

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

**INFLUENCE DE LA PHYSICO-CHIMIE DU MILIEU (pH, NH₄⁺, Ca²⁺)
SUR L'INTERNALISATION ET LA TOXICITÉ DU PLATINE ET DU
PALLADIUM CHEZ L'ALGUE VERTE
*Chlamydomonas reinhardtii***

Par
Guillaume Tétrault

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Paul Drevnik
INRS-ETE

Examinatrice externe

Anne Gosselin
Environnement Canada

Directeur de recherche

Claude Fortin
INRS-ETE

Codirecteur de recherche

Peter G. C. Campbell
INRS-ETE



REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Claude Fortin, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Son support, son sens du détail et la confiance qu'il m'a témoignée m'ont permis de mener à bien ce projet. Je tiens aussi à remercier mon co-directeur, Peter G. C. Campbell, pour son intérêt envers mon travail et ses judicieux conseils.

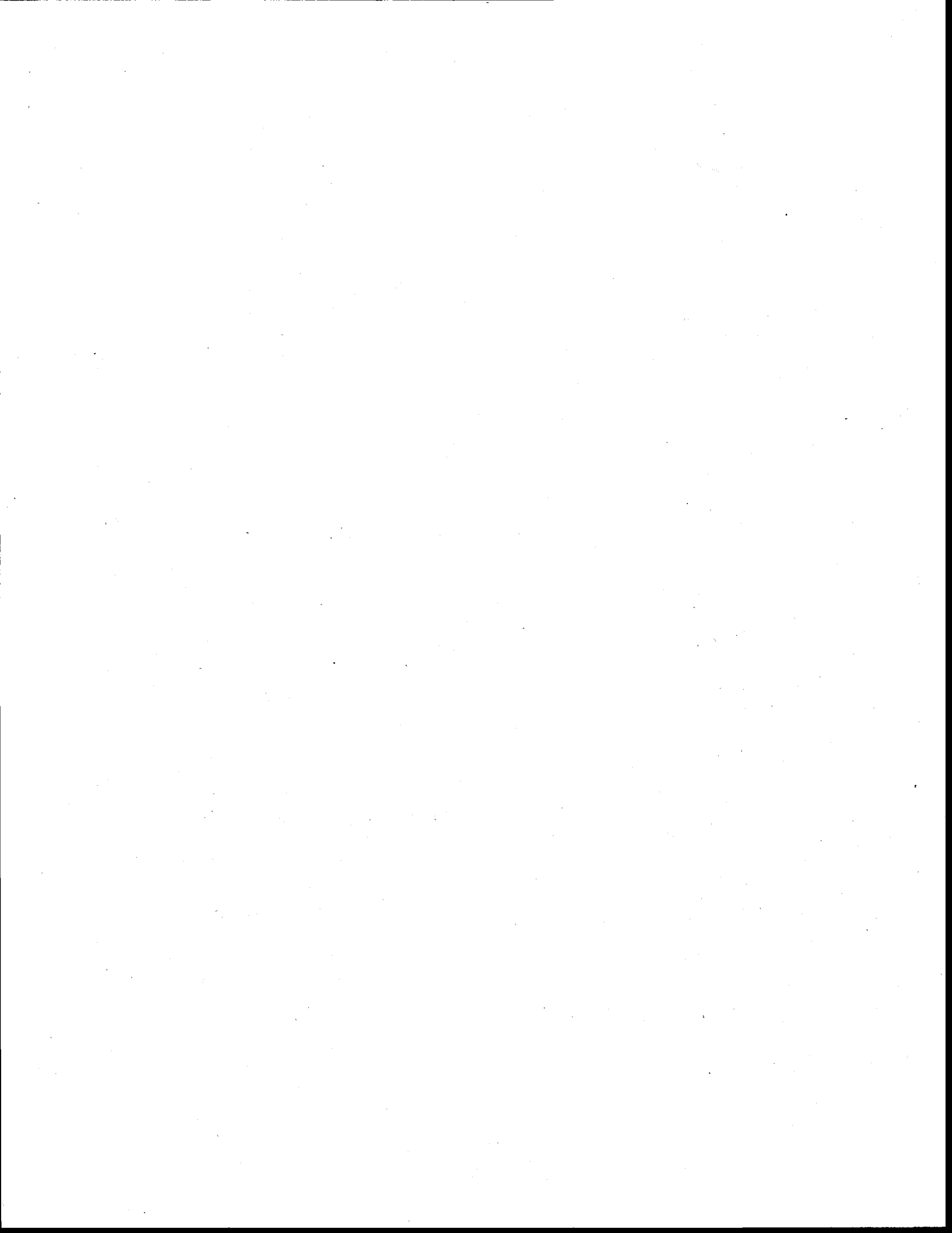
Je ne peux passer sous silence la contribution du personnel de laboratoire de l'INRS-ETE. Je vous remercie de votre soutien technique en laboratoire. Un merci plus particulier à Julie Perreault pour son aide à l'ICP-MS et pour toujours avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions.

Je voudrais également remercier mes collègues avec qui j'ai partagé le laboratoire. Les journées passées au laboratoire se sont trouvées allégées par votre présence. Je remercie plus spécialement Anne Crémazy, Jacqueline Levy et Zhongzhi Chen pour leur assistance.

Cette maîtrise n'aurait pas été la même sans la présence de mes collègues à la maîtrise, plus particulièrement Jade Bergeron, Karine Guinard et Antoine Caron, avec qui j'ai partagé réussites et frustrations.

Je ne saurais oublier de remercier ma famille et mes amis pour tout le support qu'ils m'ont donné. Vos encouragements m'ont accompagné tout au long de la maîtrise et je vous remercie d'avoir cru en moi.

Je remercie du fond du cœur ma copine Amélie pour sa compréhension, son affection et son soutien inconditionnel. Merci d'avoir été là, dans les moments difficiles comme dans les meilleurs.



RÉSUMÉ

Les concentrations de platine et de palladium dans l'environnement ont considérablement augmenté dans les trente dernières années en raison des particules émises par les convertisseurs catalytiques des systèmes d'échappement des véhicules. Peu de données sont disponibles quant à la biodisponibilité et la toxicité de ces deux métaux. Pour évaluer la toxicité de ces deux éléments, l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* a été exposée à plusieurs concentrations de Pd et de Pt. Pour évaluer l'influence de la spéciation du métal sur sa toxicité et son internalisation, trois différentes valeurs de pH (6,0, 7,0 et 8,0) ont été utilisées. Les concentrations nominales d'exposition étaient comprises entre 18 et 282 nM pour le palladium et entre 26 et 512 nM pour le platine; les concentrations expérimentales ont été mesurées par ICP-MS. La spéciation du palladium a été modélisée en utilisant Visual MINTEQ, mais celle du Pt n'a pu être estimée en raison de l'absence de données thermodynamiques fiables. La densité cellulaire a été déterminée à chaque 24 heures et a été utilisée comme paramètre pour l'évaluation de la toxicité. Aucun des deux métaux n'a eu d'incidence sur le rendement, mais un retard dans la croissance a été observé à mesure que les concentrations augmentaient. Pour le Pd, la croissance a été retardée de manière plus importante à pH 7 comparé à pH 6 et aucun délai n'a été constaté à pH 8 pour une même gamme de concentrations. Des résultats similaires ont été observés pour le Pt. Les CE_{50} déterminées ont confirmé une toxicité accrue à pH neutre. L'internalisation de ces métaux est fortement corrélée avec la concentration de métal mesurée dans le milieu de culture et change en fonction du pH. Pour évaluer l'influence de la complexation du Pd par l'ammoniac, des expériences ont été menées avec une concentration plus faible en ammonium, avec comme résultat une toxicité réduite. Étonnamment, une variation de la concentration de calcium dans le milieu de culture n'a pas eu d'effet sur la toxicité du palladium. Les concentrations environnementales de Pt et de Pd peuvent se rapprocher des CE_{50} calculées et l'émission continue de ces métaux dans l'environnement laisse présager une augmentation des concentrations dans l'eau qui pourraient nuire aux écosystèmes aquatiques dans un proche avenir.

Mots-clés : algue verte, palladium, platine, toxicité, internalisation, pH, ammonium, calcium



ABSTRACT

Platinum and palladium concentrations in the environment have increased considerably over the past 30 years, due to particles emitted by the catalytic converters in vehicle exhaust systems. Yet, little is known about the bioavailability and toxicity of these two metals. To assess the toxicity of these two elements towards aquatic organisms, the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii* was exposed to various concentrations of Pd and Pt. To explore the influence of metal speciation on uptake and toxicity, experiments were performed at pH 6.0, 7.0 and 8.0. Targeted total metal concentrations varied from 18 to 282 nM for palladium and from 26 to 512 nM for platinum; total metal concentrations were determined by ICP-MS. Palladium speciation was modeled using the Visual MINTEQ program, but speciation couldn't be estimated for Pt, due to the lack of reliable thermodynamic data. The algal density was monitored every 24 h and was used as a toxicity endpoint. Neither metal had an effect on the yield, but both induced an increase in the lag phase as the exposure concentrations increased. For Pd, the lag phase was longer at pH 7 than at pH 6 whereas no effects were observed at pH 8 over the tested range of concentrations; similar results were obtained for Pt. The calculated EC_{50} confirmed a higher toxicity at neutral pH than for the other tested pHs. The uptake of the two metals was strongly correlated with measured metal content of the exposure media and was influenced by pH. To investigate the influence of ammonia on Pd complexation, experiments were also performed in low ammonium media, which resulted in reduced toxicity. The effect of water hardness on Pd toxicity was also studied, without clear evidence of an influence on the algal response. Environmental concentrations of Pt and Pd can be near the calculated EC_{50} values and the continued emissions of these two metals to the environment suggest that exceedances may happen more frequently in the future.

Keywords: green algae, palladium, platinum, toxicity, uptake, pH, ammonium, water hardness

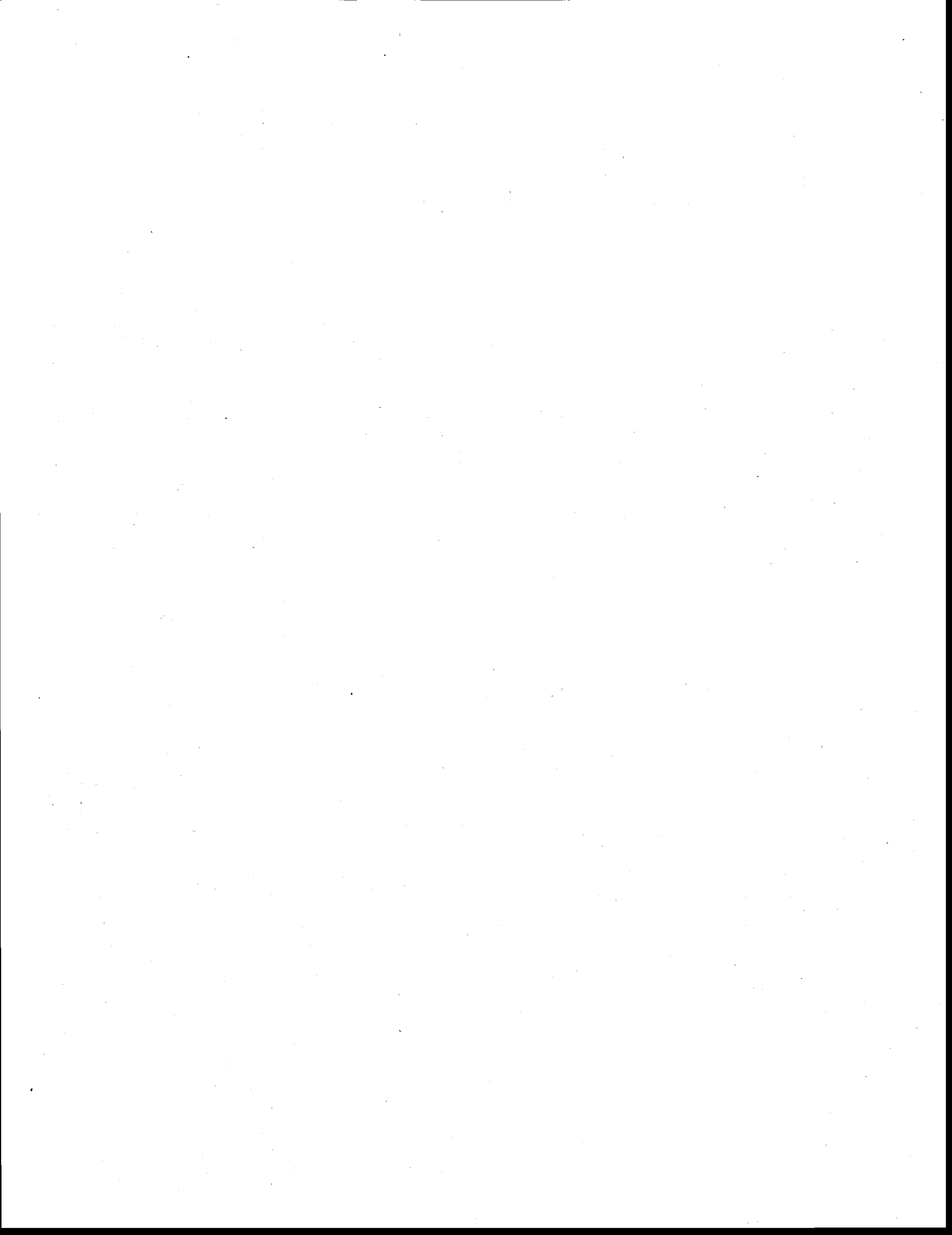


TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| REMERCIEMENTS..... | i |
| RÉSUMÉ | iii |
| ABSTRACT..... | v |
| TABLE DES MATIÈRES | vii |
| LISTE DES FIGURES..... | xi |
| LISTE DES TABLEAUX..... | xiii |
| CHAPITRE 1: INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 Les éléments du groupe platine (ÉGP) | 1 |
| 1.1.1 Caractéristiques des ÉGP..... | 1 |
| 1.1.2 L'industrie automobile | 2 |
| 1.1.3 Utilisation médicale..... | 3 |
| 1.1.4 Autres utilisations..... | 4 |
| 1.2 Contamination de l'environnement par les ÉGP..... | 4 |
| 1.2.1 Cycle naturel des ÉGP..... | 4 |
| 1.2.2 Contamination par l'extraction, les mines et les fonderies..... | 5 |
| 1.2.3 Contamination par les pots catalytiques..... | 6 |
| 1.2.4 Contamination par les rejets des centres hospitaliers | 11 |
| 1.3 Toxicité et internalisation du platine et du palladium | 12 |
| 1.3.1 Chez l'humain | 13 |
| 1.3.2 Chez les organismes terrestres (sauf les plantes)..... | 14 |
| 1.3.3 Chez les invertébrés aquatiques et les poissons..... | 15 |
| 1.3.4 Chez les plantes | 17 |
| 1.3.5 Chez les microorganismes..... | 18 |
| 1.4 Objectifs de recherche | 19 |

| | |
|---|----|
| CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES | 23 |
| 2.1 Organisme d'étude..... | 23 |
| 2.1.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 23 |
| 2.1.2 Entretien des cultures | 24 |
| 2.2 Milieux de culture | 24 |
| 2.2.1 Produits, réactifs et solutions intermédiaires | 24 |
| 2.2.2 Milieu MHSM-1 | 24 |
| 2.2.3 Milieu de rinçage..... | 25 |
| 2.2.4 Milieu d'exposition au Pd | 25 |
| 2.2.5 Milieu d'exposition au Pt | 26 |
| 2.2.6 Milieu à faible concentration d'ammonium (MHSM-NH ₄)..... | 26 |
| 2.2.7 Milieu à teneur variable en calcium (MHSM-Ca) | 29 |
| 2.3 Tests de toxicité | 29 |
| 2.3.1 Matériel de laboratoire | 29 |
| 2.3.2 Pré-Inoculation..... | 29 |
| 2.3.3 Exposition des algues | 30 |
| 2.3.4 Décompte cellulaire | 30 |
| 2.4 Internalisation des métaux par l'algue | 31 |
| 2.4.1 Récupération des algues | 31 |
| 2.4.2 Digestion..... | 32 |
| 2.5 Analyse des ÉGP..... | 32 |
| 2.5.1 Différentes méthodes analytiques..... | 32 |
| 2.5.2 L'ICP-MS : Fonctionnement et interférences..... | 33 |
| 2.5.3 Paramètres de l'ICP-MS | 34 |
| 2.6 Spéciation | 35 |
| 2.7 Traitement des données | 36 |

| | | |
|--|--|----|
| 2.7.1 | Analyse statistique | 36 |
| 2.7.2 | Calculs des CE_{50} | 37 |
| CHAPITRE 3: TOXICITÉ ET PRISE EN CHARGE DU PALLADIUM CHEZ L'ALGUE VERTE <i>C. REINHARDTII</i> : RÉSULTATS ET DISCUSSION..... | | 39 |
| 3.1 | Spéciation du Pd..... | 39 |
| 3.1.1 | Spéciation du Pd dans MHSM-1 | 39 |
| 3.1.2 | Impact de la diminution de $[NH_4^+]$ sur la spéciation du Pd..... | 41 |
| 3.2 | Comportement du Pd dans le milieu de culture..... | 42 |
| 3.2.1 | Bilan de masse | 42 |
| 3.2.2 | Variation temporelle des métaux..... | 44 |
| 3.3 | Influence du pH sur la toxicité du Pd..... | 45 |
| 3.3.1 | Toxicité du Pd chez <i>C. reinhardtii</i> | 45 |
| 3.3.2 | Interprétation de l'effet du pH..... | 49 |
| 3.4 | Influence du pH sur l'internalisation du Pd par <i>C. reinhardtii</i> | 51 |
| 3.4.1 | Prise en charge du Pd | 51 |
| 3.4.2 | Interprétation de l'effet du pH sur l'internalisation du Pd | 54 |
| 3.5 | Impact de la variation de $[NH_4^+]$ sur la toxicité du Pd pour <i>C. reinhardtii</i> | 55 |
| 3.5.1 | Croissance de <i>C. reinhardtii</i> dans un milieu faible en ammonium en présence de palladium | 55 |
| 3.5.2 | Interprétation de l'effet de l'ammonium | 58 |
| 3.6 | Effet de la variation de $[Ca^{2+}]$ sur la toxicité du Pd..... | 58 |
| 3.6.1 | Croissance de <i>C. reinhardtii</i> soumis à un gradient de calcium en présence de palladium | 58 |
| 3.6.2 | Interprétation de l'effet du calcium | 60 |
| CHAPITRE 4: TOXICITÉ ET PRISE EN CHARGE DU PLATINE CHEZ L'ALGUE VERTE <i>C. REINHARDTII</i> : RÉSULTATS ET DISCUSSION..... | | 63 |
| 4.1 | Variation temporelle du Pt dans le milieu | 63 |

| | | |
|-----------------------------|---|----|
| 4.2 | Influence du pH sur la toxicité du Pt..... | 64 |
| 4.2.1 | Toxicité du Pt pour <i>C. reinhardtii</i> | 64 |
| 4.2.2 | Interprétation de l'effet du pH..... | 69 |
| 4.3 | Influence du pH sur l'internalisation du Pt par <i>C. reinhardtii</i> | 70 |
| 4.3.1 | Prise en charge du Pt..... | 70 |
| 4.3.2 | Interprétation de l'effet du pH sur l'internalisation du Pt..... | 72 |
| CHAPITRE 5: CONCLUSION..... | | 75 |
| LISTE DE RÉFÉRENCES..... | | 79 |
| ANNEXE A..... | | 89 |
| ANNEXE B..... | | 91 |
| ANNEXE C..... | | 93 |

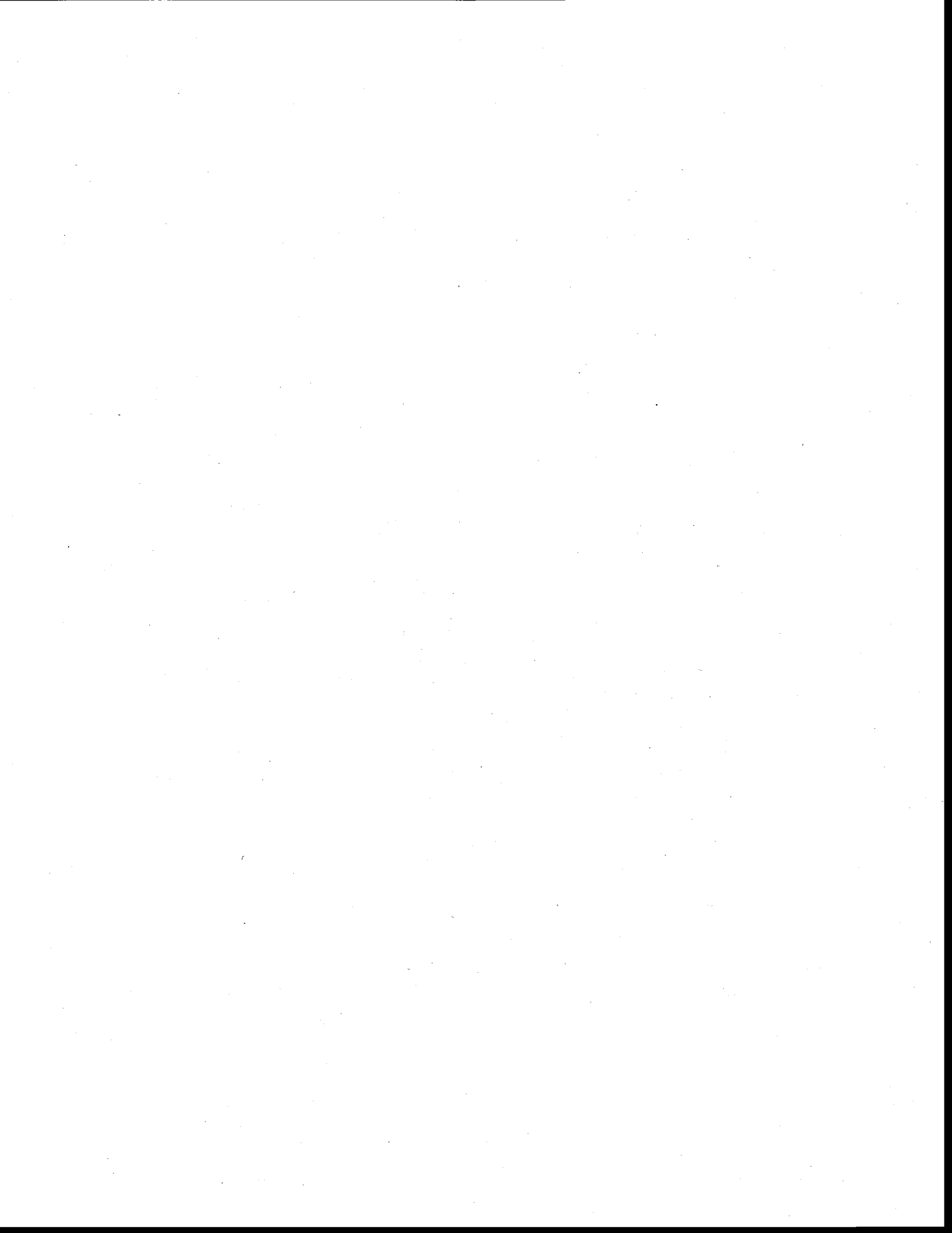
LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1.1 Convertisseur catalytique pour véhicule à essence. Crédit photo : The RedBurn..... | 3 |
| Figure 2.1 : Schéma d'un ICP-MS. Modifié de Jens Molecular and Nanoscale Analysis Laboratory, Université Washington à St-Louis..... | 34 |
| Figure 3.1 : Spéciation du Pd (141 nM) dans le milieu MHSM-1 à différents pH..... | 40 |
| Figure 3.2 : Spéciation du Pd (141 nM) dans le milieu MHSM-NH ₄ à différents pH. | 42 |
| Figure 3.3 : Variation temporelle de la concentration de Pd sur 96 h. Seuls les échantillons témoins ne contiennent pas d'algues..... | 44 |
| Figure 3.4 : Courbes de croissance de <i>C. reinhardtii</i> exposée à différentes concentrations de Pd à pH 6,0 (a), pH 7,0 (b) et pH 8,0 (c). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois mesures..... | 47 |
| Figure 3.5 : Taux de croissance relatif observé après 24 h d'exposition d'après la concentration de Pd mesurée dans le milieu de culture à pH 6,0 (a) et pH 7,0 (b). | 49 |
| Figure 3.6 : Internalisation du Pd par <i>C. reinhardtii</i> pendant 96 h selon la concentration mesurée au moment de l'inoculation des algues dans le milieu de culture à pH 6,0 (a), pH 7,0 (b) et pH 8,0 (c). | 53 |
| Figure 3.7 : Comparaison de la prise en charge de Pd par <i>C. reinhardtii</i> après 96 h selon le pH et la concentration dans le milieu. | 54 |
| Figure 3.8 : Courbes de croissance de <i>C. reinhardtii</i> exposée à différentes concentrations de Pd dans un milieu faible en ammonium à pH 7,0 (a) et pH 8,0 (b). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois mesures. | 57 |
| Figure 3.9 : Courbe de croissance de <i>C. reinhardtii</i> exposée à 20 µg L ⁻¹ de Pd sous différentes concentrations de Ca à pH 7,0. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur quatre mesures. | 59 |
| Figure 4.1 : Variation temporelle de la concentration de Pt dans le milieu de culture pendant 96 heures. | 64 |

| | |
|--|----|
| Figure 4.2 : Courbes de croissance de <i>C. reinhardtii</i> exposée à différentes concentrations de Pt à pH 6,0(a), pH 7,0 (b) et pH 8,0 (c). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois mesures..... | 67 |
| Figure 4.3 : Taux de croissance relatif observé après 24 h d'après la concentration de Pt mesurée dans le milieu de culture à pH 6,0 (a), pH 7,0 (b) et pH 8,0 (c). | 68 |
| Figure 4.4 : Internalisation du Pt par <i>C. reinhardtii</i> pendant 96 h selon la concentration mesurée au moment de l'inoculation des algues dans le milieu de culture à pH 6,0 (a) et pH 8,0 (b)..... | 71 |
| Figure 4.5 : Comparaison entre l'internalisation par <i>C. reinhardtii</i> du platine et du palladium selon la concentration de métal en solution à pH 6,0 (a) et pH 8,0 (b). | 73 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1.1 : Concentrations atmosphériques en ÉGP..... | 8 |
| Tableau 1.2 : Concentrations en ÉGP du sol et de la poussière de route..... | 9 |
| Tableau 1.3 : Concentrations en ÉGP du milieu aquatique | 11 |
| Tableau 2.1 : Composition des solutions intermédiaires utilisées pour les milieux de culture..... | 27 |
| Tableau 2.2 : Concentrations des espèces dans chacun des milieux..... | 28 |
| Tableau 2.3: Constantes de formation de complexes de Pd et de Pt | 36 |
| Tableau 3.1 : Bilan de masse du palladium pour 30 et 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ pour 100 mL de milieu | 43 |



CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1 Les éléments du groupe platine (ÉGP)

Les éléments classés comme appartenant au groupe du platine incluent le ruthénium (Ru), l'osmium (Os), l'iridium (Ir), le rhodium (Rh), le platine (Pt) et le palladium (Pd). Ils sont présents à des teneurs de 0,05 à 0,4 µg/kg dans la croûte terrestre (Wedepohl, 1995). Le Pt et le Pd sont les deux éléments du groupe du platine les plus abondamment utilisés dans le monde actuellement. On les trouve dans l'environnement sous forme de gîte alluvionnaire, dans des alliages contenant de l'iridium ou encore dans les gisements de nickel ou de cuivre (Fortin *et al.*, 2011). C'est de ce type de gisements que le Pt et le Pd sont extraits. En 2012, la production mondiale de platine s'élevait à près de 160 tonnes métriques (Johnson Matthey, 2013). Le principal pays producteur est l'Afrique du Sud, qui comble plus de 70 % de la demande pour ce métal. La Russie (14 %), le Zimbabwe (6 %) et l'Amérique du Nord (5 %) sont les autres sites d'extraction d'envergure. Le palladium est issu des mêmes régions du globe. La Russie est le plus important joueur, sa part de marché s'élevant à 44 %. L'Afrique du Sud n'est pas loin derrière, avec un peu plus de 35 % de la production mondiale. L'Amérique du Nord arrive troisième avec près de 14 % de l'offre mondiale (Johnson Matthey, 2013). Dans le milieu aquatique, on retrouve le Pd et le Pt principalement sous le degré d'oxydation +II. Les autres états d'oxydation possible sont 0, +I et +IV pour le palladium ainsi que 0 et +IV pour le platine (Fortin *et al.*, 2011).

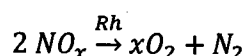
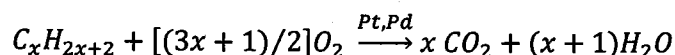
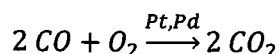
1.1.1 Caractéristiques des ÉGP

Les six éléments du groupe du platine partagent des propriétés similaires. Leur caractéristique la plus intéressante pour l'industrie est leur capacité à catalyser certaines réactions chimiques. L'utilisation de Pt et de Pd facilite les réactions d'hydrogénation, de déshydrogénation, d'oxydation ou encore d'hydrogénolyse (Fortin *et al.*, 2011). Leur pouvoir catalytique vient entre autres de leur capacité à adsorber à la surface du métal des molécules de gaz, tels que CO et O₂ (Brenan, 2008). La proximité des molécules engendrées par cette adsorption accélère grandement la vitesse de réaction. Les ÉGP

ont aussi une grande résistance à l'oxydation, et ce même à haute température. Leur haute conductivité électrique en fait des métaux de choix pour servir d'électrode ou encore pour le plaquage. Le palladium est aussi reconnu pour sa biocompatibilité et le platine a la possibilité d'inhiber la division cellulaire. De plus, ajoutés à certains alliages, les ÉGP peuvent améliorer la résistance et la rigidité du composé final (Brenan, 2008).

1.1.2 L'industrie automobile

Le plus important débouché pour le Pt, le Pd et le Rh est l'industrie automobile. Environ 56 % de la demande mondiale brute pour ces trois métaux en 2012 était attribuable à son utilisation pour la fabrication de convertisseurs catalytiques (Johnson Matthey, 2013). Ces derniers sont arrivés sur le marché pour la première fois aux États-Unis en 1975. Cela faisait écho à l'adoption par le gouvernement américain du *Clean Air Act* en 1970 qui stipulait que les automobiles devaient réduire leurs émissions de monoxyde de carbone (CO), de sous-produits de combustion incomplète (HC) et d'oxydes d'azote (NO_x) de 90 % en cinq ans afin de lutter contre le smog atmosphérique. Le convertisseur catalytique (CC) s'est révélé être le système le plus efficace pour atteindre cet objectif. À l'aide d'un catalyseur métallique, le CC oxyde le CO et les HC en dioxyde de carbone et réduit les NO_x en azote gazeux selon les réactions suivantes :



Au départ, des métaux comme le nickel, le cuivre, le cobalt et le fer avaient été testés pour catalyser ces réactions. Cependant, leur pouvoir catalytique était grandement affecté par la présence de soufre dans l'essence et leur résistance thermique n'était pas assez élevée (Twigg, 2011). La capacité des ÉGP à demeurer stable à haute température comblait cette lacune. Après son introduction en Amérique et au Japon, le convertisseur catalytique commençât à être utilisé sur les voitures européennes et australiennes en 1985 (Schafer *et al.*, 1998b). Il faudra attendre la décennie 1990 avant de voir les convertisseurs catalytiques atteindre les marchés émergents tels que le Brésil et l'Inde. À l'heure actuelle, plus de 500 millions de véhicules sont équipés d'un tel

système (Rauch *et al.*, 2005) sur un total d'un peu plus d'un milliard (Sousanis, 2011). On retrouve à la figure 1.1 une représentation d'un pot catalytique.

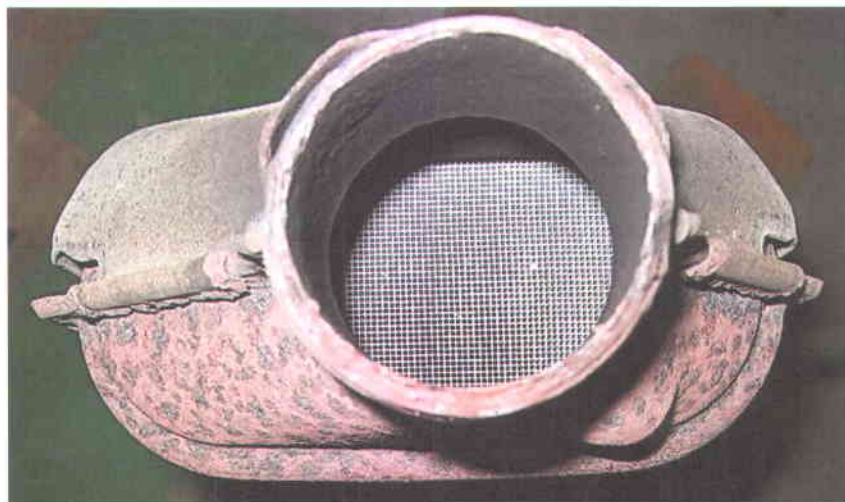


Figure 1.1 Convertisseur catalytique pour véhicule à essence. Crédit photo : The RedBurn.

Le convertisseur catalytique actuel se compose généralement d'un support en céramique fait de cordiérite ($2 \text{ MgO} \cdot 2 \text{ Al}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{ SiO}_2$) (Twigg, 2011). Une structure en nid d'abeille est utilisée afin de maximiser le rapport surface sur volume. On y dépose par imprégnation Pt et/ou Pd, Rh, alumine, oxyde de cérium ainsi qu'un large éventail de produits pour faciliter les réactions. La présence ou non du platine et du palladium tient de la nature des émissions du moteur. Le Pd est préféré lorsqu'il s'agit de moteur à essence tandis que le Pt est tout indiqué pour les moteurs fonctionnant au diesel. Cependant, on commence à substituer le Pt par le Pd pour les mécaniques diesel afin de réduire les coûts (Johnson Matthey, 2013). À titre indicatif, le CC d'une Skoda Octavia à essence contient approximativement 0,3 g de Pt, 4,3 g de Pd et 0,3 g de Rh. Le même véhicule mu par un moteur diesel est équipé d'un système catalytique qui contient au moins 1,3 g de Pt (Sebek *et al.*, 2011).

1.1.3 Utilisation médicale

Les propriétés anti-cancer du platine ont été découvertes par hasard au cours de la décennie 1960 lors de tests impliquant des souris. En 1971, des essais cliniques ont démontré l'efficacité d'un composé, le cisplatine, pour combattre les tumeurs chez l'humain. Ce n'est que sept ans plus tard qu'il a été approuvé par les autorités compétentes et que les patients ont pu en bénéficier (Brenan, 2008). D'autres composés

ont depuis été développés, tels que le carboplatine et l'oxaliplatine. Les ions de Pt(II) ou de Pt(IV) s'attaquent spécifiquement à l'ADN des cellules qui se divisent anormalement rapidement et ont un effet apoptotique sur celles-ci (Florea *et al.*, 2006). Bien que les médicaments anti-cancer accaparent la majorité des ÉGP en médecine, on les utilise aussi pour augmenter la dureté des alliages des couronnes dentaires ou encore dans la fabrication de valves cardiaques et de stimulateurs cardiaques (Brenan, 2008).

1.1.4 Autres utilisations

D'autres secteurs d'activités requièrent des éléments du groupe du platine, mais en plus faible quantité. L'industrie chimique utilise le platine et le palladium à titre de catalyseur pour le raffinage du pétrole et la fabrication de certains produits chimiques, par exemple l'acide nitrique, l'acide sulfurique et le méthanol (Johnson Matthey, 2013). Ils servent également à la polymérisation de certains types de plastique. Ces mêmes métaux sont nécessaires pour certains produits de consommation de haute technologie. Ils entrent dans la fabrication de disques durs d'ordinateur et dans la composition du verre pour les écrans à cristaux liquides (Brenan, 2008). Sur le marché des métaux précieux, le platine occupe une place importante, où sa valeur marchande est plus élevée que l'or. La demande en ÉGP risque d'augmenter avec le développement de nouveaux débouchés, entre autres avec la mise au point de piles à combustible.

1.2 Contamination de l'environnement par les ÉGP

1.2.1 Cycle naturel des ÉGP

Les éléments du groupe du platine sont présents naturellement dans l'environnement. Ils sont pour la plus grande partie séquestrés dans la croûte terrestre ou dans le manteau. Il arrive cependant que certains phénomènes naturels viennent mobiliser les ÉGP et enrichir le milieu. C'est le cas entre autres des éruptions volcaniques. Soyol-Erdene *et al.* (2011) ont déterminé que les ÉGP peuvent être utilisés comme traceurs de l'activité volcanique pour la période antérieure aux années 1980. L'enrichissement de l'environnement par ces métaux s'effectue de manière globale. En effet, des dépôts attribuables aux volcans ont été mesurés au Groenland et en Antarctique (Soyol-Erdene *et al.*, 2011). La poussière cosmique contribue aussi, mais de moindre façon, à

ces dépôts. La remobilisation naturelle des ÉGP est toutefois relativement faible par comparaison avec l'apport anthropique (Sen *et al.*, 2012) et est une cause négligeable de l'augmentation importante de leurs concentrations dans l'environnement, en particulier depuis les années 1970.

1.2.2 Contamination par l'extraction, les mines et les fonderies

La contamination anthropique par les ÉGP a probablement été amorcée par l'exploitation des mines (Van de Velde *et al.*, 2000). La documentation sur l'étendue de la contamination par le platine et le palladium aux abords des sites d'extraction est cependant bien mince. En 2013, Rauch et Fatoki ont publié une étude sur la contamination en Pt de divers sites d'intérêt en Afrique du Sud. Ils relèvent que, bien que la concentration naturelle du sol soit de $2,7 \pm 0,4 \text{ ng g}^{-1}$, elle est de plus de 600 ng g^{-1} à proximité des fonderies et peut atteindre jusqu'à 144 ng g^{-1} de Pt dans des villes situées à plusieurs kilomètres de là. Il est important de noter que selon Rauch et Fatoki (2013), les fonderies, davantage que l'extraction, seraient à l'origine de la contamination. Certaines fonderies fonctionnent depuis plusieurs décennies. Elles sont une source de contamination importante en ce qui a trait à la dispersion des métaux. Selon Boyd *et al.* (1997), les fonderies russes traitant les minerais de cuivre et de nickel seraient la cause de l'augmentation de la concentration d'ÉGP par aérosols. Cette contamination est assez dispersée et s'étend sur de grandes distances. Les aérosols peuvent atteindre des points reculés comme le sommet du Mont Blanc (Van de Velde *et al.*, 2000), les Pyrénées françaises (Moldovan *et al.*, 2007), le Groenland et l'Antarctique (Rauch *et al.*, 2005). La modélisation des vents et les ratios des ÉGP laissent croire qu'effectivement, les fonderies russes sont en partie responsables de la contamination actuelle (Moldovan *et al.*, 2007). La situation est aussi observable au Canada où les sédiments du lac Kelly, situé à proximité d'une fonderie de nickel, sont enrichis d'environ 100-1000 fois la concentration naturel en Pt. L'enrichissement était encore mesurable à une distance 2,5 km du site de transformation (Crocket *et al.*, 1976, cité dans Pyszynska *et al.*, 2000). Au Québec, Bérubé a étudié en 2005 les lacs Vose et Tantaré. Les premiers apports anthropiques de Pt à ces deux endroits ont été datés du début du 20^e siècle et ont été attribués aux émissions de l'industrie minière. L'évolution des flux de Pt coïncide avec l'essor de la production d'EGP à Sudbury et aux États-Unis, source la plus probable de la contamination. Les flux atmosphériques mesurés sont du même ordre de grandeur

que ceux qui avait été calculés au Groenland. L'utilisation des ÉGP par l'industrie chimique serait aussi en cause dans le rejet atmosphérique. Seulement qu'en Allemagne, 92 kg de Pt seraient annuellement rejetés dans l'atmosphère simplement par la synthèse d'ammoniac (Beck *et al.*, 1995, cité dans Helmers *et al.*, 1999). Le manque de données publiées sur les rejets atmosphériques industriels ne permet pas de faire une estimation précise de la quantité d'ÉGP expulsée dans l'environnement. Ce n'est cependant ni l'industrie minière ni l'industrie chimique qui sont la plus grande source de contamination par les ÉGP.

1.2.3 Contamination par les pots catalytiques

La communauté scientifique s'entend pour dire que les convertisseurs catalytiques des véhicules sont la principale source de contamination de l'environnement par les ÉGP (voir Ek *et al.* 2004 et les références citées dans cet article). En effet, leur introduction sur le marché dans la seconde moitié du 20^e siècle coïncide avec l'augmentation des concentrations de platine, de palladium et de rhodium dans différents milieux.

La contamination se produit lorsque des particules du revêtement catalytique du CC sont arrachées de leur support et sont rejetées avec les gaz d'échappement. Cela est causé par plusieurs facteurs physicochimiques. Le système, pour être efficace, doit fonctionner à haute température, ce qui affecte son intégrité à long terme. De plus, les conditions changeantes d'oxydo-réduction régnants à l'intérieur du pot catalytique induisent un stress supplémentaire sur la structure (voir Ravindra *et al.* 2004 et les références citées dans cet article). Cependant, l'abrasion mécanique qui se produit sur la couche catalytique résulte en une perte progressive de celle-ci et qui serait la principale cause des rejets d'ÉGP (Rauch *et al.*, 2008). D'autres facteurs affectent aussi, dans une moindre mesure, le volume de particules émises. La quantité de Pt, de Pd et de Rh rejetée dépend de la vitesse du véhicule, du type de moteur, du type de convertisseur catalytique ainsi que des additifs du carburant (Artelt *et al.*, 1999b). La quantité de Pt, Pd et Rh rejetée varie aussi considérablement avec l'âge du catalyseur. Palacios *et al.* (2000) ont comparé les émissions de convertisseurs catalytiques neufs avec ceux de CC usagés. Ils ont mesuré qu'un véhicule à essence avec un dispositif neuf émet en moyenne 100, 250 et 50 ng km⁻¹ de Pt, Pd et Rh, respectivement. Si le moteur fonctionne au diesel, les rejets de Pt oscillent entre 400 et 800 ng km⁻¹. Après 30 000 km, c'est plutôt de 6 à 8 ng km⁻¹ de Pt, 12 à 16 ng km⁻¹ de Pd et 3 à 12 ng km⁻¹ de

Rh qui sont émis dans l'environnement par le véhicule à essence. La part du moteur diésel varie entre 108 et 150 ng km⁻¹ après la même distance d'utilisation. Barbante *et al.* (2001) ont quant à eux estimé les rejets annuels de Pt en se basant sur des émissions entre 65 et 180 ng par kilomètre par voiture. En approximant le nombre de véhicules équipés d'un pot catalytique à 500 millions dans le monde et en établissant la distance moyenne parcourue par année à 15 000 km, de 0,5 à 1,4 tonne de Pt finirait sa course dans l'environnement. Selon les estimations de Rauch *et al.* (2005), cela pourrait même atteindre 6 tonnes de Pt par an.

Les ÉGP émis sont généralement sous forme métallique liés à des particules d'oxyde d'aluminium. Selon des tests effectués en laboratoire, la taille de ces particules est majoritairement supérieure à 10,2 µm (66 %). La fraction entre 3,14 et 10,2 µm représente 21 % du total des émissions tandis que 13 % des particules auraient une taille inférieure à 3,14 µm (Artelt *et al.*, 1999b). Il est cependant possible que, dans un cadre d'utilisation réelle, le portrait soit un peu différent. Le destin de ces particules est lié à leur taille. Selon qu'elles soient plus petites ou plus grosses, elles demeureront plus ou moins longtemps en suspension dans l'atmosphère. Les particules les plus fines représentent la majeure partie des rejets qui voyagent sur de longues distances. D'après Zereini *et al.* (2012a), environ 70 % des matières particulaires de Pd de taille inférieure à 10 µm (PM₁₀) auraient un diamètre de moins de 2,5 µm. Ce pourcentage augmente à 76 % pour les particules de platine.

La concentration en ÉGP dans l'air des villes a fait l'objet de plusieurs études (B. Gomez *et al.*, 2001, Wichmann *et al.*, 2007, Zereini *et al.*, 2012a) (Tableau 1.1). En moyenne, la quantité de Pt présente est de l'ordre de 4 à 20 pg m⁻³ et est de 2 à 20 pg m⁻³ pour le Pd (Rauch *et al.*, 2008). Cependant, ces émissions sont en progression dans le temps. En 2012, Zereini *et al.* ont échantillonné les aérosols des villes de Neuglobsow, Deuselbach et Francfort. L'air de cette dernière s'est révélé être le plus contaminé par les ÉGP. Les concentrations mesurées de Pt (PM₁₀) étaient situées entre 1,2 et 80,9 pg m⁻³, pour une moyenne de 12,4 pg m⁻³. Celles du Pd (PM₁₀) étaient plus élevées, entre 1,2 et 683 pg m⁻³, pour une moyenne de 43,9 pg m⁻³. Ces résultats marquent une augmentation significative des concentrations comparativement à un échantillonnage précédent en 2002 (Zereini *et al.*, 2012a).

En raison de leur temps de résidence plus élevé dans l'atmosphère, les fines particules de catalyseur peuvent être transportées sur de grandes distances. Des concentrations

anormalement élevées ont été mesurées au Groenland (Barbante *et al.*, 2001), dans les Pyrénées (Moldovan *et al.*, 2007) et en Antarctique (Soyol-Erdene *et al.*, 2011). D'après leurs conclusions, le début de la contamination coïncide avec l'introduction massive des convertisseurs catalytiques. De plus, l'analyse des ratios des différents ÉGP par Barbante *et al.* (2001) indique qu'ils sont très similaires à ceux des pots catalytiques, confortant l'idée que ces derniers sont une importante source de contamination en régions reculées. Puisqu'il s'agit d'endroits isolés avec peu ou pas de circulation automobile, il ne peut s'agir que de particules parcourant de grandes distances. Rauch *et al.* (2005) avancent l'idée que le transport régional et sur de longues distances contribueraient grandement au dépôt atmosphérique des ÉGP. La contamination de l'environnement par les ÉGP est une problématique globale, et ne touche pas uniquement les écosystèmes à proximité des réseaux routiers. C'est cependant à ces derniers que l'on accorde le plus d'attention.

Tableau 1.1 : Concentrations atmosphériques en ÉGP

| Échantillon | Localisation | Pd pg m ³ | Pt pg m ³ | Référence |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Route avec trafic dense | Francfort, Allemagne | 1,2 - 683 | 1,2 - 80,9 | Zereini <i>et al.</i> 2012 |
| Centre-ville | Vienne, Autriche | 5 - 29,1 | 7,5 - 26,8 | Puls <i>et al.</i> 2012 |
| Trois autoroutes | Braunschweig, Allemagne | 38 | 159 | Wichmann <i>et al.</i> 2007 |
| Six sites différents | Madrid, Espagne | | <0,1 - 57,1 | Gomez <i>et al.</i> 2001 |
| Deux sites urbains | Göteborg, Suède | 4,9 | 14 | Rauch <i>et al.</i> 2005 |
| Centre-ville | Boston, États-Unis | 7,5 | 6,7 | Rauch <i>et al.</i> 2005 |
| Centre-ville | Tokyo, Japan | 0,79 | 2,1 | Rauch <i>et al.</i> 2005 |

Aux abords des routes, on trouve les plus grosses particules qui ont tendance à se déposer plus rapidement ainsi que celles déposées par retombées sèches. La concentration en ÉGP du sol diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne des routes. La distribution du Pt, du Pd et du Rh sur des sites d'échantillonnage routiers confirme que cette contamination est belle et bien due au trafic automobile (Schafer *et al.*, 1998b). De nombreuses études ont fait état de la concentration en ÉGP de différents

systèmes routiers (autoroutes, routes de campagne, rues résidentielles, stationnements, etc.) et ce, dans plusieurs pays (Allemagne, Royaume-Uni, États-Unis, Espagne, Chine, Inde, Japon, Suède, etc.) (Tableau 1.2). Le niveau de contamination est assez variable, en raison de la diversité des sites d'échantillonnage. De manière générale, la concentration en platine dans la poussière de route varie entre 50 et 300 ng g⁻¹ et entre 25 et 250 ng g⁻¹ dans le sol qui borde les routes. Pour ce qui est du palladium, on en retrouve de 10 à 300 ng g⁻¹ et entre 1 et 12 ng g⁻¹ dans ces mêmes compartiments, respectivement. La concentration en rhodium est plus faible, comprise entre 10 et 60 ng g⁻¹ dans la poussière de route et entre 4 et 40 ng g⁻¹ dans le sol près des routes (Rauch *et al.*, 2008). Pour fin de comparaison, le niveau naturel d'ÉGP dans le sol est généralement inférieur à 1-3 ng g⁻¹ (Terashima *et al.*, 2002, cité dans Prichard *et al.*, 2012).

Tableau 1.2 : Concentrations en ÉGP du sol et de la poussière de route

| Échantillon | Localisation | Pd ng g ⁻¹ | Pt ng g ⁻¹ | Référence |
|---------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Poussière de route (ville) | Sept grandes villes, Chine | 3,8 - 538 | 4,3 - 385 | Pan <i>et al.</i> 2013 |
| Poussière de route (ville) | Calcutta, Inde | 0,7 - 63,6 | 2,6 - 51 | Pan <i>et al.</i> 2013 |
| Sol près d'avenues importantes | Sao Paulo, Brésil | 3 - 378 | 1 - 208 | Ribeiro <i>et al.</i> 2012 |
| Sol aux abords de la route | Oxfordshire, Angleterre | 84,2 - 120,8 | 2,04 - 15,9 | Hooda <i>et al.</i> 2007 |
| Sol longeant une autoroute | Francfort, Allemagne | 20 - 191 | 41 - 254 | Zereini <i>et al.</i> 2007 |
| Poussière d'une autoroute | Madrid, Espagne | | 144 - 339 | Gomez <i>et al.</i> 2003 |
| Poussière près d'une route achalandée | Karlsruhe, Allemagne | 21,3 | 101,3 | Sures <i>et al.</i> 2001 |
| Poussière et sol près d'une autoroute | Près de Londres, Angleterre | 1 - 70 | <10 - 500 | Jarvis <i>et al.</i> 2001 |
| Poussière de route | Scheffield, Angleterre | 230 - 444 | 133 - 408 | Prichard <i>et al.</i> 2008 |

La contamination par les ÉGP affecte également le milieu aquatique. Le dépôt sec de particules de convertisseur catalytique est la première voie d'entrée du platine et du palladium dans les cours d'eau. Les précipitations en sont une autre. Elles peuvent

entraîner des particules avec elles directement dans les plans d'eau par retombées humides ou encore transporter les ÉGP par ruissellement. Le plus souvent, les particules finissent leur course dans les sédiments, où les ÉGP s'accumulent (Ek *et al.*, 2004a). S'ils demeuraient sous forme particulaire, inerte, dans les sédiments, les ÉGP ne soulèveraient que peu d'inquiétudes. Cependant, ces particules sont susceptibles d'être ingérés par les animaux vivant à l'interface sédiments-eau, et une fois entrées dans le système digestif de l'animal, elles pourraient se solubiliser. De plus, sans l'intervention de ces animaux, une fraction de ces métaux est solubilisée en milieu naturel. Pour le platine, elle s'élève à environ 10 % des émissions totales (Moldovan *et al.*, 2002). Des tests effectués avec des acides faibles ont montré que jusqu'à 40 % du palladium émis est soluble (Rauch *et al.*, 2008). Le Pd est donc beaucoup plus mobile dans l'environnement que le Pt (Jarvis *et al.*, 2001). Il a aussi été montré que les fractions solubles des particules catalytiques augmentent avec l'âge du catalyseur (Moldovan *et al.*, 2002). Ce n'est pas le seul facteur qui influence la mobilisation des ÉGP. Plus les particules émises sont fines, plus elles sont susceptibles d'être en partie solubilisées. La composition du milieu exerce aussi une grande influence. Plus il est acide, plus la portion en solution va être significative. De plus, la présence d'acide fulvique et d'acide humique favorise la solubilisation du Pt et du Pd. Il en est de même pour d'autres composés, tels que le triphosphate, le pyrophosphate, la L-méthionine (Lustig *et al.*, 1998) ou des acétates (Dubiella-Jackowska *et al.*, 2009). La présence de sidérophores, des molécules utilisées par les plantes et la faune microbienne pour capter les ions ferriques, peut aussi contribuer à la mobilisation des ÉGP (Dahlheimer *et al.*, 2007). Une fois en solution, les ions de platine et de palladium sont liés en grande partie à la matière organique dissoute (Rauch *et al.*, 2008). Une partie est aussi présente sous forme de complexes avec les ions inorganiques présents (hydroxyde, chlorure, ammoniac) (Colombo *et al.*, 2008b).

La concentration de Pt et de Pd dans les milieux aquatiques est très variable (Tableau 1.3). De manière générale, on mesure des concentrations entre 1 et 10 ng L⁻¹ pour le platine et entre 10 et 50 ng L⁻¹ pour le palladium (Rauch *et al.*, 2008). Elles peuvent être cependant beaucoup plus élevées, comme cela a été mesuré en Allemagne. L'eau de ruissellement de la route (*street runoff waters*) pouvait contenir jusqu'à 1 600 ng L⁻¹ de platine (Laschka *et al.*, 1996, cité dans Dubiella-Jackowska *et al.*, 2009). Il est à retenir que cette eau va rejoindre le système d'évacuation des pluies et sera diluée. Les résultats de Roy (2009) expriment bien cette tendance. La concentration de palladium

dans l'eau de conduites pluviales de la ville de Québec pouvaient atteindre plus de 800 ng L⁻¹, avec une moyenne annuelle de près de 300 ng L⁻¹. Les conduites pluviales se déversaient ensuite dans une rivière, qui elle contenait en moyenne 33 ng L⁻¹ de palladium. Les concentrations en ÉGP sont élevées près des routes, mais le phénomène de dilution limite la portée de la contamination.

Tableau 1.3 : Concentrations en ÉGP du milieu aquatique

| Échantillon | Localisation | Pd ng L ⁻¹ | Pt ng L ⁻¹ | Référence |
|---|----------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Bassin d'écoulement, près d'une autoroute | Francfort, Allemagne | | 9 - 78 | Zereini <i>et al.</i> 1997 |
| Rivière en milieu urbain | Göteborg, Suède | 10 | | Moldovan <i>et al.</i> 2003 |
| Rivière en milieu urbain | Québec, Canada | <1 - 74 | <0,3 - 1 | Roy, 2009 |
| Conduite pluviale en milieu urbain | Québec, Canada | <1 - 800 | <0,3 - 8 | Roy, 2009 |

1.2.4 Contamination par les rejets des centres hospitaliers

En raison de son utilisation dans les médicaments pour traiter les cancers, le platine est présent dans les eaux usées des hôpitaux. En effet, après son introduction dans l'organisme, seulement de 10 à 20 % du carboplatine se lie aux protéines. Entre 50 et 75 % du Pt est excrété dans l'urine dans les premiers 24 heures suivant la prise du médicament (Kummerer *et al.*, 1997). Pour le cisplatine, entre 31 et 85 % de la dose est excrété pendant les premiers 51 jours (Kummerer *et al.*, 1997). Rauch (2008) indique que les émissions de Pt se font vraisemblablement sous forme de composés solubles. Les rejets de platine par les hôpitaux ont été estimés entre 1,3 et 14,3 kg de Pt par an pour l'Allemagne, l'Autriche et les Pays-Bas (Kummerer *et al.*, 1999). Cela représenterait entre 3 et 12 % des émissions d'ÉGP par les convertisseurs catalytiques pour chacun des pays. Les effluents des hôpitaux peuvent contenir jusqu'à 3,5 µg L⁻¹ de Pt (Ravindra *et al.*, 2004), mais sont rapidement dilués une fois qu'ils se sont déversés dans les égouts. La part de la contamination environnemental résultant des hôpitaux est somme toute faible, mais pas négligeable pour autant.

1.3 Toxicité et internalisation du platine et du palladium

Les conséquences possibles de la contamination par les éléments du groupe du platine sur les organismes vivants ont fait l'objet de quelques études jusqu'à présent. Ainsi, des expériences de toxicité et de prise en charge ont été menées afin de déterminer les seuils critiques pour certains organismes et leur capacité à réagir à la présence d'ÉGP. D'autres se sont concentrées sur leurs voies d'entrée dans les cellules et leur influence sur les processus physiologiques. Les organismes sélectionnés pour ces recherches sont issus de milieux et d'espèces très différents, qui couvrent assez largement le monde vivant tel que discuté dans les sections suivantes. Cela témoigne de l'étendue de la contamination par les ÉGP et des préoccupations que cela soulève pour l'ensemble des espèces vivantes.

Lorsque l'on parle de toxicité, il est question de dosage. Il faut cependant bien cerner ce que l'on doit doser et sous quelles formes. Il faut idéalement pouvoir évaluer l'influence du milieu sur le contaminant et les mécanismes responsables de la réponse toxique. Le modèle du ligand biotique (BLM) a été développé afin de cerner le mieux possible ces paramètres pour des expériences de toxicité de métaux cationiques en milieu aquatique. Un point fondamental de ce modèle tient de l'influence de la spéciation du métal en solution sur la biodisponibilité de celui-ci. Il a été établi que, dans des conditions physico-chimiques données, la prise en charge des métaux par les organismes vivants est proportionnelle à la concentration de métal libre (M^{2+}). Se fier uniquement à la concentration totale en solution pour évaluer le risque d'un élément pourrait mener à une surestimation de celui-ci. Il est cependant très complexe d'établir précisément la spéciation des ÉGP en raison du manque de données thermodynamiques disponibles. Bien que le BLM ne s'applique qu'au milieu aquatique, on peut penser que des facteurs propres aux autres milieux (atmosphérique, terrestre...) influencent eux aussi la biodisponibilité des ÉGP en milieu naturel et qu'il faudrait en tenir compte pour les tests d'exposition. Pour l'instant, avec l'état actuel des connaissances, les résultats publiés ne font état que des concentrations totales en ÉGP auxquelles les organismes ont été exposés.

1.3.1 Chez l'humain

Les premières inquiétudes des effets des ÉGP sur les humains ont émergé de préoccupations à l'égard de la santé des travailleurs en contact avec ces métaux. Farago *et al.* (1998) ont comparé la concentration de platine dans le sang et l'urine de travailleurs œuvrant dans la construction de route avec des personnes non exposées. La quantité de Pt était deux fois plus élevée dans le sang et quatre fois plus élevée dans l'urine chez les gens exposés au trafic automobile que chez le groupe de contrôle. Une étude concernant des travailleurs exposés au platine pendant la production et le recyclage de convertisseurs catalytiques a révélé des concentrations de Pt dans le sang et l'urine jusqu'à cent fois supérieures à celles d'individus non exposés (Zereini *et al.*, 1999, cité dans Ravindra *et al.*, 2004). Les conducteurs de tramway sont aussi plus à risque que la population en général de montrer des concentrations importantes de palladium et de rhodium dans les fluides corporels (Iavicoli *et al.*, 2007, Ovari *et al.*, 2007). Cependant, la profession n'est pas le seul facteur épidémiologique qui influence la présence des ÉGP dans le corps humain. Caroli *et al.* (2001) ont corrélié la concentration d'ÉGP dans l'urine de 310 élèves de Rome avec la densité du trafic routier de leur endroit de résidence. Ainsi, plus le trafic automobile était important près de leur domicile, plus leur urine contenait d'ÉGP.

L'exposition à des sels de platine, le plus souvent dans un contexte de travail en usine, peut causer une irritation des voies respiratoires, des crises d'asthme ou encore des dermatites (Ek *et al.*, 2004a). Ces effets sont bien documentés, cependant ce n'est pas le cas pour les sels de palladium. Pourtant, d'après Kielhorn *et al.* (2002), une plus faible dose de Pd est suffisante pour induire une réaction allergénique en comparaison avec le Pt.

Les rejets d'ÉGP par les pots catalytiques augmentant, Wiseman *et al.* (2009) se sont interrogés sur les risques liés aux particules en suspension dans l'air. Ils ont noté que de 30 à 57 % du total des ÉGP mesurés dans l'air avaient une taille inférieure à 10 µm (PM₁₀). L'exposition à des particules de cette taille, mais plus spécifiquement celles inférieures à 2,5 µm (PM_{2,5}), a été associée à une augmentation de la morbidité et de la mortalité (Dockery *et al.*, 1993, et Burnett *et al.*, 1999, cités dans Wiseman *et al.*, 2009). Zereini *et al.* (2012b) ont voulu évaluer la mobilité des ÉGP dans les fractions PM₁₀, PM_{2,5} et PM₁ de poussière de route en utilisant un substitut de liquide pulmonaire

(*simulated lung fluid*). Ils sont arrivés à la conclusion que le Rh est le plus mobile, suivi du Pt puis du Pd. Ils avancent comme hypothèse pour expliquer ce résultat que le Rh est possiblement davantage associé avec les particules fines et que sa spéciation favorise probablement sa mobilité dans les fluides biologiques. De leur côté, Colombo *et al.* (2008a) se sont intéressés à l'internalisation d'ÉGP via le tube digestif. Ils ont simulé le passage de sol contaminé par les ÉGP de l'estomac vers le petit intestin *in vitro*. Ils n'ont pas noté d'effet causé par le changement de pH d'un compartiment à l'autre. Par contre, ils ont constaté que le palladium était plus biodisponible que le platine dans le cadre de cette expérience. De plus, ils ont comparé la poussière de route, la poussière de catalyseur et une préparation d'hydroxyde d'ÉGP. La poussière de route s'est révélée être plus facilement solubilisée par le système que les autres. Pour expliquer ce résultat, les auteurs soulignent que les conditions physicochimiques sur le bord de la route ont pu altérer les particules, d'où l'importance de mener ces tests dans des conditions représentant le plus possible l'environnement.

1.3.2 Chez les organismes terrestres (sauf les plantes)

Peu de documentation est disponible sur les organismes terrestres en relation avec la contamination de l'environnement par les éléments du groupe du platine. L'une des premières recherches qui s'intéressent à ce sujet utilisait des rats comme sujet d'étude. Artelt *et al.* (1999a) ont mis au point une substance modèle, à base d'alumine et de platine, qui se rapproche des particules émises par les pots catalytiques. Ils ont ensuite exposé les rats au Pt par instillation intratrachéale (injection par les voies respiratoires), par inhalation d'aérosols ou par gavage. Bien que ces techniques ne soient pas représentatives des modes d'ingestion en condition naturelle, les résultats indiquent qu'advenant une exposition, le platine contenu dans ces particules peut être biodisponible et donc être internalisé par l'organisme. Attestant davantage de la prise en charge en milieu naturel, Ek *et al.* (2004b) ont mesuré la concentration de Pt, de Pd et de Rh dans les tissus et les œufs de trois espèces d'oiseaux de proie de la Suède, soit l'épervier (*Accipiter nisus*), le faucon pèlerin (*Falco peregrinus*) et le faucon gerfaut (*Falco rusticolus*). Bien que ces espèces ne partagent pas le même habitat, aucune tendance spatiale n'a pu être mise au jour. Par contre, comme cela a été vu avec d'autres organismes, le palladium est davantage internalisé que le Pt et le Rh. On le

retrouve principalement dans le système sanguin, les œufs et les plumes des oiseaux étudiés, alors que le platine se concentre uniquement dans le sang.

1.3.3 Chez les invertébrés aquatiques et les poissons

De tous les organismes aquatiques soumis à des tests avec des ÉGP, la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) est celle qui a été étudiée le plus intensivement. Bernd Sures et son équipe ont publié plusieurs articles consacrés à l'internalisation du Pd, du Pt et du Rh par cet organisme ainsi qu'à leurs effets sur ses processus physiologiques (Frank *et al.*, 2008, Singer *et al.*, 2005, Sures *et al.*, 2007, Sures *et al.*, 2002, Zimmermann *et al.*, 2002, Zimmermann *et al.*, 2005). La moule zébrée est considérée comme une espèce sentinelle (Goldberg, 1986), d'où l'intérêt de l'étudier. Elle peut ingérer les métaux sous forme particulaire autant que sous forme dissoute. Il a été démontré que le palladium, la platine et le rhodium sont pris en charge par le bivalve. Des trois, le palladium est celui qui est internalisé de manière plus importante (Sures *et al.*, 2002). L'ajout d'acide humique dans le milieu d'exposition augmente significativement cette prise en charge. En effet, les taux d'internalisation de Pt, de Pd et de Rh sont 6, 8 et 5 fois plus élevés en présence d'acide humique qu'en son absence, respectivement (Zimmermann *et al.*, 2005). Une étude subséquente de Sures *et al.* (2007) a cependant nuancé cette conclusion. La nature de la matière humique influencerait différemment les ÉGP. Toujours selon Sures *et al.* (2007), le palladium se lierait avec de courtes molécules de matière organique qui passeraient au travers du système de filtration de la moule, ce qui réduirait la prise en charge par l'organisme. Dans le cas du platine, il se lierait avec des molécules plus grosses qui seraient plus facilement captées par le bivalve, ce qui aurait pour effet d'augmenter l'internalisation du Pt en leur présence (Sures *et al.*, 2007). Cette interprétation semble peu plausible, en regard du comportement très similaire du platine et du palladium. Singer *et al.* (2005) ont étudié la réponse physiologique de la prise en charge d'ÉGP par *Dreissena polymorpha* en mesurant la production de la protéine de choc thermique hsp70 (*heat shock protein*). Cette molécule impliquée dans la détoxification des métaux est rapidement exprimée par la moule zébrée lorsqu'elle est exposée au Pt, Pd et Rh sous forme dissoute et la réponse est plus importante que lorsqu'elle est exposée à la même concentration de cadmium ou de plomb (Singer *et al.*, 2005). D'après Frank *et al.* (2008), le palladium induit aussi la production de

métallothionéines, des protéines impliquées dans la régulation des métaux essentiels dans la cellule et dans les processus de détoxification de certains métaux non essentiels.

En 2007, Haus *et al.* (2007) se sont penchés sur le cas des macro-invertébrés vivant dans les sédiments de quelques plans d'eau situés près de routes en Allemagne. L'analyse des sédiments et des organismes a permis de mesurer le niveau de contamination par le platine. En regard de sa concentration, le platine était internalisé de manière importante par les organismes, en particulier deux crustacés, *Gammarus pulex* et *Asellus aquaticus*. Ce dernier avait déjà fait l'objet d'une étude par Moldovan *et al.* (2001), qui ont suggéré que les ÉGP contenus dans la poussière de route pouvaient être internalisés par ce crustacé.

Le platine peut causer des effets physiologiques sur les embryons, comme l'ont démontré Osterauer *et al.* (2009) avec le poisson zèbre (*Danio rerio*) et l'escargot d'eau douce (*Marisa cornuarietis*). La présence de Pt induit une diminution de la fréquence cardiaque et du taux d'éclosion chez ces deux espèces. De plus, il a été constaté pour l'escargot un retard dans la formation des yeux des embryons et un poids plus faible lorsqu'ils étaient exposés au métal. Les dommages à l'ADN pour les embryons de *Danio rerio* et de *Marisa cornuarietis* ont été évalués par Comet assay dans une étude subséquente (Osterauer *et al.*, 2011). L'ADN embryonnaire du poisson zèbre ne présentait pas de dommage après l'exposition au platine, contrairement à l'escargot d'eau douce où des dommages significatifs ont été révélés.

Après avoir observé que l'anguille pouvait internaliser le palladium contenu dans la poussière de route (Sures *et al.*, 2001), il a été déterminé que celui-ci était accumulé principalement dans le foie. Une autre étude, celle-ci portant sur le platine, montre que ce dernier peut se retrouver également dans les reins, la bile et l'intestin de l'anguille européenne (Zimmermann *et al.*, 2004). Cette internalisation est fortement réduite en présence d'acide humique dans le milieu, ce qui suggère que la présence de matière organique pourrait avoir un effet protecteur pour *Anguilla anguilla*. Un parasite de cette même anguille, *Paratenuisentis ambiguus*, pourrait agir à titre de bioindicateur de la contamination par les ÉGP en raison de sa forte propension à accumuler le platine, même si celui-ci est en très faible concentration (Sures *et al.*, 2003).

La seule étude sur la faune marine porte sur le bigorneau (*Littorina littorea*), un gastropode (Mulholland *et al.*, 2011). En plus de considérer la prise en charge d'ÉGP en solution, elle considère la diète comme une voie d'entrée dans l'organisme. Lorsque le

bigorneau consomme des algues contaminées au palladium, le métal est internalisé. Sans qu'il n'y ait bioamplification, on observe un transfert trophique de palladium.

1.3.4 Chez les plantes

Une importante fraction des émissions d'ÉGP se déposent sur le sol aux abords des routes. Cela a mené Schafer *et al.* (1998a) à s'intéresser à la prise en charge de Pt, Pd et Rh par différentes plantes (épinard, cresson, phacélie, grande ortie). Ils ont prélevé du sol contaminé par les rejets de pots catalytiques près d'une route pour faire croître en serre les plantes choisies. L'internalisation d'ÉGP par les plantes s'est révélée significative pour les quatre. Elle était plus importante pour le Pd que pour les deux autres métaux, ce qui fait dire aux auteurs qu'il est le plus biodisponible des trois, en tenant compte de leurs concentrations respectives. Hooda *et al.* (2007) se sont penchés sur la question de l'influence de la distance de la route sur la prise en charge des ÉGP par l'herbe bordant les routes. Ils ont observé que l'internalisation diminue à mesure que l'on s'éloigne de la route. Ils ont aussi noté que la quantité d'ÉGP sur le bord de la route suit la même tendance. C'est donc dire que plus les concentrations de Pd et de Pt dans le sol sont importantes, plus l'herbe va en internaliser. Leurs travaux n'ont cependant pas pu faire le lien entre la concentration d'ÉGP dans les échantillons végétaux et la densité du trafic routier. De leur côté, Battke *et al.* (2008) ont réussi à démontrer que la prise en charge des ÉGP par l'orge est influencée par la taille des particules. Ils avancent comme explication que la vitesse de dissolution est plus rapide pour les petites particules que pour les plus grosses, et ce en raison d'un rapport volume surface plus avantageux. Le platine et le palladium n'étant pas des éléments essentiels pour les plantes, ils doivent entrer en compétition avec les nutriments du sol pour être internalisés.

Diehl et Gagnon (2007) se sont intéressés à l'effet que peut avoir la présence d'ÉGP sur la prise en charge de minéraux essentiels pour la plante aquatique *Elodea canadensis* et la plante terrestre *Peltandra virginica*. Bien que ces deux plantes internalisent le Pt, le Pd et le Rh, cela ne semble pas perturber la prise en charge de nutriments. L'ajout de cations divalent (Ca^{2+} (30 mg L⁻¹) et Zn^{2+} (6 mg L⁻¹ (concentration très élevée par rapport à celles que l'on mesure en milieu naturel))) ou d'acide humique (5 mg L⁻¹ Aldrich) n'a pas eu d'effet.

En 2010 sont publiés les travaux de recherche de Bali *et al.* (2010) sur l'accumulation et la translocation du platine par la luzerne (*Medicago sativa*) et la moutarde brune (*Brassica juncea*). Ces deux plantes sont des métallophytes facultatives, ce qui veut dire qu'elles poussent préférentiellement sur des sols riches en minéraux, mais n'y sont pas confinées. En plus de confirmer une fois de plus que la concentration de l'élément dans le sol et le temps d'exposition sont des facteurs critiques de l'internalisation, les auteurs ont montré que le pH affectait également celle-ci. Un sol acide favorise la prise en charge du platine, qui est ensuite accumulé principalement dans les racines.

1.3.5 Chez les microorganismes

Rauch *et al.* (2004) ont exposé le périphyton prélevé d'un ruisseau en Suède à diverses concentrations de platine afin d'évaluer l'internalisation de ce métal ainsi que son effet sur l'activité photosynthétique. Les résultats obtenus en utilisant un milieu synthétique de référence ont été comparés à ceux obtenus avec de l'eau issue du ruisseau. Le platine a été internalisé par le périphyton et plus la concentration de métal était élevée en solution, plus la prise en charge était importante. L'utilisation de l'eau du ruisseau diminuait le taux de prise en charge par rapport à l'eau de référence. Ils ont attribué cet écart à la présence de plus grandes concentrations en carbone organique et de chlorure. Rauch *et al.* n'ont pu observer une réponse toxique, bien qu'une diminution non significative de la moyenne de l'activité photosynthétique ait été mesurée en présence de platine dans le milieu synthétique.

Les travaux de Roy (2009) ont quant à eux porté sur l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. En observant le taux de croissance maximale sur une gamme de concentrations, elle en est venue à la conclusion qu'une concentration de Pd en solution de $8,2 \mu\text{g L}^{-1}$ diminuait celui-ci de moitié. Toutefois, en comparant la densité cellulaire d'algues exposées au métal et celle du groupe témoin, elle obtenait une concentration efficace moyenne CE_{50} plus faible ($5,7 \mu\text{g L}^{-1}$ pour 96 h d'exposition) qu'en utilisant la croissance maximale comme paramètre de toxicité. La CE_{50} est la concentration qui provoque un effet de 50 % par rapport au paramètre de mesure de la toxicité. La présence du métal induit un délai dans la croissance dans le bas de la gamme de concentration étudiée ($10\text{-}13 \mu\text{g L}^{-1}$) et inhibe complètement la division cellulaire à plus de $30 \mu\text{g L}^{-1}$. Le même exercice a été réalisé avec le platine. Une concentration efficace moyenne (CE_{50}) de $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pt (soit 23 nM) a été déterminée pour *C. reinhardtii*

après 48 h d'exposition. Puisque la concentration en solution n'a pas été mesurée pour ce métal, on doit la comparer avec la concentration nominale de Pd. Il apparaît que le platine est plus toxique pour l'algue verte que le palladium (CE_{50} de $16,4 \mu\text{g L}^{-1}$, soit 154 nM aux mêmes conditions).

Une autre algue verte, *Pseudokirchneriella subcapitata*, a aussi fait l'objet d'une étude sur les effets physiologiques et moléculaires du palladium (Vannini *et al.*, 2011). Les cellules étaient exposées à un sel de Pd (K_2PdCl_4). Trois concentrations nominales ont été testées (30, 75 et $150 \mu\text{g L}^{-1}$), mais le métal n'a pas été dosé en solution. L'internalisation du Pd par *P. subcapitata* était influencée par la concentration de palladium dans le milieu d'exposition. Plus il y en avait, plus la prise en charge était significative. La présence de palladium affectait la croissance algale. Une diminution du taux de croissance était observée à 30 et $75 \mu\text{g Pd L}^{-1}$ alors qu'il y avait une inhibition totale de la division cellulaire à $150 \mu\text{g Pd L}^{-1}$. D'après leurs analyses, le palladium se loge dans la membrane des chloroplastes de la cellule. Ils ont aussi observé que des dommages avaient été causés à l'ADN génomique des algues exposées au Pd.

1.4 Objectifs de recherche

Comme il en a été question précédemment, les concentrations du platine et du palladium sont en constante augmentation dans l'environnement. Cet enrichissement du milieu naturel pose des questions quant au risque que peuvent représenter ces métaux. Peu de données sont disponibles sur la toxicité de ceux-ci pour les organismes vivants et leur comportement en milieu naturel. Ces données sont nécessaires afin de mieux cerner les conséquences que le platine et le palladium pourraient engendrer.

Ce mémoire s'inscrit dans un projet plus vaste appuyé financièrement par Environnement Canada qui s'intéresse à la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité de métaux pour lesquels peu de données sont disponibles (*data-poor metals*). Il complète également les travaux initiés par Gabrielle Roy (2009) lors de sa maîtrise. Les concentrations environnementales du Pt, du Pd et du Rh ont alors été mesurées dans des cours d'eau de la ville de Québec, tout comme la toxicité de ces trois métaux pour une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*. La réponse biologique de cet organisme a été évaluée dans un seul milieu aux paramètres physico-chimiques définis. Cependant, les conditions environnementales sont très variables et il est nécessaire de déterminer

comment certains paramètres influencent la prise en charge et la toxicité des ÉGP. En dehors de quelques observations sur l'effet de la matière organique sur la biodisponibilité de ces métaux (Colombo *et al.*, 2008b, Sures *et al.*, 2007), il n'y a pas d'études qui ont abordé la problématique de l'impact de la physicochimie du milieu sur leur toxicité.

Les métaux d'intérêt pour ce mémoire sont le platine et le palladium. Ce dernier est, selon la littérature, le plus mobile et le plus facilement assimilable des deux. Il est aussi le plus rejeté dans l'environnement. Le Pt est moins mobile que le Pd, mais présente une toxicité similaire. De plus, les sources d'émissions de ce métal sont plus nombreuses. Le rhodium, en raison de son utilisation moins importante et de sa toxicité moindre, a été laissé de côté.

En raison de la compétition des protons et des ions métalliques pour les sites membranaires des cellules, le pH est un paramètre essentiel à évaluer. Les ions Ca^{2+} peuvent aussi compétitionner avec les métaux pour ces mêmes sites, d'où l'intérêt de mesurer cet effet. Aussi, la tendance de l'ammonium à former des complexes avec le Pt et le Pd en solution peut influencer la biodisponibilité du palladium et justifie de se pencher plus sérieusement sur cet aspect physico-chimique.

La problématique de ce projet se décline comme suit :

- Déterminer l'effet de différents paramètres physico-chimiques, tels que le pH, la concentration de calcium et la concentration d'ammonium, sur l'internalisation et la toxicité du platine et du palladium chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.

L'hypothèse de ce mémoire est la suivante :

- Une augmentation du pH du milieu entraîne une augmentation de la prise en charge des ions métalliques par *C. reinhardtii* et incidemment de la toxicité en raison d'une plus faible compétition pour les sites membranaires. L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} a quant à elle avoir l'effet inverse, soit de réduire l'internalisation et la toxicité du Pd et du Pt pour l'algue verte. L'ammonium influence l'internalisation et la toxicité de ces métaux selon le niveau de complexation.

L'atteinte de cet objectif permettrait de mieux comprendre la problématique des ÉGP en milieu naturel et de mieux cerner les facteurs-clés de celle-ci. De plus, les données obtenues pourraient être utilisées pour les évaluations de risque menées par les instances gouvernementales.



CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Organisme d'étude

Le choix des algues vertes comme organisme d'étude s'est imposé de lui-même. Très répandues, on les retrouve dans divers types de milieux, tant aquatiques que terrestres. Ces producteurs primaires occupent le bas de la chaîne trophique et une perturbation de leur cycle de vie peut se répercuter sur toute la chaîne. Leurs hauts ratios surface/volume leur confèrent une sensibilité accrue à de faibles concentrations de contaminants. De plus, elles sont faciles à cultiver et à manipuler. Pour les dénombrer, un compteur de particules suffit. Les algues vertes peuvent être exposées dans des milieux simples, c'est-à-dire sans substrat organique, et ces milieux peuvent être facilement modifiés pour répondre aux impératifs du design expérimental.

2.1.1 *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii est une algue verte unicellulaire ellipsoïde dont la taille varie entre 3 et 15 μm . Elle est munie de deux flagelles qui lui permettent de se déplacer dans son milieu. On la retrouve tant dans le sol que dans le milieu aquatique. Étudiée depuis les années 1950, *C. reinhardtii* est utilisée comme organisme modèle en biologie. Son génome a depuis été séquencé en totalité. Son cycle de vie est largement connu, tout comme ses mécanismes de régulations internes. De nombreux tests de toxicité ont été effectués avec d'autres métaux sur cette algue verte. On connaît certains de leurs mécanismes d'actions, ainsi que les voies d'entrée qu'ils utilisent. Les effets sur la physiologie de la cellule sont très bien documentés. *Chlamydomonas reinhardtii*, déjà largement étudiée au sein de notre équipe de recherche, est aussi tolérante à une large gamme de pH, condition essentielle pour étudier les effets de la spéciation sur la toxicité (O'Kelly, 2004).

La souche de *C. reinhardtii* utilisée dans cette étude provient du *Canadian Phycological Culture Center* (CPCC), dont les laboratoires se trouvent à l'Université de Waterloo, Ontario, Canada. Celle qui a servi aux expérimentations est *Chlamydomonas reinhardtii* Dang (CPCC11).

Les algues étaient issues d'une culture liquide. Sur réception de cette dernière, les cellules ont été transférées dans un milieu frais MHSM-1 à température ambiante afin de les acclimater.

2.1.2 Entretien des cultures

Les cellules sont conservées dans un bon état physiologique par un transfert hebdomadaire d'un millilitre du milieu de culture dans un erlenmeyer de verre de 250 mL contenant 100 mL de milieu MHSM-1 récemment préparé. Cette manipulation est effectuée en milieu stérile sous une hotte à flux laminaire. L'erlenmeyer est ensuite incubé dans une chambre de croissance (Conviron CMP 4030) à $20,0 \pm 0,1$ °C et à une luminosité de $100 \pm 10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (éclairage fluorescent blanc froid), sur une plaque agitatrice tournant à 60 rotations par minute. La photopériode était de 24 h.

2.2 Milieux de culture

La section qui suit présente les différents milieux de culture utilisés pour l'exposition des algues et les solutions qui entrent dans leurs compositions. À l'annexe A est présenté le schéma expérimental global du projet.

2.2.1 Produits, réactifs et solutions intermédiaires

Les solutions intermédiaires sont préparées à partir de produits de qualité analytique (au minimum) et d'eau Milli-Q. Le contenu de chaque solution est détaillé dans le tableau 2.1. Elles sont filtrées sur une membrane en polycarbonate de $0,2 \mu\text{m}$ de Millipore, à l'exception de la solution de NaOH. Un filtre en polysulfone $0,45 \mu\text{m}$ est utilisé pour celle-ci. Les solutions, sauf la solution AAP, sont ensuite autoclavées à 121 °C pendant 15 minutes. Elles sont ensuite conservées à 4 °C dans des flacons fermés, à l'abri de la lumière.

2.2.2 Milieu MHSM-1

Le milieu de culture, *Modified High Salt Medium* (MHSM-1), était le même que celui utilisé par Gabrielle Roy pour ses travaux de maîtrise (2009) pour des tests de toxicité

utilisant *Chlamydomonas reinhardtii*. Il est une adaptation du milieu *High Salt Medium*, de Macfie *et al.* (1994), où la concentration de certains produits a été réduite afin de diminuer la possible précipitation de sels.

Un litre de milieu nécessitait 5 mL de la solution Ammonium 2, 250 µL de la solution Phosphate 2, 4 mL de KNO₃ et 100 mL de solution tampon MOPS (Tableau 2.1). Le volume est complété avec de l'eau MilliQ. La solution est ensuite autoclavée à 121 °C pendant 15 minutes. Une fois le milieu refroidi, 1 mL de la solution d'AAP y est ajouté. Le pH de chaque solution est ensuite ajusté à 7,0 avec une solution de NaOH 1 M. Les solutions MHSM-1 sont maintenues dans des contenants fermés à 4 °C, à l'abri de la lumière. Elles ne sont pas conservées plus d'un mois. La concentration des différentes espèces est présentée au tableau 2.2.

2.2.3 Milieu de rinçage

Le milieu MHSM-2, utilisé pour rincer les algues après l'exposition au métal, était similaire au milieu de culture MHSM-1. Cependant, il ne contenait pas d'oligo-éléments (solution AAP) et on y ajoutait 2 mL de la solution d'EDTA 0,005 M. La concentration des espèces en solution peut être consultée au tableau 2.2.

2.2.4 Milieu d'exposition au Pd

Le milieu d'exposition des algues pour les expériences avec le palladium était semblable à MHSM-1. Pour chaque litre de milieu, 5 mL de la solution Ammonium 2, 250 µL de la solution Phosphate 2, 4 mL de KNO₃ et 100 mL de tampon étaient nécessaires. Ce dernier diffère en fonction du pH requis pour l'exposition, soit pH 6,0, 7,0 et 8,0. Dans le premier cas, le tampon MES (2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid, pK_a 6,1) a été ajouté au milieu, le MOPS (3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid, pK_a 7,2) a été utilisé pour le deuxième cas et pour le dernier, c'est le tampon HEPES (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, pK_a 7,5) qui a été ajouté. Une fois le milieu autoclavé à 121 °C durant 15 minutes et refroidi, 1 mL de la solution AAP y est ajouté. Le pH est ensuite ajusté adéquatement. Le palladium est ajouté directement à chaque milieu (n=3 pour chaque concentration d'exposition). Il provenait d'un étalon ICP-MS 10 000 ppm dans 1 % HCl de la compagnie Fisher. Au besoin, le pH était corrigé. Les concentrations visées de palladium pour *C. reinhardtii* étaient 0, 2, 5, 10, 15, 20 et 30 µg L⁻¹, soit

respectivement 0, 19, 47, 94, 141, 188 et 282 nM. Il s'agit de la plage de concentrations où un effet sur *C. reinhardtii* a été observé par Roy (2009).

2.2.5 Milieu d'exposition au Pt

Pour les expositions au platine, le même milieu que pour les expositions au palladium a été utilisé. Les pH d'exposition étaient de 6,0, 7,0 et 8,0. La source de platine était un étalon ICP-MS 10 000 ppm dans 1 % HCl de la compagnie Fisher. Après l'ajout du Pt dans chaque échantillon, le pH était réajusté avec la solution de NaOH. Les concentrations d'exposition au platine étaient de 0, 5, 10, 20, 30, 50 et 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, ce qui correspond à 0, 25, 51, 102, 153, 256 et 513 nM. Il s'agit de la plage de concentrations où un effet sur *C. reinhardtii* a été observé par Roy (2009).

2.2.6 Milieu à faible concentration d'ammonium (MHSM-NH₄)

Pour les expériences réalisées en milieu faible en ammonium, la méthode de préparation d'un litre de milieu MHSM-1 a été modifiée. Un volume de 5 mL de la solution Ca Mg remplaçait le même volume d'Ammonium 2, afin de ne pas diminuer la concentration de calcium et de magnésium en solution. Pour obtenir une concentration d'ammonium en solution de 94 μM , 1 mL de la solution NH_4NO_3 était ajouté. Un volume de 0,84 mL de KNO_3 supplémentaire assurait que la force ionique était gardée constante par rapport au milieu MHSM-1. Les volumes des solutions de phosphate et de tampon demeuraient inchangés. Les concentrations visées de palladium étaient de 0, 2, 5, 10, 15, 20 et 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, soit respectivement 0, 19, 47, 94, 141, 188 et 282 nM. Le platine n'a pas été testé avec ce milieu.

Tableau 2.1 : Composition des solutions intermédiaires utilisées pour les milieux de culture

| Usage | Solution intermédiaire | Produit | Concentration |
|---------------------------|-----------------------------------|---|--------------------------|
| MHSM-1 | Ammonium 2 | NH ₄ NO ₃ | 15,0 g L ⁻¹ |
| | | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 4,00 g L ⁻¹ |
| | | Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O | 3,21 g L ⁻¹ |
| | Phosphate 2 | KH ₂ PO ₄ | 29,6 g L ⁻¹ |
| | | K ₂ HPO ₄ | 57,6 g L ⁻¹ |
| | KNO ₃ | KNO ₃ | 101,11 g L ⁻¹ |
| | AAP | H ₃ BO ₃ | 186 mg L ⁻¹ |
| | | MnCl ₂ · 4H ₂ O | 415 mg L ⁻¹ |
| | | FeCl ₃ · 6H ₂ O | 160 mg L ⁻¹ |
| | | Na ₂ EDTA · 2H ₂ O | 300 mg L ⁻¹ |
| Zn (1 g L ⁻¹) | | 1,59 mg L ⁻¹ | |
| Co (1 g L ⁻¹) | | 0,64 mg L ⁻¹ | |
| Mo (1 g L ⁻¹) | | 2,88 mg L ⁻¹ | |
| Cu (1 g L ⁻¹) | 4,47 µg L ⁻¹ | | |
| Tampon | MOPS | MOPS | 20,93 g L ⁻¹ |
| | MES | MES | 19,52 g L ⁻¹ |
| | HEPES | HEPES | 23,83 g L ⁻¹ |
| Ajustement du pH | NaOH | NaOH | 40,00 g L ⁻¹ |
| Variation des ions | CaMg | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 4,00 g L ⁻¹ |
| | | Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O | 3,21 g L ⁻¹ |
| | Ca(NO ₃) ₂ | Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O | 208,70 g L ⁻¹ |
| | NH ₄ NO ₃ | NH ₄ NO ₃ | 7,50 g L ⁻¹ |
| | Nitrate 2 | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 4,00 g L ⁻¹ |
| | | Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O | 3,21 g L ⁻¹ |
| | | KNO ₃ | 18,95 g L ⁻¹ |

Tableau 2.2 : Concentrations des espèces dans chacun des milieux

| Espèces | MHSM-1 | MHSM-2 | MHSM-NH ₄ | MHSM-Ca |
|--------------------|--------------------------|-------------------------|---|---|
| | M | M | M | M |
| BO ₃ | 3,01 x 10 ⁻⁶ | - | 3,01 x 10 ⁻⁶ | 3,01 x 10 ⁻⁶ |
| Ca | 6,80 x 10 ⁻⁵ | 6,80 x 10 ⁻⁵ | 6,80 x 10 ⁻⁵ | 6,80 x 10 ⁻⁵ à 2,00 x 10 ⁻³ |
| Cl | 5,98 x 10 ⁻⁶ | 5,98 x 10 ⁻⁶ | 5,98 x 10 ⁻⁶ | 5,98 x 10 ⁻⁶ |
| Co | 1,09 x 10 ⁻⁸ | - | 1,09 x 10 ⁻⁸ | 1,09 x 10 ⁻⁸ |
| CO ₃ | atm ^a | atm ^a | atm ^a | atm ^a |
| Cu | 7,04 x 10 ⁻¹¹ | - | 7,04 x 10 ⁻¹¹ | 7,04 x 10 ⁻¹¹ |
| EDTA | 8,06 x 10 ⁻⁷ | 1,00 x 10 ⁻⁵ | 8,06 x 10 ⁻⁷ | 8,06 x 10 ⁻⁷ |
| Fe | 5,92 x 10 ⁻⁷ | - | 5,92 x 10 ⁻⁷ | 5,92 x 10 ⁻⁷ |
| K | 4,22 x 10 ⁻³ | 4,22 x 10 ⁻³ | 4,22 x 10 ⁻³ à 5,16 x 10 ⁻³ | 4,22 x 10 ⁻³ |
| Mg | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ |
| Mn | 2,10 x 10 ⁻⁶ | - | 2,10 x 10 ⁻⁶ | 2,10 x 10 ⁻⁶ |
| MoO ₄ | 3,00 x 10 ⁻⁸ | - | 3,00 x 10 ⁻⁸ | 3,00 x 10 ⁻⁸ |
| Na | 1,02x 10 ⁻⁴ | 1,02x 10 ⁻⁴ | 1,02x 10 ⁻⁴ | 1,02x 10 ⁻⁴ |
| NH ₄ | 9,37 x 10 ⁻⁴ | 9,37 x 10 ⁻⁴ | 9,37 x 10 ⁻⁵ | 9,37 x 10 ⁻⁴ |
| NO ₃ | 5,07 x 10 ⁻³ | 5,07 x 10 ⁻³ | 5,07 x 10 ⁻³ | 5,07 x 10 ⁻³ à 7,00 x 10 ⁻³ |
| PO ₄ | 1,37 x 10 ⁻⁴ | 1,37 x 10 ⁻⁴ | 1,37 x 10 ⁻⁴ | 1,37 x 10 ⁻⁴ |
| SO ₄ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ | 8,12 x 10 ⁻⁵ |
| Zn | 2,43 x 10 ⁻⁸ | - | 2,43 x 10 ⁻⁸ | 2,43 x 10 ⁻⁸ |
| MOPS ^b | 1,00 x 10 ⁻² | - | 1,00 x 10 ⁻² | 1,00 x 10 ⁻² |
| MES ^b | 1,00 x 10 ⁻² | - | - | - |
| HEPES ^b | 1,00 x 10 ⁻² | - | 1,00 x 10 ⁻² | - |

^aLa concentration des carbonates est à l'équilibre avec l'atmosphère

^bSelon le pH désiré

2.2.7 Milieu à teneur variable en calcium (MHSM-Ca)

Le milieu pour tester l'effet de la concentration de calcium sur la toxicité du palladium était lui aussi dérivé de MHSM-1. Pour conserver la force ionique de 6 mM constante entre les traitements, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ remplaçait KNO_3 dans la solution de croissance. Les concentrations testées étaient 0,068, 0,5, 1,0 et 2,0 mM de Ca^{2+} . Cela correspondait à un ajout de 0, 49, 105 et 219 μL de la solution $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Pour normaliser les échantillons, on a dû ajouter respectivement 400, 314, 214 et 14 μL de la solution de KNO_3 à chacun d'eux. La concentration de palladium pour cette exposition était de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Le platine n'a pas été testé avec ce milieu.

2.3 Tests de toxicité

2.3.1 Matériel de laboratoire

Les erlenmeyers utilisés pour les expositions aux métaux sont fabriqués en polycarbonate. Ce matériau a été préféré au verre borosilicaté en raison de la plus faible adsorption du Pd et du Pt à sa surface (Cobelo-Garcia *et al.*, 2007, Roy, 2009).

Tout le matériel est laissé dans un bain d'acide nitrique 15 % pendant un minimum de 24 h puis rincé cinq fois à l'eau déminéralisée et ensuite rincé deux fois à l'eau ultrapure Milli-Q. Les contenants et les ustensiles de laboratoire résistants aux hautes températures sont envoyés à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min et sont ensuite mis à sécher sous une hotte à flux laminaire.

2.3.2 Pré-Inoculation

Toutes les expositions sont effectuées en triplicate, à raison d'un témoin de croissance algale, d'un témoin du métal en solution ainsi que de six concentrations d'exposition, pour un total de 24 échantillons. Une journée avant l'exposition, un volume de 100 mL de milieu d'exposition est disposé dans chaque erlenmeyer. Le volume adéquat de solution contenant le métal est ensuite ajouté au milieu afin que ce dernier puisse s'équilibrer. Le pH est alors réajusté par ajout de NaOH 1 M.

2.3.3 Exposition des algues

Avant l'inoculation, un échantillon de chaque milieu est prélevé et acidifié avec de l'acide chlorhydrique de qualité *trace metal*. Il est ensuite réfrigéré à 4 °C en attendant l'analyse par ICP-MS. Le pH de chacun des milieux d'exposition est ensuite mesuré.

Afin de s'assurer que les algues soient en phase de croissance exponentielle, elles sont transférées de milieux deux fois, à intervalles de 48 h, avant d'être inoculées dans les milieux d'exposition. Le jour de l'inoculation, les algues du milieu de culture sont filtrées sur un filtre Millipore en polycarbonate de 2,0 µm puis lavées deux fois par 10 mL de MHSM-1 récemment préparé. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 10 mL du milieu d'exposition. Un sous-échantillon est prélevé pour mesurer la densité cellulaire en utilisant un compteur à particule. Chaque échantillon est alors inoculé afin d'obtenir une densité initiale de 10 000 cellules par mL. Cette concentration est un compromis entre l'impact d'une importante population de cellules sur la spéciation du milieu (Franklin *et al.*, 2002) et la limite de détection du compteur de particules qui se situe aux environs de 10 000 cellules par mL (Roy, 2009). Les milieux de croissance inoculés sont incubés dans une chambre de croissance, dans les mêmes conditions que pour l'entretien de la culture.

Toutes les 24, 48, 72 et 96 h, le pH de chaque milieu est mesuré afin de s'assurer de sa stabilité. Une aliquote de 1 mL est prélevée de chaque erlenmeyer puis centrifugée pendant 15 min à 15 000 rpm. Un volume de 900 µL de surnageant est récupéré sans perturber le culot et acidifié pour atteindre 1 % HCl. Les sous-échantillons sont alors entreposés à 4°C, en attente d'être analysés. Un autre millilitre de chaque culture est ajouté à 9 mL d'une solution isotonique et la densité cellulaire est mesurée en utilisant un compteur de particules et ce, à tous les 24, 48, 72 et 96 h de l'expérience. La moyenne des échantillons témoins sans algues en solution est considérée en tant que blanc.

2.3.4 Décompte cellulaire

L'utilisation d'un compteur de particules est nécessaire pour évaluer la croissance algale. Le principe de cet appareil est le suivant : une solution d'électrolytes circule dans un tube entre deux électrodes. Le passage de particules dans ce tube perturbe

l'impédance et cette variation peut être convertie en taille et nombre (Beckman Coulter, 2013). On obtient ainsi le nombre de particules, sans égard à leur nature. Le compte cellulaire est effectué par un compteur de particules *Coulter Counter Multisizer III*, manufacturé par Beckman-Coulter. Il est équipé d'une tige avec une ouverture de 70 μm . Les comptes sont réalisés pendant 24,41 secondes et l'échantillon est dilué 1:10 avec la solution Isoton II. Un rinçage a lieu entre chaque mesure. Pour calculer la concentration de cellules dans l'échantillon à partir du compte cellulaires, l'équation suivante est utilisée :

$$\text{densité cellulaire (cellules mL}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{compte} - \text{blanc}) * 10}{0,5217 \text{ mL}}$$

Le blanc est la moyenne des comptes des échantillons ne contenant pas d'algues et 0,5217 mL est le volume prélevé par l'appareil selon les paramètres d'analyse. La limite de détection de l'appareil est d'environ 10 000 cellules/mL (Roy, 2009).

2.4 Internalisation des métaux par l'algue

2.4.1 Récupération des algues

Pour récupérer les algues, deux méthodes ont été envisagées. La première consiste à centrifuger le milieu à 15 000 rpm, à retirer le surnageant puis à resuspendre le culot avec une solution enrichie en EDTA (MHSM-2) afin d'enlever les ions métalliques adsorbés à la surface des algues. La resuspension est centrifugée de nouveau et le surnageant est prélevé sans perturber le culot. Ce dernier est ensuite digéré. Cette méthode requiert une quantité appréciable de cellules à la fin de l'exposition, ce qui n'est pas toujours le cas selon les traitements. De plus, les nombreuses manipulations et le volume mort qui reste entre les cellules sont des sources d'incertitudes sur les mesures.

La méthode de récupération privilégiée a été la filtration des milieux de culture. Les filtres en nitrocellulose et les filtres en polycarbonate ont été considérés. Ces derniers ont été retenus car la désorption des métaux se fait plus aisément pour ceux-ci que leur contrepartie digérable à l'acide. Les filtres de marque Millipore et de porosité de 2,0 μm ont été utilisés avec des tulipes Nalgene® en polycarbonate. Un volume de 40 mL de chaque milieu de culture est filtré à chaque fois. Ce volume permet une collecte d'algue maximale sans obstruer le filtre, soit au plus 20 000 000 cellules. Le filtre (sur lequel les

algues sont récoltées) est ensuite rincé deux fois avec 5 mL de MHSM-2 (solution enrichie en EDTA) afin d'enlever le métal adsorbé à la surface des algues. Le filtrat de rinçage est récupéré, acidifié à 1 % avec HCl puis réfrigéré pour fin d'analyse ICP-MS.

2.4.2 Digestion

Les filtres contenant les algues sont ensuite mis à sécher dans un tube de 13 mL à 70°C pendant un minimum de 48 h. Une fois retiré du four, 1 mL de HCl concentré est ajouté à chaque échantillon puis ils sont mis à digérer sous la hotte pendant 48 h. Après ce délai, le digestat est récupéré dans un tube Corning de 50 mL puis le volume est complété à 50 mL avec de l'eau MilliQ. Le digestat est ainsi totalement compris dans un volume de 50 mL contenant 2 % d'acide chlorhydrique. Les échantillons sont conservés à 4 °C à l'abri de la lumière.

2.5 Analyse des ÉGP

2.5.1 Différentes méthodes analytiques

La technique doit être choisie en fonction du type d'échantillon à analyser. La spectrométrie d'absorption atomique à flamme (FAAS), en raison de sa faible sensibilité, est indiquée pour des échantillons de catalyseur, d'alliages ou de minerai (Godlewska-Zylkiewicz, 2004). Pour des concentrations un peu plus faibles de métaux, par exemple pour des échantillons de source géologique ou pour faire le suivi de médicaments contenant du platine dans les fluides biologiques, la spectrométrie d'absorption atomique à fournaise au graphite (GFAAS) et la spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES) sont couramment utilisées.

La voltampérométrie par adsorption (*adsorptive voltammetry*, AV) utilise une électrode à goutte pendante de mercure (HMDE) pour mesurer les ÉGP. Un complexe se forme à la surface de l'électrode et la réponse voltamétrique est proportionnelle à la concentration de ce complexe. Cette méthode, bien que sensible, est fortement perturbée par la présence de molécules organiques et requiert d'incinérer les échantillons avant analyse. Les autres ÉGP peuvent aussi interférer sur les mesures, ce qui en fait principalement une méthode monoélémentaire (Balcerzak, 2011, Locatelli, 2007, Obata *et al.*, 2006).

L'analyse par activation neutronique est une technique très sensible, pouvant mesurer des concentrations inférieures au picogramme par gramme. Elle consiste en l'irradiation de l'échantillon par des neutrons ou des particules chargées (ions d'hydrogène, de deutérium ou d'hélium) puis en la mesure de la radioactivité ou des radiations produites par l'analyte. Une phase de séparation ou de pré-concentration est souvent requise pour éviter les interférences. Le plus gros désavantage réside cependant dans le coût très élevé de cette méthode d'analyse.

Les fluides biologiques peuvent être aussi analysés par spectrométrie d'absorption atomique à atomisation électrothermique (ET-AAS), comme dans le cas d'analyse du platine en chimiothérapie. Cependant, cette méthode n'est pas intéressante pour les échantillons environnementaux en raison d'importants effets de matrice. De plus, une pré-concentration suivie d'une séparation des composantes est presque toujours nécessaire.

2.5.2 L'ICP-MS : Fonctionnement et interférences

La méthode privilégiée dans le cadre de ce mémoire est le spectromètre de masse à source à plasma inductif (ICP-MS). Il s'agit de la technique la plus utilisée pour la détermination de très faibles quantités de platine dans les matrices environnementales (Balcerzak, 1997). Elle peut mesurer des concentrations de l'ordre du ppt pour les ÉGP. Comme pour les autres méthodes, le principal défi analytique est de réduire au maximum les interférences causées par la matrice. Pour le palladium (^{105}Pd) et le platine (^{195}Pt), les principales espèces qui interfèrent avec leur signal sont respectivement l'oxyde d'yttrium ($^{89}\text{Y}^{16}\text{O}$) et l'oxyde d'hafnium ($^{179}\text{Hf}^{16}\text{O}$). Elles n'ont cependant pas causé de problème lors de l'analyse des échantillons en raison des soins apportés pour éviter toute contamination par d'autres métaux. Il en aurait été autrement si des échantillons naturels avaient été prélevés, mais le caractère synthétique des milieux de culture limite au minimum les interférences possibles.

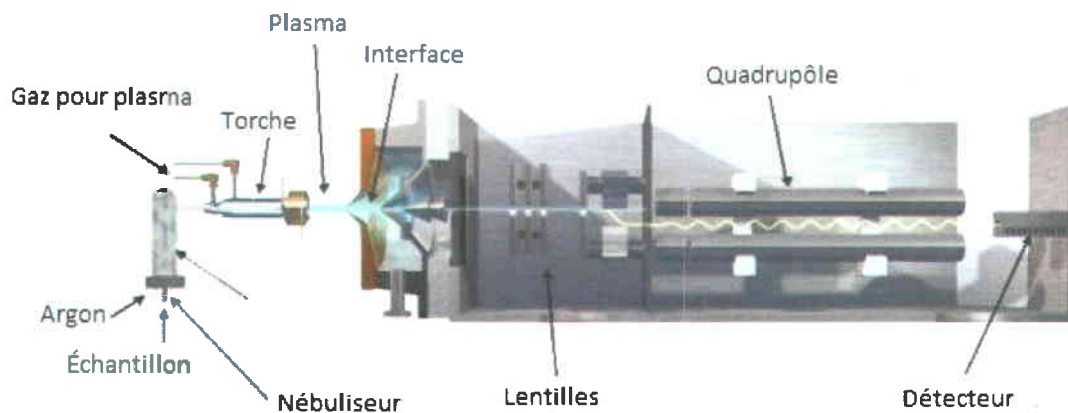


Figure 2.1 : Schéma d'un ICP-MS. Modifié de Jens Molecular and Nanoscale Analysis Laboratory, Université Washington à St-Louis.

L'ICP-MS se divise en deux composantes, la torche à plasma et le spectromètre de masse (voir Figure 2.1). Une pompe péristaltique amène l'échantillon au nébuliseur qui le vaporise sous forme d'aérosols. Entraîné par un flux d'argon, l'analyte atteint le plasma, subit une désolvatation puis est ionisé. L'échantillon continue son chemin au travers de cônes qui l'aiguillent dans le quadripôle. Ce dernier, selon le voltage spécifié, ne permettra qu'aux atomes dans une certaine gamme de rapport masse sur charge (m/z) de se rendre au détecteur. Les ions atteignent ensuite le détecteur de type multiplicateur d'électrons.

2.5.3 Paramètres de l'ICP-MS

L'appareil utilisé dans cette étude pour quantifier le métal en solution est un ICP-MS modèle X Series 2, fabriqué par Thermo Scientific. Il est équipé d'un quadripôle, le détecteur est de type multiplicateur d'électrons et les cônes sont en platine. La calibration de l'ICP-MS est effectuée avec une solution multi-élémentaire de référence (Li, Be, Co, In, Ba, Ce et U). L'uranium était utilisé comme indicateur de la stabilité du signal et le taux de comptage ne devait pas dévier de plus de 5 % au cours de l'étalonnage. La formation d'oxyde, mesurable par le ratio CeO/Ce , était maintenu en dessous de 0,02, tandis que le ratio Ba^{2+}/Ba , indicateur de la formation d'espèces doublement ionisées, ne dépassait pas 0,05. Cela était possible par l'ajustement de

différentes pièces de l'appareil : la position du nébuliseur, la profondeur d'échantillonnage (*sampling depth*), ainsi que l'alignement des lentilles.

Les concentrations utilisées pour la préparation de la courbe d'étalonnage du palladium étaient comprises entre 0,1 et 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ tandis que celles du platine étaient comprises entre 0,1 et 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Elles ont été validées à partir d'un étalon certifié PlasmaCal pour ICP-MS 9,93 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pd et 10,03 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pt dans HCl 5 %. La limite de détection était déterminée en multipliant par trois l'écart-type sur dix mesures de la plus faible concentration de la courbe d'étalonnage et variait entre 0,009 et 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Chaque échantillon était lu quatre fois par l'appareil suivi d'un lavage de 45 s avec de l'eau régale 2,5 %. L'étalon interne de l'appareil était le ^{103}Rh . Une solution étalon de l'analyte était passée à tous les dix échantillons afin de mesurer les variations temporelles du détecteur.

2.6 Spéciation

Les constantes thermodynamiques de complexation du palladium sont tirées de la banque de données NIST version 8 et IUPAC version 5. On retrouve dans le tableau 2.3 les valeurs utilisées pour le calcul de la spéciation du palladium dans le milieu de culture. Les constantes sélectionnées sont les plus représentatives du milieu quant aux espèces présentes et à la force ionique utilisée. Peu de données sont disponibles, ce qui laisse un certain doute quant à la justesse de celles-ci (par exemple le complexe $\text{Pt}(\text{OH})_2^0$ dans le tableau 2.3)

Le même exercice n'a pu être tenu pour le platine car les constantes thermodynamiques de complexation sont incomplètes, peu fiables ou inexistantes. En regardant les données disponibles, on s'aperçoit cependant que les constantes du platine se rapprochent de celles du palladium et qu'elles suivent la même tendance. On pourrait donc s'attendre à ce que la spéciation du Pt soit similaire à celle du palladium. Le programme utilisé pour déterminer la spéciation du palladium est Visual MINTEQ version 3.0, mis au point par le KTH *Royal Institute of Technology*, en Suède.

Tableau 2.3: Constantes de formation de complexes de Pd et de Pt

| Complexe de Pd | Constante de formation (log β) | Complexe de Pt | Constante de formation (log β) |
|---|---------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| PdOH ⁺ | -1,6 | PtOH | 2,9 |
| Pd(OH) ₂ ⁰ | -1,5 | Pt(OH) ₂ ⁰ | -3,0* |
| PdCl ⁺ | 6,1 | PtCl ⁺ | 5,5 |
| PdCl ₂ ⁰ | 10,7 | PtCl ₂ ⁰ | 9,8 |
| PdCl ₃ ⁻ | 13,1 | PtCl ₃ ⁻ | 12,6 |
| PdCl ₄ ²⁻ | 15,7 | PtCl ₄ ²⁻ | 14,3 |
| PdEDTA ²⁻ | 27,32 | | |
| Pd(NH ₃) ²⁺ | 0,36 | | |
| Pd(NH ₃) ₂ ²⁺ | 0,01 | | |
| Pd(NH ₃) ₃ ²⁺ | -1,73 | | |
| Pd(NH ₃) ₄ ²⁺ | -4,18 | | |
| PdSO ₄ ⁰ | 2,2 | | |

*déterminée à une force ionique de 1,0M

$$\beta = \frac{[ML_n^{z+}]}{[M^{z+}] * [L]^n} = K_1 * K_2 \dots K_n$$

2.7 Traitement des données

2.7.1 Analyse statistique

Le logiciel de traitement statistique utilisé pour comparer les différents traitements est SigmaStat, version 3.5, produit par Systat Software. La méthode d'analyse de variance à deux voies (ANOVA) a été privilégiée pour la comparaison des échantillons d'un même pH. Pour cette méthode, six degrés de liberté sont utilisés (puisque les échantillons témoins de métaux ne sont pas inclus) sauf pour le cas du calcium, où il n'y

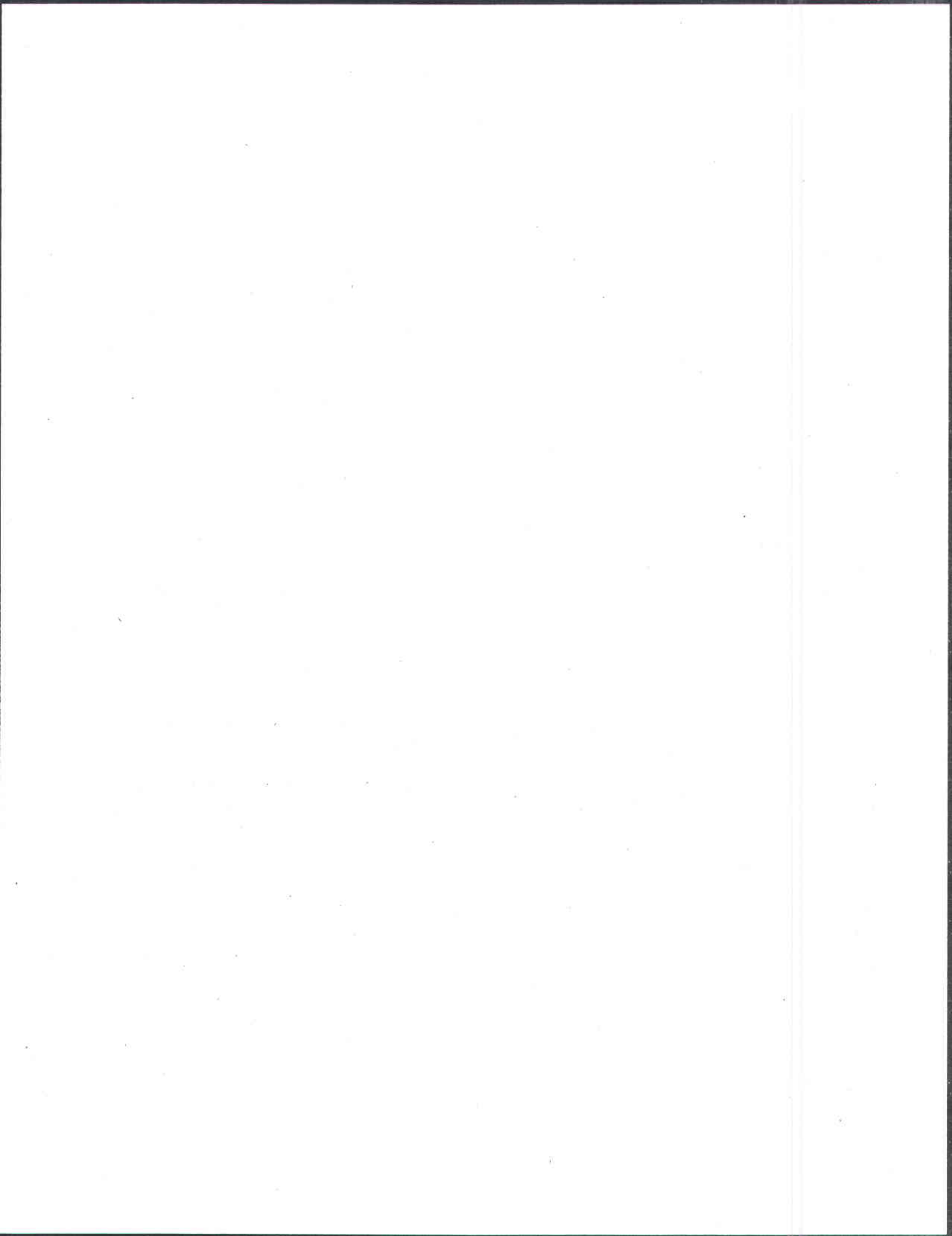
en a que cinq en raison d'un plus faible nombre de conditions. La méthode Holm-Sidak a été appliquée afin de déterminer quels traitements étaient significativement différents ($p < 0,05$). Lorsque la distribution ne pouvait être qualifiée de normale ou que la variance différait entre les groupes, une analyse de type non paramétrique à une voie dite Kruskal-Wallis suivie de comparaisons selon la méthode de Dunn ou de Tukey était alors employée. Le niveau de signification choisi était toujours $p < 0,05$.

2.7.2 Calculs des CE_{50}

Le programme SigmaPlot version 11.0 de Systat Software a été utilisé pour déterminer les concentrations efficaces moyennes (CE_{50}) de chaque métal pour chacun des traitements. L'équation de la courbe standard à quatre paramètres (régression non linéaire) a été privilégiée :

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

où cH est le coefficient de Hill. L'incertitude sur la mesure de la concentration de métal est l'erreur-type obtenue sur la courbe dose-réponse.



CHAPITRE 3: TOXICITÉ ET PRISE EN CHARGE DU PALLADIUM CHEZ L'ALGUE VERTE *C. REINHARDTII* : RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Spéciation du Pd

3.1.1 Spéciation du Pd dans MHSM-1

La figure 3.1 présente la spéciation du palladium ($15 \mu\text{g L}^{-1}$; $1,4 \times 10^{-7} \text{ M}$) dans le milieu de culture MHSM-1 en fonction du pH, obtenue avec le logiciel VisualMINTEQ. À pH 6,0, le complexe formé par le palladium et l'EDTA est majoritaire en solution, à $1,4 \times 10^{-7} \text{ M}$. Viennent ensuite les complexes où le ligand est l'ammoniac. Le complexe $\text{Pd}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ est présent à hauteur de $4,7 \times 10^{-10} \text{ M}$ et $\text{Pd}(\text{NH}_3)_3^{2+}$, à $1,5 \times 10^{-10} \text{ M}$. La concentration de $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ est de $9,8 \times 10^{-12} \text{ M}$. L'ion libre Pd^{2+} est environ dix ordres de grandeur moins concentré que PdEDTA^{2+} , à $1,3 \times 10^{-17} \text{ M}$. Les autres espèces en solution sont toutes en concentration inférieure à cinq ordres de grandeur par rapport au complexe majoritaire. La distribution relative des espèces est la même pour les autres concentrations de palladium utilisées.

La présence d'EDTA dans le milieu est utile pour tamponner le Pd^{2+} en solution. En effet, au fur et à mesure que les ions sont internalisés par les algues, la concentration de Pd^{2+} diminue. Pour rétablir l'équilibre, certaines molécules de PdEDTA^{2+} , largement supérieure en concentration que les ions libres Pd^{2+} , se dissocient et la concentration de Pd^{2+} se trouve inchangée. Il y a donc toujours des ions de palladium en solution, à une concentration connue.

Dans un milieu de culture MHSM-1 à pH neutre, on observe un changement de la spéciation par rapport au pH 6,0. La principale espèce du palladium est désormais le $\text{Pd}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ (85,6 % du Pd total). À $1,2 \times 10^{-7} \text{ M}$, il est presque dix fois plus concentré que le complexe formé avec l'EDTA, qui pointe à $1,6 \times 10^{-8} \text{ M}$ (11,3 %). La présence du palladium lié avec trois molécules d'ammoniac est plus importante qu'au pH précédent, avec $4,0 \times 10^{-9} \text{ M}$, soit 2,8 %. Il en est de même pour l'espèce $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2^{2+}$, avec une concentration de $2,6 \times 10^{-11} \text{ M}$. La concentration de l'ion Pd^{2+} est de $3,5 \times 10^{-19} \text{ M}$, soit 37 fois plus faible que dans le milieu plus acide. Les autres complexes ne représentent qu'une maigre part du palladium présent dans le milieu.

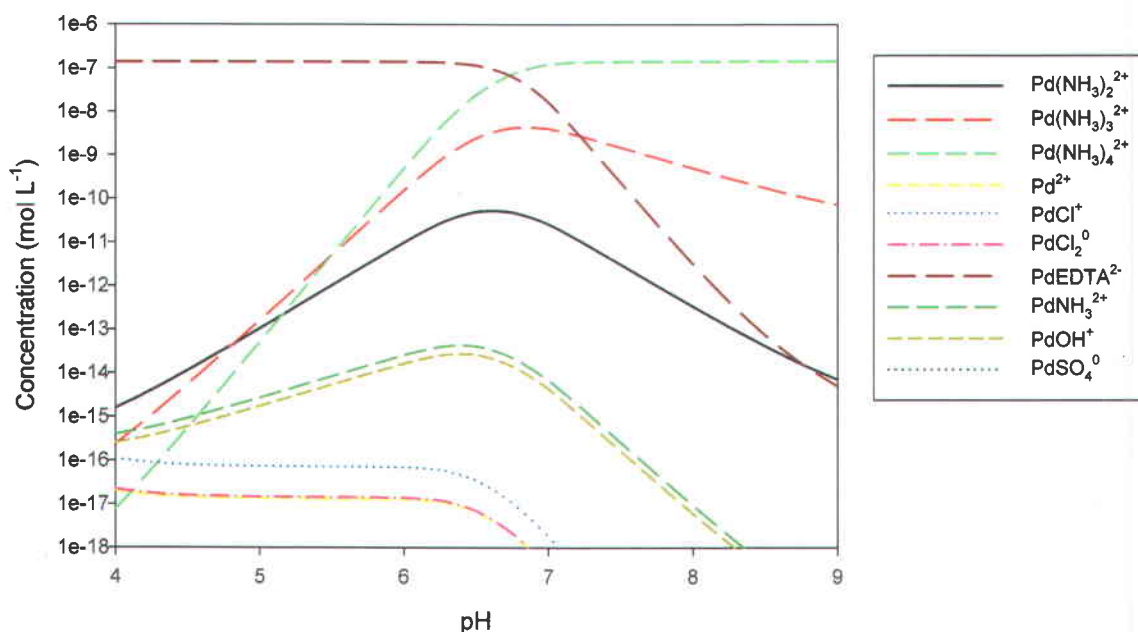


Figure 3.1 : Spéciation du Pd (141 nM) dans le milieu MHSM-1 à différents pH.

Le troisième pH d'exposition est de 8,0, où dominant largement les complexes ammoniacaux. Le complexe majoritaire est $\text{Pd}(\text{NH}_3)_4^{2+}$, suivi de $\text{Pd}(\text{NH}_3)_3^{2+}$ puis de $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2^{2+}$. Ils ont respectivement une concentration de $1,4 \times 10^{-7}$, $4,9 \times 10^{-10}$ et $3,4 \times 10^{-13}$ M. Cela représente >99 % du palladium total en solution. L'espèce PdEDTA^{2-} est tout de même présente, à hauteur de $3,2 \times 10^{-12}$ M ou 0,002 %. La concentration de l'ion libre du palladium a grandement diminuée, à $5,1 \times 10^{-23}$ M. Les autres complexes ne sont présents qu'en faible proportion.

Les constantes utilisées pour modéliser la spéciation proviennent soit de la base de données du NIST (2004), soit de celle de l'IUPAC (Powell, 2001). Les valeurs pour les ligands inorganiques, tels que les hydroxydes et les chlorures sont bien établies et soutenues par plusieurs publications. Cependant, il n'en est pas de même pour les constantes des complexes ammoniacaux. Nous avons choisi les valeurs publiées par les deux banques de données de référence, car ce sont elles qui ont été déterminées dans des conditions correspondant le mieux à nos milieux expérimentaux. D'autres constantes sont disponibles, par exemple celles publiées par Shoukry *et al.* (1988). Ces valeurs diffèrent de plusieurs ordres de grandeur par rapport à celles retenues. L'utilisation des données de Shoukry *et al.* (1988) changerait totalement la spéciation

obtenue. D'après Wood *et al.* (1992), l'ammoniac est un acteur important de la spéciation du palladium et, sous certaines conditions, est le ligand majoritaire pour le palladium. Les données de Shoukry furent mises de côté au profit de celles du NIST (2004) et de l'IUPAC (Powell, 2001) qui indiquaient des constantes thermodynamiques très similaires. Wood *et al.* (1992) soulèvent aussi qu'il pourrait y avoir formation de complexes mixtes impliquant l'ammoniac et le chlorure, qui se lieraient chacun au palladium. Il faut comprendre que la connaissance de l'activité du palladium en solution est encore très limitée et que la spéciation obtenue peut aider à comprendre la chimie du milieu, mais elle ne doit pas être considérée comme absolue.

3.1.2 Impact de la diminution de $[\text{NH}_4^+]$ sur la spéciation du Pd

Un des objectifs de ce mémoire est d'évaluer l'influence de l'ammoniac sur le palladium en solution. Si l'on réduit la concentration d'ammonium de 90 % dans le milieu de culture, la spéciation change considérablement (figure 3.2). On observe dans le milieu MHSM-NH₄ que le passage du complexe PdEDTA²⁺ au complexe Pd(NH₃)₄²⁺ se produit à une unité de pH plus basique qu'avec le milieu MHSM-1, c'est-à-dire à pH 8,0 au lieu de pH 7,0. De même, la spéciation à pH 7,0 du milieu faible en ammonium est la même que la spéciation à pH 6,0 du milieu non modifié. Les concentrations de chaque complexe restent sensiblement similaires. Les mêmes constantes thermodynamiques ont été employées, ce qui implique que l'incertitude sur la spéciation du Pd demeure. Notre hypothèse est la suivante : si le changement de pH ne modifie pas la physiologie de l'algue *C. reinhardtii*, la réponse toxique sera dépendante de la spéciation du palladium. Ainsi, l'effet physiologique mesuré à pH 7,0 dans le milieu MHSM-1 et celui mesuré à pH 6,0 dans le milieu MHSM-NH₄ devraient être semblables car la spéciation dans les deux milieux est similaire. Il en serait de même à pH 8,0 dans MHSM-1 et pH 7,0 avec MHSM-NH₄.

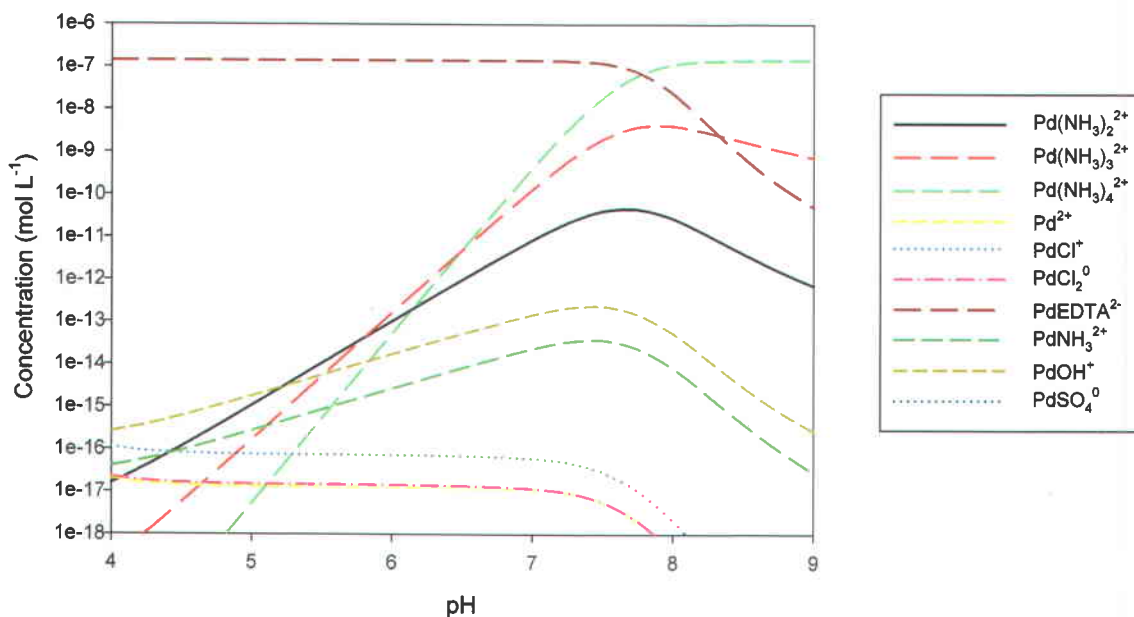


Figure 3.2 : Spéciation du Pd (141 nM) dans le milieu MHSM-NH₄ à différents pH.

3.2 Comportement du Pd dans le milieu de culture

3.2.1 Bilan de masse

Afin de mieux comprendre le devenir du palladium en solution, un bilan de masse a été réalisé sur plusieurs échantillons (tableau 3.1). Dans le cas du palladium, un écart non négligeable est observable entre la concentration nominale de ce métal et la concentration mesurée en solution. Typiquement, il y a une perte de Pd en solution de l'ordre de 30 à 50 %. Cette perte peut s'expliquer en partie par l'adsorption du palladium aux parois des erlenmeyers en polycarbonate. En effet, à la fin de l'expérimentation, deux lavages successifs des contenants d'exposition avec 1 mL d'acide chlorhydrique concentré ont permis de récupérer entre 10 et 21 % en masse du palladium total. Une partie du palladium est aussi adsorbée à la surface des algues. Par contre, elle ne représente qu'une très faible portion du Pd, soit à peine 2,5 % de la masse totale ajoutée au milieu. Les algues internalisent aussi le métal en solution, ce qui diminue sa concentration dans le milieu. Son impact est cependant fort limité, représentant moins de 1 % de la masse totale de Pd ajouté à la culture. En additionnant les masses du

palladium en solution, adsorbée et internalisée, on récupère entre 75 et 79 % du métal lorsque la concentration initiale de Pd est de $60 \mu\text{g L}^{-1}$. Les résultats diffèrent légèrement avec une concentration nominale de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ en solution pour évaluer la récupération. Elle est alors de l'ordre de 65 à 71 % du Pd total.

Tableau 3.1 : Bilan de masse du palladium pour 30 et $60 \mu\text{g L}^{-1}$ pour 100 mL de milieu

| Pd_{nom} | $\text{Pd à } 0 \text{ h}$ | $\text{Pd à } 96 \text{ h}$ | $\text{Pd}_{\text{Adsorbé}}$ (contenant) | $\text{Pd}_{\text{Adsorbé}}$ (algues) | $\text{Pd}_{\text{Intracellulaire}}$ | Pd_{total} | $\text{Pd}_{\text{total}}/\text{Pd}_{\text{nom}}$ |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|---|--|--------------------------------------|----------------------------|---|
| μg | μg | μg | μg | μg | μg | μg | % |
| 3 | $1,8 \pm 0,2$ | $1,6 \pm 0,1$ | $0,4 \pm 0,1$ | $0,075 \pm 0,003$ | $0,021 \pm 0,004$ | $2,1 \pm 0,2$ | 70 |
| 6 | $3,9 \pm 0,2$ | $3,17 \pm 0,06$ | $1,29 \pm 0,09$ | $0,15 \pm 0,02$ | $0,05 \pm 0,01$ | $4,7 \pm 0,2$ | 78 |

La perte de palladium s'explique entre autres par l'adsorption sur le matériel utilisé lors des transferts d'échantillons. Plusieurs manipulations doivent être effectuées afin de prélever le milieu de culture. Le conditionnement de tout le matériel nécessaire n'est pas possible en raison des risques de contamination biologique et des contraintes techniques. Il peut en résulter une perte du métal d'exposition. La précipitation d'espèces de Pd insolubles lors de la période d'exposition pourrait aussi se produire. Cependant, les calculs de spéciation n'ont pas suggéré la formation d'une phase solide contenant du palladium. Il est fort probable que ces complexes seraient resolubilisés lors de l'acidification des échantillons et de la digestion des filtres avec l'acide chlorhydrique, et donc inclus dans le bilan de masse.

Cobelo-Garcia *et al.* (2007) ont étudié le phénomène d'adsorption du Pd, Pt et Rh sur le matériel de laboratoire. Leurs conclusions étaient qu'il y avait moins de perte de métal en solution lors de l'utilisation du verre borosilicaté que du polyéthylène à faible densité. Ils n'ont cependant pas testé le polycarbonate, le matériau le plus couramment employé dans notre laboratoire pour les tests de toxicité. Roy (2009) a comparé ce dernier avec le pyrex pour vérifier sa capacité à maintenir les ions Pd^{2+} dans le milieu. Les résultats sont similaires pour les deux matériaux, ce qui justifie l'utilisation du polycarbonate pour limiter l'adsorption du palladium à la surface des contenants.

3.2.2 Variation temporelle des métaux

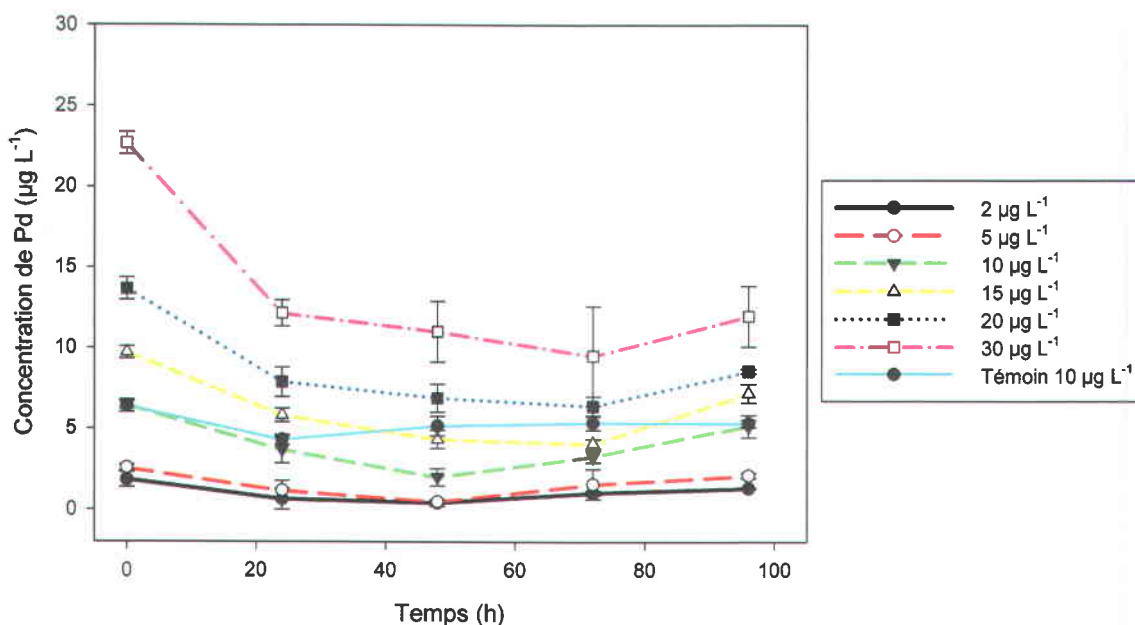


Figure 3.3 : Variation temporelle de la concentration de Pd sur 96 h. Seuls les échantillons témoins ne contiennent pas d'algues.

Les milieux sont préparés 24 h à l'avance afin de favoriser l'atteinte de l'équilibre. Cependant, après ce laps de temps, la concentration réelle en solution continue de diminuer (Figure 3.3). Cela est particulièrement marquant pour les concentrations les plus élevées. La teneur en Pd semble se stabiliser après les 24 premières heures après l'inoculation. On observe une légère augmentation de la concentration du métal à la fin de la période d'exposition. Cette augmentation peut s'expliquer par un changement dans la méthode de prélèvement de l'échantillon. En effet, de 0 h à 72 h, le volume prélevé des erlenmeyers est centrifugé dans un tube Eppendorf avant d'être transféré dans un flacon puis acidifié. À 96 h, le prélèvement est filtré puis conservé, acidifié, dans un flacon. Il y a donc un transfert de moins pour les derniers échantillons, ce qui soutient l'hypothèse qu'il y a des pertes de Pd lors des manipulations en laboratoire. Ce phénomène a aussi été observé par Cobelo-Garcia *et al.* (2007). La perte qu'ils ont observée s'est élevée jusqu'à 90 % de la concentration initiale. Ils attribuaient cette diminution de la concentration en Pd à la précipitation d'hydroxyde insoluble et à l'adsorption sur les parois du contenant. Une salinité élevée ainsi que la présence de matière organique pourraient réduire ces phénomènes en complexant le Pd, le

maintenant en solution. Sures *et al.* (2007) abondaient dans le même sens. Ils ont observé un déclin rapide de la concentration de Pd dans leurs milieux dans les 24 premières heures, après quoi elle se stabilisait. La présence de matière organique réduisait la perte de Pd, causée par la précipitation et l'adsorption du métal. Ce phénomène n'est pas exclusif au palladium, il a été constaté avec d'autres métaux, dont le cuivre (Simpson *et al.*, 2003). Il faut aussi remarquer que la présence ou l'absence d'algues n'affecte pas le devenir du palladium en solution. La diminution du Pd est du même ordre tant dans les milieux inoculés que dans les échantillons témoins pour les métaux. Dans un souci de clarté et de concision, les courbes de croissance des sections suivantes seront présentées avec les concentrations nominales de palladium. Cependant, les concentrations efficaces moyennes et les mesures d'internalisation ont été déterminées à l'aide des concentrations mesurées de chaque échantillon afin d'être le plus juste possible.

3.3 Influence du pH sur la toxicité du Pd

3.3.1 Toxicité du Pd chez *C. reinhardtii*

On trouve à la figure 3.4a la courbe de croissance de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* exposée à une gamme de concentrations de palladium, à un pH d'exposition de 6,0. Les concentrations nominales de Pd sont de 0, 2, 5, 10, 15, 20 et 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. Chaque point est la moyenne des trois échantillons soumis à la même concentration de métal. Après 24 h d'exposition, seule la plus faible concentration (2 $\mu\text{g L}^{-1}$) n'est pas significativement différente du témoin. Plus la concentration de métal est élevée, plus l'écart avec le milieu témoin est important. Le milieu le plus concentré en palladium affiche même une densité cellulaire plus faible qu'à l'inoculation (environ 7 000 cellules mL^{-1} versus 10 000 cellules mL^{-1}). Cette différence peut s'expliquer d'abord par la concentration très près de la limite de détection du compteur de particules. L'erreur est plus grande sur une faible densité cellulaire. Cependant, les trois échantillons étant tous inférieurs à la concentration initiale, il se pourrait que la présence de palladium en soit la cause. Si la croissance est lente ou inexistante, la mort ou l'éclatement d'algues plus rapide que la régénération de celles-ci diminuerait le décompte cellulaire. Après 48 h, le milieu contenant 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ est le seul qui est encore significativement différent du milieu témoin. Cet écart subsiste encore après 72 h mais s'efface après 96 h. À la fin de

l'exposition, le rendement de chaque traitement est similaire. La présence du palladium induit un délai dans la phase de croissance de *C. reinhardtii*. Cet effet est particulièrement visible pour les deux concentrations les plus élevées. Alors qu'un plateau semble atteint pour les plus faibles concentrations après 48 h, cela prend un peu plus de 72 h pour arriver à ce stade avec le traitement 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. En reportant les densités cellulaires des traitements sur celles des témoins, on obtient le taux de croissance relatif pour chacune des concentrations de palladium. Il s'agit des comptes cellulaires après 24 h d'exposition, où l'effet sur la croissance est le plus marqué. On schématise ensuite les taux de croissance par rapport à la concentration de palladium mesurée dans chaque échantillon (Figure 3.5a). Cela permet par régression non-linéaire de déterminer la concentration efficace moyenne (CE_{50}) qui inhibe de moitié la croissance de *C. reinhardtii*. À pH 6,0, la CE_{50} du palladium est de $10 \pm 1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Les résultats de l'exposition de *C. reinhardtii* au palladium à pH 7,0 sont présentés à la figure 3.4b. Il s'agit des mêmes concentrations nominales que celles utilisées à pH 6,0. La croissance algale à des concentrations de 2 et 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pd ne se distingue pas de celle des milieux témoins. À 10 et 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pd, on observe un délai significatif dans la croissance après 24 h. Celui-ci se résorbe par la suite. Le retard avant la phase exponentielle de croissance des échantillons exposés aux concentrations les plus élevées, 20 et 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, est plus marqué. La croissance ne s'amorce qu'après 24 h dans le premier cas et qu'après 48 h dans le second. Le retard n'est comblé qu'à la toute fin de l'exposition, où il n'y a alors plus de différence significative de densité cellulaire avec le groupe témoin. Comme lors de l'expérience à pH 6, la présence de métal n'a pas affecté le rendement total final. Il n'a fait qu'induire un délai dans la croissance, comme observé précédemment. Par contre, cet effet est plus prononcé qu'à pH plus faible.

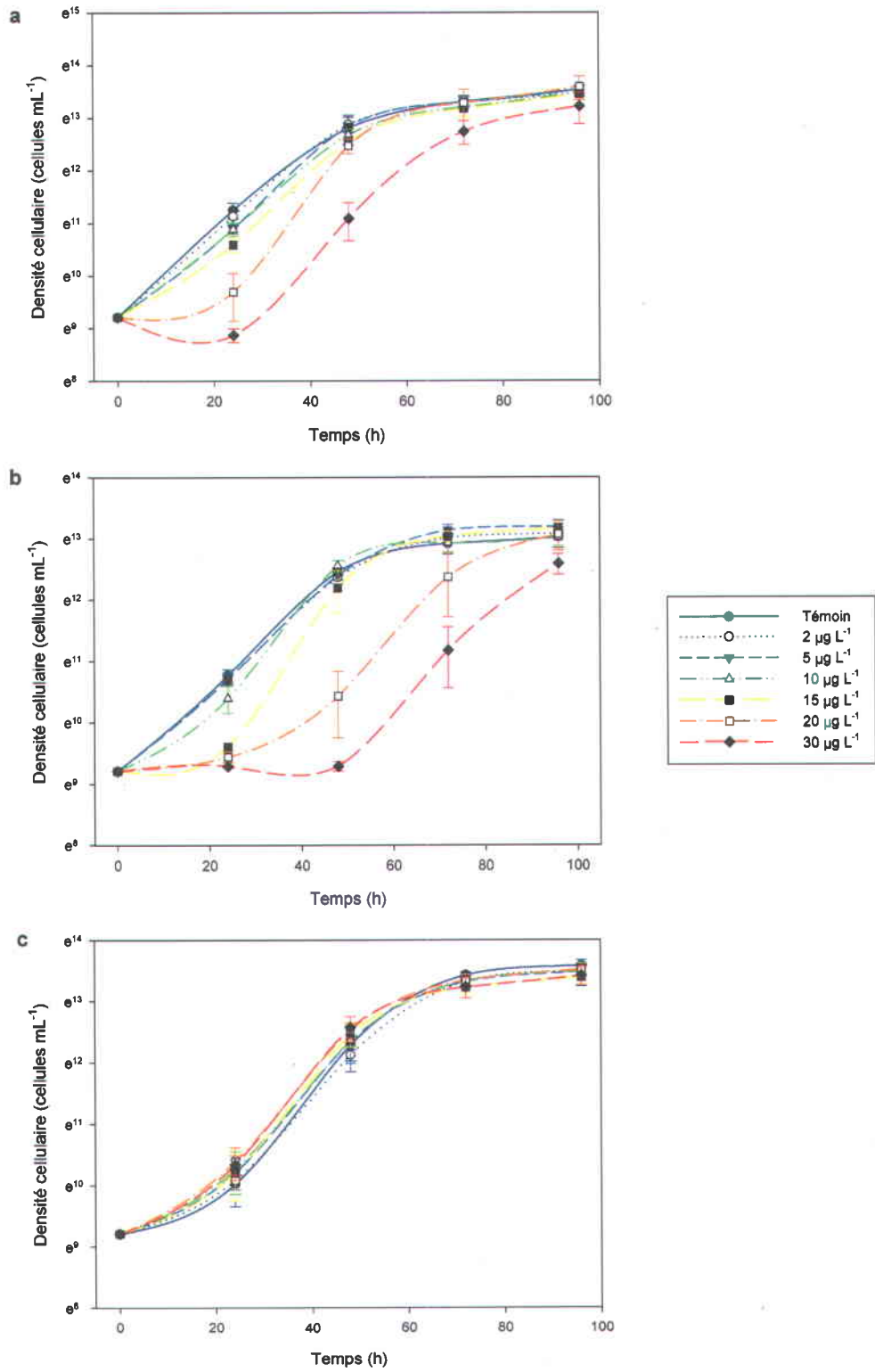


Figure 3.4 : Courbes de croissance de *C. reinhardtii* exposée à différentes concentrations de Pd à pH 6,0 (a), pH 7,0 (b) et pH 8,0 (c). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois mesures.

Cette observation est confirmée par le calcul de la concentration efficace moyenne. On retrouve à la figure 3.5b le taux de croissance relatif des algues selon la concentration mesurée pour chaque essai. Encore une fois, le taux de croissance a été calculé en utilisant la densité cellulaire à 24 h. La CE_{50} obtenue est alors de $7,0 \pm 0,3 \mu\text{g Pd L}^{-1}$. Roy (2009) a obtenu, avec la même algue verte, une CE_{50} variant entre $5,7 \pm 0,5 \mu\text{g Pd L}^{-1}$ pour 96 heures d'exposition et $10,1 \pm 0,4 \mu\text{g Pd L}^{-1}$ pour 24 heures, à des conditions expérimentales très similaires. On peut donc affirmer que les résultats obtenus sont cohérents avec les travaux précédents. La concentration de palladium en solution nécessaire pour inhiber 50 % de la croissance algale après 24 h est moins élevée à pH 7 qu'à pH 6. Le Pd est donc plus toxique à pH neutre.

La situation est bien différente à pH plus élevé. Avec les mêmes concentrations de palladium en solution mais cette fois-ci à pH 8, les algues n'ont pas été affectées par la présence du métal (Figure 3.4c). Il n'y a pas d'écart significatif de densité cellulaire entre les différents traitements de palladium et le groupe témoin à chacun des temps expérimentaux. Il est clair qu'à ces conditions d'exposition, le palladium n'a pas d'effet toxique sur *Chlamydomonas reinhardtii*. Contrairement aux expositions à pH 6 et 7, on observe une légère inflexion de la courbe de croissance, indiquant que la phase exponentielle n'a pas démarré immédiatement après inoculation. Cela peut être causé par la différence de pH. La croissance de *C. reinhardtii* est peut-être moins rapide à un pH plus basique. Cela dit, la densité cellulaire finale n'a pas été affectée.

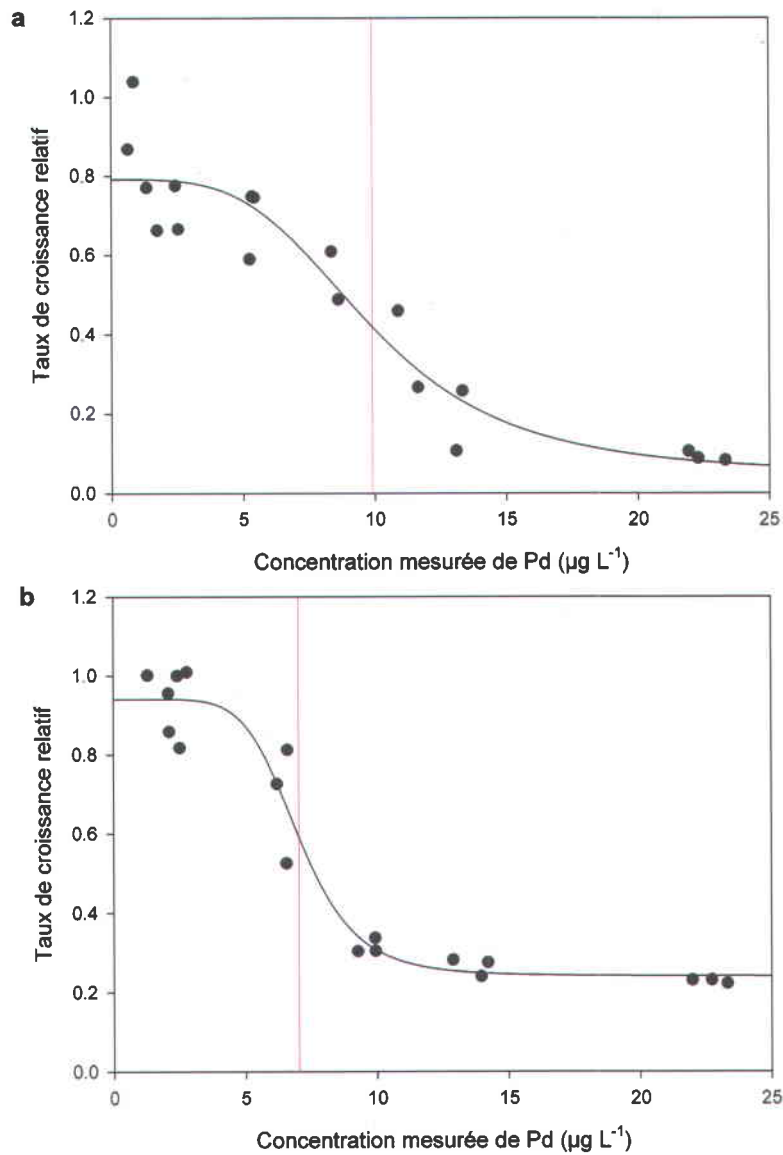


Figure 3.5 : Taux de croissance relatif observé après 24 h d'exposition d'après la concentration de Pd mesurée dans le milieu de culture à pH 6,0 (a) et pH 7,0 (b).

3.3.2 Interprétation de l'effet du pH

La présence d'un délai avant le début de la phase exponentielle est un indice qu'une acclimatation de l'hôte à son milieu ou encore qu'une modification du milieu est nécessaire pour permettre une division cellulaire efficace. Dans le cas qui nous intéresse, à pH 6 et 7, il n'y a pas de délai pour le groupe témoin mais il y en a un pour

les échantillons qui contiennent des concentrations élevées en palladium. La croissance commence plus tardivement mais rejoint tout de même les densités cellulaires des échantillons témoins. Un phénomène de détoxification a possiblement cours, et il serait plus long à mettre en branle avec des concentrations de métal élevées (Harris *et al.*, 2009). Ce phénomène est aussi rapporté par Bartlett *et al.* en 1974, cités par Franklin *et al.* (2000) pour l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*. De leur côté, Steemann et Kampniel (1970) ont soumis *Chlorella sp.* à différentes concentrations de cuivre afin d'observer son effet sur celle-ci. Certaines concentrations de Cu ont eu pour effet d'induire un délai dans la croissance algale. Ils affirment que le cuivre avait été lié par l'algue de façon à ce que les effets toxiques ne soient plus observables, mais sans déterminer quels processus étaient impliqués. Dans leurs travaux publiés en 2000, Franklin *et al.* ont évoqué les processus de détoxification des algues, comme par exemple la production de substances organiques qui réduisent la biodisponibilité du métal en solution, pour expliquer les effets de la présence de Cu sur la réponse biologique de *Chlorella sp.* Le délai dans la croissance cellulaire pourrait s'expliquer par le temps pris par les cellules pour mettre en branle ces processus de détoxification pour faire face au palladium en solution. Un de ces processus pourrait être une plus grande production de phytochélatines, molécules qui, par leurs groupements thiols, peuvent complexer fortement certains ions métalliques à l'intérieur de l'algue (Zenk, 1996). Cela a été observé chez *C. reinhardtii* en réaction à la présence d'ions métalliques non essentiels dans le milieu de culture, notamment le Cd (Brautigam *et al.*, 2011, Lavoie *et al.*, 2009). Il pourrait également s'agir d'une réduction de la prise en charge des ions en solution afin de limiter la présence de Pd²⁺ à l'intérieur des cellules. L'algue pourrait aussi agir sur son environnement en relarguant des exsudats dans le milieu de culture dans le but de complexer les ions Pd²⁺ et ainsi les rendre moins disponibles. Une fois que ces phénomènes se seraient avérés efficaces, l'algue serait en mesure de croître normalement. Il est plausible de croire que plus la concentration en Pd est élevée, plus le processus demande du temps et de l'énergie à la cellule afin d'accomplir la détoxification et ainsi retarde l'atteinte de la phase exponentielle.

Plusieurs travaux ont déjà été menés sur l'influence du pH sur la toxicité des métaux. Macfie *et al.* (1994) ont étudié le cadmium, le cobalt, le cuivre et le nickel à pH 5,0 et 6,8 pour constater que ces éléments sont plus toxiques pour *C. reinhardtii* à pH plus élevé. Parent *et al.* (1994) sont arrivés à la même conclusion lors d'une expérimentation avec *C. pyrenoidosa* et l'aluminium. L'exposition de *C. pyrenoidosa* à ce métal nuisait

davantage à sa croissance à pH 6 qu'à pH 4,8. Franklin *et al.* (2000) et Wilde *et al.* (2006) ont aussi démontré qu'une acidité plus importante du milieu diminue la toxicité de métaux. Ils ont travaillé avec l'uranium et le zinc, respectivement. Les résultats des tests de toxicité pour le palladium concordent avec la littérature, du moins pour les échantillons exposés à pH 6,0 et 7,0. L'effet biologique sur *C. reinhardtii* est moins marqué lorsque l'acidité du milieu augmente. Lorsqu'exposée aux concentrations de Pd les plus élevées, la croissance reprend plus rapidement à pH 6 qu'à pH 7. En comparant les CE₅₀ obtenues à chacun des pH, on tire les mêmes conclusions. Ce phénomène s'expliquerait par une compétition pour les sites d'internalisation sur la membrane plasmique (Macfie *et al.*, 1994). Pour qu'il y ait toxicité, les ions Pd²⁺ doivent se lier à un site de transport sur la membrane avant d'être internalisé par la cellule. Une plus grande concentration de protons diminue la probabilité de la liaison des Pd²⁺ sur la membrane. De ce fait, la quantité de Pd internalisée est plus faible et la toxicité est amoindrie. Cependant, la diminution du pH change aussi la spéciation du palladium. La concentration de palladium sous forme d'ion libre augmente de plus d'un ordre de grandeur en passant de pH 7 à 6. Cela ne semble toutefois pas suffisant pour contrer l'effet protecteur des protons. Il est aussi possible que le changement de pH ait une influence sur la membrane plasmique elle-même. Le nombre de sites de prise en charge pourrait diminuer ou l'internalisation pourrait être ralentie. Le potentiel de la membrane change avec le pH, ce qui pourrait modifier la toxicité de certains métaux (François *et al.*, 2007).

Le changement de la spéciation du palladium pourrait expliquer l'absence de toxicité du palladium à pH 8,0. Il y a une transition qui s'effectue entre les pH 6,0 et 8,0. Si le complexe majoritaire était PdEDTA²⁻ à pH acide, c'est Pd(NH₃)₄²⁺ qui domine la spéciation à pH basique. Une hypothèse serait que la complexation par l'ammoniac des ions Pd²⁺ réduise la biodisponibilité du palladium et, par conséquent, sa toxicité. Les expériences subséquentes fourniront des pistes de réponse à cette question.

3.4 Influence du pH sur l'internalisation du Pd par *C. reinhardtii*

3.4.1 Prise en charge du Pd

L'internalisation du palladium par *C. reinhardtii*, dans le milieu MHSM-1 à pH 6, est représentée à la figure 3.6a. La quantité de métal est donnée en mol cellule⁻¹. Les

algues n'ayant été digérées qu'à la toute fin de l'exposition, cette valeur représente la quantité de palladium internalisée à l'état stationnaire par les algues de chaque traitement. La masse totale de Pd récupérée est divisée par le nombre de cellules contenues dans l'échantillon digéré afin d'obtenir une valeur moyenne pour chaque traitement.

La concentration de palladium dans le milieu d'exposition est celle qui a été mesurée au moment de l'inoculation. Les concentrations mesurées en solution sont comprises entre 0,6 et 23,3 $\mu\text{g L}^{-1}$. La prise en charge, soit la quantité moyenne de palladium à l'intérieur des cellules, est comprise entre $8,4 \times 10^{-20}$ et $1,3 \times 10^{-17}$ mol cellule⁻¹. On observe que la quantité de palladium mesurée à l'intérieur des cellules peut être corrélée avec la concentration du métal en solution. Le coefficient de corrélation est de 0,77. Les concentrations de palladium des cellules digérées se situent proche de la limite de détection de l'appareil, ce qui contribue à l'incertitude des valeurs les plus faibles. Comme attendu, une concentration plus importante de Pd entraîne une augmentation de sa prise en charge par l'algue.

À la figure 3.6b est illustrée la prise en charge du palladium par *C. reinhardtii* dans un milieu MHSM-1 à pH neutre. De la même façon qu'au pH précédent (pH 6,0), la concentration moyenne de palladium à l'intérieur des cellules après 96 h est reportée en fonction de la concentration initiale mesurée de Pd dans le milieu de culture. Les concentrations mesurées dans les erlenmeyers vont de 1,3 à 23,3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Les quotas cellulaires sont un peu plus élevés que précédemment, de $2,9 \times 10^{-19}$ à $1,1 \times 10^{-16}$ mol cellule⁻¹. Une corrélation linéaire est observable entre la concentration dans les échantillons et le quota cellulaire. Le coefficient de corrélation est de 0,87. On peut dire qu'une relation existe entre la concentration de Pd présente dans le milieu et la quantité que l'algue internalise tout au long de l'exposition.

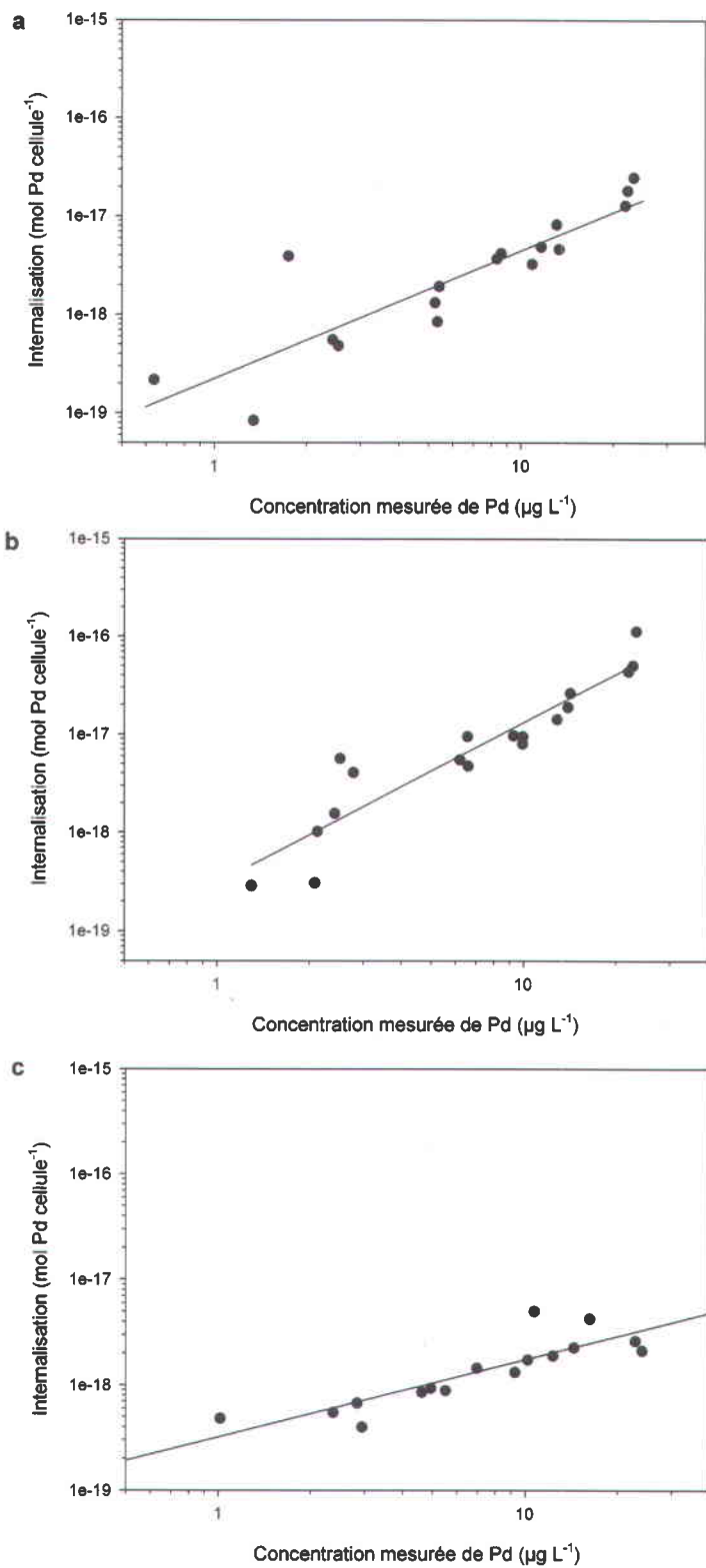


Figure 3.6 : Internalisation du Pd par *C. reinhardtii* pendant 96 h selon la concentration mesurée au moment de l'inoculation des algues dans le milieu de culture à pH 6,0 (a), pH 7,0 (b) et pH 8,0 (c).

L'internalisation du Pd à pH 8,0 est le sujet de la figure 3.6c. Les concentrations mesurées de palladium dans les milieux de culture se situent entre 0,8 et 24,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, et ne sont pas très différentes de celles qui ont été déterminées pour les autres pH. Cependant, la prise en charge du Pd par les cellules est plus faible : elle va de $1,5 \times 10^{-19}$ à $5,0 \times 10^{-18}$ mol cellule $^{-1}$. Tout comme pour les deux autres conditions d'exposition, il y a une corrélation positive entre la concentration de métal en solution et la quantité internalisée. Le coefficient de corrélation est de 0,74. Les quantités de Pd mesurées dans les cellules digérées sont très faibles, particulièrement pour les basses concentrations en palladium du milieu de culture. Certaines ont dues être écartées car elles étaient sous la limite de quantification de l'appareil.

3.4.2 Interprétation de l'effet du pH sur l'internalisation du Pd

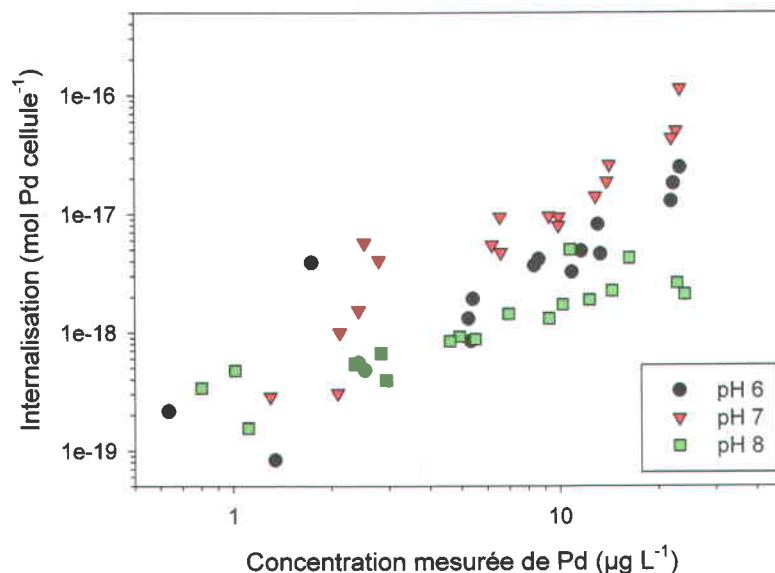


Figure 3.7 : Comparaison de la prise en charge de Pd par *C. reinhardtii* après 96 h selon le pH et la concentration dans le milieu.

La figure 3.7 compare les quotas cellulaires selon les pH d'exposition. Deux tendances peuvent être tirées de ce graphique. La première est que la prise en charge est plus importante à pH 7,0, elle diminue un peu à pH 6,0 et est encore plus faible à pH 8,0. Ce phénomène est particulièrement frappant aux concentrations les plus élevées. On observe la même tendance que lors des tests de toxicité, où les effets biologiques observés suivaient l'ordre pH 7 > 6 > 8 pendant l'exposition. Plus l'effet physiologique

sur les algues est marqué, plus la prise en charge par l'algue est importante. Cela implique que le pH influence soit la vitesse à laquelle le Pd est pris en charge par *C. reinhardtii*, soit la vitesse à laquelle celui-ci est excrété, ou encore la vitesse de croissance de l'algue. En effet, pour un temps d'exposition identique, la quantité de Pd internalisé est plus élevée à pH neutre qu'à pH 6,0 et pH 8,0. La deuxième tendance que l'on observe est que cette différence de prise en charge est accentuée par l'augmentation de la concentration métal en solution. Cela s'observe en regardant les pentes des diverses corrélations. À pH 6,0, la pente est de 1,30 alors qu'elle augmente à 1,64 à pH 7. Elle descend à 0,74 à pH 8,0.

3.5 Impact de la variation de $[NH_4^+]$ sur la toxicité du Pd pour *C. reinhardtii*

3.5.1 Croissance de *C. reinhardtii* dans un milieu faible en ammonium en présence de palladium

D'après la spéciation obtenue à la section 3.1.2, l'ammonium joue un rôle important dans la complexation du Pd. En réduisant la concentration de NH_4^+ dans le milieu, une réponse biologique différente de *C. reinhardtii* est attendue. Le milieu utilisé pour cette expérience contient dix fois moins d'ammonium que le milieu MHSM-1 sans que cela ne compromette la croissance algale (voir Annexe B). Les concentrations nominales de palladium sont les mêmes que lors des tests de toxicité avec le milieu MHSM-1, s'échelonnant de 2 à 30 $\mu g L^{-1}$. La figure 3.8a présente les différentes courbes de croissance de *C. reinhardtii* à pH 7,0. Bien qu'un écart par rapport au témoin semble apparent pour le milieu le plus concentré en palladium, la réalité statistique est différente. L'utilisation du test de Kruskal Wallis selon la méthode de Dunn ou de Tukey démontre que l'écart n'est pas significatif. Par contre, en utilisant la méthode de Student-Newman-Keuls, qui est plus permissive, la différence est considérée significative. Ainsi, il est plus prudent de dire qu'à faible concentration d'ammonium dans le milieu, le palladium n'a pas d'effet aux concentrations testées. On n'observe pas non plus d'effet sur la production algale : le rendement total est le même pour tous les traitements.

Le rendement total est un peu plus faible que pour *C. reinhardtii* dans le milieu MHSM-1. La diminution de la concentration d'ammonium est probablement la cause de cette différence, mais ce n'est pas assez pour compromettre la croissance algale. De fait,

l'effet de la diminution de la concentration d'ammonium sur la croissance avait préalablement été testé.

Les résultats obtenus avec le milieu MHSM-NH₄ dénotent un écart important avec ceux acquis précédemment. Dans le milieu MHSM-1 à pH 7,0, on notait un délai dans la croissance dès 10 µg Pd L⁻¹, alors qu'il n'y en a aucun lorsqu'il y a moins d'ammonium dans le milieu. Puisqu'il s'agit du seul paramètre modifié dans le protocole expérimental, la concentration d'ammonium joue forcément un rôle dans la biodisponibilité du palladium. En modifiant la concentration de NH₄⁺ dans le milieu, la spéciation subit un changement. Selon la modélisation avec le programme Visual MINTEQ, la spéciation du milieu faible en ammonium à pH 7,0 devrait être similaire à celle du milieu MHSM-1 à pH 6,0. Un retard dans l'atteinte de la phase de croissance exponentielle avait été observé lors de l'exposition dans ce dernier milieu. Notre hypothèse de départ était que la réponse biologique de *C. reinhardtii* serait semblable dans les expériences où la spéciation calculée des milieux de culture était similaire. Or, ce n'est pas le cas. Comme cela a déjà été évoqué, il se pourrait que la spéciation obtenue ne soit pas représentative de la situation réelle. Cependant, il serait aussi possible que notre interprétation de la toxicité ne soit pas juste en regard de la spéciation. Le stress occasionné par la raréfaction de l'ammonium en solution pourrait avoir modifié l'équilibre interne de la cellule, ce qui pourrait influencer la réponse biologique à la présence de Pd.

À pH 8,0, il n'y a pas de différence significative entre les densités cellulaires en présence de différentes concentrations de palladium et celles des échantillons témoins (figure 3.8b). La présence de palladium n'a pas eu d'effet sur la croissance des algues. Au même pH mais à concentration normale d'ammonium, la présence de palladium n'avait pas non plus influencé le développement algal. Cela semble indiquer que la diminution de NH₄⁺ ne modifie pas la réponse algale à la présence de palladium à pH 8,0 dans la gamme de concentrations étudiée. On s'attendait cependant à un résultat différent en raison de la spéciation calculée. D'après la composition du milieu, la spéciation du palladium devait se rapprocher de celle qui prévalait lorsque l'effet toxique le plus prononcé a été constaté, soit MHSM-1 à pH 7,0. Selon notre hypothèse, un effet toxique serait survenu à pH 8,0 si la concentration d'ammonium diminuait. L'influence de l'ammonium semble plus subtile que ce que l'on présageait.

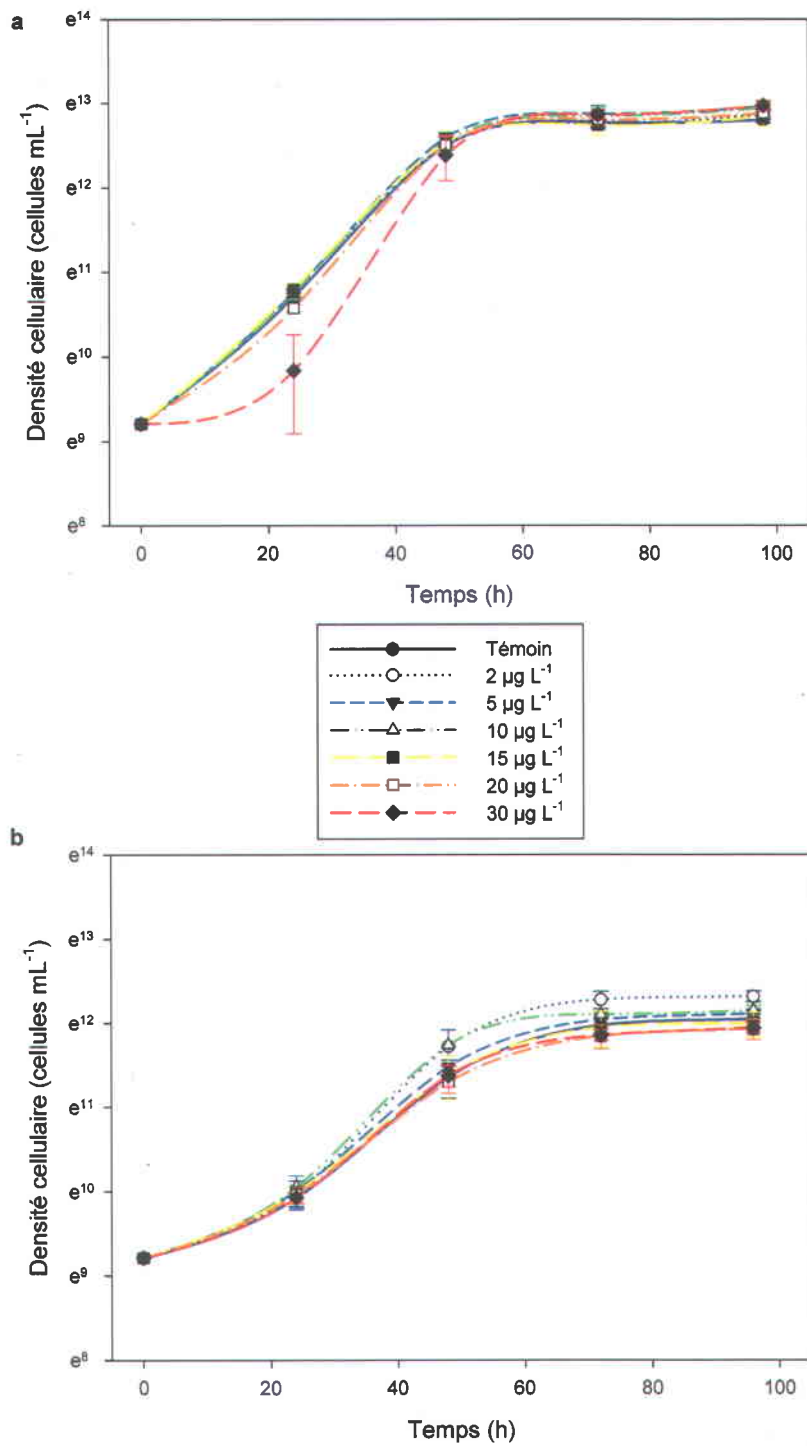


Figure 3.8 : Courbes de croissance de *C. reinhardtii* exposée à différentes concentrations de Pd dans un milieu faible en ammonium à pH 7,0 (a) et pH 8,0 (b). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois mesures.

À pH 8, la densité cellulaire finale se trouve passablement affectée par la diminution de l'ammonium dans le milieu. On parle d'une diminution du rendement de l'ordre de 3,5 fois par rapport au rendement final dans un milieu riche en ammonium au même pH.

3.5.2 Interprétation de l'effet de l'ammonium

L'absence de toxicité à pH 8 était en partie attribuée à la forte complexation du Pd par les molécules d'ammoniaque, ce qui réduisait sa biodisponibilité. Au regard des résultats de la section 3.5.1, on peut remettre en question cette interprétation. Clairement, la concentration d'ammonium dans le milieu de culture affecte la spéciation du palladium. Cependant, la façon dont ce changement de spéciation modifie la biodisponibilité du Pd demeure floue. Des expériences supplémentaires seront nécessaires afin de mieux comprendre le rôle de l'ammonium. L'utilisation de l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* pourrait apporter des réponses car, pour croître, elle ne nécessite pas d'ammonium dans le milieu. La comparaison de la réponse physiologique au palladium de cette algue en fonction de la concentration d'ammonium serait plus à même de cerner le rôle de l'ammonium dans la biodisponibilité du Pd. Au-delà de la variation de la concentration d'ammonium, les variations de pH pourraient aussi en être la cause.

3.6 Effet de la variation de $[Ca^{2+}]$ sur la toxicité du Pd

3.6.1 Croissance de *C. reinhardtii* soumis à un gradient de calcium en présence de palladium

Afin d'observer l'effet de la présence d'ions Ca^{2+} sur la toxicité du Pd, l'algue *C. reinhardtii* a été exposée à $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de palladium avec différentes concentrations de calcium. Celles-ci étaient de 0,068, 0,5, 1,0 et 2,0 mM. La plus faible concentration correspond à celle du milieu MHSM-1. Afin d'encadrer au mieux l'expérience, on a eu recours à deux groupes témoins sans palladium. Le premier témoin, avec une concentration de 0,068 mM de Ca^{2+} , a été utilisé à titre de référence pour la croissance algale. Le second témoin, à 2,0 mM de calcium, avait pour objectif de mesurer l'effet de l'augmentation de la dureté de l'eau sur la croissance des algues, afin qu'il ne soit pas attribué par erreur à la présence de palladium. Dans le but de garder la force ionique du milieu constante, l'ajout de calcium, sous forme de $Ca(NO_3)_2$, a été compensé par la

réduction de KNO_3 . Toutes les expositions ont eu lieu à un pH de 7,0. Pour pallier à une éventuelle variabilité importante dans les résultats, les manipulations ont été effectuées en quadruple pour faciliter les analyses statistiques.

La concentration de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de palladium a été choisie afin de s'assurer d'avoir une réponse toxique mesurable à 24 h. Le calcium est un ion majeur qui, selon la littérature, peut diminuer la réponse biologique de certains métaux en entrant en compétition avec ceux-ci pour les sites membranaires (Paquin *et al.*, 2002). Selon ce que le modèle du ligand biotique (BLM) indique, il est possible qu'une concentration plus élevée en calcium induise une réduction de la toxicité du palladium, d'où l'importance de choisir une concentration de métal où l'effet biologique est clairement mesurable à de faibles concentrations de Ca^{2+} .

À la figure 3.9 sont représentées les courbes de croissance de *C. reinhardtii* pour l'expérience avec des concentrations de calcium variable. On observe une différence significative entre les groupes témoins selon le test de Student. La concentration la plus élevée en calcium induit une croissance plus faible que celle obtenue avec le milieu MHSM-1 tout au long de l'exposition. Ainsi, le rendement final de la culture s'en trouve diminué. Cependant, lorsque la méthode de Kruskal-Wallis est appliquée à l'ensemble des traitements, la différence entre les témoins n'est plus considérée significative.

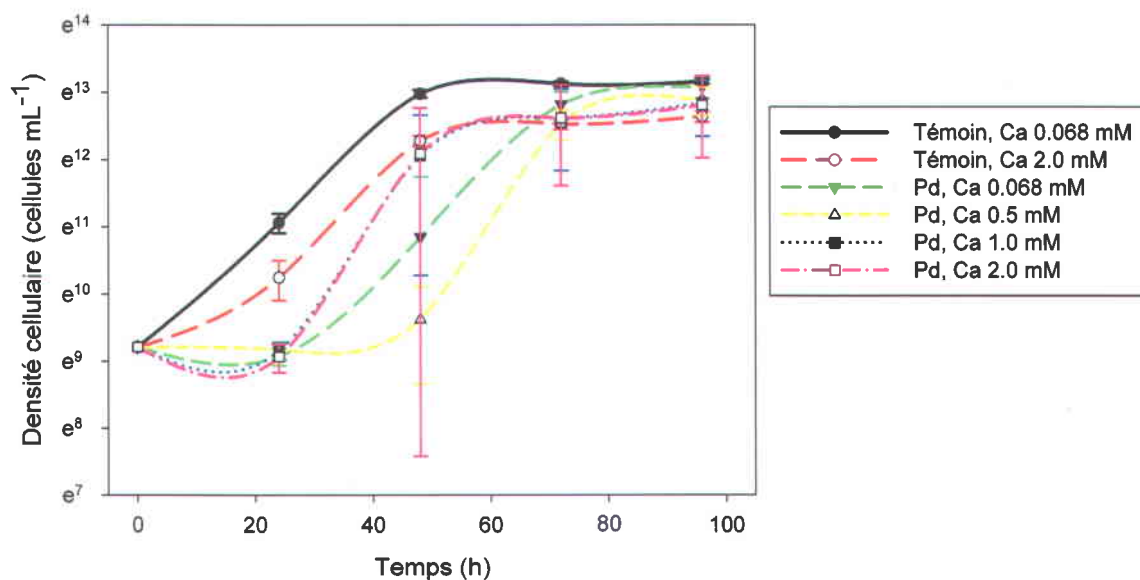


Figure 3.9 : Courbe de croissance de *C. reinhardtii* exposée à $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pd sous différentes concentrations de Ca à pH 7,0. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur quatre mesures.

Après 24 h de croissance, seuls les milieux M00 (MHSM-1 et 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pd) et M20 (Ca^{2+} 2,0 mM et 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pd) sont significativement différents. La grande variabilité des autres traitements ne permet pas de voir une tendance claire. En comparant les densités cellulaires, la toxicité causée par le palladium est sans équivoque. Les milieux contenant le Pd ont vu leur nombre de cellules stagner dans les premières 24 h, alors que la population de ceux qui n'en contenaient pas s'est vue parfois multipliée par 7. Cela s'accorde avec les expériences précédentes. La présence de calcium ne semble pas avoir influé sur la croissance algale. Le constat est différent 48 h après l'inoculation. Seuls les deux traitements aux concentrations les plus faibles en calcium, M00 et M05, diffèrent significativement du groupe témoin T00. Par ailleurs, les algues exposées au palladium en présence de 1,0 et 2,0 mM de Ca^{2+} semblent avoir repris leur croissance plus rapidement que celles qui étaient exposées à 0,068 et 0,5 mM de calcium. En effet, il n'y a pas d'écart significatif de densité cellulaire entre le milieu le plus riche en calcium sans palladium et celui qui en contient après 48 h d'exposition. Cependant, le milieu témoin avec la plus faible concentration de calcium contient significativement plus de cellules algales par millilitre que celui auquel on a ajouté du palladium à ce même moment.

3.6.2 Interprétation de l'effet du calcium

La grande variabilité des résultats nuit à leur analyse. Il semble qu'une concentration élevée de calcium n'empêche pas la présence d'un délai dans la croissance algale mais semble diminuer l'impact de celui-ci. C'est ce que montre la densité cellulaire à 48 h. La récupération des cellules semble plus rapide si la concentration en calcium est élevée. Il serait cependant plus prudent de pousser plus loin les expérimentations afin d'avoir des résultats plus solides. Pour l'instant, l'effet de la concentration de Ca^{2+} sur la toxicité du palladium pour *C. reinhardtii* n'est pas significatif.

La compétition pour les sites membranaires est souvent une raison avancée pour expliquer la réduction de la toxicité d'un métal en présence de fortes concentrations en calcium. D'après Charles *et al.* (2002), « les études qui ont exploré les effets de la dureté de l'eau (Ca et/ou Mg) sur la toxicité des métaux traces sur les algues unicellulaires ont généralement montré que la toxicité des métaux est réduite par Ca et/ou Mg, soit en raison de la compétition pour les sites membranaires de la cellule, soit parce que la complexation ou la coprécipitation a changé la spéciation de la solution

d'exposition ». Dans leurs propres travaux, ils ont montré qu'une augmentation de la dureté de 8 à 400 mg L⁻¹ CaCO₃ a réduit de cinq ordres de grandeur la toxicité de l'uranium pour *Chlorella sp.* sur une période de 72 h. De plus, l'ajout de calcium n'ayant pas changé la spéciation de l'uranium, ils en ont déduit que la compétition entre Ca et U est probablement la cause de la baisse de la toxicité. Dans le cas qui nous concerne, l'effet toxique ne s'est amenuisé qu'au-delà de 24 h. Un effet de compétition aurait possiblement fait sentir sa présence dès l'inoculation. Il est aussi possible que la concentration choisie pour l'exposition ait été trop importante en regard de l'effet protecteur que pourrait avoir le calcium. Si cet effet est subtil, une concentration trop élevée de palladium pourrait nuire à son identification et le masquer complètement. Cependant, une concentration trop faible n'aurait provoqué aucune toxicité. La ligne est mince et cette expérience n'a pas donné de résultats probants.



CHAPITRE 4: TOXICITÉ ET PRISE EN CHARGE DU PLATINE CHEZ L'ALGUE VERTE *C. REINHARDTII* : RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Variation temporelle du Pt dans le milieu

Afin d'observer le comportement du platine en solution, des erlenmeyers ne contenant que le milieu de culture et $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de platine ont été préparés. Lorsque mesurée, la concentration moyenne de Pt était de $18,8 \pm 0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ à l'inoculation et de $18,8 \pm 0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ après 96 h d'exposition (sans algues). Les pertes de platine dans les milieux d'exposition étant très faibles, la préparation de bilans de masse détaillés n'a pas semblé nécessaire. La perte observée est probablement causée par l'adsorption des ions sur la paroi des contenants. En comparant les témoins avec les échantillons inoculés avec *C. reinhardtii*, on remarque une diminution de la concentration de Pt dans tous les erlenmeyers contenant des algues (Figure 4.1). Cette diminution est significative seulement pour les concentrations de 50 et $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pt. L'ajout d'algues est la seule variable qui a été modifiée entre les erlenmeyers observant la variabilité du platine en solution et les autres échantillons. La perte de Pt en solution leur est donc attribuable. Le platine peut s'être adsorbé à la surface des algues, avoir été internalisé ou encore des débris cellulaires ont pu être produits par les algues qui ont ensuite adsorbé les ions métalliques. Contrairement au palladium, le platine demeure plus longtemps en solution. D'autres travaux font état de perte de platine en solution plus prononcées. Zimmermann *et al.* (2004) ont observé une diminution du Pt en solution de l'ordre de 50 % si le milieu était constitué d'eau du robinet. L'ajout de matière organique modifiait encore davantage la présence du métal. Si le milieu de culture était un mélange à part égal d'eau du robinet et d'eau provenant d'un lac, il n'y avait plus que 30 % du platine toujours en solution. Ces données se rapprochent davantage de celles observées avec le palladium. Cependant, les pertes ont été beaucoup plus limitées pour Cobelo-Garcia *et al.* (2007), ne s'élevant qu'à 20 % de la concentration nominale. En milieu salée, elles pouvaient être de moins de 10 %. Ils ont eux aussi noté que la présence de matière organique augmente la perte de platine en solution. Les ions Pt^{2+} sont probablement en partie complexés par cette matière organique, ce qui réduit leur concentration libre en solution. Lors de l'exposition de *C. reinhardtii* au platine, le volume

de milieu prélevé pour suivre la concentration de métal en solution est centrifugé avant d'être analysé. La matière organique particulaire de fort poids moléculaire se trouve alors dans le culot et seule la concentration de platine dans le surnageant est mesurée. Cela pourrait expliquer la perte de platine en solution. La diminution continue au cours de l'exposition pourrait être imputée à la production constante de débris cellulaires dans le milieu de culture qui complexeraient les ions Pt^{2+} .

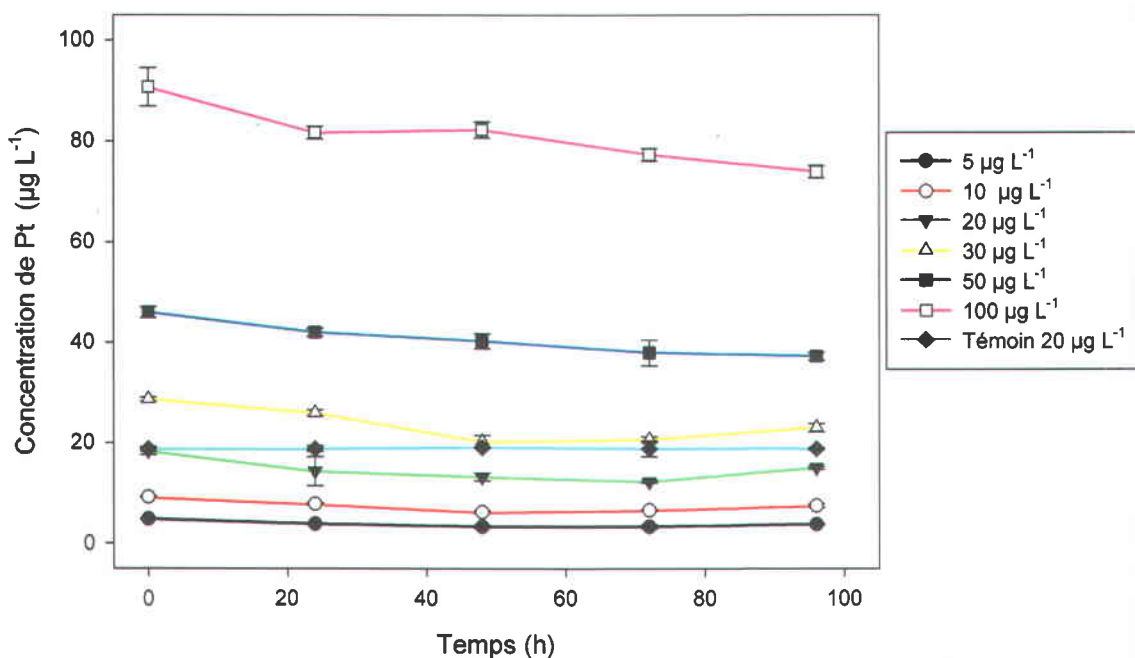


Figure 4.1 : Variation temporelle de la concentration de Pt dans le milieu de culture pendant 96 heures.

4.2 Influence du pH sur la toxicité du Pt

4.2.1 Toxicité du Pt pour *C. reinhardtii*

Les concentrations de platine nécessaires pour observer un effet toxique sur *C. reinhardtii*, si calculées en unités de masse, sont plus élevées que celles observées pour le palladium. La gamme de concentration nominale est 5, 10, 20, 30, 50 et 100 µg L⁻¹. Il est cependant plus juste de comparer les deux métaux en unité molaire. La

gamme de concentrations devient respectivement 26, 51, 103, 154, 256 et 513 nM. Les concentrations d'exposition sont donc similaires à celles du palladium (19 à 282 nM).

La figure 4.2a présente les courbes de croissance de *C. reinhardtii* exposée à une gamme de concentration de platine à pH 6. La légende indique les concentrations nominales, bien que la teneur en Pt des milieux ait été mesurée. Une journée après inoculation, la densité cellulaire des cultures exposées au platine est significativement plus faible que celle du groupe témoin. Plus la concentration d'exposition est élevée, plus l'écart est important. L'effet observé n'est pas une inhibition de la croissance, mais un délai dans l'atteinte de la phase de croissance exponentielle. Statistiquement, on peut exprimer la différence de densité cellulaire entre les traitements de la manière suivante : Témoin > 5 > 10 > 20, 30 > 50, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Le gradient de toxicité du platine est clair. Après 48 h d'exposition, les quatre plus faibles traitements, soient 5, 10, 20 et 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pt, ne diffèrent plus du groupe de contrôle. Seuls les échantillons soumis à 50 et 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pt présentent encore un retard dans la croissance algale. Ce délai n'existe plus une fois la barrière des 72 h franchie. À ce moment, aucun écart significatif ne subsiste entre le groupe témoin et les autres. À la toute fin de l'exposition, tous les échantillons ont sensiblement la même densité cellulaire. La présence de platine n'a pas affecté le rendement final des cultures de *C. reinhardtii*.

La croissance de *C. reinhardtii* en présence de Pt à pH 7,0 montre des effets plus marqués. La figure 4.2b illustre les courbes de croissance de l'algue verte à différentes concentrations de platine. Un retard dans l'atteinte de la phase exponentielle est visible après 24 h. À ce moment, tous les échantillons contenant du Pt souffrent d'un retard dans la croissance algale; leur densité cellulaire est significativement plus faible que celle du groupe témoin. La croissance est presque nulle pour les algues exposées à des concentrations de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pt et plus. En effet, alors que la population du groupe témoin triplait, à peine deux des 15 échantillons les plus concentrés voyaient leur densité cellulaire augmenter de plus de 50 %. De ces 15 échantillons, sept ne dépassent pas 20 % de croissance. Après 48 h d'exposition, le retard dans la croissance s'est fortement amenuisé. Les essais réalisés à des concentrations de 5, 10, 20 et 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ ne sont pas statistiquement différents du groupe témoin. Seuls les traitements de 50 et 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ présentent encore une densité cellulaire plus faible qu'en absence de platine. Il n'y a plus de différence mesurable entre les traitements après 72 h. À la fin de l'exposition, le rendement est semblable pour tous les échantillons. Tout comme à pH

6,0, la présence de platine n'influe pas sur quantité totale d'algues pour cette expérience. La toxicité plus vive après 24 h de croissance laisse croire à une toxicité accrue du platine à pH neutre par rapport à pH 6,0.

Le raisonnement proposé pour expliquer l'effet du palladium sur le délai dans la croissance algale tient également pour le platine. Ce délai serait le temps nécessaire à l'algue pour permettre à ses processus de détoxification de réduire les effets de la présence de Pt^{2+} et ainsi permettre la division cellulaire. Plus la concentration en platine est élevée dans le milieu, plus le temps nécessaire pour accomplir ces phénomènes est important.

Les résultats de la croissance de *C. reinhardtii* à pH 8 sont présentés à la figure 4.2c. Bien que les courbes puissent laisser penser que le platine influence la densité cellulaire des échantillons, il n'y a pas d'écart significatif avec le groupe témoin et ce, à tous les pas de temps. Cela s'explique en partie par la méthode de préparation des milieux. Pour chaque expérience, 1 litre de milieu de culture est préparé en triplicata, pour un volume final de 3 litres. Tous les échantillons « a » utilisent le milieu du premier contenant, tous les « b » le deuxième et le troisième litre sert pour les erlenmeyers restants. Ainsi, si un des contenants était affecté par un quelconque problème lors de sa préparation, tous les traitements seraient affectés de la même façon, ce qui permet d'empêcher d'imputer un résultat par erreur à la présence de métal. Les comptes cellulaires laissent croire qu'il y a eu un problème avec un des milieux. Aucune croissance n'est mesurable après 24 heures pour tous les échantillons « a », ce qui n'est pas le cas avec les autres (voir Annexe C). Les échantillons « b » et « c » montrent une réponse algale modulée par la concentration de platine similaire aux expériences menées à pH 6 et 7. La tendance est plus difficile à cerner pour les échantillons « a ». Afin de comparer les densités cellulaires des différents traitements entre eux, nous utilisons la méthode d'analyse de variance à deux voies (ANOVA). Elle requiert un minimum de trois échantillons pour chaque traitement pour pouvoir être appliquée. Pour cette raison, nous ne pouvons exclure la série d'échantillon « a » pour la réalisation des courbes de croissance. Si le platine a un effet sur la croissance algale à pH 8, cette expérience n'a pas permis de le prouver. L'analyse statistique ne permet pas d'écarter l'apport du hasard dans les disparités entre les traitements.

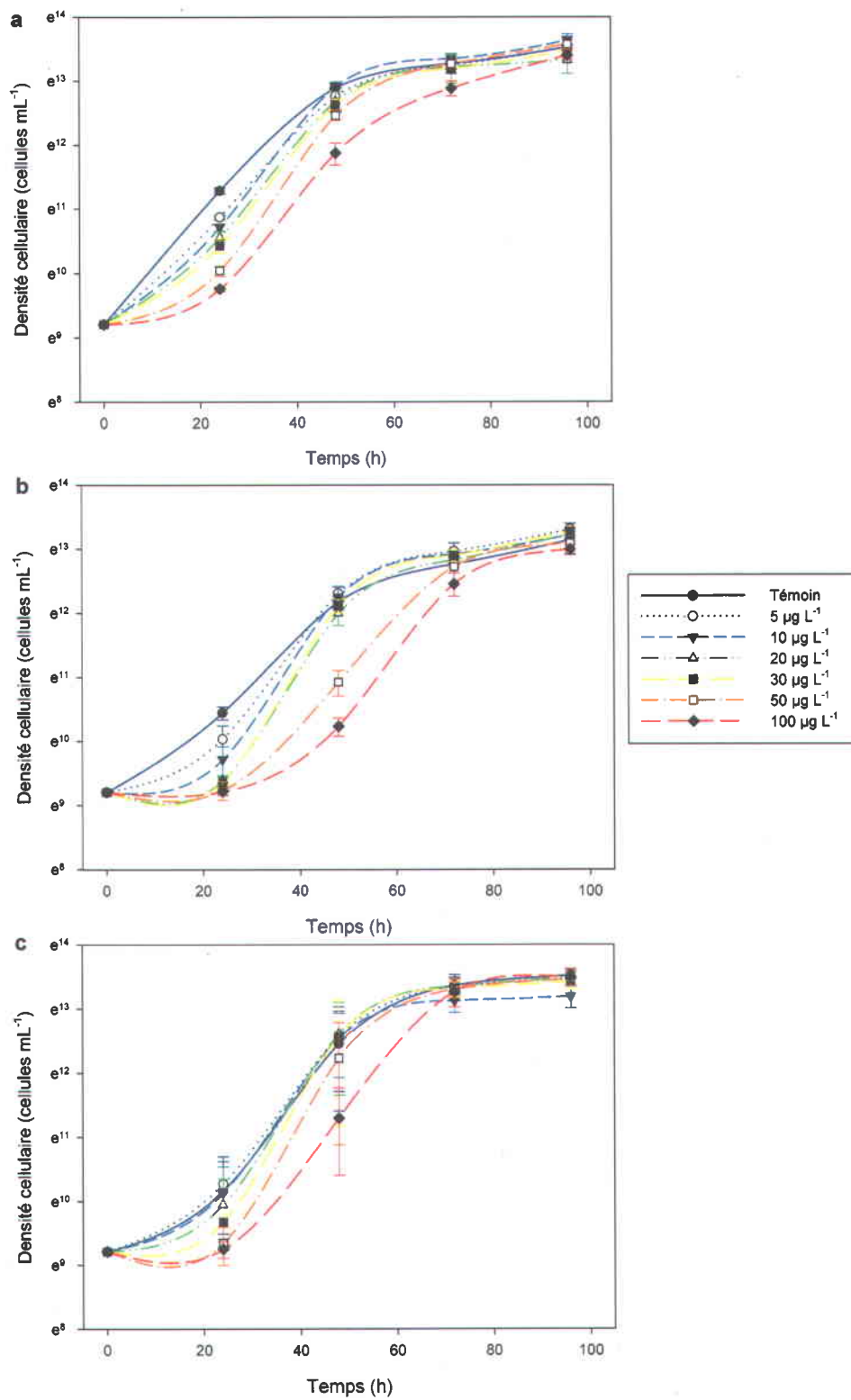


Figure 4.2 : Courbes de croissance de *C. reinhardtii* exposée à différentes concentrations de Pt à pH 6,0(a), pH 7,0 (b) et pH 8,0 (c). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois mesures.

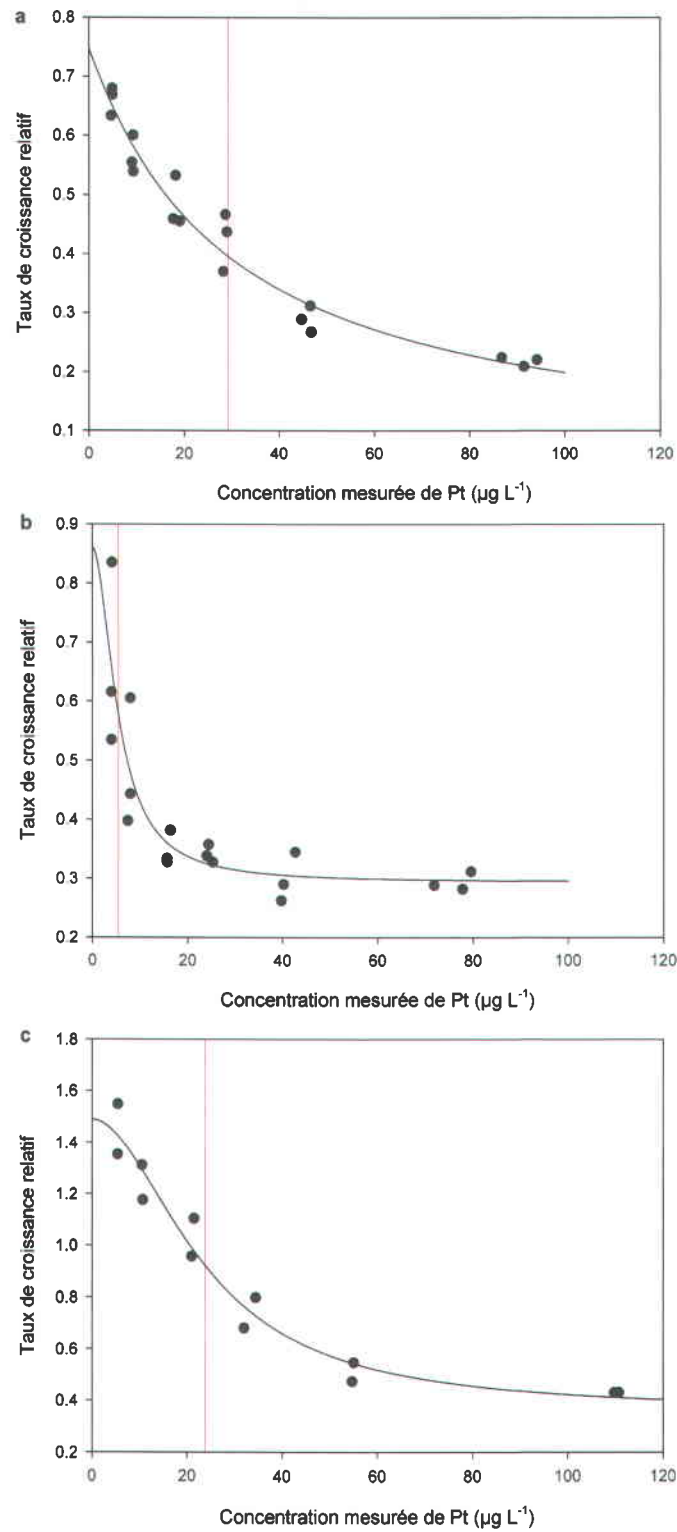


Figure 4.3 : Taux de croissance relatif observé après 24 h d'après la concentration de Pt mesurée dans le milieu de culture à pH 6,0 (a), pH 7,0 (b) et pH 8,0 (c).

À la figure 4.3, on retrouve, pour chacun des pH d'exposition, le taux de croissance de *C. reinhardtii* après 24 h en fonction de la concentration mesurée de platine dans le milieu de culture. Cela nous permet, comme à la section 3.3.1, de déterminer la CE₅₀ du métal d'intérêt. À pH 6, la concentration de platine qui réduit de 50 % la croissance algale après 24 h est de $24 \pm 12 \mu\text{g L}^{-1}$. Elle est de $5 \pm 7 \mu\text{g L}^{-1}$ à pH 7 et remonte à $23 \pm 4 \mu\text{g L}^{-1}$ à pH 8. Cela correspond à 123 ± 62 , 26 ± 36 et $118 \pm 21 \text{ nM}$ respectivement. Pour le dernier pH, la mesure de la CE₅₀ ne tient compte que des échantillons « b » et « c ». En effet, puisqu'on utilise chaque erlenmeyer indépendamment des autres, on peut exclure ceux de la série « a » qui sont considérés aberrants. On peut ainsi déterminer la concentration efficace moyenne à pH 8 plus adéquatement. La valeur de CE₅₀ obtenue à pH 7 est assez faible si l'on considère la gamme de concentration à laquelle les algues ont été exposées. Elle correspond en effet à la plus faible concentration de Pt de tous les échantillons. À la lumière de ces résultats, on peut affirmer que le platine est plus toxique pour *C. reinhardtii* à pH 7,0 qu'aux deux autres pH.

4.2.2 Interprétation de l'effet du pH

On observe avec le platine la même tendance qu'avec le palladium. Le Pt cause une toxicité au pH le plus faible, toxicité qui est exacerbée à pH 7. Cependant, lorsque le pH devient basique, les effets biologiques du platine sur *C. reinhardtii* diminuent dans la gamme de concentrations testées. Le rendement final n'a pas été affecté par la variation des concentrations de platine dans les milieux d'exposition. Encore une fois, tous les traitements se sont soldés par une densité cellulaire finale semblable.

Il est possible que la compétition des protons pour les sites membranaires soit en partie responsable de la baisse de la toxicité du platine à pH 6,0 comparé à pH 7,0. Cependant, la diminution des effets observés sur *C. reinhardtii* à pH 8,0 dans la plage de concentrations testée laisse croire que d'autres facteurs pourraient contribuer à expliquer le phénomène. François *et al.* (2007) ont étudié l'effet du pH sur le transport transmembranaire du manganèse et du cadmium chez *C. reinhardtii*. Il en est ressorti que la compétition des protons était négligeable pour ces deux métaux, mais que ces mêmes protons pourraient induire un changement de conformation des protéines chargées du transport transmembranaire, affectant ainsi les flux d'internalisation des deux métaux.

Contrairement au Pd, à pH 8, lorsque l'on tient uniquement compte des échantillons « b » et « c », on constate un effet biologique du platine sur la croissance de l'algue verte. Il y aurait donc tout de même un effet physiologique sur les algues, mais pour des fins statistiques, d'autres expériences devraient être réalisées afin de mieux mesurer cet effet.

La concentration de métal en solution ne chute pas au cours de l'exposition. La cause de la « récupération » lors de la croissance ne peut donc pas être le retrait du métal en solution, que ce soit par adsorption ou par précipitation, contrairement à ce que G. Roy (2009) avançait comme possibilité (la concentration de Pt en solution n'avait pas été mesurée).

En comparant avec le Pd, on observe que les CE_{50} sont du même ordre de grandeur. À pH 6, elle est de $10 \pm 1 \mu\text{g L}^{-1}$ pour le palladium et de $24 \pm 12 \mu\text{g L}^{-1}$ pour le platine. On exprime par convention les CE_{50} en unité de masse par volume, mais la comparaison des concentrations molaires apporte un éclairage différent. La CE_{50} du palladium à pH 6 devient alors $94 \pm 9 \text{ nM}$ et celle du platine, $123 \pm 62 \text{ nM}$. À pH 7, les CE_{50} sont assez semblables. L'expression en molarité ne change pas ce constat. De $7,0 \pm 0,3$ et $5 \pm 7 \mu\text{g L}^{-1}$ pour le palladium et le platine, on passe à 66 ± 3 et $26 \pm 36 \text{ nM}$ respectivement. Le platine présente donc une toxicité très similaire au palladium à pH neutre. Il faut cependant garder à l'esprit que l'incertitude sur la mesure pour le platine est importante.

4.3 Influence du pH sur l'internalisation du Pt par *C. reinhardtii*

4.3.1 Prise en charge du Pt

La prise en charge du platine par *C. reinhardtii* a aussi été mesurée, selon la même méthode que celle employée pour le palladium. La quantité de métal internalisée par les cellules, en mol cellule^{-1} , a été dosée à la suite de leur digestion après 96 h d'exposition. La concentration de Pt en solution est celle mesurée dans le milieu de culture avant inoculation. La variation temporelle étant faible, elle représente adéquatement le milieu de culture. En raison d'erreurs de manipulation en laboratoire, la prise en charge du platine à pH 7,0 n'a pu être analysée. Les résultats pour ce pH ne sont donc pas disponibles.

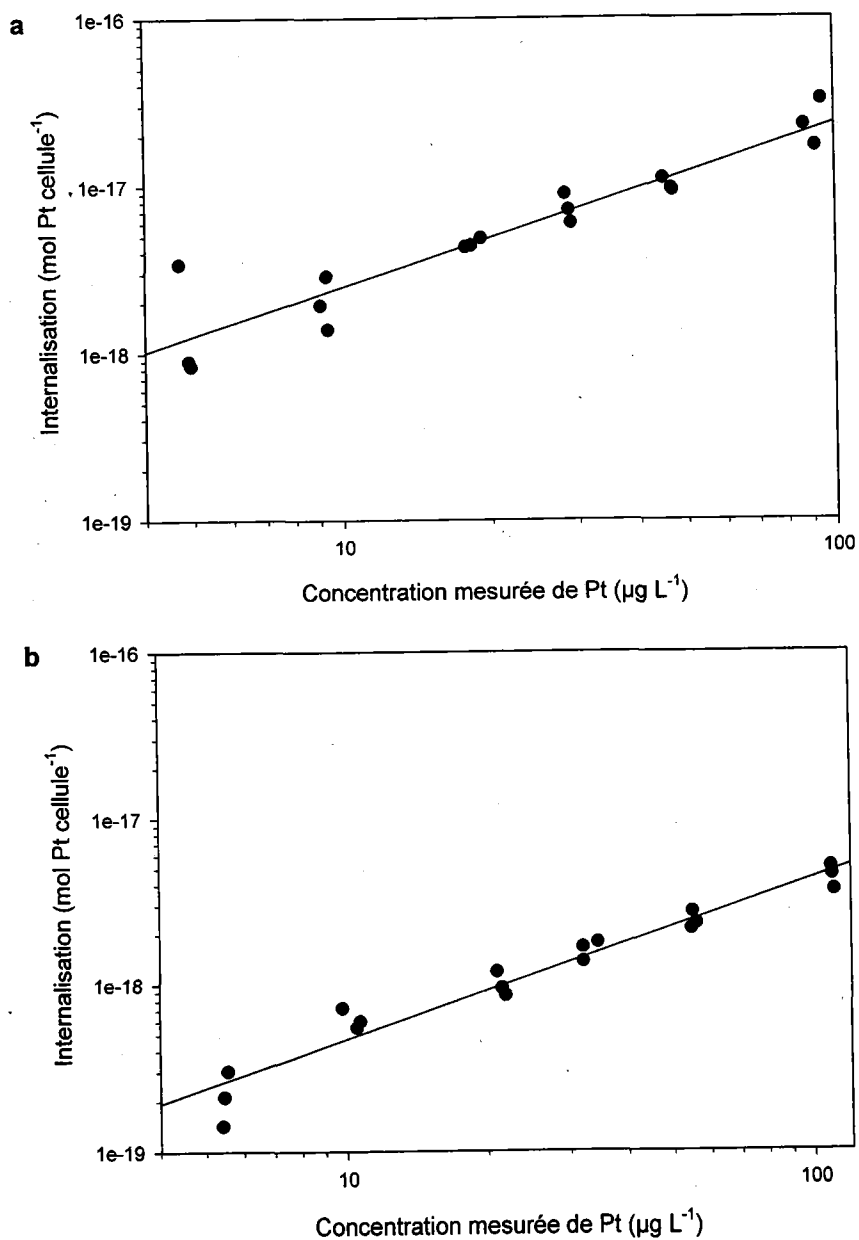


Figure 4.4 : Internalisation du Pt par *C. reinhardtii* pendant 96 h selon la concentration mesurée au moment de l'inoculation des algues dans le milieu de culture à pH 6,0 (a) et pH 8,0 (b).

La quantité de platine internalisée par *C. reinhardtii* en fonction de la concentration de ce métal en solution est illustrée à la figure 4.4. À pH 6,0, la concentration mesurée de Pt dans le milieu d'exposition varie entre 4,6 et 94,2 µg L⁻¹. Le quota cellulaire, soit la quantité de platine par cellule, est compris entre 8,4 × 10⁻¹⁹ et 3,2 × 10⁻¹⁷ mol cellule⁻¹. On observe une corrélation linéaire entre le platine en solution et la quantité que l'on retrouve à l'intérieur des algues. Le coefficient de corrélation (R²) est de 0,89. À pH 8,0,

les milieux contiennent entre 5,4 et 110,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ de platine. Le platine internalisé représente entre $1,4 \times 10^{-19}$ et $5,0 \times 10^{-18}$ mol cellule⁻¹. On observe une corrélation linéaire ($R^2 = 0,95$) entre la concentration de Pt en solution et le quota cellulaire des algues. Tout comme à pH 6,0, plus la concentration de métal dans le milieu de culture est importante, plus on retrouve de ce métal à l'intérieur des cellules.

4.3.2 Interprétation de l'effet du pH sur l'internalisation du Pt

En comparant les pentes des deux graphiques de la figure 4.4, on remarque qu'elles sont très similaires. La première est de 0,97 à pH 6,0 et la suivante, de 0,96 à pH 8,0. On n'observe pas la même tendance que dans le cas du palladium, où le pH influençait grandement ce facteur. À pH 6,0, la pente était alors de 1,30 et elle diminuait à 0,74 à pH 8,0.

L'internalisation du platine est plus importante à pH 6,0 qu'à pH 8,0 pour les mêmes concentrations d'exposition. D'après les corrélations obtenues, une cellule exposée à une concentration de platine déterminée en internalisera cinq fois plus si le pH du milieu est de 6,0 que s'il est de 8,0. Si l'on compare aux résultats du palladium, on observe cette même tendance, soit une plus grande prise en charge du Pd à pH 6,0 qu'à pH 8,0, à concentration équivalente dans les deux milieux.

Afin de comparer adéquatement l'internalisation du Pt et du Pd entre elles, la figure 4.5 exprime la concentration de métal du milieu en mol litre⁻¹ par rapport au quota cellulaire en mol cellule⁻¹. N'y sont représentées que les concentrations se recoupant pour les deux éléments. À pH 6,0 tout comme à pH 8,0, la différence d'internalisation entre le platine et le palladium n'est pas significative. C'est donc dire que sur la gamme de concentrations étudiée, la prise en charge par *C. reinhardtii* à pH 6,0 est la même pour les deux métaux. C'est aussi vrai à pH 8,0. Cela est cohérent avec les concentrations efficaces moyennes qui ont été mesurées. À pH 6,0, elles étaient très semblables, soient 94 ± 9 nM pour le palladium et 123 ± 62 nM pour le platine. Ainsi, pour une prise en charge similaire, on observe une toxicité similaire.

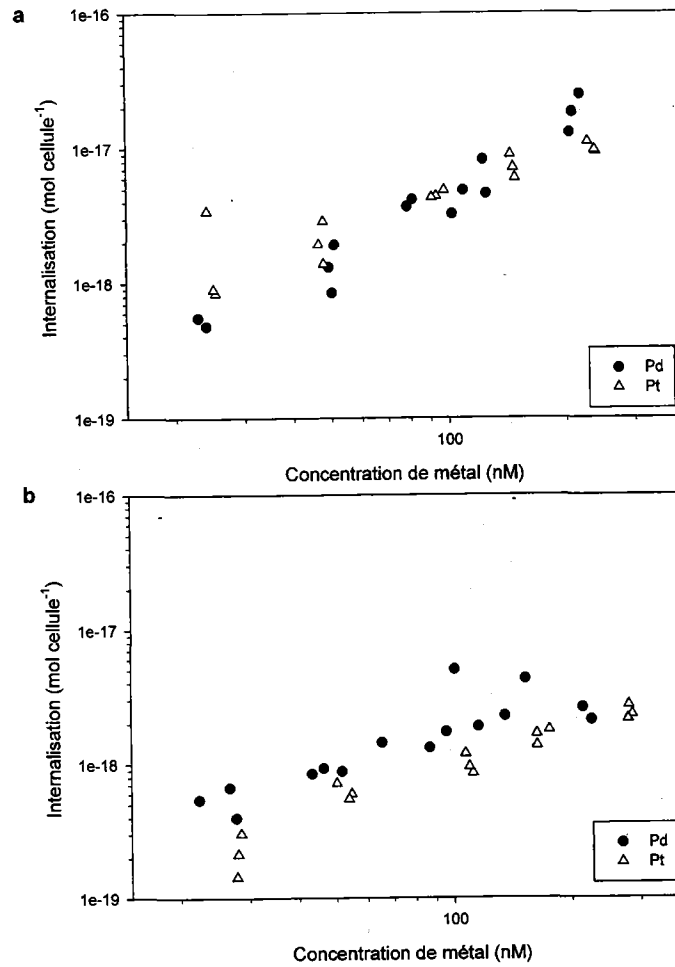
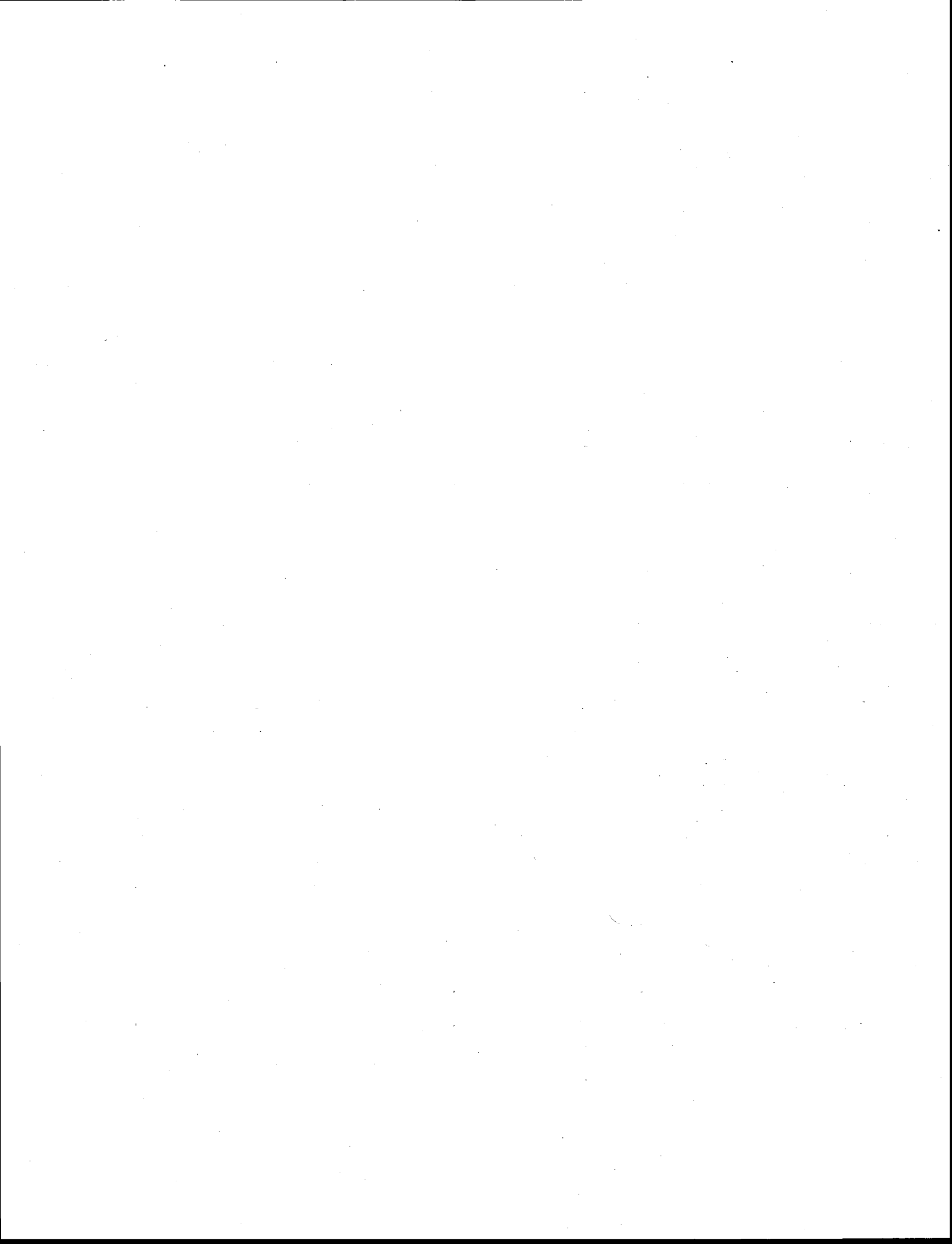


Figure 4.5 : Comparaison entre l'internalisation par *C. reinhardtii* du platine et du palladium selon la concentration de métal en solution à pH 6,0 (a) et pH 8,0 (b).



CHAPITRE 5: CONCLUSION

Les propriétés catalytiques particulières des éléments du groupe du platine (EGP) ont fortement contribué à leur essor dans le domaine industriel. Leur capacité à oxyder le monoxyde de carbone et les résidus de combustion incomplète en CO₂ en ont faits de précieux outils pour l'industrie automobile. Depuis les années 1970, ils entrent dans la composition des convertisseurs catalytiques des voitures et transforment certains gaz néfastes pour l'écosystème en gaz moins dommageables. Cependant, l'utilisation de cette technologie n'est pas sans conséquence. Le rejet de particules de pots catalytiques contenant des ÉGPs contamine l'environnement de façon globale. Il en résulte une augmentation des concentrations de ces métaux, plus particulièrement du platine et du palladium. Le milieu aquatique n'y échappe pas, d'où l'importance de bien caractériser le risque qu'ils peuvent représenter pour les organismes y vivant. Cela est d'autant plus vrai que les émissions de Pt et de Pd vont continuer d'augmenter au cours des prochaines années.

Le milieu aquatique n'est pas homogène. Sa composition en minéraux et en matière organique ainsi que son pH changent selon l'environnement dans lequel il se trouve. Cette variabilité peut influencer le comportement des métaux en solution et, par le fait même, leur toxicité. Cela souligne l'importance de mener des études écotoxicologiques selon un éventail de paramètres physico-chimiques. C'est ce qui a été fait dans cette étude en exposant au palladium et au platine l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* dans différents milieux de culture.

La première partie du projet avait pour objectif de déterminer l'impact du pH sur la toxicité et l'internalisation du palladium et du platine par *C. reinhardtii*. L'algue unicellulaire a été exposée à trois pH, soit 6,0, 7,0 et 8,0. Sur la gamme de concentrations de palladium étudiée, la toxicité la plus prononcée a été observée à pH neutre. Elle s'exprime par un délai dans l'atteinte de la phase exponentielle de croissance des cellules. Ce délai s'accroît avec l'augmentation de la concentration de Pd dans le milieu de culture. À pH 6,0, une CE₅₀ de $10 \pm 1 \mu\text{g L}^{-1}$ a été calculée en utilisant la densité cellulaire relative à 24 h comme seuil. À pH 7,0, elle diminue à $7,0 \pm 0,3 \mu\text{g L}^{-1}$. Cependant, aucun effet sur la croissance de *C. reinhardtii* n'a été décelé à pH 8,0. Il y a bien eu internalisation de palladium à ce pH, mais en plus faible quantité qu'aux deux autres conditions. C'est à pH 7,0 que l'internalisation a été la plus

importante, ce qui est cohérent avec une plus forte toxicité observée à ce pH. La concentration de métal en solution est bien corrélée avec la quantité de métal prise en charge par les cellules.

Les résultats obtenus avec le platine sont similaires à ceux du palladium. La présence de Pt induit lui aussi une phase de latence avant la croissance exponentielle des algues. La réponse biologique est la plus marquée à pH 7,0, comparativement aux pH 6,0 et 8,0. Elle n'est pas significative pour ce dernier, mais elle est mesurable à pH 6,0. La CE_{50} pour ce traitement, déterminée à partir de la densité cellulaire relative à 24 h, est de $24 \pm 12 \mu\text{g L}^{-1}$, alors qu'elle est de $5 \pm 7 \mu\text{g L}^{-1}$ à une unité de pH supplémentaire. Bien que la toxicité soit moins discernable à pH 8,0, une CE_{50} de $23 \pm 4 \mu\text{g L}^{-1}$ a pu tout de même être calculée. La prise en charge du platine à ce pH s'est révélée être cinq fois plus faible qu'à pH 6,0 lorsque l'algue est soumise aux mêmes concentrations de Pt en solution. Encore une fois, il y a une forte corrélation entre l'internalisation du platine par *C. reinhardtii* et sa concentration dans le milieu de culture.

Lorsque l'on compare les résultats du platine et du palladium, il en ressort que ces métaux affectent l'algue verte de manière semblable. Tous deux induisent un délai dans la croissance des algues, et ce, à des concentrations similaires. En effet, les CE_{50} à pH 7,0 sont de $66 \pm 3 \text{ nM}$ pour le palladium et $26 \pm 36 \text{ nM}$ pour le platine. Ce délai peut s'expliquer par le temps nécessaire pour la cellule à mettre en branle des processus de détoxification, par exemple la production de ligands pouvant séquestrer les ions métalliques (soit dans le milieu intracellulaire, soit dans le milieu d'exposition). L'effet toxique de ces deux ÉGP s'estompe cependant à pH plus basique.

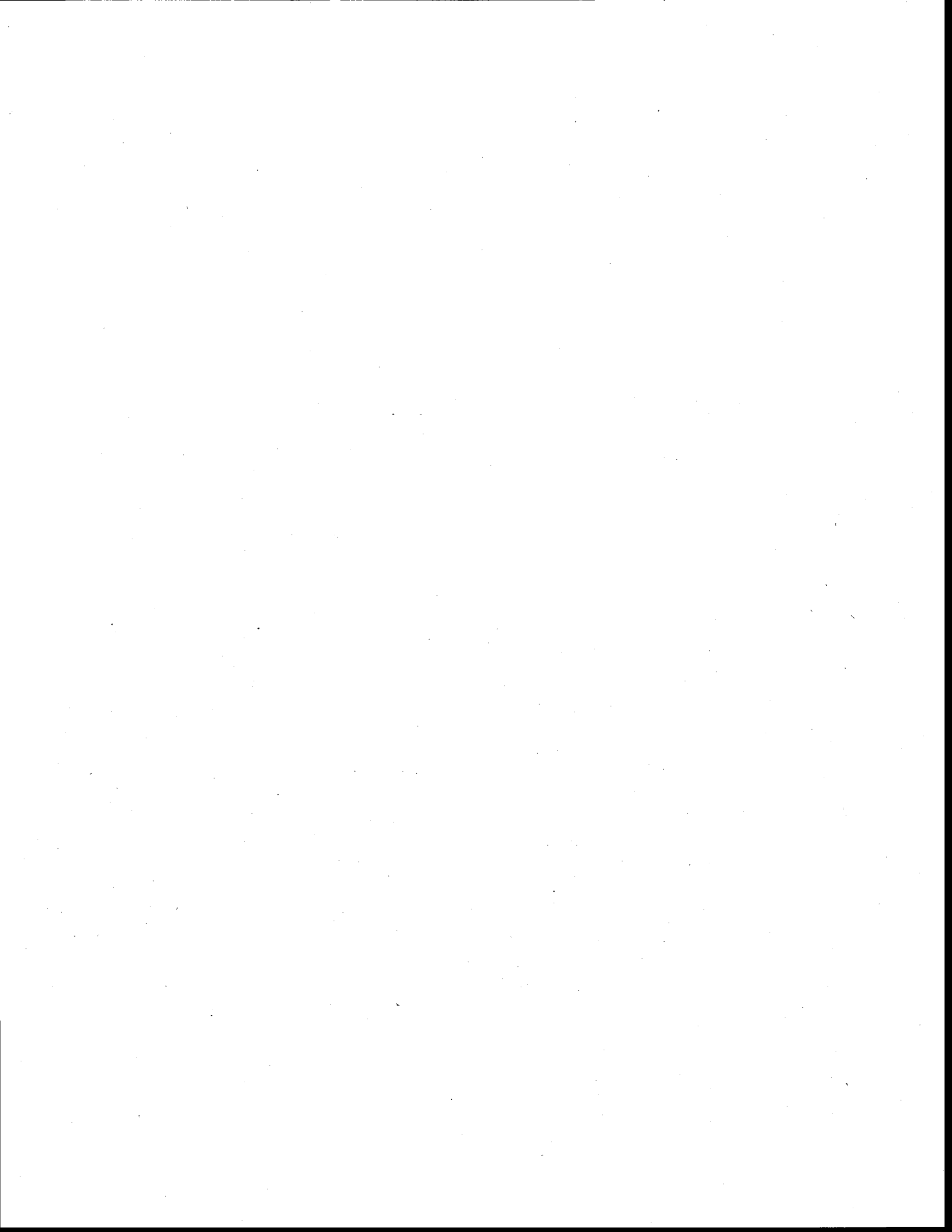
Le deuxième aspect de ce projet était d'évaluer l'influence de l'ammonium sur la toxicité du palladium sur *C. reinhardtii*. L'ion NH_4^+ est nécessaire pour la croissance de l'organisme d'étude mais il agit également, lorsqu'il est déprotoné, comme ligand pour les ions Pd^{2+} et possiblement pour le Pt^{2+} . Sa concentration en solution influence la spéciation du palladium, et donc possiblement la biodisponibilité de celui-ci. La composition du milieu a été modifiée afin de réduire de 90 % la concentration d'ammonium. Ce changement s'est répercuté sur la réponse physiologique des algues, où aucune toxicité n'a été détectée sur la gamme de concentrations de Pd testée. Cela est vrai autant à pH 7,0 qu'à pH 8,0.

La troisième portion du mémoire consistait à estimer l'impact de la concentration de calcium sur la toxicité du Pd pour *C. reinhardtii*. Les ions Ca^{2+} , à une concentration

donnée, peuvent avoir un effet protecteur pour les cellules contre certains métaux. Cela a été vérifié en exposant l'algue verte à $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de palladium selon un gradient de calcium (0,068 à 2,0 mM). Dans tous les échantillons, l'augmentation de la dureté de l'eau n'a pas empêchée l'apparition d'un délai dans la croissance algale. Il semble que la reprise de la croissance soit plus rapide à haute concentration de Ca^{2+} , mais l'importante variabilité des résultats ne permet pas de l'affirmer avec certitude.

Les concentrations d'exposition ont été choisies afin d'observer un effet physiologique sur les algues. Les concentrations naturelles sont habituellement plus faibles que celles-ci (Roy, 2009). On peut donc s'attendre à ce que le platine et le palladium aient peu d'influence sur la croissance de *C. reinhardtii* en milieu naturel.

Les paramètres physico-chimiques du milieu influencent la réponse algale à la présence de platine et de palladium en laboratoire. C'est pourquoi une caractérisation adéquate de l'environnement doit pouvoir être réalisée. La détermination de davantage de constantes thermodynamiques pour la complexation du palladium et du platine permettrait de préciser la spéciation de ce métal dans les milieux de culture et ainsi de mieux cerner l'impact de la spéciation sur la toxicité. Il va sans dire que ces données devraient être déterminées dans des conditions pertinentes pour une spéciation en milieu naturel, par exemple pour la force ionique du milieu. En complément aux tests de toxicité sur 96 h, des expériences d'internalisation et d'efflux à court terme (une heure) pourraient être réalisées afin de mesurer les flux d'internalisation du Pt et du Pd et de les utiliser pour élucider les causes du délai dans la croissance des algues. Il pourrait s'en suivre aussi des expériences de fractionnement cellulaire pour cerner les mécanismes cellulaires de détoxification et les cibles internes des ÉGP chez *C. reinhardtii*. Cela pourrait répondre à certains questionnements : pourquoi malgré une internalisation similaire, les effets du platine et du palladium diffèrent à pH 8,0. L'utilisation d'une espèce d'algue qui ne nécessite pas d'ammonium pour sa croissance, en l'occurrence *Pseudokirchneriella subcapitata*, fournirait possiblement des pistes de réponses à cette interrogation.



LISTE DE RÉFÉRENCES

- Artelt S, Creutzenberg O, Kock H, Levsen K, Nachtigall D, Heinrich U, Ruhle T & Schlogl R (1999a) Bioavailability of fine dispersed platinum as emitted from automotive catalytic converters: a model study. *Sci. Total Environ.* 228(2-3):219-242. Doi: 10.1016/s0048-9697(99)00049-2
- Artelt S, Kock H, Konig HP, Levsen K & Rosner G (1999b) Engine dynamometer experiments: platinum emissions from differently aged three-way catalytic converters. *Atmos. Environ.* 33(21):3559-3567. Doi: 10.1016/s1352-2310(99)00109-0
- Balcerzak M (1997) Analytical methods for the determination of platinum in biological and environmental materials. *Analyst* 122(5):R67-R74. Doi: 10.1039/a608153c
- Balcerzak M (2011) Methods for the determination of platinum group elements in environmental and biological materials: a review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 41(3):214-235. Doi: 10.1080/10408347.2011.588922
- Bali R, Siegele R & Harris AT (2010) Biogenic Pt uptake and nanoparticle formation in *Medicago sativa* and *Brassica juncea*. *J. Nanopart. Res.* 12(8):3087-3095. Doi: 10.1007/s11051-010-9904-7
- Barbante C, Veysseyre A, Ferrari C, Van de Velde K, Morel C, Capodaglio G, Cescon P, Scarponi G & Boutron C (2001) Greenland snow evidence of large scale atmospheric contamination for platinum, palladium, and rhodium. *Environ. Sci. Technol.* 35(5):835-839. Doi: 10.1021/es000146y
- Bartlett L, Rabe FW & Funk WH (1974) Effects of copper, zinc and cadmium on *Selenastrum capricornutum*. *Water Res.* 8(3):179-185. Doi: 10.1016/0043-1354(74)90041-4
- Battke F, Leopold K, Maier M, Schmidhalter U & Schuster M (2008) Palladium exposure of barley: uptake and effects. *Plant Biol.* 10(2):272-276. Doi: 10.1111/j.1438-8677.2007.00017.x
- Beckman Coulter (2013) *The Coulter principle.*; <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/industrial/particle-technologies/coulter-principle/index.htm> (Consulté le 30 novembre 2013)
- Bérubé L (2005) *Mobilité et géochronologie du Pt et du Pd dans les sédiments de deux lacs du Québec*. Mémoire de maîtrise (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Québec). 102 p
- Boyd R, Niskavaara H, Kontas E, Chekushin V, Pavlov V, Often M & Reimann C (1997) Anthropogenic noble-metal enrichment of topsoil in the Monchegorsk area, Kola peninsula, northwest Russia. *J. Geochem. Explor.* 58(2-3):283-289. Doi: 10.1016/s0375-6742(97)00002-2
- Brautigam A, Schaumlöffel D, Preud'homme H, Thondorf I & Wesenberg D (2011) Physiological characterization of cadmium-exposed *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ.* 34(12):2071-2082. Doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02404.x
- Brenan JM (2008) The platinum-group elements: "Admirably Adapted" for science and industry. *Elements* 4(4):227-232. Doi: 10.2113/gselements.4.4.227

- Caroli S, Alimonti A, Petrucci F, Bocca B, Krachler M, Forastiere F, Sacerdote MT & Mallone S (2001) Assessment of exposure to platinum-group metals in urban children. *Spectroc. Acta Pt. B-Atom. Spectr.* 56(7):1241-1248. Doi: 10.1016/s0584-8547(01)00203-8
- Charles AL, Markich SJ, Stauber JL & De Filippis LF (2002) The effect of water hardness on the toxicity of uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquat. Toxicol.* 60(1-2):61-73. Doi: 10.1016/s0166-445x(01)00260-0
- Cobelo-Garcia A, Turner A, Millward GE & Couceiro F (2007) Behaviour of palladium(II), platinum(IV), and rhodium(III) in artificial and natural waters: Influence of reactor surface and geochemistry on metal recovery. *Anal. Chim. Acta* 585(2):202-210. Doi: 10.1016/j.aca.2006.12.029
- Colombo C, Monhemius AJ & Plant JA (2008a) The estimation of the bioavailabilities of platinum, palladium and rhodium in vehicle exhaust catalysts and road dusts using a physiologically based extraction test. *Sci. Total Environ.* 389(1):46-51. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.08.022
- Colombo C, Oates CJ, Monhemius AJ & Plant JA (2008b) Complexation of platinum, palladium and rhodium with inorganic ligands in the environment. *Geochem.-Explor. Environ. Anal.* 8:91-101. Doi: 10.1144/1467-7873/07-151
- Dahlheimer SR, Neal CR & Fein JB (2007) Potential mobilization of platinum-group elements by siderophores in surface environments. *Environ. Sci. Technol.* 41(3):870-875. Doi: 10.1021/es0614666
- Diehl DB & Gagnon ZE (2007) Interactions between essential nutrients with platinum group metals in submerged aquatic and emergent plants. *Water Air Soil Pollut.* 184(1-4):255-267. Doi: 10.1007/s11270-007-9414-0
- Dubiella-Jackowska A, Kudak B, Polkowska Z & Namisenik J (2009) Environmental fate of traffic-derived platinum group metals. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39(4):251-271. Doi: 10.1080/10408340903001144
- Ek KH, Morrison GM & Rauch S (2004a) Environmental routes for platinum group elements to biological materials - a review. *Sci. Total Environ.* 334:21-38. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.04.027
- Ek KH, Rauch S, Morrison GM & Lindberg P (2004b) Platinum group elements in raptor eggs, faeces, blood, liver and kidney. *Sci. Total Environ.* 334:149-159. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.04.067
- Farago ME, Kavanagh P, Blanks R, Kelly J, Kazantzis G, Thornton I, Simpson PR, Cook JM, Delves HT & Hall GEM (1998) Platinum concentrations in urban road dust and soil, and in blood and urine in the United Kingdom. *Analyst* 123(3):451-454. Doi: 10.1039/a705920e
- Florea AM & Busselberg D (2006) Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *Biometals* 19(4):419-427. Doi: 10.1007/s10534-005-4451-x
- Fortin C, Wang F & Pitre D (2011) Critical review of platinum group elements (Pd, Pt, Rh) in aquatic ecosystems, Research report No R-1269. (Environment Canada), p 39.
- François L, Fortin C & Campbell PGC (2007) pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through

- non-competitive interactions: Implications for an algal BLM. *Aquat. Toxicol.* 84(2):123-132. Doi: 10.1016/j.aquatox.2007.02.019
- Frank SN, Singer C & Sures B (2008) Metallothionein (MT) response after chronic palladium exposure in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Environ. Res.* 108(3):309-314. Doi: 10.1016/j.envres.2008.07.021
- Franklin NM, Stauber JL, Apte SC & Lim RP (2002) Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(4):742-751. Doi: 10.1897/1551-5028(2002)021<0742:eoicdo>2.0.co;2
- Franklin NM, Stauber JL, Markich SJ & Lim RP (2000) pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquat. Toxicol.* 48(2-3):275-289. Doi: 10.1016/s0166-445x(99)00042-9
- Godlewska-Zylkiewicz B (2004) Preconcentration and separation procedures for the spectrochemical determination of platinum and palladium. *Microchim. Acta* 147(4):189-210. Doi: 10.1007/s00604-004-0234-2
- Goldberg ED (1986) The mussel watch concept. *Environ. Monit. Assess.* 7(1):91-103. Doi: 10.1007/bf00398031
- Gomez B, Gomez M, Sanchez JL, Fernandez R & Palacios MA (2001) Platinum and rhodium distribution in airborne particulate matter and road dust. *Sci. Total Environ.* 269(1-3):131-144. Doi: 10.1016/s0048-9697(00)00826-3
- Gomez MB, Gomez MM & Palacios MA (2003) ICP-MS determination of Pt, Pd and Rh in airborne and road dust after tellurium coprecipitation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18(1):80-83. Doi: 10.1039/b209727n
- Harris EH, B. SD & G. W (2009) *The Chlamydomonas sourcebook*. Academic Press, Burlington, USA, 2e. 501 p
- Haus N, Zimmermann S, Wiegand J & Sures B (2007) Occurrence of platinum and additional traffic related heavy metals in sediments and biota. *Chemosphere* 66(4):619-629. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.07.097
- Helmers E & Kummerer K (1999) Platinum group elements in the environment - anthropogenic impact - Anthropogenic platinum fluxes: Quantification of sources and sinks, and outlook. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 6(1):29-36. Doi: 10.1007/bf02987118
- Hooda PS, Miller A & Edwards AC (2007) The distribution of automobile catalysts-cast platinum, palladium and rhodium in soils adjacent to roads and their uptake by grass. *Sci. Total Environ.* 384(1-3):384-392. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.05.040
- Iavicoli I, Bocca B, Carelli G, Caroli S, Caimi S, Alimonti A & Fontana L (2007) Biomonitoring of tram drivers exposed to airborne platinum, rhodium and palladium. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 81(1):109-114. Doi: 10.1007/s00420-007-0195-y
- Jarvis KE, Parry SJ & Piper JM (2001) Temporal and spatial studies of autocatalyst-derived platinum, rhodium, and palladium and selected vehicle derived trace elements in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 35(6):1031-1036. Doi: 10.1021/es0001512

- Johnson Matthey (2013) *Platinum 2013*. Johnson Matthey Public Limited Company, Royston, England
- Kielhorn J, Melber C, Keller D & Mangelsdorf I (2002) Palladium - A review of exposure and effects to human health. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 205(6):417-432. Doi: 10.1078/1438-4639-00180
- Kummerer K & Helmers E (1997) Hospital effluents as a source for platinum in the environment. *Sci. Total Environ*. 193(3):179-184. Doi: 10.1016/s0048-9697(96)05331-4
- Kummerer K, Helmers E, Hubner P, Mascart G, Milandri M, Reinthaler F & Zwakenberg M (1999) European hospitals as a source for platinum in the environment in comparison with other sources. *Sci. Total Environ*. 225(1-2):155-165. Doi: 10.1016/s0048-9697(98)00341-6
- Lavoie M, Le Faucheur S, Fortin C & Campbell PGC (2009) Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquat. Toxicol*. 92(2):65-75. Doi: 10.1016/j.aquatox.2008.12.007
- Locatelli C (2007) Voltammetric analysis of trace levels of platinum group metals principles and applications. *Electroanalysis* 19(21):2167-2175. Doi: 10.1002/elan.200704026
- Lustig S, Zang SL, Beck W & Schramel P (1998) Dissolution of metallic platinum as water soluble species by naturally occurring complexing agents. *Mikrochimica Acta* 129(3-4):189-194. Doi: 10.1007/bf01244740
- Macfie SM, Tarmohamed Y & Welbourn PM (1994) Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green-alga *Chlamydomonas reinhardtii* - the influences of the cell-wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 27(4):454-458. Doi: WOS:A1994PP45800003
- Moldovan M, Palacios MA, Gomez MM, Morrison G, Rauch S, McLeod C, Ma R, Caroli S, Alimonti A, Petrucci F, Bocca B, Schramel P, Zischka M, Pettersson C, Wass U, Luna M, Saenz JC & Santamaria J (2002) Environmental risk of particulate and soluble platinum group elements released from gasoline and diesel engine catalytic converters. *Sci. Total Environ*. 296(1-3):199-208. Doi: 10.1016/s0048-9697(02)00087-6
- Moldovan M, Rauch S, Gomez M, Palacios MA & Morrison GM (2001) Bioaccumulation of palladium, platinum and rhodium from urban particulates and sediments by the freshwater isopod *Asellus aquaticus*. *Water Res*. 35(17):4175-4183. Doi: 10.1016/s0043-1354(01)00136-1
- Moldovan M, Rauch S, Morrison GM, Gomez M & Palacios MA (2003) Impact of ageing on the distribution of platinum group elements and catalyst poisoning elements in automobile catalysts. *Surf. Interface Anal*. 35(4):354-359. Doi: 10.1002/sia.1541
- Moldovan M, Veschambre S, Amouroux D, Benech B & Donard OFX (2007) Platinum, palladium, and rhodium in fresh snow from the Aspe Valley (Pyrenees Mountains, France). *Environ. Sci. Technol*. 41(1):66-73. Doi: 10.1021/es061483v

- Mulholland R & Turner A (2011) Accumulation of platinum group elements by the marine gastropod *Littorina littorea*. *Environ. Pollut.* 159(4):977-982. Doi: 10.1016/j.envpol.2010.12.009
- NIST (2004) *Standard reference database 46 version 8.0*. National institute of standards and technology, Gaithersburg, USA
- O'Kelly CJ (2004) *PID Chlamydomonas index*. Université de Montréal), <http://megasun.bch.umontreal.ca/protists/chlamy/summary.html> (Consulté le 31 octobre 2013)
- Obata H, Yoshida T & Ogawa H (2006) Determination of picomolar levels of platinum in estuarine waters: A comparison of cathodic stripping voltammetry and isotope dilution-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 580(1):32-38. Doi: 10.1016/j.aca.2006.07.044
- Osterauer R, Fassbender C, Braunbeck T & Kohler HR (2011) Genotoxicity of platinum in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) and ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*). *Sci. Total Environ.* 409(11):2114-2119. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.01.060
- Osterauer R, Haus N, Sures B & Kohler HR (2009) Uptake of platinum by zebrafish (*Danio rerio*) and ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*) and resulting effects on early embryogenesis. *Chemosphere* 77(7):975-982. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.08.033
- Ovari M, Muranszky G, Zeiner M, Virag I, Steffan I, Mihucz VG, Tatar E, Caroli S & Zaray G (2007) Determination of Pt in urine of tram drivers by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchem J.* 87(2):159-162. Doi: 10.1016/j.microc.2007.07.005
- Palacios M, Gomez MM, Moldovan M, Morrison G, Rauch S, McLeod C, Ma R, Laserna J, Lucena P, Caroli S, Alimonti A, Petrucci F, Bocca B, Schramel P, Lustig S, Zischka M, Wass U, Stenbom B, Luna M, Saenz JC & Santamaria J (2000) Platinum-group elements: quantification in collected exhaust fumes and studies of catalyst surfaces. *Sci. Total Environ.* 257(1):1-15. Doi: 10.1016/s0048-9697(00)00464-2
- Pan SH, Sun YL, Zhang G & Chakraborty P (2013) Spatial distributions and characteristics of platinum group elements (PGEs) in urban dusts from China and India. *J. Geochem. Explor.* 128:153-157. Doi: 10.1016/j.gexplo.2013.02.002
- Paquin PR, Gorsuch JW, Apte S, Batley GE, Bowles KC, Campbell PGC, Delos CG, Di Toro DM, Dwyer RL, Galvez F, Gensemer RW, Goss GG, Hogstrand C, Janssen CR, McGeer JC, Naddy RB, Playle RC, Santore RC, Schneider U, Stubblefield WA, Wood CM & Wu KB (2002) The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 133(1-2):3-35. Doi: 10.1016/s1532-0456(02)00112-6
- Parent L & Campbell PGC (1994) Aluminum bioavailability to the green-alga *Chlorella pyrenoidosa* in acidified synthetic soft-water. *Environ. Toxicol. Chem.* 13(4):587-598. Doi: 10.1897/1552-8618(1994)13[587:abttga]2.0.co;2
- Powell KJ (2001) IUPAC stability constants database. (Academic software, Otley, England).

- Prichard HM & Fisher PC (2012) Identification of platinum and palladium particles emitted from vehicles and dispersed into the surface environment. *Environ. Sci. Technol.* 46(6):3149-3154. Doi: 10.1021/es203666h
- Prichard HM, Jackson MT & Sampson J (2008) Dispersal and accumulation of Pt, Pd and Rh derived from a roundabout in Sheffield (UK): From stream to tidal estuary. *Sci. Total Environ.* 401(1-3):90-99. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.03.037
- Puls C, Limbeck A & Hann S (2012) Bioaccessibility of palladium and platinum in urban aerosol particulates. *Atmos. Environ.* 55:213-219. Doi: 10.1016/j.atmosenv.2012.03.023
- Pyrzynska K (2000) Monitoring of platinum in the environment. *J. Environ. Monit.* 2(6):99N-103N. Doi: 10.1039/b007368g
- Rauch S & Fatoki OS (2013) Anthropogenic platinum enrichment in the vicinity of mines in the bushveld igneous complex, South Africa. *Water Air Soil Pollut.* 224(1). Doi: 10.1007/s11270-012-1395-y
- Rauch S, Hemond HF, Barbante C, Owari M, Morrison GM, Peucker-Ehrenbrink B & Wass U (2005) Importance of automobile exhaust catalyst emissions for the deposition of platinum, palladium, and rhodium in the Northern Hemisphere. *Environ. Sci. Technol.* 39(21):8156-8162. Doi: 10.1021/es050784m
- Rauch S & Morrison GM (2008) Environmental relevance of the platinum-group elements. *Elements* 4(4):259-263. Doi: 10.2113/gselements.4.4.259
- Rauch S, Paulsson M, Wilewska M, Blanck H & Morrison GM (2004) Short-term toxicity and binding of platinum to freshwater periphyton communities. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47(3):290-296. Doi: 10.1007/s00244-004-3197-8
- Ravindra K, Bencs L & Van Grieken R (2004) Platinum group elements in the environment and their health risk. *Sci. Total Environ.* 318(1-3):1-43. Doi: 10.1016/s0048-9697(03)00372-3
- Ribeiro AP, Figueiredo AMG, Sarkis JES, Hortellani MA & Markert B (2012) First study on anthropogenic Pt, Pd, and Rh levels in soils from major avenues of Sao Paulo City, Brazil. *Environ. Monit. Assess.* 184(12):7373-7382. Doi: 10.1007/s10661-011-2506-8
- Roy G (2009) *Les éléments du groupe du platine (Pd, Pt et Rh) dans les eaux de surface et leur toxicité chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii*. Mémoire de maîtrise (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Québec). 145 p
- Schafer J, Hannker D, Eckhardt JD & Stuben D (1998a) Uptake of traffic-related heavy metals and platinum group elements (PGE) by plants. *Sci. Total Environ.* 215(1-2):59-67. Doi: 10.1016/s0048-9697(98)00115-6
- Schafer J & Puchelt H (1998b) Platinum-Group-Metals (PGM) emitted from automobile catalytic converters and their distribution in roadside soils. *J. Geochem. Explor.* 64(1-3):307-314. Doi: 10.1016/s0375-6742(98)00040-5
- Sebek O, Mihaljevic M, Strnad L, Ettler V, Jezek J, Stedry R, Drahota P, Ackerman L & Adamec V (2011) Dissolution kinetics of Pd and Pt from automobile catalysts by naturally occurring complexing agents. *J. Hazard. Mater.* 198:331-339. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.10.051

- Sen IS & Peucker-Ehrenbrink B (2012) Anthropogenic disturbance of element cycles at the earth's surface. *Environ. Sci. Technol.* 46(16):8601-8609. Doi: 10.1021/es301261x
- Shoukry MM, Khairy EM & Saeed A (1988) Mixed-ligand complexes of palladium(II) with diethylenetriamine. *J. Coord. Chem.* 17(4):305-310. Doi: 10.1080/00958978808073921
- Simpson SL, Roland MGE, Stauber JL & Batley GE (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(9):2073-2079. Doi: 10.1897/02-418
- Singer C, Zimmermann S & Sures B (2005) Induction of heat shock proteins (hsp70) in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to platinum group metals (platinum, palladium and rhodium): Comparison with lead and cadmium exposures. *Aquat. Toxicol.* 75(1):65-75. Doi: 10.1016/j.aquatox.2005.07.004
- Sousanis J (2011) *World vehicle population tops 1 billion units*. Wards auto), http://wardsauto.com/ar/world_vehicle_population_110815 (Consulté le 3 novembre 2013)
- Soyol-Erdene TO, Huh Y, Hong S & Do Hur S (2011) A 50-year record of platinum, iridium, and rhodium in Antarctic snow: volcanic and anthropogenic sources. *Environ. Sci. Technol.* 45(14):5929-5935. Doi: 10.1021/es2005732
- Steemann E & Kampniel.L (1970) Influence of deleterious concentrations of copper on growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiol. Plant.* 23(4):828-&. Doi: WOS:A1970H308200021
- Sures B & Zimmermann S (2007) Impact of humic substances on the aqueous solubility, uptake and bioaccumulation of platinum, palladium and rhodium in exposure studies with *Dreissena polymorpha*. *Environ. Pollut.* 146(2):444-451. Doi: 10.1016/j.envpol.2006.07.004
- Sures B, Zimmermann S, Messerschmidt J & Von Bohlen A (2002) Relevance and analysis of traffic related platinum group metals (Pt, Pd, Rh) in the aquatic biosphere, with emphasis on palladium. *Ecotoxicology* 11(5):385-392. Doi: 10.1023/a:1020517624371
- Sures B, Zimmermann S, Messerschmidt J, von Bohlen A & Alt F (2001) First report on the uptake of automobile catalyst emitted palladium by European eels (*Anguilla anguilla*) following experimental exposure to road dust. *Environ. Pollut.* 113(3):341-345. Doi: 10.1016/s0269-7491(00)00185-8
- Sures B, Zimmermann S, Sonntag C, Stuben D & Taraschewski H (2003) The acanthocephalan *Paratenuisentis ambiguus* as a sensitive indicator of the precious metals Pt and Rh from automobile catalytic converters. *Environ. Pollut.* 122(3):401-405. Doi: 10.1016/s0269-7491(02)00306-8
- Twigg MV (2011) Catalytic control of emissions from cars. *Catal. Today* 163(1):33-41. Doi: 10.1016/j.cattod.2010.12.044
- Van de Velde K, Barbante C, Cozzi G, Moret I, Bellomi T, Ferrari C & Boutron C (2000) Changes in the occurrence of silver, gold, platinum, palladium and rhodium in Mont Blanc ice and snow since the 18th century. *Atmos. Environ.* 34(19):3117-3127. Doi: 10.1016/s1352-2310(99)00434-3

- Vannini C, Domingo G, Marsoni M, Fumagalli A, Terzaghi R, Labra M, De Mattia F, Onelli E & Bracale M (2011) Physiological and molecular effects associated with palladium treatment in *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquat. Toxicol.* 102(1-2):104-113. Doi: 10.1016/j.aquatox.2011.01.002
- Wedepohl KH (1995) The composition of the continental crust. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59(7):1217-1232. Doi: WOS:A1995QT16600001
- Wichmann H, Anquandah GAK, Schmidt C, Zachmann D & Bahadir MA (2007) Increase of platinum group element concentrations in soils and airborne dust in an urban area in Germany. *Sci. Total Environ.* 388(1-3):121-127. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.07.064
- Wilde KL, Stauber JL, Markich SJ, Franklin NM & Brown PL (2006) The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51(2):174-185. Doi: 10.1007/s00244-004-0256-0
- Wiseman CLS & Zereini F (2009) Airborne particulate matter, platinum group elements and human health: A review of recent evidence. *Sci. Total Environ.* 407(8):2493-2500. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.12.057
- Wood SA, Mountain BW & Pan P (1992) The aqueous geochemistry of platinum, palladium and gold - recent experimental constraints and a reevaluation of theoretical predictions. *Can. Mineral.* 30(4):955-982. Doi: WOS:A1992KW49000001
- Zenk MH (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - A review. *Gene* 179(1):21-30. Doi: 10.1016/s0378-1119(96)00422-2
- Zereini F, Alsenz H, Wiseman CLS, Puttmann W, Reimer E, Schleyer R, Bieber E & Wallasch M (2012a) Platinum group elements (Pt, Pd, Rh) in airborne particulate matter in rural vs. urban areas of Germany: Concentrations and spatial patterns of distribution. *Sci. Total Environ.* 416:261-268. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.11.070
- Zereini F, Skerstupp B, Alt F, Helmers E & Urban H (1997) Geochemical behaviour of platinum-group elements (PGE) in particulate emissions by automobile exhaust catalysts: experimental results and environmental investigations. *Sci. Total Environ.* 206(2-3):137-146. Doi: 10.1016/s0048-9697(97)80005-8
- Zereini F, Wiseman C & Puttmann W (2007) Changes in palladium, platinum, and rhodium concentrations, and their spatial distribution in soils along a major highway in Germany from 1994 to 2004. *Environ. Sci. Technol.* 41(2):451-456. Doi: 10.1021/es061453s
- Zereini F, Wiseman CLS & Puttmann W (2012b) *In vitro* investigations of platinum, palladium, and rhodium mobility in urban airborne particulate matter (PM₁₀, PM_{2.5}, and PM₁) using simulated lung fluids. *Environ. Sci. Technol.* 46(18):10326-10333. Doi: 10.1021/es3020887
- Zimmermann S, Alt F, Messerschmidt J, von Bohlen A, Taraschewski H & Sures B (2002) Biological availability of traffic-related platinum-group elements (palladium, platinum, and rhodium) and other metals to the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in water containing road dust. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(12):2713-2718. Doi: 10.1897/1551-5028(2002)021<2713:baotrp>2.0.co;2

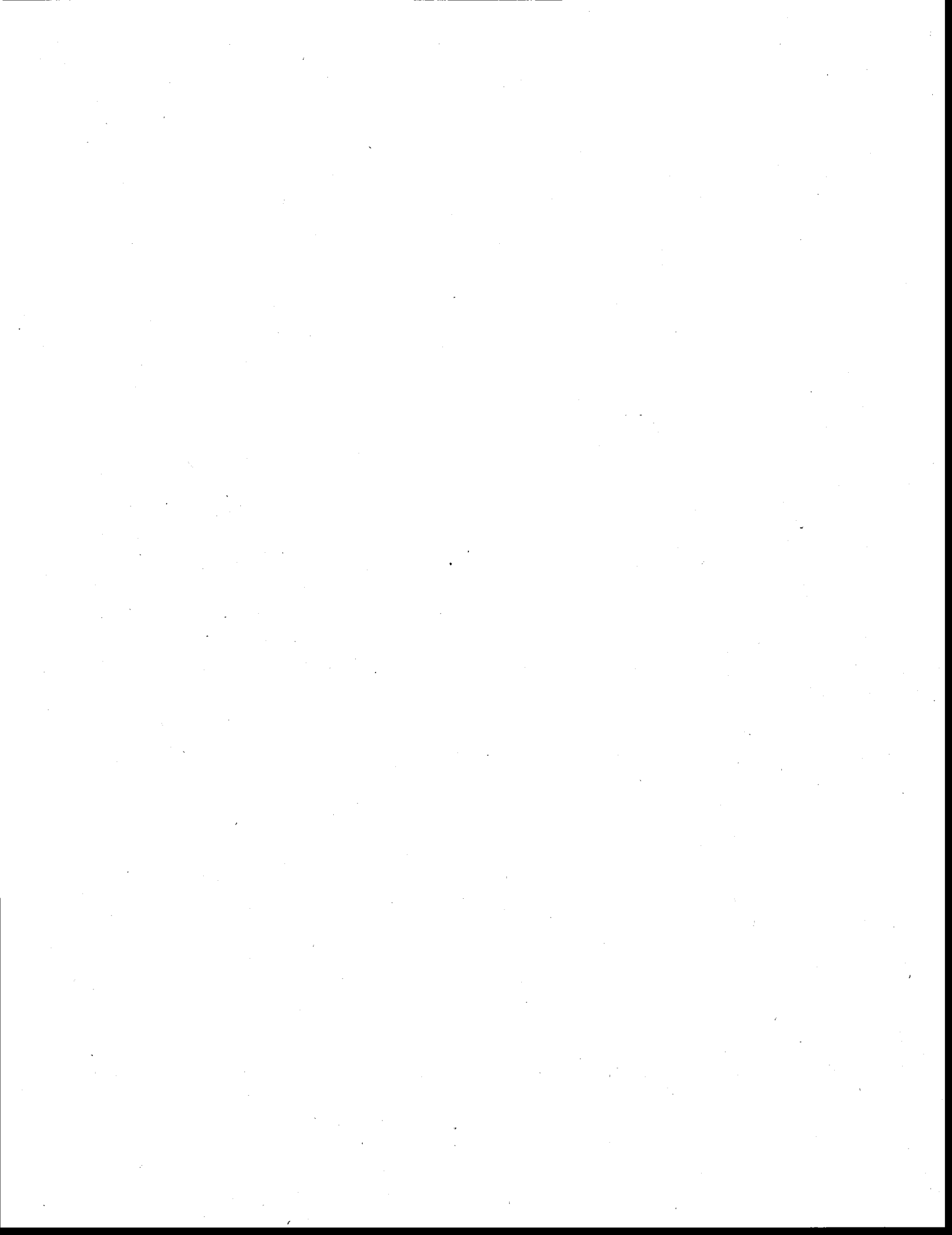
- Zimmermann S, Baumann U, Taraschewski H & Sures B (2004) Accumulation and distribution of platinum and rhodium in the European eel *Anguilla anguilla* following aqueous exposure to metal salts. *Environ. Pollut.* 127(2):195-202. Doi: 10.1016/j.envpol.2003.08.006
- Zimmermann S, Messerschmidt J, von Bohlen A & Sures B (2005) Uptake and bioaccumulation of platinum group metals (Pd, Pt, Rh) from automobile catalytic converter materials by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Environ. Res.* 98(2):203-209. Doi: 10.1016/j.envres.2004.08.005



ANNEXE A

Tableau A1 : Schéma expérimental global

| Expérience | Milieu de culture | pH | M | [M ²⁺] µg L ⁻¹ | [NH ⁴⁺] µM | [Ca ²⁺] mM | Mesure de la prise en charge |
|------------|----------------------|-----|----|--|---------------------------|---------------------------|------------------------------|
| D6 | MHSM-1 | 6,0 | Pd | 0, 2, 5, 10, 15, 20 et 30 | 937 | 0,068 | oui |
| D7 | MHSM-1 | 7,0 | Pd | 0, 2, 5, 10, 15, 20 et 30 | 937 | 0,068 | oui |
| D8 | MHSM-1 | 8,0 | Pd | 0, 2, 5, 10, 15, 20 et 30 | 937 | 0,068 | oui |
| T6 | MHSM-1 | 6,0 | Pt | 0, 5, 10, 20, 30, 50 et 100 | 937 | 0,068 | oui |
| T7 | MHSM-1 | 7,0 | Pt | 0, 5, 10, 20, 30, 50 et 100 | 937 | 0,068 | non |
| T8 | MHSM-1 | 8,0 | Pt | 0, 5, 10, 20, 30, 50 et 100 | 937 | 0,068 | oui |
| NH7 | MHSM-NH ₄ | 7,0 | Pd | 0, 2, 5, 10, 15, 20 et 30 | 94 | 0,068 | non |
| NH8 | MHSM-NH ₄ | 8,0 | Pd | 0, 2, 5, 10, 15, 20 et 30 | 94 | 0,068 | non |
| Ca | MHSM-Ca | 7,0 | Pd | 0 et 20 | 937 | 0,068, 0,5, 1,0 et 2,0 | non |



ANNEXE B

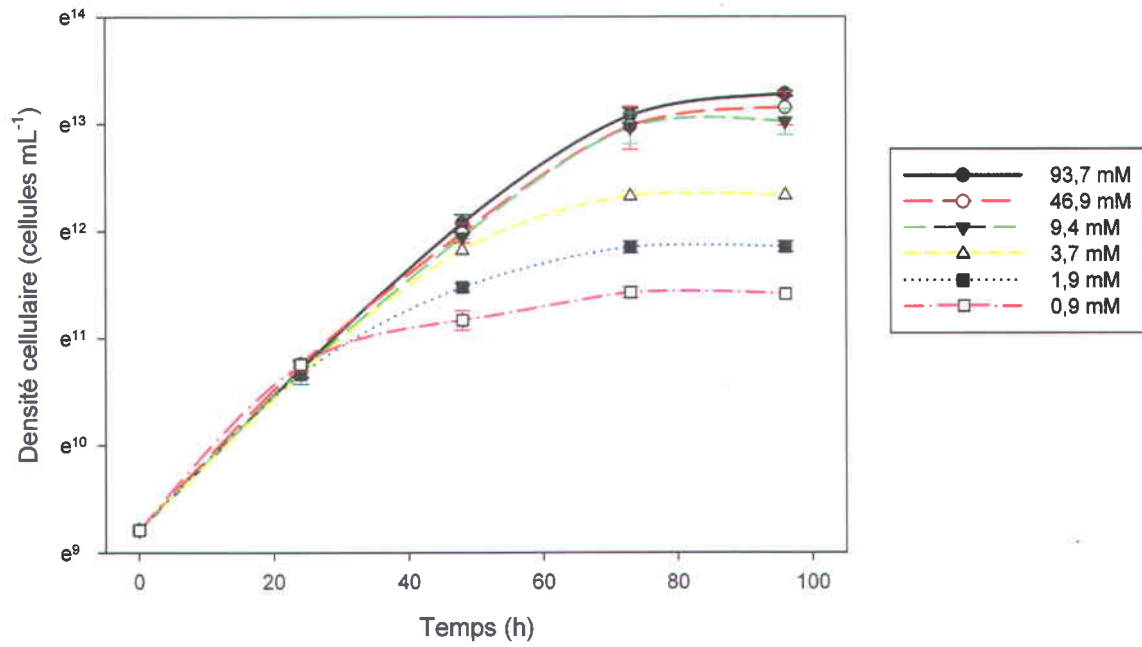


Figure B1 : Courbe de croissance de *C. reinhardtii* à différentes concentrations d'ammonium à pH 7,0.



ANNEXE C

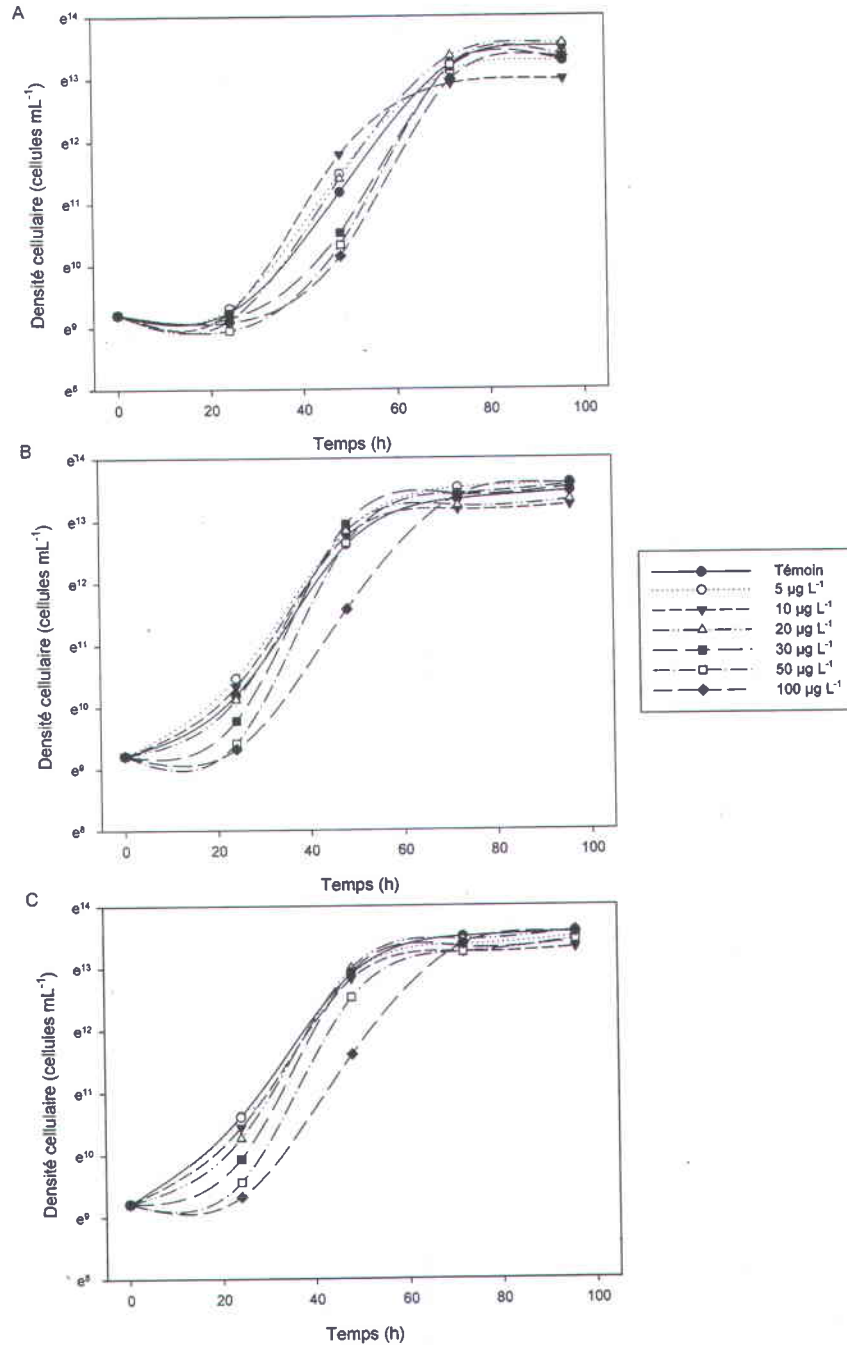


Figure C1 : Courbes de croissance de *C. reinhardtii* exposée à différentes concentrations de Pt à pH 8,0 pour les échantillons a (A), b (B) et c (C). Pour les échantillons « a », il n'y a aucune croissance cellulaire mesurée à 24 h, y compris pour le témoin, alors que la densité cellulaire à 24 h des échantillons « b » et « c » est modulée par la concentration de platine dans le milieu de culture.

