

**REPROGRAPHIE DE LA REMISE FINALE
DU MÉMOIRE OU DE LA THÈSE**

Lors de la remise finale de mon mémoire ou de ma thèse, les photocopies ont été effectuées par :

l'étudiant(e) :

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

ou par le

Service de documentation :



Nom

Bernard Vigneault


Signature

Nom du directeur de recherche:

Peter G.C. Campbell

Nom du co-directeur de recherche:

Boursier ou non-boursier:

Boursier FCAR

Université du Québec
INRS – Eau

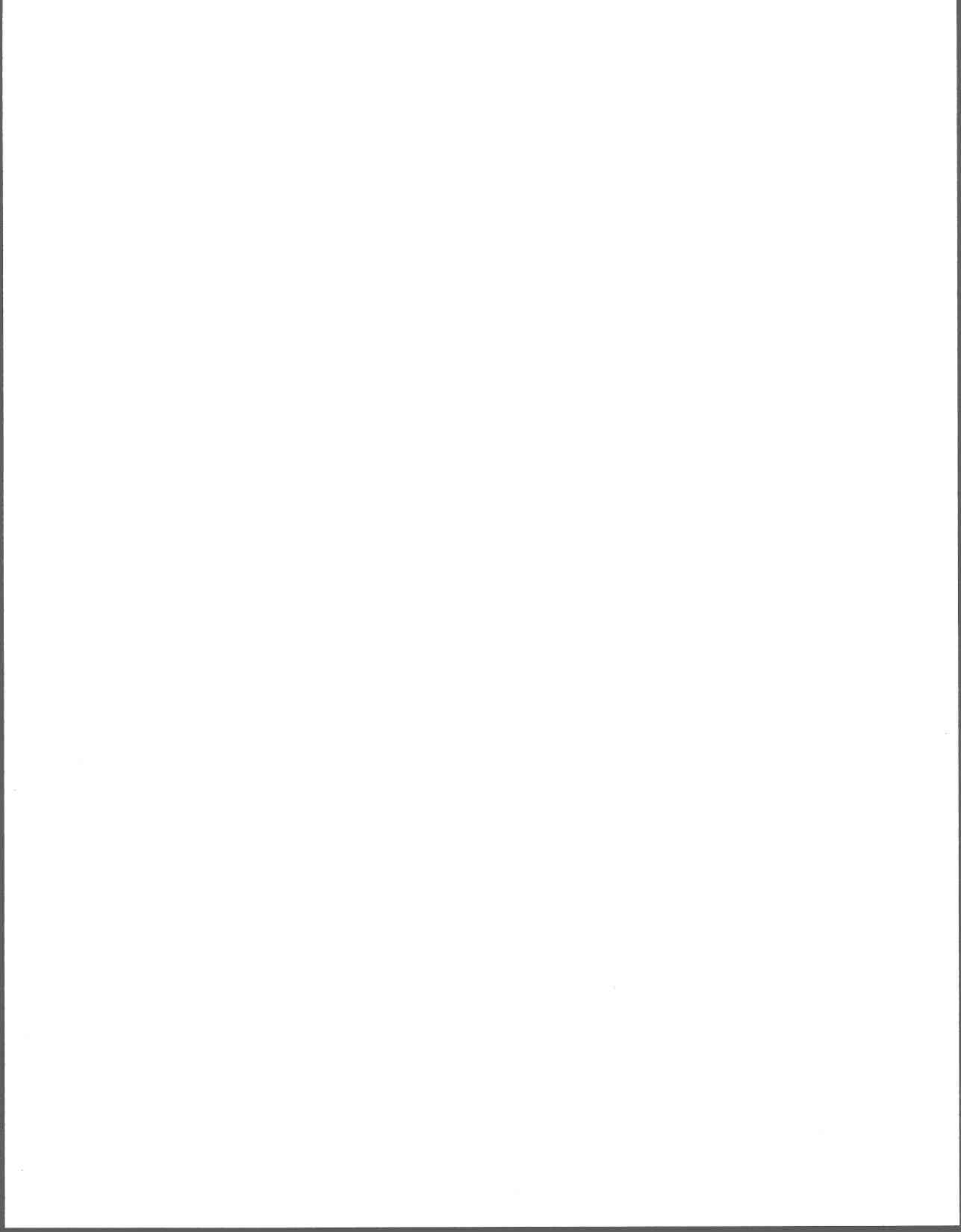
Interactions des substances humiques dissoutes avec les algues unicellulaires –
Mécanismes et implications

Par
Bernard Vigneault

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

15 septembre 2000

© droits réservés de Bernard Vigneault 2000



Résumé

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

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

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

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

Nous avons finalement étudié la prise en charge du Cd en présence de substances humiques. Deux modes de prise en charge ont été étudiés : le transport passif à travers la membrane cellulaire (en présence d'un complexe hydrophobe), et le transport facilité (en présence de complexes hydrophiles). Chez *S. capricornutum*, la prise en charge du Cd sous forme d'un complexe hydrophobe, Cd(diethyldithiocarbamate)₂⁰, est augmentée en présence de substances humiques adsorbées. Nous avons également comparé la prise en charge du Cd, présent sous formes de complexes hydrophiles, pour deux milieux à une même concentration de Cd libre, mesurée par une technique d'échange ionique. Dans l'un des milieux, le Cd était complexé par l'acide fulvique ou l'acide humique, alors que dans l'autre, le Cd était complexé par un ligand synthétique, l'acide nitrilotriacétique (NTA). En accord avec le modèle de l'ion libre, MIL, la prise en charge de Cd par les algues vertes *S. capricornutum* et *Chlamydomonas reinhardtii* peut être prédite à partir de la complexation en solution du Cd par les substances humiques, et ce, même en présence d'acide fulvique ou humique adsorbé à la surface de l'algue.

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


Bernard Vigneault



Peter G.C. Campbell

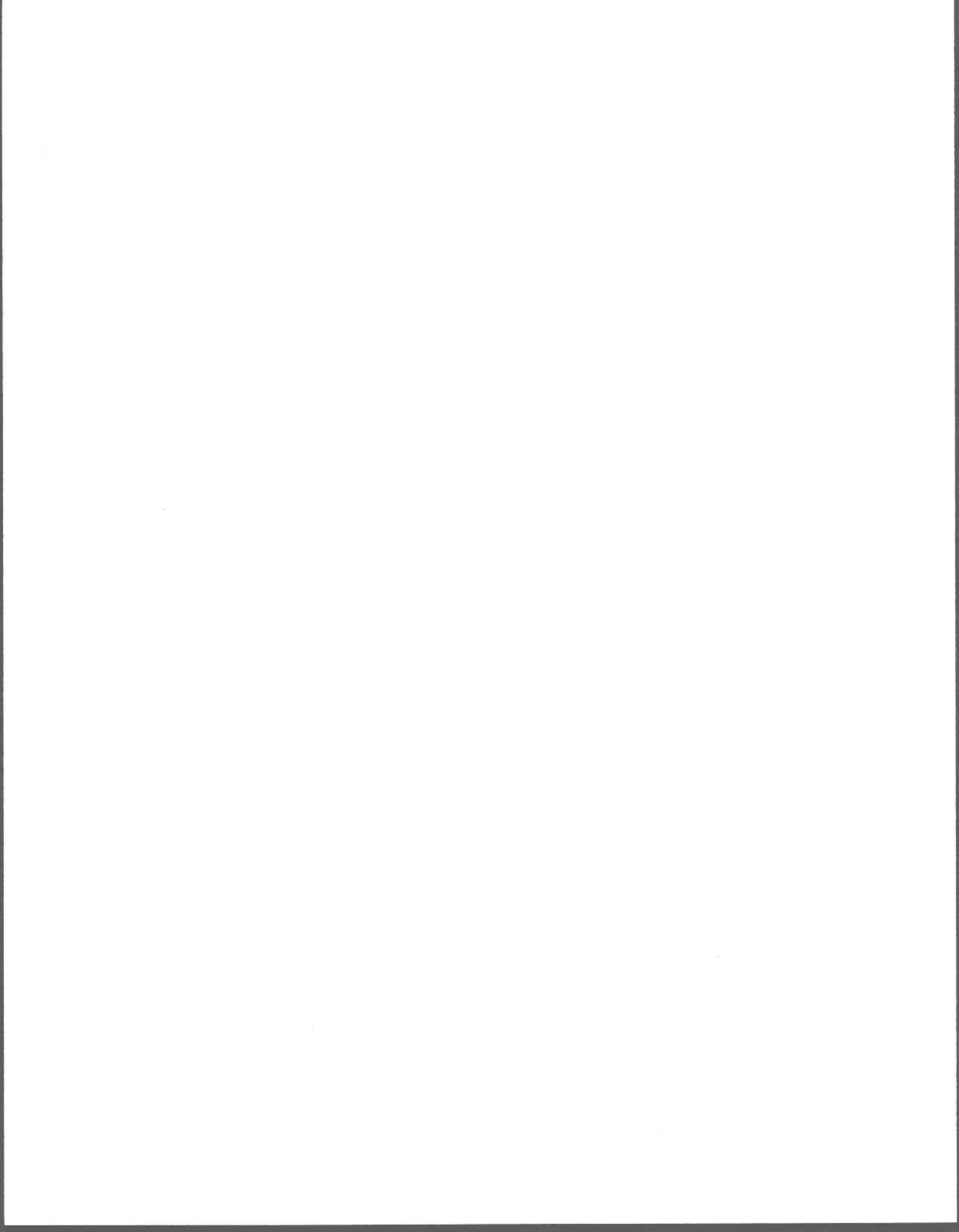
Table des matières

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

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

Abréviations

DDC	diéthylthiocarbamate
D ₂ O	eau lourde
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
FDA	diacétate de fluoresceine
MIL	modèle de l'ion libre (Morel, 1983)
Fraquil	milieu de culture standard (Morel et al., 1975)
Fra _{NaNO₃}	milieu de culture pour <i>Selenastrum capricornutum</i> , I = 0,01 M ajusté avec NaNO ₃
Fra _{NaNO₃-Cu}	milieu de culture Fra _{NaNO₃} sans Cu ajouté
Fra _t	milieu d'exposition simplifié (sans EDTA, sans métaux et sans vitamines ajoutés)
Fra _{t - NaNO₃}	milieu d'exposition simplifié (sans EDTA, sans métaux et sans vitamines ajoutés), I = 0,01 M ajusté avec NaNO ₃
HEPES	acide N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulphonique]
IHSS	« International Humic Substances Society »
LUV	vésicules unilamellaires de grandes tailles
MES	acide 2-[N-morpholino]ethanesulphonique
NTA	acide nitrilotriacétique
pD	- log {D ⁺ }
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycérol
SRB	sulphorhodamine B
Triton X-100	surfactant non-ionique (octylphenoxyethoxyethanol)
WHAM	« Windermere Humic Aqueous Model » (Tipping, 1994)
XAD	résine de copolymères styrène - divinylbenzène



1 Introduction

1.1 Problématique

1.1.1 Les substances humiques aquatiques

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

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

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

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

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

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

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

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