de diffusion (J_{dif}) et d'internalisation maximale observé (J_{obs}) du cadmium libre pour une algue.

L'équation 6.1 ci-dessous permet de calculer le flux de diffusion du cadmium de la solution d'exposition vers la surface cellulaire d'une algue (Fortin et Campbell 2000 ; Slaveykova et Wilkinson 2002) :

$$(6.1) \quad J_{dif} = D_{Cd^{2+}} \cdot ([Cd^{2+}]_s - [Cd^{2+}]_i) \cdot \left(\frac{1}{\delta} + \frac{1}{r}\right)$$

avec :

- $D_{Cd^{2+}}$ le coefficient de diffusion du cadmium libre à 25°C, issu des travaux de Li et Gregory (1974) ; il vaut $7,17 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$;
- $D_{Cd(L)^0}$ le coefficient de diffusion du cadmium en présence de ligand organique, environ 25% plus faible que celui du Cd^{2+} libre (Scally *et al.* 2006) ;
- $[Cd^{2+}]_s = 3,8 \cdot 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3}$, la concentration de cadmium dans la solution d'exposition ;
- $[Cd^{2+}]_i$ est la concentration de cadmium libre à la surface algale (sites X) que l'on suppose nulle ;
- δ est l'épaisseur de la couche de diffusion ; elle est égale à l'épaisseur de la phycosphère que l'on fixe de manière conservatrice à $20 \cdot 10^{-4} \text{ cm}$ (Vigneault et Campbell 2005) ; en effet, la mobilité de *C. reinhardtii* diminue l'épaisseur de cette couche de diffusion (environ 3 fois) ce qui augmenterait J_{dif} et par conséquent le ratio J_{dif}/J_{obs} ;
- r est le rayon de l'algue en cm (près de $3 \cdot 10^{-4} \text{ cm}$ aux pH 7 et 5,5 pour *C. reinhardtii*) ;
- J_{dif} est alors le flux de diffusion du Cd^{2+} vers l'interface cellulaire, ses unités étant en $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Quant au calcul de J_{obs} , nous utilisons la cinétique de prise en charge initiale du Cd, en présence ou non des ligands organiques, aux pH 5,5 et 7. La prise en charge (exprimé en $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}$) du temps le plus court (quelques minutes) est alors divisée par ce temps d'exposition (exprimé en s) afin d'obtenir un flux de prise en charge (ou d'internalisation) maximal dans les mêmes unités que J_{dif} .

Le tableau 6.1 donne les valeurs de J_{dif} et J_{obs} dans les différents systèmes. Il apparaît clairement que tous les systèmes ont un taux potentiel de diffusion du cadmium dans la phycosphère supérieur à celui de l'internalisation du cadmium dans la cellule, et ce en présence ou non de ligands organiques. Nous n'aurons donc pas à considérer de perte de cadmium dans la zone non agitée (phycosphère) de l'algue *C. reinhardtii* quelque soient le système et le pH étudiés. Selon Croot *et al.* (1999), la prise en charge du $\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$ est comparable à la vitesse de diffusion en solution pour toutes les espèces de phytoplancton étudiées hormis avec la cyanobactérie *Synechococcus leopoliensis*; dans ce cas les auteurs obtiennent des résultats semblables aux nôtres (l'étape limitante de la prise en charge est la diffusion à travers la membrane). Notons que cette cyanobactérie est aussi la seule espèce de leur étude qui est la plus proche de l'algue *C. reinhardtii* du point de vue de la taille ($7 \mu\text{m}^2$ pour *Synechococcus* comparé à $80 \mu\text{m}^2$ pour *C. reinhardtii* alors que les autres espèces de leur étude ont des superficies supérieures à $1\ 100 \mu\text{m}^2$).

Tableau 6.1 : Résultats des flux de diffusion et d'internalisation du Cd chez *C. reinhardtii* aux pH 5,5 et 7 en présence ou non de ligands organiques.

	système	r (cm)	J_{dif} ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	J_{obs} ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	$J_{\text{dif}}/J_{\text{obs}}$
pH 5,5	Cd^{2+}	$2,63\cdot 10^{-4}$	$1,17\cdot 10^{-14}$	$5,87\cdot 10^{-18}$	2 000
	Cd-DDC	$2,63\cdot 10^{-4}$	$2,93\cdot 10^{-15}$	$1,87\cdot 10^{-16}$	16
	Cd-XANT	$2,63\cdot 10^{-4}$	$2,93\cdot 10^{-15}$	$2,46\cdot 10^{-16}$	12
	Cd-Ox	$2,63\cdot 10^{-4}$	$2,93\cdot 10^{-15}$	$4,15\cdot 10^{-17}$	71
pH 7	Cd^{2+}	$2,74\cdot 10^{-4}$	$1,13\cdot 10^{-14}$	$9,34\cdot 10^{-18}$	1 200
	Cd-DDC	$2,74\cdot 10^{-4}$	$2,83\cdot 10^{-15}$	$7,45\cdot 10^{-16}$	4
	Cd-XANT	$2,74\cdot 10^{-4}$	$2,83\cdot 10^{-15}$	$7,34\cdot 10^{-16}$	4
	Cd-Ox	$2,74\cdot 10^{-4}$	$2,83\cdot 10^{-15}$	$3,77\cdot 10^{-16}$	8

6.3 Bioaccumulation du cadmium libre

Avant toute expérience en présence de ligand organique, il est nécessaire de déterminer les vitesses de prise en charge du Cd^{2+} pour l'algue étudiée en absence de tout ligand significatif. Les résultats obtenus rendent compte uniquement du cadmium intracellulaire ; le cadmium adsorbé à la surface cellulaire n'est pas inclus puisque le protocole dans ce cas-ci implique des rinçages à l'EDTA afin de retirer cette fraction du cadmium accumulé par les algues (Hassler *et al.* 2004a).

A l'étude de la figure 6.4, il apparaît que la prise en charge n'est que faiblement affectée par le pH. En effet, la cinétique de prise en charge peut se modéliser par une régression non linéaire, plus précisément une exponentielle à plafonnement :

$$(6.2) \quad \text{prise en charge} = \ll a \gg \cdot (1 - e^{-\ll b \gg \cdot \text{temps}})$$

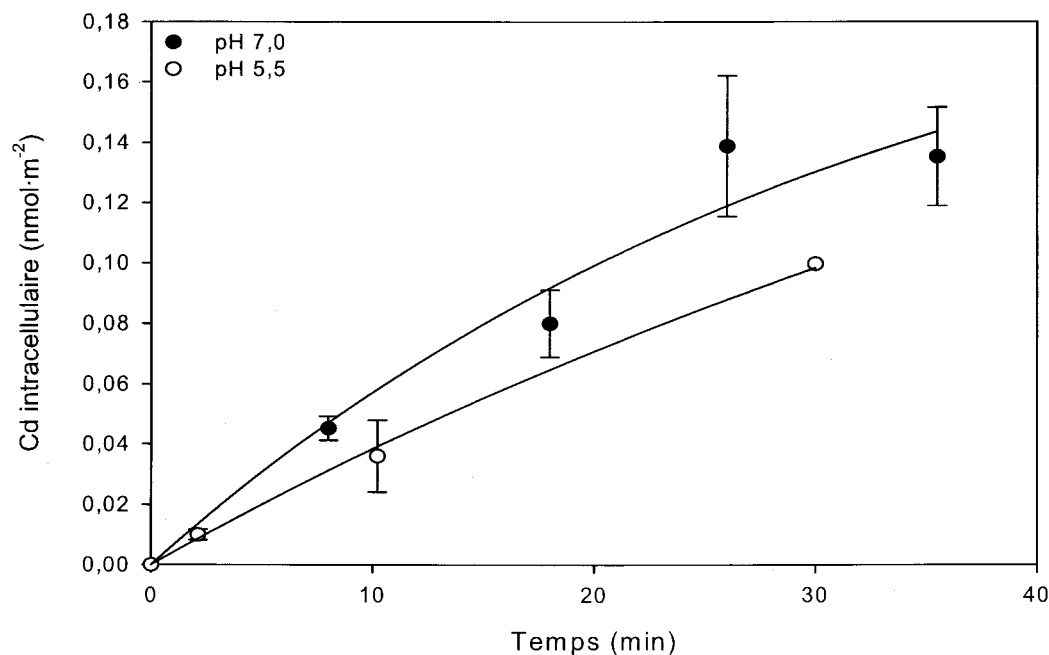


Figure 6.4 : Prise en charge intracellulaire du Cd^{2+} libre à pH 5,5 et 7 par *C. reinhardtii* exposée à 0,38 nM de Cd total. Les lignes représentent les régressions non linéaires appliquées aux deux groupes de points.

Nous obtenons alors deux équations à pH 7 et 5,5 (cf. tableau 6.2) qui ne sont pas différentes statistiquement ($P > 0,05$; test t non pairé de Student sur chacune des paires de paramètres «a» et «b»)

Tableau 6.2 : Compilation des paramètres «a» et «b» pour la prise en charge du Cd libre par *C. reinhardtii* aux pH 7 et 5,5.

	«a» (nmol·m ⁻²)	Erreur-type	«b» (min ⁻¹)	Erreur-type
Cd ²⁺ à pH 5,5	0,18	0,04	0,045	0,018
Cd ²⁺ à pH 7	0,18	0,02	0,045	0,009

Les travaux de Laura François (thèse en cours, communication personnelle) n'ont pas non plus montré d'effet significatif du pH sur la prise en charge du Cd²⁺ par *C. reinhardtii* dans la gamme de pH 5 à 7 pour des concentrations en Cd²⁺ inférieures à 100 nM.

Concernant ce faible effet de pH sur la prise en charge du Cd²⁺ à court terme par *C. reinhardtii*, elle pourrait s'expliquer par une constante de complexation du Cd (K_{Cd}) aux sites X de transport (cf. section 1.2) beaucoup plus grande que celle pour les protons H⁺ (K_H), ce qui s'écrit :

$$K_{Cd} \cdot [Cd^{2+}] > K_H \cdot [H^+]$$

$$\text{soit } K_{Cd} \cdot 10^{-7} > K_H \cdot 10^{-5,5}$$

$$\text{ou encore } K_{Cd} > 32 \cdot K_H.$$

Une autre raison, plus spéculative, impliquerait le mécanisme de passage transmembranaire de ce métal. En effet, le cadmium inorganique est pris en charge chez *C. reinhardtii* par l'intermédiaire de protéines de la famille des NRAMP (protéines de macrophages associées à la résistance naturelle) qui sont sélectives pour la prise en charge de certains métaux

divalents tels que le Mn, le Cu, le Fe et le Cd mais pas le Zn (Rosakis et Koster 2005). Avec ces protéines, la prise en charge des cations se fait par co-transport avec les protons H^+ . Or, d'après le BLM (cf. section 1.2), les protons H^+ entrent en compétition avec les métaux divalents pour les sites membranaires de transport, conduisant ainsi à une diminution de bioaccumulation du métal étudié. Il s'en suit que la baisse du pH de 7 à 5,5 aura deux effets qui se compensent : i) favoriser le co-transport puisque la concentration de H^+ augmente avec une diminution du pH, ii) défavoriser la liaison du Cd^{2+} aux sites de transport (compétition H^+ - Cd^{2+} d'après le BLM) ; ces deux effets s'annuleraient alors dans notre cas.

Par ailleurs, la littérature en biologie cellulaire et moléculaire semble passer sous silence des effets dus à une variation de pH. Il se pourrait que le pH induise des effets au niveau de la conformation des protéines de transport membranaire, mais ici cet effet serait faible pour un temps d'exposition court (< 30 min). Il est cependant envisageable que les effets de compétition métaux-protons soient visibles plutôt pour des concentrations plus fortes que les nôtres (Laura François, doctorante à l'INRS-ETE, communication personnelle).

6.4 Modélisation de la bioaccumulation des complexes neutres

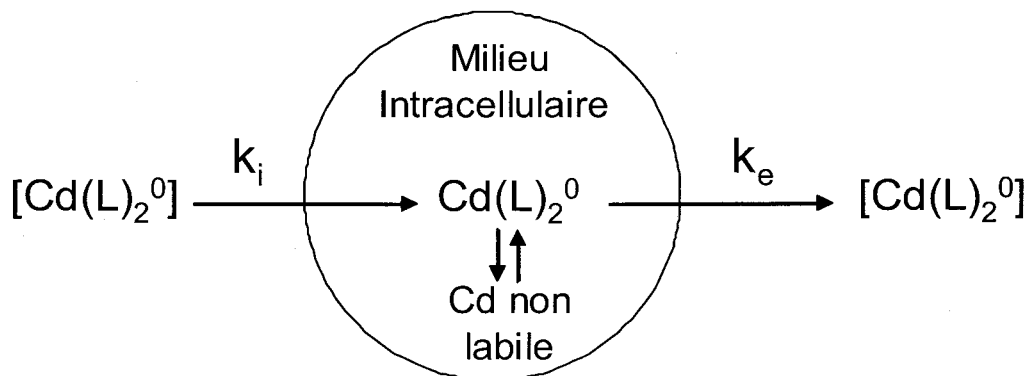


Figure 6.5 : Schéma de la bioaccumulation du Cd en présence de ligands organiques ($Cd(L)_2^0$) par une algue verte unicellulaire. Les constantes k_i et k_e sont respectivement pour l'internalisation et l'élimination du Cd ; le «Cd non labile» correspond au Cd qui se trouve à l'intérieur de la cellule et qui ne participe pas à l'élimination.

Considérons un modèle de bioaccumulation du cadmium sous forme de complexe hydrophobe (associé aux ligands organiques) analogue à celui développé par Spacie et Hamelink (1982) pour des composés hydrophobes. Pour une concentration de complexe $[Cd(L)_2^0]$, la constante k_i décrit l'entrée du cadmium tandis que k_e représente l'élimination du cadmium accumulé au niveau intracellulaire ($[Cd]_a$) par l'algue (cf. figure 6.5). Il faut tenir compte par ailleurs de la concentration de Cd non labile ($[Cd]_{nl}$) à l'intérieur de la cellule. Cette quantité de Cd est accumulée par l'algue mais n'est pas «disponible» pour en être éliminé. Nous avons observé cette concentration de Cd résiduel sur nos courbes d'élimination (cf. figure 6.6). L'équation 6.3 traduit ce modèle :

$$(6.3) \quad \frac{d[Cd]_a}{dt} = k_i \cdot [Cd(L)_2^0] - k_e \cdot ([Cd]_a - [Cd]_{nl})$$

Cette équation se résout comme une équation différentielle linéaire avec second membre, en utilisant une solution particulière du problème. Une telle solution particulière peut s'obtenir à l'état stationnaire où nous avons :

$$(6.4) \quad \frac{d[Cd]_a}{dt} = k_i \cdot [Cd(L)_2^0] - k_e \cdot ([Cd]_a - [Cd]_{nl}) = 0$$

ce qui donne après réarrangement de l'équation ci-dessus la concentration de métal intracellulaire à l'état stationnaire $[Cd]_a^{es}$ (6.5):

$$(6.5) \quad [Cd]_a^{es} = \frac{k_i \cdot [Cd(L)_2^0] + k_e \cdot [Cd]_{nl}}{k_e}$$

Au final, nous obtenons comme solution de l'équation 6.3 :

$$(6.6) \quad [Cd]_a = \frac{k_i \cdot [Cd(L)_2^0] + k_e \cdot [Cd]_{nl}}{k_e} \cdot (1 - e^{-k_e \cdot t})$$

L'équation 6.6 a la même forme que l'équation 6.2 mais l'équation 6.2 modélise les points expérimentaux tandis que l'équation 6.6 représente une bioaccumulation théorique. La comparaison entre ces deux modèles sera présentée dans les sections suivantes.

Pour extraire les constantes de l'équation 6.6, nous calculons tout d'abord la constante k_e d'élimination du cadmium intracellulaire en min^{-1} . Pour cela nous avons conduit des expériences d'élimination du Cd pour tous nos systèmes $Cd(L)_2^0$ de la manière suivante : les algues sont exposées pendant 30 min au cadmium en présence du ligand souhaité. Ensuite, les algues sont récupérées, rincées puis inoculées dans un milieu propre (ni cadmium ni ligand) dans lequel nous suivons le cadmium qui demeure à l'intérieur des cellules en fonction du temps (cf. figure 6.6).

Du point de vue de la modélisation, nous considérons que la concentration externe $[Cd(L)_2^0]$ au temps zéro est nulle dans ces expériences d'élimination et qu'elle demeure négligeable tout au long. En effet, la concentration de $Cd(L)_2^0$ maximale dans le milieu externe, en supposant la sortie complète du Cd contenu dans les cellules algales, serait toujours inférieure à 0,02 nM (comparée à 0,38 nM dans les milieux d'exposition pour les expériences de prise en charge). L'équation 6.3 devient alors :

$$(6.7) \quad \frac{d[Cd]_a}{dt} = -k_e \cdot ([Cd]_a - [Cd]_{nl})$$

La résolution de l'équation 6.7 entre $t = 0$ et t , donne :

$$(6.8) \quad [Cd]_a = [Cd]_{nl} + ([Cd]_a^0 - [Cd]_{nl}) \cdot e^{-k_e \cdot t}$$

Nous pouvons alors modéliser avec cette équation nos points expérimentaux des expériences d'élimination ($[Cd]_a^0$ est la quantité de Cd au temps zéro des expériences d'élimination) afin d'extraire k_e .

Dans un deuxième temps, nous considérons que pour un temps très court, l'élimination du Cd est négligeable et la concentration de Cd intracellulaire est nulle (voir plus haut), autrement dit il ne reste que :

$$(6.9) \quad \frac{d[Cd]_a}{dt} = k_i \cdot [Cd(L)_2^0] = k'_i$$

où k'_i revient à J_{obs} exprimé en $nmol \cdot m^{-2} \cdot min^{-1}$ dans le tableau 6.1.

Enfin, pour que l'équation 6.6 soit totalement connue, il manque à déterminer k_i , ce que nous faisons avec l'équation 6.10 :

$$(6.10) \quad k_i = \frac{J_{obs} \cdot [cell] \cdot A}{[Cd(L)_2^0]_{total}}$$

avec J_{obs} = la constante telle que déterminée plus haut ($mol \cdot m^{-2} \cdot min^{-1}$) ; $[cell]$ = la densité cellulaire moyenne de nos expériences ($15 \cdot 10^6 \text{ cell} \cdot L^{-1}$) ; A = la superficie moyenne de l'algue ($94 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{cell}^{-1}$ à pH 7 et $87 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{cell}^{-1}$ à pH 5,5) ; et $[Cd(L)_2^0]_{total} = 0,38 \text{ nM}$.

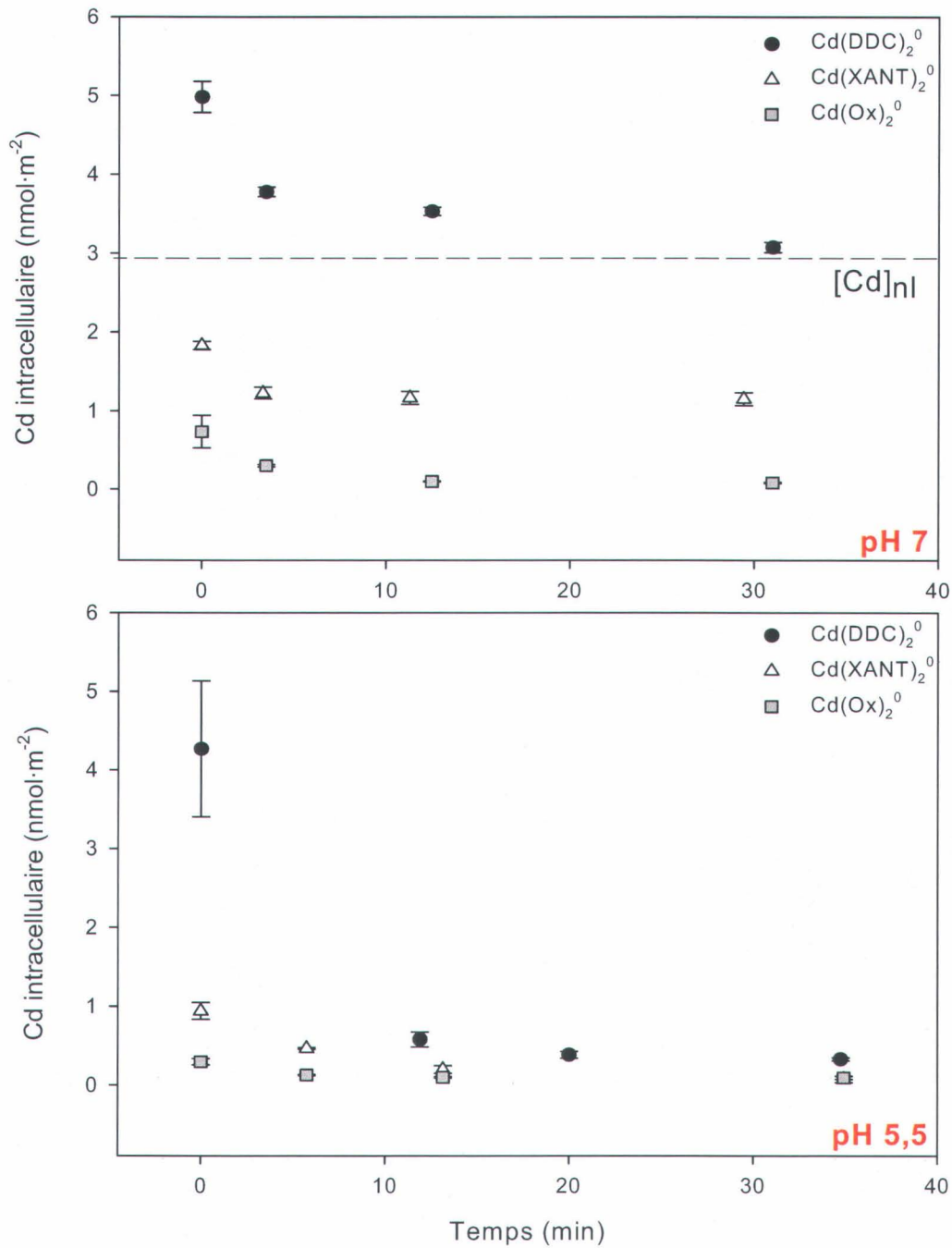


Figure 6.6 : Expériences d'élimination : concentrations en Cd demeurant dans les cellules algales (*C. reinhardtii*) aux pH 7 et 5,5 en fonction du temps. A titre d'exemple, nous illustrons ici par la ligne en pointillée la signification expérimentale de $[Cd]_{nl}$, la quantité de Cd non labile dans le cas du Cd-DDC à pH 7 (cf. le modèle pour plus de détails).

Nous remarquons sur la figure 6.6 qu'un plateau est atteint rapidement, en 30 min dans les six cas. Ce plateau correspond au Cd intracellulaire non labile, tout le Cd pouvant être éliminé étant donc sorti de la cellule algale dans les 30 min.

Jusqu'ici, nous avons donc réussi à obtenir la constante k_e pour les trois systèmes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ aux deux pH (7 et 5,5), en tenant compte judicieusement de la présence d'une quantité de Cd non labile présent à temps zéro dans les expériences d'élimination. Pour les expériences de prise en charge, à temps zéro, la concentration intracellulaire de Cd non labile est nulle. Cette concentration augmente avec le temps et nous amène à nous demander quelle est la nature chimique du Cd non labile. Nous savons déjà que lorsque des algues sont exposées à du Cd^{2+} seul, k_e est alors nulle (Hassler *et al.* 2004a) puisque le Cd demeure à l'intérieur de la cellule (la quantité de cadmium non labile vaut alors 100% du Cd total), lié aux phytochélatines majoritairement tel que démontré par Hu *et al.* (2001). Dans le cas de nos systèmes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$, la proportion de Cd non labile face au cadmium total est dépendante du devenir intracellulaire de ces complexes. Ainsi, la présence de $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ qui ne se dissocie pas dans le cytosol de l'algue entraîne une constante d'élimination élevée, soit $[\text{Cd}]_{\text{nl}} = 0 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}$ (cf. cas 1 figure 6.7), alors que si le complexe $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ se dissocie totalement, nous avons $[\text{Cd}]_{\text{nl}} = [\text{Cd}]_{\text{total}}$ (cf. cas 2 figure 6.7). Par ailleurs, la constante d'élimination k_e pour des composés hydrophobes, tels que les complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$, est inversement proportionnelle à leur D_{ow} (Kooijman *et al.* 2004). C'est bien ce que nous observons aux deux pH pour les complexes $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ et $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$: le $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ a des D_{ow} plus élevés aux pH 7 et 5,5 et des k_e plus faibles que ceux du $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ (cf. tableau 6.3). Le cas des formes $\text{Cd}(\text{Ox})_n$ à pH 7 et 5,5 est particulier (présence de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ non négligeable ?) et il est traité à la section 6.8.

En ce qui concerne le Cd non labile, ses proportions sont semblables à pH 7 lors de la prise en charge des complexes $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ et $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ (respectivement 66% et 63%). A pH 5,5 la proportion de Cd non labile demeure la même dans le cas du $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ tandis qu'elle chute à 9% dans le cas du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$. Dans le cas des formes $\text{Cd}(\text{Ox})_n$, les proportions de Cd labile sont de 11% et 37% du Cd total respectivement à pH 7 et 5,5. Ces résultats indiquent que 1) dans tous les systèmes une partie des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ reste

«libre» dans le cytosol et peut être éliminée alors que l'autre partie se dissocie et 2) que la répartition du Cd entre ces deux fractions est sensible à une variation de pH (sauf pour le $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$).

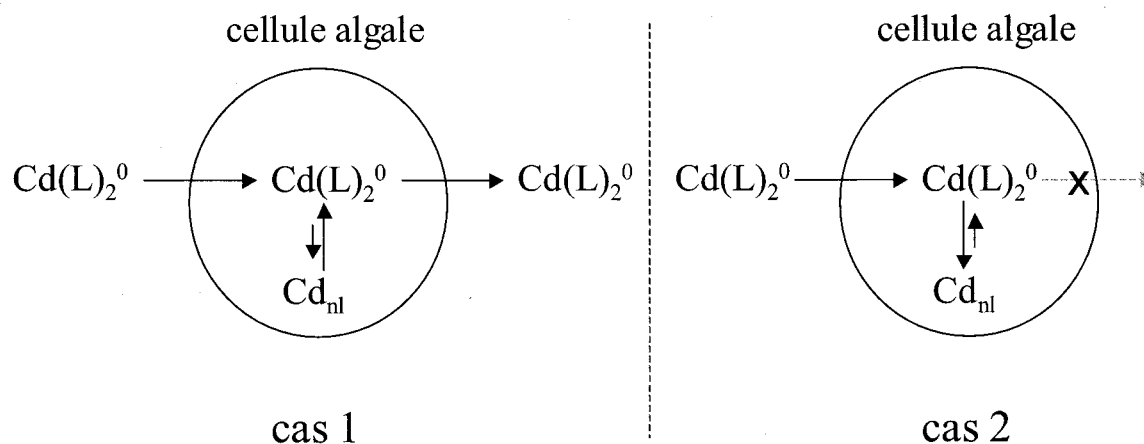


Figure 6.7 : Schéma de l'élimination du Cd suivant un comportement analogue à un composé organique lipophile (cas 1) ou suivant un comportement comparable à celui du Cd^{2+} (cas 2).

Nous ne connaissons pas l'évolution du Cd non labile en fonction du temps lors des expériences d'accumulation. Néanmoins, pour simplifier notre équation 6.6 nous allons supposer que la fraction de Cd non labile est constante tout le long de l'exposition. Nous calculons donc tout d'abord la proportion de Cd labile (C , sans unité) sur le plateau d'élimination (cf. l'exemple pour le système Cd-DDC à pH 7 sur la figure 6.6) par l'équation suivante :

$$(6.11) \quad C = 1 - \frac{[\text{Cd}]_{nl}}{[\text{Cd}]_a^{es}}$$

L'équation 6.6 qui modélise l'évolution de la concentration de Cd intracellulaire dans les expériences de prise en charge devient alors :

$$(6.12) \quad [Cd]_a = \frac{k_i \cdot [CdL_n]}{C \cdot k_e} \cdot (1 - e^{-k_e \cdot C \cdot t})$$

Les valeurs des paramètres C, k_e , k_i et «a» (prise en charge à l'état stationnaire) en fonction du pH et des L sont regroupées dans le tableau 6.3 et discutées dans les sections suivantes. Notons que pour le cas du système Cd-Ox, nous supposons pour le moment et pour les calculs qui suivent, que plus de 99,9% du Cd est présent sous la forme $Cd(Ox)_2^0$. Cette hypothèse est fautive (cf. section 4.4.4) mais la section 6.8 examine en détail ce système particulier du point de vue de la spéciation.

Tableau 6.3 : Compilation des constantes C (équation 6.11) , k_e (équation 6.8), «a» (équation 6.2 appliquée à la prise en charge des $Cd(L)_2^0$) et k_i (équation 6.10) pour *C. reinhardtii* aux pH 7 et 5,5 (\pm l'erreur-type).

	système	k_i ($10^{-4} \cdot \text{min}^{-1}$)	k_e (min^{-1})	C	«a» ($\text{nmol} \cdot \text{m}^{-2}$)
pH 7	$Cd(DDC)_2^0$	20 ± 3	$0,325 \pm 0,059$	$0,344 \pm 0,055$	$4,4 \pm 0,2$
	$Cd(XANT)_2^0$	16 ± 4	$0,685 \pm 0,017$	$0,368 \pm 0,018$	$2,2 \pm 0,1$
	* $Cd(Ox)_2^0$	$6,0 \pm 0,9$	$0,313 \pm 0,002$	$0,886 \pm 0,032$	$0,80 \pm 0,03$
pH 5,5	$Cd(DDC)_2^0$	$2,8 \pm 0,9$	$0,224 \pm 0,002$	$0,914 \pm 0,019$	$0,43 \pm 0,01$
	$Cd(XANT)_2^0$	$6,6 \pm 1,3$	$0,356 \pm 0,007$	$0,341 \pm 0,027$	$0,94 \pm 0,06$
	* $Cd(Ox)_2^0$	$0,8 \pm 0,2$	$0,115 \pm 0,001$	$0,633 \pm 0,051$	$0,25 \pm 0,01$

* se référer à la discussion de la section 6.8.

6.5 Prise en charge et élimination des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ par *C. reinhardtii* à pH 7

La comparaison des courbes des cinétiques de prise en charge des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ à pH 7 (cf. figure 6.8) avec celle de prise en charge du Cd^{2+} seul, toujours à pH 7 (cf. figure 6.4), démontre très clairement que la prise en charge des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ est beaucoup plus élevée que celle du Cd^{2+} seul. Ceci confirme ce que l'on retrouve dans la littérature (Poldoski 1979 ; Ahsanullah et Florence 1984 ; Florence et Stauber 1986 ; Florence *et al.* 1992 ; Phinney et Bruland 1994 ; Phinney et Bruland 1997a ; Phinney et Bruland 1997b ; Croot *et al.* 1999).

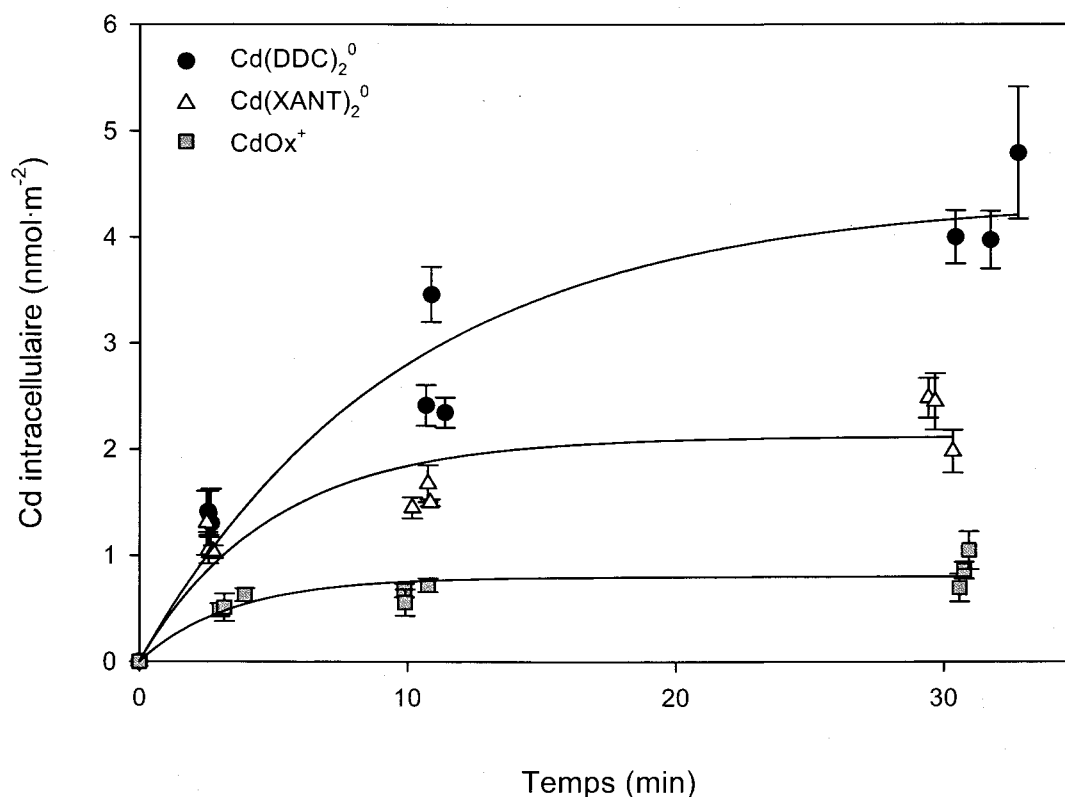


Figure 6.8 : Cinétiques de prise en charge des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ à pH 7 par *C. reinhardtii* accompagnées de leur régression non linéaire (équation 6.2). Les neuf points pour chaque système sont issus de trois expériences indépendantes avec chacune trois points.

Si nous comparons maintenant le modèle théorique (équation 6.12) développé à la section 6.4 avec les points expérimentaux (figure 6.8), la concordance est bonne quelque soit le système à pH 7 (cf. figures 6.9.A, 6.10.A et 6.11.A). En effet, les points expérimentaux se trouvent dans l'intervalle (lignes en tirets) entourant les valeurs théoriques du modèle, intervalle calculé selon les erreurs-types sur C , k_i et k_e , et en tenant compte de la propagation des erreurs. Nous allons donc baser notre discussion sur les paramètres suivants : k_i (constante d'internalisation du cadmium déterminée expérimentalement, équation 6.10) ; k_e (constante d'élimination du cadmium déterminée d'après la résolution de l'équation 6.8) ainsi que «a» (prise en charge sur le plateau d'après l'équation 6.2 appliquée à la prise en charge des complexes $Cd(L)_2^0$ sur la figure 6.8).

Tableau 6.4 : Coefficients «a» et k_i (\pm erreur-type) pour les cinétiques de prise en charge des complexes $Cd(L)_2^0$ à pH 7 par *C. reinhardtii* et indication du D_{ow} (\pm écart-type).

pH 7	«a» (nmol·m ⁻²)	k_i (10 ⁻⁴ ·min ⁻¹)	D_{ow}
$Cd(DDC)_2^0$	4,36 \pm 0,20	20 \pm 3	270 \pm 28
$Cd(XANT)_2^0$	2,12 \pm 0,10	16 \pm 4	56 \pm 1
* $Cd(Ox)_n$	0,800 \pm 0,034	6,0 \pm 0,9	66 \pm 5
Cd^{2+}	0,18 \pm 0,04	0,20 \pm 0,02	5·10 ⁻³ \pm 1·10 ⁻³

* se référer à la discussion de la section 6.8.

Notons immédiatement que dans cette discussion, nous allons utiliser la formule $Cd(Ox)_n$ pour représenter le système Cd-Ox. En effet, il existe une certaine ambiguïté à propos de la spéciation du Cd en présence d'oxine. Nous traitons de ce cas particulier à la section 6.8.

Les valeurs de k_i des complexes $Cd(L)_2^0$ suivent l'ordre : $Cd(DDC)_2^0 \sim Cd(XANT)_2^0 > Cd(Ox)_n$ (~ indique qu'il n'existe pas de différences statistiques entre deux valeurs, soit $P >$

0,05 par une ANOVA à une voie ; test post hoc NSK). Ces complexes possèdent une constante k_i respectivement 93, 77 et 28 fois plus importante que celle pour le Cd^{2+} en absence de ligand organique (cf. tableau 6.4). La comparaison du paramètre «a», qui est relié à la bioaccumulation après 30 min, indique bien que les complexes $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$, $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$, $\text{Cd}(\text{Ox})_n$ sont respectivement 24, 12 et 4 fois plus bioaccumulés que le Cd^{2+} inorganique seul. L'ordre selon la valeur de «a» n'est pas modifié par rapport à celui observé pour k_i : $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0 > \text{Cd}(\text{XANT})_2^0 > \text{Cd}(\text{Ox})_n$ ($P < 0,001$; ANOVA à une voie ; test post hoc NSK). Enfin, l'ordre d'après la constante d'élimination du cadmium suit à pH neutre (cf. tableau 6.3) : $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0 > \text{Cd}(\text{Ox})_n \sim \text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ ($P < 0,05$; ANOVA à une voie ; test post hoc NSK).

Nous constatons donc que la prise en charge des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ est plus élevée que celle du Cd^{2+} seul à pH neutre. Cette prise en charge peut s'expliquer en partie par le D_{ow} des complexes mais pas totalement puisque l'ordre sur k_i n'est pas le même que pour le D_{ow} à pH 7 (les comparaisons selon «a» et k_e entre les complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ et le Cd^{2+} seul ne sont pas justifiées car k_e est quasi nulle et «a» n'est pas le plateau pour le Cd^{2+}). Phinney et Bruland (1994) constatent aussi cette absence de relation, toutefois dans leur étude, les D_{ow} sont calculés et non mesurés comme dans nos travaux. Par ailleurs, Fisher *et al.* (Fischer *et al.* 1998) notent bien que le coefficient de partage octanol-eau ne peut pas prédire correctement la capacité de diffusion d'un composé lipophile à travers une membrane, puisque l'octanol n'est pas anisotropique à l'inverse des membranes biologiques.

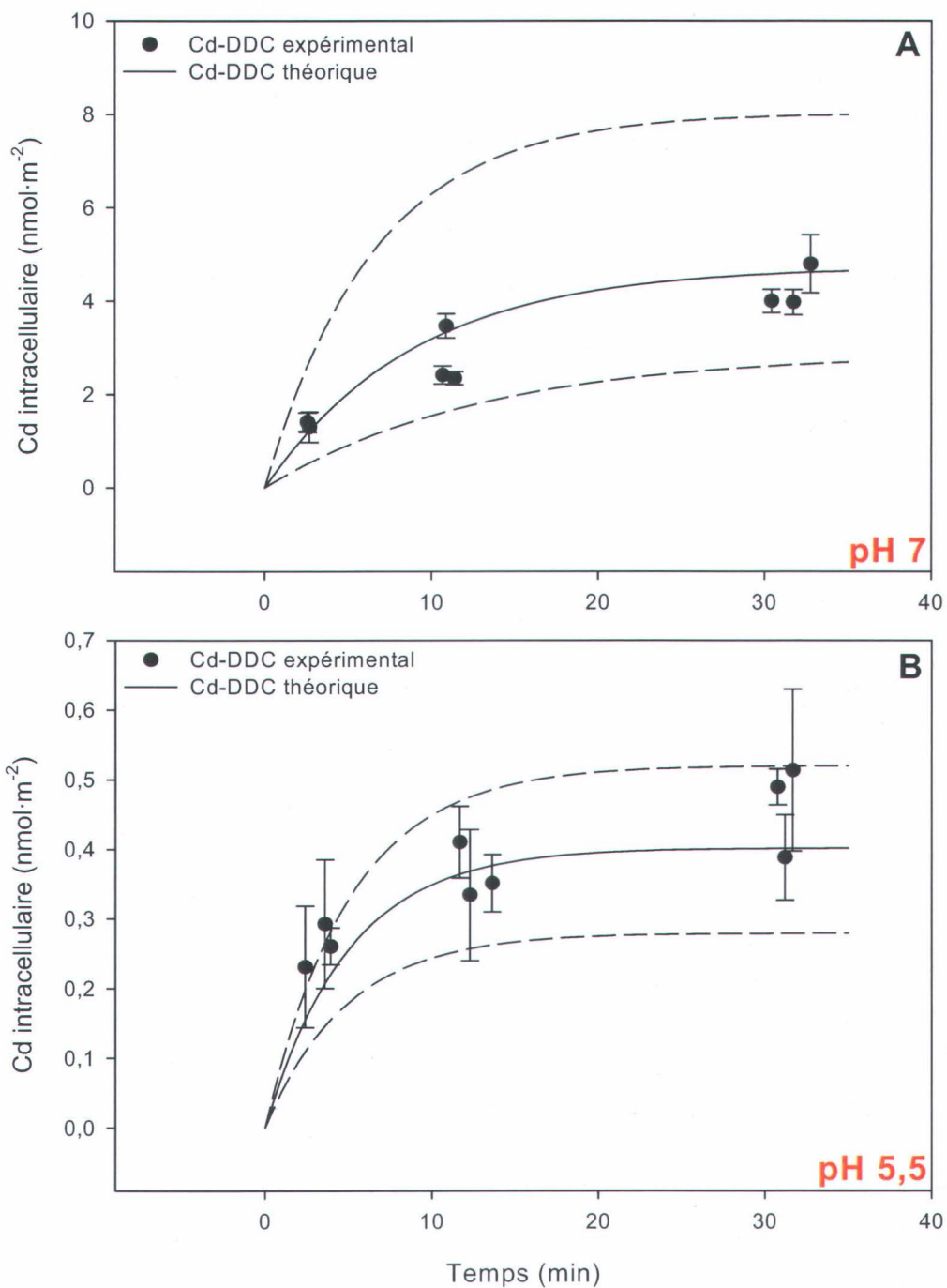


Figure 6.9 : Prise en charge expérimentale (points noirs) et théorique calculée en fonction de k_i et k_e (ligne noire) du complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par *C. reinhardtii* aux pH 7 et 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.

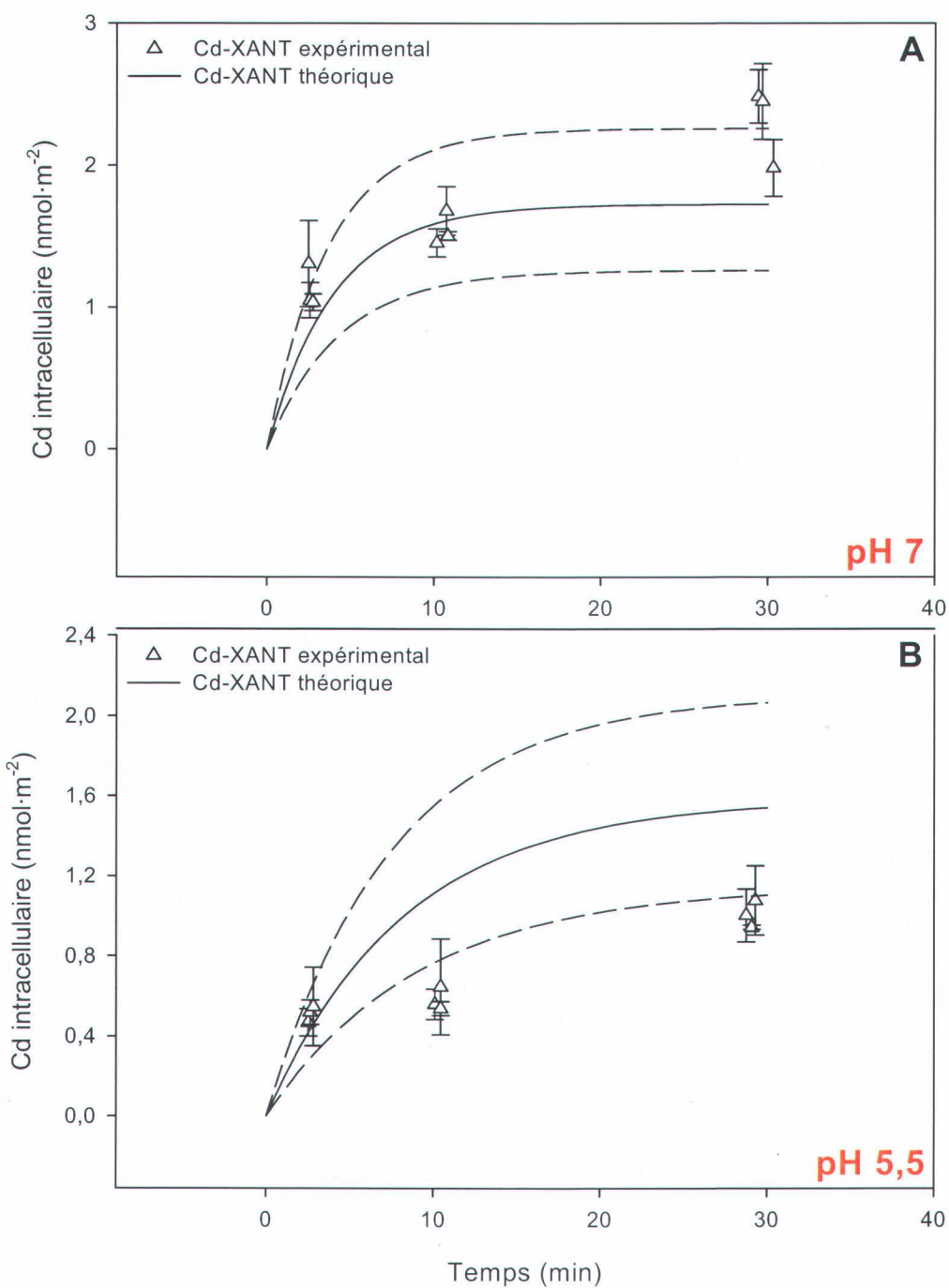


Figure 6.10 : Prise en charge expérimentale (triangles blancs) et théorique calculée en fonction de k_i et k_e (ligne noire) du complexe $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ par *C. reinhardtii* aux pH 7 et 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.

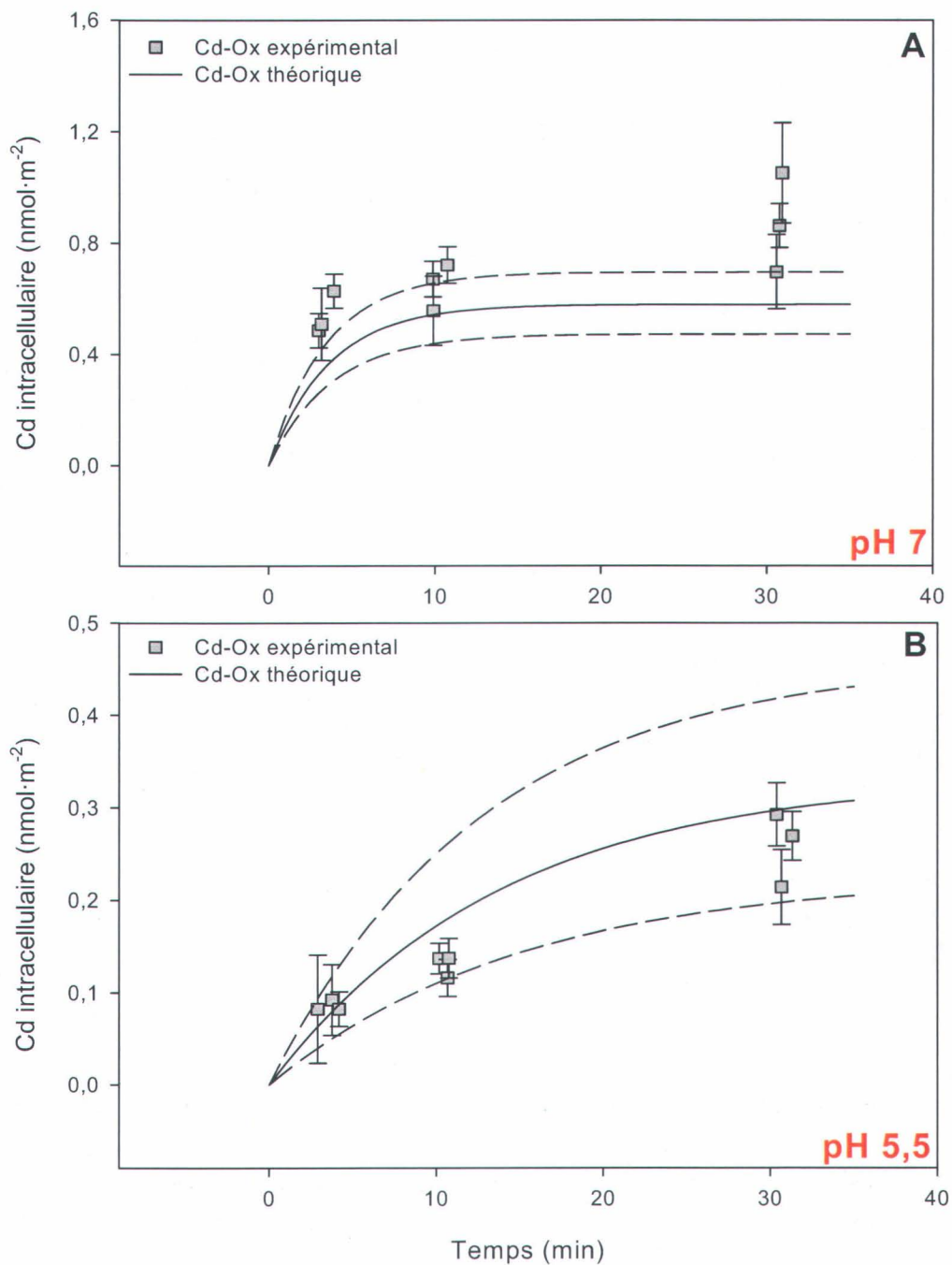


Figure 6.11 : Prise en charge expérimentale (carrés gris) et théorique calculée en fonction de k_i et k_e (ligne noire) du complexe $Cd(Ox)_2^0$ par *C. reinhardtii* aux pH 7 et 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.

6.6 Prise en charge et élimination des complexes Cd(L)_2^0 par *C. reinhardtii* à pH 5,5

L'ajustement du modèle avec les points expérimentaux est encore une fois relativement bon à pH 5,5 (cf. figure 6.9.B et 6.11.B) à l'exception du cas Cd-XANT pour lequel le modèle surestime la prise en charge (cf. figure 6.10.B). Un tel écart entre les points expérimentaux et la modélisation de la prise en charge du complexe Cd(XANT)_2^0 ne s'explique pas par la sensibilité du modèle aux constantes puisque'il faudrait faire varier de plus de 40% indépendamment la valeur de k_i , k_e ou C afin de caler le modèle aux valeurs expérimentales. Nous n'avons pour le moment pas d'explication quant à cette différence.

La comparaison des courbes de cinétique de prise en charge des complexes Cd(L)_2^0 (cf. figure 6.12) avec celle de la prise en charge du Cd^{2+} seul à pH 5,5 (cf. figure 6.4), montre encore une fois que la prise en charge des complexes Cd(L)_2^0 est plus élevée que celle du Cd^{2+} seul, mais dans une moindre mesure qu'à pH neutre. Les comparaisons des constantes k_i (constante d'internalisation du Cd) donnent avec le cadmium libre les écarts suivants : 23, 54 et 7 fois, respectivement pour les complexes Cd(DDC)_2^0 , Cd(XANT)_2^0 , Cd(Ox)_n par rapport au Cd^{2+} à pH 5,5. Selon k_i , l'ordre des complexes neutres est donc : $\text{Cd(XANT)}_2^0 > \text{Cd(DDC)}_2^0 > \text{Cd(Ox)}_n$ (> indique des différences statistiques entre deux valeurs soit $P < 0,05$ par une ANOVA à une voie ; test post hoc NSK). En revanche, la comparaison des paramètres «a» entre les complexes Cd(L)_2^0 et le Cd^{2+} seul n'est pas justifiée car l'équilibre n'est pas atteint au niveau de la prise en charge du Cd^{2+} à pH 5,5 (cf. figure 6.4). Les paramètres «a» des complexes Cd(L)_2^0 suivent l'ordre : $\text{Cd(XANT)}_2^0 > \text{Cd(DDC)}_2^0 > \text{Cd(Ox)}_n$ (cf. tableau 6.5). En ce qui concerne k_e , l'ordre est le même que celui observé pour le paramètre «a» : $\text{Cd(XANT)}_2^0 > \text{Cd(DDC)}_2^0 > \text{Cd(Ox)}_n$. Les trois complexes suivent toujours le même ordre que nous étudions k_i , k_e ou «a», mais encore une fois l'ordre n'est pas forcément relié au D_{ow} des complexes Cd(L)_2^0 à pH 5,5.

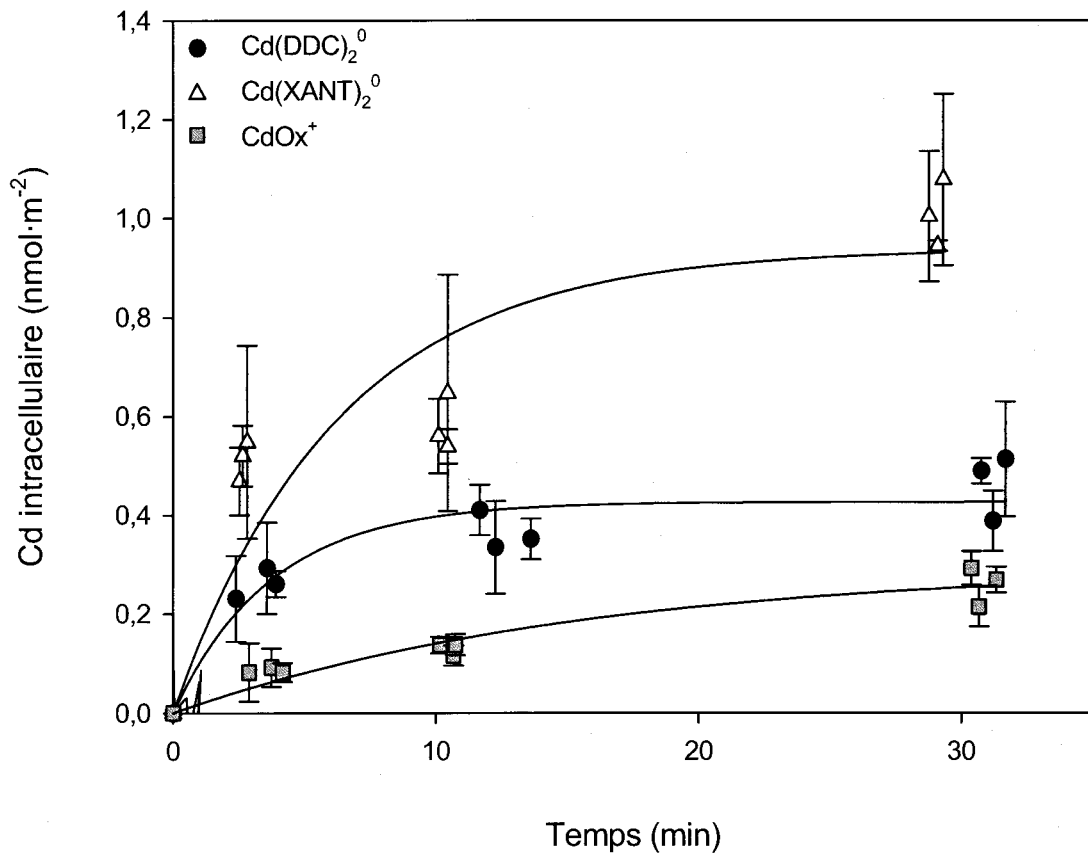


Figure 6.12 : Cinétiques de prise en charge des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ à pH 5,5 par *C. reinhardtii* accompagnées de leur régression non linéaire (équation 6.2). Les neuf points pour chaque système sont issus de trois expériences indépendantes avec chacune trois points.

Tableau 6.5 : Coefficients «a» et k_i (\pm erreur-type) pour les cinétiques de prise en charge des complexes $Cd(L)_2^0$ à pH 5,5 par *C. reinhardtii* et indication du D_{ow} (\pm écart-type).

pH 5,5	a (nmol·m ⁻²)	k_i (10 ⁻⁴ ·min ⁻¹)	D_{ow}
$Cd(DDC)_2^0$	0,427 \pm 0,014	2,8 \pm 0,9	481 \pm 73 *
$Cd(XANT)_2^0$	0,941 \pm 0,056	6,6 \pm 1,3	60 \pm 4
** $Cd(Ox)_n$	0,250 \pm 0,014	0,8 \pm 0,2	2,0 \pm 0,2
Cd^{2+}	0,18 \pm 0,04	0,20 \pm 0,02	5·10 ⁻⁴ \pm 6·10 ⁻⁵

* valeur mesurée pour un très grand excès de DDC (cf. tableau 4.7). ** se référer à la discussion de la section 6.8.

6.7 Comparaison de la prise en charge des complexes $Cd(L)_2^0$ par *C. reinhardtii* entre pH 7 et pH 5,5

La bioaccumulation des complexes étudiés est clairement influencée par le pH. En effet, dans le tableau 6.6, il apparaît que les paramètres k_i , k_e et «a» varient entre les pH 7 et 5,5 pour un même complexe.

Tableau 6.6 : Effet de l'acidification du milieu sur les constantes k_e , k_i et «a» (ratio des valeurs à pH 7 sur celles à pH 5,5) pour *C. reinhardtii* (\pm l'erreur-type en tenant compte de la propagation des erreurs).

système	ratio sur k_i (min ⁻¹) pH 7/pH 5,5	ratio sur k_e (min ⁻¹) pH 7/pH 5,5	ratio sur «a» (nmol·m ⁻²) pH 7/pH 5,5
$Cd(DDC)_2^0$	7 \pm 3	1,5 \pm 0,3	10 \pm 1
$Cd(XANT)_2^0$	2 \pm 1	1,9 \pm 0,1	2,4 \pm 0,2
* $Cd(Ox)_2^0$	* 7 \pm 2	2,70 \pm 0,03	3,2 \pm 0,2

* se référer à la discussion de la section 6.8.

Lorsque le pH diminue de 7 à 5,5, le paramètre «a» (qui représente l'accumulation à l'état stationnaire) diminue d'un facteur 10 pour le $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$, d'un facteur 3 pour le complexe $\text{Cd}(\text{Ox})_n$ et d'un facteur 2 pour le complexe $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$. La constante d'internalisation elle aussi diminue dans les trois systèmes quand le milieu d'exposition s'acidifie. Comme nous pouvions nous y attendre, la constante d'élimination suit la même tendance que celle d'internalisation pour tous les systèmes. En effet, k_i et k_e traduisent des perméabilités sur la même membrane, donc si un paramètre tel que le pH influence la membrane et fait varier k_i dans un sens, alors k_e devrait varier aussi dans le même sens (ce raisonnement étant valable pour des composés hydrophobes). Cet effet du pH est tout à fait inédit et nous amène à rejeter l'hypothèse 1.

Un tel effet de pH n'est pas explicitement considéré dans la théorie de la diffusion passive selon laquelle le pH n'influence pas la bioaccumulation. L'équation 6.13 ci-dessous, modélisant le passage d'un composé à travers une membrane et qui représente le mieux la diffusion passive, donne la perméabilité membranaire (Croot *et al.* 1999).

$$(6.13) \quad P_m = \frac{K_{lw} \cdot D_{mem}}{\Delta z} = \frac{\text{flux}_{initial}}{A \cdot (\Delta[ML_n])}$$

Dans l'équation 6.13, P_m est la perméabilité membranaire en $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$; D_{mem} est le coefficient de diffusion à travers la membrane en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; A est la surface cellulaire en $\text{cm}^2 \cdot \text{cell}^{-1}$; Δz est l'épaisseur de la membrane en cm ; $\Delta[ML_n]$ est le gradient initial de concentration du complexe, ce qui représente pour nous la concentration en complexe $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ dans le milieu d'exposition exprimé en $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ (en supposant que $[\text{Cd}(\text{L})_2^0]_{interne} = 0$ à $t = 0$); le flux initial est exprimé en $\text{mol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; enfin K_{lw} est le coefficient de partage membrane-eau pour le complexe considéré (sans unité), ce qui permet d'établir une comparaison avec le D_{ow} du complexe.

Les paramètres K_{lw} et A peuvent être affectés par le pH. Le paramètre K_{lw} est relié au D_{ow} , or nous avons montré que seul le complexe $\text{Cd}(\text{Ox})_n$ possède une telle dépendance au pH (cf. section 4.5). Pour les deux autres paramètres reliés aux caractéristiques de l'algue, nous avons pu montrer un effet mineur de pH. Ainsi en étudiant la superficie de l'algue *C.*

reinhardtii dans toutes nos expériences de prise en charge, il apparaît que la superficie moyenne, elle aussi, diminue de 8% en abaissant le pH :

Superficie moyenne de *C. reinhardtii* à pH 7 = $94,1 \pm 1,6 \mu\text{m}^2 \cdot \text{cell}^{-1}$ (N = 27)

Superficie moyenne de *C. reinhardtii* à pH 5,5 = $86,7 \pm 2,6 \mu\text{m}^2 \cdot \text{cell}^{-1}$ (N = 27)

P = 0,027 par un test t non pairé de Student, en supposant que les populations algales suivent une courbe de Gauss (\pm représente l'erreur-type).

L'effet de pH sur la prise en charge des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ par *C. reinhardtii* ne peut donc s'expliquer que partiellement en tenant compte des changements provoqués au niveau des complexes (D_{ow}) et au niveau de l'algue (superficie).

L'équation 6.13 exprimant la perméabilité membranaire observée peut s'exprimer uniquement en fonction J_{obs} et $[\text{Cd}(\text{L})_2^0]$ en convertissant toutefois $[\text{Cd}(\text{L})_2^0]$ de $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ en $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ (ce qui donne l'équation 6.14).

$$(6.14) \quad P_{\text{obs}} = \frac{J_{\text{max}}}{3,8 \cdot 10^{-13}}$$

Le tableau 6.7 compare les perméabilités observées dans notre étude face à deux autres études. Il ressort de ces comparaisons que les P_{obs} dans notre étude à pH 7 sont les plus élevées de toutes. Cela suggérerait donc une perméabilité plus grande de l'algue verte *C. reinhardtii* relativement aux autres microorganismes du tableau. Toutefois, la perméabilité observée chez la diatomée *D. brightwellii* est aussi élevée alors que Croot *et al.* (1999) suggère que la présence d'une surface cellulaire de silice diminuerait la diffusion de complexes lipophiles. Dans leur étude, ces auteurs remarquèrent que les cellules de ces diatomées subissaient des déformations et même s'ouvraient, ce qui pourrait expliquer cette valeur de P_{obs} étonnamment élevée.

À pH 5,5 dans notre étude, les P_{obs} diminuent de 3 à 12 fois par rapport au pH neutre et elles deviennent comparables aux P_{obs} des deux autres études. Cette diminution de perméabilité avec une baisse de pH pourrait être liée à une rigidité accrue de la membrane

de *C. reinhardtii*, qui serait suffisante pour à son tour abaisser la prise en charge. Cette argumentation laisse entendre que la membrane algale serait modifiée en fonction du pH (le degré de protonation des têtes polaires des phospholipides ; la conformation des protéines présentes dans la membrane ; ou même un changement dans la composition des phospholipides constituant la membrane).

Dans le tableau 6.7, nous faisons aussi figurer un paramètre (k_{bio}) de comparaison développé par Phinney et Bruland (1994) et repris par Croot *et al.* (1999). La bioaccumulation par diffusion passive de complexes lipophiles par des microorganismes peut se traduire par cette constante qui représente un taux biologique de disparition du complexe en solution (équation 6.15).

$$(6.15) \quad \frac{d[\text{Cd}(\text{L})_2^0]}{dt} = -k_{\text{bio}} \cdot [\text{cellules}] \cdot [\text{Cd}(\text{L})_2^0]$$

L'équation 6.15 comprend la prise en charge du complexe considéré au temps le plus court possible ($d[\text{Cd}(\text{L})_2^0]/dt$) en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. La valeur de k_{bio} s'exprime en $\text{L} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $[\text{cellules}]$ est la concentration en cellules en $\text{cell} \cdot \text{L}^{-1}$ dans le milieu, et $[\text{Cd}(\text{L})_2^0]$ est la concentration du complexe $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ dans ce même milieu en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Il apparaît clairement que les k_{bio} calculés dans notre étude sont toujours inférieurs à ceux de Phinney et Bruland (1994) ainsi que de ceux de Croot *et al.* (1999) sauf pour ces derniers, dans le cas de la prise en charge du complexe $\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$ par une cyanobactérie. Cette observation pourrait se justifier par le fait que nos complexes étudiés ($\text{Cd}(\text{L})_2^0$) sont moins hydrophobes que ceux formés avec le Cu ou le Pb. Par exemple, les D_{ow} pour les complexes $\text{Cu}(\text{DDC})_2^0$ et $\text{Pb}(\text{DDC})_2^0$ sont respectivement de 630 et 10 000 comparé à 270 pour le $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ (Turner et Mawji 2004). Ainsi le seul système comparable à l'un des nôtres, le $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ pour une diatomée, montre un k_{bio} comparable à celle à pH 7 pour *C. reinhardtii*. Par ailleurs, l'exception avec la cyanobactérie pourrait s'expliquer par des différences de perméabilité membranaires intrinsèques à chaque espèce. Notons aussi que le calcul réalisé dans notre étude pour le complexe $\text{Cd}(\text{Ox})_n$ est discutable puisque

l'équation 6.15 est censée s'appliquer uniquement aux complexes pris en charge par diffusion passive, rien ne justifiant cela pour le $\text{Cd}(\text{Ox})_n$. En réalité, dans la section 6.8 nous verrons que ce dernier point est finalement à nuancer.

Tableau 6.7 : Perméabilité membranaire observée pour des complexes métal-ligand organique (1) dans notre étude, (2) dans Phinney et Bruland (1994) et (3) dans Croot *et al.* (1999). P_{obs} (équation 6.14) est exprimée en $10^{-4} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ et k_{bio} (équation 6.15) est exprimée en $10^{-9} \cdot \text{L} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; ces deux paramètres sont normalisés pour $[\text{métal}] = 1 \text{ nM}$.

Complexe	Organisme	pH – [métal]	R (L/M)	P_{obs}	k_{bio}
⁽¹⁾ $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$	<i>C. reinhardtii</i> (algue verte)	pH 7 - 0,38 nM	3 000	20	6,6
⁽¹⁾ $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$		pH 7 - 0,38 nM	300 000	19	6,5
⁽¹⁾ $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$		pH 7 - 0,38 nM	200 000	10	3,4
⁽¹⁾ $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$		pH 5,5 - 0,38 nM	3 000	4,9	1,5
⁽¹⁾ $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$		pH 5,5 - 0,38 nM	300 000	6,5	2,0
⁽¹⁾ $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$		pH 5,5 - 0,38 nM	200 000	1,1	0,34
⁽²⁾ $\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$	<i>T. weissflogii</i> (diatomée)	pH 8 - 5 nM	300 ou 1 500	6,4	18
⁽²⁾ $\text{Cu}(\text{DDC})_2^0$		pH 8 - 5 nM	1 000 ou 7 000	5,9	16
⁽²⁾ $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$		pH 8 - 5 nM	11 000	> 2,7	> 5,0
⁽²⁾ $\text{Pb}(\text{DDC})_2^0$		pH 8 - 5 nM	20 000	> 1,1	> 33
⁽³⁾ $\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$	<i>Synechococcus</i> (cyanobactérie)	pH 8 - 10 nM	10	0,55	0,01
⁽³⁾ $\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$		pH 8 - 20 nM	10	2,3	0,04
⁽³⁾ $\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$	<i>A. carterae</i> (dinoflagellé)	pH 8 - 10 nM	10	6,9	28
⁽³⁾ $\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$	<i>P. micans</i> (dinoflagellé)	pH 8 - 10 nM	10	3,6	136
⁽³⁾ $\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$	<i>C. polylepis</i> (prymnesiophyte)	pH 8 - 10 nM	10	7,1	39
⁽³⁾ $\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$	<i>D. brightwellii</i> (diatomée)	pH 8 - 10 nM	10	19	570

Concernant le devenir du Cd intracellulaire, nous émettons l'hypothèse qu'à notre concentration de Cd et pour les pH 7 et 5,5 la prise en charge de complexes hydrophobes Cd(L)_2^0 par *C. reinhardtii* soit limitée par leur transport transmembranaire associée, une fois à l'intérieur de la cellule, à une compétition avec les ligands intracellulaires.

Nous avons pu confirmer cette hypothèse par l'intermédiaire d'autres expériences. Nous avons réalisé des expériences préliminaires de prise en charge du Cd(DDC)_2^0 par *C. reinhardtii* aux pH 7 et 5,5 en augmentant parallèlement les concentrations de Cd et de DDC afin de garder constant le ratio L/M constant (3 000, cf. tableau 6.6). Du point de vue expérimental, il est à noter que nous nous sommes heurtés à la précipitation du complexe Cd(DDC)_2^0 pour les plus fortes concentrations, ce qui par conséquent a limité la gamme de concentrations de cadmium étudiée, en particulier à pH 5,5. Les figures 6.13 et 6.14 présentent les points expérimentaux de prise en charge mesurés à l'état stationnaire (30 min) ainsi que les points obtenus d'après le modèle (équation 6.12). Notons que la fraction labile C qui figure dans l'équation 6.12 est obtenue pour chaque concentration de Cd par une relation linéaire. Plus précisément, à pH neutre et pour $[\text{Cd(DDC)}_2^0] = 0,38 \text{ nM}$ nous avons obtenu une valeur expérimentale de $C = 0,344 \pm 0,055$. D'autre part, nous fixons arbitrairement $C = 1$ (tous les sites intracellulaires de complexation du Cd sont alors saturés) pour la dernière concentration étudiée, soit $[\text{Cd(DDC)}_2^0] = 616 \text{ nM}$. Pour les concentrations entre 0,38 nM et 616 nM nous attribuons à C une valeur obtenue par une relation linéaire entre $C = 0,344$ et 1. Nous procédons de la même manière à pH acide : pour $[\text{Cd(DDC)}_2^0] = 0,38 \text{ nM}$ nous avons $C = 0,904 \pm 0,024$; pour $[\text{Cd(DDC)}_2^0] = 336 \text{ nM}$ nous avons $C = 1$. Concernant la constante d'élimination à pH 7 et 5,5 nous la gardons constante quelles que soient les concentrations de Cd.

Les résultats indiqués aux figures 6.13 et 6.14 confirment bien tout d'abord que la prise en charge (telle que déterminée au plateau) est supérieure à pH 7 par rapport à pH 5,5 et que cette différence s'accroît même aux plus fortes concentrations du complexe. Quoiqu'il en soit, deux zones émergent de ces deux figures, la première linéaire et la seconde non linéaire. Ceci suggère que jusqu'à des concentrations externes en Cd de 300 nM à pH 7 et 150 nM à pH 5,5, la prise en charge du complexe Cd(DDC)_2^0 par *C. reinhardtii* est limitée

uniquement et significativement par le transport à travers la membrane puisque la relation entre la prise en charge sur le plateau et la concentration en Cd(L)_2^0 demeure linéaire. En outre, Phinney et Bruland (1994) proposent qu'une fois le complexe présent dans le cytosol, il se dissocierait à la faveur de la compétition avec les ligands intracellulaires, ce qui correspond à la fraction de Cd non labile dans notre étude, autorisant donc cette relation linéaire. En revanche, au-delà de ce seuil le taux de prise en charge commence à plafonner et indique que d'autres phénomènes limitent la prise en charge. Il est envisageable, si le processus décrit par Phinney et Bruland a lieu, que les ligands intracellulaires deviennent progressivement saturés. Dans un tel cas, quand la concentration du complexe Cd(DDC)_2^0 en solution augmente, la concentration de Cd(DDC)_2^0 intracellulaire augmente ainsi que l'élimination. Autrement dit, le gradient de concentration entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule pour le complexe Cd(DDC)_2^0 diminue à mesure que la concentration d'exposition s'élève, entraînant au final une diminution du flux d'entrée, d'où le plafonnement que nous observons aux plus fortes concentrations (et que le modèle prédit aussi). Remarquons enfin qu'il n'est pas improbable que les concentrations les plus élevées en Cd externe causent une certaine toxicité envers les algues.

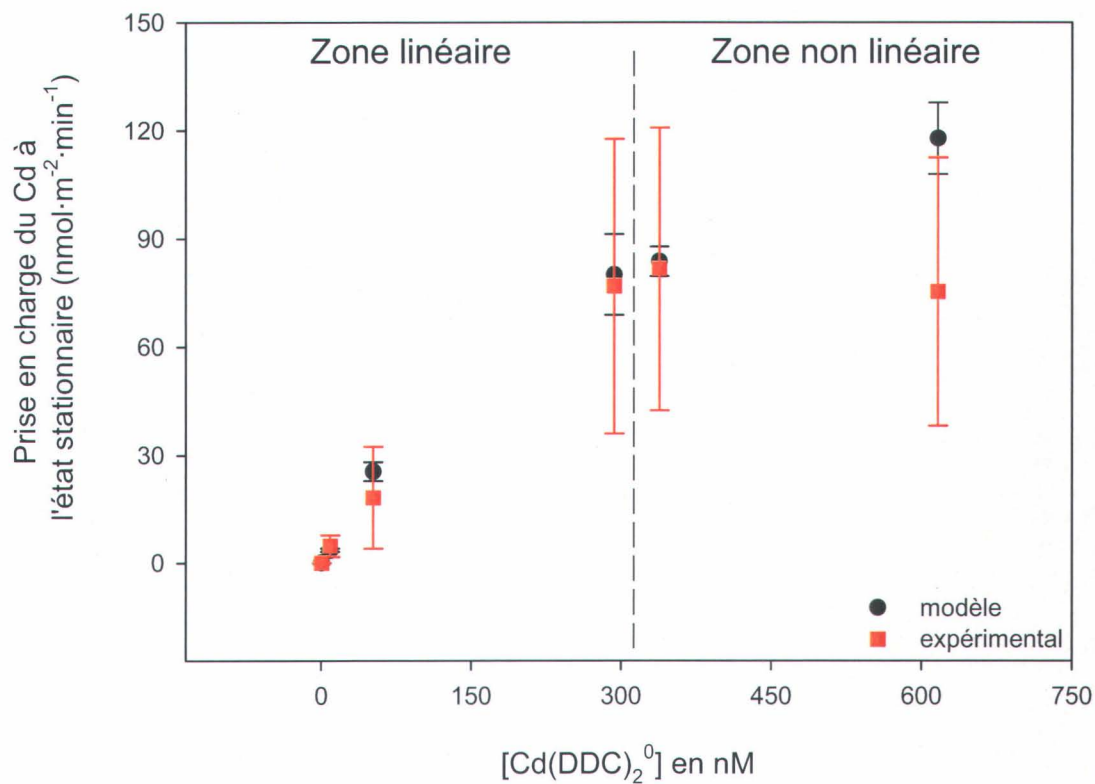


Figure 6.13 : Prise en charge du Cd(DDC)_2^0 par *C. reinhardtii* à pH 7 pour des concentrations croissantes de Cd ($R = L/M = 3\ 000 = \text{constant}$), mesurée à $t = 30$ min.

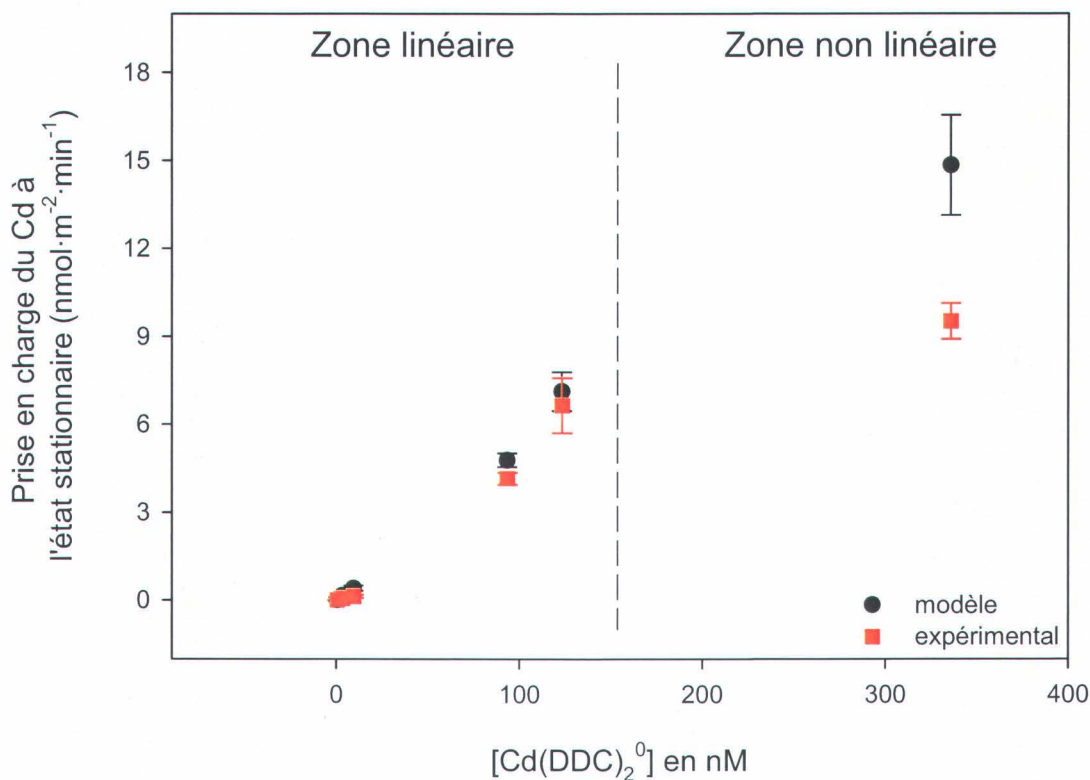


Figure 6.14 : Prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par *C. reinhardtii* à pH 5,5 pour des concentrations croissantes de Cd ($R = L/M = 3\ 000 = \text{constant}$), mesurée à $t = 30$ min.

La modélisation qui tient compte de la fraction labile C, en l'ajustant tel que mentionné précédemment, s'ajuste bien aux points expérimentaux, sauf pour le dernier point à pH 7 et 5,5. Le modèle surestime alors la prise en charge sur le plateau à ces très fortes concentrations de Cd et aux deux pH.

Un autre point est à soulever à propos des différences de prise en charge entre les complexes neutres. Vaara (1992) a démontré dans son étude que des agents chélateurs tel que l'EDTA⁴⁻ peuvent augmenter la perméabilité de la membrane d'une bactérie. Le mécanisme suspecté aurait lieu par l'intermédiaire de la complexation du Ca et du Mg (composant la membrane) par les agents chélateurs, déstabilisant ainsi la membrane

biologique. Si ce résultat s'applique aux membranes des algues, alors l'excès de ligand employés dans nos expériences pourrait avoir aussi une influence sur la perméabilité membranaire, en particulier pour le XANT et l'Ox qui sont en concentrations importantes (respectivement 100 μM et 79 μM par rapport à 1 μM pour le DDC). Nous avons testé cette hypothèse avec le ligand DDC car à sa concentration plus faible que les deux autres, le Cd est déjà à plus de 99,9% sous forme $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$. Nous pouvons donc augmenter sa concentration, la spéciation ne changeant pas, et si la prise en charge est altérée cela devrait être due uniquement à l'excès de ligand (le seul paramètre modifié dans le système). Deux expériences étaient menées en parallèle avec une même culture d'algue (pour éviter des effets inhérents aux différences entre deux générations d'algues) pour la même concentration en Cd (0,38 nM) dans les deux expériences et deux concentrations différentes de DDC (1 μM et 50 μM) ; la figure 6.15 présente ces résultats de prise en charge. L'extraction des paramètres k_i et «a» est compilée au tableau 6.8. La constante d'internalisation du Cd est significativement supérieure en présence de 50 μM par rapport à 1 μM de DDC ($P < 0,0001$ par un test t non pairé de Student) ; de la même manière «a» est plus élevé en présence de la concentration la plus forte en DDC ($P < 0,01$ par un test t non pairé de Student). Ces observations signifient donc que la présence en excès d'un ligand tel que le DDC^- favoriserait la prise en charge du Cd sous forme $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$, probablement en augmentant la perméabilité membranaire de l'algue comme le suggère Vaara (1992).

Tableau 6.8 : Coefficients k_i et «a» pour la prise en charge du Cd (0,38 nM) à pH 7 par *C. reinhardtii* en présence de deux concentrations différentes de DDC (1 et 50 μM).

Systeme $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ à pH 7	[DDC] = 1 μM	[DDC] = 50 μM
Coefficient k_i ($10^{-4} \cdot \text{min}^{-1}$)	35 \pm 1	59 \pm 2
Coefficient «a» ($\text{nmol} \cdot \text{m}^{-2}$)	4,7 \pm 0,4	6,1 \pm 0,2

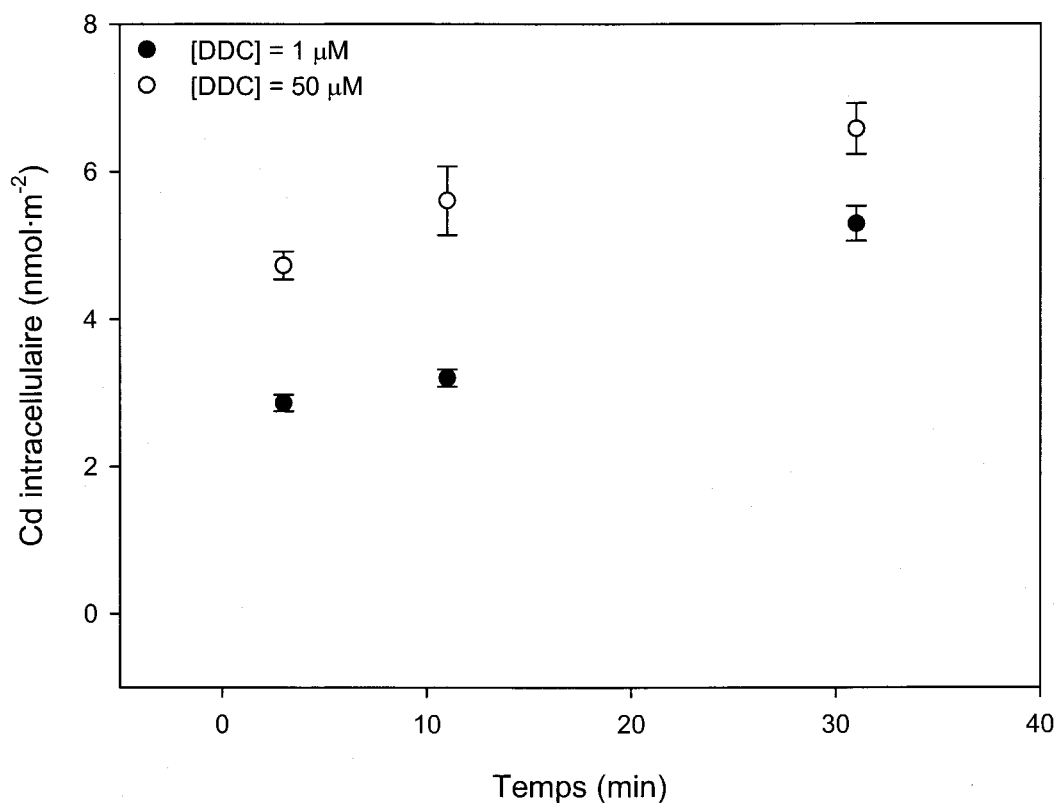


Figure 6.15 : Prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par *C. reinhardtii* à pH 7 pour deux concentrations de DDC (1 μM et 50 μM) et la même concentration de Cd (0,38 nM).

6.8 Cas particulier de la bioaccumulation du complexe $\text{Cd}(\text{Ox})_n$

6.8.1 Rappel de la spéciation du Cd dans le système Cd-Ox

D'après la constante K_1 que nous avons déterminée à pH 5,5 par polarographie ($\log K_1 = 9,58 \pm 0,02$) et celle β_2 obtenue par relation de proportionnalité entre deux métaux pour divers ligands ($\log \beta_2 = 13,13 \pm 1,15$), nous avons déterminé qu'en absence de substances humiques, moins de 0,1% de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ était présent aux deux pH. En revanche l'espèce chargée CdOx^+ était majoritaire aux deux pH (99,7% et 93,5% respectivement à pH 7 et 5,5) tandis que le Cd^{2+} libre représentait 0,3% à pH 7 et 6,4% à pH 5,5.

Eu égard aux résultats de bioaccumulation du Cd en présence d'Ox, nous pensons que la spéciation calculée à la section 4.4.4 n'est peut-être pas réaliste. Nous allons tenter de préciser notre point de vue dans les sections qui suivent.

6.8.2 Constantes d'élimination du Cd dans le système Cd-Ox

Aux deux pH (neutre et acide), la constante d'élimination du Cd dans le système Cd-Ox est toujours plus faible que celle des deux autres systèmes (Cd-DDC et Cd-XANT). Par ailleurs, la diminution du pH entraîne une baisse de k_e pour le système Cd-Ox. Ces observations suggèrent que si l'élimination est surtout reliée à la présence intracellulaire de complexe neutre intact alors la présence de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ est effectivement probable. De plus, comme nous l'avons dit (section 6.4), l'élimination des complexes hydrophobes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ est inversement proportionnelle à leur D_{ow} (Kooijman *et al.* 2004). Or, en considérant que la constante d'élimination pour le système Cd-Ox à pH 5,5 est la plus faible des trois systèmes et que le D_{ow} du système Cd-Ox à pH 5,5 est lui aussi le plus faible des trois systèmes, alors nous pouvons supposer que la proportion de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ intracellulaire à pH 5,5 est également faible par rapport à la forme CdOx^+ . Par conséquent, la concentration extérieure (en solution) de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ devrait être à son tour plutôt faible ; les section suivantes préciseront ce point.

6.8.3 Prise en charge du Cd sous forme $\text{Cd}(\text{Ox})_n$

6.8.3.1 Constatations

Le fait que d'une part, les calculs de spéciation indiquent que plus de 95% du Cd est présent sous la forme CdOx^+ alors que la présence de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ est négligeable (cf. section 4.4.4), et que d'autre part, la constante k_i du Cd en présence d'oxine est 28 et 10 fois plus élevée que celle du Cd^{2+} seul respectivement à pH 7 et 5,5 nous amènent à questionner la validité des calculs de spéciation, ou plus spécifiquement les valeurs des constantes thermodynamiques pour les réactions $\text{Cd}^{2+} + n\text{Ox}^-$ et $\text{H}^+ + \text{Ox}^-$. En effet, les complexes chargés comme le CdOx^+ ne sont pas connus pour être pris en charge par les algues, hormis quand le ligand lui-même est assimilable comme dans le cas du Cd ou du Zn en présence de citrate (Errécalde et Campbell 2000). A priori, nous aurions donc pu nous attendre à obtenir

une prise en charge du cadmium réduite par rapport à celle du Cd^{2+} seul aux deux pH. Puisque cela n'est pas le cas (et que la prise en charge n'est pas limitée par la diffusion d'espèces labiles du Cd de la solution vers la surface de l'algue), deux hypothèses peuvent être avancées :

- 1) le complexe CdOx^+ est assimilable ; ou,
- 2) une (faible) quantité de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ est présente et suffit à expliquer la prise en charge élevée.

À propos de la première hypothèse, ce complexe chargé CdOx^+ devrait être bioaccumulé par les algues via un transporteur et non par diffusion passive comme un composé neutre et hydrophobe. A ce sujet, il a été seulement rapporté par Florence et Stauber (1986) que suite à la prise en charge du $\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$ par la diatomée marine *Nitzschia closterium*, le complexe se dissocie et l'oxine sort de la cellule sous forme HOx , le Cu demeurant à l'intérieur de la cellule. L'élimination de HOx ne semble donc pas impliquer de transporteur, l'élimination ayant plutôt lieu par diffusion passive. La perméabilité de la membrane vis-à-vis de HOx ne semble donc pas justifier ici la prise en charge du ligand Ox^+ . Si un transporteur avait été impliqué dans le passage transmembranaire de Ox^+ , le complexe CdOx^+ aurait à son tour pu entrer dans la cellule par l'intermédiaire de ce transporteur. Puisque ce n'est pas le cas, il est peu probable que le complexe CdOx^+ pénètre les cellules algales par l'intermédiaire d'un transporteur de l'oxine.

Pour tester la deuxième hypothèse, il faut déterminer une proportion minimale et cohérente de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ qui suffirait à expliquer la prise en charge du cadmium en présence d' Ox observée à pH 7 par *C. reinhardtii*. Il s'agit là de l'objectif des deux sections suivantes.

6.8.3.2 Détermination de la proportion de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ par l'intermédiaire du D_{ow}

Si nous considérons que le complexe $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ se comporte comme un produit organique lipophile non dissociable, et que le principe de Le Châtelier ne s'applique pas à ce complexe, alors le D_{ow} traduit l'équation 6.16 :

$$(6.16) \quad D_{ow} = \frac{n(Cd)_{octanol}}{n(Cd)_{eau}} \cdot \frac{V_{eau}}{V_{octanol}}$$

avec $V_{eau} / V_{octanol} = 3$; nous avons aussi $n(Cd)_{octanol} + n(Cd)_{eau} = n(Cd)_{total}$ pour les conditions de l'expérience.

Par exemple, à pH 5,5 où $D_{ow} = 2$ nous pouvons écrire :

$$(6.17) \quad n(Cd)_{octanol} + n(Cd)_{eau} = 0,44 \text{ nmol}$$

$$(6.18) \quad 3 \cdot n(Cd)_{octanol} = 2 \cdot n(Cd)_{eau} \text{ (cf. équation 6.16)}$$

En combinant les équations 6.17 et 6.18 nous obtenons $n(Cd)_{octanol} = 0,18 \text{ nmol}$.

En considérant, comme nous l'avons dit, que seule la forme $Cd(Ox)_2^0$ passe dans la phase octanol, ce résultat implique qu'à pH 5,5 la proportion de complexe neutre $Cd(Ox)_2^0$ par rapport au Cd total doit être de $40 \pm 4\%$.

La même approche à pH 7 donne $96 \pm 7\%$ de complexe neutre $Cd(Ox)_2^0$ par rapport au Cd total. Cependant, pour atteindre ces proportions de $Cd(Ox)_2^0$ dans MINEQL+ et en fixant $\log K_1 = 9,58$, il faudrait une valeur de $\log \beta_2 = 17,80$ comparé à $13,13 \pm 1,15$ obtenue d'après la littérature (cf. section 4.4.3.3). Cette nouvelle constante β_2 semble déraisonnablement très éloignée de la littérature.

Pour réaliser ce calcul, nous avons considéré que le complexe $Cd(Ox)_2^0$ se comporte comme un composé organique lipophile non dissociable. Nous aurions pu supposer qu'au contraire le complexe neutre $Cd(Ox)_2^0$ soit en équilibre avec les espèces $Cd^{2+} + 2 Ox^-$, et que le principe de Le Châtelier s'applique. En effet, ces deux types de comportements ont été observés comme nous l'indiquons à la figure 6.16 (cf. la discussion dans l'étude de Turner et Mawji, 2004).

Cette figure montre le comportement de deux systèmes très différents : $Pb(Ox)_n$, faiblement hydrophobe, et $Cu(Ox)_n$, très hydrophobe. L'extraction par l'octanol en fonction du pH du

$Pb(Ox)_n$ suit la spéciation du complexe neutre $Pb(Ox)_2^0$ alors que celle du $Cu(Ox)_n$ semble constante sur une large gamme de pH alors que l'espèce neutre n'y est pas présente majoritairement. Dans ce dernier cas, le système $Cu(Ox)_n$ étant très hydrophobe, une faible quantité de $Cu(Ox)_2^0$ peut expliquer une forte extraction par l'octanol. Le système $Cd(Ox)_n$ étant intermédiaire aux deux systèmes précédents, une faible quantité de complexe neutre $Cd(Ox)_2^0$ pourrait entraîner une extraction par l'octanol décelable. Dans un tel cas, la valeur de D_{ow} ne reflèterait pas la spéciation du Cd dans la phase aqueuse.

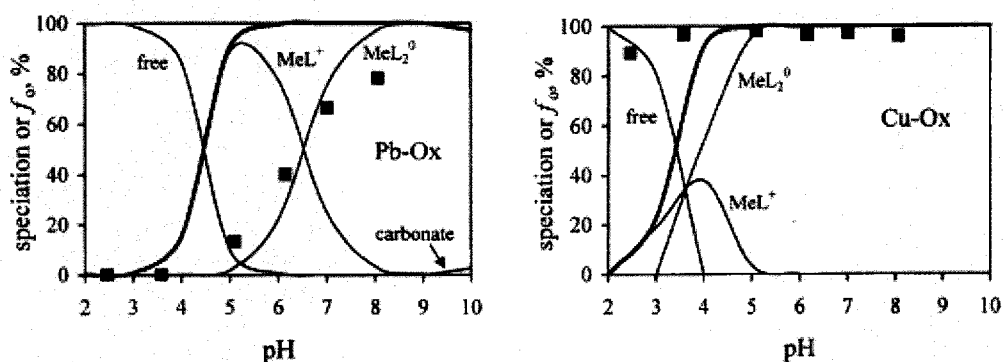


Figure 6.16 : Spéciation et extraction par l'octanol du Pb et du Cu en présence d'oxine. Les lignes représentent la spéciation en % de chaque espèce métallique. Les carrés noirs représentent la fraction de métal extraite par l'octanol. Figure tirée de Turner et Mawji (2004).

Malgré nos réticences à valider l'approche du D_{ow} , nous présentons les changements sur k_i (cf. tableau 6.9) et sur k_{bio} et P_{obs} (cf. tableau 6.10) qu'induirait ces nouvelles proportions de complexe neutre. Nous constatons que la valeur de k_i dans le système Cd-Ox demeure inférieure à celles mesurées dans les deux autres systèmes, quel que soit le pH.

Tableau 6.9 : Constantes d'internalisation du Cd aux pH 7 et 5,5 obtenues avec l'approche des D_{ow} . Entre parenthèses figurent les valeurs pour 100% de complexe $Cd(Ox)_2^0$.

	k_i ($10^{-4} \cdot \text{min}^{-1}$) pH 7	k_i ($10^{-4} \cdot \text{min}^{-1}$) pH 5,5
$Cd(DDC)_2^0$	20 ± 3	$2,8 \pm 0,9$
$Cd(XANT)_2^0$	16 ± 4	$6,6 \pm 1,3$
$Cd(Ox)_2^0$	9 ± 2 (6 ± 1)	$0,8 \pm 0,2$ ($0,9 \pm 0,1$)
Cd^{2+}	$0,20 \pm 0,02$	$0,080 \pm 0,003$

Tableau 6.10 : Constantes d'élimination k_{bio} et de perméabilité P_{obs} aux pH 7 et 5,5 pour le complexe $Cd(Ox)_2^0$ chez *C. reinhardtii* obtenues avec l'approche des D_{ow} . Entre parenthèses figurent les valeurs pour 100% de complexe $Cd(Ox)_2^0$.

	pH 7	pH 5,5
k_{bio} ($10^{-9} \cdot L \cdot \text{cell}^{-1} \cdot h^{-1}$)	3,5 (3,4)	0,84 (0,34)
P_{obs} ($10^{-4} \cdot \text{cm} \cdot s^{-1}$)	10 (10)	2,7 (1,1)

6.8.3.3 Détermination de la proportion de $Cd(Ox)_2^0$ par comparaison des k_i issus d'autres études

La deuxième approche fait appel à un choix de constante k_i raisonnable et aux comparaisons avec la littérature. Si nous examinons les constantes d'internalisation k_i pour les complexes $Cd(DDC)_2^0$ et $Cd(XANT)_2^0$, à chaque pH les k_i sont statistiquement semblables. En outre, d'après le tableau 6.11, les constantes d'internalisation k_i calculées

d'après les données des études de Phinney et Bruland (1994) et de Croot *et al.* (1999) sont statistiquement semblables pour la prise en charge des complexes $\text{Cu}(\text{DDC})_2^0$ et $\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$. Nous constatons aussi dans le tableau 6.11, que les valeurs de k_i compilées aux pH 7 et 8 sont du même ordre de grandeur. Celles à pH 5,5 sont plus faibles mais cela est relié à l'effet de pH que nous avons observé sur la prise en charge des complexes neutres.

Tableau 6.11 : Constantes d'internalisation du Cd aux pH 7 et 5,5 d'après nos travaux, ceux de Phinney et Bruland (1994) et ceux de Croot *et al.* (1999). Les calculs sont réalisés de la même manière qu'expliquée à la section 6.4.

notre étude	k_i ($10^{-4} \cdot \text{min}^{-1}$) pH 7	k_i ($10^{-4} \cdot \text{min}^{-1}$) pH 5,5
$\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$	20 ± 3	$2,8 \pm 0,9$
$\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$	16 ± 4	$6,6 \pm 1,3$
$\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$	20 ± 3	83 ± 22
Cd^{2+}	$0,20 \pm 0,02$	$0,080 \pm 0,003$
Phinney et Bruland 1994 ; étude sur <i>T. weissflogii</i> (diatomée) à pH 8		
$\text{Cu}(\text{DDC})_2^0$	29 ± 11	
$\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$	35 ± 1	
Croot <i>et al.</i> (1999) ; étude sur <i>Synechococcus</i> à pH 8		
$\text{Cu}(\text{DDC})_2^0$	55 ± 2	
$\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$	57 ± 5	

En supposant alors qu'à pH 7 le complexe $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ entraîne la même constante k_i d'internalisation que pour le $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$, alors il faudrait la présence de 30% du complexe neutre dans la solution d'exposition pour avoir un k_i identique à celui du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ (cf. tableau 6.11). Ceci nécessite d'après MINEQL+ (en fixant $\log K_1 = 9,58$) une constante $\log \beta_2 = 15,98$ par rapport à celle de $13,13 \pm 1,15$ obtenue d'après la littérature, ce qui paraît plus raisonnable que la constante β_2 obtenue dans la section précédente. La spéciation donnerait alors à pH 5,5 : 6,3% de Cd^{2+} , 1,0% de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ et 92,5% de CdOx^+ .

Avec ces nouvelles données, k_i à pH 5,5 devient alors plus élevé qu'à pH 7 à l'inverse des deux autres complexes. Ceci s'explique par le fait que la très faible proportion de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ à pH acide (1%) doit traduire la prise en charge observée, d'où une constante d'internalisation plutôt élevée. Une autre raison pourrait être la présence non négligeable (22%) de l'espèce H_2Ox^+ à pH 5,5. Ce complexe chargé positivement pourrait se comporter comme les peptides antibactériens et antifongiques (tout comme l'oxine d'ailleurs) qui possèdent une charge positive leur conférant un pouvoir perméabilisant des membranes biologiques élevé (Powers et Hancock 2003 ; Avrahami et Shai 2004).

Les changements sur k_{bio} et P_{obs} sont compilés dans le tableau 6.12. Les nouvelles valeurs de k_{bio} aux deux pH deviennent maintenant comparables à celles des études de Phinney et Bruland (1994) et de Croot *et al.* (1999) du tableau 6.7. En revanche, les perméabilités observées sont plus élevées, notamment à pH acide, toujours en comparaison à ces études. Cependant, n'oublions pas que l'excès d'Ox que nous ajoutons est de 2 à 4 ordres de grandeur plus grand que dans les deux études précitées. Si l'Ox a un effet perméabilisant de la membrane, comme nous l'avons montré pour le DDC (cf. section 6.7), alors il est logique d'observer de tels écarts de perméabilité. Rajoutons enfin que l'oxine est algistatique pour *C. reinhardtii* (cf. section 6.1), ce qui pourrait causer des effets inconnus sur la membrane de cette algue.

Tableau 6.12 : Constantes d'élimination k_{bio} et de perméabilité P_{obs} aux pH 7 et 5,5 pour le complexe $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ chez *C. reinhardtii* obtenues avec l'approche des D_{ow} . Entre parenthèses figurent les valeurs pour 100% de complexe $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$.

	pH 7	pH 5,5
$k_{\text{bio}} (10^{-9} \cdot \text{L} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	11 (3,4)	34 (0,34)
$P_{\text{obs}} (10^{-4} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$	33 (10)	109 (1,1)

6.8.3.4 Synthèse

Eu égard aux derniers développements, il nous apparaît que :

- 1) dans nos calculs de diffusion (cf. section 6.2), la prise en charge n'est pas limitée par la diffusion du complexe de la solution vers la surface de l'algue ;
- 2) l'hypothèse 1, spéculant que le complexe chargé CdOx^+ serait assimilable, n'est pas vérifiable en l'état actuel de nos travaux ;
- 3) l'hypothèse 2, soit la présence de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$, est plausible, en particulier en attribuant des k_i «raisonnables» au système $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ à pH 7 et ce par comparaison avec la littérature (cf. section 6.8.3.3) ; nous avons alors 30% et 1% de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ respectivement aux pH 7 et 5,5 ; dans ce dernier cas, la proportion de Cd^{2+} ne dépasse pas 7%.

Au final, il nous semble approprié d'utiliser les constantes calculées à la section 6.8.3.3 et qui correspondent à des proportions de 30% et 1% de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ respectivement à pH 7 et 5,5. Pour le chapitre 7 (présence de substances humiques), nous emploierons donc ces nouveaux résultats.

6.9 Synthèse à propos de la bioaccumulation des complexes neutres $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ par *C. reinhardtii* aux pH 7 et 5,5

Pour synthétiser, à pH 7 et 5,5 les complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ ($[\text{Cd}] = 0,38 \text{ nM}$) sont bioaccumulés par l'algue verte *C. reinhardtii* par diffusion passive en présence des ligands organiques DDC et XANT et ce beaucoup plus que si le Cd était présent comme l'ion Cd^{2+} libre. À cette concentration de Cd, la diffusion est uniquement limitée par le transport à travers la membrane de l'algue, tel que montré par les comparaisons entre J_{dif} et J_{obs} . La bioaccumulation des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ est plus faible à pH acide que neutre, ceci pouvant s'expliquer par une diminution de la perméabilité membranaire de l'algue à faible pH (confirmée par la diminution de k_i et k_e avec le pH). Cet effet du pH sur la prise en charge de complexes neutres est nouveau dans la littérature scientifique et nous amène à rejeter l'hypothèse 1 énoncée à la section 2.

Les différences de prise en charge entre les trois complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ étudiés, pour un même pH, trouvent leur explication dans la spéciation du Cd, dans le D_{ow} qui diffère suivant le complexe, dans la présence en excès des ligands organiques DDC^- , XANT^- et HOx , et dans la compétition au niveau intracellulaire entre des ligands tels que les phytochélatines et les ligands organiques pour la complexation du Cd. À ce sujet et en tenant compte des nouvelles concentrations estimées pour le complexe $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$, Phinney et Bruland (1994) ont déjà observé des disparités entre les perméabilités observées des complexes $\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$, $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ et $\text{Pb}(\text{Ox})_2^0$ et leur D_{ow} respectifs (calculés). Ils ont attribué ces différences à la compétition intracellulaire dont nous avons parlé ci-haut. À l'étude du tableau 6.13, nous observons aussi une divergence entre les D_{ow} mesurés et les P_{obs} . Ce tableau indique aussi que, quand la fraction de Cd non labile diminue, la P_{obs} augmente logiquement excepté dans le cas du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ à pH 5,5. Ceci illustre bien le fait que la prédiction de la bioaccumulation de ces complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ doit tenir compte de tous les éléments suscités.

Tableau 6.13 : Comparaison pour les complexes Cd(L)₂⁰ à pH 7 et 5,5 des perméabilités observées (P_{obs}), des coefficients de partage octanol-eau (D_{ow}) et de la fraction non labile de Cd intracellulaire, chez *C. reinhardtii*.

pH	complexe	P _{obs} (10 ⁻⁴ ·cm·s ⁻¹)	D _{ow}	Fraction non labile de Cd intracellulaire
5,5	Cd(DDC) ₂ ⁰	5	481 ± 73 *	9%
	Cd(XANT) ₂ ⁰	7	60 ± 4	66%
	Cd(Ox) ₂ ⁰	110	2,0 ± 0,2	37%
7	Cd(DDC) ₂ ⁰	20	270 ± 28	66%
	Cd(XANT) ₂ ⁰	19	56 ± 1	63%
	Cd(Ox) ₂ ⁰	33	66 ± 5	11%

* valeur mesurée pour un très grand excès de DDC (cf. tableau 4.7).

7. Résultats et discussion des expériences de prise en charge de complexes neutres Cd(L)_2^0 par *Chlamydomonas reinhardtii* en présence de substances humiques*

Nous allons maintenant examiner la bioaccumulation des complexes lipophiles Cd(L)_2^0 en présence de substances humiques. Nous savons d'ores et déjà que les SH n'ont pas d'effets délétères sur la croissance des algues vertes (cf. section 6.1.2) et donc, s'il y a un effet des SH, il est au niveau des surfaces biologiques et/ou des complexes Cd(L)_2^0 en solution (cf. section 2).

Pour rappel, l'idée principale de ce chapitre est d'étudier la bioaccumulation du Cd en présence de ligands organiques (la présence de Cd et des L est hautement probable dans les zones agricoles et minières) dans des milieux synthétiques mimant les conditions naturelles. Pour réaliser ces conditions, nous rajoutons des SH aquatiques (ubiquistes dans la nature) dans nos milieux d'exposition afin que nos conditions en laboratoire ressemblent au mieux à celles en milieu naturel.

Avant toute chose, nous vérifions une fois de plus qu'il n'y a pas de perte de Cd dans la zone non agitée qui entoure les cellules algales. Effectivement, le flux diffusif J_{dif} n'est pas l'étape limitante pour la prise en charge du Cd puisque dans tous les cas possibles (Cd-L-SH, pH 7 et 5,5) J_{dif} est supérieur au taux d'internalisation J_{obs} (au minimum 19 fois).

Nous pouvons aussi émettre des hypothèses quant aux effets anticipés de l'ajout de SH sur la prise en charge des complexes Cd(L)_2^0 :

* sauf avis contraire, les barres d'erreurs sur les graphiques des sections 7 à 9 représentent un écart-type ($N = 3$).

- 1) l'association Cd-L-SH (cf. section 4.2) fait diminuer la quantité de Cd(L)_2^0 «libre» et devrait donc faire diminuer k'_i (la vitesse initiale de prise en charge) et «a» (prise en charge à l'état stationnaire) ;
- 2) la sorption des SH sur la membrane biologique à pH acide (cf. section 1.3.2) pourrait rendre plus perméable la membrane biologique modifiant ainsi k_i et k_e .

7.1 Prise en charge du Cd dans les systèmes Cd-L-SH par *C. reinhardtii* : observations générales

Si nous confrontons les points expérimentaux de prise en charge des complexes Cd(L)_2^0 en présence ou non des SH, plusieurs points majeurs apparaissent (cf. figures 7.1 et 7.2). Tout d'abord, à pH neutre, l'ajout des SH au milieu d'exposition diminue d'un facteur 2 à 4 la bioaccumulation du Cd sous forme Cd(L)_2^0 en comparaison aux mêmes conditions mais en absence des SH, ce qui confirme l'hypothèse 2. En outre, la fraction des AH (en bleu sur les figures 7.1 et 7.2) est celle qui induit le plus de diminution des trois fractions. Sachant que les complexes Cd(L)_2^0 s'associent en proportion importante à pH neutre avec les AH, nous pouvons relier la diminution de prise en charge à cette association. En revanche, il n'est pas possible à ce stade-ci de la discussion de conclure si les interactions des complexes Cd(L)_2^0 avec les SH expliquent totalement la diminution observée de prise en charge du Cd ; la modélisation à la section suivante nous apportera une réponse. À pH acide, les points reliés à la prise en charge en présence des SH sont très similaires de ceux en absence des SH. Ceci signifie que globalement l'ajout des SH dans les milieux d'exposition n'altère pas la bioaccumulation du Cd sous forme Cd(L)_2^0 à pH 5,5. Si dans le cas du Cd(DDC)_2^0 l'explication peut encore provenir de son comportement en présence des AH (très faible association entre le complexe Cd(DDC)_2^0 et les AH à pH 5,5 telle que déterminée par dialyse), il n'en est pas de même pour les deux autres complexes (association non négligeable avec les AH même à pH 5,5). D'autres phénomènes sont donc à considérer ; nous y reviendrons dans les sections suivantes.

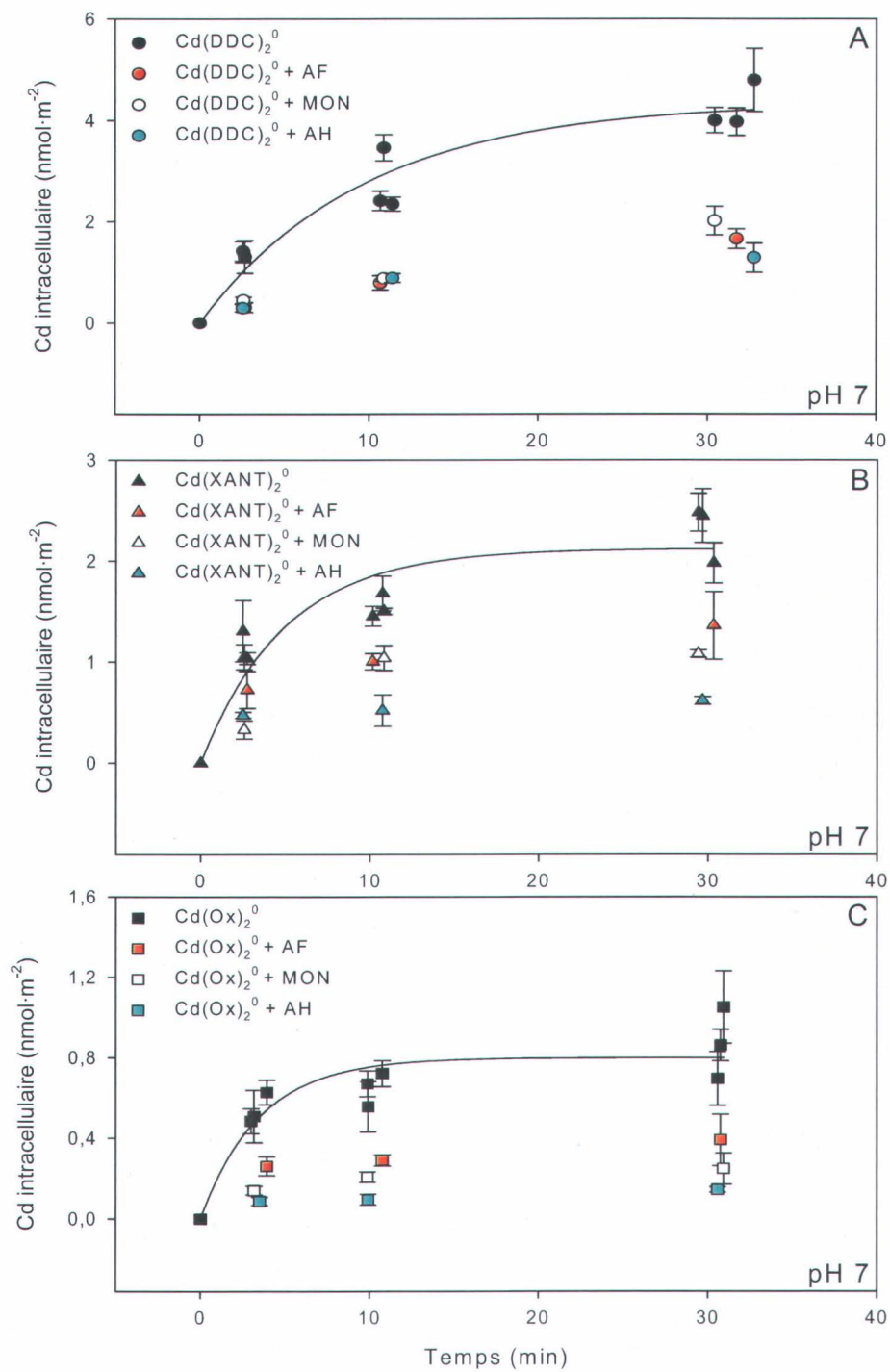


Figure 7.1 : Prise en charge expérimentale des complexes Cd(L)₂⁰ par *C. reinhardtii* en absence (symboles noirs) et en présence des SH (symboles de couleurs) à pH 7.

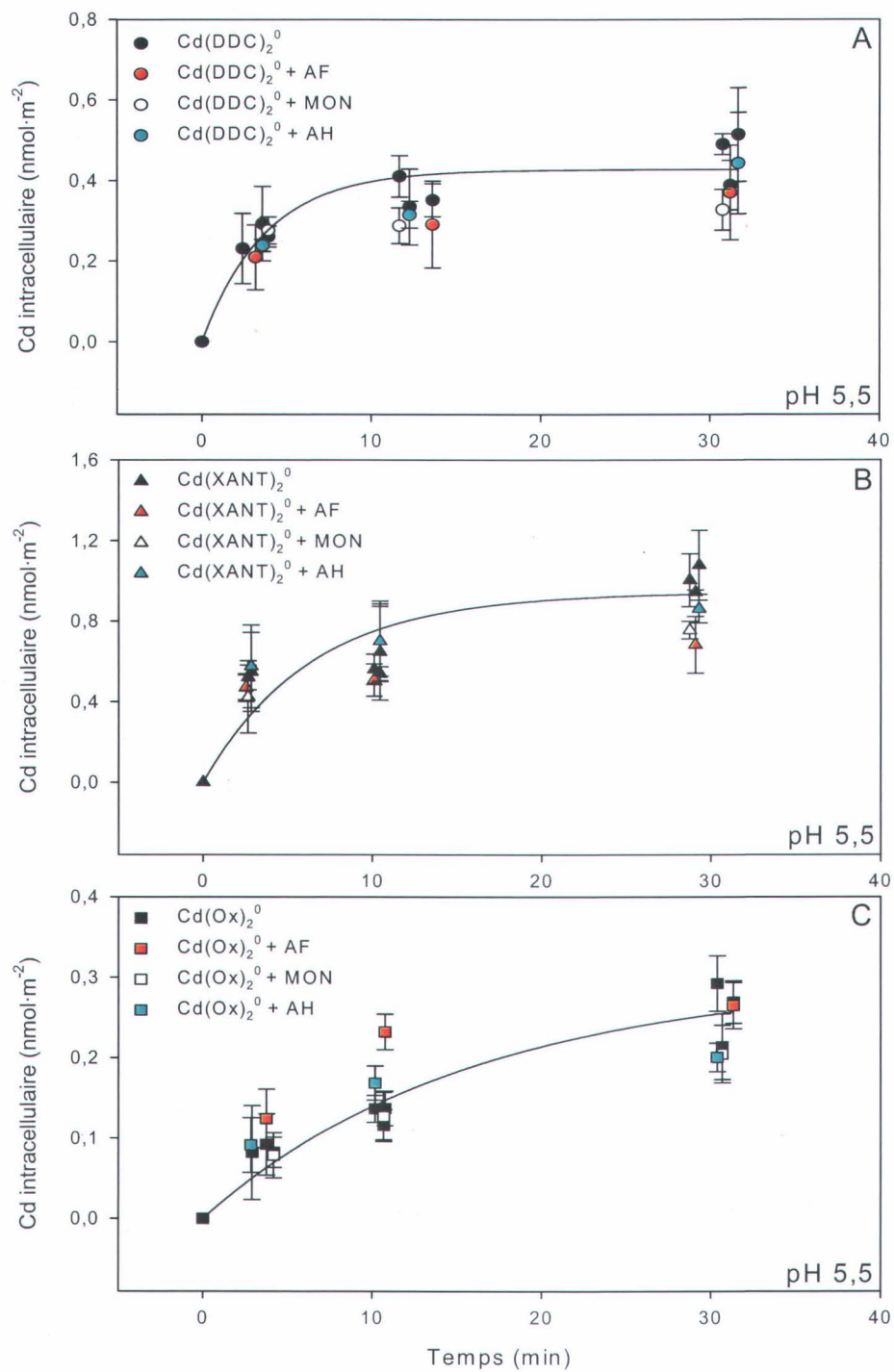


Figure 7.2 : Prise en charge expérimentale des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ par *C. reinhardtii* en absence (symboles noirs) et en présence des SH (symboles de couleurs) à pH 5,5.

Nous analysons maintenant les résultats de la modélisation en nous concentrant sur la prise en charge du Cd sous forme $Cd(L)_2^0$ en présence des AH. En effet, il s'agit de la seule fraction pour laquelle nous avons les données d'association (par dialyse) entre les complexes $Cd(L)_2^0$ et les AH. Ces résultats nous permettent donc d'obtenir la concentration des complexes $Cd(L)_2^0$ «libres» participant réellement à la prise en charge. Concernant le modèle, nous allons utiliser la même approche de modélisation qu'à la section 6.4 en gardant les paramètres k_i (constante d'internalisation du Cd), k_e (constante d'élimination) et C (fraction de Cd intracellulaire labile) constants. En effet, un des buts de cette étude est de vérifier si le modèle développé en absence de SH est applicable dans des milieux pour lesquels nous ne changeons que la quantité de $Cd(L)_2^0$ «libre». Notons que le fait de garder k_i , k_e et C constants entre les études en absence et en présence des SH, signifie que nous faisons abstraction des effets que pourraient avoir les SH sur les cellules algales. Or, nous pouvons nous attendre à observer des écarts entre le modèle et les points expérimentaux puisque les AH sont connus pour modifier la perméabilité membranaire, notamment à pH acide (Vigneault *et al.* 2000). Les AH pourraient alors faire varier k_i et k_e . Pour que le modèle fonctionne, il nous faut de plus la constante k'_i (cf. équation 6.9) qui vaut :

$$(7.1) \quad k'_i = [Cd(L)_2^0]_{total} \cdot (1 - dialyse) \cdot k_i = [Cd(L)_2^0]_{libre} \cdot k_i$$

où $(1 - dialyse)$ représente la fraction de $Cd(L)_2^0$ en solution non liée aux acides humiques. Nous pouvons alors comparer les points expérimentaux avec le modèle (cf. figure 7.3 et 7.4), les paramètres permettant de réaliser ces figures sont compilés dans le tableau 7.1.

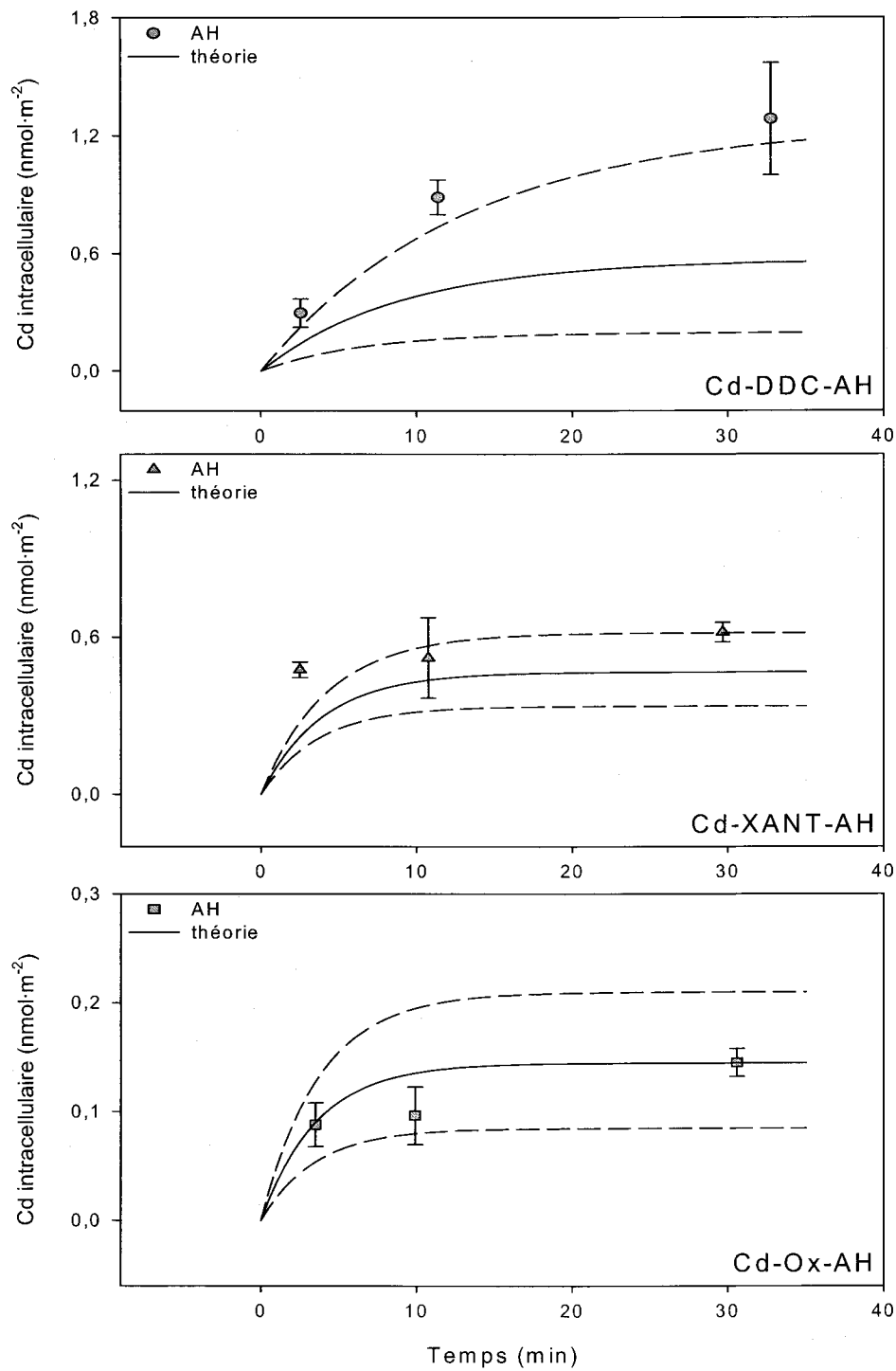


Figure 7.3 : Prises en charge expérimentales (symboles) et théoriques (lignes noires) des complexes $Cd(L)_2^0$ en présence des AH par *C. reinhardtii* à pH 7. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.

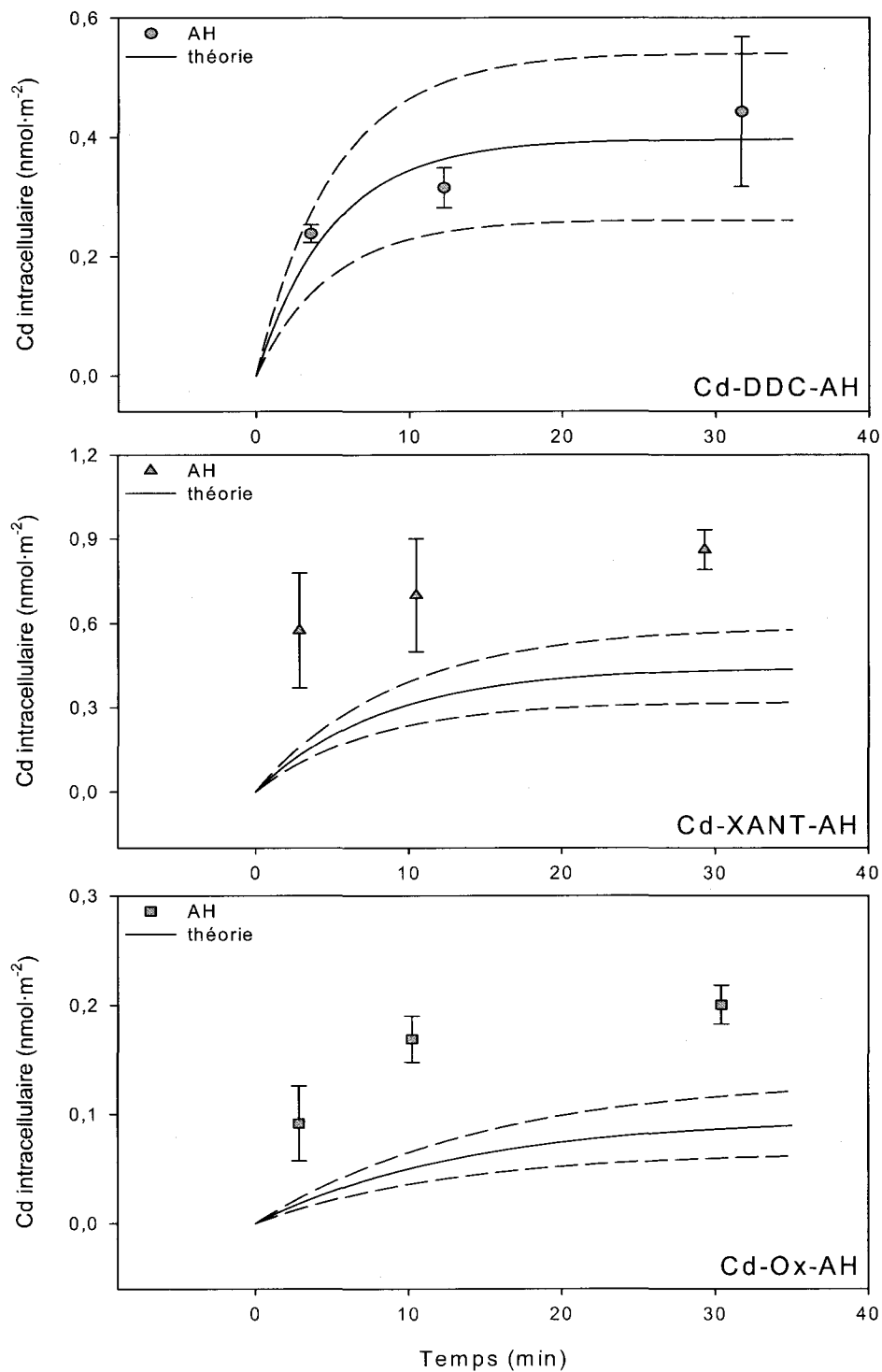


Figure 7.4 : Prises en charge expérimentales (symboles) et théoriques (lignes noires) des complexes $Cd(L)_2^0$ en présence des AH par *C. reinhardtii* à pH 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.

Tableau 7.1 : Compilation des paramètres k_i et k_e pour les systèmes Cd-L-AH à pH 7 et 5,5 tels que déterminés dans la section 6.4 pour les systèmes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ en absence des AH (\pm représente l'erreur-type sur la valeur). k'_i est calculée selon l'équation 7.1.

pH	système	k_i ($10^{-4} \cdot \text{min}^{-1}$)	k_e (min^{-1})	$[\text{Cd}(\text{L})_2^0]$ libre en %	k'_i ($\text{nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$)
7	Cd-DDC-AH	20 ± 3	$0,325 \pm 0,059$	12 ± 6	$0,063 \pm 0,033$
	Cd-XANT-AH	16 ± 4	$0,685 \pm 0,017$	27 ± 2	$0,118 \pm 0,027$
	*Cd-Ox-AH	20 ± 3	$0,313 \pm 0,002$	78 ± 5	$0,040 \pm 0,016$
5,5	Cd-DDC-AH	$2,8 \pm 0,9$	$0,224 \pm 0,002$	$98,6 \pm 0,2$	$0,080 \pm 0,026$
	Cd-XANT-AH	$0,7 \pm 0,1$	$0,356 \pm 0,007$	$28,0 \pm 0,4$	$0,054 \pm 0,011$
	*Cd-Ox-AH	83 ± 22	$0,115 \pm 0,001$	86 ± 3	$0,007 \pm 0,002$

* calcul réalisé selon les proportions de $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ discutées à la section 6.8.3.3.

La prise en charge des complexes $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ à pH 7 et $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ à pH 5,5, telle que prédite par le modèle, s'ajuste plutôt bien aux points expérimentaux. En revanche dans tous les autres cas, le modèle sous-estime à des degrés variés la prise en charge de ces complexes. Ceci signifie que les hypothèses 3 et 4 sont confirmées puisque le modèle en présence des AH (et en ne tenant compte que de l'association entre les AH et les complexes neutres) sous-estime la prise en charge. Autrement dit, la présence des AH augmente la prise en charge des complexes neutres par rapport à ce qu'aurait prédit le modèle (hypothèse 3) et, comme dans le cas du système Cd-XANT-AH, le modèle sous-estime d'autant plus la prise en charge que le pH diminue (hypothèse 4).

D'un point de vue purement «modélisation», l'ajustement s'améliore si nous augmentons k_i ou si nous diminuons k_e . Cependant, ces deux constantes sont interdépendantes (elles s'appliquent à une même membrane biologique) et si l'une augmente, l'autre devrait suivre la même tendance. Il n'apparaît donc pas opportun d'expliquer un tel écart entre le modèle et les points expérimentaux par les constantes d'élimination et d'internalisation. Il reste donc le coefficient de Cd labile (C) qui peut être modifié. Effectivement, si nous diminuons la fraction de Cd labile à pH neutre (cf. tableau 7.2) alors le modèle se rapproche convenablement des points expérimentaux. En revanche à pH acide, si nous diminuons C alors seul les points expérimentaux autour de 30 min sont bien modélisés tandis que les points pour des temps inférieurs ne sont plus du tout pris en compte par le modèle (cf. figure 7.5).

Il est donc clair que la modélisation, en ne tenant compte que de l'association $Cd(L)_2^0$ avec les AH, ne rend pas fidèlement compte des valeurs expérimentales. D'autres phénomènes doivent intervenir, comme par exemple l'influence des SH sur la membrane biologique, mais à ce stade-ci de la discussion il serait prématuré d'essayer de les modéliser.

Tableau 7.2 : Variations sur la fraction labile de Cd (C) permettant d'améliorer la modélisation de la prise en charge dans les systèmes Cd-L-AH (\pm est l'erreur-type en tenant compte de la propagation des erreurs, N = 9).

pH	Système	fraction C en absence des AH	fraction C modifiée améliorant le modèle
7	Cd-DDC-AH	0,34 \pm 0,06	0,10
	Cd-XANT-AH	0,37 \pm 0,02	0,29
	Cd-Ox-AH	0,89 \pm 0,03	la même valeur est convenable
5,5	Cd-DDC-AH	0,91 \pm 0,02	la même valeur est convenable
	Cd-XANT-AH	0,34 \pm 0,03	0,13
	Cd-Ox-AH	0,63 \pm 0,05	0,05

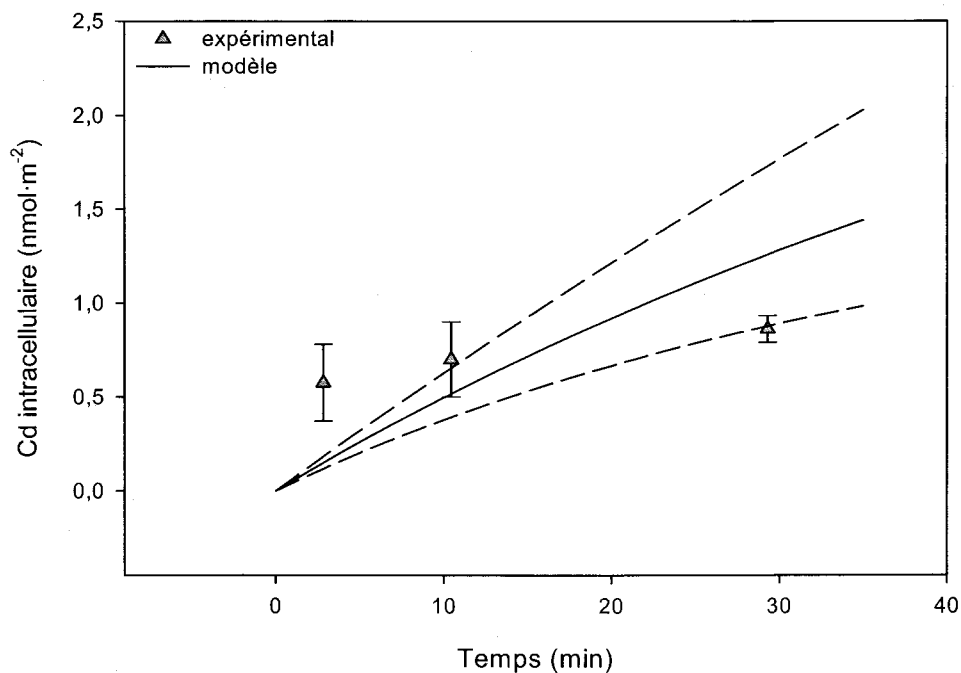


Figure 7.5 : Prise en charge expérimentale à pH 5,5 du Cd sous forme $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ comparée à celle calculée par le modèle en faisant varier C (se référer au texte pour plus de détails).

7.2 Comparaison de la prise en charge dans les systèmes Cd-L-AH avec les systèmes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$

Puisque la modélisation ne permet pas de bien rendre compte des résultats de nos expériences de bioaccumulation du Cd sous forme $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ en présence des AH, nous allons baser notre discussion sur des paramètres expérimentaux. Ainsi, nous établissons la discussion sur les paramètres «a» (prise en charge sur le plateau) et k_i (constante d'internalisation) car d'une part ces paramètres sont accessibles expérimentalement et d'autre part nous n'avons pas de données expérimentales concernant k_e en présence des SH. Les paramètres expérimentaux k_i et «a» sont compilés dans le tableau 7.3 ; leur variation entre les systèmes en absence ou en présence des AH est, quant à elle, présentée dans le

tableau 7.4. Les effets avec les autres fractions de SH (AF et MON) sont traités à la section 7.4.

7.2.1 Discussion sur la prise en charge sur le plateau «a»

Tableau 7.3 : Compilation des paramètres «a» et k_i pour les systèmes Cd(L)_2^0 et Cd-L-AH à pH 7 et 5,5 (\pm représente l'erreur-type sur la valeur).

pH	système	«a» ($\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}$)	k_i ($10^{-4}\cdot\text{min}^{-1}$)	% d'association Cd-L-AH
7	Cd(DDC)_2^0	$4,4 \pm 0,2$	20 ± 3	-
	Cd-DDC-AH	$1,3 \pm 0,004$	54 ± 8	88 ± 6
	Cd(XANT)_2^0	$2,1 \pm 0,10$	16 ± 4	-
	Cd-XANT-AH	$0,58 \pm 0,03$	26 ± 2	73 ± 2
	Cd(Ox)_n	$0,80 \pm 0,03$	* 20 ± 3	-
	Cd-Ox-AH	$0,13 \pm 0,01$	* $4,0 \pm 0,9$	22 ± 5
5,5	Cd(DDC)_2^0	$0,43 \pm 0,01$	$2,8 \pm 0,9$	-
	Cd-DDC-AH	$0,41 \pm 0,02$	$2,3 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$
	Cd(XANT)_2^0	$0,94 \pm 0,06$	$6,6 \pm 1,3$	-
	Cd-XANT-AH	$0,79 \pm 0,06$	25 ± 9	$72,0 \pm 0,4$
	Cd(Ox)_n	$0,25 \pm 0,01$	* 83 ± 22	-
	Cd-Ox-AH	$0,198 \pm 0,002$	* 130 ± 48	14 ± 3

* calcul réalisé selon les proportions de Cd(Ox)_2^0 déterminées à la section 6.8.3.3.

À pH 7, le complexe Cd(XANT)_2^0 en présence des AH montre un pourcentage de diminution sur «a» (74 ± 5) % (cf. tableau 7.4) qui correspond très bien à l'association Cd-XANT-AH (diminution sur «a» statistiquement comparable à la proportion de complexe associé aux AH). Quant au complexe Cd(DDC)_2^0 , la diminution sur «a» (69 ± 3) %

proviendrait aussi en grande partie de l'association Cd-DDC-AH (la comparaison entre l'association Cd-DDC-AH et le pourcentage de diminution sur «a» donne $P = 0,047$ par un test t non pairé de Student ; la différence statistique est donc peu marquée). En revanche dans le cas du système $\text{Cd}(\text{Ox})_n$, la diminution sur «a» est beaucoup plus grande que prévue par l'association Cd-Ox-AH déterminée par l'expérience de dialyse (14 ± 3) %. De nouveau l'oxine se démarque, mais ce calcul ne discrimine pas entre les formes $\text{CdOx}^+\text{-AH}$ et $\text{Cd}(\text{Ox})_2\text{-AH}$; l'association entre le complexe neutre $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ et les AH pourrait être alors plus élevée que 22 ± 5 %. Ainsi, si nous reprenons les calculs des expériences de dialyse et que nous supposons qu'uniquement le complexe neutre $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ (en proportion de 30% du Cd total) s'associe aux AH, alors nous obtenons comme pourcentage d'association (75 ± 18) % pour le système Cd-Ox-AH à pH 7. À partir de là, si nous considérons que la prise en charge à pH neutre s'explique effectivement par la présence de 30% de complexe neutre (cf. section 6.8) alors la diminution sur «a» (83 ± 7) % s'expliquerait en grande partie par l'association Cd- $(\text{Ox})_2\text{-AH}$ telle que nouvellement estimée (75 ± 18) % à pH neutre.

Tableau 7.4 : Effet dans les systèmes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ de la présence des AH sur le paramètre «a» et sur la constante k_i aux pH 7 et 5,5 ; \pm représente l'erreur-type sur les valeurs en tenant compte de la propagation des erreurs.

pH	Système	* Diminution sur «a» en %	* Augmentation sur k_i en %
7	Cd-DDC-AH	69 \pm 3	175 \pm 38
	Cd-XANT-AH	74 \pm 5	61 \pm 14
	Cd-Ox-AH	83 \pm 7	-80 \pm -22
5,5	Cd-DDC-AH	<i>pas de différence statistique</i>	<i>pas de différence statistique</i>
	Cd-XANT-AH	16 \pm 2	279 \pm 114
	Cd-Ox-AH	21 \pm 1	55 \pm 25

* la diminution sur «a» se calcule par $1 - [(\text{«a» en présence des AH}) / (\text{«a» en absence des AH})]$; l'augmentation sur k_i provient du calcul $[(k_i \text{ en présence des AH}) / (k_i \text{ en absence des AH})] - 1$.

A pH acide, il n'apparaît pas de diminution statistiquement significative sur «a» pour le complexe neutre $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$. Nous pouvons relier ce résultat à la faible association Cd-DDC-AH observée en dialyse. Autrement dit, la prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ n'est pas modifiée par la présence des AH. Quant au complexe $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$, l'association Cd-XANT-AH demeure élevée à pH acide tout comme à pH neutre, or la prise en charge à pH 5,5 est légèrement mais significativement diminuée (16 \pm 2) % en présence des AH. Il est possible que deux effets contradictoires aient lieu simultanément : i) l'association Cd-XANT-AH qui diminue la concentration de $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ disponible pour la bioaccumulation, ii) l'excès du XANT⁻ perméabilise la membrane de l'algue et s'oppose au premier effet (cf. section 6.7). La résultante apparente est une faible diminution de prise en charge (i l'emporte sur ii). Pour le système $\text{Cd}(\text{Ox})_n$ et toujours à pH acide, la diminution sur «a» (21 \pm 1) % est plus faible qu'à pH 7 (83 \pm 7) % . En utilisant la même approche

qu'à pH neutre, à pH 5,5 nous avons conclu que près de 1% du Cd serait sous forme $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ (cf. section 6.8). Si nous tenons compte de cette proportion dans les expériences de dialyse, nous aboutissons à une valeur corrigée pour l'association $\text{Cd}(\text{Ox})_2\text{-AH}$ de l'ordre de $(70,9 \pm 0,4) \%$ à pH 5,5. Dans ce cas, la baisse de prise en charge sur le plateau ne s'explique pas entièrement par l'intermédiaire du comportement en solution du complexe neutre. Les mêmes arguments que pour le $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ peuvent être avancés, à savoir deux effets contradictoires simultanés, l'association $\text{Cd}(\text{Ox})_2\text{-AH}$ et l'excès de ligand perméabilisant HOx.

Nous avons démontré à la section 7.2 qu'en utilisant le modèle de prise en charge développé en absence des SH, et en tenant compte de l'association des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ avec les AH nous n'étions pas en mesure de modéliser correctement les points expérimentaux. Or, dans cette section nous concluons que l'association des complexes neutres avec les AH permet de bien expliquer la diminution du paramètre «a» dans tous les systèmes à pH 7, et pour le $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ à pH 5,5. Une telle opposition pourrait intervenir si k'_i (vitesse initiale de prise en charge du Cd) est sensible à la fois à l'association des complexes neutres avec les AH mais aussi aux effets des SH sur la membrane biologique et ce de façon temporaire. Nous allons mieux décrire ce phénomène en étudiant les constantes d'internalisation expérimentales dans la section qui suit.

7.2.2 Discussion sur la constante d'internalisation k_i

Nous avons auparavant fixé k_i égal aux valeurs dans la section 6.4 et calculé k'_i pour tenter de modéliser les points expérimentaux. Cela n'a pas fonctionné, c'est pourquoi maintenant nous extrayons k_i des données expérimentales en tenant compte de la concentration de complexe neutre «libre».

Concernant k_i , nous avons $k_i = k'_i / [\text{Cd}(\text{L})_2^0]$ (cf. section 6.4) mais en présence de SH la concentration de complexe $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ n'est pas égale à celle totale car une partie est associée avec les AH. En considérant cette nouvelle «molécule» Cd-L-AH non biodisponible pour les algues (taille trop grande pour être prise en charge par une algue unicellulaire), nous

calculons donc k_i en tenant compte de cette association Cd-L-AH. Dans le tableau 7.3 nous faisons donc figurer k_i calculé de la manière suivante :

$$(7.2) \quad k_i = \frac{J_{obs} \cdot [cell] \cdot A}{[Cd(L)_2^0]_{total} \cdot (1 - dialyse)} = \frac{J_{obs} \cdot [cell] \cdot A}{[Cd(L)_2^0]_{libre}}$$

qui est la même équation que 6.10 avec comme différence la prise en compte de l'association entre le complexe $Cd(L)_2^0$ et les AH, telle que déterminée par dialyse (cf. section 4.3) ; l'expression $(1 - dialyse)$ traduit la fraction libre, non liée, du complexe $Cd(L)_2^0$; J_{obs} est la constante telle que déterminée à la section 6.4 ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) ; $[cell]$ est la densité cellulaire moyenne de nos expériences ($15 \cdot 10^6 \text{ cell} \cdot \text{L}^{-1}$) ; A est la superficie moyenne de l'algue ($94,1 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{cell}^{-1}$ à pH 7 et $86,8 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{cell}^{-1}$ à pH 5,5) et $[Cd(L)_2^0]_{total}$ vaut 0,38 nM.

À ce stade-ci de notre discussion et avant de discuter de l'influence des AH sur k_i , il convient de rappeler les propriétés importantes des AH qui peuvent jouer en faveur ou non d'une augmentation de la perméabilité membranaire :

- 1) Nous savons que les AH se sorbent de plus en plus aux surfaces biologiques à mesure que le pH diminue (Campbell *et al.* 1997). Leur sorption aux surfaces biologiques entraînent des modifications de perméabilité membranaire à pH acide mais pas à pH neutre de l'algue comme cela a été démontré par Vigneault *et al.* (2000). Les travaux de Cook (Cook R.L. 2006, communication personnelle, Département de Chimie, Louisiana State University) abondent aussi dans ce sens. Ce chercheur propose que les AH s'adsorbent aux membranes biologiques (étape 1) avant d'insérer leur partie hydrophobe au sein de la membrane (étape 2 d'absorption). Ils démontrent aussi que ce phénomène a lieu uniquement à des pH acides tout en suggérant que cela favoriserait la pénétration de contaminants.
- 2) Nous avons aussi démontré que les AH sont plus tensioactifs à pH 7 qu'à pH 5,5, pour une force ionique et une concentration en AH comparables à celles

des milieux d'exposition dans les expériences de prise en charge (section 4.1). Si nous considérons que ces AH s'accumulent dans la phycosphère, alors ils pourraient jouer un rôle dans l'augmentation de la perméabilité membranaire à pH 7. En réalité, dans le milieu pharmacologique, les composés organiques surfactants sont connus pour perméabiliser les membranes biologiques, en particulier celles humaines (Fischer *et al.* 1998 ; Xia et Onyuksel 2000). L'insertion du surfactant monomère semble aussi l'étape obligée pour que la perméabilisation ait lieu. Le phénomène de tension de surface traduirait donc pour les AH, le même mécanisme que décrit au point 1 à savoir l'insertion des AH dans la membrane. Cette insertion des AH dans les membranes biologiques à pH 7 n'est pas contradictoire avec les résultats du point 1 pour lequel l'insertion est plus grande à pH acide qu'à pH neutre. En effet, la diminution de tension de surface serait due à l'agglomération des AH avec une diminution de pH (cf. section 4.1), les AH étant alors plus hydrophobes à pH acide, ce qui devrait favoriser leurs interactions avec la partie lipidique des membranes biologiques. Quoiqu'il en soit, l'insertion des AH dans les membranes biologiques devrait être plus élevée à pH 5,5 qu'à pH 7 car quantitativement les expériences de Vigneault *et al.* (2000), de Twiss *et al.* (1999) et de l'équipe de Cook *et al.* (Cook R.L. 2006, communication personnelle, Département de Chimie, Louisiana State University) ont bien démontré cet effet de pH.

- 3) Cet effet perméabilisant des AH serait cependant compensé par une diminution de la concentration effective des AH ou plutôt d'une modification des propriétés de sorption des AH envers les membranes biologiques. En effet, les expériences de fluorescence ont démontré que les ligands organiques interagissent avec les AH en modifiant l'intensité de fluorescence des AH et en déplaçant les pics d'intensité maximale. Si nous relierons qualitativement une atténuation de fluorescence («quenching») à une association L-AH, alors nous pouvons tirer l'ordre d'association suivant : AH-Ox pH 7 > AH-Ox pH 5,5 > AH-XANT pH 7 ~ AH-XANT pH 5,5 >

AH-DDC pH 7 > AH-DDC pH 5,5 (cf. section 5.5). Cependant, les ligands ne sont pas présents en concentrations égales. La seule conclusion valable est que le DDC (1 μM) n'interagit que peu ou pas avec les AH ($[\text{AH}] = 3,8 \mu\text{M}$), quelque soit le pH ; l'Ox s'associe plus que le XANT avec les AH, quelque soit le pH, alors que la concentration d'Ox est légèrement plus faible que celle de XANT (respectivement 79 μM et 100 μM). Autrement dit, les effets des points 1 et 2 devraient être diminués (mais dans quelle proportion ?) surtout en présence d'Ox, dans une moindre mesure en présence de XANT et pas du tout en présence de DDC.

Il existe donc un mécanisme qui peut entraîner une augmentation de perméabilité membranaire par les AH à pH 7 (par l'intermédiaire de la tension de surface qui se traduit par une insertion partielle de la substance tensioactive dans la membrane lipidique) et à pH 5,5 (ad/absorption des AH dans la membrane biologique). Cette insertion serait néanmoins plutôt favorisée à pH 5,5 par rapport à pH 7.

Considérons maintenant les résultats. À pH 7 la constante d'internalisation k_i suit deux types d'évolution différents : k_i augmente dans les systèmes Cd-DDC-AH et Cd-XANT-AH tandis que k_i diminue pour le système Cd-Ox-AH, comparé à k_i dans les systèmes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ en absence des AH. Pour les complexes neutres $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ et $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$, cela semble contradictoire avec une diminution de prise en charge à l'état stationnaire (paramètre «a») mais cette augmentation pourrait être temporaire. En effet, de la manière dont les expériences de prise en charge sont conduites, les algues sont exposées aux SH pour la première fois lors de l'inoculation (cf. section 3.4). Il est donc envisageable que les algues «réagissent» à la présence de ces molécules et ce aux deux pH en augmentant leur perméabilité membranaire. L'acclimatation serait alors plutôt courte, quelques minutes, après quoi les algues bioaccumuleraient le cadmium en fonction du comportement en solution des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ en présence des AH (cf. discussion sur «a» section 7.2.1).

À pH acide et par rapport aux systèmes ne contenant pas les AH, k_i augmente pour les systèmes Cd-Ox-AH et Cd-XANT-AH. Pour le complexe $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$, il s'agit d'un retournement complet de comportement. Pour le complexe $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ l'augmentation de

k_i est plus grande à pH acide qu'à pH neutre. D'autre part, cette constante n'est pas statistiquement modifiée pour le système Cd-DDC-AH.

Ces variations sur k_i en présence des AH apparaissent complexes et difficilement reliées à un effet en particulier. Le tableau 7.5 tente de compiler les effets connus de la littérature et ceux démontrés dans notre étude. Nous avons arbitrairement attribué des symboles positifs ou négatifs à chacun des effets, 0 indique une absence d'effet sur la perméabilité membranaire, un signe positif représente une augmentation de perméabilité d'autant plus forte qu'il y a de symbole, et inversement si le symbole est négatif. Dans la colonne résultat, nous effectuons la somme de tous les signes d'une même ligne, et nous confrontons alors ces résultats avec une représentation «théorique». Pour cette dernière nous attribuons la côte ++ pour le système Cd-XANT-AH à pH 5,5 car la constante k_i y varie le plus fortement. Toutes les autres côtes de cette colonne sont alors exprimés en relation avec le système Cd-XANT-AH à pH 5,5. Par ailleurs, concernant l'Ox, nous considérons que l'effet de l'excès de ligand est dû en particulier à l'espèce chargée puisque les agents cationiques sont connus pour déstabiliser les membranes des bactéries (Vaara 1992). Pour l'Ox à pH 7, HOx est présent à plus de 99,9% alors qu'à pH 5,5 sa proportion diminue à 78%, les 22% restant étant H_2Ox^+ . Nous attribuons alors un effet 0 à pH 7 et un effet ++ à pH 5,5 pour l'excès d'oxine.

Tableau 7.5 : Compilation des possibles effets des AH et des ligands organiques sur la perméabilité membranaire de *C. reinhardtii* aux pH 7 et 5,5. Pour les détails se référer au texte.

pH	Système	Excès de L	Insertion des AH dans la membrane	Association $Cd(L)_2^{0+}$ AH	Association L + AH	Résultat	Théorie
7	Cd-DDC-AH	0	+	0	0	+	+
	Cd-XANT-AH	++	+	0	-	++	+
	Cd-Ox-AH	0	+	0	--	-	-
5,5	Cd-DDC-AH	0	++	0	0	++	0
	Cd-XANT-AH	++	++	0	-	+++	++
	Cd-Ox-AH	++	++	0	--	++	+

À l'étude du tableau 7.5, nous nous rendons compte que les variations sur k_i (par rapport à un système en absence des AH) s'explique bien dans la plupart des cas (en rouge) si nous tenons compte de tous les effets connus qui pourraient éventuellement modifier la perméabilité membranaire de *C. reinhardtii*.

Dans l'état actuel de notre étude, un seul cas ne cadre pas avec notre modèle conceptuel, à savoir le système Cd-DDC-AH à pH 5,5 mais une amélioration de ce modèle conceptuel se fera jour à la section 9.3.2.

7.3 Comparaison de la prise en charge dans les systèmes Cd-L-(AF ou MON) avec les systèmes Cd(L)₂⁰

Avant d'entamer toute comparaison entre les fractions de SH, il est important de noter qu'à l'inverse de l'approche que nous avons utilisée jusqu'ici, nous n'avons pas «accès» à k_i . En effet, cette constante d'internalisation est calculée selon l'équation 7.2, ce qui sous-entend de connaître le pourcentage d'association entre les SH et les complexes Cd(L)₂⁰. Or, nous n'avons pas pu, ni par dialyse ni par fluorescence, déterminer quantitativement cette association. Nous décidons alors dans cette section de baser notre discussion et les comparaisons sur k'_i (vitesse initiale de prise en charge du Cd) et sur «a» (prise en charge sur le plateau).

Tableau 7.6 : Compilation des paramètres «a» issu des régressions non linéaires (N = 9) et k'_i expérimental (N = 3) pour les systèmes Cd-L-SH à pH 7 (\pm représente l'erreur type sur la valeur).

pH 7	Fraction	«a» (nmol·m ⁻²)	diminution sur «a» en %	k'_i (nmol·m ⁻² ·min ⁻¹)	diminution sur k'_i en %
Cd-DDC-SH	-	4,4 ± 0,2	-	0,529 ± 0,088	-
	AF	2,2 ± 0,1	28 ± 5	0,114 ± 0,036	78 ± 28
	MON	3,1 ± 0,6	49 ± 3	0,116 ± 0,029	78 ± 23
	AH	1,3 ± 0,003	69 ± 3	0,174 ± 0,024	67 ± 14
Cd-XANT-SH	-	2,2 ± 0,1	-	0,435 ± 0,072	-
	AF	1,3 ± 0,03	40 ± 2	0,264 ± 0,067	<i>pas de différences statistiques</i>
	MON	1,2 ± 0,005	48 ± 2	0,128 ± 0,035	71 ± 25
	AH	0,58 ± 0,03	74 ± 5	0,190 ± 0,012	56 ± 13
Cd-Ox-SH	-	0,80 ± 0,03	-	0,161 ± 0,024	-
	AF	0,36 ± 0,02	56 ± 4	0,067 ± 0,012	58 ± 14
	MON	0,24 ± 0,01	70 ± 3	0,044 ± 0,007	72 ± 16
	AH	0,13 ± 0,01	83 ± 7	0,025 ± 0,006	84 ± 23

* la diminution sur «a» se calcule par $1 - [(\text{«a» en présence des AH}) / (\text{«a» en absence des AH})]$; la diminution sur k'_i provient du calcul $1 - [(k'_i \text{ en présence des AH}) / (k'_i \text{ en absence des AH})]$.

Tableau 7.7 : Compilation des paramètres «a» issu des régressions non linéaires (N = 9) et k'_i expérimental (N = 3) pour les systèmes Cd-L-SH à pH 5,5 (\pm représente l'erreur type sur la valeur).

pH 5,5	Fraction	«a» ($\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}$)	diminution sur «a»	k'_i ($\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$)	diminution sur k'_i
Cd-DDC-SH	-	$0,43 \pm 0,01$	-	$0,082 \pm 0,026$	-
	AF	$0,40 \pm 0,03$	<i>pas de différences statistiques</i>	$0,066 \pm 0,025$	<i>pas de différences statistiques</i>
	MON	$0,31 \pm 0,01$	28 ± 1	$0,070 \pm 0,008$	<i>pas de différences statistiques</i>
	AH	$0,41 \pm 0,02$	<i>pas de différences statistiques</i>	$0,067 \pm 0,004$	<i>pas de différences statistiques</i>
Cd-XANT-SH	-	$0,94 \pm 0,06$	-	$0,192 \pm 0,039$	-
	AF	$0,60 \pm 0,06$	37 ± 4	$0,186 \pm 0,024$	<i>pas de différences statistiques</i>
	MON	$0,74 \pm 0,01$	21 ± 1	$0,160 \pm 0,067$	<i>pas de différences statistiques</i>
	AH	$0,79 \pm 0,06$	<i>pas de différences statistiques</i>	$0,203 \pm 0,072$	<i>pas de différences statistiques</i>
Cd-Ox-SH	-	$0,25 \pm 0,01$	-	$0,024 \pm 0,006$	-
	AF	$0,27 \pm 0,002$	<i>pas de différences statistiques</i>	$0,033 \pm 0,010$	<i>pas de différences statistiques</i>
	MON	$0,22 \pm 0,006$	14 ± 1	$0,019 \pm 0,007$	<i>pas de différences statistiques</i>
	AH	$0,20 \pm 0,002$	21 ± 1	$0,032 \pm 0,012$	<i>pas de différences statistiques</i>

* la diminution sur «a» se calcule par $1 - [(\text{«a» en présence des AH}) / (\text{«a» en absence des AH})]$; la diminution sur k'_i provient du calcul $1 - [(k'_i \text{ en présence des AH}) / (k'_i \text{ en absence des AH})]$.

7.3.1 Discussion de la prise en charge sur le plateau «a»

Dans le tableau 7.6 nous faisons figurer les valeurs à pH 7 de «a» en présence des trois fractions de SH et nous les comparons aux systèmes Cd(L)_2^0 qui ne contiennent pas de SH. La première observation qui saute aux yeux est la diminution de «a» à pH 7 dans les trois systèmes Cd(L)_2^0 en présence de n'importe laquelle des trois fractions de SH. En outre, cette diminution de la prise en charge sur le plateau suit l'ordre $\text{AH} > \text{MON} > \text{AF}$ quelque soit le complexe Cd(L)_2^0 . Si le comportement en solution des complexes Cd(L)_2^0 en présence des AH explique la diminution de «a» à pH 7 alors nous pouvons spéculer que l'association Cd(L)_2^0 avec les SH suit elle aussi l'ordre suivant : $\text{AH} > \text{MON} > \text{AF}$ à pH 7. Notons que cet ordre d'association n'est pas celui que nous dégagons avec les expériences de fluorescence (section 5.6). Comme nous l'avons déjà mentionné, la proportion des changements de fluorescence n'est pas forcément reliée linéairement à l'association entre les complexes Cd(L)_2^0 et les SH.

Si nous nous concentrons maintenant sur le tableau 7.7, qui nous donnent les valeurs de «a» à pH 5,5, les conclusions sont différentes de celles à pH neutre. Ainsi, nous constatons que la MON demeure la seule fraction en mesure de diminuer la prise en charge sur le plateau pour les trois systèmes Cd(L)_2^0 bien que cet abaissement soit au moins deux fois moins fort qu'à pH 7. Concernant les AF, ils n'influencent pas de façon significative la prise en charge du Cd en présence des ligands DDC et Ox tandis que la diminution que les AF entraînent pour la bioaccumulation du Cd sous forme Cd(XANT)_2^0 est comparable à celle à pH 7.

7.3.2 Discussion sur la vitesse initiale de prise en charge k'_i

À pH neutre, le tableau 7.6 indique que k'_i en présence de n'importe quelle fraction de SH, et quelque soit le système, est diminuée en comparaison avec le même système sans SH (hormis le système $\text{Cd(XANT)}_2^0 + \text{AF}$ mais cela est dû aux erreurs types élevées qui entraînent une absence de différences statistiques). Ici, nous pouvons à l'instar de la section 7.2 avancer l'hypothèse que l'association Cd(L)_2^0 et SH diminue la quantité de Cd(L)_2^0 libre et donc sa vitesse de prise en charge initiale. Nous ne pouvons cependant pas dire si cette diminution est comparable à leur association (données non disponibles comme nous

l'avons dit en avant-propos de la section 7.3) ou bien si l'insertion des SH dans la membrane biologique limite la diminution sur k'_i (effet compensatoire).

À l'opposé du comportement à pH neutre, la vitesse initiale de prise en charge des complexes $Cd(L)_2^0$ à pH 5,5 en présence des SH ne subit aucunes variations significatives par rapport à un système ne contenant pas de SH. Ceci signifie que même s'il y a association entre les complexes $Cd(L)_2^0$ et les fractions de SH, cela n'est pas suffisant pour diminuer la vitesse initiale de prise en charge des complexes neutres. L'insertion des SH dans les membranes biologiques, en augmentant la perméabilité membranaire est le phénomène le plus plausible qui compenserait la diminution de $Cd(L)_2^0$ «libre» à pH acide.

7.4 Synthèse des effets des SH

Le modèle développé pour les complexes $Cd(L)_2^0$ en absence des AH ne permet pas de prédire adéquatement la bioaccumulation du Cd en présence des AH, ce qui nous amène à confirmer les hypothèses 3 et 4 (les AH augmentent la perméabilité membranaire). En effet, k_i (constante d'internalisation) est modifiée de façon complexe et nous ne pouvons pas tenir compte uniquement de l'association $Cd(L)_2^0 + AH$. L'insertion des AH dans la membrane biologique telle que démontrée dans nos laboratoires (Vigneault *et al.* 2000) et par une autre équipe (Cook R.L. 2006, communication personnelle, Département de Chimie, Louisiana State University), est un phénomène majeur qui augmente la perméabilité membranaire des algues et dont il faudra tenir compte à l'avenir de façon quantitative.

Concernant le paramètre «a» déterminé expérimentalement, qui est la bioaccumulation des complexes neutres sur le plateau à l'état stationnaire, il incorpore k_i , k_e et C (respectivement constante d'internalisation du Cd, constante d'élimination du Cd, fraction intracellulaire de Cd labile). A pH 7, ce paramètre dépend largement du comportement en solution des complexes $Cd(L)_2^0$ en présence des AH ; nous spéculons que cela devrait être aussi le cas pour les deux autres fractions avec un ordre d'association : $Cd(L)_2^0 + AH > Cd(L)_2^0 + MON > Cd(L)_2^0 + AF$; ceci confirme l'hypothèse 2 pour laquelle l'association entre les SH et les complexes neutres devrait diminuer la prise en charge des complexes neutres. En revanche,

à pH 5,5 le comportement en solution des complexes Cd(L)_2^0 en présence des SH (diminution de Cd(L)_2^0 «libre») associé à l'excès de ligand (perméabilisant la membrane de l'algue) pourrait expliquer les faibles, voire les absences de diminutions observées sur «a».

Dans le cadre de l'étude de la bioaccumulation des complexes neutres Cd(L)_2^0 en présence des acides humiques AH, la constante k_i mesurée expérimentalement fait apparaître des comportements complexes qui nécessite de faire intervenir tous les effets connus (littérature) et expérimentaux (notre étude) pour tenter de comprendre ses variations en présence des AH.


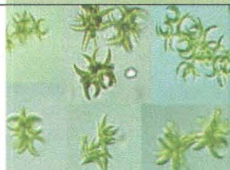
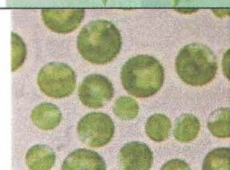
Le tableau 7.5 résume bien tous ces effets et nous permet, tout du moins conceptuellement, de mieux comprendre l'influence des AH sur la bioaccumulation de complexes neutres par une algue verte unicellulaire. Un seul système n'a pas pu être élucidé, le $\text{Cd(DDC)}_2^0 + \text{AH}$ à pH 5,5 puisque le tableau conceptuel 7.5 ne permet pas de prédire la variation de k_i en présence des AH.



8. Prise en charge du complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par trois algues vertes unicellulaires en absence de substances humiques*

Un des objectifs de ce doctorat est d'étudier l'effet de l'espèce de l'algue sur la bioaccumulation de complexes neutres. Nous nous sommes concentrés pour cette partie sur un seul complexe neutre, le $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$, car en présence de DDC, le Cd est à plus de 99,9% sous forme $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ aux pH 7 et 5,5, en présence ou non de substances humiques, ce qui simplifie l'analyse et la comparaison des résultats. Avant d'entrer dans le vif du sujet, nous présentons au tableau 8.1, quelques caractéristiques pour les trois algues étudiées afin que le lecteur visualise mieux les différences entre ces algues.

Tableau 8.1 : Quelques caractéristiques concernant les trois algues étudiées.

pH	algue	superficie déterminée expérimentalement en phase exponentielle (μm^2 ; N = 27)	motile	forme
5,5	<i>C. reinhardtii</i>	87 ± 3	oui	
7		94 ± 2		
5,5	<i>P. subcapitata</i>	67 ± 2	non	
7		68 ± 2		
5,5	<i>C. pyrenoïdosa</i>	120 ± 12	non	
7		107 ± 9		

* sauf avis contraire, les barres d'erreurs sur les graphiques des sections 8 à 9 représentent un écart-type (N = 3).

8.1 Coefficients de diffusion et d'internalisation

En supposant que les coefficients de diffusion du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ aux pH 5,5 et 7 sont environ 25% plus petits que ceux du Cd^{2+} libre (cf. section 6.2), nous vérifions qu'il n'y a pas de pertes de Cd dans la zone non agitée (phycosphère) de nos milieux d'expérience. Autrement dit, nous vérifions que le flux diffusif J_{dif} est supérieur au flux d'internalisation J_{obs} (cf. tableau 8.2), le calcul de ce dernier se fait selon les explications de la section 6.2. Concernant ces flux en présence de SH, nous avons fait seulement figurer dans le tableau 8.2 le flux d'internalisation le plus élevé que nous avons observé (autrement dit le cas le plus défavorable). Encore une fois l'étape limitante pour la bioaccumulation du Cd est son internalisation, pas sa diffusion de la solution vers la surface algale.

Tableau 8.2 : Résultats des flux de diffusion et d'internalisation du Cd chez *C. reinhardtii*, *P. subcapitata* et *C. pyrenoïdosa* aux pH 5,5 et 7 pour Cd^{2+} et $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ en présence ou non de SH.

pH	espèce	système	r (cm)	J_{dif} ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	J_{obs} ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	$J_{\text{dif}}/J_{\text{obs}}$
5,5	<i>C. reinhardtii</i>	Cd^{2+}	$2,63\cdot 10^{-4}$	$1,17\cdot 10^{-14}$	$5,87\cdot 10^{-18}$	2 000
	<i>P. subcapitata</i>	Cd^{2+}	$2,33\cdot 10^{-4}$	$1,30\cdot 10^{-14}$	$4,21\cdot 10^{-19}$	31 000
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	Cd^{2+}	$3,10\cdot 10^{-4}$	$1,02\cdot 10^{-14}$	$4,64\cdot 10^{-18}$	2 000
	<i>C. reinhardtii</i>	Cd-DDC	$2,63\cdot 10^{-4}$	$2,93\cdot 10^{-15}$	$1,36\cdot 10^{-16}$	22
		Cd-DDC-MON	$2,63\cdot 10^{-4}$	$2,93\cdot 10^{-15}$	$1,17\cdot 10^{-16}$	25
	<i>P. subcapitata</i>	Cd-DDC	$2,33\cdot 10^{-4}$	$3,26\cdot 10^{-15}$	$9,20\cdot 10^{-18}$	350
		Cd-DDC-MON	$2,33\cdot 10^{-4}$	$3,26\cdot 10^{-15}$	$3,50\cdot 10^{-17}$	93
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	Cd-DDC	$3,10\cdot 10^{-4}$	$2,54\cdot 10^{-15}$	$1,74\cdot 10^{-17}$	150
Cd-DDC-MON		$3,10\cdot 10^{-4}$	$2,54\cdot 10^{-15}$	$2,56\cdot 10^{-17}$	99	

7	<i>C. reinhardtii</i>	Cd ²⁺	2,74·10 ⁻⁴	1,13·10 ⁻¹⁴	9,34·10 ⁻¹⁸	1 200
	<i>P. subcapitata</i>	Cd ²⁺	2,31·10 ⁻⁴	1,31·10 ⁻¹⁴	1,11·10 ⁻¹⁶	120
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	Cd ²⁺	2,92·10 ⁻⁴	1,07·10 ⁻¹⁴	1,13·10 ⁻¹⁶	95
	<i>C. reinhardtii</i>	Cd-DDC	2,74·10 ⁻⁴	2,83·10 ⁻¹⁵	8,81·10 ⁻¹⁶	3
		Cd-DDC-AH	2,74·10 ⁻⁴	2,83·10 ⁻¹⁵	2,91·10 ⁻¹⁶	10
	<i>P. subcapitata</i>	Cd-DDC	2,31·10 ⁻⁴	3,29·10 ⁻¹⁵	5,48·10 ⁻¹⁶	6
		Cd-DDC-MON	2,31·10 ⁻⁴	3,29·10 ⁻¹⁵	1,65·10 ⁻¹⁶	20
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	Cd-DDC	2,92·10 ⁻⁴	2,68·10 ⁻¹⁵	9,77·10 ⁻¹⁶	3
		Cd-DDC-AF	2,92·10 ⁻⁴	2,68·10 ⁻¹⁵	8,85·10 ⁻¹⁶	3

8.2 Prise en charge du Cd²⁺ par les algues vertes étudiées

La bioaccumulation du Cd²⁺ en absence de tout ligand organique dépend de l'espèce d'algue étudiée et du pH (cf. figure 8.1). Comme nous l'avons mentionné à la section 6.3, la prise en charge par *C. reinhardtii* ne démontre qu'un faible effet de pH ; au contraire, *P. subcapitata* et *C. pyrenoïdosa* démontrent une prise en charge du Cd²⁺ très largement diminuée avec une acidification du milieu, conformément aux prédictions du BLM (cf. tableau 8.3). En effet, si nous examinons plus particulièrement la constante d'internalisation k_i (ce genre de calcul n'est pas justifié sur «a» car à pH 5,5 la bioaccumulation du Cd²⁺ par les algues n'atteint pas de plateau), la diminution du pH influence les algues dans des proportions fortement différentes suivant l'ordre : *P. subcapitata* >> *C. pyrenoïdosa* >> *C. reinhardtii*. Il semblerait donc que les deux premières algues soient bien plus sensibles au pH que *C. reinhardtii* pour la prise en charge du Cd²⁺ (impliquant des transporteurs à la surface de la membrane algale).

Tableau 8.3 : Influence du pH sur les paramètres de prise en charge du Cd²⁺ (k_i et «a») pour les trois algues vertes étudiées aux pH 7 et 5,5 (± l'erreur-type).

pH	algue	k _i (10 ⁻⁴ ·min ⁻¹)	Ratio sur k _i pH 7/5,5	«a» (nmol·m ⁻²)
5,5	<i>C. reinhardtii</i>	0,21 ± 0,02		0,18 ± 0,04
	<i>P. subcapitata</i>	0,007 ± 0,001		0,012 ± 0,001
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	0,13 ± 0,02		0,062 ± 0,005
7	<i>C. reinhardtii</i>	0,2 ± 0,02	<i>pas d'effet</i>	0,181 ± 0,040
	<i>P. subcapitata</i>	1,8 ± 0,2	258 ± 34	0,329 ± 0,040
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	2,9 ± 0,7	22 ± 6	0,361 ± 0,034

Les effets différents du pH sur la prise en charge du Cd²⁺ seul, suivant l'espèce d'algue, pourraient s'expliquer par plusieurs mécanismes simultanés : i) la compétition entre le Cd²⁺ et les protons H⁺ pour les sites de transport transmembranaire (cf. théorie sur le BLM, section 1.2), ces sites étant en quantités variables et/ou d'affinités variables suivant l'espèce algale ; et ii) l'effet du pH sur les membranes biologiques, qui serait lui aussi différent suivant l'espèce algale.

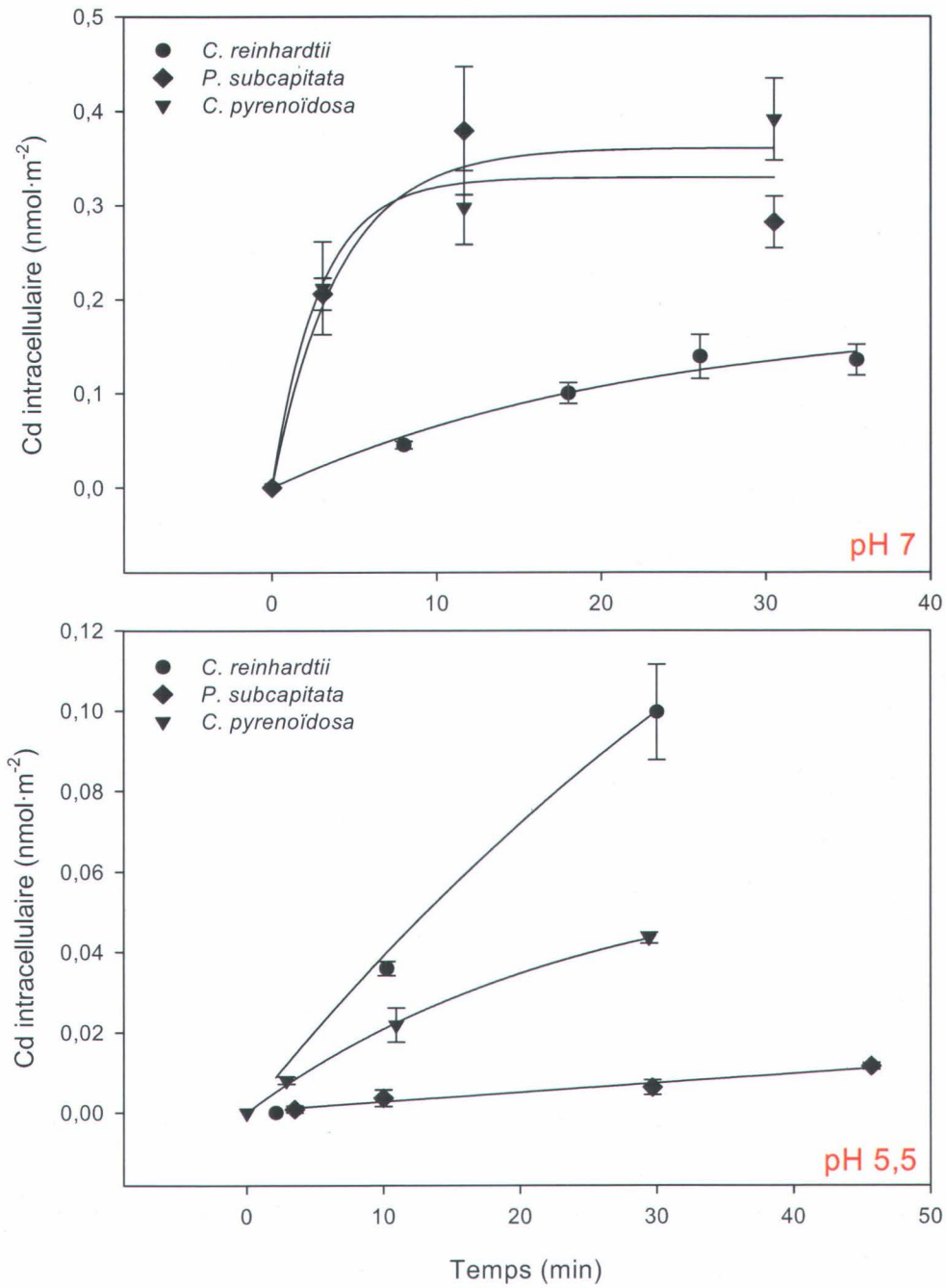


Figure 8.1 : Prise en charge du Cd²⁺ (0,38 nM) par les trois algues vertes aux pH 7 et 5,5.

8.3 Paramètres de modélisation de la bioaccumulation du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par les algues

Notons que tous les graphiques concernant *C. reinhardtii* sont repris des sections 6 et 7. Tout comme à la section 6.4, à partir de nos expériences d'élimination du Cd et de celles de prise en charge nous pouvons extraire respectivement les constantes k_e (constante d'élimination du Cd intracellulaire), C (fraction intracellulaire de Cd labile) et k_i (constante d'internalisation du Cd en solution); ces données sont compilées dans le tableau 8.4. Notons également que k_i et «a» seront discutées dans les sections de prise en charge qui suivent. Les courbes d'élimination du Cd en présence de DDC ont déjà été présentées à la section 6.4 pour *C. reinhardtii* (cf. figure 6.5); celles pour *P. subcapitata* et *C. pyrenoïdosa* sont indiquées à la figure 8.2.

Tableau 8.4 : Compilation des constantes «a», k_e et C (déterminées par régression non linéaire), k_i (déterminées expérimentalement) pour la prise en charge par trois algues verte unicellulaires du complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ aux pH 7 et 5,5 (\pm l'erreur-type).

pH	algue	k_i ($10^{-4} \cdot \text{min}^{-1}$)	k_e (min^{-1}) équation 6.8	C (fraction labile)	«a» ($\text{nmol} \cdot \text{m}^{-2}$)
5,5	<i>C. reinhardtii</i>	$2,8 \pm 0,9$	$0,224 \pm 0,002$	$0,914 \pm 0,019$	$0,43 \pm 0,01$
	<i>P. subcapitata</i>	$0,15 \pm 0,02$	$0,112 \pm 0,022$	$0,157 \pm 0,020$	$0,18 \pm 0,04$
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	$0,50 \pm 0,06$	$0,216 \pm 0,028$	$0,619 \pm 0,088$	$0,082 \pm 0,004$
7	<i>C. reinhardtii</i>	20 ± 3	$0,325 \pm 0,059$	$0,344 \pm 0,055$	$4,4 \pm 0,2$
	<i>P. subcapitata</i>	$8,7 \pm 1,5$	$0,151 \pm 0,008$	$0,515 \pm 0,051$	$5,5 \pm 1,2$
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	25 ± 2	$0,212 \pm 0,014$	$0,302 \pm 0,023$	14 ± 1

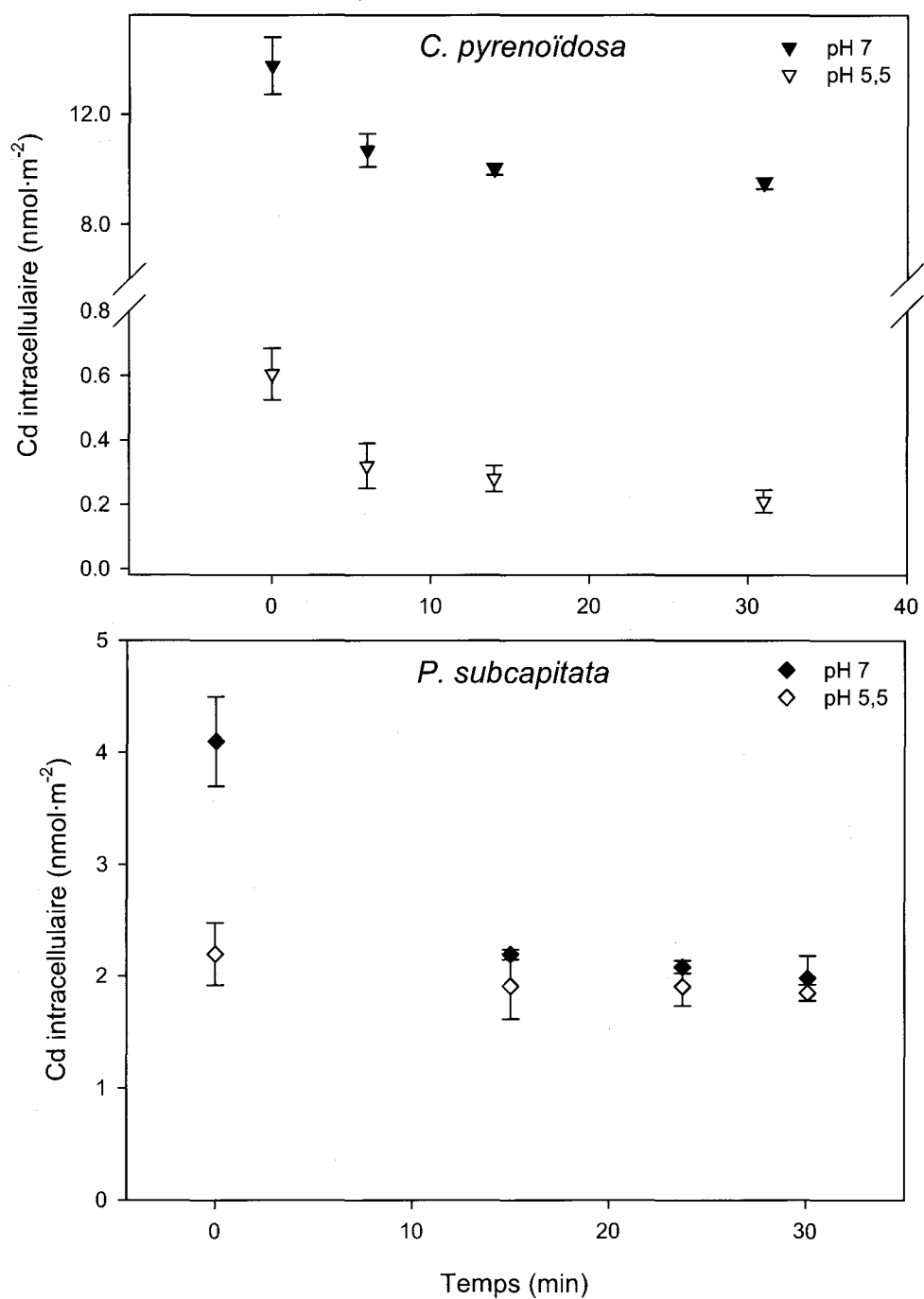


Figure 8.2 : Quantité de Cd²⁺ demeurant dans les cellules algales de *P. subcapitata* et *C. pyrenoïdosa* aux pH 7 et 5,5 en présence de DDC.

Les constantes d'élimination à pH 7 du Cd en présence de DDC, k_e , suivent l'ordre : *C. reinhardtii* > *C. pyrenoïdosa* > *P. subcapitata* (différences significatives, $P < 0,01$; ANOVA à une voie, test post hoc NSK). À pH 5,5 l'ordre n'est pas changé, mais les différences statistiques sont en revanche moins marquées entre les deux premières espèces algales : *C. reinhardtii* ~ *C. pyrenoïdosa* > *P. subcapitata* (cf. tableau 8.4). Un abaissement du pH entraîne une diminution significative de k_e pour les espèces *C. reinhardtii* et *P. subcapitata* (k_i diminue lui aussi pour ces deux espèces) tandis que k_e n'est pas modifiée pour *C. pyrenoïdosa* entre les pH 7 et 5,5 (alors que k_i diminue). Puisque la spéciation du Cd en présence de DDC est la même pour les trois algues vertes étudiées, les différences observées sur les constantes d'élimination et d'internalisation suggère des perméabilités membranaires et/ou des compositions lipidiques variables entre ces algues. Au sein du groupe des Chlorophycées, les algues ont des membranes plutôt similaires, mais des différences de composition lipidique de leur membrane ne sont pas à exclure. Par exemple, *C. reinhardtii* et *P. subcapitata* démontrent des compositions lipidiques variables quand elles sont cultivées à pH 7 (cf. tableau 8.5) cependant les conditions de culture sont variables. Ce dernier point est problématique, car dans la littérature il n'existe pas de comparaison des compositions lipidiques pour des espèces algales cultivées de la même manière. Quoiqu'il en soit, le fait que k_e ne varie pas en fonction du pH chez *C. pyrenoïdosa* à l'inverse des deux autres algues, évoque une absence d'influence du pH sur la perméabilité membranaire.

Tableau 8.5 : Pourcentage de quelques acides gras composant la membrane biologique de *C. reinhardtii* et *P. subcapitata*.

espèce algale	étude	pH de culture	luminosité/ noirceur	% d'acide gras		
				16:0	18:1	18:2
<i>C. reinhardtii</i>	(Tatsuzawa <i>et al.</i> 1996)	7	12 h / 12 h	36,1	13,3	17,8
<i>P. subcapitata</i>	(McLarnon- Riches <i>et al.</i> 1998)	7	24 h / 0 h	23,3	28,3	9,4

Concernant la fraction de Cd labile dans le cytosol des algues, nous notons à la lecture du tableau 8.3, que les proportions sont différentes suivant l'algue mais aussi le pH. En l'état actuel de nos connaissances, il n'est pas évident de relier ces différences inter algales de répartition du Cd intracellulaire non disponible à un mécanisme en particulier. Nous pouvons seulement suggérer des synthèses de phytochélatines différentes suivant les algues (Ahner *et al.* 1995); les complexes phytochélatines-Cd seraient ensuite stockés dans les vacuoles des algues pour ne plus être disponibles. L'effet du pH sur les proportions de Cd labile au sein d'une même espèce est encore plus délicat à comprendre eu égard au pH constant dans le cytosol.

8.4 Prise en charge du complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par rapport à celle du Cd^{2+} seul

L'utilisation des paramètres compilés dans le tableau 8.4 permet de tracer, comme à la section 6.5, les courbes théoriques (avec l'erreur-type sur la prise en charge calculée en tenant compte de la propagation des erreurs) de prise en charge du Cd en présence du DDC par les trois algues vertes étudiées et cela permet aussi de les comparer à la bioaccumulation observée. Les figures 8.3, 8.4 et 8.5 montrent que le modèle s'ajuste plutôt bien aux points expérimentaux. Nous pouvons donc baser nos comparaisons concernant la prise en charge du Cd sous forme $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ sur les paramètres issus de la modélisation, tels qu'influencés par l'espèce algale et le pH. Plus précisément, pour la comparaison entre $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ et Cd^{2+} , nous effectuons les comparaisons sur k_i et «a» à pH 7 et uniquement sur k_i à pH 5,5 car k_e est quasi nulle pour la prise en charge du Cd^{2+} et «a» n'est pas atteint à pH 5,5 toujours pour la prise en charge du Cd^{2+} .

L'accumulation du Cd en présence de DDC est beaucoup plus élevée que celle du Cd^{2+} seul et ce pour les trois algues vertes unicellulaires étudiées (cf. tableau 8.6), comme nous l'avions déjà montré à la section 6.3 pour *C. reinhardtii*. Cependant, cette fois-ci, la variable n'est plus le ligand utilisé mais l'espèce algale, et nous constatons aussi qu'il existe des différences entre les trois algues.

Tableau 8.6 : Influence du DDC sur la prise en charge du Cd par rapport au Cd²⁺ seul pour les paramètres k_i et «a» pour les trois algues vertes étudiées aux pH 7 et 5,5 (± l'erreur-type).

pH	algue	Ratio sur k _i Cd(DDC) ₂ ⁰ /Cd ²⁺	Ratio sur «a» Cd(DDC) ₂ ⁰ /Cd ²⁺
5,5	<i>C. reinhardtii</i>	13 ± 4	<i>non applicable</i>
	<i>P. subcapitata</i>	22 ± 4	<i>non applicable</i>
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	4 ± 1	<i>non applicable</i>
7	<i>C. reinhardtii</i>	93 ± 18	24 ± 3
	<i>P. subcapitata</i>	5 ± 1	17 ± 4
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	9 ± 2	38 ± 2

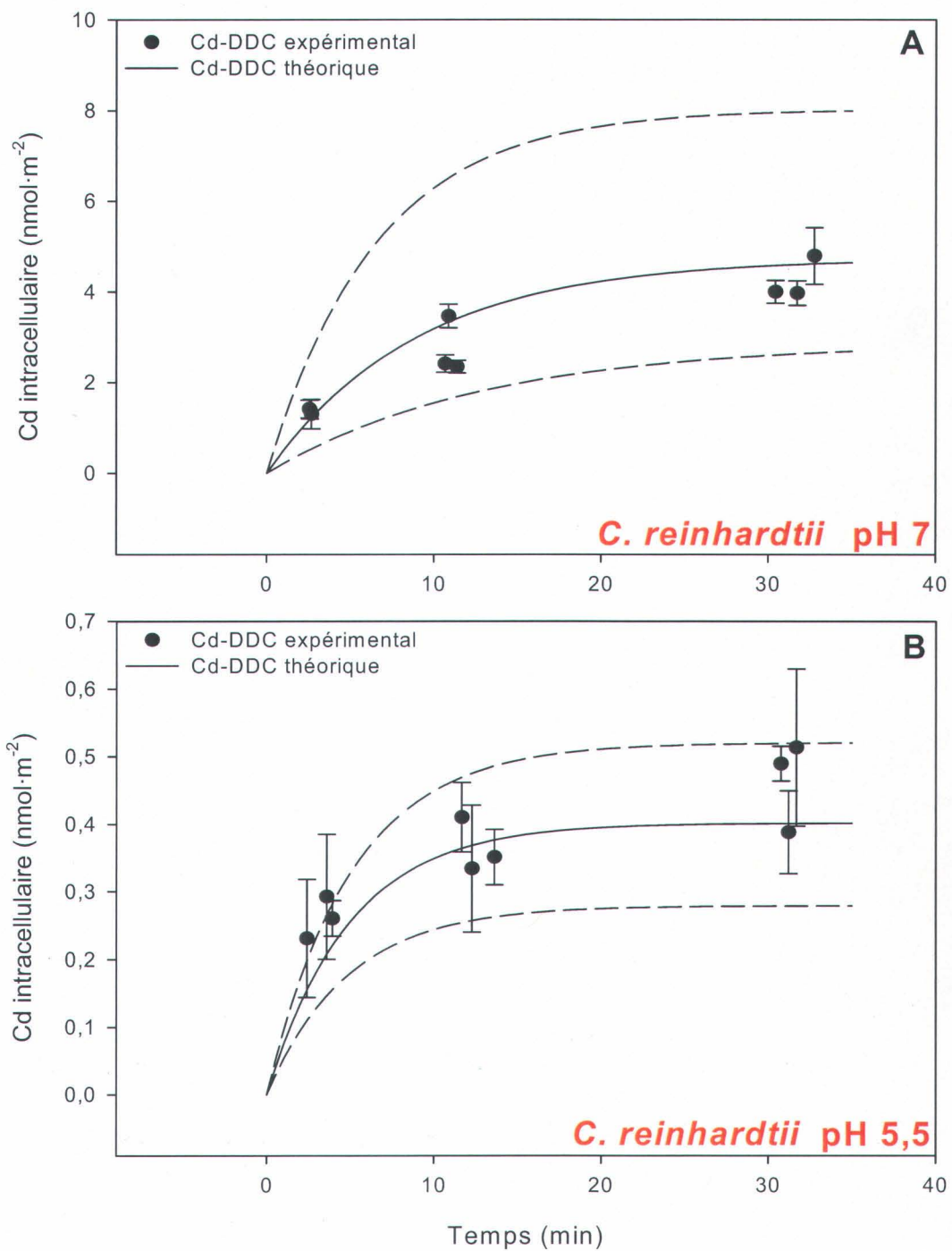


Figure 8.3 : Prise en charge expérimentale (points noirs) et théorique (ligne noire) du complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par *C. reinhardtii* aux pH 7 et 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.

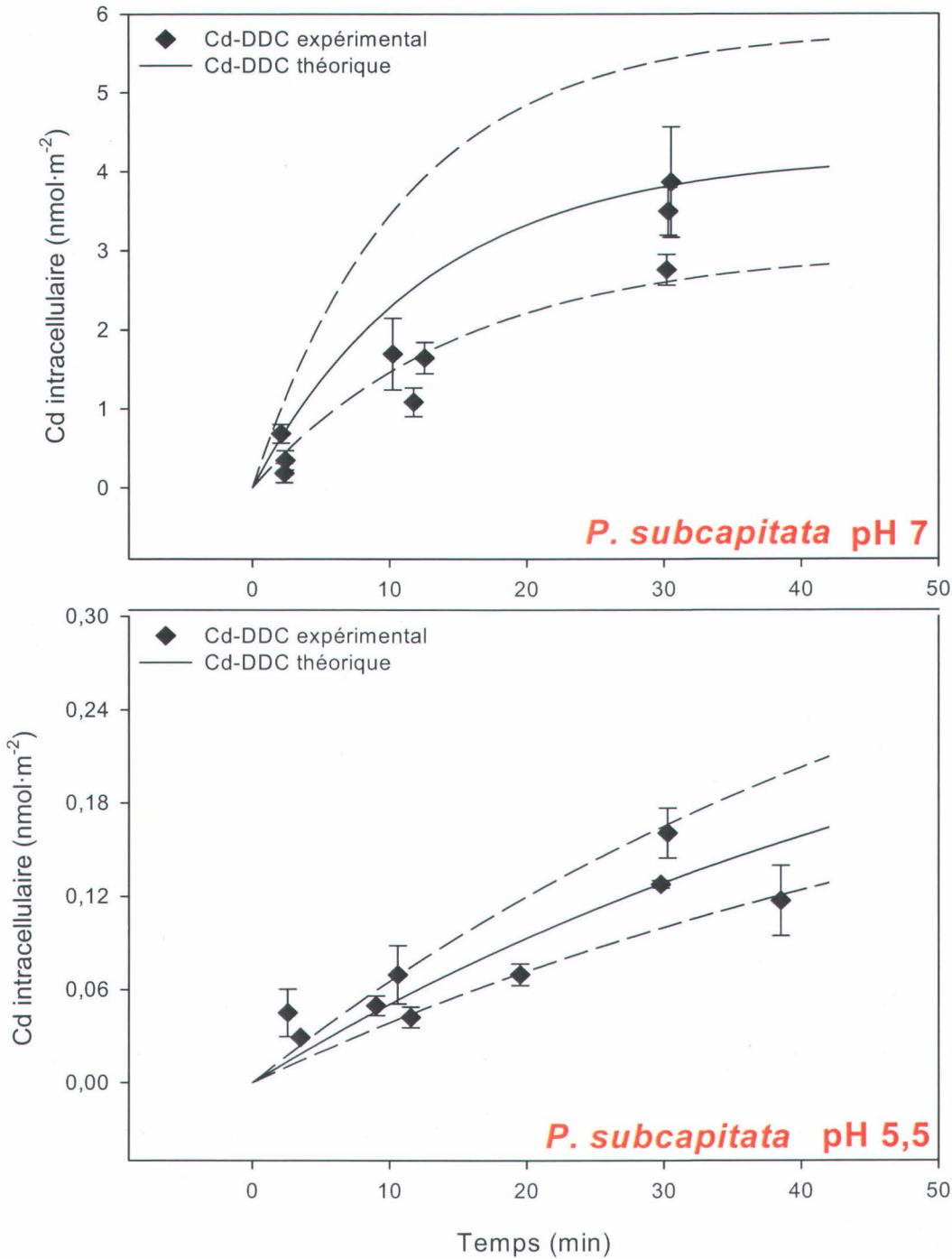


Figure 8.4 : Prise en charge expérimentale (losanges noirs) et théorique (ligne noire) du complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par *P. subcapitata* aux pH 7 et 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.

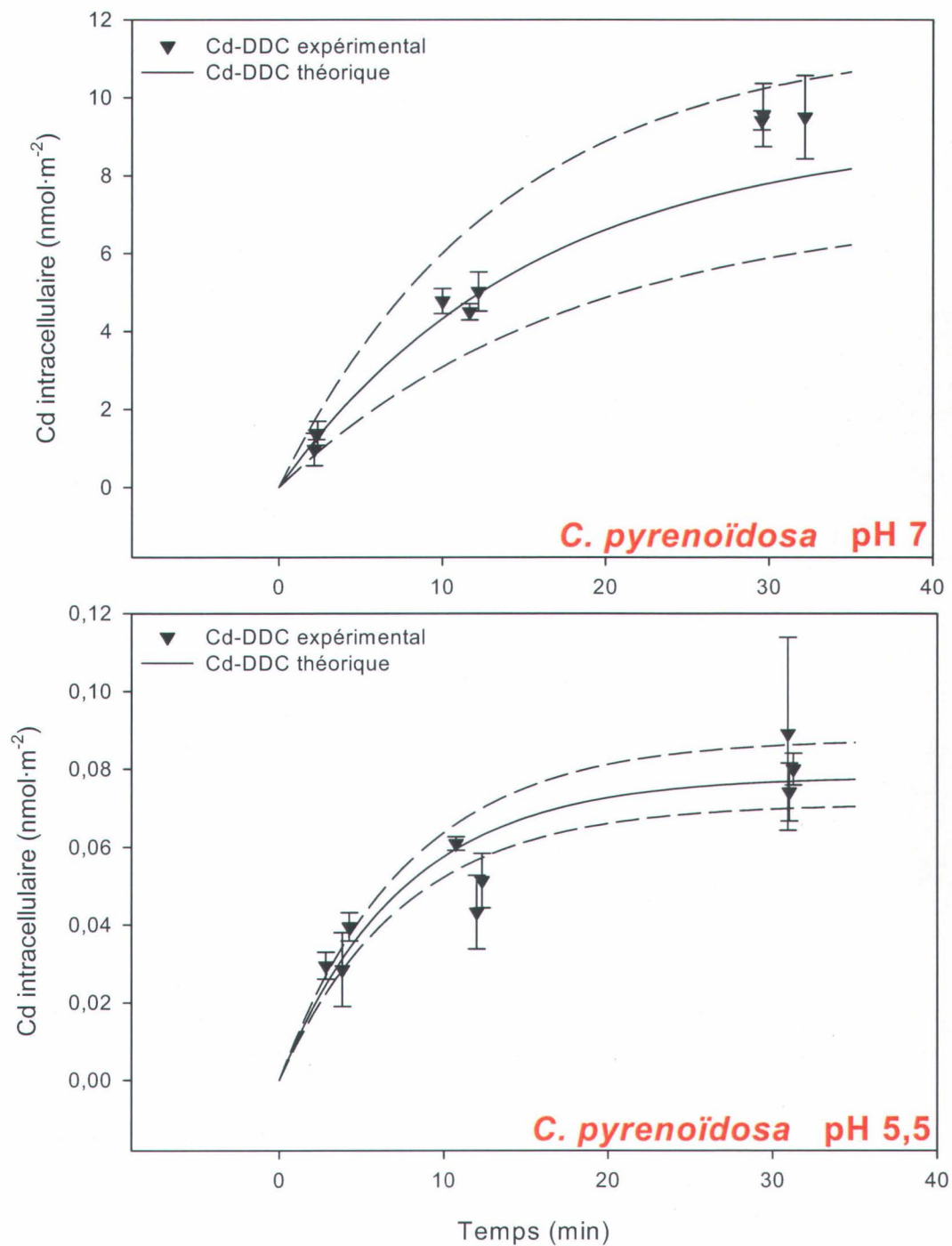


Figure 8.5 : Prise en charge expérimentale (triangles inversés noirs) et théorique (ligne noire) du complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par *C. pyrenoidosa* aux pH 7 et 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.

Ainsi, en comparant les ratios calculés pour la constante k_i entre les milieux en présence et en absence de DDC, il apparaît que l'algue *C. reinhardtii* est celle qui voit sa constante d'internalisation du Cd augmenter le plus en présence de DDC (93 fois) par rapport au Cd^{2+} seul à pH neutre. La constante k_i augmente aussi, mais plus modérément, pour les deux autres algues, *C. pyrenoïdosa* (9 fois) et *P. subcapitata* (5 fois) toujours à pH 7. À pH 5,5 la présence de DDC favorise de nouveau la prise en charge du Cd (constante k_i) mais dans des proportions plus faibles qu'à pH 7 pour les algues *C. reinhardtii* (13 fois) et *C. pyrenoïdosa* (4 fois) tandis que pour *P. subcapitata* l'augmentation de k_i est plus importante qu'à pH neutre (22 fois).

Concernant le paramètre «a» à pH 7, il augmente dans des proportions comparables (entre 17 et 38 fois) pour les trois algues.

La présence d'un ligand organique tel que le DDC favorise donc la prise en charge du Cd, quelle que soit l'espèce algale et le pH (avec toutefois des différences liées à ces facteurs) en comparaison de la bioaccumulation du Cd^{2+} seul. Ces résultats sont une confirmation de la littérature comme nous l'avons déjà mentionné à la section 6.

8.5 Prise en charge du complexe $Cd(DDC)_2^0$ en absence de SH – comparaison entre les trois algues vertes

8.5.1 Analyse des résultats

La constante d'internalisation k_i pour la prise en charge du $Cd(DDC)_2^0$ suit l'ordre *C. pyrenoïdosa* ~ *C. reinhardtii* > *P. subcapitata* à pH 7 et il change peu à pH 5,5, *C. reinhardtii* > *C. pyrenoïdosa* > *P. subcapitata* ($P < 0,01$ par une ANOVA à une voie ; test post hoc NSK). L'espèce algale *P. subcapitata* est celle qui, des trois algues, présente la plus faible k_i quel que soit le pH.

Le paramètre «a» (prise en charge du $Cd(DDC)_2^0$ sur le plateau) suit l'ordre *C. pyrenoïdosa* > *P. subcapitata* ~ *C. reinhardtii* à pH 7, tandis qu'à pH 5,5 l'ordre est passablement

modifié : *C. reinhardtii* > *P. subcapitata* > *C. pyrenoïdosa* ($P < 0,01$ par une ANOVA à une voie ; test post hoc NSK). Il est intéressant de constater que *C. pyrenoïdosa* affiche une prise en charge à l'état stationnaire complètement inversée entre pH 7 («a» est le plus élevée parmi les trois algues) et 5,5 («a» est le plus faible parmi les trois algues).

8.5.2 Effet du pH sur la prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$

Une diminution de pH (7 à 5,5) entraîne une baisse de la constante k_i quelle que soit l'espèce algale. En outre, l'effet de pH que ce soit sur le paramètre «a» ou k_i (cf. tableau 8.7) suit l'ordre : *C. pyrenoïdosa* > *P. subcapitata* > *C. reinhardtii*. Pour la prise en charge du Cd^{2+} nous avons déjà observé un effet de pH très important chez *C. pyrenoïdosa* et *P. subcapitata* (cf. section 8.2) ; c'est encore le cas en présence de DDC. Cet effet de pH n'est pas significatif pour *C. reinhardtii* dans le cas de la prise en charge du Cd^{2+} alors qu'en présence de DDC les deux constantes «a» et k_i sont largement diminuées quand le pH est abaissé (respectivement 7 et 10 fois plus faibles). Cette observation laisse supposer que le pH influence plus la perméabilité membranaire (prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$) que les sites de transport transmembranaire (prise en charge du Cd^{2+}) chez *C. reinhardtii*.

Quoiqu'il en soit, l'effet d'une baisse du pH que nous avons déjà observé chez *C. reinhardtii*, diminuant la prise en charge des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ en présence de ligands organiques, se confirme donc pour deux autres espèces d'algues vertes et tend à prouver que l'hypothèse 1 est à rejeter de façon générale quelque soit le complexe neutre et l'espèce phytoplanctonique. Ce phénomène semblerait donc général et il est tout à fait nouveau dans la littérature scientifique.

Tableau 8.7 : Effet du pH (ratio des valeurs à pH 7 sur celles à pH 5,5) sur les paramètres «a» et k_i caractérisant la prise en charge du Cd en présence de DDC par les trois algues vertes étudiées.

Espèce algale	Effet du pH (7/5,5) sur «a»	Effet du pH (7/5,5) sur k_i
<i>C. reinhardtii</i>	10 ± 1	7 ± 3
<i>P. subcapitata</i>	30 ± 9	50 ± 7
<i>C. pyrenoïdosa</i>	167 ± 10	58 ± 13

Calculons maintenant les perméabilités observées P_{obs} (équation 6.14, section 6.7) qui représentent les perméabilités membranaires des algues dans nos conditions d'exposition, ainsi que les k_{bio} (équation 6.15, section 6.7) qui sont les taux biologiques d'élimination du complexe $Cd(DDC)_2^0$ en solution. Les résultats (cf. tableau 8.8) indiquent que les valeurs de P_{obs} suivent le même ordre que celui pour les k_i , soit *C. pyrenoïdosa* > *C. reinhardtii* > *P. subcapitata* à pH 7 et *C. reinhardtii* > *C. pyrenoïdosa* > *P. subcapitata* à pH 5,5. Les perméabilités observées sont du même ordre de grandeur pour les trois algues vertes étudiées à pH neutre (entre 17 et 24) alors qu'à pH acide les P_{obs} diminuent fortement pour les algues *C. pyrenoïdosa* et *P. subcapitata* (plus de 50 fois) et elles sont aussi plus d'un ordre de grandeur plus faibles que la perméabilité observée à pH 5,5 chez *C. reinhardtii*. Les P_{obs} calculées sont à pH 7 supérieures à celles obtenues dans deux autres études (Phinney et Bruland 1994 ; Croot *et al.* 1999) alors que l'inverse se produit pour nos P_{obs} à pH 5,5. Comme le suggèrent Croot *et al.* (1999), les variations que nous remarquons entre les trois espèces d'algues pourraient être reliées à des compositions lipidiques membranaires distinctes.

Le calcul des k_{bio} , qui traduisent un taux biologique d'élimination (cf. section 6.7), donne dans tous les cas des valeurs inférieures à ce que nous trouvons dans la littérature (cf. tableau 8.8) excepté pour la cyanobactérie *Synechococcus*. Comme nous l'avons déjà mentionné, le caractère hydrophobe du $Cd(DDC)_2^0$ est inférieur à ceux des complexes

répertoriés dans le tableau 8.8 (Turner et Mawji 2004) et cela pourrait expliquer les k_{bio} plus faibles observés dans notre étude.

Tableau 8.8 : Perméabilité membranaire observée pour des complexes métal-ligand organique (1) dans notre étude, (2) dans Phinney et Bruland (1994) et (3) dans Croot *et al.* (1999). P_{obs} (équation 6.14) est exprimée en $10^{-4} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ et k_{bio} (équation 6.15) est exprimée en $10^{-9} \cdot \text{L} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; ces deux paramètres sont normalisés pour $[\text{métal}] = 1 \text{ nM}$.

Complexe	Organisme	pH – [métal]	R (L/M)	P_{obs}	k_{bio}
⁽¹⁾ Cd(DDC) ₂ ⁰	<i>C. reinhardtii</i> (algue verte)	pH 7 - 0,38 nM	3 000	20	6,6
⁽¹⁾ Cd(DDC) ₂ ⁰	<i>P. subcapitata</i> (algue verte)	pH 7 - 0,38 nM	3 000	14	2,9
⁽¹⁾ Cd(DDC) ₂ ⁰	<i>C. pyrenoïdosa</i> (algue verte)	pH 7 - 0,38 nM	3 000	26	9,9
⁽¹⁾ Cd(DDC) ₂ ⁰	<i>C. reinhardtii</i> (algue verte)	pH 5,5 - 0,38 nM	3 000	4,9	1,5
⁽¹⁾ Cd(DDC) ₂ ⁰	<i>P. subcapitata</i> (algue verte)	pH 5,5 - 0,38 nM	3 000	0,24	0,26
⁽¹⁾ Cd(DDC) ₂ ⁰	<i>C. pyrenoïdosa</i> (algue verte)	pH 5,5 - 0,38 nM	3 000	0,46	0,20
⁽²⁾ Cu(Ox) ₂ ⁰	<i>T. weissflogii</i> (diatomée)	pH 8 - 5 nM	300 ou 1 500	6,4	18
⁽²⁾ Cu(DDC) ₂ ⁰		pH 8 - 5 nM	1 000 ou 7 000	5,9	16
⁽²⁾ Cd(DDC) ₂ ⁰		pH 8 - 5 nM	11 000	> 2,7	> 5,0
⁽²⁾ Pb(DDC) ₂ ⁰		pH 8 - 5 nM	20 000	> 1,1	> 33
⁽³⁾ Cu(Ox) ₂ ⁰	<i>Synechococcus</i> (cyanobactérie)	pH 8 - 10 nM	10	0,55	0,01
⁽³⁾ Cu(Ox) ₂ ⁰		pH 8 - 20 nM	10	2,3	0,04
⁽³⁾ Cu(Ox) ₂ ⁰	<i>A. carterae</i> (dinoflagellé)	pH 8 - 10 nM	10	6,9	28
⁽³⁾ Cu(Ox) ₂ ⁰	<i>P. micans</i> (dinoflagellé)	pH 8 - 10 nM	10	3,6	136
⁽³⁾ Cu(Ox) ₂ ⁰	<i>C. polylepis</i> (prymnesiophyte)	pH 8 - 10 nM	10	7,1	39
⁽³⁾ Cu(Ox) ₂ ⁰	<i>D. brightwellii</i> (diatomée)	pH 8 - 10 nM	10	19	570

Les complexes neutres, tels que le $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$, traversent la membrane par diffusion passive, or l'influence du pH sur l'équation dérivant de cette voie d'accumulation (équation 6.13 section 6.7) n'apparaît pas explicitement ou tout du moins aucun des paramètres y figurant (D_{ow} , surface cellulaire et épaisseur de la membrane biologique) ne peut expliquer un tel effet de pH. Et ce d'autant plus que le D_{ow} du complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ demeure élevé aux deux pH. Cet effet de pH suggère donc que la membrane algale est réellement modifiée quand le milieu est acidifié de 7 vers 5,5 (composition lipidique, conformation des protéines ?). L'étude de Tatsuzawa *et al.* (1996) nous éclaire un peu plus sur cet effet de pH. Ces auteurs ont comparé la composition lipidique et le contenu en triacylglycérol (TAG) de la membrane de *C. reinhardtii* issue d'une collection algale (en l'occurrence celle de Tokyo) et *Chlamydomonas* sp. isolée d'un lac volcanique acide (pH = 2). Les deux conclusions majeures de cette étude sont : i) la fluidité des lipides membranaires est plus faible chez *Chlamydomonas* sp. que chez *C. reinhardtii*, probablement en raison d'une adaptation de *Chlamydomonas* sp. aux pH extrêmes ; et ii) *Chlamydomonas* sp. accumule plus de TAG quand elle est cultivée à pH 1 par rapport à des pH plus élevés, certainement pour se prémunir des dérèglements osmotiques dus à la forte présence de H_2SO_4 aux pH acides. Le même genre d'adaptation aux pH extrêmes (mais basiques cette fois-ci) est démontrée dans l'étude de Guckert et Cooksey (1990).

Tous ces résultats nous amènent à penser que nos algues, cultivées pendant 72 h à pH 7 puis acclimatées pendant 12 h à pH 5,5 par l'intermédiaire d'un bullage au $\text{CO}_2(\text{g})$ (pour *C. pyrenoïdosa* et *P. subcapitata* ; 48 h à pH 7 et 8 h à pH 5,5 pour *C. reinhardtii*), s'adaptent au pH acide en augmentant le degré de saturation des acides gras dans les lipides polaires, diminuant ainsi la perméabilité membranaire (Guschina et Harwood 2006) et en modifiant le ratio des lipides composant la membrane, par exemple plus de TAG à pH acide chez *Chlamydomonas* sp. (Tatsuzawa *et al.* 1996).

Nous nous sommes aussi demandés si l'acclimatation au $\text{CO}_2(\text{g})$ avait une quelconque influence sur la perméabilité membranaire des algues étudiées ; la section 8.6 tente de répondre à cette interrogation.

8.6 Acclimatation au CO₂(g) ou culture directe à pH acide

Quelques études, compilées dans la revue de la littérature de Guschina et Harwood (2006), démontrent que des algues vertes (*Chlorella kessleri*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*) sont sensibles à la concentration en CO₂ dans le milieu de culture. Le CO₂ semble influencer la distribution des lipides de la membrane ainsi que le degré de saturation des acides gras dans la membrane. Pour vérifier si le CO₂ a réellement un effet, nous avons comparé nos résultats de bioaccumulation chez les trois algues *C. pyrenoïdosa*, *P. subcapitata* et *C. reinhardtii* pour deux types de culture. Le premier est celui que nous avons utilisé jusqu'à présent, à savoir une acclimatation au CO₂(g) pour atteindre pH = 5,5 après une culture jusqu'en phase exponentielle à pH 7 (cf. section 3.4). Les résultats correspondent à ceux présentés jusqu'à maintenant à pH 5,5. Le second type est une culture de chacune des algues directement à pH 5,5. Nous avons vérifié à ce titre, que la phase exponentielle est atteinte pour le même nombre d'heures qu'à pH 7 (48 h pour *C. reinhardtii* et 72 h pour *C. pyrenoïdosa* et *P. subcapitata*). Les expériences de prise en charge du Cd(DDC)₂⁰ sont alors réalisées après au moins trois générations d'algues cultivées à pH 5,5. Quant aux expériences de prise en charge du Cd(DDC)₂⁰, elles sont effectuées de la même manière que décrite à la section 3.4.

Les résultats sont présentés à la figure 8.6. Ils indiquent autant de comportements différents que d'espèces d'algues. Si nous comparons la bioaccumulation du Cd(DDC)₂⁰ à pH 5,5 entre des algues cultivées directement à pH 5,5 et des algues acclimatées pendant plusieurs heures avec du CO₂(g), les points suivants ressortent : i) le CO₂(g) n'a pas d'effet visible sur la prise en charge du Cd(DDC)₂⁰ chez *C. pyrenoïdosa* ; ii) le CO₂(g) entraîne une diminution de prise en charge du Cd chez *P. subcapitata* (l'effet de pH sur k_i et «a» aurait été alors plus important si nous avions cultivé directement *P. subcapitata* à pH 5,5) ; et iii) le CO₂(g) augmente la prise en charge du Cd chez *C. reinhardtii* (ceci implique que l'effet de pH sur k_i et «a» aurait été alors moins important si nous avions cultivé directement *C. reinhardtii* à pH 5,5)

Même si le $\text{CO}_2(\text{g})$ influence la perméabilité membranaire en fonction de l'espèce algale, il ne faut pas perdre de vue que les deux approches (acclimatation temporaire des algues au pH 5,5 ou culture en continue et directe à pH 5,5) traduisent deux phénomènes distincts dans la nature. En effet, d'un côté lors de la fonte des neiges au printemps ou bien d'un effluent acide rejeté occasionnellement, les rivières s'acidifient momentanément ; cela correspondrait aux expériences qui utilisent le $\text{CO}_2(\text{g})$ pour acclimater les algues temporairement. D'un autre côté, des rivières qui sont en continue à pH acide de par la géologie des zones qu'elles traversent s'apparenteraient plutôt à nos expériences dans lesquelles les algues sont cultivées directement à pH 5,5.

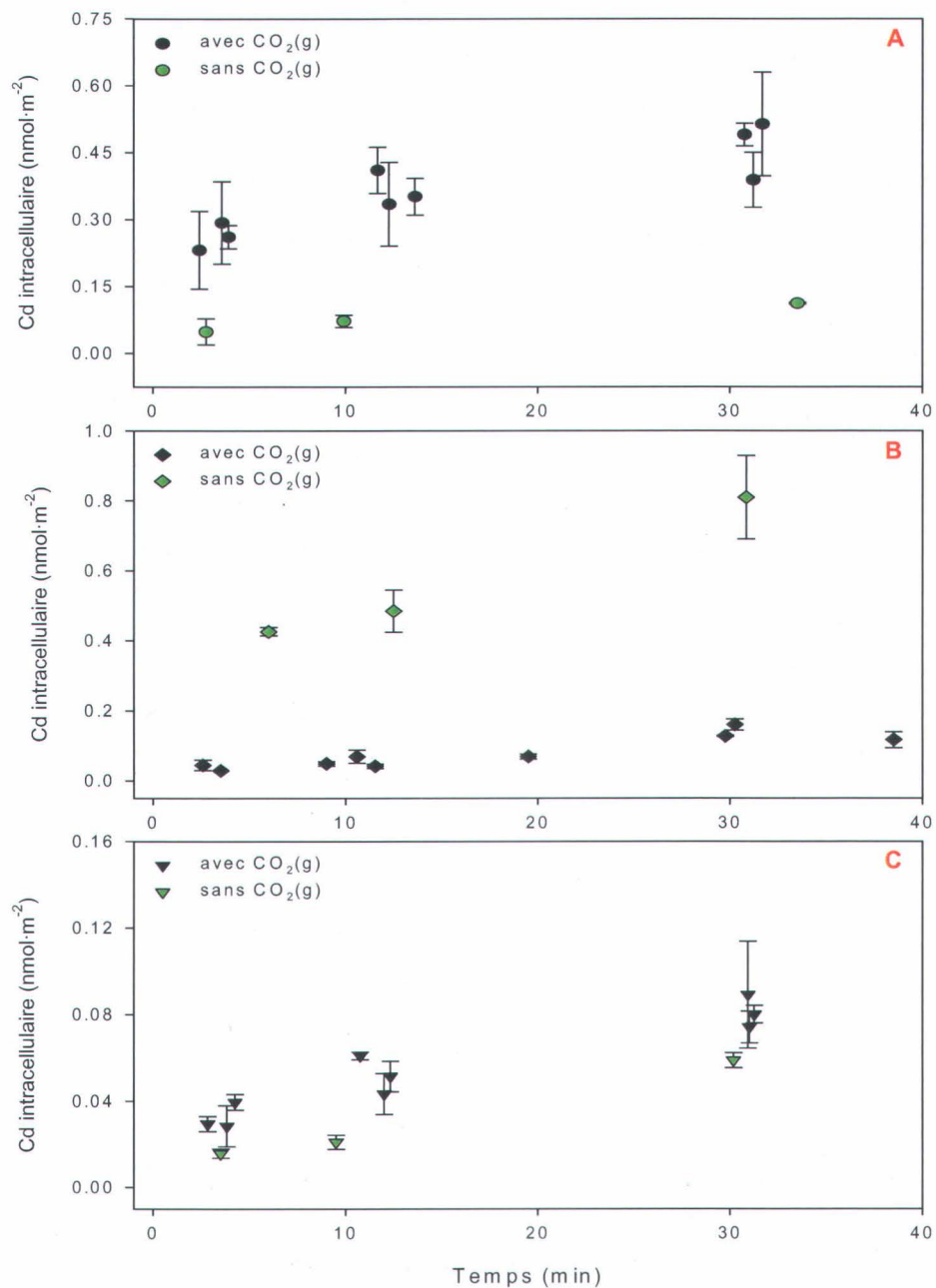


Figure 8.6 : Prise en charge du Cd(DDC)₂⁰ à pH 5,5 par (A) *C. reinhardtii*, (B) *P. subcapitata* et (C) *C. pyrenoidosa*, après des cultures algales acclimatées au CO₂(g) ou directement cultivées à pH 5,5.

8.7 Synthèse de l'effet de l'espèce algale en absence de SH

La prise en charge du Cd^{2+} seul, et celle du Cd en présence de DDC, sont fortement dépendantes de l'espèce d'algue. Cette observation est à relier à des compositions en lipides des membranes différentes chez les trois algues étudiées, ainsi qu'au devenir intracellulaire des complexes.

Nos algues vertes unicellulaires d'eau douce accumulent à l'état stationnaire le même complexe neutre $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ dans des proportions différentes. Ce résultat n'est pas dû à des tailles variables puisque les trois algues ont des dimensions semblables et la prise en charge est justement normalisée par rapport à leur superficie ($\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}$). En outre, un abaissement du pH de 7 vers 5,5 entraîne une bioaccumulation du complexe neutre à la baisse (k_i et «a» diminuent), point inédit dans la littérature scientifique. Néanmoins, chaque algue réagit inégalement à une diminution de pH puisque les diminutions sur k_i (constante d'internalisation) et «a» (prise en charge à l'état stationnaire) sont fonction de l'espèce algale (l'effet du pH sur k_i suit l'ordre *C. pyrenoïdosa* > *P. subcapitata* > *C. reinhardtii*). Nous avons émis l'hypothèse que l'effet du pH sur la bioaccumulation du complexe neutre $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ chez trois algues vertes serait dû à une modification de la perméabilité membranaire. Des tests utilisant des sondes moléculaires fluorescentes ne nous ont pas permis de corroborer cette hypothèse (choix de sonde, sensibilité de la méthode ?). En revanche, l'étude de la littérature offre quelques références importantes pour soutenir cette hypothèse. Ainsi, seulement quelques études démontrent qu'une baisse de pH influence la distribution des lipides au sein de la membrane et qu'elle augmente le degré de saturation des acides gras dans les lipides polaires (Guschina et Harwood 2006), ce qui mène à une diminution de la fluidité de la membrane. Ces résultats pourraient expliquer la diminution de la prise en charge de complexes neutres par des algues vertes unicellulaires d'eau douce quand le pH est abaissé. Mais il est clair que tout un champ d'investigation de la biologie cellulaire et moléculaire est à approfondir pour mieux comprendre cet effet du pH sur les surfaces biologiques algales.

9. Prise en charge du complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par trois algues vertes unicellulaires en présence de substances humiques*

Tout comme à la section 7, l'ajout de SH dans les milieux d'exposition vise à rapprocher les conditions expérimentales de celles rencontrées en milieu naturel. À la section 7 nous étudions l'influence des SH sur la prise en charge de plusieurs complexes neutres $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ par une seule algue verte *C. reinhardtii* aux pH 7 et 5,5. Dans cette section, nous faisons varier plutôt l'espèce algale, ce qui est la suite logique des travaux de la section 8. Ainsi, nous voulons analyser les possibles différences qu'entraîne la présence de SH sur le comportement de prise en charge du complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par trois algues vertes unicellulaires d'eau douce.

9.1 Prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par trois algues vertes : observations générales

Les figures 9.1 et 9.2 font largement penser aux figures déjà observées pour la prise en charge des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ par *C. reinhardtii* (cf. section 7.1). Plus précisément, à pH neutre, les trois espèces d'algues voient leur bioaccumulation du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ diminuer en présence de n'importe laquelle des trois fractions de SH (AH, AF et MON). Toutefois, la proportion de cette diminution dépend du type de fraction de SH mais aussi de l'algue considérée.

À pH acide, la prise en charge du complexe par *C. reinhardtii* et *C. pyrenoïdosa* n'est pas modifiée par la présence des SH. En revanche, chez *P. subcapitata*, les fractions AH et MON ont tendance à augmenter la prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$, résultat tout à fait inédit dans notre étude.

* sauf avis contraire, les barres d'erreurs sur les graphiques des sections 8 à 9 représentent un écart-type ($N = 3$).

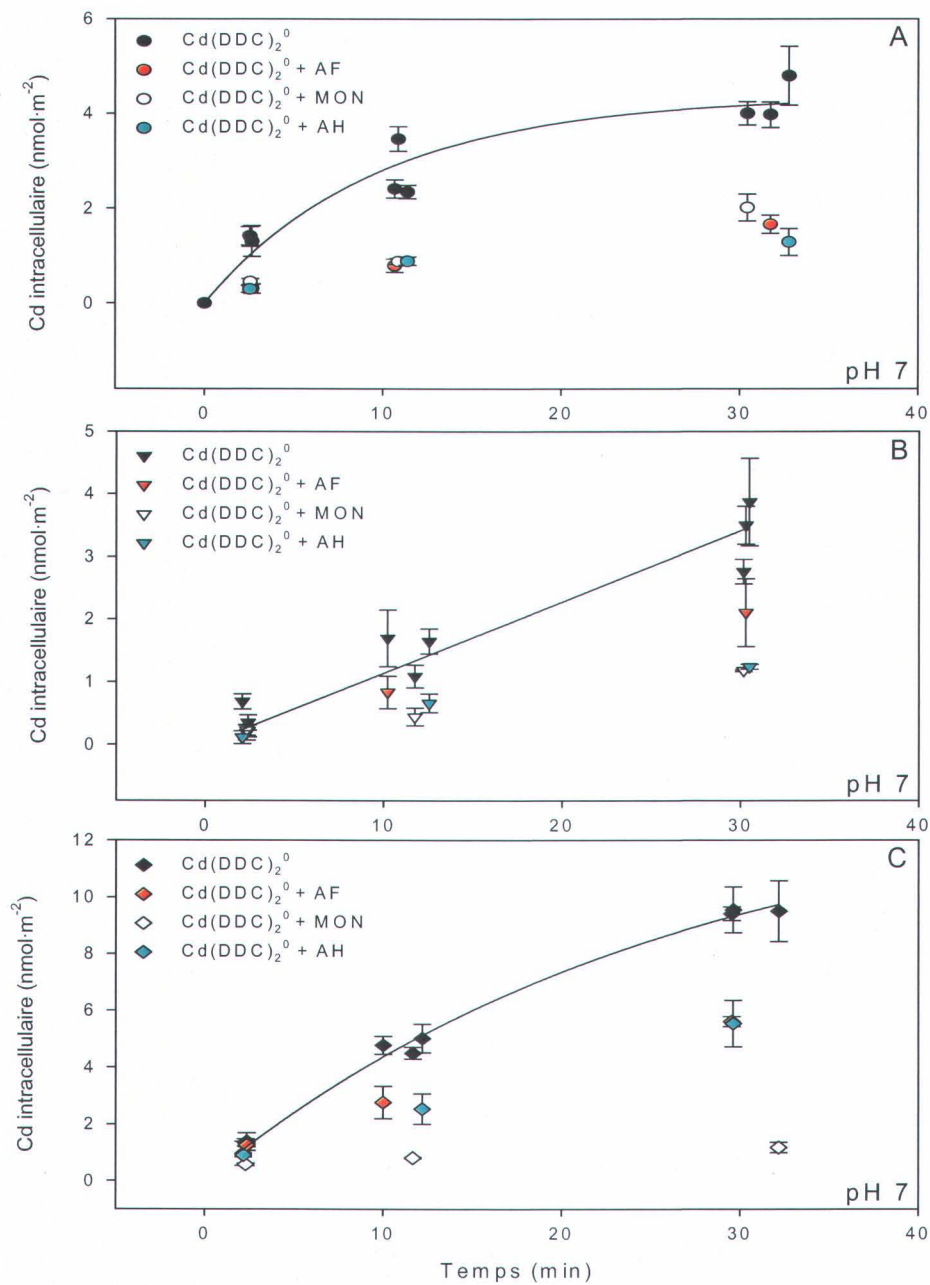


Figure 9.1 : Prise en charge expérimentale du complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par *C. reinhardtii* (A), *P. subcapitata* (B) et *C. pyrenoïdosa* (C) en absence (symboles noirs) et en présence des SH (symboles de couleurs) à pH 7.

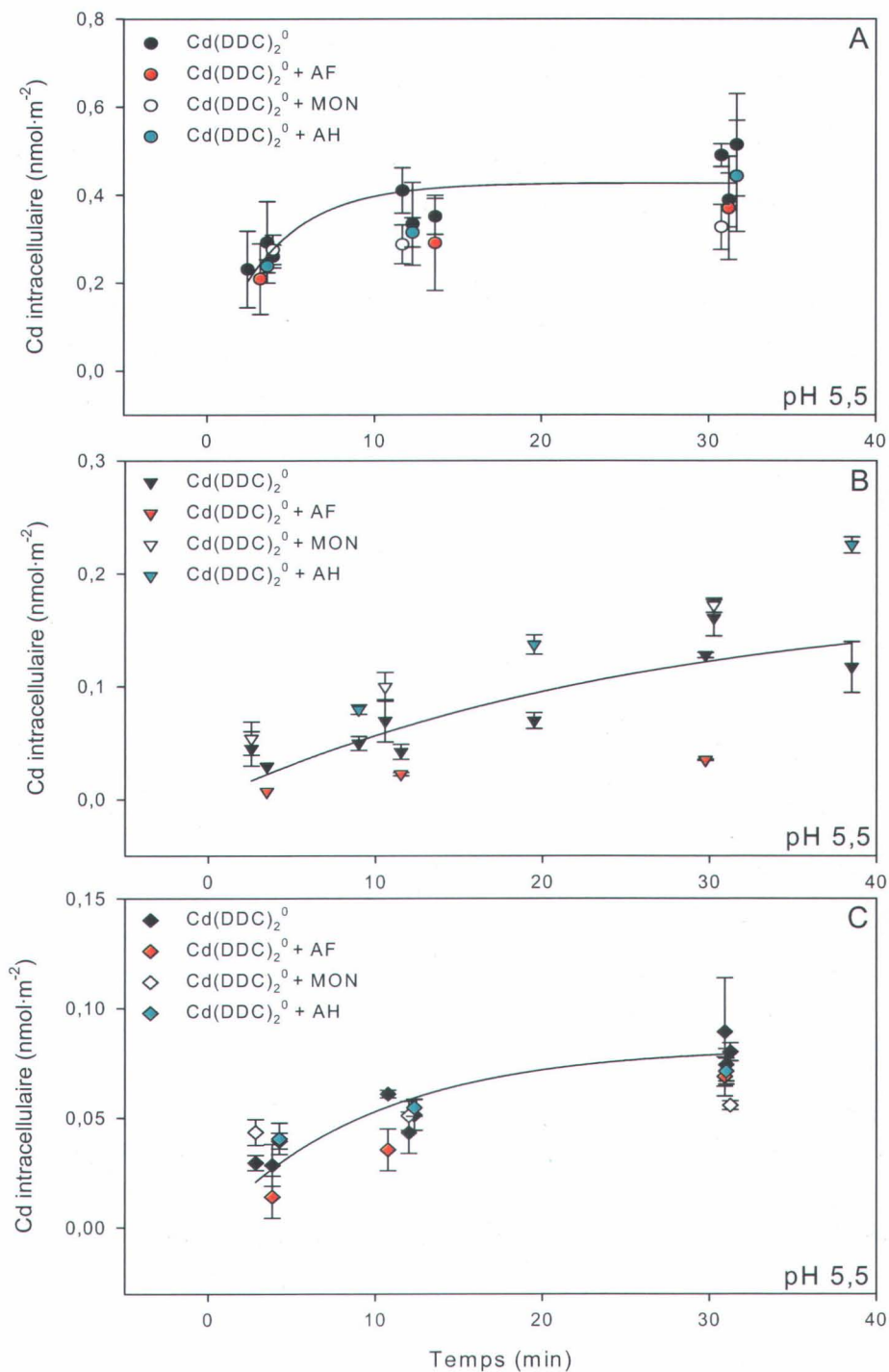


Figure 9.2 : Prise en charge expérimentale du complexe Cd(DDC)_2^0 par *C. reinhardtii* (A), *P. subcapitata* (B) et *C. pyrenoïdosa* (C) en absence (symboles noirs) et en présence des SH (symboles de couleurs) à pH 5,5.

9.2 Modélisation de la prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ en présence des AH

Encore une fois, nous adoptons la même approche qu'à la section 7.2. Nous examinons donc la bioaccumulation du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par trois algues vertes aux pH 7 et 5,5 en présence ou non des AH puisqu'il s'agit de la seule fraction pour laquelle nous avons les données d'association (telle que déterminée par dialyse) entre ce complexe neutre et les AH. A partir de l'association $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ -AH, nous obtenons la concentration de $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ «libre» participant réellement à la prise en charge. Quant à la modélisation, nous gardons les paramètres issus de la section 8.3 constants soit k_i (constante d'internalisation du Cd), k_e (constante d'élimination) et C (fraction de Cd intracellulaire labile). Pour générer le modèle nous déterminons la constante k'_i d'après l'équation 7.1. Les paramètres du modèle sont compilés dans le tableau 9.1 et nous obtenons les figures 9.3 et 9.4.

Tableau 9.1 : Compilation des constantes k_i , k_e et C pour la prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ à pH 7 et 5,5 tels que déterminés dans la section 8 en absence des AH (\pm représente l'écart-type sur la valeur). k'_i est calculée selon l'équation 7.1.

pH	espèce algale	k_i ($10^{-4} \cdot \text{min}^{-1}$)	k_e (min^{-1})	k'_i calculée ($\text{nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$)	C (fraction labile de Cd)
5,5	<i>C. reinhardtii</i>	$2,8 \pm 0,9$	$0,224 \pm 0,002$	$0,08 \pm 0,03$	$0,914 \pm 0,019$
	<i>P. subcapitata</i>	$0,15 \pm 0,02$	$0,112 \pm 0,022$	$0,0020 \pm 0,0002$	$0,157 \pm 0,020$
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	$0,5 \pm 0,1$	$0,216 \pm 0,028$	$0,010 \pm 0,001$	$0,619 \pm 0,088$
7	<i>C. reinhardtii</i>	20 ± 3	$0,325 \pm 0,059$	$0,06 \pm 0,03$	$0,344 \pm 0,055$
	<i>P. subcapitata</i>	$8,7 \pm 1,5$	$0,151 \pm 0,048$	$0,09 \pm 0,02$	$0,515 \pm 0,051$
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	25 ± 2	$0,212 \pm 0,014$	$0,46 \pm 0,04$	$0,302 \pm 0,023$

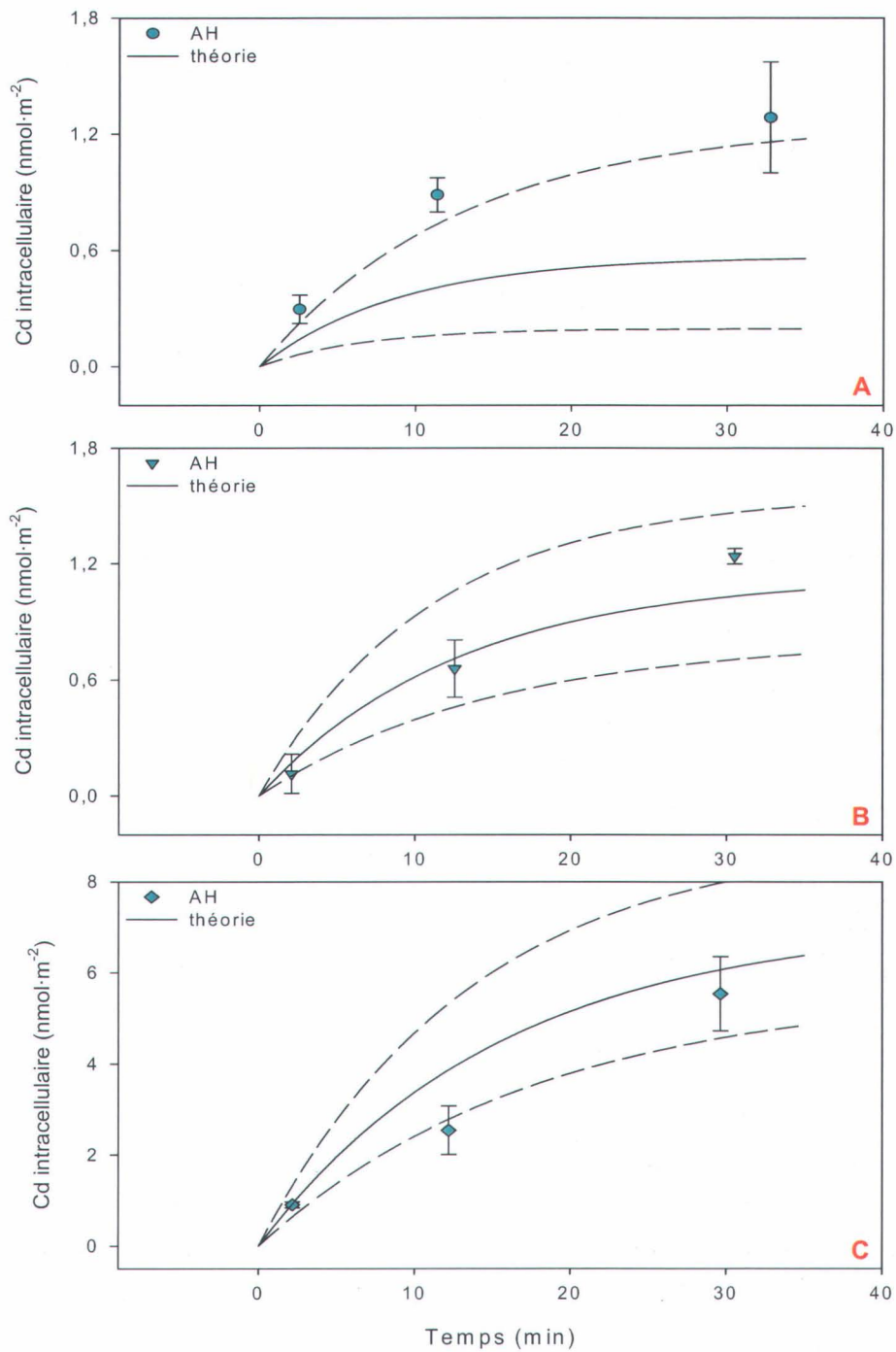


Figure 9.3 : Prises en charge expérimentales (symboles) et théoriques (lignes noires) du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ en présence des AH par *C. reinhardtii* (A), *P. subcapitata* (B) et *C. pyrenoïdosa* (C) à pH 7. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.

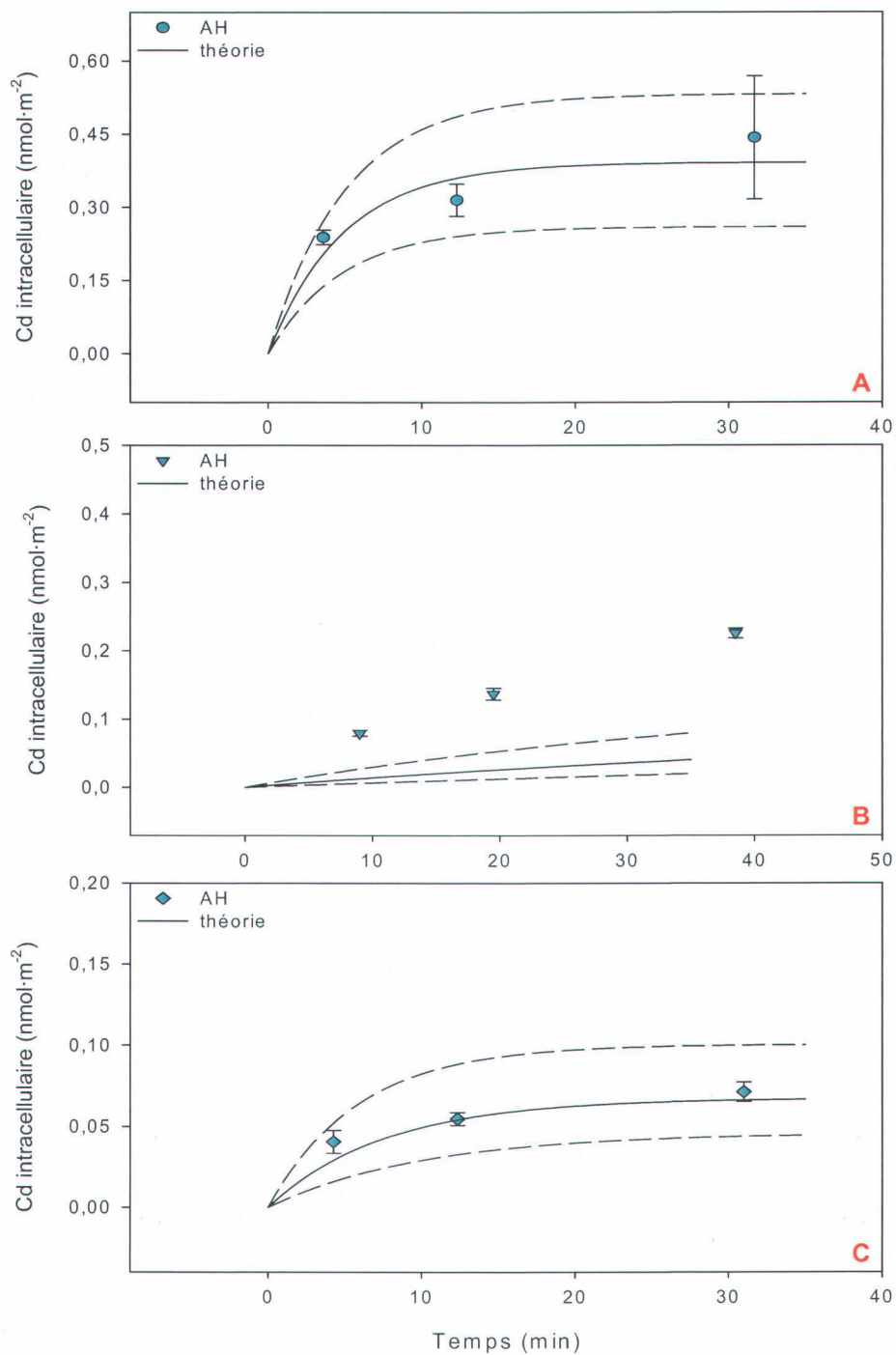


Figure 9.4 : Prises en charge expérimentales (symboles) et théoriques (lignes noires) du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ en présence des AH par *C. reinhardtii* (A), *P. subcapitata* (B) et *C. pyrenoïdosa* (C) à pH 5,5. Les lignes en tirets sont les erreurs-types pour la prise en charge théorique.

La prise en charge du complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ à pH 7 et 5,5 est plutôt bien prédite par le modèle dans le cas de l'algue *C. pyrenoïdosa*, alors que pour *C. reinhardtii* et *P. subcapitata* les prédictions sont bonnes uniquement à pH 7 et 5,5 respectivement.

Ces observations signifient que le comportement en solution du complexe neutre (autrement dit son association avec les AH) suffit à expliquer la prise en charge du Cd dans quatre cas sur six. Il est aussi remarquable de constater que le modèle sous-estime largement cette prise en charge à pH 5,5 pour l'algue *P. subcapitata* confirmant ici l'hypothèse 4. Il est clair que dans ce cas, les AH jouent un rôle plus important que dans les cinq autres cas de figure, pour favoriser la bioaccumulation du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$.

9.3 Comparaison de la prise en charge dans le système Cd-DDC-AH avec le système $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par trois algues vertes

Le fait que notre modèle ne s'ajuste pas totalement (quatre cas sur six) aux points expérimentaux, nous oblige, pour pouvoir faire des comparaisons, à utiliser des paramètres expérimentaux plutôt que les paramètres du modèle cinétique. Toujours en suivant l'approche développée à la section 7.4, la discussion s'articulera autour du paramètre «a» (prise en charge sur le plateau) et de k_i (constante d'internalisation). Ces constantes sont compilées dans le tableau 9.2.

9.3.1 Discussion sur la prise en charge sur le plateau «a»

À pH neutre, les trois espèces d'algues voient leur bioaccumulation du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ à l'état stationnaire diminuer dans des proportions comparables en présence des AH (entre 51% et 69%, cf. tableau 9.3). L'association Cd-DDC-AH qui est importante à pH 7 (près de 90%) explique en partie cette diminution observée sur «a». Les AH, outre s'associer avec le complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$, doivent donc entraîner aussi une augmentation de la perméabilité membranaire à pH neutre. À pH acide, *C. reinhardtii* et *C. pyrenoïdosa* affichent des prises en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ sur le plateau qui sont statistiquement similaires, qu'il y ait présence ou non des AH ; la faible association Cd-DDC-AH observée en dialyse pourrait expliquer ce résultat. En revanche, *P. subcapitata* présente une augmentation remarquable

de ce paramètre «a», ce qui est tout à fait nouveau concernant la prise en charge de complexe neutre en présence des AH.

Tableau 9.2 : Compilation des paramètres «a» et k_i pour le système $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ en présence ou non des AH à pH 7 et 5,5 (\pm représente l'erreur-type sur la valeur).

pH	système	algue	«a» ($\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}$)	k_i expérimentale ($10^4\cdot\text{min}^{-1}$)
5,5	$\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$	<i>C. reinhardtii</i>	$0,43 \pm 0,01$	$2,8 \pm 0,9$
	Cd-DDC-AH		$0,41 \pm 0,02$	$2,3 \pm 0,2$
	$\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$	<i>P. subcapitata</i>	$0,18 \pm 0,04$	$0,10 \pm 0,02$
	Cd-DDC-AH		$0,35 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,05$
	$\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$	<i>C. pyrenoïdosa</i>	$0,08 \pm 0,004$	$0,50 \pm 0,06$
	Cd-DDC-AH		$0,09 \pm 0,002$	$0,50 \pm 0,09$
7	$\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$	<i>C. reinhardtii</i>	$4,4 \pm 0,2$	20 ± 3
	Cd-DDC-AH		$1,3 \pm 0,004$	54 ± 7
	$\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$	<i>P. subcapitata</i>	$5,5 \pm 1,2$	$8,7 \pm 1,5$
	Cd-DDC-AH		$2,0 \pm 0,04$	$5,4 \pm 0,5$
	$\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$	<i>C. pyrenoïdosa</i>	$14 \pm 0,6$	25 ± 2
	Cd-DDC-AH		$6,8 \pm 0,9$	23 ± 2

Tableau 9.3 : Influence de l'ajout des AH sur le paramètre «a» et la constante k_i aux pH 7 et 5,5 ; \pm représente l'erreur-type sur les valeurs en tenant compte de la propagation des erreurs.

pH	Système	Diminution sur «a» en %	Augmentation sur k_i en %
5,5	<i>C. reinhardtii</i>	<i>pas de différence statistique</i>	<i>pas de différence statistique</i>
	<i>P. subcapitata</i>	-94 \pm 20	500 \pm 65
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	<i>pas de différence statistique</i>	<i>pas de différence statistique</i>
7	<i>C. reinhardtii</i>	69 \pm 3	175 \pm 38
	<i>P. subcapitata</i>	63 \pm 14	-38 \pm 7
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	51 \pm 7	<i>pas de différence statistique</i>

Notons tout de même que la présence de substances humiques peut dans certains cas augmenter la prise en charge de métaux seuls dans les milieux aquatiques. Cela a surtout été démontré pour des organismes aquatiques filtreurs, tels les moules et les huîtres ; dans ces cas d'exceptions, la matière organique dissoute dans les milieux d'exposition entraîne une augmentation de la prise en charge des métaux étudiés . Les raisons avancées pour une telle augmentation contraire au BLM sont les suivantes :

- le métal est co-transporté avec la MOD si cette dernière est une source de carbone pour l'organisme, la MOD serait alors assimilée par endocytose (Erickson *et al.* 1996 ; Roditi *et al.* 2000 ; Guo *et al.* 2001) ;
- le D_{ow} d'un métal est augmenté en présence de MOD le rendant plus biodisponible (Zimmermann *et al.* 2005) ;
- la fraction de faible poids moléculaire (LMW) issue de la MOD augmenterait la prise en charge et/ou la toxicité des métaux en comparaison avec l'absence de MOD

ou en présence de sa fraction plus lourde (HMW) (Giesy et Paine 1977 ; Giesy *et al.* 1977 ; Kozuch et Pempkowiak 1996) ;

- le complexe métal-MOD est assimilable par phagocytose (Sauvant *et al.* 2000) ;

Toutes ces études portent cependant sur des organismes trop différents des algues vertes unicellulaires et les hypothèses émises ne sont pas applicables dans notre étude d'autant que le métal que nous étudions est sous forme complexée $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$.

À notre connaissance, seules deux études ont démontré une augmentation de prise en charge de métaux en présence de substances humiques pour des organismes proche des nôtres : Rouleau *et al.* (1998) pour la bioaccumulation du HgCH_3Cl par une larve d'insecte et, encore plus intéressant pour nous, Slaveykova *et al.* (2003) pour la prise en charge du Pb par une algue verte unicellulaire d'eau douce. Dans ces deux études, le mécanisme invoqué serait une modification de la perméabilité membranaire induite par les SH, mécanisme probable dans notre cas.

À la section 7.3, nous avons considéré l'excès des ligands XANT^- et H_2Ox^+ comme des agents perméabilisant la membrane mais cela ne serait pas le cas pour l'excès de DDC^- (concentration près de 100 fois moins grande que dans le cas des deux autres ligands). L'augmentation de prise en charge sur le plateau à l'état stationnaire ne peut donc être due à une perméabilisation de la membrane de *P. subcapitata* par le DDC^- . Le seul facteur qui semble se dégager est la présence des AH qui s'insèrent plus dans les membranes biologiques à pH 5,5 plutôt qu'à pH 7 (Vigneault *et al.* 2000). Toutefois, si nous observons des différences entre *P. subcapitata* et les deux autres espèces d'algues, alors l'insertion des AH ou leur effet une fois insérées, doit être variable suivant l'espèce. Nous pouvons envisager une sensibilité plus grande de *P. subcapitata* que les deux autres espèces algales envers l'insertion des AH et la perméabilisation de sa membrane qui s'en suit.

9.3.2 Discussion sur la constante d'internalisation k_i

Le calcul de k_i se fait suivant l'équation 7.2 (décrite dans la section 7.3.2) qui tient compte de la concentration « libre » de complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ en présence des AH. Du tableau 9.3

plusieurs constatations se dégagent alors. Tout d'abord, l'algue *C. pyrenoïdosa* n'affiche pas de variation de sa constante d'internalisation du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ en présence des AH en comparaison du même système sans AH et ce aux deux pH. Ensuite, *C. reinhardtii* voit sa constante k_i augmenter à pH 7 tandis qu'à pH 5,5 elle ne subit pas de modification, toujours en comparaison au système en absence des AH. Enfin, *P. subcapitata* montre en présence des AH une constante k_i qui diminue à pH 7 alors que celle-ci augmente fortement à pH 5,5 par rapport à k_i sans AH et au même pH.

Pour expliquer ces résultats, il nous faut revenir sur les points importants soulevés à la section 7.3.2 concernant les effets des AH sur la perméabilité membranaire de *C. reinhardtii*.

- 1) En premier lieu, nous suggérons que l'algue *C. reinhardtii* réagirait à la présence des AH sur un temps court en augmentant sa perméabilité membranaire. Après quelques minutes, les algues s'acclimateraient et prendraient en charge les complexes neutres en fonction du comportement en solution des complexes $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ en présence des AH (étude du paramètre «a»). Ce point devrait aussi s'appliquer aux trois algues étudiées pour la prise en charge du complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$.
- 2) Les AH s'inséreraient plus à pH 5,5 que 7 dans les membranes biologiques (Vigneault *et al.* 2000).
- 3) En outre, l'association entre un complexe neutre et les AH n'altère que la concentration de complexe «libre» et non la constante d'internalisation.
- 4) Ensuite, l'association entre les ligands organiques et les AH, telle que déterminée par fluorescence, diminue la quantité des AH disponibles pour agir dans le point 1. Nous avons déjà à la section 7.3.2 posé l'absence de telles interactions entre le DDC et les AH quelque soit le pH.
- 5) L'excès de ligand organique participe à la perméabilisation des membranes biologiques, excepté pour le DDC.
- 6) La section 8.5 nous apprend en plus que la perméabilité membranaire diminue avec le pH dans l'ordre *C. pyrenoïdosa* > *P. subcapitata* > *C. reinhardtii* (cet ordre correspond à celui de l'effet du pH sur la prise en charge du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ en absence de SH).

À partir de ces observations, nous pouvons réaliser le même type de tableau conceptuel (cf. tableau 9.4) qu'à la section 7.2.2 pour tenter d'expliquer les variations sur k_i en présence des AH par des modifications de perméabilité membranaire, ces dernières étant induites par plusieurs mécanismes envisageables.

Le seul moyen d'améliorer les prédictions du tableau conceptuel est de modifier l'attribution des signes + dans la colonne «insertion des AH dans la membrane». Ainsi, nous devons émettre les hypothèses suivantes : l'insertion des AH dans les membranes de *C. pyrenoïdosa* et *P. subcapitata* doit être négligeable à pH 7 tandis qu'elle augmenterait substantiellement à pH 5,5, conformément au point 2 ci-dessus. Quant à *C. reinhardtii*, un changement de pH ne modifierait pas l'insertion des AH dans sa membrane qui demeurerait limitée aux pH 7 et 5,5 contrairement au point 2.

Tableau 9.4 : Compilation des effets possibles des AH et du DDC^- sur la perméabilité membranaire de *C. reinhardtii*, *P. subcapitata* et *C. pyrenoïdosa* aux pH 7 et 5,5. Pour les détails se référer au texte.

pH	algue	Excès de DDC^-	rigidité de la membrane	Insertion des AH dans la membrane	Association $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0 + \text{AH}$	Association $\text{DDC}^- + \text{AH}$	Résultat	Théorie
5,5	<i>C. reinhardtii</i>	0	-	+	0	0	0	0
	<i>P. subcapitata</i>	0	--	++++	0	0	++	++
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	0	---	+++	0	0	0	0
7	<i>C. reinhardtii</i>	0	0	+	0	0	+	+
	<i>P. subcapitata</i>	0	0	0	0	0	0	-
	<i>C. pyrenoïdosa</i>	0	0	0	0	0	0	0

Des hypothèses et résultats synthétisés dans le tableau 9.4, cinq cas sur six sont prédits correctement par le modèle qualitatif. Le cas de *P. subcapitata* à pH 7 prévoit une absence d'effet sur la perméabilité membranaire (donc k_i) alors que les résultats indiquent une diminution de la constante d'internalisation du $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ à pH neutre. Pour le moment, nous n'avons pas d'explication pour un tel écart.

Si nous revenons au tableau conceptuel de la section 7.2.2 en tenant compte des nouvelles informations à propos de la rigidité de la membrane de *C. reinhardtii* et de l'absence de variation d'insertion des AH dans sa membrane alors un nouveau tableau peut être dressé (cf. tableau 9.5).

Tableau 9.5 : Compilation des possibles effets des AH et des ligands organiques sur la perméabilité membranaire de *C. reinhardtii* aux pH 7 et 5,5. Pour les détails se référer au texte.

pH	Système	Excès de L	Insertion des AH dans la membrane	Association $\text{Cd}(\text{L})_2^0 + \text{AH}$	Rigidité de la membrane	Association L + AH	Résultat	Théorie
5,5	Cd-DDC-AH	0	+	0	-	0	0	0
	Cd-XANT-AH	+++	+	0	-	-	++	++
	Cd-Ox-AH	+++	+	0	-	--	+	+
7	Cd-DDC-AH	0	+	0	0	0	+	+
	Cd-XANT-AH	+++	+	0	0	-	+++	+
	Cd-Ox-AH	0	+	0	0	--	-	-

Le tableau 9.5, amélioré du point de vue théorique en comparaison du tableau 7.5, permet désormais de mieux appréhender toutes les variations sur k_i .

9.4 Comparaison de la prise en charge dans les systèmes Cd-L-(AF ou MON) avec les systèmes Cd(L)₂⁰

De la même manière qu'à la section 7.4, nous ne connaissons pas les valeurs de k_i car l'association entre le complexe Cd(DDC)₂⁰ et les AF ou la MON n'a pas été déterminée quantitativement. Donc nous discuterons encore une fois sur les paramètres k'_i (vitesse initiale de prise en charge du Cd) et «a» (prise en charge sur le plateau). Les tableaux 9.6 et 9.7 compilent ces données et il y est indiqué les variations sur ces paramètres (pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport au système en absence de SH).

Tableau 9.6 : Compilation des paramètres «a» et k'_i pour le système Cd-DDC-SH à pH 5,5 chez trois algues vertes (± représente l'erreur-type sur la valeur). PDS signifie «pas de différences statistiques».

pH 5,5	Fraction	«a» (nmol·m ⁻²)	diminution sur «a»	k'_i (nmol·m ⁻² ·min ⁻¹)	diminution sur k'_i
<i>C. reinhardtii</i>	-	0,43 ± 0,01	-	0,082 ± 0,026	-
	AF	0,40 ± 0,03	<i>pds</i>	0,066 ± 0,025	<i>pds</i>
	MON	0,31 ± 0,01	28 ± 1	0,070 ± 0,008	<i>pds</i>
	AH	0,41 ± 0,02	<i>pds</i>	0,067 ± 0,004	<i>pds</i>
<i>P. subcapitata</i>	-	0,18 ± 0,04	-	0,006 ± 0,001	-
	AF	0,040 ± 0,001	77 ± 16	0,002 ± 0,0001	64 ± 8
	MON	0,18 ± 0,01	<i>pds</i>	0,021 ± 0,006	-300 ± 80
	AH	0,35 ± 0,02	-94 ± 20	0,009 ± 0,001	-60 ± 8
<i>C. pyrenoidosa</i>	-	0,080 ± 0,004	-	0,010 ± 0,001	-
	AF	0,070 ± 0,002	17 ± 1	0,004 ± 0,0002	65 ± 8
	MON	0,050 ± 0,001	35 ± 2	0,015 ± 0,003	-48 ± 10
	AH	0,090 ± 0,001	<i>pds</i>	0,010 ± 0,002	<i>pds</i>

Tableau 9.7 : Compilation des paramètres «a» et k'_i pour le système Cd-DDC-SH à pH 7 chez trois algues vertes (\pm représente l'erreur-type sur la valeur). PDS signifie «pas de différences statistiques».

pH 7	Fraction	«a» (nmol·m ⁻²)	diminution sur «a»	k'_i (nmol·m ⁻² ·min ⁻¹)	diminution sur k'_i
<i>C. reinhardtii</i>	-	4,4 ± 0,2	-	0,529 ± 0,088	-
	AF	2,2 ± 0,1	49 ± 3	0,114 ± 0,036	78 ± 28
	MON	3,1 ± 0,6	28 ± 5	0,116 ± 0,029	78 ± 23
	AH	1,300 ± 0,003	69 ± 3	0,174 ± 0,024	67 ± 14
<i>P. subcapitata</i>	-	5,5 ± 1,2	-	0,329 ± 0,057	-
	AF	5,2 ± 0,1	<i>pds</i>	0,091 ± 0,040	73 ± 35
	MON	1,9 ± 0,1	65 ± 15	0,099 ± 0,038	70 ± 29
	AH	2,00 ± 0,04	63 ± 14	0,055 ± 0,005	83 ± 16
<i>C. pyrenoidosa</i>	-	14 ± 1	-	0,586 ± 0,088	-
	AF	6,9 ± 0,5	50 ± 4	0,531 ± 0,020	<i>pds</i>
	MON	1,0 ± 0,1	93 ± 7	0,254 ± 0,026	57 ± 8
	AH	6,8 ± 0,9	51 ± 7	0,418 ± 0,030	29 ± 3

9.4.1 Discussion sur la prise en charge sur le plateau «a»

À pH neutre, l'ajout de SH diminue la prise en charge du Cd(DDC)₂⁰ à l'état stationnaire chez les trois algues vertes excepté dans le cas de *P. subcapitata* en présence de MON où aucune différence statistique n'apparaît ($P > 0,05$; test t non pairé de Student). A pH acide, un seul cas donne une augmentation du paramètre «a» ; il s'agit de *P. subcapitata* en présence des AH, alors que dans tous les autres cas ce paramètre est abaissé ou inchangé sans pour autant qu'une tendance relative au type de fraction ne ressorte clairement.

9.4.2 Discussion sur la vitesse initiale de prise en charge k'_i

À pH neutre, k'_i diminue en présence des SH dans des proportions semblables quelle que soit la fraction pour les algues *C. reinhardtii* et *P. subcapitata*. En ce qui concerne *C. pyrenoïdosa*, l'abaissement de la prise en charge du Cd suit l'ordre $MON > AH > AF$. À pH acide, k'_i ne varie pas selon une tendance constante quand les SH sont ajoutées dans les milieux d'exposition. Ainsi, chez *C. reinhardtii*, la vitesse initiale de prise en charge ne change pas entre les systèmes en présence ou non de SH. Chez *P. subcapitata* et *C. pyrenoïdosa* k'_i augmente en présence de la MON alors qu'elle diminue en présence des AF. L'ajout des AH quant à eux, entraînent une augmentation de k'_i chez *P. subcapitata* alors qu'ils n'ont aucun effet sur k'_i chez *C. pyrenoïdosa*. Comme nous ne connaissons pas le degré d'association entre le $Cd(DDC)_2^0$ et les AF ou la MON, nous pouvons seulement expliquer l'augmentation de k'_i par une augmentation de k_i . En effet, $k'_i = k_i \cdot [Cd(DDC)_2^0]$, la concentration en complexe neutre en présence de SH peut diminuer ou demeurer la même (s'il n'y a pas d'association) en comparaison avec le système sans SH. Si k'_i augmente alors forcément k_i augmente. En revanche si k'_i diminue ou ne change pas, cela peut être dû à une variation sur k_i et/ou une variation de la concentration en complexe. De ces observations, il ressort que la présence de MON entraîne une augmentation sur k_i à pH 5,5 chez *P. subcapitata* et *C. pyrenoïdosa* tout comme les AH pour *P. subcapitata*. Une telle augmentation pourrait être reliée à une insertion importante de la MON dans la membrane de ces deux algues vertes conduisant à une élévation de la perméabilité membranaire.

9.5 Synthèse des effets des SH

Encore une fois, la présence des AH empêche le modèle de prédire correctement tous les cas de figure de prise en charge en se basant uniquement sur l'association entre le $Cd(DDC)_2^0$ et les AH.

Le modèle conceptuel que nous avons développé à la section 7.3.2 puis amélioré dans la section 9.3.2 permet de mieux estimer, qualitativement du moins, l'influence de nombreux facteurs sur la perméabilité membranaire et donc sur k_i (pH, rigidité membranaire, insertion

des AH dans les membranes biologiques, association des ligands avec les AH). De là, nous pouvons prédire les variations sur k_i pour les complexes Cd(L)_2^0 en présence des AH pour *C. reinhardtii* dans six cas sur six, mais aussi pour le Cd(DDC)_2^0 pour trois algues vertes dans cinq cas sur six.

Le comportement de *P. subcapitata* à pH 5,5 est remarquable car la présence des AH (et de la MON) entraîne une augmentation importante de k_i et «a» (constante d'internalisation et prise en charge à l'état stationnaire respectivement). Quant aux algues *C. pyrenoïdosa* et *C. reinhardtii* toujours à pH 5,5, elles réagissent de la même manière pour k_i et «a», les AH n'ayant aucun effet. À pH 7, les trois algues démontrent trois types de variation sur k_i en présence des AH (augmentation, diminution et absence d'effet), ce qui laisse penser que ces algues ont effectivement des propriétés membranaires différentes à pH neutre.



10. Synthèse

Le schéma conceptuel suivant (cf. figure 10.1) vise à récapituler tout ce que nous avons pu observer dans nos travaux. L'algue au centre (cercle vert), avec une certaine composition lipidique de la membrane, voit la prise en charge des complexes neutres Cd(L)_2^0 affectée par plusieurs interactions et paramètres. Les numéros sur les flèches sont repris ci-dessous puis expliqués brièvement.

10.1 Les hypothèses

Hypothèse 1 : elle est à rejeter puisque dans tous les systèmes (complexes, espèce algale), la prise en charge d'un complexe neutre est diminuée quand le pH diminue de 7 vers 5,5.

Hypothèse 2 : elle est en partie confirmée. La prise en charge des complexes neutres, quels que soient le complexe et l'espèce algale, est diminuée en présence des SH à pH 7. Ce résultat provient clairement de l'association $\text{AH} + \text{Cd(L)}_2^0$ à pH 7 (démontrée par les expériences de dialyse). Ceci demeure vrai avec les deux autres fractions AF et MON (association démontrée par les expériences de fluorescence). Ces résultats ne sont pas valables à pH 5,5; malgré l'association $\text{AH} + \text{Cd(L)}_2^0$ la prise en charge n'est jamais diminuée en présence des AH.

Hypothèse 3 : elle est confirmée puisque le modèle développé en absence des AH, sous-estime dans la plupart des cas la prise en charge des complexes neutres en présence des AH à pH 7, si nous tenons compte uniquement de l'association $\text{AH} + \text{Cd(L)}_2^0$.

Hypothèse 4 : elle est aussi confirmée car dans la plupart des cas, le modèle sous-estime plus à pH 5,5 que 7 la prise en charge des complexes neutres en présence des AH. Il est à

noter toutefois, que seule la prise en charge du complexe neutre $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ par *C. pyrenoïdosa*, est bien modélisée. Dans ce cas seulement, les hypothèses 3 et 4 ne sont pas validées. Les AH ne modifieraient alors pas de la même manière la perméabilité membranaire de cette algue par rapport aux deux autres espèces.

10.2 Les interactions

Tout au long de cette thèse, nous avons montré voire quantifié les interactions entre les composants de nos systèmes : Cd, ligands organiques (DDC, XANT et Ox) et les substances humiques (AH, AF et MON).

- (1) Le Cd en présence d'un excès de ligand L dans les milieux d'exposition est complexé à plus de 99,9% à pH 7 et 5,5 pour former le complexe neutre $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$, à plus de 96% à pH 7 et 5,5 pour former le complexe neutre $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$, à 30% et 1% respectivement à pH 7 et 5,5 pour former le complexe neutre $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$. Ces observations découlent de plusieurs approches différentes : électrode sélective au Cd^{2+} , polarographie et méthode indirecte de détermination des constantes de stabilité (en utilisant la littérature) (cf. sections 4.4.4 et 6.8.3.3).
- (2) L'excès de ligand L interagit avec les SH, probablement par des interactions hydrophobes dans le cas de HOx et par des liaisons hydrogènes dans les cas du DDC^- et du XANT^- . Cependant, nous n'avons pas pu quantifier ces interactions par les mesures de fluorescence. Nous pouvons seulement affirmer qualitativement que les interactions entre HOx et les trois fractions de SH sont plus fortes que celles entre XANT^- et les SH, les interactions entre le DDC^- et les SH étant beaucoup plus faibles. Notons ici que les interactions entre les ligands XANT^- ou HOx et les SH se caractérisent par une atténuation de la fluorescence par rapport aux SH seules tandis que, fait remarquable et inédit, l'ajout de DDC^- entraîne une augmentation de fluorescence des SH (cf. section 5.5). Ces associations L-SH entraîneraient une modification des propriétés des SH et diminueraient leurs interactions avec les membranes biologiques (cf. point 9 plus loin).

- (3) Les complexes neutres s'associent aux SH. Nous avons démontré ce résultat par dialyse dans le cas des AH et par fluorescence pour les trois fractions de matière organique. Ces deux méthodes sont difficilement comparables mais nous avons pu tout de même identifier deux points majeurs : i) les interactions sont principalement dues à la formation de complexes ternaires aux deux pH, des interactions hydrophobes contribuant légèrement à pH 5,5 (cf. section 5.6) ; ii) l'association entre les complexes neutres et les AH vaut respectivement à pH 7 et 5,5 : 88% et 2% pour le $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$; 73% et 72% pour le $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$; 75% et 71% pour le $\text{Cd}(\text{Ox})_2^0$ (cf. section 4.3).
- (4) Au niveau intracellulaire, le Cd bioaccumulé sous forme $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ est en compétition avec les ligands cytosoliques tels que les phytochélatines. Une portion du Cd intracellulaire va alors se complexer avec ces ligands intracellulaires pour former une fraction que nous avons nommé «Cd non labile». La proportion de cette fraction dépend du ligand L dans le complexe $\text{Cd}(\text{L})_2^0$ pris en charge, du pH, de l'espèce algale, et aussi du ligand L en excès qui pourrait être bioaccumulé. Dans ce dernier cas, nous pensons particulièrement à l'espèce HOx ; sa présence dans le cytosol défavorise alors l'action des ligands intracellulaires puisque de l'oxine est disponible pour recomplexer le Cd si nécessaire (cf. sections 6.4 et 8.3).

10.3 Les influences

- (5) Le pH est LA variable clef de notre étude. Nous savons tout d'abord qu'elle influence les réactions de complexation de par les pK_a . Dans notre cas, seul la réaction $\text{Cd}^{2+} + 2 \text{Ox}^-$ est sensible à un changement de pH (7 \rightarrow 5,5), les deux autres réactions (avec le DDC et le XANT) n'étant pas affectées de façon notable dans la gamme de pH étudiée (cf. section 4.4.4).
- (6) Nous savons aussi que le pH modifie la conformation des SH. Elles seraient plutôt agglomérées à pH acide et elles se disperseraient à mesure que le pH augmente. Le pH pourrait donc influencer indirectement l'association $\text{Cd}(\text{L})_2^0 + \text{SH}$, mais seule l'association entre le complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ et les AH est clairement affectée par un changement de pH (cf. point 3). Dans la littérature, il

est démontré qu'une diminution du pH augmente la propension des SH à s'associer avec les membranes biologiques, conduisant alors à une perméabilité membranaire plus grande à pH 5,5 que 7 (Twiss *et al.* 1999 ; Vigneault *et al.* 2000). Dans notre étude, nous montrons par des mesures de tension de surface que les AH et AF ont un effet surfactant plus élevé à pH 7 qu'à pH 5,5 dans les conditions de nos expériences de prise en charge (faible force ionique, faible concentration de SH) (cf. section 4.1). Nous spéculons alors, qu'à l'instar des surfactants pharmacologiques, les AH et les AF s'inséreraient dans les membranes biologiques causant une augmentation de perméabilité membranaire. L'ensemble de ces données ne sont pas contradictoires puisque les propriétés mesurées des SH ne sont pas les mêmes. Nous pouvons affirmer que les SH influencent les membranes biologiques aux deux pH, mais en revanche il est délicat d'affirmer à quel pH les SH s'inséreraient le plus.

- (7) Nous avons clairement montré que la prise en charge des complexes neutres diminue quand le pH est abaissé (entre 2 et 170 fois pour la prise en charge à l'état stationnaire, c'est-à-dire le paramètre «a»), et ce quelque soit le complexe $Cd(L)_2^0$ et l'espèce algale (cf. sections 6.7 et 8.5.2). Ce résultat est sans précédent dans la littérature. Les diminutions observées sont tout de même variables ; les explications découleraient d'une diminution de perméabilité membranaire différentes suivant l'espèce algale (cf. point 8), de D_{ow} différents selon le complexe $Cd(L)_2^0$, de l'excès de ligand organique (cf. point 10), et de la compétition intracellulaire entre les phytochélatines et le Cd sous forme $Cd(L)_2^0$ qui est fonction de l'espèce algale et du pH (cf. point 4).
- (8) Quelques études ont pu démontrer qu'une diminution de pH réduit vraisemblablement la fluidité membranaire, augmente le degré de saturation des acides gras dans les lipides polaires et modifie le ratio des lipides composant la membrane (Guschina et Harwood 2006). Ces observations conduisent au point 8', selon lequel une baisse de pH entraînerait une diminution de la prise en charge des complexes $Cd(L)_2^0$, en partie due à une diminution de perméabilité membranaire. De plus, la composition lipidique des trois espèces algales étudiées, *C. reinhardtii*, *P. subcapitata* et *C. pyrenoïdosa*, est probablement différente, ce

qui contribuerait aux différences de prise en charge pour le complexe $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ suivant l'espèce algale (cf. section 8.5).

- (9) Les SH, et en particulier les AH (pour lesquels nous avons le plus de données), modifient la perméabilité membranaire des algues en s'y insérant. Il s'en suit alors des changements de la constante d'internalisation k_i ou de la perméabilité observée P_{obs} . Les tableaux conceptuels développés à la section 9.3.2 nous amènent à conclure que les AH s'insèrent dans la membrane biologique dans des proportions différentes suivant l'espèce algale et le pH. Ainsi l'ordre d'insertion des AH suivrait : *P. subcapitata* à pH 5,5 > *C. pyrenoïdosa* à pH 5,5 > *C. reinhardtii* pH 5,5 et 7 > *P. subcapitata* et *C. pyrenoïdosa*.
- (10) Les ligands organiques ajoutés en excès participeraient eux aussi à la perméabilisation de la membrane. D'après nos données, un très grand excès de DDC^- (50 μM) accroît la perméabilité membranaire de *C. reinhardtii*. Néanmoins aux concentrations de DDC^- dans les expériences de prise en charge (1 μM) il ne devrait pas avoir d'effet perméabilisant des membranes des trois algues étudiées quelque soit le pH. Nous supposons concernant l'oxine (79 μM) que H_2Ox^+ (près de 30% à pH 5,5) possède un effet perméabilisant les membranes biologiques tandis que HOx (> 99% à pH 7) n'en aurait pas. De la même manière, nous spéculons que le très grand excès de XANT^- aux pH 5,5 et 7 (100 μM) amplifierait la perméabilité membranaire des algues (cf. section 6.7 et section 9.3.2).

10.4 Les implications pratiques

La présence simultanée d'un métal (cadmium) et de certains ligands organiques conduit à la formation d'un complexe stable, neutre et lipophile, qui change radicalement les interactions métal-membrane biologique. Rappelons que les ligands organiques utilisés dans cette étude sont représentatifs des activités humaines (pesticides, antibiotiques, réactifs miniers). Les complexes que nous avons étudiés sont beaucoup plus bioaccumulés que le métal libre en absence de tels ligands organiques dans la gamme de pH 5,5 à 7. Il existe donc un réel risque pour les organismes aquatiques d'eau douce (comme les algues vertes que nous avons étudiées). Cependant, la présence de substances humiques diminue ce

risque à pH neutre tandis qu'à pH acide, la bioaccumulation des complexes neutres Cd(L)_2^{00} n'est pas modifiée voire elle est augmentée. Ces deux facteurs que sont le pH et les substances humiques sont de plus en plus intégrés dans les études qui visent à améliorer les réglementations environnementales. Nos travaux montrent que cela ne sera pas aisé tant ces facteurs influencent de nombreux autres paramètres.

10.5 Les perspectives

Ce projet de doctorat a mis en lumière des inconnues qui existent encore à plusieurs niveaux. Tout d'abord, d'un point de vue purement biologique, les interactions entre les substances humiques et les membranes biologiques ne sont pas totalement élucidées tout comme l'influence du pH sur ces membranes. Les techniques de biologie moléculaire (sondes moléculaires, anticorps) semblent offrir une opportunité intéressante pour parfaire nos connaissances à ce sujet. Par ailleurs, la caractérisation des propriétés des substances humiques, et la compréhension de leurs influences sur différents paramètres (bioaccumulation par exemple), demeurent encore en chantier actif. Il pourrait être envisageable de poursuivre ces travaux avec des organismes aquatiques supérieures (moules, huîtres, etc.) en conditions contrôlées, pour tenter de dégager des mécanismes généraux concernant les substances humiques sur la bioaccumulation de métaux ou complexes neutres. Enfin, à l'heure actuelle se développe à un rythme jamais égalé la production (et donc la dissémination dans l'environnement) de nanoparticules, qui sont attendues comme la prochaine révolution technologique (Hardman 2006). De par leur taille et leurs propriétés de surfactants, les nanoparticules ressemblent aux substances humiques, mais elles possèdent en plus des réactivités physico-chimiques extrêmement élevées. Il devient dès lors primordial d'examiner les effets de telles particules sur les organismes aquatiques et à terme sur la santé humaine. À ce titre nos travaux peuvent être un point de départ pour le développement d'autres études portant sur les nanoparticules.

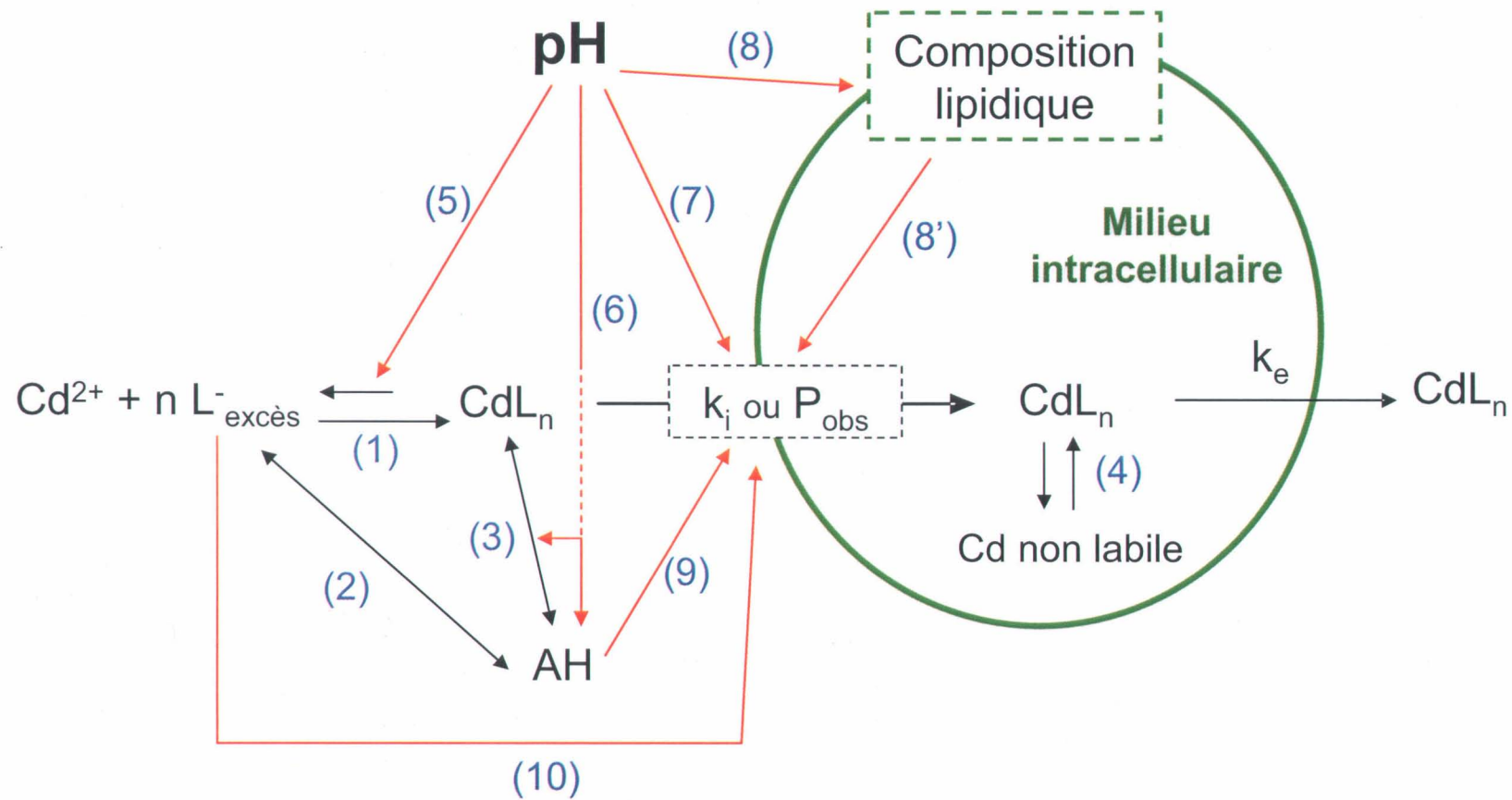


Figure 10.1 : Schéma conceptuel synthétisant les interactions entre les composés en solution et leurs influences concernant la prise en charge de complexes neutres par des algues vertes.



RÉFÉRENCES

- Abbt-Braun G., Lankes U. et Frimmel F.H. **2004**. Structural characterization of aquatic humic substances - The need for a multiple method approach. *Aquatic Sciences* 66, 151-170.
- Adhiya J., Cai X., Sayre R.T. et Traina S.J. **2002**. Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Colloids and Surfaces* 210, 1-11.
- Ahner B.A., Kong S. et Morel F.M.M. **1995**. Phytochelatin Production in Marine-Algae .1. An Interspecies Comparison. *Limnology and Oceanography* 40, 649-657.
- Ahsanullah M. et Florence T.M. **1984**. Toxicity of copper to the marine amphipod *Allorchestes compressa* in the presence of water and lipid soluble ligands. *Marine Biology* 84, 41-45.
- Alberts J.J. et Takacs M. **2004**. Comparison of the natural fluorescence distribution among size fractions of terrestrial fulvic and humic acids and aquatic natural organic matter. *Organic Geochemistry* 35, 1141-1149.
- Allen H.E. et Hansen D.J. **1996**. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environment Research* 68, 42-54.
- Arancibia V., Alarcon L. et Segura R. **2004**. Supercritical fluid extraction of cadmium as Cd-oxine complex from human hair. Determination by square wave anodic or adsorptive stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 502, 189-194.
- Avrahami D. et Shai Y. **2004**. A new group of antifungal and antibacterial lipopeptides derived from non-membrane active peptides conjugated to palmitic acid. *Journal of Biological Chemistry* 279, 12277-12285.
- Baldisserotto B., Chowdhury M.J. et Wood C.A. **2005**. Effects of dietary calcium and cadmium on cadmium accumulation, calcium and cadmium uptake from the water, and their interactions in juvenile rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 72, 99-117.
- Bardez E., Devol I., Larrey B. et Valeur B. **1997**. Excited-state processes in 8-hydroxyquinoline: Photoinduced tautomerization and solvation effects. *Journal of Physical Chemistry B* 101, 7786-7793.
- Beckett R. **1990**. The surface chemistry of humic substances in aquatic systems. *Surface and colloid chemistry in natural waters and water treatment*. Ed. R. Beckett, London: Plenum Press , 3-20.

- Block M. **1991**. Distribution of cadmium in an octanol/water system in the presence of xanthates and diethyldithiocarbamate. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10, 1267-1272.
- Block M. et Glynn W.A. **1992**. Influence of xanthates on the uptake of ^{109}Cd by eurasian dace (*Phoxinus phoxinus*) and rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 873-879.
- Block M. et Pärt P. **1986**. Increased availability of cadmium to perfused rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Rich.) gills in the presence of the complexing agents diethyldithiocarbamate, ethyl xanthate and isopropyl xanthate. *Aquatic Toxicology* 8, 295-302.
- Bold H.C., Delevoryas T. et Alexopoulos C.J. **1980**. Morphology of Plants and Fungi. *Fourth Edition*. Harper & Row Publishers, NY.
- Bonnemain H. et Dive D. **1990**. Studies on synergistic toxic effects of copper and dithiocarbamate pesticides with the ciliate protozoan *Colpidium campylum* (Stokes). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 19, 320-326.
- Borg K., Gottofrey J. et Tjälve H. **1988**. Effects of some chelating agents on the uptake and distribution of ^{203}Hg in the brown trout (*Salmo trutta*): studies on ethyl- and isopropylxanthate, diethyl- and diisopropylidithiophosphate, dimethyl- and diethyldithiocarbamate and pyridinethione. *Archives of Toxicology* 62, 387-391.
- Boullemant A., Vigneault B., Fortin C. et Campbell P.G.C. **2004**. Uptake of neutral metal complexes by a green alga: influence of pH and humic substances. *Australian Journal of Chemistry* 57, 931-936.
- Briant J. et Ténèbre L. **1989**. Phénomènes d'interface - Agents de surface. Principes et modes d'action. *Editions Technip, Paris et Institut Français du Pétrole, Rueil-Malmaison*.
- Brûlé B., Mazé M., Simaillaud B. et Potti J.J. **2001**. Caractérisation de l'interface bitume/eau par la mesure de la tension interfaciale. *Bulletin des Laboratoires des Ponts et Chaussées* 234, 3-15.
- Buffle J. **1988**. Complexation reactions in aquatic systems. Chichester, UK: Ellis Horwood.
- Cabaniss S.E. **1992**. Synchronous fluorescence-spectra of metal-fulvic acid complexes. *Environmental Science & Technology* 26, 1133-1139.
- Cain D.J., Carter J.L., Fend S.V., Luoma S.N., Alpers C.N. et Taylor H.E. **2000**. Metal exposure in a benthic macroinvertebrate, *Hydropsyche californica*, related to mine drainage in the Sacramento river. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 380-390.
- Campbell P.G.C. **1995**. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, vol. IUPAC, Eds. A. Tessier et D. R. Turner. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 45-102.

- Campbell P.G.C., Fortin C., Hiriart-Baer V.P. et Vigneault B. **2002**. Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 133, 189-206.
- Campbell P.G.C. et Stokes P.M. **1985**. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42, 2034-2049.
- Campbell, P.G.C. and A. Tessier, 1987. Metal speciation in natural-waters: Influence of environmental acidification. In: American Chemistry Society (ed.), In Sources and Fates of Aquatic Pollutants, pp. 185-207.
- Campbell P.G.C., Twiss M.R. et Wilkinson K.J. **1997**. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 2543-2554.
- Ceretti H.M., Vullo D.L., Zalts A. et Ramirez S.A. **2006**. Cadmium complexation in culture media. *Electroanalysis* 18, 493-498.
- Chen Y. et Schnitzer M. **1976**. Scanning electron microscopy of a humic acid and of a fulvic acid and its metal and clay complexes. *Soil Science Society of America Journal* 40, 682-686.
- Chen Y. et Schnitzer M. **1989**. Sizes and shape of humic substances by electron microscopy. In M. H. B. Hayes, P. MacCarthy, R. L. Malcolm and R. S. Swift (Eds). *Humic substances II. In search of structure*. John Wiley & Sons. 764 pages .
- Coble P.G. **1996**. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51, 325-346.
- Croot P.L., Karlson B., Van Elteren J.T. et Kroon J.J. **1999**. Uptake of Cu-64-oxine by marine phytoplankton. *Environmental Science & Technology* 33, 3615-3621.
- Croteau M.N., Luoma S.N. et Stewart A.R. **2005**. Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnology and Oceanography* 50, 1511-1519.
- Datta A., Sanyal S.K. et Saha S. **2001**. A study on natural and synthetic humic acids and their complexing ability towards cadmium. *Plant and Soil* 235, 115-125.
- De Schamphelaere K.A.C., Heijerick D.G. et Janssen C.R. **2002**. Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting acute copper toxicity to *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 133, 243-258.
- De Schamphelaere K.A.C., Vasconcelos F.M., Tack F.M., Allen H.E. et Janssen C.R. **2004**. Effect of dissolved organic matter source on acute copper toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1248-1255.

- Dobson S. **1992**. Environmental Health Criteria 135: Cadmium - Environmental aspects. World Health Organisation, Geneva, 16-87.
- Duffus J. **1993**. Glossary for chemists of terms used in toxicology (IUPAC Recommendations 1993) Commission on Toxicology. *Pure and Applied Chemistry* 65, 2003-2123.
- Edwards M., Benjamin M.M. et Ryan J.N. **1996**. Role of organic acidity in sorption of natural organic matter (NOM) to oxide surfaces. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* 107, 297-307.
- Elkins K.M. et Nelson D.J. **2002**. Spectroscopic approaches to the study of the interaction of aluminium with humic substances. *Coordination Chemistry Reviews* 228, 205-225.
- Erickson R.J., Benoit D.A., Mattson V.R., Nelson Jr.H.P. et Leonard E.N. **1996**. The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 181-193.
- Erickson R.J., Brooke L.T., Kahl M.D., Venter F.V., Harting S.L., Markee T.P. et Spehar R.L. **1998**. Effects of laboratory test conditions on the toxicity of silver to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 572-578.
- Errécalde O. et Campbell P.G.C. **2000**. Cadmium and zinc bioavailability to *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae): accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate. *Journal of Phycology* 36, 473-483.
- Errécalde O., Seidl M. et Campbell P.G.C. **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 Research* 32, 419-429.
- Faller P., Kienzler K. et Krieger-Liszkay A. **2005**. Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site. *Biochimica et Biophysica Acta* 1706, 158-164.
- Fang S., Xu S., Dong L. et Li W. **1994**. Determination of cadmium in biological materials by flame atomic absorption spectrometry with flow-injection on-line sorption preconcentration. *Talanta* 41, 2165-2172.
- Findlay S.E.G. et Sinsabaugh R.L. **2002**. Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter.
- Finizio A., Vighi M. et Sandroni D. **1997**. Determination of N-octanol/water partition coefficient (Kow) of pesticide. Critical review and comparison of methods. *Chemosphere* 34, 131-161.
- Fischer H., Gottschlich R. et Seelig A. **1998**. Blood-brain barrier permeation: Molecular parameters governing passive diffusion. *Journal of Membrane Biology* 165, 201-211.

- Florence T.M., Powell H.K.J., Stauber J.L. et Town R.M. **1992**. Toxicity of lipid-soluble copper (II) complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*: amelioration by humic substances. *Water Research* 26, 1187-1193.
- Florence T.M. et Stauber J.L. **1986**. Toxicity of copper complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Aquatic Toxicology* 8, 11-26.
- Fortin C. et Campbell P.G.C. **2000**. Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2769-2778.
- Fortin C. et Campbell P.G.C. **2001**. Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: role of anion transporters in metal uptake. *Environmental Science & Technology* 35, 2214-2218.
- Frimmel F.H. et Huber L. **1996**. Influence of humic substances on the aquatic adsorption of heavy metals on defined mineral phases. *Environment International* 22, 507-517.
- Gédziorowska D., Pempkowiak J. et Dobrzynski I. **1984**. The influence of dissolved humic substances on two species of unicellular Baltic algae. *Limnologica* 15, 319-324.
- Ghosh K. et Schnitzer M. **1980**. Macromolecular structures of humic substances. *Soil Science* 129, 266-276.
- Giannakopoulos E., Christoforidis K.C., Tsipis A., Jerzykiewicz M. et Deligiannakis Y. **2005**. Influence of Pb(II) on the radical properties of humic substances and model compounds. *Journal of Physical Chemistry A* 109, 2223-2232.
- Giesy J.P.Jr., Laversee G.L. et Williams D.R. **1977**. Effects of naturally occurring aquatic organic fractions on cadmium toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae) and *Gambusia affinis* (Poeciliidae). *Water Research* 11, 1013-1020.
- Giesy J.P.Jr., Newell A. et Laversee G.L. **1983**. Copper speciation in soft, acid, humic waters: effects on copper bioaccumulation by and toxicity to *Simocephalus serrulatus*. *The Science of the Total Environment* 28, 23-36.
- Giesy J.P.Jr. et Paine D. **1977**. Effects of naturally occurring aquatic organic fractions on ²⁴¹Am uptake by *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) and *Aeromonas hydrophila* (Pseudomonadaceae). *Applied and Environmental Microbiology* 33, 89-96.
- Gottofrey J. **1990**. The disposition of Cd, Ni, Hg and CH₃Hg in fish and effects of lipophilic metal chelation. *Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Pharmacology and Toxicology (Thèse)* .
- Gottofrey J., Björklund I. et Tjälve H. **1988a**. Effect of sodium isopropylxanthate, potassium amyloxanthate and sodium diethyldithiocarbamate on the uptake and distribution of cadmium in the brown trout (*Salmo trutta*). *Aquatic Toxicology* 12, 171-184.

Gottofrey J., Borg K., Jasim S. et Tjälve H. **1988b**. Effect of potassium ethylxanthate and sodium diethyldithiocarbamate on the accumulation and disposition of nickel in the brown trout (*Salmo trutta*). *Pharmacology and Toxicology* 63, 46-51.

Grassi M. et Daquino V. **2005**. Cd-113 NMR and fluorescence studies of multiple binding mechanisms of Cd(II) by the Suwannee River fulvic acid. *Annali di Chimica* 95, 579-591.

Grassi M. et Mingazzini M. **2001**. ¹¹³Cd-NMR and fluorescence studies of the interactions between Cd(II) and extracellular organic matter released by *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Science & Technology* 35, 4271-4276.

Green S.A., Morel F.M.M. et Blough N.V. **1992**. Investigation of the electrostatic properties of humic substances by fluorescence quenching. *Environmental Science & Technology* 26, 294-302.

Grez P., Celedon C., Molinari A., Oliva A., Orellana M., Schrebler R. et del Rio R. **2005**. New aspects of the electroadsorption of ethyl xanthate on copper electrodes. *Journal of Physical Chemistry B* 109, 22920-22927.

Guckert J.B. et Cooksey K.E. **1990**. Triglyceride accumulation and fatty-acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH-induced cell-cycle inhibition. *Journal of Phycology* 26, 72-79.

Guo L., Hunt B.J., Santschi P.H. et Ray S.M. **2001**. Effect of dissolved organic matter on the uptake of trace metals by American oysters. *Environmental Science & Technology* 35, 885-893.

Guschina I.A. et Harwood J.L. **2006**. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45, 160-186.

Haitzer M., Hoss S., Traunspurger W. et Steinberg C. **1998**. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms - A review. *Chemosphere* 37, 1335-1362.

Hardman R. **2006**. A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environmental Health Perspectives* 114, 165-172.

Harrison G.I., Campbell P.G.C. et Tessier A. **1986**. Effects of pH changes on zinc uptake by *Chlamydomonas variabilis* grown in batch culture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43, 687-693.

Hasan B.A., Khalaf K.D., Morales-Rubio A. et Guardia M. **1996**. FIA-spectrophotometric determination of 8-hydroxyquinoline with p-aminophenol. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 354, 216-220.

- Hassler C.S., Slaveykova V.I. et Wilkinson K.J. **2004a**. Discriminating between intra-and extracellular metals using chemical extractions. *Limnology and Oceanography Methods* 2, 237-247.
- Hassler C.S., Slaveykova V.I. et Wilkinson K.J. **2004b**. Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 283-291.
- Hayashi K., Sasaki Y., Inomata S. et Yanagidani T. **1984**. Acid dissociation-constants of alkyl xanthic acids and formation-constants of cadmium(II) and zinc(II) xanthato complexes in 1-1 v/v H₂O-DMF Medium. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 57, 3074-3076.
- Hayashi K., Sasaki Y., Tagashira S. et Yanagidani T. **1986**. Acid dissociation constants of dialkyldithiocarbamic acids and O, O' dialkyl S-hydrogen dithiophosphates and formation constants of their complexes with cadmium (II), zinc (II) and lead (II) in 1:1 v/v water-DME medium. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 59, 1255-1256.
- Hays M.D., Ryan D.K. et Pennell S. **2003**. Multi-wavelength fluorescence-quenching model for determination of Cu²⁺ conditional stability constants and ligand concentrations of fulvic acid. *Applied Spectroscopy* 57, 454-460.
- Hays M.D., Ryan D.K. et Pennell S. **2004**. A modified multisite Stern-Volmer equation for the determination of conditional stability constants and ligand concentrations of soil fulvic acid with metal ions. *Analytical Chemistry* 76, 848-854.
- He L. et Jurs P.C. **2005**. Probabilistic neural network multiple classifier system for predicting the genotoxicity of quinolone and quinoline derivatives. *Chemical Research in Toxicology* 18, 428-440.
- Henry M.M. et Fahrni C.J. **2002**. Excited state intramolecular proton transfer and metal ion complexation of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzazoles in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry A* 106, 5210-5220.
- Hertkorn N., Perdue E.M. et Kettrup A. **2004**. A potentiometric and (113)Cd NMR study of cadmium complexation by natural organic matter at two different magnetic field strengths. *Analytical Chemistry* 76, 6327-6341.
- Hoffman D.J. **1994**. Handbook of ecotoxicology. D. J. Hoffman & B. A. Rattner (editors). CRC Press Inc .
- Hu S.X., Lau K.W.K. et Wu M. **2001**. Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science* 161, 987-996.
- Huh C. et Mason S.G. **1975**. A rigorous theory of ring tensiometry. *Colloid and Polymer Science* 253, 566-580.

- Kamenosono T., Shimada H., Funakoshi T. et Kojima S. **2002**. Involvement of active transport systems in the mobilization of cadmium by dithiocarbamates in vivo. *Toxicology* 170, 103-110.
- Karlsson T., Persson P. et Skyllberg U. **2005**. Extended X-ray absorption fine structure spectroscopy evidence for the complexation of cadmium by reduced sulfur groups in natural organic matter. *Environmental Science & Technology* 39, 3048-3055.
- Klinck J., Dunbar M., Brown S., Nichols J., Winter A., Hughes C. et Playle R.C. **2005**. Influence of water chemistry and natural organic matter on active and passive uptake of inorganic mercury by gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 72, 161-175.
- Kola H., Laglera L.M., Parthasarathy N. et Wilkinson K.J. **2004**. Cadmium adsorption by *Chlamydomonas reinhardtii* and its interaction with the cell wall proteins. *Environmental Chemistry* 1, 172-179.
- Kooijman S.A.L.M., Jager T. et Kooi B.W. **2004**. The relationship between elimination rates and partition coefficients. *Chemosphere* 57, 745-753.
- Koukal B., Gueguen C., Pardos M. et Dominik J. **2003**. Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere* 53, 953-961.
- Kozuch J. et Pempkowiak J. **1996**. Molecular weight of humic acids as a major property of the substances influencing the accumulation rate of cadmium by a blue mussel (*Mytilus edulis*). *Environment International* 22, 585-589.
- Labuda J., Skatulokova M., Németh M. et Gergely S. **1984**. Formation and stability of diethyldithiocarbamate complexes. *Chemicke Zvesti* 38, 597-605.
- Lakowicz J. **1983**. Principles of fluorescence spectroscopy. *Plenum Press, New York, NY 10013*.
- Larrivee E.M., Elkins K.M., Andrews S.E. et Nelson D.J. **2003**. Fluorescence characterization of the interaction of Al^{3+} and Pd^{2+} with Suwannee River fulvic acid in the absence and presence of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Journal of Inorganic Biochemistry* 97, 32-45.
- Lead J.R., Wilkinson K.J., Balnois E., Cutak B.J., Larive C.K., Assemi S. et Beckett R. **2000a**. Diffusion coefficients and polydispersities of the Suwannee River fulvic acid: comparison of fluorescence correlation spectroscopy, pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance, and flow field-flow fractionation. *Environmental Science & Technology* 34, 3508-3513.
- Lead J.R., Wilkinson K.J., Starchev K., Canonica S. et Buffle J. **2000b**. Determination of diffusion coefficients of humic substances by fluorescence correlation spectroscopy: role of solution condition. *Environmental Science & Technology* 34, 1365-1369.

- Lee D.Y., Fortin C. et Campbell P.G.C. **2005**. Contrasting effects of chloride on the toxicity of silver to two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology* 75, 127-135.
- Lee M.H., Choi S.Y., Chung K.H. et Moon H. **1993**. Complexation of cadmium (II) with humic acids: effects of pH and humic acid origin. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 14, 726-732.
- Leenheer J.A., McKnight D.M., Thurman E.M. et MacCarthy P. **1995**. Structural components of proposed structural models of fulvic acid from the Suwannee River. In: *Humic substances in the Suwannee River, Georgia: interactions, properties and proposed structure*. Water Supply Paper 2373, Eds. R. C. Averett, J. A. Leenheer, D. M. McKnight et K. A. Thorn. Denver, CO: US Geological Survey, 195-211.
- Li Y.H. et Gregory S. **1974**. Diffusion of ions in sea-water and in deep-sea sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 38, 703-714.
- Lochmüller C.H. et Saavedra S.S. **1986**. Conformational changes in a soil fulvic acid measured by time-dependent fluorescence depolarization. *Analytical Chemistry* 58, 1978-1981.
- Lofts S. et Tipping E. **2001**. Windermere Humic Aqueous Model. Equilibrium chemical speciation for natural waters. Natural Environment Research Council.
- Ludwig C. **1992**. GRFIT, a program for solving speciation problems: Evaluation of equilibrium constants, concentrations and other physical parameters. *Internal report, University of Berne*.
- Luster J., Lloyd T., Sposito G. et Fry I.V. **1996**. Multi-wavelength molecular fluorescence spectrometry for quantitative characterization of copper (II) and aluminium (III) complexation by dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology* 30, 1565-1574.
- Macfie S.M., Tarmohamed Y. et Welbourn P.M. **1994**. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27, 454-458.
- Malik A.K. et Faubel W. **1999**. Methods of analysis of dithiocarbamate pesticides: a review. *Pesticide Science* 55, 965-970.
- Martell A.E. et Smith R.M. **2004**. NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes. *National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD, USA*.
- Mason R.P., Reinfelder J.R. et Morel F.M.M. **1996**. Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. *Environmental Science & Technology* 30, 1835-1845.

- McCarthy J.F. et Zachara J.M. **1989**. Subsurface transport of contaminants - mobile colloids in the subsurface environment may alter the transport of contaminants. *Environmental Science & Technology* 23, 496-502.
- McKnight D.M. et Aiken G.R. **1998**. Sources and age of aquatic humus. *Ecological Studies Vol 133, Eds D. O. Hessen et L. J. Tranbvik. Berlin: Springer-Verlag* , 9-39.
- McKnight D.M., Boyer E.W., Westerhoff P.K., Doran P.T., Kulbe T. et Andersen D.T. **2001**. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography* 46, 38-48.
- McKnight D.M. et Tate C.M. **1997**. Canada stream: A glacial meltwater stream in Taylor Valley, South Victoria Land, Antarctica. *Journal of the North American Benthological Society* 16, 14-17.
- McLarnon-Riches C.J., Rolph C.E., Greenway D.L.A. et Robinson P.K. **1998**. effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids. *Phytochemistry* 49, 1241-1247.
- Meador J.M. **1991**. The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity. *Aquatic Toxicology* 19, 13-32.
- Mierle G. et Stokes P.M. **1976**. Heavy metal tolerance and metal accumulation by planctonic algae. *Trace substances in environment health-X. 1976. A symposium. Eds Hemphill D. D. University of Missouri, Columbia.* 113-122.
- Mobed J.J., Hemmingsen S.L., Autry J.L. et McGown L.B. **1996**. Fluorescence characterization of IHSS humic substances: total luminescence spectra with absorbance correction. *Environmental Science & Technology* 30, 3061-3065.
- Morel F.M.M. **1983**. Principles of aquatic chemistry. *New-York: Wiley-Interscience* .
- Muller P. **1994**. Glossary of terms used in physical organic-chemistry. *Pure and Applied Chemistry* 66, 1077-1184.
- Muramoto S. **1981**. Vertebral column damage and decrease of calcium-concentration in fish exposed experimentally to cadmium. *Environmental Pollution Series A-Ecological and Biological* 24, 125-133.
- Nagao S., Aoyama M., Watanabe A., Nakaguchi Y. et Ogawa H. **2001**. Fluorescence quenching studies of Eu-humic complexes by three-dimensional excitation emission matrix spectroscopy. *Analytical Sciences* 17 supplement, i1585-i1588.
- Nelson W.O. et Campbell P.G.C. **1991**. The effects of acidification on the geochemistry of Al, Cd, Pb and Hg in fresh-water environments - a literature-review. *Environmental Pollution* 71, 91-130.

- Nieboer E. et Richardson D.H.S. **1980**. The replacement of the nondescriptive term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution: Series B-Chemical and Physical* 1, 3-26.
- Nordberg G.F. **2004**. Cadmium and health in the 21st Century - historical remarks and trends for the future. *Biometals* 17, 485-489.
- Ohno T. **2002**. Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology* 36, 742-746.
- Otto W.H., Burton S.D., Carper R.W. et Larive C.K. **2001**. Examination of cadmium (II) complexation by the Suwannee River fulvic acid using ^{113}Cd NMR relaxation measurements. *Environmental Science & Technology* 35, 4900-4904.
- Pacheco M.L., Pena-Méndez E.M. et Havel J. **2003**. Supramolecular interactions of humic acids with organic and inorganic xenobiotics studied by capillary electrophoresis. *Chemosphere* 51, 95-108.
- Parent L. et Campbell P.G.C. **1994**. Aluminium bioavailability to the green alga *Chlorella pyrenoidosa* in acidified synthetic soft water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 587-598.
- Paschke A., Neitzel P.L., Walther W. et Schuurmann G. **2004**. Octanol/water partition coefficient of selected herbicides: Determination using shake-flask method and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chemical and Engineering Data* 49, 1639-1642.
- Patel-Sorrentino N., Mounier S. et Benaim J.Y. **2002**. Excitation-emission fluorescence matrix to study pH influence on organic matter fluorescence in the Amazon basin rivers. *Water Research* 36, 2571-2581.
- Patra D. et Mishra A.K. **2002**. Total synchronous fluorescence scan spectra of petroleum products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373, 304-309.
- Paul A., Stosser R., Zehl A., Zwirnmann E., Vogt R.D. et Steinberg C.E.W. **2006**. Nature and abundance of organic radicals in natural organic matter: Effect of pH and irradiation. *Environmental Science & Technology* 40, 5897-5903.
- Perdue E.M. et Ritchie J.D. **2004**. Dissolved organic matter in freshwaters in Treatise on Geochemistry vol. 5. Ed. Drever J. I. 273-318.
- Petelska A.D. et Figaszewski Z.A. **2002**. Effect of pH on the interfacial tension of bilayer lipid membrane formed from phosphatidylcholine or phosphatidylserine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1561, 135-146.
- Petersen R.C. et Persson U. **1987**. Comparison of the biological effects of humic materials under acidified conditions. *The Science of the Total Environment* 62, 387-398.

- Pettit L.D. et Powell K.J. **2001**. IUPAC Stability Constants Database, version 5.18. *Academic Software: Yorks, U. K.*
- Pflugmacher S., Fay T.L. et Steinberg C.E.W. **2001**. Dissolved humic substances can directly affect freshwater organisms. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 29, 34-40.
- Phinney J.T. et Bruland K.W. **1994**. Uptake of a lipophilic organic Cu, Cd and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environmental Science & Technology* 28, 1781-1790.
- Phinney J.T. et Bruland K.W. **1997a**. 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.
- Phinney J.T. et Bruland K.W. **1997b**. 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. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 2046-2053.
- Piccolo A. **2001**. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science* 166, 810-832.
- Plaza C., Brunetti G., Senesi N. et Polo A. **2006**. Molecular and quantitative analysis of metal ion binding to humic acids from sewage sludge and sludge-amended soils by fluorescence spectroscopy. *Environmental Science & Technology* 40, 917-923.
- Poldoski J.E. **1979**. Cadmium bioaccumulation assays. Their relationship to various ionic equilibria in Lake Superior. *Environmental Science & Technology* 13, 701-706.
- Powell H.K.J. et Town R.M. **1991**. Interaction of humic substances with hydrophobic metal complexes: a study by anodic stripping voltammetry and spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta* 248, 95-102.
- Powers J.P.S. et Hancock R.E.W. **2003**. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24, 1681-1691.
- Pranzas P.K., Willumeit R., Gehrke R., Thieme J. et Knöchel A. **2003**. Characterisation of structure and aggregation processes of aquatic humic substances using small-angle scattering and X-ray microscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376, 618-625.
- Provenzano M.R., D'Orazio V., Jerzykiewicz M. et Senesi N. **2004**. Fluorescence behaviour of Zn and Ni complexes of humic acids from different sources. *Chemosphere* 55, 885-892.
- Pullin M.J. et Cabaniss S.E. **1995**. Rank analysis of the pH-dependent synchronous fluorescence-spectra of six standard humic substances. *Environmental Science & Technology* 29, 1460-1467.

- Quentel F., Cabon J.Y., L'Her M. et Courtot-Coupez J. **1978**. Stabilité de complexes organométalliques dans le carbonate de propylène saturé d'eau. I. Complexes hydroxy-8-quinoléine-cuivre(II), cadmium (II), zinc(II) et plomb(II). *Analytica Chimica Acta* 96, 133-142.
- Rauen T.G., Debacher N.A., Sierra M.M.D. et Sierra E.J.S. **2002**. Tensioactivity of humic acids from distinct environments. *Quimica Nova* 25, 909-913.
- Ritchie J.D. et Perdue E.M. **2003**. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 85-96.
- Röderer G. **1983**. Differential toxic effects of mercuric chloride and methylmercuric chloride on the freshwater alga *Poteroochromonas malhamensis*. *Aquatic Toxicology* 3, 23-34.
- Roditi H.A., Fisher N.S. et Sanudo-Wilhelmy S.A. **2000**. Uptake of dissolved organic carbon and trace elements by zebra mussels. *Nature* 407, 78-80.
- Rosakis A. et Koster W. **2005**. Divalent metal transport in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* is mediated by a protein similar to prokaryotic Nramp homologues. *Biometals* 18, 107-120.
- Roskill information services Ltd. **1995**. Cadmium Market Update Analysis and Outlook. London, UK .
- Rouleau C., Block M. et Tjälve H. **1998**. Kinetics and body distribution of waterborne $^{65}\text{Zn}(\text{II})$, $^{109}\text{Cd}(\text{II})$, $^{203}\text{Hg}(\text{II})$, and $\text{CH}_3^{203}\text{Hg}(\text{II})$ in phantom midge larvae (*Chaoborus americanus*) and effects of complexing agents. *Environmental Science & Technology* 32, 1230-1236.
- Roy R.L. et Campbell P.G.C. **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. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1962-1969.
- Ryan A.C., Van Genderen E.J., Tomasso J.R. et Klaine S.J. **2004**. Influence of natural organic matter source on copper toxicity to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*): Implications for the biotic ligand model. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1567-1574.
- Ryan D.K. et Weber J.H. **1982a**. Copper (II) complexing capacities of natural waters by fluorescence quenching. *Environmental Science & Technology* 16, 866-872.
- Ryan D.K. et Weber J.H. **1982b**. Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability-constants of fulvic-acid. *Analytical Chemistry* 54, 986-990.

Sauvant M.P., Pepin D., Bohatier J. et Groliere C.A. **2000**. Effects of chelator on the acute toxicity and bioavailability of aluminium to *Tetrahymena pyriformis*. *Aquatic Toxicology* 47, 259-275.

Scally S., Davison W. et Zhang H. **2006**. Diffusion coefficients of metals and metal complexes in hydrogels used in diffusive gradients in thin films. *Analytica Chimica Acta* 558, 222-229.

Scappaticci B., Soubeyrand J., Rousseau-Tsangaris M., Desage M., Brazier J.L. et Coquet B. **1990**. Determination of sodium diethyldithiocarbamate (Imuthiol) and its S-methyl metabolite by gas chromatography-mass spectrometry. Use of deuteromethyl iodide derivatization. *Journal of Chromatography Biomedical applications* 534, 57-66.

Scharfe R.R., Sastri V.S. et Chakrabarti C.L. **1973**. Stability of metal dithiocarbamate complexes. *Analytical Chemistry* 45, 413-415.

Schecher W.D. **2001**. MINEQL+: Version 4.5, Environmental Research Software. *Hallowell, ME, USA*.

Schnitzer M. **1976**. The chemistry of humic substances. Second International Symposium of Environmental Biogeochemistry. *Ed. J. Nriagu*, 89-107.

Schulten H.R. et Schnitzer M. **1998**. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology and Fertility of Soils* 26, 1-15.

Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M. et Imboden D.M. **1993**. Environmental Organic Chemistry. *John Wiley, New York*.

Seebaugh D.R., Goto D. et Wallace W.G. **2005**. Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. *Marine Environmental Research* 59, 473-491.

Sekkat N., Le Dû A., Jouany J.M. et Guerbet M. **1992**. Study of the interactions between copper, cadmium, and ferbam using the protozan *Colpidium campylum* bioassay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 24, 294-300.

Sierra M.M., Giovanela M., Parlanti E. et Soriano-Sierra E.J. **2005**. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* 58, 715-733.

Simpson A.J. **2002**. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* 40, S72-S82.

Slaveykova V.I. et Wilkinson K.J. **2002**. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science & Technology* 36, 969-975.

Slaveykova V.I. et Wilkinson K.J. **2003**. Effect of pH on Pb biouptake by the freshwater alga *Chlorella kesslerii*. *Environmental Chemistry Letters* 1, 185-189.

Slaveykova V.I., Wilkinson K.J., Ceresa A. et Pretsch E. **2003**. Role of fulvic acid on lead bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environmental Science & Technology* 37, 1114-1121.

Smith A.L. et Green R.H. **1975**. Uptake of mercury by freshwater clams (family Unionidae). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 32, 1297-1303.

Soares H.M.V.M. et Conde P.C.F.L. **2000**. Electrochemical investigations of the effect of N-substituted aminosulfonic acids with a piperazinic ring pH buffers on heavy metal processes which may have implications on speciation studies. *Analytica Chimica Acta* 421, 103-111.

Soares H.M.V.M., Conde P.C.F.L., Almeida A.A.N. et Vasconcelos M.T.S.D. **1999**. Evaluation of n-substituted aminosulfonic acid pH buffers with a morpholinic ring for cadmium and lead speciation studies by electroanalytical techniques. *Analytica Chimica Acta* 394, 325-335.

Spacie A. et Hamelink J.L.M. **1982**. Alternatives models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1, 309-320.

Stedmon C.A., Markager S. et Bro R. **2003**. Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry* 82, 239-254.

Steinberg C.E.W., Hoss S., Kloas W., Lutz I., Meinelt T., Pflugmacher S. et Wiegand C. **2004**. Hormonellike effects of humic substances on fish, amphibians, and invertebrates. *Environmental Toxicology* 19, 409-411.

Steinberg C.E.W., Kamara S., Prokhotskaya V.Y., Manusadzianas L., Karasyova T.A., Timofeyev M.A., Jie Z., Paul A., Meinelt T., Farjalla V.F., Matsuo A.Y.O., Burnison B.K. et Menzel R. **2006**. Dissolved humic substances - ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? *Freshwater Biology* 51, 1189-1210.

Stevenson F.J. **1994**. Humus chemistry. Genesis, Composition, Reactions. Second edition. *John Wiley & Sons*.

Stumm W. et Morgan J.J. **1996**. Aquatic Chemistry – Chemical equilibria and rates in natural waters. *Third edition. J. Wiley and Sons Ltd., New York, NY, 1022 pages*.

Sunda W.G., Engel D.W. et Thuotte R.M. **1978**. Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp *Palaemonetes pugio*: importance of free cadmium ion. *Environmental Science & Technology* 12, 409-413.

Sunda W.G. et Lewis J.A.M. **1978**. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*. *Limnology and Oceanography* 23, 870-876.

Sutton R. et Sposito G. **2005**. Molecular structure in soil humic substances: The new view. *Environmental Science & Technology* 39, 9009-9015.

Swift R.S. **1999**. Macromolecular properties of soil humic substances: Fact, fiction, and opinion. *Soil Science* 164, 790-802.

Sze P.A. **1986**. Biology of the algae. *Wm. C. Publishers. Dubuque, Iowa* .

Tan K.H. **1998**. Principles of soil chemistry. *Publishers: New York, Marcel Dekker* .

Tatsuzawa H., Takizawa E., Wada M. et Yamamoto Y. **1996**. Fatty acid and lipid composition of the acidophilic green alga *Chlamydomonas sp.* *Journal of Phycology* 32, 598-601.

Templeton D.M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L.-G., Muntau H., Van Leeuwen H.P. et Lobonski R. **2000**. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure and Applied Chemistry* 72, 1453-1470.

Theander K. et Pugh R.J. **2001**. The influence of pH and temperature on the equilibrium and dynamic surface tension of aqueous solutions of sodium oleate. *Journal of Colloidal and Interface Science* 239, 209-216.

Thurman E.M. **1985**. Organic geochemistry of natural waters. *Dordrecht: Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk publishers (Kluwer Academic Publishers Group)* .

Thurman E.M. et Malcolm R.L. **1981**. Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environmental Science & Technology* 15, 463-466.

Thurman E.M. et Malcolm R.L. **1995**. Nitrogen and amino acids in fulvic and humic acids from the Suwannee River. *In: Humic substances in the Suwannee River, Georgia: interactions, properties and proposed structured. Water Supply Paper 2373, Eds. R. C. Averett, J. A. Leenheer, D. M. McKnight et K. A. Thorn. Denver, CO: US Geological Survey* , 55-66.

Tipping E. **1994**. Wham - A chemical-equilibrium model and computer code for waters, sediments, and soils incorporating a discrete site electrostatic model of ion-binding by humic substances. *Computers and Geosciences* 20, 973-1023.

Tucker J.S., Amszi V.L. et Acree W.E.Jr. **1992**. Primary and secondary inner filtering. *Journal of Chemical Education* 69, A8-A12.

Turner A. et Mawji E. **2004**. Hydrophobicity and octanol-water partitioning of trace metals in natural waters. *Environmental Science & Technology* 38, 3081-3091.

Turner A. et Williamson I. **2005**. On the relationship between D_{ow} and K_{ow} in natural waters. *Environmental Science & Technology* 39, 8719-8727.

- Twiss M.R., Fortin C., Campbell P.G.C., Jumarie C., Denizeau F., Berkelaar E., Hale B. et Van Rees K. **2001**. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. *Chemical Speciation and Bioavailability* 13, 9-24.
- Twiss M.R., Granier L., Lafrance P. et Campbell P.G.C. **1999**. Bioaccumulation of 2,2',5,5' - tetrachlorobiphenyl and pyrene by picoplankton (*Synechococcus leopoliensis*, cyanophyceae): influence of variable humic acid concentrations and pH. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2063-2069.
- Vaara M. **1992**. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews* 56, 395-411.
- Vaes W.H.J., Ramos E.U., Verhaar H.J.M., Cramer C.J. et Hermens J.L.M. **1998**. Understanding and estimating membrane/water partition coefficients: Approaches to derive quantitative structure property relationships. *Chemical Research in Toxicology* 11, 847-854.
- Van Ginneken L., Bervoets L. et Blust R. **2001**. Bioavailability of Cd to the common carp, *Cyprinus carpio*, in the presence of humic acid. *Aquatic Toxicology* 52, 13-27.
- Vasconcelos M.T.S.D., Almeida C.M.R., Lage O.M. et Sansonetty F. **2000**. Influence of zwitterionic pH buffers on the bioavailability and toxicity of copper to the alga *Amphidinium carterae*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2542-2550.
- Vasconcelos M.T.S.D., Azenha M.A.G.O. et Lage O.M. **1996**. Electrochemical evidence of surfactant activity of the HEPES pH buffer which may have implications on trace metal availability to cultures *in vitro*. *Analytical Biochemistry* 241, 248-253.
- Vasseur P., Dive D., Sokar Z. et Bonnemain H. **1988**. Interactions between copper and some carbamates used in phytosanitary treatments. *Chemosphere* 17, 767-782.
- Vigneault B. **2000**. Interactions des substances humiques dissoutes avec les algues unicellulaires : mécanismes et implications. *Thèse de Doctorat (Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique)*, 166 pages.
- Vigneault B. et Campbell P.G.C. **2005**. Uptake of cadmium by freshwater green algae: Effects of pH and aquatic humic substances. *Journal of Phycology* 41, 55-61.
- Vigneault B., Percot L., Lafleur M. et Campbell P.G.C. **2000**. Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environmental Science & Technology* 34, 3907-3913.
- Visser S.A. **1985**. Physiological action of humic substances on microbial-cells. *Soil Biology & Biochemistry* 17, 457-462.
- Wehr J.D., Brown L.M. et Vanderelst I.E. **1986**. Hydrogen ion buffering of culture media for algae from moderately acidic, oligotrophic waters. *Journal of Phycology* 22, 88-94.

- Wershaw R.L. **1999**. Molecular aggregation of humic substances. *Soil Science* 164, 803-813.
- Westerhoff P., Chen W. et Esparza M. **2001**. Fluorescence analysis of a standard fulvic acid and tertiary treated wastewater. *Journal of Environmental Quality* 30, 2037-2046.
- Wetzel R.G. **2001**. Protists: key ecosystem regulators. *Bioscience* 51, 997.
- Whealy R.D. et Bland B.J. **1962**. Reaction of cadmium with oxine. *Talanta* 9, 823-826.
- Williams C.F., Farmer W.J., Letey J. et Nelson S.D. **1999**. Design and characterization of a new dialysis chamber for investigating dissolved organic matter-organic complexes. *Journal of Environmental Quality* 28, 1757-1760.
- Wilson D.N. **1988**. Cadmium - market trends and influences. *Proceedings of the 6th International Cadmium Conference, London, Cadmium Association* , 9-16.
- Winch S., Ridal J. et Lean D. **2002**. Increased metal bioavailability following alteration of freshwater dissolved organic carbon by ultraviolet B radiation exposure. *Environmental Toxicology* 17, 267-274.
- Winner R.W. **1984**. The toxicity and bioaccumulation of cadmium and copper as affected by humic acid. *Aquatic Toxicology* 5, 267-274.
- Wu F., Cai Y., Evans D. et Dillon P. **2004**. Complexation between Hg(II) and dissolved organic matter in stream waters: an application of fluorescence spectroscopy. *Biogeochemistry* 71, 339-351.
- Xia W.J. et Onyuksel H. **2000**. Mechanistic studies on surfactant-induced membrane permeability enhancement. *Pharmaceutical Research* 17, 612-618.
- Xue H. et Sigg L. **1999**. Comparison of the complexation of Cu and Cd by humic or fulvic acids and by ligands observed in lake waters. *Aquatic Geochemistry* 5, 313-335.
- Xue H., Stumm W. et Sigg L. **1988**. The binding of heavy metals to algal surfaces. *Water Research* 22, 917-926.
- Zepp R.G., Sheldon W.M. et Moran M.A. **2004**. Dissolved organic fluorophores in southeastern US coastal waters: correction method for eliminating Rayleigh and Raman scattering peaks in excitation-emission matrices. *Marine Chemistry* 89, 15-36.
- Zhou J.L. et Banks C.J. **1992**. Humic-acid removal from water by biosorption. *Environmental Technology* 13, 727-737.
- Zimmermann S., Baumann U., Taraschewski H. et Sures B. **2004**. Accumulation and distribution of platinum and rhodium in the European eel *Anguilla anguilla* following aqueous exposure to metal salts. *Environmental Pollution* 127, 195-202.

Zimmermann S., Messerschmidt J., von Bohlen A. et Sures B. **2005**. Uptake and bioaccumulation of platinum group metals (Pd, Pt, Rh) from automobile catalytic converter materials by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Research* 98, 203-209.

Zimmermann U., Skrivanek T. et Löhmannsröben H.-G. **1999**. Fluorescence quenching of polycyclic aromatic compounds by humic substances. Part 1. Methodology for the determination of sorption coefficients. *Journal of Environmental Monitoring* 1, 525-532.

Zsolnay A. **2003**. Dissolved organic matter: artefacts, definitions, and functions. *Geoderma* 113, 187-209.

**REPROGRAPHIE DE LA REMISE FINALE
DU MÉMOIRE OU DE LA THÈSE**

Lors de la remise finale de mon mémoire ou de ma thèse, les photocopies ont été effectuées par :

l'étudiant(e) :



*Les photocopies effectuées par l'étudiant(e)
seront sous sa responsabilité.*

Amiel Boulléant
Nom

[Signature]
Signature

Nom du directeur de recherche: *Peter Campbell*

Nom du co-directeur de recherche: *Claude Bortin*

Boursier ou non-boursier: *oui*.