

Centre Eau Terre Environnement

**ÉTUDE DE LA TOXICITÉ DES TERRES RARES NÉODYME, THULIUM  
ET YTTRIUM CHEZ DEUX ESPÈCES ALGALES D'EAU DOUCE  
*CHLORELLA FUSCA* ET *CHLAMYDOMOANS REINHARDTII***

Par  
Faouzia Bahloul

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

**Jury d'évaluation**

Présidente du jury et  
examinatrice interne

Séverine Le Faucheur  
Professeure associée INRS-ETE  
Professeure Université de Pau et des Pays  
de l'Adour

Examineur externe

Richard Goulet  
Ressources naturelles Canada

Directeur de recherche

Claude Fortin  
INRS-ETE

# REMERCIEMENTS

---

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury, Richard Goulet et Séverine Le Faucheur, qui ont accepté d'évaluer mes travaux de recherches et tous mes professeurs qui ont enrichi mes connaissances durant toutes mes études. Je souhaite exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance à mon directeur de recherche Claude Fortin non seulement pour l'opportunité de ce projet, la qualité de l'encadrement, sa confiance, sa disponibilité et ses discussions enrichissantes mais aussi pour le soutien moral dans les moments les plus difficiles. Merci à vous de m'avoir accueillie dans l'équipe de recherche et de m'avoir donné l'opportunité à participer à différentes conférences. Je remercie également les techniciens des laboratoires de l'INRS qui m'ont formé sur les différents équipements particulièrement Julie Perreault pour ses réponses à mes questions à propos de l'ICP-MS. J'exprime mes remerciements au Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et à Environnement et Changement climatique Canada (ECCC) pour leur appui financier au projet ainsi qu'à l'organisme sans but lucratif MITACS pour la bourse de recherche qu'il m'a accordée.

Tous mes remerciements vont à Imad Aharchaou et Kim Racine pour le soutien et le support tout au long du projet et les bons moments qu'on a passés au laboratoire. Je remercie Sophie Duchesne pour ses précieux conseils à propos des analyses statistiques.

Je tiens à remercier mes collègues à l'INRS Laura, Caroline, Vincent, Mariem, Océane, Rahma et surtout Emeric (Monsounmola) qui m'a toujours encouragée.

Je remercie ma famille, mes parents la raison de ma réussite, mes frères et sœurs (Emeni et Mariem), mes belles nièces pour leur amour, leur tendresse et leurs beaux sourires. Merci à mon beau-frère Bechir qui est toujours à mon écoute. Je tiens également à remercier mes amies tunisiennes qui m'ont manquées : ma meilleure amie Manel, la patiente et généreuse Asma Meddah et mes amies Rakia, Balkis et Nadia qui m'ont toujours supportée. Merci à mes amis : Moez, Sirine et Amal pour les bons moments et les bons repas qu'on a partagés ensemble et pour les belles expériences vécues à Québec.

Merci mon ami et mon frère Nader d'être à côté de moi tout le long de cette expérience.

Finalement, je remercie ma colocataire Roxanne et les deux beaux chats tannants Shany et Manssour.



## RÉSUMÉ

---

Les terres rares (TR) sont des métaux très convoités dans différentes technologies et secteurs, ce qui peut avoir comme conséquences d'augmenter leurs concentrations et leur dispersion dans les écosystèmes aquatiques et avoir des impacts sur les organismes qui y habitent. Cependant, les effets écotoxicologiques des TR ont été peu étudiés. Étant donné l'importance écologique des microalgues dans la chaîne alimentaire, il est essentiel de déterminer les répercussions de la contamination par les TR sur ces organismes. Pour ce faire, il faut tenir compte de la spéciation chimique des éléments d'intérêt en milieu aquatique. Par exemple, les ions phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ont un rôle essentiel dans la croissance des algues et dans le métabolisme algal. Néanmoins, ils ont une forte affinité avec les TR ce qui entraîne la complexation et la précipitation de ces métaux ce qui entrave l'évaluation de leur toxicité. Au cours de ce projet, la forme inorganique du phosphore habituellement utilisée pour cultiver les cellules a été substituée par une forme organique, le  $\beta$ -glycérol phosphate, à une concentration de 25  $\mu\text{M}$ . L'objectif de ce projet était de déterminer la toxicité de trois TR soit le néodyme (Nd), le thulium (Tm) et l'yttrium (Y) sur deux algues d'eau douce (*Chlorella fusca* et *Chlamydomonas reinhardtii*) ainsi que leur internalisation. Le projet portait également sur les effets lorsque deux TR sont mélangées, soit une légère (Nd) et l'autre lourde (Tm).

De façon générale, les travaux suggèrent que la réponse biologique obtenue est liée à l'activité en ion libre en solution. La toxicité du Nd, du Tm et de l'Y a été comparée et, bien que les résultats montrent que pour les deux espèces l'yttrium est le plus toxique suivie par le Tm puis le Nd (le moins toxique), les deux espèces ont une sensibilité différente. En effet, des différences importantes sont toutefois apparues en considérant l'internalisation cellulaire des trois métaux. Par exemple, les concentrations internes menant à un effet toxique indiquent que *C. reinhardtii* est plus tolérante au Tm qu'au Nd.

Pour les expériences réalisées en présence de deux TR simultanément, *C. reinhardtii* a été choisie pour investiguer l'accumulation du Tm en présence de 1  $\mu\text{M}$  de Nd. Les résultats démontrent que le Nd inhibe l'accumulation du Tm suggérant ainsi l'existence d'un transporteur commun et une saturation au niveau du ligand biotique.

**Mots-clés** : terres rares, spéciation, phosphore organique, MINEQL+, algues d'eau douce, *Chlorella fusca*, *Chlamydomonas reinhardtii*, flux d'internalisation, toxicité.



## ABSTRACT

---

Rare earth elements (REEs) are metals that are highly used in different technologies and sectors, which can have the consequences of increasing their concentrations and their dispersion in aquatic ecosystems and have impacts on biota. However, the ecotoxicological effects of REEs have been little studied. Given the ecological importance of microalgae in the food chain, it is essential to determine the effects of REEs contamination on these organisms. To do this, we must consider the chemical speciation of the elements of interest in the aquatic environment. For example, phosphate ions ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) play an essential role in algal growth and metabolism. However, they have a strong affinity with REEs which leads to the complexation and precipitation of these metals thus hindering the evaluation of their toxicity. During this project, the inorganic form of phosphorus usually used for cell culture was replaced by an organic form,  $\beta$ -glycerol phosphate, at a concentration of 25  $\mu\text{M}$ . The objective of this project was to determine the toxicity of three RREs: neodymium (Nd), thulium (Tm) and yttrium (Y) on two freshwater algae (*Chlorella fusca* and *Chlamydomonas reinhardtii*) as well as their internalization. The project also focused on the effects of a combined exposure to a light (Nd) and a heavy REE (Tm).

In general, studies suggest that the biological response obtained is linked to the activity of the free ion in solution. The toxicity of Nd, Tm and Y were compared and although the results showed that for the two species yttrium is the most toxic followed by Tm then Nd (the least toxic), both species have different sensitivity. In fact, significant differences appeared when considering the cellular internalization of the three metals. For example, internal concentrations leading to a toxic effect indicate that *C. reinhardtii* is more tolerant to Tm than Nd.

For the experiment carried out in the presence of two REEs simultaneously, *C. reinhardtii* was chosen to investigate the accumulation of Tm in the presence of 1  $\mu\text{M}$  of Nd. The results demonstrate that Nd inhibits the accumulation of Tm, thus suggesting the existence of a common transporter as well as the saturation of the biotic ligand.

**Key-words:** Rare earth, speciation, organic phosphorus, MINEQL+, freshwater algae, *Chlorella fusca*, *Chlamydomonas reinhardtii*, internalization flux, toxicity.



# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>I</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>XIII</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 GÉNÉRALITÉS.....	1
1.1.1 <i>Nomenclature, structure atomique et abondance</i> .....	1
1.1.2 <i>Types de dépôts et de minerais sources des TR</i> .....	3
1.1.3 <i>Applications</i> .....	4
1.2 PRODUCTION ET ASPECT ÉCONOMIQUE.....	5
1.2.1 <i>Réserve, production et demande mondiale</i> .....	5
1.2.2 <i>Potentiel minier en TR au Canada</i> .....	8
1.3 PROBLÉMATIQUES ENVIRONNEMENTALES DES TERRES RARES .....	9
1.3.1 <i>La spéciation des terres rares, leur devenir et leur internalisation</i> .....	9
1.3.2 <i>Les apports et les concentrations en TR dans les milieux naturels</i> .....	16
1.3.3 <i>Accumulation et toxicité des terres rares sur les organismes</i> .....	18
1.4 OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....	23
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>25</b>
2.1 MODÈLE DE SPÉCIATION CHIMIQUE : .....	25
2.2 CHOIX DES MICROORGANISMES :.....	25
2.2.1 <i>Chlorella fusca</i> .....	26
2.2.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	27
2.2.3 <i>Entretien des cultures algales</i> .....	28
2.3 MILIEUX UTILISÉS ET RÉACTIFS .....	28
2.3.1 <i>Composition du milieu de culture, de rinçage et d'extraction</i> .....	28
2.3.2 <i>Préparation des milieux et matériel utilisé</i> .....	31
2.3.3 <i>Le milieu de rinçage sans EDTA</i> .....	34
2.3.4 <i>Le milieu de rinçage avec EDTA</i> .....	34
2.3.5 <i>Choix des concentrations du phosphore organique dissous des milieux de culture</i> .....	34
2.4 EXPÉRIENCES D'EXPOSITION : TEST DE TOXICITÉ DES TERRES RARES SUR LES ALGUES.....	35
2.4.1 <i>Choix de la verrerie</i> .....	35
2.4.2 <i>Principe et méthodologie</i> .....	35

2.4.3	<i>Récupération des algues et leur digestion</i> .....	39
2.4.4	<i>ICP-MS</i> .....	40
2.5	TRAITEMENT DES DONNÉES.....	42
2.5.1	<i>Paramètres de la toxicité</i> .....	42
2.5.2	<i>Analyse statistique</i> .....	42
<b>CHAPITRE 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>		<b>47</b>
3.1	STABILITÉ TEMPORELLE DES CONCENTRATIONS DE MÉTAUX DANS LE MILIEU MHSM-2 .....	47
3.1.1	<i>Comportement du néodyme</i> .....	47
3.1.2	<i>Comportement du thulium</i> .....	48
3.1.3	<i>Comportement de l'yttrium</i> .....	49
3.1.4	<i>Comportement du néodyme en présence des algues</i> .....	51
3.2	EXPOSITION DE <i>C. FUSCA</i> .....	52
3.2.1	<i>Exposition au néodyme</i> .....	52
3.2.2	<i>Exposition au thulium</i> .....	63
3.2.3	<i>Exposition à l'yttrium</i> .....	72
3.3	EXPOSITION DE <i>C. REINHARDTII</i> .....	79
3.3.1	<i>Exposition au néodyme</i> .....	79
3.3.2	<i>Exposition au thulium</i> .....	87
3.3.3	<i>Exposition à l'yttrium</i> .....	95
3.4	ÉTUDE COMPARATIVE ENTRE LES DEUX ESPÈCES ALGALES .....	103
3.5	EXPOSITION DE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE THULIUM EN PRÉSENCE DE NÉODYME .....	107
3.5.1	<i>Adsorption</i> .....	107
3.5.2	<i>Toxicité : Effet sur la croissance cellulaire</i> .....	110
3.5.3	<i>Accumulation : Métal internalisé</i> .....	115
3.5.4	<i>Flux d'internalisation :</i> .....	116
<b>CHAPITRE 4 : CONCLUSION .....</b>		<b>123</b>
<b>CHAPITRE 5: BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>127</b>
<b>CHAPITRE 6 : ANNEXE.....</b>		<b>132</b>

## LISTE DES FIGURES

---

FIGURE 1-1: TABLEAU PÉRIODIQUE DES ÉLÉMENTS CHIMIQUES (SCHÜLER ET AL., 2011) .....	1
FIGURE 1-2: REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DE LA RÈGLE DE MADELUNG .....	2
FIGURE 1-3 ABONDANCES DES ÉLÉMENTS EXPRIMÉES EN FRACTION ATOMIQUE EN FONCTION DU NOMBRE ATOMIQUE (HAXEL, BOORE ET MAYFIELD, 2005) .....	3
FIGURE 1-4: PRODUCTION GLOBALE DES OXYDES DES TERRES RARES (USGS, SD) .....	6
FIGURE 1-5: PRÉVISION DE LA DEMANDE MONDIALE EN TERRE RARE 2009-2025. (HYKAWY, 2014). .....	7
FIGURE 1-6: FUTURES MINES POTENTIELLES (NATURAL RESOURCES CANADA, 2014). .....	8
FIGURE 1-7: MODÈLE CONCEPTUEL SUR LE DEVENIR DES MÉTAUX (DISSOUS $Me_D$ ET PARTICULAIRE $Me_P$ ) DANS UN MILIEU AQUATIQUE EN PRÉSENCE DE PHYTOPLANCTON (DE SOUZA MACHADO ET AL., 2016). .....	10
FIGURE 1-8: SCHÉMA PRÉSENTANT LES RÉACTIONS PRISES EN COMPTE DANS LE MODÈLE DU LIGAND BIOTIQUE. ADAPTÉ DE (DI TORO ET AL., 2001). .....	12
FIGURE 1-9 SCHÉMA CONCEPTUEL REPRÉSENTANT LES INTERACTIONS MÉTAL-ORGANISME. INSPIRÉ DE (CAMPBELL, 1995). $M^{N+}$ : ION MÉTALLIQUE LIBRE; L : LIGAND; ML : COMPLEXE MÉTALLIQUE; $L_{CELL}$ : LIGAND BIOTIQUE (SITE DE TRANSPORT DANS LE SCHÉMA); $M-L_{CELL}$ : COMPLEXE MÉTALLIQUE DE SURFACE.....	13
FIGURE 2-1 : COMPARAISON ENTRE LES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES ET NATURELLES DE LA CROISSANCE ALGALE. ....	36
FIGURE 2-2 : SCHÉMA RÉCAPITULATIF DE LA MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE SUIVIE. ....	36
FIGURE 2-3 : EXEMPLE DU TRACÉ P-P DANS LE LOGICIEL DE SPSS (UOH, 2013). ....	43
FIGURE 3-1 : CONCENTRATION DE NÉODYME EN ABSENCE D'ALGUES DANS LE MHSM-2 : 500 NM (A), 3000 NM (B) ET 5000 NM (C). .....	48
FIGURE 3-2 : COMPORTEMENT DU Tm AU COURS DU TEMPS EN ABSENCE DES ALGUES : 10 NM (A), 50 NM (B), 100 NM (C) ET 1000 NM (D).....	49
FIGURE 3-3 : COMPORTEMENT DE L'YTTRIUM AU COURS DU DANS LE MILIEU MHSM-2 EN ABSENCE DES ALGUES : 10 NM (A), 50 NM (B), 100 NM (C), 500 NM (D) ET 1000 NM.....	50
FIGURE 3-4 : SUIVI DES CONCENTRATIONS EN Nd DANS LE MILIEU DE CULTURE MHSM-2 EN PRÉSENCE DE L'ALGUE VERTE <i>C. FUSCA</i> . ....	51
FIGURE 3-5 : CONCENTRATION DU NÉODYME EN PRESENCE D'ALGUES APRES 24 ET 120 HEURES D'EXPOSITION A 500, 1000 ET 5000 NM DE Nd. ....	52
FIGURE 3-6 : NÉODYME ADSORBÉ À LA SURFACE CELLULAIRE DE <i>C. FUSCA</i> : DONNÉES EN LOGARITHMIQUE ( $y = -1,16x + 0,45$ ).....	53
FIGURE 3-7 : TRACÉ DES RÉSIDUS EN FONCTION DU PRÉDICTEUR POUR VÉRIFIER LA CONDITION DE NORMALITÉ DES RÉSIDUS.....	54
FIGURE 3-8 : TRACÉ DES RÉSIDUS (ERREURS) EN FONCTION DES VALEURS PRÉDITES : VÉRIFICATION DE L'HOMOSCÉDASTICITÉ.....	55
FIGURE 3-9 : PROFILS DE CROISSANCE CELLULAIRE DE <i>C. FUSCA</i> EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE Nd AU COURS DU TEMPS. LES BARRES D'ERREURS REPRESENTENT L'ÉCART-TYPE SUR LES MESURES (N=3).....	55
FIGURE 3-10 : DENSITÉ RELATIVE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS DE NÉODYME MESURÉES (A) ET EN FONCTION DE L'ION LIBRE EN Nd (B) APRÈS 120 H D'EXPOSITION. ....	58

FIGURE 3-11 : LES DENSITÉS RELATIVES DE <i>C. FUSCA</i> EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE DE Nd APRÈS 120 H D'EXPOSITION.....	61
FIGURE 3-12 : Nd INTERNALISÉ CHEZ <i>C. FUSCA</i> EN FONCTION DES CONCENTRATIONS EN Nd TOTALES MESURÉES DANS LE MILIEU AU COURS DU TEMPS (LES BARRES D'ERREURS REPRÉSENTENT LES ÉCARTS-TYPES).....	62
FIGURE 3-13. Nd INTERNALISÉ CHEZ <i>C. FUSCA</i> EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ION LIBRE (LES BARRES D'ERREURS REPRÉSENTANT LES ÉCARTS-TYPES SONT PRÉSENTÉES).....	62
FIGURE 3-14 : CONCENTRATION DU THULIUM EN PRÉSENCE D'ALGUES APRÈS 24 ET 120 HEURES D'EXPOSITION À UNE GAMME ENTRE 100 NM ET 3000 NM (LES BARRES D'ERREURS REPRÉSENTENT LES ÉCARTS-TYPES). ....	63
FIGURE 3-15 : THULIUM ADSORBÉ AU NIVEAU DE LA SURFACE BIOLOGIQUE DE <i>C. FUSCA</i> . ....	64
FIGURE 3-16 : TRACÉ DES RÉSIDUS EN FONCTION DU PRÉDITS : VÉRIFICATION DE LA DISTRIBUTION NORMALE. ....	65
FIGURE 3-17 : TRACÉ DES RÉSIDUS (ERREURS) EN FONCTION DES VALEURS PRÉDITES : VÉRIFICATION DE L'HOMOSCÉDASTICITÉ.....	65
FIGURE 3-18 : PROFILS DE CROISSANCE CELLULAIRE DE <i>C. FUSCA</i> EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DU Tm AU COURS DU TEMPS. LES BARRES D'ERREURS REPRÉSENTENT LES ÉCARTS- TYPES SUR LES MESURES.....	66
FIGURE 3-19 : DENSITÉ RELATIVE DE <i>C. FUSCA</i> EN FONCTION DES CONCENTRATIONS DE THULIUM MESURÉES (A) ET EN FONCTION DE L'ION LIBRE EN Tm (B) APRÈS 120 D'EXPOSITION. ....	69
FIGURE 3-20 : LA DENSITÉ RELATIVE DE <i>C. FUSCA</i> EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE DU THULIUM APRÈS 120 H D'EXPOSITION.....	70
FIGURE 3-21 : Tm INTERNALISÉ CHEZ <i>C. FUSCA</i> EN FONCTION DE LA MOYENNE DES CONCENTRATIONS EN Tm MESURÉE AU COURS DU TEMPS. ....	71
FIGURE 3-22 : Tm INTERNALISÉ CHEZ <i>C. FUSCA</i> EN FONCTION DES CONCENTRATIONS EN IONS LIBRES.....	71
FIGURE 3-23 : CONCENTRATION DE L'YTTRIUM EN PRÉSENCE D'ALGUES APRÈS 24 ET 96 HEURES D'EXPOSITION À UNE GAMME ENTRE 20 ET 800 NM. ....	72
FIGURE 3-24 : YTTRIUM ADSORBÉ AU NIVEAU DE LA SURFACE PLASMIQUE DE <i>C. FUSCA</i> APRÈS 120 H D'EXPOSITION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN Y <sup>3+</sup> LIBRE ....	73
FIGURE 3-25 : TRACÉ DES RÉSIDUS (ERREURS) EN FONCTION DES VALEURS PRÉDITES : VÉRIFICATION DE L'HOMOSCÉDASTICITÉ.....	74
FIGURE 3-26 : PROFILS DE CROISSANCE CELLULAIRE DE <i>C. FUSCA</i> EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS D'Y AU COURS DU TEMPS. LES BARRES D'ERREURS REPRÉSENTENT LES ÉCARTS-TYPES SUR LES MESURES. ....	75
FIGURE 3-27 : DENSITÉ RELATIVE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS DE L'YTTRIUM MESURÉES (A) ET EN FONCTION DE L'ION LIBRE EN Y <sup>3+</sup> (B) APRÈS 120 H D'EXPOSITION. ....	77
FIGURE 3-28 : LES DENSITÉS RELATIVES DE <i>C. FUSCA</i> EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE DE L'YTTRIUM APRÈS 120 H D'EXPOSITION.....	78
FIGURE 3-29 : Y INTERNALISÉ CHEZ <i>C. FUSCA</i> EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN IONS LIBRES DE L'Y <sup>3+</sup> .....	79
FIGURE 3-30 : CONCENTRATION DU NÉODYME EN PRESENCE D'ALGUES APRES 120 HEURES D'EXPOSITION A 150, 600, 1800, 3000 ET 5000 NM DE Nd (N=3) (BARRES D'ERREURS REPRESENTENT LES ECARTS-TYPES).....	80

FIGURE 3-31 : NÉODYME ADSORBÉ AU NIVEAU DE LA MEMBRANE CELLULAIRE DE <i>C. REINHARDTII</i> EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN $\text{Nd}^{3+}$ LIBRE. ....	81
FIGURE 3-32 : ND ADSORBÉ CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> : VÉRIFICATION DE L'HOMOSCÉDASTICITÉ. ....	81
FIGURE 3-33 : PROFILS DE CROISSANCE CELLULAIRE DE <i>C. REINHARDTII</i> EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE ND AU COURS DU TEMPS. LES BARRES D'ERREURS REPRÉSENTENT L'ÉCART- TYPE SUR LES MESURES.....	82
FIGURE 3-34 : DENSITÉ RELATIVE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS DU NÉODYME MESURÉES (A) ET EN FONCTION DE L'ION LIBRE EN $\text{Nd}^{3+}$ (B) APRÈS 120 H D'EXPOSITION.....	85
FIGURE 3-35: DENSITÉ RELATIVE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS DU NÉODYME INTRACELLULAIRE APRÈS 120 H. ....	86
FIGURE 3-36 : NÉODYME INTERNALISÉ EN FONCTION DE LA CONCENTRATION MOYENNE EN ND DANS LE MILIEU. ....	87
FIGURE 3-37 : NÉODYME INTERNALISÉ EN FONCTION DE L'ION LIBRE. ....	87
FIGURE 3-38 CONCENTRATION THULIUM EN PRÉSENCE D'ALGUES APRÈS 120 HEURES D'EXPOSITION À .....	88
FIGURE 3-39 : Tm ADSORBÉ AU NIVEAU DE LA SURFACE BIOLOGIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN $\text{Tm}^{3+}$ LIBRE. ....	89
FIGURE 3-40 : Tm ADSORBÉ CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> : VÉRIFICATION DE L'HOMOSCÉDASTICITÉ. ....	89
FIGURE 3-41 : PROFILS DE CROISSANCE CELLULAIRE DE <i>C. REINHARDTII</i> EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE Tm AU COURS DU TEMPS. LES BARRES D'ERREURS REPRÉSENTENT L'ÉCART- TYPE SUR LES MESURES.....	90
FIGURE 3-42 : DENSITÉ RELATIVE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS DE THULIUM MESURÉES (A) ET EN FONCTION DE L'ION LIBRE EN $\text{Tm}^{3+}$ (B) APRÈS 120 H D'EXPOSITION. ....	92
FIGURE 3-43 : DENSITÉ RELATIVE DE <i>C. REINHARDTII</i> EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE DU THULIUM APRÈS 120 H D'EXPOSITION.....	93
FIGURE 3-44 : Tm INTERNALISÉ CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> EN FONCTION DE LA MOYENNE DES CONCENTRATIONS EN Tm MESURÉE AU COURS DU TEMPS. ....	95
FIGURE 3-45 : Tm INTERNALISÉ CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> EN FONCTION DE LA MOYENNE DES CONCENTRATIONS EN ION LIBRE DE $\text{Tm}^{3+}$ AU COURS DU TEMPS. ....	95
FIGURE 3-46 : SUIVIE DES CONCENTRATIONS EN Y AU COURS DU TEMPS EN PRÉSENCE DE <i>C. REINHARDTII</i> .....	96
FIGURE 3-47 : YTTRIUM ADSORBÉ AU NIVEAU DE LA SURFACE CELLULAIRE DE <i>C. REINHARDTII</i> APRÈS 120 H D'EXPOSITION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN $\text{Y}^{3+}$ LIBRE. ....	97
FIGURE 3-48 : PROFILS DE CROISSANCE CELLULAIRE DE <i>C. REINHARDTII</i> EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE L'Y AU COURS DU TEMPS. LES BARRES D'ERREURS REPRÉSENTENT L'ÉCART- TYPE SUR LES MESURES.....	98
FIGURE 3-49 : DENSITÉ RELATIVE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS DE L'YTTRIUM MESURÉES (A) ET EN FONCTION DE L'ION LIBRE EN $\text{Y}^{3+}$ (B) APRÈS 120 H D'EXPOSITION .....	100
FIGURE 3-50 : DENSITÉS RELATIVE PAR RAPPORT À LA CULTURE TÉMOIN DE <i>C. REINHARDTII</i> EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE DE L'YTTRIUM APRÈS 120 H D'EXPOSITION. ....	102
FIGURE 3-51 Yttrium INTERNALISÉ CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> EN FONCTION DE LA MOYENNE DES CONCENTRATIONS EN Y MESURÉE AU COURS DU TEMPS.....	102

FIGURE 3-52 : YTTRIUM INTERNALISÉ CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> EN FONCTION DE LA MOYENNE DES CONCENTRATIONS EN Y LIBRE AU COURS DU TEMPS. ....	103
FIGURE 3-53 : MÉTAUX INTERNALISÉS CHEZ LES DEUX ESPÈCES EN FONCTION DE L'ION LIBRE. LES POINTS ENTOURÉS EN BLEU REPRÉSENTENT <i>C. REINHARDTII</i> ; CEUX EN ROUGE REPRÉSENTENT <i>C. FUSCA</i> . ....	107
FIGURE 3-54 : LES FLUX D'INTERNALISATION MAXIMUMS POUR LES DEUX ESPÈCES ALGALES. ....	107
FIGURE 3-55 : TRACÉ P-P NORMAL DE RÉGRESSION RÉSIDUEL STANDARDISÉ.....	108
FIGURE 3-56 : TRACÉ DES RÉSIDUS (ERREURS) EN FONCTION DES VALEURS PRÉDITES : VÉRIFICATION DE L'HOMOSCÉDASTICITÉ.....	109
FIGURE 3-57 : Tm ADSORBÉ AU NIVEAU DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DE <i>C. REINHARDTII</i> EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN Tm <sup>3+</sup> LIBRE APRÈS UNE EXPOSITION DE 120 H.....	109
FIGURE 3-58 : COURBE DE CROISSANCE DE <i>C. REINHARDTII</i> À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE Tm EN PRÉSENCE DE 1 µM DE Nd. ....	110
FIGURE 3-59 : DENSITÉ RELATIVE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION MOYENNE MESURÉE EN Tm (A) ET EN FONCTION DE Tm LIBRE (B) APRÈS 120H D'EXPOSITION. ....	113
FIGURE 3-60 : COURBE DOSE-RÉPONSE : INHIBITION CAUSÉE PAR LE THULIUM EN PRÉSENCE D'UNE CONCENTRATION CONSTANTE DE 1000 nM DE Nd. ....	114
FIGURE 3-61 : COURBE DOSE-RÉPONSE : DENSITÉ RELATIVE EN FONCTION DE THULIUM INTERNALISÉ PAR CELLULE.....	115
FIGURE 3-62 : THULIUM INTERNALISÉ EN FONCTION DES CONCENTRATIONS EN ION LIBRE. ....	116
FIGURE 3-63 : FLUX D'INTERNALISATION DE Nd CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> À pH= 5,00 EN ABSENCE DE Tm.....	117
FIGURE 3-64 : FLUX D'INTERNALISATION DE Tm EN ABSENCE DE Nd CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> À pH=5,00. ....	118
FIGURE 3-65 : FLUX D'INTERNALISATION DE Tm EN PRÉSENCE DE 1000 nM DE Nd CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> . ....	120
FIGURE 3-66 : FLUX D'INTERNALISATION DE Tm EN FONCTION DES IONS LIBRES : EN ROUGE LES FLUX DE Tm EN ABSENCE DE Nd, ET LES POINTS EN BLEU REPRÉSENTENT LES FLUX EN PRÉSENCE DE Nd. ....	121
FIGURE 3-67 : FLUX D'INTERNALISATION DE Tm CALCULÉS EN UTILISANT LES CONSTANTES DÉTERMINÉES EXPÉRIMENTALEMENT EN FONCTION DES FLUX D'INTERNALISATION DÉTERMINÉS EXPÉRIMENTALEMENT CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> À pH 5,00. LA DROITE 1 :1 (LIGNE PLEINE) EST TRACÉE POUR COMPARAISON.....	122
FIGURE 6-1 LES SITES DES MINES ACTIVES DES TR AINSI QUE LES PROJETS EN STADE AVANCÉ (SCHULZ, K. J., DEYOUNG, J. H., SEAL, R. R., & BRADLEY, 2018).....	132
FIGURE 6-2 : RÉSULTAT DE LA RÉGRESSION LINÉAIRE ENTRE LE Tm ADSORBÉ ET CELUI MESURÉ CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> . ....	141

# LISTE DES TABLEAUX

---

TABLEAU 1-1: LES ÉTATS D'OXYDATION DES LANTHANIDES (GREGORY AND RIKALLA, 1994).....	2
TABLEAU 1-2: SPÉCIATION DES TR DANS L'EAU DE MER (ELDERFIELD ET AL., 1988). LES ESPÈCES SONT PRÉSENTÉES EN POURCENTAGE D'ION DISSOUS ^.....	17
TABLEAU 1-3 : RÉSUMÉ DE L'EFFET DE TROIS TR SUR LA CROISSANCE DE DEUX ESPÈCES CANADIENNES NATIVES. (THOMAS ET AL., 2014). CE10 ET CE50 (EN MG·KG-1 SOL SEC ) REPRÉSENTENT LES CONCENTRATIONS DES MÉTAUX AUXQUELLES IL Y A 10% ET 25 % DE RÉDUCTION DE BIOMASSE PAR RAPPORT AU TÉMOIN SANS TRAITEMENT; AS POUR <i>A. SYRIACA</i> ET DC POUR <i>D. CANADENSE</i> . ....	20
TABLEAU 1-4: LES VALEURS DES CE50 DE DEUX LANTHANIDES SUR <i>C. FUSCA</i> OBTENUES AU LABORATOIRE DU PROF. FORTIN À L'INRS. ..	23
TABLEAU 1-5: VALEURS CALCULÉES DES CE50 DE LA POUR L'ALGUE <i>CHLORELLA FUSCA</i> APRÈS 120 H D'EXPOSITION POUR DES CONCENTRATIONS D'ACIDE HUMIQUE DE 0, 1, 2 ET 3 MG C/L (RAHAL, 2018). ....	23
TABLEAU 2-1      CONSTANTES DE FORMATION DE COMPLEXES AVEC LE TM, LE ND ET L'Y. ....	25
TABLEAU 2-2 : COMPOSITION DES SOLUTIONS STOCKS ET QUANTITÉS AJOUTÉES POUR LA PRÉPARATION D'UN LITRE DE MILIEU DE CULTURE MHSM-2. ....	30
TABLEAU 2-3 : VOLUMES DE SOLUTIONS INTERMÉDIAIRES UTILISÉS POUR LA PRÉPARATION DES MILIEUX DE RINÇAGE ET D'EXPOSITION PAR 1 L.....	32
TABLEAU 2-4: EXEMPLES DE PRÉLÈVEMENT DES VOLUMES À PARTIR DES SOLUTIONS CONTENANT LE MÉTAL D'INTÉRÊTS.....	32
TABLEAU 2-5: CONCENTRATIONS DES ESPÈCES DANS LE MILIEU DE CULTURE ET D'EXPOSITION.....	33
TABLEAU 2-6: TABLEAU DES CONCENTRATIONS NOMINALES TESTÉES (EN NM) POUR CHAQUE MÉTAL CHEZ CHAQUE ESPÈCE ALGALE. ....	39
TABLEAU 2-7 : CONCENTRATIONS DE MÉTAL MESURÉES DANS LES CONTRÔLES DE DIGESTION DU MATÉRIEL DE RÉFÉRENCE. ....	40
TABLEAU 2-8 : LA CONCENTRATION MAXIMALE ADMISSIBLE POUR ISO 7 (MECART INC., 2020) .....	41
TABLEAU 3-1 : ONE-WAY ANOVA TEST : P-VALUE ENTRE LES DENSITÉS CELLULAIRES À 120 H. ....	57
TABLEAU 3-2: ONE-WAY ANOVA TEST : P-VALUE ENTRE LES TAUX DE DIVISION CELLULAIRE DE <i>C. FUSCA</i> APRÈS 120 H D'EXPOSITION AU ND.....	57
TABLEAU 3-3: : POURCENTAGES EN ND <sup>3+</sup> DANS LES MILIEUX D'EXPOSITION. ....	59
TABLEAU 3-4: COMPARAISON ENTRE LES VALEURS DE CE50 OBTENUES DE ND ET DE LA SUR <i>C. FUSCA</i> .....	60
TABLEAU 3-5: ONE-WAY ANOVA TEST : P-VALUE ENTRE LES DENSITÉS CELLULAIRES À 72 H. ....	67
TABLEAU 3-6: ONE-WAY ANOVA TEST : P-VALUE ENTRE LES DENSITÉS CELLULAIRES À 120 H. ....	67
TABLEAU 3-7: ONE-WAY ANOVA TEST : P-VALUE ENTRE LES TAUX DE DIVISION CELLULAIRE DE <i>C. FUSCA</i> APRÈS 120 H D'EXPOSITION AU TM.....	68
TABLEAU 3-8: ONE-WAY ANOVA TEST : P-VALUE ENTRE LES DENSITÉS CELLULAIRES À 120 H. ....	76

TABLEAU 3-9: ONE-WAY ANOVA TEST : P-VALUE ENTRE LES TAUX DE DIVISION CELLULAIRE DE <i>C. FUSCA</i> APRÈS 120 H D'EXPOSITION À L'Y. .....	76
TABLEAU 3-10: ONE-WAY ANOVA TEST : P-VALUE ENTRE LES DENSITÉS CELLULAIRES DE <i>C. REINHARDTII</i> À 96 ET À 120 H.....	83
TABLEAU 3-11: ONE-WAY ANOVA TEST : P-VALUE ENTRE LES TAUX DE DIVISION CELLULAIRE DE <i>C. REINHARDTII</i> APRÈS 120 H D'EXPOSITION AU Nd ( $\mu$ TÉMOIN = 0,518 $\pm$ 0,02).....	83
TABLEAU 3-12: EXPOSITION DE <i>C. REINHARDTII</i> AU Nd : CONCENTRATIONS EN Nd MESURÉ ET POURCENTAGES EN Nd <sup>3+</sup> DANS LE MILIEU MHSM-2.....	85
TABLEAU 3-13: ONE-WAY ANOVA TEST : P-VALUE ENTRE LES DENSITÉS CELLULAIRES DE <i>C. REINHARDTII</i> À 120 H (EXPOSÉE AU Tm). ....	91
TABLEAU 3-14: ONE-WAY ANOVA TEST : P-VALUE ENTRE LES TAUX DE DIVISION CELLULAIRE DE <i>C. REINHARDTII</i> APRÈS 120 H D'EXPOSITION AU Tm ( $\mu$ TÉMOIN = 0,61 $\pm$ 0,014). ....	91
TABLEAU 3-15: POURCENTAGES EN IONS LIBRES PAR RAPPORT AUX CONCENTRATIONS MESURÉES DANS LE MILIEU D'EXPOSITION MHSM-2 EN PRÉSENCE DE <i>C. REINHARDTII</i> . ....	93
TABLEAU 3-16: POURCENTAGES EN Tm <sup>3+</sup> DANS LE MHSM-2 .....	94
TABLEAU 3-17: VALEURS DES P-VALUE ENTRE LES DENSITÉS CELLULAIRES DE <i>C. REINHARDTII</i> À 120 H (EXPOSÉE À L'Y).....	99
TABLEAU 3-18: ONE-WAY ANOVA TEST : P-VALUE ENTRE LES TAUX DE DIVISION CELLULAIRE DE <i>C. REINHARDTII</i> APRÈS 120 H D'EXPOSITION À L'Y ( $\mu$ TÉMOIN = 0,66 $\pm$ 0,01). ....	99
TABLEAU 3-19: VALEURS DES CONCENTRATIONS EFFICACES CAUSANT DIFFÉRENTS POURCENTAGES D'INHIBITION EXPRIMÉE EN Y MESURÉ ET EN ION LIBRE Y <sup>3+</sup> CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> . ....	101
TABLEAU 3-20: COMPARAISON ENTRE LES CE50 DE CHAQUE MÉTAL CHEZ <i>C. FUSCA</i> (AVEC LES IC95%).....	105
TABLEAU 3-21: COMPARAISON ENTRE LES CE50 DE CHAQUE MÉTAL CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> . ....	105
TABLEAU 3-22: ONE-WAY ANOVA TEST : P-VALUE ENTRE LES DENSITÉS CELLULAIRES À 120 H. ....	111
TABLEAU 3-23: ONE-WAY ANOVA TEST : P-VALUE ENTRE LES TAUX DE CROISSANCE CELLULAIRE DE <i>C. REINHARDTII</i> APRÈS 120 H D'EXPOSITION AU MÉLANGE DU Tm ET Nd ( $\mu$ TÉMOIN = 0,54 $\pm$ 0,013). ....	111
TABLEAU 3-24 : POURCENTAGE D'INHIBITION (EN MOYENNE DES TRIPPLICATA) SELON LES CONCENTRATIONS NOMINALES.....	112
TABLEAU 3-25 : VALEURS DES CE50. ....	115
TABLEAU 3-26 : VALEURS DE FLUX MAXIMAL, CONSTANTE DE DEMI-SATURATION ET CONSTANTE DE STABILITÉ DE Nd CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> . .....	118
TABLEAU 3-27 : VALEURS DE FLUX MAXIMAL, CONSTANTE DE DEMI SATURATION ET CONSTANTE DE STABILITÉ DE Tm EN ABSENCE DE NÉODYME.....	119
TABLEAU 3-28 : J <sub>MAX</sub> , CONSTANTE DE DEMI-SATURATION K <sub>D</sub> ET CONSTANTE DE STABILITÉ DE Tm K <sub>Tm</sub> . ....	121
TABLEAU 6-1: CONCENTRATIONS EN NÉODYME EN PRÉSENCE DE <i>C. FUSCA</i> (N = 3). ....	133
TABLEAU 6-2: CONCENTRATIONS EN THULIUM EN PRÉSENCE DE <i>C. FUSCA</i> (N = 3). ....	133

TABLEAU 6-3: CONCENTRATIONS EN YTTRIUM EN PRÉSENCE DE <i>C. FUSCA</i> (N = 3). .....	133
TABLEAU 6-4 : DONNÉES DE L'EXPÉRIENCE D'EXPOSITION DE <i>C. FUSCA</i> AU NÉODYME PENDANT 120 H. CONCENTRATIONS EN ND: NOMINALES, MESURÉES (MOYENNE AU COURS DU TEMPS), ION LIBRE, INTERNALISÉES ET DENSITÉS CELLULAIRES. N (NOMBRE DE RÉPÉTITION) = 3. ....	134
TABLEAU 6-5: EXPÉRIENCE AVEC <i>C. FUSCA</i> À 120 H : CONCENTRATIONS EN THULIUM: NOMINALES, MESURÉES (MOYENNE AU COURS DU TEMPS), ION LIBRE, INTERNALISÉES ET DENSITÉS CELLULAIRES. N (NOMBRE DE RÉPÉTITION) = 3. ....	135
TABLEAU 6-6 : EXPÉRIENCE AVEC <i>C. FUSCA</i> À 120 H. CONCENTRATIONS EN YTTRIUM : NOMINALES, MESURÉES (MOYENNE AU COURS DU TEMPS), ION LIBRE, INTERNALISÉES ET DENSITÉS CELLULAIRES (N=3). ....	136
TABLEAU 6-7 : EXPÉRIENCE AVEC <i>C. REINHARDTII</i> À 120 H. CONCENTRATIONS EN NÉODYME : NOMINALES, MESURÉES (MOYENNE AU COURS DU TEMPS), ION LIBRE, INTERNALISÉES ET DENSITÉS CELLULAIRES (N=3). ....	137
TABLEAU 6-8: EXPÉRIENCE AVEC <i>C. REINHARDTII</i> À 120 H : CONCENTRATIONS EN THULIUM: NOMINALES, MESURÉES, ION LIBRE, INTERNALISÉES ET DENSITÉS CELLULAIRES (N=3). ....	138
TABLEAU 6-9: EXPÉRIENCE AVEC <i>C. REINHARDTII</i> À 120 H : CONCENTRATIONS EN YTTRIUM : NOMINALES, MESURÉES, ION LIBRE, INTERNALISÉES ET DENSITÉS CELLULAIRES (N=3). ....	139
TABLEAU 6-10 EXPÉRIENCE AVEC <i>C. REINHARDTII</i> À 120 H EXPOSÉE AU Tm ET Nd : CONCENTRATIONS EN Tm, Nd : NOMINALES, MESURÉES, ION LIBRE, INTERNALISÉES ET DENSITÉS CELLULAIRES (N=3). ....	141
TABLEAU 6-11 : FLUX PRÉDITS ET CALCULÉS EXPÉRIMENTALEMENT CHEZ <i>C. REINHARDTII</i> EXPOSÉE AUX DEUX MÉTAUX :Tm ET Nd (N=3). .....	142

# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

## 1.1 Généralités

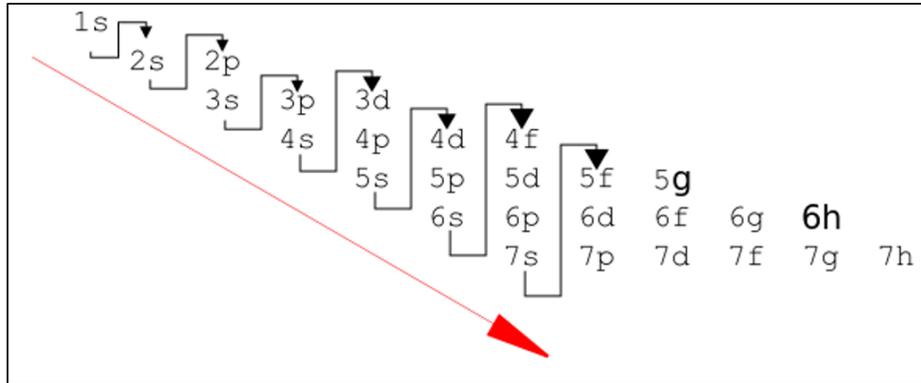
La découverte des terres rares (TR) a débuté à la fin du 19<sup>e</sup> siècle avec l'yttrium. Cette section décrit brièvement la structure atomique, la nomenclature des TR et leur abondance. On cite quelques applications liées à leurs propriétés.

### 1.1.1 Nomenclature, structure atomique et abondance

Les TR forment un groupe de 17 métaux possédant des caractéristiques physicochimiques très similaires qui inclut le scandium (Sc), l'yttrium (Y) et le groupe des lanthanides 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). La Figure 1.1 montre le tableau périodique des éléments : les lanthanides se placent entre baryum (Ba) et hafnium (Hf) (Voncken, 2016). L'ordre des éléments dans ce tableau dépend de leurs configurations électroniques où les orbitales sont remplies selon la règle de Madelung comme indiqué dans la Figure 1.2.

1 H Hydrogène 1,00794																	2 He Hélium 4,003																												
3 Li Lithium 6,941	4 Be Béryllium 9,012182	TR										5 B Bore 10,811	6 C Carbone 12,0107	7 N Azote 14,00644	8 O Oxygène 15,9994	9 F Fluore 18,9984032	10 Ne Neon 20,1797																												
11 Na Sodium 22,989770	12 Mg Magnésium 24,3050	TRLE TRDO										13 Al Aluminium 26,981538	14 Si Silicium 28,0855	15 P Phosphore 30,973761	16 S Soufre 32,066	17 Cl Chlore 35,4527	18 Ar Argon 39,948																												
19 K Potassium 39,0983	20 Ca Calcium 40,078	21 Sc Scandium 44,955910	22 Ti Titane 47,867	23 V Vanadium 50,9415	24 Cr Chromium 51,9961	25 Mn Manganèse 54,938049	26 Fe Fer 55,845	27 Co Cobalt 58,933200	28 Ni Nickel 58,6934	29 Cu Cuivre 63,546	30 Zn Zinc 65,39	31 Ga Gallium 69,723	32 Ge Germanium 72,61	33 As Arsenic 74,92160	34 Se Sélénium 78,96	35 Br Brome 79,904	36 Kr Krypton 83,80																												
37 Rb Rubidium 85,4678	38 Sr Strontium 87,62	39 Y Yttrium 88,90585	40 Zr Zirconium 91,224	41 Nb Niobium 92,90638	42 Mo Molybdène 95,94	43 Tc Technétium (98)	44 Ru Ruthénium 101,07	45 Rh Rhodium 102,90550	46 Pd Paladium 106,42	47 Ag Argent 107,8682	48 Cd Cadmium 112,411	49 In Indium 114,818	50 Sn Étain 118,710	51 Sb Antimoine 121,760	52 Te Tellure 127,60	53 I Iode 126,90447	54 Xe Xénon 131,29																												
55 Cs Césium 132,90545	56 Ba Baryum 137,327	57 La Lanthane 138,905	72 Hf Hafnium 178,49	73 Ta Tungstène 180,9479	74 W Wolfram 183,84	75 Re Rhenium 186,207	76 Os Osmium 190,23	77 Ir Iridium 192,22	78 Pt Platine 195,078	79 Au Or 196,96655	80 Hg Mercure 200,59	81 Tl Thallium 204,3833	82 Pb Plomb 207,2	83 Bi Bismuth 208,98038	84 Po Polonium (209)	85 At Astatine (210)	86 Rn Radon (222)																												
87 Fr Francium (223)	88 Ra Radium (226)	89 Ac Actinium (227)	104 Rf Rutherfordium (261)	105 Db Dubnium (262)	106 Sg Seaborgium (263)	107 Bh Bohrium (264)	108 Hs Hassium (265)	109 Mt Meitnerium (266)	110 (269)	111 (272)	112 (277)	113	114																																
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>58 Ce Cérium 140,116</td> <td>59 Pr Praséodyme 140,90766</td> <td>60 Nd Néodyme 144,242</td> <td>61 Pm Prométhium (145)</td> <td>62 Sm Samarium 150,36</td> <td>63 Eu Europium 151,964</td> <td>64 Gd Gadolinium 157,25</td> <td>65 Tb Terbium 158,92534</td> <td>66 Dy Dysprosium 162,50</td> <td>67 Ho Holmium 164,93032</td> <td>68 Er Erbium 167,26</td> <td>69 Tm Thulium 168,93048</td> <td>70 Yb Ytterbium 173,054</td> <td>71 Lu Lutécium 174,967</td> </tr> <tr> <td>90 Th Thorium 232,0381</td> <td>91 Pa Protactinium 231,03688</td> <td>92 U Uranium 238,0289</td> <td>93 Np Neptunium (237)</td> <td>94 Pu Plutonium (244)</td> <td>95 Am Americium (243)</td> <td>96 Cm Curium (247)</td> <td>97 Bk Berkélium (247)</td> <td>98 Cf Californium (251)</td> <td>99 Es Einsteinium (252)</td> <td>100 Fm Fermium (257)</td> <td>101 Md Mendelevium (288)</td> <td>102 No Nobelium (289)</td> <td>103 Lr Lawrencium (262)</td> </tr> </table>																		58 Ce Cérium 140,116	59 Pr Praséodyme 140,90766	60 Nd Néodyme 144,242	61 Pm Prométhium (145)	62 Sm Samarium 150,36	63 Eu Europium 151,964	64 Gd Gadolinium 157,25	65 Tb Terbium 158,92534	66 Dy Dysprosium 162,50	67 Ho Holmium 164,93032	68 Er Erbium 167,26	69 Tm Thulium 168,93048	70 Yb Ytterbium 173,054	71 Lu Lutécium 174,967	90 Th Thorium 232,0381	91 Pa Protactinium 231,03688	92 U Uranium 238,0289	93 Np Neptunium (237)	94 Pu Plutonium (244)	95 Am Americium (243)	96 Cm Curium (247)	97 Bk Berkélium (247)	98 Cf Californium (251)	99 Es Einsteinium (252)	100 Fm Fermium (257)	101 Md Mendelevium (288)	102 No Nobelium (289)	103 Lr Lawrencium (262)
58 Ce Cérium 140,116	59 Pr Praséodyme 140,90766	60 Nd Néodyme 144,242	61 Pm Prométhium (145)	62 Sm Samarium 150,36	63 Eu Europium 151,964	64 Gd Gadolinium 157,25	65 Tb Terbium 158,92534	66 Dy Dysprosium 162,50	67 Ho Holmium 164,93032	68 Er Erbium 167,26	69 Tm Thulium 168,93048	70 Yb Ytterbium 173,054	71 Lu Lutécium 174,967																																
90 Th Thorium 232,0381	91 Pa Protactinium 231,03688	92 U Uranium 238,0289	93 Np Neptunium (237)	94 Pu Plutonium (244)	95 Am Americium (243)	96 Cm Curium (247)	97 Bk Berkélium (247)	98 Cf Californium (251)	99 Es Einsteinium (252)	100 Fm Fermium (257)	101 Md Mendelevium (288)	102 No Nobelium (289)	103 Lr Lawrencium (262)																																

Figure 1-1: Tableau périodique des éléments chimiques (Schüler et al., 2011).



**Figure 1-2: Représentation graphique de la règle de Madelung**

*(The spectrum of Riemannium, Physmatics in a nutshell, sd)*

Pour la majorité des atomes neutres de lanthanides, la configuration électronique peut être donnée comme  $4f^{n+1}, 5s^2, 5p^2, 6s^2$  (avec n nombre quantique : entier vérifiant  $n \geq 1$ ). Les lanthanides sont des ions trivalents (3+) ; cela est dû à la perte d'un électron en 4f et deux électrons en  $6s^2$ , à l'exception du Ce qui forme aussi des ions (4+) ainsi que l'Eu, l'Yb, et le Sm qui forment des ions bivalents (2+) (Gregory et Rikalla, 1994). Les possibilités d'états d'oxydation sont présentées dans le Tableau 1.1.

**Tableau 1-1: Les états d'oxydation des lanthanides (Gregory and Rikalla, 1994).**

Les états d'oxydation entre parenthèses sont instables.

La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
		(2)	(2)		2	2			(2)	(2)		2	2	
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
	4	4	(4)					4	(4)					3

Les TR sont souvent divisées en deux groupes : les terres rares légères (TRLE) et les terres rares lourdes (TRLO) comme montré à la Figure 1.1. Cette division est basée sur la configuration électronique de chaque élément :

- La première catégorie regroupe les éléments allant du lanthane avec un nombre atomique de 57, jusqu'au gadolinium ayant un nombre atomique de 65.
- Le deuxième groupe inclut les éléments entre le terbium ayant un nombre atomique de 65, et le dernier lanthanide, le lutécium, de nombre atomique égale à 71. Ce groupe

comprend également l'yttrium de nombre atomique égal à 39. Il est inclus dans ce groupe vu que ses propriétés chimiques et son rayon ionique sont similaires à cette catégorie. Bien qu'il soit classé comme TR, le scandium n'est pas catégorisé comme TRLE ou TRLO (Gregory et Rikalla, 1994).

Il est observé que l'abondance des TR dans la croûte terrestre diminue avec l'augmentation du nombre atomique Z : les TRLE sont beaucoup plus abondantes que les TRLO. Selon la règle de Oddo-Harkins (Banin & Navrot, 1975), les éléments avec un nombre atomique pair sont plus abondants que les éléments à un nombre impair. Par exemple, le cérium (Z = 58) est plus abondant que le lanthane (Z = 57) et le praséodyme (Z = 59). Le cérium est le plus abondant des TRLE alors que l'yttrium est le plus dominant pour les TRLO (Binnemans et Jones, 2015). On peut voir à la Figure 1.3 une allure en dents de scie expliquée par la règle d'Oddo-Harkins.

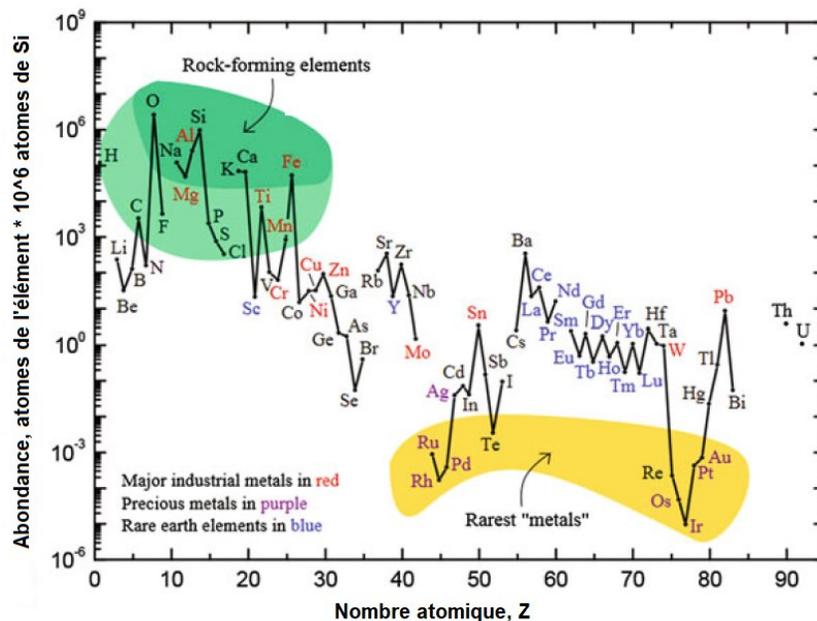


Figure 1-3 Abondances des éléments exprimées en fraction atomique en fonction du nombre atomique (Haxel, Boore et Mayfield, 2005) .

### 1.1.2 Types de dépôts et de minerais sources des TR

Les terres rares sont souvent associées à une roche carbonatée appelée carbonatite: une roche ignée (généralement intrusive) constituée de plus de 50% de minéraux carbonatés (carbonates de Ca, Mg, Na et Fe). Les carbonatites sont liés aux roches

alcalines. Ces dernières contiennent des métaux comme le niobium (Nb), tantale (Ta) et les terres rares (REE) et se retrouvent dans une grande variété de dépôts. Ces dépôts contenant différents types de minerais comme la bastnaésite dans lequel on retrouve principalement les TRLE comme le Ce, La et le Nd. Un exemple de mine contenant ce type de minerais est celui de Mountain Pass en Californie, de Bayan Obo en Chine (Figure 6.1 de l'annexe). D'autres minerais comme la monazite contiennent des lanthanides comme Ce, La, Pr et Sm comme celui trouvé à Mount Weld en Australie (Figure 6.1). D'autres exemples sont montrés sur la carte du monde montrant les différents sites actifs des mines, ou des projets en stade avancé.

### **1.1.3 Applications**

Comme discuté dans la partie 1.1.1, les TR ont au moins un électron non apparié dans leurs orbitales 4f, ce qui leur donne des propriétés catalytiques et magnétiques. Dans cette section, nous passons en revue les diverses utilisations des TR.

Le scandium est utilisé majoritairement comme métal d'alliage pour l'aluminium. L'isotope radioactif scandium-46 (avec une demi-vie de 84 jours) est exploité en tant que traceur pendant le procédé de raffinage d'huile permettant de surveiller le mouvement de diverses fractions (Royal Society of Chemistry, 2017b). Une autre application mineure est l'ajout de l'iodure de scandium à vapeur de mercure pour produire une source de lumière efficace similaire à la lumière du soleil. Ces lampes contribuent à la reproduction des couleurs pour les caméras de télévision lors des tournages (Scandium.org, 2017).

L'yttrium est souvent utilisé dans les alliages comme un additif. Il augmente la résistance des alliages en aluminium et en magnésium. On le trouve aussi dans les filtres des micro-ondes. L'Y est également utilisé comme catalyseur lors de la polymérisation de l'éthène. D'autres applications de l'yttrium sont connues : on le trouve dans les lasers et dans les lumières LED blanches sous forme de grenat d'yttrium aluminium (YAG). L'oxyde d'yttrium est ajouté aux verres destinés à la fabrication des objectifs des appareils photo afin de leur conférer une résistance à la chaleur et aux chocs. Dans le domaine médical, l'isotope radioactif yttrium-90 est utilisé pour traiter quelques cas de cancers comme celui du foie (Royal Society of Chemistry, 2017c)

L'oxyde de cérium est utilisé comme catalyseur. Il est utilisé dans la paroi intérieure des fours autonettoyants afin d'éviter l'accumulation de résidus de cuisson.

Le lanthane est utilisé dans la fabrication des batteries, pellicules de photographie de rayon X, des lasers, les appareils de communications et aussi comme catalyseur pour le raffinement du pétrole (Reisman, Weber et Mckernan, 2012).

Le néodyme, grâce à ses propriétés magnétiques et physiques, est utilisé dans la fabrication des aimants permanents très puissants employés dans les machines électriques (Rahman et Slemon, 1985). Cette découverte en 1983 a permis de miniaturiser de nombreux appareils électroniques tels que les téléphones portables, les microphones... Ces aimants sont également utilisés dans les éoliennes. Le néodyme est aussi utilisé dans la fabrication des verres de didyme avec le praséodyme. Le verre du néodyme est exploité pour fabriquer des lasers. Ces derniers sont utilisés comme pointeurs lasers ainsi qu'en chirurgie oculaire, esthétique et pour le traitement du cancer de la peau (Royal Society of Chemistry, 2017a). Le gadolinium possède plusieurs applications. Cependant, aucune application n'existe à grande échelle. En métallurgie, le Gd améliore la résistance du fer et du chrome à l'oxydation et aux températures élevées. Il est utile comme agent contrastant en imagerie par résonance magnétique (IRM), en particulier pour diagnostiquer les tumeurs cancéreuses.

Le thulium est utilisé dans les lasers à usage chirurgical (vu la longueur d'onde cohérente à cette application). Des travaux ont été menés pour l'étude de l'extirpation de la prostate, indépendamment de la taille de prostate, au laser à l'aide Tm. Cette approche a été recommandée pour résoudre l'hyperplasie bénigne de la prostate (BPH) (Foster *et al.*, 2018). L'emploi du Tm dans les systèmes du laser pour des fins médicales améliorant l'efficacité des soins urologiques (Martov, Ergakov , Guseinov, *et al.* 2018). Le Tm est aussi employé dans les équipements portatifs de rayons X.

## **1.2 Production et aspect économique**

### **1.2.1 Réserve, production et demande mondiale**

#### **1.2.1.1 Réserve**

Les réserves en TR sont d'environ 120 millions de tonnes métriques. La Chine possède la plupart de ces réserves avec environ 55 millions de tonnes métriques (Schulz, DeYoung, Seal,& Bradley, 2018). D'autres principaux pays disposent des TR : l'Australie avec des réserves estimées d'environ 3,2 millions de tonnes métriques en oxyde de TR et l'Inde avec 3,1 millions de tonnes des oxydes des TR (Schulz, DeYoung, Seal &

Bradley, 2018). Une partie significative de ces éléments se situe aux États-Unis avec environ 1,8 million de tonnes métriques. La découverte des TR en Chine fut à Bayan Obo en 1927 et la production des concentrées des TR commença en 1957 (Tse, 2011).

### 1.2.1.2 Production

Entre 1990 et 2000, la production en Chine a augmenté de plus de 450 %, allant d'une quantité d'environ 16 000 à une quantité de 73 000 tonnes métriques (Figure 1.4). À la même période, un déclin de production a été observé aux É.-U.A et au sein d'autres pays producteurs. Depuis 2000, la production annuelle en Chine a continué d'augmenter. En 2009, elle est passée à 129 000 tonnes. À la même année, la production des autres pays a diminué à 3000 tonnes.

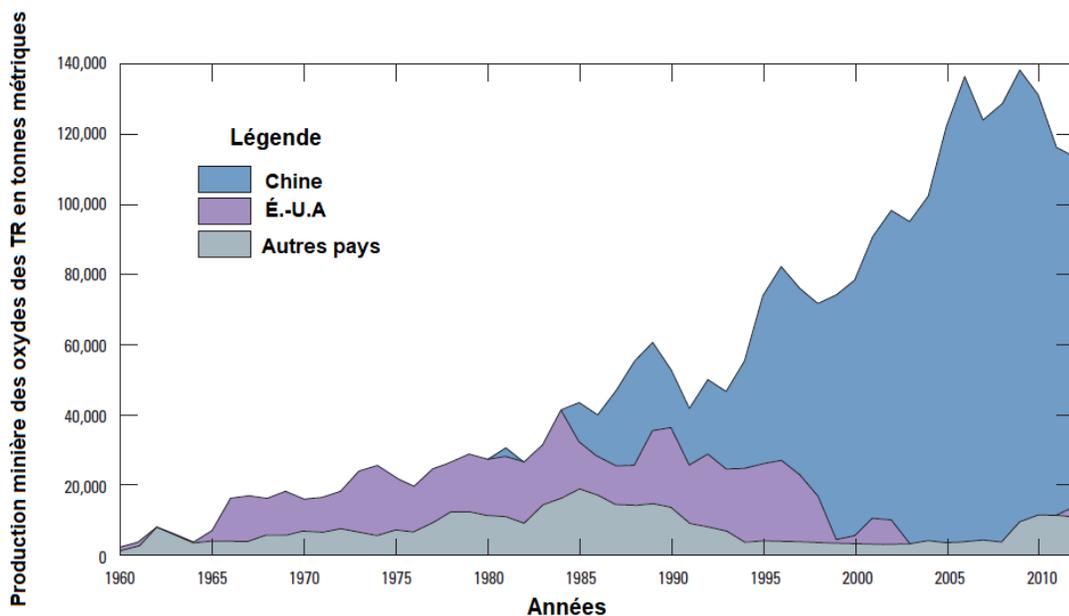


Figure 1-4: Production globale des oxydes des terres rares (USGS, sd)

Entre les années 1990 et 2000, le gouvernement chinois et les producteurs des TR se sont réunis pour discuter et trouver des moyens de production et d'exportation afin de conserver les ressources minérales et protéger l'environnement. Cependant, la compétition entre les gouvernements locaux et les entreprises a entraîné une augmentation de la production. En 2010, les restrictions imposées et les quotas définis par la Chine sur les TR (Tse, 2011) a changé l'industrie mondiale de ces éléments en favorisant l'augmentation des stocks des TR, ainsi que l'augmentation de l'exploration et

du développement des gisements hors de la Chine. Ceci a mené à une nouvelle mine de production en Australie en 2011 à son complexe carbonatite à Mont Weld. D'autres projets en Australie comprennent la propriété Nolans Bore dans le Territoire du Nord et le gisement de « Dubbo Zirconia project » en Nouvelle-Galles du Sud, les deux projets étaient au stade de l'étude de faisabilité avancée (Gambogi, 2016).

### 1.2.1.3 Demande

L'accroissement continu de l'exploitation des TR dans diverses technologies comme par exemple le virage vers les véhicules hybrides de nouvelles générations, fait en sorte que la demande en TR augmente. Selon la société Lynas Corporation, la demande mondiale totale est en évolution continue. Comme le montre la Figure 1.5, la demande en TR a augmenté depuis 2012 jusqu'à 2019 et est passé de 34 000 tonnes métriques à 54 000 tonnes métriques. Selon les estimations, cette demande continuera à croître jusqu'à 2025 avec une valeur prévue de 65 000 tonnes métriques.

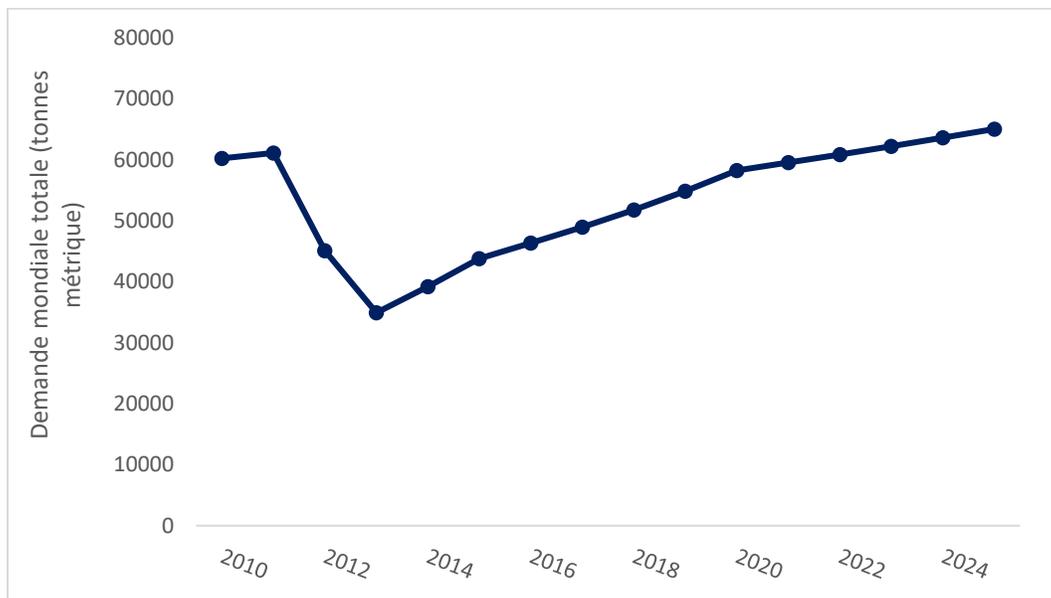


Figure 1-5: Prédiction de la demande mondiale en terre rare 2009-2025. (Hykawy, 2014).

## 1.2.2 Potentiel minier en TR au Canada

Différents projets d'exploration sont à différents stades de développement au Canada. Parmi les stades de développement, on compte l'étude de la préfaisabilité et l'évaluation environnementale. Le gouvernement a identifié 11 projets à un stade de développement avancé. Parmi ces projets, on cite les projets de Kipawa au Québec, Nechalacho aux territoires nord-ouest et Eco Ridge Mine à Ontario (Hykawy, 2014). La Figure 1.6 montre les sites potentiels de futures mines des TR au Canada. Un projet au territoire du nord de Québec (Nunavik) est indiqué sur la carte ci-dessous : Eldor (projet Ashram). Le concentré des TR exploité pour ce projet contient des TR servant à la fabrication d'aimants. La zone minéralisée primaire contient 19 % de Nd, 5 % de Pr, avec quelques quantités en Dy (0,9 %) et Tb (0,2 %) (Commerce Resources Corp, 2019). Pour le projet Kipawa localisé en Abitibi-Témiscamingue, les ressources présumées sont de 6805 millions de tonnes de TR si une teneur de 0,2 % d'oxyde de TR était exploitée. Pour cette teneur les pourcentages en oxyde de Nd ( $\text{Nd}_2\text{O}_3$ ), oxyde de Tm ( $\text{Tm}_2\text{O}_3$ ) et oxyde d'Y ( $\text{Y}_2\text{O}_3$ ) sont de 0,05, 0,0014 et 0,08 % respectivement (MATAMEC, 2013).

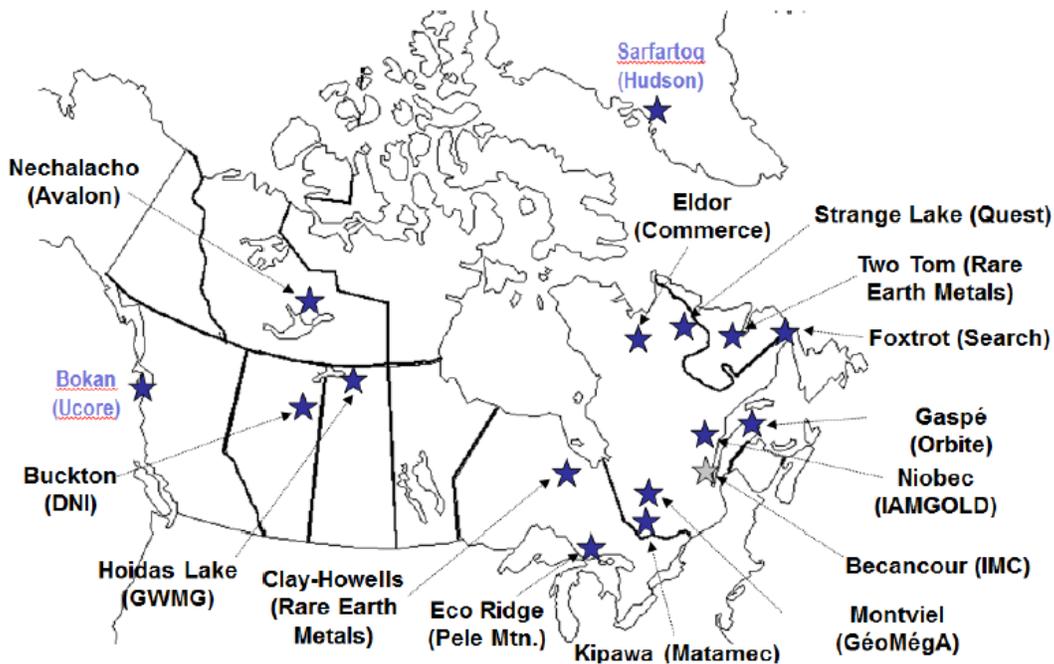


Figure 1-6: Futures mines potentielles (Natural Resources Canada, 2014).

Il existe plusieurs défis à surmonter afin d'exploiter les éléments des TR. Ces défis peuvent être techniques, et touchent la séparation, le traitement et le raffinage de TR. Les technologies peuvent être coûteuses et innovantes vu que chaque dépôt est différent de l'autre (Natural Resources Canada, 2014). Un défi économique peut se manifester lors de l'exploration étant donné que les coûts de développements peuvent être plus élevés que ceux d'une mine conventionnelle. Un autre défi lié au développement des mines de TR est la gestion des risques environnementaux. De plus, la présence des éléments radioactifs (thorium et uranium) dans certains gisements est une préoccupation courante (Natural Resources Canada, 2014).

### **1.3 Problématiques environnementales des terres rares**

Les données toxicologiques des TR sur les micro-organismes, les animaux et les plantes sont limitées. De plus, il existe peu d'informations sur les impacts environnementaux liées à l'extraction des TR. Une production antérieure des TR en Californie à Mountain Pass a débuté avant l'ère de surveillance réglementaire environnementale. Ceci explique le manque d'informations environnementales associées aux nouvelles mines. En outre, la mine chinoise à Bayan Obo, qui est la principale mine source des TR fournit des informations limitées liées aux impacts sur l'environnement (Natural Resources Canada, 2014). Quelques projets d'exploration au Canada comme celui de Nechalacho, (près de Thor lake, Territoires du Nord-Ouest, Canada), représente de nouvelles sources de données environnementales relatives aux activités courantes (Natural Resources Canada, 2014).

#### **1.3.1 La spéciation des terres rares, leur devenir et leur internalisation**

##### **1.3.1.1 Devenir des métaux et rôle des algues dans un système aquatique**

Le métal peut être adsorbé à un ligand biotique ou abiotique et / ou absorbé et assimilé par des organismes à différentes échelles trophiques. Le phytoplancton représente les producteurs primaires qui se trouvent dans la colonne d'eau et sont à la base de la chaîne trophique. Ces organismes assimilent les métaux, entre autres les TR. Ceci engendre une contamination vers tous les organismes présents dans la chaîne trophique si les algues se montrent contaminées. Par exemple, le zooplancton en se nourrissant du phytoplancton, sera contaminé. Il faut noter que le transfert trophique des métaux dépend de la partie où le métal se trouve dans la cellule. La Figure 1.7 ci-dessus

montre le devenir des métaux dans les eaux naturelles selon la phase ou la forme sous laquelle il se trouve.

La présence de la matière organique autochtone et allochtone engendre la modification de la spéciation chimique des TR vu qu'elle peut se complexer à ces éléments. Il est important d'étudier la spéciation du métal étant donné qu'elle joue un rôle dans son devenir dans le milieu.

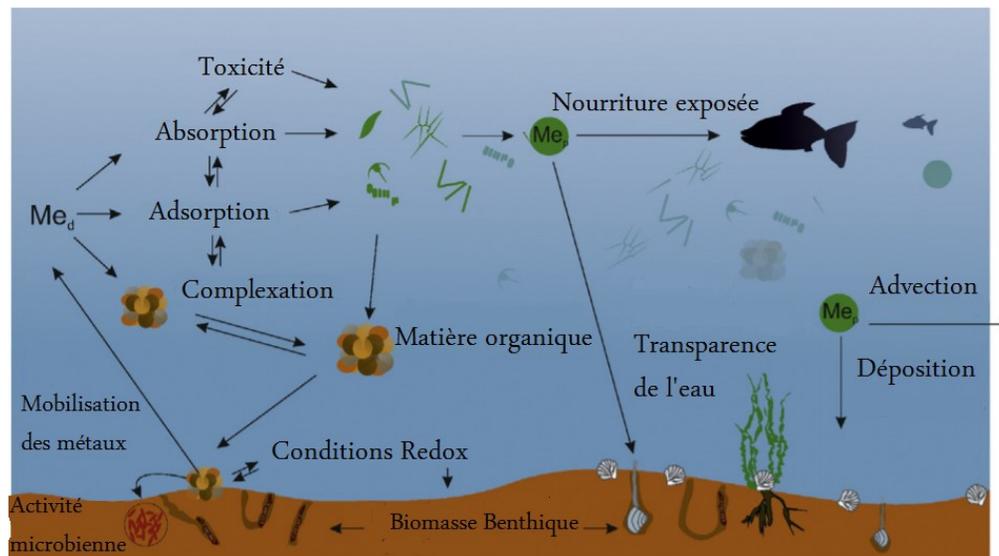


Figure 1-7: Modèle conceptuel sur le devenir des métaux (dissous  $Me_d$  et particulaire  $Me_p$ ) dans un milieu aquatique en présence de phytoplancton (de Souza Machado *et al.*, 2016).

### 1.3.1.2 Définition et importance de la spéciation

La spéciation chimique définit les formes sous lesquelles se distribue un élément chimique. Un métal peut être sous forme d'ion libre ( $M^{n+}$ ) ou complexé à un ligand inorganique ( $OH^-$ ,  $Cl^-$ ,  $F^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $S_2O_3^{2-}$ ,  $CO_3^{2-}$ ) ou organique (acides fulviques ou acides humiques) (un exemple de spéciation des lanthanides a été représenté dans le Tableau 1.2 à la section 1.3.1). La spéciation du métal est déterminée par la composition et les conditions physico-chimiques (pH, potentiel redox, force ionique, concentrations des ligands) de son milieu (Pelletier et Campbell, 2008).

La spéciation des éléments joue un rôle clé dans la mobilité, la distribution ainsi que dans la toxicité sur les différents organismes. Pour cette raison, il est primordial d'étudier la spéciation des terres rares lors de l'évaluation de leur toxicité. Par ailleurs, la biodisponibilité des éléments chimiques varie selon la forme chimique sous laquelle ils se trouvent dans un milieu aqueux (Pelletier et Campbell, 2008).

### 1.3.1.3 Modèles d'équilibre chimique

Les méthodes analytiques qui permettent de quantifier et de caractériser la composition d'un milieu et les logiciels se basant sur des calculs thermodynamiques ont permis d'établir des liens entre la spéciation des métaux, leur biodisponibilité et leurs interactions avec les organismes. Il existe des modèles d'équilibre chimique permettant de calculer les concentrations des différentes espèces chimiques sous lesquelles se trouve un élément :

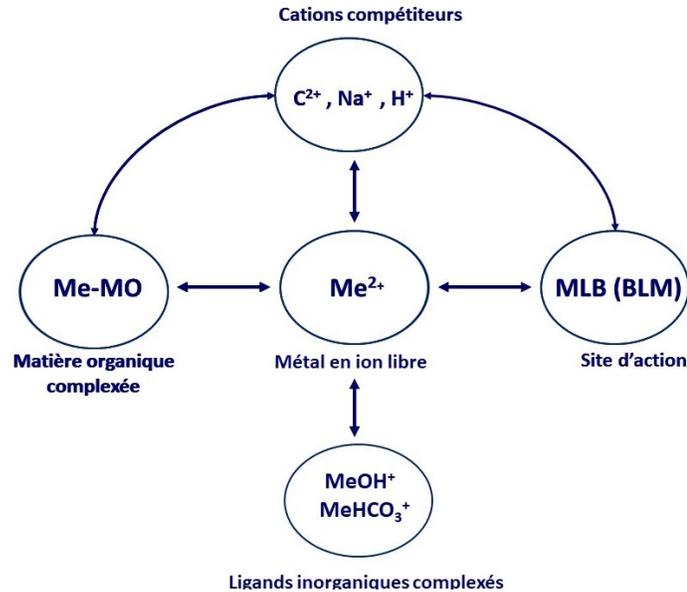
#### **Modèle d'interaction de surface de branchies (*Gill Site Interaction Model* ; **GSIM**)**

Ce modèle prend en compte que le pH et l'alcalinité qui influencent la spéciation du métal (l'effet de la matière organique dissoute n'est pas pris en compte dans ce modèle). Il envisage que la toxicité des métaux sur les poissons résulte de sa forme cationique qui se lie aux sites d'interaction anionique au niveau des branchies. Ces métaux entrent en compétition avec les cations majeurs tels que :  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ... (Pagenkopf, 1983; Niyogi et Wood, 2004).

**Modèle de l'ion libre** : des travaux ont mené à l'élaboration du modèle de l'ion libre ou **Free Ion Activity Model** (FIAM). Ce dernier se base sur le fait que la toxicité d'un métal est surtout liée à la concentration en ion libre  $\text{M}^{n+}$  (aquo-ion ou  $\text{M}(\text{H}_2\text{O})_x$ ) (Campbell, 1995; Lavoie, Campbell et Fortin, 2016). Le FIAM se focalise sur les interactions entre la forme cationique du métal et les sites de liaisons sur la membrane biologique (Niyogi et Wood, 2004). Pour ce modèle, le degré de toxicité est lié à la fraction des sites d'actions occupés par l'espèce réactive du métal.

**Modèle de ligand biotique** : Le modèle de ligand biotique (**MLB**) ou «*Biotic Ligand Model*» (**BLM**) est adapté à partir des deux modèles précédemment cités (le GSIM et le FIAM). Comme illustré dans la Figure 1.8, le BLM tient en compte de la compétition entre les ions libres du métal avec d'autres cations tel que le  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ... et de la complexation aux ligands abiotiques (matière organique dissoute, sulfures, ...) pour

se lier aux ligands biotiques au niveau du site d'action (Di Toro *et al.*, 2001; Niyogi et Wood, 2004).



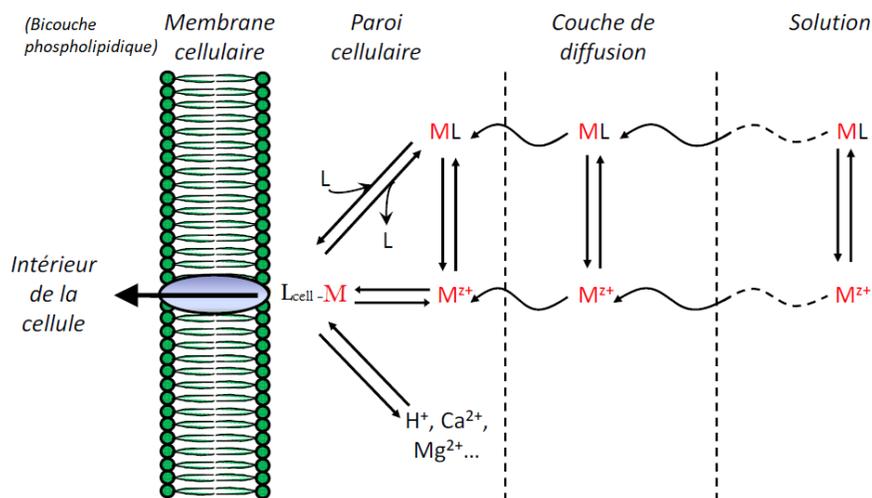
**Figure 1-8: Schéma présentant les réactions prises en compte dans le modèle du ligand biotique.**  
Adapté de (Di Toro *et al.*, 2001).

La réponse biologique à l'exposition au métal et/ou l'accumulation du métal est la résultante de l'internalisation du métal en question, qui interagit d'abord avec la membrane biologique. Le schéma de la Figure 1.9 illustre le processus suivi par le métal lors de son interaction avec un organisme aquatique :

Le métal doit en premier lieu diffuser rapidement de la solution aqueuse envers la membrane plasmique après avoir traversé, dans le cas d'une algue unicellulaire, la paroi cellulaire qui est une couche protectrice riche en polysaccharides (cellulose) contenant des sites auxquels le métal peut se lier. Le métal peut être adsorbé sur la paroi cellulaire des algues (Bræk *et al.*, 1980). De plus, avec la division cellulaire, au cours de laquelle le nombre de cellules augmente, de nouveaux sites de surface réactive seront disponibles et donc l'adsorption du métal augmentera linéairement (Fisher *et al.*, 1984). Ces sites d'interaction au sein de la paroi cellulaire sont considérés inertes, de même, il existe au niveau de la membrane plasmique des sites auxquels le métal peut également se lier sans engendrer un effet biologique.

### 1.3.1.4 Prémisses du modèle BLM

La réponse biologique n'est obtenue que lorsque le métal interagit avec un site physiologiquement actif au niveau de la membrane biologique. Parmi les sites « actifs » où la complexation d'un métal non essentiel mène à une perturbation des fonctions cellulaires, on cite : une enzyme membranaire, un transporteur protéique ou un canal ionique et une pompe échangeuse d'ions (Lavoie, Campbell et Fortin, 2016). Ce type de transport correspond à l'absorption. La densité / concentration du transporteur joue aussi un rôle dans ce mode de transport (Fisher *et al.*, 1984). L'absorption est régie par les interactions thermodynamiques entre le métal et le transporteur (Sunda et Huntsman, 1998).



**Figure 1-9 Schéma conceptuel représentant les interactions métal-organisme.** Inspiré de (Campbell, 1995). M<sup>n+</sup> : ion métallique libre; L : ligand; ML : complexe métallique; L<sub>cell</sub> : ligand biotique (site de transport dans le schéma); M-L<sub>cell</sub> : complexe métallique de surface.

Les équations décrivant le processus de liaison des métaux à la surface biologique sont présentées ci-dessous (Lavoie, Campbell et Fortin, 2016) :

Le métal M<sup>n+</sup> se lie au ligand abiotique L ; une fois que l'équilibre chimique est établi dans le milieu, on a la constante d'équilibre K<sub>1</sub> exprimée à partir de l'équation (2) :



$$K_1 = \frac{[ML]}{[M^{n+}] \times [L]} \quad \text{Équation 2}$$

De même, pour l'interaction entre le métal  $M^{n+}$  et le ligand biotique  $L_{cell}$ , à l'équilibre on peut écrire :



$$\{ML_{cell}\} = K_2 \times \{L_{cell}\} \times [M^{n+}]^1 \quad \text{Équation 4}$$

avec  $K_2$  est la constante d'affinité entre le métal et le ligand biotique

Pour en conclure que la quantité du métal d'intérêt, lié aux sites physiologiquement actifs, internalisé et/ou qui entraîne une réponse biologique est proportionnelle à la concentration en ion libre  $[M^{n+}]$ , il faut considérer les hypothèses suivantes :

- i. La concentration en sites cellulaires physiologiquement actifs  $\{L_{cell}\}$  est constante.
- ii. Les sites  $L_{cell}$  sont loin d'être saturés de métaux ( $\{L_{cell}\} \gg [M-L_{cell}]$ ).
- iii. Le temps d'exposition est court.

Le complexe ML peut aussi interagir avec le site  $L_{cell}$ , à l'équilibre on aura l'équation suivante :



$$\{ML_{cell}\} = \frac{K_3 \times [ML] \times \{L_{cell}\}}{[L]} \quad \text{Équation 6}$$

On peut écrire à partir de l'équation (2) l'équation (7) :

$$[ML] = K_1 \times [M^{n+}] \times [L] \quad \text{Équation 7}$$

Par substitution de [ML] dans l'équation (6) par l'équation (7) on obtient :

$$\{ML_{cell}\} = K_3 \times K_1 [M^{n+}] \times \{L_{cell}\} \quad \text{Équation 8}$$

---

<sup>1</sup> [ ] et { } indiquent respectivement les concentrations au niveau du milieu aqueux et à la surface biologique.

L'équation (8) est identique à l'équation (4) avec  $K_3 \times K_1 = K_2$ . Ainsi, quelle que soit l'interaction via un ligand ou non, la concentration des sites actifs liés au métal est toujours dépendante de la concentration en métal libre. En effet, la prise en charge et la toxicité des métaux sur les organismes aquatiques sont influencées par la concentration en métal sous sa forme ionique libre (Lavoie, Campbell et Fortin, 2016).

L'agence de protection environnementale (Environmental Protection Agency, EPA) aux É.-U.A se base sur le BLM pour l'évaluation du risque environnemental de certains métaux sur les organismes aquatiques. En 2007, elle l'a adopté pour élaborer les critères de qualités de la vie aquatique pour le cuivre (Office of Science and Technology et Water, 2016).

Le BLM est largement appliqué avec succès pour prédire la biodisponibilité des métaux traces divalents aux organismes aquatiques (Slaveykova et Wilkinson, 2005) mais il existe peu d'études sur son applicabilité aux métaux trivalents. En outre, il faut tenir compte qu'il existe une relation de compétition entre le métal d'intérêt et d'autres métaux sous la forme cationique présents dans le milieu afin de se lier au même site à la surface biologique (comme illustré plus haut à la Figure 1.9). Cela est pris en compte par le BLM pour prédire la biodisponibilité des métaux. L'équation 9 exprime la concentration en sites complexés tout en tenant compte des ions compétiteurs :

$$\{ML_{Cell}\} = \frac{\{ML_{Cell}\}_{max} \times K_2 \times [M^{n+}]}{1 + K_2 \times [M^{n+}] + \sum_i (K_{ci} \times [C_i])} \quad \text{Équation 9}$$

### 1.3.1.5 Modélisation des flux d'internalisation du métal

Lorsque les micro-organismes (ex. : algues) sont exposés à un métal, la concentration du métal accumulé au cours du temps (normalisée par la quantité en biomasse) ainsi que le flux internalisé (normalisé par rapport à la surface des cellules algales) sont déterminés à partir de la pente de la courbe du métal internalisé en fonction du temps de contact.

Une fois les flux d'internalisation sont déterminés, ils sont tracés en fonction de la concentration en métal dans la solution. L'équation (10) de Michaelis-Menten (utilisée dans des études de cinétique enzymatique) est utilisée pour quantifier le flux de saturation  $J_{max}$  et la constante de demi-saturation  $K_{MM}$  :

$$j_{int} = \frac{J_{max} \times [M^{n+}]}{K_{MM} + [M^{n+}]} \quad \text{Équation 10}$$

En cas de compétition avec d'autres cations présents dans la solution, le flux internalisé n'est pas exprimé en fonction de  $[M^{n+}]$  seulement, mais il faut prendre en compte l'effet protecteur des cations compétiteurs (Crémazy, 2014) selon l'équation (11) :

$$J_{int} = \frac{J_{max} \times K_M \times [M^{n+}]}{1 + K_M \cdot [M^{n+}] + \sum_i K_{Ci} \cdot [C_i]} \quad \text{Équation 11}$$

Où  $K_{Ci}$  et  $K_M$  correspondent aux constantes d'équilibre du cation  $C_i$  et du métal  $M$  avec le site de surface  $L_{cell}$ .

### 1.3.2 Les apports et les concentrations en TR dans les milieux naturels

La moyenne d'abondance crustale des lanthanides combinés est de 146,4 ppm; l'abondance de l'yttrium est de 22 ppm. La concentration moyenne des lanthanides dans les sols est similaire à la moyenne d'abondance crustale de ces éléments (Schulz, DeYoung, Seal, & Bradley, 2018).

La concentration moyenne dissoute en TR dans la mer est de  $0,15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Elderfield *et al.*, 1988). La spéciation des TR dans l'eau de mer est dominée par les complexes carbonates et la proportion de chaque TR complexée au ligand carbonate augmente avec l'augmentation du nombre atomique. Par contre, la concentration en ion libre diminue avec l'augmentation de ce nombre (comme discutée à la section 1.1.1). Le Tableau 1.2 montre les concentrations de chaque spéciation des TR dans l'eau de mer. Dans les rivières, les concentrations en TR sont de  $1,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en moyenne (Elderfield *et al.*, 1988).

Tableau 1-2: Spéciation des TR dans l'eau de mer (Elderfield *et al.*, 1988). Les espèces sont présentées en pourcentage d'ion dissous <sup>a</sup>

TR	Z	[TR <sup>3+</sup> ]	TR(OH) <sup>2+</sup>	TR(F) <sup>2+</sup>	TR(SO <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	TR(CO <sub>3</sub> ) <sup>+</sup>	TR(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>-</sup>
<b>La</b>	57	6,7	0,9	0,2	2,8	66,1	20,3
<b>Ce</b>	58	5,1	1,2	0,3	2,4	65,1	23,0
<b>Pr</b>	59	4,0	1,3	0,2	2,1	64,4	26,2
<b>Nd</b>	60	3,1	1,3	0,2	1,7	62,7	29,6
<b>Pm</b>	61	_____	_____	_____	_____	_____	_____
<b>Sm</b>	62	1,9	1,1	0,1	1,2	57,7	37,1
<b>Eu</b>	63	1,6	1,1	0,1	0,8	54,5	41,1
<b>Gd</b>	64	1,2	0,9	0,1	0,7	51,1	45,4
<b>Tb</b>	65	1,0	0,7	0,1	0,6	47,3	49,8
<b>Dy</b>	66	0,8	0,6	0,1	0,5	43,3	54,3
<b>Ho</b>	67	0,7	0,5	0,1	0,3	39,3	58,8
<b>Er</b>	68	0,6	0,8	0,1	0,3	35,1	62,9
<b>Tm</b>	69	0,5	0,9	0,0	0,3	31,1	67,1
<b>Yb</b>	70	0,4	0,7	0,1	0,2	27,2	71,2
<b>Lu</b>	71	0,3	1,3	0,1	0,1	23,5	74,7

<sup>a</sup> Pour l'eau de mer : [CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>] = 1.39 x 10<sup>-4</sup> M (TCO<sub>2</sub> = 2.3 x 10<sup>-3</sup> M, pH = 7.90).

L'augmentation de l'extraction des TR à partir des minerais fait en sorte qu'ils se retrouvent dans l'environnement proche des sites miniers et dans leurs déchets. Des études effectuées sur des eaux acides collectées de sites miniers aux É.-U.A ont trouvé des concentrations élevées en TR entre 0,45 et 161  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Verplanck *et al.*, 2001). Sous les conditions de drainage minier acide -qui ne sont pas liées aux mines des TR- avec un pH égal à 1,1, les concentrations dissoutes en TR peuvent atteindre 2,50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Seal *et al.*, 2008; Schulz, DeYoung, Seal, & Bradley, 2018). D'autres études portant sur la pollution atmosphérique montrent que des teneurs en TR et d'autres éléments sont plus élevées à Beijing, en Chine qu'aux Pays-Bas (ville de Delft). La combustion du charbon a été prise en compte comme facteur contribuant aux teneurs atmosphériques en TR en Chine (Wang *et al.*, 2001). L'augmentation de l'utilisation des TR dans différentes technologies et leur emploi par le secteur agricole dans les engrais peuvent être une source possible de contamination des systèmes environnementaux. Les TR, en se rajoutant dans les sols agricoles par le biais des engrais, peuvent se retrouver dans les différentes parties des plantes. Parmi les types de fertilisants, on cite le «Changle» (nitrates), le «Nongle» (chlorures et oxydes) et le «MAR» (complexes avec les acides aminés). Dans une étude menée par (Zhang et Shan, 2001), le blé *Triticum aestivum* L. a été exposé à l'engrais «Changle» contenant du Ce, La, Nd et Pr. Pour une concentration en fertilisant de 80  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de sol, la concentration en Nd était de 1,5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dans la tige de la plante et 9,5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dans les racines. Vu la progression de l'utilisation de ces éléments dans divers produits et la possibilité de l'augmentation de leurs concentrations dans les écosystèmes, des questions se posent sur leurs accumulations et la toxicité qu'ils peuvent avoir sur les différents organismes.

### **1.3.3 Accumulation et toxicité des terres rares sur les organismes**

#### **1.3.3.1 Les TR et les plantes**

L'utilisation des engrais fertilisants contenant une teneur élevée en TR est une pratique courante, surtout en Chine (Pagano, 2017). Cela pousse les chercheurs à étudier les modalités d'absorption, d'accumulation et d'action des TR chez les végétaux supérieurs. Par exemple, une étude sur les lichens *Xanthoria parietina* exposé au Ce (0,1 mM, 1 mM, 10 mM et 100 mM) a montré une bioaccumulation extra et intracellulaire de ce métal causant une toxicité aiguë marquée par une diminution de la performance photosynthétique (Paoli *et al.*, 2014).

Les données concernant l'effet des TR sur les grains et leur germination sont contradictoires. Dans une étude récente (2014), l'effet du La, Ce et Y sur la vitesse de germination de quelques espèces a été rapporté. À pH élevé, le La et le Ce n'ont pas d'impact sur la germination des espèces testées. En revanche à pH faible, des effets négatifs sur la germination ont été notés pour les espèces suivantes : *Asclepias syriaca*, *Panicum virgatum*, *Raphanus sativus*, et *Solanum lycopersicum*. L'Y a affecté négativement la germination de *Desmodium canadense* et *S. lycopersicum* (Thomas et al., 2014). Dans la même étude, l'effet sur la croissance des deux espèces *A. syriaca* et *D. canadense* est aussi rapporté, les concentrations efficaces causant 10% et 25% d'inhibition sont présentées dans le Tableau 1.3.

En contrepartie, une augmentation de la germination des grains a été observée dans une autre étude avec *Phaseolus vulgaris* (haricot) (Pagano, 2017) exposé aux TR. En outre, le taux de germination chez les grains de riz *Oryza sativa* a augmenté lorsque cette espèce est exposée à des concentrations en nitrate de cérium de 10-15 µg/mL (Fashui, 2002). Le même auteur a rapporté que le traitement au La à des concentrations de 500 µg/g a amélioré la germination du riz. Cela peut être expliqué par les propriétés du Ce et La qui sont similaires au calcium. Ces deux lanthanides ont donc un mécanisme d'action similaire au Ca : maintenance de la stabilité et de l'intégrité de la membrane plasmique et retardation du vieillissement engendré par les radicaux libres. Toutefois cela ne prouve pas que les lanthanides sont des éléments essentiels pour les plantes (Fashui, 2002). Malgré l'évolution des études sur l'effet des TR sur les plantes, la phytotoxicité reste mal comprise.

**Tableau 1-3 : Résumé de l'effet de trois TR sur la croissance de deux espèces canadiennes natives.** (Thomas *et al.*, 2014). CE10 et CE25 (en mg·kg<sup>-1</sup> sol sec ) représentent les concentrations des métaux auxquelles il y a 10% et 25 % de réduction de biomasse par rapport au témoin sans traitement; AS pour *A. syriaca* et DC pour *D. canadense*.

	AS	DC
Lanthane		
CE10	91,4	132,4
CE25	201,4	301,3
ANOVA (P value)	0,001	0,003
Yttrium		
CE10	95,8	33,7
CE25	257	109,4
ANOVA (P value)	0,001	0,001
Cérium pH élevé		
CE10	54,6	165,9
CE25	252,6	213
ANOVA (P value)	0,001	0,001
Cérium pH faible		
CE10	119	67,2
CE25	196,7	145,6
ANOVA (P value)	0,001	0,001

### 1.3.3.2 Les TR et les micro-organismes

Plusieurs espèces microbiennes ont été identifiées comme résistantes aux concentrations élevées en TR présents dans leur environnement. Des effets stimulants et inhibiteurs ont été rapportés en fonction des concentrations en lanthanides et sous des conditions de laboratoires (Pagano, 2017). Cela suggère que l'augmentation des concentrations des TR dans l'environnement peut modifier l'équilibre des populations microbiennes.

Dans une étude, les effets inhibiteurs de croissance des champignons ont été détectés avec des tests sur plaque où le La ou un mélange de TR (La, Ce, Pr, Nd et Gd) a été ajouté à des concentrations de plus de 100 mM. Dans un milieu de culture liquide, l'inhibition de croissance de *Trichoderma atroviride* et de *T. harzianum* est obtenue à des concentrations de La ou mélange en TR variant de 1 à 10 mM (D'Auino *et al.*, 2009).

Les résultats de Wenhua (Wenhua *et al.*, 2003) ont montré que le traitement avec La<sup>3+</sup> stimule le métabolisme (endogène et exogène) d'*Escherichia coli* à des concentrations de 50 à 150 mg·L<sup>-1</sup>. Une autre étude menée par Ruming (Ruming *et al.*, 2000) a montré qu'à des concentrations en ion libre du La allant jusqu'à 400 mg·L<sup>-1</sup> la croissance

d'*E. Coli* est stimulée, au-dessus de  $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  une inhibition de croissance est notée. Ces observations ont été expliquées de la même logique que pour les plantes : l'endommagement cellulaire chez *E. coli* est dû au remplacement des ions du calcium par ceux du La (ou Ce) au niveau du site de liaison, en raison de la similarité de leurs rayons ioniques et de la même affinité au ligand (Peng *et al.*, 2004)

### 1.3.3.3 Les TR et les algues

La toxicité des TR sur les organismes aquatiques reste peu étudiée. Les algues (micro et macro) sont considérées comme des organismes sensibles. Les concentrations en TR dans des algues brunes échantillonnées de la côte de Niigata, une préfecture au Japon, ont été quantifiées afin d'étudier le comportement de ces métaux chez les organismes marins (Sakamoto, Kano et Imaizumi, 2008). La biosorption et la bioaccumulation de ces éléments a été étudiée chez ces mêmes organismes. Dans cette étude, les concentrations des TR (La, Eu, and Yb) sont ordonnées selon l'organe au niveau de la macroalgue *Sargassum hemiphyllum* comme suit : « branche principale » > « feuille » > « vésicule ». Le comportement d'adsorption était similaire entre les trois lanthanides avec une capacité d'adsorption différente entre eux selon l'ordre suivant :  $\text{Eu} \geq \text{La} > \text{Yb}$ . Cela peut être dû à la différence des coefficients de distribution ainsi qu'à l'affinité de la biomasse à ces lanthanides (Sakamoto, Kano et Imaizumi, 2008).

Dans le même contexte, Birungi et Chirwa ont investigué l'adsorption et la désorption du La sur les cellules algales. Les résultats ont montré que *Desmodesmus multivariabilis* produit la meilleure performance comme adsorbant avec une capacité maximale d'accumulation de La de  $100 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  et une forte affinité  $4,55 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}$  (paramètres de Langmuir). *Chlamydomonas reinhardtii* a une meilleure capacité de sorption avec une valeur de  $143 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  mais avec une faible affinité de  $0,25 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}$  (Birungi et Chirwa, 2014).

D'autres études ont été réalisées dans le but d'investiguer si les TR peuvent remplacer les éléments essentiels. Une étude a été effectuée sur une microalgue d'eau douce *Desmodesmus quadricauda* où cette algue était exposée à des concentrations faibles en lanthanides (Ce ou Eu ou Gd ou La ou Nd) sous des conditions de stress de métal (faible concentration en Mg ou en Ca). Les résultats de cette étude montrent que les conditions de stress nutritifs réduisent la croissance ainsi que la photosynthèse et l'ajout

de faibles concentrations en TR a un effet stimulant sur les microalgues (Goecje *et al.*, 2015).

Tai *et al.* ( 2010) ont testé la toxicité de 13 lanthanides, séparément, et mélangés, sur une algue marine unicellulaire *Skeletonema costatum*. La CE50 à 96 h pour le mélange des lanthanides est de  $29,04 \pm 0,61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Des résultats similaires ont été obtenus chez *Chlorella autotrophica* avec une CE50 de mélange de 12 lanthanides de  $29,00 \pm 0,50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  après 96 h d'exposition à 25 °C (Su *et al.*, 2005).

À l'INRS, dans le laboratoire de métaux traces du professeur Claude Fortin, la toxicité aiguë (à court terme) et chronique (à long terme) des métaux a été étudiée sur les microalgues vertes telles que *Chlorella fusca*, *C. reinhardtii* et sur des diatomées. Une étude sur *C. fusca* exposée aux lanthanides (Ce ou La) à long terme (120 h) et à pH = 5,5 a été menée par Beaubien (2015) et ce en absence des phosphates qui ont une forte affinité avec les TR. L'étude a montré que la caractérisation du milieu d'exposition est très importante lors des tests de toxicité vu que les résultats des CE50 en présence des tampons (tel que l'acide malique) ont été différentes qu'en son absence (Beaubien, 2015). De même l'étudiant Singing a exposé la même espèce d'algue aux lanthanides (La ou Ce) en présence de  $5 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de phosphore organique qui ne cause pas la complexation de ces métaux (Singing, 2017). Les résultats ont démontré -de même que l'étude précédente de Beaubien- que la nature chimique du milieu d'exposition est d'une importance indéniable lors des tests de toxicité sur les algues (Singing, 2017). Dans les deux études, un effet d'hormèse caractérisée par une amélioration de la croissance cellulaire à de faibles concentrations en cérium.

Une étude ultérieure réalisée par Rahal (2018) a intégré l'effet de la matière organique naturelle (MON) (SRHA : *Suwannee River Humic Acid*) où elle a caractérisé la spéciation du lanthane en présence de différentes concentrations en MON et a évalué la toxicité des lanthanides en présence de cet acide humique. Cette étude a suggéré une toxicité plus importante en présence de SRHA qu'en son absence. Un tableau comparatif entre les deux premières études résume les valeurs de CE50 est présenté ci-dessous (Tableau 1.4). Une partie des résultats de Rahal est présentée au niveau du Tableau 1.5.

**Tableau 1-4: Les valeurs des CE50 de deux lanthanides sur *C. fusca* obtenues au laboratoire du Prof. Fortin à l'INRS.**

1<sup>re</sup> étude en absence de phosphore, 2<sup>e</sup> étude en présence du phosphore organique. Tableau établi à partir des données de (Beaubien, 2015) et (Singing, 2017); ND: donnée Non Disponible. Les  $\pm$  représentent les écarts-types et les [ ] indiquent les intervalles de confiance à 95 %,

		1 <sup>re</sup> étude (Beaubien, 2015)	2 <sup>e</sup> étude (Singing, 2017)
		CE50 (nM)	
En absence de tampon	[La] mesurée	490 $\pm$ 70	570 [190 -1050]
	[La <sup>3+</sup> ]	430 $\pm$ 60	280 [60-630]
	[Ce] mesurée	190 $\pm$ 70	530 [430-670]
	[Ce <sup>3+</sup> ]	170 $\pm$ 60	160 [90-250]
En présence de 10 <sup>-4</sup> nM d'acide malique	[La] mesurée	3 800 $\pm$ 500	360 [140-780]
	[La <sup>3+</sup> ]	260 $\pm$ 30	ND
	[Ce] mesurée	6000 $\pm$ 1000	3900 [2010- 6750]
	[Ce <sup>3+</sup> ] libre	270 $\pm$ 60	100 [30- 200]

**Tableau 1-5: Valeurs calculées des CE50 de La pour l'algue *Chlorella fusca* après 120 h d'exposition pour des concentrations d'acide humique de 0, 1, 2 et 3 mg C/L (Rahal, 2018).**

CE50	[SRHA] (mg C/L)	0	1	2	3
	[La] mesuré (nM)		611 $\pm$ 150	529 $\pm$ 81	364 $\pm$ 18

#### 1.4 Objectifs de la recherche

Le manque d'informations à propos des effets des TR sur l'écosystème empêche l'évaluation adéquate de leurs risques potentiels sur l'environnement aquatique. L'investigation de l'impact de ces éléments sur la réponse biologique d'une algue verte *C. fusca* fut l'objectif de plusieurs études au sein de notre laboratoire depuis quelques années. En continuité de ces travaux, le présent projet s'intéresse à l'impact des trois TR Nd, Tm et Y (ces éléments font partie des TR potentiellement exploitées dans divers domaines industriels comme détaillé dans la section 1.1.3.) sur la réponse biologique non seulement de *C. fusca* mais aussi d'une autre algue : *C. reinhardtii*. Ceci permet de comparer d'une part les effets des TR choisies entre eux (TRLE et TRLO) et aux effets lanthanides étudiés précédemment (Ce et La) et d'autre part la comparaison entre la

réponse de ces deux espèces phytoplanctoniques. Ces travaux sont réalisés en présence de POD pour éviter la précipitation des métaux d'intérêt.

Puisque les TR coexistent dans l'environnement, nous avons opté d'évaluer la toxicité d'un mélange de Nd et Tm sur l'algue verte *C. reinhardtii*.

Les objectifs de cette maîtrise consistaient à :

- Vérifier l'efficacité de la substitution du phosphore inorganique par celui organique.
- Évaluer la toxicité d'une TR légère (Nd) et de deux TR lourdes (Tm et Y) et comparer entre les deux groupes.
- Comparer les réponses biologiques des deux espèces des microalgues.
- Évaluer l'effet de la présence d'une TRLE sur le flux d'une TRLO et étudier l'effet toxique de ce mélange sur *C. reinhardtii*.

Les hypothèses liées à ces objectifs sont : i) le POD peut être utilisé par les deux espèces d'algues pour effectuer ces études évitant la précipitation des TR et permettant aux algues de se développer ; ii) les TRLO sont plus toxiques que les TRLE ; iii) les deux espèces n'ont pas la même sensibilité aux TR ; et iv) les TR en mélange ont un effet additif.

Des différences seraient probablement observées entre la réaction biologique des deux espèces dans des conditions d'exposition similaires vu que chaque algue peut avoir ses propres mécanismes de défense. Dans ce cas, il faudrait trancher de la significativité de ces différences. En ce qui concerne la contamination métallique avec deux TR, nous croyons qu'une compétition aurait lieu entre les deux éléments suggérant l'existence d'un site commun pour le transport des TR.

## CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Modèle de spéciation chimique :

Afin d'estimer la concentration en métal libre pour chaque expérience, des simulations ont été réalisées à l'aide de version 5.0 du programme MINEQL+. Ce logiciel a permis de calculer la spéciation des métaux en se basant sur la composition ainsi que la concentration de chaque composant présent dans le milieu. Les constantes thermodynamiques utilisées dans ce modèle sont mises à jour continuellement dans le laboratoire du Pr. Fortin. Elles proviennent de la banque de données NIST (*National Institute of Standards and Technology*). Le tableau résume les constantes thermodynamiques utilisées avec le logiciel MINEQL+ pour le calcul de la forme des trois métaux : Nd, Tm et Y.

Tableau 2-1 Constantes de formation de complexes avec le Tm, le Nd et l'Y.

Complexe formé	log $\beta$	Complexe formé	log $\beta$	Complexe formé	log $\beta$
Tm(SO <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	3,59	Nd(SO <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	3,66	Y(SO <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	3,48
Tm(CO <sub>3</sub> ) <sup>+</sup>	7,930	Nd(CO <sub>3</sub> ) <sup>+</sup>	7,530	Y(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> <sup>-</sup>	5,20
Tm(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>-</sup>	13,830	Nd(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>-</sup>	12,730	Y(OH) <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	-7,70
Tm(EDTA) <sup>-</sup>	21,760	Nd(EDTA) <sup>-</sup>	19,08	Y(OH) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	-16,40
TmOH <sup>2+</sup>	-7,81	NdOH <sup>2+</sup>	-8,33	Y <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub> <sup>4+</sup>	-14,20
				Y <sub>3</sub> (OH) <sub>5</sub> <sup>4+</sup>	-31,6
				YCO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	7,48
				Y(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>-</sup>	12,63
				YHCO <sub>3</sub> <sup>2+</sup>	12,65
				YEDTA <sup>-1</sup>	20,66
				YCl <sup>2+</sup>	0,58

### 2.2 Choix des microorganismes :

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques vivant dans des eaux marines ou dulcicoles. Elles peuvent être procaryotes (les cyanobactéries) ou

eucaryotes. Ces dernières se distinguent en plusieurs groupes comme : les microalgues brunes, rouges et vertes. Ces microorganismes jouent un rôle important dans l'écosystème : ce sont les producteurs primaires. Ainsi leur contamination pourrait avoir un effet sur le reste de la chaîne trophique. D'où vient l'importance d'étudier la toxicité des métaux sur ce maillon alimentaire. L'intérêt de l'utilisation des microalgues dérive de la considération de la sensibilité de ces organismes dans le processus d'élaboration des recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement (RCQE) du conseil canadien des ministres de l'environnement (CCME). Aussi la manipulation de ces microorganismes est aisée dans les laboratoires : un organisme peu compliqué, qui a besoin d'une source lumineuse, de sels minéraux et du dioxyde de carbone pour sa croissance. Dans notre projet nous étudions deux espèces micro-algales vertes unicellulaires. Les souches utilisées proviennent du Canadian Phycological Culture Centre (CPCC) à l'université de Waterloo.

### 2.2.1 *Chlorella fusca*

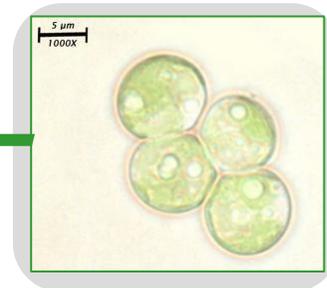
La 1<sup>ère</sup> souche à l'étude dans ce projet est *Chlorella fusca* var. *vacuolata* (Shihira et Krauss, 1965) (CPCC#89).

**Nom** : *Chlorella fusca vacuolata*  
(ayant une vacuole importante pour la gestion de l'eau et des sels minéraux et un chloroplaste important pour la photosynthèse).

**Découverte** : par Dr Emerson en 1923 à Philadelphie .

**Forme** : ellipsoïdale / sphérique.

**Mesure** : 5,5 à 12 µm (longueur)  
3,5 à 11 µm (largeur)



La reproduction de cette souche est asexuée se réalisant par mitose précédée par la duplication de l'ADN durant l'interphase et qui se finit par la division cellulaire. Dans un travail effectué dans l'équipe du professeur Fortin à l'INRS, cette algue est testée sous

des conditions de stress intense, en absence du phosphore (P). En effet, les ions phosphates  $PO_4^{3-}$  ont une faible solubilité en présence de terres rares. Ceci peut engendrer la précipitation des TR ce qui complique l'investigation de la toxicité des métaux d'intérêt. L'algue verte *C. fusca* a pu croître dans un milieu de culture inorganique dépourvu de P pendant une période de 5 jours (Beaubien, 2015). Aussi cette algue est trouvée tolérante au milieu relativement acide (Parent, 1991). *Chlorella fusca* fût l'objet de plusieurs études au sein de l'équipe du Pr. Fortin et a été exposée aux lanthanides (Ce et La) et d'autres métaux trivalents tel que l'aluminium Al. Ceci en fait un organisme d'intérêt au cours de notre projet avec les TR bien que cette espèce ne soit pas isolée à partir des eaux canadiennes.

### 2.2.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

Une deuxième algue a été sélectionnée dans ce projet : *Chlamydomonas reinhardtii*. C'est un organisme modèle très utilisé expérimentalement pour la biologie cellulaire et moléculaire. La souche utilisée lors des expériences est *Chlamydomonas reinhardtii* Dang (CPCC11). *C. reinhardtii* est beaucoup étudiée au sein de l'équipe du Pr. Fortin : dans le cas d'argent (exposition à court terme) (Fortin et Campbell, 2000), notamment dans l'investigation de la relation entre la composition du milieu, la spéciation et la biodisponibilité de l'uranium (Fortin, *et al.*, 2004), des éléments du groupe platine (Rioux, 2018) et du chrome (Aharchaou *et al.*, 2017).

**Nom** : *Chlamydomonas Reinhardtii*

**Découverte** : par Dr Dangeard (d'où le nom).

**Diamètre** : 5-10\*  $\mu\text{m}$

**Milieu** : eau douce, saumâtre, sols.

**Mode** : Mixotrophe



(Roy, 2009)

\*(Sasso *et al.*, 2018)

### 2.2.3 Entretien des cultures algales

Afin d'assurer un bon état physiologique des algues, ces microorganismes étaient repiqués chaque deux semaines. Le transfert s'effectuait en milieu stérile, c'est-à-dire près d'une flamme sous une hotte à flux laminaire, afin d'empêcher la contamination bactérienne des cultures. Lors du transfert, 3 mL de la culture algale précédente étaient ajoutés à 100 mL de milieu de culture MHSM-2 stérile (la composition du milieu est donnée plus bas). La culture des algues a été effectuée dans des erlenmeyers en verre borosilicaté de 250 mL préalablement autoclavés. Les erlenmeyers étaient placés sur une plaque agitatrice (60 rotations par min) à l'intérieur d'une chambre de croissance (Convion CMP4030) dont la température et la luminosité étaient gardées constantes, soit  $20,0 \pm 0,1$  °C pour la température et  $80 \pm 10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (éclairage fluorescent blanc froid) pour la luminosité. La photopériode était de 24 h et l'éclairage était permanent durant cette période. L'absence de bactéries dans les cultures était vérifiée de façon mensuelle par une incubation des algues sur un gel d'agarose à 30 °C.

## 2.3 Milieux utilisés et réactifs

### 2.3.1 Composition du milieu de culture, de rinçage et d'extraction

À l'université de Waterloo, les deux espèces algales ont été cultivées dans un milieu riche en nutriments : le BBM modifié (Bold's Basal Medium). À la réception de l'inoculum, on prépare un duplicata de culture à un ratio de 1:10 (par exemple 5 mL d'algues dans 50 mL de notre milieu de culture). Un volume d'inoculum peut être conservé à 4°C pour 6 à 12 mois. Cette phase de transfert constitue l'adaptation des algues dans notre milieu. Une fois on obtient une densité cellulaire similaire au premier inoculum reçu, on peut utiliser le duplicata pour le prochain repiquage.

Le milieu de culture utilisé au cours des travaux de notre équipe pour la croissance des algues est un milieu synthétique modifié, le MHSM-1 (*Modified High Salt Medium*). Ce milieu contient du phosphore inorganique dissous (PID). Le milieu de culture utilisé pour nos expériences d'exposition des algues aux TR est le MHSM-2 où le phosphore inorganique a été substitué par une source de phosphore organique dissous (POD), le  $\beta$ -glycérol phosphate. Cette substitution a pour but de réduire la complexation et la précipitation des TR ayant une grande affinité pour le phosphore inorganique. Des études précédentes ont été effectuées lors des travaux de maîtrise par Singing (Singing,

2017) et qui a vérifié l'efficacité de cette substitution. La concentration de POD choisie pour cette étude est de  $25 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Il faut noter que le P constitue un élément nutritif important pour la croissance des microorganismes notamment pour les microalgues. Une concentration élevée en ce nutriment peut cependant entraîner une eutrophisation et une détérioration des cours d'eaux naturelles. C'est pour cette raison que les autorités gouvernementales établissent des exigences relatives aux rejets en P dans les réseaux d'égouts ( $\text{Pt} < 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ainsi que dans les cours d'eau ( $\text{Pt} < 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Toutes les solutions intermédiaires étaient autoclavées à une température de  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  et sous une pression maximale de 2,5 bars (sauf celle des micronutriments (solution AAP)).

**Tableau 2-2 : Composition des solutions stocks et quantités ajoutées pour la préparation d'un litre de milieu de culture MHSM-2.**

	Solution intermédiaires	Composition	Masse par litre	Volume prélevé
MHSM-2	β-glycérol phosphate	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	36 g·L <sup>-1</sup> (0,20 M)	250 µL
	Ammonium	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	15,00 g·L <sup>-1</sup>	5 mL
		MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,00 g·L <sup>-1</sup>	
		Ca(NO <sub>3</sub> )·4H <sub>2</sub> O	3,20 g·L <sup>-1</sup>	
	Nitrate de potassium	KNO <sub>3</sub>	101,1 g·L <sup>-1</sup>	4 mL
Tampon	MES Monohydrate (10 <sup>-2</sup> )	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S	21,32 g·L <sup>-1</sup>	100 mL
		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	186 mg·L <sup>-1</sup>	
		MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	415 mg·L <sup>-1</sup>	
		FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	160 mg·L <sup>-1</sup>	
	AAP (Algal Assay Procedure)	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	300 mg·L <sup>-1</sup>	1 mL
	Micronutriments	Zn 1 g/L	1,59 mg·L <sup>-1</sup>	
		Co 1 g/L	0,64 mg·L <sup>-1</sup>	
		Mo 1 g/L	2,88 mg·L <sup>-1</sup>	
		Cu 1 g/L	4,47 µg·L <sup>-1</sup>	
Ajustement de pH	Hydroxyde de sodium	NaOH	0,4 g·L <sup>-1</sup>	Variable*
Métaux d'exposition	Nd		1,00 g·L <sup>-1</sup>	
Étalon ICP (SCP science).	Tm		1,00 g·L <sup>-1</sup>	Variable
	Y		1,00 g·L <sup>-1</sup>	

\*environ 800 µL par 1 L de milieu de culture.

### 2.3.2 Préparation des milieux et matériel utilisé

À partir des solutions intermédiaires; les milieux de culture, d'exposition et de rinçage ont été préparés avec de l'eau ultrapure ayant une résistivité de 18 M $\Omega$ ·cm et dans des fioles jaugées en polycarbonates. Chaque solution (Tableau 2.2) a été filtrée sur une membrane Millipore en polycarbonate ayant une porosité de 0,2  $\mu$ m sauf celle du NaOH qui a été filtrée sur une membrane en PES (polyéthersulfone) également d'une porosité de 0,2  $\mu$ m. Les solutions préparées étaient toujours conservées à 4°C à l'obscurité. Les bouteilles utilisées étaient en polypropylène (PP), en polycarbonate (PC) ou en verre, qui sont des matériaux autoclavables.

Le matériel utilisé était trempé dans l'acide nitrique HNO<sub>3</sub> à 10 % pendant 48 h, puis rincé cinq fois avec de l'eau déminéralisée et quatre fois avec de l'eau ultrapure. Par la suite le matériel était mis sous hotte à flux laminaire. La surface de cette hotte à flux destinée au séchage ainsi que celle de la hotte biologique étaient nettoyées à l'alcool. Les expériences d'exposition étaient réalisées dans des erlenmeyers de 250 mL en polycarbonate Nalgene™. Tout le matériel était nettoyé de la même manière, et autoclavé à une température de 121 °C pendant une quinzaine de minutes afin d'effectuer des repiquages et d'avoir des cultures axéniques puisque toute contamination bactérienne peut biaiser les résultats de nos expériences d'exposition.

Pour préparer un litre de milieu de culture on ajoute 5 mL de la solution Ammonium, 250  $\mu$ L de la solution phosphore organique ( $\beta$ -glycérol phosphate) et 4 mL de KNO<sub>3</sub> dans un volume d'eau ultrapure ; les compositions des solutions sont détaillées dans le Tableau 2.2. Afin de maintenir un pH constant du milieu égale à 5,00, 100 mL du tampon 2-(N-morpholino) ethanesulfonate (MES ; 10 mM) ont été ajoutés pour obtenir une concentration finale de 1,0 mM MES. À ce pH, les métaux d'intérêts sont peu complexés. On complète avec de l'eau ultrapure et on ajuste le pH. Chaque milieu était autoclavé selon un cycle de 15 minutes de stérilisation et à une température de 121°C. Après 24 h de refroidissement sous la hotte biologique, 1 mL de la solution des oligoéléments (AAP) a été ajouté à chaque litre.

Le Tableau 2.3 indique les volumes prélevés pour préparer le milieu d'exposition (de même composition que celui de culture décrit au Tableau 2.2) et celui de rinçage. Pour les expositions, les volumes des métaux ont été ajoutés à chaque 100 mL dans l'erlenmeyer pour obtenir la concentration désirée. Un exemple est montré dans le Tableau 2.4.

**Tableau 2-3 : Volumes de solutions intermédiaires utilisés pour la préparation des milieux de rinçage et d'exposition par 1 L.**

	Milieu de rinçage	Milieu d'exposition
<b>Ammonium</b>	5 mL	5 mL
<b>Nitrate de potassium</b>	4 mL	4 mL
<b><math>\beta</math>-glycérol phosphate</b>	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L
<b>MES</b>	100 mL	100 mL
<b>AAP</b>	-	1 mL
<b>NaOH</b>	variable	variable

**Tableau 2-4: Exemples de prélèvement des volumes à partir des solutions contenant le métal d'intérêts**

<b>Métal (masse molaire)</b>	<b>Concentration nominale désirée (nM)</b>	<b>Solution stock 1 g·L<sup>-1</sup></b>	<b>Solution mère S dilution : <math>\times 100</math></b>	<b>Volume prélevé à partir de S (<math>\mu</math>L)</b>
Nd (144,24 g·mol <sup>-1</sup> )	600 nM	$6,93 \times 10^{-3}$ M	$6,93 \times 10^{-5}$ M	865
Thulium (168,93 g·mol <sup>-1</sup> )	500 nM	$5,92 \times 10^{-3}$ M	$5,92 \times 10^{-5}$ M	845
Yttrium (88,9 g·mol <sup>-1</sup> )	400 nM	$1,12 \times 10^{-2}$	$1,12 \times 10^{-4}$ M	533

**Tableau 2-5: Concentrations des espèces dans le milieu de culture et d'exposition**

<b>Entité chimique</b>	<b>Concentration (mol·L<sup>-1</sup>)</b>
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	$3,01 \times 10^{-6}$
<b>Mn</b>	$2,10 \times 10^{-6}$
<b>Cl</b>	$5,97 \times 10^{-6}$
<b>Fe</b>	$5,92 \times 10^{-7}$
<b>Na</b>	$8,00 \times 10^{-5}$
<b>Co</b>	$1,09 \times 10^{-8}$
<b>Zn</b>	$2,43 \times 10^{-8}$
<b>Mo</b>	$3,00 \times 10^{-8}$
<b>Cu</b>	$7,03 \times 10^{-11}$
<b>EDTA</b>	$8,06 \times 10^{-7}$
<b>NH<sub>4</sub></b>	$9,370 \times 10^{-4}$
<b>NO<sub>3</sub></b>	$5,073 \times 10^{-3}$
<b>Mg</b>	$8,114 \times 10^{-5}$
<b>SO<sub>4</sub></b>	$8,114 \times 10^{-5}$
<b>Ca</b>	$6,797 \times 10^{-5}$
<b>K</b>	$4,000 \times 10^{-3}$
<b>MES</b>	$1,095 \times 10^{-2}$

### **2.3.3 Le milieu de rinçage sans EDTA**

Le milieu de rinçage a presque la même composition que celui de culture mais plus simplifiée (sans oligoéléments). Au début de chaque expérience, les algues en phase exponentielle récupérées sur les filtres étaient remises en suspension dans 20 mL de ce milieu de rinçage puis distribuées dans les erlenmeyers. À la fin de l'exposition, les algues récupérées à la filtration étaient rincées trois fois avec ce même milieu (10 mL × 3).

### **2.3.4 Le milieu de rinçage avec EDTA**

Les volumes nécessaires pour préparer un litre du milieu de rinçage avec EDTA sont décrits dans le Tableau 2.3. Ce milieu ayant une concentration de 1 mM d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) : agent chélateur qui sert à extraire / retirer les métaux adsorbés à la surface des algues après les 5 jours d'exposition. D'ailleurs, ce produit chimique (l'EDTA) connu comme un ligand hexadentate (ou tétradentate lorsque seuls les sites carboxyliques sont utilisés) est exploité dans divers domaines. Par exemple en agronomie où il est exploité pour faciliter l'accès à certains éléments nutritifs dans la plante ce qui permet de lutter contre la carence en oligoéléments. De même, dans notre milieu de culture, cet élément permet de maintenir en solution les éléments mineurs comme le fer qui aurait tendance à précipiter.

Au cours de ce projet, 10 mL de ce milieu étaient ajoutés à chaque système de filtration à la fin de l'expérience d'exposition. Le temps de contact de l'EDTA avec les algues récupérées sur les filtres était de 10 minutes.

### **2.3.5 Choix des concentrations du phosphore organique dissous des milieux de culture**

Dans le travail de Singing (Singing, 2017) la croissance des algues a été testée à différentes concentrations en POD, en présence de PID et en absence de toute source de P. Ses résultats ont montré une inhibition de la croissance des algues en absence du P. En effet, le P est un élément essentiel pour assurer le métabolisme et la croissance des algues. Par exemple, une étude effectuée sur la microalgue *Scenedesmus obliquus* cultivée dans le milieu de culture BG11 à différentes concentrations de P (Hamouda et Abou-El-Souod, 2018) a montré qu'à la concentration en P égale à  $0,007 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  le contenu en carbohydrates et en protéines était plus élevé que le contenu obtenu à

d'autres concentrations en P. Pour notre étude, nous avons choisi une concentration de  $25 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\beta$ -glycérol phosphate, à laquelle on a obtenu une bonne croissance des algues. À cette concentration on a garanti une quantité suffisante en P pour la croissance et le métabolisme des algues.

## **2.4 Expériences d'exposition : test de toxicité des terres rares sur les algues**

### **2.4.1 Choix de la verrerie**

Les expériences d'exposition ont été effectuées dans des erlenmeyers en polycarbonates (PC) lavés et stérilisés (comme décrit à la section 2.4.2). Ce type de matériau était choisi pour minimiser les pertes de métaux dû à l'adsorption sur les parois des erlenmeyers au cours de l'exposition (Lavoie *et al.*, 2009). Au cours de notre projet, la stabilité temporelle de chaque TR était testée dans les contenants en PC. Nous avons enregistré des pertes de 10 % à 20 % environ en absence d'algues. Cependant au cours des expériences en présence d'algues, nous avons observé une diminution plus intense. Pour cette raison, nous avons tenu compte de la concentration moyenne mesurée du métal au cours du temps lors du traçage des courbes et lors de nos calculs.

### **2.4.2 Principe et méthodologie**

En pratique, la même démarche était suivie pour toutes les expériences lors de ce projet. Pour chaque métal, chaque espèce était exposée à une gamme de concentrations nominales. Au laboratoire, nous essayons de procéder dans des conditions similaires à celles naturelles (et dans les mêmes conditions que celles fixées pour l'entretien des algues). Les expériences étaient réalisées dans des chambres de culture (Conviron CMP4030) où la température, la luminosité et la photopériode sont contrôlées. Les erlenmeyers étaient déposés sur une plaque agitatrice. L'agitation est importante pour mélanger les algues et assurer une bonne diffusion du dioxyde de carbone vers ces microorganismes. La Figure 2.1 compare les conditions opératoires de culture à celles naturelles (simplifiées). La Figure 2.2 représente un schéma récapitulatif simplifié de la méthodologie suivie au cours des expériences.

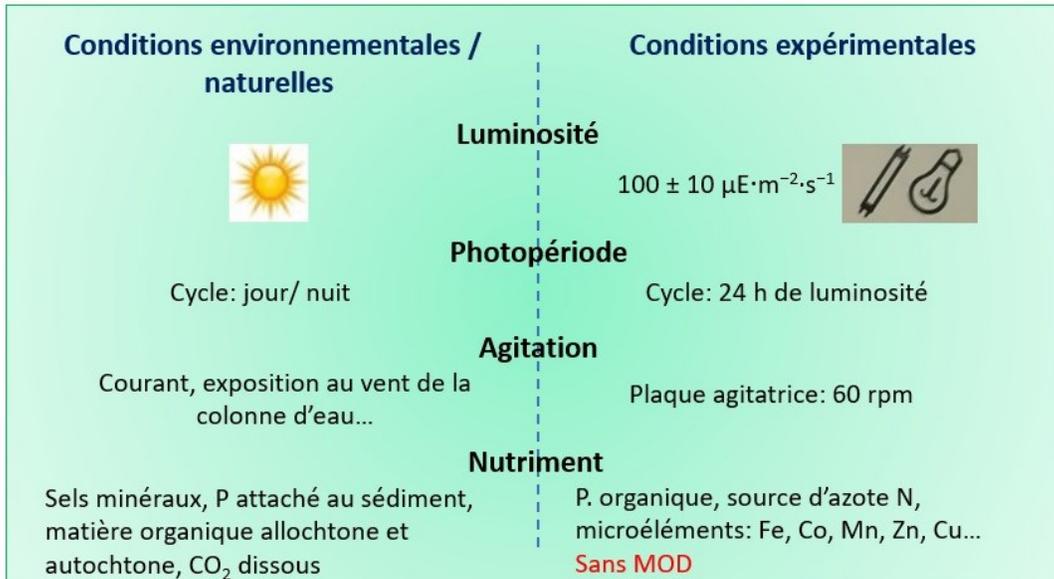


Figure 2-1 : Comparaison entre les conditions expérimentales et naturelles de la croissance algale.

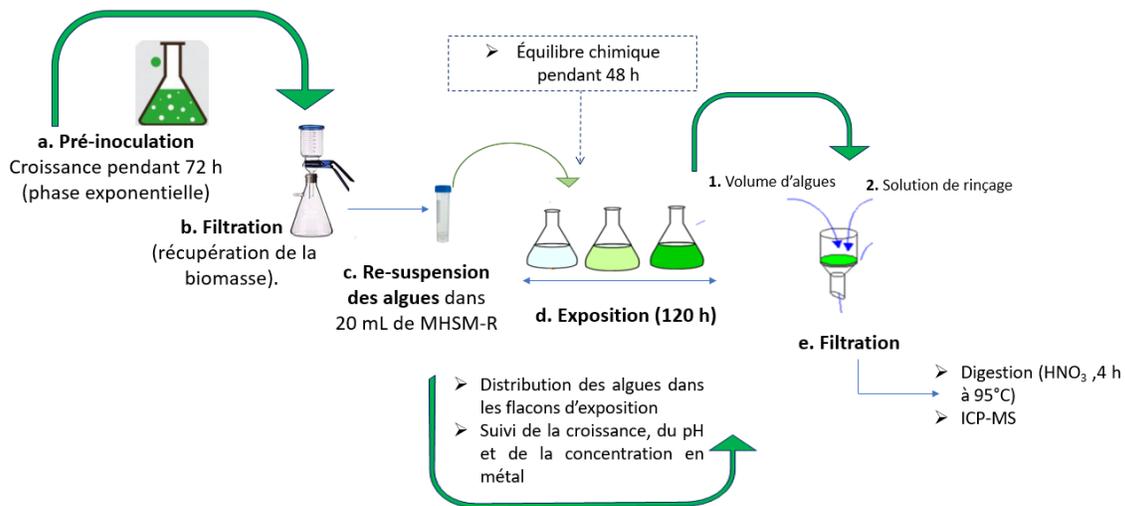


Figure 2-2 : Schéma récapitulatif de la méthodologie expérimentale suivie.

#### 2.4.2.1 La pré-inoculation

La première étape consiste en la pré-inoculation où les algues en phase exponentielle étaient transférées dans le milieu de culture (3 mL par 100 mL de MHSM-2). Un volume de 400 mL était inoculé afin d'obtenir une quantité d'algues suffisante pour démarrer l'exposition. Chaque concentration nominale était testée en triple et six concentrations en métal au minimum ont été préparées préalablement. En effet, après la préparation des solutions intermédiaires du métal en question, 100 mL de MHSM-2 étaient ajoutés

dans un erlenmeyer en polycarbonate Nalgene™. À ce volume, on rajoute le volume nécessaire de la solution du métal (Nd, Tm ou Y) de telle sorte qu'on obtient la concentration nominale désirée. Il y avait également des témoins de croissance d'algues sans métal. La vérification du pH était réalisée sur un seul erlenmeyer pour chaque concentration le long de l'expérience afin de minimiser la possible contamination des échantillons. Ainsi, pour chaque concentration, l'ajustement du pH se fait comme suit : un volume de base (hydroxyde de soude ; 1 M) était ajouté lorsque nécessaire. Ce volume est noté et ensuite ajouté aux deux autres erlenmeyers. Les erlenmeyers sont laissés semi-ouverts sous la hotte afin d'atteindre l'équilibre chimique des espèces en solution.

#### **2.4.2.2 Exposition et suivi au cours du temps**

Après 72 h de croissance, 500  $\mu$ L d'algues étaient prélevés pour déterminer la densité cellulaire sur laquelle on se base pour décider le volume d'algues nécessaire à filtrer. Une fois que la filtration effectuée (environ 50 mL de culture étaient filtrés par filtre pour éviter le colmatage de celui-ci) sur une membrane en polycarbonate de porosité de 2  $\mu$ m, ces microorganismes étaient remis en suspension dans 20 mL de solution de rinçage (sans EDTA). La densité cellulaire était alors déterminée à nouveau. Sur cette base, on calculait ensuite le volume nécessaire d'algues à ajouter (calcul ci-dessous) pour chaque 100 mL de milieu d'exposition pour atteindre une densité algale entre 35 000 et 40 000 cell/mL. Après cette inoculation, les erlenmeyers étaient mis dans la chambre de culture avec les conditions décrites ci-haut à la Figure 2.1. La variation de la biomasse algale a été suivie chaque 24 h via le compteur à particules. Ce dernier s'agit du Coulter Counter Multisizer III de la compagnie Beckman Coulter. Pour lire la densité des algues, on prélevait soit 1 mL ou 100  $\mu$ L (le choix du facteur de dilution dépendra de la prolifération des algues) à partir des erlenmeyers et on rajoute ce volume à 9,0 mL (ou 9,9 mL) de la solution électrolyte ISOTON®. Cette solution est introduite dans un tube possédant un orifice de 70  $\mu$ m «aperture tube» et qui se situait entre deux électrodes. Lorsqu'une particule passe à travers ce tube, un volume équivalent de la solution est déplacé. Ainsi, une impulsion électrique ayant une amplitude proportionnelle à la taille de la particule est créée. Cette action (changement de résistance) est transformée en concentration de particule par l'appareil de telle sorte que l'on soit capable de décompter précisément les cellules. L'appareil était nettoyé avant son utilisation avec une solution de nettoyage bactériostatique. Le calcul suivant était

effectué pour déterminer le nombre de cellules ainsi que le volume exact à mettre dans les erlenmeyers de 100 mL:

$$\text{Densité du concentré d'algue filtré (ou densité cellulaire)} : \frac{\sigma \times FD}{0,5}$$

Avec  $\sigma$  : le nombre donné par le compteur à particule

FD : facteur de dilution

$$\text{Volume à ajouter} : \frac{35\,000 \times 100}{\text{Densité du concentré d'algue filtré}}$$

Les concentrations testées durant l'exposition sont indiquées dans le Tableau 2.6. Les trois solutions des métaux d'intérêt (Nd, Tm et Y) étaient des étalons mono-élément *PlasmaCAL* pour ICP-MS de concentration  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Pour chaque milieu d'exposition, un échantillon de 1,5 mL a été prélevé dans un tube Eppendorf. Ce volume était centrifugé à une rotation de 5000 tr par minute pendant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse ayant un rotor de 4 cm. Par la suite, le surnageant était récupéré et acidifié avec de l'acide nitrique à 2 %. Ce prélèvement était effectué tout au long des 5 jours de l'expérience d'exposition afin de déterminer les concentrations en métal d'intérêt. Le choix des concentrations d'exposition est basé sur des tests préliminaires effectués en début de la maîtrise. Seules les concentrations nominales étaient prises en compte sans détermination des concentrations totales mesurées pour ces tests préliminaires.

**Tableau 2-6: Tableau des concentrations nominales testées (en nM) pour chaque métal chez chaque espèce algale.**

	<b>Néodyme (nM)</b>	<b>Thulium (nM)</b>	<b>Yttrium (nM)</b>
<i>Chlorella fusca</i>	10, 50, 100, 500, 1000, 3000 et 5000	100, 500, 800, 1000, 1200, 1500, 2000 et 3000.	10, 20, 50, 100, 200, 350, 600 et 800
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	10, 50, 150, 600, 1800, 3000 et 5000.	20, 100, 250, 500, 900, 1200 et 2400	20, 100, 200, 400, 600 et 800

### 2.4.3 Récupération des algues et leur digestion

Après 5 jours d'exposition, les algues ont été récupérées en recourant à la filtration. Cette méthode était privilégiée à la centrifugation (Tétrault, 2014). Les filtres en polycarbonates de marque Millipore, de porosité 2,0 µm ont été utilisés. Le système de filtration se compose de deux filtres superposés déposés sur des tulipes Nalgene® en polycarbonates. Une pompe de filtration réglée à une pression maximale de 10 psi permettait de séparer les algues de leurs milieux d'exposition. Le volume ajouté de milieu à chaque tulipe était compris entre 40 et 50 mL. Le filtrat était récupéré dans un tube de 50 mL et acidifié à 2 % de HNO<sub>3</sub>. Ensuite, les filtres étaient rincés deux fois avec la solution de rinçage sans EDTA. Un volume de 10 mL de milieu de rinçage contenant de l'EDTA (1 mM) était ajouté afin d'enlever les métaux en question qui étaient adsorbés sur la surface des algues. Le temps de contact était de 10 minutes. Les algues étaient rincées de nouveau avec la solution de rinçage sans EDTA. Par la suite, les filtres ont été récupérés. Le filtre se situant en bas représente la quantité en métal potentiellement adsorbé à la membrane de filtration, celui se situant en haut contenant les algues sert à déterminer la quantité en métal internalisé. Afin de déterminer les concentrations sur les filtres, la technique de la digestion à l'acide était employée. Aux filtres récupérés dans des tubes de 50 mL, on ajoutait 5 mL d'acide nitrique de «grade trace métal» 70 % et 1 mL de peroxyde d'hydrogène. Ensuite, les tubes étaient placés dans un bloc chauffant à une température de 95°C pendant 4 h. Après, le volume de digestat était complété avec de l'eau ultrapure jusqu'à 50 mL.

Au cours de la digestion, des contrôles de matériels de références étaient aussi mis avec les échantillons. Ces contrôles ont servi à vérifier si la digestion avait bien fonctionné et permettait de déterminer le pourcentage de récupération du métal. Le matériel de référence certifié utilisé était le BCR®-670. Ce matériel a été préparé dans du matériaux «sans métal» (metal free) (Kramer *et al.*, 2001). Le pourcentage de récupération de chaque métal est montré dans le Tableau 2.7.

Il faut rappeler qu'au sein de notre équipe on procède parfois à la digestion totale où le HF (acide fluorhydrique) est employé en plus de l'acide nitrique. Pour ce projet, on a recouru à la digestion partielle au cours de laquelle seulement l'acide nitrique était utilisé. Ce dernier s'est montré assez efficace puisque nous avons obtenu des pourcentages de récupération proches de ceux obtenus de la digestion totale : 90 % de récupération de La (Singing, 2017) et 75,6 % pour le platine en utilisant le matériel de référence IAEA-450 (Rioux, 2018).

**Tableau 2-7 : Concentrations de métal mesurées dans les contrôles de digestion du matériel de référence.**

<b>Fraction massique</b>	<b>Valeur certifiée BCR-670</b>	<b>Pourcentage de récupération en moyenne</b>
<b>[Nd] (mg·kg<sup>-1</sup>)</b>	0,473 ± 0,015	72 ± 4 %
<b>[Tm] (mg·kg<sup>-1</sup>)</b>	5,7 ± 0,7	84 ± 3 %
<b>[Y] (mg·kg<sup>-1</sup>)</b>	0,46 ± 0,06	79 ± 4 %

#### **2.4.4 ICP-MS**

L'analyse des échantillons se fait par un appareil de spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). Cet instrument est de la compagnie ThermoScientific (modèle X series 2). Cet appareil est installé dans une salle blanche ISO 7 (classe 10 000) où la concentration particulaire est maîtrisée afin de minimiser l'introduction et la rétention des particules. Pour cette classe, le nombre maximal de particules par mètre cube est indiqué dans le tableau suivant :

**Tableau 2-8 : La concentration maximale admissible pour ISO 7 (MECART Inc., 2020)**

Concentration maximale en particules égales ou supérieures aux tailles indiquées (particules /m <sup>3</sup> d'air)						
Classe	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm
ISO 7	Ne sont prises en considération			352 000	83 200	2930

La première étape dans le fonctionnement de l'ICP-MS est la nébulisation : la solution est introduite dans une chambre de vaporisation (à l'aide d'une pompe péristaltique) où le nébuliseur la transforme en un aérosol liquide composé de microgouttelettes à l'aide d'argon gazeux. Cet aérosol formé passe dans une torche à plasma d'argon où la température est assez élevée (entre 6000 et 10 000 °C) permettant de vaporiser, dissocier et ioniser les éléments. Par la suite, les éléments ionisés passent par deux cônes en nickel et un ensemble de lentilles ioniques. Ce dernier extrait les ions chargés positivement et les transporte vers un filtre de masse quadripolaire. Ce filtre sépare les ions selon leurs masses ainsi que leurs charges (m/z). Le rapport (m/z) est déterminé en fonction de la fréquence appliquée au quadripôle.

L'étalonnage de l'appareil se faisait avant chaque analyse avec une solution multi-élémentaire de référence contenant 1 µg·L<sup>-1</sup> de Li, Be, Co, Ba, Ce, In et U. Les deux derniers éléments (l'uranium et l'indium) étaient utilisés pour vérifier la sensibilité ainsi que la stabilité du signal. Le signal de l'uranium devrait être supérieur à 80 000 coups par seconde. Le coefficient de variation des deux éléments pour quatre lectures devrait être inférieur à 1,5 %. Pour limiter la formation des oxydes, le ratio CeO/Ce ne devrait pas dépasser 0,02. La double charge est aussi contrôlée en réglant le ratio Ba<sup>2+</sup>/Ba à une valeur sous 0,05. Afin de garder ces paramètres aux valeurs désirées avant d'analyser nos échantillons, un ajustement était effectué : soit la position des lentilles, la pression dans le nébuliseur, soit la position de la torche face aux cônes. Un test de stabilité de l'appareil était effectué avant le début d'analyse des échantillons.

La courbe d'étalonnage était préparée à partir des solutions stocks certifiées PlasmaCal ayant la concentration de 1000 µg·L<sup>-1</sup> de la compagnie SPC science. Deux courbes

étaient préparées : une à 2 % de HNO<sub>3</sub> et l'autre à 10 % puisqu'on avait des échantillons de différentes matrices. Les étalons contenaient le Nd, le Tm et l'Y, et la gamme de concentrations variait de 0,01 à 30 µg·L<sup>-1</sup>. Lors de chaque analyse, deux contrôles préparés avec de l'eau ultrapure, à partir de l'étalon multi-éléments certifiés 414 de SCP Science étaient analysés afin de vérifier la courbe. Les contrôles avaient des concentrations respectives de 0,1 et 1 µg·L<sup>-1</sup> de chaque métal. Ils étaient également analysés tous les 9 à 12 échantillons afin de vérifier la déviation de l'appareil durant l'analyse. La limite de détection a été déterminée en multipliant par trois l'écart-type de dix mesures de la concentration la plus faible dans la gamme étalon, soit 0,1 µg·L<sup>-1</sup>. Lors des analyses, cette limite a varié de 0,0012 à 0,0044 µg·L<sup>-1</sup> selon l'élément étudié.

## **2.5 Traitement des données**

### **2.5.1 Paramètres de la toxicité**

Le logiciel TRAP «Toxicity Relationship Analysis Program» a été utilisé pour déterminer les concentrations efficaces moyennes médianes 50 % (CE50) de chaque métal chez chaque espèce. Ce programme analyse la diminution d'une variable biologique telle que la survie, la croissance ou la fécondité (dans notre cas la croissance cellulaire) d'une valeur de témoin à zéro quand l'exposition chimique (concentration, log concentration...) augmente. Dans la plateforme, l'axe des «Y» ou «Effect Variable» réfère à la variable biologique affectée, l'axe des «X» ou «Exposure Variable» à la mesure de la concentration du composant chimique d'exposition.

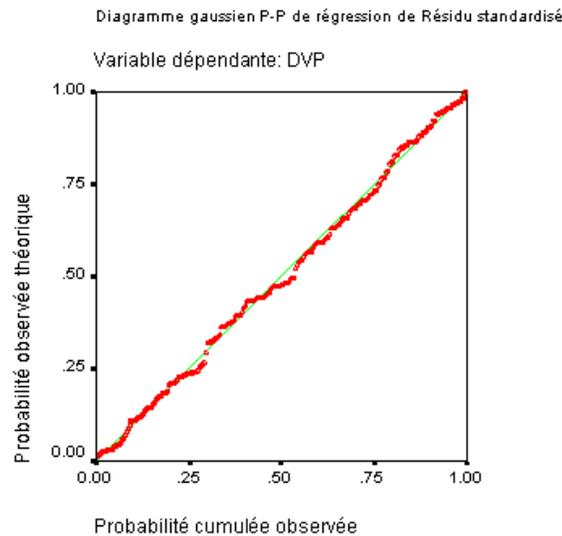
### **2.5.2 Analyse statistique**

#### **2.5.2.1 SPSS**

Afin d'expliquer la relation entre le métal adsorbé et celui présent en solution d'exposition, la technique de la régression linéaire a été utilisée. Cette technique statistique vise à expliquer ou à prédire une variable dépendante (le métal adsorbé dans notre cas) par une ou un ensemble de variables indépendantes. Au cours de cette étude, on a une seule variable indépendante (la concentration de métal en solution mesurée au cours du temps) donc il s'agit d'une régression linéaire simple. Lorsque l'on fait cette modélisation, il est intéressant d'examiner la qualité de la relation entre les données prédites et celles observées. Ceci est déterminé en évaluant les écarts entre

valeurs prédites et valeurs observées qu'on appelle les résidus. Pour un bon modèle, les résidus vérifient les propriétés suivantes :

- La normalité : les résidus doivent posséder les propriétés classiques d'une distribution normale. Pour vérifier cette condition avec le logiciel SPSS, on peut construire un diagramme mettant en relation la probabilité cumulée d'apparition d'une valeur avec sa probabilité théorique (on trace le diagramme gaussien P-P). Les points doivent être aux alentours d'une droite linéaire comme le montre la figure suivante (ici le résultat est assez satisfaisant) :



**Figure 2-3 : Exemple du tracé P-P dans le logiciel de SPSS (UOH, 2013).**

- Homoscédasticité : elle est vérifiée par l'examen des résidus. Pour toutes les valeurs prédites, la variance des résidus est homogène. Cette prémisse peut être vérifiée par l'examen du nuage de points du croisement entre les valeurs prédites standardisées et les résiduels standardisés.
- L'indépendance des termes d'erreur est une autre condition de l'analyse de ce type de régression. Cette condition peut aussi être validée par le test de Durbin-Watson.

### **Interprétation des coefficients**

Les résultats de la régression se lisent grâce aux indices suivants :

**R** : le coefficient de corrélation multiple est un indice standardisé variant de  $-1$  à  $+1$ , indiquant la force de la relation entre l'ensemble des variables indépendantes et la variable dépendante. Plus la corrélation est élevée, plus la relation linéaire entre les variables indépendantes et la variable dépendante est élevée.

**R<sup>2</sup>** : la corrélation multiple au carré, appelée coefficient de détermination, est un indice de la part de variance de la variable dépendante expliquée par les variables indépendantes qui sont dans l'équation. Il donne ainsi la part de variance de la variable expliquée par la variable indépendante.

**La valeur de F** : La régression est basée sur le rapport entre le carré moyen de l'amélioration due au modèle et le carré moyen de la différence observée entre le modèle et les données réelles. Si un modèle est bon, l'amélioration de la prédiction due au modèle devrait être grande et les différences entre le modèle (droite de régression) et les valeurs observées, petites.

$$F = (n - 2) \frac{R^2}{1 - R^2} = \frac{SCE/1}{SCR/(n - 2)}$$

Avec :

SCE : représente la variance expliquée par la régression.

SCR : représente la variance résiduelle ou non expliquée (partie de la variation totale qui n'est pas expliquée par le modèle de régression).

La valeur de F devrait être plus grande que 1 pour que le modèle soit bon mais ceci est confirmé avec le p-value donné par SPSS.

### 2.5.2.2 SigmaPlot

Afin de déterminer si la différence est significative ou non entre les différentes variables, on a utilisé le logiciel SigmaPlot qui est un outil d'analyse de données proposant divers tests statistiques et des représentations graphiques utiles pour aborder des problématiques complexes. Le test statistique utilisé avec SigmaPlot pour nos données est le test «One Way ANOVA». Cette commande permet de faire le test de normalité (Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov test) qui vérifie si les différentes variables peuvent suivre une loi normale : une valeur de p supérieur au niveau de signification  $\alpha$  indique que la variable analysée suit la loi normale. Le test d'égalité de variances pour le niveau de facteur (la valeur de p supérieure à  $\alpha$  implique la rétention de l'hypothèse

nulle stipulant l'égalité des variances entre les niveaux de facteur) ainsi que l'analyse de la variance ANOVA qui vérifie l'hypothèse selon laquelle les moyennes de deux populations ou plus sont égales, sont vérifiées. L'hypothèse nulle stipule que toutes les moyennes de la population sont égales, l'hypothèse alternative stipule qu'au moins l'une d'elles est différente. Pour déterminer si les différences sont statistiquement significatives, il suffit de comparer la valeur de  $p$  obtenue par le test au niveau de signification choisi pour évaluer l'hypothèse nulle. Habituellement, un niveau de signification  $\alpha$  de 0,05 fonctionne bien: un niveau de signification de 0,05 indique un risque de 5 % de conclure qu'une différence existe lorsqu'il n'y a pas de différence réelle. Deux cas de valeur de  $p$  se présente :

- Cas 1 :  $P\text{-value} > \alpha$  : Les différences entre les moyennes ne sont pas statistiquement significatives. Si la valeur de  $p$  est supérieure au niveau de signification, on ne dispose pas de suffisamment de preuve pour rejeter l'hypothèse nulle.
- Cas 2 :  $P\text{-value} < \alpha$  : L'hypothèse nulle est rejetée et on peut conclure que toutes les moyennes de populations ne sont pas égales.

La méthode de Tukey, de Student-Newman-Keuls ou Bonferroni permettent de tester les différences entre les moyennes pour déterminer si cette différence entre les paires est statistiquement significative. Pour la comparaison entre les croissances cellulaires obtenues à différents traitements avec celles des témoins, on a eu recours toujours au test Bonferroni (car on peut indiquer lesquelles des valeurs sont les témoins).



## CHAPITRE 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

---

Ce chapitre est consacré à la présentation des résultats des expériences effectuées lors de notre projet ainsi qu'à leurs interprétations. Nous allons commencer par les résultats concernant la stabilité temporelle des éléments dans le milieu sans algues, puis les résultats des éléments dans le milieu en présence d'algues, de toxicité et d'accumulation de *C. fusca* exposée au Nd puis au Tm et finalement à l'Y, suivis par ceux de *C. reinhardtii* exposée aux mêmes éléments. Les travaux d'exposition de *C. reinhardtii* à un mélange de Nd et Tm sont présentés à la fin.

### 3.1 Stabilité temporelle des concentrations de métaux dans le milieu MHSM-2

Le suivi de la concentration de chaque métal a été effectué en absence des algues (contrôle abiotique (CA)) sur une période de temps de 120 h. Chaque 24 h une aliquote a été prise pour chaque concentration, centrifugée à 5000 rotations par minute (rpm) et le surnageant était acidifié pour être analysé par la suite à l'ICP-MS.

#### 3.1.1 Comportement du néodyme

Les courbes 3.1 (a), (b) et (c) présentent la variation de la concentration du Nd au cours du temps pour des concentrations initiales de 500 nM, 3000 nM et 5000 nM respectivement.

Pour chacun des traitements, la concentration du néodyme a peu varié au cours du temps, sauf pour le 3<sup>ème</sup> échantillon de 5000 nM où on constate une baisse après 48 h. Ce point aberrant peut être due à une mauvaise dilution. Les pourcentages des pertes sont de  $7 \pm 1 \%$ ,  $0,5 \pm 0,01 \%$  et  $0,5 \pm 0,05 \%$  respectivement pour 500, 3000 et 5000 nM.

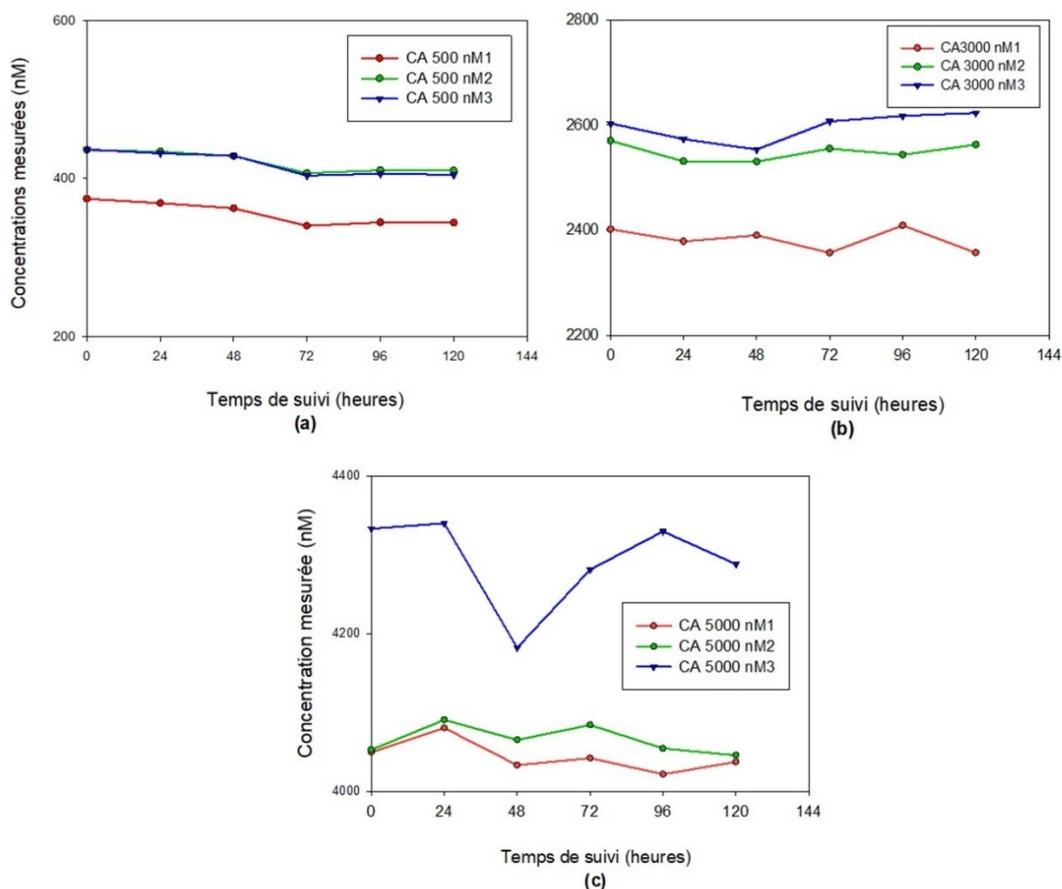


Figure 3-1 : Concentration de néodyme en absence d'algues dans le MHSM-2 : 500 nM (a), 3000 nM (b) et 5000 nM (c).

### 3.1.2 Comportement du thulium

La concentration en thulium total présent dans le milieu d'exposition sans algues a été mesurée toutes les 24 h. Les concentrations nominales testées étaient : 10 nM, 100 nM, 500 nM et 1000 nM et les résultats sont montrés dans la Figure 3.2. Ce test permet de vérifier la stabilité des concentrations au cours du temps. Ces dernières restent aux alentours des concentrations initiales. La perte la plus importante observée était à 1000 nM avec un pourcentage de perte d'environ 20 %. Cela pourrait être expliqué par une précipitation qui, lors de la centrifugation des échantillons, résulterait en une concentration plus faible dans le surnageant. En revanche, les pertes pour 10, 50 et 100 nM sont de  $3 \pm 0,46 \%$ ,  $2,4 \pm 1 \%$  et  $4,7 \pm 3,5 \%$  respectivement.

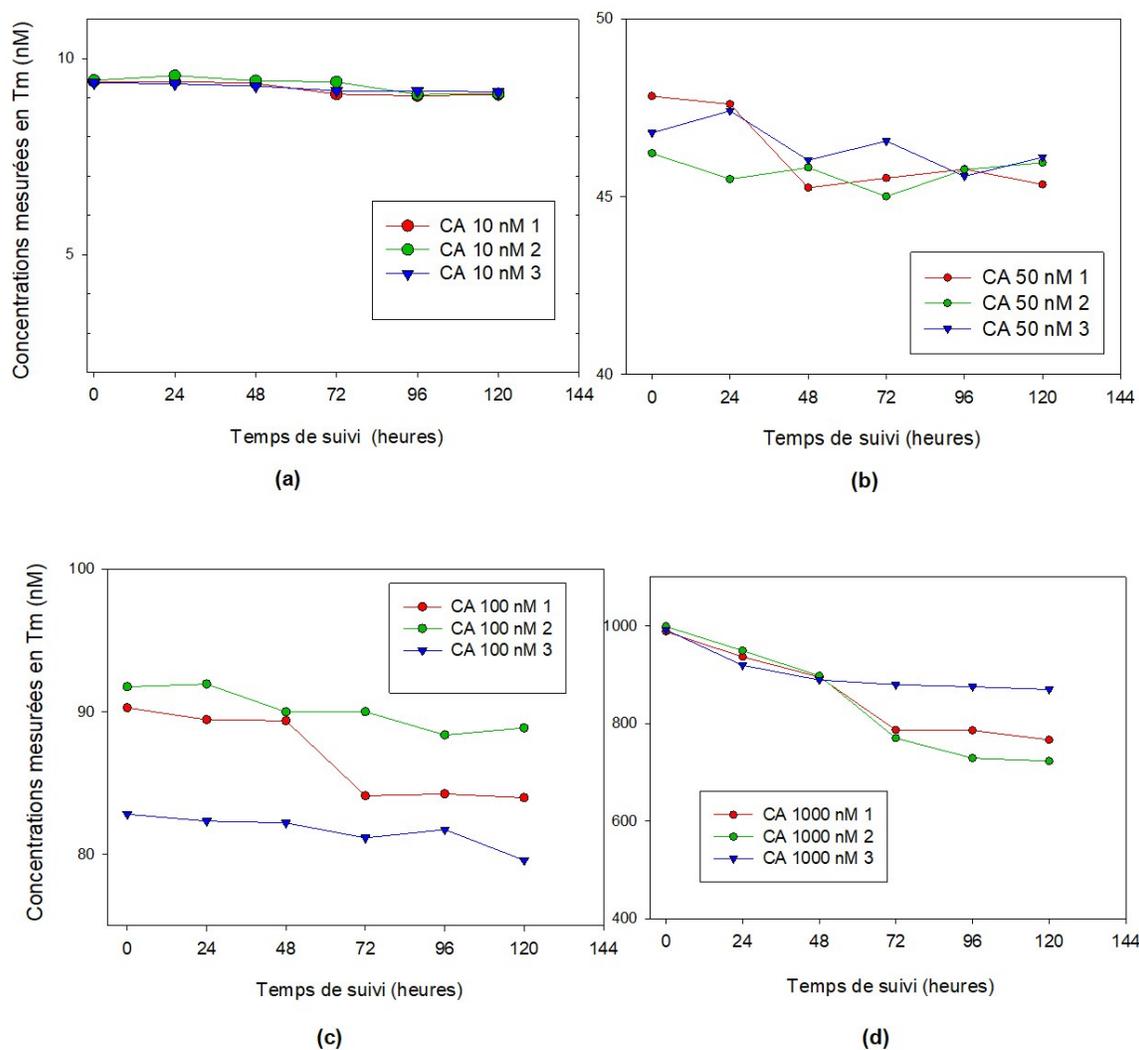
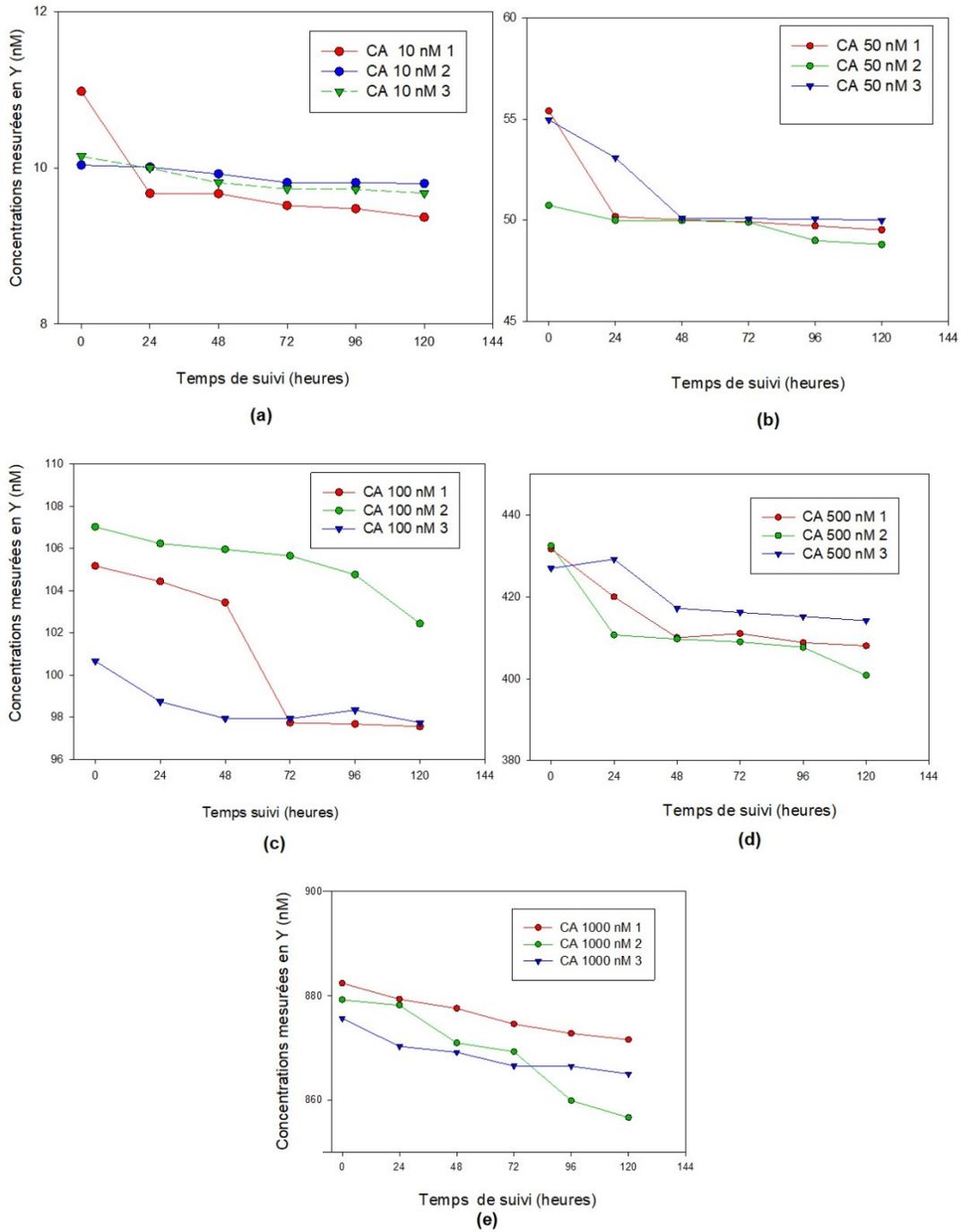


Figure 3-2 : Comportement du Tm au cours du temps en absence des algues : 10 nM (a), 50 nM (b), 100 nM (c) et 1000 nM (d).

### 3.1.3 Comportement de l'yttrium

La vérification de la stabilité de l'yttrium a aussi été réalisée. Cinq concentrations ont été testées : 10, 50, 100, 500 et 1000 nM. Les résultats sont illustrés par la Figure 3.3. Une légère baisse est observée : l'échantillon 10 nM (1) est passé d'une concentration de 11,0 nM à 9,7 nM après 24 h (une diminution de 14 %) mais après la concentration était plutôt stable. Pour les échantillons de concentration de 50 nM, le pourcentage de perte est de  $10 \pm 4,9 \%$ . Ce pourcentage est aux alentours de  $7 \pm 4,1, 5 \pm 1,7$  et  $1,67 \pm 0,93 \%$  pour les concentrations nominales : 100, 500 et 1000 nM respectivement.



**Figure 3-3 : Comportement de l'yttrium au cours du dans le milieu MHSM-2 en absence des algues : 10 nM (a), 50 nM (b), 100 nM (c), 500 nM (d) et 1000 nM.**

### 3.1.4 Comportement du néodyme en présence des algues

Bien que les pertes observées ne soient pas très importantes, nous nous sommes posés la question si des tests menés dans des erlenmeyers composés d'autres matériaux que le polycarbonate aurait engendré moins de pertes de métal présent (ex. : Téflon). On a aussi supposé que ces pertes seraient plus importantes en présence des algues vertes qu'en leur absence. Nous avons testé ceci avec un seul métal : le Nd. Les résultats sont présentés à la Figure 3.4. Comme supposé, les pourcentages de pertes de métal étaient plus importants en ajoutant les algues qu'en leur absence : ces pourcentages sont de  $36,5 \pm 6$ ,  $16,2 \pm 3,7$ ,  $14,6 \pm 5,2$  et  $13,3 \pm 3,8$  % pour les concentrations de 500, 1000, 3000 et 5000 nM respectivement. C'est pour cette raison qu'au cours de nos expériences nous prenons en compte la moyenne des concentrations mesurées au cours du temps pour dresser toutes les figures.

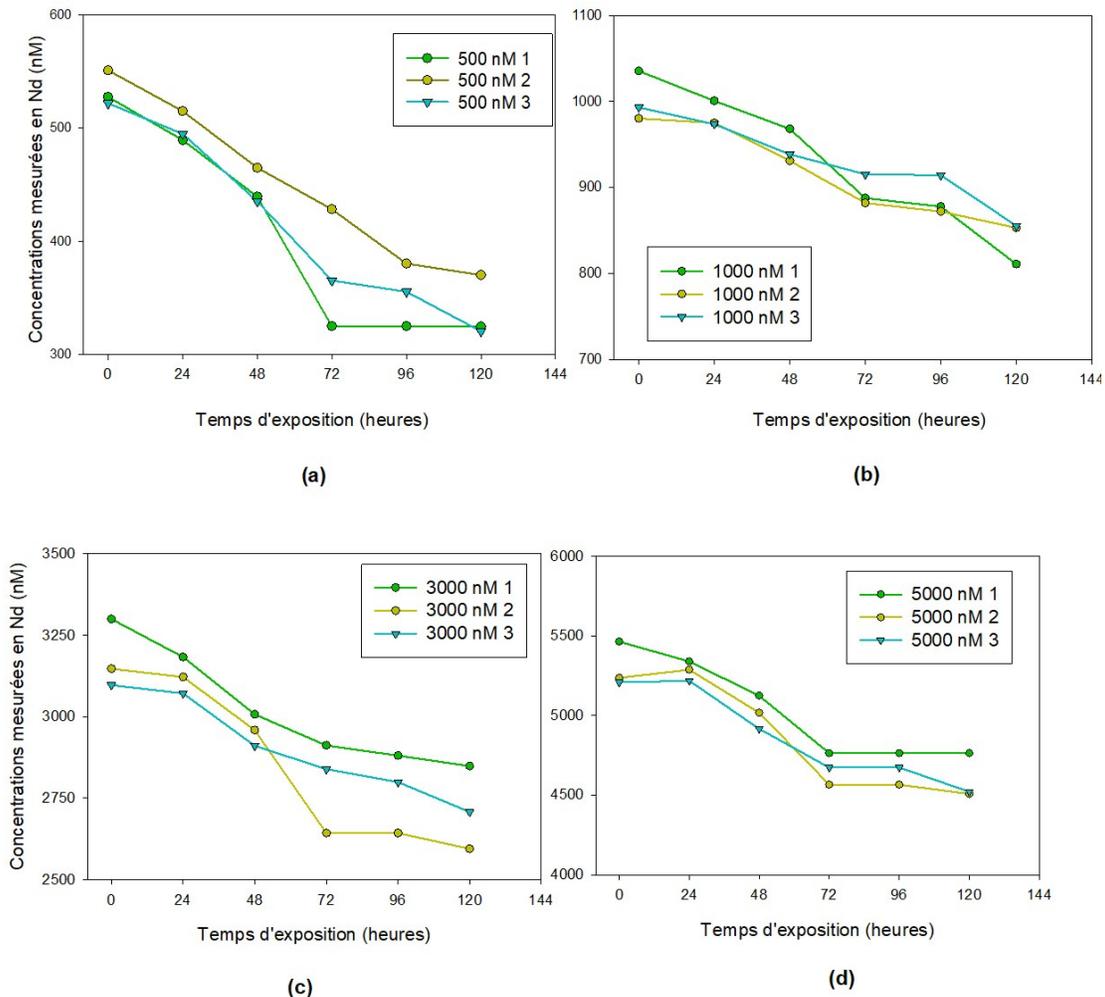


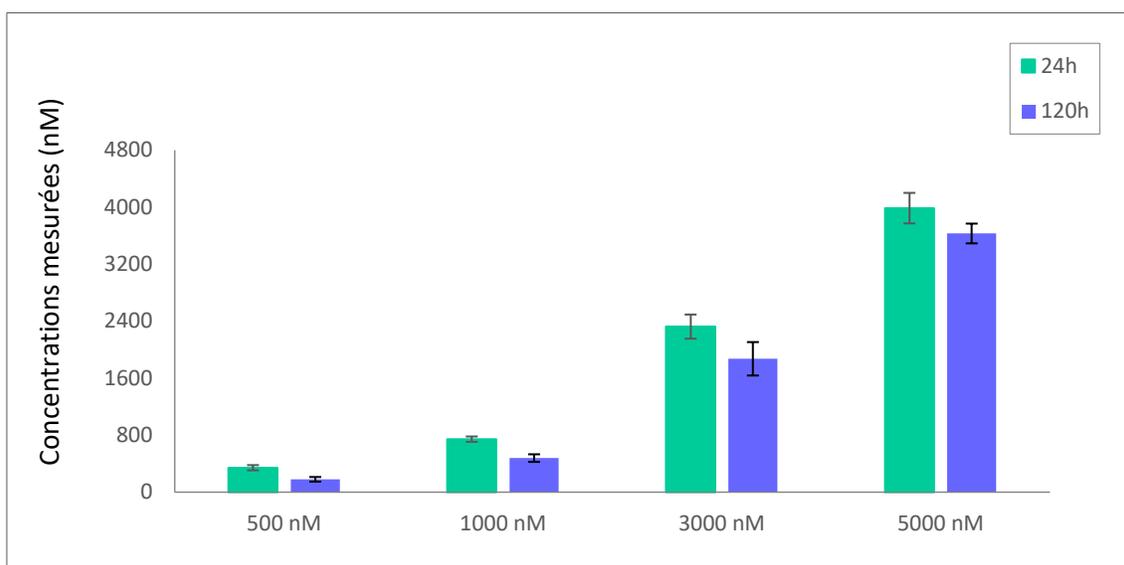
Figure 3-4 : Suivi des concentrations en Nd dans le milieu de culture MHSM-2 en présence de l'algue verte *C. fusca*.

## 3.2 Exposition de *C. fusca*

### 3.2.1 Exposition au néodyme

#### 3.2.1.1 Suivi des concentrations

Le suivi des concentrations en Nd a été effectué sur une durée totale de 120 h avec prise d'aliquote pour chaque concentration (500, 1000, 3000 et 5000 nM) toutes les 24 h. La Figure 3.5 montre la variation de la concentration du métal après 24 et 120 h. Les données traitées sont présentées au Tableau 6.1 dans l'annexe.



**Figure 3-5 : Concentration du néodyme en présence d'algues après 24 et 120 heures d'exposition à 500, 1000 et 5000 nM de Nd (n=3).**

On note que la baisse est plus prononcée à faible concentration de Nd avec les pourcentages d'écart suivants : 48, 36, 19 et 8,9 % respectivement pour les concentrations de plus faibles aux plus élevées. Cette observation est similaire à ce qui a été constaté dans d'autres travaux de recherche au sein de notre équipe sur le lanthane et le cérium. Cet écart a été pris en compte dans l'interprétation des résultats puisque les données de toxicité et les calculs de l'ion libre ont été interprétés en fonction de la concentration moyenne entre le début et la fin des expériences.

### 3.2.1.2 Adsorption

La quantité du métal adsorbé au niveau de la membrane algale a été déterminée en recourant à la filtration et en utilisant l'EDTA (1 mM). La Figure 3.6 représente la distribution des mesures des concentrations en Nd adsorbé au niveau de la paroi cellulaire de *C. fusca* en fonction de la concentration d'exposition et ce sur une échelle log-log. On remarque que la quantité du métal adsorbé augmente avec l'augmentation de la concentration testée à l'exception des concentrations aux alentours de 15 et 2144 nM (points entourés en mauve) pour lesquelles la quantité en Nd est moins importante que pour les concentrations précédentes. Ces points à l'écart sont parfois supérieurs et parfois inférieurs à la tendance et peuvent possiblement refléter un bruit expérimental. Le test Spearman confirme qu'il y a une corrélation significative entre le Nd adsorbé et le Nd mesuré ( $p < 0,01$ ). La régression linéaire est construite à l'aide de SigmaPlot.

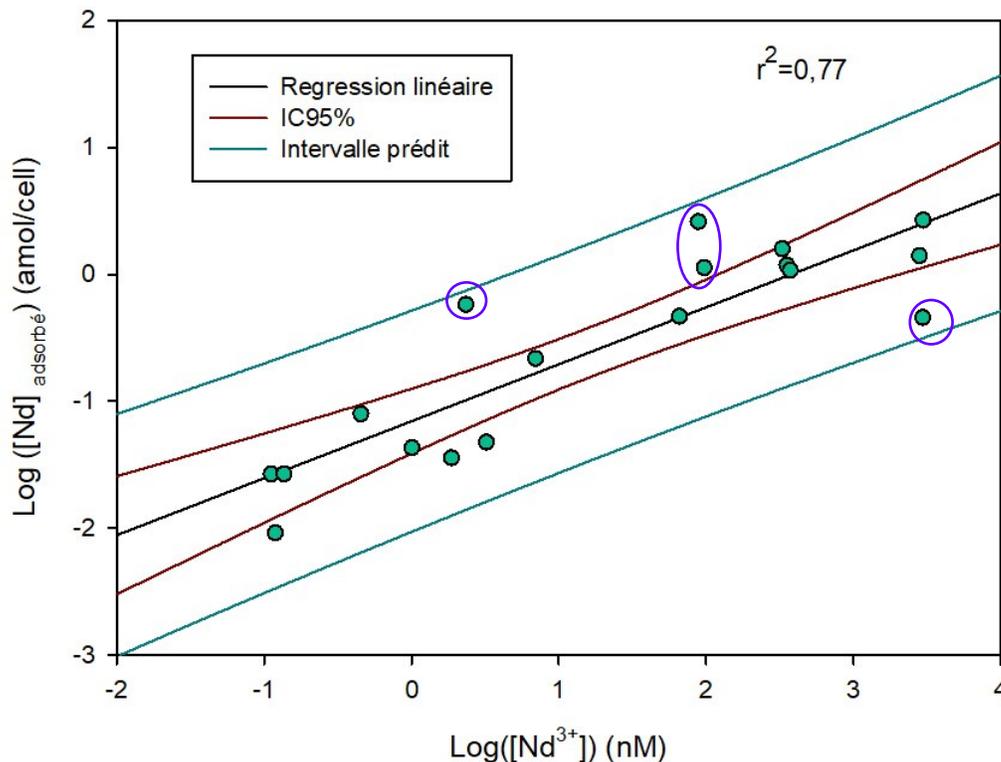


Figure 3-6 : Néodyme adsorbé à la surface cellulaire de *C. fusca* : données en logarithmique ( $y = -1,16x + 0,45$ ).

Les conditions de la régression linéaire sont vérifiées. Afin d'identifier les points atypiques «outliers» (c'est une observation qui est mal expliquée par le modèle et

présente un résidu élevé), il faut regarder les résidus standardisés qui ne doivent pas dépasser -3,29 et 3,29. Dans le cas étudié, les résidus standardisés sont d'un minimum de -1,88 et d'un maximum de 1,917. L'indépendance des termes d'erreurs, une autre condition pour ce type d'analyse, a été confirmée grâce au test de Durbin-Watson ( $d = 1,71$ ) : ce terme ne doit pas être inférieur à 1 ou supérieur à 3. Le tracé « P-P normal » représente les probabilités attendues sous l'hypothèse de normalité en fonction de celles observées. Ce graphe vérifie la normalité des résiduels : on remarque que les points s'alignent autour d'une droite linéaire ce qui signifie une distribution suivant une loi normale (Figure 3.7).

La Figure 3.8 représente les résidus en fonction des valeurs de la variable dépendante prédite. Si une forme apparaît (tendance, cône...), l'hypothèse d'homoscédasticité risque fort de ne pas être validée. En analysant les tests statistiques, on conclut que, lorsque les données ne sont pas transformées, le Nd total mesuré ne peut pas prédire statistiquement celui adsorbé. Lorsque ces données sont transformées en logarithmes, le modèle se montre significatif : la statistique F de Fisher est de 54,35 avec un p-value égal  $< 0,005$ . Toutefois, le  $r^2$  est égale à 0,77 avec les données transformées en logarithmique et cette prédiction est significative.

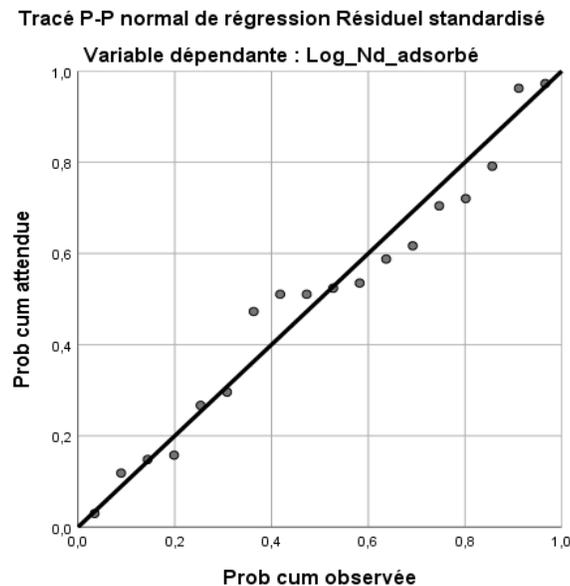


Figure 3-7 : Tracé des résidus en fonction du prédicteur pour vérifier la condition de normalité des résidus.

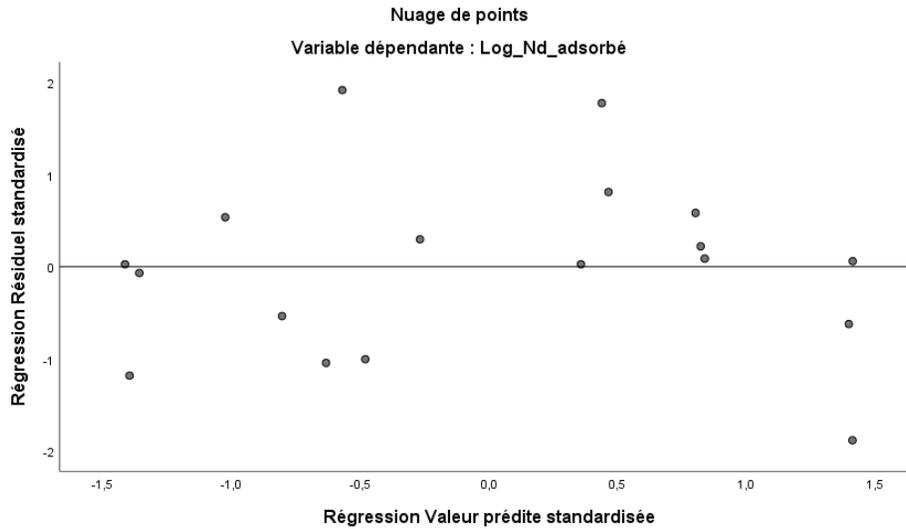


Figure 3-8 : Tracé des résidus (erreurs) en fonction des valeurs prédites : vérification de l'homoscédasticité.

### 3.2.1.3 Toxicité : Effet du néodyme sur la croissance

#### a. Courbe de croissance

Les courbes décrivant la croissance de *C. fusca* à différentes concentrations de néodyme sont représentées par la Figure 3.9.

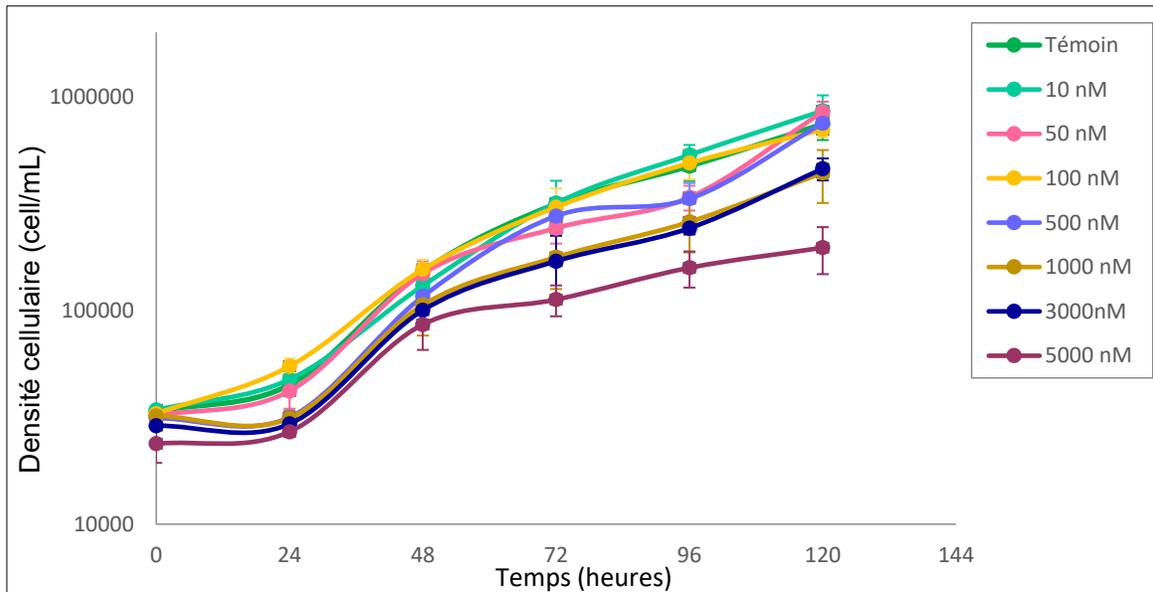


Figure 3-9 : Profils de croissance cellulaire de *C. fusca* en présence de différentes concentrations de Nd au cours du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures (n=3).

La courbe montre une phase de latence qui marque le début du cycle de croissance entre 0 et 24 h, suivie d'une phase exponentielle (48 – 120 h) qui reflète la division cellulaire. On note qu'à 120 h, la phase stationnaire n'est toujours pas atteinte.

Après 72 h et 120 h d'exposition, on observe une différence entre la population algale de toutes les concentrations testées :

- Pour la gamme de concentration entre 1000 nM et 5000 nM, la croissance de l'algue verte est affectée par le Nd avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 40 % et 73 % après 120 h. Il est à noter que *C. fusca* était sensible à la même gamme de concentration en La (Singing, 2017).
- Pour des concentrations comprises entre 10 et 50 nM, le Nd semble stimuler la croissance de *C. fusca* de 13 % et 12 % respectivement par rapport au contrôle sans métal après 120 h. Ce phénomène est connu sous le nom d' « effet d'hormèse » où on observe une stimulation de la croissance à de faibles concentrations en métal. Ce phénomène est observé à des faibles doses d'un produit chimique aboutissant à un effet bénéfique pour un organisme ou des cellules, malgré qu'il peut être dommageable à des concentrations plus importantes (Mattson, 2008). De ce fait, un stress chimique très faible ne cause pas un effet biologique négatif mais bien le contraire. L'analyse statistique ( $p > 0,05$ ) montre toutefois que pour la densité cellulaire, la différence n'est pas significative entre les traitements (10 et 50 nM) et le contrôle.
- En contrepartie, la différence entre la croissance algale à des concentrations comprises entre 1000 et 5000 nM et le témoin est significative avec  $p < 0,05$ . Le Tableau 3.1 montre les p-value pour chaque couple (traitement – témoin). Le Tableau 3.2 représente les valeurs des taux de division pour chaque traitement ainsi que les valeurs de p-value correspondante à chaque couple (Traitement-témoins). On remarque que les résultats du test ANOVA qui compare les densités cellulaires et ceux des divisions cellulaires des traitements et des témoins sont semblables, avec une légère différence pour les échantillons de 1000 nM. En effet, la différence est significative lorsque l'on compare les densités cellulaires de ces traitements par rapport aux témoins, ce qui n'est pas le cas pour le taux de division.

Tableau 3-1 : One-way ANOVA test : p-value entre les densités cellulaires à 120 h.

	<b>p</b>	<b>p &lt; 0,05</b>
<b>Témoin vs. 5000 nM</b>	< 0,001	Oui
<b>Témoin vs. 3000 nM</b>	0,016	Oui
<b>Témoin vs.1000 nM</b>	0,010	Oui
<b>Témoin vs. 500 nM</b>	1,00	Non
<b>Témoin vs. 100 nM</b>	1,00	Non
<b>Témoin vs. 50 nM</b>	1,00	Non
<b>Témoin vs 10 nM</b>	1,00	Non

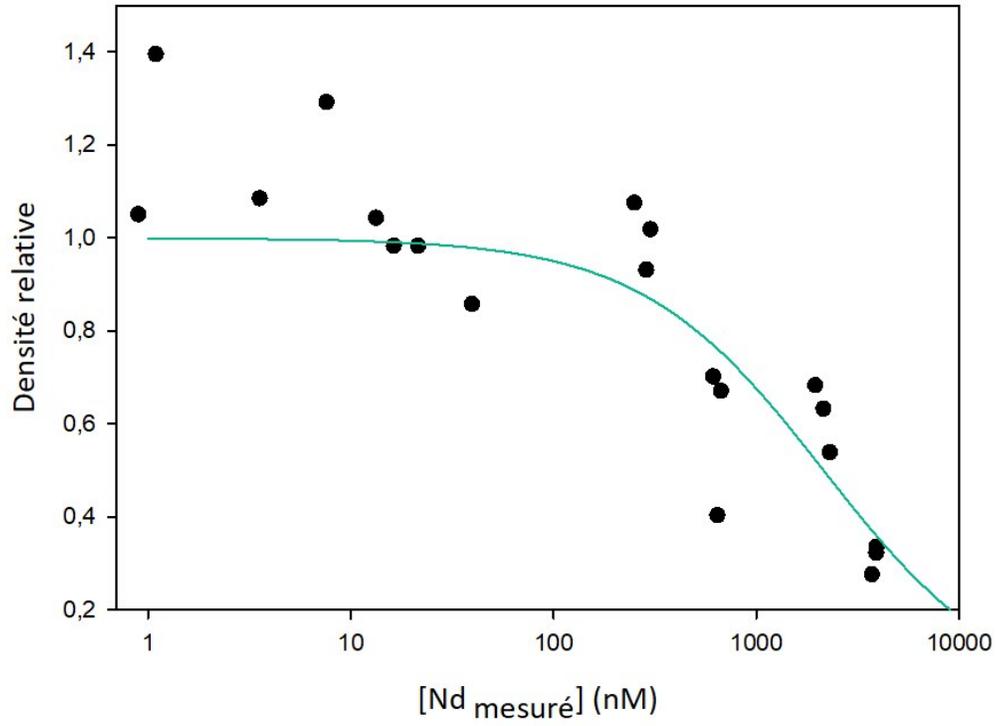
Tableau 3-2: One-way ANOVA test : p-value entre les taux de division cellulaire de *C. fusca* après 120 h d'exposition au Nd (n=3).

	<b><math>\mu</math> (j<sup>-1</sup>)</b>	<b>p</b>	<b>p &lt; 0,05</b>
<b>Témoin vs. 5000 nM</b>	0,42 ± 0,007	< 0,001	Oui
<b>Témoin vs. 3000 nM</b>	0,55 ± 0,16	0,165	Non
<b>Témoin vs.1000 nM</b>	0,517 ± 0,65	0,1	Oui
<b>Témoin vs. 500 nM</b>	0,63 ± 0,02	1,00	Non
<b>Témoin vs. 100 nM</b>	0,61 ± 0,002	1,00	Non
<b>Témoin vs. 50 nM</b>	0,65 ± 0,005	1,00	Non
<b>Témoin vs 10 nM</b>	0,64 ± 0,037	1,00	Non

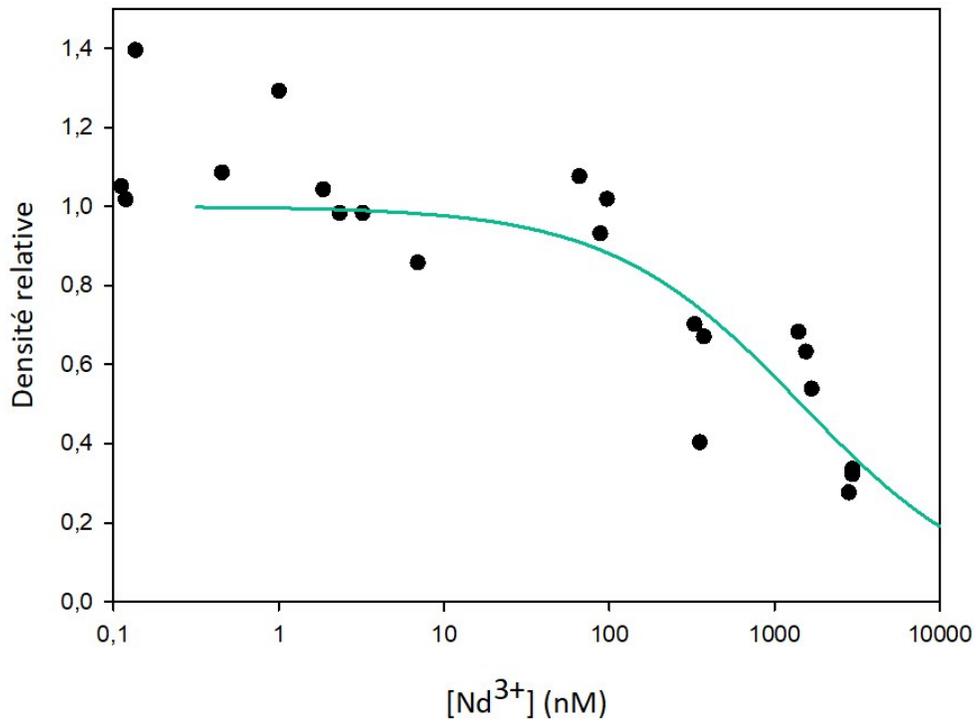
Les données brutes des densités cellulaires de *C. fusca* et des concentrations mesurées et libres sont représentées dans le Tableau 6.4 de l'annexe.

#### **b. Courbe dose-réponse**

Les expériences d'exposition de l'algue *Chlorella fusca* ont permis de tracer les courbes dose-réponse obtenues après 120 h (Figure 3.10 (a) et (b)).



(a)



(b)

Figure 3-10 : Densité relative en fonction des concentrations de néodyme mesurées (a) et en fonction de l'ion libre en Nd (b) après 120 h d'exposition.

La Figure 3.10 (a) visualisant la concentration algale en fonction de chaque concentration mesurée permet de déterminer la concentration efficace médiane qui cause 50 % d'inhibition de croissance (CE50). Cette valeur est égale à 2160 nM (avec un intervalle de confiance à 95 % de 1250-3690 nM). L'analyse de variance donne une valeur du facteur F de 55 avec p-value < 0.05.

Après avoir déterminé les concentrations en ion libre à partir de concentrations totales mesurées (Tableau 6.4 de l'annexe), les densités relatives sont dressées en fonctions de l'ion libre et la CE50 exprimée en  $\text{Nd}^{3+}$  a été déterminée (Figure 3.10 (b)). Cette dernière est de 1180 nM avec un  $\text{IC}_{95\%} = [624 - 2230 \text{ nM}]$ . Pour ce cas, la régression est significative (p-value <  $\alpha$ ) avec un F égal à 70. La CE50 exprimée en ion libre est différente de celle exprimée en concentrations totales mesurées puisque le Nd est présent sous forme libre à des pourcentages de 12 et 15 % pour des faibles concentrations. Ce pourcentage est plus important lorsque la concentration mesurée augmente. Il est d'environ 50 % et 70 % pour les des concentrations nominales de 1000 et 5000 nM. Les pourcentages en ions libres sont présentés dans le Tableau 3.3.

**Tableau 3-3: : Pourcentages en  $\text{Nd}^{3+}$  dans les milieux d'exposition.**

<b>Concentration nominale</b>	<b>Pourcentage en ion libre</b>
<b>10 nM</b>	12 % $\pm$ 0 %
<b>50 nM</b>	13 % $\pm$ 1 %
<b>100 nM</b>	15% $\pm$ 2 %
<b>500 nm</b>	30 % $\pm$ 3 %
<b>1000 nM</b>	55 % $\pm$ 1 %
<b>3000 nM</b>	72 % $\pm$ 1 %
<b>5000 nM</b>	76 % $\pm$ 0 %

Le Tableau 3.4 compare les valeurs des CE50 de Nd et celles du La obtenues lors d'un travail de recherche réalisé sur la même espèce d'algue au sein de notre équipe (Singing, 2017). On remarque que les CE50 du Nd sont 4 et 6 fois plus grandes que celles du La pour les concentrations en ion libre et totales mesurées respectivement.

**Tableau 3-4: Comparaison entre les valeurs de CE50 obtenues de Nd et de La sur *C. fusca*.**

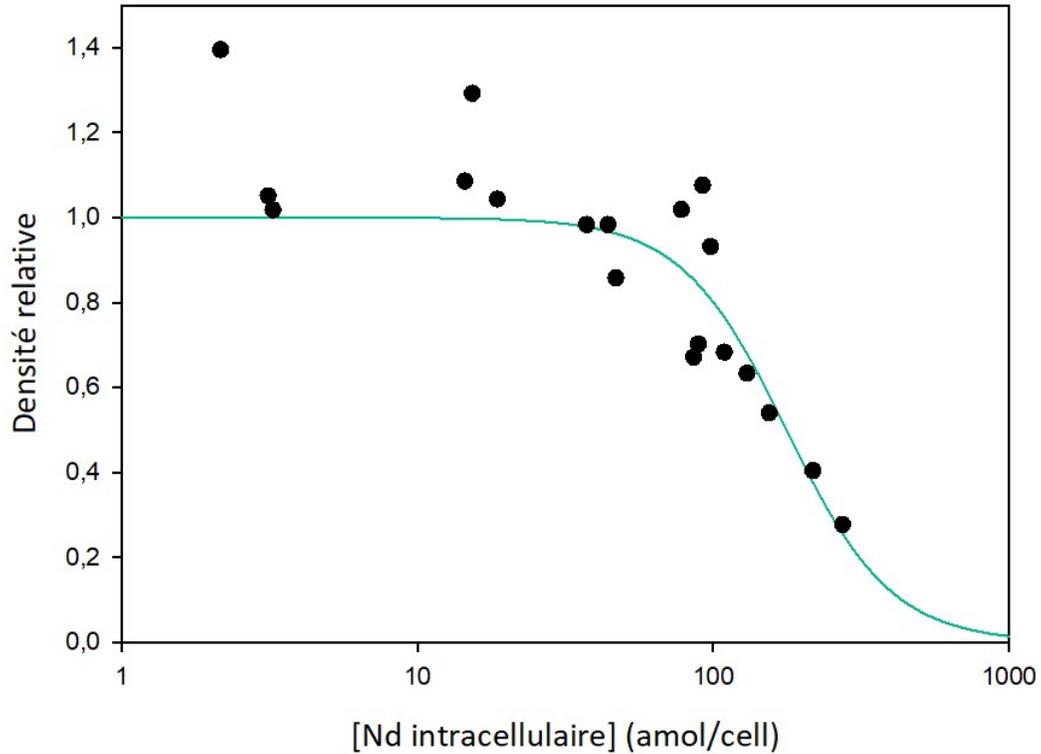
	<b>[Nd<sup>3+</sup>] (nM)</b>	<b>[Nd<sub>mesuré</sub>] (nM)</b>	<b>[La<sup>3+</sup>] (nM) *</b>	<b>[La<sub>mesuré</sub>] (nM) *</b>
<b>CE50</b>	1180	2160	280	360
<b>Intervalle de confiance</b>	[624 – 2230]	[1250 – 3690]	[67,5 – 630]	[140 – 780]

\*(Signing, 2017)

#### **3.2.1.4 Accumulation : Néodyme internalisé**

La densité relative est exprimée en fonction du Nd internalisé et la CE50 en métal internalisé a été déterminée. Selon une étude précédente au sein de nos laboratoires, la CE50 du lanthane en présence d'acide malique est de 48 amol/cell avec un intervalle de confiance (IC<sub>95%</sub>) de [20-80] (Singing, 2017). La CE50 du Nd obtenue au cours de nos expériences correspond au triple de la valeur précédemment déterminée (pour le lanthane) : elle est de 177 amol/cellule avec un intervalle de confiance de [137 – 222] amol/cellule. L'analyse de variance donne un F d'une valeur de 50 avec un p-value <  $\alpha$ .

Les résultats illustrés à la Figure 3.11 montrent que plus la concentration internalisée en métal en question est importante, plus nous obtenons une baisse de la densité relative qui traduit une diminution au niveau de la concentration cellulaire à différents traitements par rapport au témoin sans métal. Comme on l'observe dans la Figure 3.11, au-delà d'une concentration intracellulaire de Nd de 100 amol/cell ( $\log(100) = 2$ ), on obtient un fort impact sur la population.



**Figure 3-11 : Les densités relatives de *C. fusca* en fonction de la concentration intracellulaire de Nd après 120 h d'exposition.**

Les concentrations en Nd internalisé par cellule ont été également exprimées en fonction des concentrations moyennes mesurées au cours du temps (Figure 3.12), ainsi que des concentrations en Nd libre (Figure 3.13). Ces figures montrent que la quantité de métal internalisé augmente parallèlement avec l'augmentation des concentrations totales et libre de métal d'intérêt. On remarque que l'accumulation du métal à l'intérieur de la cellule augmente linéairement avec une représentation graphique en logarithmique.

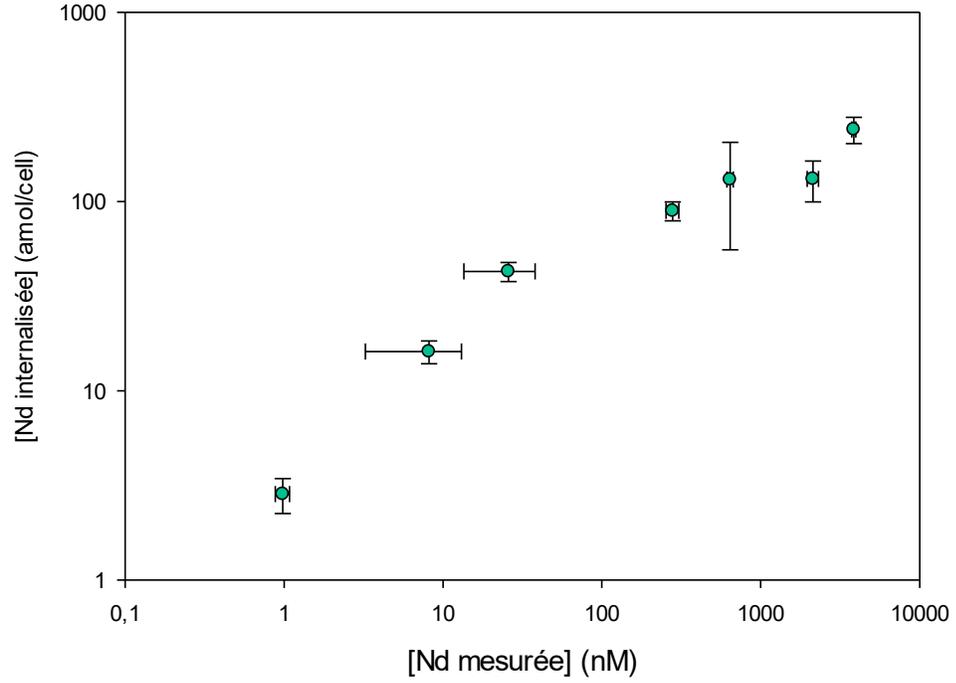


Figure 3-12 : Nd internalisé chez *C. fusca* en fonction des concentrations en Nd totales mesurées dans le milieu au cours du temps (les barres d'erreurs représentent les écarts-types).

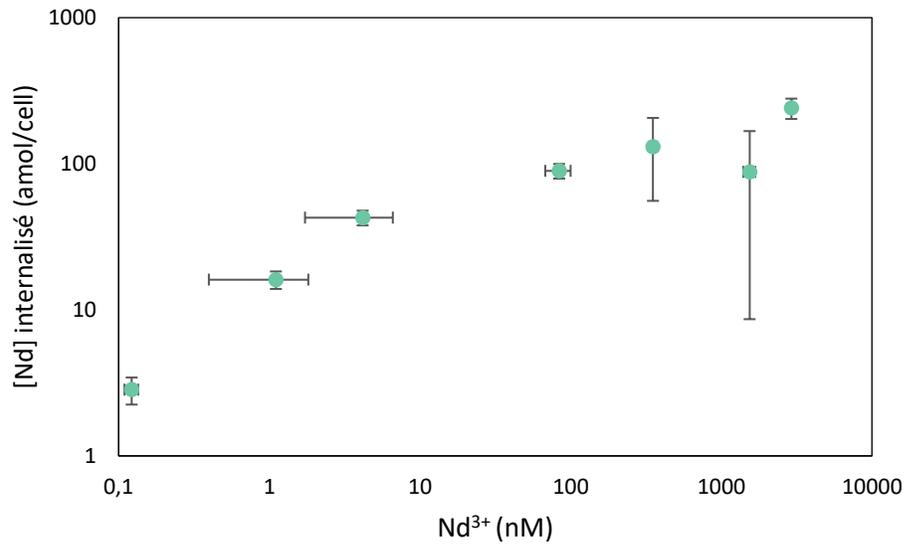
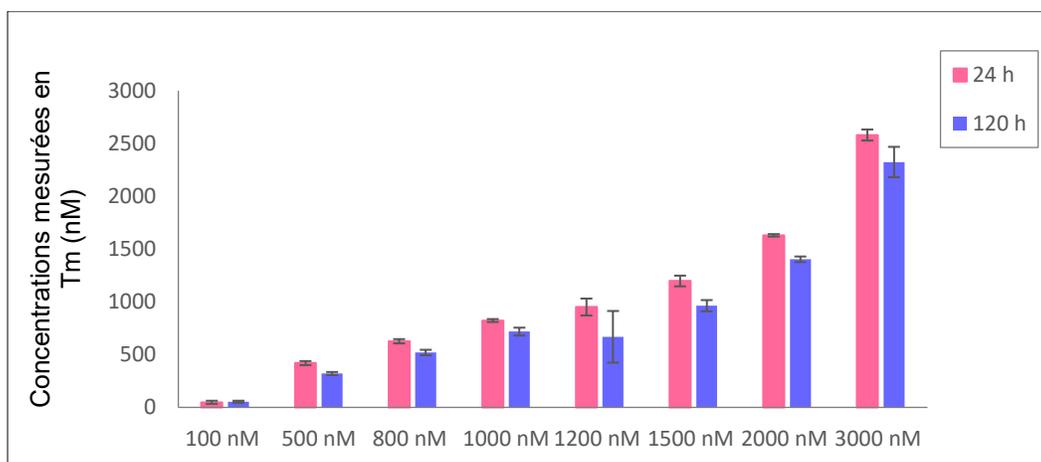


Figure 3-13. Nd internalisé chez *C. fusca* en fonction de la concentration en ion libre (les barres d'erreurs représentant les écarts-types sont présentées).

### 3.2.2 Exposition au thulium

#### 3.2.2.1 Suivi des concentrations

La quantité en Tm présent dans le milieu de culture a été analysée au cours du temps. La Figure 3.14 montre la variation de la concentration après 120 h d'exposition. Les données sont présentées au Tableau 6.2 à l'annexe.



**Figure 3-14 : Concentration du thulium en présence d'algues après 24 et 120 heures d'exposition à une gamme entre 100 nM et 3000 nM (les barres d'erreurs représentent les écarts-types).**

On note que la baisse est plus prononcée à faible concentration de Tm avec les pourcentages d'écart suivants : 24 ( $\pm 1,5$ ), 17 ( $\pm 1,5$ ), 13 ( $\pm 1,43$ ) et 9,9 ( $\pm 3,1$ ) % pour les concentrations 500, 800, 1000 et 3000 nM respectivement.

#### 3.2.2.2 L'adsorption

Vers la fin de l'exposition, le Tm adsorbé à la surface de *C. fusca* est déterminé par digestion. La Figure 3.15 illustre cette quantité pour chaque concentration d'exposition. Le métal adsorbé varie avec l'augmentation de la concentration du Tm en solution. Une régression linéaire est réalisée pour examiner si la concentration totale présente en solution d'exposition peut prédire celle adsorbée au niveau de la paroi cellulaire de *C. fusca*. Le résultat est aussi montré dans la Figure 3.15. Les prémisses de cette analyse statistique sont vérifiées à l'aide du logiciel SPSS : nous n'observons pas des points « aberrants » ou atypiques puisque les résidus standardisés sont de -2,42 et de 1,69. Le test Durbin-Waston donne un facteur « d » égal à 0,799 ceci signifie que l'indépendance des termes d'erreurs est vérifiée. La figure des probabilités vérifie la condition de la distribution normale de l'erreur (Figure 3.16). Pour valider la condition d'homoscédasticité, il faut tracer les résidus en fonction des valeurs prédites. Si ce tracé

donne une structure définie, la condition n'est pas validée : dans notre cas les points se propagent sous forme d'une tendance comme le montre la Figure 3.17. Ainsi, nous avons alors une condition qui n'est pas vérifiée. En regardant l'analyse statistique, on conclut que la concentration en Tm total présent dans le milieu d'exposition des cellules algales prédit significativement le Tm adsorbé à la surface de la cellule algale : le facteur F est égal à 18,51 avec  $p < 0,005$  et avec une variabilité en Tm adsorbé de 50 % expliquée par le Tm libre. La condition d'homoscédasticité qui n'a pas été vérifiée comme discuté plus haut, nous mène à décider de ne pas prendre en compte la significativité de ce modèle. En effet l'hétéroscédasticité tend à produire un p-value plus petit qu'il ne devrait l'être.

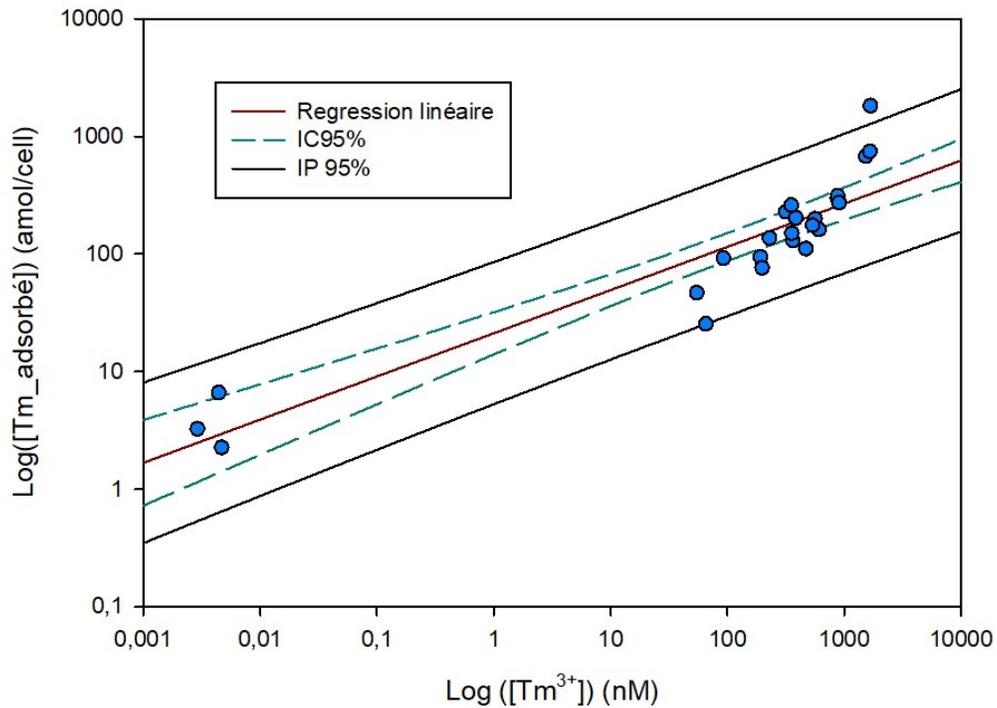


Figure 3-15 : Thulium adsorbé au niveau de la surface biologique de *C. fusca*.

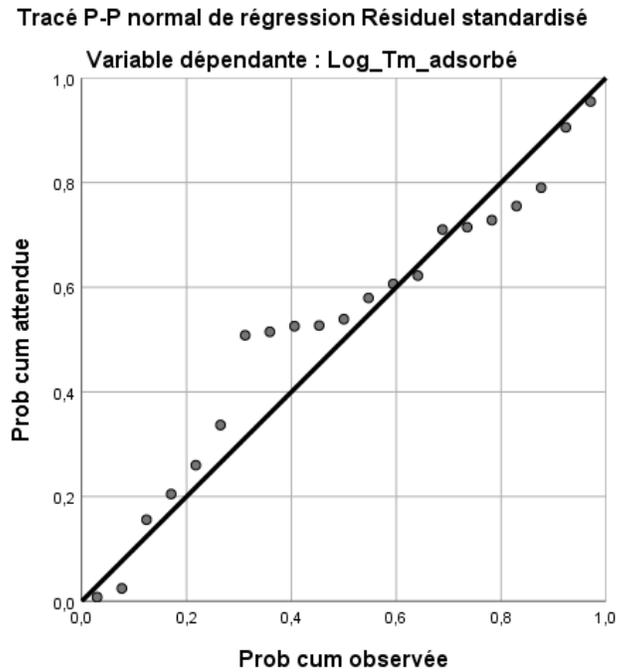


Figure 3-16 : Tracé des résidus en fonction du prédits : vérification de la distribution normale.

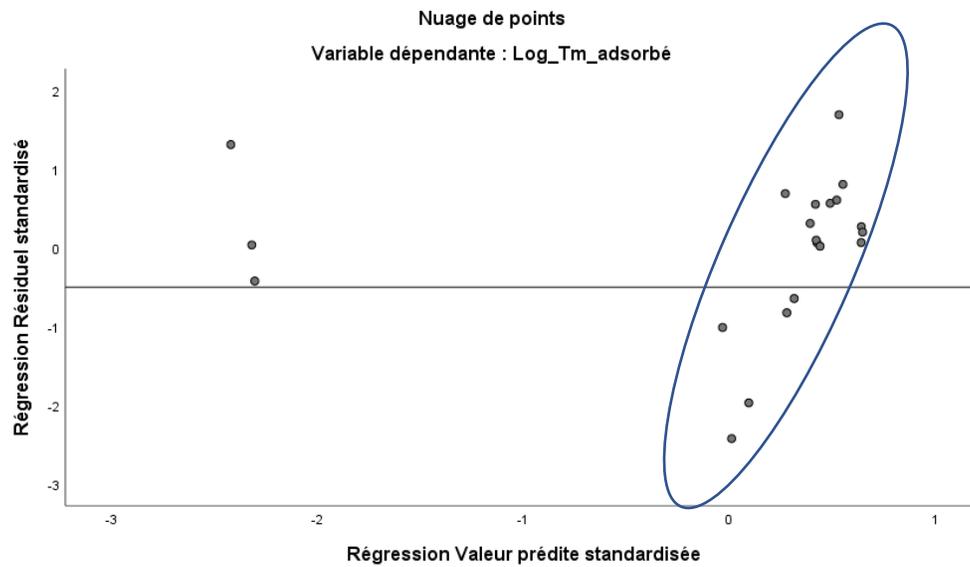


Figure 3-17 : Tracé des résidus (erreurs) en fonction des valeurs prédites : vérification de l'homoscédasticité.

### 3.2.2.3 Toxicité : Effet du thulium sur la croissance

#### a. Courbe de croissance

Les courbes de croissance obtenues sont présentées dans la Figure 3.18. Chaque point correspond à la moyenne de la croissance des échantillons exposés à la même concentration de thulium et les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types de ces mesures.

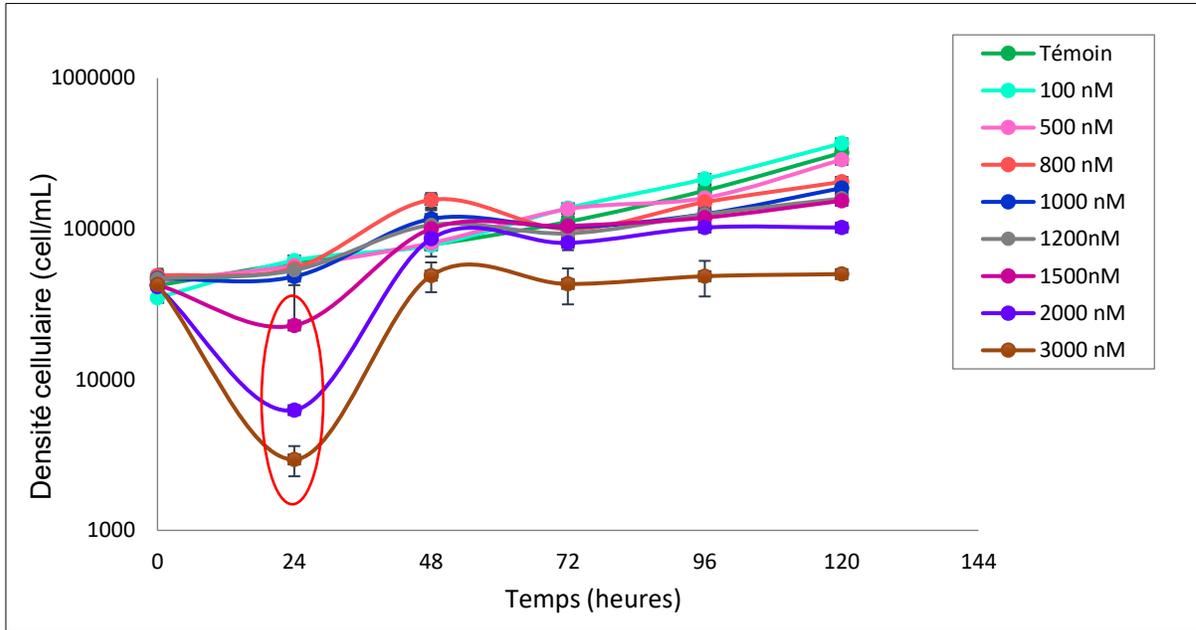


Figure 3-18 : Profils de croissance cellulaire de *C. fusca* en présence de différentes concentrations du Tm au cours du temps. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types sur les mesures.

On remarque qu'après 24 h d'exposition une baisse de la densité algale pour les concentrations les plus élevées en Tm de 1500 nM à 3000 nM. Cela peut-être dû à une formation des agglomérats d'algues, ce qui empêche la lecture des algues (empêche le passage des particules dont leur diamètre dépasse celui du compteur à particule). Une observation microscopique pourrait être utile pour confirmer cette possibilité.

Après 24 et 48 h d'exposition, aucune des concentrations testées ne donne une densité cellulaire différente significativement des témoins sauf pour la concentration 3000 nM ( $p < 0,05$ ). Après 72 h d'exposition la différence est significative pour les concentrations 2000, 3000, 500 et 100 nM avec un effet d'hormèse pour ces deux dernières

concentrations. Après 96 h de traitement, toutes les concentrations testées sont différentes significativement du témoin. L'effet d'hormèse est toujours obtenu à une concentration de 100 nM. À 120 h, on observe une différence entre la population algale de toutes les concentrations testées avec les témoins. L'effet d'hormèse est observé pour 100 nM avec une stimulation significative de croissance de 15,5 % par rapport au témoin sans Tm. L'inhibition de la croissance est de 10, 35, 41, 50, 52, 68 et 78% pour les concentrations variant de 500 à 3000 nM.

Les Tableaux 3.5 et 3.6 présentent les valeurs de p-value obtenues à partir du test ANOVA à 72 et 120 h respectivement. Les taux de croissance ont été calculés pour chaque concentration entre t0 et t5 (après 120 h). L'analyse statistique entre le taux de la croissance cellulaire des témoins et celles des traitements montre une différence significative sauf pour les résultats de traitements à 500 nM. Les résultats sont montrés dans le tableau 3.7.

**Tableau 3-5: One-way ANOVA test : p-value entre les densités cellulaires à 72 h.**

	<b>p</b>	<b>p &lt; 0,050</b>
<b>Témoin vs. 3000 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 2000 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 100 nM</b>	0,005	Oui
<b>Témoin vs. 500 nM</b>	0,01	Oui
<b>Témoin vs. 1200 nM</b>	0,076	Non
<b>Témoin vs. 800 nM</b>	0,592	Non
<b>Témoin vs. 1000 nM</b>	1	Non
<b>Témoin vs. 1500 nM</b>	1	Non

**Tableau 3-6: One-way ANOVA test : p-value entre les densités cellulaires à 120 h.**

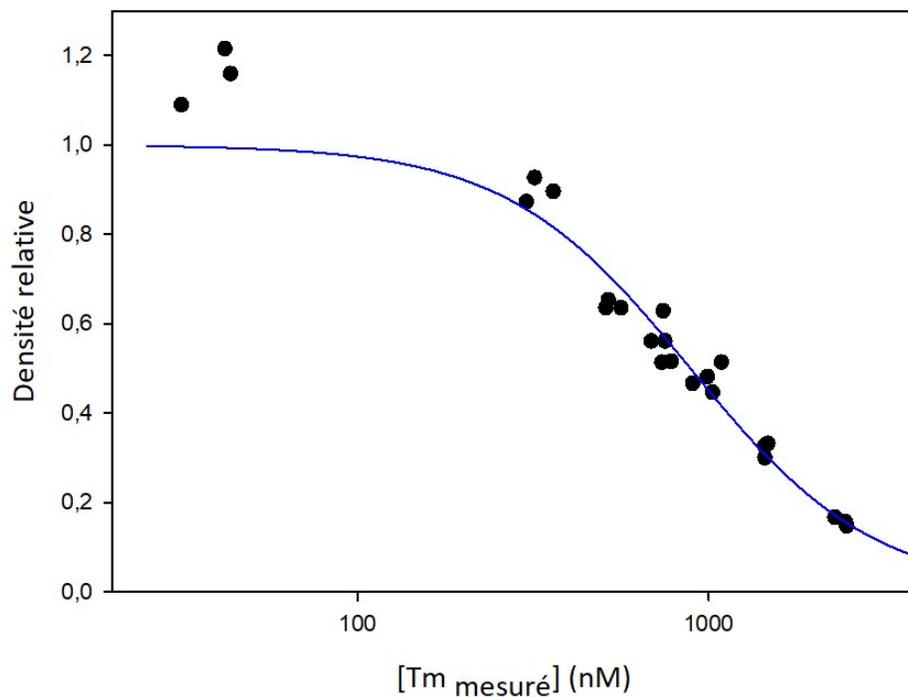
	<b>p</b>	<b>p &lt; 0,050</b>
<b>Témoin vs. 3000 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 2000 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 1500 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 1000 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 800 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 100 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 500 nM</b>	0,042	Oui

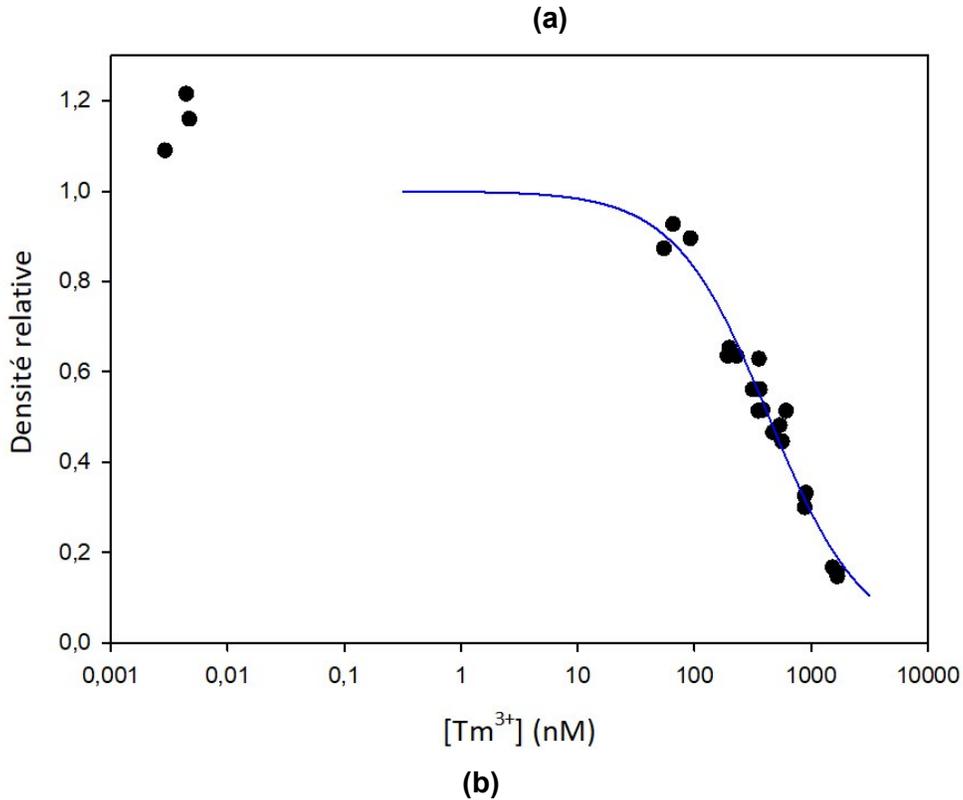
Tableau 3-7: One-way ANOVA test : p-value entre les taux de division cellulaire de *C. fusca* après 120 h d'exposition au Tm.

	$\mu$ ( $j^{-1}$ )	$p < 0,050$
Témoin vs. 3000 nM	$0,03 \pm 0,02$	<0,001
Témoin vs. 2000 nM	$0,18 \pm 0,008$	<0,001
Témoin vs. 1500 nM	$0,26 \pm 0,01$	<0,001
Témoin vs. 1200 nM	$0,25 \pm 0,01$	<0,001
Témoin vs. 1000 nM	$0,28 \pm 0,016$	<0,001
Témoin vs. 800 nM	$0,29 \pm 0,025$	<0,001
Témoin vs. 100 nM	$0,47 \pm 0,01$	<0,001
Témoin vs. 500 nM	$0,37 \pm 0,006$	0,136

b. Courbe dose réponse

La Figure 3.19 illustre la variation de la densité relative de *C. fusca* en fonction de la concentration moyenne en Tm mesurée au cours du temps dans la solution (illustration a) et en fonction de l'ion libre (illustration b).



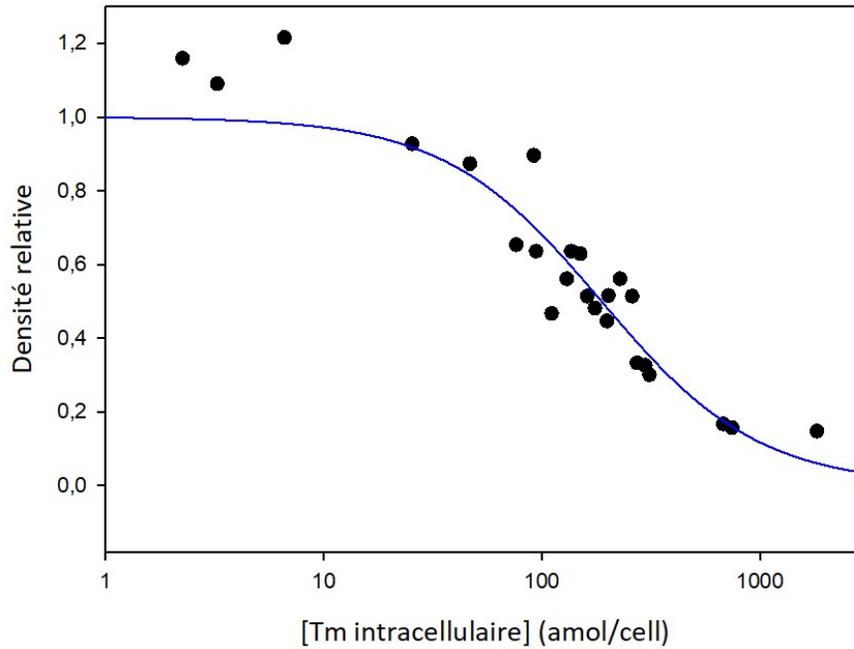


**Figure 3-19 : Densité relative de *C. fusca* en fonction des concentrations de thulium mesurées (a) et en fonction de l'ion libre en Tm (b) après 120 d'exposition.**

La CE50 exprimée en concentration mesurée totale du Tm est de 888 nM avec un intervalle de confiance à 95 % de [802 – 983] nM. Cette valeur est de 435 nM avec un IC<sub>95%</sub> de [375 – 503] nM exprimé en ion de Tm<sup>3+</sup> libre.

#### **3.2.2.4 Accumulation : Thulium internalisé**

La CE50 exprimé en Tm internalisé est déterminée après avoir dressé la courbe dose-réponse. Sa valeur est de 187 amol/cell avec un intervalle de confiance de [156 – 225] amol/cell ( $F = 179$ ,  $p\text{-value} < \alpha$ ).



**Figure 3-20 : La densité relative de *C. fusca* en fonction de la concentration intracellulaire du thulium après 120 h d'exposition.**

Les Figures 3.21 et 3.22 présentent les concentrations en Tm internalisé en fonction des concentrations moyennes mesurées et en fonction des concentrations en  $Tm^{3+}$  libre présent dans le milieu, respectivement. On constate que la concentration intracellulaire du Tm augmente avec l'augmentation de la concentration en  $Tm^{3+}$ .

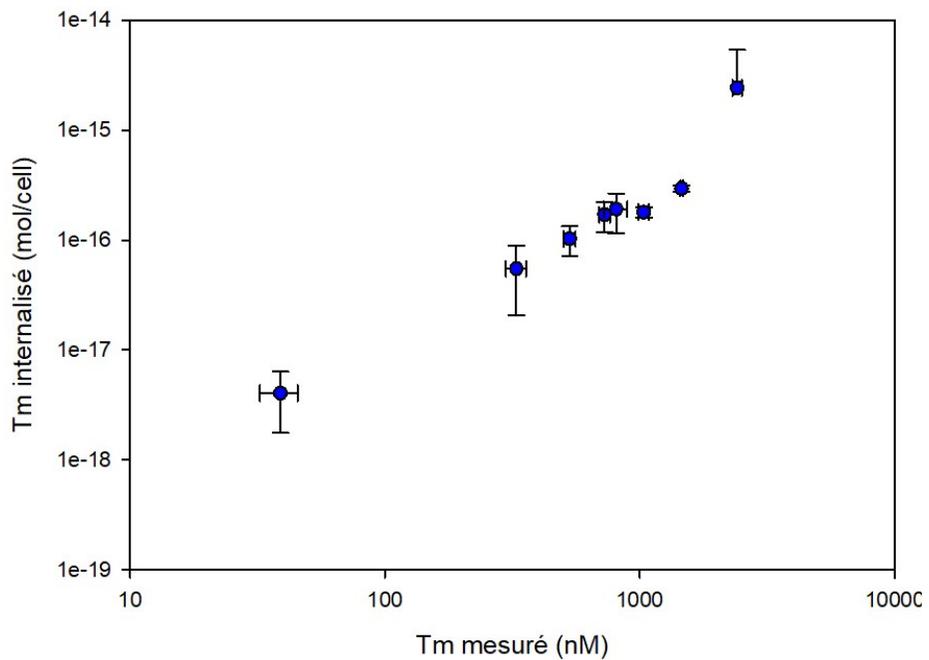


Figure 3-21 : Tm internalisé chez *C. fusca* en fonction de la moyenne des concentrations en Tm mesurée au cours du temps.

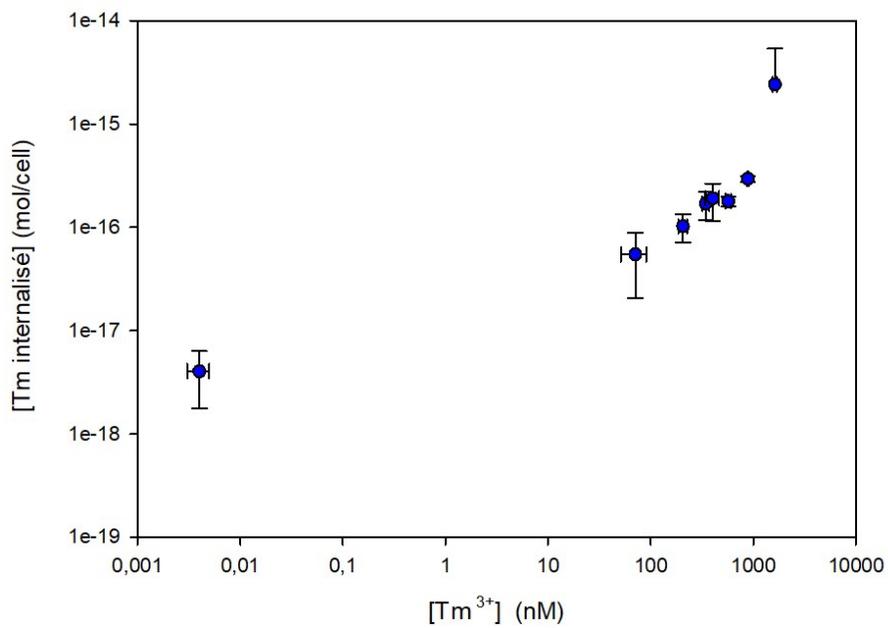


Figure 3-22 : Tm internalisé chez *C. fusca* en fonction des concentrations en ions libres.

### 3.2.3 Exposition à l'yttrium

#### 3.2.3.1 Suivi des concentrations

La toxicité de l'yttrium a été étudiée sur l'algue *C. fusca*. Le suivi de la concentration de ce métal a été effectué sur une période de 120 h. La Figure 3.23 présente la variation de l'Y en solution entre 24 et 120 h. On observe une baisse de la concentration de l'Y en présence des algues. On note qu'une diminution prononcée pour les concentrations faibles avec des pourcentages d'écart, représentant la perte, de : 79, 67, 48, 44, 26, 20, 15 et 14 % respectivement pour les concentrations : 10, 20, 50, 100, 200, 350, 600 et 800 nM.

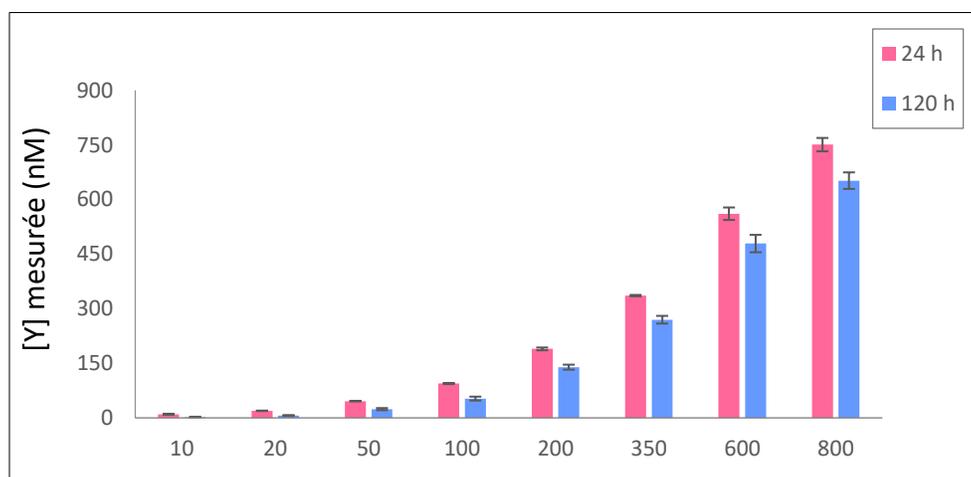


Figure 3-23 : Concentration de l'yttrium en présence d'algues après 24 et 96 heures d'exposition à une gamme entre 20 et 800 nM.

#### 3.2.3.2 L'adsorption

Les concentrations en Y adsorbé à la paroi cellulaire de *C. fusca* sont dressées en fonction des concentrations en ions libres de l'Y au cours du temps. La régression linéaire de ces points est aussi dressée. Le résultat est représenté dans la Figure 3.24. Cette figure montre que la majorité des points sont proches de la droite linéaire et que le coefficient de détermination  $r^2$  est égale à 0,7. Cela signifie que 70 % de la variance des concentrations du métal adsorbé est prédite à partir des concentrations  $Y^{3+}$ . La corrélation est positive c'est-à-dire lorsque la concentration en Y présent en solution augmente d'une unité, la concentration de l'Y adsorbé augmente d'un facteur de  $0,7 \times 10^{-5}$  unités.

L'équation de régression est :  $y = 0,002 + 0,7 \cdot 10^{-5} \cdot x$

Les prémisses de cette approche ont été vérifiées via le logiciel SPSS : les résidus standardisés ne dépassent pas l'intervalle  $[-3,29 - 3,29]$ , cela signifie l'absence des points atypiques. Le coefficient «d» donné par le test Durbin-Waston est égale à 1,05 donc l'indépendance des termes d'erreurs est vérifiée. Le tracé des résidus en fonction des valeurs prédites ne donne aucune forme définie (Figure 3.25). Ceci vérifie que pour toutes les valeurs du prédicteur (concentration en ions libres), la variance des erreurs des mesures est homogène. En regardant l'analyse statistique, on conclut que la concentration en  $Y^{3+}$  libre présent dans le milieu d'exposition des cellules algales prédit significativement l' $Y$  adsorbé à la cellule,  $F = 27,52$  avec  $p < 0,005$ .

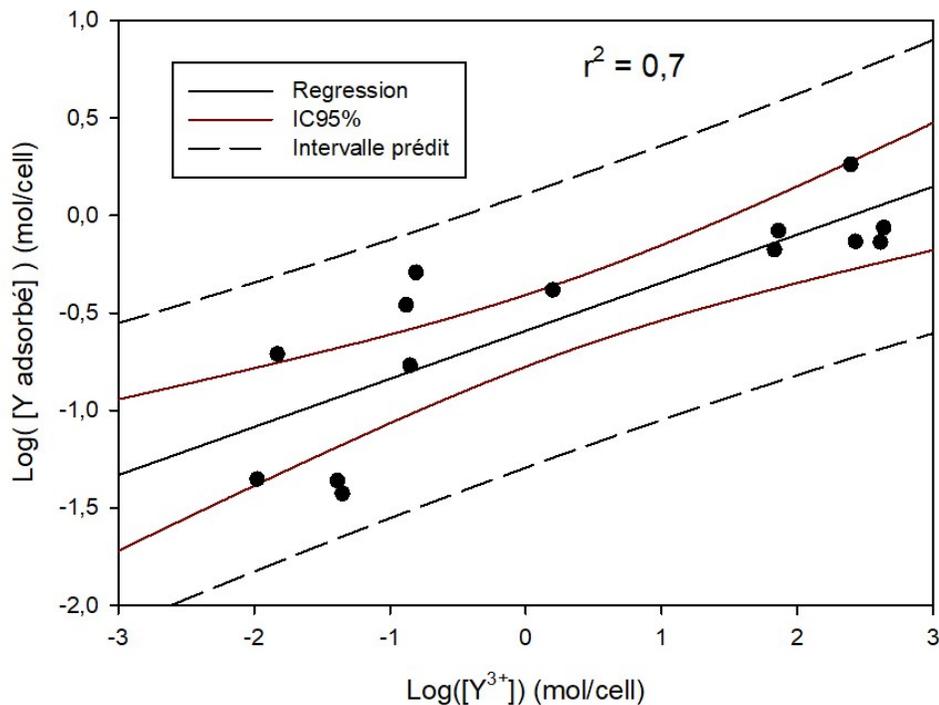


Figure 3-24 : Yttrium adsorbé au niveau de la surface plasmique de *C. fusca* après 120 h d'exposition en fonction de la concentration en  $Y^{3+}$  libre ( $y = 0,7 \cdot 10^{-5} \cdot x + 0,002$ ).

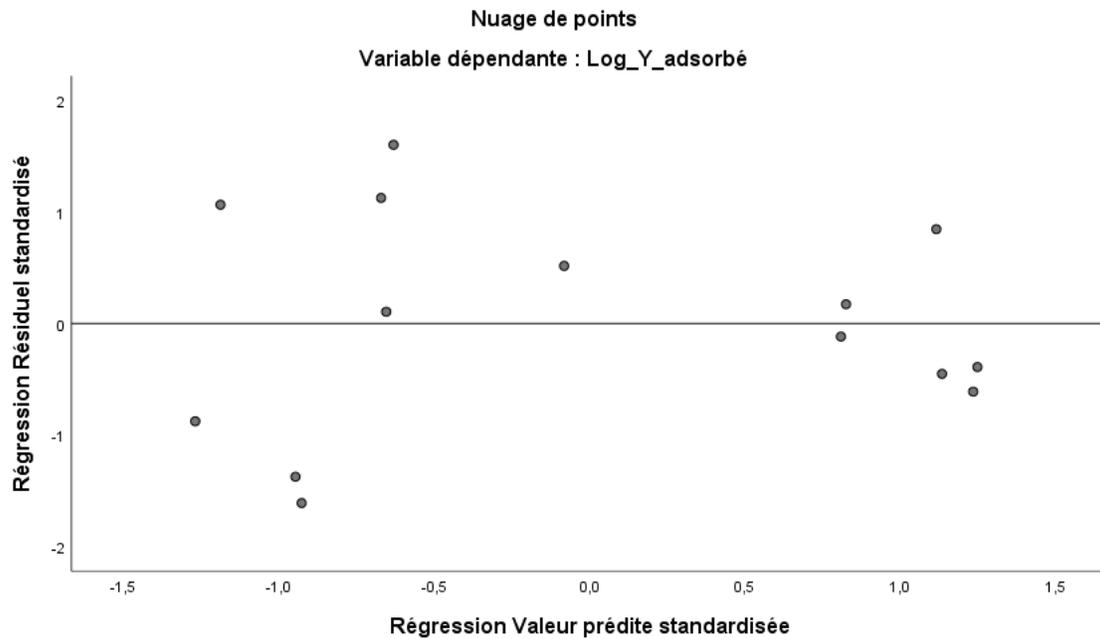
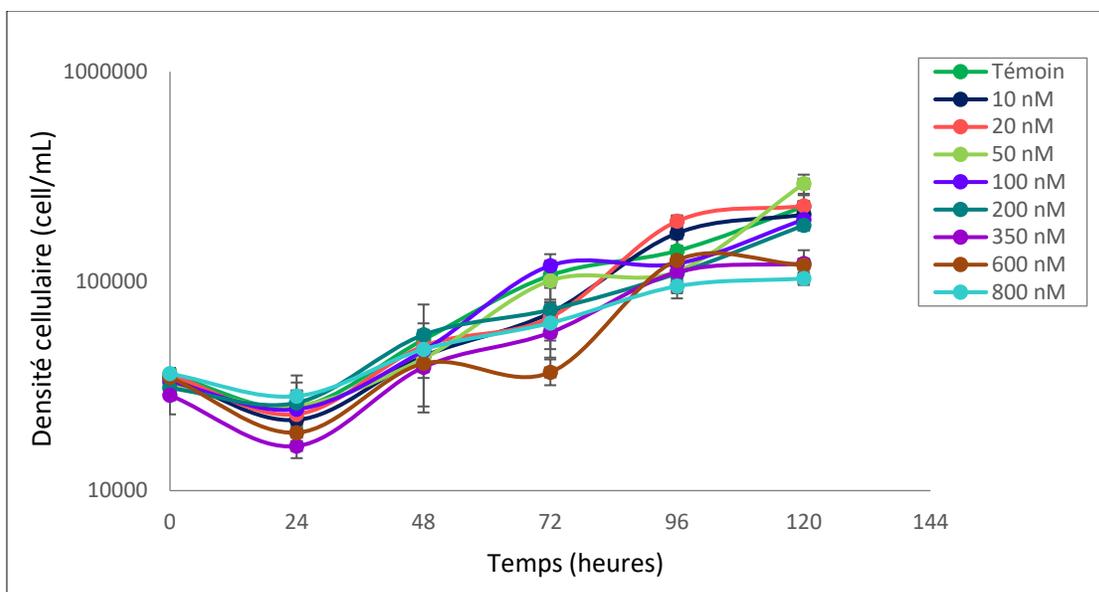


Figure 3-25 : Tracé des résidus (erreurs) en fonction des valeurs prédites : vérification de l'homoscédasticité.

### 3.2.3.3 Toxicité : Effet de l'yttrium sur la croissance

#### a. Courbe de croissance

Les courbes de croissance obtenues sont présentées à la Figure 3.26. Chaque point correspond à la moyenne de la croissance des échantillons de même concentration de l'yttrium et les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types de ces mesures. Au cours de cette expérience, nous avons rencontré un problème technique au niveau du compteur à particules ce qui nous a forcé à se contenter de deux lectures pour quelques échantillons de chaque triplicata.



**Figure 3-26 : Profils de croissance cellulaire de *C. fusca* en présence de différentes concentrations d'Y au cours du temps. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types sur les mesures.**

Après 24 h d'exposition, on remarque qu'il y a une réduction de la densité cellulaire, comparativement à la journée précédente pour toutes les conditions. Cette observation est obtenue dans d'autres travaux avec le cérium au sein de notre équipe (Beaubien, 2015) et avec des concentrations élevées en Tm au cours du présent projet. L'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les densités cellulaires du témoin et celles obtenues à différentes concentrations de l'Y qu'à 120 h pour les échantillons de 350, 600 et 800 nM. Il est observé que pour les échantillons de 50 nM la densité cellulaire est supérieure à celle des témoins quoique non-significatif. Cet effet d'hormèse était déjà identifié dans d'autres expériences en présence de Tm et Nd à des faibles concentrations. De même, ce phénomène est obtenu dans d'autres travaux de recherche avec la même espèce algale en présence d'autres lanthanides tels que le cérium pour des concentrations de 10, 50 et 100 nM (Beaubien, 2015).

Les résultats de comparaison statistique entre les densités cellulaires des témoins et celles obtenues à différentes concentrations d'exposition sont présentés dans le Tableau 3.8 :

Tableau 3-8: One-way ANOVA test : p-value entre les densités cellulaires à 120 h.

	<b>p</b>	<b>p &lt; 0,050</b>
<b>Témoin vs. 600 nM</b>	< 0,001	Oui
<b>Témoin vs. 800 nM</b>	0,005	Oui
<b>Témoin vs. 350 nM</b>	0,004	Oui
<b>Témoin vs. 50 nM</b>	1	Non
<b>Témoin vs. 200 nM</b>	1	Non
<b>Témoin vs. 100 nM</b>	1	Non
<b>Témoin vs. 10 nM</b>	1	Non
<b>Témoin vs. 20 nM</b>	1	Non

Le Tableau 3.9 présente les valeurs des taux de croissance de chaque traitement cellulaire et les p-value entre chaque couple (traitements – Témoins).

Tableau 3-9: One-way ANOVA test : p-value entre les taux de division cellulaire de *C. fusca* après 120 h d'exposition à l'Y.

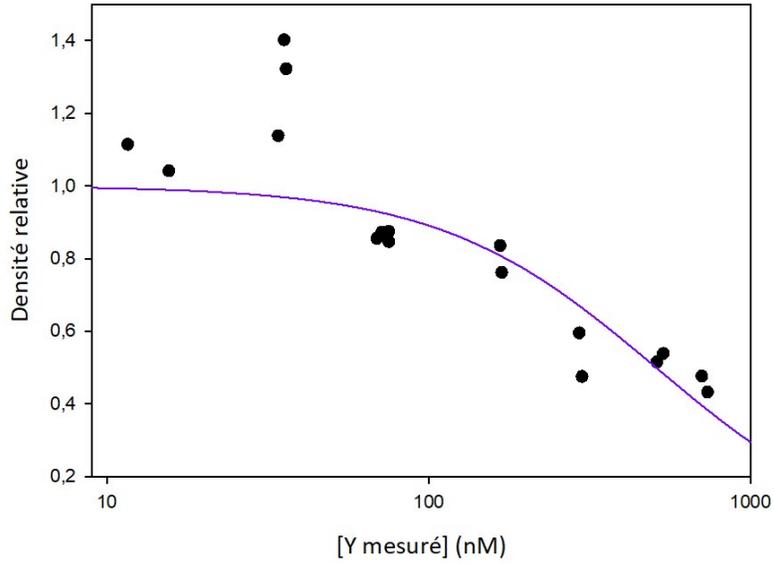
	<b><math>\mu</math> (j<sup>-1</sup>)</b>	<b>p</b>	<b>P &lt; 0,050</b>
<b>Témoin vs. 800 nM</b>	0,02 ± 0,016	< 0,001	Oui
<b>Témoin vs. 600 nM</b>	0,25 ± 0,008	0,016	Oui
<b>Témoin vs. 350 nM</b>	0,027 ± 0,07	0,047	Oui
<b>Témoin vs. 200 nM</b>	0,36 ± 0,022	1	Non
<b>Témoin vs. 100 nM</b>	0,036 ± 0,03	1	Non
<b>Témoin vs. 50 nM</b>	0,44 ± 0,04	1	Non
<b>Témoin vs. 10 nM</b>	0,037 ± 0,012	1	Non
<b>Témoin vs. 20 nM</b>	0,035 ± 0,021	1	Non

Les pourcentages d'inhibition de la croissance cellulaire sont les suivants : 8,3, 13, 19, 46, 47 et 55 % pour les concentrations respectives en Y de 10, 100, 200, 350, 600 et 800 nM par rapport au témoin après 120 h.

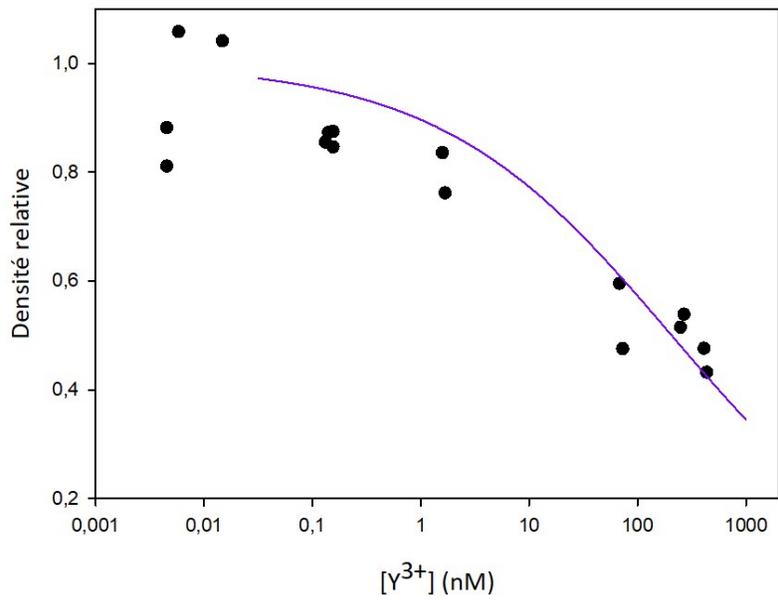
#### **b. Courbe dose-réponse**

La concentration efficace moyenne 50 % (CE50) de l'Y par rapport au rendement final de chaque traitement a été calculée à partir de la densité cellulaire moyenne du groupe témoin. La régression non linéaire est représentée à la Figure 3.27 ((a) en fonction des concentrations mesurées, (b) en fonction de l'ion libre en Y<sup>3+</sup>).

La valeur de CE50 exprimé en concentration totale du métal mesurée est de 508 nM avec un  $IC_{95\%}$  de [323 – 799] (F = 37,9 ; (p-value <  $\alpha$ )). Ce paramètre est de 206 [50 – 839] nM exprimé en ion libre d' $Y^{3+}$  (F = 38,2 ; (p-value <  $\alpha$ )).



(a)



(b)

Figure 3-27 : Densité relative en fonction des concentrations de l'yttrium mesurées (a) et en fonction de l'ion libre en  $Y^{3+}$  (b) après 120 h d'exposition.

### 3.2.3.4 Accumulation : Yttrium internalisé

La Figure 3.28 présente la régression de la densité cellulaire en fonction de la concentration intracellulaire de l'Y mesurée. Les résultats obtenus montrent que plus la concentration intracellulaire en Y augmente, plus les cellules sont affectées. Les points qui dépassent le 1 confirment l'effet d'hormèse que nous observons à des faibles concentrations de métal.

La valeur de la CE50 exprimée en Y internalisé est de 173 amol/cellule avec un intervalle de confiance (IC<sub>95%</sub>) de [114– 262].

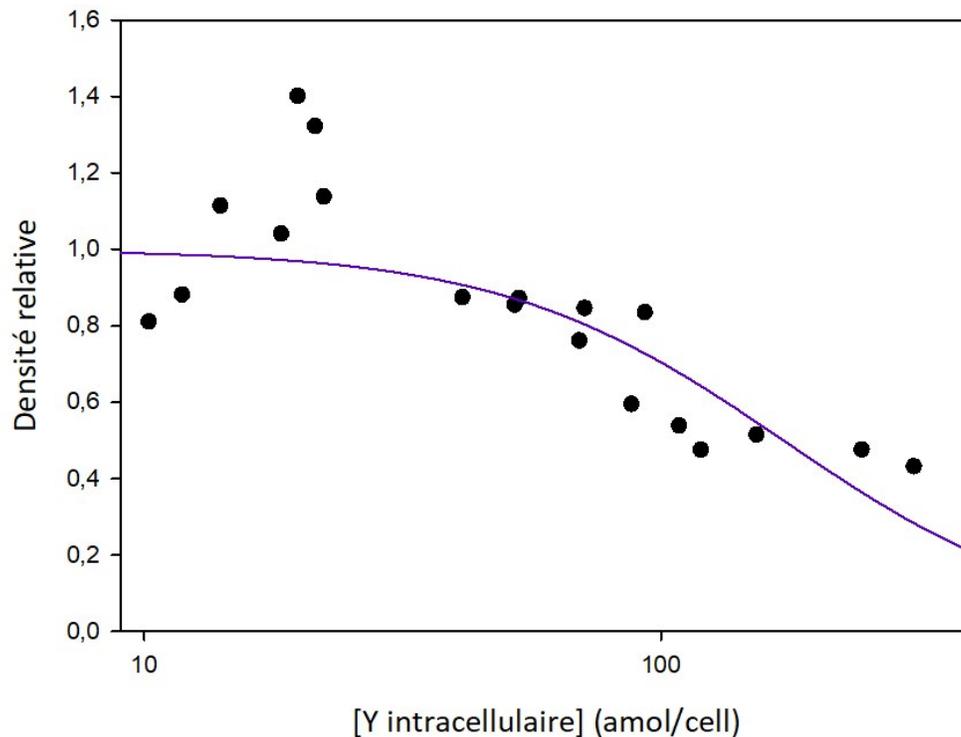


Figure 3-28 : Les densités relatives de *C. fusca* en fonction de la concentration intracellulaire de l'yttrium après 120 h d'exposition.

Les concentrations en Y internalisé sont présentées en fonction des concentrations calculées en métal libre. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.29.

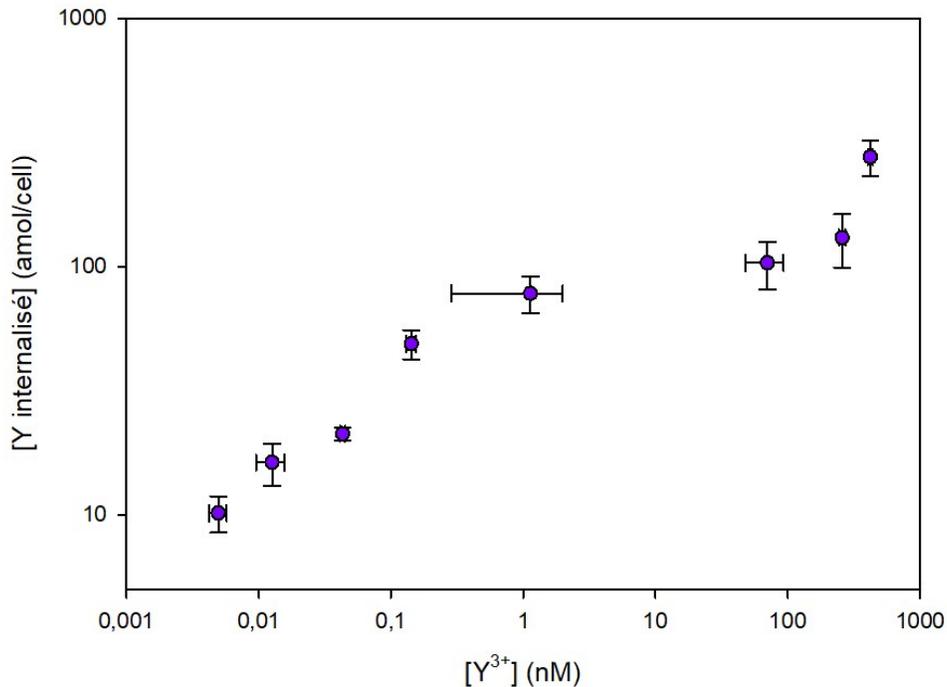


Figure 3-29 : Y internalisé chez *C. fusca* en fonction de la concentration en ions libres de l'Y<sup>3+</sup>.

### 3.3 Exposition de *C. reinhardtii*

La même démarche expérimentale établie avec *C.fusca* a été suivie sur une deuxième algue : *Chlamydomonas reinhardtii*. Cela nous a permis d'investiguer davantage sur la toxicité des TR et de comparer entre la réponse biologique entre les deux espèces algales.

#### 3.3.1 Exposition au néodyme

Une expérience en présence de différentes concentrations de Nd dans le milieu MHSM-2 à pH 5,0 a été effectuée pour tester la toxicité de ce métal sur *C. reinhardtii*. La gamme de concentration est la suivante : 10, 50, 150, 600, 1800, 3000 et 5000 nM. Chaque concentration a été testée à trois reprises. La densité cellulaire cible au lancement des expositions était de 38 000 cellules·mL<sup>-1</sup>.

### 3.3.1.1 Suivi des concentrations

La Figure 3.30 présente la variation du Nd en solution après 5 jours d'exposition. On observe une baisse de la concentration du Nd en présence des algues.

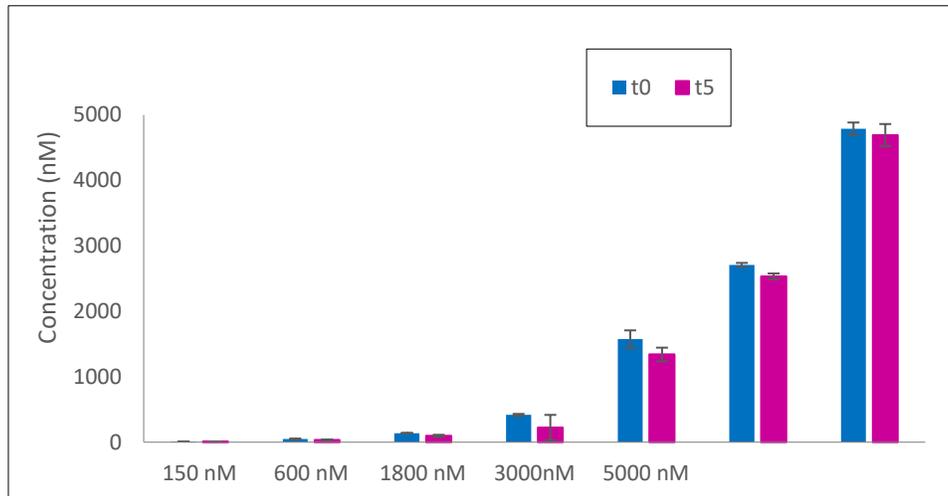


Figure 3-30 : Concentration du néodyme en présence d'algues après 120 heures d'exposition à 150, 600, 1800, 3000 et 5000 nM de Nd (n=3) (barres d'erreurs représentent les écarts-types).

### 3.3.1.2 L'adsorption

Le Nd adsorbé a été quantifié : la Figure 3.31 montre un nuage de points de celui-ci en fonction des logarithmiques des concentrations en  $\text{Nd}^{3+}$  libre en solution. La droite linéaire représente la régression construite avec l'aide de Sigma Plot. Les conditions de validité de cette analyse ont été vérifiées : les résidus standardisés sont d'un minimum de -1,41 et d'un maximum de 2,22. Ces valeurs ne dépassent pas l'intervalle [-3,29 – 3,29] donc on néglige la présence des points « aberrants ». Le test de Durbin-Waston donne un facteur d de 1,63, c'est-à-dire les résidus sont indépendants. Le nuage des points des résidus standardisés en fonction des valeurs prédites standardisées (Figure 3.32) ne suit aucune forme définie, donc on peut dire que l'homoscédasticité est vérifiée : la variance des erreurs des mesures est homogène pour toutes les valeurs de la variable indépendante ( $\text{Nd}^{3+}$ ). Le facteur de Fisher est égal à 94 avec un p-value < 0,005. Le modèle est statistiquement significatif, avec un coefficient de détermination  $r^2=0,84$ ; c'est-à-dire 84 % des valeurs prédites par notre modèle.

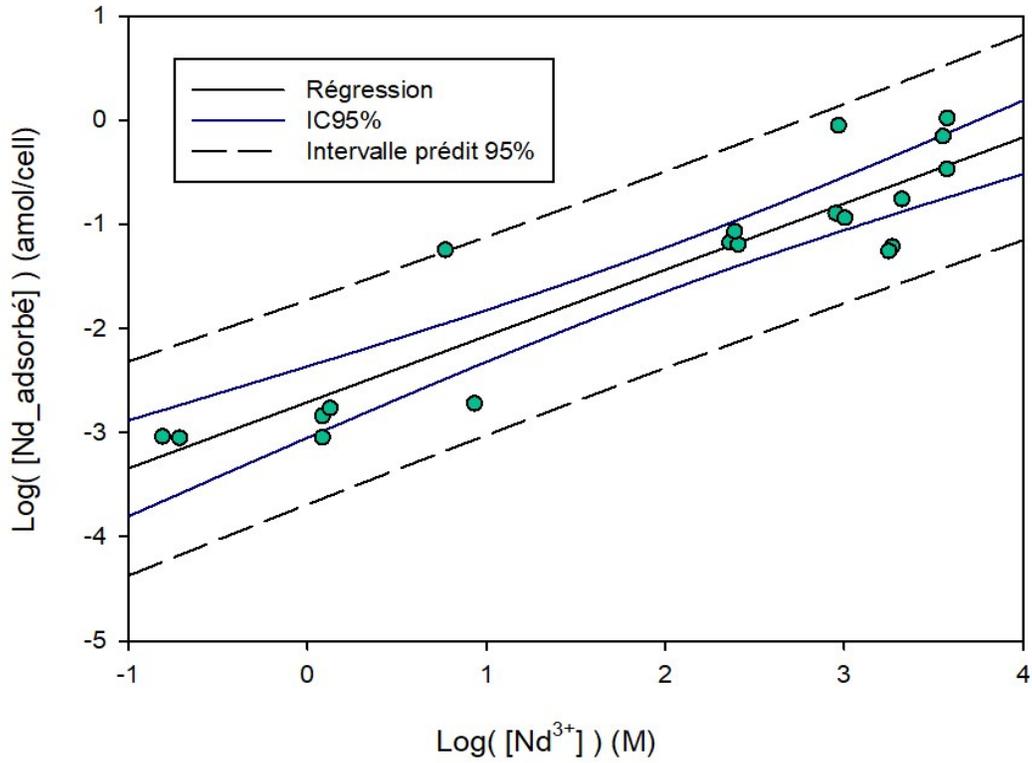


Figure 3-31 : Néodyme adsorbé au niveau de la membrane cellulaire de *C. reinhardtii* en fonction de la concentration en Nd<sup>3+</sup> libre.

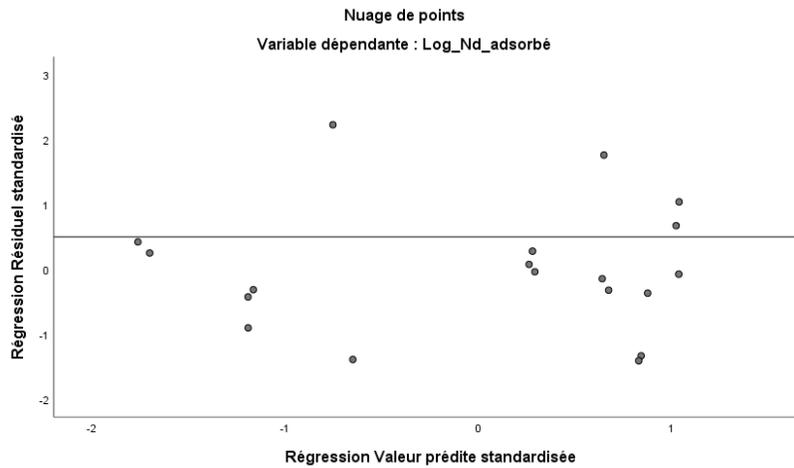


Figure 3-32 : Nd adsorbé chez *C. reinhardtii* : vérification de l'homoscédasticité.

### 3.3.1.3 Toxicité : Effet du néodyme sur la croissance de *C. reinhardtii*

#### a. Courbe de croissance

Les courbes de croissance obtenues sont présentées à la Figure 3.33. Chaque point correspond à la moyenne des croissances des échantillons exposés à la même concentration de néodyme et les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types de ces mesures.

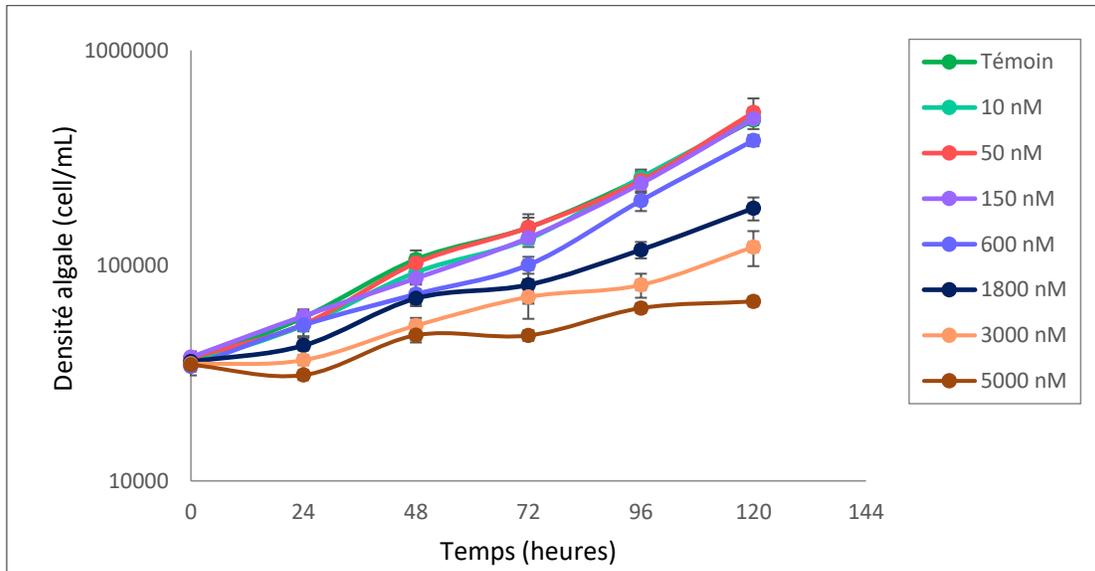


Figure 3-33 : Profils de croissance cellulaire de *C. reinhardtii* en présence de différentes concentrations de Nd au cours du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures.

Après 24 h, on remarque qu'il y a une différence significative entre les densités cellulaires des échantillons à 1800, 3000 et 5000 nM et celles du témoin. Après 48, 72 et 96 h d'exposition, les échantillons dont les densités cellulaires des concentrations entre 600 et 5000 nM sont différentes significativement des témoins. Après 120 h d'exposition, seuls les échantillons de 1800, 3000 et 5000 nM sont différents significativement des témoins ( $p < 0,05$ ). Les résultats du test statistique à 96 h sont regroupés au Tableau 3.9. À 96 h, les pourcentages d'inhibition étaient de 19, 61, 74 et 86 % pour les concentrations de Nd de 600, 1800, 3000 et 5000 nM respectivement.

Aussi les taux de croissance ont été calculés après 5 jours d'exposition. Les résultats des tests statistiques sont montrés dans le Tableau 3.10. Il est remarqué que les résultats des tests statistiques des taux de croissance cellulaire et ceux des densités cellulaires sont semblables.

Tableau 3-10: One-way ANOVA test : p-value entre les densités cellulaires de *C. reinhardtii* à 96 et à 120 h.

	p-value (96 h)	p < 0,05 (96 h)	p-value (120 h)	p < 0,05 (120 h)
Témoin vs. 5000 nM	< 0,05	Oui	< 0,05	Oui
Témoin vs. 3000 nM	< 0,05	Oui	< 0,05	Oui
Témoin vs. 1800 nM	< 0,05	Oui	< 0,05	Oui
Témoin vs. 600 nM	0,006	Oui	1	Non
Témoin vs. 150 nM	1	Non	1	Non
Témoin vs. 50 nM	1	Non	1	Non
Témoin vs. 10 nM	1	Non	1	Non

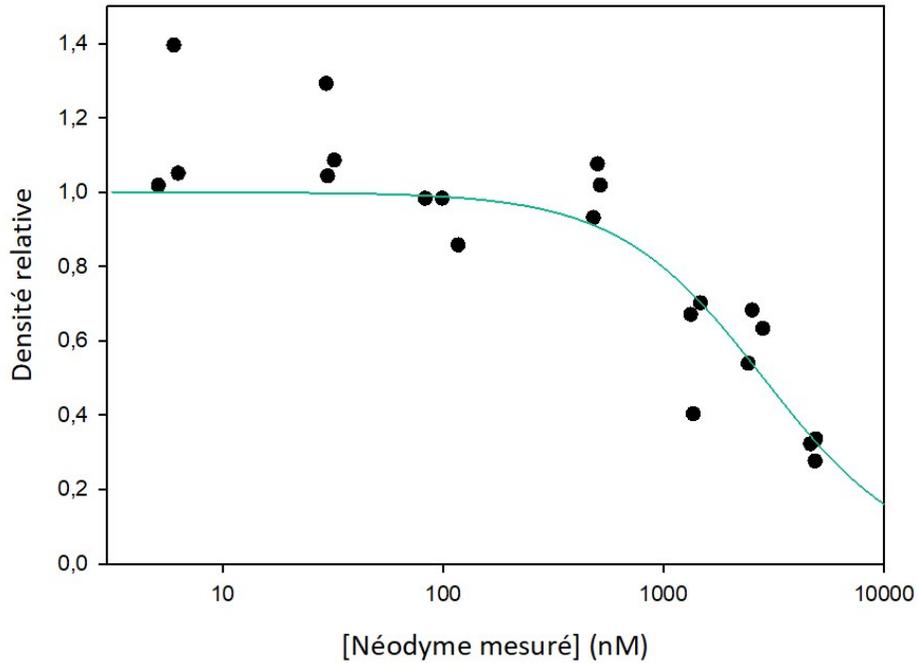
Tableau 3-11: One-way ANOVA test : p-value entre les taux de division cellulaire de *C. reinhardtii* après 120 h d'exposition au Nd ( $\mu$  témoin =  $0,518 \pm 0,02$ ).

	$\mu$ ( $j^{-1}$ )	p-value	p < 0,05
Témoin vs. 5000 nM	$0,13 \pm 0,01$	< 0,05	Oui
Témoin vs. 3000 nM	$0,25 \pm 0,01$	< 0,05	Oui
Témoin vs. 1800 nM	$0,33 \pm 0,02$	< 0,05	Oui
Témoin vs. 600 nM	$0,48 \pm 0,01$	1	Non
Témoin vs. 150 nM	$0,51 \pm 0,01$	1	Non
Témoin vs. 50 nM	$0,52 \pm 0,03$	1	Non
Témoin vs. 10 nM	$0,53 \pm 0,02$	1	Non

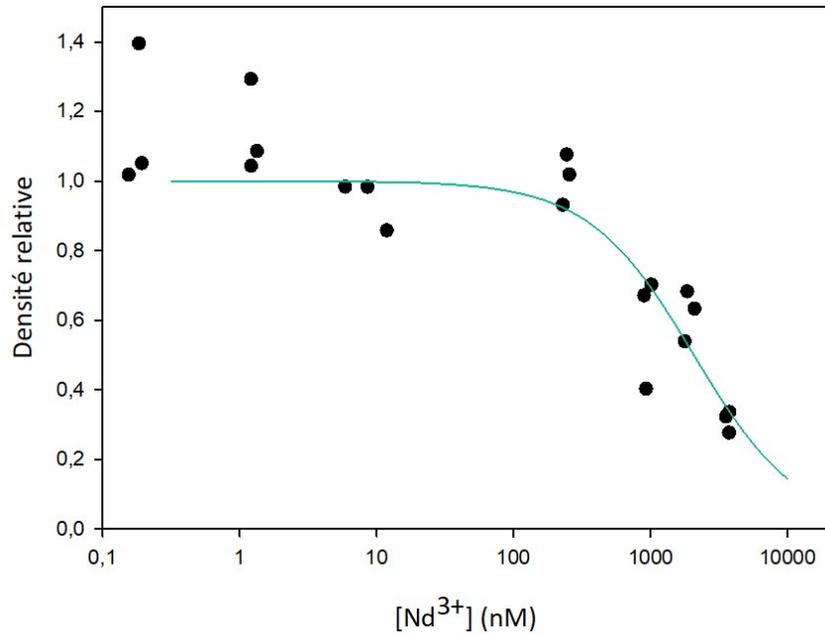
#### b. Courbe dose-réponse

À partir des densités cellulaires obtenues après 120 h d'exposition, il a été possible de déterminer la CE50 en fonction de Nd mesuré et de l'ion libre (Figure 3.33 (a) et (b)). Ce

paramètre est de valeur équivalente à 2840 nM avec un  $IC_{95\%}$  de [1970 – 4110] nM exprimé en fonction du néodyme total mesuré ( $F = 65,6$  ;  $p\text{-value} < 0,05$ ). La valeur de la  $CE_{50}$  exprimée en ion libre est proche de celle exprimée en Nd mesuré; elle est de 2070 nM avec un  $IC_{95\%}$  de [1360 – 3150] nM. Les pourcentages en ions libres présents dans la solution d'exposition sont présentés dans le Tableau 3.8.



(a)



(b)

Figure 3-34 : Densité relative en fonction des concentrations du néodyme mesurées (a) et en fonction de l'ion libre en  $Nd^{3+}$  (b) après 120 h d'exposition.

Tableau 3-12: Exposition de *C. reinhardtii* au Nd : concentrations en Nd mesuré et pourcentages en  $Nd^{3+}$  dans le milieu MHSM-2.

Concentration en Nd mesuré (nM)	Pourcentages en ions libres (%)
$5,8 \pm 0,6$	$3,06 \pm 0,02$
$31 \pm 1,4$	$4,10 \pm 0,05$
$100 \pm 17$	$8,6 \pm 1,5$
$501 \pm 18$	$48,5 \pm 0,9$
$1390 \pm 75$	$68,0 \pm 0,6$
$2590 \pm 210$	$73,6 \pm 0,5$
$4810 \pm 140$	$76,7 \pm 0,1$

### 3.3.1.4 Accumulation : Néodyme internalisé

Après avoir quantifié les concentrations en Nd intracellulaire pour chaque traitement, la courbe dose-réponse est dressée : densité relative en fonction du métal internalisé après 120 h (Figure 3.35). À partir de cette courbe, la concentration efficace causant 50 % d'inhibition est déterminée. Cette valeur est de 173 amol/cell avec un  $IC_{95\%}$  de [118 – 252]. On remarque qu'au-delà d'une concentration intracellulaire de 90 amol/cellule ( $\text{Log}(90) = 1,95$  dans la figure ci-dessous), la cellule contrôle de moins en moins l'internalisation et l'effet inhibiteur s'accroît.

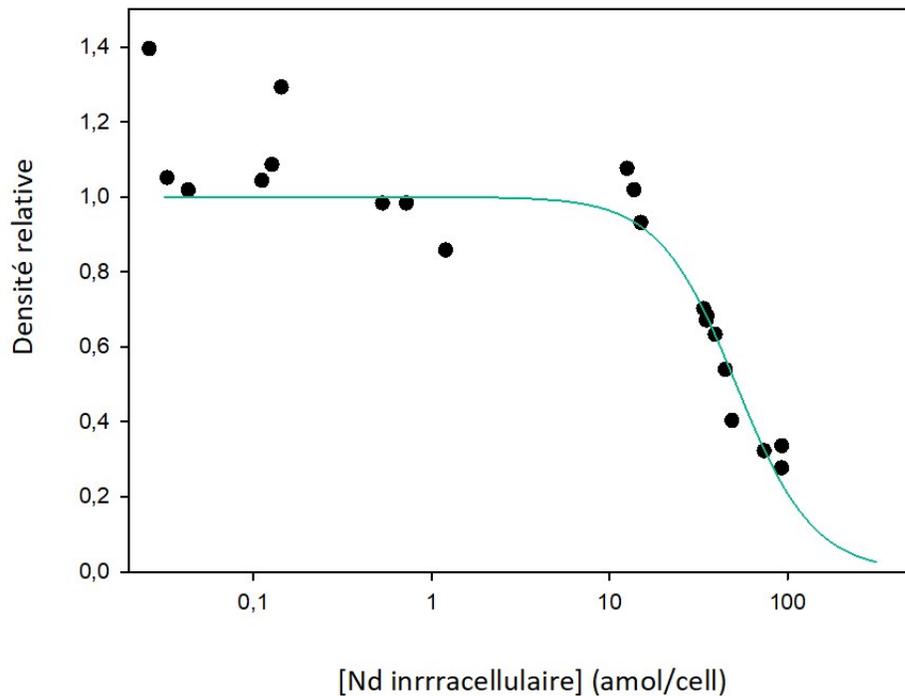


Figure 3-35: Densité relative en fonction des concentrations du néodyme intracellulaire après 120 h.

La concentration intracellulaire en Nd a été également illustrée en fonction de la concentration totale de Nd en solution après 120 h d'exposition (Figure 3.36) et en fonction des concentrations calculées en ions libres de  $\text{Nd}^{3+}$  (Figure 3.37).

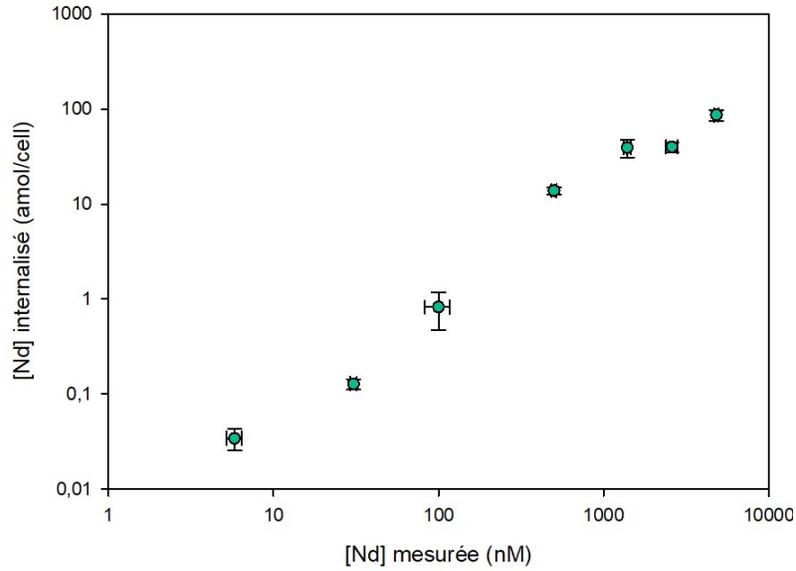


Figure 3-36 : Néodyme internalisé en fonction de la concentration moyenne en Nd dans le milieu.

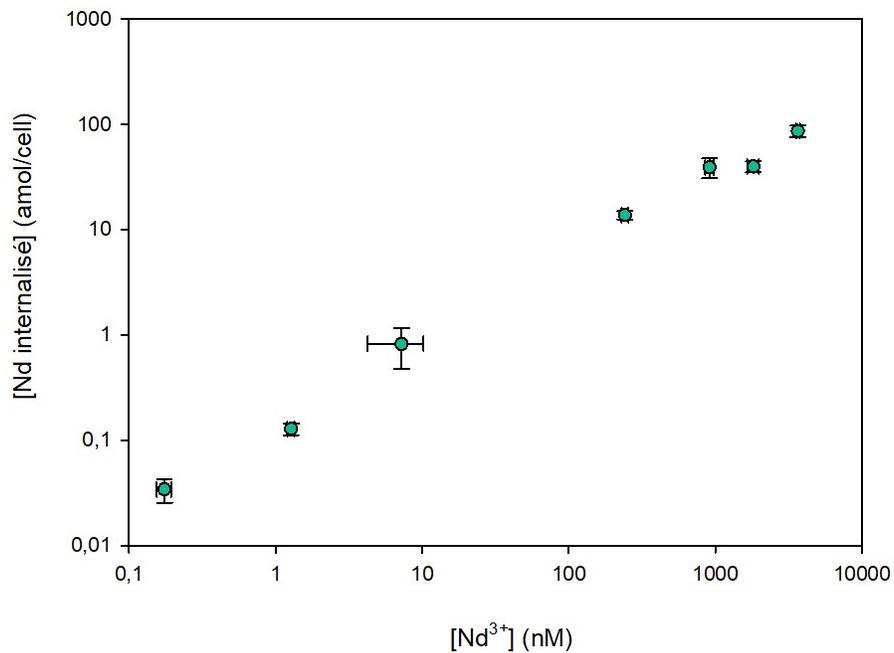


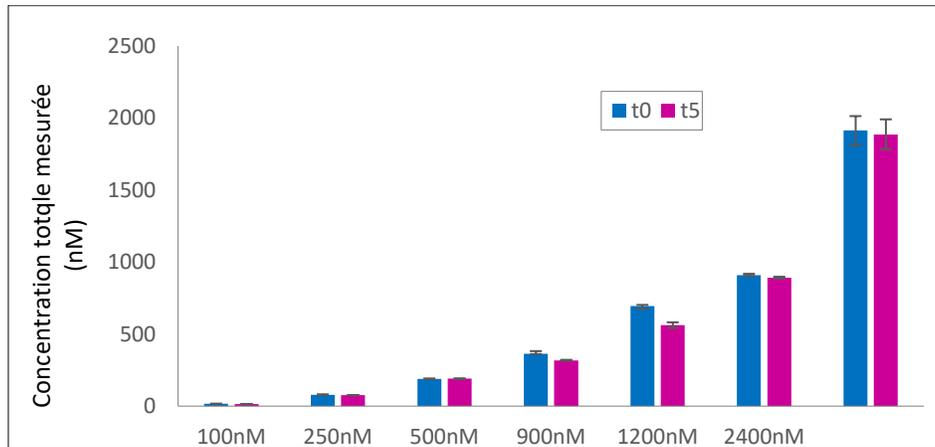
Figure 3-37 : Néodyme internalisé en fonction de l'ion libre.

### 3.3.2 Exposition au thulium

#### 3.3.2.1 Suivi des concentrations

La quantité en Tm présent dans le milieu de culture a été analysée au cours du temps. La Figure 3.38 montre la variation de la concentration après 120 h d'exposition en

présence d'algues. La diminution devient moins importante lorsque la concentration est plus élevée dans le milieu.



**Figure 3-38 Concentration thulium en présence d'algues après 120 heures d'exposition à 100, 250, 500, 900, 1200, 2400 nM de Tm (n=3) (les barres d'erreurs représentent les écarts-types).**

### 3.3.2.2 L'adsorption

La croissance de *C. reinhardtii* a aussi été testée en présence du Tm à différentes concentrations. La Figure 3.39 montre les différents logarithmes des concentrations en Tm adsorbé au niveau de la surface algale. On observe que le Tm adsorbé augmente lorsqu'on a plus de Tm en solution. La régression linéaire est vérifiée avec SPSS : les résidus standardisés sont d'un minimum de -2,35 et d'un maximum de 1,10 par la suite on néglige la présence des points «aberrants». Le facteur d obtenu à partir du test de Durbin-Waston est de 1,61, c'est-à-dire les résidus sont indépendants. Le nuage des points des résidus standardisés en fonction des valeurs prédites standardisées ne suit aucune forme définie, donc on peut dire que l'homoscédasticité est vérifiée (Figure 3.40)

Le facteur de Fisher est égal à 24,6 avec un p-value < 0,005. Le modèle est statistiquement significatif, avec un coefficient de détermination  $r^2 = 0,67$ .

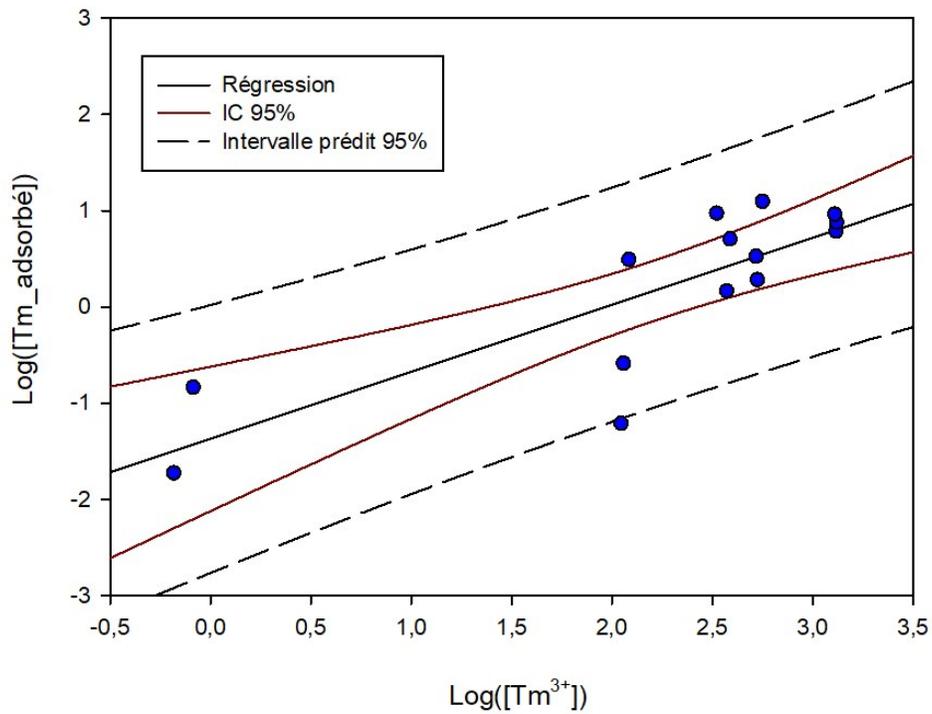


Figure 3-39 : Tm adsorbé au niveau de la surface biologique en fonction de la concentration en  $\text{Tm}^{3+}$  libre.

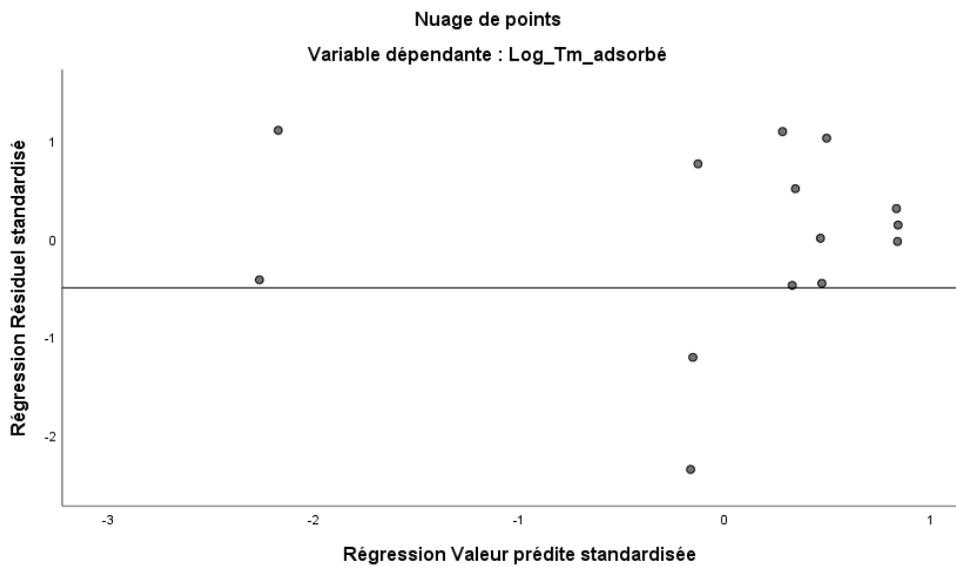


Figure 3-40 : Tm adsorbé chez *C. reinhardtii* : vérification de l'homoscédasticité.

### 3.3.2.3 Toxicité : Effet du Tm sur la croissance de *C. reinhardtii*

#### a. Courbe de croissance

La Figure 3.41 représente les courbes de croissance de *C. reinhardtii* en absence du Tm et à différentes concentrations de ce métal dans le milieu de culture le MHSM-2.

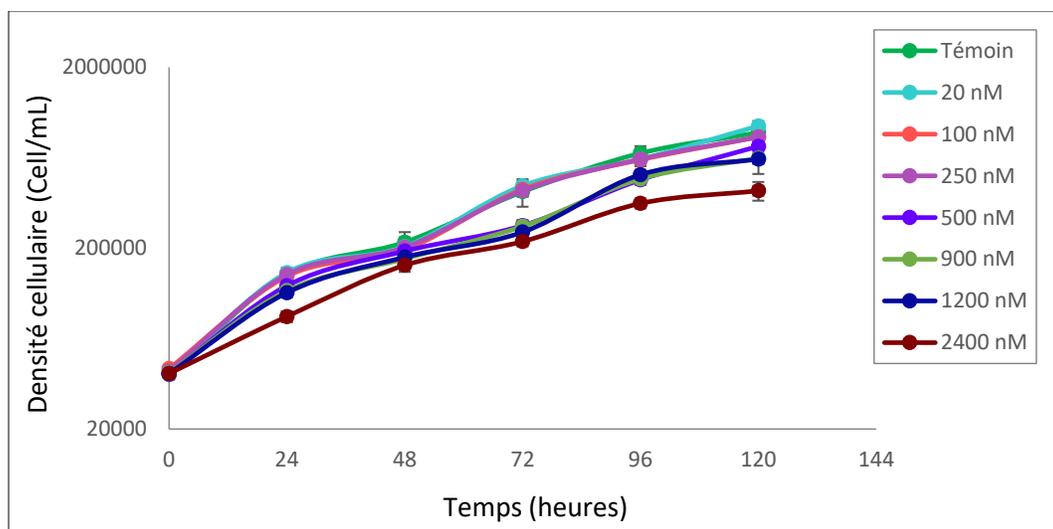


Figure 3-41 : Profils de croissance cellulaire de *C. reinhardtii* en présence de différentes concentrations de Tm au cours du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures.

On observe, après 24 et 48 h que la différence au niveau de la croissance entre les témoins et les traitements n'est pas significative. À 72 et 96 h, la croissance cellulaire est différente significativement entre les témoins et les échantillons ayant des concentrations de Tm de 500, 900, 1200 et 2400 nM. À 120 h, la différence est significative seulement pour 900, 1200 et 2400 nM (Tableau 3.13). Cette significativité est vérifiée pour le taux de croissance. Les résultats sont présentés au Tableau 3.14.

Les pourcentages d'inhibition de la croissance cellulaire par rapport aux témoins à 120 h, sont : 5,4, 5,5, 16, 16 28, 29, et 52 % causées par les concentrations suivantes : 100, 250, 500, 900, 1200 et 2400 nM, respectivement.

Tableau 3-13: One-way ANOVA test : p-value entre les densités cellulaires de *C. reinhardtii* à 120 h (exposée au Tm).

	p	p < 0,050
Témoin vs. 2400 nM	< 0,001	Oui
Témoin vs. 1200 nM	0,006	Oui
Témoin vs. 900 nM	0,007	Oui
Témoin vs. 500 nM	0,224	Non
Témoin vs. 250 nM	1	Non
Témoin vs. 100 nM	1	Non
Témoin vs. 20 nM	1	Non

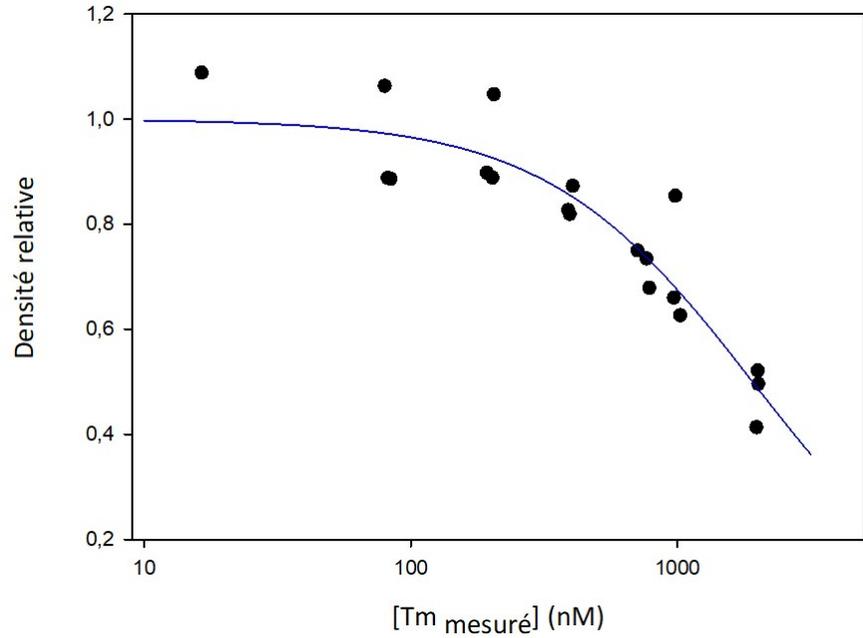
Tableau 3-14: One-way ANOVA test : p-value entre les taux de division cellulaire de *C. reinhardtii* après 120 h d'exposition au Tm ( $\mu$  témoin =  $0,61 \pm 0,014$ ).

	$\mu$ ( $j^{-1}$ )	p	P < 0,050
Témoin vs. 2400 nM	$0,46 \pm 0,03$	< 0,001	Oui
Témoin vs. 1200 nM	$0,54 \pm 0,03$	0,016	Oui
Témoin vs. 900 nM	$0,55 \pm 0,01$	0,047	Oui
Témoin vs. 500 nM	$0,58 \pm 0,006$	1	Non
Témoin vs. 250 nM	$0,59 \pm 0,02$	1	Non
Témoin vs. 100 nM	$0,59 \pm 0,02$	1	Non
Témoin vs. 20 nM	$0,63 \pm ND$	1	Non

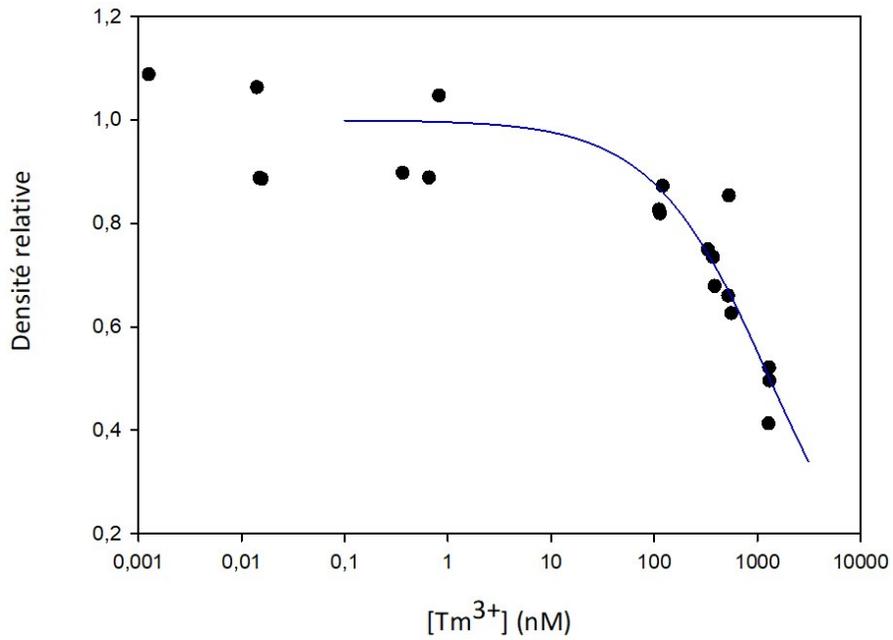
#### b. Courbe dose-réponse

Les concentrations efficaces moyennes à 50 % (CE50) de la croissance de *C. reinhardtii* après 120 h d'exposition ont été calculées en fonction de Tm total mesuré et celui libre présent en solution à partir des courbes dose-réponse suivantes : Figure 3.42 (a) et (b).

Les valeurs de ce paramètre sont de 1910 nM avec un IC<sub>95%</sub> de [1450 – 2520] nM et 1320 [823 – 2110] nM exprimé en Tm total mesuré et Tm<sup>3+</sup> respectivement. Les pourcentages en ions libres peuvent expliquer la différence entre la CE50 exprimée en Tm mesuré et celle en Tm<sup>3+</sup>. Ces pourcentages sont présentés dans le Tableau 3.15.



(a)



(b)

Figure 3-42 : Densité relative en fonction des concentrations de thulium mesurées (a) et en fonction de l'ion libre en  $Tm^{3+}$  (b) après 120 h d'exposition.

Tableau 3-15: Pourcentages en ions libres par rapport aux concentrations mesurées dans le milieu d'exposition MHSM-2 en présence de *C. reinhardtii*.

Concentration en Tm mesuré (nM)	Pourcentages en ions libres %
82 ± 2	0,02 ± 5×10 <sup>-4</sup>
200 ± 6	0,30 ± 0,11
396 ± 8	29,2 ± 0,7
753 ± 40	48,3 ± 1,3
991 ± 28	54,2 ± 0,6
1996 ± 17	65,2 ± 0,1

### 3.3.2.4 Accumulation : Thulium internalisé

La densité relative est dressée en fonction de la concentration internalisée en Tm. La Figure 3.43 représente la régression non linéaire de ces valeurs. La CE50 exprimée en Tm intracellulaire est égale à 915 amol/cell avec un intervalle de confiance de [576 – 1450] amol/cell.

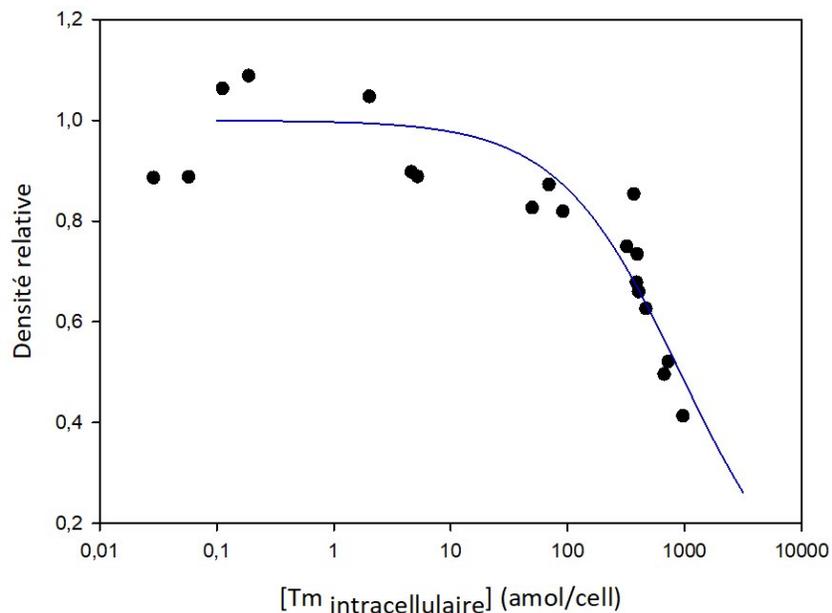


Figure 3-43 : Densité relative de *C. reinhardtii* en fonction de la concentration intracellulaire du thulium après 120 h d'exposition.

Les Figures 3.44 et 3.45 représentent les concentrations de Tm internalisé en fonction de celles mesurées et celles en ion libre respectivement après 120 h d'exposition. Ces Figures renseignent sur la corrélation entre le métal intracellulaire et les concentrations libres d'une part et celles totales mesurées d'autre part. On remarque que plus la concentration en solution est élevée plus le Tm internalisé est important. On remarque que pour les faibles concentrations en métal, ces pourcentages sont très faibles. En effet, lorsque la concentration en TR est faible, l'EDTA complexe majoritairement le thulium (Tableau 3.16). Ceci explique la différence entre les deux courbes ci-dessous si on examine l'axe des abscisses.

**Tableau 3-16: Pourcentages en Tm<sup>3+</sup> dans le MHSM-2**

<b>Concentrations nominales</b>	<b>Pourcentages en ions libre (%)</b>
50 nM	0,44 ± 0,04
100 nM	0,61 ± 0,06
400 nM	17,1 ± 3,9
700 nM	39,6 ± 1,0
1000 nM	46,8 ± 0,6
1500 nM	56,2 ± 0,1
3000 nM	67,6 ± 0,4

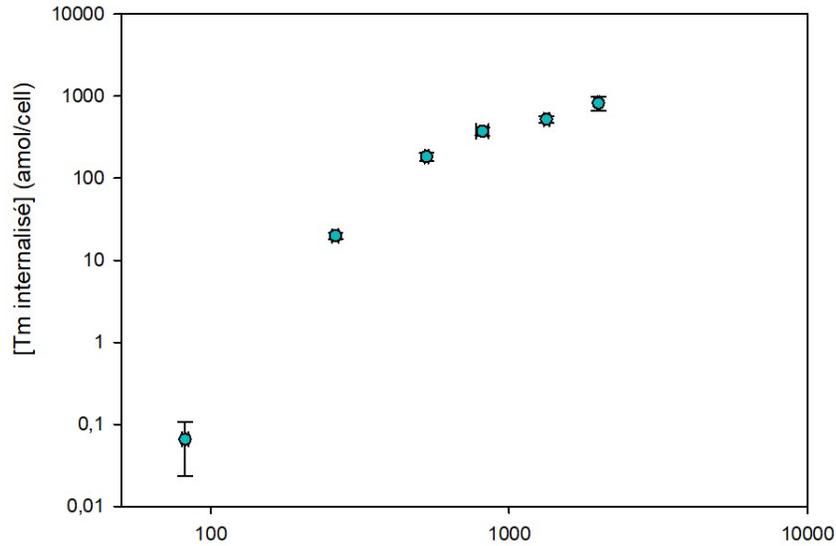


Figure 3-44 : Tm internalisé chez *C. reinhardtii* en fonction de la moyenne des concentrations en Tm mesurée au cours du temps.

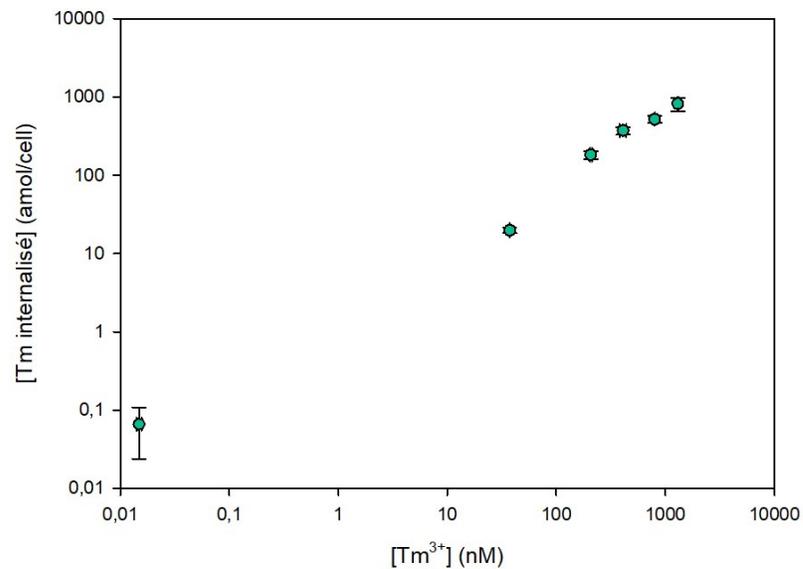


Figure 3-45 : Tm internalisé chez *C. reinhardtii* en fonction de la moyenne des concentrations en ion libre de Tm<sup>3+</sup> au cours du temps.

### 3.3.3 Exposition à l'yttrium

#### 3.3.3.1 Suivi des concentrations

La croissance de *C. reinhardtii* est testée aussi en présence de l'Y à différentes concentrations allant de 20 à 800 nM. Les histogrammes dans la Figure 3.46 montre la

variation des concentrations qui subissent une déplétion après l'exposition chronique ( 5 jours).

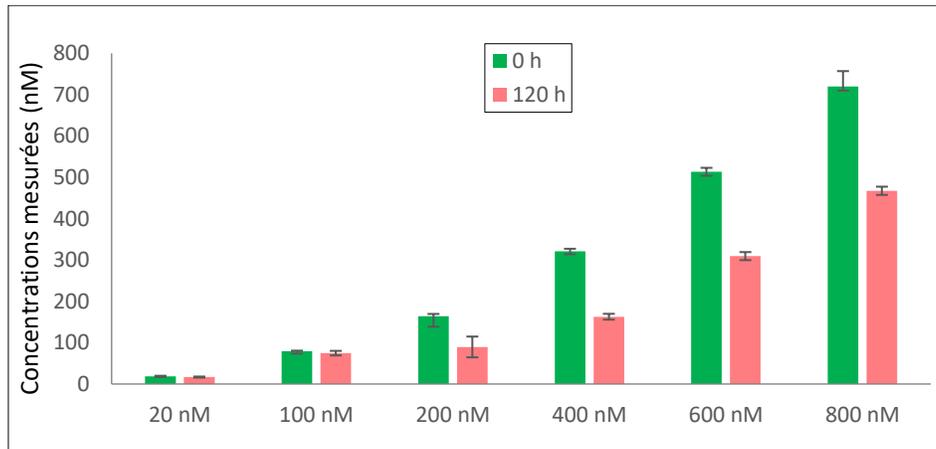


Figure 3-46 : Suivre des concentrations en Y au cours du temps en présence de *C. reinhardtii*.

### 3.3.3.2 L'adsorption

L'Y adsorbé à la surface cellulaire de cette espèce a été quantifié. Ces quantités ont été dressées en fonction de celles totales mesurées présentes en solution d'exposition comme le montre la Figure 3.47. L'analyse de la régression linéaire est effectuée en recourant au logiciel SPSS. Les conditions de cette technique ont été vérifiées : les résidus standardisés sont d'un minimum de -1,423 et d'un maximum de 2,31. Ces valeurs ne dépassent pas l'intervalle [-3,29 – 3,29]. On conclut l'absence des points atypiques. Le facteur d donné par le test Durbin-Waston est de 2,38, ceci signifie que les erreurs sont indépendantes. La valeur de F est de 15,19 avec  $p < 0,005$ . Le modèle est statistiquement significatif avec un  $r^2$  égal à 0,83.

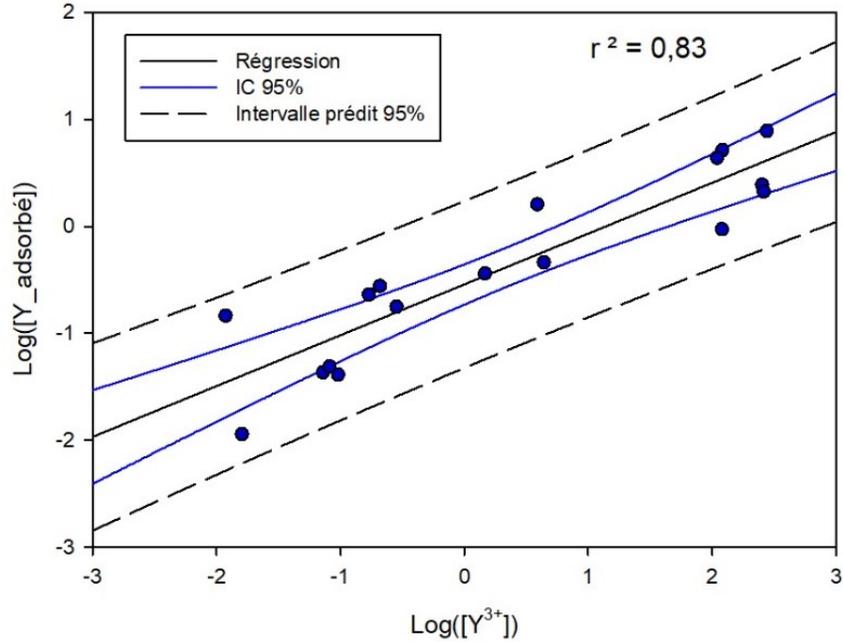
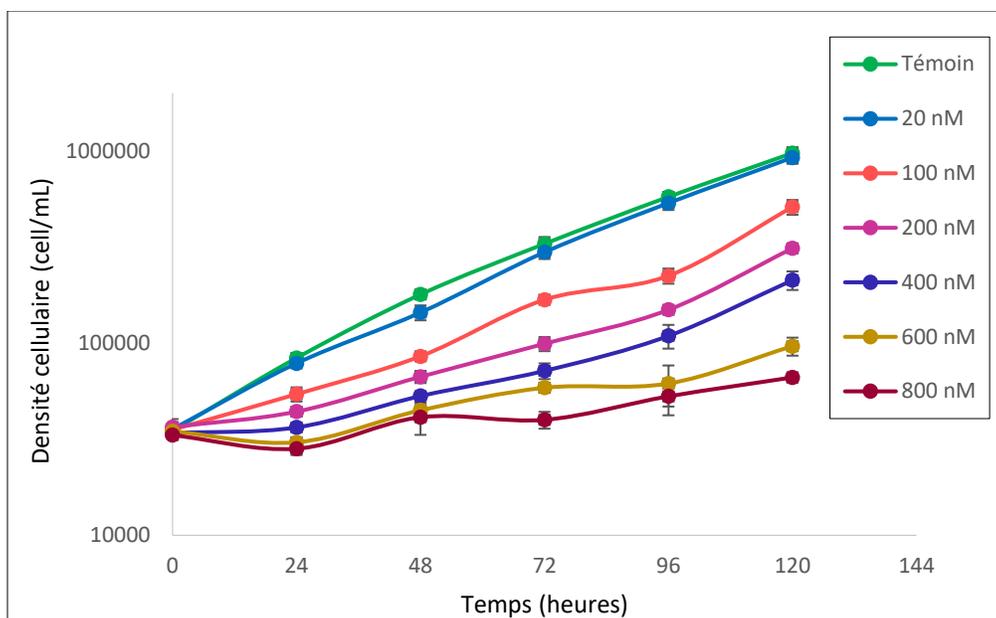


Figure 3-47 : Yttrium adsorbé au niveau de la surface cellulaire de *C. reinhardtii* après 120 h d'exposition en fonction de la concentration en  $Y^{3+}$  libre.

### 3.3.3.3 Toxicité : Effet sur la croissance cellulaire de *C. reinhardtii*

#### a. Courbe de croissance

Les courbes de croissance obtenues sont présentées à la Figure 3.48. Chaque point correspond à la moyenne des croissances des échantillons exposés à la même concentration d'yttrium et les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types de ces mesures.



**Figure 3-48 : Profils de croissance cellulaire de *C. reinhardtii* en présence de différentes concentrations de l'Y au cours du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur les mesures.**

Pour cette exposition, l'effet hormèse n'a pas été observé contrairement à l'expérience réalisée sur *C. fusca*. Après 24 h d'exposition, toutes les courbes se différencient du témoin. Le test statistique a montré que la différence est significative entre le témoin et toutes les autres concentrations testées sauf pour la concentration la plus faible : 20 nM. À 48 h la différence entre les témoins et tous les traitements est significative avec un  $p < 0,05$ . Pour les périodes de traitement de 72 à 120 h, il y a une différence significative entre les échantillons des témoins et les traitements sauf pour ceux exposés à 20 nM.

Le Tableau 3.17 montre les valeurs de p-value à 120 h d'exposition. Le Tableau 3.18 indique les résultats du test statistique pour évaluer la significativité de la différence entre les taux de croissance cellulaire de différents traitements et ceux des témoins.

Tableau 3-17: Valeurs des p-value entre les densités cellulaires de *C. reinhardtii* à 120 h (exposée à l'Y).

	<b>p</b>	<b>p &lt; 0,050</b>
<b>Témoin vs. 800 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 600 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 400 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 200 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 100 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 20 nM</b>	1	Non

Tableau 3-18: One-way ANOVA test : p-value entre les taux de division cellulaire de *C. reinhardtii* après 120 h d'exposition à l'Y ( $\mu$  témoin = 0,66  $\pm$  0,01).

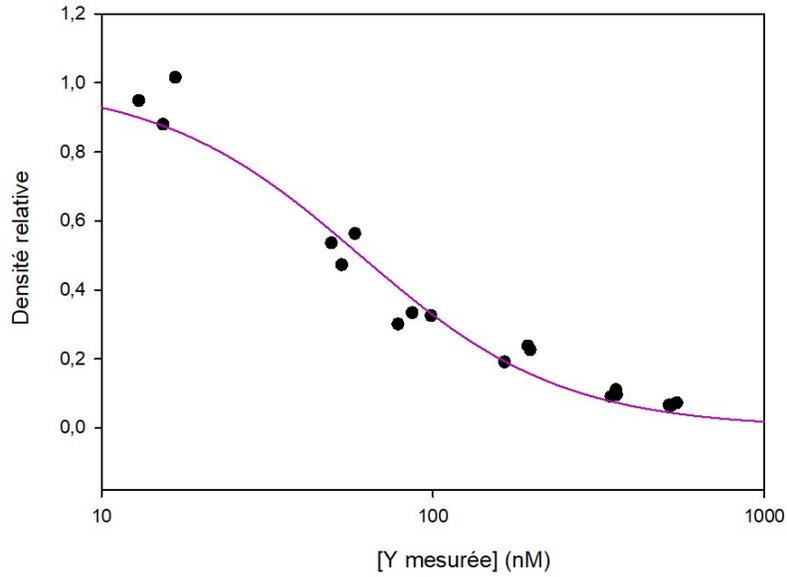
	$\mu$ (j <sup>-1</sup> )	<b>p-value</b>	<b>P &lt; 0,050</b>
<b>Témoin vs. 800 nM</b>	0,14 $\pm$ 0,01	< 0,001	Oui
<b>Témoin vs. 600 nM</b>	0,20 $\pm$ 0,03	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 400 nM</b>	0,37 $\pm$ 0,02	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 200 nM</b>	0,43 $\pm$ 0,02	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 100 nM</b>	0,53 $\pm$ 0,01	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 20 nM</b>	0,65 $\pm$ 0,02	1	Non

#### b. Courbe dose-réponse

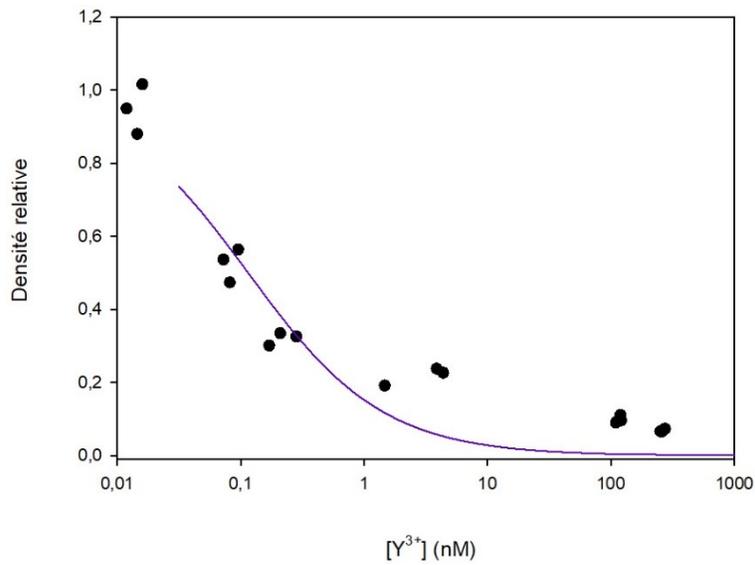
Les courbes 3.49 (a) et (b) représentent la régression non linéaire des densités relatives algales en fonction des concentrations en Y total mesuré et des concentrations en ions libres Y<sup>3+</sup>. Le Tableau 3.19 représente les valeurs des concentrations en Y<sup>3+</sup> causant les pourcentages d'inhibition de croissance de 5, 10, 20 et 50 % obtenues par le logiciel «TRAP».

La CE50 exprimé en Y mesuré est de 50 [29 – 86] nM, celle exprimé en fonction de l'ion libre est de  $9,97 \times 10^{-2}$  [ $1,85 \times 10^{-2}$  – 0,51] nM. Il est noté que l'yttrium est l'élément le plus toxique parmi les TR étudiées dans notre projet (voir section 3.4 Étude comparative entre les deux espèces algales). Cependant, les résultats de l'estimation de la toxicité de cet élément sur *C. reinhardtii* apparaît en rouge dans le logiciel utilisé. Ceci signifie que le logiciel arrive à estimer les paramètres de la toxicité mais nos données ne sont

pas adéquates pour une estimation fiable. En examinant nos données à l'œil, on remarque que pour des concentrations aux alentours de 0,07 à 0,1 nM en  $Y^{3+}$ , les pourcentages d'inhibition de la croissance étaient de 42 à 47 %. La CE50 doit être donc autour de ces valeurs.



(a)



(b)

Figure 3-49 : Densité relative en fonction des concentrations de l'yttrium mesurées (a) et en fonction de l'ion libre en  $Y^{3+}$  (b) après 120 h d'exposition

Tableau 3-19: Valeurs des concentrations efficaces causant différents pourcentages d'inhibition exprimée en Y mesuré et en ion libre Y<sup>3+</sup> chez *C. reinhardtii*.

Pourcentage d'effet	Exprimé en [Y] mesuré (nM)	Exprimé en [Y <sup>3+</sup> ] (nM)
<b>CE5</b>	7,64 [4,74 – 12,30]	$2,08 \times 10^{-2}$ [ $0,57 \times 10^{-2}$ – $0,14 \times 10^{-1}$ ]
<b>CE10</b>	12,9 [8,85 – 18,81]	$0,72 \times 10^{-2}$ [ $0,21 \times 10^{-2}$ – $0,24 \times 10^{-1}$ ]
<b>CE20</b>	22,8 [17,34 – 29,97]	$0,2 \times 10^{-1}$ [ $0,87 \times 10^{-2}$ – $0,46 \times 10^{-1}$ ]
<b>CE50</b>	60,32 [52,25 – 70]	0,114 [ $0,73 \times 10^{-1}$ – 0,18]

#### 3.3.3.4 Accumulation : Yttrium internalisé

La densité relative de *C. reinhardtii* est représentée en fonction de l'yttrium internalisé à la Figure 3.50. La CE50 exprimée en Y intracellulaire est de 26 avec un IC<sub>95%</sub> de [17,3–38,62] amol/cell.

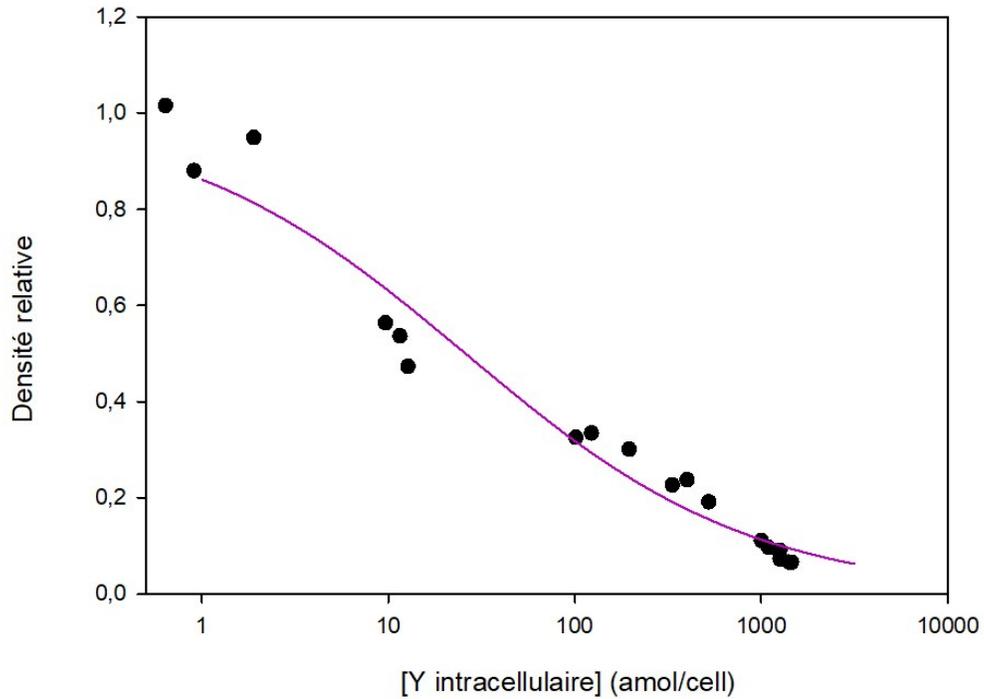


Figure 3-50 : Densités relative par rapport à la culture témoin de *C. reinhardtii* en fonction de la concentration intracellulaire de l'yttrium après 120 h d'exposition.

Les Figures 3.51 et 3.52 représentent le métal internalisé en fonction des concentrations en Y mesuré total et en fonction des concentrations calculées en ions libres, respectivement.

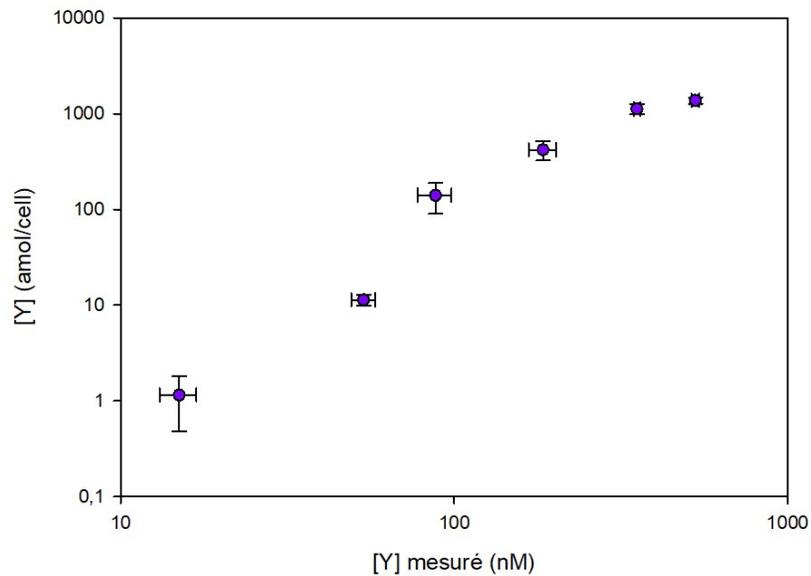


Figure 3-51 Yttrium internalisé chez *C. reinhardtii* en fonction de la moyenne des concentrations en Y mesurée au cours du temps.

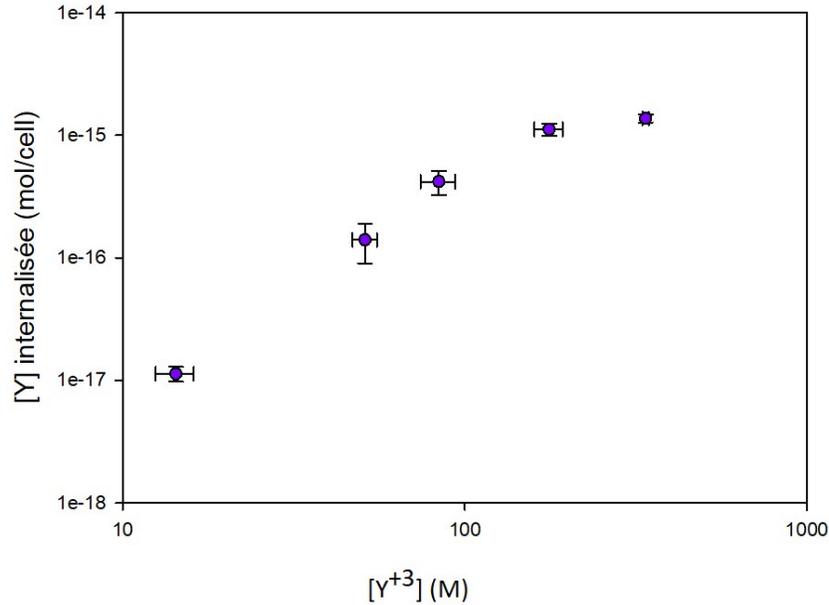


Figure 3-52 : Yttrium internalisé chez *C. reinhardtii* en fonction de la moyenne des concentrations en Y libre au cours du temps.

### 3.4 Étude comparative entre les deux espèces algales

On sait que la compétition sur les sites des transporteurs membranaires peut influencer l'absorption des nutriments ainsi que l'absorption des métaux toxiques, et ceci a un effet sur la croissance cellulaire. Un changement du milieu de culture (composition plus riche en nutriments) ou des conditions d'exposition (pH par exemple) peut altérer cette compétition donc faire varier l'internalisation du métal étudié soit dans le sens de l'inhibition ou dans le sens de l'exacerbation. Afin de mener une étude comparative, les conditions de travail étaient similaires pour l'étude de la toxicité des TR sur les deux espèces d'algues; c'est-à-dire les conditions des cultures algales et de l'exposition : température, pH, luminosité, milieu de culture et agitation.

Les Tableaux 3.20 et 3.21 résument les valeurs des CE50 des trois TR pour chaque espèce étudiée *C. fusca* et *C. reinhardtii* respectivement. L'ordre de toxicité du moins toxique vers le plus toxique est le suivant : Nd < Tm < Y : on remarque que pour les deux espèces le Nd est le moins toxique parmi les trois TR étudiés vu que la CE50 exprimée en ions libres est plus élevée que celles des autres métaux. En examinant la CE50 exprimée en Nd intracellulaire, on déduit que *C. fusca* et *C. reinhardtii* semblent avoir la même résistance envers le Nd internalisé vu que les CE50 exprimé en Nd

intracellulaire sont presque égales. Pour le thulium, *C. fusca* s'est montrée plus sensible que *C. reinhardtii* puisque la concentration intracellulaire causant 50 % d'inhibition est presque cinq fois plus faible que celle pour *C. reinhardtii*. Finalement l'yttrium est le plus toxique parmi les TR testés. Dans le cas de ce métal, *C. reinhardtii* est plus sensible que *C. fusca* vu que la CE50 de l'yttrium intracellulaire de *C. fusca* est beaucoup plus élevée que celle chez *C. reinhardtii*. Toutefois, il faut être prudent pour les dernières données (l'yttrium chez *C. reinhardtii*) vu les données traitées ne se montrent pas aussi robustes pour avoir des résultats fiables.

La différence de la résistance aux TR chez ces deux algues peut possiblement être expliquée par la différence de leurs mécanismes de défense ou de détoxification. Afin de maintenir une concentration optimale de micronutriments et de se protéger contre les métaux toxiques, les algues synthétisent des biomolécules contenant des groupements fonctionnels ayant une grande affinité aux métaux. Parmi ces biomolécules, on cite les phytochélatines qui sont des polypeptides riches en cystéine dont la structure générale est  $(\gamma\text{-glu-cys})_n\text{-Gly}$  où  $n$  varie de 2 à 11. Une étude sur la toxicité du Cd menée par (Lavoie *et al.*, 2009) a montré que *C. reinhardtii* était plus résistante au Cd que *Pseudokirchneriella subcapitata*. Dans cette recherche, les algues ont synthétisé beaucoup de phytochélatines, celles exprimées chez *C. reinhardtii* se caractérisent par une chaîne peptidique plus longue. Aussi, un composé inconnu contenant un groupement thiol a été produit chez les deux algues mais avec une concentration beaucoup plus importante chez *C. reinhardtii* que chez *P. subcapitata*. Ainsi, la différence de la sensibilité entre les espèces algales que nous avons étudiées peut être expliquée entre autres par la différence de la détoxification bien que l'exemple cité s'applique sur le Cd qui est un élément de groupe B «mou». Une autre étude menée par Kim Racine (Racine, 2016) a examiné la gestion intracellulaire des éléments du groupe platine et des TR chez *C. reinhardtii*. Cette étude a montré que les TR sont logées majoritairement dans les organites (mitochondrie, chloroplaste, noyau) et dans les granules (renfermant une grande teneur de polyphosphate ou en azote/soufre). Racine a montré que les TR se concentrent dans la fraction organites et granules avec un pourcentage de 75 % que ce soit pour des expériences à court terme (1 heure) ou à long terme (14 heures). Au sein de la même équipe du Pr. Fortin, Anne Crémazy (Crémazy, 2014) a étudié dans sa thèse la distribution subcellulaire de l'aluminium et du scandium accumulés chez *C. reinhardtii*. Crémazy a trouvé une prépondérance dans la

répartition des deux métaux selon l'ordre décroissant suivant : organites > granules > HSP et HDP. Ces deux métaux sont de groupe A «dur» tout comme les métaux d'intérêt de notre projet. Ils ont comme donneurs d'électrons typiques les atomes d'oxygènes, les groupements phosphates, carboxylates, sulfates, qui sont négativement chargés. La distribution de ces métaux dépend certainement de leur spéciation chimique et de leurs affinités aux ligands disponibles dans le système biologique. Les ions d'aluminium formeront fréquemment des complexes solubles avec les groupements phosphates. Ces derniers se trouvent dans les terminaux de l'ADP (adénosine diphosphates) et l'ATP (adénosine triphosphate) (Martin, 1992). Ceci pourrait expliquer la concentration importante des métaux trivalents dans la fraction organites. L'ATP se produit dans la mitochondrie au cours de respiration cellulaire, également dans les chloroplastes au cours de la photosynthèse. Une étude de fractionnement subcellulaire aurait pu confirmer cette hypothèse pour notre cas (le Nd, le Tm et de l'Y). Pour résumer, les différents mécanismes de défense mis en branle par les cellules algales lorsqu'elles sont contaminées avec les TR, peuvent être la cause de la différence entre les réponses des deux espèces.

**Tableau 3-20: Comparaison entre les CE50 de chaque métal chez *C. fusca* (avec les IC95%).**

Métal (M)	Néodyme	Thulium	Yttrium
Paramètre	CE50		
<b>[M] total mesuré (nM)</b>	2159 [1254 – 3688]	888 [802 – 983 nM]	508 [323 – 799]
<b>[M<sup>3+</sup>] (nM)</b>	1181 [624 – 2234]	435 [375-503]	206 [50-839]
<b>[M] intracellulaire (amol/cell)</b>	<b>176</b> [134 – 233]	<b>187</b> [156 – 225]	<b>173</b> [114 – 262]

**Tableau 3-21: Comparaison entre les CE50 de chaque métal chez *C. reinhardtii*.**

Métal (M)	Néodyme	Thulium	Yttrium
Paramètre	CE50		
<b>[M] total mesuré (nM)</b>	2840 [1070 – 4110]	1910 [1450 – 2510]	60,3 [52,3 – 70,0]
<b>[M<sup>3+</sup>] (nM)</b>	2070 [1360 – 3150]	1320 [823 – 2110]	0,114 [ 0,735× 10 <sup>-1</sup> – 0,179]
<b>[M] intracellulaire (amol)</b>	<b>173</b> [118 – 252]	<b>915</b> [576 -1450]	<b>25,8</b> [17,3 – 38,6]

La Figure 3.53 représente les concentrations de chaque métal internalisé chez chaque espèce. On remarque *C. fusca* internalise plus facilement les TR étudiées que *C. reinhardtii* (les pentes de ces représentations sont plus importantes chez *C. fusca* que chez *C. reinhardtii*). Au-delà d'une concentration en ions libres de Tm de  $10^{-7}$  M, on observe une superposition des points pour les deux espèces. Ceci s'explique par l'effet de mortalité des cellules à des concentrations élevées en métal. Pour *C. fusca*, les nuages des points des trois métaux internalisés sont presque superposables. D'ailleurs, les valeurs CE50 de chaque métal exprimé en concentration intracellulaire sont similaires pour cette algue.

On a calculé les flux d'internalisation maximaux de chaque métal chez chacune des espèces après 120 h d'exposition. Les valeurs des flux sont ordonnées dans la Figure 3.54. Chez *C. fusca*, la valeur la plus élevée de  $J_{max}$  est obtenue pour le néodyme ( $6,4 \times 10^{-22}$  mol. $\mu\text{m}^{-2}.\text{min}^{-1}$ ) suivie de celle de thulium avec  $4,10 \times 10^{-22}$  et en dernier lieu l'yttrium avec  $3,27 \times 10^{-22}$  mol. $\mu\text{m}^{-2}.\text{min}^{-1}$ . Dans le cas de la 2<sup>ème</sup> espèce, *C. reinhardtii*, l'ordre susmentionné est inversé : les valeurs de  $J_{max}$  correspondent à :  $7,82 \times 10^{-21}$ ,  $4,77 \times 10^{-21}$  et  $5,21 \times 10^{-22}$  mol. $\mu\text{m}^{-2}.\text{min}^{-1}$  pour l'Y, le Tm et le Nd respectivement. Les constantes d'affinités pour *C. fusca* sont  $K_{Tm, c. f} = 10^{6,66} \text{ M}^{-1}$ ,  $K_{Nd, c. f} = 10^{7,32} \text{ M}^{-1}$  et  $K_{Y, c. f} = 10^{9,8} \text{ M}^{-1}$ . Pour *C. reinhardtii*, ces constantes déterminées par la méthode de Michaelis-Menten sont les suivantes :  $K_{Tm, c. r} = 10^{6,22} \text{ M}^{-1}$ ,  $K_{Nd, c. r} = 10^{6,05} \text{ M}^{-1}$   $K_{Y, c. r} = 10^{6,4} \text{ M}^{-1}$ . On remarque que pour chaque espèce, les constantes d'affinité des métaux sont similaires sauf pour le cas de l'yttrium.

Dans un travail de Wilkinson sur *C. reinhardtii*, le flux maximal du Sm était de  $2,5 \times 10^{-24}$  mol. $\mu\text{m}^{-2}.\text{min}^{-1}$  et la constante d'affinité  $K_{Sm, c. r} = 10^7 \text{ M}^{-1}$  quand l'espèce était exposée à court terme (60 min) au Sm seul. Dans la même étude, la compétition entre le Sm et d'autres lanthanides (La, Eu et Ce) mène à une déplétion du flux de Sm en présence de ces compétiteurs avec les constantes de stabilité respectives suivantes :  $K_{La, c. r} = 10^{6,8} \text{ M}^{-1}$ ,  $K_{Ce, c. r} = 10^{6,9} \text{ M}^{-1}$  et  $K_{Eu, c. r} = 10^{6,9} \text{ M}^{-1}$  (Tan, Yang et Wilkinson, 2017). Pour cette étude, les constantes d'affinité sont similaires pour les quatre lanthanides. Ces observations supposent l'existence d'un site commun d'internalisation pour les lanthanides.

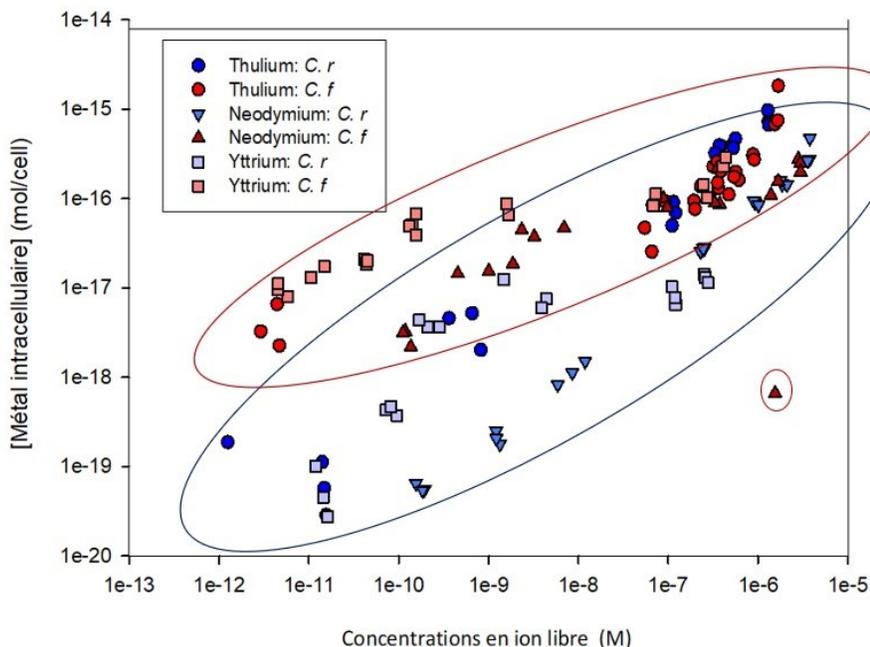


Figure 3-53 : Métaux internalisés chez les deux espèces en fonction de l'ion libre. Les points entourés en bleu représentent *C. reinhardtii*; ceux en rouge représentent *C. fusca*.

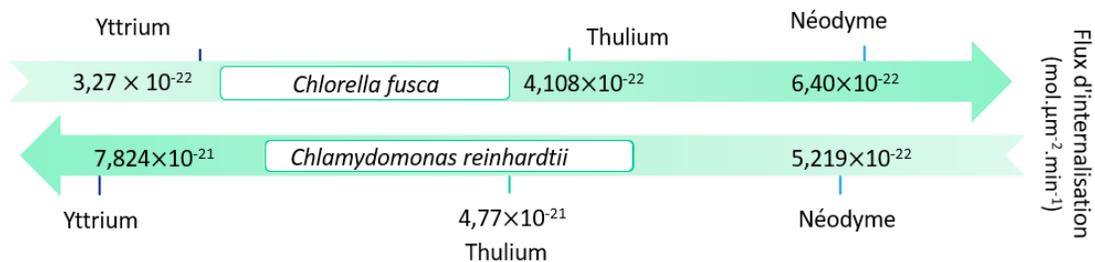


Figure 3-54 : Les flux d'internalisation maximums pour les deux espèces algales.

### 3.5 Exposition de *Chlamydomonas reinhardtii* à différentes concentrations de thulium en présence de néodyme

#### 3.5.1 Adsorption

*Chlamydomonas reinhardtii* a été exposée à un mélange de deux lanthanides (Tm, Nd) dans le milieu MHSM-2; la concentration du Nd a été fixée à une valeur nominale de 1000 nM alors que la concentration du thulium augmentait de 50 à 3000 nM. Également, *C. reinhardtii* a été exposée en présence de 1000 nM en Nd en absence de Tm. Cette expérience a pour but de déterminer le comportement de *C. reinhardtii* en présence de

deux lanthanides et d'investiguer l'effet de la combinaison d'un lanthanide léger et un autre lourd.

La figure ci-dessous illustre l'adsorption du Tm (Figure 3.57) au niveau de la surface biologique de l'espèce algale après une exposition chronique. Les concentrations en Tm varient d'un échantillon à l'autre dans la gamme de 50 à 3000 nM, le Tm adsorbé augmente linéairement en fonction de celui mesuré. Une régression linéaire a été dressée à l'aide des logarithmes des données. Les conditions de la linéarité sont vérifiées à l'aide du logiciel SPSS : les points se concentrent autour de la ligne droite imaginaire représentant les moindres carrés. Les résidus standardisés se situent entre un minimum et maximum de -2,1 et 2,3 respectivement, ce qui néglige l'existence des points «aberrants». Le terme d du test Durbin-Watson confirme l'indépendance des termes d'erreurs; il est de 1,54. Le graphe «P-P normal» (Figure 3.55) vérifie la normalité des résiduels : on remarque que les points s'alignent autour d'une droite linéaire ce qui signifie une distribution suivant une loi normale. Finalement, la Figure 3.54 représente les résidus en fonction des valeurs de la variable dépendante prédite. Aucune forme n'apparaît (tendance, cône...), l'hypothèse d'homoscédasticité est donc validée. Le facteur F est égal à 140 avec un p-value < 0,005. Le  $r^2$  est égale à 0,87 avec les données transformées en logarithmique et cette prédiction est significative.

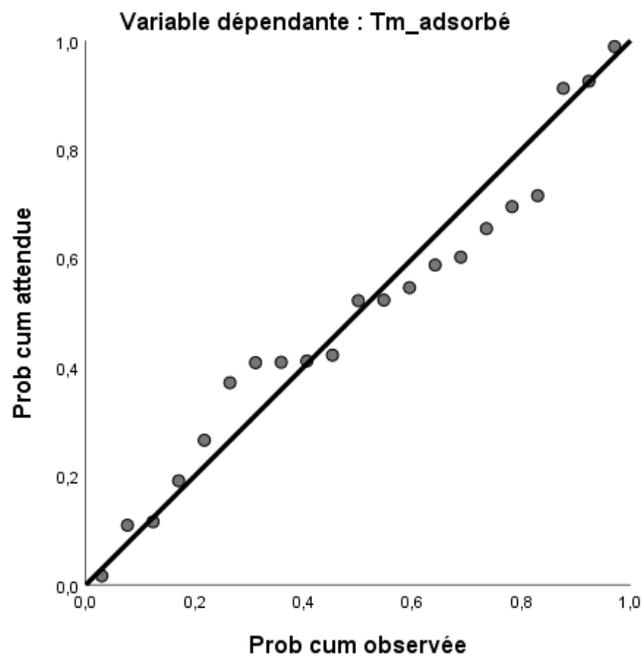


Figure 3-55 : Tracé P-P normal de régression résiduel standardisé

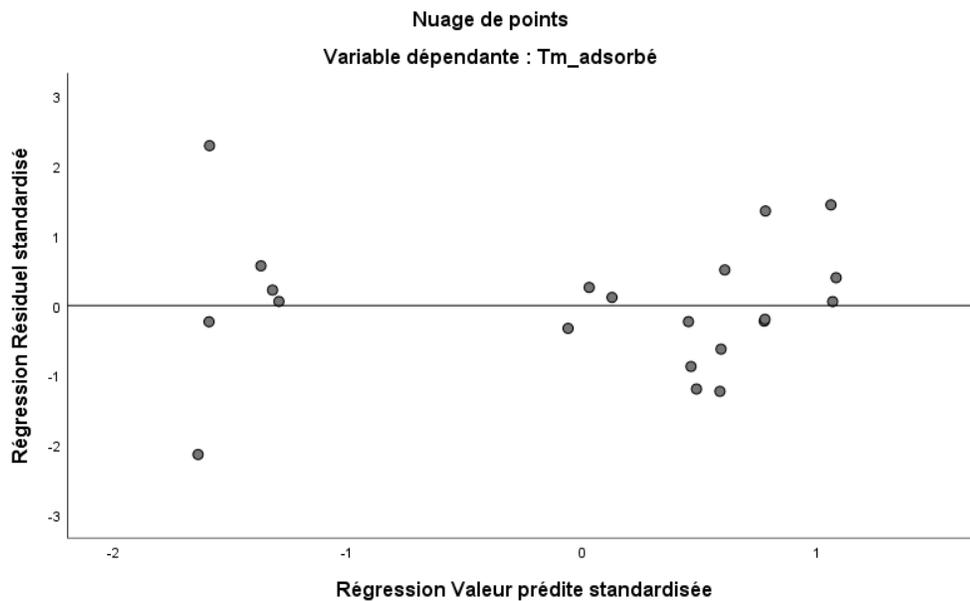


Figure 3-56 : Tracé des résidus (erreurs) en fonction des valeurs prédites : vérification de l'homoscédasticité

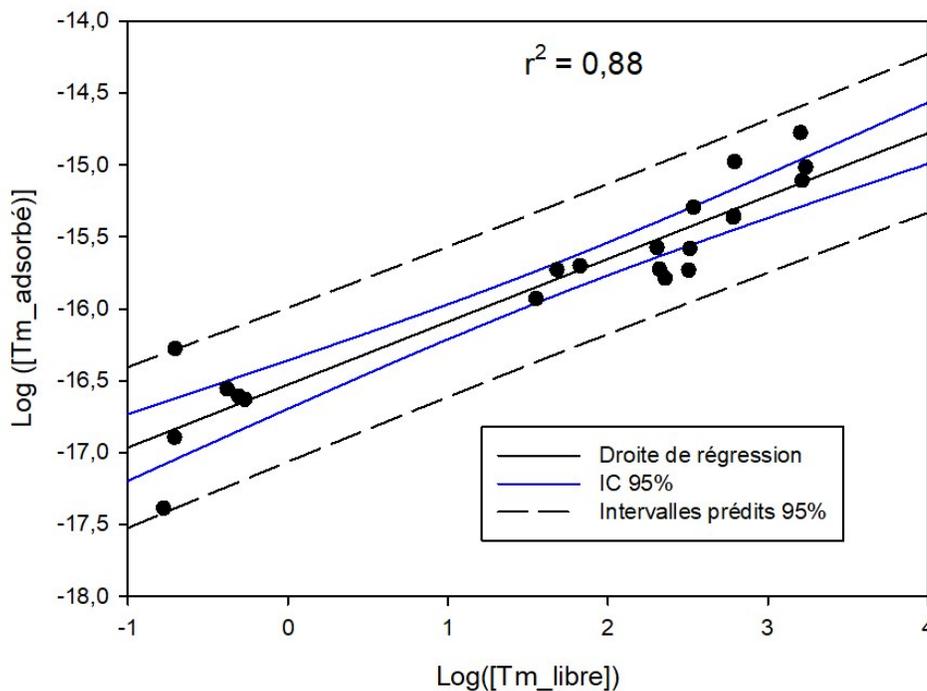


Figure 3-57 : Tm adsorbé au niveau de la membrane plasmique de *C. reinhardtii* en fonction de la concentration en Tm<sup>3+</sup> libre après une exposition de 120 h.

### 3.5.2 Toxicité : Effet sur la croissance cellulaire

#### 3.5.2.1 Courbe de croissance

Le Tableau 6.10 au niveau de l'annexe représente les concentrations mesurées de chaque échantillon ainsi que la valeur en ions libres correspondante calculée avec MINEQL+ version 5.0. Les courbes suivantes dans la Figure 3.58 représentent le profil de croissance de *C. reinhardtii* à différentes concentrations du thulium en présence de 1  $\mu\text{M}$  de néodyme.

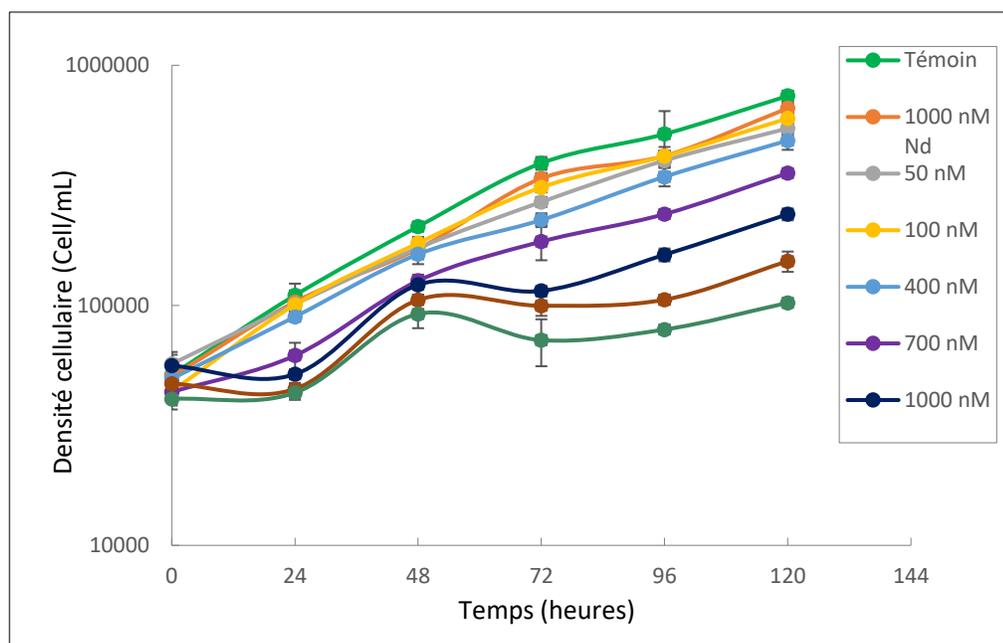


Figure 3-58 : Courbe de croissance de *C. reinhardtii* à différentes concentrations de Tm en présence de 1  $\mu\text{M}$  de Nd.

On observe qu'après 24 h, une légère diminution cellulaire pour les hautes concentrations en Tm (1000 et 1500 nM). Une phase exponentielle est montrée par la courbe de croissance entre 24 et 48 h pour toutes les concentrations. La différence entre les densités cellulaires des témoins et celles de chaque traitement est significative après 120 h d'exposition. Le Tableau 3.22 représente les résultats du test statistique. Les taux de croissance pour chaque traitement sont calculés à 120 h et comparés avec ceux des témoins. Les résultats représentés dans le Tableau 2.23 montrent que la

différence est significative sauf ceux pour le traitement à 100 nM de Tm et 1  $\mu$ M de Nd ajouté seul au milieu.

**Tableau 3-22: One-way ANOVA test : p-value entre les densités cellulaires à 120 h.**

	<b>p</b>	<b>p &lt; 0,050</b>
<b>Témoin vs. 3000 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 1500 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 1000 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 700 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 400 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 50 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 100 nM</b>	<0,001	Oui
<b>Témoin vs. 1000 nM Nd</b>	0,004	Oui

**Tableau 3-23: One-way ANOVA test : p-value entre les taux de croissance cellulaire de *C. reinhardtii* après 120 h d'exposition au mélange du Tm et Nd ( $\mu_{\text{Témoin}} = 0,54 \pm 0,013$ ).**

	<b><math>\mu</math> (<math>j^{-1}</math>)</b>	<b>p</b>	<b>P &lt; 0,050</b>
<b>Témoin vs. 3000 nM</b>	0,18 $\pm$ 0,01	< 0,001	Oui
<b>Témoin vs. 1500 nM</b>	0,25 $\pm$ 0,04	< 0,001	Oui
<b>Témoin vs. 1000 nM</b>	0,29 $\pm$ 0,02	< 0,001	Oui
<b>Témoin vs. 700 nM</b>	0,42 $\pm$ 0,005	< 0,001	Oui
<b>Témoin vs. 400 nM</b>	0,46 $\pm$ 0,03	0,006	Oui
<b>Témoin vs. 100 nM</b>	0,53 $\pm$ 0,03	1	Non
<b>Témoin vs. 50 nM</b>	0,45 $\pm$ 0,01	0,003	Oui
<b>Témoin vs. 1000 nM Nd</b>	0,51 $\pm$ 0,01	1	Non

Le pourcentage d'inhibition causée par chaque concentration d'exposition a été calculé selon la formule ci-dessous. Le Tableau 3.24 représente ces résultats par moyennes de chaque triplicata.

**Tableau 3-24 : Pourcentage d'inhibition (en moyenne des triplicata) selon les concentrations nominales.**

<b>Concentration nominale</b>	<b>Inhibition (%)</b>	<b>Propagation d'erreur (%)<sup>2</sup></b>
<b>50 nM</b>	26,8	± 8,6
<b>100 nM</b>	19,4	± 4,5
<b>400 nM</b>	34,8	± 8,0
<b>700 nM</b>	52	± 12
<b>1000 nM</b>	68	± 16
<b>1500 nM</b>	80	± 18
<b>3000 nM</b>	86	± 20
<b>1000 nM en Nd</b>	11,2	± 2,6

$$Inhibition (\%) = \frac{control - Ci}{control} * 100 \quad \text{Équation 12}$$

*Ci* : densité cellulaire correspondante à une concentration de thulium en solution

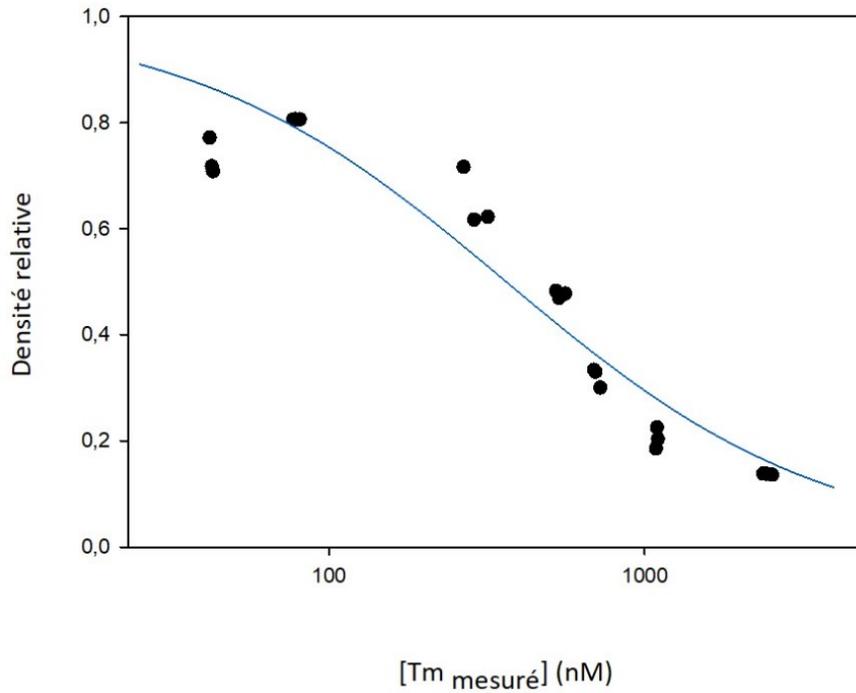
*Control* : densité cellulaire en absence de Tm et de Nd

On remarque une seule exception, pour 100 nM, qui cause moins d'inhibition que 50 nM avec des pourcentages respectifs de 19,4 % et 26,8 %.

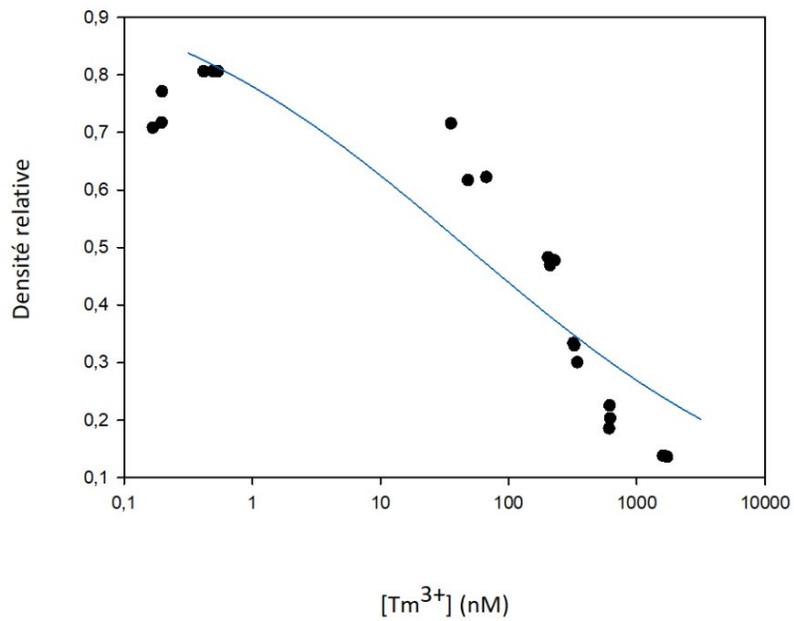
Courbe dose-réponse

La concentration efficace moyenne 50 % (CE50) de Tm a été déterminée à partir de la densité relative calculée à partir des concentrations algales obtenues après 120 h en fonction des concentrations mesurées en Tm. Le résultat est montré dans la Figure 3.59 (a). De même, la CE50 a été déterminée en fonction du Tm libre. Le résultat est montré à la Figure 3.57 (b).

<sup>2</sup> Le calcul de la propagation d'erreur est détaillé dans l'annexe.



(a)

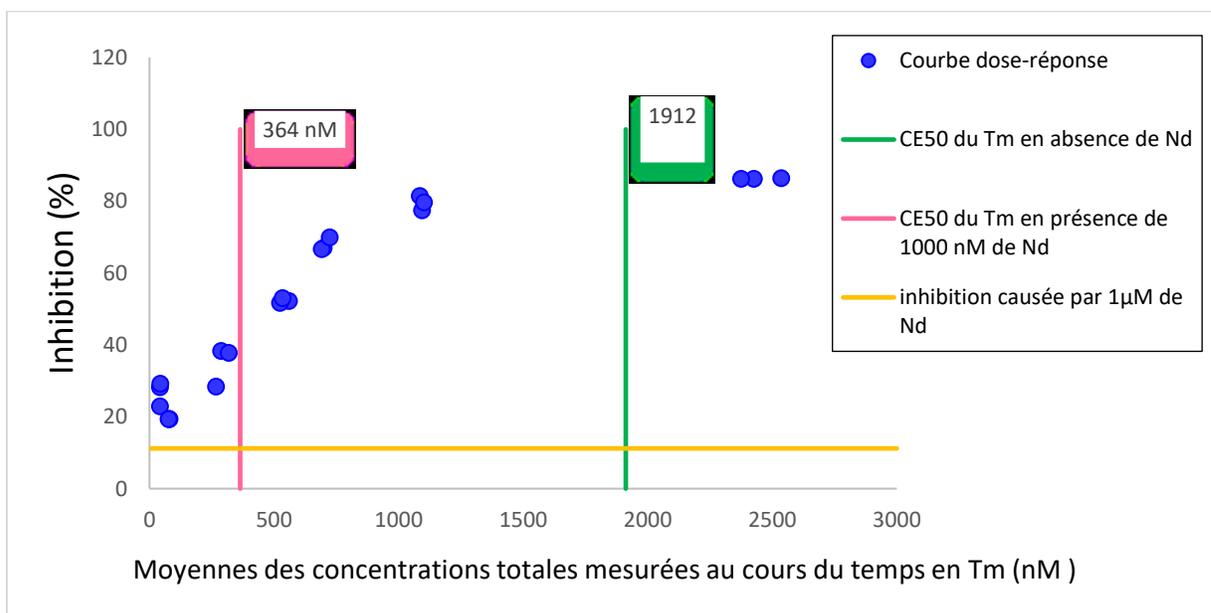


(b)

Figure 3-59 : Densité relative en fonction de la concentration moyenne mesurée en Tm (a) et en fonction de Tm libre (b) après 120h d'exposition.

La valeur de CE50 est 364 nM avec un IC<sub>95%</sub> de [291– 455] nM en fonction du Tm mesuré. Cette valeur est de 48 nM avec un IC<sub>95%</sub> [22 – 104] nM si on l'exprime en Tm libre en solution.

La Figure 3.60 représente les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en Tm. La ligne horizontale en jaune représente la mortalité causée par la présence de 1000 nM de Nd seul (sans Tm) avec le même lot de microalgues utilisé au cours de cette expérience. La ligne verte verticale représente la valeur de CE50 en Tm seul obtenue dans une expérience précédente. Celle en rose représente la valeur de CE50 de Tm en présence de 1 µM de Nd.



**Figure 3-60 : Courbe dose-réponse : inhibition causée par le thulium en présence d'une concentration constante de 1000 nM de Nd.**

On remarque qu'il y a une diminution de la valeur de la CE50 de Tm en présence de 1 µM de Nd. Cette valeur est de 364 nM alors que dans une autre expérience en absence de Nd, la CE50 de Tm était de 1912 nM avec un intervalle de confiance de [1453 – 2514] nM. On présume qu'il y a un effet additif en présence d'un deuxième métal (le Nd) vu qu'on a obtenu une toxicité plus élevée que celle obtenue en présence de Tm seul. L'inhibition est importante à des concentrations en Tm inférieures à la CE50 de Tm seul donc on a un effet « more than additive ».

### 3.5.3 Accumulation : Métal internalisé

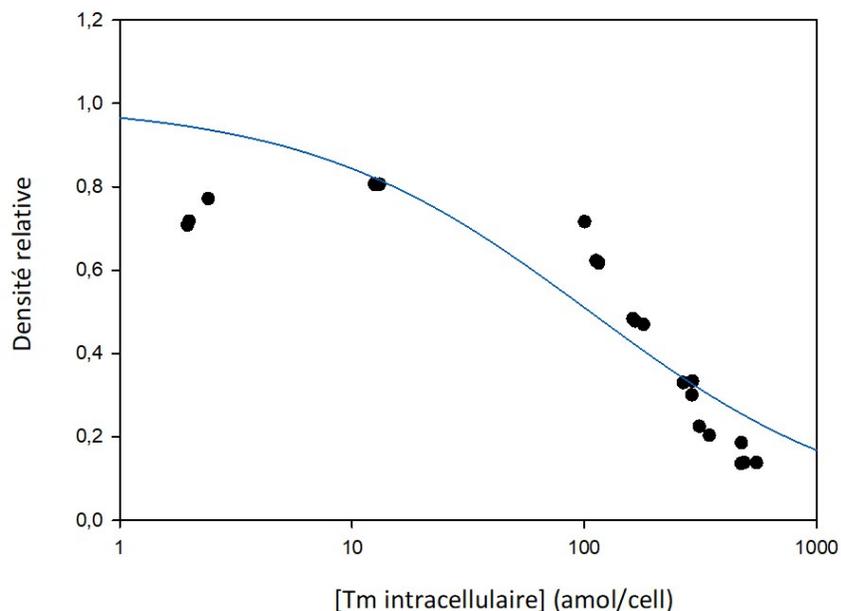


Figure 3-61 : Courbe dose-réponse : densité relative en fonction de thulium internalisé par cellule.

La Figure 3.61 représente la densité cellulaire en fonction du thulium internalisé quantifié après 120 h d'exposition. Ce paramètre est de 106 amol avec un  $IC_{95\%}$  de [69 – 163].

Le Tableau 3.25 résume les valeurs des CE50 :

Tableau 3-25 : Valeurs des CE50.

Exprimée en	CE50	Intervalle de confiance
Tm mesurée (nM)	364	[291 – 455]
Tm internalisé (amol/cell)	106	[69 – 163]
ion libre Tm <sup>3+</sup> (nM)	48	[22 – 104]

La Figure 3.62 montre le métal internalisé par cellule après 5 jours d'exposition en fonction des concentrations en ions libres. La relation entre ces deux paramètres est linéaire.

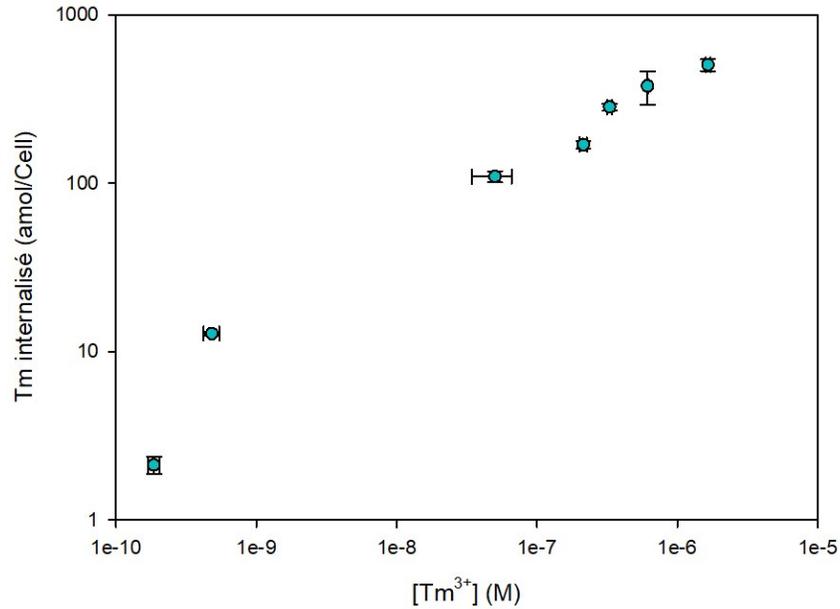


Figure 3-62 : Thulium internalisé en fonction des concentrations en ion libre.

### 3.5.4 Flux d'internalisation :

Nous avons remarqué au long de nos expériences que la réponse biologique (inhibition de croissance) est liée directement à la quantité du métal en forme libre présente dans le milieu ainsi qu'à la quantité internalisée au sein des cellules. L'internalisation du métal est directement associée à la liaison du métal d'intérêt avec un site au niveau de la membrane biologique (un transporteur). La modélisation des flux internalisés des métaux chez le phytoplancton représente une méthode simple pour tester quantitativement le BLM (Slaveykova et Wilkinson, 2005).

Nous avons choisi *C. reinhardtii* pour déterminer les flux d'internalisation ainsi que pour étudier le comportement des algues en présence de deux TR en même temps. Nous avons eu recours aux équations citées au niveau de la section 1.3.1.5 afin de déterminer les constantes d'affinités de chaque métal. Les commandes de SigmaPlot sont utilisées pour dresser les courbes des flux.

### 3.5.4.1 Flux d'internalisation de néodyme en absence de thulium

Afin de calculer les flux internalisés expérimentalement nous avons pris en compte le taux de division  $\mu$  vu que nos expériences sont à long terme :  $J_{int} = [Metal]_{intracellulaire} \times \mu$ .

Afin de déterminer la constante de stabilité de néodyme  $K_{Nd}$ , la courbe de flux d'internalisation de Nd chez *C. reinhardtii* est dressée (Figure 3.63).

$$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{\Delta t}$$

avec  $X_f$  : densité cellulaire après 120 h d'exposition

$X_i$  : densité cellulaire inoculée à  $t_0$ .

L'équation à laquelle on a eu recours pour déterminer les constantes  $K_{Nd}$  et  $J_{max}$  est la suivante :

$$J_{int} = \frac{J_{max} \times [M^{n+}]}{K_{Nd} \times [M^{n+}] + J_{max}}$$

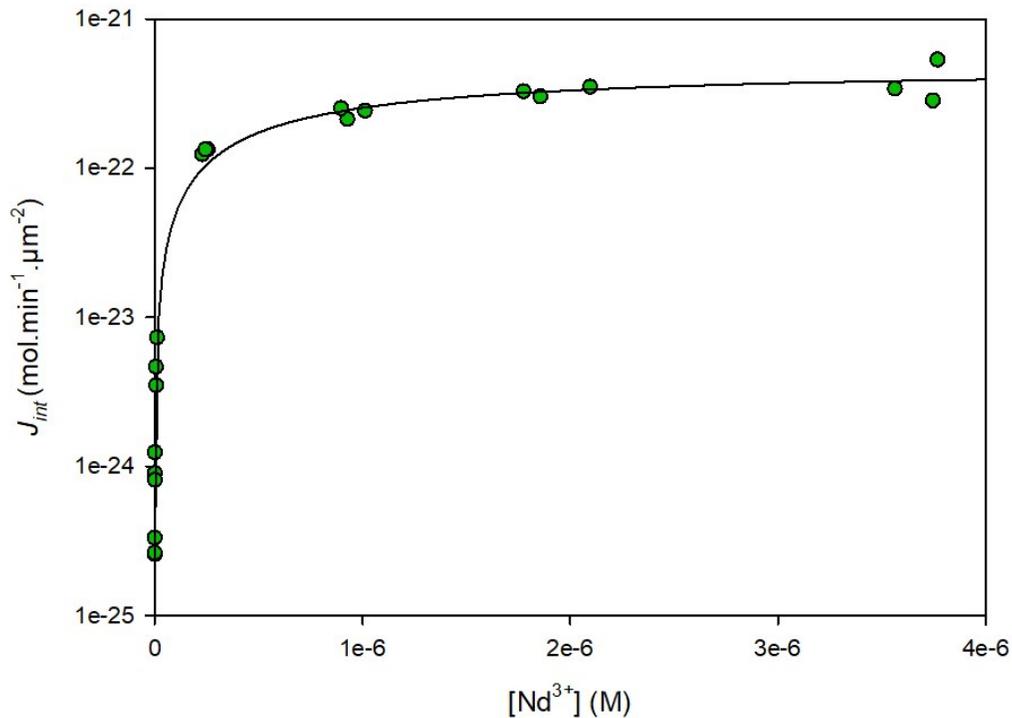


Figure 3-63 : Flux d'internalisation de Nd chez *C. reinhardtii* à pH= 5,00 en absence de Tm.

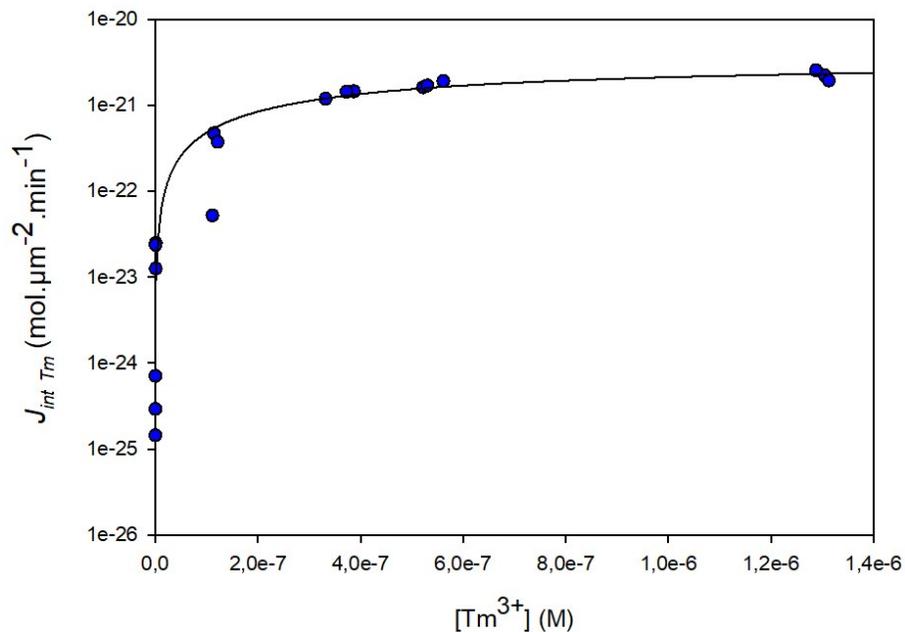
Le flux maximal de Nd, la constante d'affinité  $K_{Nd}$  et la constante de demi-saturation  $K_d$  sont présentés dans le Tableau 3.26.

**Tableau 3-26 : Valeurs de flux maximal, constante de demi-saturation et constante de stabilité de Nd chez *C. reinhardtii*.**

Valeur	
$J_{max}$ (mol. $\mu\text{m}^{-2}.\text{min}^{-1}$ )	$4,8 \times 10^{-22}$
$K_d$ (M)	$8,86 \times 10^{-7}$
$K_{Nd}$ (M <sup>-1</sup> )	$1,13 \times 10^6$

### 3.5.4.2 Flux d'internalisation de thulium en absence de néodyme

De même, le flux d'internalisation de Tm est déterminé en absence de Nd. La Figure 3.64 représente le flux d'internalisation de Tm en fonction de la concentration en ion libre présent dans le milieu. Le Tableau 3.27 résume les résultats de flux d'internalisation maximal ainsi que les constantes de demi-saturation  $K_d$  et celle d'affinité  $K_{Tm}$ .



**Figure 3-64 : Flux d'internalisation de Tm en absence de Nd chez *C. reinhardtii* à pH=5,00.**

**Tableau 3-27 : Valeurs de flux maximal, constante de demi saturation et constante de stabilité de Tm en absence de néodyme.**

	<b>Valeur</b>
$J_{max}$ (mol. $\mu\text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$3,39 \times 10^{-21}$
$K_d$ (M)	$6,05 \times 10^{-7}$
$K_{Tm}$ (M <sup>-1</sup> )	$1,65 \times 10^6$

### 3.5.4.3 Flux d'internalisation de Tm en présence de 1000 nM de Nd

Le flux d'internalisation est calculé expérimentalement pour l'expérience d'exposition de *C. reinhardtii* à différentes concentrations en Tm en présence de 1  $\mu\text{M}$  de Nd.

Le flux d'internalisation de Tm en présence de Nd est aussi prédit selon l'équation qui tient compte de la compétition.

$$J_{int,Tm} = \frac{J_{max\ Tm} \cdot K_{Tm} \cdot [Tm^{3+}]}{1 + K_{Tm} \cdot [Tm^{3+}] + K_{Nd} \cdot [Nd^{3+}]}$$

Le Tableau 6.11 dans l'annexe résume les valeurs des flux internalisés mesurés et prédits du thulium ainsi que ceux du néodyme. La Figure 3.65 représente le flux en Tm en fonction de la concentration en ion libre  $Tm^{3+}$ . Les constantes de Michaelis-Menten sont présentées dans le Tableau 3.21.

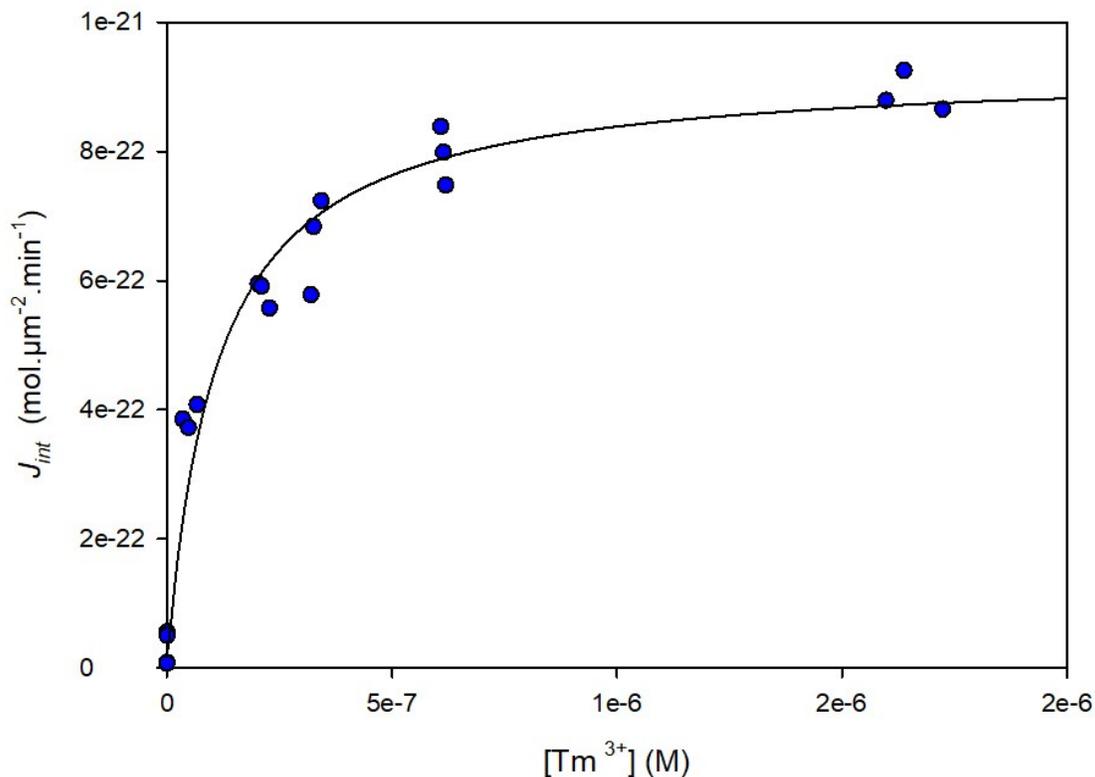


Figure 3-65 : Flux d'internalisation de Tm en présence de 1000 nM de Nd chez *C. reinhardtii*.

Le Tableau 3.28 résume les résultats obtenus de la courbe de flux d'internalisation. Le flux maximal du Tm en présence de Nd est de  $9,3 \times 10^{-22}$  mol.μm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>, cette valeur était inférieure à celle obtenue en absence de Nd ( $3,4 \times 10^{-21}$  mol.μm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>). La Figure 3.66 montre les flux d'internalisation pour chaque cas. En présence de 1000 nM de Nd, l'internalisation de Tm est inhibée : dans ce cas à partir d'une concentration égale à  $5 \times 10^{-7}$ , les flux sont inférieurs aux flux obtenus sans Nd. À une concentration constante de Nd, plus le Tm augmente dans le milieu plus on remarque l'inhibition de l'internalisation du TRLO. Ces observations sont cohérentes avec l'hypothèse que l'assimilation de deux métaux est effectuée via un même transporteur membranaire.

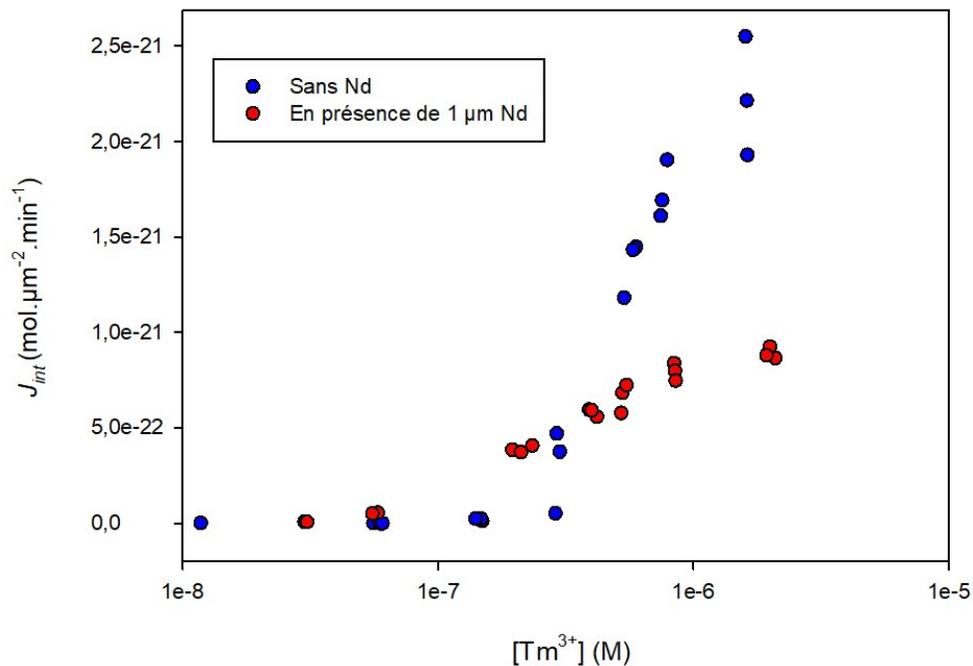


Figure 3-66 : Flux d'internalisation de Tm en fonction des ions libres : en rouge les flux de Tm en absence de Nd, et les points en bleu représentent les flux en présence de Nd.

Tableau 3-28 :  $J_{\max}$ , constante de demi-saturation  $K_d$  et constante de stabilité de Tm  $K_{Tm}$ .

	Valeur
$J_{\max}$ (mol. $\mu\text{m}^{-2}.\text{min}^{-1}$ )	$9,3 \times 10^{-22}$
$K_d$ (M)	$1,1 \times 10^{-7}$
$K_{Tm}$ (M <sup>-1</sup> )	$10^{6,96}$

La courbe 3.67 suivante représente  $J_{int}$  prédit par rapport à celui mesuré. On remarque que la relation est linéaire entre les deux paramètres avec un  $r^2$  égal à 0,77. Ainsi, l'équation à laquelle on a eu recours nous a permis de prédire les flux d'internalisation dans le cas d'une compétition entre deux lanthanides.

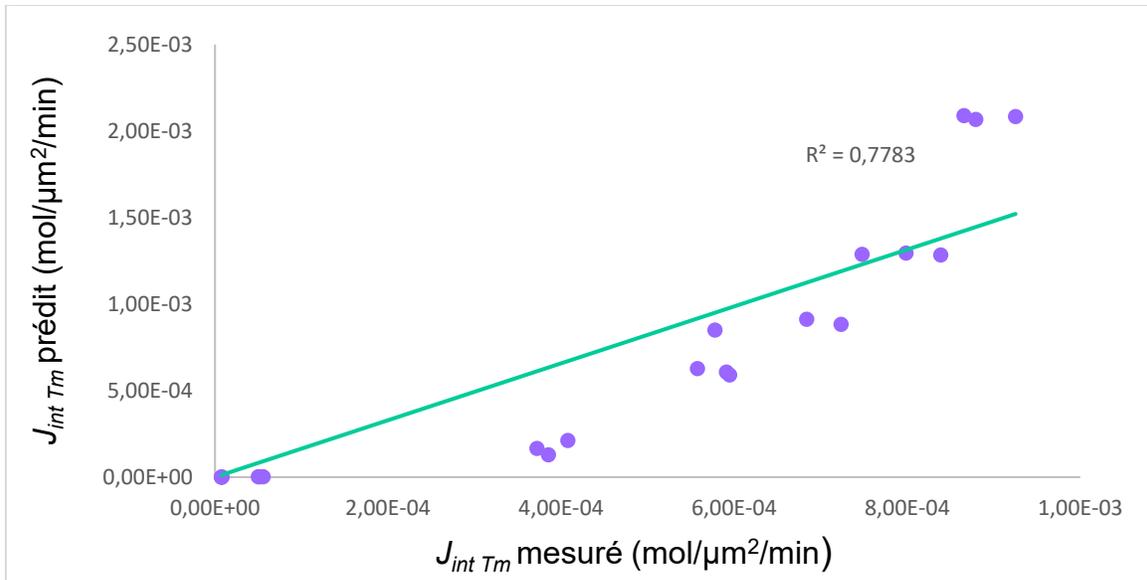


Figure 3-67 : Flux d'internalisation de Tm calculés en utilisant les constantes déterminées expérimentalement en fonction des flux d'internalisation déterminés expérimentalement chez *C. reinhardtii* à pH 5,00. La droite 1 :1 (ligne pleine) est tracée pour comparaison.

## CHAPITRE 4 : CONCLUSION

---

La forte demande et production des terres rares sont dues à l'accroissement continu de leur utilisation dans les industries de hautes technologies notamment dans la production des appareils électroniques (téléphones, tablettes, télévisions...), dans l'industrie militaire (avion), dans la médecine (IRM), dans le secteur du transport (voitures hybrides) et en agronomie (engrais chimiques). Le potentiel que possède les provinces canadiennes pour ces substances est élevé. Le succès d'exploration de projets au Témiscamingue et au nord de Schefferville est un bon exemple à citer pour le Québec. Ceci fera en sorte d'augmenter les concentrations en TR dans l'environnement. En effet, la contamination en TR de l'écosystème aquatique peut être due aux déchets miniers, à leur extraction, à leur utilisation, aux déchets électroniques et aux sols traités par les engrais. Une fois que le milieu aquatique est contaminé, ces métaux peuvent être biodisponibles aux producteurs primaires et se retrouveront chez d'autres organismes (brouetteurs) à cause du transfert trophique. Le premier objectif dans notre projet consistait en la détermination de la toxicité de trois TR différentes sur deux algues vertes ainsi d'établir une étude comparative entre ces éléments et entre la réponse de deux espèces. Dans nos expériences, les deux espèces : *Chlorella fusca* et *Chlamydomonas reinhardtii*, ont été exposées pendant 120 h à différentes gammes de concentrations de chacun de TR suivants : le néodyme, qui représente le groupe de TRLE, le thulium qui représente celui de TRLO et l'yttrium. Ceci avait pour but de déterminer la toxicité de chaque TR à pH = 5. Le classement des TR par ordre de toxicité croissant est comme suit : Nd < Tm < Y. Les résultats ont montré que *C. fusca* était plus sensible aux TR que *C. reinhardtii*. Les C50 exprimées en fonction des concentrations totales mesurées chez *C. fusca* étaient de 2060 [1250 – 3690] nM, 888 [802 – 983] nM et 508 [323 – 799] nM pour le Nd, le Tm et l'Y respectivement. Les valeurs en CE50 exprimées en ions libres de Nd, de Tm et d'Y pour cette algue sont respectivement de 1180 nM [624 – 2230] nM, 435 [375 – 503] nM et 206 [50 – 839]. Pour *C. reinhardtii*, les valeurs en CE50 en fonction des concentrations totales sont de 2840 [1070 – 4110], 1910 [1450 – 2510] nM et 50 [29 – 86] nM pour le Nd, Tm et Y respectivement. Ces concentrations, exprimées en ions libres, sont : 2070 [1360 – 3150] nM pour le Nd, 1320 [823 – 2110] pour le Tm et  $9,97 \times 10^{-2}$  [ $1,85 \times 10^{-2}$  – 0,51] nM pour l'Y.

La différence entre les CE50 exprimées en concentrations totales et celles exprimées en métal libre ( $CE50_{\text{total mesuré}} > CE50_{\text{ions Libres}}$ ) est due à la complexation du métal d'intérêt à l'EDTA présent dans notre milieu. Lorsque la concentration en TR est inférieure à celle de l'EDTA, ce dernier complexe une grande partie des TR. A contrario, quand la concentration en TR est plus élevée que cet élément, l'EDTA devient saturé et les TR seront majoritairement sous la forme libre.

Il est à remarquer que *C. fusca* internalise mieux ces métaux que *C. reinhardtii* surtout pour les concentrations faibles en ions libres. Cependant, les flux maximaux de TR chez *C. reinhardtii* étaient plus élevés que chez *C. fusca* à l'exception du flux de Nd pour lequel les deux valeurs sont similaires.

Quel que soit le métal, la CE50 exprimée en fonction du métal internalisé chez *C. fusca* ne dépasse pas 190 amol/cell et les valeurs sont semblables pour les trois métaux. Pour la 2<sup>ème</sup> espèce, la CE50 du Tm internalisé est la plus élevée par rapport aux autres métaux. Cette valeur s'explique par l'important flux de Tm intracellulaire et indique une tolérance relative de *C. reinhardtii* à cet élément.

Le deuxième objectif consistait à déterminer l'impact de la présence d'un élément des TR sur l'internalisation d'un autre chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Dans le présent projet, il a été démontré que chez *C. reinhardtii*, la présence d'une concentration en TRLE affecte l'internalisation d'une TRLO. En effet, le flux du Tm en absence de Nd est plus important qu'en sa présence. À une concentration constante en Nd, plus la concentration en Tm augmente plus on observe un flux plus faible de ce métal qu'en absence de Nd. La toxicité du thulium en présence de 1  $\mu\text{M}$  Nd est de 364 nM Tm alors qu'elle est de 888 nM Tm en absence de Nd dans le milieu.

Les résultats de ce projet déterminent la toxicité des TR qui sont peu étudiées - le La et le Ce sont fréquemment étudiés dans notre équipe- et comparent entre les réponses de deux algues différentes. Il était utile d'étudier la toxicité d'un mélange de TR vu qu'elles se trouvent, habituellement, ensemble dans la nature. Au surplus, les résultats montrent l'influence de la présence d'un lanthanide léger sur l'internalisation d'un autre lourd. Il serait intéressant de déterminer la toxicité de ces éléments en présence de différentes sources de matière organique. Dans cette étude, les conditions d'exposition au laboratoire étaient constantes (pH, autotrophie), il serait de même intéressant de faire des essais à différents valeurs de pH. Il serait souhaitable d'étudier des rejets industriels et miniers contenant les éléments d'intérêt. L'étude comparative menée dans ce projet

nous laisse se poser la question : quelles sont les mécanismes de défenses envers les TR chez chaque espèce? Des expériences sur la gestion intracellulaire de ces métaux répondront à cette question. Il sera aussi intéressant de vérifier l'effet des valeurs du pH sur la toxicité et la prise en charge de ces éléments.



## CHAPITRE 5: BIBLIOGRAPHIE

---

- Aharchaou I, Rosabal M, Liu F, Battaglia E, Vignati, D.A.L. & Fortin C (2017) Bioaccumulation and subcellular partitioning of Cr (III) and Cr (VI) in the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*. 182:49-57.
- Beaubien C. (2015) Toxicité de deux lanthanides (La ,Ce) sur l'algue verte *Chlorella fusca*. (Thèse de maîtrise, Université de Québec, INRS).
- Binnemans K. & Jones P. T (2015) Rare Earths and the Balance Problem. *Journal of Sustainable Metallurgy*. 1(1):29-38.
- Birungi, Z. S. & Chirwa, E. M. N (2014) Bioresource Technology The kinetics of uptake and recovery of lanthanum using freshwater algae as biosorbents: Comparative analysis. *Bioresource Technology*. 160:43-51.
- Bræk G. S, Malnes D, & Jensen A (1980) Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. IV. Combined effect of zinc and cadmium on growth and uptake in some marine diatoms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 42(1):39-54.
- Campbell P. G. C. (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. In: Tessier, A. and Turner, D.R., Eds., *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, John Wiley & Sons, London, 45-102
- Cloern J. E (2001) Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem *Marine ecology progress series*, 210:223-253.
- Commerce Resources Corp. (2019) Mise en valeur du gisement de terres rares Ashram.
- Crémazy A (2014) Étude des mécanismes de prise en charge des métaux traces trivalents chez les algues unicellulaires. (Thèse de doctorat, Université de Québec, INRS).
- d'Aquino L, Morgana M, Carboni M. A., Staiano M, Antisari M. V., Re M. & Woo S. L. (2009) Effect of some rare earth elements on the growth and lanthanide accumulation in different *Trichoderma* strains. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(12) :2406-2413.
- Elderfield H. (1988) The oceanic chemistry of the rare-earth elements. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 325(1583):105-126.
- Fashui H (2002) Study on the Mechanism of Cerium Nitrate Effects on Germination of Aged Rice Seed. *Biological Trace Element Research*, 87(1):191-200.
- Fisher N. S, Bohe M, & Teyssie J. L (1984). Accumulation and toxicity of Cd, Zn, Ag, and Hg in four marine phytoplankters. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 19(3): 201-213.
- Fortin C & Campbell P. G. C. (2000) Silver Uptake by the Green Alga *Chlamydomonas Reinhardtii* in Relation to Chemical Speciation: Influence of Chloride. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(11):2769.

- Fortin C, Dutel L & Grenier-Laplace J (2004) Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4): 974-981.
- Foster H. E., Barry M. J., Dahm P., Gandhi M. C., Kaplan S. A., Kohler T. S., ... & Welliver, C. (2018). Surgical management of lower urinary tract symptoms attributed to benign prostatic hyperplasia: AUA guideline. *The Journal of Urology*, 200(3), 612-619.
- Gambogi J & Cordier D. J (2016) Minerals yearbook, rare earths. *US Geological Survey*, Virginia, USA.
- Goecje F, Jerez C.G, Zachleder V, Figuerora F.L, 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*, p. 1-12.
- Schulz K J, DeYoung J H, Seal R. R & Bradley D. C. (Eds.) (2018) Critical Mineral Resources of the United States: Economic and Environmental Geology and Prospects for Future Supply. *Geological Survey Professional Paper*, 1802:1-31.
- Choppin G. R & Rizkalla E. N (1994) Solution chemistry of actinides and lanthanides. *Handbook on the physics and chemistry of rare earths*, 18: 559-590.
- Hamouda R. A. E & Abou-El-Souod G. W (2018) Influence of various concentrations of phosphorus on the antibacterial, antioxidant and bioactive components of green microalgae *Scenedesmus obliquus*. *International Journal of Pharmacology*, 14(1): 99-107.
- Haxel G (2002) Rare earth elements: critical resources for high technology (Vol. 87, No. 2). US Department of the Interior, US Geological Survey.
- Hykawy J, Tom Chudnovsky (2014) Initiating Sector Coverage The rare earths Market keeps Changing. Rare earth Industry report
- Kramer K. J. M, De Haan E, Dorten W.S, Kramer Gerard N, Quevauviller Ph (2001) BCR information - the certification of the contents (mass fractions) of Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sc, Sm, Tb, Tm, Y, Yb, Th and U in aquatic plant. European Commission, Standards Measurements and Testing Program. Brussels, Belgium. p 54.
- Lavoie M, Le Faucheur S, Fortin C & Campbell, P. G. (2009) Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquatic Toxicology*, 92(2):65-75.
- Lavoie M, Campbell P & Fortin C (2016) Importance de mieux connaître les mécanismes de transport des métaux pour la prédiction de l'accumulation et de la toxicité des métaux dissous chez le phytoplancton: récentes avancées et défis pour le développement du modèle du ligand biotique. *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, 29(2) :119-147.
- Martin R.B (1992) Aluminium speciation in biology. *Aluminium in Biology and Medicine*. 169:5-25.
- Martov A. G., Ergakov D. V., Guseinov M. A., Andronov A. S., Dutov S. V., Vinnichenko V. A., & Kovalenko A. A. (2018) Initial experience in clinical application of thulium

- laser contact lithotripsy for transurethral treatment of urolithiasis. *Urologia*, 1, p. 112-120.
- MATAMEC (2013) Projet de Terres Rares Kipawa. Description d'un projet désigné. Disponible à : <https://iaac-aeic.gc.ca/050/evaluations/proj/80029?culture=fr-CA>
- Mattson M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing research reviews*, 7(1), 1-7.
- MECART Inc. (2020) Clean room Classification, <https://www.mecart-cleanrooms.com/>. Disponible à: <https://www.mecart-cleanrooms.com/learning-center/cleanroom-classifications-iso-8-iso-7-iso-6-iso-5/>.
- Natural Resources Canada (2014) The rare earth elements industry in Canada—Summary of evidence Standing Committee on Natural Resources. p. 1-26.
- Niyogi S & Wood C. M (2004) Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environmental Science and Technology*, 38(23): 6177-6192.
- Office of Science and Technology et Water, O. of water (2016) Biotic Ligand Model and Copper Criteria. Disponible à: <https://www.epa.gov/wqs-tech/copper-biotic-ligand-model>.
- Pagano G (éd) (2016) Rare earth elements in human and environmental health *at the crossroads between toxicity and safety*. CRC Press. Singapore: Pan Standard.
- Paoli L, Fiorini E, Munzi S, Sorbo S, Basile A & Loppi S (2014) Uptake and acute toxicity of cerium in the lichen *Xanthoria parietina*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104:379-385.
- Parent L (1991) Biodisponibilité de l'aluminium dans les eaux douces en relation avec les pluies acides (Thèse de doctorat, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).
- Pelletier É & Campbell P. G. C. (2008) Comparaison entre les micropolluants organiques et les métaux: Constats actuels et défis pour l'avenir. *Revue des Sciences de l'Eau*, 21(2) :173-197.
- Peng L, Yi L, Zhexue L, Juncheng Z, Jiixin D, Daiwen P & Songsheng Q (2004) Study on biological effect of La<sup>3+</sup> on *Escherichia coli* by atomic force microscopy. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(1):68-72.
- Racine, K. (2016) Étude de la répartition subcellulaire des éléments du groupe platine et des terres rares chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. (Thèse de maîtrise, Université de Québec, INRS).
- Rahal, R. (2018) Toxicité du lanthane chez l'algue verte *Chlorella fusca* en présence de matière organique naturelle. (Thèse de maîtrise, Université de Québec (INRS).
- Reisman D, Weber R, Mckernan J & Northeim C (2013) Rare earth elements: A Review of Production, Processing, Recycling, and Associated Environmental Issues. U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Washington, DC, p.135.
- Rioux, G. (2018) Spéciation du platine en présence de matière organique naturelle et biodisponibilité pour l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. (Thèse de maîtrise, Université de Québec, INRS.)
- Royal Society of Chemistry (2017a) Neodymium. Disponible à: <https://www.rsc.org/periodic-table/element/60/neodymium>

- Royal Society of Chemistry (2017b) Scandium. Disponible à: <https://www.rsc.org/periodic-table/element/21/scandium>
- Royal Society of Chemistry (2017c) Yttrium. Disponible à: <https://www.rsc.org/periodic-table/element/39/yttrium>.
- Ruming Z, Yi L, Zhixiong X, Ping S & Songsheng Q (2000) A microcalorimetric method for studying the biological effects of  $\text{La}^{3+}$  on *Escherichia coli*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 46(1-2): 1-9.
- Sakamoto, N., Kano, N. & Imaizumi H (2008) Biosorption of Uranium and Rare Earth Elements Using Biomass of Algae. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2008.
- Sasso S, Stibor H, Mittag M & Grossman A. R. (2018) The Natural History of Model Organisms: From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *Elife*, 7, e39233.
- Schüler D, Buchert M, Liu R, Dittrich S & Merz, C. (2011) Study on rare earths and their recycling. Final report for the Greens/EFA group in the European Parliament. Öko-Institut eV Darmstadt.
- Seal II R R, Hammarstrom J M, Johnson A N, Piatak N M & Wandless G A (2008) Environmental geochemistry of a Kuroko-type massive sulfide deposit at the abandoned Valzinco mine, Virginia, USA. *Applied geochemistry*, 23(2):320-342.
- Shihira I & Krauss R. W (1965) *Chlorella*, physiology and taxonomy of forty-one isolates. University of Maryland.
- Singing B. N (2017) Évaluation de la toxicité de deux lanthanides (La et Ce) chez les algues vertes unicellulaires à l'aide d'une source organique de phosphore. (Thèse de maîtrise, Université du Québec, INRS).
- Slaveykova V. I & Wilkinson K. J (2005) Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model. *Environmental Chemistry*, 2(1):9-24.
- de Souza Machado A. A, Spencer K, Kloas W, Toffolon M & Zarfl C. (2016) Metal fate and effects in estuaries: A review and conceptual model for better understanding of toxicity. *Science of the Total Environment*, 541:268-281.
- Su D, Li P & Tai P.D (2005) Toxic effects of lanthanides on *Chlorella autotrophica*. *Chinese Journal of Ecology*, 24:382-384.
- Sunda W. G & Huntsman S. A (1998) Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems. *Science of the Total Environment*, 219(2-3):165-181.
- Tai P, Zhao Q, Su D, Li & Stagnitti F (2010) Biological toxicity of lanthanide elements on algae. *Chemosphere*, 80(9):1031-1035.
- Tan, Q. G, Yang G & Wilkinson K. J. (2017) Biotic ligand model explains the effects of competition but not complexation for Sm biouptake by *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 168 :426-434.
- Tétrault, G. (2014) Influence de la physico-chimie du milieu (pH,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) sur l'internalisation et la toxicité du platine et du palladium chez l'algue verte: *Chlamydomonas reinhardtii* . (Thèse de maîtrise, Université du Québec, INRS).

- The spectrum of Riemannium, Physmatics in a nutshell (sans date). Disponible à: <https://thespectrumofriemannium.wordpress.com/?s=Madelung>. Consulté le 20 juin 2019.
- Thomas P. J, Carpenter D, Boutin C & Allison J.E. (2014) Rare earth elements (REEs): effects on germination and growth of selected crop and native plant species. *Chemosphere*, 96:57-66.
- Di Toro D. M, Allen H. E, Bergman H. L, Meyer J. S, Paquin P. R & Santore R. C. (2001) Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(10):2383-2396.
- Tse P. K. (2011) China's rare-earth industry. Reston: US Department of the Interior, US Geological Survey. Disponible à: <https://pubs.usgs.gov/of/2011/1042/of2011-1042.pdf>.
- Université Ouverte des Humanités UOH, Éric Raufaste (2013) Régression linéaire : Évaluer la qualité de la relation. Disponible à: [http://w3.uohpsy2.univ-tlse2.fr/UOHPsy2/index.php?option=com\\_content&task=view&id=207&Itemid=1&limit=1&limitstart=1](http://w3.uohpsy2.univ-tlse2.fr/UOHPsy2/index.php?option=com_content&task=view&id=207&Itemid=1&limit=1&limitstart=1).
- USGS (sans date) Rare earth productions trends. Disponible à: <https://www.usgs.gov/centers/nmic/rare-earths-statistics-and-information>
- Verplanck P. L, Antweiler R. C, Nordstrom D. K & Taylor H. E (2001) Standard reference water samples for rare earth element determinations. *Applied Geochemistry*, 16(2):231-244.
- Voncken J. H. L. (2016) The rare earth elements: an introduction. *Springer International Publishing AG*. Cham. p 127.
- Wang C. X, 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(5-6):309-313.
- Wenhua L, Ruming Z, Zhixiong X, Xiangdong C & Ping S (2003) Effects of La<sup>3+</sup> on growth, transformation, and gene expression of Escherichia coli. *Biological Trace Element Research*, 94(2), 167-177.
- Zhang S & Shan X Q (2001) Speciation of rare earth elements in soil and accumulation by wheat with rare earth fertilizer application. *Environmental Pollution*, 112(3):395-405.

# CHAPITRE 6 : ANNEXE

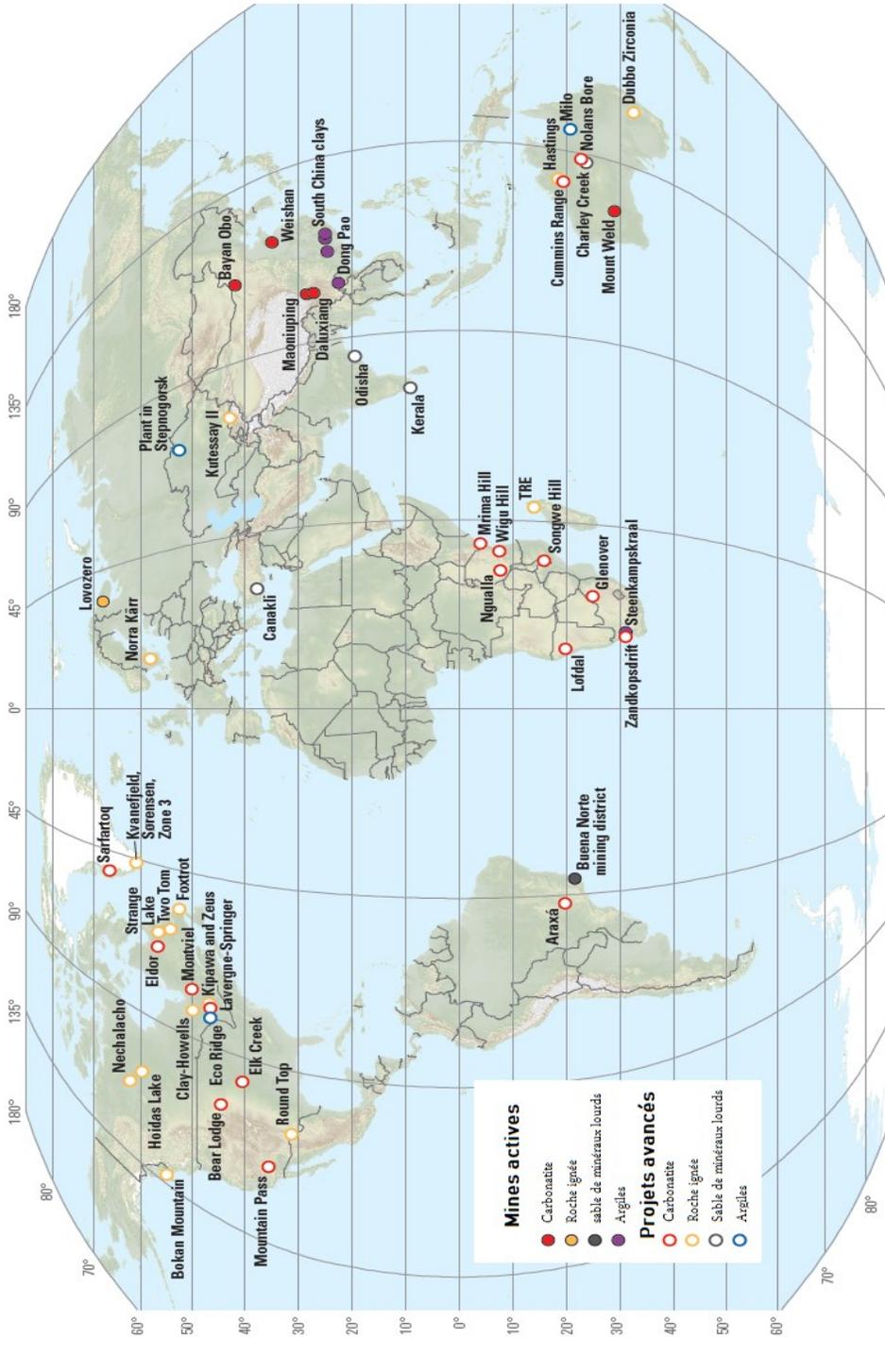


Figure 6-1 Les sites des mines actives des TR ainsi que les projets en stade avancé (Schulz, K. J., DeYoung, J. H., Seal, R. R., & Bradley, 2018)

**Tableau 6-1: Concentrations en néodyme en présence de *C. fusca* (n = 3).**

<b>[Nd]<sub>nominale</sub></b>	<b>24 h</b>	<b>120 h</b>
500 nM	342 ± 37	180 ± 33
1000 nM	744 ± 38	478 ± 53
3000 nM	2323 ± 169	1872 ± 235
5000 nM	3986 ± 214	3631 ± 139

**Tableau 6-2: Concentrations en thulium en présence de *C. fusca* (n = 3).**

<b>[Tm]<sub>nominale</sub></b>	<b>24 h</b>	<b>120 h</b>
100 nM	48 ± 15	54 ± 10
500 nM	420 ± 19	321 ± 15
800 nM	627 ± 20	520 ± 26
1000 nM	823 ± 14	718 ± 37
1200 nM	951 ± 80	669 ± 245
1500 nM	1198 ± 51	964 ± 53
2000 nM	1630 ± 12	1403 ± 27
3000 nM	2580 ± 52	2325 ± 144

**Tableau 6-3: Concentrations en yttrium en présence de *C. fusca* (n = 3).**

<b>[Y]<sub>nominale</sub></b>	<b>24 h</b>	<b>120 h</b>
10 nM	9,97 ± 0,27	2,0 ± 0,6
20 nM	19,0 ± 0,6	6,5 ± 1,1
50 nM	46,0 ± 0,5	24 ± 3
100 nM	94,0 ± 1,6	53 ± 5
200 nM	190 ± 4	139 ± 7
350 nM	336 ± 2	270 ± 11
600 nM	561 ± 17	479 ± 24
800 nM	751 ± 18	652 ± 23

**Tableau 6-4 : Données de l'expérience d'exposition de *C. fusca* au néodyme pendant 120 h.**  
**concentrations en Nd: nominales, mesurées (moyenne au cours du temps), ion**  
**libre, internalisées et densités cellulaires. n (nombre de répétition) = 3.**

<b>[Nd]<sub>nominale</sub> (nM)</b>	<b>[Nd]<sub>mesuré</sub> moyenne (nM)</b>	<b>[Nd<sup>3+</sup>]<sub>estimé</sub> (M)</b>	<b>[Nd]<sub>internalisé</sub> (mol/cell)</b>	<b>Densité cellulaire (10<sup>5</sup> Cell/mL)</b>
Témoin	-	-	-	7,44 ± 1,17
10 nM	0,98 ± 0,07	1,22 × 10 <sup>-1</sup> ± 1,3 × 10 <sup>-2</sup>	(2,8 ± 0,6) × 10 <sup>-18</sup>	8,6 ± 1,6
50 nM	8,2 ± 6,0	1,11 ± 0,7	(1,6 ± 0,2) × 10 <sup>-17</sup>	8,48 ± 0,1
100 nM	2,6 × 10 <sup>1</sup> ± 7,67	4,2 ± 2,4	(4,3 ± 0,51) × 10 <sup>-17</sup>	7,00 ± 0,537
500 nM	2,8 × 10 <sup>2</sup> ± 8,2	84 ± 16	(8,9 ± 1,1) × 10 <sup>-17</sup>	7,5 ± 0,54
1000 nM	6,4 × 10 <sup>2</sup> ± 9,12	3,52 × 10 <sup>2</sup> ± 22,6	(1,3 ± 0,8) × 10 <sup>-16</sup>	4,4 ± 1,22
3000 nM	2,13 × 10 <sup>3</sup> ± 28	1,53 × 10 <sup>3</sup> ± 141,2	(1,3 ± 0,8) × 10 <sup>-16</sup>	4,6 ± 0,542
5000 nM	3,9 × 10 <sup>3</sup> ± 56,5	2,92 × 10 <sup>3</sup> ± 89,3	(2,4 ± 0,4) × 10 <sup>-16</sup>	1,97 ± 4,9

**Tableau 6-5: Expérience avec *C. fusca* à 120 h : concentrations en thulium: nominales, mesurées (moyenne au cours du temps), ion libre, internalisées et densités cellulaires. n (nombre de répétition) = 3.**

<b>[Tm] nominal (nM)</b>	<b>[Tm]<sub>mesuré</sub> moyenne (nM)</b>	<b>[Tm<sup>3+</sup>] estimé (nM)</b>	<b>[Tm]<sub>internalisé</sub> (mol/cell)</b>	<b>Densité cellulaire (10<sup>4</sup> Cell/mL)</b>
Témoin	-	-	-	31,9 ± 2,2
100 nM	39 ± 6,5	4×10 <sup>-3</sup> ± 9,6×10 <sup>-4</sup>	(4,03 ± 2,3) ×10 <sup>-18</sup>	36,9 ± 2,0
500 nM	328 ± 30	71 ± 19,5	(5,5 ± 3,40) ×10 <sup>-17</sup>	28,7 ± 0,9
800 nM	530 ± 29	2,07×10 <sup>2</sup> ± 20,1	(1,02 ± 0,31) ×10 <sup>-16</sup>	20,5 ± 0,3
1000 nM	729 ± 36	3,46×10 <sup>2</sup> ± 25,5	(1,7 ± 0,5) ×10 <sup>-16</sup>	1,9 ± 1,3
1200 nM	808 ± 85	4,04×10 <sup>2</sup> ± 61,9	(1,91 ± 0,8) ×10 <sup>-16</sup>	15,9 ± 0,9
1500 nM	1037 ± 48	5,71×10 <sup>2</sup> ± 36,0	(1,8 ± 0,2) ×10 <sup>-16</sup>	15,3 ± 1,1
2000 nM	1459 ± 18	8,89×10 <sup>2</sup> ± 13,5	(2,94 ± 0,20) ×10 <sup>-16</sup>	10,2 ± 0,5
3000 nM	2412 ± 101	1,63×10 <sup>3</sup> ± 89,5	(1,08 ± 0,7) ×10 <sup>-15</sup>	5,01 ± 0,31

**Tableau 6-6 : Expérience avec *C. fusca* à 120 h. Concentrations en yttrium : nominales, mesurées (moyenne au cours du temps), ion libre, internalisées et densités cellulaires (n=3).**

<b>[Y] nominal (nM)</b>	<b>[Y]<sub>mesuré</sub> moyenne (M)</b>	<b>[Y<sup>3+</sup>] estimé (M)</b>	<b>[Y] internalisé (mol/cell)</b>	<b>Densité cellulaire (10<sup>5</sup> Cell/mL)</b>
Témoin	-	-	-	2,27 ± 0,30
10 nM	(5,9 ± 0,8) ×10 <sup>-9</sup>	(5,0 ± 0,7) ×10 <sup>-12</sup>	(9,6 ± 1,6) ×10 <sup>-18</sup>	1,56 ± 0,17
20 nM	(1,4 ± 0,3) ×10 <sup>-8</sup>	(1,3 ± 0,3) ×10 <sup>-12</sup>	(1,52 ± 0,29) ×10 <sup>-17</sup>	2,5 ± 1,2
50 nM	(3,5 ± 0,1) ×10 <sup>-8</sup>	(4,31 ± 0,01) ×10 <sup>-8</sup>	(1,98 ± 0,62) ×10 <sup>-17</sup>	2,9 ± 3,1
100 nM	(7,2 ± 0,3) ×10 <sup>-8</sup>	(1,43 ± 0,12) ×10 <sup>-10</sup>	(4,58 ± 0,62) ×10 <sup>-17</sup>	2,0 ± 2,4
200 nM	(1,36 ± 0,53) ×10 <sup>-7</sup>	(1,14 ± 0,01) ×10 <sup>-9</sup>	(7,3 ± 1,2) ×10 <sup>-17</sup>	1,9 ± 1,1
350 nM	(2,96 ± 0,04) ×10 <sup>-7</sup>	(7,04 ± 0,03) ×10 <sup>-8</sup>	(9,7 ± 2,1) ×10 <sup>-17</sup>	1,21 ± 0,19
600 nM	(5,23 ± 0,17) ×10 <sup>-7</sup>	(2,58 ± 0,14) ×10 <sup>-7</sup>	(1,22 ± 0,30) ×10 <sup>-16</sup>	1,20 ± 0,04
800 nM	(7,2 ± 0,2) ×10 <sup>-7</sup>	(4,22 ± 0,17) ×10 <sup>-7</sup>	(2,60 ± 0,43) ×10 <sup>-16</sup>	1,03 ± 0,07

**Tableau 6-7 : Expérience avec *C. reinhardtii* à 120 h. Concentrations en néodyme : nominales, mesurées (moyenne au cours du temps), ion libre, internalisées et densités cellulaires (n=3).**

<b>[Nd]<sub>nominal</sub> (nM)</b>	<b>[Nd]<sub>mesuré moyenne</sub> (nM)</b>	<b>[Nd<sup>3+</sup>]<sub>estimé</sub> (nM)</b>	<b>[Nd]<sub>internalisé</sub> (mol/cell)</b>	<b>Densité cellulaire (10<sup>5</sup> Cell/mL)</b>
Témoin	-	-	-	4,74± 0,1
10 nM	5,8 ± 0,6	1,8 ×10 <sup>-1</sup> ± 0,02	(3,4 ± 0,9) × 10 <sup>-20</sup>	4,9 ± 0,02
50 nM	30,54 ± 1,4	1,3 ± 0,07	(1,3 ± 0,1) × 10 <sup>-19</sup>	5,14 ± 0,83
150 nM	99,72 ± 17,16	8,8 ± 3	(8,2 ± 3,4) × 10 <sup>-19</sup>	4,81 ± 0,21
600 nM	501 ± 17,96	2,43×10 <sup>2</sup> ± 13,2	(1,4 ± 0,12) × 10 <sup>-17</sup>	3,82 ± 0,23
1800 nM	1380,3 ± 74,70	9,5×10 <sup>2</sup> ± 59,3	(3,92 ± 0,83) × 10 <sup>-17</sup>	1,9 ± 0,22
3000 nM	2593 ± 207,6	1,91× 10 <sup>3</sup> ± 167	(2,94 ± 0,5) × 10 <sup>-17</sup>	1,22 ± 0,08
5000 nM	4813,3 ± 139,7	3,7× 10 <sup>3</sup> ± 112,3	(2,94 ± 1,44) × 10 <sup>-17</sup>	0,68 ± 0,017

**Tableau 6-8: Expérience avec *C. reinhardtii* à 120 h : concentrations en thulium: nominales, mesurées, ion libre, internalisées et densités cellulaires (n=3).**

<b>[Tm]<sub>nominal</sub> (nM)</b>	<b>[Tm]<sub>mesuré</sub> moyenne (nM)</b>	<b>[Tm<sup>3+</sup>]<sub>estimé</sub> (nM)</b>	<b>[Tm]<sub>internalisé</sub> (mol/cell)</b>	<b>Densité cellulaire (10<sup>5</sup> Cell/mL)</b>
Témoin	-	-	-	3,0 ± 0,7
20 nM	16,24 ± 0,3	1,25 × 10 <sup>-3</sup> ± ND	1,9 × 10 <sup>-19</sup> ± ND	9,5 ± ND
100 nM	81,91 ± 2,06	(1,5 ± 0,08) × 10 <sup>-2</sup>	(6,60 ± 4,22) × 10 <sup>-20</sup>	8,24 ± 0,9
250 nM	199,72 ± 6,30	(6,3 ± 2,31) × 10 <sup>-1</sup>	(3,93 ± 1,7) × 10 <sup>-18</sup>	8,23 ± 0,8
500 nM	396,20 ± 7,9	1,2 × 10 <sup>2</sup> ± 5,23	(7,01 ± 2,1) × 10 <sup>-17</sup>	7,31 ± 0,3
900 nM	752,8 ± 39,50	3,7 × 10 <sup>2</sup> ± 2,8 × 10 <sup>-1</sup>	(3,7 ± 0,4) × 10 <sup>-16</sup>	6,3 ± 3,3
1200 nM	991,31 ± 28,2	(5,4 ± 0,2) × 10 <sup>2</sup>	(4,13 ± 0,5) × 10 <sup>-16</sup>	6,21 ± 1,1
2400 nM	1996,2 ± 16,9	(1,3 ± 0,01) × 10 <sup>3</sup>	(7,9 ± 1,6) × 10 <sup>-16</sup>	4,15 ± 0,6

**Tableau 6-9: Expérience avec *C. reinhardtii* à 120 h : concentrations en yttrium : nominales, mesurées, ion libre, internalisées et densités cellulaires (n=3).**

$[Y]_{\text{nominal}}$ (nM)	$[Y]_{\text{mesuré moyenne}}$ (nM)	$[Y^{3+}]_{\text{estimé}}$ (nM)	$[Y]_{\text{internalisé}}$ (mol/cell)	Densité cellulaire ( $10^5$ Cell/mL)
Témoin	-	-	-	$9,73 \pm 0,7$
20 nM	$14,97 \pm 1,9$	$(1,41 \pm 0,21) \times 10^{-2}$	$(5,8 \pm 3,8) \times 10^{-20}$	$9,23 \pm 0,7$
100 nM	$53,5 \pm 4,4$	$(8,32 \pm 1,2) \times 10^{-2}$	$(4,21 \pm 0,5) \times 10^{-19}$	$5,10 \pm 0,5$
200 nM	$87,9 \pm 10,22$	$(2,2 \pm 0,6) \times 10^{-2}$	$(3,9 \pm 0,4) \times 10^{-18}$	$3,11 \pm 0,2$
400 nM	$184,8 \pm 17,7$	$3,3 \pm 1,6$	$(8,7 \pm 3,43) \times 10^{-18}$	$2,12 \pm 0,23$
600 nM	$353,5 \pm 7,62$	$(1,2 \times 10^2) \pm 6,3$	$(8,2 \pm 2,00) \times 10^{-18}$	$0,96 \pm 0,10$
800 nM	$529,2 \pm 14,3$	$(2,63 \pm 0,12) \times 10^1$	$(1,3 \pm 0,14) \times 10^{-18}$	$0,66 \pm 0,03$

## Calcul de la propagation de l'erreur

La formule utilisée pour calculer le pourcentage d'inhibition pour l'expérience de *C. reinhardtii* exposée aux deux lanthanides Tm et Nd est la suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{Témoins} - C_i}{\text{Témoins}} \times 100 \quad \text{équation 12}$$

Le témoin et la  $C_i$  correspond respectivement à la moyenne de la densité cellulaire pour le témoin non exposé aux métaux et la densité obtenue lorsque on expose l'algue à une concentration donnée de métal. À chaque moyenne correspond un écart-type, par conséquent le pourcentage d'inhibition aura une erreur qui lui correspond.

Pour calculer la propagation d'erreur de chaque pourcentage d'inhibition, on a procédé comme suit :

On pose :  $C = \frac{A}{B}$  où :

C = inhibition causée par la concentration du métal

A = Témoins -  $C_i$  = T -  $C_i$

B = moyenne de la densité cellulaire des témoins

L'erreur de A se calcule comme suit :

$$\Delta A = \sqrt{\Delta T^2 + \Delta C_i^2}$$

Avec :  $\Delta A$  = erreur du terme A

$\Delta T$  = erreur du terme Témoins

$\Delta C_i$  = erreur du terme  $C_i$

Par la suite, on peut calculer l'erreur de C :

$$\Delta C = C \times \sqrt{\left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2}$$

Avec  $\Delta C$  = erreur de C

$\Delta B$  = erreur de la moyenne du témoin

ANOVA<sup>a</sup>

Modèle		Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
1	Régression	86,392	1	86,392	7,832	,016 <sup>b</sup>
	de Student	132,367	12	11,031		
	Total	218,760	13			

a. Variable dépendante : Tm\_adsorbé

b. Prédicteurs : (Constante), Tm\_mesuré

Figure 6-2 : Résultat de la régression linéaire entre le Tm adsorbé et celui mesuré chez *C. reinhardtii*.

Tableau 6-10 Expérience avec *C. reinhardtii* à 120 h exposée au Tm et Nd : concentrations en Tm, Nd : nominales, mesurées, ion libre, internalisées et densités cellulaires (n=3).

	[Tm] moyenne mesurée (nM)	[Tm <sup>3+</sup> ] nM	[Nd] mesurée totale (nM)	[Nd <sup>3+</sup> ] nM	Densité cellulaire (Cell/mL)
Témoin	-	-	-	-	(7,5 ± 0,4) × 10 <sup>5</sup>
1000 nM Nd sans Tm	-	-	622 ± 26,0	-	(7,00 ± 0,70) × 10 <sup>5</sup>
50 nM	42,3 ± 0,5	(1,87 ± 0,17) × 10 <sup>-1</sup>	594 ± 49,1	3,5 × 10 <sup>2</sup> ± 38	(5,5 ± 0,24) × 10 <sup>5</sup>
100 nM	79 ± 2	(4,82 ± 6,2) × 10 <sup>-1</sup>	606,9 ± 47,4	3,83 × 10 <sup>2</sup> ± 39	(6,01 ± 0,001) × 10 <sup>5</sup>
400 nM	291 ± 26	(5,03 ± 1,6) × 10 <sup>1</sup>	635,1 ± 99	5,05 × 10 <sup>2</sup> ± 80	(4,9 ± 0,4) × 10 <sup>5</sup>
700 nM	540 ± 18,4	(2,14 ± 0,13) × 10 <sup>2</sup>	688,4 ± 30,4	5,5 × 10 <sup>2</sup> ± 32,3	(3,6 ± 0,005) × 10 <sup>5</sup>
1000 nM	704,40 ± 16,89	(3,30 ± 0,12) × 10 <sup>2</sup>	618 ± 88,4	4,94 × 10 <sup>2</sup> ± 71	(2,4 ± 1,7) × 10 <sup>5</sup>
1500 nM	1094 ± 7,92	(6,14 ± 0,06) × 10 <sup>2</sup>	735 ± 17,3	5,9 × 10 <sup>2</sup> ± 14	(1,53 ± 0,2) × 10 <sup>5</sup>
3000 nM	2446 ± 82,4	(1,7 ± 0,06)	811 ± 53	6,50 × 10 <sup>2</sup> ± 42	(1,02 ± 0,01) × 10 <sup>5</sup>

Tableau 6-11 : Flux prédits et calculés expérimentalement chez *C. reinhardtii* exposée aux deux métaux :Tm et Nd (n=3).

Concentration nominale	Tm		Nd	
	Flux mesuré	Flux prédit	Flux mesuré	Flux prédit
nM	mol.µm <sup>-2</sup> .min <sup>-1</sup>			
50 nM 1	8,19×10 <sup>-24</sup>	7,81 ×10 <sup>-25</sup>	1,75 ×10 <sup>-21</sup>	1,42 ×10 <sup>-22</sup>
50 nM 2	7,35×10 <sup>-24</sup>	7,81 ×10 <sup>-25</sup>	1,86 ×10 <sup>-21</sup>	1,39 ×10 <sup>-22</sup>
50 nM 3	7,31×10 <sup>-24</sup>	7,00 ×10 <sup>-25</sup>	2,12 ×10 <sup>-21</sup>	1,21 ×10 <sup>-22</sup>
100 nM 1	5,14×10 <sup>-23</sup>	1,91 ×10 <sup>-24</sup>	2,01 ×10 <sup>-21</sup>	1,48 ×10 <sup>-22</sup>
100 nM 2	5,57×10 <sup>-23</sup>	2,06 ×10 <sup>-24</sup>	2,17 ×10 <sup>-21</sup>	1,52 ×10 <sup>-22</sup>
100 nM 3	4,99×10 <sup>-23</sup>	1,69 ×10 <sup>-24</sup>	2,04 ×10 <sup>-21</sup>	1,33 ×10 <sup>-22</sup>
400 nM 1	3,85×10 <sup>-22</sup>	1,28 ×10 <sup>-22</sup>	1,84 ×10 <sup>-21</sup>	1,52 ×10 <sup>-22</sup>
400 nM 2	3,72×10 <sup>-22</sup>	1,66 ×10 <sup>-22</sup>	1,77 ×10 <sup>-21</sup>	1,62 ×10 <sup>-22</sup>
400 nM 3	4,07×10 <sup>-22</sup>	2,12 ×10 <sup>-22</sup>	2,00 ×10 <sup>-21</sup>	1,80 ×10 <sup>-22</sup>
700 nM 1	5,57×10 <sup>-22</sup>	6,28 ×10 <sup>-22</sup>	1,49 ×10 <sup>-21</sup>	1,56 ×10 <sup>-22</sup>
700 nM 2	5,95×10 <sup>-22</sup>	5,90 ×10 <sup>-22</sup>	1,56 ×10 <sup>-21</sup>	1,48 ×10 <sup>-22</sup>
700 nM 3	5,91 ×10 <sup>-22</sup>	6,06 ×10 <sup>-22</sup>	1,48 ×10 <sup>-21</sup>	1,48 ×10 <sup>-22</sup>
1000 nM 1	6,84×10 <sup>-22</sup>	9,12 ×10 <sup>-22</sup>	1,20 ×10 <sup>-21</sup>	1,12 ×10 <sup>-22</sup>
1000 nM 2	5,78 ×10 <sup>-22</sup>	8,50 ×10 <sup>-22</sup>	9,80 ×10 <sup>-22</sup>	1,33 ×10 <sup>-22</sup>
1000 nM 3	7,23 ×10 <sup>-22</sup>	8,82 ×10 <sup>-22</sup>	1,23 ×10 <sup>-21</sup>	1,36 ×10 <sup>-22</sup>
1500 nM 1	8,39 ×10 <sup>-22</sup>	1,28 ×10 <sup>-21</sup>	9,68 ×10 <sup>-22</sup>	1,18 ×10 <sup>-22</sup>
1500 nM 2	7,99 ×10 <sup>-22</sup>	1,29 ×10 <sup>-21</sup>	8,98 ×10 <sup>-22</sup>	1,17 ×10 <sup>-22</sup>
1500 nM 3	7,48 ×10 <sup>-22</sup>	1,28 ×10 <sup>-21</sup>	8,37 ×10 <sup>-22</sup>	1,21 ×10 <sup>-22</sup>
3000 nM 1	8,65 ×10 <sup>-22</sup>	2,08 ×10 <sup>-21</sup>	4,47 ×10 <sup>-22</sup>	8,16 ×10 <sup>-23</sup>
3000 nM 2	9,25 ×10 <sup>-22</sup>	2,08 ×10 <sup>-21</sup>	4,36 ×10 <sup>-22</sup>	7,71 ×10 <sup>-23</sup>
3000 nM 3	8,79 ×10 <sup>-22</sup>	2,07 ×10 <sup>-21</sup>	4,36 ×10 <sup>-22</sup>	7,76 ×10 <sup>-23</sup>

