

**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

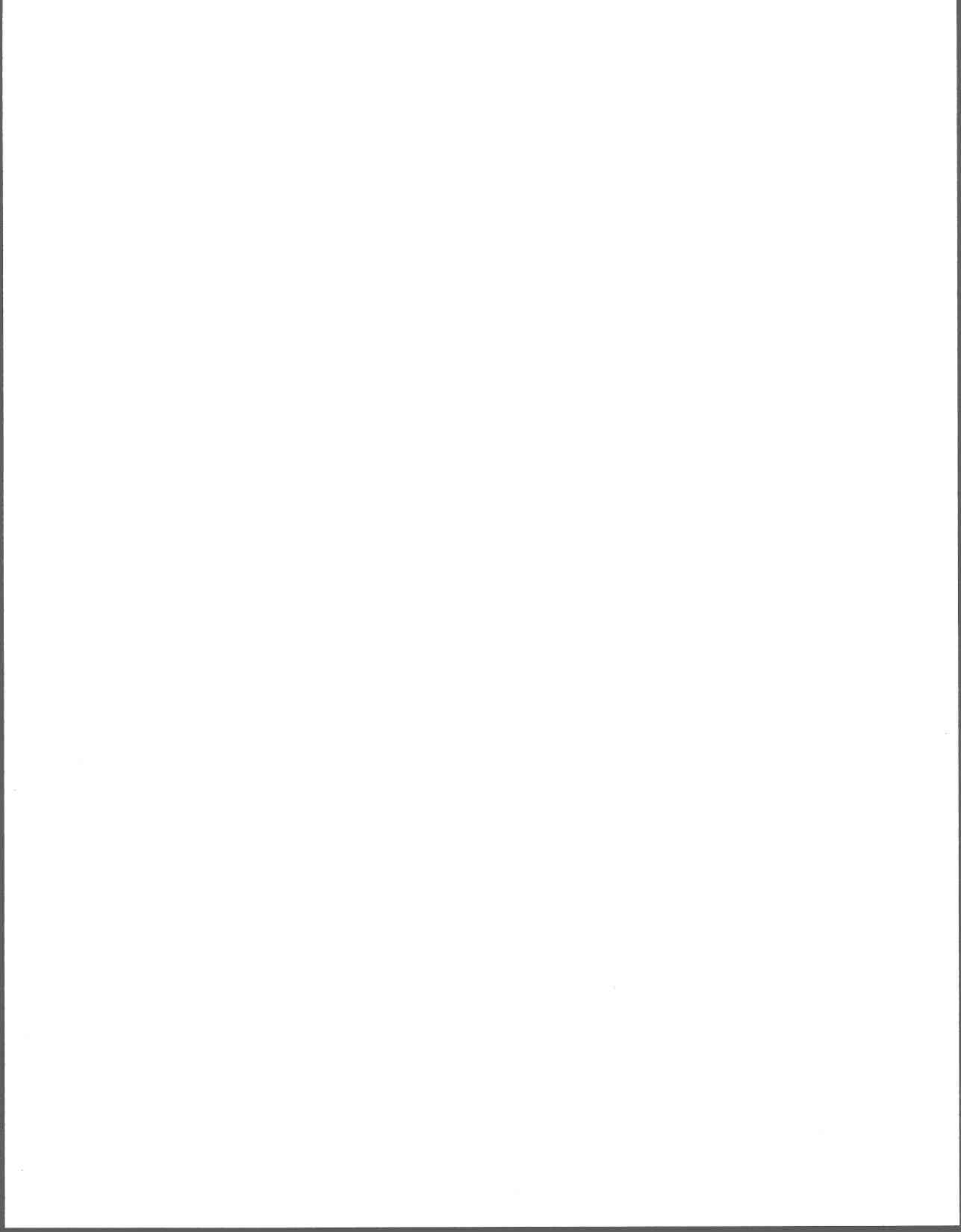
Interactions des substances humiques dissoutes avec les algues unicellulaires –  
Mécanismes et implications

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

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

  
Bernard Vigneault


  
Peter G.C. Campbell

Table des matières

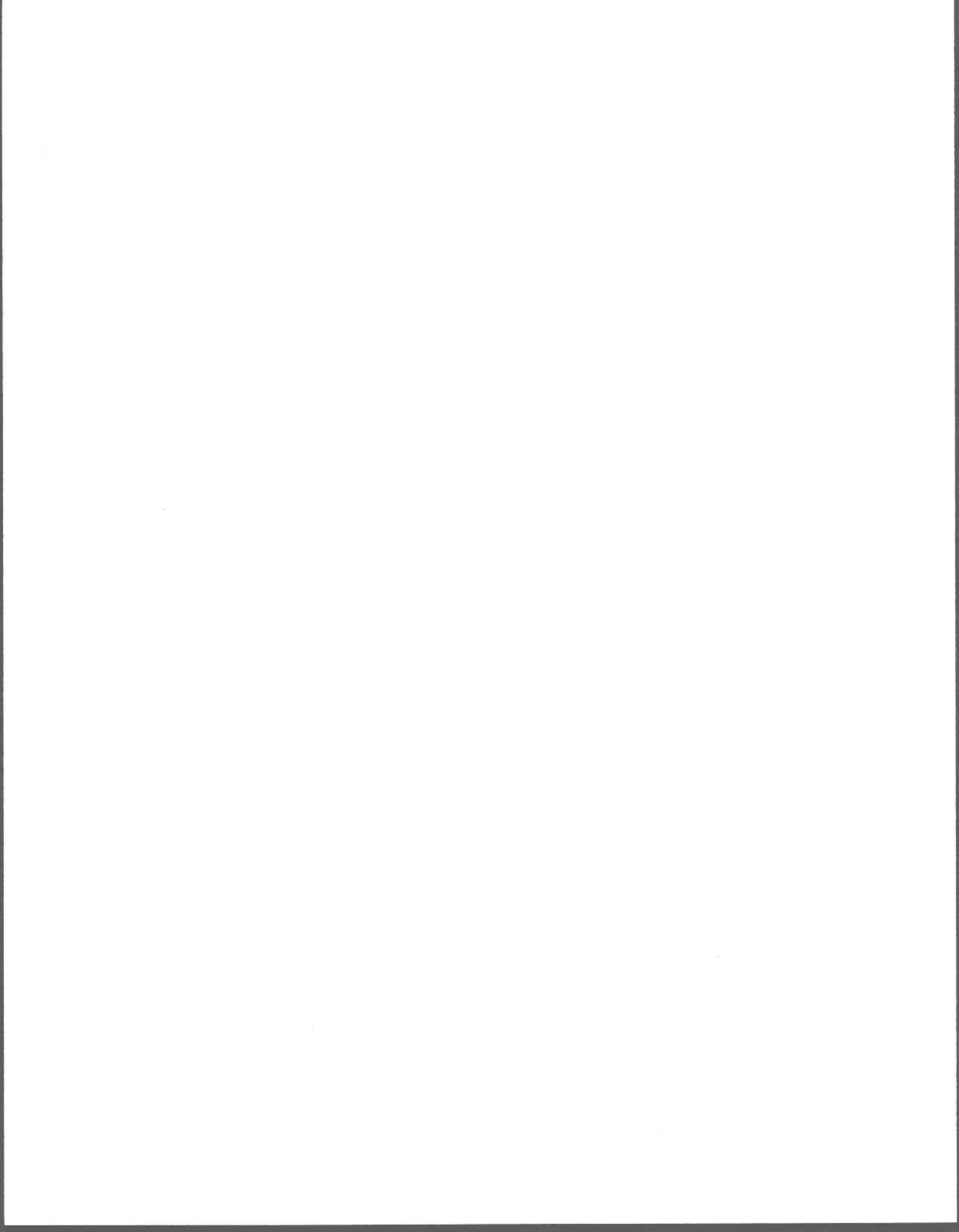
1	Introduction.....	1
1.1	Problématique.....	1
1.1.1	Les substances humiques aquatiques .....	1
1.1.2	Adsorption des substances aquatiques aux surfaces naturelles.....	10
1.1.3	Conséquences physiologiques possibles de l'adsorption de substances humiques sur les membranes biologiques.....	15
1.2	Objectifs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

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

Abréviations

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





## 1 Introduction

### 1.1 Problématique

#### 1.1.1 Les substances humiques aquatiques

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

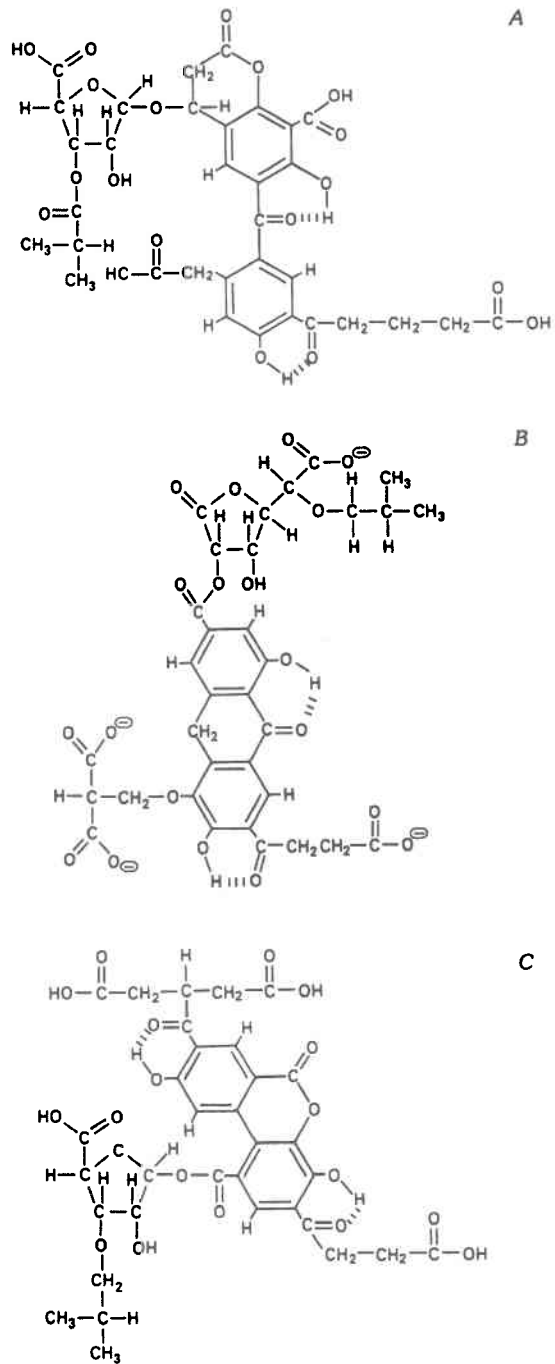
Outre ces quelques exemples à l'appui du MIL, il existe également des études dont les résultats sont en contradiction avec ce modèle. Dans certains cas, la biodisponibilité des métaux est augmentée en présence de substances humiques. Dans d'autres études la présence de substances humiques a provoqué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

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

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

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





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

Tableau 1.1: Propriétés chimiques des substances humiques et processus biogéochimiques reconnus qui y sont associés (adapté de Campbell et al. (1997)).

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

### 1.1.2 Adsorption des substances aquatiques aux surfaces naturelles

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

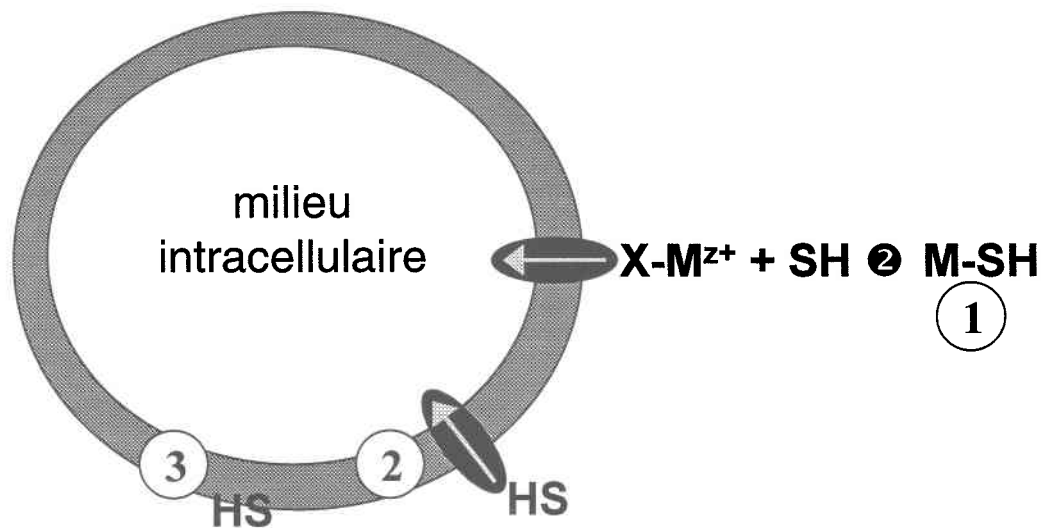


biologique. Tel que discuté précédemment, le modèle de l'ion libre tient compte de la complexation en solution des ions métalliques par les acides humiques et fulviques, mais il ne considère pas les effets de la présence de substances humiques adsorbées. La matière organique adsorbée à la membrane biologique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

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

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

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



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

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

## 1.2 Objectifs

### 1.2.1 Objectif général

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

### 1.2.2 Objectifs spécifiques

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

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

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

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

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

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

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

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

## 2 Adsorption des substances humiques aux surfaces biologiques

### 2.1 Introduction

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

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

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

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

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



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

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

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

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

## 2.2 Matériel et méthodes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 2.2.2 Mesures directes

### 2.2.2.1 Substances humiques non-radiomarquées

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

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

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

#### 2.2.2.2 Acide humique radiomarqué

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

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

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

### 2.2.3 Mobilité électrophorétique

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

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

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

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

#### 2.2.4 Types d'interactions

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



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

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

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

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

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

## 2.3 Résultats et discussion

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

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

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

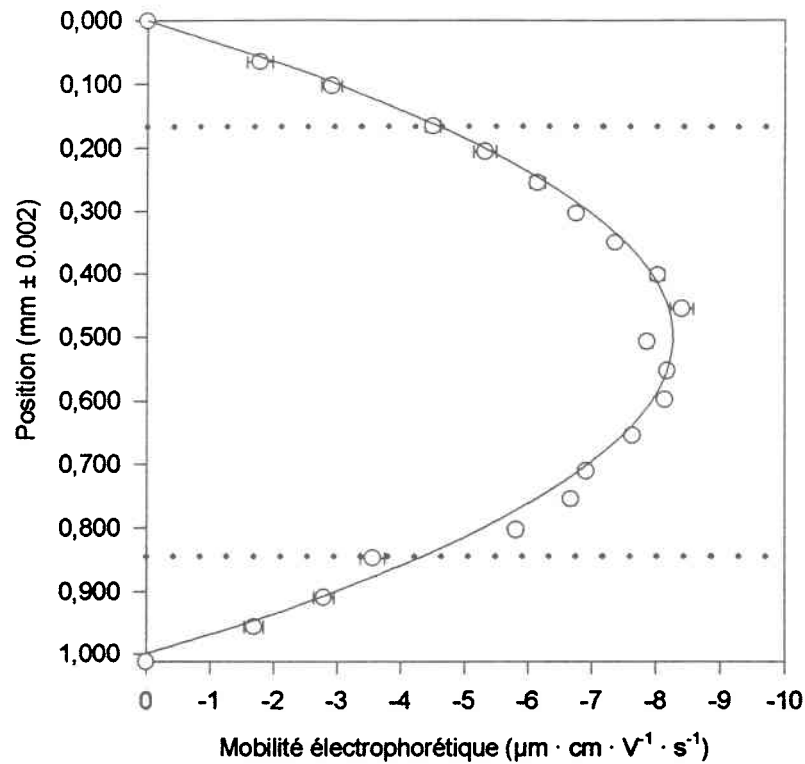
Cette technique a d'abord été utilisée pour répéter les mesures de Campbell et al. (1997) de mobilité électrophorétique de *S. leopoliensis* en présence d'acide fulvique Armadale (Fig. 2.2). Les résultats obtenus étaient semblables à ceux de Campbell et al. (1997) (Fig. 2.3). L'augmentation significative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

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

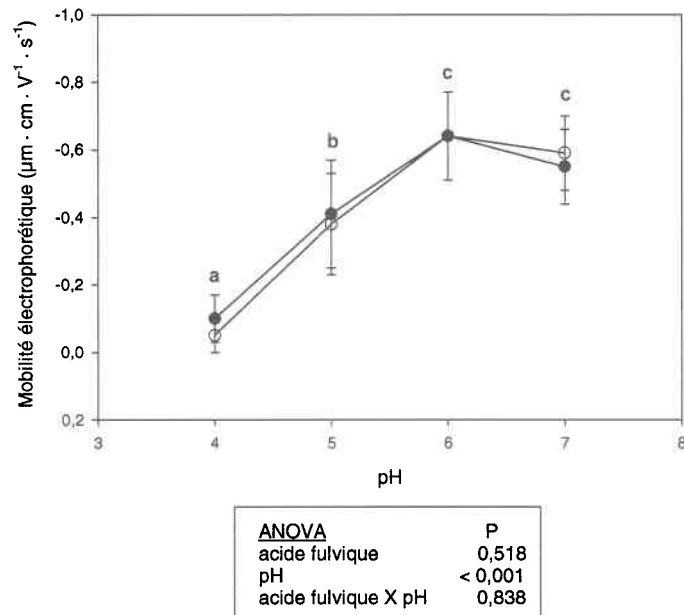
Des mesures directes de la quantité de substances humiques adsorbées permettent quant à elles de comparer les fractions humique et fulvique par rapport à l'intensité de leurs interactions avec les algues. À pH 5, des quantités similaires d'acide humique et d'acide fulvique Suwannee River s'adsorbent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

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

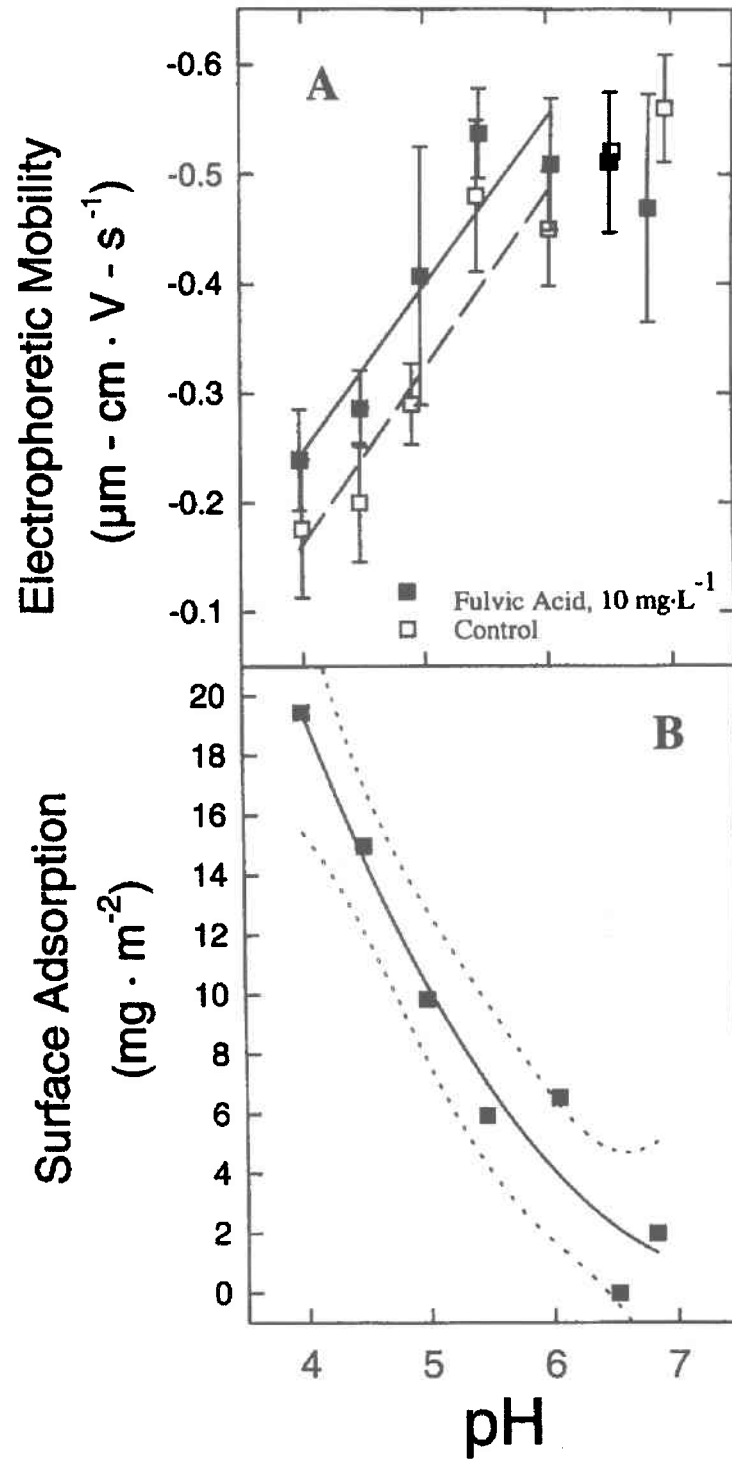
après que le pH se soit stabilisé. La mobilité électrophorétique de *S. capricornutum* augmente de pH 5,3 à 7,3 (Fig. 2.7), et la forme de la courbe est très similaire à celle obtenue pour *S. leopoliensis*. Cependant, la mobilité électrophorétique de *S. capricornutum* à pH 5 est ~ 8 fois supérieure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



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

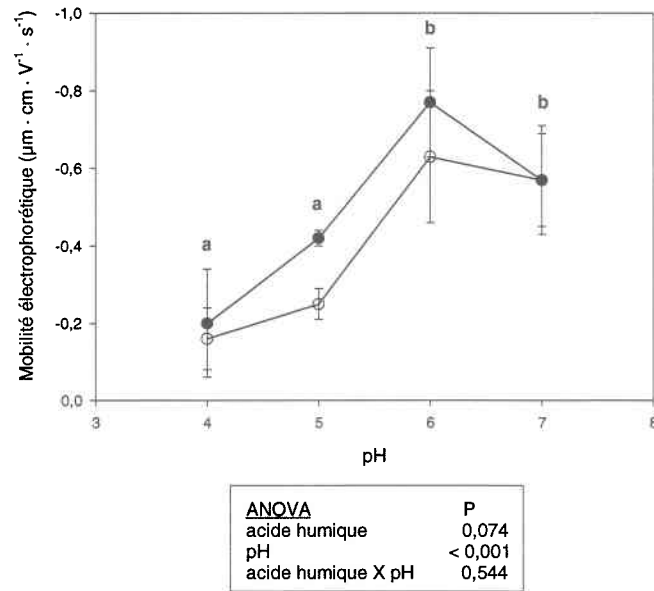


**Figure 2.2:** Mobilité électrophorétique (moyennes  $\pm$  écart type,  $n = 4$ ) de *Synechococcus leopoliensis* en absence, ○, et en présence de 4.95 mg C · L<sup>-1</sup> d'acide fulvique Armadale, ●, dans le milieu Fra<sub>t</sub> - NaCl 0,01 M. L'acide fulvique a été mis en solution dans NaOH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



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





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

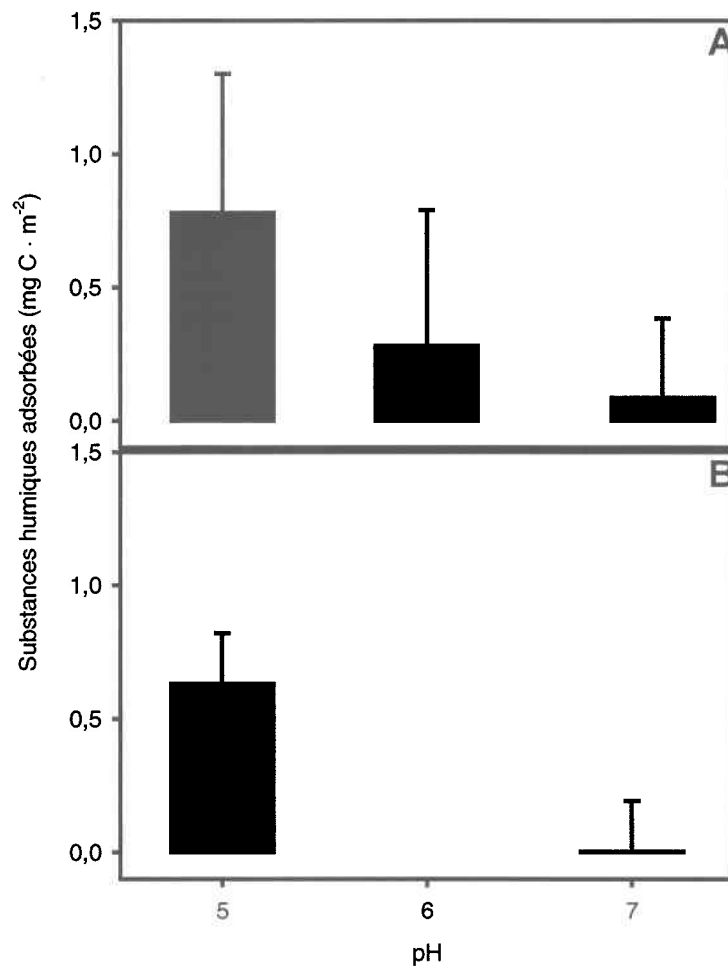


Figure 2.5: Effets du pH sur l'adsorption de l'acide humique (A) et fulvique (B) Suwannee River sur *Selenastrum capricornutum* (moyenne  $\pm$  écart type,  $n \geq 3$ ). La concentration d'acide humique et d'acide fulvique était de 5,4 mg C · L<sup>-1</sup>. La force ionique des solutions pour les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

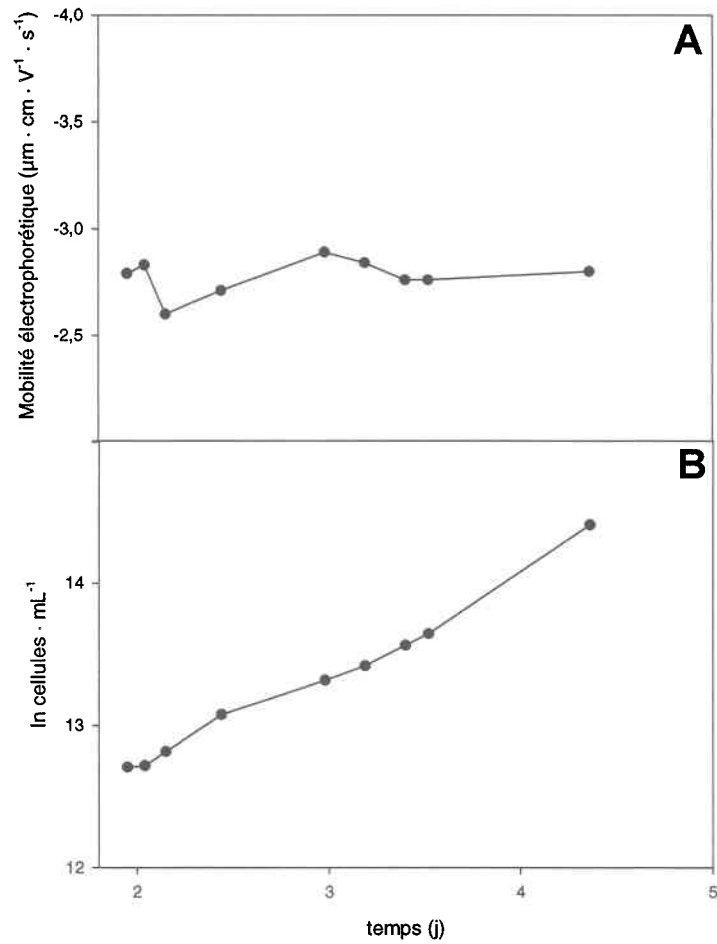


Figure 2.6: Variation de la mobilité électrophorétique (A) et de la croissance (B) de *Selenastrum capricornutum* en fonction du temps de croissance depuis l'inoculation ( $n = 1$ ).

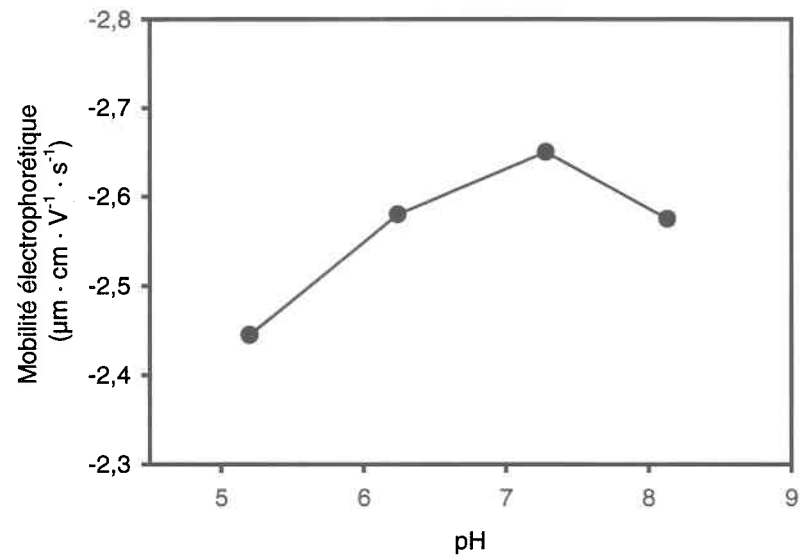


Figure 2.7: Variation de la mobilité électrophorétique de *Selenastrum capricornutum* en fonction du pH dans Fra<sub>t-NaNO<sub>3</sub></sub> ( $n = 1$ ).

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

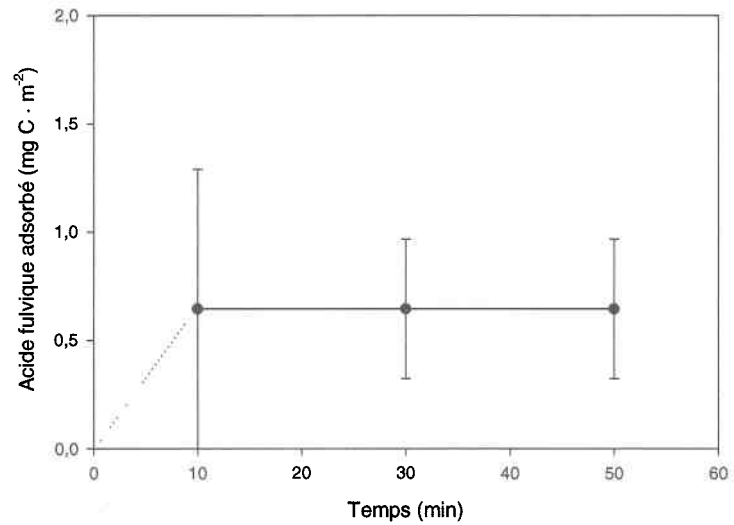
Les résultats d'adsorption présentés (Fig. 2.5) étant pour des expositions allant de 30 min à 100 min, il fallait déterminer s'il y avait un effet de la durée d'exposition sur la quantité de substances humiques adsorbées. De plus, pour pouvoir étudier la prise en charge de métaux en présence de substances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

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

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

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

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



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



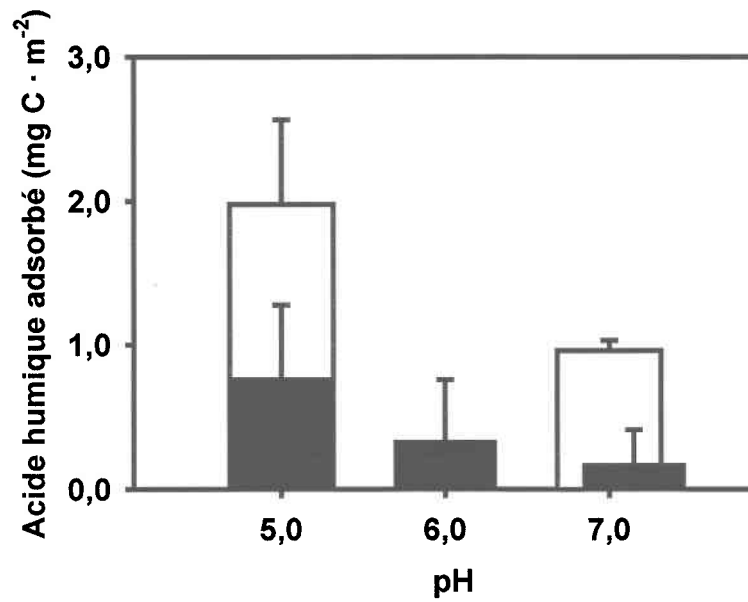
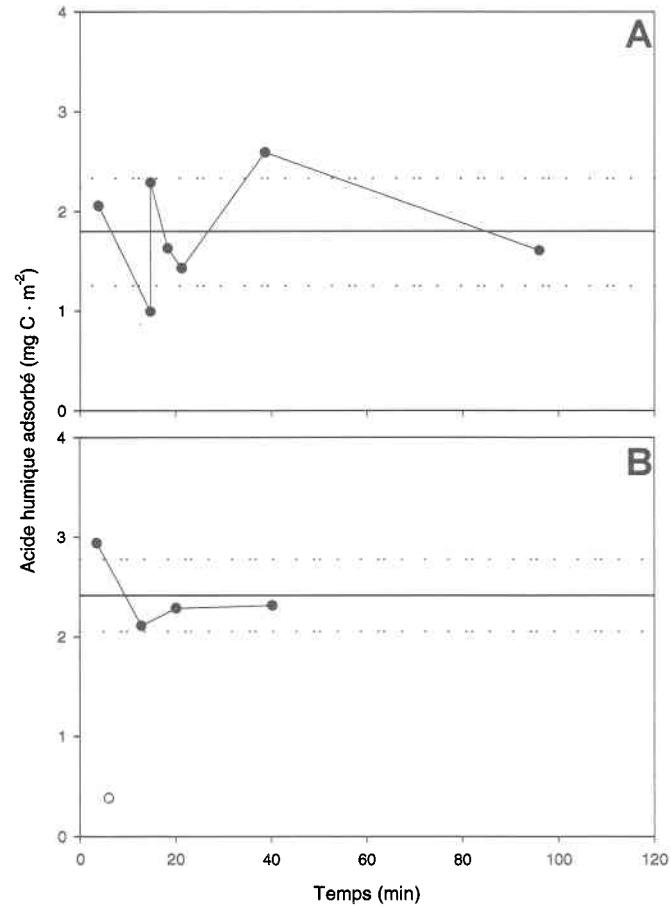


Figure 2.9: Adsorption de l'acide humique Suwannee River radiomarqué (barres vides) et de l'acide humique parent (barres noires) à la surface de *Selenastrum capricornutum* en fonction du pH (moyenne  $\pm$  écart type,  $n \geq 3$ ).



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

### 2.3.3 Types d'interactions

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

À pH 5 et 6, il y a environ  $0,3 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  d'acide humique adsorbé à la surface des sphères de latex (Fig. 2.12), alors que la mobilité électrophorétique à ces pH est identique en absence ou en présence d'acide humique (Fig. 2.11). Ainsi les mesures de mobilité électrophorétique ne permettent pas toujours de révéler la présence de substances humiques adsorbées. L'adsorption n'étant pas mesurable à pH 7, il y a donc également une augmentation de l'adsorption avec une diminution de pH, comme c'est le cas pour les algues. De plus, comme pour l'adsorption de l'acide fulvique sur *S. capricornutum*, la quantité d'acide humique adsorbée est constante pour des expositions de 10 à 85 min ( $P = 0.116$ , ANOVA factorielle  $1 \times 3$ ; Fig. 2.13), ce qui indique que l'adsorption de l'acide humique à la surface des particules de latex est également rapide, complète dans  $< 10$  min. À pH 5, la quantité d'acide humique adsorbée à la surface des particules de latex est plus faible que la quantité adsorbée à la surface de *S. capricornutum*, qui est elle-même beaucoup plus faible que la quantité d'acide fulvique Armadale adsorbée à la surface de *S. leopoliensis*. Cet ordre croissant de quantité adsorbée, latex  $< S. capricornutum < S. leopoliensis$  correspond à l'ordre décroissant des charges nettes négatives superficielles, telles qu'estimées par la mobilité électrophorétique, soulignant ainsi l'importance des

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

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

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

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

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

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

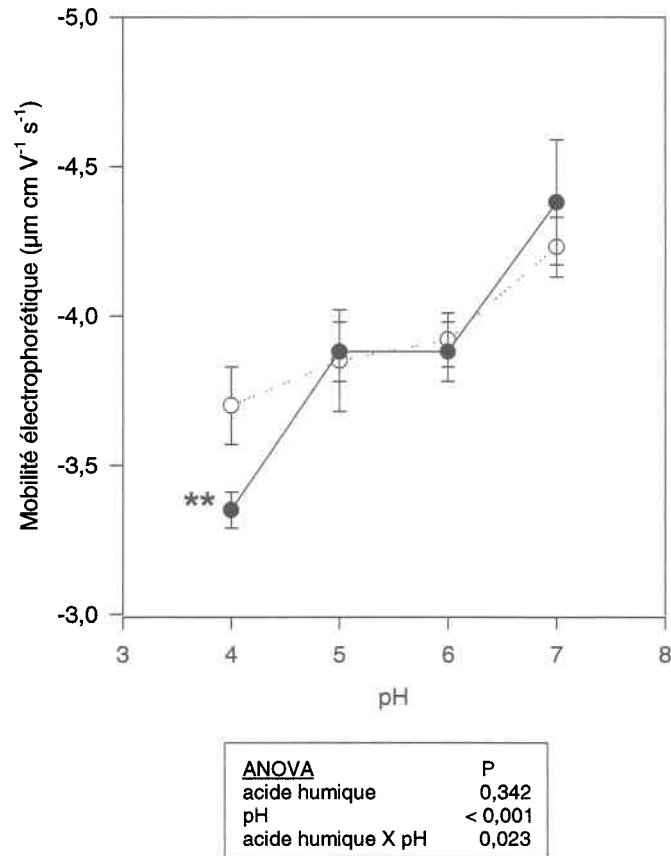


Figure 2.11: Mobilité électrophorétique de sphères de latex (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 3$ ) dans NaCl 0,1 M en absence, ○, et en présence d'acide humique Suwannee River ( $5,42 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ ), ●. Les sphères de latex ont des groupements de surface carboxyliques et sulfates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