

Université du Québec  
INRS – Eau

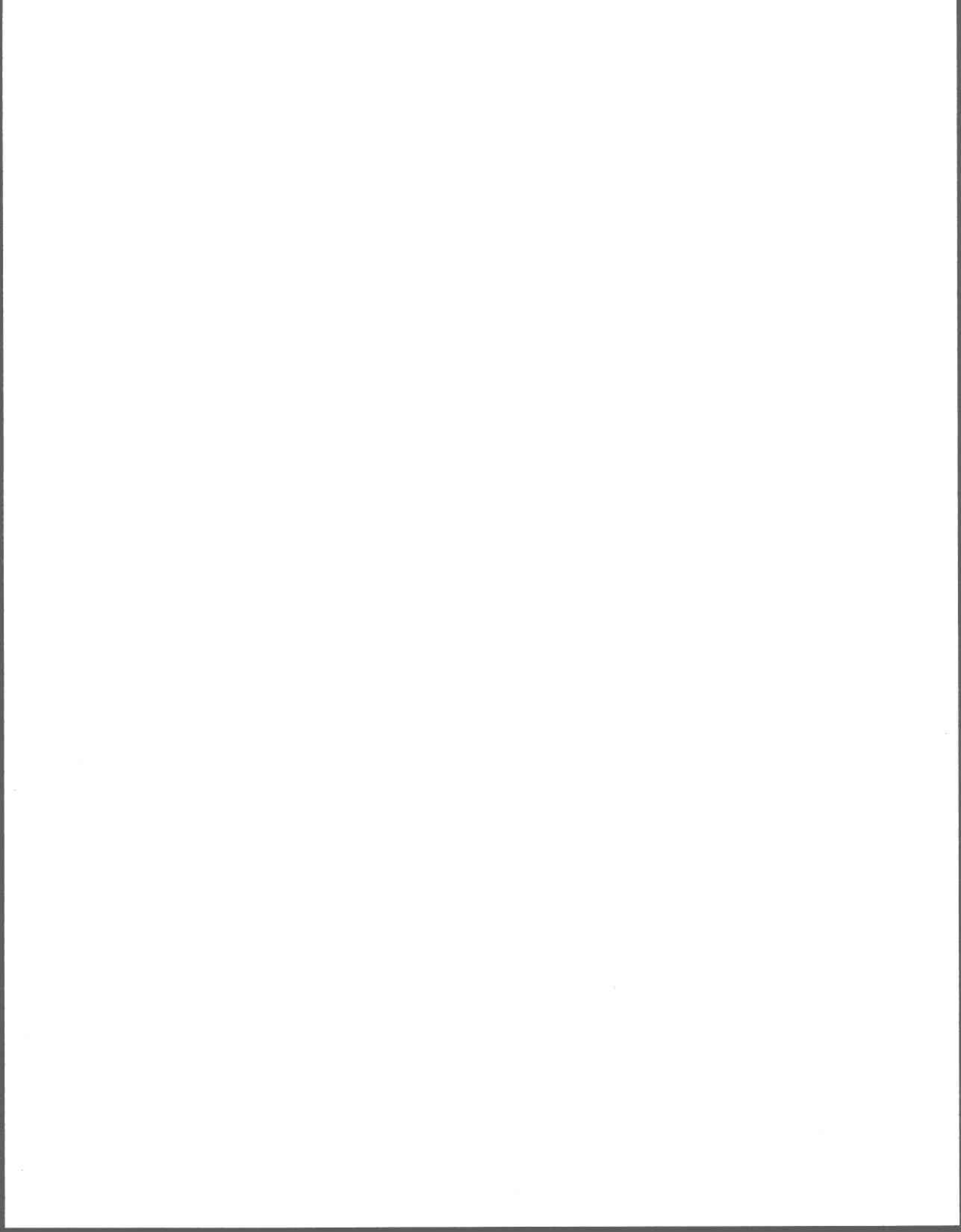
Interactions des substances humiques dissoutes avec les algues unicellulaires –  
Mécanismes et implications

Par  
Bernard Vigneault

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

15 septembre 2000

© droits réservés de Bernard Vigneault 2000



## Résumé

Cette recherche visait à explorer l'hypothèse que les substances humiques aquatiques puissent influencer la biodisponibilité des métaux dans les eaux naturelles de deux manières, en raison de leur pouvoir de complexation des métaux dans la solution ambiante, et également grâce à leurs interactions avec la membrane cellulaire des organismes aquatiques cibles (ex. : des algues unicellulaires). Dans ce cadre général, nos travaux avaient pour objectifs d'étudier les facteurs influençant l'adsorption des substances humiques à la surface des algues unicellulaires et de mettre en évidence des effets physiologiques directs de cette adsorption sur la perméabilité membranaire et sur la prise en charge des métaux cationiques.

Nous avons d'abord étudié l'adsorption des substances humiques à la surface d'algues vertes unicellulaires et à la surface de sphères de latex, utilisées comme surface analogue aux surfaces biologiques. L'adsorption des substances humiques à la surface des cellules de phytoplancton augmente avec une diminution de pH. Bien que les mesures de mobilité électrophorétique n'aient pas permis de mettre en évidence la présence des substances humiques à la surface des algues, ces mesures ont montré l'importance de la charge nette négative à la surface de l'algue, qui module l'intensité de l'adsorption des substances humiques (rôle de la répulsion électrostatique).

Nous avons également étudié les effets des substances humiques sur la perméabilité de membranes biologiques artificielles (vésicules de phospholipides), en mesurant les pertes d'une sonde fluorescente encapsulée dans les vésicules, et sur la perméabilité des membranes d'une algue verte, en mesurant la prise en charge d'une sonde hydrophobe. Il y a une forte augmentation de la perméabilité des vésicules composées de phospholipides neutres en présence de substances humiques. Les effets de l'acide humique sont plus importants que ceux de l'acide fulvique correspondant. Pour l'acide humique, l'interaction avec les vésicules s'accroît à mesure que le pH diminue, tel qu'observé avec les algues, mais pour l'acide fulvique l'intensité de l'interaction avec les vésicules ne varie pas dans la gamme de pH 5,8 – 7,6. L'incorporation dans les vésicules d'un

phospholipide portant une charge nette négative réduit de beaucoup l'intensité de l'interaction avec l'acide humique et l'acide fulvique. Lorsqu'adsorbés à la surface de *Selenastrum capricornutum* (pH 5), ces substances humiques augmentent également la perméabilité membranaire de cette algue vis-à-vis d'une sonde hydrophobe (fluorescéine diactétate); par ailleurs, il n'y a pas d'effets en absence d'adsorption (pH 7).

Nous avons finalement étudié la prise en charge du Cd en présence de substances humiques. Deux modes de prise en charge ont été étudiés : le transport passif à travers la membrane cellulaire (en présence d'un complexe hydrophobe), et le transport facilité (en présence de complexes hydrophiles). Chez *S. capricornutum*, la prise en charge du Cd sous forme d'un complexe hydrophobe, Cd(diethyldithiocarbamate)<sub>2</sub><sup>0</sup>, est augmentée en présence de substances humiques adsorbées. Nous avons également comparé la prise en charge du Cd, présent sous formes de complexes hydrophiles, pour deux milieux à une même concentration de Cd libre, mesurée par une technique d'échange ionique. Dans l'un des milieux, le Cd était complexé par l'acide fulvique ou l'acide humique, alors que dans l'autre, le Cd était complexé par un ligand synthétique, l'acide nitrilotriacétique (NTA). En accord avec le modèle de l'ion libre, MIL, la prise en charge de Cd par les algues vertes *S. capricornutum* et *Chlamydomonas reinhardtii* peut être prédite à partir de la complexation en solution du Cd par les substances humiques, et ce, même en présence d'acide fulvique ou humique adsorbé à la surface de l'algue.

Ces résultats nous amènent à conclure que l'adsorption des substances humiques à la surface des algues unicellulaires résulte en partie d'interactions hydrophobes et qu'elle est modulée par le pH, par la charge nette négative à la surface de l'algue, et par la composition des substances humiques (acide fulvique *versus* acide humique). Nous avons également montré que les substances humiques peuvent agir directement sur la biodisponibilité du Cd par une augmentation du transport passif du Cd sous forme d'un complexe lipophile, et indirectement, en réduisant la biodisponibilité du Cd par la complexation du métal en solution.

  
Bernard Vigneault


  
Peter G.C. Campbell

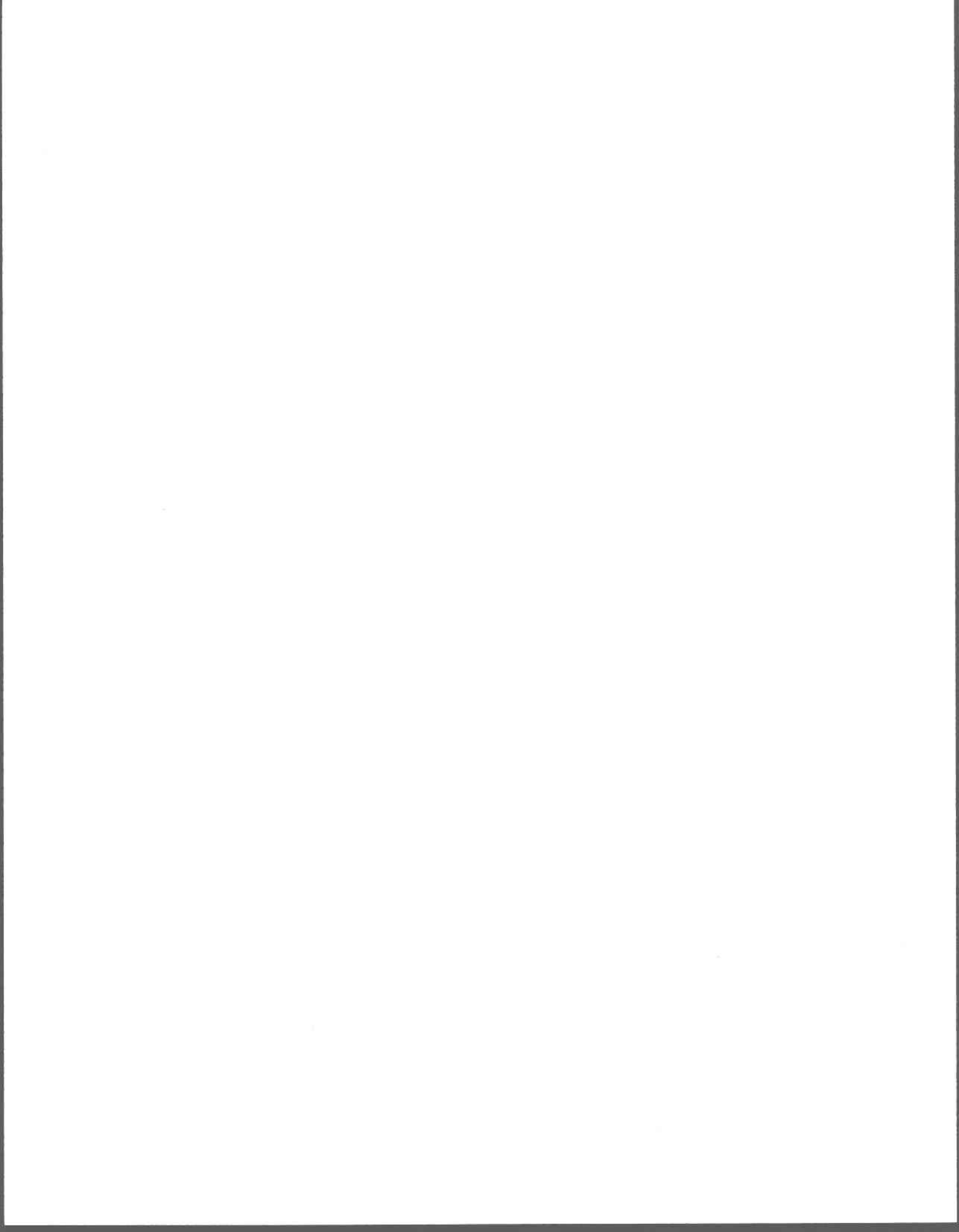
Table des matières

1	Introduction.....	1
1.1	Problématique.....	1
1.1.1	Les substances humiques aquatiques .....	1
1.1.2	Adsorption des substances aquatiques aux surfaces naturelles.....	10
1.1.3	Conséquences physiologiques possibles de l'adsorption de substances humiques sur les membranes biologiques.....	15
1.2	Objectifs	
1.2.1	Objectif général .....	19
1.2.2	Objectifs spécifiques .....	19
2	Adsorption des substances humiques aux surfaces biologiques.....	22
2.1	Introduction .....	22
2.2	Matériel et méthodes .....	25
2.2.1	Choix des organismes et d'une surface modèle, des substances humiques et des milieux de culture et d'exposition.....	25
2.2.2	Mesures directes.....	28
2.2.3	Mobilité électrophorétique .....	30
2.2.4	Types d'interactions .....	31
2.3	Résultats et discussion.....	33
2.3.1	Effets du pH, de l'espèce algale et de la substance humique sur l'adsorption.....	33
2.3.2	Temps requis pour l'adsorption et la désorption.....	44
2.3.3	Types d'interactions .....	50
3	Influence des substances humiques adsorbées sur la perméabilité membranaire .....	61
3.1	Introduction .....	61
3.2	Matériel et méthodes .....	62
3.2.1	Perméabilité de la membrane d'une algue verte en présence de substances humiques .....	63

3.2.2	Comparaison de l'activité de surface de substances humiques par polarographie.....	64
3.2.3	Mesure de la perméabilité de vésicules de phospholipides.....	65
3.2.4	Prise en charge par diffusion passive de $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ .....	67
3.3	Résultats et Discussion.....	68
3.3.1	Perméabilité de la membrane d'une algue verte en présence de substances humiques.....	68
3.3.2	Perméabilité de vésicules de phospholipides.....	74
3.3.3	Prise en charge par diffusion passive de $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ .....	79
3.3.4	Conséquences en écotoxicologie et pour les tests de toxicité.....	83
4	Influence des substances humiques adsorbées sur les échanges membranaires de métaux cationiques.....	85
4.1	Introduction.....	85
4.2	Matériel et méthodes.....	88
4.2.1	Choix des métaux et des organismes cibles.....	88
4.2.2	Mesure des pertes de Cs en présence d'acide humique.....	89
4.2.3	Prise en charge du Cd en présence de substances humiques.....	90
4.3	Résultats et Discussion.....	95
4.3.1	Perte de Cs en présence d'acide humique.....	95
4.3.2	Prise en charge de Cd en présence de substances humiques.....	99
5	Conclusions.....	109
5.1	Interactions des substances humiques les membranes biologiques.....	109
5.2	Biodisponibilité des métaux dans les eaux naturelles.....	111
6	Bibliographie.....	115
7	Annexes.....	132
Annexe A :	A test of environmentally relevant properties of radiolabelled aquatic humic substances.....	133
Annexe B :	Cinétique de la prise en charge du Cs, du Cd et du Cu par des algues vertes unicellulaires.....	146

Abréviations

DDC	diéthylthiocarbamate
D <sub>2</sub> O	eau lourde
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
FDA	diacétate de fluoresceine
MIL	modèle de l'ion libre (Morel, 1983)
Fraquil	milieu de culture standard (Morel et al., 1975)
Fra <sub>NaNO<sub>3</sub></sub>	milieu de culture pour <i>Selenastrum capricornutum</i> , I = 0,01 M ajusté avec NaNO <sub>3</sub>
Fra <sub>NaNO<sub>3</sub>-Cu</sub>	milieu de culture Fra <sub>NaNO<sub>3</sub></sub> sans Cu ajouté
Fra <sub>t</sub>	milieu d'exposition simplifié (sans EDTA, sans métaux et sans vitamines ajoutés)
Fra <sub>t - NaNO<sub>3</sub></sub>	milieu d'exposition simplifié (sans EDTA, sans métaux et sans vitamines ajoutés), I = 0,01 M ajusté avec NaNO <sub>3</sub>
HEPES	acide N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulphonique]
IHSS	« International Humic Substances Society »
LUV	vésicules unilamellaires de grandes tailles
MES	acide 2-[N-morpholino]ethanesulphonique
NTA	acide nitrilotriacétique
pD	- log {D <sup>+</sup> }
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycérol
SRB	sulphorhodamine B
Triton X-100	surfactant non-ionique (octylphenoxyethoxyethanol)
WHAM	« Windermere Humic Aqueous Model » (Tipping, 1994)
XAD	résine de copolymères styrène - divinylbenzène





## 1 Introduction

### 1.1 Problématique

#### 1.1.1 Les substances humiques aquatiques

La matière organique dans les eaux naturelles est constituée principalement (50% - 80%) de substances humiques, les acides fulviques et humiques, ex. (Beckett, 1990, Buffle, 1988). Omniprésents dans les eaux naturelles, ces acides sont polyfonctionnels, sont impliqués dans plusieurs processus biogéochimiques et constituent des surfactants naturels.

Les acides humiques et fulviques sont majoritairement responsables de la coloration brune des eaux naturelles; ils y sont présents à des teneurs variables, normalement de 1 à 15 mg C · L<sup>-1</sup> dans les eaux douces (Thurman, 1985). À titre d'exemple, Wilkinson et al. (1997) ont établi pour un petit lac Suisse eutrophe que le carbone organique était composé principalement d'acides fulviques pédogéniques et de polysaccharides, ces derniers constituant de 10 à 23 % du carbone organique dissous. Les proportions généralement établies entre les acides fulviques et humiques sont de 9:1 respectivement, et ces proportions semblent peu variables (Thurman, 1985). Par exemple, dans deux lacs affectés par le drainage minier acide de la région de Sudbury (Ontario), Boerschke et al. (1996) ont fractionné le carbone organique dissous à l'aide de résines XAD : la fraction "acide fulvique" comptait pour environ 48 % du carbone organique dissous, la fraction "acide humique" pour 8 %.

Les mécanismes exacts impliqués dans la formation des substances humiques sont encore peu connus, mais les théories formulées pour expliquer leur formation impliquent la biodégradation de biopolymères ou la condensation abiotique de molécules organiques de poids moléculaires faibles (McKnight et Aiken, 1998). Ces deux groupes de théories ne sont pas totalement contradictoires, puisque les composés de poids moléculaires faibles produits par la dégradation microbienne de la matière organique des plantes peuvent être polymérisés, condensés et oxydés pour également former les substances humiques. La lignine et les polyphénols sont les précurseurs les plus probables des substances

humiques. En milieu aquatique, il semble que les substances humiques soient principalement d'origine exogène, formées à partir de l'un ou l'autre des deux processus suivants (ou de leur combinaison) : la ramification photochimique et auto-oxydante de biopolymères, catalysée par des enzymes microbiens et par les métaux de transition (Aiken, 1985), et la polycondensation de molécules organiques simples résultant de la dégradation microbienne de la matière végétale (De Haan, 1992). Dans certains environnements aquatiques (ex. zone pélagique océanique, lacs en Antarctique avec un couvert de glace permanent), où les apports de matière organique terrestre sont faibles, les substances humiques peuvent également être produites à partir de la matière organique autochtone. Dans ces cas particuliers, les substances humiques sont donc dérivées de la biomasse planctonique et ont des structures distinctes (McKnight et Aiken, 1998).

De façon générale cependant, les acides humiques et fulviques sont des hétéropolymères « polydisperses », dont le poids moléculaire peut varier de  $<10^3$  à  $>10^5$  (Schnitzer, 1976). Reddy et al. (1995) ont estimé, à partir d'analyses élémentaires et en supposant un poids moléculaire nominal de  $750 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , la formule moléculaire empirique suivante pour l'acide fulvique isolé de la rivière Suwannee,  $\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{O}_{19}$ . Les substances humiques ont une structure complexe formée à partir de cycles aromatiques et de chaînes aliphatiques (Fig. 1.1). Plusieurs types de groupements fonctionnels sont présents au sein de ces macromolécules dont principalement des groupements carboxyliques, phénoliques et également des cétones, ex. (Leenheer et al., 1995). Les analyses élémentaires des substances humiques révèlent également la présence de soufre comme constituant mineur ( $< 1 \%$ ), qui pourrait être en partie présent sous la forme d'acides aminés, comme la cystéine et la méthionine, comme c'est le cas de l'acide humique Suwannee River (Thurman et Malcolm, 1995). La présence de groupements protonnés ionisables, principalement des groupements carboxyliques, confère aux acides humiques et fulviques leur propriété d'acides organiques faibles. Ces composés organiques insaturés contiennent également des groupements chromophores conjugués.

*Les substances humiques aquatiques comme source de C.* Compte tenu de leurs propriétés diverses et de leur omniprésence, les acides humiques et fulviques sont

impliqués dans plusieurs processus biogéochimiques (tableau 1). Bien que généralement considérées comme réfractaires, les substances humiques peuvent néanmoins constituer une source de C pour les micro-organismes. Plusieurs processus abiotiques et biotiques ont été proposés pour expliquer que les substances humiques puissent être dégradées. Lindell et al. (1995) et Tulonen (1992) ont montré que la photolyse était impliquée dans le processus de dégradation des substances humiques. De plus, Sunda et Kieber (1994) ont montré que les substances humiques pouvaient être oxydées à la surface d'oxydes de Mn. Les enzymes extracellulaires peuvent être également en partie responsables de la dégradation des substances humiques (Münster, 1991). Finalement, De Haan (1974 et 1977) a suggéré la possibilité de co-métabolisme pour expliquer la biodégradation accrue d'un acide fulvique en présence d'acide benzoïque. Ainsi Volk et al. (1997) considèrent que les substances humiques, bien que réfractaires, constituent une fraction importante du carbone organique dissous biodégradable en milieu lotique. Alors que le bactérioplancton est généralement limité par les apports en C-organique de la production primaire, l'utilisation des substances humiques aquatiques comme substrat va permettre une augmentation de la biomasse bactérienne, ce qui augmentera les processus de respiration et d'hétérotrophie.

*Les substances humiques aquatiques comme source de N et de P.* Les substances humiques peuvent également constituer une source de N et de P pour les micro-organismes aquatiques. Bushaw et al. (1996) ont démontré qu'un acide fulvique isolé d'un étang d'une forêt boréale, lorsque irradié, pouvait servir de source d'azote ammoniacal pour le bactérioplancton. La production de nitrite lors de la photodégradation de substances humiques aquatiques a également été démontrée (Kieber et al., 1999). Ces processus photochimiques de conversion de N-organique en N assimilable n'avaient pas été démontrés précédemment et pourraient être quantitativement importants dans les eaux naturelles. Panosso et Ganéli (2000) ont montré que la cyanobactérie *Nodularia spumigena* déficiente en N et P pouvait utiliser la matière organique dissoute comme source de N mais non de P. Cependant, les substances humiques sont également impliquées à plusieurs niveaux dans le cycle du P. La photoréduction du Fe et l'action

hydrolytique des phosphatases sont deux processus de régénération du P inorganique dans les eaux naturelles. La formation de complexes ternaires, impliquant les substances humiques, le Fe et le phosphate, permet de maintenir le Fe et le P en solution et de tamponner la concentration de ces deux éléments (Jones, 1992). Ces complexes sont photosensibles, et le P inorganique pourra être libéré par des réactions photochimiques (Francko et Heath, 1982, Francko, 1986, Jones et al., 1988). Par exemple, lors de l'exposition d'une eau de lac à de la radiation UV, il y avait libération simultanée de P inorganique et de  $\text{Fe}^{2+}$  (Francko et Heath, 1982, Francko, 1986), ce qui suggère la photoréduction du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  comme mécanisme de la libération du P des complexes ternaires <substances humiques-Fe-P>. Les phosphatases sont des enzymes extracellulaires dont l'activité est couramment mesurée dans les eaux naturelles et est reliée aux populations de bactério- et de phytoplancton. L'activité des phosphatases est fortement influencée par les substances humiques (Francko, 1986). Parent et al. (1996) ont quant à eux montré que pour une culture de *Chlorella pyrenoidosa*, un acide fulvique d'origine terrestre (Armadale) pouvait constituer une source de P.

L'utilisation des substances humiques aquatiques comme source de C, de N et de P va entraîner l'établissement d'assemblages planctoniques et de boucles microbiennes particuliers aux lacs humiques. En utilisant la matière organique allochtone comme source énergétique, le bactérioplancton pourra être limité en N et en P en raison des rapports C/P et C/N élevés de cette matière organique. Les proportions de bactéries et de flagellés hétérotrophes par rapport au phytoplancton seront plus importantes dans les lacs humiques. De même, les espèces de phytoplancton potentiellement mixotrophes seront plus importantes dans les lacs humiques. Dans les lacs humiques, le broutage du bactérioplancton riche en P, par le phytoplancton mixotrophe, a été proposé comme un processus d'assimilation des nutriments inorganiques (Jansson, 1998).

Les substances humiques influencent également les écosystèmes aquatiques en complexant les exoenzymes et les métaux traces. Des exoenzymes sont sécrétés par certains micro-organismes pour faciliter l'apport intracellulaire de nutriments. Duddley et Churchill (1995) ont mis en évidence la complexation et la stabilisation d'une protéase

extracellulaire par l'acide humique en milieu aquatique. De plus, les substances humiques aquatiques sont reconnues depuis longtemps comme des ligands potentiels pour les métaux traces. Xue et Sigg (1999) ont cependant montré que des ligands de plus hautes affinités que les acides humique et fulvique étaient susceptibles d'être les principaux ligands pour le Cu et Cd aux concentrations ambiantes dans des eaux de lacs peu contaminés. À des concentrations de Cu et de Cd plus importantes que celles retrouvées dans les eaux non-contaminées, et pour des lacs ayant des concentrations de substances humiques dissoutes plus élevées, les acides humique et fulvique pourraient cependant contribuer significativement à la complexation de ces deux métaux. Plusieurs expériences qualitatives ont montré, dans la majorité des cas, des diminutions de la toxicité de métaux en présence de substances humiques; ces diminutions étant attribuées au pouvoir de complexation des substances humiques.

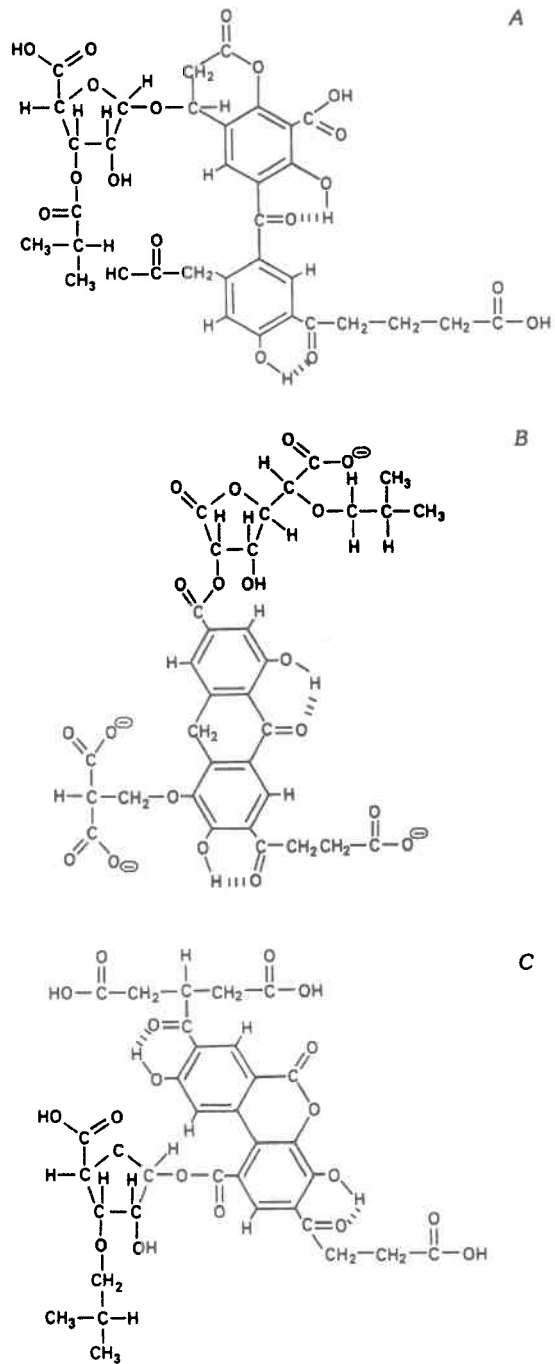
En effet, plusieurs expériences avec des ligands synthétiques ont démontré l'importance de la concentration de métal libre pour déterminer la prise en charge et la toxicité des métaux, ce qui a mené à la formulation du modèle de l'ion libre, MIL, par Morel (1983). Ce modèle stipule que la réponse biologique à un métal cationique est proportionnelle à l'activité de ce métal libre en solution. Jusqu'à présent, peu d'expériences quantitatives ont permis de démontrer la validité de ce modèle pour les eaux naturelles, en présence de matière organique dissoute (Campbell, 1995). Les quelques expériences appuyant le MIL en présence de matière organique naturelle ont été effectuées avec le Cu (Meador, 1991, Sunda et Gillespie, 1979, Sunda et Lewis, 1978). De plus, Hare et Tessier (1996) ont montré dans une série de lacs du Québec et de l'Ontario que le MIL pouvait permettre de prédire le contenu en Cd de la larve d'insecte *Chaoborus punctipennis*, si l'on tient compte de la compétition entre  $H^+$  et le Cd libre pour les sites de prise en charge du métal.

Outre ces quelques exemples à l'appui du MIL, il existe également des études dont les résultats sont en contradiction avec ce modèle. Dans certains cas, la biodisponibilité des métaux est augmentée en présence de substances humiques. Dans d'autres études la présence de substances humiques a provoqué une diminution de la biodisponibilité des

métaux, mais insuffisamment par rapport à ce qui aurait été prédit à partir de la concentration de l'ion métallique libre. Giesy et al. (1983) et Laegreid et al. (1983) ont observé des diminutions de la toxicité du Cu vis-à-vis des cladocères d'eau douce en présence de substances humiques, mais ces diminutions étaient moindres que celles anticipées en tenant compte de la concentration de Cu libre mesurée. Daly et al. (1990b) ont également observé un effet protecteur de la matière organique dissoute chez une crevette d'eau douce vis-à-vis du Cu, mais plus important que celui anticipé en tenant compte de la concentration de Cu libre mesurée. Bien qu'il faille demeurer prudent dans l'interprétation de ces résultats, ceux-ci suggèrent que la prédiction de la toxicité des métaux en présence de substances humiques n'est peut-être pas aussi simple que le suggère le MIL tel que formulé.

*La tensio-activité des substances humiques aquatiques.* De toute évidence, les substances humiques constituent d'importants régulateurs des écosystèmes aquatiques. En plus de présenter un pouvoir de complexation des métaux traces, les substances humiques sont également tensioactives, une propriété très importante quant à leur réactivité dans les eaux naturelles. En effet, ces macromolécules constituent des surfactants, puisque des domaines hydrophiles (groupements polaires et ionisables) et des domaines hydrophobes (chaînes aliphatiques et noyaux aromatiques) se côtoient au sein de leurs structures complexes. La tension superficielle de solutions de substances humiques a cependant fait l'objet de relativement peu d'études ex. : (Kawahigashi et Fujitake, 1998, Anderson et al., 1995, Chen et Schnitzer, 1978, Tschapek et Wasowski, 1976, Visser, 1982), bien que les implications de ces études sur les modèles décrivant la structure secondaire de ces composés macromoléculaires soient importantes. Ainsi, Ghosh et Schnitzer (1980) ont élaboré un modèle conceptuel de la structure macromoléculaire des acides fulvique et humique à partir de mesures de tension de surface et de viscosité à différents pH et forces ioniques. À bas pH et à hautes forces ioniques, le comportement des substances humiques est similaire à celui de sphérocolloïdes, alors qu'à pH élevé et à faibles forces ioniques, elles agissent plus comme des chaînes polymères linéaires et flexibles. Visser (1982) indique qu'à faibles concentrations,  $< 5 \text{ mg L}^{-1}$ , les acides humiques aquatiques seraient de meilleurs surfactants que les acides fulviques aquatiques, alors qu'à plus fortes

concentrations,  $> 25 \text{ mg L}^{-1}$ , ces derniers constitueraient de meilleurs surfactants. Étant tensioactives, les substances humiques sont donc susceptibles de s'adsorber aux surfaces inorganiques et organiques dans les eaux naturelles.



**Figure 1.1:** Trois structures moyennes proposées pour l'acide fulvique Suwannee River (figure tirée de Leenheer et al. (1995)).



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"> <li>• acides faibles (groupements carboxyliques et phénoliques)</li> <li>• polyfonctionnels</li> <li>• polyelectrolytes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• contrôle du pH de certaines eaux de surface</li> <li>• complexation des métaux</li> <li>• complexation du P, complexes ternaires avec le Fe</li> <li>• complexation et stabilisation d'exoenzymes</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• surfactants</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• contrôle des charges superficielles de particules inorganiques</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• domaines hydrophobes (chaînes aliphatiques et noyaux aromatiques)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• association avec des composés organiques hydrophobes</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• accepteurs d'électrons (groupements quinones)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (photo)réduction de métaux, Fe et Mn</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• chromophores (électrons <math>\pi</math> excitables)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (photo)oxydation d'autres molécules organiques (photosensibilisation)</li> <li>• atténuation de la lumière dans les eaux de surfaces</li> </ul>

### 1.1.2 Adsorption des substances aquatiques aux surfaces naturelles

En raison de leur caractère amphiphile, les acides humiques et fulviques sont des surfactants de masses moléculaires élevées, capables de s'adsorber à la fois aux surfaces hydrophiles et hydrophobes (Ochs et al., 1994). Les substances humiques sont donc susceptibles de s'adsorber à plusieurs surfaces immergées, notamment les particules inorganiques et les micro-organismes en suspension.

L'adsorption de la matière organique dissoute, principalement constituée de substances humiques, joue un rôle important en ce qui concerne la chimie des surfaces minérales dans les eaux naturelles. Ce processus influence la stabilité des colloïdes, ex. : (Buffle et al., 1998, Kretzschmar et al., 1997), la croissance des particules, la cristallisation, la dissolution et les interactions de ces particules avec d'autres espèces chimiques dissoutes (Tipping, 1990, Tipping et Heaton, 1983). L'adsorption de substances humiques sur une vaste gamme de surfaces minérales a été mise en évidence et fait encore aujourd'hui l'objet de plusieurs études : oxydes de fer (Edwards et al., 1996, Frimmel et Huber, 1996) ; oxydes d'aluminium (Davis, 1980, Ochs et al., 1994, Schlautman, 1994, Zhou et al., 1994) ; oxydes de manganèse, calcite et silice (Frimmel et Huber, 1996) ; argiles (Jayasundera et Torrents, 1997, Kretzschmar et al., 1997).

Les principaux processus impliqués dans l'adsorption des substances humiques aux surfaces minérales sont l'échange de ligands, les interactions hydrophobes, les interactions électrostatiques, la formation de liens hydrogène, la co-adsorption avec d'autres solutés et les changements de conformation chez les substances humiques adsorbées. Les groupements hydroxyl à la surface des oxydes peuvent être échangés pour des groupements fonctionnels acides, tels les groupements carboxyliques des substances humiques (Stumm, 1992). Dans le cas de surfaces contenant des domaines hydrophobes, ceux-ci peuvent s'associer avec les domaines hydrophobes des substances humiques, et ainsi, minimiser leur contact avec l'eau. Cette relaxation dans la structure imposée à l'eau au voisinage de ces domaines hydrophobes entraîne une augmentation de l'entropie du système (Tipping, 1990). De plus, les interactions électrostatiques pourront également

jouer un rôle important dans le processus d'adsorption, soit d'attraction pour des surfaces minérales chargées positivement ou encore de répulsion, pour des surfaces chargées négativement ex. : (Gu et al., 1994). À plus courte distance, il pourra y avoir la formation de liens hydrogène, plus faibles que les interactions hydrophobes et électrostatiques, entre la surface minérale et les substances humiques ex. : (Gu et al., 1994). Dans le cas de surfaces négatives, les cations divalents et trivalents peuvent également former des ponts entre la surface et les substances humiques, par la formation de complexes ternaires ex. : (Tipping et Heaton, 1983). Finalement, des changements de conformation chez la substance humique adsorbée peuvent également contribuer au processus d'adsorption (Tipping, 1990).

Les processus d'adsorption prédominants varient selon la nature de la phase solide, selon les conditions de pH et selon les concentrations de cations bivalents et trivalents dissous. L'adsorption des substances humiques sur les oxydes de Fe et de Mn est généralement attribuable à la formation de complexes de surfaces, ex. : (Edwards et al., 1996), et aux réactions d'échange de ligands entre les groupements hydroxyl à la surface des oxydes de Fe et de Mn et les groupements anioniques des substances humiques, principalement les groupements carboxyliques, ex. : (Ochs et al., 1994, Schlautman, 1994). Cependant, l'adsorption sur les aluminosilicates est principalement due à la formation de ponts cationiques (Theng, 1976). Les réactions d'échange de ligands dépendent fortement du pH. Le pH va également influencer le processus d'adsorption en contrôlant largement le signe de la charge nette de la surface des oxydes et des molécules de substances humiques, affectant ainsi les interactions électrostatiques entre ceux-ci. Les oxydes d'Al, de Fe et quelques oxydes de Mn ont des points de charge nulle autour de pH 7, alors qu'il est de  $\sim 1$  pour la silice ( $\text{SiO}_2$ ). Dans la gamme de pH des eaux naturelles ( $\sim$  pH 4 à pH 9), la silice sera donc toujours chargée négativement, alors que les oxydes de Fe et d'Al pourront être chargés positivement. Puisque la charge des substances humiques diminue avec une diminution de pH, mais demeure négative à pH  $> 4$ , l'adsorption sur les oxydes de Fe et Al sera favorisée par des attractions électrostatiques aux pH inférieurs au point de charge nulle des oxydes, où ils auront une charge nette positive. Dans plusieurs cas, l'adsorption des substances humiques aux surfaces minérales augmente avec une

diminution de pH, en partie en raison de la protonation des substances humiques qui diminue la répulsion électrostatique entre les molécules d'acides humiques adsorbées et entre les acides humiques et la surface, dans le cas de surfaces chargées négativement. Finalement, la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  peut également augmenter l'adsorption des substances humiques sur les oxydes de Fe et d'Al, en favorisant la formation de complexes de surfaces ternaires, ex. : (Schlautman, 1994, Tipping, 1981).

L'importance de l'adsorption des substances humiques aquatiques aux surfaces minérales en milieux lacustre et marin a été mise en évidence par le suivi de la charge superficielle des particules en suspension en présence ou en absence de matière organique dissoute. En effet, il a été démontré par des mesures de mobilité électrophorétique que la charge nette des particules dans les eaux naturelles était toujours négative (Hunter, 1980, Hunter, 1983, Hunter et Liss, 1982, Loder et Liss, 1985, Neihof et Loeb, 1974, Newton et Liss, 1987). Cette charge négative, même pour les oxydes chargés positivement en absence de matière organique naturelle, est attribuable à la formation d'une couche de matière organique à la surface des particules en suspension. Ceci a été démontré expérimentalement par Tipping (1981), qui a ajouté des oxydes de Fe synthétiques à une eau de lac; les oxydes ont acquis une charge négative à tous les pH testés, de pH 5 à pH 8,5. Avena et Koopal (1999) ont récemment montré que l'adsorption d'un acide humique à la surface d'un oxyde de Fe était complétée en moins d'environ 1 min, selon la concentration d'acide humique testée.

La phase particulaire dans les eaux naturelles contient également des micro-organismes, à la surface desquels les substances humiques sont également susceptibles de s'adsorber. Il faut cependant noter que la surface biologique est encore plus complexe que les surfaces minérales en raison de la variabilité de sa composition et de la "présence" de processus physiologiques membranaires. Des chercheurs ont invoqué l'adsorption de substances humiques à la surface de bactéries (Johnson et Logan, 1996, Visser, 1985), de cellules végétales (Samson et Visser, 1989), d'une larve d'insecte (Rouleau et al., 1998) et d'une algue (Pempkowiak et Kosakowska, 1998) pour expliquer leurs différents résultats expérimentaux. Cependant, peu de résultats expérimentaux jusqu'à présent ont mis en

évidence l'adsorption des acides fulviques et humiques aux surfaces biologiques (tableau 1.2).

Tableau 1.2: Revue de la littérature : adsorption de substances humiques à la surface de différents organismes biologiques

<u>Type d'organismes</u>	<u>Méthodologie</u>	<u>Références</u>
• spores de parasites	Mobilité électrophorétique	(Ongerth et Pecoraro, 1996)
• bactéries	Mesure directe	(Carlson et Silverstein, 1997) (Zhou, 1992b)
	Mobilité électrophorétique	(Gerritsen et Bradley, 1987)
• champignons	Mesure directe	(Banks et Parkinson, 1992, Zhou et Banks, 1991, Zhou et Banks, 1992, Zhou et Banks, 1993)
	Mesures directes	(Claus et Filip, 1998)
• phytoplancton	Mesures directes et mobilité électrophorétique: <i>Chlorella</i> <i>pyrenoidosa</i> et <i>Synechococcus leopoliensis</i>	(Campbell et al., 1997)
	Mobilité électrophorétique: <i>Microcystis aeruginosa</i> et <i>Chlorella vulgaris</i>	(Gerritsen et Bradley, 1987)
	Mobilité électrophorétique : <i>Nannochloris oculata</i> , <i>Monochrysis lutheri</i> et <i>Cyclotella meneghiniana</i>	(Myers et al., 1975)
• cellules isolées de branchies de poissons	Mobilité électrophorétique	(Campbell et al., 1997)

### 1.1.3 Conséquences physiologiques possibles de l'adsorption de substances humiques sur les membranes biologiques

Puisque la membrane cellulaire constitue pour les micro-organismes le médiateur entre l'organisme et son environnement, on peut anticiper que l'interaction directe des substances humiques à la surface biologique ait des conséquences importantes au niveau des propriétés membranaires comme l'activité enzymatique localisée à la surface cellulaire, la fluidité et la perméabilité membranaire et le transport transmembranaire de solutés, y compris des métaux. En raison du poids moléculaire élevé des substances humiques, de leur hétérogénéité, de leur caractère polyélectrolyte et de leur polyfonctionnalité, on peut supposer que plusieurs groupements fonctionnels puissent être impliqués simultanément dans l'adsorption de ces molécules aux surfaces biologiques.

La perméabilité et la fluidité membranaire sont des propriétés importantes sur le plan des fonctions biologiques (Gennis, 1989, Schechter and Rossignol, 1997, Shinitzky, 1984). Une modification de la fluidité membranaire pourrait se traduire par une interférence avec les processus d'adaptation aux différents stress environnementaux. Par ailleurs, Parent et al. (1996) ont noté une diminution de la perméabilité membranaire chez une algue verte (*Chlorella pyrenoidosa*) quand celle-ci était exposée à l'aluminium inorganique ; cependant, lorsque cette algue était exposée à la même concentration d'aluminium inorganique mais en présence d'acide fulvique, la présence de l'acide fulvique provoquait une restauration (augmentation) de la perméabilité membranaire. Des résultats similaires ont été rapportés par Samson et Visser (1989) qui ont mesuré chez la cellule de pomme de terre des efflux de  $K^+$  plus importants en présence qu'en absence d'acide humique. Il nous semble important de vérifier l'influence spécifique des substances humiques sur la perméabilité membranaire, en raison de son importance potentielle sur le plan de la toxicologie.

Plus particulièrement, la biodisponibilité et la toxicité des métaux traces sont susceptibles d'être influencées par la présence de substances humiques adsorbées à la surface

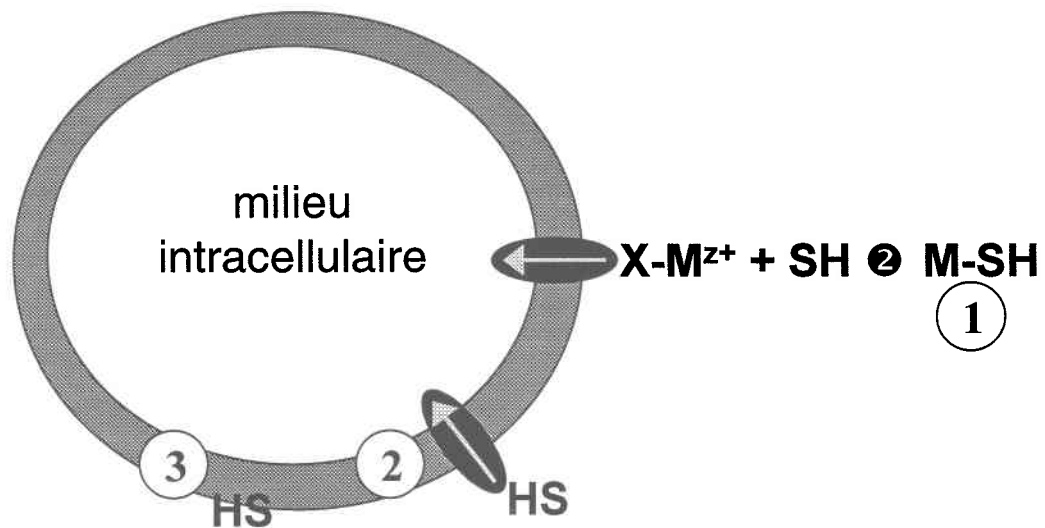
biologique. Tel que discuté précédemment, le modèle de l'ion libre tient compte de la complexation en solution des ions métalliques par les acides humiques et fulviques, mais il ne considère pas les effets de la présence de substances humiques adsorbées. La matière organique adsorbée à la membrane biologique pourrait affecter la prise en charge des métaux à plusieurs niveaux, et pourrait interférer avec les processus de transport transmembranaire et influencer ainsi la prise en charge des métaux traces. Les substances humiques adsorbées sont d'abord susceptibles d'interagir directement avec la membrane biologique. Les substances humiques sont également susceptibles d'influencer le transport du métal de la solution externe vers le site de prise en charge localisé à la surface algale, ce qui pourrait influencer la vitesse de prise en charge du métal dans les cas où la diffusion du métal vers la membrane constituerait l'étape qui limite la vitesse de prise en charge.

Les substances humiques adsorbées à la surface cellulaire peuvent complexer les métaux, interagir avec les sites de transport et avec la membrane cellulaire (Fig. 1.2). Comme dans la solution externe, les substances humiques adsorbées vont complexer les métaux au voisinage de la membrane. Elles pourraient également interagir avec les protéines transmembranaires lors du processus d'adsorption et modifier leur capacité de transport du métal. Cette interaction pourrait également être indirecte : les substances humiques adsorbées pourraient modifier la perméabilité et la fluidité de la bicouche lipidique qui forme la membrane, ce qui pourrait modifier l'activité de la protéine transmembranaire responsable du transport du métal cationique.

Dans le cas d'un contrôle cinétique de la prise en charge, c'est à dire dans la situation où c'est la vitesse de diffusion du métal (de la solution vers la surface biologique) ou la vitesse de formation du complexe M-X-cellule (voir fig. 1.2) qui détermine la vitesse de prise en charge du métal, les substances humiques accumulées à la surface cellulaire sont également susceptibles de modifier la cinétique de la prise en charge du métal. Par exemple, Campbell et al. (1997) ont estimé pour *Chlorella pyrenoidosa* que la concentration d'acide fulvique dans la phycosphère, le microenvironnement au voisinage de l'algue dont la composition chimique est différente de celle du milieu environnant,



pourrait être de 30 à 900 fois plus élevée que dans la solution ambiante, en raison de l'adsorption de l'acide fulvique. Cette accumulation d'acide fulvique ou humique pourrait possiblement influencer la vitesse de diffusion du métal dans la couche de diffusion au voisinage de l'algue. La spéciation du métal dans cette couche de diffusion et sa vitesse globale de formation du complexe de surface, M-X-cellule, sont également susceptibles d'être affectées par la présence d'un excès de substances humiques près de la membrane cellulaire. Ainsi, la biodisponibilité du métal est susceptible d'être affectée par la présence des substances humiques, adsorbées ou non, à la surface biologique.



<b>SH</b>	<b>Substances humiques</b>
	<b>Membrane cellulaire</b>
	<b>Site de transport spécifique</b>

Figure 1.2: Modèle conceptuel de la prise en charge des métaux en présence de substances humiques adsorbées à la surface cellulaire: (1) complexation des métaux ; (2) interactions entre les substances humiques et les sites de transport spécifique ; et (3) interactions entre les substances humiques et la membrane affectant la perméabilité de la bicouche lipidique.

## 1.2 Objectifs

### 1.2.1 Objectif général

L'hypothèse générale à vérifier dans cette recherche doctorale était que l'interaction directe des substances humiques à la surface du phytoplancton influe de manière significative sur sa physiologie. Nous voulions d'abord confirmer que l'adsorption des substances humiques se produit à la surface du phytoplancton et démontrer que ce processus est général. Pour expliquer la généralité de cette interaction, nous voulions aussi caractériser les interactions responsables de l'adsorption. Dans un second temps, nous cherchions à identifier au niveau physiologique différents impacts possibles de cette association. Nous voulions établir l'influence des substances humiques adsorbées sur des propriétés biophysiques des membranes, tel que la perméabilité membranaire. De plus, dans un contexte de validation du Modèle de l'Ion Libre pour les solutions d'exposition contenant de la matière organique naturelle, nous avons étudié la prise en charge de cations métalliques, notamment en présence ou en absence de substances humiques adsorbées.

### 1.2.2 Objectifs spécifiques

#### 1.2.2.1 Caractériser l'adsorption des substances humiques à la surface des algues vertes

Nous voulions vérifier que l'adsorption des substances humiques à la surface du phytoplancton n'est pas spécifique à certaines espèces d'algues ou encore à des acides humiques ou fulviques isolés de certains sites. De plus, nous voulions confirmer que l'adsorption mesurée n'est pas un artefact des mesures expérimentales, en effectuant simultanément les contrôles nécessaires. Campbell et al. (1997) ont montré une augmentation de l'adsorption d'acide fulvique pour une diminution de pH. Trois processus d'interactions pourraient expliquer cette augmentation : des interactions électrostatiques, des interactions hydrophobes ou la formation de liens hydrogène, séparément ou simultanément. Discriminer entre ces processus facilitera l'interprétation des résultats à venir (influence des substances humiques sur les processus physiologiques)

et permettra de mieux prédire la variabilité de cette adsorption dans des conditions expérimentales différentes.

#### 1.2.2.2 Mesurer les effets des substances humiques adsorbées sur la perméabilité membranaire

L'association des substances humiques avec la membrane cellulaire pourrait résulter en une modification de ses propriétés biophysiques. La perméabilité est une caractéristique importante des membranes cellulaires ; celles-ci contrôlent en partie ou en totalité la diffusion de plusieurs solutés, qu'ils soient bénéfiques ou non pour l'organisme. La perméabilité membranaire peut être étudiée *in vivo* au moyen de sondes dont la prise en charge se fait par diffusion passive et dont les produits de l'hydrolyse intracellulaire sont fluorescents et imperméables vis-à-vis de la membrane (ex. (Snell et al., 1996)). De plus, des vésicules, formées de phospholipides, peuvent également être utilisées comme membranes artificielles modèles pour les études sur la perméabilité membranaire.

#### 1.2.2.3 Déterminer l'influence des substances humiques adsorbées sur les échanges membranaires de métaux cationiques

Selon des résultats antérieurs obtenus dans notre laboratoire (Gauthier, 1995), la prise en charge du Cd par les juvéniles du saumon atlantique en milieu acide et en présence d'acide fulvique était réduite pour une même concentration de  $\text{Cd}^{2+}$  libre, par rapport à un milieu d'exposition sans acide fulvique, où le Cd était complexé par l'EDTA. Ces résultats allant à l'encontre des prédictions du Modèle de l'Ion Libre, nous voulions les vérifier mais pour des organismes biologiques différents, à savoir le phytoplancton. L'utilisation du phytoplancton implique un système expérimental plus simple, et permet de mesurer à la fois la prise en charge des métaux et la présence de substances humiques adsorbées.

Pour réaliser ces objectifs, nous avons étudié l'adsorption de substances humiques sur des algues unicellulaires et les effets de cette adsorption sur la perméabilité membranaire, sur la prise en charge des métaux et finalement sur la toxicité des métaux traces. L'adsorption de substances humiques à la surface de cellules de phytoplancton et à une surface modèle a d'abord été vérifiée par des mesures directes d'adsorption et par des mesures de mobilité électrophorétique en présence de substances humiques adsorbées (chapitre 2). Nous avons également étudié les échanges membranaires par diffusion passive de sondes fluorescentes et de complexes organométalliques hydrophobes, en utilisant des vésicules de phospholipides et une algue verte (chapitre 3). Les échanges membranaires de métaux cationiques par des systèmes de transport spécifiques ont été ensuite mesurés chez des algues vertes, en présence de substances humiques adsorbées. La plupart de ces expériences ont été conçues pour permettre de tester le MIL en présence et en absence de substances adsorbées (chapitre 4).

## 2 Adsorption des substances humiques aux surfaces biologiques

### 2.1 Introduction

L'adsorption des substances humiques aux surfaces biologiques a été observée chez plusieurs espèces biologiques, dont des espèces de phytoplancton. Nous avons choisi d'étudier les algues en raison de leur importance dans les écosystèmes aquatiques comme organismes autotrophes, de leur implication dans plusieurs cycles biogéochimiques et en raison de l'importance des processus de surface pour les organismes unicellulaires, possédant des rapports surface/volume élevés. De plus, les algues unicellulaires sont assez facilement cultivées et se prêtent bien aux manipulations en laboratoire.

L'adsorption des substances humiques sur sept d'espèces de phytoplancton a été démontrée de façon indirecte, par des mesures de mobilité électrophorétique (voir tableau 1.2) ; les mesures directes de l'adsorption à la surface d'algues unicellulaires sont encore moins nombreuses (Campbell et al., 1997). La méthodologie utilisée dans l'étude de Campbell et al. (1997) impliquait la récupération des algues par filtration. Avec cette approche, même avec des contrôles adéquats, il subsiste toujours un risque d'artefact lié à la rétention supérieure ou l'adsorption des substances humiques sur les filtres utilisés. Campbell et al. (1997) ont fait ces mesures directes d'adsorption d'un acide fulvique extrait d'un sol pour deux espèces, soit *Chlorella pyrenoidosa* (Chlorophyceae) et *Synechococcus leopoliensis* (Cyanophyceae). Pour compléter ces études, nous avons décidé d'entreprendre des études supplémentaires sur l'adsorption des substances humiques à la surface des algues unicellulaires, utilisant d'autres espèces d'algues, des méthodologies ne nécessitant pas de filtrations ainsi que des acides fulviques et humiques aquatiques.

Pour comprendre les rôles biogéochimiques possibles du processus d'adsorption des substances humiques à la surface du phytoplancton, il faut également étudier la question de la cinétique et de la réversibilité de l'adsorption. L'influence des substances humiques adsorbées sur les processus de transport membranaire dépendra du temps requis pour compléter le processus d'adsorption par rapport au temps requis pour le transport. De

plus, une irréversibilité du processus d'adsorption résulterait en la formation d'un revêtement permanent de substances humiques à la surface des algues suite à une exposition aux substances humiques. Ce revêtement serait susceptible d'interagir avec les processus physiologiques, même après une disparition des substances humiques dans le milieu externe. Finalement, la question de la cinétique d'adsorption sera très importante en ce qui concerne l'élaboration des protocoles expérimentaux pour les expériences ultérieures de prise en charge de métaux pour des périodes de temps courtes.

En plus de la durée d'exposition, le pH apparaît comme le facteur principal régulant le processus d'adsorption. Pour les deux espèces d'algues étudiées, Campbell et al. (1997) ont montré une augmentation de la quantité d'acide fulvique adsorbée avec une diminution de pH. C'est également le cas pour huit espèces de champignons unicellulaires pour lesquels l'adsorption d'un acide humique a été comparée à pH 4, 6, et 8 (Zhou, 1992a). Cette augmentation de l'adsorption avec une diminution de pH a plusieurs implications au niveau des processus d'adsorption. Pour expliquer ces observations, trois peuvent être avancés : des interactions de nature électrostatique, des interactions de type hydrophobes et la formation de liens hydrogène. Ces trois types d'interactions peuvent exister simultanément. Cependant, une estimation de leur contribution respective à ce processus d'adsorption serait utile afin d'extrapoler ce processus d'adsorption à différentes conditions environnementales et à différents organismes. Puisque dans la gamme de pH 4 à pH 7, les groupements carboxyliques sont les principaux groupements ionisables à la surface de l'algue ex. : (Kiefer et al., 1997) et pour les substances humiques ex. : (Schnitzer, 1976), ces derniers auront une charge nette négative et il y aura une répulsion électrostatique. Avec une diminution de pH, la protonation diminue la charge nette négative aux surfaces biologiques et à la surface des substances humiques, ce qui diminue la répulsion électrostatique et favorise ainsi l'adsorption. À pH faible, la répulsion étant diminuée, on pourrait s'attendre à la formation de liens hydrophobes et hydrogène entre la surface de l'algue et les substances humiques.

La contribution électrostatique au processus d'adsorption des substances humiques se fait aux niveaux de la conformation, de la stabilisation des charges et du pontage (Tipping, 1990). Premièrement, la conformation des macromolécules humiques est influencée par l'environnement ionique. En présence de contre-ions, la stabilisation des charges permet une constriction de la structure tridimensionnelle (Ghosh et Schnitzer, 1980). Cependant, l'effet de la force ionique sur la conformation de certaines substances humiques peut être faible, comme c'est le cas pour les acides fulvique et humique Suwannee River (Lead et al., 2000). La protonation des groupements ionisables, principalement des groupements carboxyliques, joue le même rôle. Ces déformations de la macromolécule sont susceptibles de modifier l'encombrement stérique au niveau de sites clés tels que des sites de complexation. La présence de contre-ions à ces deux surfaces diminue également la répulsion électrostatique et favorise ainsi l'adsorption. De plus, les cations bivalents peuvent contribuer davantage au processus d'adsorption, en formant des pontages entre les surfaces biologiques et les substances humiques. La contribution des interactions électrostatiques est toujours présente. Par exemple, la stabilisation des charges (protonation, contre-ions, pontage) pourrait favoriser le rapprochement des domaines hydrophobes à la surface des substances humiques et aux surfaces biologiques.

Les surfaces biologiques et les substances humiques contiennent des domaines hydrophobes qui sont susceptibles de s'associer, principalement en milieu acide. Les substances humiques ont des propriétés de surfactants, puisqu'elles contiennent à la fois des domaines hydrophiles (groupements ionisables) et des domaines hydrophobes (chaînes aliphatiques et noyaux aromatiques). Les substances humiques étant de poids moléculaires élevés, l'emplacement de ces domaines au sein de la molécule peut conférer à celle-ci des propriétés tensioactives. Les surfaces biologiques contiennent également des domaines hydrophobes, principalement des lipides et des protéines.

Nous voulons donc démontrer l'adsorption d'acides fulvique et humique aquatiques à la surface d'algues unicellulaires. Nous voulons de plus étudier l'effet de la durée d'exposition sur l'adsorption et la désorption des substances humiques à la surface



d'algues. Finalement, nous voulons mettre en évidence la contribution respective des types d'interactions entre les surfaces biologiques et les substances humiques.

## 2.2 Matériel et méthodes

### 2.2.1 Choix des organismes et d'une surface modèle, des substances humiques et des milieux de culture et d'exposition

Les espèces de phytoplancton qui ont déjà été utilisées pour les études sur l'adsorption des substances humiques sont indiquées au tableau 1.2. Nous avons également utilisé *Synechococcus leopoliensis* (Cyanophyceae) (UTCC 102), une algue de forme cylindrique de 1-3  $\mu\text{m}$  de longueur, et nous avons choisi d'étudier *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae) (UTCC 37), une algue en forme de croissant de  $\sim 3 \mu\text{m}$  de longueur, en raison de son utilisation très répandue comme organisme cible dans les tests de toxicité standards. De plus, *Selenastrum sp.* sont des espèces communes aux eaux douces nord-américaines. Ces algues ont été obtenues de la collection de cultures de l'Université de Toronto. Les cellules ont été cultivées à une température ( $20^\circ\text{C}$ ) et sous une luminosité ( $100\text{-}115 \mu\text{Einstein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) constantes, avec une agitation circulaire (50 rpm).

Pour s'assurer de la représentativité des substances humiques par rapport au milieu aquatique, de la reproductibilité de leurs propriétés de lot en lot, et de la disponibilité de données de caractérisation, nous avons choisi de travailler de préférence avec les acides humiques et fulviques aquatiques isolés par "International Humic Substances Society", IHSS. Nous avons utilisé principalement l'acide humique et l'acide fulvique standard Suwannee River (Malcolm et al., 1995). La méthode d'extraction développée par l'IHSS est une des plus utilisées au monde, bien que l'hydrolyse partielle des substances humiques isolés (Aiken, 1988) et leur fractionnement (Serkiz et Perdue, 1990) constituent des artefacts possibles de cette méthode. De plus, des problèmes d'agrégations et de dissociations sont également à considérer lors de la resolubilisation de substances humiques lyophilisées. Balnois et al. (1999) n'ont cependant pas observé par microscopie

de force atomique d'agrégations de l'acide humique Suwannee River entre pH 3 et pH 10 pour des forces ioniques de 5 à 50 mM. Lead et al. (2000) ont observé que les coefficients de diffusion des acides fulvique et humique Suwannee River sont peu ou pas influencés par la force ionique (jusqu'à 100 mM), tandis qu'il y a une légère diminution des coefficients de diffusion entre pH 7 et pH 5, correspondant à un faible degré d'agrégation. Il est donc peu probable qu'il y ait des problèmes importants d'agrégations lors de la solubilisation de l'acide fulvique Suwannee River, puisque celui-ci est plus hydrophile que l'acide humique. Pour des raisons pratiques, les acides lyophilisés ont donc été utilisés dans le cadre de ce projet de recherche, et des précautions ont été prises pour uniformiser leur utilisation (délais constants entre la préparation des solutions et le début des expériences ; filtration des solutions sur membranes en polycarbonate de 0,4 µm (Poretics<sup>®</sup>, Osmonics Inc., Livermore, CA, USA) avant les expériences).

Pour comparaison, nous avons également utilisé l'acide fulvique Armadale obtenu de Ecolinc Inc. (Roxboro, Québec), comme substance humique isolée du sol. Pour exprimer la concentration de substances humiques en  $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ , nous avons utilisé les contenus en carbone organique rapportés par IHSS pour les acides fulvique et humique Suwannee River et par Ghosh et Schnitzer (1981) pour l'acide fulvique Armadale.

Les milieux de culture et d'exposition ont également été choisis pour être représentatifs des eaux naturelles. Le milieu de culture Fraquil, développé par Morel et al. (1975) pour les études sur les métaux traces, a été sélectionné. Pour les expériences d'adsorption, une version simplifiée de ce milieu de culture, sans vitamines et sans métaux ajoutés, a été utilisée comme milieu d'exposition, Fra<sub>t</sub> (tableau 2.1).

Tableau 2.1: Composition ionique du milieu de culture Fraquil et des milieux modifiés.

Constituant	Concentration (mol · L <sup>-1</sup> )			
	Fraquil	Fra <sub>NaNO<sub>3</sub></sub>	Fra <sub>t</sub>	Fra <sub>t - NaNO<sub>3</sub></sub>
Sodium	2,85 x 10 <sup>-4</sup>	8,29 x 10 <sup>-3</sup>	2,85 x 10 <sup>-4</sup>	8,29 x 10 <sup>-3</sup>
Potassium	2,00 x 10 <sup>-5</sup>			
Calcium	2,50 x 10 <sup>-4</sup>			
Magnésium	1,50 x 10 <sup>-4</sup>			
Sulfate	1,50 x 10 <sup>-4</sup>			
Silicate	1,25 x 10 <sup>-5</sup>			
Carbonate	1,50 x 10 <sup>-4</sup>			
Chlorure	5,00 x 10 <sup>-4</sup>			
Nitrate	1,00 x 10 <sup>-4</sup>	8,10 x 10 <sup>-3</sup>	1,00 x 10 <sup>-4</sup>	8,10 x 10 <sup>-3</sup>
Phosphate	1,00 x 10 <sup>-5</sup>			
EDTA	5,00 x 10 <sup>-6</sup>			
Fer	4,51 x 10 <sup>-7</sup>			
Cobalt	2,50 x 10 <sup>-9</sup>			
Cuivre	9,97 x 10 <sup>-10</sup>			
Manganèse	2,30 x 10 <sup>-8</sup>			
Molybdène	1,50 x 10 <sup>-9</sup>			
Zinc	4,00 x 10 <sup>-9</sup>			

**Fraquil** milieu de culture standard ayant un pH de 7,3 (Morel et al., 1975)

**Fra<sub>NaNO<sub>3</sub></sub>** milieu de culture pour *Selenastrum capricornutum*,  
I = 0,01 M ajusté avec NaNO<sub>3</sub>

**Fra<sub>t</sub>** milieu d'exposition simplifié  
(sans EDTA, sans métaux et sans vitamines ajoutés)

**Fra<sub>t - NaNO<sub>3</sub></sub>** milieu d'exposition simplifié  
(sans EDTA, sans métaux et sans vitamines ajoutés),  
I = 0,01 M ajusté avec NaNO<sub>3</sub>

## 2.2.2 Mesures directes

### 2.2.2.1 Substances humiques non-radiomarquées

Les cellules ont été recueillies 3 jours après leur inoculation dans le milieu Fraquil, à la fin de la phase exponentielle de croissance, par une filtration douce sur des membranes de polycarbonate de 0,4  $\mu\text{m}$  (Poretics<sup>®</sup>, Osmonics Inc, Livermore, CA, USA), et rincées 3 fois avec 10 mL du milieu d'exposition, Fra<sub>t</sub>. Un vide minimal a été utilisé pour la filtration (< 15 cm de Hg) pour minimiser la lyse des cellules. Les densités cellulaires et la surface algale ont été mesurées avec un compteur électronique de particules (CoulterMultisizer II, Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA) équipé d'un orifice de 15  $\mu\text{m}$  pour *S. leopoliensis* et de 70  $\mu\text{m}$  pour *S. capricornutum*.

Pour les expériences d'adsorption, *S. capricornutum* a été exposées à différents pH à des solutions de 5 mg C · L<sup>-1</sup> d'acide humique ou fulvique pour au moins 30 minutes et ont été récoltées par centrifugation. Pour les expériences d'adsorption, des cellules de *S. capricornutum* ont été exposées à différents pH à des solutions de 5 mg C · L<sup>-1</sup> d'acide humique ou fulvique pendant au moins 30 minutes et ont été récoltées par centrifugation. Les expériences d'adsorption ont été effectuées directement dans les tubes à centrifuger à fonds conique en polyéthylène de haute densité (HDPE) et des volumes de 10 mL de solution ont été utilisés. Les expériences avaient lieu à force ionique constante, soit dans le milieu d'exposition Fra<sub>t</sub>. Les pH avaient été préalablement ajustés avec des solutions concentrées de NaOH ou HNO<sub>3</sub>. Les concentrations initiales de substances humiques et les concentrations dans les surnageants après les expositions ont été comparées pour calculer la quantité de substances humiques perdue de la solution par adsorption. La concentration de substances humiques a été déterminée par des mesures d'absorbance à 326 nm, en utilisant des courbes de calibration propres à chacun des pH. Deux séries d'échantillons contrôles ont suivi les mêmes traitements. Les premiers contrôles, contenant soit l'acide fulvique ou l'acide humique, ont été utilisés pour corriger les résultats pour la dilution suivant l'ajout de la suspension mère d'algues et pour les pertes potentielles lors de la centrifugation ou par adsorption aux parois des contenants. Les seconds contrôles, contenant les algues sans substances humiques, ont été utilisés pour

corriger pour l'absorbance due aux algues qui seraient demeurées en suspension après l'étape de centrifugation ou due à la présence d'exudats d'algues qui auraient pu interférer avec la mesure spectrophotométrique de la concentration de substances humiques. De telles interférences, résultant d'une quantité significative d'algues demeurées dans le surnageant, ne se sont manifestées que rarement. Dans ces cas, une relation linéaire a été établie entre l'absorbance à 326 nm et la concentration d'algues résiduelle dans le surnageant de ces contrôles. Cette relation a ensuite été utilisée pour calculer une correction de l'absorbance mesurée à 326 nm, basée sur la densité algale résiduelle dans les surnageants. Cette correction a toujours été  $< 3 \%$  de l'absorbance mesurée.

#### 2.2.2.2 Acide humique radiomarqué

La méthode décrite dans la section précédente (2.2.2.1) et utilisée pour déterminer la quantité de substances humiques adsorbée n'était pas assez sensible pour suivre des expériences de désorption. Nous avons donc utilisé la technique proposée par Warwick et al. (1993) pour radiomarquer des substances humiques à l'aide de  $^{14}\text{C}$  (voir Annexe A pour la méthodologie détaillée). Des expériences préliminaires ont permis de démontrer que des solutions d'acide fulvique Suwannee River radiomarqué avaient une tension superficielle beaucoup plus élevée que l'acide fulvique parent, tandis que les solutions d'acide humique Suwannee River radiomarqué et parent avaient des tensions superficielles identiques (Annexe A). Nous avons donc choisi de travailler uniquement avec l'acide humique pour les expériences d'adsorption et de désorption.

Les expériences d'adsorption avec l'acide humique radiomarqué ont été effectuées dans des tubes coniques en polypropylène et des volumes de 50 mL de solution ont été utilisés. Les expériences avaient lieu à force ionique constante, soit dans le milieu d'exposition  $\text{Fra}_t\text{-NaNO}_3$ . Les pH avaient été préalablement ajustés avec des solutions concentrées de NaOH ou  $\text{HNO}_3$ . Pour les expériences d'adsorption et de désorption, *S. capricornutum*,  $\sim 5 \times 10^5$  cellules  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , a été exposée à  $5,4 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$  d'acide humique Suwannee River radiomarqué. Pour l'expérience d'adsorption, les algues ont été recueillies après  $\sim 4, 15,$

21, 39 et 96 min. Pour l'expérience de désorption, les algues ont été récoltées après ~ 2 h d'exposition, resuspendues dans le milieu d'exposition,  $\text{Fra}_{\text{t-NaNO}_3}$ , sans acide humique, et ont ensuite été recueillies après ~ 4, 13, 20 et 40 min. Les algues ont été recueillies sur deux membranes de polycarbonate de 0,4  $\mu\text{m}$  (Poretics<sup>®</sup>, Osmonics Inc, Livermore, CA, USA) superposées, puis rincées avec 3 x 10 ml du milieu d'exposition sans acide humique. Un mL d'eau et 5 mL de liquide à scintillation Ecolume (ICN Canada, Montréal, QC) ont été ajoutés à chacun des filtres. Après agitation et une période d'équilibration d'environ 12 heures, l'activité en  $^{14}\text{C}$  des filtres a été déterminée avec un compteur à scintillation liquide, modèle 1414 Winspectral  $\alpha / \beta$  (Wallac, Turku, Finlande). L'activité du filtre du dessous a été soustraite à l'activité du filtre du dessus afin de corriger nos résultats pour le bruit de fonds (ex. : adsorption sur le filtre ou rétention passive dans les pores du filtre). L'activité spécifique de l'acide humique radiomarqué utilisé a été déterminée en mesurant la concentration d'acide humique par absorbance et l'activité du  $^{14}\text{C}$ .

### 2.2.3 Mobilité électrophorétique

La mobilité électrophorétique a été mesurée par vélocimétrie Doppler / spectroscopie-laser de corrélation photonique sur un Coulter<sup>®</sup> Delsa 440 (Hialeah, FL, USA). La vitesse de mouvement des cellules exposées à un champ électrique est calculée à partir des différences de fréquence entre un rayon laser de référence et des rayons lasers traversant le canal d'électrophorèse contenant la suspension d'algues (effet Doppler). En raison du courant électro-osmotique, les cellules sont ralenties près des parois du canal d'électrophorèse et accélérées au centre du canal. À une distance précise des parois du canal, soit le plan stationnaire, la vitesse des cellules est indépendante du courant électro-osmotique. L'appareil était équipé d'un indicateur digital de position d'une résolution de 0,001 mm (modèle 543-423A, Mitutoyo America Corp., Mississauga, ON). La vitesse apparente,  $V$  ( $\mu\text{m} \cdot \text{cm} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), la somme de la mobilité électrophorétique réelle et de la vitesse électroosmotique, a été mesurée à 5 positions différentes le long du canal rectangulaire d'électrophorèse. Une équation parabolique décrivant la vitesse apparente

en fonction de la position dans le canal d'électrophorèse a été ajustée à la vitesse apparente mesurée (Jandel Scientific Sigmaplot Version 3.02, San Rafael, CA, USA) :

$$V = 3/2 V_{\text{moyenne}} (1 - 4(P/L)^2) \quad (2.1)$$

où P (mm) est la position relative par rapport au centre du canal, calculée comme la position mesurée moins la moitié de la largeur mesurée du canal, et  $V_{\text{moyenne}}$  ( $\mu\text{m} \cdot \text{cm} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et L (mm) sont des paramètres d'ajustement. La mobilité électrophorétique réelle a été calculée avec ces paramètres,  $V_{\text{moyenne}}$  et L, obtenus aux positions des plans stationnaires supérieurs et inférieurs (soit à 16 % et 84 % de la largeur mesurée du canal), où la contribution de la vitesse électroosmotique est nulle.

#### 2.2.4 Types d'interactions

Pour étudier les types d'interactions impliqués dans l'adsorption des substances humiques aux surfaces biologiques, nous avons utilisé des sphères de latex comportant des groupements carboxyliques comme surface d'étude modèle. Les sphères de latex utilisées ont des groupements de surface carboxyliques et sulfates et un diamètre de 1,5  $\mu\text{m}$  (Interfacial Dynamics Corp., Portland, OR, USA). Les groupements sulfates sont nécessaires pour stabiliser les sphères de latex à bas pH. Mis à part les groupements ionisables, la surface de ces particules de latex est hydrophobe (Romero-Cano et al., 1998). Nous avons donc utilisé les sphères de latex comme une surface modèle très simplifiée des surfaces biologiques, sachant que celles-ci comportent elles-aussi des groupements carboxyliques et des domaines hydrophobes (bicouche lipidique). Les caractéristiques de surface des particules de latex sont plus homogènes et reproductibles que la surface des algues cultivées en lot, mais le principal avantage de leur utilisation est leur résistance chimique et physique. Les expériences d'adsorption avec les sphères de latex ont été effectuées avec le même protocole que celui utilisé pour l'adsorption de l'acide humique et fulvique non-radiomarké à la surface de *S. capricornutum*. Cependant, le volume total de solution utilisé était de 3 mL et les expériences ont été

effectuées dans des tubes coniques à ultracentrifugation. De plus, les sphères de latex ont été séparées par ultracentrifugation pendant 30 min à 265 070 g.

L'emploi de sphères de latex plutôt que d'algues a permis l'utilisation d'un surfactant synthétique nonionique pour tester l'implication d'interactions hydrophobes dans le processus d'adsorption. Si les substances humiques s'adsorbent aux sphères de latex par la formation de liens hydrophobes, l'ajout d'un surfactant nonionique, comme le Triton X-100, devrait inhiber leur adsorption. En effet, le surfactant synthétique étant plus tensioactif, il devrait occuper préférentiellement les domaines hydrophobes à la surface des particules de latex et limiter ainsi l'adsorption des substances humiques. Nous avons donc mesuré la mobilité électrophorétique et la quantité d'acide humique adsorbée à la surface des sphères de latex en présence d'acide humique et de Triton X-100. Les sphères de latex ont été ajoutées à des solutions contenant déjà à la fois l'acide humique et le Triton X-100.

En plus d'interactions hydrophobes, étant donné la présence de groupements phénoliques et carboxyliques sur les substances humiques et des groupements carboxyliques sur les surfaces biologiques, la formation de liens hydrogène pourrait également contribuer au processus d'adsorption. Une diminution du pH augmente le nombre de groupements carboxyliques protonés à la surface biologique. Par conséquent, la probabilité de formation d'un lien hydrogène augmente. Afin d'isoler ce type d'interactions, nous avons utilisé l'eau lourde. Le deutérium possédant une masse plus élevée que l'hydrogène, nous présumons que la formation de liens hydrogène sera moins importante dans l'eau lourde que dans l'eau normale. La mesure du pD a été faite à l'aide d'une électrode à pH standard et la mesure a été corrigée selon l'équation suivante (Bates, 1964):

$$pD = pH_{\text{mesuré}} + 0,4 \quad (2.2)$$



En raison de la densité supérieure de  $D_2O$ , les sphères de latex n'ont pas pu être séparées par ultracentrifugation pour les expériences d'adsorption dans l'eau lourde ; elles ont été séparées par filtration sur des membranes de polycarbonate de  $0,4 \mu m$  (Poretics<sup>®</sup>, Osmonics Inc, Livermore, CA, USA).

## 2.3 Résultats et discussion

### 2.3.1 Effets du pH, de l'espèce algale et de la substance humique sur l'adsorption

L'adsorption de substances humiques à la surface des cellules d'algue a tout d'abord été étudiée par des mesures de mobilité électrophorétique. Des milieux d'exposition de force ionique relativement élevée ( $0,01 M$ ) ont été utilisés de façon à déplacer le plan de cisaillement (« shear plane ») vers la surface des cellules. Le potentiel zeta, calculé à partir de la mobilité électrophorétique, est mesuré au plan de cisaillement. Le potentiel zeta, calculé à partir de la mobilité électrophorétique, est mesuré au plan de cisaillement. Plus la couche diffuse est comprimée, plus le plan de cisaillement s'approche de la couche de Stern, et plus la mobilité électrophorétique devient alors directement reliée au potentiel à la surface de la cellule. L'équation parabolique choisie pour le calcul de la mobilité électrophorétique permet de reproduire adéquatement la variation de la vitesse apparente en fonction de la position dans le canal d'électrophorèse (Fig. 2.1). L'utilisation d'une équation parabolique pour calculer la mobilité électrophorétique au plan stationnaire permet de minimiser la source d'erreurs expérimentales principale dans la mesure de la mobilité électrophorétique, soit la localisation des plans stationnaires (James, 1979). En effet, le profil de la mobilité électrophorétique en fonction de la position montre bien qu'une faible variation de position près du plan stationnaire entraîne une variation très importante de la mobilité électrophorétique mesurée. L'utilisation d'une équation parabolique pour calculer la mobilité électrophorétique est de plus en plus répandue et fait

partie d'une méthode standardisée de mesure récemment proposée (Furusawa et Uchiyama, 1998).

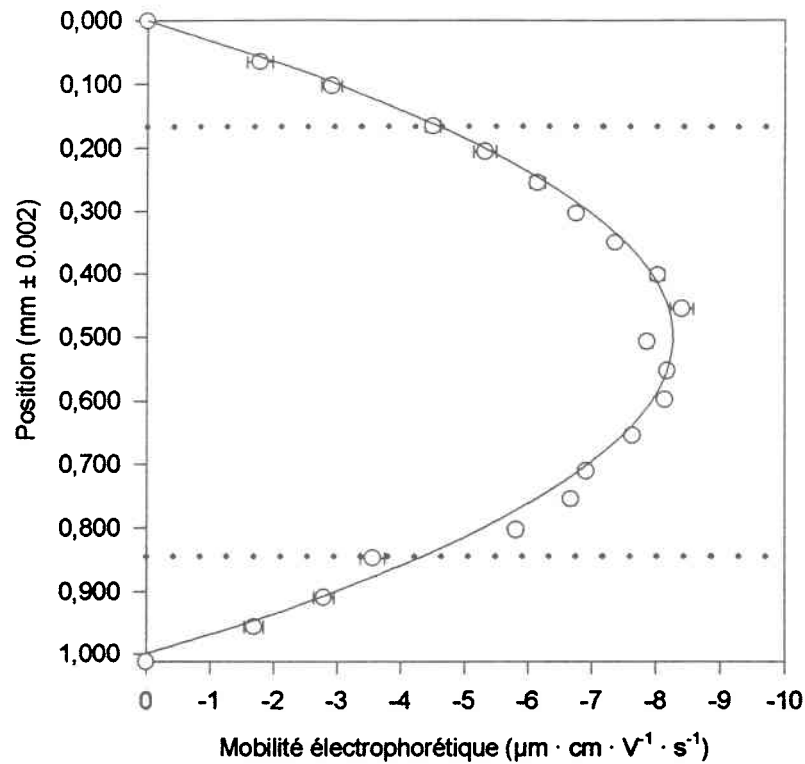
Cette technique a d'abord été utilisée pour répéter les mesures de Campbell et al. (1997) de mobilité électrophorétique de *S. leopoliensis* en présence d'acide fulvique Armadale (Fig. 2.2). Les résultats obtenus étaient semblables à ceux de Campbell et al. (1997) (Fig. 2.3). L'augmentation significative de la mobilité électrophorétique avec une augmentation de pH ( $P < 0,001$ , ANOVA bifactorielle 2 x 4) résulte de la dissociation des groupements ionisables des protéines et des polysaccharides qui composent la paroi et la membrane cellulaire de l'algue. Dans cette gamme de pH, les principaux groupements ionisables sont les groupements carboxyliques, mais il pourrait y avoir également une contribution mineure des groupements hydroxy, amino et mercapto. La forme des courbes obtenues de mobilité électrophorétique en fonction du pH est similaire à celles obtenues pour des bactéries (James, 1979). Le plafonnement de la mobilité aux pH élevés correspondrait à la dissociation complète des groupements carboxyliques de la surface cellulaire. La meilleure façon d'obtenir le  $pK_a$  à la surface cellulaire est de déterminer le point d'intersection de deux courbes de mobilité électrophorétique obtenues à différentes forces ioniques. Cependant, le  $pK_a$  de la surface cellulaire peut également être estimé par le pH où la mobilité électrophorétique est la moitié de la valeur mesurée aux pH élevés (après le plafonnement). Pour *S. leopoliensis*, il semble que la dissociation complète commence autour de pH 6, et le  $pK_a$  ainsi obtenu est  $\sim 4,8$ , ce qui est dans la gamme attendue pour le  $pK_a$  des acides carboxyliques soit entre 4 et 6. Même si les différences entre la mobilité électrophorétique en absence et en présence d'acide fulvique Armadale ne sont pas significatives ( $P = 0,518$ , ANOVA bifactorielle 2 x 4), il est intéressant d'observer les mêmes tendances en présence de cet acide fulvique que pour les résultats de Campbell et al. (1997), soit une augmentation de la mobilité électrophorétique à  $pH < 6$  et un plafonnement à pH 7. Il faut noter que la mobilité électrophorétique en présence de cet acide fulvique est peu liée à la quantité d'acide fulvique adsorbée à la surface cellulaire, puisque Campbell et al. (1997) ont mesuré une augmentation marquée de la quantité d'acide fulvique adsorbée avec une diminution de pH (Fig 2.3).

Nous avons voulu confirmer ces résultats, obtenus avec une substance humique isolée d'un sol, avec une substance humique aquatique. La mobilité électrophorétique de *S. leopoliensis* n'est pas significativement affectée en présence d'acide humique Suwannee River ( $P = 0,074$ , ANOVA bifactorielle  $2 \times 4$ ) et elle augmente significativement avec une augmentation de pH ( $P < 0,001$ , ANOVA bifactorielle  $2 \times 4$ ) (Fig. 2.4). Cette absence d'effets sur la mobilité électrophorétique n'est pas nécessairement reliée à l'absence d'acide humique adsorbé, puisqu'il n'y avait pas non plus de modifications significatives de la mobilité électrophorétique de cette algue en présence d'acide Armadale, même si cet acide s'adsorbe à la surface de *S. leopoliensis*.

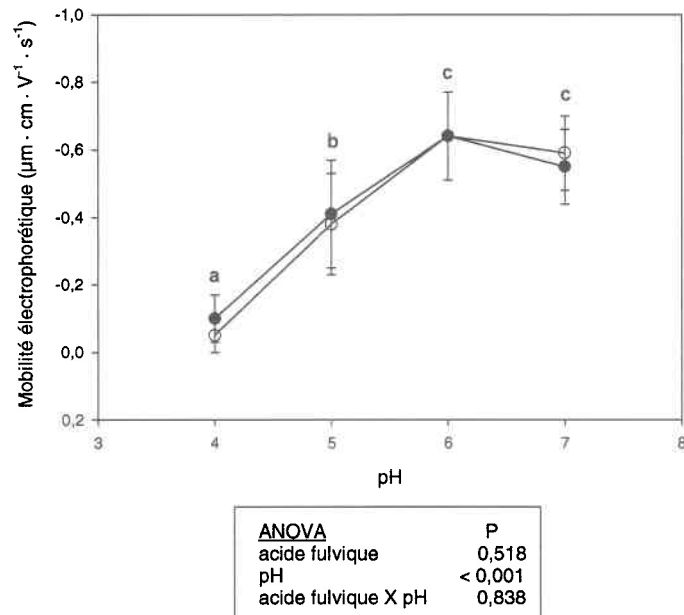
Des mesures directes de la quantité de substances humiques adsorbées permettent quant à elles de comparer les fractions humique et fulvique par rapport à l'intensité de leurs interactions avec les algues. À pH 5, des quantités similaires d'acide humique et d'acide fulvique Suwannee River s'adsorbent à la surface de l'algue *S. capricornutum*, alors qu'il n'y a pas d'adsorption significative à pH 7 (Fig. 2.5). Ces résultats correspondent bien à l'augmentation de l'adsorption de l'acide fulvique Armadale à la surface de *S. leopoliensis* et *C. pyrenoidosa* avec une diminution de pH, observée par Campbell et al. (1997). La quantité d'acide fulvique Suwannee River adsorbée à la surface de *S. capricornutum* (pH 5 :  $0,6 \text{ mg C} \cdot \text{m}^{-2}$ ) est cependant  $\sim 8$  fois plus faible que la quantité d'acide fulvique Armadale adsorbé à la surface de *S. leopoliensis* et de *C. pyrenoidosa*. Cette différence pourrait s'expliquer par la méthodologie employée, utilisant la filtration au lieu de la centrifugation, ou par des différences entre l'acide fulvique aquatique et celui extrait de sol, mais également par une différence de charge nette négative plus élevée à la surface de *S. capricornutum* qu'à la surface de *C. pyrenoidosa*.

Pour estimer la contribution de la charge à la surface de *S. capricornutum* au processus d'adsorption des substances humiques, la mobilité électrophorétique de cette algue a été mesurée à différents pH. La mobilité électrophorétique des cellules de *S. capricornutum* cultivées en lots demeure constante durant leur croissance, de 2 à 5 jours après l'inoculation,  $SE = 1\%$ ,  $n = 9$  (Fig. 2.6). La suspension de cellules a été titrée de pH 5 à pH 8 dans une solution ouverte à l'atmosphère et les mesures de mobilités ont été faites

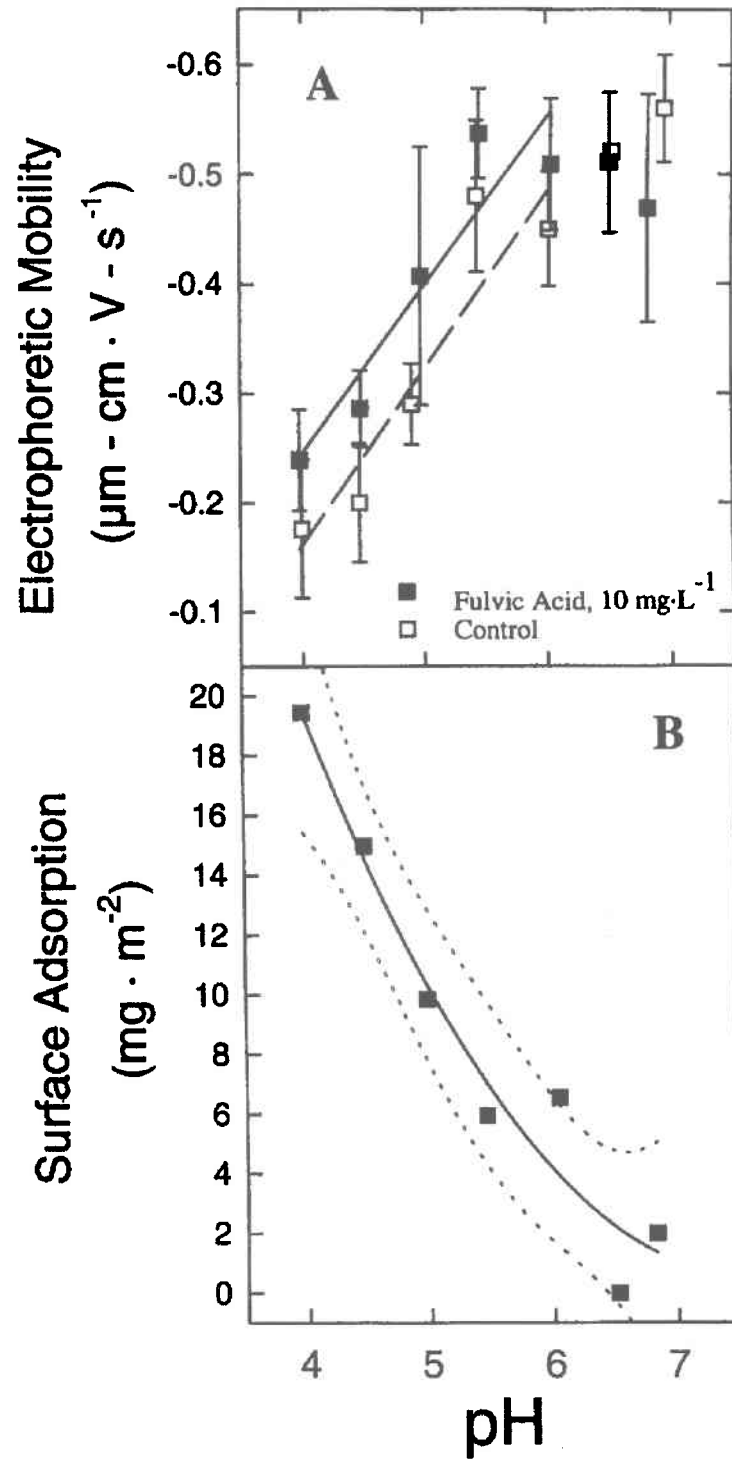
après que le pH se soit stabilisé. La mobilité électrophorétique de *S. capricornutum* augmente de pH 5,3 à 7,3 (Fig. 2.7), et la forme de la courbe est très similaire à celle obtenue pour *S. leopoliensis*. Cependant, la mobilité électrophorétique de *S. capricornutum* à pH 5 est ~ 8 fois supérieure à celle de *S. leopoliensis*, indiquant la présence d'une charge nette négative plus grande à la surface de *S. capricornutum*. Cette différence pourrait donc être en partie responsable de la quantité moins importante d'acide fulvique adsorbé à la surface de *S. capricornutum*, en raison de répulsion électrostatique plus importante.



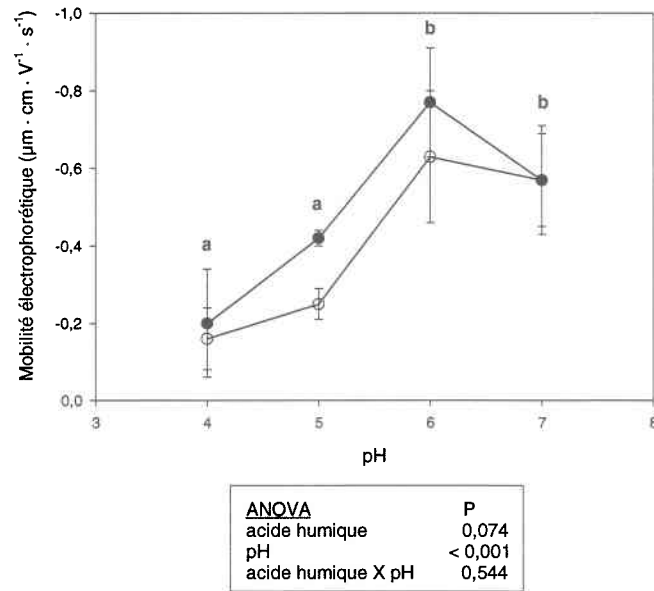
**Figure 2.1:** Profil de la vélocité apparente de sphères de latex (standard de mobilité électrophorétique Coulter<sup>®</sup>, Hialeah, FL, USA) mesurée à travers le canal d'électrophorèse dans NaCl 0,01 M. La courbe pleine est le profil calculé avec une équation parabolique (eq. 2.1) et avec les valeurs de  $V_{\text{moyenne}}$  et  $L$  obtenues par régression non-linéaire. Les lignes pointillées représentent les positions des plans stationnaires, (moyennes  $\pm$  écart type,  $n = 4$ ). Pour l'ensemble des données de mobilité électrophorétique présentées ultérieurement, le nombre de positions a été de 5, afin de limiter le temps d'analyse requis pour ces expériences



**Figure 2.2:** Mobilité électrophorétique (moyennes  $\pm$  écart type,  $n = 4$ ) de *Synechococcus leopoliensis* en absence, ○, et en présence de 4.95 mg C · L<sup>-1</sup> d'acide fulvique Armadale, ●, dans le milieu Fra<sub>t</sub> - NaCl 0,01 M. L'acide fulvique a été mis en solution dans NaOH 0,01 M. Les lettres différentes indiquent des effets significatifs du pH sur la mobilité électrophorétique ( $P < 0,05$ , test de Tukey).



**Figure 2.3:** Mobilité électrophorétique (moyennes  $\pm$  écart type) de *Synechococcus leopoliensis* en absence,  $\square$ , et en présence d'acide fulvique Armadale,  $\blacksquare$ , dans NaCl 0,1 M (A) et adsorption de l'acide fulvique à la surface de l'algue (B) (figure tirée de (Campbell et al., 1997)).



**Figure 2.4:** Mobilité électrophorétique (moyennes  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ) de *Synechococcus leopoliensis* en absence, ○, et en présence de 5,42 mg C · L<sup>-1</sup> d'acide humique Suwannee River, ●, dans le milieu Fra<sub>t</sub> - NaCl 0,01 M. L'acide humique a été mis en solution dans NaOH 0,01 M. Les lettres différentes indiquent des effets significatifs du pH sur la mobilité électrophorétique ( $P < 0,05$ , test de Tukey).



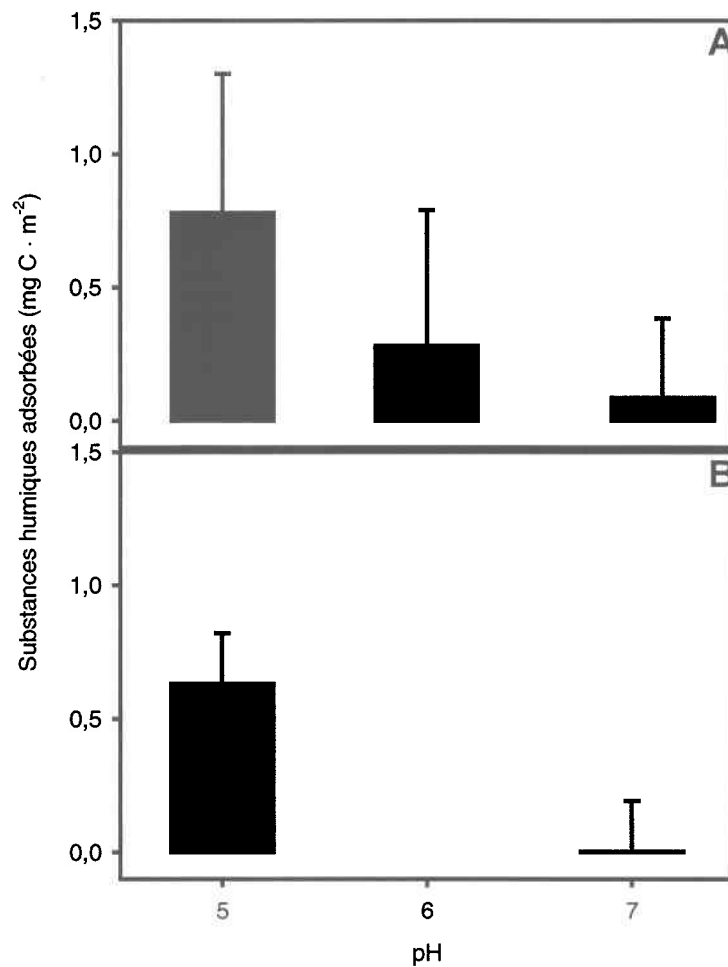


Figure 2.5: Effets du pH sur l'adsorption de l'acide humique (A) et fulvique (B) Suwannee River sur *Selenastrum capricornutum* (moyenne  $\pm$  écart type,  $n \geq 3$ ). La concentration d'acide humique et d'acide fulvique était de 5,4 mg C · L<sup>-1</sup>. La force ionique des solutions pour les expériences avec l'acide humique était inférieure, soit 0,002 M plutôt que 0,01 M.

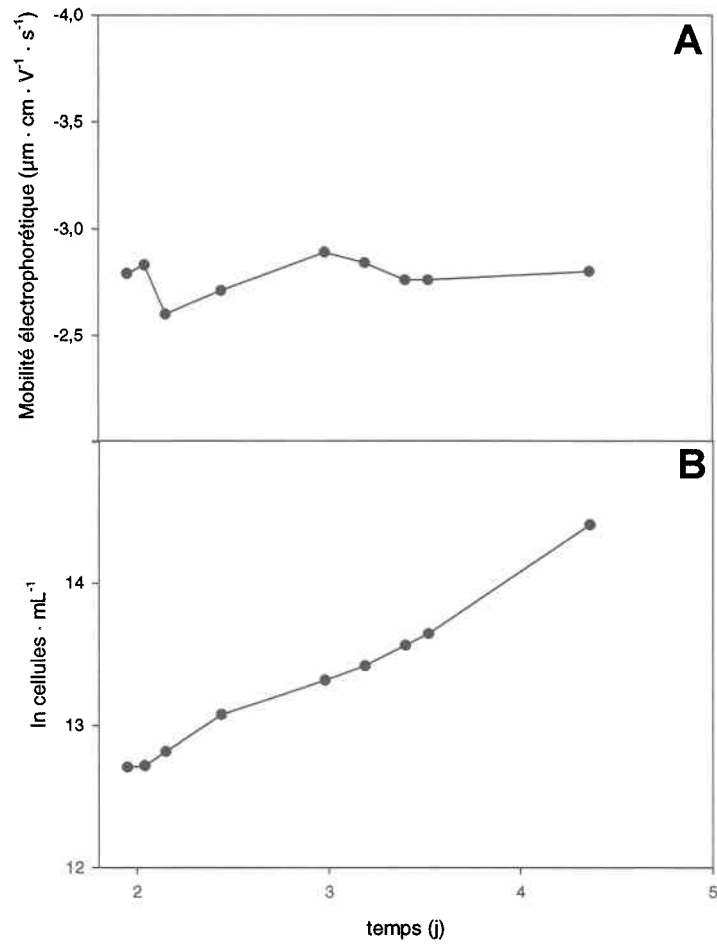


Figure 2.6: Variation de la mobilité électrophorétique (A) et de la croissance (B) de *Selenastrum capricornutum* en fonction du temps de croissance depuis l'inoculation ( $n = 1$ ).

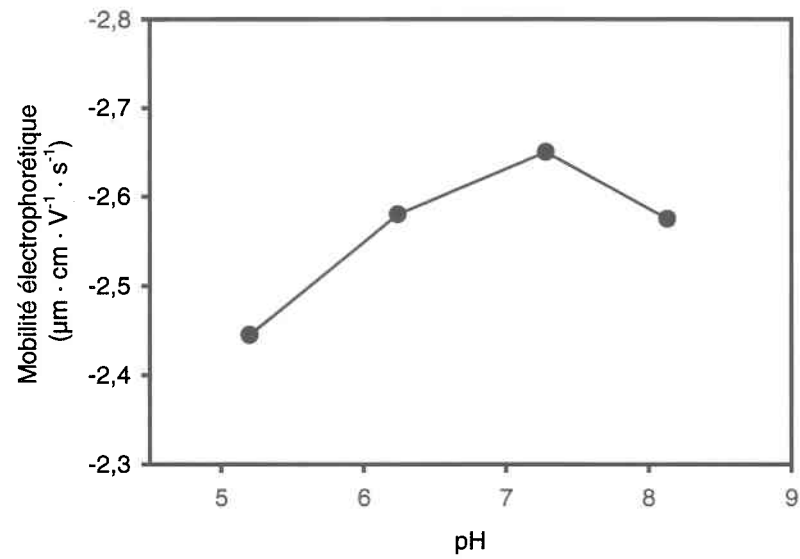


Figure 2.7: Variation de la mobilité électrophorétique de *Selenastrum capricornutum* en fonction du pH dans Fra<sub>t-NaNO<sub>3</sub></sub> ( $n = 1$ ).

### 2.3.2 Temps requis pour l'adsorption et la désorption

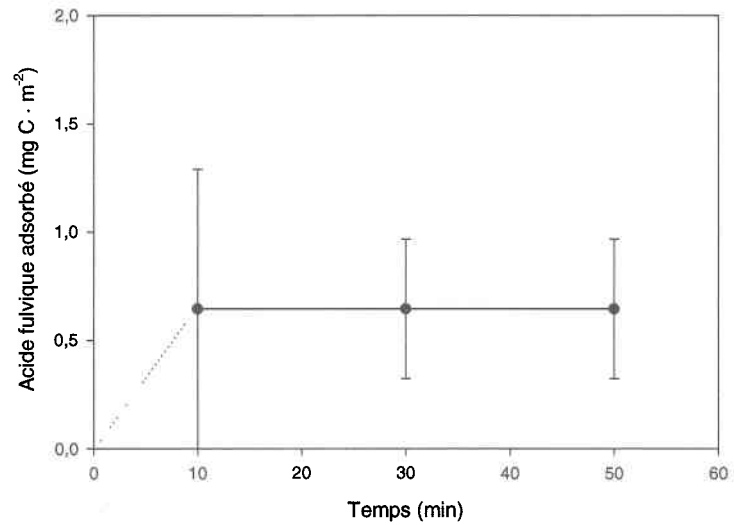
Les résultats d'adsorption présentés (Fig. 2.5) étant pour des expositions allant de 30 min à 100 min, il fallait déterminer s'il y avait un effet de la durée d'exposition sur la quantité de substances humiques adsorbées. De plus, pour pouvoir étudier la prise en charge de métaux en présence de substances humiques adsorbées à temps court (< 20 min), il fallait d'abord étudier la cinétique d'adsorption à la surface des algues. L'adsorption à pH 5 de l'acide fulvique Suwannee River sur *S. capricornutum* n'augmente pas entre 10 et 50 min (Fig. 2.8). La variabilité importante associée à ces mesures résulte de la méthodologie utilisée pour déterminer la quantité d'acide fulvique adsorbé. En effet, la quantité adsorbée est calculée par des différences entre des mesures d'absorbance avant et après l'exposition des algues à l'acide fulvique, et ces différences sont faibles par rapport à la précision des mesures d'absorbance. Compte tenu de cette variabilité, il est difficile de discerner des tendances non équivoques de ces résultats, mais nous présumons néanmoins que l'adsorption est rapide, c'est à dire complète après  $\leq 10$  min. Nous ne savons cependant pas si l'adsorption est réversible et si c'est le cas, si la cinétique de désorption est aussi rapide.

Dans l'espoir d'augmenter la sensibilité de nos mesures directes d'adsorption, nous avons utilisé l'acide humique Suwannee River radiomarqué. L'introduction du groupement  $^{14}\text{C}$ -méthylamine pourrait cependant modifier les interactions de l'acide radiomarqué avec la membrane biologique. Il s'est avéré que les mesures d'adsorption faites à pH 5 et pH 7 avec l'acide radiomarqué donnent des quantités adsorbées plus importantes aux deux pH par rapport à l'acide humique parent (Fig. 2.9). Cette adsorption plus grande pourrait résulter d'une interaction plus grande avec la surface de l'algue des molécules qui ont perdu 1 % de leurs groupements carboxyliques pour des groupements méthylamine, soit par une diminution de la charge nette négative ou par des changements de conformation favorables au sein de la molécule. Cependant, cette adsorption augmentée pourrait également être un artéfact du à la présence de  $^{14}\text{C}$ -méthylamine libre s'étant dissocié de l'acide humique, ou encore, être due à la sensibilité plus grande des mesures faites avec l'acide humique radiomarqué. L'erreur associée aux mesures d'adsorption avec l'acide

humique est relativement importante. Cependant, les causes principales d'irreproductibilité de ces mesures n'ont pas été identifiées précisément, mais cette irreproductibilité pourrait être reliée à la présence de  $^{14}\text{C}$ -méthylamine libre dans les solutions. Il s'est avéré très difficile, voire impossible, d'éliminer toutes traces de  $^{14}\text{C}$ -méthylamine des solutions, puisque ce dernier se dissocie avec le temps de l'acide humique radiomarqué. Or des expériences supplémentaires ont permis de montrer que la  $^{14}\text{C}$ -méthylamine pouvait également être prise en charge par les algues par adsorption et peut-être également par absorption. Néanmoins, l'utilisation de l'acide humique radiomarqué pourra permettre d'estimer la cinétique d'adsorption et de désorption à / de la surface de *S. capricornutum*.

L'acide humique radiomarqué s'adsorbe rapidement à la surface de l'algue, puisqu'il n'y a pas d'augmentation de la quantité d'acide humique adsorbée de 4 à 100 min (Fig. 2.10A), ce qui correspond bien aux résultats obtenus avec l'acide fulvique non-radiomarqué, soit aucune augmentation au delà de 10 min. Le revêtement d'acide humique semble être fortement retenu à la surface de l'algue, puisque lorsque *S. capricornutum* pré-exposée à l'acide humique radiomarqué est resuspendue dans le même milieu d'exposition à pH 5, mais en absence d'acide humique, la quantité d'acide humique adsorbée demeure constante pendant au moins 40 min (Fig. 2.10B). Cette irréversibilité de l'adsorption de la matière organique naturelle est également observée sur des surfaces minérales, par exemple des oxydes de fer (Gu et al., 1995) et des argiles (Jayasundera et Torrents, 1997), bien que les types d'interactions impliqués soient vraisemblablement différents. Cependant, lorsque les algues sont resuspendues à pH 10,2, il y a désorption rapide de ~ 85 % de l'acide humique adsorbé (Fig. 2.10B, cercle ouvert). Dans leurs expériences sur l'association d'un acide humique à la surface d'un champignon unicellulaire, Zhou et Banks (1993) ont également observé des pourcentages de désorption similaires, de 85 à 95 %, avec une solution de NaOH 0,1 M. Ces résultats suggèrent donc qu'un faible pourcentage de l'acide humique, < 10 %, est adsorbé de façon irréversible et ne peut être désorbé même à des pH très basiques. Avena et Koopal (1998) ont également observé une désorption rapide d'un acide humique à une surface

d'oxydes de Fe lors d'une augmentation de pH, alors que la désorption sans changement de pH dans une solution ne contenant pas d'acide humique était très lente.



**Figure 2.8:** Cinétique de l'adsorption de l'acide fulvique Suwannee River à la surface de *Selenastrum capricornutum* à pH 5 (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ).

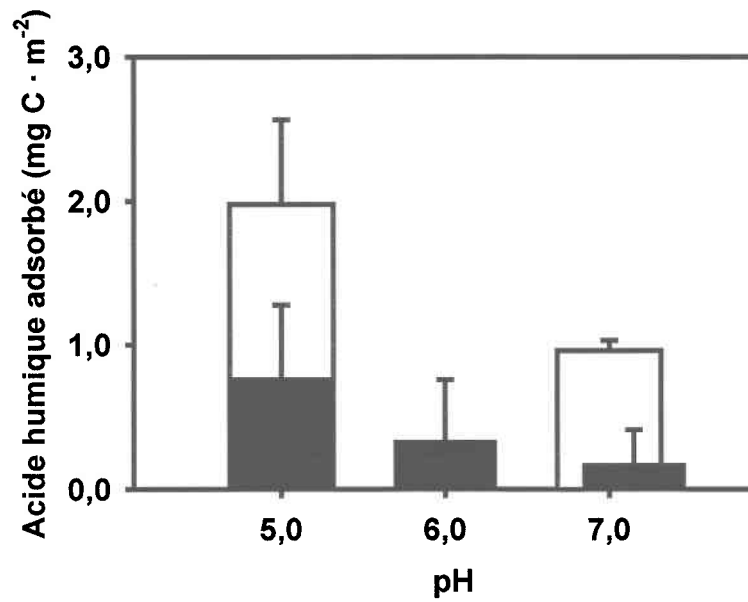
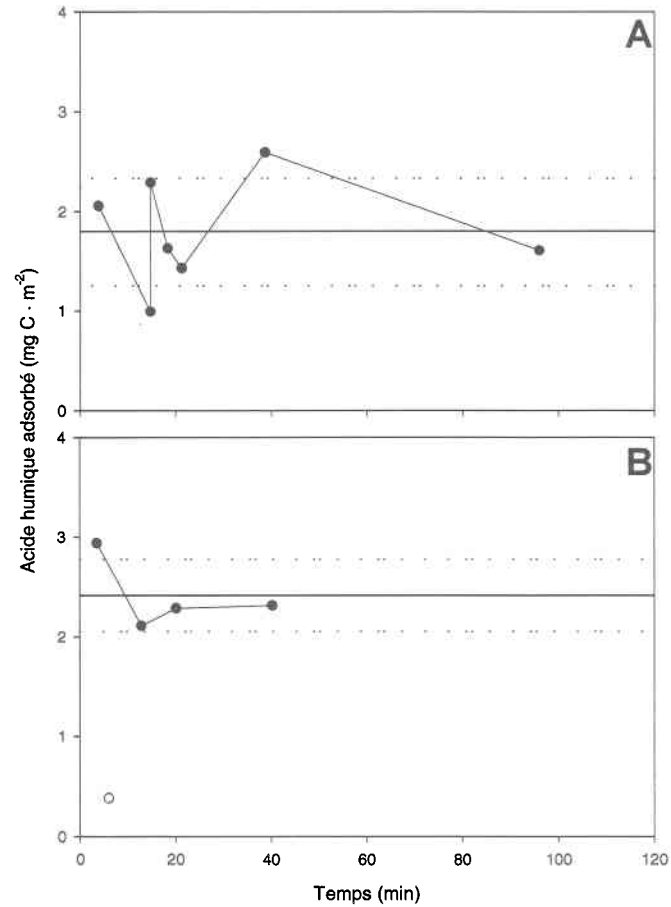


Figure 2.9: Adsorption de l'acide humique Suwannee River radiomarqué (barres vides) et de l'acide humique parent (barres noires) à la surface de *Selenastrum capricornutum* en fonction du pH (moyenne  $\pm$  écart type,  $n \geq 3$ ).





**Figure 2.10:** Cinétique de l'adsorption (A) et de la désorption (B) de l'acide humique Suwannee River radiomarqué à  $1/\text{m}^2$  de la surface de *Selenastrum capricornutum* à pH 5, ●, et à pH 10,2, ○ ( $n = 1$ ). La ligne pleine indique la moyenne et les lignes pointillées indiquent la moyenne + l'écart-type et la moyenne - l'écart-type.

### 2.3.3 Types d'interactions

Nous avons d'abord répété avec les sphères de latex les mesures de mobilité électrophorétique qui avaient été faites pour *S. leopoliensis*. Dans la gamme de pH étudiée, de 4 à 7, la mobilité électrophorétique des particules de latex (Fig. 2.11) est plus grande que pour *S. leopoliensis* et *S. capricornutum*, ce qui indique une charge nette négative plus grande à la surface des sphères de latex. La mobilité électrophorétique des sphères de latex augmente significativement avec le pH ( $P < 0,001$ , ANOVA bifactorielle  $2 \times 4$ ) et les effets de l'acide humique sur la mobilité électrophorétique dépendent du pH ( $P = 0,023$ , ANOVA bifactorielle  $2 \times 4$ ). La mobilité électrophorétique est significativement diminuée à pH 4 en présence d'acide humique ( $P < 0,001$ , test de Tukey). Pour *S. leopoliensis*, la mobilité était augmentée à bas pH en présence d'acide humique, ce qui suggère que la charge nette de l'acide humique est inférieure à la charge à la surface des sphères de latex et supérieure à la charge à la surface de *S. leopoliensis*.

À pH 5 et 6, il y a environ  $0,3 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  d'acide humique adsorbé à la surface des sphères de latex (Fig. 2.12), alors que la mobilité électrophorétique à ces pH est identique en absence ou en présence d'acide humique (Fig. 2.11). Ainsi les mesures de mobilité électrophorétique ne permettent pas toujours de révéler la présence de substances humiques adsorbées. L'adsorption n'étant pas mesurable à pH 7, il y a donc également une augmentation de l'adsorption avec une diminution de pH, comme c'est le cas pour les algues. De plus, comme pour l'adsorption de l'acide fulvique sur *S. capricornutum*, la quantité d'acide humique adsorbée est constante pour des expositions de 10 à 85 min ( $P = 0,116$ , ANOVA factorielle  $1 \times 3$ ; Fig. 2.13), ce qui indique que l'adsorption de l'acide humique à la surface des particules de latex est également rapide, complète dans  $< 10$  min. À pH 5, la quantité d'acide humique adsorbée à la surface des particules de latex est plus faible que la quantité adsorbée à la surface de *S. capricornutum*, qui est elle-même beaucoup plus faible que la quantité d'acide fulvique Armadale adsorbée à la surface de *S. leopoliensis*. Cet ordre croissant de quantité adsorbée, latex  $< S. capricornutum < S. leopoliensis$  correspond à l'ordre décroissant des charges nettes négatives superficielles, telles qu'estimées par la mobilité électrophorétique, soulignant ainsi l'importance des

interactions électrostatiques dans le processus d'adsorption des substances humiques, en plus des interactions hydrophobes.

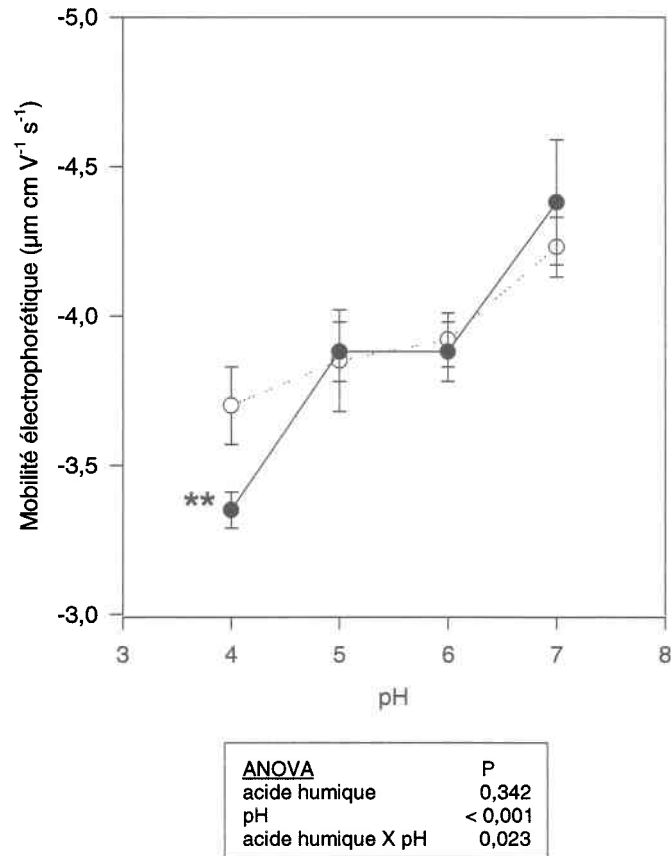
Pour mettre en évidence la contribution des interactions hydrophobes dans le processus d'adsorption, les mesures de mobilité électrophorétique des sphères de latex ont été répétées à pH 4 en présence de Triton X-100 (Fig. 2.14). Le Triton X-100 est un surfactant non-ionique couramment utilisé pour réduire l'hydrophobicité de la surface des particules de latex. L'adsorption de ce surfactant non chargé réduit la mobilité électrophorétique des sphères de latex en cachant « screening » les charges négatives à la surface des particules de latex : la mobilité électrophorétique en absence d'acide humique diminue de  $-3,7 \pm 0,1$  à  $-1,16 \pm 0,08 \mu\text{m} \cdot \text{cm} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Cependant, alors qu'en absence de Triton X-100 la mobilité électrophorétique des sphères de latex est significativement diminuée en présence de l'acide humique ( $P = 0,013$ , test de Student), en présence de Triton X-100, l'acide humique ne modifie pas significativement la mobilité électrophorétique ( $P = 0,241$ , test de Student). Ainsi l'occupation des domaines hydrophobes à la surface des particules de latex par le surfactant semble inhiber l'adsorption de l'acide humique, ce qui suggère que l'acide humique s'associe également à ces domaines par des interactions hydrophobes.

Pour confirmer cette conclusion, nous avons mesuré directement la quantité d'acide humique adsorbée à pH 4 à la surface des sphères de latex en présence de concentrations croissantes de Triton X-100 (Fig. 2.15). Bien que la quantité d'acide humique mesurée dans le contrôle apparaisse élevée par rapport aux quantités mesurées lors de l'expérience de cinétique (Fig. 2.13), l'adsorption de l'acide humique est diminuée en présence de Triton X-100 ( $P = 0,017$ , ANOVA factorielle 1 x 4). La légère augmentation de la quantité adsorbée à 0,5 et 1,0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de Triton X-100 pourrait correspondre à la saturation complète de la surface des sphères de latex par le surfactant (BastosGonzalez et al., 1996) et à la formation de complexes ternaires latex-Triton X-100-acide humique en raison des interactions hydrophobes possibles entre la couche superficielle de Triton X-100 et l'acide humique.

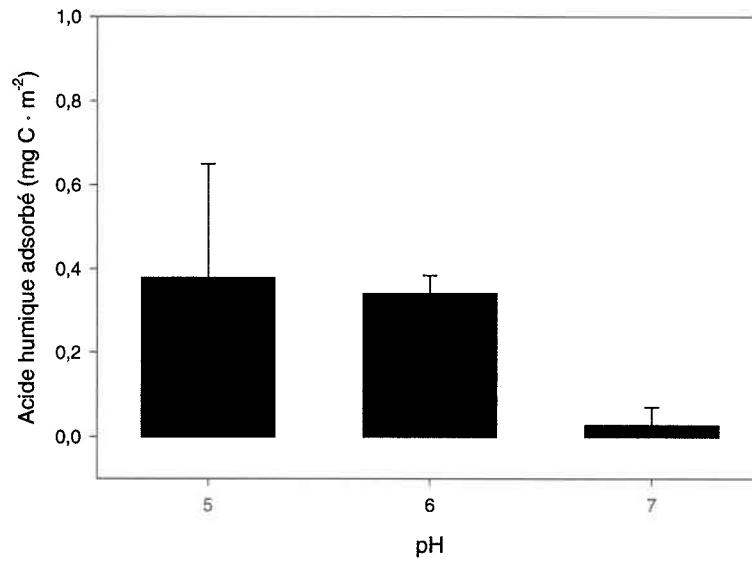
En plus des interactions hydrophobes, la formation de liens hydrogènes entre la surface biologique et les substances humiques est également susceptible de contribuer au processus d'adsorption. Dans l'espoir d'inhiber la formation de liens hydrogène, nous avons répété les mesures de mobilité électrophorétique des sphères de latex à pH 4 dans l'eau lourde. Comme c'était le cas dans l'eau, la mobilité électrophorétique dans l'eau lourde est significativement modifiée en présence de l'acide humique ( $P < 0,001$ , test de Student) (Fig. 2.16). Cependant, ces données ne peuvent être interprétées davantage puisque le conductivimètre, dont est équipé le vélocimètre utilisé pour les mesures de mobilité électrophorétique, n'a pas été calibré dans l'eau lourde. De plus, les mesures ont été corrigées uniquement pour la différence de viscosité et non pas pour la différence de constante diélectrique.

La quantité d'acide humique adsorbée dans l'eau lourde n'est pas significativement différente de la quantité adsorbée dans l'eau ( $P = 0,656$ , test de Student) (Fig. 2.17). Si notre hypothèse de départ que la formation de liaisons hydrogène est inhibée dans l'eau lourde est valable, la similitude entre les résultats obtenus dans l'eau et dans l'eau lourde suggère que la formation de liens hydrogènes contribue peu au processus d'adsorption. Cependant, nous n'avons pu trouver aucune indication dans la littérature permettant de conclure que la formation de liens hydrogène serait réduite dans l'eau lourde. Joesten et Schaad (1974) ont relevé des données d'enthalpie pour la formation de liens deutérium intramoléculaires et extramoléculaires. Dans le cas de liens intramoléculaires, la force relative des liens deutérium par rapport aux liens hydrogène varie selon le système étudié. Pour des liens hydrogène extramoléculaires, les liens deutérium sont plus forts dans le cas de bases faibles et les liens hydrogène sont plus forts pour des basicités plus fortes. Némethy et Scheraga (1964) ont comparé plusieurs paramètres physico-chimiques de  $H_2O$  et  $D_2O$  liquides selon lesquels la quantité de liens deutérium est plus importante en raison d'une fréquence vibrationnelle plus faible et d'une force plus grande du lien deutérium. Ainsi, nous ne pouvons conclure à l'absence de contribution des liens hydrogène au processus d'adsorption en nous basant sur le fait qu'à l'équilibre, les quantités de substances humiques adsorbées ne sont pas significativement différentes dans le  $D_2O$  et dans l'eau. Bien qu'uniquement efficaces à courte distance, il y aura

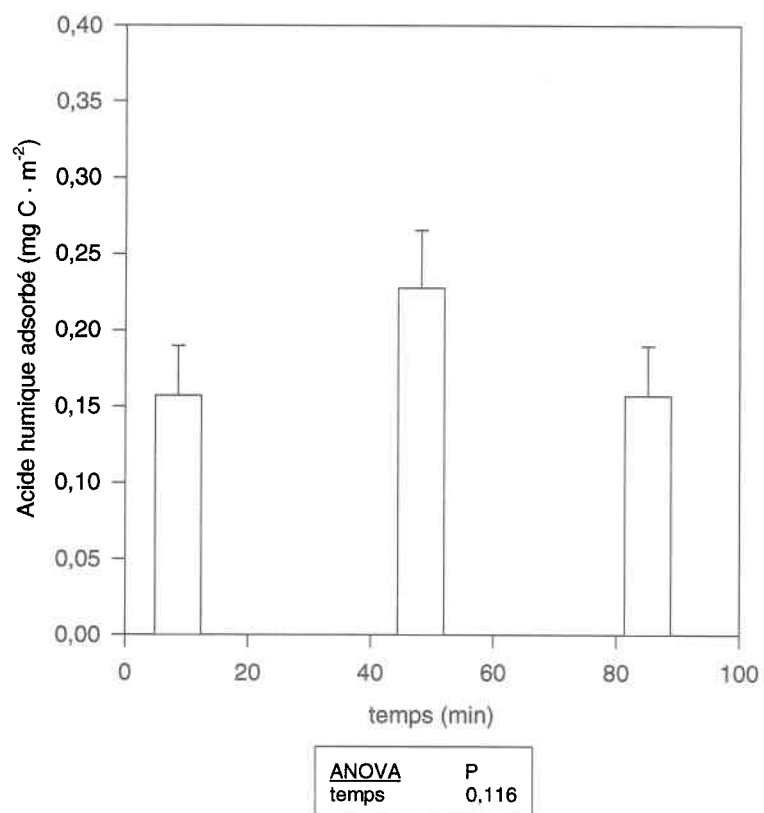
sûrement formation de liens hydrogène entre les surfaces biologiques et les substances humiques. Ces liens pourrait être relativement importants puisqu'en raison des masses moléculaires élevées des substances humiques, celles-ci pourraient former plusieurs liens par molécule (Tipping, 1990). Des liens hydrogène pourront se former, une fois que les substances humiques seront adsorbées à la surface en raison d'interactions hydrophobes initiales, puisque ce dernier type d'interactions peut agir à plus grande distance.



**Figure 2.11:** Mobilité électrophorétique de sphères de latex (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 3$ ) dans NaCl 0,1 M en absence,  $\circ$ , et en présence d'acide humique Suwannee River ( $5,42 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $\bullet$ . Les sphères de latex ont des groupements de surface carboxyliques et sulfates et un diamètre de  $1,5 \text{ } \mu\text{m}$ . À pH 4, la mobilité électrophorétique est significativement affectée par la présence de l'acide humique ( $P < 0,05$ , test de Tukey).

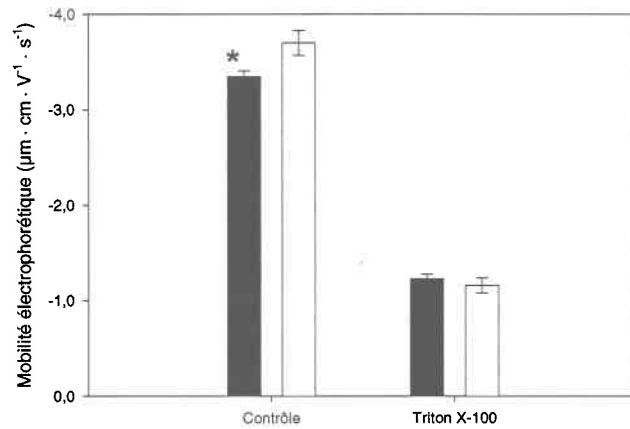


**Figure 2.12:** Adsorption de l'acide humique Suwannee River à la surface de sphères de latex (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 2$ , sauf pour pH 6 où  $n = 3$ ) en fonction du pH (durée d'exposition de 60 min).

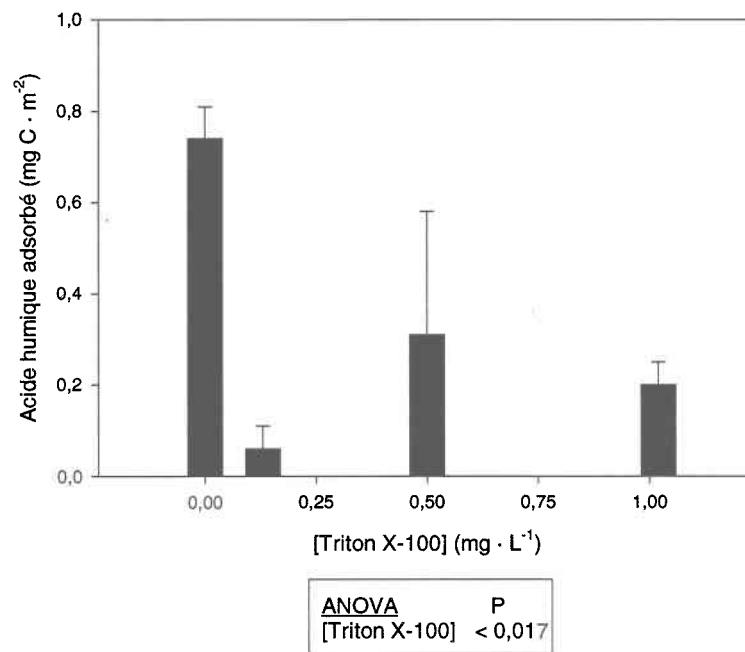


**Figure 2.13:** Adsorption de l'acide humique Suwannee River à la surface de sphères de latex à pH 4 (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 3$ ) en fonction du temps d'exposition.





**Figure 2.14:** Mobilité électrophorétique de sphères de latex (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 3$ ) dans NaCl 0,1 M en présence, barres noires, et en absence, barres vides, d'acide humique Suwannee River ( $5,4 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ ) et en présence de  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de Triton X-100. En absence de Triton X-100, la mobilité électrophorétique est significativement affectée par la présence de l'acide humique ( $P = 0,013$ , test de Student).



**Figure 2.15:** Adsorption de l'acide humique Suwannee River à la surface de sphères de latex (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 3$ , sauf pour  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  où  $n = 2$ ) en présence de Triton X-100 à pH 4 (durée d'exposition de 60 min).

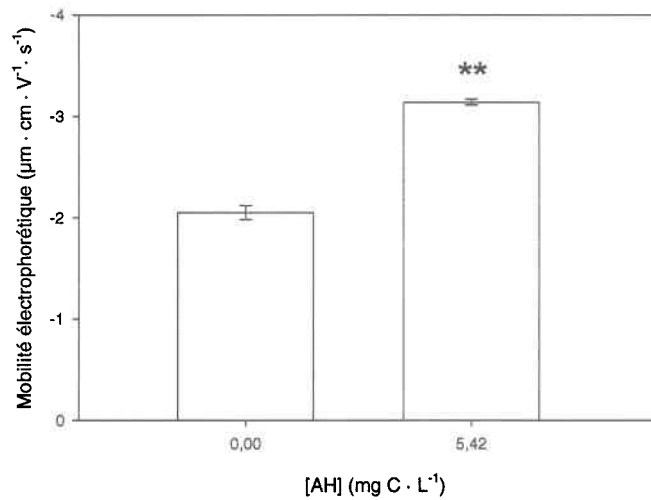
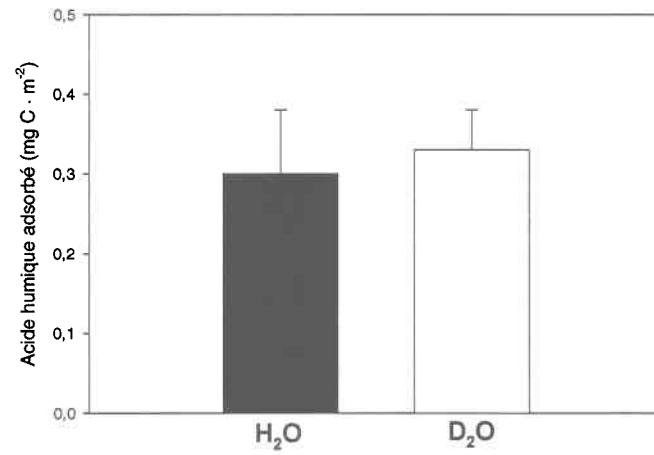


Figure 2.16: Mobilité électrophorétique de sphères de latex (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 3$ ) dans  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$  0,1 M et pD 4 en présence ou en absence d'acide humique Suwannee River ( $5,4 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ ). La présence de l'acide humique affecte significativement la mobilité électrophorétique ( $P < 0,001$ , test de Student).



**Figure 2.17:** Adsorption de l'acide humique Suwannee River à la surface de sphères de latex (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 3$ ) dans l'eau et dans l'eau lourde à pH 4 (durée d'exposition de 60 min).

### 3 Influence des substances humiques adsorbées sur la perméabilité membranaire

#### 3.1 Introduction

Compte tenu des caractéristiques de surfactant des substances humiques, leur association avec les membranes biologiques est susceptible de modifier la structure et la fluidité de la bi-couche lipidique au point de modifier la perméabilité membranaire cellulaire (Visser, 1982). En science des sols, on reconnaît depuis longtemps que les substances humiques augmentent la perméabilité membranaire des plantes.

Par exemple, plusieurs chercheurs ont observé une augmentation de la prise en charge de nutriments par les plantes en présence de substances humiques et ont conclu que les substances humiques augmentent la perméabilité membranaire cellulaire, ex. (Chaminade et Blanchet, 1953, Khristeva, 1953, Lee et Bartlett, 1976). Samson et Visser (1989) ont démontré une augmentation de l'efflux de K de cellules de pommes de terre en présence d'acide humique isolé de tourbe. Visser (1985) a également étudié les effets physiologiques des substances humiques sur les bactéries du sol et a conclu que la membrane cellulaire est le principal site de l'action physiologique des substances humiques, puisque les effets observés étaient similaires à ceux induits par des surfactants synthétiques.

Puisque les substances humiques de sols augmentent la perméabilité membranaire chez les plantes, il est également plausible qu'elles aient des effets similaires chez le phytoplancton. Cependant, peu d'expériences ont permis jusqu'à présent de mettre en évidence de tels effets chez les algues. Zientara (1983) a étudié le potentiel transmembranaire chez des cellules internodales de la macroalgue *Nitellopsis obtusa* et a proposé que l'action physiologique principale des substances humiques avait lieu au niveau de la perméabilité du plasmalemma, particulièrement sur les pompes à proton électrogènes. Des effets sur la diffusion passive sont également envisageables; Parent et al. (1996) ont démontré que l'acide fulvique Armadale augmente le taux de prise en charge du sorbitol par l'algue verte unicellulaire *Chlorella pyrenoidosa*. Dans ce contexte, la prise en charge par diffusion passive de métaux sous forme de complexes

lipophiles (Phinney et Bruland, 1994) serait également susceptible d'être augmentée en présence de substances humiques. Chez le phytoplancton, de tels effets potentiels des substances humiques aquatiques, similaires aux effets de surfactants sur la perméabilité membranaire, pourraient être le résultat d'interactions avec la fraction lipidique de la membrane et / ou les protéines responsables du transport facilité de certains métabolites.

Nous avons voulu démontrer une augmentation, en présence de substances humiques aquatiques, de la diffusion passive à travers la membrane de cellules d'algue et à travers des membranes modèles de phospholipides. Nous avons étudié les effets du pH, de la nature des substances humiques (acide humique *versus* acide fulvique) et de leurs origines (aquatique *versus* terrestre). Nous avons de plus modifié la composition en phospholipides des membranes modèles étudiées, ceux-ci ayant été choisis pour être représentatifs de la composition membranaire des algues vertes.

### 3.2 Matériel et méthodes

Deux approches expérimentales utilisant des sondes fluorescentes ont été utilisées pour mettre en évidence des effets de substances humiques sur la diffusion passive à travers les membranes biologiques. Nous avons d'abord étudié *in vivo* la prise en charge d'une sonde non-polaire par *S. capricornutum*. La prise en charge a été mesurée par la formation d'un produit fluorescent lors de l'hydrolyse enzymatique intracellulaire de la sonde. Dans une seconde série d'expériences, nous avons utilisé des vésicules de phospholipides comme modèles des membranes de cellules de phytoplancton; les fuites d'une sonde fluorescente des vésicules ont été mesurées. Ce système de membranes biologiques modèles nous a permis d'étudier l'influence de la composition membranaire et de démontrer des effets sur la bicouche de phospholipides sans interférence avec les protéines ou les autres constituants membranaires.

### 3.2.1 Perméabilité de la membrane d'une algue verte en présence de substances humiques

*S. capricornutum* a été cultivée aux pH expérimentaux, pH 5 ou pH 7, dans le milieu  $\text{Fra}_{\text{NaNO}_3}$  (tableau 2.1) tamponné avec 0,01 M MES (pH 5,0) ou 0,01 M HEPES (pH 7,0). Les cellules ont été récoltées tel que décrit précédemment (section 2.2.2.1), et resuspendues dans le milieu d'exposition,  $\text{Fra}_{\text{t-NaNO}_3}$  (tableau 2.1), afin d'obtenir une concentration cellulaire finale dans les milieux d'exposition de  $4,4 \times 10^5$  cellules  $\cdot \text{mL}^{-1}$ . Les solutions mères de substances humiques ont été préalablement filtrées avec des filtres seringues de  $0,45 \mu\text{m}$  de porosité (Ion Chromatography Acrodisc<sup>®</sup>, Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, MI). La sonde diacétate de fluorescéine (FDA) a été obtenue de Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA). Des solutions mères de FDA ont été préparées quotidiennement dans l'acétone et de faibles volumes de celles-ci ont été ajoutés aux milieux d'exposition afin d'obtenir une concentration aqueuse finale de FDA de  $3 \mu\text{M}$ . La prise en charge par diffusion passive de la sonde neutre et non-fluorescente FDA a été mesurée en suivant l'apparition de la molécule fluorescente fluorescéine, produite par l'hydrolyse intracellulaire du FDA par des estérases non-spécifiques (Snell et al., 1996). Les estérases sont un ensemble d'enzymes présents chez les cellules animales et végétales responsables du clivage des liaisons ester au niveau intracellulaire. L'hydrolyse a été mesurée à intervalles réguliers pendant 10 minutes avec une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 530 nm. En absence de cellules, aucune auto-hydrolyse de FDA n'a été mesurée au cours des 10 premières minutes. L'intensité de la fluorescence a été corrigée pour la contribution des substances humiques elle-mêmes. Les taux initiaux d'hydrolyse de FDA ont été obtenus de la pente de la régression linéaire de l'intensité de la fluorescence en fonction du temps ( $r^2 \geq 0,96$ ).

Pour caractériser l'hydrolyse de FDA par *S. capricornutum*, l'activité des estérases a également été étudiée à pH 5 en fonction de la concentration externe de FDA. Nous avons effectué une régression nonlinéaire des données de taux initiaux d'hydrolyse de FDA,  $v_0$ , en fonction de la concentration externe de FDA (Jandel Scientific Sigmaplot Version

3,02, San Rafael, CA) avec comme paramètres la constante apparente de Michaelis-Menten,  $K_m$ , et le taux maximal d'hydrolyse initiale,  $V_{max}$  :

$$v_0 = \frac{V_{max}[FDA]}{K_m + [FDA]} \quad (3.1)$$

Afin de comparer les résultats obtenus avec les substances humiques aquatiques Suwannee River, nous avons également choisi d'utiliser, comme substances humiques isolées du sol, les acides fulviques Laurentien et Armadale obtenus de Ecolinc Inc. (Roxboro, Québec). Ces deux acides fulviques se dissolvent aisément dans les solutions aqueuses aux pH étudiés. Le contenu en carbone organique de l'acide fulvique Laurentien a été obtenu de Wang et al. (1990).

### 3.2.2 Comparaison de l'activité de surface de substances humiques par polarographie

Les activités de surface des substances humiques étudiées ont été comparées en mesurant la diminution du courant capacitif d'une électrode de mercure; cette diminution découle de la réduction de la capacité de la double couche de l'électrode due à l'adsorption des substances humiques à la surface de l'électrode. La méthodologie utilisée a été proposée par Cosovic et Vojvodic (1982) pour mesurer les substances tensioactives dans l'eau de mer, mais l'accumulation des substances humiques et le début des balayages ont été faits à  $-0,4$  mV plutôt qu'à  $-0,6$  mV. Les mesures de courants capacitifs ont été effectuées sur un système polarographique à trois électrodes (Metrohm 663 VA stand, Metrohm Ltd., Herisau, Suisse) et avec un analyseur polarographique, BAS 100B, connecté à un préamplificateur, BAS PA-1 (Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, IN, USA). Nous avons utilisé comme électrode de travail une électrode à goutte de mercure suspendue, comme électrode de référence une électrode Ag/AgCl et finalement une contre-électrode de carbone vitreux. Les mesures ont été effectuées soit à pH 5 soit à pH 7 dans des solutions de NaCl 0,5 M, qui contenaient également les autres ions majeurs du milieu Fraquil. Le NaCl utilisé comme électrolyte de support a été préalablement chauffé à  $450$  °C pendant plusieurs heures afin d'éliminer toutes traces de matière organique. De



plus, toute la verrerie a été trempée dans l'acide sulfochromique avant d'être utilisée. Les cellules utilisées étaient en contact avec l'atmosphère et les solutions n'ont pas été dégazées. Le temps d'accumulation des substances humiques a été de 60 s à  $-0,4$  V. Au cours des analyses, le potentiel alternatif appliqué était de 10 mV à 230 Hz; le balayage a été enregistré de  $-0,4$  à  $1,8$  V à une vitesse de  $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  et une sensibilité de  $1 \mu\text{A} \cdot \text{V}^{-1}$ . Le courant capacitif était le courant initial mesuré à  $-0,415$  V. Les concentrations des substances humiques testées étaient les mêmes que les concentrations les plus élevées testées pour la prise en charge de FDA, soit  $4,5 - 5,5 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ .

### 3.2.3 Mesure de la perméabilité de vésicules de phospholipides

Les solutions mères de lipides ont été préparées en dissolvant chaque lipide dans une solution de benzène/méthanol, 85/15 (v/v) et les mélanges de lipides ont été effectués en combinant des volumes appropriés de solutions mères. Les phospholipides 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC) et 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol (POPG) ont été obtenus de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA). La sonde sulphorhodamine B (SRB) a été obtenue de Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA). Les lipides ont été lyophilisés des solutions de benzène/méthanol et entreposés jusqu'à leur utilisation. Des solutions fraîches de lipides furent préparées quotidiennement en hydratant les phospholipides dans des tampons contenant la sonde SRB (50 mM SRB, 5 mM EDTA, 15 mM NaCl) et dont le pH avait été ajusté à soit pH 5,6 (50 mM acide 2-[N-morpholino]ethanesulphonique, MES) ou pH 7,6 (50 mM acide N-[2-hydroxyethyl]pipérazine-[2-ethanesulphonique], HEPES). Ces deux pH ont été sélectionnés en raison de leur représentativité des eaux naturelles et parce nous avons montré (chapitre 2) que la quantité de substances humiques adsorbées aux surfaces biologiques est susceptible d'augmenter de façon importante entre pH 7,6 et pH 5,7. Des vésicules unilamellaires (LUV) ont été préparées selon la méthode décrite par Benashir et al. (1997) par extrusion de la suspension de lipides à travers des filtres en polycarbonate d'une porosité de 100 nm. La concentration des solutions mères de phospholipides a été déterminée par la méthode de Fiske-SubbaRow (1925). Les vésicules de phospholipides contenant la sonde SRB ont par la suite été séparées de la sonde libre par

chromatographie par exclusion de taille sur un gel Sephadex G-50 fin, (Pharmacia LKB, Uppsala, Suède), imbibé des tampons isotoniques externes (5 mM EDTA, 90 mM NaCl et 50 mM MES, pH 5,8 ou 50 mM HEPES, pH 7,6). Les vésicules éluées ont été diluées dans le même tampon isotonique externe afin d'obtenir une concentration finale de lipides dans la cuvette de ~ 10-20  $\mu$ M.

Les expériences de fuite de la sonde ont été effectuées en mesurant la libération de SRB, tel que décrit par Benashir et al. (1997). Les fuites de SRB ont été mesurées en suivant l'augmentation de l'intensité de la fluorescence après que les substances humiques aient été ajoutées aux suspensions de vésicules. Après des pertes rapides de la sonde au cours des premières minutes, la fluorescence devient ensuite presque constante. L'intensité de la fluorescence utilisée pour calculer les pertes ( $I_F$ ) a été mesurée une fois ce plateau atteint. Puisque la concentration interne élevée (50 mM) de la sonde encapsulée entraîne une auto-extinction de la fluorescence, le bruit de fonds de fluorescence de la dispersion de vésicules est faible ( $I_B$ ). L'efficacité de l'auto-extinction de la fluorescence ( $Q$ ) a été calculée pour chaque mesure avec l'équation suivante :

$$Q = \left( 1 - \frac{I_B}{I_T} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

où  $I_T$  est l'intensité de la fluorescence totale mesurée après la rupture complète de toutes les vésicules suite à l'addition de Triton X-100 (0,1 % v/v). L'efficacité de l'auto-extinction a été utilisée comme un indicateur du bon état des vésicules et elle a toujours été entre 80 et 95 %. De faibles volumes des solutions de substances humiques ont été ajoutés aux suspensions de vésicules afin d'obtenir chacune des concentrations testées. Si l'imperméabilité des vésicules est affectée par des interactions avec les substances humiques, il y aura fuite de SRB vers le milieu externe où la dilution entraînera une augmentation de la fluorescence. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'intensité totale de la fluorescence ( $I_T$ ). Le pourcentage de SRB libérée a été calculé selon l'équation suivante, en utilisant l'intensité de la fluorescence mesurée après 10 min d'exposition ( $I_F$ ) :

$$\% \text{ perte} = 100 (I_F - I_B) / (I_T - I_B) \quad (3.3)$$

Les mesures de fluorescence ont été faites à 25°C après agitation, à l'aide d'un spectromètre SPEX Fluorolog-2. L'intensité de fluorescence de la sonde SRB a été mesurée avec une longueur d'onde d'excitation de 565 nm, une longueur d'onde d'émission de 586 nm et un temps de réponse de 0,3 s. Les trajets de la bande d'excitation et d'émission ont été ajustés à 1,5 et 0,5 nm respectivement. Lors d'expériences contrôles à pH 5,7, nous avons mesuré une légère diminution de la fluorescence de SRB en présence de l'acide humique et de l'acide fulvique. Pour des solutions de 1 µM de SRB, la réduction était de 10 % et 3 % en présence de ~ 40 mg C · L<sup>-1</sup> d'acide humique et fulvique respectivement. À pH 7,6, l'inhibition de la fluorescence par les substances humiques était plus importante : 27 % en présence de 180 mg C · L<sup>-1</sup> d'acide humique et 16 % en présence de 430 mg C · L<sup>-1</sup> d'acide fulvique. Cependant, ces interférences n'ont pas affecté significativement les résultats des expériences de fuites puisque les résultats de ces expériences sont exprimés en pourcentage de l'intensité de la fluorescence totale après la libération de toute la sonde SRB à chacune des concentrations de substances humiques testées.

#### 3.2.4 Prise en charge par diffusion passive de Cd(DDC)<sub>2</sub><sup>0</sup>

Pour évaluer si la prise en charge de métaux par diffusion passive était également augmentée en présence de substances humiques adsorbées, nous avons suivi la prise en charge du complexe Cd-diéthylthiocarbamate, Cd(DDC)<sub>2</sub><sup>0</sup>, par *S. capricornutum* à pH 5, en présence d'acide fulvique et humique Suwannee River. Le DDC<sup>-</sup> forme avec le Cd un complexe très stable et lipophile. Compte tenu du poids moléculaire relativement faible et du caractère lipophile de ce complexe, il est attendu que celui-ci sera pris en charge par les algues unicellulaires par diffusion passive, tel que démontré par Phinney et Bruland (1994) pour l'algue verte *Thalassiosira weissflogii*. Une solution mère de DDC 4,9 mM a été préparée dans du méthanol grade HPLC. Cette solution mère a été utilisée pour obtenir une concentration aqueuse finale de DDC de 1 µM dans les milieux d'exposition. Pour le Cd, une solution de <sup>109</sup>Cd de 1,57 mCi · µg<sup>-1</sup> (Amersham Pharmacia

Biotech, Baie d'Urfé, Québec) a été utilisée pour obtenir une concentration totale finale de Cd de 0,4 nM. Étant donné la très forte constante d'affinité entre le DDC et le Cd, nous pouvons supposer que dans nos milieux expérimentaux plus de 99 % du Cd sera complexé par le DDC (Phinney et Bruland, 1994), et que même en présence d'acide fulvique et humique, la spéciation du Cd sera contrôlée par le DDC.

Nous avons d'abord étudié la cinétique de la prise en charge du  $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$  en absence de substances humiques. Une suspension mère d'algue a été préparée en récoltant par centrifugation les algues à la fin de leur phase de croissance exponentielle. Elles ont ensuite été rincées puis resuspendues dans le milieu d'exposition simplifié  $\text{Fra}_{\text{NaNO}_3}$ . Après des expositions de 0, 10, 20 et 30 min, les algues ont été recueillies sur deux membranes superposées de polycarbonate de 0,4  $\mu\text{m}$  de Poretics® (Osmonics Inc, Livermore, CA, USA), puis rincées avec 3 x 10 ml d'eau ultrapure. Les filtres recueillis ont été comptés au compteur  $\gamma$  (Wizard 1480, Wallac, Turku, Finlande) dans la gamme de 16-32 keV, pour 2000 s ou 100 000 comptes. Les mesures en cpm ont été converties en quantité de Cd en tenant compte de l'efficacité de comptage, de la géométrie de l'échantillon, de la décroissance radioactive et de l'activité spécifique des solutions utilisées. L'activité du filtre du dessous a été soustraite à l'activité du filtre du dessus afin de corriger nos résultats pour le bruit de fond. Les prises en charge de  $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$  en absence de substances humiques, en présence de 5,4 mg C · L<sup>-1</sup> d'acide humique et en présence de 5,4 mg C · L<sup>-1</sup> d'acide fulvique Suwannee River ont ensuite été comparées pour des expositions de 5 min.

### 3.3 Résultats et Discussion

#### 3.3.1 Perméabilité de la membrane d'une algue verte en présence de substances humiques

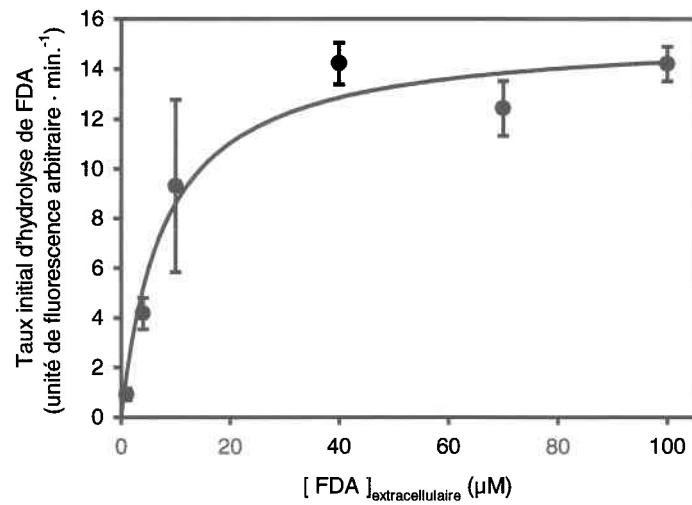
Pour déterminer les effets des substances humiques adsorbées (pH 5) sur la perméabilité de la membrane cellulaire de *S. capricornutum*, nous avons d'abord établi la concentration appropriée de FDA à utiliser dans nos essais en mesurant le taux initial d'hydrolyse de FDA en fonction de sa concentration externe (Fig. 3.1). Pour des

concentrations externes de FDA < 10  $\mu\text{M}$ , la relation entre le taux d'hydrolyse de FDA par *S. capricornutum* et la concentration externe est approximativement linéaire, indiquant que la concentration interne de FDA est directement proportionnelle à la concentration externe de FDA. Cependant, le taux initial d'hydrolyse de FDA plafonne aux concentrations externes > 10  $\mu\text{M}$ . Aux concentrations élevées, ce plafonnement pourrait être dû à la saturation des estérase (Breeuwer et al., 1995). Cependant, il nous semble plus probable que ce plafonnement soit dû à la précipitation du FDA dans le milieu externe, la solubilité maximum du FDA n'étant que de  $\sim 10 \mu\text{M}$ . Une concentration de FDA de 3  $\mu\text{M}$  a été choisie pour les mesures de perméabilité puisqu'à cette concentration, la concentration de substrat enzymatique intracellulaire dépendra du flux entrant de la molécule neutre FDA.

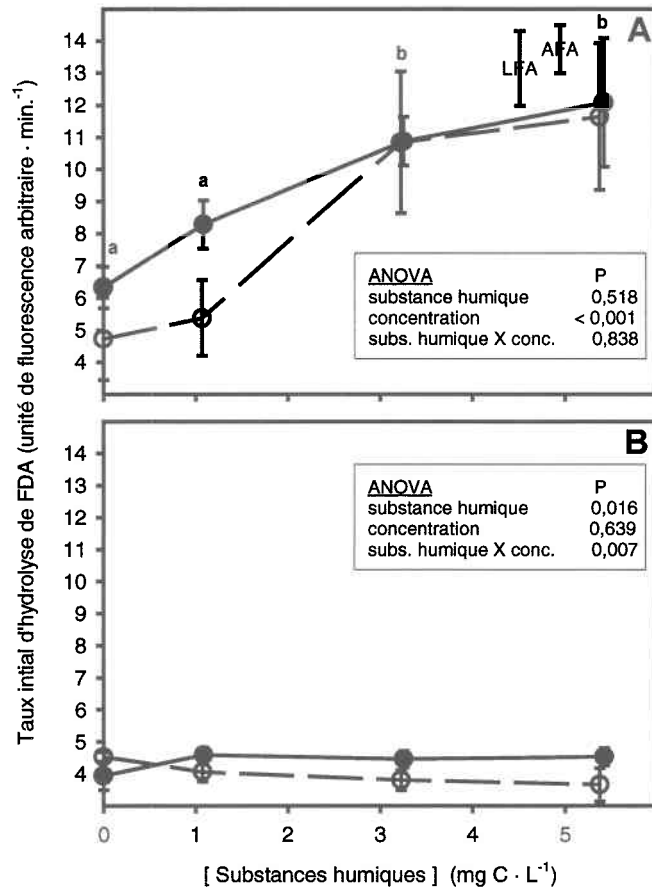
La perméabilité de la membrane algale au FDA en absence de substances humiques n'est pas affectée par le pH, tel qu'indiqué par les taux d'hydrolyse initiaux similaires pour les contrôles à pH 5 et pH 7 (Fig. 3.2). À pH 5, cependant, la perméabilité de *S. capricornutum* au FDA augmente significativement avec une augmentation de la concentration d'acide fulvique ou d'acide humique Suwannee River ( $P < 0,001$ , ANOVA bifactorielle 2 x 4 ; Fig. 3.2A). Signalons qu'il n'y a pas eu d'augmentations significatives de la perméabilité à pH 7 en présence de concentrations croissantes de ces deux acides ( $P = 0,639$ , ANOVA bifactorielle 2 x 4 ; Fig. 3.2B). Pour l'expérience à pH 5, les acides humique et fulvique ont induit une augmentation semblable de la perméabilité aux concentrations 3,2 et 5,4  $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $P > 0,05$ , test de Tukey). De plus, aux concentrations les plus élevées testées, 4,5 – 5,5  $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ , les deux acides fulviques extraits de sols testés, l'acide fulvique Laurentien et l'acide fulvique Armadale, ont également eu des effets similaires, ce qui suggère que l'effet sur la perméabilité dans cette gamme de concentrations ne dépend ni de la fraction (fulvique *versus* humique), ni de l'origine (aquatique *versus* terrestre) des substances humiques.

Pour expliquer cette absence d'effets de la nature et de l'origine des substances humiques, nous avons comparé leur activité de surface par polarographie. L'activité de surface a été

estimée en mesurant l'adsorption des substances humiques à la surface non-polaire d'une électrode à goutte de mercure suspendue, par la mesure de la diminution du courant capacitif. Il faut noter que nous n'avons pas utilisé l'électrode de mercure pour la comparer à une surface biologique, mais bien pour obtenir une méthode expérimentale indépendante pour comparer l'activité de surface des substances humiques étudiées. Les substances humiques testées ont toutes induit à pH 7 et à pH 5 des réductions du courant capacitifs mesurés ( $P < 0,001$ , ANOVA bifactorielle  $2 \times 4$ ) et les réductions ont été plus importantes à pH 5 qu'à pH 7 ( $P = 0,023$ , ANOVA bifactorielle  $2 \times 4$  ; Fig. 3.3). Néanmoins, les différences de réduction de courant capacitif mesurées entre les substances humiques testées sont modestes, ce qui est cohérent avec leur effet semblable aux concentrations les plus élevées sur la perméabilité membranaire. Cependant, seulement une faible diminution de l'activité de surface à pH 7 comparée à celle à pH 5 est obtenue avec la technique polarographique utilisée, tandis que les interactions des substances humiques avec la surface algale sont fortement influencées par le pH. Les changements de conformation induits par la force ionique élevée utilisée pour la technique polarographique,  $I = 0,5 \text{ M}$ , pourraient être à l'origine de l'absence d'effets marqués du pH sur la tensioactivité mesurée.

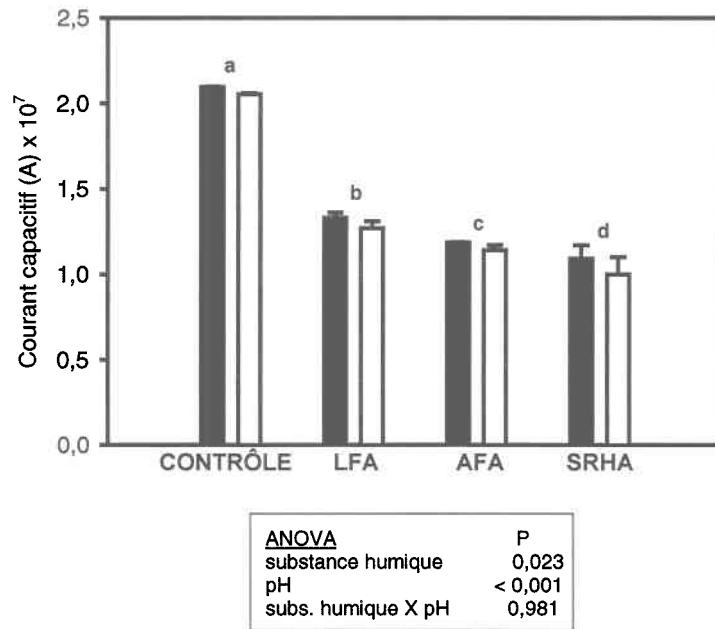


**Figure 3.1:** Hydrolyse intracellulaire de FDA par les estérases non-spécifiques chez *Selenastrum capricornutum* (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ , sauf pour [FDA] = 10  $\mu\text{M}$ , où  $n = 4$ ): Taux initial d'hydrolyse en fonction de la concentration externe de FDA. La ligne pleine est la régression non-linéaire des données avec une équation d'hyperbole (eq. 3.1). Les expériences ultérieures ont été effectuées à [FDA] = 3  $\mu\text{M}$ .



**Figure 3.2:** Perméabilité de la membrane de *Selenastrum capricornutum* au FDA (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ) en présence de substances humiques à pH 5 (A) et pH 7 (B). ●, acide humique Suwannee River; ○, acide fulvique Suwannee River; LFA, acide fulvique Laurentien; AFA, acide fulvique Armadale. À pH 5 (A), les lettres différentes indiquent des effets significatifs de la concentration de substances humiques sur le taux d'hydrolyse ( $P < 0,05$ , test de Tukey). À pH 7 (B), le taux d'hydrolyse est significativement affecté par le type de substance humique (acide fulvique *versus* acide humique) ( $P < 0,003$ , test de Tukey).





**Figure 3.3:** Réduction du courant capacitif,  $I_c$ , (moyenne  $\pm$  erreur standard,  $n \geq 3$  sauf pour LFA à pH 5 où  $n = 2$ ) à une électrode à goutte de mercure suspendue résultant de l'adsorption de substances humiques tensioactives à pH 7 (barres noires) et à pH 5 (barres vides). LFA, acide fulvique Laurentien ; AFA, acide fulvique Armadale ; SRHA, acide humique Suwannee River. Les lettres différentes indiquent des effets significativement différents sur la réduction du courant capacitif à pH 5 et pH 7 ( $P < 0,05$ , test de Tukey).

### 3.3.2 Perméabilité de vésicules de phospholipides

La structure amphiphile des substances humiques, ainsi que l'augmentation avec une diminution de pH de la quantité adsorbée à la surface algale, suggèrent que ces substances peuvent interagir avec les lipides membranaires et que cette interaction pourrait augmenter la perméabilité membranaire. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré les fuites de SRB à travers la membrane de vésicules composées d'un phospholipide zwitterionique, le POPC. En absence de substances humiques, les pertes passives de SRB des vésicules sont demeurées inférieure à 7 % au cours de la durée des essais, soit 10 min. Cependant, à la fois l'acide fulvique et l'acide humique Suwannee River ont augmenté la perméabilité des vésicules de POPC à des concentrations et des pH représentatifs des eaux naturelles (Figs 3.4 et 3.5). Pour un pH donné, la relation dose-réponse était presque linéaire pour la portion équivalente à des pertes de 0 à 60 % ; les pertes de SRB semblent cependant plafonner aux concentrations plus élevées de substances humiques. À des concentrations massiques équivalentes, l'acide humique Suwannee River a eu un effet beaucoup plus marqué que l'acide fulvique correspondant. L'acide humique s'avère donc un meilleur surfactant que l'acide fulvique, comme dans les expériences de perméabilité avec les algues (section 3.3.1) et les mesures de tension superficielle (Annexe A). Signalons aussi qu'une diminution du pH de 7,6 à 5,7 augmente considérablement l'interaction de l'acide humique avec les vésicules de POPC, tandis que pour l'acide fulvique cette diminution de pH n'a pas eu d'effets significatifs. Étant plus hydrophobe, l'acide humique pourrait peut-être pénétrer plus profondément dans la membrane et être ainsi plus sensible que l'acide fulvique aux changements de charges des têtes polaires des phospholipides, qui résultent de la diminution du pH.

Les effets des acides fulvique et humique sur la perméabilité des vésicules à pH 5,7 ont également été étudiés pour des vésicules chargées négativement, préparées à partir d'un mélange POPC:POPG (85:15). Cette composition a été choisie pour être représentative de la composition membranaire des algues vertes unicellulaires d'eau douce, incluant *S. capricornutum* (McLarnon-Riches et al., 1998). L'incorporation de POPG aux vésicules de POPC résulte en l'établissement d'une charge nette négative à la surface des vésicules

ce qui diminue de façon marquée les effets des acides fulvique et humique sur la perméabilité des vésicules (Figs 3.4 et 3.5). Pour la fraction fulvique, les pertes des vésicules POPC:POPG ont été  $\geq 5$  fois plus faibles que pour les vésicules POPC; pratiquement aucun effet de l'acide fulvique sur les vésicules POPC:POPG n'a pu être détecté jusqu'à  $110 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$  (Fig. 3.4). L'incorporation de POPG dans les vésicules de POPC a également réduit leur sensibilité à l'acide humique, puisque les pertes ont diminué d'un facteur d'environ 15 (calcul basé sur la quantité nécessaire pour provoquer une perte de 20 %).

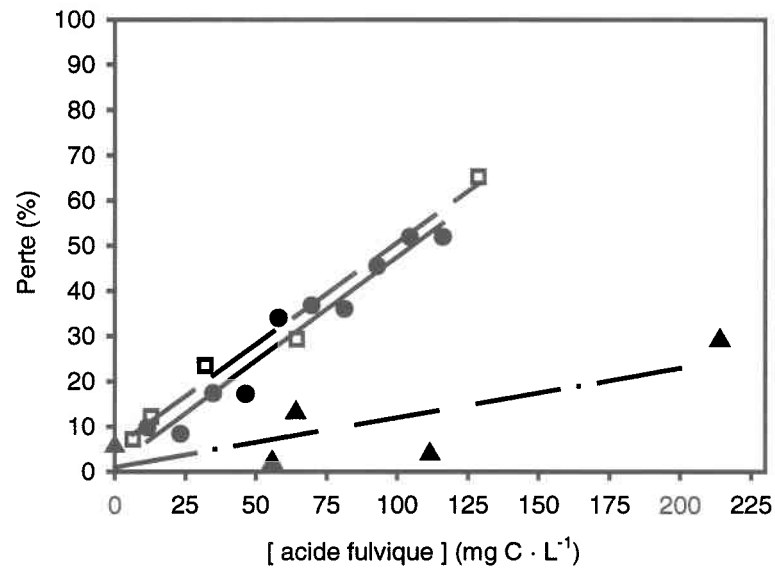
Les acides fulvique et humique ont un contenu élevé en groupements carboxyliques, soit  $6,1 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$  (Malcolm et al., 1995) et  $4,9 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$  (Leenheer et al., 1995) respectivement. À pH 5,7, la charge nette négative des substances humiques dépend principalement de la déprotonation partielle de ces groupements carboxyliques. En ce qui concerne les processus impliqués dans l'interaction entre les substances humiques et les membranes biologiques, la sensibilité réduite des membranes de POPC:POPG suggère que les répulsions électrostatiques entre la membrane et les acides fulvique et humique contrôle en partie le processus d'adsorption et que cette adsorption est un phénomène sensible à la densité de charges à la surface de la membrane.

-----

À la fois les expériences *in vivo* et *in vitro* ont démontré que les substances humiques peuvent perturber la perméabilité membranaire. Avec les cellules algales vivantes, nous avons observé une augmentation de la perméabilité vis-à-vis de la sonde non-polaire FDA, tandis qu'avec les membranes lipidiques modèles, nous avons démontré que les acides fulvique et humique induisent la présence de défauts dans la membrane, suffisamment importants pour laisser fuir le SRB. Dans les deux cas, les interactions avec les membranes étaient clairement sensibles aux interactions électrostatiques. L'addition de lipides chargés négativement à la membrane modèle a conduit à une réduction marquée de la sensibilité des vésicules à la présence des substances humiques. De même, l'augmentation de la charge à la surface algale et de la charge nette sur les substances

humiques (résultant de l'augmentation du pH du milieu d'exposition de 5 à 7) conduisent également à une diminution des effets des substances humiques.

L'analogie entre nos membranes modèles et vivantes est cependant imparfaite puisqu'en variant le pH, leur comportement respectif en présence d'acide humique a été similaire alors qu'il s'est montré différent pour l'acide fulvique. L'augmentation des pertes des vésicules de POPC induites par l'acide fulvique est demeurée identique lorsque le pH a été augmenté de 5,7 à 7,6 alors que l'augmentation de perméabilité des cellules algales à pH 5 a disparu lorsque le pH a été augmenté de 5 à 7. Cette différence de sensibilité au pH résulterait probablement en majeure partie de la variation limitée de densités de charges à la surface de la membrane modèle (le pKa des groupements phosphates des vésicules de POPC étant  $\sim 1$ ) comparativement à l'ionisation des groupements fonctionnels présents à la surface de l'algue. Elle pourrait également être due à des processus différents de transport membranaire pour SRB et FDA, ayant des sensibilités au pH différentes. Alors que FDA<sup>0</sup> traverse la membrane cellulaire par diffusion passive dans la phase lipidique, SRB<sup>-</sup> diffuse à travers les imperfections au sein de la bicouche lipidique, tels que les pores aqueux dans une bicouche lipide récemment décrit mathématiquement par Bordi et al. (1999).



**Figure 3.4:** Effets du pH et de la composition en phospholipides des vésicules sur les pertes de SRB induites par l'acide fulvique Suwannee River: ●, POPC pH 5,7 ; □, POPC pH 7,6 ; ▲, POPC:POPG (85:15) pH 5,7. Les lignes ont été obtenues par régression linéaire.

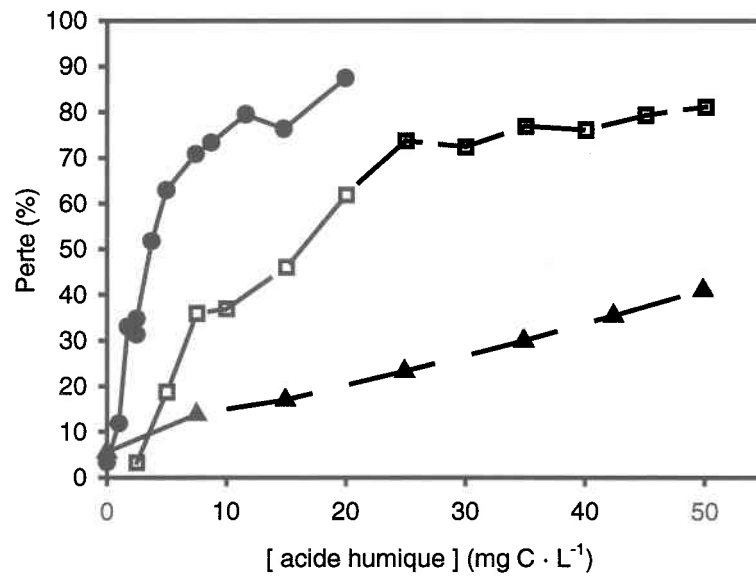


Figure 3.5: Effets du pH et de la composition en phospholipides des vésicules sur les pertes de SRB induites par l'acide humique Suwannee River. Voir la figure 3.4 pour la légende des symboles.

### 3.3.3 Prise en charge par diffusion passive de $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$

Pour compléter nos observations sur la perméabilité membranaire, nous avons testé l'hypothèse que la prise en charge par diffusion passive du complexe  $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$  augmente en présence de substances humiques. En présence de DDC, la prise en charge de Cd par *S. capricornutum* est rapide et augmente de façon linéaire durant les 30 premières min d'exposition (Fig. 3.6). Phinney et Bruland (1994) ont trouvé une augmentation de la prise à charge par *Thalassiosira weissflogii* dans les milieux contenant  $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$  par rapport aux milieux contenant  $\text{Cd}(\text{EDTA})^{2-}$ , soit une prise en charge ~ 17 fois plus importante en présence du complexe lipophile pour une même concentration de Cd totale. La diffusion passive du complexe  $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$  constitue donc une réelle augmentation de la prise en charge du Cd, qui ne peut être prédite par la concentration de Cd totale ou libre.

Comme c'est le cas pour la prise en charge du FDA, la prise en charge du  $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$  par diffusion passive est augmentée à pH 5 en présence de  $5,4 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$  d'acide fulvique et  $5,4 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$  d'acide humique Suwannee River ( $P < 0,001$ , ANOVA factorielle 1 x 3 ; Fig. 3.7). La prise en charge en présence de l'acide humique est le double de la prise en charge en absence de substances humiques, tandis que l'acide fulvique induit une augmentation intermédiaire de la prise en charge. L'augmentation plus importante de la perméabilité membranaire en présence de l'acide humique, par rapport à l'acide fulvique, corrobore bien les résultats obtenus précédemment de prise en charge de FDA et avec les vésicules.

Les dialkyldithiocarbamates forment une classe très utilisée de fongicides et sont susceptibles de se retrouver en concentrations importantes dans certains écosystèmes aquatiques contaminés. Comme nous avons mesuré une augmentation de la perméabilité membranaire pour des molécules lipophiles très différentes, soit la FDA et  $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ , il est plausible que la perméabilité membranaire vis-à-vis de la plupart des molécules ou complexes lipophiles de poids moléculaires faibles soit augmentée (ex. : des complexes avec les congénères du DDC ou encore les complexes Cd-xanthates (Block et Wicklund

Glynn, 1992)). La prise en charge du Cd sera donc augmentée en présence de DDC ou autres ligands formant des complexes neutres de poids moléculaires faibles et elle le sera davantage encore en présence également de matière organique naturelle. Dans de tels milieux, la prise en charge sera peu reliée à la concentration de Cd total ou libre, mais davantage aux concentrations de  $\text{Cd}(\text{X})_n^0$  et de substances humiques.



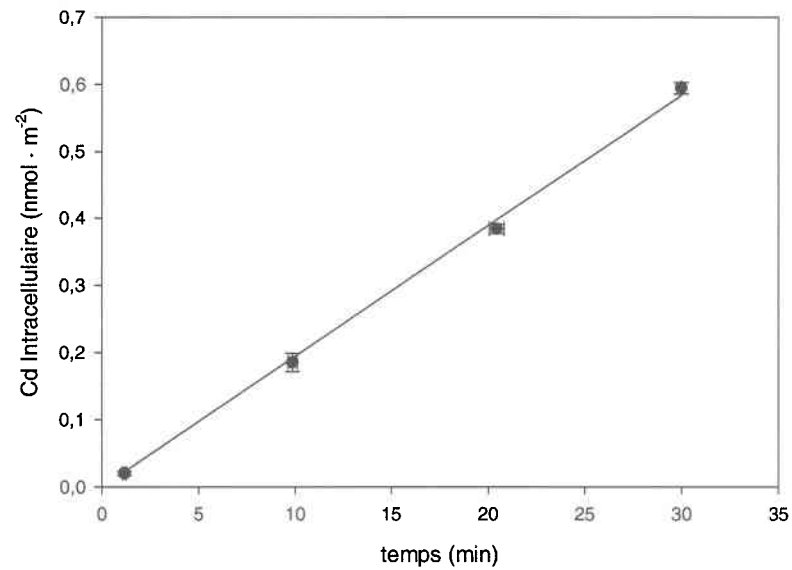
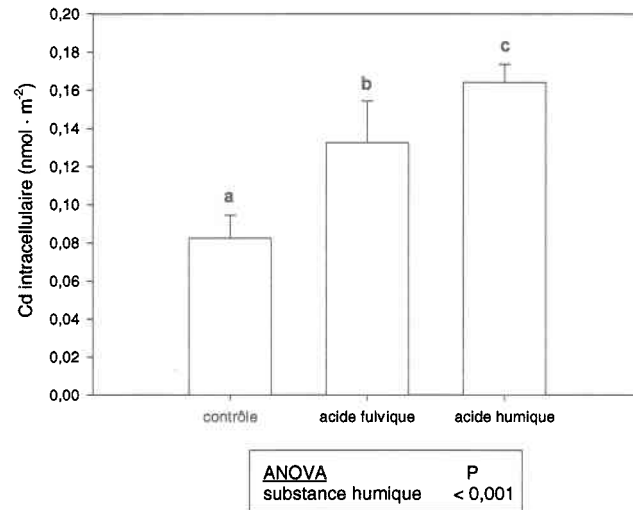


Figure 3.6: Cinétique de la prise en charge par diffusion passive du complexe  $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$  par *Selenastrum capricornutum* à pH 5 (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ).



**Figure 3.7:** Augmentation de la prise en charge par diffusion passive du complexe  $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$  par *Selenastrum capricornutum* (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 4$ ) en présence de l'acide fulvique ou humique Suwannee river à pH 5 pour des expositions de 5 min. Les lettres différentes indiquent des prise en charge significativement différentes ( $P < 0,05$ , test de Tukey).

### 3.3.4 Conséquences en écotoxicologie et pour les tests de toxicité

Nous avons démontré que des substances humiques aquatiques peuvent augmenter la perméabilité membranaire d'une algue unicellulaire vis-à-vis des solutés non-polaires à des concentrations et des pH représentatifs des eaux naturelles. Par exemple, la gamme de concentrations retrouvées dans la rivière Suwannee est de 12,3 à 17,5 mg C · L<sup>-1</sup> pour l'acide fulvique et de 1,9 à 2,7 mg C · L<sup>-1</sup> pour l'acide humique et le pH y est inférieur à 5 (Malcolm et al., 1995). Dans des conditions semblables au laboratoire, les acides fulvique et humique ont induit des pertes de SRB des vésicules de POPC et ont augmenté la perméabilité de *S. capricornutum* vis-à-vis du FDA. Ces résultats ont des implications potentielles pour les tests de toxicité d'inhibition des estérases et pour la prise en charge et la régulation des solutés toxiques et essentiels pour les communautés phytoplanctoniques.

L'inhibition des estérases, mesurée par la réduction du taux d'hydrolyse de FDA, a été proposée comme un test de toxicité rapide pour le phytoplancton (Blaise et Ménard, 1998, Gilbert et al., 1992, Snell et al., 1996). Nos résultats indiquent cependant qu'il faut être prudent dans l'interprétation des résultats des tests de toxicité d'inhibition des estérases en présence de substances tensioactives, telle que la matière organique naturelle. À bas pH, ces substances sont susceptibles d'augmenter le taux d'hydrolyse en augmentant le flux de FDA à travers la membrane cellulaire, tel que démontré par nos résultats. Par exemple, Blaise et Ménard (1998) ont testé des séries d'essais de dilution de sédiments toxiques et ont observé aux concentrations de sédiments les plus élevées une diminution inattendue de l'inhibition des estérases de *S. capricornutum* en contact avec ces sédiments toxiques. Cette réduction apparente de la toxicité pourrait être due à une augmentation de la perméabilité membranaire de *S. capricornutum* au FDA en présence de teneurs plus élevées de matière organique dissoute, occasionnées par la présence de sédiments à des concentrations plus élevées.

Dans les eaux naturelles, l'augmentation de la perméabilité membranaire induite par les substances humiques pourrait augmenter la prise en charge par diffusion passive des

espèces chimiques neutres hydrophobes. Outre les complexes de Cd, il pourrait s'agir d'autres complexes lipophiles de poids moléculaires faibles, comme les complexes de Cu et Pb avec la 8-hydroxyquinoline ou le DDC (Phinney et Bruland, 1994), ou le complexe inorganique dichloro-Hg(II) ( $\text{HgCl}_2^0$ ). La prise en charge par diffusion passive de contaminants organiques non-polaires pourrait également être augmentée à bas pH en présence de matière organique naturelle. Cependant, l'association de tels contaminants et de la matière organique naturelle va généralement diminuer leur biodisponibilité, masquant ainsi des augmentations potentielles de bioaccumulation découlant d'une augmentation de la perméabilité membranaire en présence de substances humiques.

En accord avec ces observations, Haitzer et al. (1998) ont noté, dans une revue récente sur l'effet de la matière organique dissoute sur la bioconcentration de contaminants organiques hydrophobes, qu'à des concentrations élevées de matière organique dissoute la bioconcentration est généralement réduite alors qu'il y a également des cas où la bioconcentration est augmentée à des concentrations faibles de matière organique dissoute. Ces auteurs reconnaissent, sans pouvoir l'expliquer, l'existence d'un processus qui augmente la prise en charge des contaminants hydrophobes en présence de matière organique dissoute. L'augmentation de la perméabilité membranaire en présence de substances humiques mise en évidence ici pourrait expliquer les prises en charge accrues rapportées par Haitzer et al. (1998) pour des contaminants hydrophobes en présence de concentrations faibles de matière organique dissoute.

#### 4 Influence des substances humiques adsorbées sur les échanges membranaires de métaux cationiques

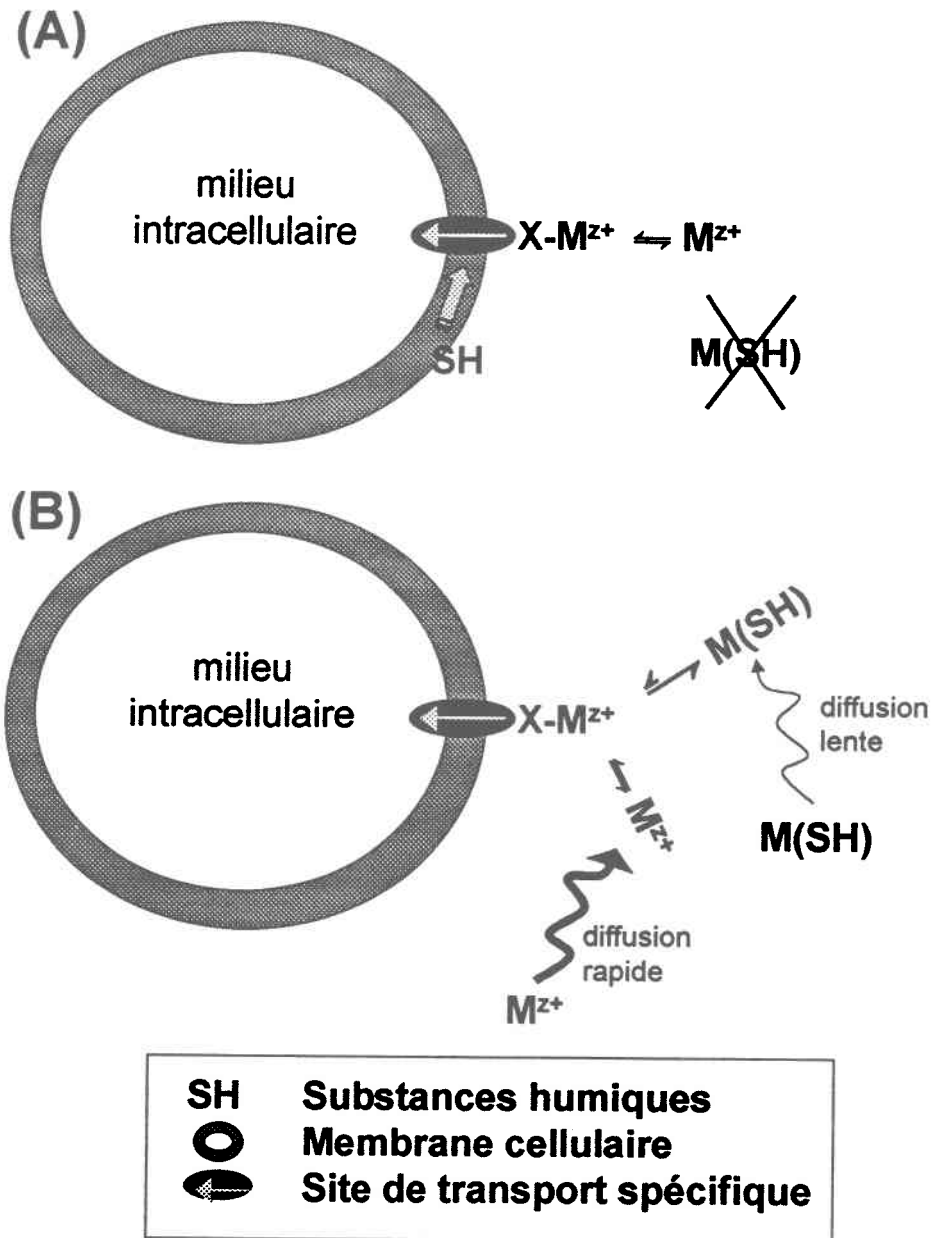
##### 4.1 Introduction

Nous avons montré que la prise en charge du Cd par diffusion passive (complexe lipophile  $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ ) est augmentée en présence d'un acide humique ou fulvique (section 3.3.3). Le transport de métaux via des sites de transport spécifiques est également susceptible d'être affecté par les substances humiques. L'adsorption des substances humiques au niveau membranaire pourrait modifier le fonctionnement des protéines transmembranaires impliquées dans le transport des métaux. D'autre part, les substances humiques pourraient également modifier la cinétique du transport du métal et de ses complexes de la solution externe vers les sites de transport (voir section 1.1.3).

L'étude des échanges membranaires d'un métal qui est peu complexé par la matière organique naturelle, comme le Cs, devrait permettre de mettre en évidence des effets directs des substances humiques adsorbées sur les systèmes de transport membranaires (Fig. 4.1A). Avery et al. (1993) ont proposé que l'influx intracellulaire de Cs chez une algue unicellulaire verte se produit via un système de transport transmembranaire unique et relativement peu sélectif. Quelques cations monovalents comme le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{K}^+$ , et donc possiblement le  $\text{Cs}^+$ , peuvent également traverser la membrane cellulaire par diffusion à travers des canaux transmembranaires (Hudson, 1998). Ainsi, en s'adsorbant à la membrane cellulaire, il est possible que les substances humiques affectent le fonctionnement des protéines formant de tels systèmes de transport transmembranaire, soit en interagissant directement avec celles-ci ou encore indirectement par la modification des propriétés de la bicouche lipidique au voisinage de ces protéines, telle que la fluidité membranaire. Samson et Visser (1989) ont constaté qu'un acide humique de sol provoquait une augmentation des pertes de  $\text{K}^+$  de cellules isolées de pomme de terre, et ils ont conclu que cette augmentation provenait au moins en partie d'un effet de l'acide humique sur la fluidité membranaire.

Le Cd est un métal toxique, dont l'affinité pour la matière organique est plus grande que celle du Cs. Étant un métal non-essentiel, on peut présumer qu'il n'y a pas de systèmes de transport transmembranaire spécifiques pour le Cd, et que celui-ci est pris en charge par des systèmes destinés à d'autres solutés essentiels. Sunda et Huntsman (1998) ont proposé que le Cd est ainsi transporté à l'intérieur des cellules de phytoplancton par l'intermédiaire du système de transport du Mn. Lorsque le Cd est complexé par les substances humiques, la prise en charge pourrait être affectée par la dissociation lente du complexe (formation d'un complexe non-labile) ou encore par la vitesse de diffusion réduite du complexe vers le site de prise en charge (Fig 4.1B). Plusieurs études qualitatives, menées sur des organismes aquatiques, ont montré que la présence de substances humiques diminue la prise en charge et la toxicité du Cd. Par exemple, Sedlacek et al. (1983) ont montré que la prise en charge et la toxicité du Cd vis-à-vis de *Selenastrum capricornutum* étaient réduites en présence de substances humiques, ce qu'ils ont attribué à la complexation du Cd en solution par les substances humiques. Pempkowiak et Kosakowska (1998) ont constaté une prise en charge réduite de Cd par *Chlorella vulgaris* en présence de substances humiques marines, et ils ont quant à eux proposé que l'adsorption de ces substances humiques à la surface de cette algue, et non la complexation en solution, était responsable de cette diminution de la prise en charge du Cd. Malheureusement, ces derniers auteurs n'ont pas mesuré la spéciation du Cd dans leurs milieux d'exposition et l'interprétation de leurs résultats demeure qualitative.

Nous voulons donc déterminer la prise en charge de métaux dans des milieux où la concentration de métal libre est mesurée, de façon à tester quantitativement le MIL en présence de substances humiques. Plus particulièrement, nous voulons tester l'effet de la présence de substances humiques adsorbées à la surface cellulaire sur la prise en charge de métaux par les systèmes de transport spécifiques.



**Figure 4.1:** Modèle conceptuel de la prise en charge de métaux cationiques en présence de substances humiques, SH : métal faiblement complexé, effets directs des substances humiques adsorbées sur le transport transmembranaire (A) ; métal fortement complexé, effets cinétiques résultant de la dissociation lente du complexe ou d'une diffusion lente dans la phycosphère (B).

## 4.2 Matériel et méthodes

### 4.2.1 Choix des métaux et des organismes cibles

Nous avons choisi d'étudier le Cd en raison de sa toxicité reconnue, de sa présence fréquente dans les milieux contaminés et de son affinité intermédiaire pour la matière organique naturelle. De plus, Campbell (1995) a noté dans une revue de la littérature que les exceptions au modèle de l'ion libre, en absence de matière organique naturelle, semblaient être plus nombreuses pour le Cd que pour les autres métaux. Pour compléter les travaux avec le Cd et afin d'étudier le transport membranaire des métaux cationiques sans l'influence de la complexation par les substances humiques, nous avons choisi d'étudier conjointement le Cs, puisque ce métal monovalent n'est pas complexé de manière appréciable par la matière organique naturelle. Dans les sédiments, Evans et al. (1983) ont montré que le Cs est très peu associé aux substances humiques. Cremers et al. (1988) ont conclu que la matière organique ne contribue pas à la rétention du Cs dans les sols. Dans une étude sur une eau naturelle, Granier et al. (1997) ont également démontré l'absence de complexation du Cs par la matière organique dissoute.

Pour l'étude de la prise en charge du Cd en présence d'acides humique ou fulvique, nous avons continué de travailler avec *S. capricornutum*. Par contre, étant donné le taux de croissance très réduit de *S. capricornutum* à pH 5, nous avons également étudié une autre algue verte unicellulaire, *Chlamydomonas reinhardtii*, dont le taux de croissance varie peu dans la gamme de pH 7 à 5. D'autre part, pour les expériences avec le Cs, nous avons d'abord choisi l'algue *Synechococcus leopoliensis*, puisque l'accumulation et les pertes de ce métal par cette algue avaient été étudiées précédemment (Twiss et Campbell, 1995). Pour les travaux sur le Cs, nous avons également choisi une seconde algue de la famille des Chlorophyceae, *Chlorella pyrenoidosa*, pour compléter nos résultats avec *S. leopoliensis*. *C. pyrenoidosa* (Chlorophyceae) (UTCC89) et *C. reinhardtii* (UTCC 11) ont été obtenues de la collection de cultures de l'Université de Toronto. Signalons que nous avons ajouté du NH<sub>4</sub>OH (0,94 mM) comme source d'azote dans le milieu Fraquil (tableau 2.1) pour la culture de *Chlamydomonas reinhardtii* ; le pH du milieu était ensuite rajusté à



pH 5,0, avec une solution d'acide nitrique. À titre d'expériences préliminaires, les cinétiques de prise en charge du Cs, Cu et du Cd ont également été étudiées (Annexe B).

#### 4.2.2 Mesure des pertes de Cs en présence d'acide humique

Twiss et Campbell (1995) ont mesuré des pertes rapides de Cs lorsque *S. leopoliensis*, ayant accumulé du Cs, était resuspendue dans un milieu sans Cs. Afin d'étudier l'influence des substances humiques sur les échanges membranaires de métaux, nous avons utilisé ce type d'expérience pour mesurer les pertes de Cs lorsque l'algue était resuspendue dans des milieux sans Cs, en absence ou en présence de  $5,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  d'acide humique Suwannee River. Les algues ont été inoculées dans le milieu de culture Fraquil (tableau 2.1) contenant  $10 \text{ nM}$  de  $^{137}\text{Cs}$  (activité spécifique =  $3,6 \mu\text{Ci} \cdot \text{nmol}^{-1}$ ). À la fin de la phase exponentielle de croissance, après 5 jours, les algues ont été récoltées sur des membranes de polycarbonate de  $0,2 \mu\text{m}$ , tel que décrit précédemment (section 2.2.2.1), et resuspendues dans le milieu d'exposition sans Cs, Fra<sub>0</sub>, à pH 7,1 ou à pH 5, avec ou sans acide humique. La concentration cellulaire finale dans ces milieux d'exposition était de  $\sim 1 \times 10^6 \text{ cellules} \cdot \text{mL}^{-1}$ . La croissance des algues a été négligeable au cours de l'expérience (durée < 5 h). Entre 0 et 5 h, des sous-échantillons (20 mL) des suspensions algales étaient prélevés à différents temps, filtrés sur deux membranes de polycarbonate de  $0,2 \mu\text{m}$  superposées, et rincées avec  $3 \times 5 \text{ mL}$  du milieu d'exposition, sans Cs et sans acide humique. L'activité du filtre du dessous a été soustraite à l'activité du filtre du dessus afin de corriger les résultats pour le bruit de fond, qui pourrait résulter de la rétention de Cs par le filtre. Le contenu cellulaire de Cs (Cs particulaire), soit l'activité retenue sur le filtre, a été exprimé comme le % de l'activité totale (Cs particulaire + Cs dissous). Les mêmes manipulations ont été répétées pour *Chlorella pyrenoidosa* à pH 7,1 et à pH 5,5.

### 4.2.3 Prise en charge du Cd en présence de substances humiques

#### 4.2.3.1 Mesure de la prise en charge du Cd

La prise en charge du Cd a été mesurée dans des milieux d'exposition contenant l'acide fulvique ou l'acide humique Suwannee River comme ligands naturels ; ces taux de prise en charge ont été comparés à ceux mesurés dans un milieu de contrôle contenant de l'acide nitrilotriacétique, NTA. La prise en charge lors de courtes expositions a été étudiée, afin de limiter l'influence possible des algues sur la spéciation des métaux dans les milieux d'exposition. Le NTA a été choisi car il s'agit d'un ligand synthétique qui avait été utilisé pour plusieurs expériences à la base de l'élaboration du modèle de l'ion libre. Simkiss et Taylor (1995) de même que Daly et al. (1990a) ont démontré que les membranes d'algues sont imperméables au NTA et à ses complexes métalliques. Pour tester le modèle de l'ion libre en présence de matière organique naturelle, nous avons comparé la prise en charge du Cd dans les deux milieux d'exposition, contenant soit la substance humique soit le NTA. Tel que formulé, le modèle de l'ion libre prédit une prise en charge identique pour une même concentration de Cd libre. Nous avons donc comparé la prise en charge du Cd sur la même gamme de concentrations en  $\text{Cd}^{2+}$  dans les deux types de milieu.

Les algues ont été cultivées aux pH expérimentaux, à pH 5 ou à pH 7. Aucun tampon n'a été utilisé à pH 7, puisque le pH du milieu de culture Fraquil est de 7,1 et qu'il demeure constant durant la phase de croissance exponentielle. Pour les algues poussant à pH 5, le milieu de culture a été tamponné avec du MES (1 mM). Pour récolter les algues en vue des expériences, le volume nécessaire de culture d'algues a été centrifugé pendant 10 min à 20 000 g. Le surnageant a été enlevé et le culot a ensuite été récolté, filtré sur une membrane (0,4  $\mu\text{m}$ ) et rincé avec au moins 3 x 10 mL de Fraquil- $\text{NaNO}_3$  (tableau 2.1) (pH 5 ou pH 7). Les algues ont été finalement resuspendues dans < 20 mL de cette solution. Un mL de cette suspension d'algues a été ajouté à 100 mL de milieu d'exposition afin d'obtenir une concentration cellulaire finale de l'ordre de  $8 \times 10^4$  cellules  $\cdot \text{mL}^{-1}$ .

Les deux milieux d'exposition, l'un contenant du NTA et le second contenant l'acide fulvique ou humique, ont été préparés en parallèle au moins 24 h à l'avance. L'acide fulvique ou humique a été dissous directement dans le milieu d'exposition pour obtenir une concentration de  $5,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Le  $^{109}\text{Cd}$  d'une solution mère « carrier-free » ( $1,8 \times 10^5 \text{ mCi} \cdot \text{mmol}^{-1}$ , Amersham Pharmacia Biotech, Baie-d'Urfé, QC) a été dilué avec du Cd non-radioactif afin d'obtenir des solutions d'activités spécifiques plus faibles. Des portions de ces solutions diluées ont été ajoutées aux milieux d'exposition, contenus dans des bouteilles 500 mL en HDPE, pour obtenir la même gamme de concentrations en  $\text{Cd}^{2+}$  dans chaque milieu. Les valeurs de pH des milieux d'exposition ont été ajustées lors de la préparation des solutions et vérifiées ou rajustées avant de débiter les expériences de prise en charge. Les milieux d'exposition ont également été filtrés avant le début des expériences sur des membranes en polycarbonate de  $0,4 \mu\text{m}$  (Poretics<sup>®</sup>, Osmonics Inc, Livermore, CA, USA).

Pour chaque essai, des sous-échantillons du milieu d'exposition (contenant les algues) ont été prélevés pour déterminer la concentration totale de Cd (2 mL) et pour mesurer la concentration d'algues et leur surface cellulaire au moyen d'un compteur électronique de particules (1 mL). À la fin de la période d'exposition, le volume total de la suspension d'algue a été filtré sur deux membranes superposées en polycarbonate de  $0,4 \mu\text{m}$ . La durée d'exposition a été mesurée à partir de l'ajout de la suspension mère d'algues aux milieux d'exposition, jusqu'à ce que toute la solution soit passée à travers le filtre. Pour chaque expérience, nous avons comparé la prise en charge dans les milieux contenant les substances humiques et dans les milieux contenant du NTA, pour des algues provenant d'une même culture et d'une même suspension mère d'algues. Le début de l'exposition à chaque concentration de Cd libre testée a été décalé de façon à pouvoir filtrer en parallèle les 3 échantillons contenant le NTA et les 3 échantillons contenant la substance humique d'une même concentration de Cd libre, avant de passer à la prochaine concentration de Cd libre. Cette façon de procéder avait pour avantage de permettre la comparaison, à une même concentration de Cd libre, d'algues dans un état physiologique identique. Un échantillon de 2 mL de chaque filtrat a également été prélevé pour mesurer la

concentration de Cd totale après l'exposition aux algues. Au cours des expositions, la concentration totale de Cd n'a jamais diminué de plus de 4 %.

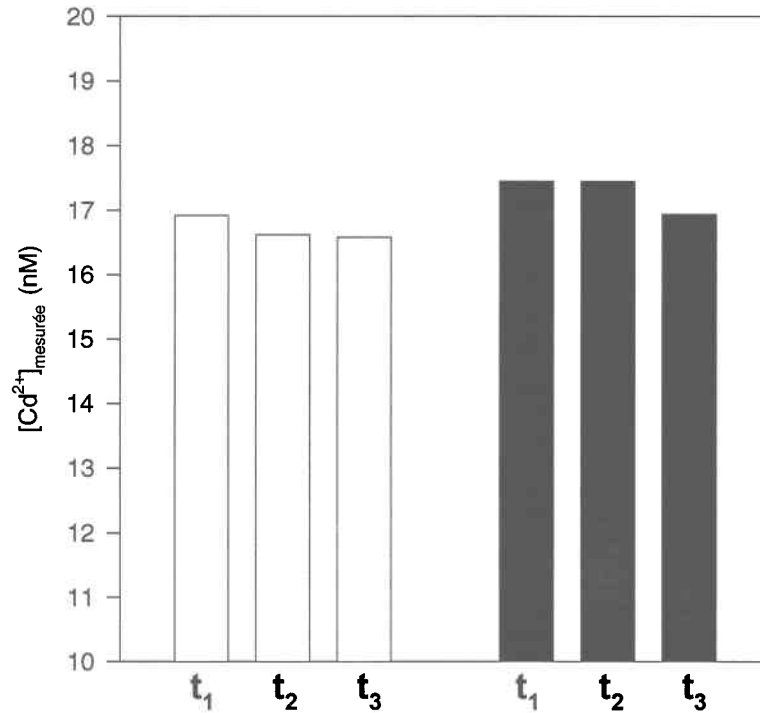
Pour extraire le Cd adsorbé à la surface des cellules, 10 mL d'une solution EDTA  $10^{-4}$  M (dans Fraquil<sub>t-NaNO<sub>3</sub></sub>, à pH 5 ou à pH 7) a été versé sur les filtres superposés, toujours maintenus dans les appareils de filtration, et laissé pendant une période de 10 min. Les filtres ont finalement été rincés avec 3 x 10 mL de Fraquil<sub>t-NaNO<sub>3</sub></sub> (pH 5 ou pH 7). Les filtres ont ensuite été transférés dans des tubes en verre pour mesurer le  $^{109}\text{Cd}$  intracellulaire, et 2 mL d'eau ont été ajoutés aux tubes, afin d'obtenir une géométrie de comptage constante pour les échantillons. Le  $^{109}\text{Cd}$  a été mesuré avec un compteur  $\gamma$  automatique, Wizard modèle 1480 (Wallac, Turku, Finlande). Les mesures en cpm ont été converties en concentrations totales de Cd intracellulaire en tenant compte de l'efficacité de comptage, de la décroissance radioactive, de l'activité spécifique des solutions utilisées, et du nombre d'algues recueillies sur le filtre. Les résultats sont exprimés en nmol Cd par  $\text{m}^{-2}$  de surface algale.

#### 4.2.3.2 Mesure de la spéciation dans les milieux d'exposition

Pour les expériences de prise en charge, la force ionique du milieu Fraquil a été augmentée à 0,01 M en ajoutant du  $\text{NaNO}_3$ , Fraquil<sub>NaNO<sub>3</sub></sub>, pour le dosage du Cd libre par une technique d'échange ionique (Fortin et Campbell, 1998). Brièvement, les milieux d'exposition ont été passés à travers une colonne contenant une résine échangeuse d'ions (DOWEX 50W-X8, 50-100 mesh), sous forme sodium, jusqu'à ce qu'il y ait équilibre entre le Cd libre et la résine. Le Cd retenu sur la résine est ensuite élué à l'aide d'une solution d'acide nitrique 1,5 M. La concentration de Cd libre,  $[\text{Cd}^{2+}]$  (nM), est finalement calculée en utilisant la concentration de Cd dans l'éluat,  $[\text{Cd}]_{\text{éluat}}$  (nM) et le volume d'acide utilisé pour l'éluat, V (L), connaissant la masse de résine dans la colonne utilisée,  $m_r$  (g), et le coefficient de distribution conditionnel entre le Cd et la résine,  $\lambda$ , spécifique à nos milieux d'exposition :

$$[\text{Cd}^{2+}] = ([\text{Cd}]_{\text{éluat}} \cdot V) \cdot (\lambda \cdot m_r)^{-1} \quad (4.1)$$

L'augmentation de la force ionique permet de limiter le volume d'échantillon nécessaire pour atteindre un état d'équilibre entre le Cd en solution et la résine, puisque l'augmentation de la concentration de  $\text{Na}^+$ , en compétition avec le Cd pour les sites sur la résine, va limiter la quantité de Cd qui se liera à la résine à l'équilibre. La concentration de Cd libre a été mesurée dans les filtrats 24 à 48 h après la fin de l'expérience de prise en charge. Une expérience préliminaire a permis de montrer que les résultats de dosage du Cd libre en présence d'acide fulvique ou humique Suwannee River n'étaient pas affectés par les différentes étapes de traitement des solutions (Fig. 4.2), soit la filtration des solutions et un délai de 48 h avant le dosage du Cd libre. Pour nos milieux d'exposition, la technique nécessitait un échantillon de 160 mL; les filtrats (~ 100 mL) de 3 répétitions ont donc été mélangés pour former un échantillon composite. Le coefficient de distribution du Cd avec la résine utilisée a été préalablement déterminé dans le milieu  $\text{Fra}_t\text{-NaNO}_3$  à pH 5 et à pH 7. Fortin et Campbell (1998) ont vérifié l'absence d'interférences de  $\text{CdCl}^+$  et des substances humiques avec les dosages. Les résultats de l'ensemble des dosages de Cd libre dans les milieux d'exposition des expériences de prise en charge indiquent qu'à pH 7, 49 % du Cd total est complexé par l'acide fulvique Suwannee River, alors que 54 % du Cd est complexé par le NTA. À pH 5, 26 % du Cd est complexé par l'acide fulvique River et 30 % par l'acide humique Suwannee River, alors que 25 % du Cd est complexé par le NTA. Pour les milieux de contrôle ne contenant pas de substances humiques, la concentration de Cd libre a également été calculée à l'aide du logiciel MINEQL+ (Schecher et McAvoy, 1994) en utilisant une base de données modifiée, dont les constantes thermodynamiques ont été complétées et corrigées (Fortin et Gauthier, 1995).



**Figure 4.2:** Stabilité des mesures de Cd libre par la technique d'échange ionique ( $n = 1$ ) en présence  $5,4 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$  d'acide fulvique, barres vides, et d'acide humique Suwannee river, barres noires: Mesure du Cd libre 48 h après la mise en solution ( $t_1$ ), immédiatement après la filtration ( $t_2$ ), et 48 h après la filtration ( $t_3$ ). Conditions de l'expérience : pH 5 et  $[\text{Cd}]_{\text{T}} = 20 \text{ nM}$ .

### 4.3 Résultats et Discussion

#### 4.3.1 Perte de Cs en présence d'acide humique

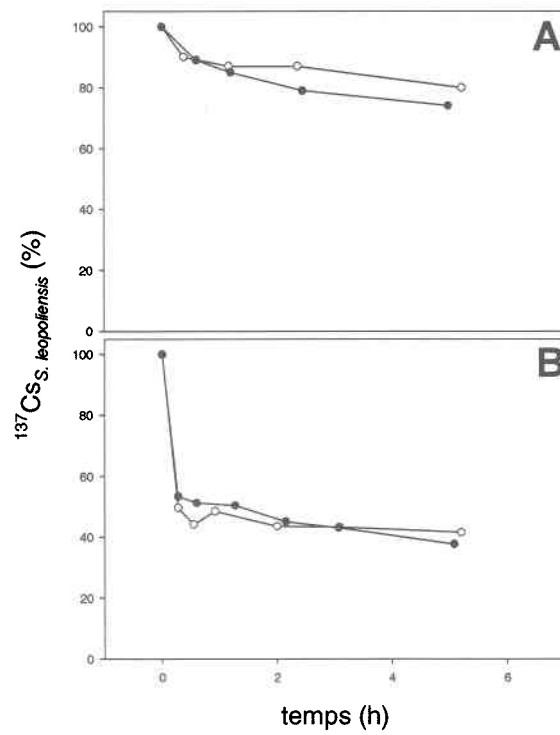
Le Cs peut être considéré comme un traceur du K, puisque son comportement dans l'environnement en général et vis-à-vis des algues est similaire à celui du K (Corisco et Carreiro, 1990). La prise en charge du Cs par les algues est faible, comparativement à celle notée pour les particules inorganiques, principalement les argiles (Garnham et al., 1993, Miskovic et al., 1992, Twiss et Campbell, 1998). Elle est également relativement faible par rapport à l'accumulation d'autres métaux par les algues. Cependant, les algues accumulent tout de même du Cs en faible quantité, par un processus passif rapide d'adsorption à la paroi et à la membrane cellulaire suivi d'un processus lent de transport transmembranaire facilité (Garnham et al., 1993).

Les pertes de Cs des algues constituent également un processus biphasique (Avery et al., 1993). Pour *S. capricornutum* ayant accumulé du  $^{134}\text{Cs}$  et ayant été resuspendue dans des milieux sans Cs, Corisco et Carreiro (1990) ont observé une perte rapide de Cs au cours des premières 30 min, attribuée à la désorption du Cs extracellulaire, suivi d'une phase lente attribuée à la perte du Cs intracellulaire et à la dilution biologique résultant de la croissance des cellules. Nous avons observé le même processus de pertes biphasiques pour *S. leopoliensis* (Fig. 4.3). Pour cette algue, la désorption du Cs associée à la surface cellulaire, soit la diminution du Cs associé à la phase particulaire pour des expositions < 1 h, a été augmentée de façon très marquée par une diminution de pH. Après 1 h d'exposition, le % de Cs associé à l'algue a diminué de 15 % à pH 7,1 de 50 % à pH 5 pour *S. leopoliensis*. De façon similaire, le % de Cs associé à *C. pyrenoidosa* a diminué de ~ 10 % à pH 7,1 et de ~ 65 % à pH 5,5 après 3 h (Fig. 4.4). Ces résultats suggèrent donc une compétition importante de  $\text{H}^+$  avec  $\text{Cs}^+$  pour les sites d'adsorption à la surface cellulaire.

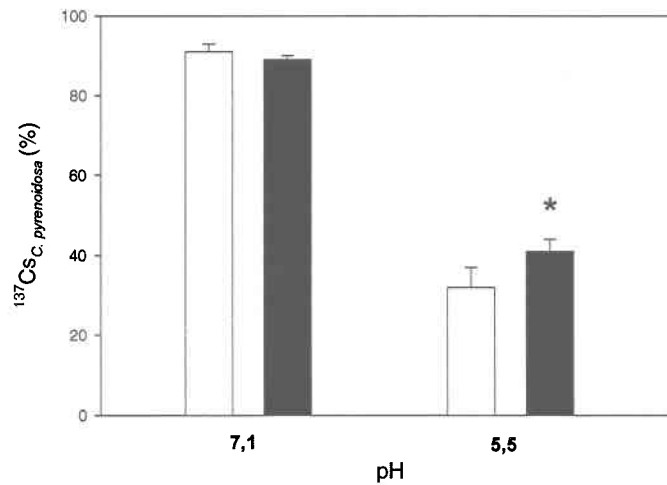
Dans le cas de *S. leopoliensis*, la présence d'acide humique n'a pas influencé les pertes de Cs (Fig. 4.3), bien qu'à pH 6 et à pH 5 les mesures de Campbell et al. (1997) avaient indiqué une adsorption de l'acide fulvique Armadale à la surface de l'algue à ces pH. La

différence apparente entre les données en présence et en absence d'acide humique à pH 7 pour les temps > 2 h peut être attribuable à l'erreur associée à ces mesures, qui est estimée à 4 %. Dans le cas de *C. pyrenoidosa*, l'acide humique semble affecter légèrement les pertes de Cs à pH acide, les pertes ayant été significativement moins élevées en présence de l'acide humique à pH 5,5 ( $P = 0,042$ , test de Student ; Fig. 4.4). D'autre part, à pH 7,1 il n'y avait pas de différence significative de pertes de Cs en présence ou en absence d'acide humique ( $P = 0,226$ , test de Student). Les données de Campbell et al. (1997) montrent également qu'il y a de l'adsorption de substances humiques sur cette algue à pH 5,5. Cette différence de comportement aux deux valeurs de pH testées est cependant difficile à interpréter. Il est possible que l'acide humique adsorbé à la surface de *C. pyrenoidosa* à pH 5 interagisse directement avec les protéines responsables du transport du K, ou encore indirectement en modifiant la charge à la surface externe de la cellule. Pour un acide humique extrait d'un sol, Samson et Visser (1989) ont observé une augmentation de l'efflux de  $K^+$  de cellules de pomme de terre en présence de substances humiques à une concentration de  $\sim 20 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ , alors qu'il n'y avait pas d'effets à  $\sim 5 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ . L'absence d'augmentation des pertes de  $Cs^+$  observée pour les algues que nous avons étudiées pourrait donc être attribuable à la faible concentration d'acide humique utilisée,  $5,4 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ , mais également à des différences physiologiques entre les types de cellules végétales testées.





**Figure 4.3:** Perte de Cs ( $n = 1$ ) de *Synechococcus leopoliensis* à pH 7,1 (A), à pH 5 (B) en absence, ○, et en présence, ●, de 5.4 mg · L<sup>-1</sup> d'acide humique Suwannee River.



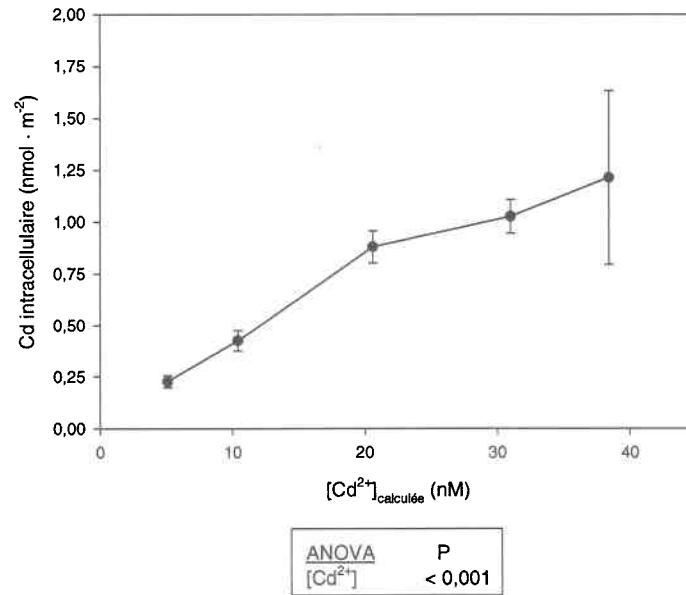
**Figure 4.4:** Perte de Cs (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ) de *Chlorella pyrenoidosa* après 3 h à pH 7,1 et à pH 5,5 en absence, barres vides, et en présence, barres noires, de  $5,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  d'acide humique Suwannee River. Les pertes de Cs sont significativement différentes en présence de l'acide humique à pH 5,5 ( $P = 0,042$ , test de Student).

#### 4.3.2 Prise en charge de Cd en présence de substances humiques

*Prise en charge du Cd par C. reinhardtii en présence de substances humiques.* Nous avons tout d'abord mesuré la prise en charge du Cd par *C. reinhardtii* dans des milieux contenant NTA et ne contenant pas de substances humiques, afin de déterminer la gamme de concentrations à étudier pour les expériences ultérieures. La prise en charge augmente de 5 nM à 45 nM de Cd libre ( $P < 0,001$ , ANOVA factorielle 1 x 5 ; Fig. 4.5), et nous avons donc utilisé cette gamme de concentrations pour comparer la prise en charge du Cd dans des milieux de contrôle (NTA) et dans des milieux contenant des substances humiques aquatiques.

Rappelons que selon le modèle de l'ion libre, la prise en charge du Cd à une même concentration de Cd libre devrait être identique dans des milieux où le Cd est complexé par le NTA et dans des milieux où il est complexé par des substances humiques. En accord avec le modèle de l'ion libre, nos expériences avec *C. reinhardtii* indiquent que la prise en charge peut-être prédite par la concentration de Cd libre, même à faible pH, en présence de substances humiques aquatiques tensioactives. Pour les deux expériences effectuées avec l'acide fulvique à pH 5, la prise en charge du Cd augmente significativement avec la concentration de Cd libre dans le milieu externe ( $P < 0,001$ , ANOVA bifactorielle 2 x 2 x 3), mais elle n'est pas significativement influencée par la présence de l'acide fulvique ( $P = 0,089$  et  $0,366$ , ANOVA bifactorielle 2 x 2 x 3 ; Fig. 4.6). C'est également le cas en présence de l'acide humique puisque pour les deux expériences effectuées, la prise en charge du Cd augmente significativement avec la concentration de Cd libre dans le milieu externe ( $P < 0,001$ , ANOVA bifactorielle 2 x 2 x 3), mais elle n'est pas significativement influencée par la présence de l'acide humique ( $P = 0,165$  et  $0,343$ , ANOVA bifactorielle 2 x 2 x 3 ; Fig. 4.7). Pour les milieux contenant le NTA et les milieux contenant les substances humiques, la prise en charge mesurée s'avère similaire. La prise en charge du Cd à pH 5 en présence des substances humiques Suwannee River n'est donc pas affectée par la présence présumée à la surface cellulaire de ces acides humiques adsorbés.

À notre connaissance, ces résultats constituent l'une des premières démonstrations expérimentales quantitative de l'applicabilité du modèle de l'ion pour le Cd en présence de matière organique naturelle. Les travaux sur le terrain de Hare et Tessier (1996) ont également appliqué avec succès le MIL pour prédire l'accumulation de Cd intracellulaire chez une larve d'insecte. La prédiction de la prise en charge basée sur la concentration de Cd libre implique que le transport facilité du Cd est sous contrôle thermodynamique et non cinétique, c'est-à-dire que même en présence de substances humiques, le transport du Cd à travers la membrane cellulaire constitue l'étape limitant le processus de prise en charge. Le contrôle thermodynamique de la prise en charge du Cd est cohérent avec le fait qu'il s'agit d'un métal non-essentiel avec une cinétique rapide d'échange de ligands et pour lequel on peut présumer que l'affinité pour les sites de prise en charge est faible (Hudson, 1998).



**Figure 4.5:** Prise en charge du Cd (moyenne ± écart type,  $n = 3$ ) à pH 5 par *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction de la concentration de Cd libre calculée avec MINEQL+. Conditions d'exposition : [NTA] = 100 nM et durée d'exposition = 15 min.

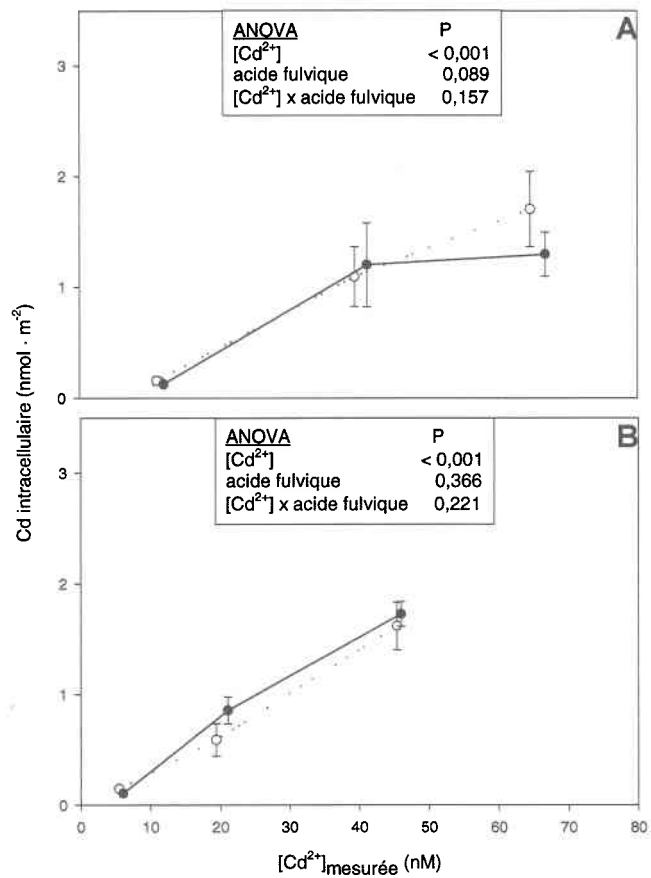
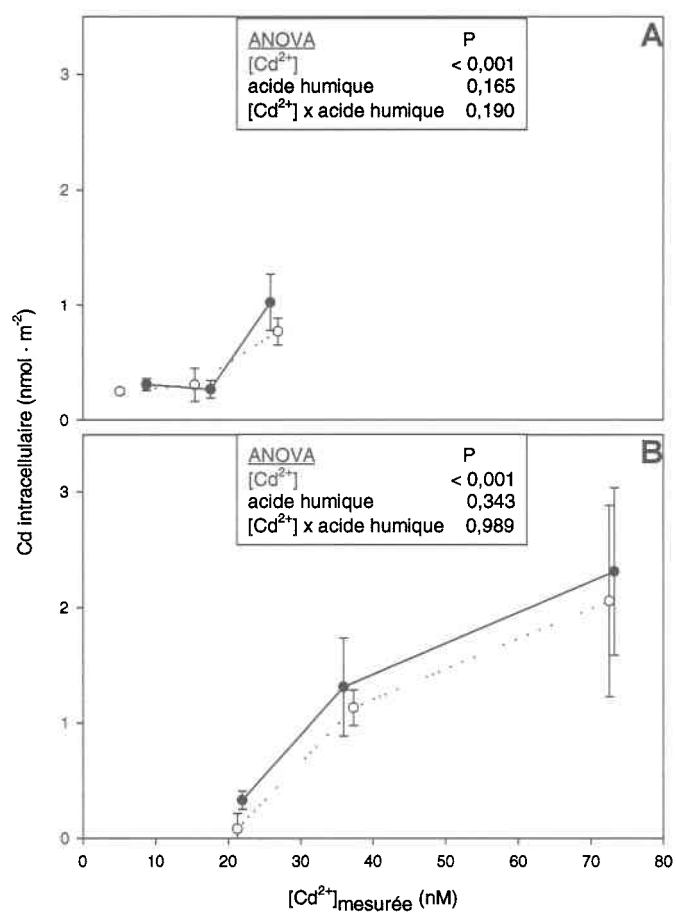


Figure 4.6: Prise en charge du Cd (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ) par *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 5, en présence de NTA ( $[NTA] = 100$  nM),  $\circ$ , ou en présence d'acide fulvique Suwannee River ( $[AFSR] = 5,4$  mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>),  $\bullet$ . Durée d'exposition = 15 min. Deux expériences différentes ont été réalisées (A et B).



**Figure 4.7:** Prise en charge du Cd (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ) par *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 5, en présence de NTA ( $[NTA] = 100$  nM),  $\circ$ , ou en présence d'acide humique Suwannee River ( $[AHSR] = 5,4$  mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>),  $\bullet$ . Durée d'exposition = 15 min. Deux expériences différentes ont été réalisées (A et B).

*Prise en charge du Cd par S. capricornutum en présence de substances humiques.* Pour vérifier les résultats précédents, à savoir l'applicabilité du MIL à la prise en charge du Cd en présence des substances humiques aquatiques, nous avons également effectué les mêmes mesures avec une seconde algue, *S. capricornutum*, pour laquelle nous avons mesuré de l'adsorption de l'acide humique et fulvique à pH 5 (Fig. 2.5).

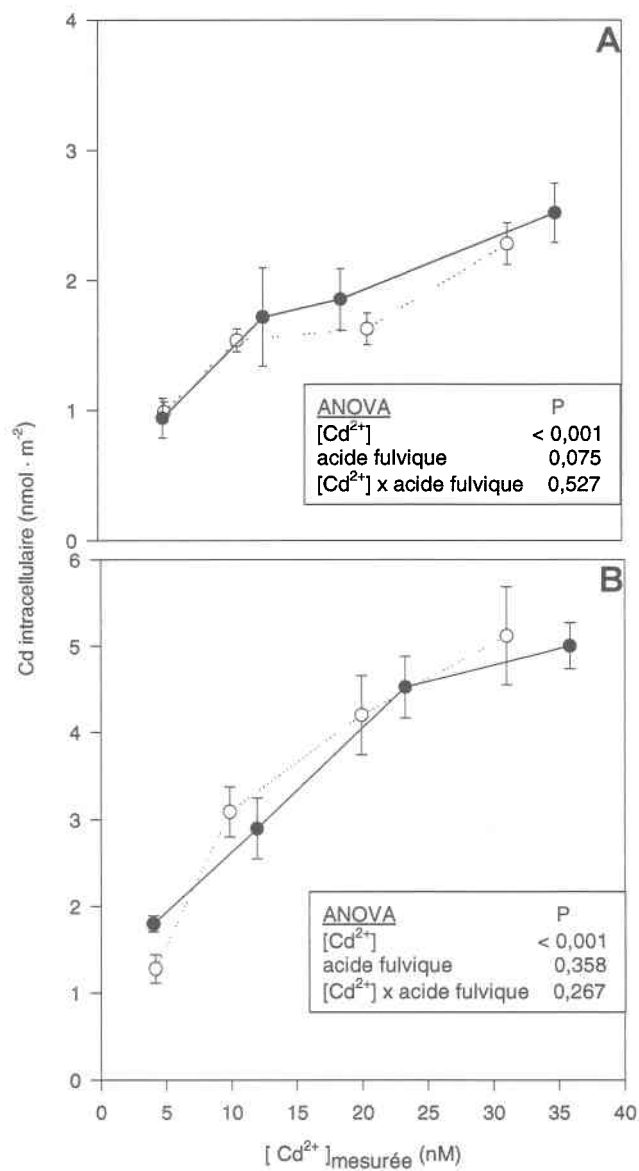
En accord avec les résultats obtenus pour *C. reinhardtii*, la prise en charge du Cd par *S. capricornutum* en absence et en présence de substances humiques adsorbées est identique à la prise en charge en présence de NTA pour une même concentration de Cd libre (Figs. 4.8 – 4.10). À pH 7, en absence d'acide fulvique adsorbé (Fig. 2.5), la prise en charge du Cd augmente significativement avec la concentration de Cd libre dans le milieu d'exposition pour des expositions de 10 et de 20 min ( $P < 0,001$ , ANOVA bifactorielle 2 x 2 x 4 ; Figs 4.8A et B) mais elle n'est pas significativement influencée par la présence de l'acide fulvique ( $P = 0,385$  et  $0,076$ , ANOVA bifactorielle 2 x 2 x 4 ; Figs 4.8A et B). Tel qu'attendu, la prise en charge après 20 min d'exposition est environ le double de la prise en charge après 10 min. La prise en charge à pH 5 a été ~ 20 fois plus faible qu'à pH 7, vraisemblablement en raison de la compétition avec  $H^+$  pour les sites de prise en charge à la surface de la membrane cellulaire. Harrison et al. (1986) et Schenk et al. (1988) ont également montré chez des algues vertes une compétition de  $H^+$  pour les sites de prises en charge du Zn, et du Fe et du Mn respectivement.

À pH 5, en présence d'acide humique adsorbé (Fig. 2.5), la prise en charge du Cd augmente significativement avec la concentration de Cd libre dans le milieu d'exposition ( $P < 0,001$ , ANOVA bifactorielle 2 x 2 x 3) mais elle n'est pas significativement influencée par la présence de l'acide humique ( $P = 0,434$ , ANOVA bifactorielle 2 x 2 x 3 ; Fig. 4.9). De même, à pH 5 en présence d'acide fulvique adsorbé (Fig. 2.5), la prise en charge du Cd augmente significativement avec la concentration de Cd libre dans le milieu d'exposition ( $P < 0,001$ , ANOVA bifactorielle 2 x 2 x 3) mais elle n'est pas significativement influencée par la présence de l'acide fulvique ( $P = 0,298$ , ANOVA bifactorielle 2 x 2 x 3 ; Fig. 4.10). À une concentration de Cd libre égale, le Cd accumulé est identique dans le milieu NTA et dans les milieux contenant de l'acide fulvique.

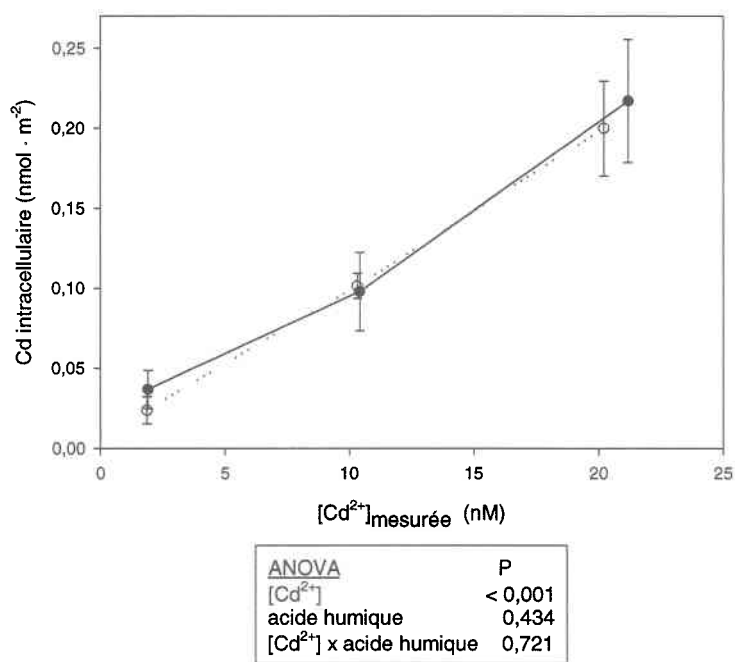


L'absence d'effets sur la prise en charge du Cd de l'acide humique ou fulvique adsorbé à la surface cellulaire implique que les substances humiques adsorbées ne ralentissent pas la cinétique du transport du Cd de la solution externe vers les sites de prise en charge, à tout le moins pas de façon significative par rapport à la cinétique du transport transmembranaire, qui demeure l'étape limitant la prise en charge. De plus, les substances humiques adsorbées ne semblent donc pas interférer directement avec les protéines responsables du transport intracellulaire du Cd.

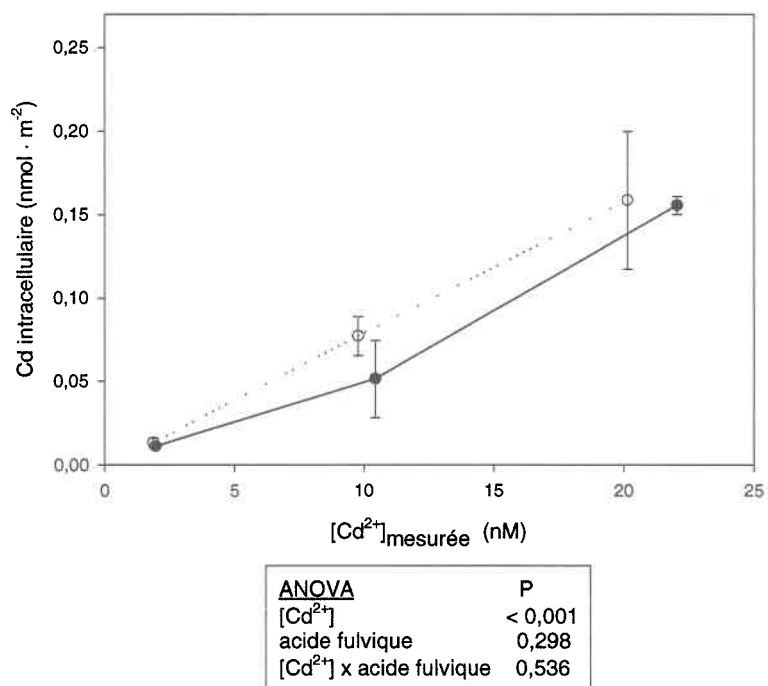
Nos résultats sont en contradiction avec l'explication de Pempkowiak et Kosakowska (1998) quant à la prise en charge réduite de Cd par *Chlorella vulgaris* en présence de substances humiques marines. Ils attribuent cette réduction à un effet de l'adsorption des substances humiques à la surface cellulaire plutôt qu'à la complexation en solution. Pour arriver à cette conclusion, ces auteurs se basent sur le pouvoir limité de complexation des substances humiques étudiées, mais ils ont peut-être sous-estimé la complexation du Cd dans leur milieu d'exposition. La différence entre nos conclusions et celles de ces chercheurs pourrait également découler du fait que nous avons étudié la prise en charge intracellulaire à temps court, alors qu'ils ont mesuré la prise en charge totale après 7 j. Elle pourrait également découler du fait que les substances humiques marines étudiées par Pempkowiak et Kosakowska (1998) sont vraisemblablement très différentes des substances humiques Suwannee River. Les substances humiques marines sont entre autres plus aliphatiques que les substances humiques terrestres ou d'eaux douces.



**Figure 4.8:** Prise en charge du Cd (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ) à pH 7 par *Selenastrum capricornutum* en présence de NTA ( $[NTA] = 100$  nM), ○, et en présence d'acide fulvique Suwannee River ( $[AFSR] = 5,4$  mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>), ●. Durées d'exposition = 10 min (A) et 20 min (B).



**Figure 4.9:** Prise en charge du Cd (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ) à pH 5 par *Selenastrum capricornutum*, en présence de NTA ([NTA] = 100 nM),  $\circ$ , et en présence d'acide humique Suwannee River ([AHSR] = 5,4 mg · L<sup>-1</sup>),  $\bullet$ . Durée d'exposition = 20 min.



**Figure 4.10:** Prise en charge du Cd (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ) à pH 5 par *Selenastrum capricornutum*, en présence de NTA ([NTA] = 100 nM),  $\circ$ , et en présence d'acide fulvique Suwannee River ([AFSR] = 5,4 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>),  $\bullet$ . Durée d'exposition = 20 min.

## 5 Conclusions

### 5.1 Interactions des substances humiques les membranes biologiques

Les substances humiques sont reconnues pour stimuler la croissance du phytoplancton. Cette stimulation de la croissance est actuellement attribuée de façon générale à l'effet indirect de la complexation des métaux par les substances humiques en solution. Cependant, avant la reconnaissance générale de l'importance de la complexation sur la biodisponibilité des métaux (ex. : avant 1970), des effets physiologiques directs des substances humiques sur le phytoplancton ont également été proposés pour expliquer les effets des substances humiques sur la croissance du phytoplancton. Nos travaux de recherche réconcilient en quelque sorte ces deux écoles de pensée puisqu'ils démontrent clairement l'existence simultanée d'effets directs des substances humiques sur les cellules algales et d'effets indirects via la complexation des métaux en solution.

Pour mettre en évidence l'influence de l'adsorption des substances humiques sur les processus de transports membranaires, nous avons voulu d'abord déterminer les facteurs influençant l'adsorption des substances humiques aquatiques aux surfaces biologiques. Nous avons trouvé que l'adsorption des substances humiques à la surface de cellules d'algues vertes est modulée par le pH, par la charge nette négative aux surfaces biologiques, et par la composition des substances humiques (acide fulvique *versus* acide humique).

L'adsorption des substances humiques à la surface des membranes biologiques résulte en majeure partie d'interactions hydrophobes entre les domaines hydrophobes au sein des substances humiques et à la surface cellulaire. Des mesures directes d'adsorption, faites à des pH différents, ont permis de montrer l'augmentation à faible pH de l'adsorption d'un acide humique aquatique et d'un acide fulvique aquatique à la surface de l'algue verte *S. capricornutum* et à la surface de sphères de latex, utilisées comme surface analogue aux surfaces biologiques. Tel que démontré précédemment par Campbell et al. (1997), le pH apparaît donc un paramètre important déterminant l'importance des interactions entre les

substances humiques et les surfaces biologiques. Cet effet du pH sur l'adsorption, l'inhibition compétitive de l'adsorption par un surfactant non-ionique (sphères de latex) et l'augmentation de la perméabilité membranaire en présence de substances humiques sont tous cohérents avec l'implication d'interactions hydrophobes dans le processus d'adsorption.

L'importance des interactions entre les substances humiques aquatiques et les membranes biologiques est également modulée par les interactions électrostatiques répulsives entre les acides humique et fulvique et la surface biologique. Les mesures de mobilité électrophorétique n'ont pas permis de mettre en évidence de l'adsorption des substances humiques à la surface de deux algues vertes. Cependant les mesures de mobilité électrophorétique, de même que l'incorporation d'une charge nette négative aux vésicules de phospholipides étudiés, ont permis d'identifier la charge nette négative à la surface biologique comme un autre paramètre déterminant l'importance des interactions entre les substances humiques et la surface cellulaire. En effet, la quantité de substances humiques adsorbée diminue avec une augmentation des charges nettes négatives aux surfaces biologiques. De même, les interactions entre l'acide humique ou l'acide fulvique et les vésicules de phospholipides ont été fortement inhibées par l'incorporation d'un phospholipide chargé négativement.

Finalement, la composition des substances humiques, c'est à dire les proportions relatives d'acide fulvique et d'acide humique, influence de manière modeste l'importance des interactions entre les substances humiques et les surfaces biologiques. L'origine des substances humiques, terrestre *versus* aquatique, semble peu importante. L'utilisation des vésicules de phospholipides comme membranes biologiques modèles a permis de mettre en évidence une augmentation beaucoup plus marquée de la perméabilité de ces vésicules en présence de l'acide humique par rapport à l'acide fulvique isolé de la même rivière. Cette augmentation du transport membranaire passif a également été observée *in vivo* avec une algue verte en présence d'acide humique ou fulvique adsorbé à la surface cellulaire, bien que les différences marquées entre ces deux fractions n'aient pas été observées *in vivo*. Finalement, les expériences de perméabilité membranaire avec l'algue

verte suggèrent également qu'à des concentrations représentatives des eaux naturelles ( $\sim 5 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ ) les substances humiques terrestres ont des effets similaires aux substances humiques aquatiques testés.

## 5.2 Biodisponibilité des métaux dans les eaux naturelles

Nos travaux sur la biodisponibilité des métaux avaient pour objectif de déterminer les effets des substances humiques sur la prise en charge des métaux (Cd) par les algues vertes : via des échanges passifs à travers la membrane (en présence de complexes lipophiles) et via des échanges facilités à travers la membrane cellulaire (en présence de complexes hydrophiles).

La prise en charge par diffusion passive du complexe  $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$  par une algue verte a été augmentée en présence d'acide humique ou fulvique adsorbé à la surface cellulaire. La prise en charge de tels complexes lipophiles n'est pas prise en compte par le MIL puisqu'il s'agit d'un processus de transport passif ; ceci constitue donc une limite à l'application du MIL pour la prédiction de la biodisponibilité des métaux, d'autant plus que l'augmentation de la perméabilité membranaire en présence de substances humiques augmentera également la prise en charge de ces complexes lipophiles. Nos travaux n'ont considéré que le complexe  $\text{Cd}(\text{DDC})_2^0$ . Dans les eaux naturelles, il existe également des molécules organométalliques (ex. :  $\text{Hg}(\text{CH}_3)_2^0$ ) et d'autres complexes lipophiles dont la prise en charge par diffusion passive est susceptible d'être augmentée en présence de la matière organique naturelle ; les complexes  $\text{Ag}(\text{Cl})^0$ ,  $\text{Hg}(\text{Cl})_2^0$  et  $\text{M}(\text{xanthates})_x^0$  sont tous des complexes potentiellement importants au niveau de la biodisponibilité des métaux (Hudson, 1998).

Cependant, l'importance de la prise en charge par voie passive des métaux par le phytoplancton dans les eaux naturelles n'est pas encore évaluée. Elle dépendra de la présence de ligands formant des complexes lipophiles dans les eaux naturelles et de la compétition entre les substances humiques et ces ligands pour la complexation des

métaux. À l'heure actuelle, il n'existe pas d'étude démontrant l'existence répandue de complexes organométalliques lipophiles d'origine anthropique ou naturelle dans les eaux naturelles (Phinney et Bruland, 1997). Cependant, l'utilisation des dithiocarbamates comme accélérateurs dans l'industrie des polymères et comme herbicides est largement répandue (Rouleau et al., 1998). On peut donc présumer que la prise en charge de complexes lipophiles pourra augmenter significativement la prise en charge des métaux dans certains environnements aquatiques contaminés, comme par exemple dans les eaux de ruissellement de terres agricoles où sont utilisés comme fongicides de tels ligands. L'importance de cette voie de prise en charge dépendra également de la stabilité de ces complexes dans les eaux naturelles. Nos résultats avec le Cd et les résultats de Phinney et Bruland (1994, 1997) avec le Cd, le Cu, le Ni et le Pb indiquent clairement que le DDC complexe ces métaux même en présence de substances humiques aquatiques, ce qui n'est pas nécessairement le cas pour d'autres ligands formant des complexes lipophiles. Ainsi, Florence et al. (1992) ont observé une diminution de la toxicité du Cu formant un ligand lipophile avec l'oxine en présence d'un acide humique et ils ont conclu que cette diminution était liée à la complexation du Cu par l'acide humique. Finalement, l'influence de la prise en charge de ces complexes lipophiles sur la toxicité a été démontrée par les travaux de Florence et al. (1992, 1986), qui indiquent une grande toxicité du Cu sous formes de complexes lipophiles vis-à-vis d'une diatomée marine.

Nous avons également étudié la prise en charge du Cd en présence de ligands formant des complexes hydrophiles, soit le NTA ou les substances humiques aquatiques. Nos résultats constituent la première démonstration expérimentale quantitative de l'applicabilité du MIL pour prédire la prise en charge du Cd par le phytoplancton dans des milieux contenant des substances humiques aquatiques. Même en présence d'acide humique ou d'acide fulvique adsorbé à la surface cellulaire, il n'y a pas d'effets sur le transport du métal de la solution externe vers les sites de prise en charge ou sur le transport facilité du Cd. Ainsi, en absence de complexes lipophiles, les substances humiques ne semblent pas influencer significativement la biodisponibilité du Cd outre qu'en réduisant la concentration de Cd libre en solution en complexant une fraction du Cd en solution. À notre connaissance, les travaux de Sunda et Lewis (1978), réalisés avec le Cu, constituent



la seule autre étude quantitative qui montre l'applicabilité du MIL pour prédire la biodisponibilité des métaux vis-à-vis du phytoplancton dans les eaux contenant de la matière organique naturelle.

Cependant le MIL n'est pas applicable à tous les métaux ou pour tous les organismes. Ainsi, le MIL n'est pas applicable pour des métaux dont la prise en charge est sous contrôle cinétique, comme c'est le cas pour le Fe et la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* (Hudson et Morel, 1990) par exemple. De plus, en raison de la grande affinité de la matière organique pour le Cu, on peut s'attendre à ce que les complexes de Cu soient moins labiles et que les vitesses de dissociation des complexes Cu-MOD seront plus lentes que pour d'autres métaux comme le Cd ; la prise en charge du Cu par d'autres organismes est donc plus susceptible que le celle du Cd d'être sous un contrôle cinétique (Hudson, 1998). Un contrôle cinétique de la prise en charge du Cu pourrait expliquer certaines exceptions au MIL relevées par Campbell (1995) pour le Cu en présence de matière organique dissoute (Hudson, 1998).

D'autre part, Hill et al. (1996) ont identifié un enzyme membranaire chez *Chlamydomonas reinhardtii*, ayant pour fonction de réduire le Cu(II) en Cu(I). Weger (1999) a proposé que cette même réductase membranaire soit également responsable de la réduction du Fe(III) en Fe(II). Compte tenu de la très grande affinité du Cu pour les substances humiques et du fait que les substances humiques sont impliquées dans plusieurs réactions redox en milieu naturel, l'adsorption des substances humiques à la surface membranaire est susceptible d'affecter l'activité de cet enzyme. Étant donné que les prises en charge du Cu et du Fe sont fortement régulées chez le phytoplancton, des interactions au niveau des processus physiologiques impliqués pourraient avoir des conséquences importantes quant à la prise en charge de ces métaux par les algues munies de réductases membranaires.

En conclusion, nous avons démontré que les substances humiques peuvent agir directement sur la prise en charge du Cd, par une augmentation du transport passif du Cd

sous forme d'un complexe lipophile, et indirectement, en réduisant la biodisponibilité du Cd par la complexation en solution. Cependant, la toxicité du Cd vis-à-vis du phytoplancton en présence de substances humiques aquatiques, bien que reliée à la prise en charge du Cd, pourrait quant à elle être influencée par la présence de substances humiques adsorbées.

## 6 Bibliographie

- Aiken, G. R. 1985. "Isolation and concentration techniques for aquatic humic substances." dans *Humic Substances in Soil, Sediment and Water. Geochemistry, Isolation and Characterization*, eds G. R. Aiken, D. M. McKnight, R. L. Wenshaw, and P. MacCarthy. Chichester: John Wiley p. 363-385.
- . 1988. "A critical evaluation of the use of macroporous resin for the isolation of aquatic humic substances ." dans *Humic Substances and Their Role in the Environment*, vol. Dahlem Konferenzen, Eds. F. H. Frimmel et R. F. Christman. John Wiley & Sons Limited p. 15-28.
- Anderson, M. A., A. Y. C. Hung, D. Mills, et M. S. Scott. 1995. "Factors affecting the surface tension of soil solutions and solutions of humic acids." *Soil Sci.* 160:111-116.
- Avena, M. J. et L. K. Koopal. 1998. "Desorption of humic acids from an iron oxide surface." *Environ. Sci. Technol.* 32:2572-2577.
- . 1999. "Kinetics of humic acid adsorption at solid-water interfaces." *Environmental Science & Technology* 33:2739-2744.
- Avery, S. V., G. A. Codd, et G. M. Gadd. 1993. "Transport kinetics, cation inhibition and intracellular location of accumulated caesium in the green microalga *Chlorella salina*." *J. Gen. Microbiol.* 139:827-834.
- Balnois, E., K. J. Wilkinson, J. R. Lead, et J. Buffle. 1999. "Atomic force microscopy of humic substances: Effects of pH and ionic strength." *Environ. Sci. Technol.* 33:3911-3917.
- Banks, C. J. et M. E. Parkinson. 1992. "The mechanism and application of fungal biosorption to color removal from raw waters." *J. Chem. Technol. Biotechnol.*

51:192-196.

- BastosGonzalez, D., R. HidalgoAlvarez, et F. J. delasNieves. 1996. "Electrokinetic behavior of polystyrene latexes with different surface groups: Effect of heat treatment." *J. Colloid Interface Sci.* 177:372-379.
- Bates, R. G. 1964. *Determination of pH. Theory and Practice*. New York: J. Wiley.
- Beckett, R. 1990. "The surface chemistry of humic substances in aquatic systems." dans *Surface and Colloid Chemistry in Natural Waters and Water Treatment*, Ed R. Beckett. London: Plenum Press p. 3-20.
- Benashir, T., M. Monette, J. Grenier, et M. Lafleur. 1997. "Melittin-induced leakage from phosphatidylcholine vesicles is modulated by cholesterol: a property used for membrane targeting." *Eur. Biophys. J.* 25:201-210.
- Blaise, C. et L. Ménard. 1998. "A micro-algal solid-phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments." *Water Qual. Res. J. Can.* 33:133-151.
- Block, M. et A. Wicklund Glynn. 1992. "Influence of xanthates on the uptake of <sup>109</sup>Cd by eurasian dace (*Phoxinus phoxinus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Environ. Toxicol. Chem.* 11:873-879.
- Boerschke, R. C., E. A. Gallie, N. Belzile, R. N. Gedye, et J. R. Morris. 1996. "Quantitative elemental and structural analysis of dissolved organic carbon fractions from lakes near Sudbury, Ontario." *Can. J. Chem.* 74:2460-2470.
- Bordi, F., C. Cametti, et A. Naglieri. 1999. "Ion transport in lipid bilayer membranes through aqueous pores." *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 159:231-237.
- Breeuwer, P., J.-L. Drocourt, N. Bunschoten, M. H. Zwietering, F. M. Rombouts, et T.

- Abee. 1995. "Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product." *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1614-1619.
- Buffle, J. 1988. *Complexation Reactions in Aquatic Systems*. Chichester, UK: Ellis Horwood.
- Buffle, J., K. J. Wilkinson, S. Stoll, M. Filella, et J. W. Zhang. 1998. "A generalized description of aquatic colloidal interactions: The three-colloidal component approach." *Environ. Sci. Technol.* 32:2887-2899.
- Bushaw, K. L., R. G. Zepp, M. A. Tarr, D. Schulz-Jander, R. A. Bourbonniere, R. E. Hodson, W. L. Miller, D. A. Bronk, et M. A. Moran. 1996. "Photochemical release of biologically available nitrogen from aquatic dissolved organic matter." *Nature* 381:404-407.
- Campbell, P. G. C. 1995. "Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model." dans *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, vol. IUPAC, eds. A. Tessier et D. R. Turner. John Wiley & Sons Ltd p. 45-102.
- Campbell, P. G. C., M. R. Twiss, et K. J. Wilkinson. 1997. "Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells - implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54:2543-2554.
- Carlson, G. et J. Silverstein. 1997. "Effect of ozonation on sorption of natural organic matter by biofilm." *Wat. Res.* 31:2467-2478.
- Chaminade, R. et R. Blanchet. 1953. "Mécanisme de l'action stimulante de l'humus sur la nutrition minérale des végétaux." *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 237:1768-1770.

- Chen, Y. et M. Schnitzer. 1978. "The surface tension of aqueous solutions of soil humic acid substances." *Soil Sci.* 125:7-15.
- Claus, H. et Z. Filip. 1998. "Degradation and transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*." *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 26:180-185.
- Corisco, G. J. A. et V. M. C. Carreiro. 1990. "Étude expérimentale sur l'accumulation et la rétention du <sup>134</sup>Cs par une microalgues planctonique, *Selenastrum capricornutum* Printz." *Rev. Sci. Eau* 3:457-468.
- Cosovic, B. et V. Vojvodic. 1982. "The application of ac polarography to the determination of surface-active substances in seawater." *Limnol. Oceanogr.* 27:361-369.
- Cremers, A., A. Elsen, P. De Preter, et A. Maes. 1988. "Quantitative analysis of radiocaesium retention in soils." *Nature* 335:247-249.
- Daly, H. R., I. C. Campbell, et B. T. Hart. 1990a. "Copper toxicity to *Paratya australiensis*: I. Influence of nitrilotriacetic acid and glycine." *Environ. Toxicol. Chem.* 9:997-1005.
- Daly, H. R., M. J. Jones, B. J. Hart, et I. C. Campbell. 1990b. "Copper toxicity to *Paratya australiensis* III. Influence of dissolved organic matter ." *Environ. Toxicol. Chem.* 9:1013-1018.
- Davis, J. A. 1980. "Adsorption of natural organic matter from freshwater environments by aluminium oxide." dans *Contaminants and Sediments, Volume 2*, ed. R. A. Baker. Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science Publishers, inc. p. 279-304.
- De Haan, H. 1974. "Effect of a fulvic acid fraction on the growth of a *Pseudomonas* from Tjeukemeer (The Netherlands)." *Freshwat. Biol.* 4:301-310.

- De Haan, H. 1977. "Effect of benzoate on microbial decomposition of fulvic acids in Tjeukemeer (The Netherlands)." *Limnol. Oceanogr.* 22:38-44.
- . 1992. "Impacts of environmental changes on the biogeochemistry of aquatic humic substances." *Hydrobiologia* 229:59-71.
- Dudley, R. J. et P. F. Churchill. 1995. "Effect and potential ecological significance of the interaction of humic acids with two aquatic extracellular proteases." *Freshwat. Biol.* 34:485-494.
- Edwards, M., M. M. Benjamin, et J. N. Ryan. 1996. "Role of organic acidity in sorption of natural organic matter (NOM) to oxide surfaces." *Colloids Surfaces A* 107:297-307.
- Evans, D. W., J. J. Alberts, et R. A. Clark. 1983. "Reversible ion-exchange fixation of cesium-137 leading to mobilization from reservoir sediments." *Geochim. Cosmochim. Acta* 47:1041-1049.
- Fiske, C. H. et Y. SubbaRow. 1925. "The colorimetric determination of phosphorus." *J. Biol. Chem.* 66:375-400.
- Florence, T. M., H. K. J. Powell, J. L. Stauber, et R. M. Town. 1992. "Toxicity of lipid-soluble copper(II) complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*: amelioration by humic substances." *Wat. Res.* 26:1187-1193.
- Florence, T. M. et J. L. Stauber. 1986. "Toxicity of copper complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*." *Aquat. Toxicol.* 8:11-26.
- Fortin, C. et P. G. C. Campbell. 1998. "An ion-exchange technique for free-metal ion measurements ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ): Applications to complex aqueous media." *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 72:173-194.

- Fortin, C. et J. Gauthier. 1995. *Constantes de formation et différences d'enthalpie pour divers complexes métalliques : Comparaison de différentes base de données*. Rapport interne 136. Québec: INRS-Eau.
- Francko, D. A. 1986. "Epilimnetic phosphorus cycling: Influence of humic materials and iron on coexisting major mechanisms." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43:302-310.
- Francko, D. A. et R. T. Heath. 1982. "UV-sensitive complexe phosphorus: Association with dissolved humic material and iron in a bog lake." *Limnol. Oceanogr.* 27:564-569.
- Frimmel, F. H. et L. Huber. 1996. "Influence of humic substances on the aquatic adsorption of heavy metals on defined mineral phases." *Env. Int.* 22:507-517.
- Furusawa, K. et K. Uchiyama. 1998. "Collaborative Studies of Zeta-Potential Measurements and Electrophoretic Measurements Using Reference Sample." *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 140:217-226.
- Garnham, G. W., G. A. Codd, et G. M. Gadd. 1993. "Uptake of cobalt and cesium by microalgal- and cyanobacterial-clay mixtures." *Microb. Ecol.* 25:71-82.
- Gauthier, J. 1995. *Toxicité et bioaccumulation du cadmium chez le saumon atlantique juvénile (Salmo salar) en présence de matière organique dissoute (MOD) synthétique ou naturelle*. Mémoire de maîtrise, Québec, INRS-Eau.
- Gennis, R. B. 1989. *Biomembranes Molecular Structure and Function*. New-York: Springer-Verlag.
- Gerritsen, J. et S. W. Bradley. 1987. "Electrophoretic mobility of natural particles and cultured organisms in freshwaters." *Limnol. Oceanogr.* 32:1049-1058.
- Ghosh, K. et M. Schnitzer. 1980. "Macromolecular structures of humic substances." *Soil*



*Sci.* 129:266-276.

- . 1981. "Fluorescence excitation spectra and viscosity behavior of a fulvic acid and its copper and iron complexes." *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45:25-29.
- Giesy, J. P., A. Newell, et G. J. Laversee. 1983. "Copper speciation in soft, acid, humic waters: effects on copper bioaccumulation by and toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae)." *Sci. Total Environ.* 28:23-36.
- Gilbert, F., F. Galgani, et Y. Cadiou. 1992. "Rapid assessment of metabolic activity in marine microalgae: application in ecotoxicological tests and evaluation of water quality." *Mar. Biol.* 112:199-205.
- Granier, J.-M., M. K. Pham, et P. M. J. M. Ciffroy. 1997. "Kinetics of trace element complexation with suspended matter and with filtrable ligands in freshwater." *Environ. Sci. Technol.* 31:1597-1606.
- Gu, B., J. Schmitt, Z. Chen, et L. M. F. J. Liang. 1995. "Adsorption and desorption of different organic matter fractions on iron oxide." *Geochim. Cosmochim. Acta* 59:219-229.
- Gu, B., J. Schmitt, Z. Chen, L. Liang, et J. F. McCarthy. 1994. "Adsorption and desorption of natural organic matter on iron oxide: Mechanisms and models." *Environ. Sci. Technol.* 28:38-46.
- Haitzer, M., S. Hoss, W. Traunspurger, et C. Steinberg. 1998. "Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms - A Review." *Chemosphere* 37:1335-1362.
- Hare, L. et A. Tessier. 1996. "Predicting animal cadmium concentrations in lakes." *Nature* 380:430-432.

- Harrison, G. I., P. G. C. Campbell, et A. Tessier. 1986. "Effects of pH changes on zinc uptake by *Chlamydomonas variabilis* grown in batch culture." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43:687-693.
- Hill, K. L., R. Hassett, D. Kosman, et S. Merchant. 1996. "Regulated copper uptake in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to copper availability." *Plant Physiol.* 112:697-704.
- Hudson, R. J. M. 1998. "Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Observations and predictions of non-equilibrium effects." *Sci. Total Environ.* 219:95-115.
- Hudson, R. J. M. et F. M. M. Morel. 1990. "Iron transport in marine phytoplankton: kinetics of cellular and medium coordination reactions." *Limnol. Oceanogr.* 35:1002-1020.
- Hunter, K. A. 1980. "Microelectrophoretic properties of natural surface-active organic matter in coastal seawater." *Limnol. Oceanogr.* 25:807-822.
- . 1983. "On the estuarine mixing of dissolved substances in relation to colloid stability and surface properties." *Geochim. Cosmochim. Acta* 47:467-473.
- Hunter, K. A. et P. S. Liss. 1982. "Organic matter and the surface charge of suspended particles in estuarine waters." *Limnol. Oceanogr.* 27:322-335.
- James, A. M. 1979. "Electrophoresis of particles in suspension." *Surface Colloid Sci.* 11:121-185.
- Jansson, M. 1998. "Nutrient limitation and bacteria - phytoplankton interactions in humic lakes." dans *Aquatic Humic Substances*, vol. Ecological Studies, Eds. D. O. Hessen et L. J. Tranvik. Berlin: Springer-Verlag p. 177-195.

- Jayasundera, S. et A. Torrents. 1997. "Natural organic matter sorption by kaolinite: modified langmuir isotherm." *J. Environ. Eng. ASCE* 123:1162-1165.
- Joesten, M. D. et L. J. Schaad. 1974. *Hydrogen Bonding*. New-York: Marcel Dekker, inc.
- Johnson, W. P. et B. E. Logan. 1996. "Enhanced transport of bacteria in porous media by sediment-phase and aqueous-phase natural organic matter." *Wat. Res.* 30:923-931.
- Jones, R. I. 1992. "The influence of humic substances on lacustrine planktonic food chains." *Hydrobiologia* 229:73-91.
- Jones, R. I., K. Salonen, et H. De Haan. 1988. "Phosphorus transformations in the epilimnion of humic lakes: abiotic interactions between dissolved humic materials and phosphate." *Freshwat. Biol.* 19:357-369.
- Kawahigashi, M. et N. Fujitake. 1998. "Surface-active properties of particle Size fractions in two humic Acids." *Soil Sci. Plant Nutri.* 44:497-505.
- Khristeva, L. A. 1953. "The participation of humic acids and other organic substances in the nutrition of higher plants." *Pochvivedenie* 10:46-59.
- Kieber, R. J., A. Li, et P. J. Seaton. 1999. "Production of nitrite from the photodegradation of dissolved organic matter in natural waters." *Environ. Sci. Technol.* 33:993-998.
- Kiefer, E., L. Sigg, et P. Schosseler. 1997. "Chemical and spectroscopic characterization of algae surfaces." *Environ. Sci. Technol.* 31:759-764.
- Kretzschmar, R., D. Hesterberg, et H. Sticher. 1997. "Effects of adsorbed humic acid on surface charge and flocculation of kaolinite." *Soil Science Society of America Journal* 61:101-108.
- Laegreid, M., J. Alstad, D. Klaveness, et H. M. Seip. 1983. "Seasonal variation of

cadmium toxicity toward the alga *Selenastrum capricornutum* Printz in two lakes with different humus content." *Environ. Sci. Technol.* 17:357-361.

Lead, J. R., K. J. Wilkinson, K. Starchev, A. Canonica, et J. Buffle. 2000. "Determination of diffusion coefficients of humic substances by fluorescence correlation spectroscopy: Role of solution conditions." *Environ. Sci. Technol.* 34:1365-1369.

Lee, Y. S. et R. J. Bartlett. 1976. "Stimulation of plant growth by humic substances." *Soil Sci. Soc. Am. J.* 40:876-879.

Leenheer, J. A., D. M. McKnight, E. M. Thurman, et P. MacCarthy. 1995. "Structural components of proposed structural models of fulvic acid from the Suwannee river." dans *Humic Substances in the Suwannee River, Georgia: Interactions, Properties and Proposed Structures*, vol. Water-Supply Paper 2373, Eds. R. C. Averett, J. A. Leenheer, D. M. McKnight, et K. A. Thorn. Denver, CO: US Geological Survey p. 195-211.

Lindell, M. J., W. Granéli, et L. J. Tranvik. 1995. "Enhanced bacterial growth in response to photochemical transformation of dissolved organic matter." *Limnol. Oceanogr.* 40:195-199.

Loder, T. C. et P. S. Liss. 1985. "Control by organic coatings of the surface charge of estuarine suspended particles." *Limnol. Oceanogr.* 30:418-421.

Malcolm, R. L., G. R. Aiken, E. C. Bowles, et J. D. Malcolm. 1995. "Isolation of fulvic and humic acids from the Suwannee river." dans *Humic Substances in the Suwannee River, Georgia: Interactions, Properties and Proposed Structures*, vol. Water-Supply Paper 2373, Eds. R. C. Averett, J. A. Leenheer, D. M. McKnight, et K. A. Thorn. Denver, CO: US Geological Survey p. 13-19.

McKnight, D. M. et G. R. Aiken. 1998. "Sources and age of aquatic humus." dans *Aquatic Humic Substances*, vol. Ecological Studies Vol. 133, Eds D. O. Hessen et

L. J. Tranvik. Berlin: Springer-Verlag p. 9-39.

- McLarnon-Riches, C. J., C. E. Rolph, D. L. A. Greenway, et P. K. Robinson. 1998. "Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum carpicornutum* lipids." *Phytochem.* 49:1241-1247.
- Meador, J. P. 1991. "The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity." *Aquat. Toxicol.* 19:13-32.
- Miskovic, D, Lj. Conkic, B. Dalmacija, et M. Gantar. 1992. "Removal of some radionuclides from water by bioaccumulation." *Wat. Sci. Tech.* 26:2129-2132.
- Morel, F. M. M. 1983. *Principles of Aquatic Chemistry*. New-York: Wiley-Interscience.
- Morel, F. M. M., J. C. Westall, J. G. Rueter, et J. P. Chaplick. 1975. *Description of the Algal Growth Media "Aquil" and "Fraquil"*. Technical Note No. 16. Depart.Civil Eng., Mass. Inst. Technol.
- Münster, U. 1991. "Extracellular enzyme activity in eutrophic and polyhumic lakes." dans *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*, vol. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience, ed. R. J. Chrost. New-York: Springer-Verlag p. 96-122.
- Myers, V. B., R. L. Iverson, et R. C. Harriss. 1975. "The effect of salinity and dissolved organic matter on surface charge characteristics of some euryhaline phytoplankton." *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 17:59-68.
- Neihof, R. et G. Loeb. 1974. "Dissolved organic matter in seawater and the electric charge of immersed surfaces." *J. Mar. Res.* 32:5-12.
- Némethy, G. et H. A. Scheraga. 1964. "Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. IV. The thermodynamic properties of liquid water and deuterium oxide."

*J. Chem. Phys.* 41:680-689.

- Newton, P. P. et P. S. Liss. 1987. "Positively charged suspended particles: Studies in an iron-rich river and its estuary." *Limnol. Oceanogr.* 32:1267-1276.
- Ochs, M., B. Cosovic, et W. Stumm. 1994. "Coordinative and hydrophobic interaction of humic substance with hydrophilic Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and hydrophobic mercury surfaces." *Geochim. Cosmochim. Acta* 58:639-650.
- Ongerth, J. E. et J. P. Pecoraro. 1996. "Electrophoretic mobility of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts." *J. Environ. Eng. ASCE* 122:228-231.
- Panosso, R. et E. Graneli. 2000. "Effects of dissolved organic matter on the growth of *Nodularia spumigena* (Cyanophyceae) cultivated under N or P deficiency." *Marine Biology* 136:331-336.
- Parent, L., M. R. Twiss, et P. G. C. Campbell. 1996. "Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga *Chlorella*: A test of the free-ion model of trace metal toxicity." *Environ. Sci. Technol.* 30:1713-1720.
- Pempkowiak, J. et A. Kosakowska. 1998. "Accumulation of cadmium by green algae *Chlorella vulgaris* in the presence of marine humic substances." *Environ. Int.* 24:583-588.
- Phinney, J. T. et K. W. Bruland. 1994. "Uptake of lipophilic organic Cu, Cd, and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*." *Environ. Sci. Technol.* 28:1781-1790.
- . 1997. "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.

- Reddy, M. M., J. A. Leenheer, et R. L. Malcolm. 1995. "Elemental analysis and heat of combustion of fulvic acid from the Suwannee river." dans *Humic Substances in the Suwannee River, Georgia: Interactions, Properties and Proposed Structures*, vol. Water-Supply Paper 2373, Eds. R. C. Averett, J. A. Leenheer, D. M. McKnight, et K. A. Thorn. Denver, CO: US Geological Survey p. 81-88.
- Romero-Cano, M. S., A. Martín-Rodríguez, G. Chauveteau, et F. J. de las Nieves. 1998. "Colloidal stabilization of polystyrene particles by adsorption of nonionic surfactants I. Adsorption study." *J. Colloid Interface Sci.* 198:266-272.
- Rouleau, C., M. Block, et H. Tjalve. 1998. "Kinetics and body distribution of waterborne Zn-65(II), Cd-109(II), Hg-203(II), and (CH<sub>3</sub>Hg)-Hg-203(II) in phantom midge larvae (*Chaoborus americanus*) and effects of complexing agents." *Environ. Sci. Technol.* 32:1230-1236.
- Samson, G. et S. A. Visser. 1989. "Surface-active effects of humic acids on potato cell membrane properties." *Soil Biol. Biochem.* 21:343-347.
- Schecher, W. D. et D. McAvoy. 1994. *Mineql*. Vers. 3.01. Hallowell, ME: Environmental Research Software.
- Schechter, E et B. Rossignol. 1997. *Biochimie et biophysique des membranes - Aspects structuraux et fonctionnels*. 2ième édition ed. Paris: Masson.
- Schenk, R. C., A. Tessier, et P. G. C. Campbell. 1988. "The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga." *Limnol. Oceanogr.* 33:538-550.
- Schlautman, M. A. M. J. J. 1994. "Adsorption of aquatic humic substances on colloidal-size aluminium oxide particles: Influence of solution chemistry." *Geochim. Cosmochim. Acta* 58:4293-4303.
- Schnitzer, M. 1976. "The Chemistry of Humic Substances." dans *Second Intern. Symp.*

*Environ. Biogeochem.* ed. J. Nriagu, p.89-107.

- Sedlacek, J. T. Källqvist, et E. T. Gjessing. 1983. "Effect of a aquatic humus on uptake and toxicity of cadmium to *Selenastrum capricornum* Printz." dans *Aquatic and Terrestrial Humic Materials*, eds R. F. Christman et E. T. Gjessing. Ann Harbor, MI: Ann Harbor Science Publisher p. 495-516.
- Serkiz, S. M. et M. E. Perdue. 1990. "Isolation of dissolved organic matter from the Suwannee River using reverse osmosis." *Wat. Res.* 24:911-916.
- Shinitzky, M. 1984. "Membrane fluidity and cellular functions." dans *Physiology of Membrane Fluidity*, vol. 1, édi. M. Shinitzky. Boca Raton: CRC Press p. 1-51.
- Simkiss, K. et M. L. Taylor. 1995. "Transport of metals across membranes." dans *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Eds. A. Tessier et D. R. Turner. New York: Wiley p. 1-44.
- Snell, T. W., J. L. Mitchell, et S. E. Burbank. 1996. "Rapid toxicity assessment with microalgae using *in vivo* esterase inhibition." dans *Techniques in Aquatic Toxicology*, Ed. G. K. Ostrander. Boca Raton, FL: Lewis p. 13-22.
- Stumm, W. 1992. *Chemistry of the Solid-Water Interface*. Toronto: John Wiley & Sons.
- Sunda, W. G. et P. A. Gillespie. 1979. "The response of a marine bacterium to cupric ion and its use to estimate cupric ion activity in seawater." *J. Mar. Res.* 37:761-777.
- Sunda, W. G. et S. A. Huntsman. 1998. "Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems." *Sci. Total Environ.* 219:165-181.
- Sunda, W. G. et D. J. Kieber. 1994. "Oxidation of humic substances by manganese oxides yields low-molecular-weight organic substrates." *Nature* 367:62-64.



- Sunda, W. G. et J. A. M. Lewis. 1978. "Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*." *Limnol. Oceanogr.* 23:870-876.
- Theng, B. K. G. 1976. "Interactions between montmorillonite and fulvic acid." *Geoderma* 15:243-251.
- Thurman, E. M. 1985. *Organic Geochemistry of Natural Waters*. Dordrecht: Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk publishers (Kluwer Academic Publishers Group).
- Thurman, E. M. et R. L. Malcolm. 1995. "Nitrogen and amino acids in fulvic and humic acids from the Suwannee river." dans *Humic Substances in the Suwannee River, Georgia: Interactions, Properties and Proposed Structures*, vol. Water-Supply Paper 2373, Eds. R. C. Averett, J. A. Leenheer, D. M. McKnight, et K. A. Thorn. Denver, CO: US Geological Survey p. 55-66.
- Tipping, E. 1981. "The adsorption of aquatic humic substances by iron oxydes." *Geochim. Cosmochim. Acta* 45:191-199.
- . 1990. "Interactions of organic acids with inorganic and organic surfaces." dans *Organic Acids in Aquatic Ecosystems*, Eds E. M. Perdue et E. T. Gjessing. Dahlem Konferenzen: John Wiley & Sons Ltd p. 209-221.
- . 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 & Geosciences* 20:973-1023.
- Tipping, E. et M. J. Heaton. 1983. "The adsorption of aquatic humic substances by two oxides of manganese." *Geochim. Cosmochim. Acta* 47:1393-1397.
- Tschapek, M. et C. Wasowski. 1976. "The surface activity of humic acid." *Geochim. Cosmochim. Acta* 40:1343-1345.

- Tulonen, T., K. Salonen, et L. Arvola. 1992. "Effects of different molecular weight fractions of dissolved organic matter on the growth of bacteria, algae and protozoa from a highly humic lake." *Hydrobiologia* 229:239-252.
- Twiss, M. R. et P. G. C. Campbell. 1995. "Regeneration of trace metals from picoplankton by nanoflagellate grazing." *Limnol. Oceanogr.* 40:1418-1419.
- . 1998. "Scavenging of  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{109}\text{Cd}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ , and  $^{153}\text{Gd}$  by plankton of the microbial food web in pelagic lake Erie surface waters." *J. Great Lakes Res.* 24:776-790.
- Visser, S. A. 1982. "Surface active phenomena by humic substances of aquatic origin." *Rev. Franc. Sci. Eau* 1:285-296.
- . 1985. "Physiological action of humic substances on microbial cells." *Soil Biol. Biochem.* 17:457-462.
- Volk, C. J., C. B. Volk, et L. A. Kaplan. 1997. "Chemical composition of biodegradable dissolved organic matter in streamwater." *Limnol. Oceanogr.* 42:39-44.
- Wang, Z.-D., B. C. Pant, et C. H. Langford. 1990. "Spectroscopic and structural characterization of a Laurentian fulvic acid: notes on the origin of the color." *Anal. Chim. Acta* 232:43-49.
- Warwick, P., L. Carlsen, A. Randall, R. Zhao, et P. Lassen. 1993. " $^{14}\text{C}$  and  $^{125}\text{I}$  labelling of humic material for use in environmental studies." *Chem. Ecol.* 8:65-80.
- Weger, H. G. 1999. "Ferric and cupric reductase activities in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: experiments using iron-limited chemostats." *Planta* 207:377-384.
- Wilkinson, K. J., A. JozRoland, et J. Buffle. 1997. "Different roles of pedogenic fulvic

acids and aquagenic biopolymers on colloid aggregation and stability in freshwaters." *Limnol. Oceanogr.* 42:1714-1724.

Xue, H. B. et L. Sigg. 1999. "Comparison of the complexation of Cu and Cd by humic or fulvic acids and by ligands observed in lake waters." *Aquat. Geochem.* 5:313-335.

Zhou, J. L. 1992a. "Biosorption and desorption of humic acid from water by microbial biomass." *Chemosphere* 24:1573-1589.

———. 1992b. "Biosorption and desorption of humic acid from water by microbial biomass." *Chemosphere* 24:1573-1589.

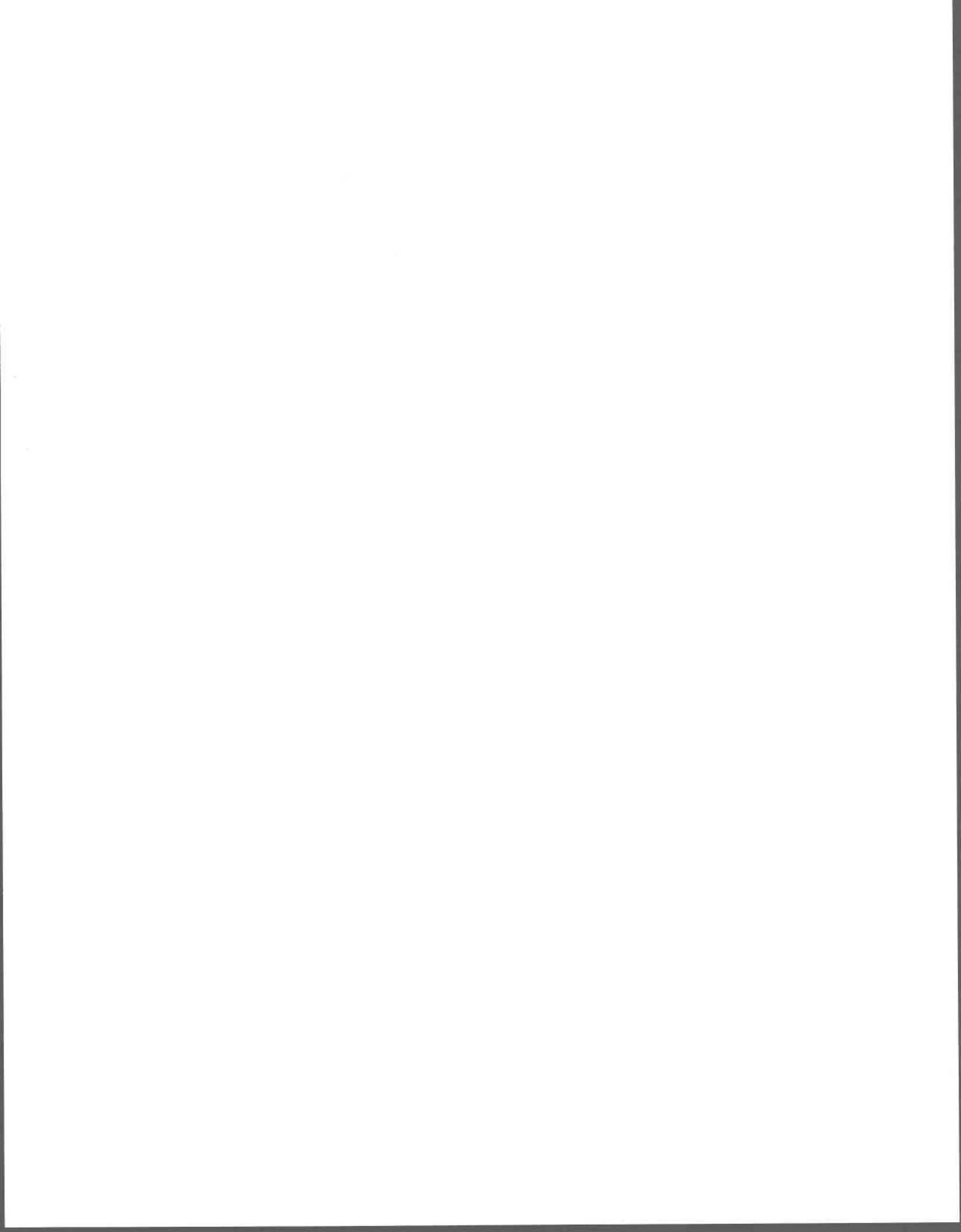
Zhou, J. L. et C. J. Banks. 1991. "The adsorption of humic acid fractions by fungal biomass." *Environ. Technol.* 12:519-530.

———. 1992. "Humic acid removal from water by biosorption." *Environ. Technol.* 13:727-737.

———. 1993. "Mechanism of humic acid colour removal from natural waters by fungal biomass biosorption." *Chemosphere* 27:607-620.

Zhou, J. L., S. Rowland, R. F. C. Mantoura, et J. Braven. 1994. "The formation of humic coatings on mineral particles under simulated estuarine conditions - A mechanistic study." *Wat. Res.* 28:571-579.

Zientara, M. 1983. "Effect of sodium humate on membrane potential in internodal cells of *Nitellopsis obtusa*." *Acta. Soc. Bot. Pol.* 52:271-277.



## **7 Annexes**

Annexe A : A test of environmentally relevant properties of radiolabelled aquatic humic substances.

Keywords: humic acid, fulvic acid, metal complexation, surface activity, labelling

Note: ces travaux ont été réalisés comme “travail dirigé” dans le cadre de la thèse de B. Vigneault

## Introduction

The utilisation of radiolabelled humic substances would improve the accuracy and precision for the measurement of adsorption of humic substances to algal surface. For example, it proved difficult to study the kinetics of adsorption - desorption without the use of radiolabelled humic substances. However, we first verified that the physico-chemical properties relevant for our study are unaltered by the radioactive labelling. We therefore decided to compare the Cd complexation capacity and the surface activity of parent and radiolabelled Suwannee River humic substances.

## Materials and methods

*Synthesis, purification and characterization of  $^{14}\text{C}$ -radiolabelled humic and fulvic acids.* Standard Suwannee River humic and fulvic acids (SRHA and SRFA, respectively) from the International Humic Substances Society, IHSS (St. Paul, MN) were selected as representative and well-characterized aquatic humic substances. The radioactive labelling was performed by activating the constituent carboxyl groups with a protein sequencer, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC, (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) before the addition of  $^{14}\text{C}$ -methylamine (NEN Life Science Products, Mississauga, ON, Canada) as described by Warwick et al. (1993). The fulvic or humic acid (20 mg) was dissolved in NaCl 0.05 M, and pH was adjusted to about 7. These humic substances solutions were filtered through Ion Chromatography Acrodisc® 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filters (Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) before the addition of the protein sequencer. The molar quantity of EDC added was similar to the molar quantity of carboxyl groups present, the carboxyl group content of SRHA and SRFA being  $4.1 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$  (Leenheer et al., 1995) and  $6.1 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$  (Bowles et al., 1995), respectively. Finally, sufficient  $^{14}\text{C}$ -methylamine ( $45.1 \text{ mCi} \cdot \text{mmol}^{-1}$ ) was added to react with exactly 1 % of the carboxyl groups present. The pH of the reaction mixture was readjusted to 7 and the solution was left with agitation for at least one hour.

Unreacted EDC and the reaction by-product, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-urea, ED urea, as well as unreacted  $^{14}\text{C}$ -methylamine, if present, were removed by dialysis against about 1 L of NaCl 0.05 M using Spectrapor CE dialysis bags with a nominal molecular weight cut off of 500 (Spectrum Medical Industries, Houston, TX). To favor aggregation/precipitation of the humic substances, the reaction mixture and external solution pH were lowered to about 2.2 with concentrated nitric acid for the dialysis purification. This step was introduced to minimize the loss of humic material from the dialysis bag. Dialysis was carried out for at least 48 h, with constant agitation of the external solution. To assess the purification efficiency of this method, 2-mL solutions of the individual components (SRFA, 2 g/L; SRHA, 2 g/L;  $^{14}\text{C}$ -methylamine, 86.1  $\mu\text{M}$ ; EDC, 12.4 mM) were each dialysed against 400 mL of NaCl 0.05M at pH 2.2. Samples of the external solution were collected during the dialysis period and analysed for their humic substances content by UV spectroscopy, on a Cary 100 Bio UV-visible spectrophotometer (Varian Canada Inc., Mississauga, Canada), for  $^{14}\text{C}$ -methylamine with a liquid scintillation counter, model 1414 Winspectral  $\alpha / \beta$  (Wallac, Turku, Finland) and for EDC with a TOC-5000A total organic carbon analyser (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Labelling efficiency was assessed by size exclusion chromatography and by mass balance calculation. A 100- $\mu\text{L}$  sample of the reaction mixture was introduced into a glass chromatographic column (length 30 cm, internal diameter 1 cm; Flex Column, Kontes, Vineland, NJ), filled with the Sephadex G25M gel filtration resin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Flow rates were measured before and after the analysis, and were found to be constant throughout the analysis. Therefore the flow rates and the elapsed time were used to calculate the volume passed through the column. Fractions were collected every 2 min from 0 to 6 min and from 30 to 40 min, and every min in the time interval from 7 to 30 min. Collected fractions were analysed for both humic substance content (UV- absorbance, at 326 nm) and  $^{14}\text{C}$  content ( $\beta$ -counter). Labelling efficiency was also estimated from mass balance calculations:  $^{14}\text{C}$  activity greater than that calculated from the measured humic substances concentration in the external solution, assuming 100 % labelling, indicates the presence of free  $^{14}\text{C}$ -methylamine in the external solution, and therefore incomplete labelling.



*Cadmium Complexation.* Humic substances complexation of Cd was measured with an ion exchange technique (Fortin et Campbell, 1998). Solutions consisted of simplified Fraquil culture media (Morel et al., 1975), without added EDTA, trace metals and vitamins, for which the ionic strength had been raised to 0.01 M with NaNO<sub>3</sub>. A solution pH of 7 was chosen in order to have a significant amount of Cd complexed by the humic substances. SRFA and SRHA concentrations (5.4 mg C · L<sup>-1</sup>) were chosen to be close to the natural levels found in fresh waters. At the lowest total Cd concentration, 0.12 nM, Cd was added as carrier-free <sup>109</sup>Cd (1.8 x 10<sup>5</sup> mCi · mmol<sup>-1</sup>) (Amersham Pharmacia Biotech, Baie-d'Urfé, QC, Canada). Non-radioactive Cd was added to the solutions to obtain the higher total Cd concentrations, up to 1 µM. Radioactive Cd was measured with an automated γ-counter, model 1480 Wizard (Wallac, Turku, Finland), and cpm measurements were converted to Cd concentrations by taking into account the measured counting efficiency, the radioactive decay and the specific activity of the solutions. We waited 24 h before initiating the free Cd<sup>2+</sup> measurements in order to maintain a standard equilibration time for all solutions. Mid-range molecular weights of SRFA and SRHA, 1250 and 7500 g·mol<sup>-1</sup> respectively (Thurman et al., 1982), were used to calculate the total Cd concentration / Suwanne River humic substance concentration ratios. In addition, the chemical speciation computer program MINEQL+ (Environmental Research Software, Hallowell, ME) (Schecher et McAvoy, 1994) was used to estimate the complexation of Cd by the inorganic components of the modified FRAQUIL medium used.

*Surface activity – Surface tension.* The surface activity of parent and radiolabelled material was compared by measuring the surface tension of NaCl 0.05 M solutions at pH 7.0. Measurements were made at room temperature on a Sigma 70 tensiometer (KSV Instruments USA, Monroe, CT) using the Du Nouy ring method. The methodology used followed the recommendations of the ISO 304 procedure (ISO, 1985), which includes cleaning of the measuring cup with hot sulfochromic acid and concentrated phosphoric acid and cleaning of the ring with hot concentrated sulfuric acid. Preliminary experiments had shown that equilibration periods of 20 min (SRHA) and 30 min (SRFA) were

required to obtain stable readings following the rapid initial drop in surface tension. At least 3 sets of 5 consecutive readings were made at each humic substance concentration.

## Results

*Characterization and purification of  $^{14}\text{C}$ -radiolabelled humic substances.* Size exclusion chromatographs confirmed the complete binding of  $^{14}\text{C}$ -methylamine to both SRFA and SRHA. The efficiency of the chromatographic technique used to separate SRFA from free  $^{14}\text{C}$ -methylamine was shown by the distinct absorbance and radioactivity peaks observed in the absence of EDC (Fig. A.1A). The retention volumes of  $^{14}\text{C}$ -methylamine, SRFA and SRHA were 19.72, 10.46 and 9.20 mL, which follows their respective molecular weights,  $30.05 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  for methylamine and 1000-1500 and 5000-10000  $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$  for SRFA and SRHA respectively (Thurman et al., 1982). The absence of free  $^{14}\text{C}$ -methylamine peaks in the reaction mixture containing EDC, and the superposition of the absorbance and  $^{14}\text{C}$  peaks, indicated complete binding of  $^{14}\text{C}$ -methylamine to SRFA and SRHA (Figs. A.1B,C). Therefore at the completion of the reaction the main products to be removed by dialysis will consist of unreacted EDC and also the by-product, ED urea.

The dialysis step at pH 2.2 allowed effective removal of unreacted EDC and free  $^{14}\text{C}$ -methylamine, if present, with limited losses of humic substances. While losses of SRFA and SRHA remained below 2 and 3 %, respectively, over the 3 d period, 91 % of the EDC and 69 % of the  $^{14}\text{C}$ -methylamine were removed after 2 d (Fig. A.2). An additional day allowed the removal of an additional 7 % of the  $^{14}\text{C}$ -methylamine. As stated above, however, no significant amounts of free  $^{14}\text{C}$ -methylamine are expected to remain in the reaction mixture in contrast to the solution used to test the dialysis purification procedure.

*Cd complexation.* Loss of 1 % of the carboxylic groups through derivitization with  $^{14}\text{C}$ -methylamine did not affect Cd complexation by SRFA and SRHA. SRFA and  $^{14}\text{C}$ -SRFA had the same complexation capacity for Cd over the entire range of metal/ligand ratios tested, as SRHA and  $^{14}\text{C}$ -SRHA (Fig. A.3). At pH 7.0, in the absence of humic

substances, we calculated that 87 % of the total Cd should be present as the free metal ion, with the remaining 13 % being complexed by the inorganic constituents of the FRAQUIL medium used. In the presence of SRHA and  $^{14}\text{C}$ -SRHA,  $(38 \pm 6)$  % of Cd is present as the free metal ion compared to  $(48 \pm 6)$  % in the presence of SRFA and  $^{14}\text{C}$ -SRFA.

*Surface activity.* The surface tensions of  $^{14}\text{C}$ -SRHA and SRHA solution were similar at the two concentrations tested, indicating no modification of the SRHA surface activity following the addition of the  $^{14}\text{C}$ -methylamine groups. However, whereas at the highest concentration SRFA induced a 1.3 % reduction of the surface tension,  $^{14}\text{C}$ -SRFA induced a 4-fold greater reduction of the surface tension at the same concentration. The measured surface tension of NaCl 0.05 M without added humic substances at 22 °C,  $(72.7 \pm 0.5)$   $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (Fig. A.4) is consistent with the reported values for water,  $72.75 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  at 20°C and  $71.97 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  at 25 °C, and for NaCl 0.1 M,  $72.92 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  at 20 °C (Weast et al., 1987-1988). SRHA was more surface active than the SRFA as indicated by the lower surface tension of the SRHA solutions at equivalent mass concentrations (Fig. A.4).

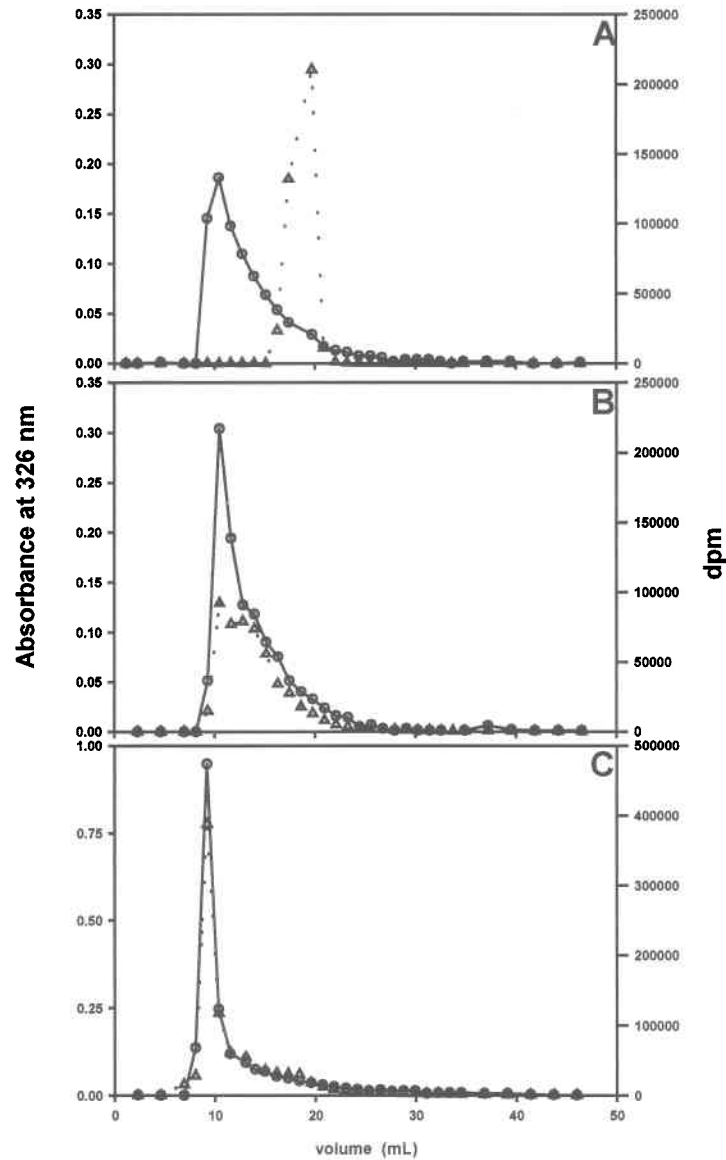
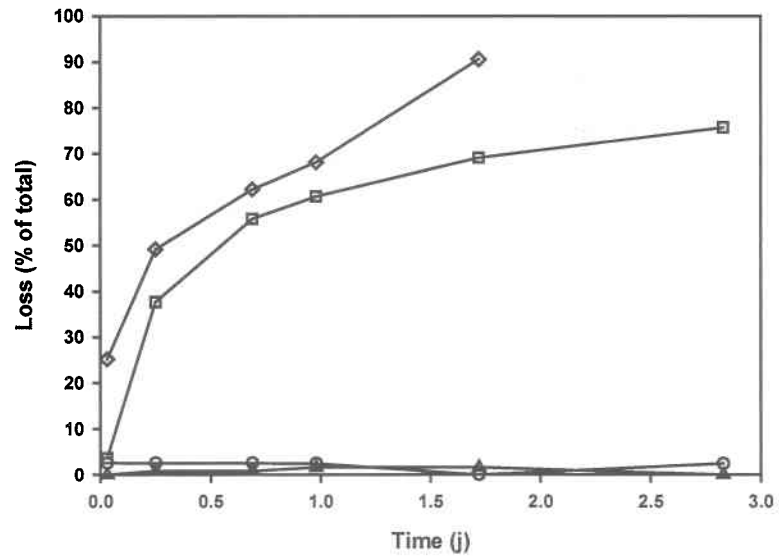
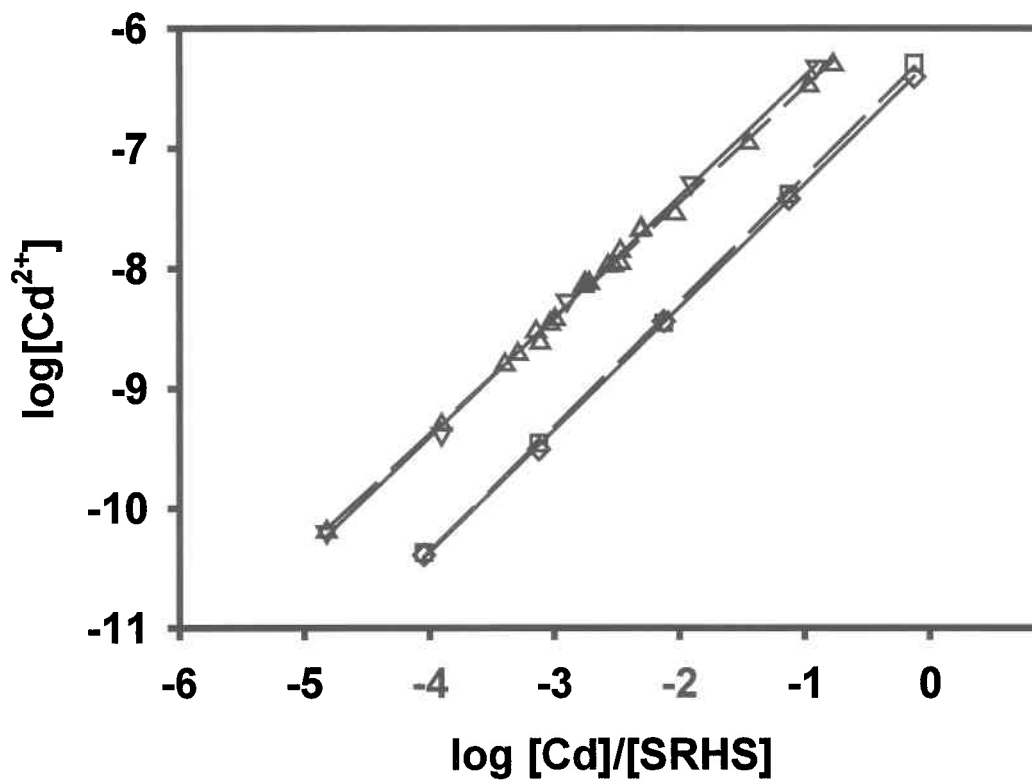


Figure A.1: (A) Size exclusion chromatographic separation of  $^{14}\text{C}$ -methylamine and SRFA without the protein sequencer in the reaction mixture. (B) Size exclusion chromatogram for  $^{14}\text{C}$ -methylamine and SRFA with the protein sequencer. (C) Size exclusion chromatogram for  $^{14}\text{C}$ -methylamine and SRHA with the protein sequencer (circles, absorbance at 326 nm and triangles, dpm).



**Figure A.2:** Purification of radiolabelled humic substances by dialysis against NaCl 0.05 M at pH 2.2: losses of SRFA, circles; SRHA, triangles; <sup>14</sup>C-methylamine, squares; 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, diamonds.



**Figure A.3:** Complexation of Cd at pH 7.0 by <sup>14</sup>C-radiolabelled SRFA, inverted triangles; SRHA, diamonds; parent SRFA, triangles; SRHA, squares. Lines are linear regressions.

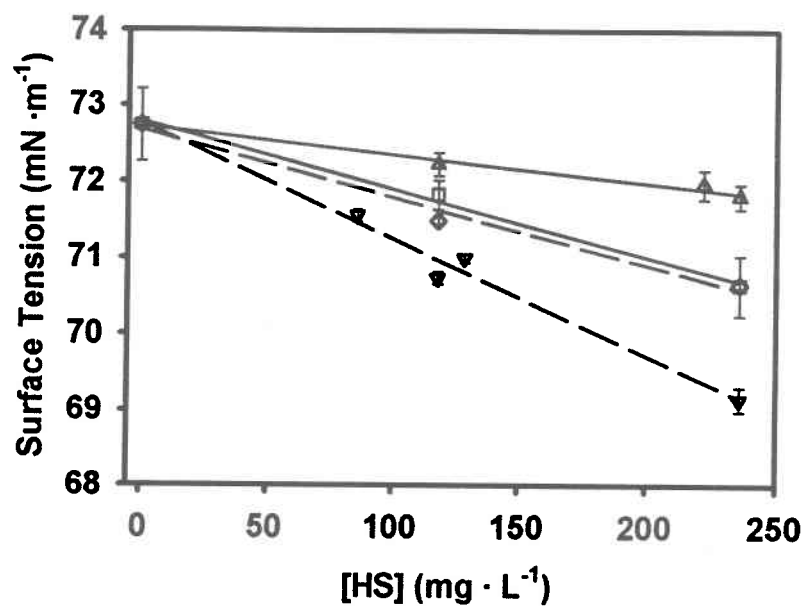


Figure A.4: Surface tension of NaCl solutions (0.05 M, pH 7.0) containing  $^{14}\text{C}$ -radiolabelled SRFA and SRHA and parent SRFA and SRHA. See Figure 3 for symbols. Lines are linear regressions and values are means  $\pm$  std deviations with  $n \geq 14$ .

## Conclusion

Cd complexation by Suwannee River humic and fulvic acid is unaffected by radiolabelling. However, while the surface activity of Suwannee River humic acid is also unaffected by radiolabelling, the surface activity of radiolabelled Suwannee River fulvic acid is markedly increased, when compared to surface activity of the parent fulvic acid. This increased surface activity could be related to an irreversible association to the radiolabelled fulvic acid of the protein sequencer, EDC, which also proved to be surface active.



## Literature Cited

- Bowles, E. C., R. C. Antweiler, and P. MacCarthy. 1995. "Acid-Base Titration and Hydrolysis of Fulvic Acid From the Suwannee River." dans *Humic Substances in the Suwannee River, Georgia: Interactions, Properties and Proposed Structures*, vol. Water-Supply Paper 2373, Eds. R. C. Averett, J. A. Leenheer, D. M. McKnight, and K. A. Thorn. Denver, CO: US Geological Survey p. 115-127.
- Fortin, C. and P. G. C. Campbell. 1998. "An ion-exchange technique for free-metal ion measurements ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ): Applications to complex aqueous media." *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 72:173-194.
- ISO. 1985. "Surface Active Agents - Determination of Surface Tension by Drawing Up Liquid Films." . Second edition - 1985-12-15 ed., vol. ISO 304-1985 (E)Geneva: International Organisation for Standardization.
- Leenheer, J. A., D. M. McKnight, E. M. Thurman, and P. MacCarthy. 1995. "Structural Components of Proposed Structural Models of Fulvic Acid From the Suwannee River." dans *Humic Substances in the Suwannee River, Georgia: Interactions, Properties and Proposed Structures*, vol. Water-Supply Paper 2373, Eds. R. C. Averett, J. A. Leenheer, D. M. McKnight, and K. A. Thorn. Denver, CO: US Geological Survey p. 195-211.
- Morel, F. M. M., J. C. Westall, J. G. Rueter, and J. P. Chaplick. 1975. *Description of the Algal Growth Media "Aquil" and "Fraquil"*. Technical Note No. 16. Depart.Civil Eng., Mass. Inst. Technol.
- Schecher, W. D. and D. McAvoy. 1994. *Mineql*. Vers. 3.01. Hallowell, ME: Environmental Research Software.
- Thurman, E. M., R. L. Wershaw, R. L. Malcolm, and D. J. Pinckney. 1982. "Molecular size of aquatic humic substances." *Org. Geochem.* 4:27-35.

Warwick, P., L. Carlsen, A. Randall, R. Zhao, and P. Lassen. 1993. " $^{14}\text{C}$  and  $^{125}\text{I}$  labelling of humic material for use in environmental studies." *Chem. Ecol.* 8:65-80.

Weast, R. C., J. A. Melvin, and H. B. William, Eds. 1987-1988. *Handbook of Chemistry and Physics*. 68th Edition ed. Boca Raton, FL: CRC Press inc.

Annexe B : Cinétique de la prise en charge du Cs, du Cd et du Cu par des algues vertes unicellulaires.

## Introduction

Nous avons voulu comparer la prise en charge pour de courte exposition en présence et en absence de substances humiques du Cs, un métal avec une très faible affinité pour la matière organique, et du Cd, un métal avec une affinité intermédiaire avec la matière organique. Pour ce faire, nous avons d'abord étudié la cinétique de la prise en charge de ces deux métaux afin de s'assurer que les durées d'exposition choisies pour les expériences ultérieures de prise en charge se situent dans la phase linéaire initiale de la prise en charge.

De plus, nous avons voulu étudier le Cu pour compléter nos résultats avec le Cs et le Cd. Le Cu est un métal fortement complexé par les substances humiques qui pourrait permettre de montrer des effets des substances humiques adsorbées sur le transport du métal complexé de la solution vers le site de prise en charge membranaire et sur la dissociation du complexe. Selon le MIL, le transport transmembranaire du métal doit constituer l'étape limitant la prise en charge. Dans le cas d'un métal dont la complexation par les substances humiques est forte, la dissociation du complexe substances humiques – métal pourrait devenir l'étape limitante.

## Matériel et méthodes

*Prise en charge du Cs.* Pour mesurer la prise en charge du  $^{137}\text{Cs}$  par *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 5, nous avons utilisé un protocole similaire à celui utilisé pour la prise en charge du Cd (section 4.2.3.1).

*Prise en charge du Cd.* Des expériences de cinétique de prise à charge du Cd ont été effectuées pour *Selenastrum capricornutum* et pour *Chlamydomonas reinhardtii* selon le protocole décrit précédemment (section 4.2.3.1). Cependant, en raison de la difficulté de faire croître *S. capricornutum* à pH 5, des algues acclimatées à pH 5 ont été utilisées pour l'expérience de cinétique à pH 5. Pour ce faire, des algues cultivées à pH 7 ont été

acclimatées à pH 5 durant les 12 heures précédant l'expérience, le pH étant descendu et maintenu à 5 par addition de CO<sub>2</sub> (g) à l'aide d'un contrôleur automatique de pH.

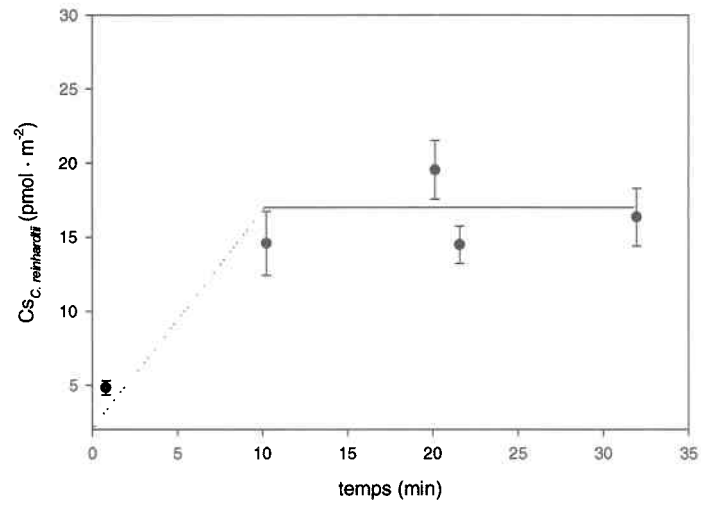
*Prise en charge du Cu.* Pour fins de comparaison avec les résultats obtenus avec le Cd, nous avons voulu utiliser le même protocole pour étudier la prise en charge du Cu, mais sans recours au <sup>64</sup>Cu ( $t_{1/2} = 12,7$  h). Nous avons tout d'abord tenté de mesurer la cinétique de la prise en charge du Cu pour *S. capricornutum*. La digestion des algues a été faite dans des bombes de Téflon lavées à l'acide. Nous avons ajouté 0.5 mL d'acide nitrique concentré aux filtres, qui avaient été déposés directement dans les bombes. Nous avons laissé réagir l'acide environ 20 min, avant que les bombes ne soient chauffées au four aux micro-ondes pendant 30 s. Les bombes ont été laissées sans chauffage pendant quelques secondes, puis chauffées à nouveau pendant 20 s. Les bombes ont ensuite été refroidies dans un bain d'eau froide puis démontées. Finalement, 4,5 mL d'eau Millipore a été ajouté à chacune des bombes.

La teneur en cuivre des solutions de digestion ainsi obtenues a été analysée par spectroscopie d'absorption atomique au four au graphite (SpectrAA 300/400, Varian Instruments, CA, USA). La concentration de Cu libre dans les milieux d'exposition a été calculée à l'aide du logiciel MINEQL (Schecher et McVoy, 1994). Des expériences de prise en charge du Cu ont également été effectuées avec des cellules de *S. capricornutum*, qui avaient été préalablement carencées en Cu. Pour ce faire, les algues ont été cultivées dans des milieux de culture ne contenant pas de Cu ajouté, Fra<sub>NaNO<sub>3</sub>-Cu</sub>, pour deux inoculations successives.

## Résultats et Discussion

*Cinétique de la prise en charge du Cs.* Dans un premier temps, nous avons exploré la possibilité d'étudier la prise en charge du Cs pour des expositions courtes plutôt que les pertes de Cs, en mesurant la cinétique de la prise en charge Cs par *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 5 (Fig. B.1). L'algue a accumulé une quantité non-négligeable de Cs

après moins d'une minute et l'accumulation a saturé après moins de 10 min, ce qui est cohérent avec un contrôle physiologique de la prise en charge du  $\text{Cs}^+$ , comme analogue de  $\text{K}^+$ . Le flux de  $\text{K}^+$  à travers la membrane via les canaux du K est fortement régulé car le  $\text{K}^+$  joue un rôle dominant au niveau du contrôle du potentiel osmotique chez les algues unicellulaires (Raven, 1980). Compte tenu du temps requis pour effectuer ces manipulations expérimentales, il aurait été impossible d'étudier la phase linéaire initiale de la prise en charge du Cs. Les pertes de Cs, plutôt que la prise en charge pour de courtes expositions, ont donc étudiées en présence d'acide humique.



**Figure B.1:** Cinétique de la prise en charge du Cs par *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 5 et  $[Cs]_T = 0,5 \text{ nM}$  (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ). Les lignes pointillées et pleines représente notre interprétation des données présentées.

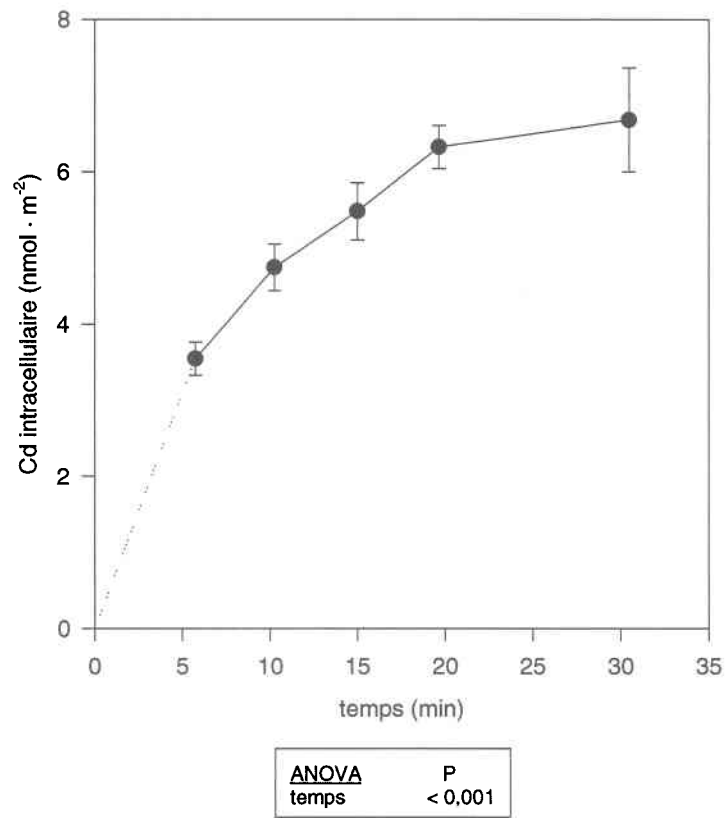
*Cinétique de la prise en charge du Cd.* La cinétique de la prise en charge du Cd a été étudiée pour *S. capricornutum* à pH 7 et à pH 5 et pour *C. reinhardtii* à pH 7. Pour deux expériences de cinétique sur trois, les algues ont poussé aux pH expérimentaux ; dans le 3<sup>ième</sup> cas, *S. capricornutum* a été acclimatée à pH 5 pendant 12 h avant l'expérience. La prise en charge du Cd par *S. capricornutum* augmente significativement en fonction du temps à pH 7 (Fig. B.2 :  $P < 0,001$ , ANOVA factorielle 1 x 5) et à pH 5 (Fig. B.3 :  $P < 0,001$ , ANOVA factorielle 1 x 4). La prise en charge du Cd par *S. capricornutum* à pH 7 atteint un plateau après 10 min (Fig. B.2), alors qu'à pH 5 la prise en charge a été nettement moindre, mais elle est demeuré linéaire de 5 à 45 min (Fig. B.3). Même à une concentration de Cd libre supérieure (14 nM versus 9 nM), la prise en charge initiale à pH 5 a été ~ 22 fois plus faible qu'à pH 7, vraisemblablement en raison de la compétition avec  $H^+$  pour les sites de prise en charge à la surface de la membrane cellulaire (Harrison et al., 1986, Schenk et al., 1988).

Pour les essais à pH 7, Errécalde et Campbell (2000) ont obtenu des résultats semblables, c'est-à-dire un plafonnement de la prise en charge, et ils ont conclu que l'arrêt de la prise en charge du Cd pendant de courtes expositions résulte non pas de l'atteinte d'un état stationnaire, mais plutôt d'une réponse physiologique de *S. capricornutum* qui limite la prise en charge du Cd. Nous avons donc choisi des durées d'exposition de 10 min à pH 7 et de 20 min à pH 5 pour *S. capricornutum* de façon à demeurer dans la phase linéaire initiale de la prise en charge, en absence de processus physiologiques limitant le transport transmembranaire du Cd.

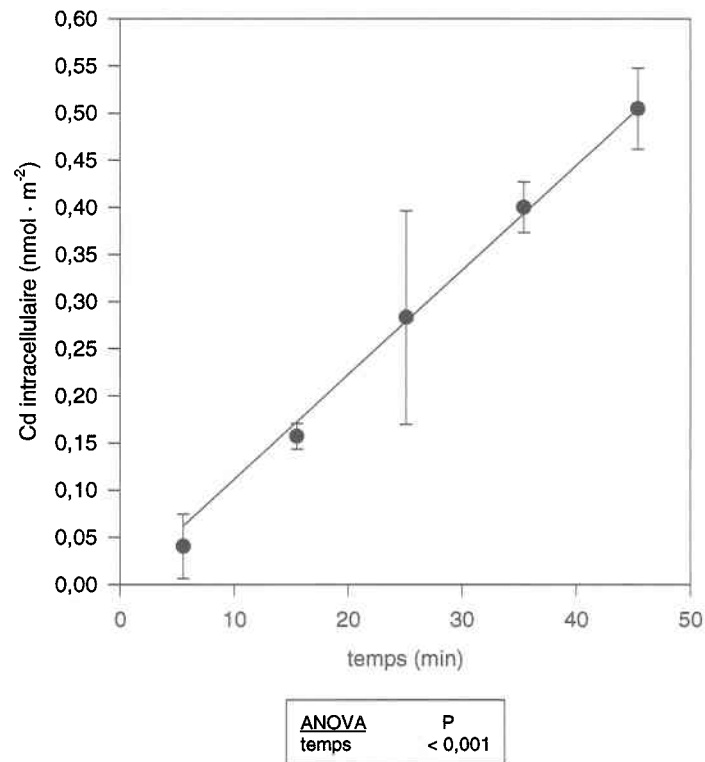
La prise en charge du Cd par *C. reinhardtii* à pH 7 augmente également significativement avec le temps (Fig. B.4 :  $P < 0,001$ , ANOVA factorielle 1 x 4). Contrairement à *S. capricornutum*, la prise en charge par semble linéaire au moins jusqu'à 20 min (Fig. B.4). Cependant, la mesure faite à  $< 5$  min semble légèrement élevée par rapport à la valeur anticipée à partir des mesures faites aux temps plus longs (ex. : par extrapolation de la régression linéaire des mesures à  $t > 5$  min). Cette valeur élevée à une durée d'exposition courte pourrait être associée à l'erreur expérimentale associée à ces mesures ou à une mauvaise distinction entre le Cd adsorbé et le Cd intracellulaire. L'erreur associée aux



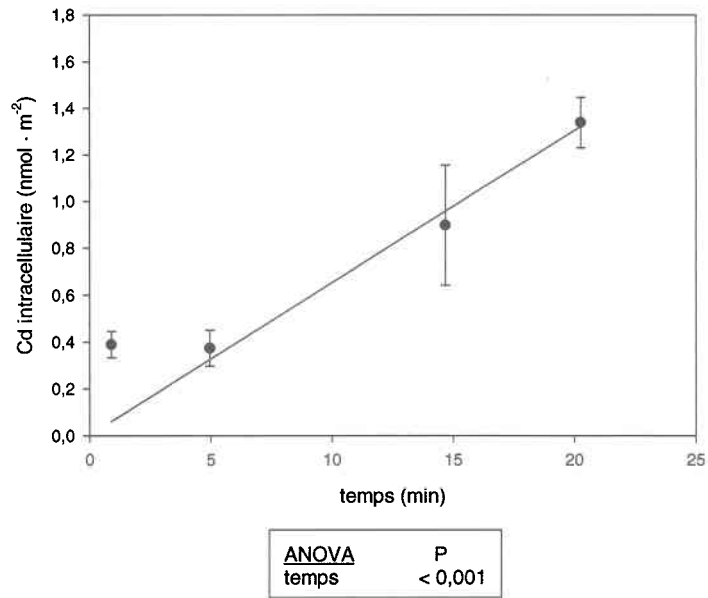
mesures à des temps < 5 min est vraisemblablement plus importante puisque le temps nécessaire pour la filtration de chaque répétition est de l'ordre 1 – 2 min et que la quantité de  $^{109}\text{Cd}$  accumulée est plus faible. Une fraction résiduelle de Cd adsorbé plutôt que de Cd intracellulaire pourrait également résulter en des mesures de Cd (intra)cellulaire non nulle pour des temps faibles, puisque l'adsorption du Cd est vraisemblablement plus rapide que la prise en charge intracellulaire. Il est cependant peu probable que le Cd adsorbé ne soit pas complètement désorbé par le rinçage à EDTA puisque l'efficacité de l'utilisation de EDTA pour la définition opérationnelle des métaux intracellulaires a été démontrée par Bates et al. (1982) et Harrison et al. (1986) pour le Zn et par Schenk et al. (1988) pour le Fe et le Mn.



**Figure B.2:** Cinétique de la prise en charge du Cd par *Selenastrum capricornutum* à pH 7,  $[Cd]_T = 107$  nM,  $[EDTA] = 100$  nM et  $[Cd^{2+}]_{calculée} = 9$  nM (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ).



**Figure B.3:** Cinétique de la prise en charge du Cd (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ) par *Selenastrum capricornutum* acclimatée pendant 12 h à pH 5. Conditions d'exposition :  $[Cd]_T = 15$  nM,  $[NTA] = 100$  nM et  $[Cd^{2+}]_{calculée} = 14$  nM. La droite a été obtenue par une régression linéaire passant par l'origine.



**Figure B.4:** Cinétique de la prise en charge du Cd (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ) par *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 7. Conditions d'exposition :  $[\text{Cd}]_T = 5,4$  nM,  $[\text{NTA}] = 100$  nM et  $[\text{Cd}^{2+}]_{\text{calculée}} = 2,8$  nM. La droite a été obtenue par une régression linéaire passant par l'origine.

*Cinétique de la prise en charge du Cu.* Nous avons voulu répéter, avec le Cu, les expériences de prise en charge pour de courtes expositions effectuées à pH 5 avec le Cd. Cependant, nous n'avons pu mesurer d'augmentation du contenu intracellulaire en Cu chez *S. capricornutum* en fonction du temps, malgré l'emploi d'une gamme large de concentrations de Cu dans les milieux d'exposition. Pour une concentration de Cu libre de 0,3 nM, le contenu intracellulaire en Cu de cette algue n'a pas augmenté pour des expositions allant jusqu'à 30 min (Fig. B.5). Pour vérifier que cette teneur constante en Cu intracellulaire n'était pas reliée à une concentration de Cu libre trop faible dans le milieu externe, nous avons effectué deux expériences supplémentaires à des concentrations en Cu plus élevées. Même pour des concentrations de Cu libre de 50 et 195 nM, le contenu intracellulaire en Cu n'a pas augmenté pour des expositions allant jusqu'à 20 min (Fig. B.6). Nous avons finalement mesuré la prise en charge pour des expositions de 10 min à des concentrations de Cu libre de 500 et 1000 nM (Fig. B.7). À 500 nM, il n'y a eu aucune augmentation du contenu intracellulaire, alors qu'à 1000 nM le Cu intracellulaire a passé de 0,6 à 0,8  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ . Nous avons décidé de ne pas poursuivre nos travaux à cette concentration artificiellement élevée de Cu libre, cette augmentation du Cu intracellulaire étant très faible. De plus, de telles concentrations de Cu libre ne sont pas représentatives de celles trouvées dans les eaux de surface. En effet, même dans des lacs contaminés par le drainage minier acide et la pollution atmosphérique, Croteau et al. (1998) n'ont jamais calculé des concentrations de Cu libre supérieures à 120 nM.

Cette absence d'augmentation marquée de la prise en charge du Cu, même à des concentrations de Cu libre allant jusqu'à 1  $\mu\text{M}$ , s'expliquerait par le fait que le Cu est un métal essentiel fortement régulé chez les algues unicellulaires. Hill et al. (1996) ont montré que les efflux de Cu sont limités chez *C. reinhardtii* et que la régulation du Cu intracellulaire se fait donc principalement au niveau de la prise en charge elle-même, ce qui semble être également le cas pour *S. capricornutum*. Verma et Singh (1990) ont également observé une augmentation marginale du contenu total en Cu chez la cyanobactérie *Nostoc calcicola* à leur plus faible concentration de Cu total testée, soit 2,5

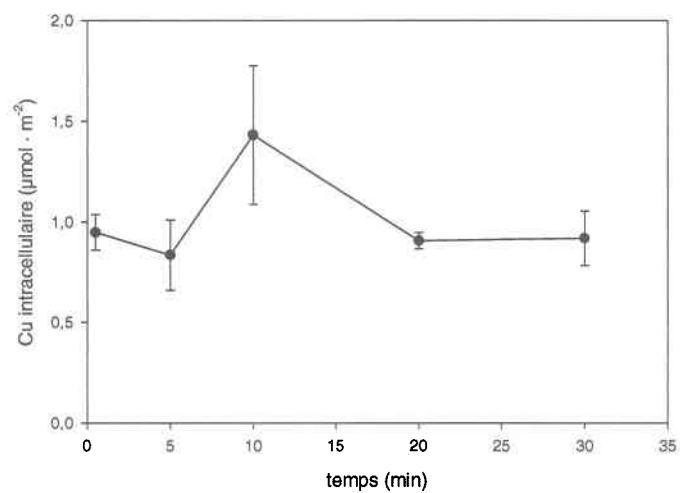
$\mu\text{M}$ , et ils ont également démontré que la prise en charge du Cu par cette algue était attribuable à un système de transport facilité saturable.

La concentration externe de Cu libre ayant peu d'effet sur la prise à charge du Cu à pH 5, nous avons voulu vérifier si le pH acide en était responsable. Cependant, il n'y a pas eu non plus de prise en charge appréciable du Cu par *S. capricornutum* à pH 7, même à une concentration de Cu libre de 195 nM et pour des durées d'exposition de 10 et 20 min (Fig. B.6B). Le contenu intracellulaire en Cu est demeuré constant,  $0,84 \pm 0,06 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ , et il était équivalent au contenu intracellulaire à pH 5.

Nous avons également mesuré la prise en charge totale, soit la somme du Cu adsorbé et du Cu intracellulaire, en omettant de faire un rinçage à l'EDTA. À pH 5, la prise en charge totale semble plus importante à  $t = 16$  min qu'aux autres temps, cependant il est peu probable que la quantité de Cu adsorbé soit plus importante à pH 5 qu'à pH 7 et de plus, le Cu intracellulaire est demeuré constant pour tous les temps étudiés (Fig. 7.6a). La prise en charge totale n'a pas augmenté également avec le temps à pH 7; le Cd adsorbé est donc demeuré autour de 29 % pour les trois durées d'exposition étudiées (Fig 7.6b). Knauer et al. (1998) ont trouvé que plus de 40 % du Cu cellulaire total accumulé par le phytoplancton pouvait être désorbé avec une solution de EDTA dans une eau de lac avec une concentration de Cu libre de 0,1 nM.

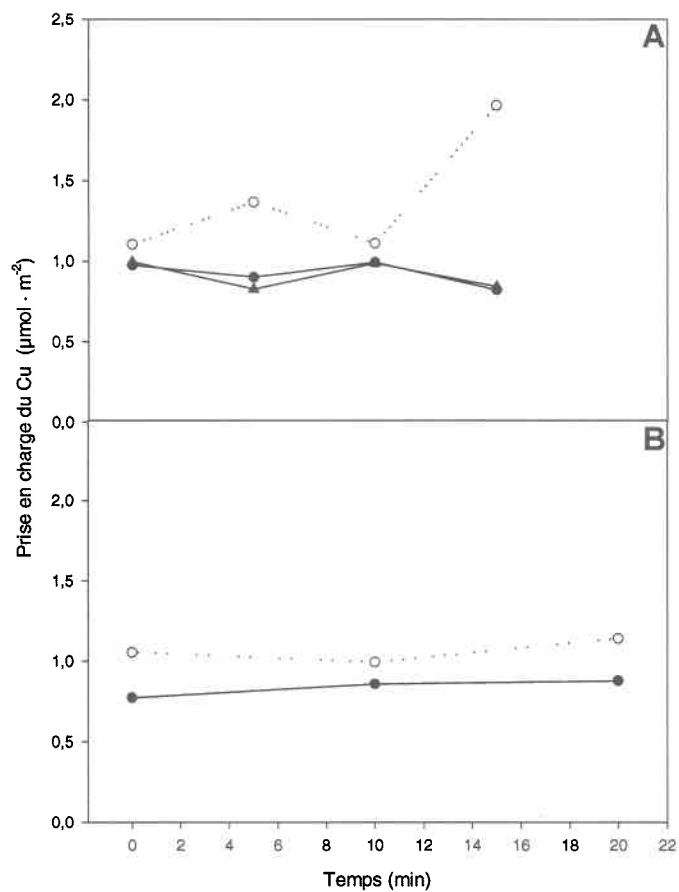
Ces résultats suggèrent donc que des processus physiologiques limitent le transfert du Cu à travers la membrane plasmique. Cette constatation pourrait découler du fait que le milieu de croissance Fraquil contient du Cu ( $[\text{Cu}]_{\text{T}} = 1 \text{ nM}$  et  $[\text{Cu}^{2+}] = 0,4 \text{ fM}$ ) et que les besoins en Cu de *S. capricornutum* soient déjà satisfaits lors des essais de prise en charge. En effet, Hill et al. (1996) ont montré une augmentation très marquée de la vitesse de prise en charge du Cu pour *Chlamydomonas reinhardtii* carencée en Cu par rapport aux cellules ayant poussé en présence d'un excès de Cu. Nous avons donc comparé la prise en charge du Cu entre *S. capricornutum* carencée en Cu et *S. capricornutum* ayant poussé dans le milieu Fraquil. Pour les contrôles, la teneur intracellulaire en Cu des algues carencées ( $0,9 \text{ mol} \cdot \text{g d'algues}^{-1}$ ), a été  $\sim 50$  x plus faible que chez les algues normales,

51 mol · g d'algues<sup>-1</sup> (Fig. B.8). Alors qu'une exposition de 20 min à 1000 nM de Cu libre n'a pas augmenté le contenu intracellulaire en Cu des algues normales, le contenu intracellulaire des algues carencées a doublé. Pour fins de comparaison avec les résultats de Knauer et al. (1997b), nous avons exprimé nos résultats en mol · g<sup>-1</sup> d'algues. La quantité de Cu intracellulaire accumulée par *Scenedesmus subspicatus* à pH 7,9 et à une concentration de Cu libre de ~ 0,01 nM a été du même ordre de grandeur que la quantité accumulée par *S. capricornutum*, préalablement carencée, lorsqu'elle est exposée à une concentration de Cu libre de 1000 nM (10<sup>5</sup> fois plus élevée !) (Fig. B.8). *S. capricornutum* carencée a donc semblé tout de même accumuler peu de Cu, ce qui est également démontré par l'absence d'augmentation en fonction du temps du contenu intracellulaire de Cu lorsqu'exposée à 194 nM de Cu libre (Fig. B.9). En raison de l'absence de prise en charge significative pour de courtes expositions au Cu par *S. capricornutum*, même carencée en Cu, nous n'avons donc pas été en mesure de répéter les expériences de prise en charge faites avec le Cd.

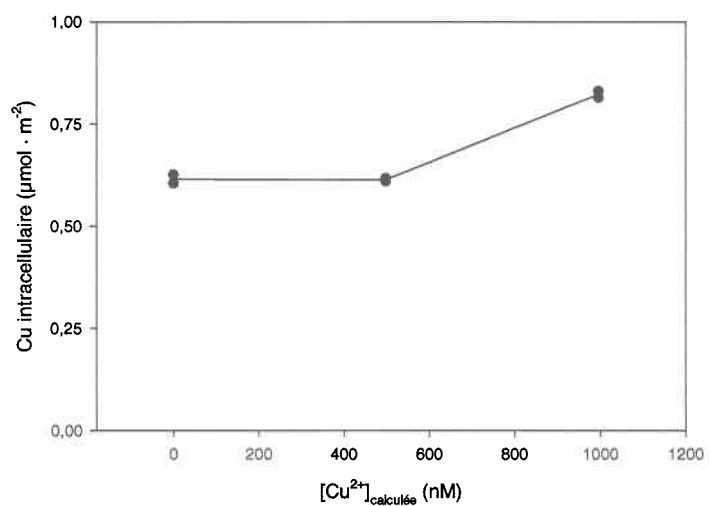


**Figure B.5:** Évolution temporelle du Cu intracellulaire chez *Selenastrum capricornutum* exposée à pH 5, [NTA] = 100 nM, [Cu]<sub>T</sub> = 15,7 nM et [Cu<sup>2+</sup>]<sub>calculée</sub> = 0,3 nM (moyenne ± écart type,  $n = 3$ ).

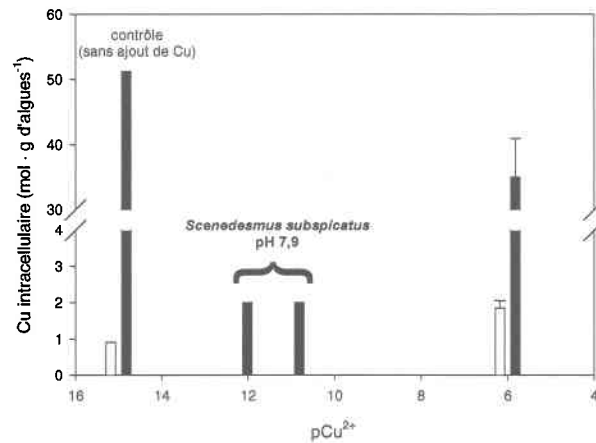




**Figure B.6:** Évolution temporelle du Cu total (symboles vides) et du Cu intracellulaire (symboles pleins) chez *Selenastrum capricornutum* ( $n = 1$ ) à pH 5 (A) et à pH 7 (B). Conditions d'exposition :  $[\text{NTA}] = 100 \text{ nM}$  et  $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{calculée}} = 195 \text{ nM}$ , ●, ou  $50 \text{ nM}$ , ▲).



**Figure B.7:** Cu intracellulaire ( $n = 2$ ) chez *Selenastrum capricornutum* en fonction de  $[\text{Cu}^{2+}]$  dans les milieux d'exposition (pH 5,  $[\text{NTA}] = 100 \text{ nM}$  et durée d'exposition de 10 min).



**Figure B.8:** Contenu intracellulaire en Cu chez *Selenastrum capricornutum* carencée en Cu, barres vides, et chez des cellules normales, barres noires, contrôle ( $n = 1$ ) et contenu après une exposition de 20 min à  $pCu^{2+} = 6$  (moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$  sauf pour les cellules carencées où  $n = 2$ ). Conditions d'exposition : pH 5, [NTA] = 100 nM.. Pour comparaison, des données obtenues par Knauer et al. (1997a) de prise en charge intracellulaire du Cu à 20 min et à pH 7,9 par *Scenedesmus subspicatus* sont également présentées sur ce graphique. Pour *S. capricornutum*, une surface moyenne de  $44 \mu m^2 \cdot cellule^{-1}$  et un poids sec de  $18.3 \text{ pg} \cdot cellule^{-1}$  ont été utilisés pour exprimer les résultats de prise en charge par unité de masse plutôt que par unité de surface.

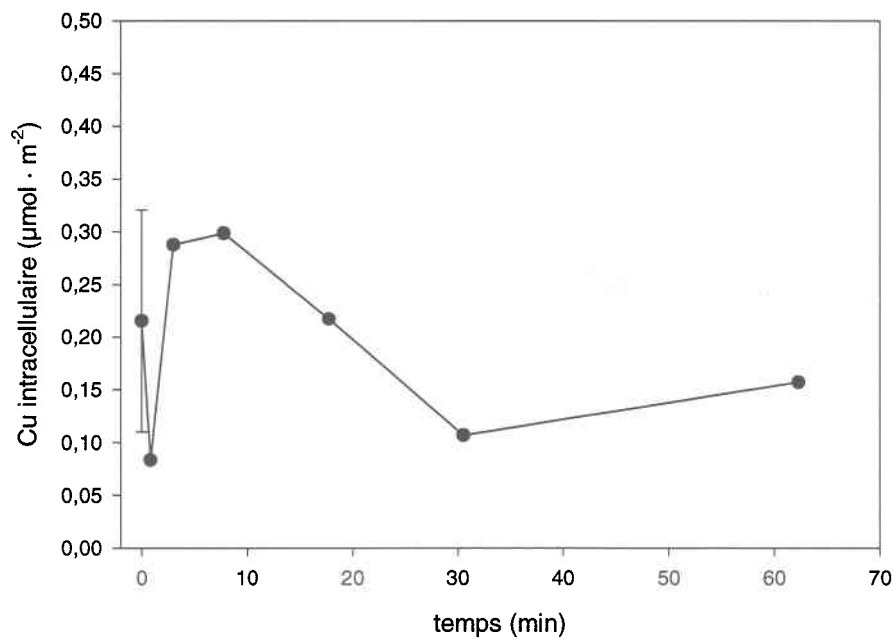


Figure B.9: Cinétique de la prise en charge du Cu ( $n = 1$ , sauf à  $t = 0$  min où il s'agit de la moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ) à pH 5 par *Selenastrum capricornutum* carencée en Cu, [NTA] = 100 nM et [Cu<sup>2+</sup>] = 194 nM.

## Conclusion

Les expériences de cinétique effectuées ont permis de montrer que la cinétique de prise en charge du Cs est probablement trop rapide pour la prise en charge du Cs soit étudiée de façon similaire à celle du Cd. Ainsi, des essais de perte de Cs en présence et en absence de substances humiques seront effectués avec des algues ayant préalablement accumulé le Cs (section 4.2.2). De plus, les expériences de cinétique ont montré que la prise en charge du Cd était linéaire jusqu'à au moins 10 min et 35 min, pour *S. capricornutum* à pH 7 et pH 5 respectivement et jusqu'à 15 min pour *C. reinhardtii* à pH 7. Finalement, *S. capricornutum* ne semble pas accumuler suffisamment de Cu pour permettre d'étudier la prise en charge sur de courtes périodes d'exposition.

## Références

- Bates, S. S., A. Tessier, P. G. C. Campbell, and J. Buffle. 1982. "Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Scenedesmus subspicatus* grown in semicontinuous culture." *J. Phycol.* 18:521-529.
- Croteau, M. N., L. Hare, and A. Tessier. 1998. "Refining and Testing a Trace Metal Biomonitor (Chaoborus) in Highly Acidic Lakes." *Environ. Sci. Technol.* 32:1348-1353.
- Errécalde, O. and P. G. C. Campbell. 2000. "Cadmium and zinc bioavailability to *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae): Accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate." *J. Phycol.* 36:473-483.
- Harrison, G. I., P. G. C. Campbell, and A. Tessier. 1986. "Effects of pH changes on zinc uptake by *Chlamydomonas variabilis* grown in batch culture." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43:687-693.
- Hill, K. L., R. Hassett, D. Kosman, and S. Merchant. 1996. "Regulated copper uptake in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to copper availability." *Plant Physiol.* 112:697-704.
- Knauer, K., B. Ahner, H. B. Xue, and L. Sigg. 1998. "Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations." *Environ. Toxicol. Chem.* 17:2444-2452.
- Knauer, K., R. Behra, and L. Sigg. 1997a. "Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyta)." *J. Phycol.* 33:596-601.
- . 1997b. "Effects of free  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions on the growth and metal accumulation in freshwater algae." *Environ. Toxicol. Chem.* 16:220-229.

- Raven, J. A. 1980. "Nutrient Transport in Microalgae." dans *Advances in Microbial Physiology*, vol. 21, Eds. A. H. Rose and J. Gareth Morris. Toronto: Academic Press p. 47-226.
- Schecher, W. D. and D. McAvoy. 1994. *Mineql*. Vers. 3.01. Hallowell, ME: Environmental Research Software.
- Schenk, R. C., A. Tessier, and P. G. C. Campbell. 1988. "The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga." *Limnol. Oceanogr.* 33:538-550.
- Verma, S. K. and S. P. Singh. 1990. "Factors regulating copper uptake in a cyanobacterium." *Current Microbiol.* 21:33-38.

**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) :

( 6 copies ) Les photocopies effectuées par l'étudiant(e) seront sous sa responsabilité.

ou par le

Service de documentation :



Nom

Bernard Vigneault

  
Signature

Nom du directeur de recherche:

Peter G.C. Campbell

Nom du co-directeur de recherche:

Boursier ou non-boursier:

Boursier FCAR