

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

**ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DE DEUX LANTHANIDES (La et Ce) CHEZ LES ALGUES
VERTES UNICELLULAIRES À L'AIDE D'UNE SOURCE ORGANIQUE DE PHOSPHORE**

Par
Bienvenu Nguimgou Signing

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	Maikel Rosabal Rodriguez INRS-ETE
Examineur externe	David Dewez Université du Québec à Montréal
Directeur de recherche	Claude Fortin INRS-ETE
Codirecteur de recherche	Peter G. C. Campbell INRS-ETE

REMERCIEMENTS

La recherche scientifique nécessite l'intervention et la collaboration de plusieurs personnes. Qu'il me soit permis d'exprimer ma gratitude à certaines personnes pour leurs précieux apports à l'élaboration de ce mémoire.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à mon directeur de recherche, Claude Fortin, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir donné la chance de découvrir le domaine passionnant de l'Écotoxicologie. Je lui exprime également ma profonde gratitude pour sa disponibilité et son constant soutien dans les moments délicats.

Je tiens aussi à remercier mon codirecteur, Peter Campbell, d'avoir accordé tant de temps et donné de si précieux conseils dans mon travail.

Je suis reconnaissant du soutien financier qui m'a été accordé par le CRSNG, Environnement Canada et la Chaire de recherche du Canada en Biogéochimie des éléments traces.

Cette maîtrise n'aurait pas été la même sans le soutien technique de l'équipe du laboratoire pour le support avec l'ICP-AES et pour toujours avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions. Je tiens à remercier personnellement Julie Perrault, Anissa Bensadoune et Jean-François Dutil.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à Sébastien Leguay; merci de l'apprentissage en laboratoire qui m'a permis de commencer mes travaux de recherche.

Je remercie mes collègues avec qui j'ai partagé le laboratoire. Je pense particulièrement à Émeric Kochoni, Kim Racine, Camille Guilleux et Fengjie Liu pour leur assistance.

J'ai toujours bénéficié d'affection de mes enfants et du soutien moral de mon épouse Christelle Carine Fumba qui est pour moi une source d'amour, que ce mémoire raffermisse plus encore nos liens.

Je n'oublierai pas tous ceux qui m'ont apporté leur aide de toute nature pour la réussite de ce travail.

RÉSUMÉ

Les Terres Rares (TR) sont exploitées dans le domaine de la haute technologie, entraînant le rejet de nombreux éléments potentiellement toxiques. Cependant, les effets écotoxicologiques des formes solubles des TR ont été peu étudiés, ce qui constitue un frein à une évaluation adéquate du risque environnemental. Ainsi, le Québec dispose des mines de TR qui devront être exploitées prochainement. Dans cette étude, la spéciation de deux lanthanides (lanthane (La) et cérium (Ce)) a été reliée à leurs effets toxiques. Les phosphates (PO_4^{3-}) sont des ions essentiels dans les milieux de culture d'algues et ont de fortes affinités avec les lanthanides pouvant entraîner la complexation ou la précipitation du métal d'intérêt. Le projet consistait à tester une nouvelle approche pour mesurer la toxicité de La et Ce chez l'algue verte *Chlorella fusca* en présence d'une source organique de phosphore. L'exposition était d'une durée de 120 h à pH 5,5. Les concentrations nominales de La et de Ce étaient comprises entre 10 et 70 000 nM. Les concentrations expérimentales ont été mesurées principalement par la technique de spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES) et la spéciation des métaux dans les milieux d'exposition a été modélisée à l'aide du logiciel MINEQL+ 5.0. La densité cellulaire a été mesurée à tous les 24 h à l'aide d'un compteur de particules. Les résultats démontrent que le β -glycérol phosphate (à une concentration initiale de 5×10^{-6} M) représente une option opportune pour étudier la toxicité de métaux peu solubles en présence de phosphates. Tel qu'anticipé, l'inhibition de la croissance de *C. fusca* croît avec l'augmentation de l'accumulation de La et de Ce et les CE50 ont été calculées en fonction du rendement final. En absence de tampon, des concentrations efficaces moyennes (CE50) de 570 [190-1050] nM et de 280 [60-630] nM de lanthane ont été obtenues, selon que celles-ci soient exprimées en fonction de la concentration totale ou libre, respectivement. Dans le cas du cérium, ces valeurs étaient de 530 [430-670] nM et 160 [90-250] nM respectivement. Les expériences de toxicité en présence d'acide malique suggèrent que l'ion libre est un indicateur adéquat pour estimer la toxicité. En présence de 10^{-4} M d'acide malique, une CE50 de 360 [140-780] nM de lanthane a été obtenue en fonction de la concentration totale. Toutefois la distribution des points n'a pas permis d'extraire une valeur basée sur la concentration de La^{3+} libre. Pour le cérium, ces valeurs étaient de 3900 [2010-6750] nM et 100 [30-200] nM respectivement. Un effet d'hormèse a été observé à des concentrations ≤ 50 nM La en absence d'acide malique et à des concentrations ≤ 500 nM Ce en présence et en absence d'acide malique. Les concentrations environnementales de La et de Ce peuvent se rapprocher des CE50 calculées et la contamination de l'environnement laisse supposer une augmentation des concentrations dans l'eau qui pourraient nuire aux écosystèmes aquatiques dans un proche avenir. Ces résultats démontrent que la nature chimique du milieu d'exposition est d'une importance indéniable lors des tests de toxicité. Ces travaux suggèrent que l'activité de l'ion métal libre en solution reflète la réponse de l'algue au métal. Cette réponse est un paramètre déterminant sur la biodisponibilité et la toxicité des métaux.

Mots-clés : *Chlorella fusca*, pH, phosphore organique, lanthane, cérium, ligand, accumulation, toxicité.

ABSTRACT

The Rare Earth Elements (REEs) are exploited in high-tech applications resulting in the discharge of many toxic elements. However, the ecotoxicological effects of soluble forms of REE have been little studied, which prevents adequate environmental risk assessment. Quebec has REE mines projected to open in the coming years. In this study, the speciation of two lanthanides (lanthanum (La) and cerium (Ce)) was related to their toxic effects. Phosphate (PO_4^{3-}) is an essential ion in algal culture media and has strong affinities for lanthanides, which may result in the complexation or precipitation of the metal of interest. This project involved testing a new approach to determine toxicity toward a green alga, *Chlorella fusca*, in the presence of an organic source of phosphorus. Exposure time was 120 hours and the pH was 5.5. Nominal concentrations of La and Ce ranged from 10 to 70,000 nM. Experimental concentrations were measured primarily using the inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) technique and the speciation of the metals in the exposure media was modeled using MINEQL+ 5.0 software. The cell density was measured every 24 h using a particle counter. The results demonstrate that β -glycerol phosphate (at an initial concentration of 5×10^{-6} M) is an interesting alternative to inorganic phosphate for studying the toxicity of metals of low solubility in the presence of phosphates. As expected, growth inhibition of *C. fusca* increased with increasing accumulation of La and Ce. The EC50 was calculated based on the final yield. In the absence of buffer, mean effective concentrations (EC50) of 570 [190-1050] nM and 280 [60-630] nM were obtained for lanthanum, depending on whether they were expressed as a function of the total or free-ion concentration, respectively. In the case of cerium, these values were 530 [430-670] nM and 160 [90-250] nM respectively. Toxicological experiments in the presence of malic acid suggest that free ion is an adequate indicator to estimate toxicity. In the presence of 10^{-4} M malic acid, an EC50 of 360 [140-780] nM of lanthanum was obtained as a function of the total La concentration. However, the data distribution precluded the derivation of an EC50 value based on the free La^{3+} concentration. For cerium, these values were 3900 [2010-6750] nM and 100 [30-200] nM respectively. For lanthanum and cerium, a hormesis effect was observed at concentrations ≤ 50 nM and at concentrations ≤ 500 nM in the presence and absence of malic acid respectively. Environmental concentrations of La and Ce can be close to the calculated EC50s and future environmental contamination may lead to an increase in water concentrations that could adversely affect aquatic ecosystems in the near future. These results demonstrate that the chemical nature of the exposure medium is of undeniable importance in toxicity tests and suggest that the activity of the free metal ion in solution reflects the response of algae to metal. This response is a key determinant of the bioavailability and toxicity of metals.

Keywords: *Chlorella fusca*, pH, organic phosphorus, lanthanum, cerium, ligand, accumulation, toxicity.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
RÉSUMÉ.....	v
ABSTRACT.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES FIGURES.....	xvi
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Généralités.....	1
1.2 Les terres rares (TR).....	1
1.2.1 Définition et nomenclature.....	1
1.2.2 Origine et classification.....	2
1.2.3 Structure électronique, états d'oxydation et dérivés.....	3
1.2.4 Propriétés et applications.....	5
1.3 Historique et production mondiale.....	6
1.3.1 Cycle de production des terres rares.....	6
1.3.2 Exploitation des terres rares.....	7
1.3.3 Production des terres rares en Chine.....	8
1.3.4 Demande des terres rares.....	9
1.3.5 Potentiel minier au Canada.....	11
1.3.6 Problématique des TR.....	11
- Les TR dans les écosystèmes naturels.....	11
- Contamination anthropique des TR.....	12
- Sources de contamination.....	12
- Spéciation en milieu aqueux.....	13
- Hypothèse du Modèle de l'Ion Libre (MIL).....	14
1.4 Phosphore dans les milieux de culture.....	15
1.5 Bioconcentration et toxicité des lanthanides.....	16
1.5.1 Concentration et toxicité chez les plantes terrestres.....	16
1.5.2 Effets sur les écosystèmes aquatiques.....	18
1.5.3 Chez les microorganismes.....	19
1.6 Objectifs et hypothèse de la recherche.....	20

1.6.1 Objectifs.....	20
1.6.2 Hypothèses	21
CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	23
2.1 Choix de l'espèce	23
2.1.1 <i>Chlorella fusca</i>	23
2.1.2 Entretien des algues	24
2.2 Milieux de culture.....	24
2.2.1 Composition des milieux de culture	24
2.2.2 Produits, réactifs et préparations des milieux de culture	26
2.2.3 Choix des concentrations du phosphore organique dissous des milieux de culture ...	27
2.2.4 Milieu et dosage des orthophosphates.....	28
2.2.5 Milieu de rinçage (MHSM-R)	29
2.2.6 Milieu d'exposition (MHSM-E) au lanthane et au cérium.....	29
2.2.7 Modélisation thermodynamique	30
2.3 Tests de toxicité.....	31
2.3.1 Matériel de laboratoire	31
2.3.2 Pré-Inoculation	32
2.3.3 Exposition des algues	32
2.3.4 Paramètres de suivi	33
- Dosage des métaux à l'ICP-AES	33
- Décompte cellulaire.....	33
2.4 Internalisation des métaux par l'algue	34
2.4.1 Récupération des filtrats et des algues	34
2.4.2 Digestion des algues à l'acide nitrique (HNO ₃) à 70 %	34
2.5 Méthodes analytiques des lanthanides.....	35
2.5.1 Technique d'analyse	35
2.5.2 Dosage à l'ICP-AES.....	35
- Le principe de l'émission atomique.....	36
- La source et composition d'un spectromètre ICP-AES	36
- Paramètres de l'ICP-AES	37
2.6 Exploitation des données	38
2.6.1 Analyse statistique	38

2.6.2 Calculs des CE50	38
CHAPITRE 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	39
3.1 Effet du phosphore.....	39
3.1.1 Tests de croissance des algues	39
3.1.2 Choix de la concentration du phosphore organique.....	40
3.1.3 Milieu et dosage des orthophosphates.....	41
3.2 Exposition de <i>C. fusca</i> au lanthane.....	42
3.2.1 Spéciation du La.....	42
3.2.2 Comportement du La dans le milieu d'exposition	43
3.2.3 Exposition au La en absence d'acide malique	47
- Effet sur la croissance.....	47
3.2.4 Exposition au La en présence de l'acide malique.....	49
- Effet sur la croissance.....	49
- Ion libre et internalisation	51
- Ion libre.....	52
- Internalisation	55
3.3 Exposition de <i>C. fusca</i> au cérium.....	57
3.3.1 Spéciation du Ce	57
3.3.2 Comportement du Ce dans le milieu d'exposition.....	59
3.3.3 Exposition au Ce en absence de tampon (acide malique).....	62
- Effet sur la croissance.....	62
3.3.4 Exposition au Ce en présence d'acide malique	64
- Effet sur la croissance.....	64
- Ion libre et internalisation	67
- Ion libre.....	67
- Internalisation	70
CHAPITRE 4. CONCLUSION	73
CHAPITRE 5. RÉFÉRENCES.....	75
ANNEXE	83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Tableau comparatif de la concentration de La, Ce et Nd, et certains métaux industriels (Cu, Pb, Sn) dans la croûte terrestre (parties par million, ppm) (CNUCED - Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement, 2014).	3
Tableau 1.2 : Configurations électroniques des lanthanides et de leurs ions trivalents	4
Tableau 1.3 : Rayons ioniques de quelques métaux. Tirés de (Cotton, 2006) et de (Lueking <i>et al.</i> , 2004).....	4
Tableau 1.4 : Principales utilisations des différents TR (adapté de Christmann (2012); Hayes-Labruto <i>et al.</i> (2013); Humphries (2012), (Weber & Reisman, 2012))	7
Tableau 1.5 : Concentrations de lanthane et d'euporium dans les différentes parties des haricots (n= 5) en mg/L (Brioschi, 2012).	17
Tableau 1.6 : Concentrations en ppb pour les TR mesurées chez les plantes annuelles (Brioschi, 2012).....	17
Tableau 2.1 : Composition et concentrations des solutions intermédiaires utilisées pour la préparation des milieux de culture (MHSM-1), (MHSM-2), d'exposition (MHSM-E) et de rinçage (MHSM-R).	25
Tableau 2.2 : Volumes de solutions intermédiaires utilisés pour la préparation des milieux MHSM-1, MHSM-2, MHSM-E et MHSM-R.	26
Tableau 2.3 : Concentrations des espèces dans chacun des milieux	27
Tableau 2.4 : La composition et les proportions des produits utilisés pour la préparation du réactif molybdique	28
Tableau 2.5: Volumes de dilution de la solution mère de phosphates monobasique de potassium	29
Tableau 2.6 : Concentrations totales (nominales) et libres (calculées) des ions en solution pour le milieu MHSM-2.....	30
Tableau 2.7 : Constantes de formation de complexes de La et de Ce (tirées de MINEQL+ version 5.0.).....	31
Tableau 2.8: Concentrations en lanthane et cérium dans les échantillons de référence <i>Aquatic Plant</i> (BCR 670, valeurs certifiées et masse analysée)	35
Tableau 3.1 : L'absorbance des différentes solutions de phosphates monobasiques de potassium	41
Tableau 3.2 : Concentration et proportion des complexes formés dans le milieu d'exposition en absence du tampon (acide malique) à une concentration de 1 μ M de lanthane.....	42

Tableau 3.3 : Concentration et proportion des complexes formés dans le milieu d'exposition en présence du tampon (acide malique, 100 μM) à une concentration de 1 μM de lanthane.	43
Tableau 3.4 : La valeur de CE50 de La pour <i>C. fusca</i> en absence de malate et son intervalle de confiance après 120 h d'exposition.....	49
Tableau 3.5 : Les valeurs de CE50 de La pour <i>C. fusca</i> en présence d'acide malique et leurs intervalles de confiance à différents temps d'exposition.	51
Tableau 3.6 : Les valeurs de concentrations efficaces de La^{3+} libre pour <i>C. fusca</i> en absence d'acide malique et leurs intervalles de confiance après 120 h d'exposition.	53
Tableau 3.7 : Concentrations et proportions des complexes formés dans le milieu d'exposition sans acide malique à une concentration totale de cérium de 1 μM	58
Tableau 3.8 : Concentrations et proportions des complexes formés dans le milieu d'exposition en présence d'acide malique (100 μM) à une concentration totale de cérium de 1 μM	58
Tableau 3.9 : La valeur de CE50 de Ce pour <i>C. fusca</i> en absence d'acide malique et son intervalle de confiance après 120 h d'exposition.....	63
Tableau 3.10 : Les valeurs de CE50 de Ce pour <i>C. fusca</i> en présence d'acide malique et leurs intervalles de confiance à différents temps d'exposition.	66
Tableau 3.11 : Les valeurs de CE50 de Ce^{3+} libre pour <i>C. fusca</i> en absence et en présence de ligand (acide malique) et leurs intervalles de confiance après 120 h d'exposition.	68

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Tableau périodique montrant la répartition des terres rares (en vert) (Hatch, 2013)	2
Figure 1.2: Évolution historique de la production mondiale de terres rares, 1900-2012 (tonnes) (Secrétariat de la CNUCED d'après l'United States Geological Survey, 2014). Les données relatives à la production mondiale s'entendent en tonne d'oxydes de terres rares (OTR).....	8
Figure 1.3 : Répartition de la production minière des TR en 2014. Tirée de (Roskill, 2015).....	9
Figure 1.4 : Évolution et prévision de la demande et de la production de terres rares par la Chine et par le reste du monde (ROW). Les prévisions sont indiquées par un «f» (forecast) après l'année. (Kingsnorth, 2013)	10
Figure 1.5 : Répartition schématique des phénomènes influant la spéciation des métaux dans les milieux naturels (Buffle, 1989).	13
Figure 1.6 : Représentation conceptuelle des interactions métaux-organismes et ses différentes étapes. M^{z+} = ion libre ; ML = métal complexé ; L^z = ligand (acide aminé, citrate, $S_2O_3^{2-}$, CO_3^{2-} , Cl^-) ; M-X = métal complexé à la surface (Campbell <i>et al.</i> , 2002).....	15
Figure 1.7: Effet dose/réponse des TR (Borzelleca, 2000)	18
Figure 1.8 : Schéma conceptuel du cheminement du phosphate en solution pour la culture d'une algue verte en présence d'une source organique de phosphore (P_{org}).....	22
Figure 2.1: Visualisation de <i>Chlorella fusca</i> au microscope optique à 1000x (a) (tirée de Beaubien 2015) et photo de <i>C. fusca</i> en milieu de culture (b) (Cliché de Nguimgou, 2016).	23
Figure 2.2 : Schéma de principe de l'excitation et de l'émission tiré de Ghellai (2015).	36
Figure 2.3 : Schéma de l'appareillage d'un spectromètre ICP-AES (http://www.pa.ingv.it/laboratori/tracce/elementi.html).	37
Figure 3.1 : Croissance de l'algue verte <i>Chlorella fusca</i> avec deux sources de phosphore (phosphore inorganique dissous (PID) ; phosphore organique dissous (POD)) à différentes concentrations en fonction du temps.	39
Figure 3.2 : Croissance de la population d'algues avec du phosphate organique dissous à différentes concentrations (0,5 ; 1; 5 et 10 μ M) après 5 jours.	40
Figure 3.3 : Courbe d'étalonnage des ions phosphate.....	41
Figure 3.4 : Concentrations de lanthane en absence d'algues et d'acide malique après 24 et 120 h d'exposition à 10, 50, 100, 500, 1000 et 5 000 nM.	45
Figure 3.5 : Concentrations de lanthane en présence d'algues et en absence d'acide malique après 24 et 120 heures d'exposition à 10, 50, 100, 500, 1 000 et 5 000 nM de lanthane.	45

Figure 3.6 : Concentrations de lanthane en présence d'algues et d'acide malique après 120 heures d'exposition à 50, 150, 500, 1 200 nM (a) et 3 500, 10 000, 40 000, 70 000 nM (b) de lanthane.....	46
Figure 3.7 : Concentrations de lanthane en solution en présence d'algues et en absence d'acide malique après 120 heures d'exposition à 100, 500, 1 000 nM et 5 000 nM de lanthane.....	47
Figure 3.8 : Courbe de croissance de <i>C. fusca</i> exposée à différentes concentrations de lanthane en absence de ligands (acide malique) en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures.	48
Figure 3.9 : Concentrations cellulaires aux témoins en fonction de la concentration de lanthane mesurée en solution après 120 h d'exposition sans ligand (acide malique).....	49
Figure 3.10 : Courbe de croissance de <i>Chlorella fusca</i> exposée à différentes concentrations de lanthane en présence d'acide malique en fonction du temps.....	50
Figure 3.11 : Concentrations cellulaires en présence de 10^{-4} M acide malique en fonction de la concentration mesurée de lanthane après 96 h (a) et 120 h (b) d'exposition.	52
Figure 3.12 : Concentrations cellulaires en fonction de la concentration d'ion libre de La en solution après 120 h d'exposition en absence d'acide malique.	54
Figure 3.13 : Concentrations cellulaires en présence d'acide malique et en fonction de la concentration d'ion libre de La en solution après 120 h d'exposition.....	54
Figure 3.14 : Les concentrations cellulaires en présence d'acide malique et en fonction de la concentration intracellulaire de La après 120 h d'exposition.....	55
Figure 3.15 : Les concentrations intracellulaires en La après 120 h d'exposition en présence d'acide malique et en fonction de la concentration moyenne de La en solution après 120 h d'exposition.	56
Figure 3.16 : Les concentrations intracellulaires en présence d'acide malique et en fonction de la concentration d'ion libre La^{3+} en solution après 120 h d'exposition.	57
Figure 3.17 Concentrations de Ce en présence d'algues et en absence d'acide malique après 24 et 120 h d'exposition à 10, 50, 100, 500, 1 000 et 5 000 nM.	59
Figure 3.18 : Concentrations de Ce en absence d'algues et d'acide malique après 24 et 120 heures d'exposition à 10, 50 et 100 nM.....	60
Figure 3.19 : Concentrations de cérium en présence d'algues et d'acide malique après 120 heures d'exposition à 50, 150, 500, 1 200 (a), 3 500, 10 000, 40 000 et 70 000 nM (b).....	61
Figure 3.20 : Courbes de croissance de <i>Chlorella fusca</i> exposée à différentes concentrations de Ce sans acide malique en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures.....	63
Figure 3.21 : Concentrations cellulaires en absence d'acide malique et en fonction de la concentration de Ce mesurée en solution après 120 h d'exposition.....	64

Figure 3.22. Courbes de croissance de <i>Chlorella fusca</i> exposée à différentes concentrations de Ce en présence du ligand (acide malique) en fonction du temps.	65
Figure 3.23 : Concentrations cellulaires en présence de 10^{-4} M d'acide malique et en fonction de la concentration mesurée de Ce en solution après 120 h d'exposition.	66
Figure 3.24 : Concentrations cellulaires en absence d'acide malique et en fonction de la concentration d'ion libre de Ce^{3+} en solution après 120 h d'exposition.	68
Figure 3.25 : Concentrations cellulaires en présence d'acide malique et en fonction de la concentration d'ion libre de Ce^{3+} en solution après 120 h d'exposition.	69
Figure 3.26 : Les concentrations cellulaires en fonction de la concentration intracellulaire de Ce en présence de l'acide malique après 120 h d'exposition.	69
Figure 3.27 : Les concentrations intracellulaires de Ce exprimées en fonction de la concentration de Ce^{3+} libre en solution après 120 h d'exposition.	70
Figure 3.28 : Les concentrations intracellulaires de Ce après 120 h d'exposition en fonction de la moyenne de mesures faites à toutes les 24 h.	71
Figure A.1 : Les concentrations cellulaires en présence d'acide malique et en fonction de la concentration d'ion libre de La en solution après 96 h d'exposition.	83
Figure A.2 : Les concentrations cellulaires en présence d'acide malique et en fonction de la concentration d'ion libre de La en solution après 72 h d'exposition.	83

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 Généralités

Un producteur primaire correspond, dans un écosystème, à un être vivant autotrophe, c'est-à-dire capable de produire de la matière organique à partir de la matière minérale. Le producteur primaire se trouve tout en bas de la chaîne alimentaire aquatique et terrestre en servant de nourriture aux populations de niveaux trophiques supérieurs : zooplancton, micro-crustacés, vers, mollusques, poissons. Du point de vue de la forme et de la structure externe, plusieurs algues sont des organismes unicellulaires, éventuellement motiles, alors que d'autres forment des filaments cellulaires ou des lames simples et d'autres développent des architectures complexes et différenciées (Ramade, 2002). Cependant, ces organismes ne possèdent pas de tissus nettement individualisés, comme on peut en trouver parmi les végétaux terrestres vasculaires. Ces êtres unicellulaires sont des matériels biologiques avantageux pour estimer l'ensemble des nuisances écologiques provoquées par un produit, par leur abondance et de leurs propriétés métaboliques. Les algues sont aussi des accumulateurs de polluants (Perez *et al.*, 2000). L'effet d'un polluant sur ces micro-organismes se reflètera éventuellement sur les maillons supérieurs. Par ailleurs, ce sont des organismes unicellulaires relativement faciles à cultiver en laboratoire, leur croissance est rapide et les effets toxiques apparaissent dans des délais très courts (quelques minutes à quelques jours). Ceci explique pourquoi les écotoxicologues cherchent à utiliser les algues pour mener les essais biologiques en laboratoire permettant de prévoir les effets toxiques de divers contaminants. Les terres rares (TR), comme les autres métaux, sont des éléments chimiques naturellement présents dans la croûte terrestre à des concentrations variées (Tchounwou *et al.*, 2012) et les organismes vivants peuvent concentrer des TR, dépassant parfois leurs tolérances métaboliques (Kameda, 1962).

1.2 Les terres rares (TR)

1.2.1 Définition et nomenclature

Les TR forment un groupe de 17 éléments comprenant le scandium (Sc), l'yttrium (Y) et les éléments de la série des lanthanides (Ln), soit le lanthane (La), le cérium (Ce), le praséodyme (Pr), le néodyme (Nd), le prométhium (Pm), le samarium (Sm), l'euporium

(Eu), le gadolinium (Gd), le terbium (Tb), le dysprosium (Dy), l'holmium (Ho), l'erbium (Er), le thulium (Tm), l'ytterbium (Yb) et le lutécium (Lu). Leur structure électronique particulière leur procure des propriétés chimiques très similaires, ce qui les rend difficiles à séparer, et des propriétés physiques qui sont utilisées principalement dans les produits industriels et de nouvelles technologies vertes (Dam *et al.*, 2007). On les retrouve à la sixième période et la troisième colonne de la table de Mendeleïev (Figure 1.1).

1																	18	
1 H 1.007 - 1.008																	2 He 4.003	
3 Li 6.939 - 6.967	4 Be 9.012	atomic number Symbol standard atomic weight										5 B 10.80 - 10.83	6 C 12.00 - 12.02	7 N 14.00 - 14.01	8 O 15.99 - 16.00	9 F 18.99 - 19.00	10 Ne 20.18	
11 Na 22.99	12 Mg 24.31											13 Al 26.98	14 Si 28.08 - 28.09	15 P 30.97	16 S 32.05 - 32.08	17 Cl 35.44 - 35.46	18 Ar 39.95	
19 K 39.10	20 Ca 40.08	21 Sc 44.96	22 Ti 47.87	23 V 50.94	24 Cr 52.00	25 Mn 54.94	26 Fe 55.85	27 Co 58.93	28 Ni 58.69	29 Cu 63.55	30 Zn 65.38(2)	31 Ga 69.72	32 Ge 72.63	33 As 74.92	34 Se 78.96(3)	35 Br 79.90	36 Kr 83.80	
37 Rb 85.47	38 Sr 87.62	39 Y 88.91	40 Zr 91.22	41 Nb 92.91	42 Mo 95.94(2)	43 Tc	44 Ru 101.1	45 Rh 102.9	46 Pd 106.4	47 Ag 107.9	48 Cd 112.4	49 In 114.8	50 Sn 118.7	51 Sb 121.8	52 Te 127.6	53 I 126.9	54 Xe 131.3	
55 Cs 132.9	56 Ba 137.3	lanthanoids 57 - 71		72 Hf 178.5	73 Ta 180.9	74 W 183.8	75 Re 186.2	76 Os 196.2	77 Ir 192.2	78 Pt 195.1	79 Au 197.0	80 Hg 200.6	81 Tl 204.3 - 204.4	82 Pb 207.2	83 Bi 208.0	84 Po	85 At	86 Rn
87 Fr	88 Ra	actinoids 89 - 103		104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Cn						
Lanthanoids		57 La 138.9	58 Ce 140.1	59 Pr 140.9	60 Nd 144.2	61 Pm	62 Sm 150.4	63 Eu 152.0	64 Gd 157.3	65 Tb 158.9	66 Dy 162.5	67 Ho 164.9	68 Er 167.3	69 Tm 168.9	70 Yb 173.1	71 Lu 175.0		
Actinoids		89 Ac	90 Th 232.0	91 Pa 231.0	92 U 238.0	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr		

Figure 1.1 : Tableau périodique montrant la répartition des terres rares (en vert) (Hatch, 2013)

1.2.2 Origine et classification

Les TR ont été découverts en 1787 par le chimiste Carl Alex Arrhenius (1757–1824) dans un échantillon de roche extrait dans une carrière près de Stockholm à proximité du village d'Ytterby en Suède, mais il faudra attendre les années 1940 pour voir le développement de techniques d'extraction perfectionnées et la production de terres rares en grande quantité. Les principaux minéraux de terres rares sont la bastnaésite, la monazite, la xénotime et la parisite. Les TR sont extraites à l'état d'oxydes ressemblant aux alcalino-terreux, d'où l'appellation « terres ». Leur séparation et purification nécessitent un travail long et compliqué, mais très automatisé, d'où exceptionnellement leur nom « rares ». En dépit de leur appellation « terres rares », ces métaux ne sont ni

des « terres » ni « rares ». À titre d'exemple, l'abondance naturelle de certains, comme le cérium, est aussi importante dans la croûte terrestre que certains métaux plus usuels comme le cuivre (CNUCED - Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement, 2014, Jewell & Kimball, 2014). Certaines terres rares sont également plus courantes que certains des principaux métaux industriels (Tableau 1.1). Elles comptent parmi les éléments métalliques les moins abondants de la croûte terrestre au même niveau que les éléments de la cinquième période de la classification de Mendeleïev (Mo, Ag, Cd, Sn,...). Les terres rares peuvent être séparées en deux catégories, qui sont: les terres rares légères (TRLE), les plus abondantes d'une part et les terres rares lourdes (TRLO), les moins abondantes de l'autre. Les TR «légers» ont un numéro atomique compris entre 57 et 63 et «lourds» pour un numéro atomique se situant de 64 à 71. La classification des TR en légers ou lourds est souvent considérée comme arbitraire (Walters *et al.*, 2011).

Tableau 1.1 : Tableau comparatif de la concentration de La, Ce et Nd, et certains métaux industriels (Cu, Pb, Sn) dans la croûte terrestre (parties par million, ppm) (CNUCED - Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement, 2014).

Numéro atomique (Z)	Symbole	Nom	Abondance dans la croûte terrestre (ppm)
57	La	Lanthane	32
58	Ce	Cérium	62
60	Nd	Néodyme	33
29	Cu	Cuivre	59
82	Pb	Plomb	13
50	Sn	Étain	2,3

1.2.3 Structure électronique, états d'oxydation et dérivés

La connaissance de la structure électronique des lanthanides est importante pour la compréhension de leurs propriétés chimiques et physiques. Le tableau 1.2 présente la configuration électronique quasi identique de la série des lanthanides (Clark, 2000). Les lanthanides sous l'appellation « éléments f » ont la particularité de remplir progressivement les sous-couches 4f. Soit du lanthane au lutécium, les électrons sont apportés à la couche électronique interne 4f plutôt qu'à une couche externe. Les orbitales 4f sont plus contractées que les orbitales 5d et 6s. Les électrons vont donc occuper de préférence les niveaux 4f (Schijf, 1992). Ainsi, les couches 4f participent peu

aux liaisons chimiques. Le rayon ionique des lanthanides diminue régulièrement le long de la série, pendant que le nombre d'électrons sur l'orbital 4f augmente, et les rend plus faciles à complexer avec d'autres composés. Cette réduction est appelée contraction lanthanidique (Bünzli & Choppin, 1989, Schijf, 1992). Le tableau 1.3 ci-dessous, regroupe les cations divalents et trivalents, comme recensés dans la littérature.

Tableau 1.2 : Configurations électroniques des lanthanides et de leurs ions trivalents

Z	Symbole	Nom	Configuration électronique de Ln	Configuration électronique de Ln ³⁺
57	La	Lanthane	[Xe]5d ¹ 6s ²	[Xe]4f ⁰
58	Ce	Cérium	[Xe]4f ¹ 5d ¹ 6s ²	[Xe]4f ¹
59	Pr	Praséodyme	[Xe]4f ³ 6s ²	[Xe]4f ²
60	Nd	Néodyme	[Xe]4f ⁴ 6s ²	[Xe]4f ³
61	Pm	Prométhéum	[Xe]4f ⁵ 6s ²	[Xe]4f ⁴
62	Sm	Samarium	[Xe]4f ⁶ 6s ²	[Xe]4f ⁵
63	Eu	Europium	[Xe]4f ⁷ 6s ²	[Xe]4f ⁶
64	Gd	Gadolinium	[Xe]4f ⁷ 5d ¹ 6s ²	[Xe]4f ⁷
65	Tb	Terbium	[Xe]4f ⁹ 6s ²	[Xe]4f ⁸
66	Dy	Dysprosium	[Xe]4f ¹⁰ 6s ²	[Xe]4f ⁹
67	Ho	Holmium	[Xe]4f ¹¹ 6s ²	[Xe]4f ¹⁰
68	Er	Erbium	[Xe]4f ¹² 6s ²	[Xe]4f ¹¹
69	Tm	Thulium	[Xe]4f ¹³ 6s ²	[Xe]4f ¹²
70	Yb	Ytterbium	[Xe]4f ¹⁴ 6s ²	[Xe]4f ¹³
71	Lu	Lutécium	[Xe]4f ¹⁴ 5d ¹ 6s ²	[Xe]4f ¹⁴

Tableau 1.3 : Rayons ioniques de quelques métaux. Tirés de (Cotton, 2006) et de (Lueking et al., 2004)

Métaux	La	Ce	Pr	Ca	Fe (II)	Cu	Mg
Rayon ionique(Å)	1,03	1,01	0,99	0,98	0,76	0,69	0,65

A la lecture de ce tableau, on constate que le magnésium a un rayon ionique faible en comparaison de celui du calcium. Les rayons ioniques des ions lanthanides sont quant à eux importants.

Les cations lanthanides sont normalement à un état d'oxydation III, ce qui leur procure un état stable et homogène. Ceci résulte de la perte des électrons 6s et 5d (Seaborg, 1993). Certains lanthanides ont des états d'oxydation de +II et +IV (Brookins, 1989); ceci s'explique par l'influence des orbitales f inoccupées, partiellement ou complètement remplies, sur la stabilité de l'élément considéré. Par exemple, le cérium s'oxyde aisément au degré +IV avec un potentiel redox approximatif $(\text{Ce (+IV) / Ce (+III)}) = 1.71$ eV (Brookins, 1989). Les interactions électrostatiques et stériques entre le cation métallique et les ligands conditionnent principalement les nombres de coordination et les géométries associées (Choppin, 1984, Quadrelli, 2002). Les lanthanides forment tous un ion Ln^{3+} , et exceptionnellement des composés correspondant aux états +2 (Sm, Eu, Yb) ou +4 (Ce, Pr, Tb). Les principaux composés sont les oxydes, les chlorures, les fluorures, les carbonates, et les sulfates.

1.2.4 Propriétés et applications

Malgré leurs propriétés chimiques plutôt similaires, les propriétés physiques des TR sont bien différentes, ce qui explique en grande partie la particularité de leurs utilisations. Les TR sont de plus en plus utilisées dans les domaines de la haute technologie (électronique, optique, automobile ...), en agriculture (engrais et pesticides) et en médecine (Imagerie par Résonance Magnétique, médicaments).

Les propriétés spécifiques des TR expliquent leur utilisation en industrie : par exemple un aimant miniature fabriqué de quelques grammes de néodyme est si puissant qu'il fait vibrer le téléphone cellulaire lorsqu'il reçoit un appel (Goonan, 2011). Une propriété caractéristique des cations lanthanides trivalents est leur paramagnétisme, issu de la présence d'au moins un électron non apparié dans leurs orbitales 4f. À titre d'exemple, les complexes de Gd (III) sont largement utilisés comme agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique. L'utilisation de substances paramagnétiques est également nécessaire dans le but d'augmenter et de contrôler la relaxation nucléaire dans les techniques de RMN pour l'imagerie et le diagnostic médical. Seuls les cations lanthane ($4f^0$) et lutécium ($4f^{14}$) sont diamagnétiques (Caravan *et al.*, 1999).

De nombreux TR ont des propriétés de luminescence intéressantes. Les TR Eu et Tb sont les plus utilisés, car ils présentent de longs temps de vie de luminescence (de l'ordre de la milliseconde comparé à la microseconde voire nanoseconde pour les molécules organiques). Tous les ions lanthanides, exceptés La(III) et Lu(III) de

configurations électroniques $4f^0$ et $4f^{14}$ respectivement, sont luminescents (Bünzli & Piguet, 2005).

Les TR sont aussi utilisées comme des traceurs naturels pour la connaissance et la modélisation d'un sol, pour retracer et quantifier l'évolution pédogénétique passée d'un sol (Laveuf & Cornu, 2009). Depuis que les techniques d'analyse des terres rares se sont développées dans les années 1980, ces éléments ont été utilisés dans de nombreuses disciplines, particulièrement en hydrogéologie, où elles servent de traceurs de genèse, d'origine et de processus géochimiques entre autres (Négre *et al.*, 2006, Ling & Liu, 2012). Les TR jouent aussi un rôle primordial dans la médecine. Elles sont utilisées dans la lutte contre les microbes et présentent des propriétés anticoagulantes. Certains chercheurs comme Azoulay *et al.* (2007) avancent l'idée selon laquelle les TR disposent des propriétés pour lutter contre le cancer, contrairement à Maxwell *et al.* (1931), dans Redling (2006), qui n'ont démontré aucun effet positif associé. Les travaux de Brunner et collaborateurs en 1994 ont montré que le cérium est utile pour combattre les bactéries Gram positives. Connues sous le nom d'Ultra-Spur, les TRs sont également utilisées dans la lutte contre l'arthrose du chien.

Les agriculteurs chinois préconisent les TR comme des engrais de cultures (Chua, 1998, França *et al.*, 2002). L'application de faibles concentrations de lanthane dans un milieu hydroponique augmente la croissance normale de *Vicia faba* en conditions limitantes (présence de cadmium dans le milieu de culture), en raison de la stimulation à de faibles concentrations des activités enzymatiques selon Wang *et al.* (2012). Certains TR (ex. le lanthane), mélangées aux engrais à base de phosphates, limiteraient les maladies des plantes liées aux champignons et aux bactéries (Hu *et al.*, 2004, Goecke *et al.*, 2015). Les engrais enrichis en TR légères stimuleraient le développement des plantes (Brioschi, 2012). Loin d'être exhaustif, le tableau 1.4 résume les principales utilisations des TR.

1.3 Historique et production mondiale

1.3.1 Cycle de production des terres rares

Dans la réalité, les terres rares se retrouvent dans une grande variété de dépôts, avec des concentrations qui peuvent largement varier de l'un à l'autre (Long *et al.*, 2012). Les trois principaux minerais dont sont extraites les terres rares sont la bastnaésite, la monazite et le xénotime (BGS – British Geological Survey, 2011).

Pour exemple, la bastnaésite et la monazite contiennent principalement des TRLE avec une concentration plus élevée de TRLO dans la monazite. Le xénotime regorge la plus grande source de TRLO dans le monde (ex. dysprosium, erbium, holmium, ytterbium et yttrium). La chaîne de production des métaux rares est longue, complexe et doit être adaptée aux particularités de chaque site de production.

Tableau 1.4 : Principales utilisations des différents TR (adapté de Christmann (2012); Hayes-Labruto *et al.* (2013); Humphries (2012), (Weber & Reisman, 2012))

Éléments	Principales utilisations
Lanthane (La)	Catalyseurs pour automobiles et avions, moteurs hybrides, alliages métalliques, verres optiques, luminophores.
Cérium (Ce)	Catalyseurs automobiles, raffinage du pétrole, alliages métalliques, polissage du verre.
Praséodyme (Pr)	Aimants, alliages métalliques pour les moteurs avions.
Néodyme (Nd)	Écouteurs, moteurs hybrides.
Prométhéum (Pr)	Batteries, sources de rayons X portables, lasers.
Samarium (Sm)	Aimants
Europium (Eu)	Luminophores, couleur rouge et bleue pour la télévision et les écrans d'ordinateur.
Gadolinium(Gd)	Imagerie pour résonance magnétique(IRM), alliages métalliques.
Terbium (Tb)	Luminophores, aimants permanents, alliages métalliques.
Dysprosium (Dy)	Aimants permanents, moteurs hybrides, lasers.
Holmium (Ho)	Coloration du verre, lasers
Erbium (Er)	Luminophores, fibres optiques, lasers.
Thulium (Tm)	Appareils médicaux émettant les rayons X.
Ytterbium (Yb)	Lasers, alliages à base d'acier.
Lutétiem (Lu)	Catalyseurs pour industrie pétrolière.
Scandium (Sc)	Alliages métalliques, éclairage, lasers.
Yttrium (Y)	Efficacité du carburant, lasers, appareils de communication à micro-ondes, alliages métalliques.

1.3.2 Exploitation des terres rares

Avant 1960, la production mondiale des TR était inférieure à 2 000 tonnes en moyenne par an. Elle a atteint 53 000 tonnes en 1960 puis 90 000 tonnes en 2000. Entre 2000 et 2012, la production mondiale de terres rares a atteint un pic de 133 300 tonnes en 2010, avant de retomber à 110 000 tonnes en 2012 (figure 1.2).

Avant 1984, les États-Unis produisaient environ 64 % de la production mondiale (selon les statistiques de l'United States Geological Survey) et se situaient au premier rang des pays producteurs de terres rares. La plupart des TR provenaient d'une ancienne mine (Mountain Pass) exploitée depuis 1954. Les États-Unis ont atteint leur pic de production

en 1974 avec 19 900 tonnes, représentant 78 % de la production mondiale. Cette hausse de production a chuté dans le début de l'année 1985 et a atteint 5 % de celle-ci en 2002. La mine a fermé en 2002, en réponse à des contraintes environnementales et des prix plus bas pour les TR, suggérant un manque de compétitivité de cette mine vis-à-vis des terres rares importées de la Chine¹. La mine a été la plupart du temps inactive depuis 2002, bien que le traitement du minerai préalablement extrait continue sur le site.

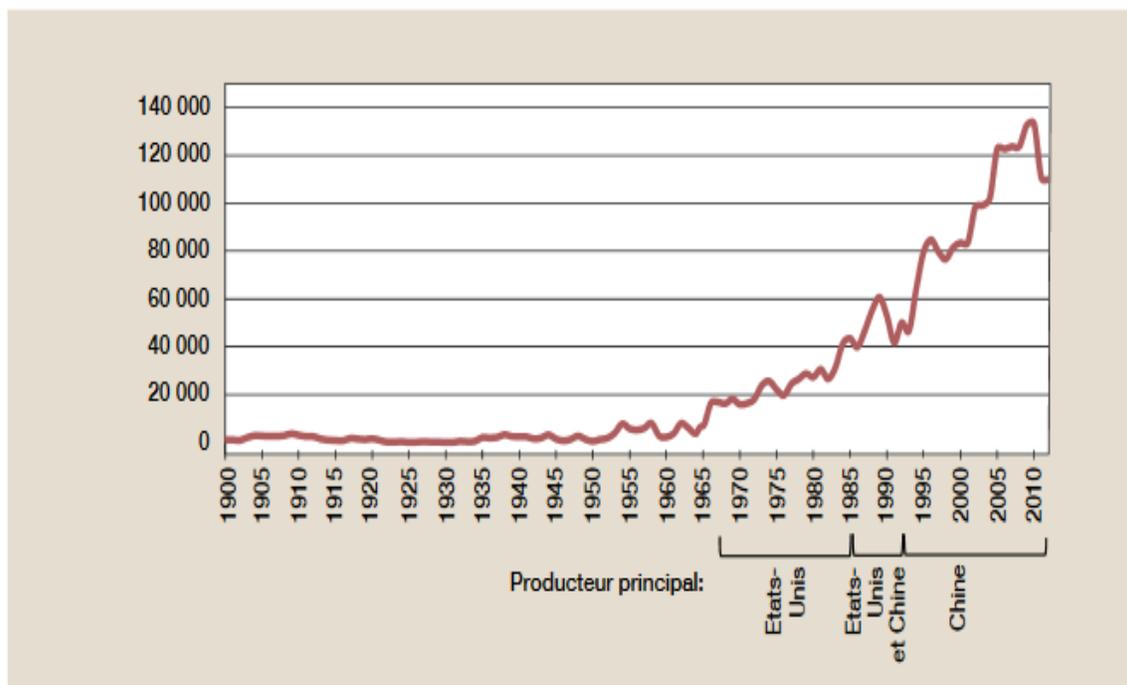


Figure 1.2: Évolution historique de la production mondiale de terres rares, 1900-2012 (tonnes) (Secrétariat de la CNUCED d'après l'United States Geological Survey, 2014). Les données relatives à la production mondiale s'entendent en tonne d'oxydes de terres rares (OTR).

1.3.3 Production des terres rares en Chine

La majorité des terres rares connues et exploitées se trouvent en Chine, particulièrement dans le gisement de Bayan Obo, en Mongolie Intérieure, dont les réserves sont estimées à 43,5 mégatonne (Mt) OTR, soit plus de 80 % des réserves chinoises et plus de 60 % des réserves mondiales (Roskill, 2015). Avec 118 700 tonnes de minerais extraits en 2005 (sur une production mondiale annuelle totale de 130 000 tonnes), la Chine obtient le quasi-monopole des ressources en terres rares les plus

¹ https://en.wikipedia.org/wiki/Mountain_Pass_rare_earth_mine

abondantes de la planète (Christmann, 2012). Cette situation s'explique grâce notamment à de faibles coûts de production en Chine et les contraintes environnementales moins importantes que dans le reste des pays producteurs (Christmann, 2012). On peut voir sur la figure 1.3 la répartition du marché des terres rares en 2014.

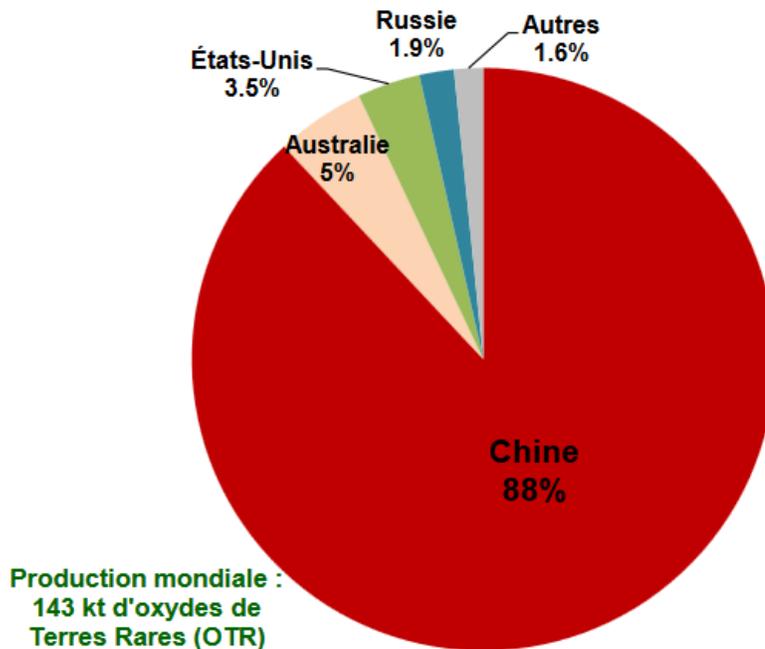


Figure 1.3 : Répartition de la production minière des TR en 2014. Tirée de (Roskill, 2015).

Les problèmes de pollution en Chine ont entraîné la diminution de l'extraction de minerai du site de Baotou à partir de 2002. Cette réduction a favorisé la délocalisation des sites d'exploitation de terres rares chinoises dans les sites du sud des provinces de Jiangxi et de Sichuang. Depuis quelques années, la Chine a commencé à réduire ses exportations de terres rares pour en tirer profit économiquement (Clamadieu & Butstraen, 2010). Ainsi, la politique des quotas et des taxes a été mise en pratique, visant à limiter les exportations entraînant le départ des industries vers la Chine.

1.3.4 Demande des terres rares

Comme l'indique le rapport de la Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement (CNUCED - Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement, 2014), la demande mondiale de terres rares est disparate. Cependant, la majorité des études suggère une croissance de la demande en terres rares durant les

prochaines années (Jordens *et al.*, 2013). Ceci peut s'expliquer entre autres par leur exploitation dans le domaine de l'électronique et l'aérospatiale et bien d'autres industries de haute technologie, notamment les technologies « vertes ». Historiquement, la Chine est le principal pays consommateur de terres rares. Sa part dans la demande mondiale a augmenté régulièrement depuis le début des années 2000, passant ainsi de 21 % en 2000 à 64 % en 2012 (Kingsnorth, 2013) (figure 1.4).

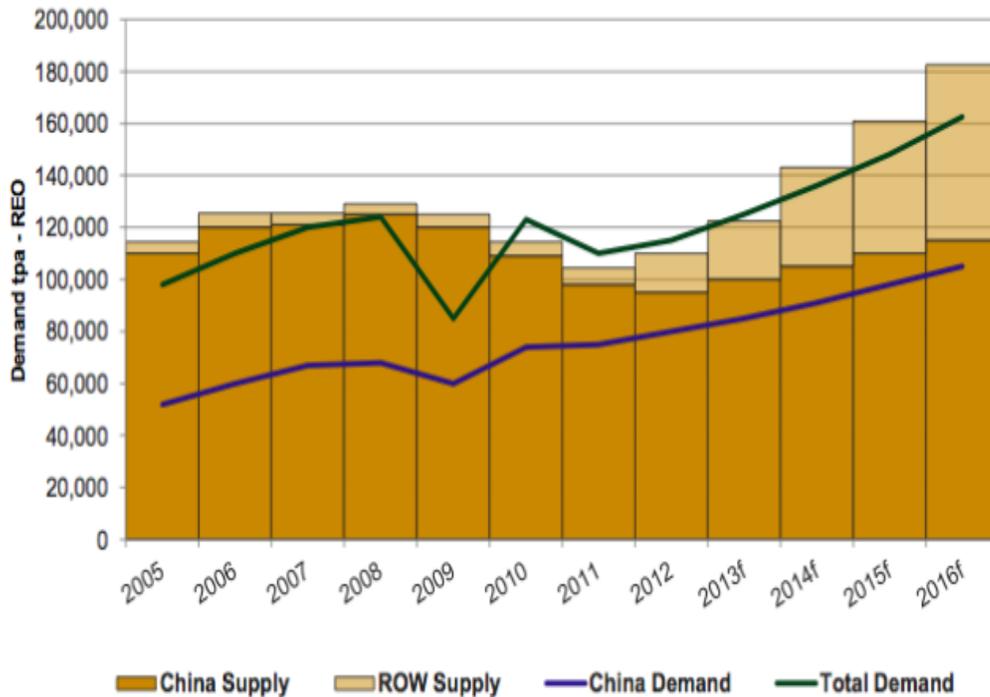


Figure 1.4 : Évolution et prévision de la demande et de la production de terres rares par la Chine et par le reste du monde (ROW). Les prévisions sont indiquées par un «f» (forecast) après l'année. (Kingsnorth, 2013)

Contrairement à la production, la demande en terres rares n'est pas limitée géographiquement (Remeur, 2013). Les plus importants secteurs consommateurs de terres rares en Chine sont ceux des aimants permanents, des alliages pour batterie, des luminophores, des poudres de polissage et des catalyseurs. Les principaux consommateurs de terres rares sont : la Chine (60 %), les États-Unis, le Japon, Hong Kong, la Corée du Sud et les pays d'Europe (Humphries, 2012). D'ici 2020, la part de la demande chinoise dans la demande mondiale devrait atteindre 70 %.

1.3.5 Potentiel minier au Canada

De nombreux pays comme le Canada ou le Groenland disposeraient de réserves importantes en TR (Schüler *et al.*, 2011). De manière générale, on recense peu d'exploration et de gisements en Europe. De nombreux travaux d'exploration sont en cours en Amérique du Nord, dont ceux de la rivière Kwyjibo, du lac Strange et de la fosse du Labrador (projet Eldor) au Québec (Mariano & Mariano, 2012). La richesse du sous-sol de ces éléments offre une opportunité indéniable à la société québécoise qui auparavant ne les a jamais exploités (Québec. Ministère de l'Énergie et des Ressources naturelles, 2016).

1.3.6 Problématique des TR

- *Les TR dans les écosystèmes naturels*

On retrouve de faibles concentrations des TR dans l'eau de mer, comprises entre 0,5 et 10 ng/L. Le Ce présente la particularité de s'oxyder sous forme 4+ dans les formations résultant de phénomènes géologiques d'origine superficielle tandis que les autres terres rares sont présentes sous forme trivalente (3+). La diminution de la concentration en solution du Ce dans les eaux superficielles (développement d'une anomalie négative de Ce au niveau des spectres) a été attribuée à sa chimie redox (Elderfield *et al.*, 1988). Ce comportement particulier du cérium peut-être découplé des autres TR induisant une forte anomalie négative en Ce dans l'eau de mer et dans les sédiments se formant en équilibre avec l'eau de mer (sédiments biogènes et authigènes). L'anomalie négative en Ce tend à s'atténuer dans les zones anoxiques des océans (de Baar *et al.*, 1988). Ce phénomène s'observe dans les fosses de Cariaco au large de Venezuela où le pH favorise la précipitation de la cérianite engendrée par l'oxydation du Ce^{3+} en Ce^{4+} (de Baar *et al.*, 1988). D'après Goldberg *et al.* (1963), il semblerait que les oxydes de manganèse jouent un grand rôle de catalyseur pour l'oxydation du cérium et sont de sites hôtes de la cérianite dans le milieu marin. Pour ce qui est des concentrations en TR mesurées dans les fleuves et les rivières, elles sont habituellement faibles, mais peuvent atteindre jusqu'à 100 fois les concentrations observées dans l'eau de mer (cas de la rivière Sanaga au Cameroun) (Braun *et al.*, 1998). L'anomalie en Ce dans l'eau des rivières est variable. Les teneurs en TR sont plus élevées dans les rivières acides que neutres et basiques. L'amplitude de l'anomalie de Ce présente dans les rivières

augmente avec le pH (Elderfield *et al.*, 1990). Par contre, dans les eaux de la rivière Sanaga, les spectres de TR sont sans anomalie négative en Ce (Braun *et al.*, 1998), ce qui est contraire aux observations apportées par Elderfield *et al.* (1990) selon lesquelles à pH élevé compris entre 7,1 à 7,8, les eaux de la rivière Sanaga conduiraient à l'apparition d'une anomalie négative en Ce.

- **Contamination anthropique des TR**

Dans la région du Québec, des compagnies minières disposent des capacités à exploiter le sous-sol riche en terres rares. L'exploitation de ces ressources naturelles constitue l'une des stratégies pour créer de la richesse et répondre aux besoins de la société québécoise. Ainsi, de nombreux travaux d'exploration sont en cours au Québec (Mariano & Mariano, 2012). Les risques écotoxicologiques liés à l'exploitation des terres rares étant très peu connus, ceci oblige à ce que l'on dispose d'outils et de méthodes qui permettent de vérifier préalablement l'état de l'environnement.

- **Sources de contamination**

En dehors de toute pollution, les TR se trouvent à l'état des éléments traces dans le milieu aquatique. Avec l'augmentation de l'extraction et du traitement des terres rares, le risque de contamination des systèmes aquatiques naturels augmente (Weber & Reisman, 2012). Les effets environnementaux de ces procédés sont multiples. Par ailleurs, les minerais contiennent souvent des produits radioactifs tels que du thorium ou de l'uranium qui sont libérés dans les déchets durant le processus de raffinement. Des problèmes similaires pourront aussi émerger dans les régions de production des produits manufacturés. La combustion de carburants fossiles, les raffineries de pétrole et les incinérateurs de déchets peuvent aussi être des sources émettrices potentielles de particules enrichies de terres rares (Celo *et al.*, 2012). Par exemple, en 1998 l'air contenait des teneurs plus élevées en TR (de 10 à 40 fois) dans la ville de Beijing que celles de grandes villes européennes (Wang *et al.*, 2001). Une microanalyse par spectrométrie EDS (analyse dispersive en énergie) de La_2O_3 NP (nanoparticulaire) a montré une forte présence de lanthane sous forme soluble (62 %) en milieu aquatique (Balusamy *et al.*, 2015).

- **Spéciation en milieu aqueux**

Les cations lanthanides (III) sont des acides de Lewis durs et ont une forte affinité pour des bases dures telles que l'oxygène, d'où leur forte attraction pour les molécules d'eau (Pearson, 1998). Cette affinité permet d'avoir des valeurs d'enthalpie d'hydratation qui décroissent du La^{3+} (- 3326 kJ.mol⁻¹) au Lu^{3+} (- 3759 kJ.mol⁻¹). Les énergies libres et les enthalpies d'hydratation des lanthanides trivalents sont relativement dépendantes du rayon ionique du cation. Ceci explique une augmentation de l'interaction ion dipôle avec la densité de charge du cation.

Dans les systèmes environnementaux comme les sols ou l'eau, les lanthanides peuvent exister sous des formes chimiques variées (espèces) : libre, complexé avec un ligand « simple » organique ou inorganique, complexé avec un ligand colloïdal ou macromoléculaire, adsorbé ou incorporé à des particules en suspension, adsorbé ou assimilé par un organisme vivant (figure 1.5).

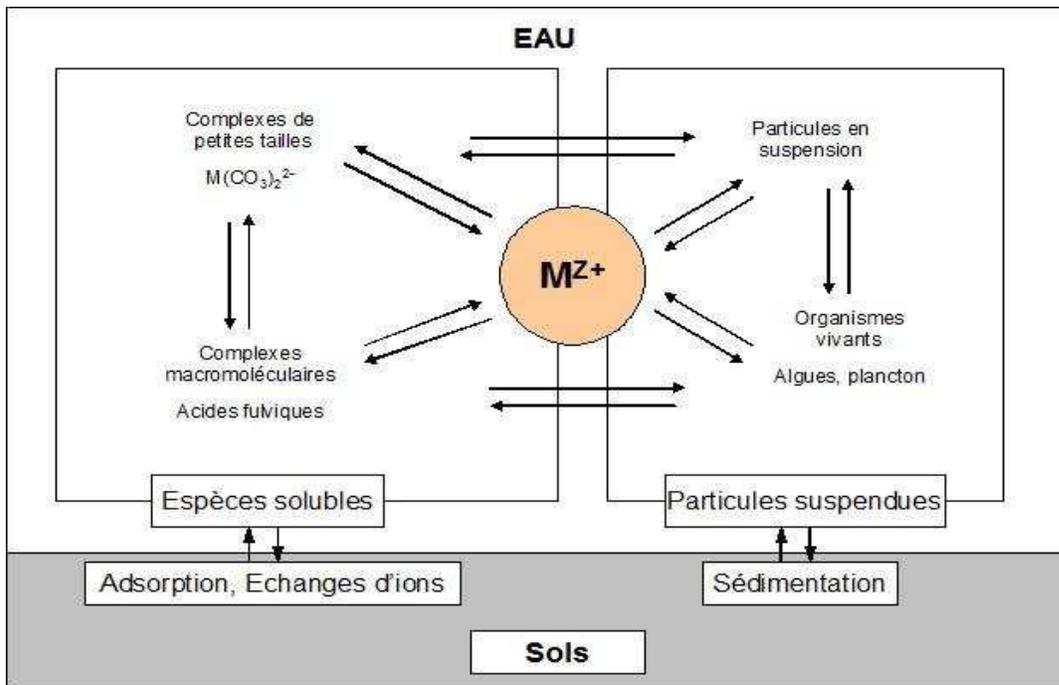


Figure 1.5 : Répartition schématique des phénomènes influant la spéciation des métaux dans les milieux naturels (Buffle, 1989).

Ainsi, la distribution quantifiée du métal entre ces différentes formes physico-chimiques définit sa spéciation. Cette spéciation détermine son devenir et son transfert dans le milieu, ainsi que sa biodisponibilité et sa toxicité dans l'environnement (Weber, 2006). La

spéciation d'un métal peut être estimée par la modélisation à partir des données physico-chimiques connues du système (concentration totale en métal, pH de la solution, force ionique, concentrations totales de ligands potentiels, ...). On retrouve les lanthanides souvent en grande proportion sous leur forme libre, M^{3+} , dans des milieux synthétiques inorganiques à pH relativement faible (Rabung *et al.*, 2000, Tan *et al.*, 2010). Pour former un complexe stable en solution aqueuse, le ligand doit être capable de déplacer des molécules d'eau qui sont fortement liées à l'ion lanthanide.

Le rôle de la matière organique dissoute (MOD) est important pour comprendre et prédire le comportement d'un contaminant tel qu'un métal dans un milieu donné (Lamelas *et al.*, 2005) Les sites de la MOD présentent des affinités vis-à-vis des métaux, le proton et certains cations tels le calcium et le magnésium. Par exemple, à pH faible, on observe généralement une décomplexation des métaux traces, caractérisée par une hausse de la concentration en métaux inorganiques (i.e. libre et complexé avec les hydroxydes et les ligands inorganiques du milieu) (Cao *et al.*, 2004). Ce phénomène est également observable quand la concentration en cations divalents alcalino-terreux augmente. La MOD joue un grand rôle dans la mobilité et la biodisponibilité des éléments traces (Citeau, 2004). C'est pour cette raison qu'une partie de notre étude a porté sur le comportement des lanthanides dans un milieu contenant un complexant organique (acide malique). Le logiciel de calculs d'équilibre thermodynamique MINEQL 5.0 permet de prédire la spéciation des métaux en solution à l'état d'équilibre thermodynamique. Ce logiciel ne prend pas en compte la complexation des métaux par les acides fulviques et humiques, contrairement au logiciel WHAM (Windermere Humic Acid Model (Tipping, 1994)) qui effectue ces calculs, mais qui, en revanche, ne prédit pas la formation de précipités.

- **Hypothèse du Modèle de l'ion Libre (MIL)**

La spéciation chimique d'un métal en solution dépend du pH de la solution et des ligands présents (Stumm & Morgan, 1996). Il existe une corrélation entre l'activité de l'ion métallique libre, la prise en charge et la toxicité des métaux (Twiss *et al.*, 2001). À titre d'exemple, la réponse biologique de différents organismes aquatiques dépend de la concentration de l'ion libre lors d'expositions réalisées en laboratoire à court terme à différents métaux et non de la concentration totale du métal en solution (Morel, 1983). Cependant, on peut aussi disposer de formes réactives (ML_n^{Z+}) qui interagissent avec la

membrane cellulaire (Campbell *et al.*, 2002) (figure 1.6). La concentration totale du métal en solution influence par conséquent celle de l'ion libre en solution (Campbell, 1995).

Plusieurs études sur des lanthanides, de l'aluminium et la plupart des métaux ont montré que le pH est un paramètre indéniable qui affectera leur spéciation et donc leur biodisponibilité. Un pH décroissant mobilise une grande proportion de métaux en solution et peut devenir un facteur pour la compétition entre les protons (H^+) et les ions M^{Z+} pour les sites de complexation à la surface de l'organisme (Parent & Campbell, 1994, François *et al.*, 2007, Crémazy *et al.*, 2013).

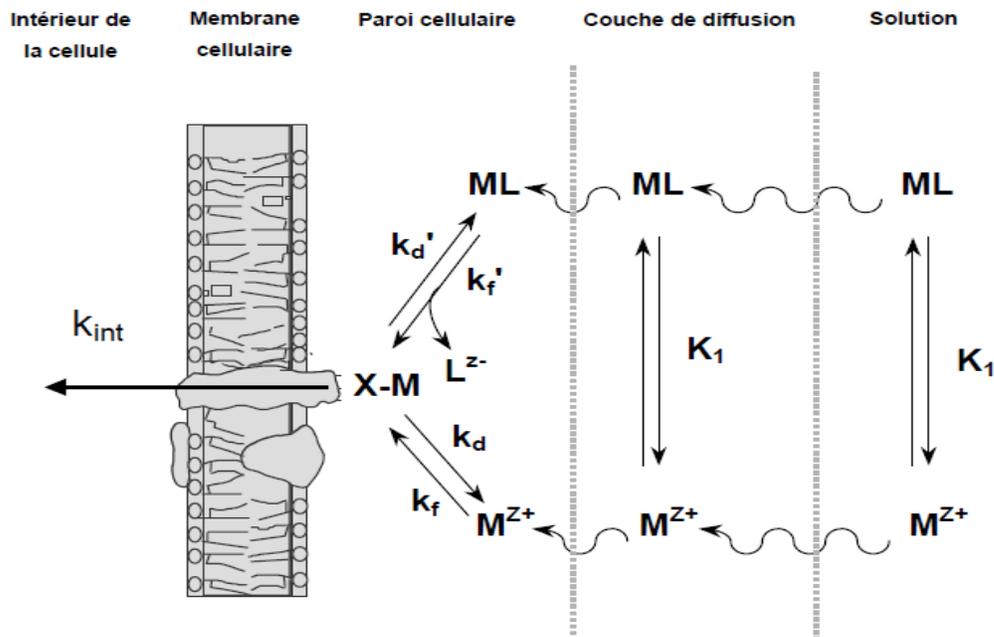


Figure 1.6 : Représentation conceptuelle des interactions métaux-organismes et ses différentes étapes. M^{Z+} = ion libre ; ML = métal complexé ; L^{z-} = ligand (acide aminé, citrate, $S_2O_3^{2-}$, CO_3^{2-} , Cl^-) ; $M-X$ = métal complexé à la surface (Campbell *et al.*, 2002).

1.4 Phosphore dans les milieux de culture

Les phosphates (PO_4^{3-}) sont des éléments essentiels dans les milieux de culture d'algues, mais ceux-ci présentent de fortes affinités avec les lanthanides. Le phosphore organique dissous (POD) peut alors devenir une source potentielle de phosphore pour les algues pour éviter la complexation / précipitation des métaux (Taft *et al.*, 1977, De Schamphelaere *et al.*, 2014). L'apport du phosphore organique dans le milieu induit la synthèse d'une enzyme, une phosphatase, capable de cliver la molécule phosphorylée

d'ester présent dans le milieu, permettant ainsi à la cellule de disposer des phosphates (Quisel *et al.*, 1996). Cette catalyse est soit à l'extérieur de la cellule ou dans la cellule. Ainsi, l'ion phosphate sera soit libéré à l'intérieur de la cellule algale, soit libéré tout près de la surface algale (la phycosphère) et immédiatement assimilé par les algues. À partir de la forme organique dans les milieux de culture, l'algue internalise approximativement à proportion du 90 % de phosphate inorganique produit. Ceci limiterait la présence du phosphore inorganique dissous (PID) en solution qui pourrait interagir avec les métaux (Labry, 2001).

1.5 Bioconcentration et toxicité des lanthanides

1.5.1 Concentration et toxicité chez les plantes terrestres

Les TR sont inégalement réparties dans les différents horizons du sol. L'étude menée par Harlavan *et al.* (2009) a relevé de faibles concentrations en surface de (3 à 22 mg·kg⁻¹) de lanthane, contre à 21 à 63 mg/kg en profondeur.

Les concentrations en TR sont variables au niveau des plantes et de leurs organes. Ainsi, on retrouve des concentrations plus prononcées dans les racines, ensuite dans les feuilles, les troncs et les tiges (Fu *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2003). À titre d'exemple, pour le lanthane et l'euporium, plus la concentration dans le milieu hydroponique est forte plus les concentrations dans la plante sont élevées et inégalement réparties. Le tableau 1.5 présente la répartition et les concentrations du lanthane et de l'euporium chez *Phaseolus vulgaris*.

L'assimilation en terres rares par les plantes est d'origine pédo-géochimique. Les plantes absorbent préférentiellement les terres rares légères à l'exception du cérium et de l'euporium qui sont moins absorbés (Wang *et al.*, 2003). Le tableau 1.6 présente la répartition et les concentrations de lanthane et de cérium chez le blé et le maïs.

Tableau 1.5 : Concentrations de lanthane et d'euporium dans les différentes parties des haricots (n= 5) en mg/L (Brioschi, 2012).

[en La dans solution hydroponique mg.L ⁻¹]	[La] en ppb	racine	tige	feuille
0		53	8,9	12,1
0,17		4100	188	950
2,3		24000	284	257
9,2		41700	501	665

[en Eu dans solution hydroponique mg.L ⁻¹]	[Eu] en ppb	racine	tige	feuille
0		1,36	0,874	1,01
0,11		2700	47,1	139
4,6		24600	509	606
36		74200	2430	3860

Tableau 1.6 : Concentrations en ppb pour les TR mesurées chez les plantes annuelles (Brioschi, 2012).

Auteur	Nom commun	Organes	La	Ce
(Liang <i>et al.</i> , 2008)	Blé	racine	8,29	13,7
		tige	0,1	0,18
		feuille	1,31	2,09
(Aouad <i>et al.</i> , 2006)	Maïs	feuille	9,4	15
		Tige	23	38
		racine	66	121

Les TR ont des effets stimulateurs ou inhibiteurs sur la croissance et le développement des végétaux (figure 1.7). Par exemple, pour des faibles concentrations d'une solution de lanthane (1 $\mu\text{mol/L}$) sur sol de mélange, on observe un taux de croissance relativement élevé pour certaines plantes comme le maïs (*Zea mays*) et le cocotier (*Cocos nucifera*) (Wahid *et al.*, 2000, Liu & Hasenstein, 2005). L'exposition des plantes à de fortes concentrations de lanthanides inhibe la croissance racinaire et le développement végétal (blé, maïs) (Diatloff *et al.*, 1995). Pour des concentrations de l'ordre de 0,05 à 1,5 mg/L de lanthane sur sol de mélange, la croissance du riz (*Oryza*

sativa) diminue (Xie *et al.*, 2002). Ce comportement peut s'expliquer par l'absorption des éléments essentiels dans le milieu de culture. Les études ont montré que les TR ont un effet sur l'absorption des éléments nutritifs, en particulier le fer et le calcium (Hu *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2012). À des faibles concentrations (<1,5 mg/L), les TR stimulent l'absorption de certains éléments cationiques (cuivre, fer, magnésium, potassium et manganèse) tandis que les fortes concentrations diminuent leur absorption (Xie *et al.*, 2002). L'assimilation du calcium semble plus influencée que les autres éléments par la présence des TR. Le lanthane peut bloquer les canaux calciques et peut avec le cérium remplacer le calcium dans certains processus physiologiques. Ils favorisent l'activité enzymatique des K- et Mg-ATPase dans le cytoplasme chez le concombre en carence de calcium (Redling, 2006). Les conditions environnementales peuvent aussi jouer un rôle primordial dans la toxicité du lanthane. En période de sécheresse, le rendement agricole du blé augmente de 10 % pour des concentrations allant de 0,5 à 10 kg de La par hectare de sol. Par contre, aucun effet n'est observé en absence de la sécheresse (Maheswaran *et al.*, 2001).

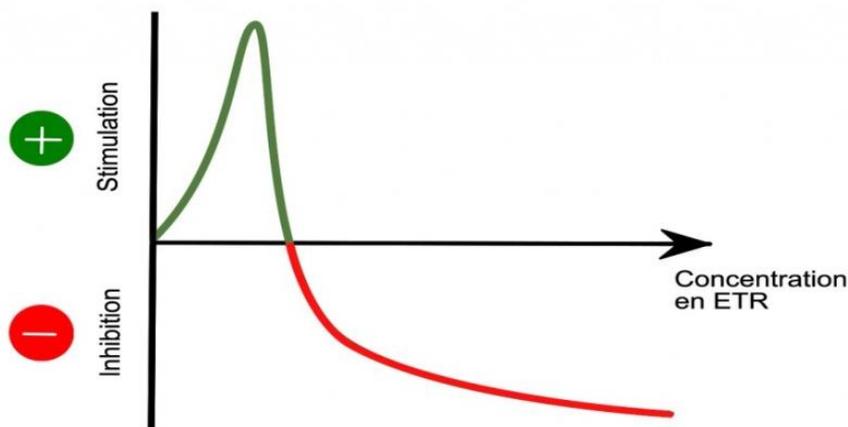


Figure 1.7: Effet dose/réponse des TR (Borzelleca, 2000)

1.5.2 Effets sur les écosystèmes aquatiques

La toxicité et le comportement des TR dans des milieux naturels n'ont pas été étudiés de façon approfondie et on ne sait dans quelle mesure leur toxicité peut affecter les espèces aquatiques ni comment ils interagissent avec des composés organiques naturels. Les TR d'origine anthropique peuvent se retrouver dans les systèmes aquatiques naturels, en raison d'écoulements superficiels et diffus comme la pollution

par les déchets de gadolinium d'origine hospitalière. La contamination des eaux par des TR mène à une accumulation dans la faune et la flore. Par exemple, les TR peuvent s'accumuler dans les plantes aquatiques (les bryophytes) (Chua, 1998). De plus, la diversité des algues peut diminuer ou augmenter en milieu aquatique en présence des TR (Hu *et al.*, 2002, Yu *et al.*, 2008). Les organismes de la chaîne trophique supérieure comme les poissons accumulent également les TR. Les milieux aquatiques sont à la base des transferts des contaminations dans la chaîne alimentaire. Les composés métalliques ont une toxicité variable selon leur nature et leur voie de pénétration (voie directe ou trophique) (Géret, 2000).

1.5.3 Chez les microorganismes

Dans les laboratoires de l'INRS, la toxicité aiguë des TR (lanthane et cérium) sur *C. fusca* (une algue verte unicellulaire couramment utilisée dans la recherche sur la toxicité des métaux en milieu aquatique) a été évaluée et a permis d'avoir une bonne compréhension de la toxicité des TR et des difficultés souvent rencontrées avec les TR (Beaubien, 2015). Par exemple, il y a souvent une différence marquée entre les concentrations nominales et les concentrations mesurées de lanthanides, ce qui met en évidence la nécessité de spécifier ces données et d'inclure les mesures de la composition chimique de la solution de culture dans toute étude utilisant ces éléments. Beaubien (2015) a cultivé l'algue verte *Chlorella fusca* en présence de phosphate, mais la testée en absence de phosphate dans les milieux d'exposition aux concentrations de 10 à 5 000 nM de cérium ou de lanthane en absence de ligand, afin d'évaluer la prise en charge du métal ainsi que son effet sur la croissance cellulaire. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux en présence d'un ligand (acide malique). Il apparaît que la toxicité du cérium est similaire à celle du lanthane pour l'algue verte *C. fusca*. En effet, les CE50 obtenues après 120 h en présence de malate et exprimées en concentrations de l'ion libre pour le lanthane (260 ± 30 nM) et le cérium (270 ± 60 nM). En absence de ligands, les CE50 obtenues et exprimées en concentrations de l'ion libre sont 430 ± 60 nM pour le lanthane et 170 ± 60 nM pour le cérium. Le lanthane et le cérium ont été internalisés par l'algue et plus la concentration croissait en solution, plus l'internalisation augmentait. La présence du métal induit un délai dans la croissance et, après 96 h d'exposition à des concentrations inférieures (10, 50 et 100 nM), on observe un effet stimulateur, la croissance de *C. fusca* pouvant être supérieure à celle des témoins.

L'effet observé est identifié dans les études antérieures comme étant un effet d'hormèse (Yuguan *et al.*, 2009). Cet effet a été observé pour beaucoup de TR et sur différentes espèces (d'Aquino *et al.*, 2009). Par exemple, un apport de faible concentration en lanthane stimule la croissance des cellules racinaires du blé et du maïs, alors que des apports plus importants la ralentissent (voir aussi la section 1.5.1) (d'Aquino *et al.*, 2009). Balusamy *et al.* (2015), ont constaté après 72 h d'exposition chez *Chlorella sp* aux concentrations de 0; 10; 50; 100; 250; 500 et 1000 mg/L de La₂O₃ NP que les algues étaient clairement agglutinées et avaient adsorbé le La₂O₃ NP sur leurs membranes pour toutes les concentrations testées sur le témoin de culture.

1.6 Objectifs et hypothèse de la recherche

1.6.1 Objectifs

Comme indiqué dans les paragraphes précédents, on anticipe que les concentrations du cérium et du lanthane seront en augmentation dans l'environnement. Cette tendance en milieu aquatiques pose la problématique des risques potentiels que peuvent représenter ces métaux et la littérature offre peu d'informations pour les effets à court et long terme que pourraient engendrer les lanthanides sur la flore et la faune.

Ce mémoire s'inscrit dans un projet 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 Beaubien (2015) sur le Ce et le La lors de sa maîtrise. La tendance des lanthanides à former des complexes et des précipités avec les ions phosphates en solution peut influencer leur biodisponibilité et explique la décision de les exclure du milieu d'exposition des algues.

Les objectifs de ce projet de recherche s'articulent autour des points suivants :

- Le développement d'un milieu d'exposition pour les lanthanides en présence de phosphore organique où le pH est légèrement acide, afin de minimiser le risque de complexation et de précipitation des métaux étudiés.
- L'évaluation de la toxicité du lanthane et du cérium afin de comparer les résultats à ceux déjà présents dans la littérature et ceux obtenus par Beaubien en 2015 en absence de phosphate dans le milieu d'exposition.
- L'évaluation de l'efficacité du modèle du ligand biotique (BLM) afin de prédire la toxicité des lanthanides en présence de l'acide malique.

L'atteinte de ces objectifs permettra de mieux comprendre la problématique des lanthanides en milieu aqueux et de mieux cerner les facteurs-clés de celle-ci. De plus, les données obtenues pourraient être utilisées pour réviser les normes des évaluations du risque environnemental au sein des institutions étatiques.

1.6.2 Hypothèses

Nous sommes donc partis de l'hypothèse que l'utilisation d'une source organique de phosphore (ester) limitera la présence de phosphate inorganique dans les milieux d'exposition et permettra de tester la toxicité des lanthanides sur les algues pour des périodes de longue durée (toxicité chronique) en évitant la formation d'un précipité ou d'un complexe (figure 1.8). Pour cela, nous avons utilisé l'algue verte *C. fusca* qui a une croissance rapide et a la capacité de croître en présence du phosphore organique. Cependant à ma connaissance, il n'existe pas de données écotoxicologiques pour les TR dans un milieu de croissance contenant du phosphore organique. Les hypothèses sont : (i) Les CE50 du La et du Ce seront plus faibles que celles recensées dans la littérature en raison de l'absence de précipitation des TR habituellement causée par la présence de phosphore inorganique dans les milieux d'exposition (l'inhibition de la croissance causée par la précipitation du phosphore apparaît lorsque $[TR] \sim [P]$; notre hypothèse sous-entend que les CE50 pour les TR seront inférieures aux concentrations de phosphore habituellement utilisées) ; et (ii) La réponse biologique induite par le lanthane et le cérium en présence ou en absence de l'acide malique sera similaire sur la base de l'activité de l'ion métallique libre.

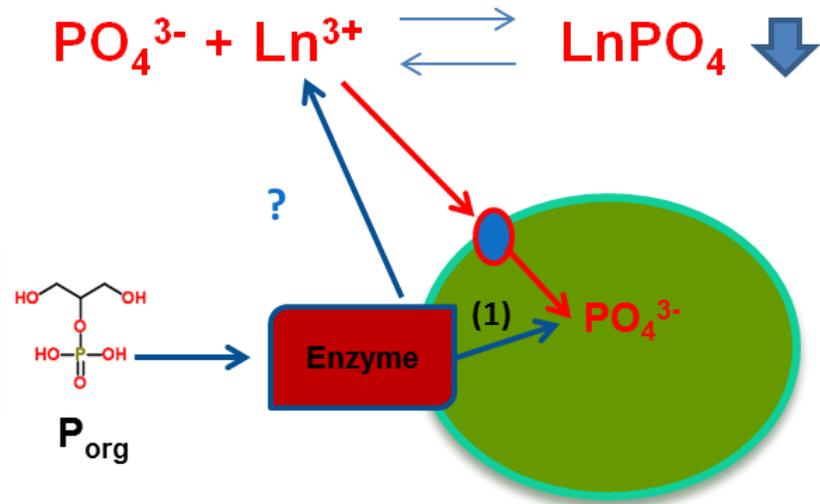


Figure 1.8 : Schéma conceptuel du cheminement du phosphate en solution pour la culture d'une algue verte en présence d'une source organique de phosphore (P_{org}).

CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Choix de l'espèce

2.1.1 *Chlorella fusca*

Pour nos essais de toxicité, nous avons utilisé comme matériel biologique l'algue verte unicellulaire *Chlorella fusca* (figure 2.1). Cette algue dispose d'une pyrénoloïde dans le chloroplaste et est habituellement utilisée en laboratoire. En milieu de culture, l'algue est solitaire ou agrégée. Les cellules sont globulaires ou ellipsoïdales avec un diamètre variable entre 3 et 9 μm . *C. fusca* peut accumuler et stocker le phosphore du milieu de culture. De plus, l'espèce peut se développer dans un milieu inorganique sans phosphore sur une période d'environ 5 jours (Beaubien, 2015). La reproduction asexuée se déroule par rupture de la cellule parentale, qui libère de 2 à 8 cellules spécialisées (spores) sans flagelles. Sur le plan physiologique, c'est une algue qui est également tolérante dans un milieu relativement acide (Parent, 1991). La souche utilisée dans la présente étude a été obtenue du Canadian Phycological Culture Centre (CPCC) à l'Université de Waterloo. La souche est connue sous le nom de *Chlorella fusca* var. *vacuolata* Shihira et Krauss (CPCC#89). Les algues provenaient d'une culture en phase liquide. Un volume de 2 mL de la solution d'algues a été transféré dans 100 mL de la solution fraîche de milieu de culture Modified High Salt Medium (MHSM-2) stérile à température ambiante et à pH 5,5 afin de les acclimater.

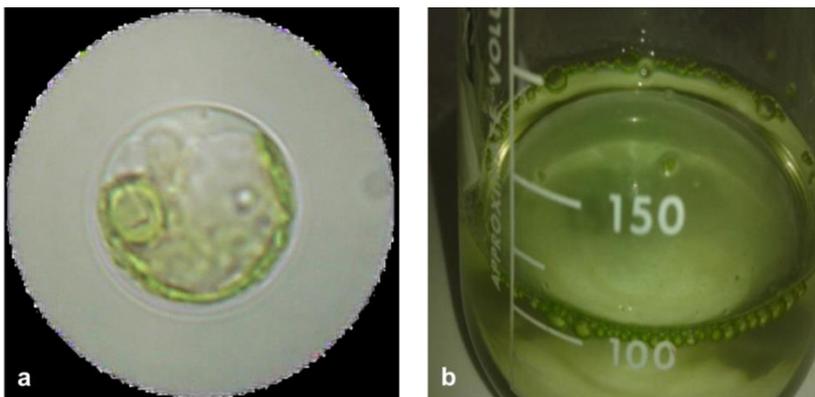


Figure 2.1: Visualisation de *Chlorella fusca* au microscope optique à 1000x (a) (tirée de Beaubien 2015) et photo de *C. fusca* en milieu de culture (b) (Cliché de Nguimgou, 2016).

2.1.2 Entretien des algues

La culture d'algues a été maintenue en phase de croissance exponentielle pour éviter leur vieillissement. Pour ce faire, après 72 h un volume de 3 mL d'algues cultivées dans le milieu MHSM-2 a été transféré dans un erlenmeyer en verre de 250 mL contenant 100 mL de milieu MHSM-2 frais et stérile. Dans l'optique d'éviter toute contamination, ce transfert a été effectué sous une hotte à flux laminaire à proximité d'un bec de Bunsen produisant une flamme réglable grâce à la combustion d'un hydrocarbure gazeux. La densité algale transférée de la culture mère était habituellement comprise entre 3 000 000 et 4 000 000 cellules/mL. Pour prévenir l'agrégation des cellules, les fioles d'erlenmeyer contenant les cultures ont été déposées sur une table d'agitation (~ 60 rpm) à l'intérieur d'une chambre de croissance (Convicon CMP 4030) à $20,0 \pm 0,1$ °C et à une luminosité de 100 ± 10 $\mu\text{E m}^2/\text{s}$ (éclairage fluorescent blanc froid). La photopériode était de 24 h. L'absence de contamination bactérienne a été vérifiée à l'obscurité régulièrement par ensemencement sur agar et visuellement au microscope.

2.2 Milieux de culture

2.2.1 Composition des milieux de culture

Le milieu de culture de l'algue verte *C. fusca* en présence du phosphore inorganique dissous (PID) était un milieu synthétique modifié (*MHSM-1*), utilisé par Beaubien (2015) pour ses travaux de maîtrise utilisant *Chlorella fusca*; la composition chimique du milieu est présentée au tableau 2.1. C'est une adaptation du Milieu *High Salt Medium (MHSM)*, de Macfie *et al.* (1994), où la concentration de certains produits a été réduite. Dans le cas de notre étude, pour la culture des algues en absence du PID, le milieu de culture MHSM-2 a été utilisé. Pour ce faire, nous avons substitué le PID par du phosphore organique dissous (POD), le β -glycérol phosphate, afin de réduire la possibilité de complexation et de précipitation. Un litre de milieu de culture préparé nécessitait 5 mL de la solution Ammonium #2, 136 μL de la solution Phosphore organique (β -glycérol phosphate) et 4 mL de KNO_3 (voir tableau 2.1). Le maintien du milieu de culture à un pH constant (pH = 5,5) a nécessité l'ajout de 100 mL du tampon 2-(N-morpholino) ethanesulfonate (MES ; 10 mM). Ce tampon est peu complexant (Soares *et al.*, 1999, Mash *et al.*, 2003) pour les métaux en solution et est habituellement utilisé pour stabiliser le pH à des valeurs précises entre 5,0 et 6,5. Le volume a été complété avec

de l'eau MilliQ. Après 24 h, 1 mL de la solution de métaux traces (AAP) était ajouté dans la solution refroidie.

Tableau 2.1 : Composition et concentrations des solutions intermédiaires utilisées pour la préparation des milieux de culture (MHSM-1), (MHSM-2), d'exposition (MHSM-E) et de rinçage (MHSM-R).

Solutions mères	Solutions intermédiaires	Cristaux	Quantités Prélevées	Volume (L)
	Phosphates#2	KH ₂ PO ₄ (500 g)	1,48 g	0,05
		K ₂ HPO ₄ (250 g)	2,88 g	
MHSM	β-glycérol phosphate	C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P	0,39 g	0,05
	Ammonium#2	NH ₄ NO ₃ MgSO ₄ •7H ₂ O	15,00 g 4,00 g	1
		Ca(NO ₃)•4H ₂ O	3,20 g	
	Nitrate de potassium	KNO ₃	101,1 g	1
	AAP	H ₃ BO ₃ MnCl ₂ •4H ₂ O FeCl ₃ •6H ₂ O Na ₂ EDTA•2H ₂ O Zn 1 g/L Co 1 g/L Mo 1 g/L Cu 1 g/L	186 mg 415 mg 160 mg 300 mg 1,59 mg 0,64 mg 2,88 mg 4,47 µg	1
Tampon	MES Monohydrate	MES	21,32 g	1
Exposition	Acide malique	Acide malique	13,408 g	1
	Lanthane	LaNO ₃ •6H ₂ O	43,3 g	1
	Cérium	CeNO ₃ •6H ₂ O	43,4 g	1
Ajustement pH	Soude	NaOH	40 g	1

2.2.2 Produits, réactifs et préparations des milieux de culture

À partir des volumes des solutions intermédiaires présentés dans le tableau 2.1, nous avons préparé dans des fioles jaugées de 1 L en polypropylène (PP) les solutions de culture (MHSM-2 ; voir tableau 2.2). Chaque solution a été filtrée sur des filtres en polycarbonate (0,2 µm) pour enlever les particules abiotiques et les bactéries pouvant adsorber et absorber respectivement les métaux en solution. La solution de soude (NaOH) a été filtrée avec une membrane en polysulfone de porosité de 0,2 µm préalablement immergé dans l'eau Milli-Q pendant 24 h. Toutes les solutions ont été autoclavées à 121 °C pendant 15 min, à l'exception des solutions des métaux traces et du β-glycérol phosphate qui ont été filtrées sur une membrane Millipore en polycarbonate 0,2 µm de porosité (dans le cas de ces filtrations, les appareils de filtration ont été autoclavés avant la filtration, et l'opération de filtration a été réalisée sous hotte à flux laminaire). Après l'autoclavage, le milieu est placé sous une hotte à flux laminaire pendant 24 h jusqu'à ce qu'il soit refroidi. Ensuite, 1 mL des oligo-éléments (solution AAP) est ajouté dans un volume de 1 litre des milieux de culture MHSM-2 afin de minimiser la précipitation de composés peu solubles à haute température (Price *et al.*, 1989). Pour éviter toute modification de la composition chimique du milieu, les solutions mères ont été conservées à 4 °C au réfrigérateur dans des bouteilles en PP lavées à l'acide nitrique 10 %. La concentration des espèces en solution est présentée dans le tableau 2.3.

Tableau 2.2 : Volumes de solutions intermédiaires utilisés pour la préparation des milieux MHSM-1, MHSM-2, MHSM-E et MHSM-R.

Solutions intermédiaires	MHSM-2 (1L)	MHSM-E (1L)	MHSM-R (1L)
Ammonium #2	5 mL	5 mL	5 mL
Nitrate de potassium	4 mL	4 mL	4 mL
AAP*	1 mL	1 mL	–
MES Monohydraté	100 mL	100 mL	100 mL
NaOH	Variable	variable	variable
β-glycérol phosphate	136 µL	136 µL	136 µL
Acide malique	–	100 µL	–
Cérium ou lanthane	–	variable	–

* 24 h après l'autoclavage

Tableau 2.3 : Concentrations des espèces dans chacun des milieux

Espèces	MHSM-1	MHSM-2	MHSM-E	MHSM-R
	M	M	M	M
B(OH)₃	3,01x10 ⁻⁶	3,01x10 ⁻⁶	3,01x10 ⁻⁶	-
Ca	6,77 x10 ⁻⁵	6,77 x10 ⁻⁵	6,77 x10 ⁻⁵	6,77 x10 ⁻⁵
Cl	4,20x10 ⁻⁶	4,20x10 ⁻⁶	4,20x10 ⁻⁶	-
Co	1,09x10 ⁻⁸	1,09x10 ⁻⁸	1,09x10 ⁻⁸	-
Fe	5,92x10 ⁻⁷	5,92x10 ⁻⁷	5,92x10 ⁻⁷	-
K	4,00x10 ⁻³	4,00x10 ⁻³	4,00x10 ⁻³	4,00x10 ⁻³
Mn	2,10x10 ⁻⁶	2,10x10 ⁻⁶	2,10x10 ⁻⁶	-
CO₃^a	atm ^a	atm ^a	atm ^a	atm ^a
MoO₄	3,00x10 ⁻⁸	3,00x10 ⁻⁸	3,00x10 ⁻⁸	-
Cu	7,04x10 ⁻¹¹	7,04x10 ⁻¹¹	7,04x10 ⁻¹¹	-
PO₄	2,49x10 ⁻⁷	-	-	-
NH₄	9,37x10 ⁻⁴	9,37x10 ⁻⁴	9,37x10 ⁻⁴	9,37x10 ⁻⁴
Na^b	1,6x10 ⁻⁶	2,09x10 ⁻⁶	2,09x10 ⁻⁶	4,97x10 ⁻⁷
NO₃	4,9x10 ⁻³	4,9x10 ⁻³	4,9x10 ⁻³	4,9x10 ⁻³
SO₄	8,12x10 ⁻⁵	8,12x10 ⁻⁵	8,12x10 ⁻⁵	8,12x10 ⁻⁵
Zn	2,40x10 ⁻⁸	2,40x10 ⁻⁸	2,40x10 ⁻⁸	-
MES	1,00x10 ⁻²	1,00x10 ⁻²	1,00x10 ⁻²	1,00x10 ⁻²
Acide malique^c	-	-	1,00x10 ⁻⁴	-
EDTA	8,02x10 ⁻⁷	8,02x10 ⁻⁷	8,02x10 ⁻⁷	-
Mg	8,12x10 ⁻⁵	8,12x10 ⁻⁵	8,12x10 ⁻⁵	8,12x10 ⁻⁵

^a À l'équilibre avec l'atmosphère.

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

^c En fonction de l'expérience.

2.2.3 Choix des concentrations du phosphore organique dissous des milieux de culture

La concentration de PID du milieu de culture est habituellement de 1,37x10⁻⁴ M. Afin d'évaluer la capacité de *C. fusca* à croître en présence de POD, nous avons réalisé deux expériences. La première expérience visait à comparer la croissance de l'algue en absence de P, en présence de 137 µM de PID (concentration de base du milieu MHSM), d'une concentration réduite en PID (10 µM) et en présence de 10 µM de β-glycérol phosphate (POD). Dans une deuxième expérience, nous avons suivi la croissance de *C. fusca* pour quatre concentrations de POD : 0,5 ; 1,0 ; 5,0 et 10 µM. La littérature situe généralement la concentration du phosphore entre 6 et 8 mg P_{total}/L dans les eaux usées

à l'affluent des stations d'épuration municipales. Ces concentrations de phosphore total atteignent un maximum de 1 mg P/L (32 µM) de phosphore organique soit un maximum de 15 % du phosphore total ((Water Environment Federation, 2006) cité par (US EPA, 2009)).

2.2.4 Milieu et dosage des orthophosphates

Afin d'évaluer la teneur en phosphates par spectrophotométrie à l'acide ascorbique, un triplicata de filtrat de la solution d'algues cultivées dans le milieu MHSM-2 a été analysé. La concentration de POD utilisée a été de 5 µM (S₄, S₅, S₆). Un volume précis du filtrat a été réparti dans des erlenmeyers en polycarbonate de 100 mL, à raison de 50 mL de milieu par flacon. Trois solutions de milieu de culture au même volume sans algues (S₁, S₂, S₃) ont servi de témoin. Les orthophosphates ont été analysés dans les échantillons de filtrat de milieu de culture d'algues en présence du tartrate double d'antimoine, du potassium et du molybdate d'ammonium en milieu acide. La couleur bleue a été mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde 880 nm (APHA, 1975). La concentration du dérivé coloré a été déterminée graphiquement à partir d'une courbe d'étalonnage établie au préalable avec des concentrations connues en phosphates. À partir des masses des produits représentés dans le tableau 2.4, nous avons préparé dans des fioles jaugées de 100 mL le réactif molybdique.

Tableau 2.4 : La composition et les proportions des produits utilisés pour la préparation du réactif molybdique

Solutions	Quantité (g)	Volume (mL)
acide sulfurique	17,5	100
tartrate double d'antimoine et de potassium	0,274	100
molybdate d'ammonium	5	100
acide ascorbique	2,2	100
phosphate monobasique de potassium	0,022	100

Par la suite, des volumes précis de chaque produit préparé ont été prélevés et mélangés : solution d'acide sulfurique (50 mL); solution de tartrate (5 mL); solution de

molybdate d'ammonium (15 mL); solution de l'acide ascorbique (30 mL). Le mélange a été homogénéisé. Enfin, les différents volumes de la solution mère de phosphates monobasique de potassium ont été dilués dans des contenants de 50 mL avec de l'eau MilliQ pour obtenir les différentes concentrations observées dans le tableau 2.5.

Tableau 2.5: Volumes de dilution de la solution mère de phosphates monobasique de potassium

Tube	1	2	3	4	5	6
V_{prélevé} (µL)	17,6	35,0	70,4	88,0	105,5	132
V_{total} (mL)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

La mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 880 nm des différentes solutions (1-6) a consisté à prélever 40 mL de ces solutions et compléter avec 6,40 mL du réactif préparé. Un blanc a été préparé et était pris comme référence. Il était fait de l'eau MilliQ. Une cuvette de 10 cm de longueur était rincée quatre fois avec la solution d'eau MilliQ avant d'être remplie pour servir comme blanc.

2.2.5 Milieu de rinçage (MHSM-R)

Les métaux étaient retirés à la surface des algues avec une solution composée de 68 µM de Ca(NO₃)₂ et 1 mM d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA). Le milieu MHSM-R (tableau 2.2) est préparé de façon identique au milieu de culture MHSM-2, mais sans oligo-éléments (pH à 5,5). Le milieu de rinçage a été utilisé pour laver les algues avant de les inoculer dans les milieux d'exposition servant aux expériences sur une période de 5 jours.

2.2.6 Milieu d'exposition (MHSM-E) au lanthane et au cérium

Les milieux d'exposition préparés (MHSM-E ; voir tableau 2.3) pour le lanthane ou le cérium étaient similaires au milieu de culture MHSM-2. Pour chaque erlenmeyer Nalgene™ de 250 mL en polycarbonate contenant 100 mL de la solution du MHSM-2, un volume précis de la solution mère de lanthane ou de cérium préparée à 5,0 mM (ainsi que les dilutions réalisées) a été ajouté. Les concentrations retenues d'exposition de

lanthane et de cérium pour *C. fusca* étaient 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM et 5000 nM. Au besoin, le pH était corrigé à 5,5 avec de la NaOH 1 M.

Une exposition en présence de 100 µM de l'acide malique comme tampon a également été réalisée pour le cérium et le lanthane. Ainsi, nous avons ajouté un volume de 100 µL d'acide malique d'une solution mère de 0,10 M dans les milieux d'exposition. Les concentrations finales de lanthanides considérées ont été de : 50 nM, 150 nM, 500 nM, 1200 nM, 3500 nM, 10 000 nM, 40 000 nM, 70 000 nM afin d'obtenir des concentrations libres de lanthane et de cérium qui correspondaient à celles où un effet avait été observé sur *C. fusca* par Beaubien (2015). Le tableau 2.6 indique les concentrations totales et libres calculées des ions en solution.

Tableau 2.6 : Concentrations totales (nominales) et libres (calculées) des ions en solution pour le milieu MHSM-2.

Espèces	MHSM-2	
	[totale] (M)	[ions libre] (M)
B(OH) ₃	3,01x10 ⁻⁶	3,01x10 ⁻⁶
Ca	6,77x10 ⁻⁵	6,63 x10 ⁻⁵
Cl	4,20x10 ⁻⁶	4,19x10 ⁻⁶
Co	1,09x10 ⁻⁸	9,39x10 ⁻¹¹
Fe	5,92x10 ⁻⁷	3,30x10 ⁻⁷
K	4,00x10 ⁻³	3,99x10 ⁻³
Mn	2,10x10 ⁻⁶	1,58x10 ⁻⁶
CO ₃	atm	atm
MoO ₄	3,00x10 ⁻⁸	2,86x10 ⁻⁸
Cu	7,04x10 ⁻¹¹	2,58x10 ⁻¹⁵
PO ₄	-	-
NH ₄	9,37x10 ⁻⁴	9,36x10 ⁻⁴
Na	2,09x10 ⁻⁶	2,09x10 ⁻⁶
NO ₃	4,9x10 ⁻³	4,89x10 ⁻³
SO ₄	8,12x10 ⁻⁵	7,78x10 ⁻⁵
Zn	2,40x10 ⁻⁸	3,01x10 ⁻¹⁰
MES	1,00x10 ⁻²	1,00x10 ⁻²
acide malique	-	-
EDTA	8,02x10 ⁻⁷	2,75x10 ⁻¹⁶
Mg	8,12x10 ⁻⁵	8,06x10 ⁻⁵

2.2.7 Modélisation thermodynamique

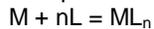
Le programme MINEQL+ (version 5.0) a été sélectionné pour calculer la spéciation des métaux. Les constantes thermodynamiques utilisées dans ce modèle sont mises à jour continuellement dans notre laboratoire. On retrouve dans le tableau 2.7 les constantes

thermodynamiques utilisées pour le calcul de la spéciation du lanthane et du cérium dans le milieu d'exposition à une température de 25°C. Les constantes thermodynamiques de complexation du lanthane et du cérium proviennent de la banque de données NIST 46 version 8.0

Tableau 2.7 : Constantes de formation de complexes de La et de Ce (tirées de MINEQL+ version 5.0.)

Complexes de La	Constante de formation log β	Complexes de Ce	Constante de formation log β
LaEDTA ⁻	17,09	CeEDTA ⁻	17,66
LaSO ₄ ⁺	3,227	Ce ₃ (OH) ₅ ⁴⁺	-33,694
LaOH ²⁺	-8,628	Ce ₂ (OH) ₂ ⁴⁺	-15,766
La(SO ₄) ₂ ⁻	4,75	CeOH ²⁺	-8,479
LaMal ⁺	5,31	CeSO ₄ ⁺	3,202
La(CO ₃) ₂ ⁻	11,31	CeCO ₃ ⁺	6,892
La(CO ₃) ⁺	6,567	Ce(CO ₃) ₂ ⁻	11,763
La(OH) ₃ (s)	-21,497	CeMal ⁺	5,554
La ₂ (CO ₃) ₃ (s)	32,368	Ce(OH) ₃ (s)	-21

La concentration des complexes dépend de la concentration totale en métal et de la concentration en ligand libre par l'intermédiaire des constantes de formation (β)



$$\beta = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n}$$

Mal : malate

2.3 Tests de toxicité

2.3.1 Matériel de laboratoire

Tout le matériel utilisé était trempé dans un bain d'acide nitrique à 10 % pendant un minimum de 24 h puis rincé sept fois à l'eau déminéralisée et ensuite rincé deux fois à l'eau ultra pure (~ 18 Mohms·cm). Les contenants en polypropylène résistants aux fortes chaleurs ont été envoyés à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Ensuite, ils ont été mis à sécher sous une hotte à flux laminaire pendant 24 h.

2.3.2 Pré-Inoculation

Une journée avant l'expérience, nous avons préparé les milieux d'exposition. La méthode de préparation de ces milieux d'exposition est expliquée à la section 2.2.5. Le volume ajouté de solution de lanthane ou de cérium acidifié à l'acide nitrique 2 % était relativement faible (10–240 µL) afin de minimiser toute variation de pH (5,5). Pour les expériences en présence de l'acide malique, un volume de 100 µL de la solution mère 0,1 M a été ajouté aux milieux d'exposition. Les expositions ont été effectuées en raison d'un groupe témoin de croissance algale, d'un groupe témoin de concentration du métal en solution sans algues, ainsi qu'en double ou triplicat des concentrations d'exposition retenues. Par la suite, les milieux d'exposition étaient conservés pendant 24 h sous la hotte à flux laminaire dans des erlenmeyers légèrement ouverts pour favoriser l'atteinte de l'équilibre physico-chimique avec l'atmosphère dans chacune des fioles. Les algues introduites pour l'exposition étaient en phase exponentielle de croissance, c'est-à-dire à 3-4 jours de croissance pour *C. fusca*.

2.3.3 Exposition des algues

Le jour de l'exposition, le pH a été contrôlé dans un seul erlenmeyer représentant chaque gamme de concentration. Au besoin, le pH était ajusté à 5,5 dans toutes les fioles. Les algues en phase exponentielle en solution ont été filtrées sur une membrane à filtre Millipore en polycarbonate de 2,0 µm. Par la suite, les cellules étaient rincées trois fois avec de la solution MHSM-R. Le filtre était immergé et agité dans une solution de 20 mL de MHSM-R. La densité algale était déterminée au compteur de particules *Coulter Counter Multisizer III* à partir d'une aliquote de 0,1 mL de suspension dans 9,9 mL de solution isotonique II.

À partir de cette concentration algale, un volume de la suspension d'algues cultivées était rapidement réparti dans chacune des fioles erlenmeyer contenant une concentration cellulaire connue décrite pour chaque expérience (14 500~15 000 cellules/mL). À la suite de l'inoculation des cellules dans les milieux d'exposition, les fioles étaient déposées sur un agitateur dans la chambre environnementale comme décrite dans la section 2.1.2.

2.3.4 Paramètres de suivi

La densité algale et le pH ont été déterminés sur un volume prélevé des fioles, et ce, à toutes les 24, 48, 72, 96 et 120 h de l'expérience à l'aide d'un compteur de particules *Coulter Counter Multisizer III* et d'un pH-mètre respectivement. Les concentrations de métaux en solution et celles internalisées par les algues (après digestions de celles-ci) ont été déterminées par l'analyse à la spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES).

- **Dosage des métaux à l'ICP-AES**

Pour s'assurer de la stabilité des concentrations du lanthane et du cérium en solution tout au long de l'expérience, les métaux ont été dosés toutes les 24 h pendant 5 jours. Cette étape est essentielle pour déterminer si la concentration de départ reste la même tout au long de l'expérience. Un volume de 10 mL était prélevé de chaque milieu d'exposition témoin sans algues puis versé dans des contenants de 13 mL. Par la suite, une portion de 1,5 mL était prélevée de chaque milieu d'exposition avec algues et déversée dans des Eppendorfs puis centrifugée pendant 5 min à 6 000 rpm. Un volume de 1 mL de surnageant a été récupéré sans perturber le culot puis acidifié dans 2 mL ou 5 mL d'acide nitrique (grade métal trace) à 10 % respectivement pour les concentrations inférieures ou égales à 50 nM et celles supérieures à 50 nM. Tous les échantillons ont été ensuite réfrigérés à 4 °C en attendant l'analyse par ICP-AES. Des étalons étaient également préparés à partir d'un volume de la solution certifiée diluée à l'eau MilliQ afin de calibrer l'appareil.

- **Décompte cellulaire**

Les cellules de chaque échantillon ont été comptées en utilisant le compteur de particules *Coulter Counter Multisizer III*. Un millilitre de chaque culture a été ajouté dans une cuvette contenant 9 mL d'une solution saline d'Isoton® III et ainsi la densité cellulaire a été mesurée par l'équation suivante :

$$\text{Densité cellulaire (cellules/mL)} = \frac{(\text{mesure} - \text{blanc}) * \text{facteur de dilution}}{0,5 \text{ mL}}$$

Le blanc correspond à l'échantillon d'Isoton® III analysé avant le passage des échantillons et 0,5 mL est le volume prélevé par l'appareil selon les paramètres

d'analyse. La dilution de l'échantillon était effectuée avec la solution Isoton® III avant l'analyse.

2.4 Internalisation des métaux par l'algue

2.4.1 Récupération des filtrats et des algues

Après 5 jours d'exposition, les algues ont été récupérées. L'opération a consisté à verser la solution d'exposition dans les tulipes Nalgene® en polycarbonate. Chaque tulipe disposait, au fond, de deux filtres Millipore superposés en polycarbonate de 2,0 µm (Fisher Scientific). À l'aide d'une pompe à manivelle, la solution d'algue a été filtrée et le filtrat récupéré dans un contenant de 50 mL. Ensuite un volume précis de filtrat a été prélevé et complété à 10 mL avec de l'acide nitrique (HNO₃) de grade métal trace à 2 %, puis réfrigéré à 4°C afin de déterminer la concentration en métal dans la solution. Les algues ont été ensuite rincées trois fois avec 10 mL du milieu MHSM-R, puis elles ont été immergées dans 10 mL de mélange du milieu MHSM-R (contenant de l'EDTA à 1 mM) pendant 10 minutes. Les algues ont de nouveau été rincées par deux rinçages de 10 mL de la solution MHSM-R. Les deux filtres ont été récupérés pour déterminer la quantité de métal intracellulaire (filtre dessus) et adsorbés sur les filtres (filtres en dessous). La différence de signal entre les deux filtres a ainsi été attribuée à la quantité de lanthane ou de cérium internalisée par les algues.

2.4.2 Digestion des algues à l'acide nitrique (HNO₃) à 70 %

La technique employée s'inspire de tests préliminaires menés par l'équipe technique des laboratoires de l'INRS-Centre Eau, Terre et Environnement. Les résultats de ces tests ont démontré un fort taux de récupération à 90 % des produits. Les concentrations certifiées et mesurées de l'échantillon de référence *Aquatic Plant (Lemna minor, BCR® 670)* en lanthane et en cérium sont présentées dans le tableau 2.8. Cet échantillon, le blanc et des filtres en polycarbonate de porosité 2 µm de marque Millipore ont servi de contrôle. Après les filtrations, les filtres de chaque traitement et les échantillons servant de contrôle étaient placés dans un tube en PP de 50 mL pour la digestion. Les volumes de 5 mL d'acide nitrique de grade trace métal 70 % et 1 mL de peroxyde d'hydrogène ont été ajoutés dans chaque tube. Ensuite, les tubes ont été placés dans le bloc à digestion à 95 °C sous une hotte à flux laminaire pendant 4 h. Enfin un volume de 0,5

mL d'acide fluorhydrique a été ajouté aux tubes et ils ont été replacés dans le bloc digesteur pendant 2 h. Après ce délai, le volume de digestat a été complété à 50 mL avec de l'eau ultra-pure. Les échantillons ont été déposés sous la hotte à flux laminaire à l'abri de la lumière pour attendre l'analyse à l'ICP-AES.

Tableau 2.8: Concentrations en lanthane et cérium dans les échantillons de référence *Aquatic Plant* (BCR 670, valeurs certifiées et masse analysée)

Échantillon	valeurs certifiées	masse analysée
<i>(Plante aquatique)</i>		
La	0,487 ± 0,02 µg/g	0,1022 g
Ce	0,99 ± 0,04 µg/g	0,1023 g

2.5 Méthodes analytiques des lanthanides

2.5.1 Technique d'analyse

La technique utilisée pour quantifier les métaux doit être choisie en fonction de la nature de l'échantillon à analyser. La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif est un type de spectrométrie de masse capable de détecter les métaux et plusieurs non-métaux à des concentrations très faibles, pouvant aller jusqu'à une partie par milliard lorsque le bruit de fond isotopique est assez faible ou interfère peu. Comparée à la spectrométrie d'absorption atomique, l'ICP-MS est plus rapide, plus précise et plus sensible. Cependant, les ($^{123}\text{Sb}^{16}\text{O}$) et ($^{123}\text{Te}^{16}\text{O}$) peuvent interférer sur les mesures obtenues de l'analyse du lanthane (^{139}La) et du cérium (^{140}Ce) à l'ICP-MS. Le caractère synthétique des milieux de culture pour ce projet a limité au minimum les interférences possibles. Le choix de l'appareil utilisé était donc basé sur la concentration en TR dans les échantillons.

2.5.2 Dosage à l'ICP-AES

Pour ce projet, l'analyse des métaux a été principalement réalisée par la technique de spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif ICP-AES. Il est nécessaire de connaître le principe de l'émission atomique pour comprendre le fonctionnement de cette technique.

- **Le principe de l'émission atomique**

L'atome, une fois excité, devient instable et va chercher à retrouver son état initial par une ou plusieurs transitions(s) électronique(s).

La transition électronique conduit à l'émission d'un photon ayant une énergie correspondante à la différence d'état (Fuger, 2011). Ainsi, l'énergie des photons est liée de l'élément et de la transition concernée. À un niveau d'énergie E à un niveau E_0 correspond l'émission d'un photon de fréquence ν transportant l'énergie $h.\nu$: $\Delta E = E - E_0 = h.\nu = h/\lambda$

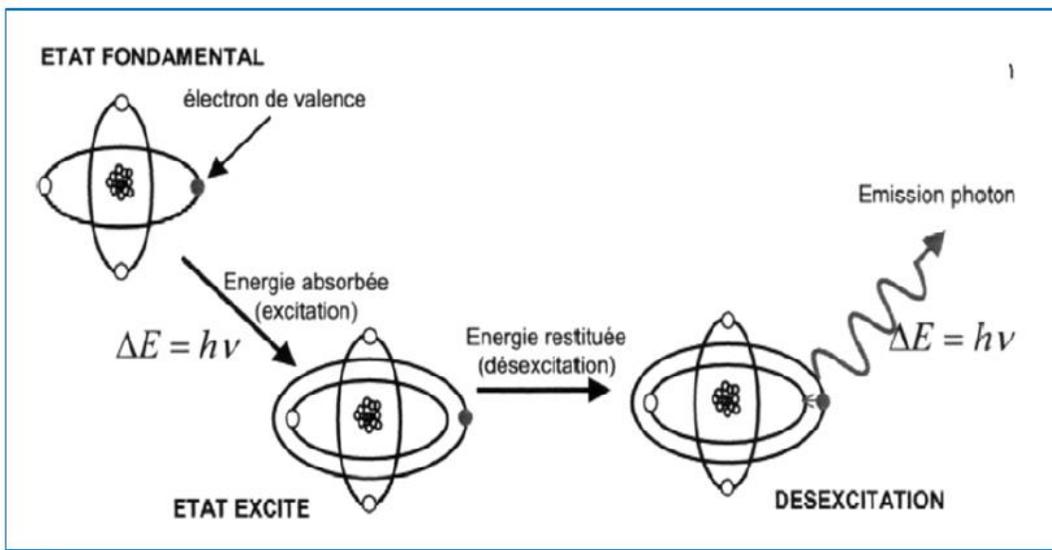


Figure 2.2 : Schéma de principe de l'excitation et de l'émission tiré de Ghellai (2015).

- **La source et composition d'un spectromètre ICP-AES**

La source de l'ICP-AES est un plasma engendré par couplage inductif. L'argon est le plasma le plus utilisé, car l'argon ne se recombine pas avec les espèces chimiques d'une façon stable et dispose un potentiel d'ionisation très élevé (15,6 eV), ce qui permet l'excitation de la majorité des ions. Ce plasma a des caractéristiques peu ionisables et peut atteindre des hautes températures (de l'ordre de 10 000 K). Un plasma d'argon est ainsi constitué d'atomes d'argon, d'ions argon Ar^+ et d'électrons. Un schéma représentant un spectromètre ICP-AES est visible sur la figure 2.3. Le principal point fort de l'ICP-AES est d'être pratiquement insensible aux effets de matrice, un

élément donné ayant la même réponse en émission, quelle que soit la composition de la matrice qui le contient.

La méthode retenue dans le cadre de ce projet est la spectrométrie d'émission atomique à source plasma (ICP-AES). C'est une technique analytique précise pour la détermination de la concentration en métaux (excepté pour le mercure). La gamme d'analyse de concentrations des métaux se situe entre le $\mu\text{g/L}$ et le mg/L avec l'appareil utilisé. La sensibilité de cet appareil peut être améliorée en augmentant le rapport signal sur bruit de fond pour une concentration donnée. L'analyse par ICP-AES présente l'avantage de posséder une source efficace d'excitation avec une large gamme de températures élevées, de pouvoir réaliser une analyse multi-élémentaire de la grande majorité du tableau périodique avec des limites de détection plus basses qu'en spectrométrie d'absorption atomique, ce qui représente un grand gain de temps.

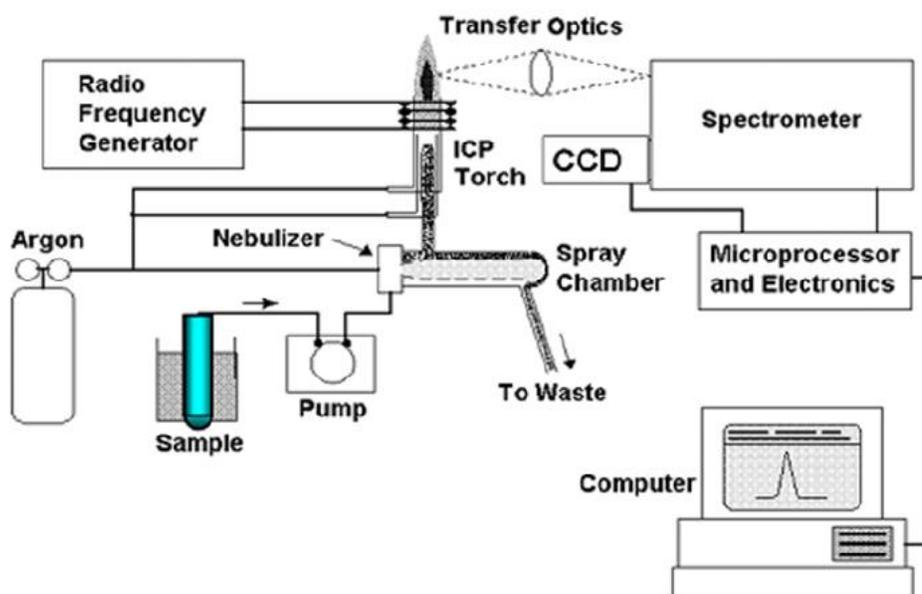


Figure 2.3 : Schéma de l'appareillage d'un spectromètre ICP-AES (<http://www.pa.ingv.it/laboratori/tracce/elementi.html>).

- Paramètres de l'ICP-AES

Afin d'évaluer la quantité des métaux tout au long de l'expérience, tous les échantillons de lanthane et de cérium total en solution et intracellulaire ont été dosés au début et à la fin de l'expérience (c.-à-d., aux jours 1→5) à l'ICP-AES, dans des solutions acidifiées à 10 % de HNO_3 concentré. La concentration des lanthanides dans les cellules a été obtenue par digestion des algues en milieu aqueux comme décrite à la section 2.4.2.

2.6 Exploitation des données

2.6.1 Analyse statistique

La comparaison et la détermination d'une différence significative entre les traitements et les sous-traitements des expériences en absence ou en présence du ligand (acide malique) dans les milieux d'exposition ont été réalisées par des analyses statistiques. L'analyse non paramétrique à deux voies (ANOVA) avec mesures répétées a été appliquée pour déterminer la différence statistique entre les valeurs. Le test de student a été employé pour déterminer le niveau de signification à $p \leq 0,05$.

2.6.2 Calculs des CE50

Les concentrations efficaces moyennes 50 % (CE50) des métaux vis-à-vis de la densité cellulaire de chaque traitement pendant 5 jours ont été calculées par rapport à la densité cellulaire moyenne des témoins sans métal d'exposition. Pour ce faire, le logiciel macro Excel Microsoft REGTOX_EV7.0.7 (Vindimian, 2005) a été utilisé pour le calcul des paramètres de toxicité et leurs intervalles de confiance à 95 %. Nous avons choisi de mesurer la concentration effective en fonction du rendement final afin de pouvoir comparer nos résultats avec ceux de l'étude de Beaubien (2015).

CHAPITRE 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Effet du phosphore

3.1.1 Tests de croissance des algues

Les algues ont été cultivées en présence de différentes sources de phosphore et à différentes concentrations. Une croissance et un rendement similaires ont été obtenus pour toutes les concentrations testées au phosphore inorganique (figure 3.1). On peut voir qu'il y'a une diminution significative de la croissance cellulaire à la courbe sans phosphore pour les jours 4, 5, 6 et 7 (figure 3.1). Les résultats statistiques pour les valeurs de densité cellulaire confirment qu'il y'a une différence significative ($p > 0,05$) entre le groupe témoin et les trois courbes de cette figure. De plus ces résultats montrent qu'il y a une différence significative entre les courbes PID et POD, mais qu'il n'y a pas de différence significative entre les courbes PID, suggérant qu'il n'y a plus de différence significative dans la croissance cellulaire pour les traitements au phosphore inorganique après 7 jours. Le phosphore est un élément essentiel et nos résultats corroborent ceux de Berman (1988) et Cotner et Wetzel (1992) sur les microorganismes en milieu dulcicole.

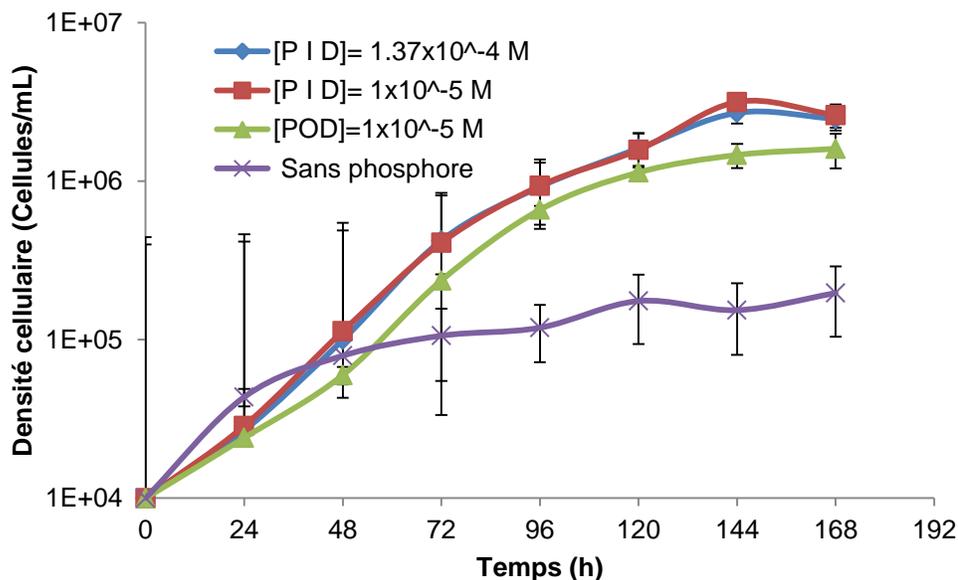


Figure 3.1 : Croissance de l'algue verte *Chlorella fusca* avec deux sources de phosphore (phosphore inorganique dissous (PID) ; phosphore organique dissous (POD)) à différentes concentrations en fonction du temps.

3.1.2 Choix de la concentration du phosphore organique

La figure 3.2 montre que les solutions aux concentrations de 5 μM et 10 μM permettent une croissance au-delà de 96 h contrairement aux concentrations de 0,5 et 1 μM qui semblent atteindre un état stationnaire peu après 72 h. Les conditions du milieu semblent optimales pour la croissance cellulaire pour les deux concentrations les plus élevées alors que les milieux de concentrations de 0,5 et 1 μM ont présenté des effets observables sur le rendement de la culture, suggérant que le phosphore limite la production de biomasse après 72 h. La concentration de POD la plus basse qui puisse permettre une bonne croissance cellulaire en ayant du phosphore disponible pour la cellule est de 5 μM (0,16 mg P/L).

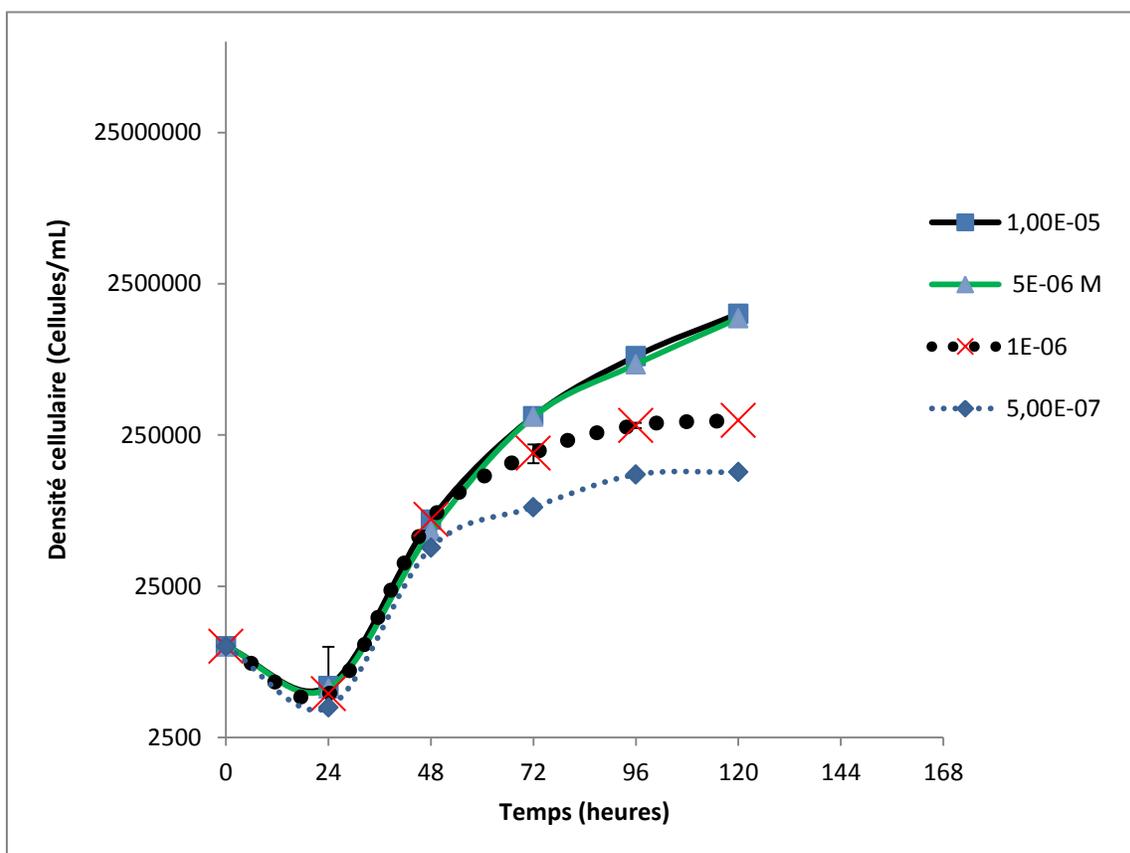


Figure 3.2 : Croissance de la population d'algues avec du phosphate organique dissous à différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 5 et 10 μM) après 5 jours.

3.1.3 Milieu et dosage des orthophosphates

Les absorbances ont été mesurées des solutions les plus diluées vers les plus concentrées. L'absorbance des différentes solutions est résumée dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : L'absorbance des différentes solutions de phosphates monobasiques de potassium

Type	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
Concentration (mg P/L)	0	0,00002	0,00004	0,00008	0,0001	0,00012	0,00015
Absorbance	0,0000	0,0966	0,1793	0,4824	0,5593	0,6309	0,7917

Le tracé de la courbe d'étalonnage $A = f([\text{PO}_4^{3-}])$ en figure 3.3 nous a permis de déduire la concentration des ions phosphates dans chaque tube avec et sans algues à partir de leur absorbance. Pour obtenir la concentration molaire en phosphate dans les milieux, on s'est rapporté à la valeur de l'absorbance des solutions sur la droite d'étalonnage de la figure 3.3. On n'a plus qu'à lire la concentration en abscisse.

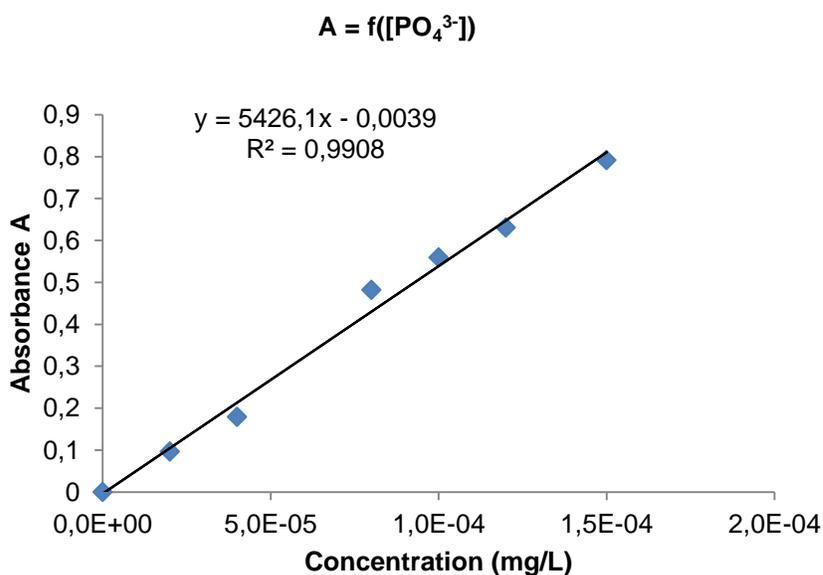


Figure 3.3 : Courbe d'étalonnage des ions phosphate.

En présence de POD, les orthophosphates en milieu avec et sans algues sont en dessous de la limite de détection (0,15 µg P/L). Ces résultats confirment l'hypothèse

selon laquelle en absence de phosphate inorganique, l'algue induit des enzymes qui catalysent l'hydrolyse du phosphore organique. Au vu des données enregistrées, nous pouvons présumer que les enzymes d'activation se trouvent sur l'ectoplasme et/ou le périplasme et/ou la membrane cytoplasmique. Cette forme d'assimilation du phosphore par les algues fait en sorte que le phosphore inorganique ne sera jamais présent de façon notable dans nos milieux d'exposition contenant du POD et ne modifiera donc pas la biodisponibilité des ions lanthanides.

3.2 Exposition de *C. fusca* au lanthane

3.2.1 Spéciation du La

Un des modèles informatisés de spéciation chimique basés sur des principes thermodynamiques utilisés pour l'analyse des différentes formes chimiques du lanthane en solution est MINEQL+ (version 5.0). La solution est ouverte à l'atmosphère à pH 5,5. Le tableau 2.6 de la section 2.2.6 indique les concentrations totales des espèces en solution. Les valeurs des espèces chimiques de lanthane en absence et en présence de malate sont inscrites dans les tableaux 3.2 et 3.3.

Tableau 3.2 : Concentration et proportion des complexes formés dans le milieu d'exposition en absence du tampon (acide malique) à une concentration de 1 μM de lanthane.

Spéciation	Concentration (M)	Pourcentage (%)
La^{3+}	5,54E-07	55,4
$\text{La}(\text{CO}_3)_2^-$	1,04E-16	<1
$\text{La}(\text{SO}_4)_2^-$	1,89E-10	<1
$\text{La}(\text{SO}_4)^+$	7,29E-08	7,3
LaOH^{2+}	3,824E-10	1
$\text{La}(\text{CO}_3)^+$	6,20E-11	<1
LaEDTA^-	3,73E-07	37,3

Les données montrent qu'en solution sans malate, le lanthane libre est l'espèce majoritaire avec une concentration de 0,55 μM soit 55,4 % suivie de l'espèce LaEDTA^- avec une concentration de 0,37 μM (37,3 %). Le lanthane forme peu de complexes avec

les ions sulfates ($\text{La}(\text{SO}_4)^+$) à une concentration de $0,073 \mu\text{M}$ (7,3 %) et très peu d'hydro-complexes (1 %). Les autres complexes sont présents à des proportions très faibles ($< 0,1$ %).

Tableau 3.3 : Concentration et proportion des complexes formés dans le milieu d'exposition en présence du tampon (acide malique, $100 \mu\text{M}$) à une concentration de $1 \mu\text{M}$ de lanthane.

Spéciation	Concentration (M)	Pourcentage (%)
La^{3+}	4,04E-8	4,0
LaSO_4^+	5,24E-9	<1
LaOH^{2+}	2,77E-11	<1
$\text{La}(\text{SO}_4)_2^-$	1,35E-11	<1
LaMal^+	8,09E-07	81
$\text{La}(\text{CO}_3)_2^-$	7,48E-18	<1
$\text{La}(\text{CO}_3)^+$	4,48E-12	<1
LaEDTA^-	1,45E-07	14,5

En revanche, en présence d'acide malique le La libre est en minorité avec une concentration de $0,040 \mu\text{M}$ (4,0 %). En comparant au milieu sans malate, la concentration de La^{3+} libre a grandement diminuée de 13,7 fois. La fraction de complexe majoritaire est le La(malate) à une concentration de $0,81 \mu\text{M}$ (81 %). La concentration de LaEDTA est de $0,15 \mu\text{M}$ (14,5 %).

En comparant les deux milieux d'exposition, nous pouvons dire que la présence de malate en solution rend moins disponible le lanthane sous sa forme d'ion libre. Ainsi, le lanthane étant présent à une concentration moindre, sa concentration liée aux surfaces biologiques sera également diminuée .

3.2.2 Comportement du La dans le milieu d'exposition

La toxicité du lanthane en présence ou en absence d'acide malique a été étudiée pour estimer le seuil de toxicité de ce métal chez l'algue *C. fusca*. Le suivi de la concentration de lanthane dans le témoin (solution sans algues) a été effectué sur une période de 120 h en présence du malate et entre 24 et 120 h en absence de malate. Les figures 3.4, 3.5 et 3.6 présentent la stabilité de La en solution en absence ou en présence de l'acide malique. La concentration du lanthane dans tous les traitements n'a pas

significativement varié par rapport au témoin avant filtration (fig. 3.4), suggérant que l'adsorption du lanthane sur les parois des erlenmeyers est négligeable. En revanche, la figure 3.7 montre que les concentrations de lanthane obtenues après filtration (porosité du filtre < 0,4 μm) ont été inférieures à celles obtenues avant filtration. Cette diminution varie en fonction des traitements et peut atteindre 51 % pour la concentration nominale de 500 nM en absence d'acide malique. À la fin de l'exposition, la concentration de lanthane mesurée a fortement diminué pour les traitements compris entre 10 à 100 nM (fig. 3.5). Suite aux résultats en absence de malate, on observe une baisse de la concentration de La en présence des algues après filtration du milieu d'exposition. La perte de La est en moyenne de 23 % pour les traitements inférieurs à 70 000 nM et peut atteindre 38 % à 70 000 nM. Cette observation montre que l'adsorption et l'assimilation du La par les algues ont un impact plus important aux faibles concentrations qu'à des concentrations élevées de La. La variation (en proportion) de la concentration de La mesurée entre 24 et 120 h diminue avec la concentration de La dans le milieu (fig. 3.5). Cette augmentation de la stabilité des concentrations d'exposition s'expliquerait par la diminution de la population algale en solution limitant par conséquent la prise en charge du métal.

En présence du malate, une diminution de La s'observe avant 72 h d'exposition pour les traitements de faibles concentrations (50-1200 nM; fig. 3.6a). Cependant, après 72 h et au-delà de 1 200 nM, la concentration de La dans le milieu ne change pas de façon notable, quel que soit le traitement (fig. 3.6b).

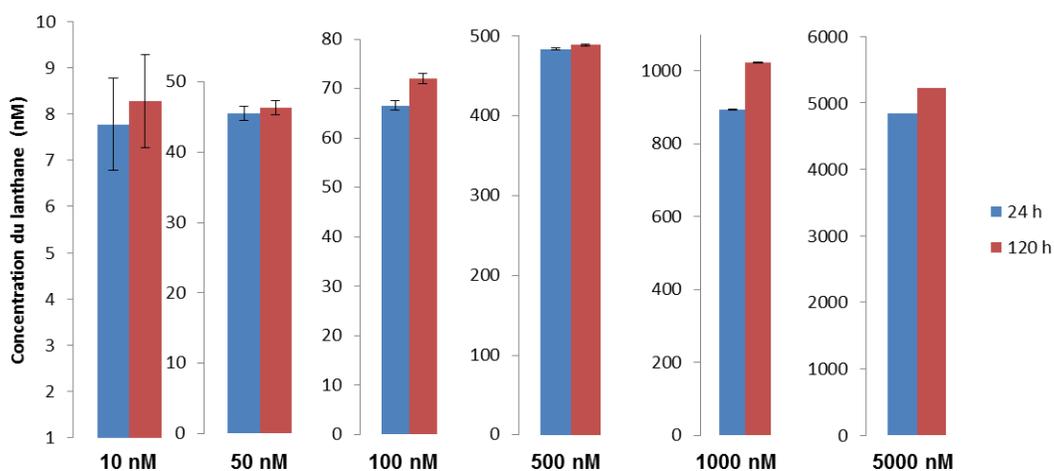


Figure 3.4 : Concentrations de lanthane en absence d'algues et d'acide malique après 24 et 120 h d'exposition à 10, 50, 100, 500, 1000 et 5 000 nM.

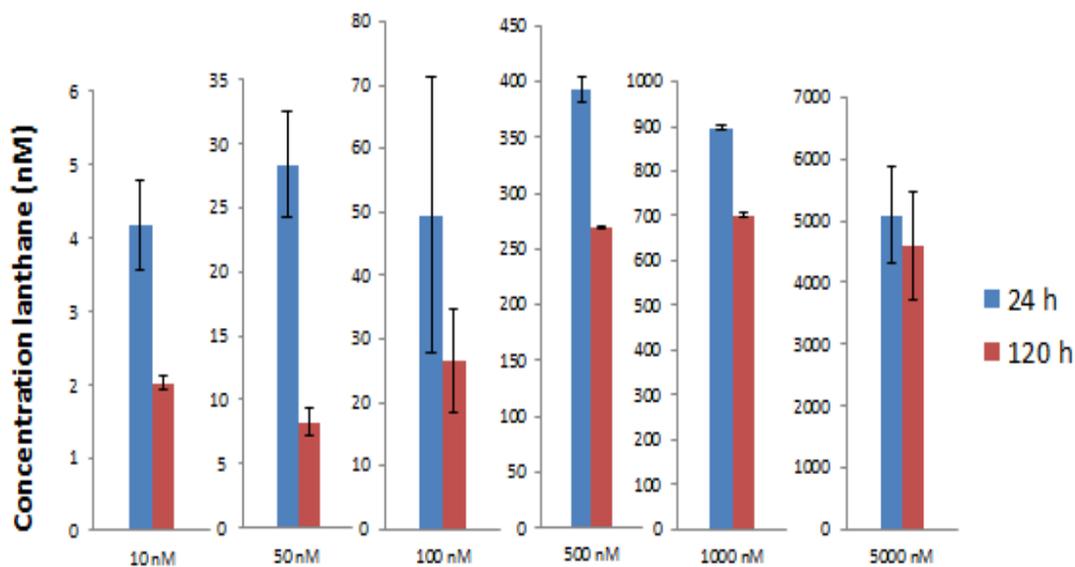
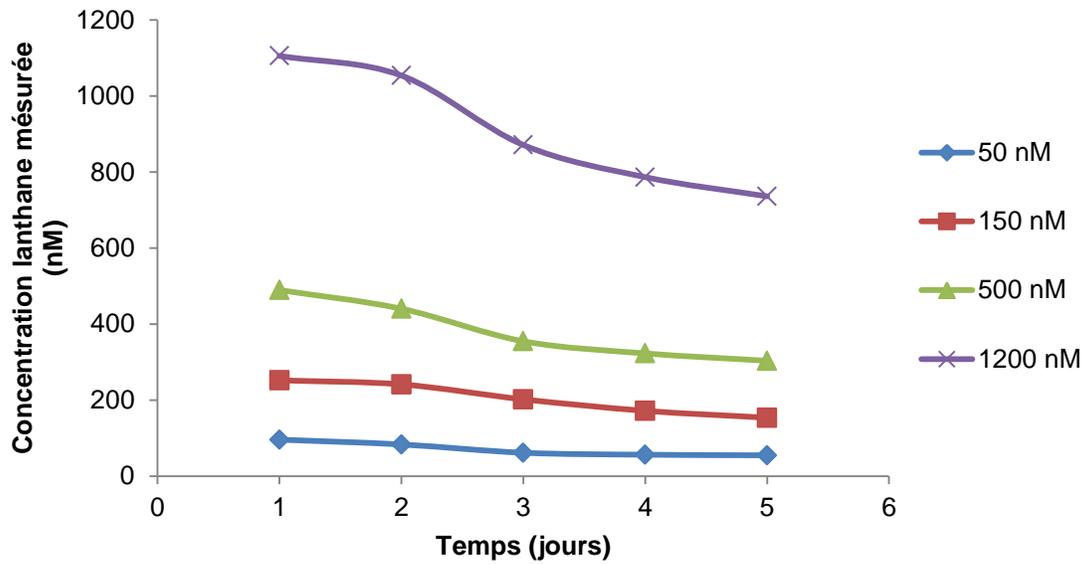
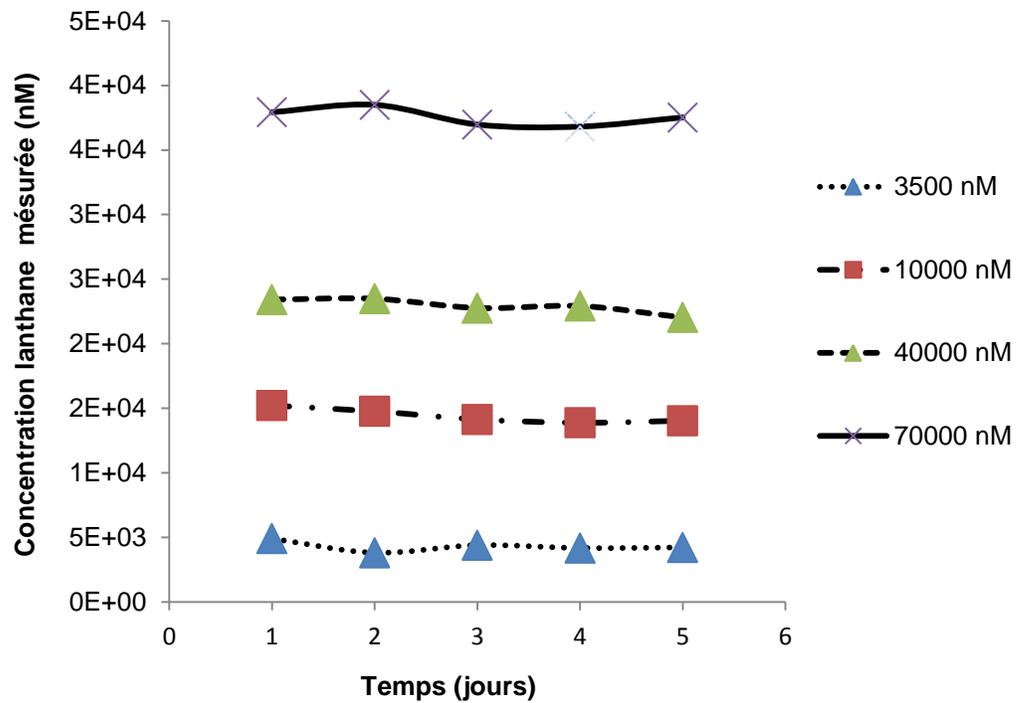


Figure 3.5 : Concentrations de lanthane en présence d'algues et en absence d'acide malique après 24 et 120 heures d'exposition à 10, 50, 100, 500, 1 000 et 5 000 nM de lanthane.



(a)



(b)

Figure 3.6 : Concentrations de lanthane en présence d'algues et d'acide malique après 120 heures d'exposition à 50, 150, 500, 1 200 nM (a) et 3 500, 10 000, 40 000, 70 000 nM (b) de lanthane.

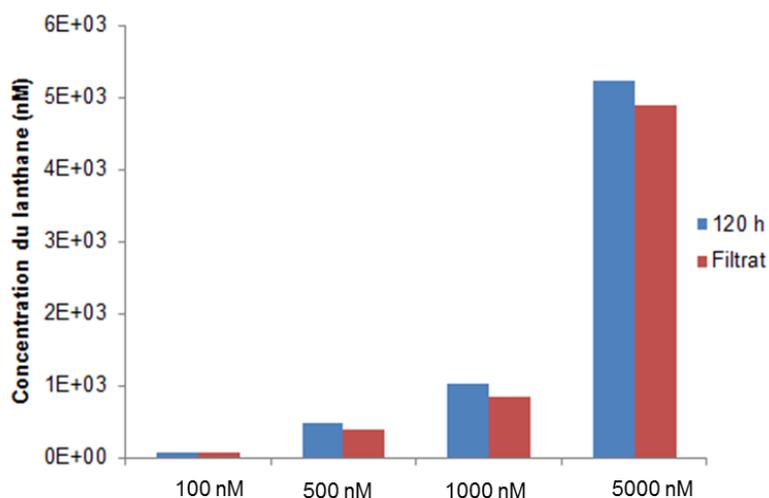


Figure 3.7 : Concentrations de lanthane en solution en présence d'algues et en absence d'acide malique après 120 heures d'exposition à 100, 500, 1 000 nM et 5 000 nM de lanthane.

3.2.3 Exposition au La en absence d'acide malique

- *Effet sur la croissance*

Les résultats obtenus montrent que lors de l'exposition de *C. fusca* au lanthane, la croissance algale suit une courbe de croissance classique (fig. 3.8). La première phase est observée en début de cycle (0-24 h) et correspond à la phase de latence. La deuxième phase est la croissance exponentielle (24-96 h) et finalement la phase stationnaire (96-120 h).

La figure 3.8 illustre les effets du lanthane sur l'algue verte *C. fusca* à différentes concentrations. On observe, après 24 h, une diminution de la population algale comparativement pour tous les traitements au début de l'expérience, incluant le témoin. Les algues sont plus sensibles aux effets du La dans la gamme de concentration de 1000-5000 nM à cette période (Beaubien, 2015). On peut aussi présumer que l'inhibition de la croissance des algues serait liée à l'action directe du La sur la physiologie cellulaire de l'algue lors de l'exposition. Après 48 h d'exposition, la concentration algale de tous les échantillons est relativement différente. Cette période marque en fait le début de la phase de croissance exponentielle des cellules. D'après Beaubien (2015) la vitesse maximale de croissance des algues est atteinte autour de 48 h (milieu sans phosphore ni oligo-éléments) tandis que nos résultats indiquent que celle-ci est atteinte à environ 72 h de croissance. Cette différence temporelle de latence de croissance des algues pourrait s'expliquer par des mécanismes d'ajustements métaboliques en

présence du phosphore organique. L'effet mesuré nous laisse suggérer aussi l'effet des oligo-éléments sur la prise en charge du La. Nous pouvons donc présumer que la croissance chez *C. fusca* est meilleure en présence du phosphore organique et des oligoéléments en comparaison de ce que Beaubien (2015) a observé. Notons que la concentration de 50 nM de La stimule le rendement cellulaire après 120 h d'exposition par rapport au groupe témoin. Pour cette concentration, la densité cellulaire est supérieure à proportion de 6 % par rapport au groupe témoin. L'analyse de variance montre que la variabilité de la densité cellulaire n'est qu'apparente puisqu'il n'existe pas de différence significative ($p > 0,05$). Ce mécanisme connu sous le nom de « effet d'hormèse » se caractérise par une stimulation aux faibles concentrations de contaminants chez un organisme vivant (Calabrese & Baldwin, 2002, Calabrese, 2009). En revanche, à une concentration de 5 000 nM, le lanthane devient toxique pour la cellule. L'analyse de variance montre une différence significative ($p < 0,001$) entre le traitement et le groupe témoin. De plus cette analyse confirme cette différence significative entre les points de la courbe à 50 nM, ce qui veut dire qu'il n'y a plus de différence significative dans la croissance cellulaire durant les jours 3, 4 et 5. Toutefois, les résultats statistiques confirment qu'à une concentration aussi élevée que 5000 nM de lanthane, on peut voir qu'il y a une augmentation significative de la croissance cellulaire durant 5 jours d'exposition. Notons finalement que le pH d'exposition n'a pas varié de façon notable pour tous les traitements (entre 5,40 et 5,49).

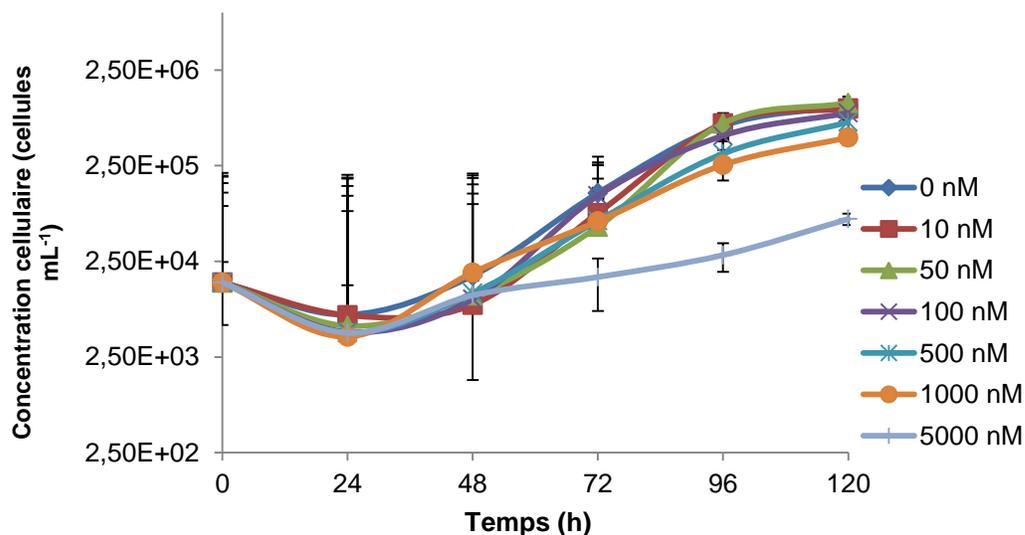


Figure 3.8 : Courbe de croissance de *C. fusca* exposée à différentes concentrations de lanthane en absence de ligands (acide malique) en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures.

La concentration efficace moyenne 50 % (CE50) du La par rapport au rendement final de chaque traitement a été calculée à partir de la densité cellulaire moyenne du groupe témoin à l'aide d'une régression non linéaire. Le résultat de la régression est présenté à la figure 3.9. La CE50 obtenue est présentée au tableau 3.4. Cette valeur est proche de celle obtenue par Beaubien (2015) (490 ± 70) chez *C. fusca* après une exposition de 120 h dans un milieu sans phosphate, sans EDTA et sans oligo-éléments.

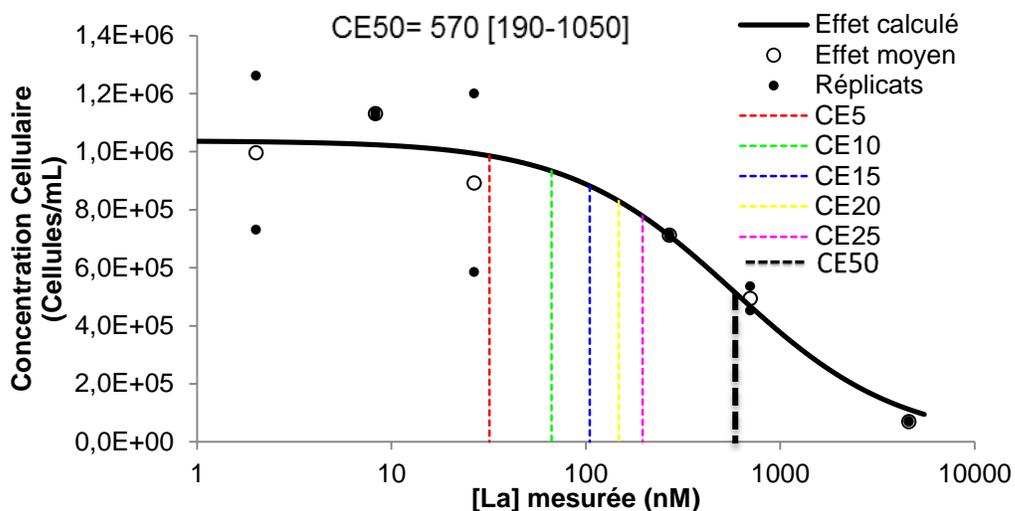


Figure 3.9 : Concentrations cellulaires aux témoins en fonction de la concentration de lanthane mesurée en solution après 120 h d'exposition sans ligand (acide malique).

Tableau 3.4 : La valeur de CE50 de La pour *C. fusca* en absence de malate et son intervalle de confiance après 120 h d'exposition.

Temps	120 h
CE50	570 nM
Intervalles de confiance	[190-1050]

3.2.4 Exposition au La en présence de l'acide malique

- Effet sur la croissance

La concentration mesurée en La de l'échantillon de référence *Aquatic plant (Lemna minor*, BCR, 670) a été de $0,410 \mu\text{g/g}$, ce qui représente une récupération de 84 % par rapport à la valeur certifiée de $0,487 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$. Les concentrations de La mesurées en solution en début de l'expérience étaient de 60, 180, 600, 1 440, 2 730, 9 890, 39 500 et 69 200 nM alors que les concentrations nominales étaient de 50, 150, 500, 1 200, 3 500, 10 000, 40 000 et 70 000 nM. La figure 3.10 présente les courbes de croissance des

algues exposées à différentes concentrations de La en présence de 10^{-4} M d'acide malique. Après 24 h d'exposition, la concentration algale des milieux d'exposition est faible contrairement au témoin. Le rendement cellulaire diminue avec l'augmentation de la concentration de La en solution, suggérant un effet toxique. Par ailleurs, après 48 h d'exposition, le retard de croissance persiste pour les traitements à 40 et 70 μ M. En revanche, on observe qu'après 72 h d'exposition, les traitements à des concentrations de 3,5 μ M et moins ne sont pas différents du témoin, contrairement aux traitements supérieurs. En comparant les densités cellulaires des différents traitements au témoin après 120 heures, on observe une diminution drastique de la population algale exposée aux concentrations de 3,5 μ M et plus avec une absence totale de croissance pour la concentration d'exposition de 70 μ M. Aux concentrations d'exposition de 1,2 μ M et moins, toutes les cultures ont atteint sensiblement la même densité cellulaire. La concentration de 3,5 μ M correspond au point expérimental auquel on observe l'effet le plus élevé par rapport aux concentrations inférieures et au témoin, suggérant que cette concentration s'approcherait de la concentration la plus faible à laquelle on observe un effet (LOEC, ou 'Lowest Observed Effect Concentration')

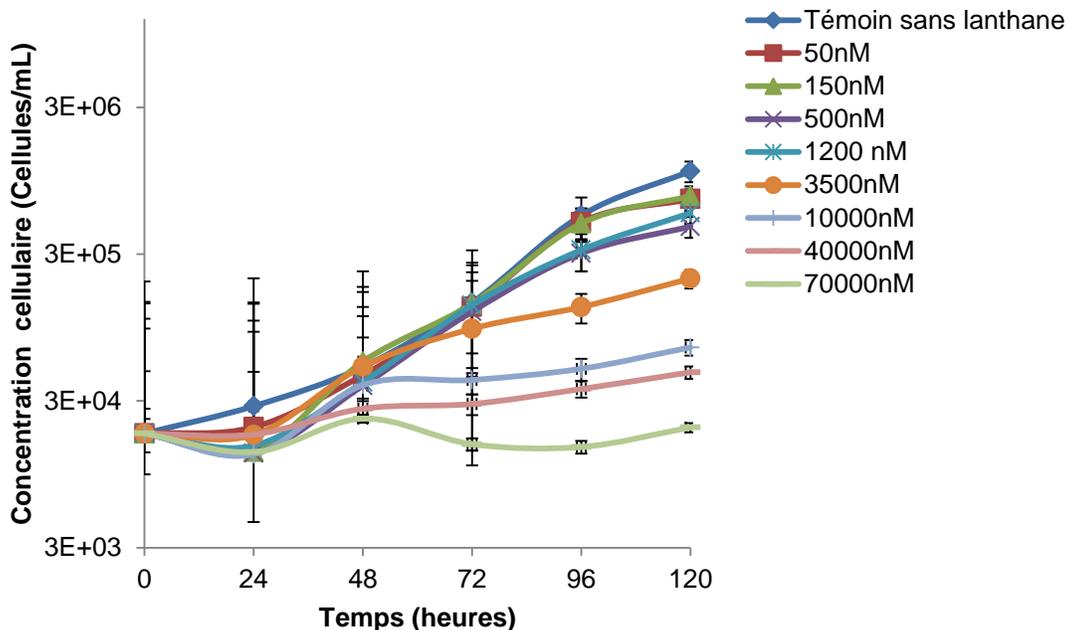


Figure 3.10 : Courbe de croissance de *Chlorella fusca* exposée à différentes concentrations de lanthane en présence d'acide malique en fonction du temps.

En effet, comme en témoigne la figure 3.10, la densité cellulaire serait proportionnelle à la concentration de La en solution dans le temps. En effet, en comparant les résultats obtenus au temps 72 h à ceux obtenus à 96 h et 120 h, on observe une différence significative ($p < 0,05$) pour les concentrations testées comprises entre 0 et 3 500 nM. Par contre, il n'existe pas de différence significative pour des fortes concentrations (10 000 nM ; 40 000 nM et 70 000 nM) de La.

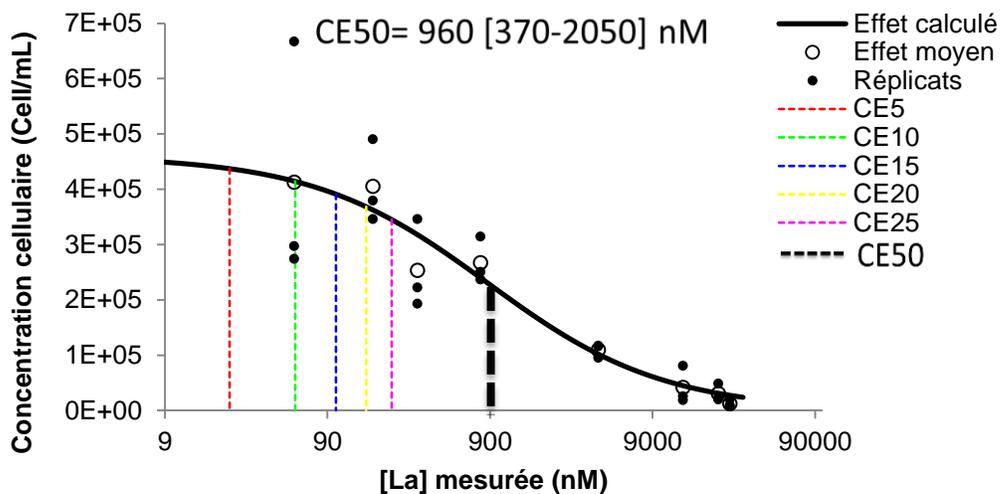
On retrouve à la figure 3.11 la concentration algale après 96 et 120 h en fonction de la concentration mesurée pour chaque traitement. Les concentrations de La qui induisent l'inhibition à 50 % (CE50) de la croissance de *C. fusca aux* différents temps d'exposition calculées sont présentées au tableau 3.5. La CE50 calculée en présence d'acide malique (360 nM ; intervalle de confiance à 95 % de 140-780 nM) n'est pas différente de celle obtenue en absence d'acide malique (570 nM ; intervalle de confiance à 95 % de 190-1 050 nM). En présence du ligand, la CE50 diminue avec l'augmentation du temps d'exposition, comme c'est habituellement le cas (Nyholm, 1990), quoique Beaubien (2015) n'avait pas observé un tel effet.

Tableau 3.5 : Les valeurs de CE50 de La pour *C. fusca* en présence d'acide malique et leurs intervalles de confiance à différents temps d'exposition.

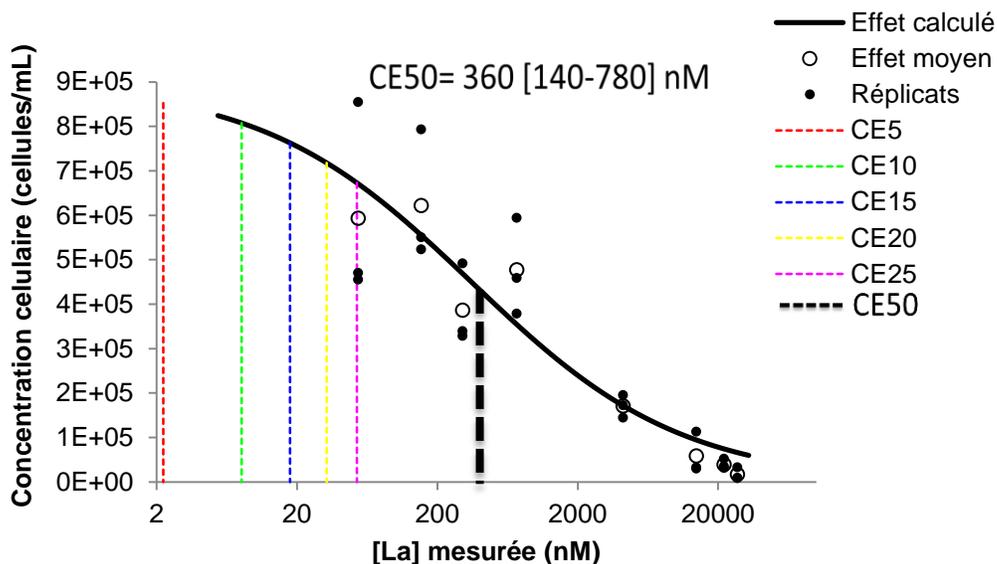
Temps	72 h	96 h	120 h
CE50 (nM)	8230	960	360
Intervalles de confiance (nM)	[3540-13 980]	[370-2050]	[140-780]

- ***Ion libre et internalisation***

Afin d'évaluer l'applicabilité du BLM, les rendements cellulaires ont été rapportés en fonction de la concentration de l'ion libre La^{3+} en lieu et place de la concentration totale de La en solution. Selon le BLM La réponse biologique des organismes aquatiques varie en fonction du métal libre lors d'expositions à court terme, au laboratoire et ce, à pH et dureté constants, ainsi qu'en présence de complexes métalliques (Campbell, 1995).



(a)



(b)

Figure 3.11 : Concentrations cellulaires en présence de 10^{-4} M acide malique en fonction de la concentration mesurée de lanthane après 96 h (a) et 120 h (b) d'exposition.

- **Ion libre**

Les figures 3.12 et 3.13 présentent la concentration algale en fonction de La^{3+} libre en solution. Après 120 h d'exposition, les concentrations totales effectivement mesurées étaient de 5,15 ; 27,3 ; 49,3 ; 379 ; 862 et 4 910 nM pour un milieu sans acide malique et de 55 ; 154 ; 303 ; 736 ; 4 220 ; 14 000 ; 22 000 et 27 500 nM pour le milieu avec l'acide malique. La concentration des ions libres correspondante en solution varie entre les

différents traitements. Tel qu'attendu, on remarque que la concentration du La libre augmente avec la concentration mesurée en solution en présence ou en absence d'acide malique. Pour une concentration donnée de La total, les densités cellulaires pour les différents traitements en présence de malate sont faibles comparativement aux densités cellulaires en absence de malate. Cet écart pourrait s'expliquer par la différence de concentration en La libre entre les milieux. Toutefois, nous n'avons pas pu extraire les concentrations efficaces (CE) de La^{3+} libre nécessaires pour baisser la densité cellulaire de 25 et 50 % par rapport à celles observées dans un milieu sans La en présence d'acide malique car les régressions n'étaient pas significatives ($P=0,63$). Les valeurs obtenues en absence d'acide malique sont résumées dans le tableau 3.6. Les flux d'internalisation des métaux n'augmentent pas toujours de façon linéaire en raison de la saturation des systèmes de transport membranaire, ce qui a été observé par (Yang *et al.*, 2014) sur l'exposition de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* avec de l'euporium. Ces auteurs ont suggéré que l'acide malique pouvait jouer un rôle dans la biodisponibilité et la toxicité des métaux.

Tableau 3.6 : Les valeurs de concentrations efficaces de La^{3+} libre pour *C. fusca* en absence d'acide malique et leurs intervalles de confiance après 120 h d'exposition.

Concentration efficace (%)	25	50
$[\text{La}^{3+}]$ (nM) Milieu sans acide malique	80,4	280
[Intervalles de confiance] (nM)	[4,40-210]	[67,5-630]

En 2015, (Beaubien) a obtenu en absence de malate une CE50 de 430 ± 60 nM de La^{3+} libre. Cette valeur est supérieure à celle du tableau 3.6, mais à l'intérieur de l'intervalle de confiance. Cette différence peut être due à la composition chimique du milieu d'exposition. En présence de phosphates, l'algue dispose d'un nutriment essentiel pour stocker de l'énergie (sous forme d'ATP) indispensable à ses fonctions métaboliques et assurer une croissance optimale. Mais cette énergie serait possiblement mal répartie (détoxiquer le métal et hydrolyser le P_{org}), entraînant peu de protection à la prise en charge du La.

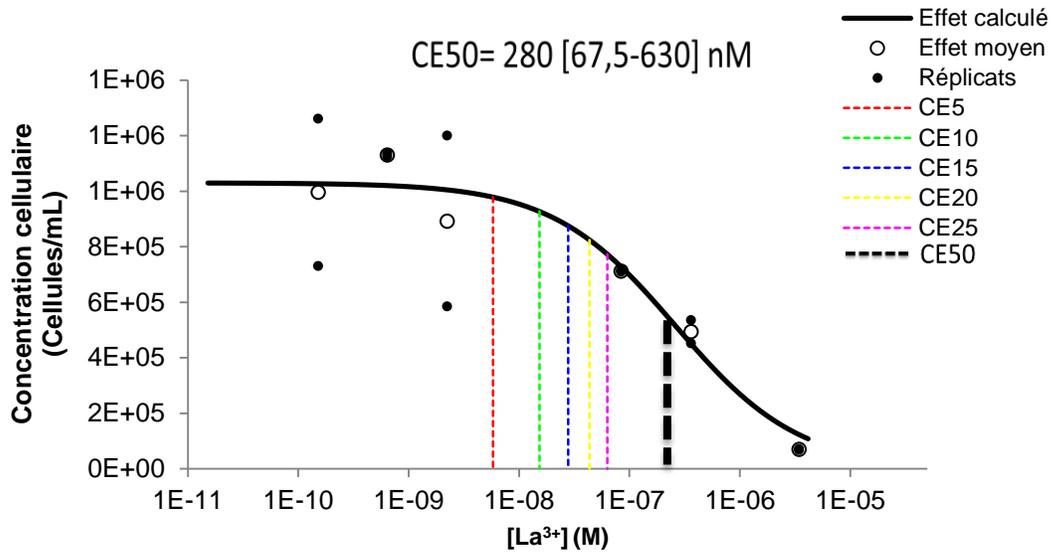


Figure 3.12 : Concentrations cellulaires en fonction de la concentration d'ion libre de La en solution après 120 h d'exposition en absence d'acide malique.

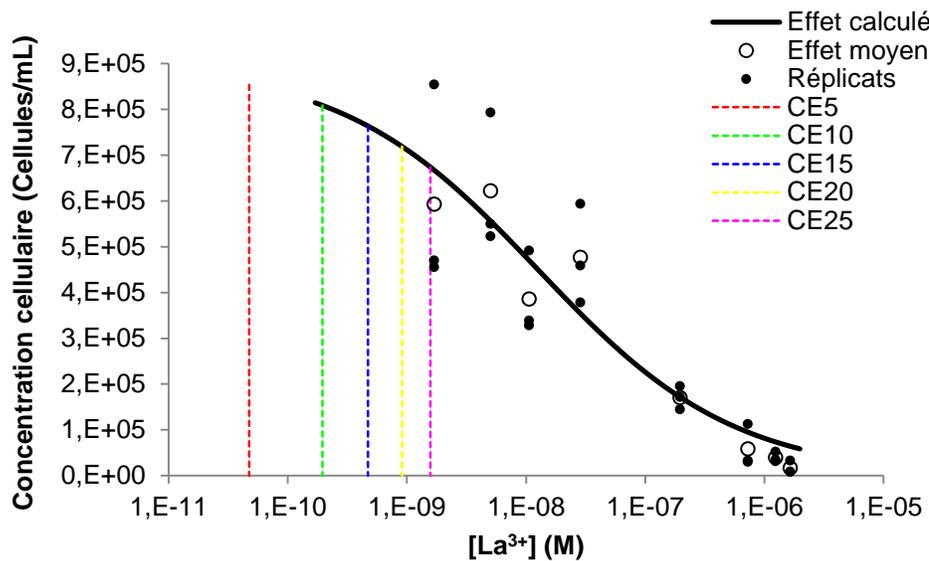


Figure 3.13 : Concentrations cellulaires en présence d'acide malique et en fonction de la concentration d'ion libre de La en solution après 120 h d'exposition.

- **Internalisation**

La figure 3.14 illustre la courbe de régression de la densité cellulaire en fonction de la concentration intracellulaire de La mesurée dans le milieu tamponné. Les résultats obtenus montrent que plus la concentration intracellulaire en La augmente, plus les cellules sont affectées.

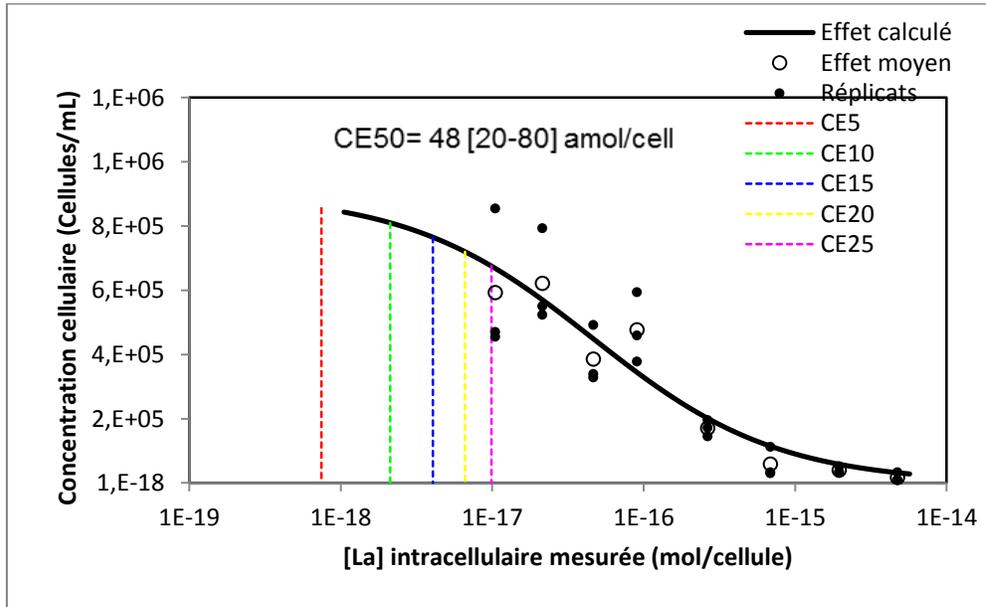


Figure 3.14 : Les concentrations cellulaires en présence d'acide malique et en fonction de la concentration intracellulaire de La après 120 h d'exposition.

On note l'existence d'une corrélation négative entre la croissance cellulaire et la concentration de La internalisé en moyenne par chaque cellule. La CE50 en présence d'acide malique est de 48 amol/cell avec un intervalle de confiance (IC) de [20-80]. Les concentrations intracellulaires en La ont également été présentées en fonction de la concentration totale de lanthane en solution. Les résultats obtenus sont indiqués à la figure 3.15.

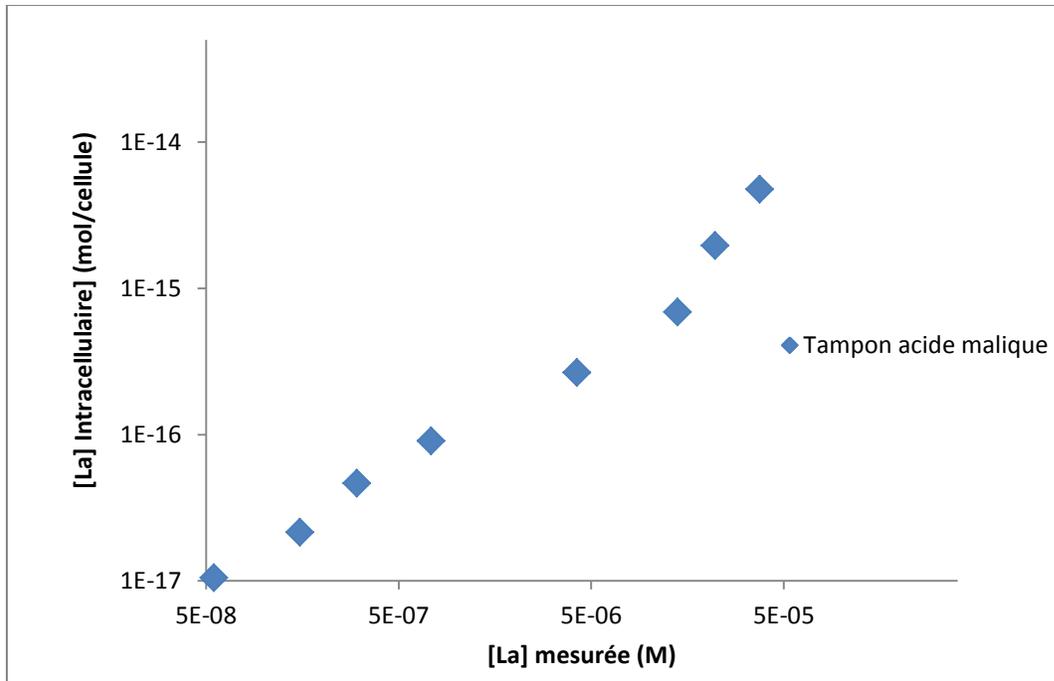


Figure 3.15 : Les concentrations intracellulaires en La après 120 h d'exposition en présence d'acide malique et en fonction de la concentration moyenne de La en solution après 120 h d'exposition.

On s'attend à ce que la concentration intracellulaire de La augmente avec la concentration de La^{3+} libre en solution (Morel, 1983). Les résultats indiquent un bris de pente lorsque les concentrations atteignent des seuils qui induisent une inhibition de la croissance. On peut penser que la cellule algale contrôle moins bien l'accumulation de La au-delà des concentrations supérieures à 100 nM de La^{3+} (figure 3.16). Finalement, un bilan de masse a permis de noter que l'accumulation dans les cellules représentent une faible portion du lanthane présent au début de l'expérience (< 7%).

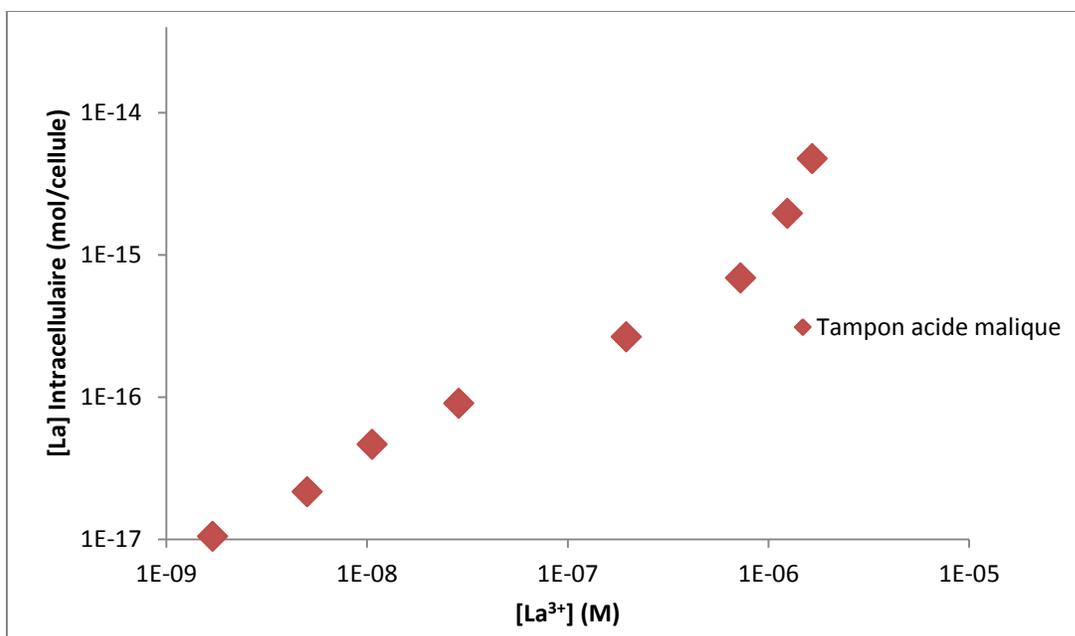


Figure 3.16 : Les concentrations intracellulaires en présence d'acide malique et en fonction de la concentration d'ion libre La^{3+} en solution après 120 h d'exposition.

3.3 Exposition de *C. fusca* au cérium

3.3.1 Spéciation du Ce

Comme pour le lanthane, la spéciation du Ce en solution a été estimée avec le logiciel MINEQL+ (version 5.0) en considérant le système ouvert à l'atmosphère à un pH de 5,5. Le tableau 2.6 de la section 2.2.6 indique les concentrations totales des espèces en solution utilisées pour effectuer les calculs. Les concentrations des différentes formes chimiques obtenues du Ce en absence et en présence d'acide malique sont inscrites dans les tableaux 3.7 et 3.8. La concentration du Ce^{3+} est plus élevée dans le milieu sans malate (0,43 μM (42,8 %)) que dans le milieu en présence de l'acide malique (0,023 μM (2,3 %)). En absence de malate, les résultats montrent que la majorité de Ce se retrouve sous forme CeEDTA^- à une concentration de 0,57 μM (57,2 %). Le Ce forme peu de complexes avec les ligands inorganiques (<1 %). Pour ce qui est du milieu avec tampon (acide malique), la fraction majoritaire est CeMal^+ (80,1 %) à une concentration de 0,80 μM . Ceci démontre que le Ce se fixe préférentiellement aux sites de complexation de l'acide malique.

Tableau 3.7 : Concentrations et proportions des complexes formés dans le milieu d'exposition sans acide malique à une concentration totale de cérium de 1 µM.

Spéciation	Concentration (M)	Pourcentage (%)
Ce ³⁺	4,28E-07	42,8
CeOH ²⁺	4,19E-10	<1
Ce ₂ (OH) ₂ ⁴⁺	2,68E-18	<1
Ce ₃ (OH) ₅ ⁴⁺	3,44E-26	<1
CeSO ₄ ⁺	5,44E-53	<1
Ce(CO ₃) ₂ ⁻	2,32E-16	<1
CeCO ₃ ⁺	1,03E-10	<1
CeEDTA ⁻	5,72E-07	57,2
Ce(OH) ₃ (s)	—	—

Par comparaison aux résultats de Beaubien (2015) sur l'exposition de *C. fusca* dans les conditions similaires, mais en absence d'une source de phosphore et des oligo-éléments, la fraction de Ce libre était ~2 fois plus élevée soient 0,89 µM (88,9 %) et 0,043 µM (4,3 %) en absence et en présence de malate respectivement.

Tableau 3.8 : Concentrations et proportions des complexes formés dans le milieu d'exposition en présence d'acide malique (100 µM) à une concentration totale de cérium de 1 µM.

Spéciation	Concentration (M)	Pourcentage (%)
Ce ³⁺	2,25E-08	2,3
CeOH ²⁺	2,18E-11	<1
Ce ₂ (OH) ₂ ⁴⁺	7,43E-21	<1
Ce ₃ (OH) ₅ ⁴⁺	4,91E-30	<1
CeSO ₄ ⁺	2,79E-09	<1
Ce(CO ₃) ₂ ⁻	1,20E-17	<1
CeMal ⁺	8,01E-07	80,1
CeCO ₃ ⁺	5,34E-12	<1
CeEDTA ⁻	1,735E-7	17,3
Ce(OH) ₃ (s)	—	—

3.3.2 Comportement du Ce dans le milieu d'exposition

Dans les conditions expérimentales similaires à celles employées pour les expériences avec le lanthane, des expériences de toxicité avec le Ce ont été réalisées en présence et en absence d'acide malique. Afin d'évaluer la prise en charge et la toxicité du métal d'intérêt, l'évolution de la concentration de Ce en solution a été mesurée tous les jours pendant 120 h avec l'acide malique et après 24 et 120 h en absence d'acide malique. Après 120 h, la concentration de Ce dans le filtrat (<0,4 μm) pour chaque traitement a été comparée à la valeur de Ce obtenue avant filtration. Il ressort qu'en absence de malate et d'algues la concentration du Ce diminue légèrement avec le temps dans les différents traitements. Comme pour le lanthane, un écart négligeable est observé entre la concentration nominale et la concentration mesurée de Ce en solution après 24 h. On peut donc penser que l'adsorption du Ce sur les parois des erlenmeyers ou sur les particules en solution est également négligeable. Par exemple, la perte de Ce en solution dans le milieu d'exposition peut atteindre 9 % pour le traitement de 5 000 nM (figure 3.17). Entre 24 et 120 h, les concentrations de Ce diminuent et cette baisse est plus prononcée pour la concentration de 50 nM.

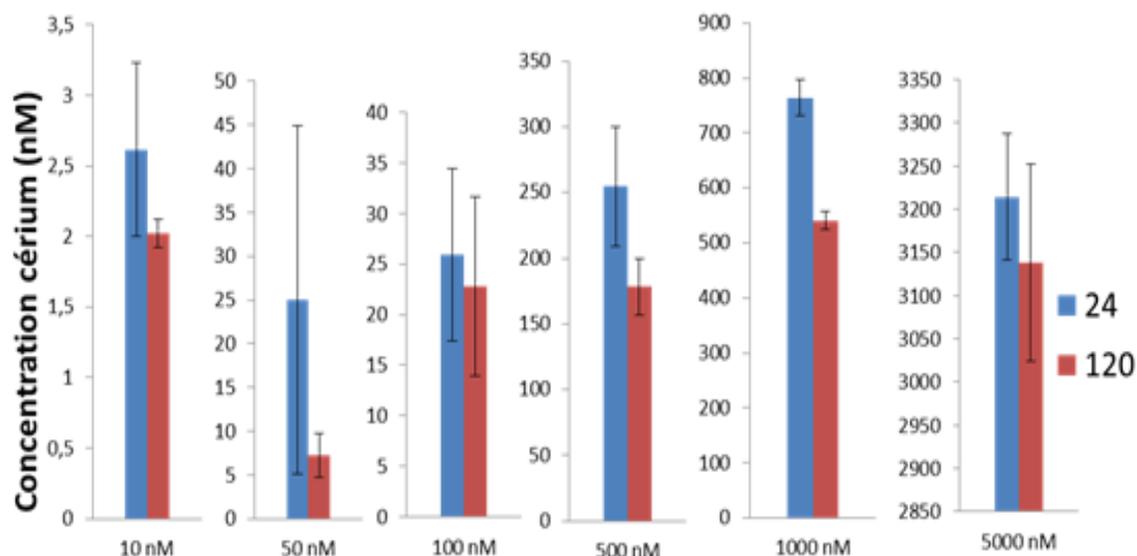


Figure 3.17 Concentrations de Ce en présence d'algues et en absence d'acide malique après 24 et 120 h d'exposition à 10, 50, 100, 500, 1 000 et 5 000 nM.

En absence d'algues et d'acide malique, les concentrations de Ce mesurées en solution sont quasi constantes dans le temps pour les concentrations nominales de 10 nM, 50

nM et 100 nM (figure 3.18). Les données probantes n'ont pas été obtenues pour les concentrations de Ce testées à 500 nM, 1 000 nM et 5 000 nM. En comparant les courbes d'évolution des concentrations en La et en Ce (figures 3.5 et 3.17), le Ce est moins disponible en solution que le La, suggérant que les algues adsorbent et/ou absorbent plus le Ce que le La à 10 nM, 100 nM, 500 nM, 1 000 nM et à 5 000 nM du métal en solution dans le temps. En revanche à 50 nM du métal en solution, la concentration demeure presque identique pour ces deux métaux.

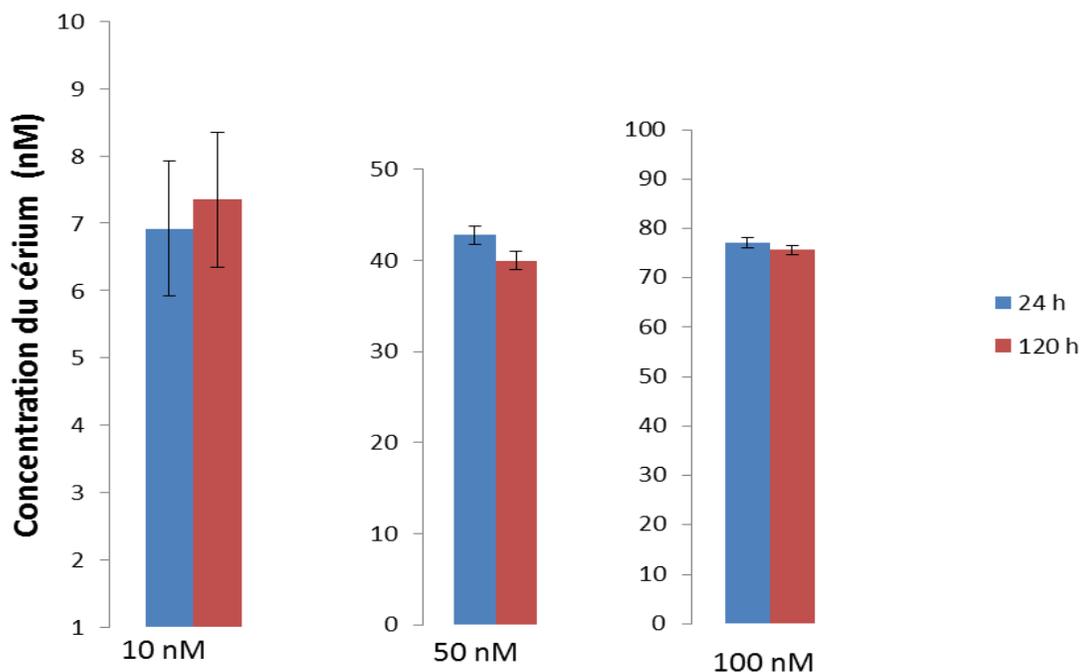


Figure 3.18 : Concentrations de Ce en absence d'algues et d'acide malique après 24 et 120 heures d'exposition à 10, 50 et 100 nM.

En présence ou en absence d'acide malique dans le milieu, la stabilité des concentrations en Ce augmente avec la concentration. Cette augmentation s'expliquerait par la diminution de la population algale en solution, limitant par conséquent la prise en charge du Ce (figures 3.17, 3.18 et 3.19). Comme en absence d'acide malique, la filtration des milieux d'exposition a pour effet de faire baisser la concentration du Ce dans le filtrat.

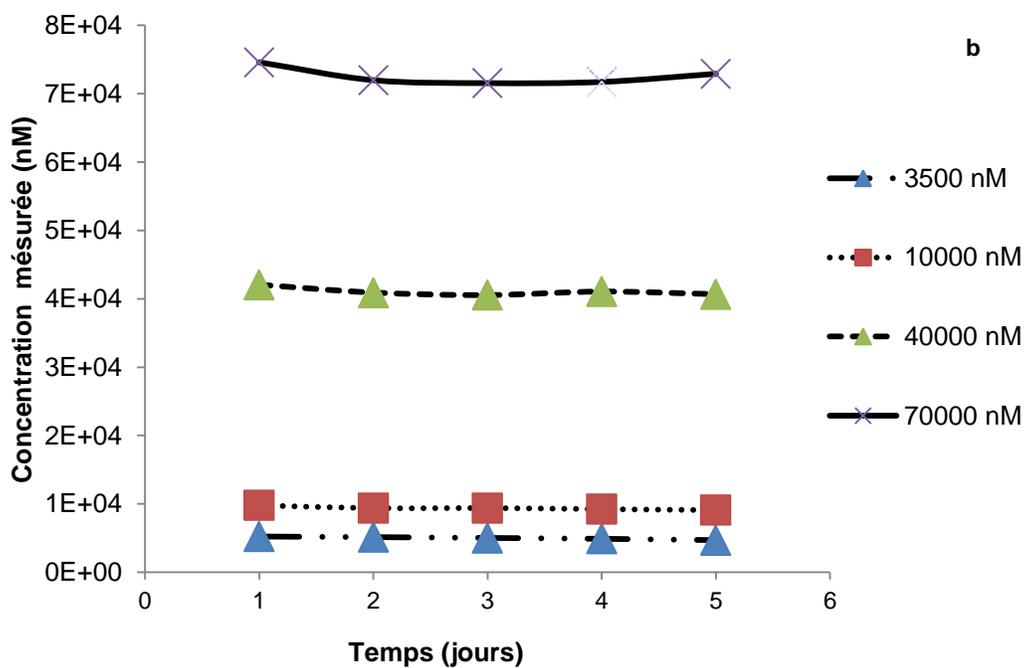
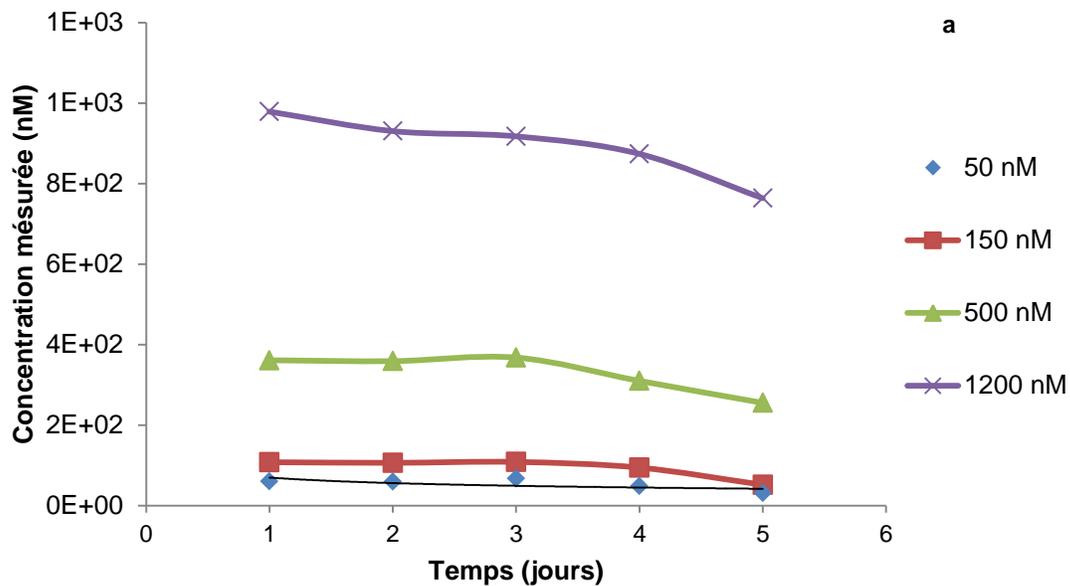


Figure 3.19 : Concentrations de cérium en présence d'algues et d'acide malique après 120 heures d'exposition à 50, 150, 500, 1 200 (a), 3 500, 10 000, 40 000 et 70 000 nM (b).

3.3.3 Exposition au Ce en absence de tampon (acide malique)

- *Effet sur la croissance*

La figure 3.20 présente les courbes de croissance par traitement. Après 24 h d'exposition, la densité cellulaire a baissé comparativement au témoin pour tous les traitements. L'écart devient plus important lorsque la concentration d'exposition est élevée. Une forte diminution est observée pour la concentration d'exposition de 5 000 nM. L'effet observé suggère une inhibition ou un délai de croissance pour atteindre sa phase exponentielle. À 48 h d'exposition, le taux de croissance est similaire pour tous les traitements à l'exception de la concentration la plus élevée. À cette période, le taux de croissance pour la gamme de concentrations comprises entre 10 et 500 nM ne diffère plus du témoin. Après 48 h les populations exposées aux concentrations supérieures à 1 000 nM ont des écarts considérables par rapport au groupe témoin. Par ailleurs, la phase de croissance exponentielle enregistrée est de 72 h contrairement à une durée de 48 h obtenue par Beaubien (2015). Nos résultats montrent que lorsque la concentration de Ce atteint le seuil de 5 000 nM, il devient toxique pour la cellule. Cependant aux concentrations inférieures, ces dernières ont un effet stimulateur sur la croissance de *C. fusca*. Ainsi, pour les concentrations d'exposition au Ce de 10, 50, 100 et 500 nM, le rendement cellulaire est supérieur au témoin après 120 h d'exposition. La variabilité du rendement cellulaire final entre les traitements et le témoin n'est qu'apparente aux concentrations de 50 nM et 500 nM puisqu'il n'existe pas de différence significative ($p > 0,05$). En revanche, on peut conclure que la densité cellulaire du traitement témoin (0 nM) est significativement différente à celle aux concentrations de 10 nM et 100 nM ($p < 0,05$).

Des effets sur la croissance, l'immunité, la reproduction seraient favorablement influencés par une exposition à des doses moyennes ou faibles de radiations (Luckey, 2006). C'est un exemple du phénomène d'hormèse décrit également par Calabrese et Baldwin (2002). Toutefois, Balusamy *et al.* (2015) ont étudié ce phénomène en exposant chez *Chlorella sp* aux concentrations de 0; 10; 50; 100; 250; 500 et 1 000 mg/L de La₂O₃ NP. Après 72 h d'exposition, les résultats obtenus montraient que le traitement à 500 mg/L avait considérablement augmenté la teneur en chlorophylle sur le groupe témoin. L'hormèse est corrélée à l'acclimatation ainsi qu'à la plasticité phénotypique des organismes, et peut jouer un rôle important dans l'adaptation à des changements dans l'environnement (Costantini *et al.*, 2010).

Ces résultats corroborent ceux de Beaubien (2015) sur l'effet du Ce chez *C. fusca* en absence de phosphore en solution pour la même gamme de concentration.

Les concentrations mesurées en solution diffèrent des concentrations nominales de Ce (10, 50, 100, 500, 1 000 et 5 000 nM) utilisées pour observer un effet toxique sur *C. fusca*. Les concentrations efficaces moyennes 50 % (CE50) de la croissance de *C. fusca* aux différents temps d'exposition après 120 h d'exposition ont été calculées à l'aide d'une régression non linéaire de la courbe dose-réponse (figure 3.21). La CE50 obtenue est présentée au tableau 3.9.

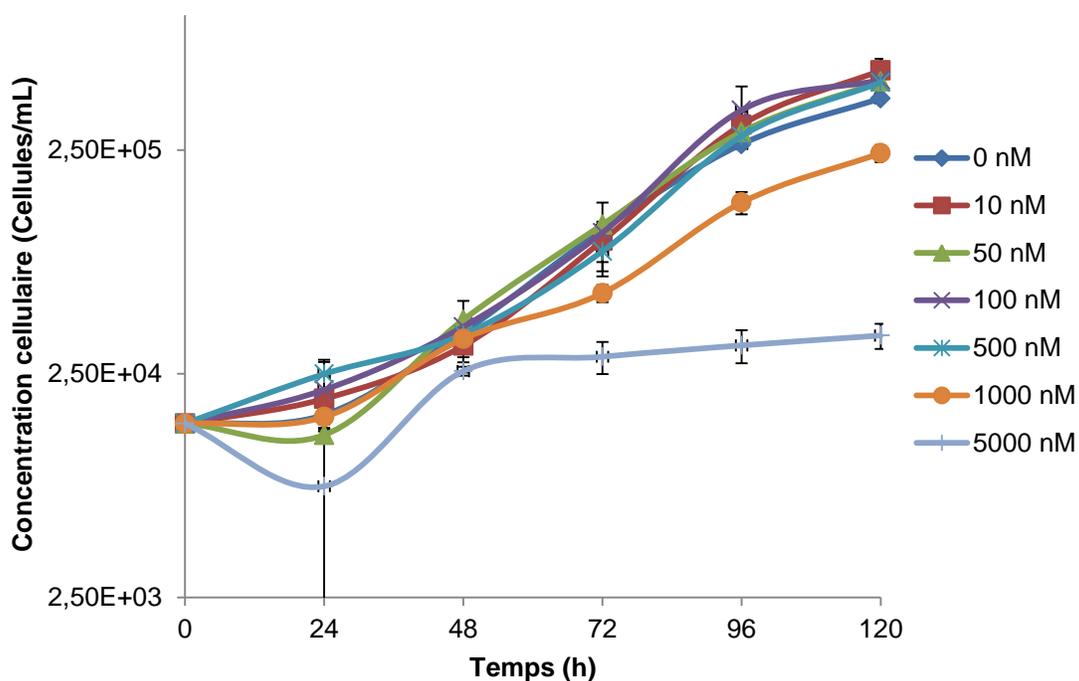


Figure 3.20 : Courbes de croissance de *Chlorella fusca* exposée à différentes concentrations de Ce sans acide malique en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures.

Tableau 3.9 : La valeur de CE50 de Ce pour *C. fusca* en absence d'acide malique et son intervalle de confiance après 120 h d'exposition.

Temps	120 h
CE50	530 nM
Intervalle de confiance	[430-670]

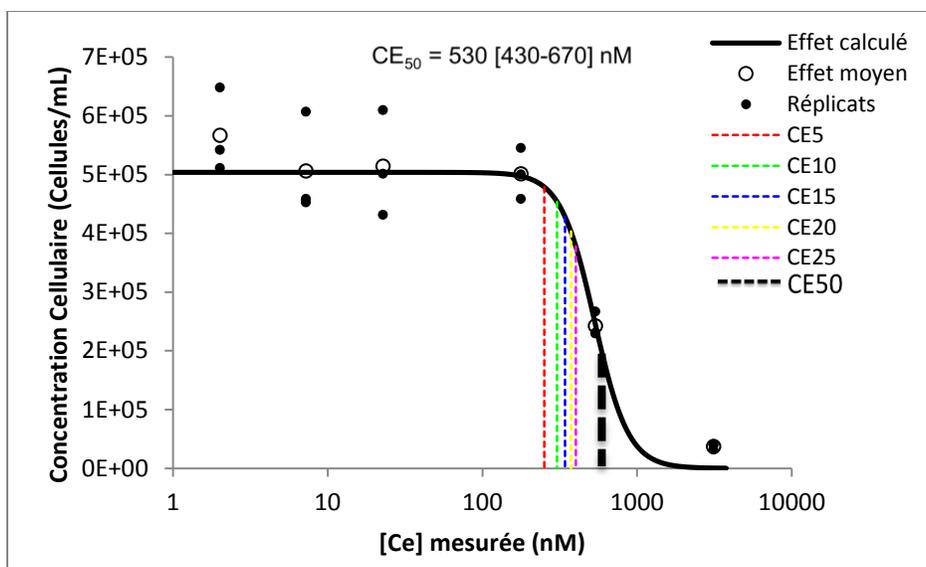


Figure 3.21 : Concentrations cellulaires en absence d'acide malique et en fonction de la concentration de Ce mesurée en solution après 120 h d'exposition.

D'après les résultats de Beaubien (2015) obtenus dans les conditions similaires, la CE50 de Ce chez *C. fusca* était de 190 ± 70 nM après 120 h d'exposition. L'effet observé montre que la croissance de *C. fusca* exposée au Ce est moins affectée en présence qu'en absence de P_{org} . Nos résultats semblent suggérer une toxicité nettement plus faible dans nos conditions (présence de P_{org} , d'EDTA et d'oligo-éléments).

3.3.4 Exposition au Ce en présence d'acide malique

- Effet sur la croissance

La concentration mesurée en Ce de l'échantillon de référence *Aquatic plant (Lemna minor, BCR, 670)* a été de $0,77 \mu\text{g/g}$, ce qui représente une récupération de 78 % par rapport à la valeur certifiée de $0,99 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$. Les concentrations nominales (50, 150, 500, 1 200, 3 500, 10 000, 40 000 et 70 000 nM) de Ce pour étudier la toxicité de *C. fusca* étaient différentes des concentrations mesurées qui sont 44, 117, 379, 1 030, 5 590, 9 850, 43 000 et 75 600 nM. La figure 3.22 montre les courbes de croissance des algues exposées à différentes concentrations de Ce en présence de 10^{-4} M de l'acide malique. Après 24 h d'exposition, la concentration algale des milieux d'exposition baisse comme chez le témoin. Le rendement cellulaire diminue avec l'augmentation de la concentration de Ce en solution. Cette baisse de croissance pourrait correspondre au délai que prennent les algues pour s'acclimater. Après 48 h d'exposition, le retard de

croissance continu pour les traitements 10 000, 40 000 et 70 000 nM comme avec le La et correspond à la fin de phase exponentielle. Pour 72 h d'exposition, les algues traitées aux faibles concentrations (50, 150, 500 et 1 200 nM) se trouvent en phase exponentielle et ont un taux de croissance similaire au groupe témoin, contrairement à celles soumises aux concentrations supérieures à 10 000 nM. En comparant les densités cellulaires des différents traitements par rapport au témoin après 120 heures d'exposition, on observe une diminution de la population algale exposée aux concentrations supérieures à 10 000 nM par rapport au témoin. Cette baisse est prononcée pour la concentration d'exposition de 70 000 nM. Pour de faibles concentrations d'exposition (50 nM, 150 nM, 500 nM et 1 200 nM), un effet stimulateur est observé sur la croissance de *C. fusca* comparativement au témoin. Cette réponse est qualifiée d'effet d'hormèse (Borzelleca, 2000). La variabilité du rendement cellulaire final entre les traitements et le témoin n'est qu'apparente à la concentration de 1 200 nM puisqu'il n'existe pas de différence significative ($p > 0,05$). En revanche, la densité cellulaire au traitement témoin (0 nM) est significativement différente ($p < 0,001$) à celle aux concentrations de 50 nM, 150 nM et 500 nM. Le Ce en présence du malate affecte le rendement des algues en cultures.

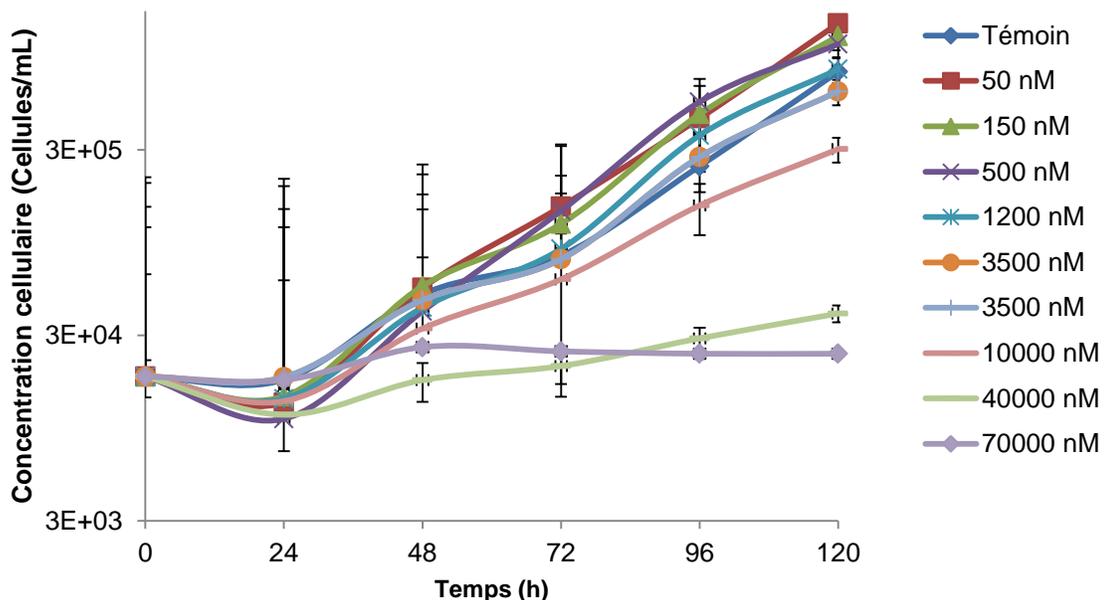


Figure 3.22. Courbes de croissance de *Chlorella fusca* exposée à différentes concentrations de Ce en présence du ligand (acide malique) en fonction du temps.

La figure 3.23 présente la densité algale en fonction de la concentration de Ce mesurée pour chaque traitement. La concentration de Ce qui induit l'inhibition à 50 % (CE50) de la population de *C. fusca* à différents temps d'exposition (48, 72, 96 et 120 h) est présentée au tableau 3.10.

La CE50 calculée en présence et en absence d'acide malique est de 3900 et 530 nM respectivement. En revanche, les valeurs obtenues par Beaubien (2015) dans des conditions semblables étaient de $6\ 000 \pm 1\ 000$ et 190 ± 70 nM. La composition du milieu d'exposition pourrait modifier la toxicité induite par les lanthanides. Cependant en présence d'acide malique, contrairement aux résultats de Beaubien (2015), la CE50 diminue avec l'augmentation du temps d'exposition et présente des écarts considérables.

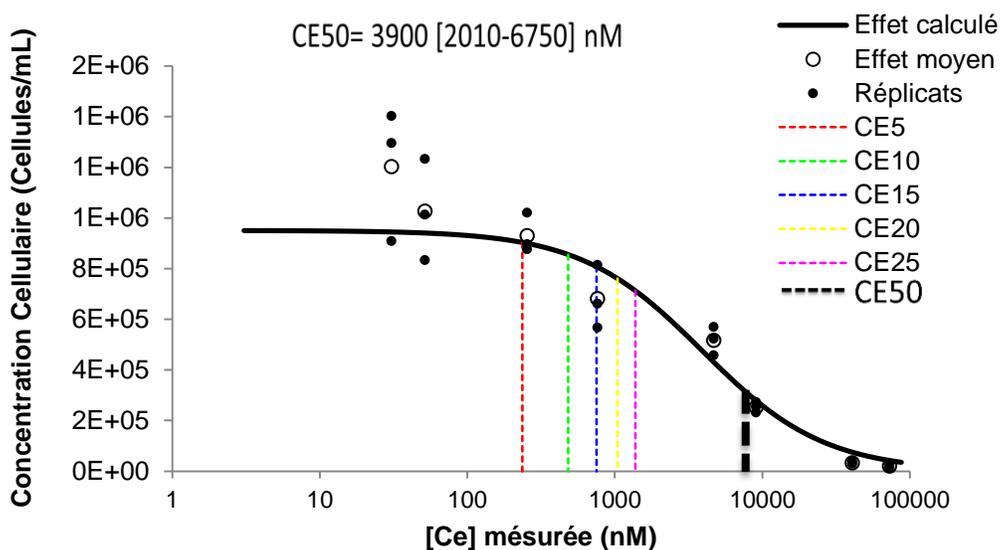


Figure 3.23 : Concentrations cellulaires en présence de 10^{-4} M d'acide malique et en fonction de la concentration mesurée de Ce en solution après 120 h d'exposition.

Tableau 3.10 : Les valeurs de CE50 de Ce pour *C. fusca* en présence d'acide malique et leurs intervalles de confiance à différents temps d'exposition.

Temps	48 h	72 h	96 h	120 h
CE50	36,5 μ M	9,62 μ M	8,29 μ M	3,90 μ M
Intervalles de confiance	[12,6-82,0]	[3,50-21,3]	[3,59-14,9]	[2,01-6,75]

- ***Ion libre et internalisation***

Comme pour le La, l'un de nos objectifs était le monitoring de la concentration cellulaire après 120 h dans les différents échantillons et la comparaison des résultats obtenus en présence et en absence d'acide malique. L'autre objectif consistait à estimer la prise en charge et la toxicité du Ce intracellulaire. Par ailleurs, la toxicité en fonction de Ce libre a été étudiée dans les milieux d'exposition

- ***Ion libre***

Les figures 3.24 et 3.25 représentent les courbes de la concentration algale en fonction du Ce libre en solution après 120 h par rapport au témoin. La gamme de concentrations de l'ion Ce^{3+} libre est plus large en présence d'acide malique que celle en absence d'acide malique aux différents traitements. En observant le rendement cellulaire en fonction du temps, on constate qu'en présence ou en absence d'acide malique, la croissance est retardée lorsque le Ce^{3+} augmente en solution. Les algues exposées aux concentrations élevées de Ce^{3+} (avec ou sans malate) ont des courbes de croissance décalées. Pour mieux cerner la toxicité du Ce, nous avons déterminé les concentrations effectives en utilisant les concentrations en Ce libre dans les milieux d'exposition et les concentrations dans la cellule. En effet, selon le BLM, la réponse biologique devrait être la même pour une concentration de Ce^{3+} libre donnée, peu importe s'il y a des ligands présents ou non. Les valeurs de CE50 obtenues en présence et absence d'acide malique sont de 100 et 160 nM respectivement. En comparant nos résultats, on constate que la CE50 est 1,6 fois plus faible en présence qu'en absence d'acide malique. Ceci représente toutefois un écart négligeable. La CE50 calculée en présence d'acide malique (100 nM ; intervalle de confiance à 95 % de 30-200 nM) n'est pas différente de celle obtenue en absence d'acide malique (160 nM ; intervalle de confiance à 95 % de 90-250 nM). À la fin de l'exposition, la concentration effective (CE) de Ce libre nécessaire pour baisser la concentration cellulaire de 5, 10, 15, 20, 25 et 50 % par rapport à celle observée dans un milieu sans lanthane est résumée au tableau 3.11.

Tableau 3.11 : Les valeurs de CE50 de Ce^{3+} libre pour *C. fusca* en absence et en présence de ligand (acide malique) et leurs intervalles de confiance après 120 h d'exposition.

(CE%)	CE5	CE10	CE15	CE20	CE25	CE50
[Ce^{3+}] (nM)						
Milieu sans ligand	26	38,8	50,5	62,4	74,8	160
[Intervalle confiance]	[2,62-79,5]	[7,02-95,2]	[12,7-106]	[20-116]	[29-120]	[90-250]
[Ce^{3+}] (nM)						
Milieu avec ligand	9,70	15,6	22,5	29,60	37,7	100
[Intervalle confiance]	[0,2-58]	[0,8-75,4]	[1,80-88]	[3,35-102]	[5,63-113]	[30-200]

La CE50 obtenue par Beaubien (2015) en absence de l'acide malique en fonction de l'ion libre était de 170 ± 60 nM alors qu'en présence d'acide malique cette valeur était de 270 ± 60 nM. Ces valeurs recoupent l'intervalle de confiance de nos résultats, suggérant que les deux approches (sans PID ou avec POD) donnent des résultats similaires pour le Ce.

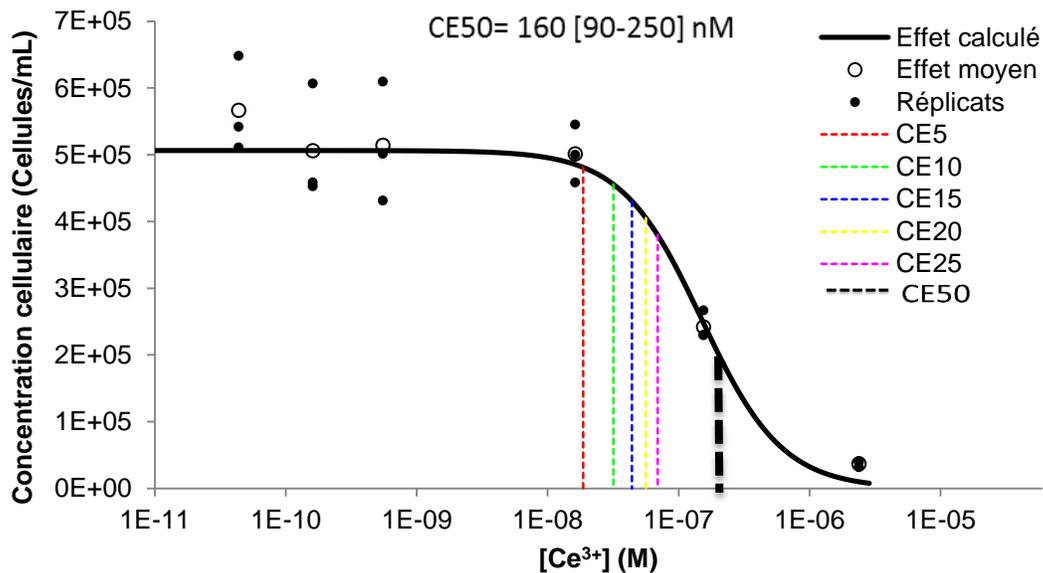


Figure 3.24 : Concentrations cellulaires en absence d'acide malique et en fonction de la concentration d'ion libre de Ce^{3+} en solution après 120 h d'exposition.

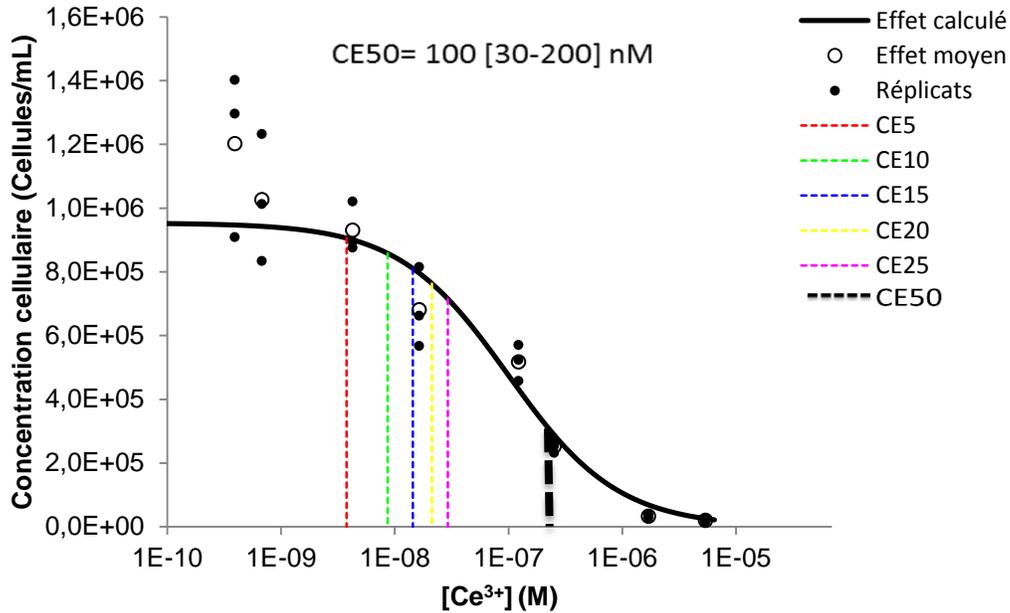


Figure 3.25 : Concentrations cellulaires en présence d'acide malique et en fonction de la concentration d'ion libre de Ce^{3+} en solution après 120 h d'exposition

La figure 3.26 illustre les densités cellulaires en fonction de la concentration intracellulaire de Ce mesurée dans le milieu tamponné avec l'acide malique. Les résultats obtenus montrent que les cellules concentrent plus de Ce dans les milieux d'exposition de forte concentration que ceux de faibles concentrations.

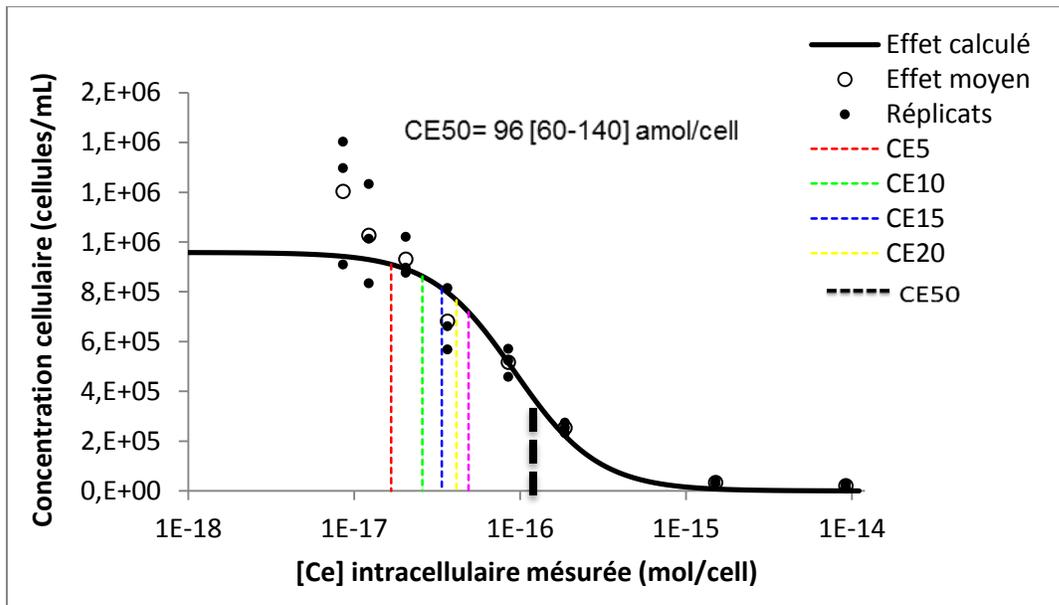


Figure 3.26 : Les concentrations cellulaires en fonction de la concentration intracellulaire de Ce en présence de l'acide malique après 120 h d'exposition.

- **Internalisation**

La CE50 en présence d'acide malique a été déterminée. La CE50 obtenue est de 96 amol/cellule [60-140], soit environ deux fois plus que pour le La. Ceci est cohérent avec nos observations pour le La qui indiquent une plus grande toxicité de ce métal que pour le Ce. La figure 3.27 nous renseigne sur la corrélation qui existe entre la concentration de métal libre en solution et la concentration moyenne de Ce internalisée.

La concentration intracellulaire en Ce a également été illustrée en fonction de la concentration totale de cérium en solution après 120 h d'exposition. Les résultats sont présentés à la figure 3.28. Finalement, un bilan de masse a permis de noter que l'accumulation dans les cellules représente une portion quantifiable mais raisonnablement faible du cérium présent au début de l'expérience (entre 0,1 et 17% ; décroissant de la concentration d'exposition la plus faible à la plus élevée).

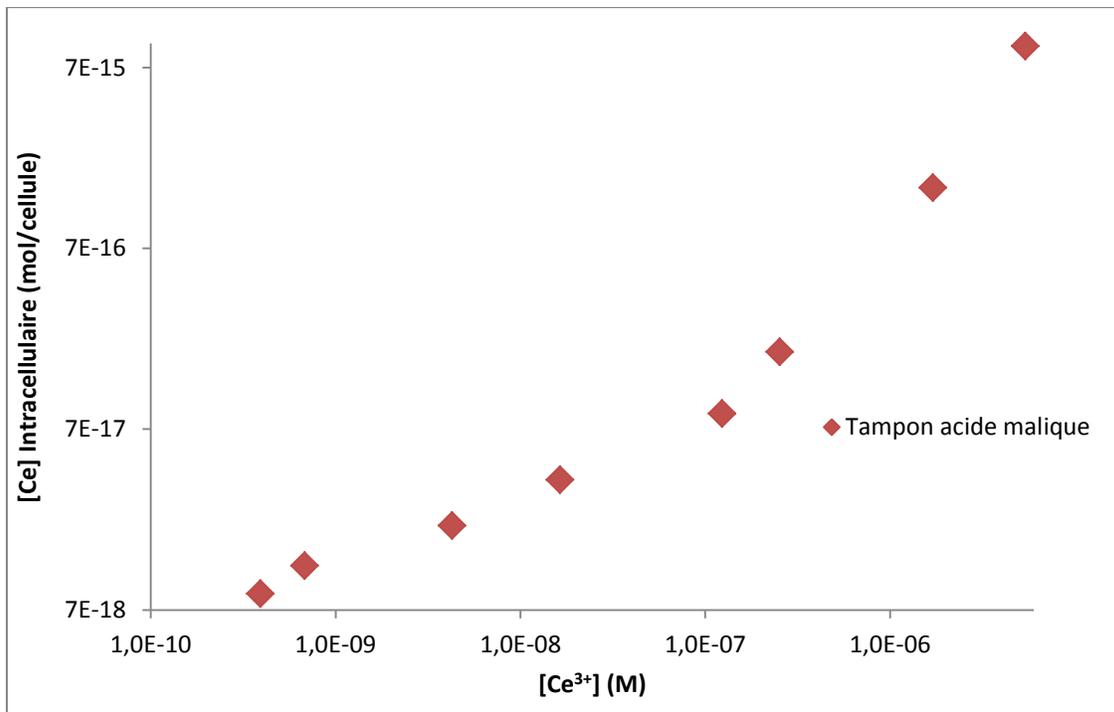


Figure 3.27 : Les concentrations intracellulaires de Ce exprimées en fonction de la concentration de Ce³⁺ libre en solution après 120 h d'exposition.

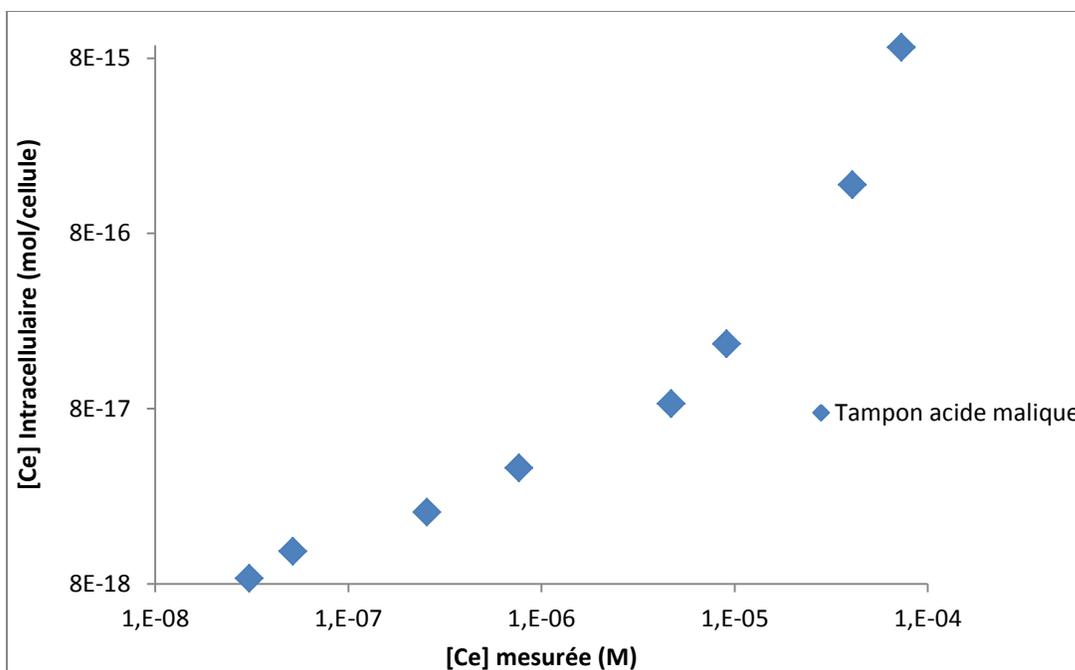


Figure 3.28 : Les concentrations intracellulaires de Ce après 120 h d'exposition en fonction de la moyenne de mesures faites à toutes les 24 h.

En comparant les quotas cellulaires de La et de Ce chez *C. fusca*, on observe que les algues absorbent plus le Ce que le La. La différence de concentration des éléments chimiques dans les cellules serait attribuée à leurs propriétés chimiques (la masse atomique et le rayon atomique). D'après les expériences de Racine (2016) chez *Chlamydomonas reinhardtii*, la quantité de TR accumulée diminue avec la masse atomique.

Lorsque l'on compare les résultats de toxicité avec ceux d'autres auteurs, on peut constater que nos CE50 exprimées en termes de quotas cellulaires (48 [20-80] amol La/cellule et de 96 [60-140] amol Ce/cellule) sont relativement élevées. A titre d'exemple, Paquet (2007) chez *Pseudokirchneriella subcapitata* après 96 h d'exposition, a rapporté des CE50_{quotas cellulaires} de $3,0 \pm 0,6$ amol Cd/cellule et de 11 ± 4 amol Ag/cellule. Tétrault (2014), quant à lui, a observé un faible quota cellulaire du platine et du palladium sur l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (t=96 h). Bien qu'aucune toxicité n'ait été observée après 96 h (des effets sur la croissance étaient observés à 24 et 48 h seulement), les quantités accumulées étaient inférieures à 5,0 amol Pd/cellule et 32 amol Pt/cellule. En revanche, les CE50 obtenues par Lavoie *et al.* (2014) avec *C. reinhardtii* après 96 h étaient respectivement de 710 ± 180 et $4,0 \pm 1,1$ fmol U/cellule à

pH 7 et 5, se situant donc au-dessus de la gamme de nos observations avec La et Ce. Boily (2004) a obtenu des valeurs de CE50 de 1660 ± 60 et 1300 ± 200 amol Cd/cellule calculée par les rendements relatifs dans les milieux du cadmium tamponnés avec de l'EDTA après 72 h d'exposition.

La comparaison des résultats de CE25 et CE50 de La et de Ce avec ceux de la littérature est très limitée. Pour cela, nous avons cherché à savoir les CE de certains métaux afin de comparer leur toxicité à nos résultats. D'après les travaux de Roy (2009) une exposition de 96 h chez *Chlamydomonas reinhardtii* au palladium (Pd) a permis de calculer une CE50 de 53 ± 4 nM estimée à partir de la densité relative de la culture en fonction du Pd mesuré. En revanche, pour Ag, une diminution de croissance de 50 % a été mesurée à des concentrations libres de 15 ± 7 et de 22 ± 13 nM Ag⁺ pour *C. reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata*, respectivement (Hiriart-Baer *et al.*, 2006). Pour ce qui est de nos valeurs de CE25 de l'ion libre qui sont de 80,4 nM avec une intervalle de confiance de 4,40-210 nM et de 37,7 nM avec une intervalle de confiance de [5,63-113] respectivement pour le La et le Ce, elles sont très faibles par rapport au CE30(Cd²⁺) qui était de 140 nM après 96 h d'exposition mesurée par Macfie *et al.* (1994).

CHAPITRE 4. CONCLUSION

La structure électronique des lanthanides procure des propriétés spécifiques qui sont utilisées dans les domaines de la haute technologie (électronique, optique, automobile), en agriculture (engrais et pesticides) et en médecine (Imagerie par Résonance Magnétique, médicaments). L'augmentation de l'extraction et du traitement des terres rares risque d'occasionner des effets néfastes sur les systèmes aquatiques naturels. De plus, les besoins en terres rares augmentent sans cesse avec une croissance importante de la population. Il en résulte possiblement une hausse des concentrations de ces métaux dans l'environnement, notamment du lanthane et du cérium. Les risques éco toxicologiques d'une telle hausse de concentrations étant très peu connus, ceci oblige que l'on dispose d'outils et de méthodes qui permettent de vérifier la toxicité de ces éléments et d'identifier les facteurs qui influent sur cette toxicité.

La composition physico-chimique des milieux aquatiques varie d'un site à l'autre. L'étude de la toxicité des lanthanides en milieu aquatique peut être influencée par plusieurs paramètres, notamment le phosphore, le pH, la température, la matière organique, les éléments minéraux et les particules en suspension. Les phosphates (PO_4^{3-}) sont des éléments essentiels dans les milieux de culture d'algues, mais ont tendance à réagir avec les lanthanides. Cela témoigne l'importance de prendre en compte la composition du milieu avant de conduire des études écotoxicologiques.

La première partie de cette étude consistait à développer un milieu d'exposition pour les lanthanides en présence du phosphore organique afin de minimiser le risque de complexation et de précipitation de lanthane et de cérium lorsque le phosphore inorganique est présent dans le milieu d'exposition. L'algue verte *C. fusca* croit aussi bien en présence du phosphore inorganique que du phosphore organique pour assurer ses fonctions vitales. La concentration de P_{org} la plus basse qui puisse permettre une bonne croissance cellulaire en ayant du phosphore disponible pour la cellule est le milieu dont la concentration est de 5 μM . Ces résultats suggèrent l'utilisation du β -glycérol phosphate comme une option intéressante pour étudier la toxicité de métaux peu solubles en présence de phosphates. Nos résultats démontrent que la concentration des orthophosphates dans le milieu algal demeure faible (<0,15 $\mu\text{g P/L}$) (c'est-à-dire. en

dessous de la limite de détection) lorsque le β -glycérol phosphate est utilisé comme source de phosphore.

La deuxième partie de cette étude était d'évaluer la toxicité du lanthane et du cérium sur l'algue verte unicellulaire *Chlorella fusca*. Les CE50 pour le lanthane et le cérium ont été obtenues à partir des concentrations totales mesurées et libres calculées en absence et en présence d'acide malique. La densité cellulaire en fonction de la concentration totale des métaux indique des CE50 de 570 [190-1050] nM et 530 [430-670] pour le lanthane et le cérium respectivement en absence de malate. Les CE50 sont de 360 [140-780] nM (La) et 3900 [2010-6750] nM (Ce) en présence de l'acide malique et les quantités de La et de Ce internalisées provoquant une diminution de la croissance de 50 % étaient de 48 [20-80] amol/cell et de 96 [60-140] amol/cell. Le ligand utilisé (le malate) avait pour rôle de mieux tamponner les ions libres de La^{3+} et de Ce^{3+} en solution. Les courbes dose-réponse obtenues indiquent une CE50 de 280 nM (intervalle de confiance à 95 % de 60-630 nM) La^{3+} en absence d'acide malique. Concernant le cérium sous sa forme libre, les CE50 (100 nM ; intervalle de confiance à 95 % de 30-200 nM) Ce^{3+} et de (160 nM ; intervalle de confiance à 95 % de 90-250 nM) Ce^{3+} ont été obtenues en présence et en absence d'acide malique respectivement. La réponse biologique induite par le lanthane en présence d'acide malique semblait plus grande que celle qui était attendue sur la base de l'activité de l'ion métallique libre toutefois cette différence apparente n'a pu être confirmée car la régression multivariée n'a pu permettre d'extraire une CE50 significative. En revanche, aucune différence n'a été observée avec le Ce.

Notons finalement que le cérium a stimulé la croissance significativement aux concentrations de 0,044 et de 0,55 nM Ce^{3+} sans acide malique et de 0,39, 0,68 et 4,3 nM Ce^{3+} avec l'acide malique en milieu de cultures synthétiques. En perspective, il serait intéressant, en complément aux tests de toxicité de 120 h, d'entreprendre des expériences de prise en charge à court terme (24 h) pour comprendre le temps de latence de la croissance cellulaire qui semble être induit par les TR. De plus, les études écotoxicologiques disponibles ne permettent pas de prendre en compte les risques des mélanges des TR. Il demeure également à répéter ces expériences avec une autre espèce (ex. : *Chlamydomonas reinhardtii*) en présence du phosphore organique. Parmi les autres paramètres physico-chimiques d'importances, il serait souhaitable de mener des essais écotoxicologiques du lanthane et du cérium en présence de la matière organique dissoute naturelle (acides fulviques et humiques) et de déterminer l'influence du pH sur la toxicité du La et du Ce chez les algues unicellulaires.

CHAPITRE 5. RÉFÉRENCES

- Aouad G, Stille P, Crovisier J-L, Geoffroy VA, Meyer J-M & Lahd-Geagea M (2006) Influence of bacteria on lanthanide and actinide transfer from specific soil components (humus, soil minerals and vitrified municipal solid waste incinerator bottom ash) to corn plants: Sr–Nd isotope evidence. *Science of The Total Environment* 370:545-551.
- APHA (1975) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, D. C. 1193 p
- Azoulay R, Alison M, Sekkal A, Tilea B, Chalard F & Sebag G (2007) RP-WP-32 IRM Osteo-articulaire de l'enfant : apports de l'injection de chelate de gadolinium. *Journal de Radiologie* 88:1597.
- Balusamy B, Tastan BE, Ergen SF, Uyar T & Tekinay T (2015) Toxicity of lanthanum oxide (La₂O₃) nanoparticles in aquatic environments. *Environmental Science: Processes & Impacts* 17:1265-1270.
- Beaubien C (2015) *Toxicité de deux lanthanides (La, Ce) sur l'algue verte Chlorella fusca*. (INRS, Université du Québec). 109 p
- Berman T (1988) Differential uptake of orthophosphate and organic phosphorus substrates by bacteria and algae in Lake Kinneret. *Journal of Plankton Research* 10:1239-1249.
- BGS – British Geological Survey (2011) Rare Earth Elements. In *Profile British Geological Survey* (Minerals UK, United Kingdom), p 54.
- Boily F (2004) *Mécanismes de prise en charge et toxicité du cadmium en présence de thiosulfate chez une algue verte, Chlamydomonas reinhardtii*. (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique). 128 p
- Borzelleca JF (2000) Paracelsus: herald of modern toxicology. *Toxicological Sciences* 53:2-4.
- Braun J-J, Viers J, Dupré B, Polve M, Ndam J & Muller J-P (1998) Solid/liquid REE fractionation in the lateritic system of Goyoum, East Cameroon: the implication for the present dynamics of the soil covers of the humid tropical regions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62:273-299.
- Brioschi L (2012) *Transfert des terres rares à l'interface géosphère-biosphère: répartition, transfert sol-végétation, et effet sur la physiologie des plantes*. PhD (Université de Franche-Comté). 220 p. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00772117> (Consulté le 2012-11-13)
- Brookins D (1989) Aqueous geochemistry of rare earth elements. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 21:201-225.
- Buffle J (1989) *Complexation reactions in aquatic systems. An analytical approach*. Ellis Horwood Ltd, Chichester. 692 p
- Bünzli J-C & Choppin GR (1989) *Lanthanide probes in life, chemical and earth sciences*. Elsevier Amsterdam, Amsterdam. 448 p
- Bünzli J-CG & Piguet C (2005) Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chemical Society Reviews* 34:1048-1077.
- Calabrese EJ (2009) Getting the dose–response wrong: why hormesis became marginalized and the threshold model accepted. *Archives of toxicology* 83:227-247.
- Calabrese EJ & Baldwin LA (2002) Applications of hormesis in toxicology, risk assessment and chemotherapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences* 23:331-337.

- Campbell PGC (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, A. Tessier & D. Turner (Édit.) John Wiley, New York, USA. p 46-102.
- Campbell PGC, Errécalde O, Fortin C, Hiriart-Baer VP & Vigneault B (2002) Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133:189-206.
- Cao J, Lam K, Dawson R, Liu W & Tao S (2004) The effect of pH, ion strength and reactant content on the complexation of Cu²⁺ by various natural organic ligands from water and soil in Hong Kong. *Chemosphere* 54:507-514.
- Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ & Lauffer RB (1999) Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chemical Reviews* 99:2293-2352.
- Celo V, Dabek-Zlotorzynska E, Zhao J & Bowman D (2012) Concentration and source origin of lanthanides in the Canadian atmospheric particulate matter: a case study. *Atmospheric Pollution Research* 3:270-278.
- Choppin GR (1984) Lanthanide complexation in aqueous solutions. *Journal of the Less Common Metals* 100:141-151.
- Christmann P (2012) Les nouvelles ressources en minerais stratégiques: l'exemple des terres rares. *Géoéconomie* 59:75-86.
- Chua H (1998) Bio-accumulation of environmental residues of rare earth elements in aquatic flora *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms in Guangdong Province of China. *Science of the Total Environment* 214:79-85.
- Citeau L (2004) *Etude des colloïdes naturels présents dans les eaux gravitaires de sols contaminés: relation entre nature des colloïdes et réactivité vis-à-vis des métaux (Zn, Cd, Pb, Cu)*. PhD (Institut national agronomique Paris-Grignon, Paris). 296 p. <http://prodinra.inra.fr/record/71408>
- Clamadieu J-P & Butstraen E (2010) Les terres rares, des matières premières minérales stratégiques. *Annales des Mines-Responsabilité et environnement*. ESKA, p 92-98.
- Clark DL (2000) The chemical complexities of plutonium. *Los Alamos Science* 26:364-381.
- CNUCED - Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement (2014) Coup d'œil sur les produits de base. In *Edition spéciale sur les terres rares*, p 50.
- Costantini D, Metcalfe NB & Monaghan P (2010) Ecological processes in a hormetic framework. *Ecology Letters* 13:1435-1447.
- Cotner JB & Wetzel RG (1992) Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus compounds by phytoplankton and bacterioplankton. *Limnology and Oceanography* 37:232-243.
- Cotton S (2006) *Lanthanide and actinide chemistry*. John Wiley & Sons LTD, West Sussex, United Kingdom. 263 p. <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/0470010088>
- Crémazy A, Campbell P & Fortin C (2013) The biotic ligand model can successfully predict the uptake of a trivalent ion by a unicellular alga below pH 6.50 but not above: possible role of hydroxo-species. *Environmental Science & Technology* 47:2408 - 2415.
- d'Aquino L, De Pinto MC, Nardi L, Morgana M & Tommasi F (2009) Effect of some light rare earth elements on seed germination, seedling growth and antioxidant metabolism in *Triticum durum*. *Chemosphere* 75:900-905.
- Dam HH, Reinhoudt DN & Verboom W (2007) Multicoordinate ligands for actinide/lanthanide separations. *Chemical Society Reviews* 36:367-377.
- de Baar HJ, German CR, Elderfield H & Van Gaans P (1988) Rare earth element distributions in anoxic waters of the Cariaco Trench. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52:1203-1219.

- De Schamphelaere KAC, Nys C & Janssen CR (2014) Toxicity of lead (Pb) to freshwater green algae: Development and validation of a bioavailability model and inter-species sensitivity comparison. *Aquatic Toxicology* 155:348-359.
- Diatloff E, Smith F & Asher C (1995) Rare earth elements and plant growth: III. Responses of corn and mungbean to low concentrations of cerium in dilute, continuously flowing nutrient solutions. *Journal of Plant Nutrition* 18:1991-2003.
- Elderfield H, Upstill-Goddard R & Sholkovitz E (1990) The rare earth elements in rivers, estuaries, and coastal seas and their significance to the composition of ocean waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54:971-991.
- Elderfield H, Whitfield M, Burton J, Bacon M & Liss P (1988) The oceanic chemistry of the rare-earth elements [and discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 325:105-126.
- França EJ, Fernandes EADN, Bacchi MA & Tagliaferro FS (2002) Pathway of rare-earth elements in a Brazilian forestry fragment. *Journal of alloys and compounds* 344:21-26.
- François L, Fortin C & Campbell PGC (2007) pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: Implications for an algal BLM. *Aquatic Toxicology* 84:123-132.
- Fu FF, Akagi T, Yabuki S & Iwaki M (2001) The variation of REE (rare earth elements) patterns in soil-grown plants: a new proxy for the source of rare earth elements and silicon in plants. *Plant and Soil* 235:53-64.
- Fuger D (2011) *Mise en application de processus analytique complexe Analyse de métaux par ICP-AES*. (IUT Robert Schuman – Département Chimie ; Eurofins Analyse pour l'Environnement France). 42 p. <http://chemphys.u-strasbg.fr/mpb/teach/ICP-AES/ICP-AES-2.pdf>
- Géret F (2000) *Synthèse de métallothionéines chez deux bivalves (l'huître et la moule) en réponse à une contamination métallique par la voie directe et par la voie trophique*. PhD (Université de Nantes). 250 p
- Ghellai IE (2015) *Evaluation des teneurs des éléments traces des eaux et chez une espèce de poisson vivant dans le barrage Hammam Boughrara*. Maitrise (Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen (UABT)). 89 p. <http://dspace.univ-tlemcen.dz/handle/112/8140>
- Goecke F, Jerez CG, Zachleder V, Figueroa FL, Bišová K, Řezanka T & Vítová M (2015) Use of lanthanides to alleviate the effects of metal ion-deficiency in *Desmodesmus quadricauda* (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Frontiers in microbiology* 6:2.
- Goldberg ED, Koide M, Schmitt R & Smith RH (1963) Rare-Earth distributions in the marine environment. *Journal of Geophysical Research* 68:4209-4217.
- Goonan TG (2011) *Rare Earth Elements--end Use and Recyclability*. US Department of the Interior, US Geological Survey. 15 p
- Harlavan Y, Erel Y & Blum JD (2009) The coupled release of REE and Pb to the soil labile pool with time by weathering of accessory phases, Wind River Mountains, WY. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73:320-336.
- Hatch GP (2013) Recent dynamics in the global critical rare earths market and the regionalization/globalization of the metals markets. *Édit Earth ISOR (Technology Metals Research, Malaysia)*, p 44.
- Hayes-Labruzzo L, Schillebeeckx SJD, Workman M & Shah N (2013) Contrasting perspectives on China's rare earths policies: Reframing the debate through a stakeholder lens. *Energy Policy* 63:55-68.
- Hiriart-Baer VP, Fortin C, Lee D-Y & Campbell PGC (2006) Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under

- continuous culture conditions: Influence of thiosulphate. *Aquatic Toxicology* 78:136-148.
- Hu X, Ding Z, Chen Y, Wang X & Dai L (2002) Bioaccumulation of lanthanum and cerium and their effects on the growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Chemosphere* 48:621-629.
- Hu Z, Richter H, Sparovek G & Schnug E (2004) Physiological and biochemical effects of rare earth elements on plants and their agricultural significance: a review. *Journal of Plant Nutrition* 27:183-220.
- Humphries M (2012) Rare earth elements: The global supply chain. In *Édit Service CR*, Édité Service CR), p 31.
- Jewell S & Kimball S (2014) Mineral commodity summaries 2014. (US Geological Survey), p 196.
- Jordens A, Cheng YP & Waters KE (2013) A review of the beneficiation of rare earth element bearing minerals. *Minerals Engineering* 41:97-114.
- Kameda K (1962) Study on abundance of rare earth elements in marine organisms. *Journal of Radiation Research* 3:89-103.
- Kingsnorth D (2013) Rare earths: is supply critical in 2013? *Proceedings of the Critical Minerals Conference Perth (AusIMM'13)*. p 17.
- Labry C (2001) *Dynamique du phosphore et rôle comme facteur limitant de la production planctonique dans le panache de la Gironde sur le plateau continental Sud Gascogne*. PhD (Université de la Méditerranée). 162 p.
<http://archimer.ifremer.fr/doc/00013/12463/9298.pdf>
- Lamelas C, Wilkinson KJ & Slaveykova VI (2005) Influence of the composition of natural organic matter on Pb bioavailability to microalgae. *Environmental Science & Technology* 39:6109-6116.
- Laveuf C & Cornu S (2009) A review on the potentiality of rare earth elements to trace pedogenetic processes. *Geoderma* 154:1-12.
- Lavoie M, Sabatier S, Garnier-Laplace J & Fortin C (2014) Uranium accumulation and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is modulated by pH. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33:1372-1379.
- Liang T, Shiming D, Wenchong S, Chong Z, Zhang C & Haitao L (2008) A review of fractionations of rare earth elements in plants. *Journal of Rare Earths* 26:7-15.
- Ling Q & Liu C (2012) Behaviors of Rare Earths during fluid-rock interaction and its significance of geochemistry. *Journal of Rare Earths* 19:292-298.
- Liu M & Hasenstein KH (2005) La³⁺ uptake and its effect on the cytoskeleton in root protoplasts of *Zea mays* L. *Planta* 220:658-666.
- Long KR, Van Gosen BS, Foley NK & Cordier D (2012) The principal rare earth elements deposits of the United States: A summary of domestic deposits and a global perspective. *Non-Renewable Resource Issues: Geoscientific and Societal Challenges*, Sinding-Larsen R & Wellmer F-W (Édit.) Springer Netherlands, Dordrecht http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-8679-2_7. p 131-155.
- Luckey TD (2006) Radiation Hormesis: The Good, the Bad, and the Ugly. *Dose-Response* 4:169-190.
- Lueking AD, Yang RT, Rodriguez NM & Baker RTK (2004) Hydrogen Storage in Graphite Nanofibers: Effect of Synthesis Catalyst and Pretreatment Conditions. *Langmuir* 20:714-721.
- Macfie S, Tarmohamed Y & Welbourn P (1994) Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27:454-458.

- Maheswaran J, Meehan B, Reddy N, Peverill K & Buckingham S (2001) Impact of rare earth elements on plant physiology and productivity. *Rural Industries Research and Development Corporation* 1:1-40.
- Mariano AN & Mariano A (2012) Rare earth mining and exploration in North America. *Elements* 8:369-376.
- Mash HE, Chin Y-P, Sigg L, Hari R & Xue H (2003) Complexation of copper by zwitterionic aminosulfonic (good) buffers. *Analytical Chemistry* 75:671-677.
- Maxwell L, Bischoff F & Ottery EM (1931) Studies in cancer chemotherapy X. The effect of thorium, cerium, erbium, yttrium, didymium, praseodymium, manganese, and lead upon transplantable rat tumors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 43:61-70.
- Morel FMM (1983) *Principles and Applications of Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., Somerset, N.J. 446 p. <https://books.google.ca/books?id=Rs31PfkeBaIC>
- Négrel P, Casanova J & Brulhet J (2006) Ree and Nd isotope stratigraphy of a Late Jurassic carbonate platform, eastern Paris Basin, France. *Journal of Sedimentary Research* 76:605-617.
- Nyholm N (1990) Expression of results from growth inhibition toxicity tests with algae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19:518-522.
- Paquet N (2007) *Évolution temporelle de la prise en charge et de la toxicité de l'argent (en présence et en absence d'acide humique) et du cadmium chez l'algue verte: Pseudokirchneriella subcapitata*. Maîtrise (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique). 166 p
- Parent L (1991) *Biodisponibilité de l'aluminium dans les eaux douces en relation avec les pluies acides*. (Université du Québec). 449 p
- Parent L & Campbell PG (1994) Aluminum bioavailability to the green alga *Chlorella pyrenoidosa* in acidified synthetic soft water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13:587-598.
- Pearson RG (1998) *Chemical hardness*. Wiley-VCH. 198 p
- Perez T, Sartoretto S, Soltan D, Capo S, Fourt M, Dutrieux E, Vacelet J, Harmelin J & Rebouillon P (2000) Étude bibliographique sur les bioindicateurs de l'état du milieu marin. In *Système d'évaluation de la Qualité des milieux littoraux—Volet biologique. Rapport Agences de l'eau*, p 237.
- Price NM, Harrison GI, Hering JG, Hudson RJ, Nirel PM, Palenik B & Morel FM (1989) Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium Aquil. *Biological Oceanography* 6:443-461.
- Quadrelli EA (2002) Lanthanide contraction over the 4f series follows a quadratic decay. *Inorganic chemistry* 41:167-169.
- Québec. Ministère de l'Énergie et des Ressources naturelles (2016) Choisir le secteur minier du Québec. (Gouvernement du Québec), p 62.
- Quisel JD, Wykoff DD & Grossman AR (1996) Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 111:839-848.
- Rabung T, Stumpf T, Geckeis H, Klenze R & Kim J (2000) Sorption of Am (III) and Eu (III) onto γ -alumina: experiment and modelling. *Radiochimica Acta* 88:711-716.
- Racine K (2016) *Étude de la répartition subcellulaire des éléments du groupe platine et des terres rares chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii*. Maîtrise en sciences de l'eau (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique). 91 p. <http://espace.inrs.ca/4636/>

- Ramade F (2002) *Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement*. Ed. Dunod. 1063 p
- Redling K (2006) *Rare earth elements in agriculture with emphasis on animal husbandry*. PhD (LMU München). 326 p. <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:19-59362> (Consulté le 27. Nov 2006)
- Remeur C (2013) Rare earth elements and recycling possibilities. In *Library of the European Parliament*, p 6.
- Roskill IS (2015) *Rare Earths: Market Outlook to 2020*. Roskill, London. 337 p
- Roy G (2009) *Les éléments du groupe platine (Pd, Pt et Rh) dans les eaux de surface et leur toxicité chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii*. Maitrise (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique). 145 p
- Schijf J (1992) Aqueous geochemistry of the rare earth elements in marine anoxic basins. *Geologica Ultraiectina* 85:1-256.
- Schüler D, Buchert M, Liu R, Dittrich S & Merz C (2011) Study on rare earths and their recycling. (The Greens/EFA Group in the European Parliament, Öko-Institut eV Darmstadt), p 140.
- Seaborg G (1993) Overview of the Actinide and Lanthanide (the f) Elements. *Radiochimica Acta* 61:115-122.
- Soares HM, Conde PC, Almeida AA & Vasconcelos MTS (1999) Evaluation of n-substituted aminosulfonic acid pH buffers with a morpholinic ring for cadmium and lead speciation studies by electroanalytical techniques. *Analytica chimica acta* 394:325-335.
- Stumm W & Morgan JJ (1996) *Aquatic Chemistry: Chemical equilibria and rates in natural waters*. John Wiley & Sons. 1040 p
- Taft JL, Loftus ME & Taylor WR (1977) Phosphate uptake from phosphomonoesters by phytoplankton in the Chesapeake Bay. *Limnology and Oceanography* 22:1012-1021.
- Tan X, Fang M & Wang X (2010) Sorption speciation of lanthanides/actinides on minerals by TRIFS, EXAFS and DFT studies: a review. *Molecules* 15:8431-8468.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK & Sutton DJ (2012) Heavy Metal Toxicity and the Environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, Environmental Toxicology), Luch A (Édit.) Springer Basel, Basel10.1007/978-3-7643-8340-4_6. p 133-164.
- Tétrault G (2014) *Influence de la physico-chimie du milieu (pH, NH₄⁺, Ca²⁺) sur l'internalisation et la toxicité du platine et du palladium chez l'algue verte: Chlamydomonas reinhardtii*. (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique). 93 p
- Tipping E (1994) WHAM—a chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments, and soils incorporating a discrete site/electrostatic model of ion-binding by humic substances. *Computers & Geosciences* 20:973-1023.
- Twiss M, Errecalde O, Fortin C, Campbell P, Jumarie C, Denizeau F, Berkelaar E, Hale B & Van Rees K (2001) Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. *Chemical Speciation & Bioavailability* 13:9 - 24.
- US EPA USEPA (2009) Nutrient Control Design Manual—State of the Technology Review Report.), p 104.
- Vindimian E (2005) MSEXcel macro REGTOX EV7. 0.5. xls. 2005.), p Available online: <http://eric.vindimian.9online.fr/>.
- Wahid P, Valiathan M, Kamalam N, Eapen J, Vijayalakshmi S, Prabhu RK & Mahalingam T (2000) Effect of rare earth elements on growth and nutrition of coconut palm and root competition for these elements between the palm and Calotropis gigantea. *Journal of Plant Nutrition* 23:329-338.

- Walters A, Lusty P & Hill A (2011) Rare earth elements. In *In Commodity Profiles Series*, Édité Survey BG (British Geological Survey), p 54.
- Wang C, Luo X, Tian Y, Xie Y, Wang S, Li Y, Tian L & Wang X (2012) Biphasic effects of lanthanum on *Vicia faba* L. seedlings under cadmium stress, implicating finite antioxidation and potential ecological risk. *Chemosphere* 86:530-537.
- Wang CX, Zhu W, Peng A & Guichreit R (2001) Comparative studies on the concentration of rare earth elements and heavy metals in the atmospheric particulate matter in Beijing, China, and in Delft, the Netherlands. *Environment International* 26:309-313.
- Wang H, Shan X-q, Zhang S & Wen B (2003) Preliminary characterization of a light-rare-earth-element-binding peptide of a natural perennial fern *Dicranopteris dichotoma*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376:49-52.
- Water Environment Federation aEaWRIUS (2006) *Biological nutrient removal (BNR) operation in wastewater treatment plants*. New York : McGraw-Hill. 597 p
- Weber RJ & Reisman DJ (2012) Rare earth elements: A review of production, processing, recycling, and associated environmental issues. (US EPA), p 21.
- Weber T (2006) *Etude expérimentale et modélisation des modes d'association du fer avec la matière organique naturelle*. PhD ('Université Paris 6, Paris, France). 154 p
- Xie Z, Zhu J, Chu H, Zhang Y, Zeng Q, Ma H & Cao Z (2002) Effect of lanthanum on rice production, nutrient uptake, and distribution. *Journal of Plant Nutrition* 25:2315-2331.
- Yang G, Tan QG, Zhu L & Wilkinson KJ (2014) The role of complexation and competition in the biouptake of europium by a unicellular alga. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33:2609-2615.
- Yu L, Sun Y & Song C (2008) Research into the influence of lanthanum and cerium on the algae diversity in the Yellow River. *2008 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*. IEEE, p 4559-4562.
- Yuguan Z, Min Z, Luyang L, Zhe J, Chao L, Sitao Y, Yanmei D, Na L & Fashui H (2009) Effects of cerium on key enzymes of carbon assimilation of spinach under magnesium deficiency. *Biological Trace Element Research* 131:154-164.

ANNEXE

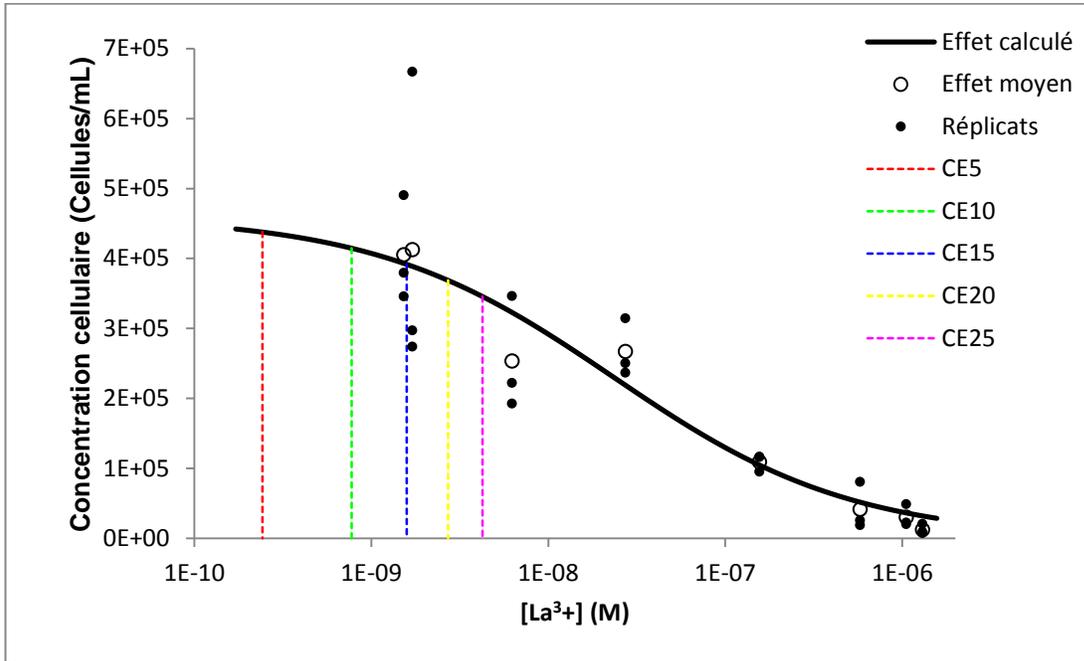


Figure A.1 : Les concentrations cellulaires en présence d'acide malique et en fonction de la concentration d'ion libre de La en solution après 96 h d'exposition.

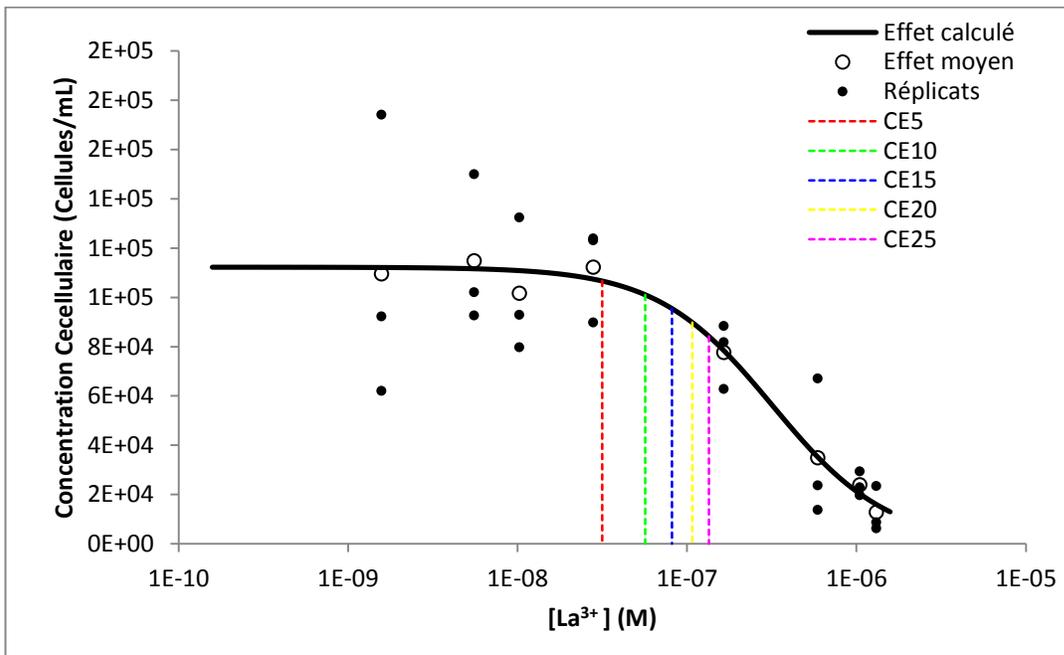


Figure A.2 : Les concentrations cellulaires en présence d'acide malique et en fonction de la concentration d'ion libre de La en solution après 72 h d'exposition.