INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THESE PRESENTÉE COMME EXIGENCE PARTIELLE DU DOCTORAT

EN SCIENCES DE L'EAU

Par

Kevin J. Wilkinson

Bioaccumulation de l'aluminium inorganique (Al^{3+}, $Al(OH)_x^{(3-x)+}$, $Al(F)_y^{(3-y)+}$ chez le saumon atlantique en relation avec l'acidification du milieu aquatique

Août 1993

Avant-propos

I dedicate this thesis to my parents, who taught me the value of hard work and of self-worth. Thank-you for believing, and in so doing, encouraging me to achieve that, which at times seemed out of reach. I cannot begin to let you how much I appreciate your being there. Any sucess that I have enjoyed, I owe to you. I love you both.

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont collaboré à la réalisation de cette étude.

Si j'ai pu me transformer d'étudiant en chercheur doctoral, c'est grâce surtoût à mon directeur de thèse, monsieur Peter G.C. Campbell. Peter, je te remercie non seulement de tes judicieux conseils, ton dévouement ou de ta porte toujours ouverte, mais surtout pour m'avoir motivé à fournir le meilleur de moi-même et de m'avoir enseigné comment apprendre, au dela du doctorat. Je t'en serai toujours reconnaissant.

Je remercie messieurs Paul Bertsch, Landis Hare, Gilles Lacroix et André Tessier. J'apprecie l'abondance de commentaires constructifs que vous m'avez fournis.

Je veux exprimer une gratitude particulière à nos agents de liaisons scientifiques, Gordon Walsh (Pêches et Océans Canada), Alain Kemp (Pêches et Océans Canada) et Christian Blaise (Environnement Canada). Ma reconnaissance s'adresse aussi au personnel de la station piscicole de l'Anse Pleureuse et à ceux de l'Institut Maurice Lamontagne et de l'Université du Caroline du sud.

Du côté technique, je remercie tous ceux qui m'ont aidé à un moment ou à un autre dans un des laboratoires où j'ai eu l'occasion de travailler (Environnement Canada, INRS-Eau, Savannah River Ecology Laboratory). Merci à: Paul Boisvert (INRS-Eau), Michelle G. Bordereau (INRS-Eau), Bertrand Dubreuil (INRS-Eau), Pauline Fournier (INRS-Eau), Ron Garber (U. du Caroline du sud), Doug Hunter (SREL), Ivan Jobin (EC), Lynn McLaughlin (INRS-Eau), Steve Mitz (SREL), Réné Rodrigue (INRS-Eau), Sylvie St.-Pierre (INRS-Eau), Sylvie Thorne (EC) et Bernard Veilleux (INRS-Eau) qui ont tous facilité la résolution des problèmes journaliers.

La rédaction de la thèse a été facilité par des commentaires utiles qui ont été fournis sur un ou plusieurs chapitres par: P.M. Bertsch, P. Couture, R.L. Hare, C.H. Jagoe, G. Lacroix, W.O. Nelson, C. Neville, R. Playle, A. Renoux, R. Roy, C. Strojan, A. Tessier et G. Walsh.

Cette étude fut réalisée grâce au support financier de Pêches et Océans Canada (Programme de Subventions de recherche 1987-90 et contrat MAS no. FP707-7-2356/01-XSK), du Conseil de recherches de sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), du Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), du U.S. Department of Energy (contrat DE-AC09-76SR00-819) et d'Environnement Canada (SPE). Nos remerciements s'adressent aussi au ministère du Loisir, Chasse et Pêche du Québec (MLCP) qui ont fourni les saumons.

Resumé

Réalisées dans des conditions physico-chimiques similaires à celles rencontrées dans les eaux courantes du Bouclier canadien au printemps (Σcations = 0.25 mM), nos expériences ont eu pour but d'élucider comment la spéciation de l'aluminium dans la colonne d'eau était reliée à sa bioconcentration sur les branchies du saumon atlantique et aux effets toxiques induits. Plusieurs plans expérimentaux ont été employés afin d'étudier la biodisponibilité de l'aluminium chez le poisson. Pour les expériences *in situ*, des juvéniles du saumon atlantique (*Salmo salar*, âge 1+) ont subi un traitement de diverses solutions d'aluminium (0-12 μM), de fluorures (0-20 μM) et de pH afin de provoquer des réponses toxiques létales ou sublétales et de permettre ainsi des déductions quant au mécanisme d'action de l'aluminium. Ces expériences, soit dynamiques et ou semi-statiques (renouvellement de l'eau 2-3 fois par jour), ont eu lieu dans des conditions bien contrôlées (10^{o}C, 16 h de lumière, la concentration d'oxygène dissous ≈ 10 ppm). On a suivi la mortalité des poissons ou des paramètres sublétaux tels que la bioconcentration branchiale de l'aluminium ou la concentration en Na plasmatique. Selon ces indicateurs de toxicité, la complexation de l'aluminium inorganique par les fluorures réduit ses effets biologiques chez le saumon. Pour nos conditions expérimentales, la toxicité est mieux expliquée par la somme ($\Sigma\ f_1[Al^{3+}] + f_2[AlF^{2+}]$) que par toute autre combinaison d'espèces. De plus, en présence de fluorures, la bioconcentration branchiale de l'Al et les pertes d'ions plasmatiques (une indication d'un stress ionorégulateur) sont réduites par rapport à celles des poissons en présence de l'aluminium seul. Cependant, cette atténuation s'avère moins importante que celle prédite; les effets toxiques résiduels de l'aluminium en présence de fluorures dépassent ceux qui auraient été anticipés en fonction des concentrations résiduelles de l'ion libre, $[Al^{3+}]$, et de ses hydroxo-complexes $[Al(OH)_x^{(3-x)+}]$. Nous avons expliqué ces résultats en modifiant le "Modèle de l'ion libre" pour tenir compte de la formation de complexes mixtes {F-Al-L-branchie} à la surface branchiale.

L'aluminium seul, tout comme la combinaison aluminium + fluorures, a provoqué une diminution du Na plasmatique, même à des concentrations sublétales. L'action toxique de l'aluminium en présence de fluorures ressemble à la perturbation de l'ionorégulation déjà documentée chez les salmonidés en absence de fluorures.

On a décelé deux compartiments importants dans le processus de bioconcentration chez les branchies du *Salmo salar*: le mucus et la surface branchiale. La production et la sécrétion du mucus jouent un rôle important dans l'accumulation de l'aluminium par les branchies du saumon. Dans des expériences dynamiques *in situ,* on a démontré que la bioconcentration de l'aluminium par les branchies avait lieu initialement dans le mucus des poissons et était suivie par une accumulation lente à la surface branchiale. Par ailleurs, une augmentation substantielle de l'aluminium internalisé est observée dans des expériences à plus long terme (>3j); l'association de faibles concentrations d'Al aux sites sensibles (0→2 j) provoquerait la séparation de l'épithélium branchial ou induirait des variations physiologiques telles qu'une augmentation de la ventilation, ce qui expliquerait la croissance exponentielle de la concentration d'aluminium internalisé.

Dans des expériences *in vitro*, on a déterminé que la diffusion d'aluminium au travers du mucus isolé du corps du *Salmo salar* était réduite de façon suffisante pour empêcher sa mesure. Puisque la capacité de complexation de l'aluminium par le mucus est très importante et que le taux de renouvellement du mucus *in situ* est extrêmement rapide, nous croyons que le mucus agirait comme barrière physique et retarderait la complexation de l'aluminium à la surface branchiale. Notons que cette protection est transitoire: nos résultats de bioconcentration indiquent que l'aluminium exercerait des effets toxiques seulement une fois que la capacité de renouvellement ou la capacité complexante du mucus est excédée.

Par ailleurs, des cellules isolées des branchies de l'achigan à grande bouche (*Micropterus salmoides*, adultes) ont été exposées à des concentrations variables d'aluminium, de fluorures et de matière organique dissoute (MOD) pour déterminer la capacité de la surface branchiale à lier l'aluminium. Des cellules branchiales isolées étaient examinées au lieu des branchies intactes afin d'éliminer (i) la couche de mucus entourant les branchies et (ii) l'excrétion de gaz respiratoires susceptibles de modifier le pH à la surface branchiale. Les résultats de microélectrophorèse et de RMN (^{19}F) appuient les résultats *in vivo*. L'aluminium se lie aux cellules isolées d'une façon semblable à la manière qu'il se lie aux branchies *in vivo*, *i.e.* la réduction de la toxicité et de la bioaccumulation de l'Al en présence des fluorures implique la complexation d'Al et d'Al-F_n et la formation subséquente de {Al-L-branchie} et {F-Al-L-branchie}, respectivement. Pour les expériences de mobilité électrophorétique, le changement en mobilité électrophorétique était inférieur à ce qu'on aurait prédit d'après les variations en $[Al^{3+}]$; l'effet d'un ajout de fluorures en solution, qui a pour effet de réduire $[Al^{3+}]$, est au moins partiellement compensé par la formation d'un complexe ternaire {F-Al-L-cellule} à la surface cellulaire. La formation de ce complexe ternaire ne modifie que légèrement la mobilité électrophorétique des cellules. Contrairement aux effets provoqués par l'Al ou l'ion H^+, l'addition de la matière organique dissoute à pH 4.5 a rendu la charge de surface des cellules branchiales plus négative. Par ailleurs, l'interaction de la MOD avec la surface cellulaire implique probablement des liaisons hydrophobes puisque les variations de mobilité électrophorétique à pH 4.5 étaient nettement plus importantes que celles observées pour une expérience semblable à pH 5.0.

Ces mêmes techniques (^{19}F RMN, microélectrophorèse) ont permis de suivre l'effet des fluorures sur l'affinité de l'aluminium pour différents composants des membranes branchiales. Dans des expériences *in vitro*, nous avons démontré que plusieurs composants membranaires peuvent imiter les capacités de complexation de la membrane biologique intacte. En présence de fluorures, des complexes ternaires {X-Al-ligand} ont été formés avec le citrate, la calmoduline, le mucus du poisson et l'acide sialique. Les complexes ternaires impliquant les fluorures n'ont pas été détectés lorsque le ligand était la phosphatidylsérine ou la phosphatidylcholine.

Nos résultats appuient le modèle/mécanisme de toxicité proposé par Haug et Caldwell (1985), qui ont suggéré que l'aluminium peut interagir avec des protéines membranaires telles que la calmoduline, pour provoquer une réponse toxique chez l'organisme. De même, il semble que la prédiction des effets biologiques puisse s'effectuer avec un modèle à base d'équilibres chimiques. Des calculs théoriques basés sur nos données de bioaccumulation indiquent que l'internalisation de l'aluminium est l'étape limitante du processus de prise-en-charge de l'aluminium.

TABLE DES MATIERES

Avant-propos ii
Remerciements iii
Resumé iv

1. Introduction

1.1 ASPECTS GEOCHIMIQUES 7
1.2 ASPECTS TOXICOLOGIQUES 10
1.2.1 Effets biologiques de l'aluminium chez le poisson 10
1.2.2 Effets de la complexation organique 12
1.2.3 Effets de la complexation inorganique 12
1.2.4 Effets d'autres espèces d'Al 15
1.3 L'INTERACTION DE L'Al À LA SURFACE BRANCHIALE 16
1.3.1 Introduction 16
1.3.2 Processus clefs 17
(a) Diffusion 17
(b) Réaction à la surface membranaire 21
(c) Internalisation 23
(d) Interconversion 24
1.3.3 Modèle général 25
1.3.4 Modèle d'équilibre chimique (*Modèle de l'ion libre*) 26
1.3.5 Modèle cinétique 31
1.3.6 Distinction entre les deux modèles d'après les résultats expérimentaux 33
1.3.7 Limites de la modélisation 33
1.4 RESUME 34

2. Objectifs 36

3. Effet de la complexation des fluorures sur la toxicité de l'aluminium chez les juveniles du saumon atlantique (*Salmo salar*)

3.1 INTRODUCTION 38
3.2 METHODOLOGIE 40
3.2.1 Généralités 40
3.2.2 Physico-chimie des solutions 42
3.2.3 Réponse biologique du saumon 44
3.3 RESULTATS 45
3.3.1 Physico-chimie des solutions expérimentales 45
3.3.2 Tests de toxicité 46
3.3.3 Concentrations en Na plasmatique 49
3.3.4 Bioaccumulation de l'aluminium 51
3.4 DISCUSSION 51
3.4.1 Sodium plasmatique 52
3.4.2 Bioaccumulation de l'aluminium 53
3.4.3 Rapport entre la toxicité et la physico-chimie des solutions 53
3.4.4 Modélisation 55
3.5 CONCLUSION 57
3.6 PERSPECTIVES DE RECHERCHE 58

4. Complexation de l'aluminium par des composantes de membranes
4.1 INTRODUCTION 60
4.2 METHODOLOGIE 61
4.2.1 Préparation et analyse des solutions 61
4.2.2 Produits chimiques 62
4.2.3 Préparation des vésicules de phospholipides 62
4.2.4 Mesure de la sorption d'Al et d'Al-F_y par la mobilité électrophorétique 63
4.2.5 Mesure de la complexation d'Al-F_y par la dialyse 65
4.2.6 Mesure de la complexation d'Al-F_y par la RMN 65
4.3 RESULTATS ET DISCUSSION 66
4.3.1 Complexation de l'aluminium par le citrate 66
4.3.2 Complexation de l'aluminium par les phospholipides 70
4.3.3 Complexation de l'aluminium par la calmoduline 73
4.3.4 Complexation de l'aluminium par le mucus du corps du poisson 75
4.3.5 Complexation de l'aluminium par l'acide sialique 76
4.3.6 Implications de la complexation d'AlF_y^{3-y} 76
4.4 CONCLUSIONS 77

5. Complexation de l'aluminium par des cellules de branchies isolées.
5.1 INTRODUCTION 80
5.2 MÉTHODOLOGIE 81
5.2.1 Choix de méthodes 81
5.2.2 Séparation des cellules 82
5.2.3 Solutions d'exposition 83
5.2.4 Analyse de mobilité électrophorétique 85
5.2.5 ^{19}F RMN 85
5.3 RESULTATS ET DISCUSSION 86
5.3.1 Al en absence de ligands ajoutés 86
5.3.2 Al en présence de F: Mobilité électrophorétique 88
5.3.3 Al en présence de F: Mesures de RMN 90
5.3.4 Al en présence de MOD 96
5.3.5 Implications toxicologiques 99

6. Bioconcentration de l'Al à la surface branchiale.
6.1 INTRODUCTION 103
6.2 METHODOLOGIE 104
6.2.1 Conditions d'exposition 104
6.2.2 Analyse des solutions 105
6.2.3 Analyse des branchies 106
6.2.4 Dosage du Na plasmatique 107
6.2.5 Traitement des données 107
6.3 RESULTATS 108
6.3.1 Répartition de l'Al branchial 108
6.3.2 Prise-en-charge de l'aluminium 109
6.3.3 Dépuration de l'aluminium branchial 111
6.3.4 Expériences de longue durée 112
6.4 DISCUSSION 113
6.4.1 Répartition de l'Al branchial 113

6.4.2 Accumulation de l'aluminium 115
6.4.3 Dépuration de l'aluminium 117
6.4.5 Modèles de prise-en-charge 119
6.4.6 Rapport avec les résultats de toxicité 123
6.5 CONCLUSIONS 124
7. Mécanismes de toxicité et bioaccumulation de l'Al chez le saumon atlantique - synthèse des connaissances.
7.1 INTRODUCTION 127
7.2 CHIMIE DE L'ALUMINIUM EN SOLUTION 128
7.2.1 Solutions en dessous de la limite de solubilité d'Al 128
7.2.2 Solutions sursaturées en Al 129
7.3 EFFETS BIOLOGIQUES DE L'Al 131
7.3.1 Introduction 131
7.3.2 Complexation de l'Al par des ligands se retrouvant dans l'environnement 133
7.3.3 Rôle du proton, des cations majeurs et d'autres métaux 134
7.4 MODELES CINETIQUES VS. MODELES D'EQUILIBRE 135
7.4.1 Introduction 135
7.4.2 Processus clés 139
7.4.3 Modèles basés sur les principes d'équilibres chimiques 143
7.4.4 Modèles basés sur des principes cinétiques 146
7.5 CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES A L'INTERFACE BRANCHIE-EAU: IMPLICATIONS POUR LA COMPLEXATION DE L'ALUMINIUM 147
7.6 SITE D'INITITIATION DE LA RÉPONSE TOXICOLOGIQUE 150
7.7 ROLE DU MUCUS 152
7.7.1 Composition du mucus 152
7.7.2 Effet de la couche de mucus 153
7.8 MECANISME DE LA COMPLEXATION DE L'ALUMINIUM 154
7.8.1 Al monomère 154
7.8.2 Al organique 156
7.8.3 Al polynucléaire, et précipités de Al (*Al-13*, $Al(OH)_3(s)$, etc.) 157
7.9 EXPOSITION A L'ALUMINIUM DANS L'ENVIRONNEMENT 159
7.10 PERSPECTIVES DE RECHERCHE 160
8. Conclusions générales 161
9. Bibliographie 164
10. Glossaire 181
11. Annexes
COMPILATION DE RÉPONSES TOXIQUES DE L'Al CHEZ LE POISSON 182
SCHEMA ANALYTIQUE POUR DETERMINER LA SPECIATION DE L'Al 190
METHODOLOGIE DE DIGESTION DES BRANCHIES POUR DETERMINATION D'Al 191
LE ROLE DE MUCUS DANS LA SORPTION ET LA DIFFUSION DE L'Al 193

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Variation temporelle de la qualité de l'eau de la rivière De la Trinité....8
Figure 1.2. Variation temporelle de l'aluminium inorganique monomère.....9
Figure 1.3. Effet de la complexation de l'aluminium sur le taux de survie de *Salvelinus fontinalis* 14
Figure 1.4. Figure schématique des processus menant à l'internalisation du métal..17
Figure 1.5. Vitesses relatives de diffusion de différentes espèces d'Al de la solution mère aux branchies 21
Figure 1.6. Vitesses relatives de réaction de différentes espèces d'Al à la surface branchiale 23
Figure 1.7. Quelques équilibres chimiques de l'Al dans les eaux naturelles 24
Figure 1.8. Représentation de l'interaction Al-branchie pour le modèle ion libre....30
Figure 3.1. Mortalité cumulative (%) du *Salmo salar* ([Al]cte., [F^-] croissante) 45
Figure 3.2. Mortalité cumulative (%) du *Salmo salar* ([Al^{3+}] cte.).....47
Figure 3.3. Mortalité après 7 jours en fonction de la concentration de Al^{3+} 48
Figure 3.4. Variation du sodium plasmatique en fonction de l'aluminium dissous..49
Figure 3.5. Concentration en aluminium branchial non-extractible à l'EDTA en fonction de l'aluminium inorganique en solution.....50
Figure 3.6. Variation de la mortalité observée de *Salmo salar* en fonction de la mortalité prédite.....56
Figure 4.1. Spectres ^{19}F RMN des composants membranaires à pH 3.8.....68
Figure 4.2. Spectres ^{19}F RMN des composants membranaires à pH 4.5.....69
Figure 4.3. Mobilité électrophorétique des vesicules en fonction de [Al].....71
Figure 4.4. Mobilité électrophorétique des vesicules en fonction de [F].....72
Figure 4.5. Mobilité électrophorétique des vesicules en fonction de [Al^{3+}] cte.....72
Figure 4.6. Dialyse de calmoduline en fonction de [F].....75
Figure 5.1. Mobilité électrophorétique des cellules isolées en fonction de pH 87
Figure 5.2. Mobilité électrophorétique des cellules isolées en fonction de [Al].....88
Figure 5.3. Mobilité électrophorétique des cellules isolées en fonction de [F] à [Al] constante.....89
Figure 5.4. Mobilité électrophorétique des cellules isolées en fonction de [Al^{3+}] constante.....90
Figure 5.5. Spectres ^{19}F RMN de l'étalon et de la résine Dowex.....92
Figure 5.6. Spectres ^{19}F RMN des résines et les cellules branchiales.....93
Figure 5.7. Mobilité électrophorétique des cellules en fonction de la [MOD] 97
Figure 6.1. Répartition de l'Al branchial.....110
Figure 6.2. Cinétique de la prise-en-charge de l'Al en présence ou en absence de F110
Figure 6.3. Cinétique du sodium plasmatique, Al branchial total, et Al internalisé.111
Figure 6.4. Dépuration de l'aluminium branchial 112
Figure 6.5. [Al] branchiale (7 j) en fonction de [Al^{3+}] 113
Figure 6.6. Modélisation du processus d'accumulation de l'Al.....121
Figure 7.1. Figure schématique des processus menant à l'internalisation du métal..137
Figure 7.2. Schématique des réactions possibles à la surface branchiale 145
Figure 7.3. Dessin schématique des filaments et des lamelles des branchies.....149

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1. Conditions expérimentales 40
Tableau 3.2. Concentrations des composants de l'eau synthétique 41
Tableau 3.3. Concentrations de fluorures mesurées et calculées 43
Tableau 3.4. Pourcentage de mortalité de *Salmo salar* tel qu'expliqué par des différent espèces d'aluminium inorganiques 55
Tableau 4.1. Plan des expériences de mobilité et de dialyse 64
Tableau 5.1. Données de ^{19}F RMN 94
Tableau 5.2. Concentrations en fluorures libres et fluorures totaux 95
Tableau 6.1. Plan expérimental 105
Tableau 6.2. Taux calculés de bioconcentration de l'Al branchial 111
Tableau 7.1. Résumé des taux calculés d'internalisation, de diffusion et de sorption de l'aluminium à la surface branchiale 142
Tableau A1.1. Compilation de réponses toxiques de l'Al chez le poisson 183
Tableau A3.1. Quantités d'acide nitrique et d'eau pour digestions 192

1. Introduction

Mots-clés: Al / géochimie / modèle / effets biologiques / poisson / membrane / équilibre / mucus / cinétique / sorption / diffusion / internalisation

1.1 ASPECTS GEOCHIMIQUES

Parmi les conséquences géochimiques de l'acidification des eaux naturelles, la mieux documentée est probablement celle impliquant la mobilisation de l'aluminium. Les eaux douces du Bouclier canadien possèdent un pouvoir tampon restreint, ce qui entraîne une sensibilité à l'acidification et de ce fait, la présence de concentrations en aluminium parfois élevées. En effet, au printemps, les protons se retrouvant dans la neige, et surtout dans la couche supérficielle des sols, sont mis en solution, provoquant ainsi une diminution importante de pH des eaux de surface (Δ pH 1-2 unités; Johannessen et Henriksen, 1978; Driscoll *et al.*, 1980; Lachance *et al.*, 1983; Henriksen *et al.*, 1984; LaZerte et Dillon, 1984; Borg, 1986; McAvoy, 1989, Wigington *et al.*, 1990, Campbell *et al.*, 1992). De même, lors de ce choc acide printanier, on observe souvent une mobilisation de métaux tels le Cd, le Mn, le Zn et surtout l'Al du milieu terrestre vers le milieu aquatique (*v.* Driscoll et Schecher, 1988; Nelson et Campbell, 1991). Par exemple, lors de la fonte printanière, pour un bassin versant situé dans les montagnes Adirondacks, Driscoll et ses collaborateurs (1980) ont constaté une augmentation en [Al] qui correspondait à celle on s'attendrait en se basant sur la solubilité de $Al(OH)_3$ (gibbsite microcrystalline). D'autres études ont également démontré une augmentation de la concentration en aluminium dissous pendant des diminutions épisodiques de pH (*e.g.* Seip *et al.*, 1984; LaZerte, 1984; Hendershot *et al.*, 1986; Goenaga et Williams, 1988; Lawrence *et al.*, 1988).

Les baisses de pH provoquent non seulement des concentrations plus importantes d'aluminium dissous (figure 1.1), mais aussi une modification de sa spéciation. Par exemple, lors du choc printanier, la proportion de complexes inorganiques (*i.e.* $Al(OH)_x^{3-x}$, $Al(F)_y^{3-y}$, $Al(H_{(4-w)}SiO_4)^{3-w}$, $Al(SO_4)_z^{3-2z}$) augmente (Driscoll et Schecher, 1990) et la répartition de l'aluminium parmi ces complexes change à mesure que le pH baisse. Les fluoro hydroxo complexes ($Al(OH)_xF_y^{3-x-y}$), qui prédominent pendant les périodes de pH neutre ($\approx$6), deviennent

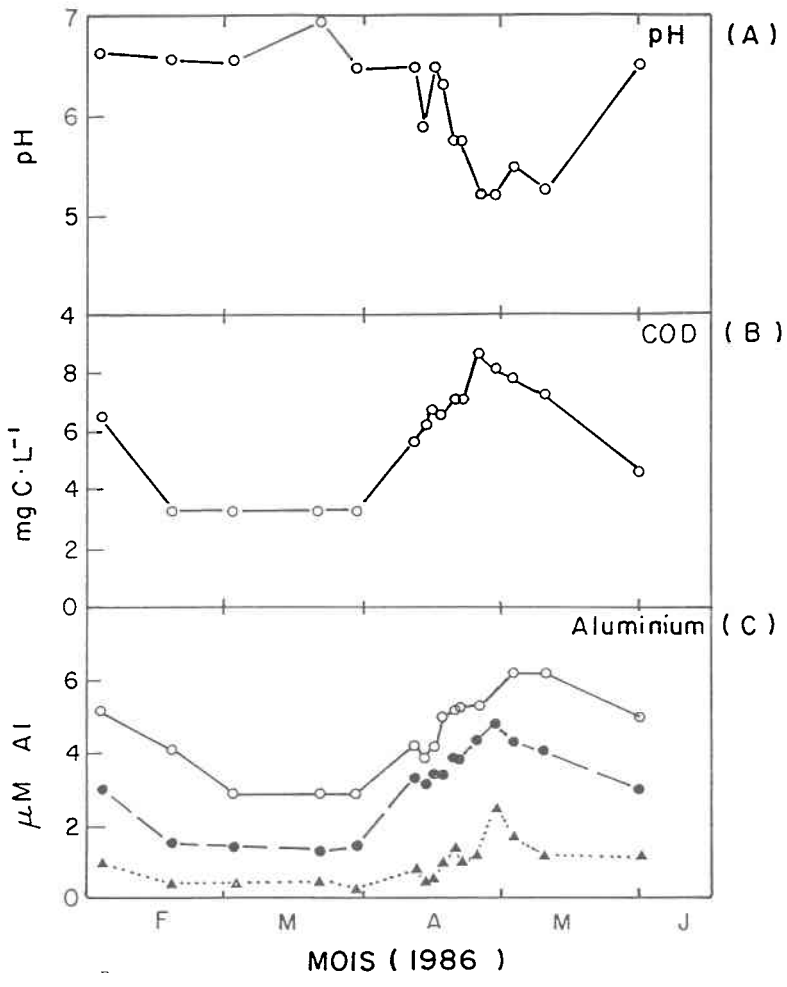


Figure 1.1. Variation temporelle de la qualité de l'eau de la rivière de la Trinité (A) pH, (B) carbone organique dissous, (C) aluminium dissous: Al monomère inorganique (•); Al monomère total (●) Al dissous total (○). Adapté de Hansen et Campbell (1987).

minoritaires en milieu acide (figure 1.2). Dans leur étude dans les montagnes Adirondacks de New York, Driscoll *et al.* (1980) ont signalé l'importance accrue des espèces AlF_y^{3-y} au cours de la baisse de pH au printemps. De même, pour trois rivières à saumon de la Côte-Nord du Golfe Saint-Laurent (rivières McDonald, Aux Rochers, de la Trinité), Campbell *et al.* (1992) ont signalé la contribution importante des fluoro-complexes AlF^{2+} et AlF_2^+ lors de la fonte printanière. Une variation de 2.9 à 10.5 µM d'Al a été enregistrée durant cette période, les fluoro-complexes représentant jusqu'à 60% de l'aluminium inorganique (figure 1.2). Notons que la concentration de l'ion libre (Al^{3+}) peut aussi devenir importante à bas pH, ses concentrations prédominant dans des eaux contenant peu de ligands complexants. A des pH > 5.0, la formation de complexes mixtes

($Al(OH)_xF_y^{3-x-y}$) peut être substantielle; leur importance croît avec une augmentation de pH. Par ailleurs, Birchall et ses collaborateurs (1989) ont signalé l'importance des silicato-complexes d'aluminium. Cependant, d'après la constante de formation de $10^{1.07}$ ($Al^{3+} + Si(OH)_4 \leftrightarrow Al(OSi(OH)_3)^{2+} + H^+$; Browne et Driscoll, 1992), seulement de fortes concentrations de $Si(OH)_4$ résulteraient en une proportion non-négligeable de $Al(OSi(OH)_3)^{2+}$. Il en va de même pour la formation des sulfato-complexes de l'aluminium ($Al^{3+} + SO_4^{2-} \leftrightarrow Al(SO_4)^+$; log K_1=3.01; Ball *et al.*, 1980). Dans les eaux de surface du Québec, il est rare d'observer des concentrations importantes de silice dissoute ou de sulfates.

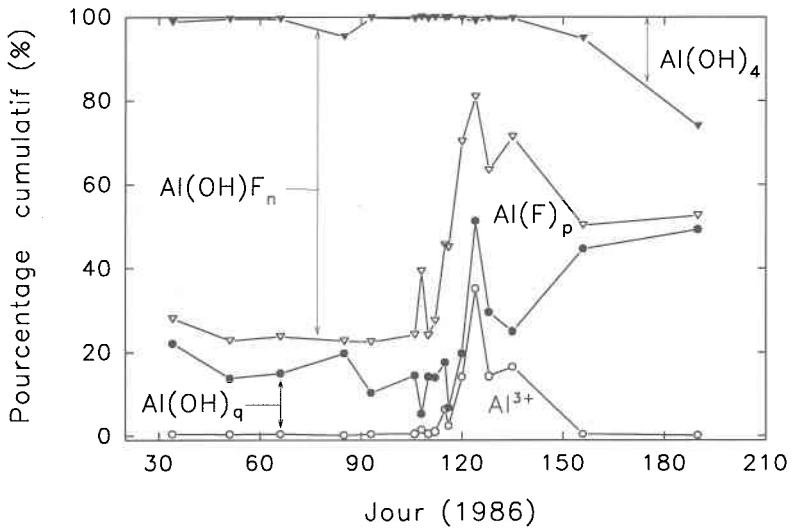


Figure 1.2. Variation temporelle des différentes formes d'aluminium inorganique monomère dans la Rivière de la Trinité pour le printemps 1986. Adapté de Campbell *et al.*, 1992. Les pH pour chaque point expérimental sont donnés à la figure 1.1.

La matière organique naturelle peut également exercer une influence importante sur la spéciation de l'aluminium pendant les périodes d'acidification épisodique. Lors de la crue automnale, Lacroix et Kan (1986) ont démontré des augmentations de $[H^+]$, de la matière organique dissoute (MOD) et d'Al dissous pendant la période de débit maximal (automne 1985). L'augmentation d'aluminium dissous a été attribuée surtout à une augmentation des espèces organiques d'aluminium. Campbell *et al.* (1992) ont observé un phénomène semblable pendant la fonte de neige pour trois rivières à

saumon sur la Côte-Nord du Québec. Bien que l'accroissement en aluminium réflète surtout des augmentations importantes de l'aluminium inorganique, la concentration d'aluminium non-échangeable (Al organique) a aussi augmenté.

L'ensemble de ces observations sur le terrain met en évidence l'importance de déterminer la spéciation de l'aluminium, plutôt que de restreindre l'effort analytique à la détermination de ses concentrations totales. Peu importe si le mécanisme de toxicité proposé est basé sur un modèle d'équilibres chimiques ou sur un modèle cinétique, ***il fera intervenir la spéciation de l'aluminium pour expliquer l'interaction du métal à l'interface entre l'organisme cible et l'eau***. L'effet de la spéciation sur l'interaction métal-membrane sera discuté dans la section sur la modélisation qui suit.

1.2 ASPECTS TOXICOLOGIQUES

1.2.1 Effets biologiques de l'aluminium chez le poisson

Dans les eaux douces, on a tendance à associer l'acidité et des concentrations élevées en aluminium à une toxicité importante chez plusieurs espèces aquatiques, notamment les poissons (NRCC, 1986). En effet, dans des eaux susceptibles à l'acidification, le déclin des populations de poissons est bien documenté (*e.g.* Watt *et al.*, 1983; Dietrich et Schlatter, 1989). Ce déclin peut être attribué à des insuccès de reproduction, à une mortalité au stade alevin, ou à une toxicité létale ou sous-létale chez d'autres stades de vie de la population. Un survol des concentrations toxiques d'Al documentées chez le poisson est présenté dans l'annexe 1 (tableau A1.1).

Par ailleurs, il semble que l'aluminium exerce son effet toxique à la surface des branchies, altérant la structure, la chimie et/ou la physiologie de l'épithélium branchial. La réponse toxique aiguë à

l'aluminium résulterait d'une défaillance des propriétés de barrière de l'épithélium; une perturbation de la capacité osmorégulatrice / ionorégulatrice du poisson menerait à une hémoconcentration suivie d'un échec du système circulatoire. Un disfonctionnement respiratoire peut aussi contribuer à la réponse toxique de l'Al chez le poisson, surtout à des valeurs de pH>5 (*e.g.* Rosseland, 1980; Muniz et Leivestad, 1980; Neville, 1985) ou à une [Ca^{2+}] plus élevée (Wood et McDonald, 1987).

Comme l'action toxique semble se produire au niveau de la surface branchiale, il serait raisonnable de s'attendre à des corrélations entre la bioaccumulation branchiale de l'aluminium et des paramètres physiologiques. En effet, Booth *et al.* (1988) ont identifié un seuil toxique de bioaccumulation sur les branchies de l'omble de fontaine (≅840 µg Al/g branchie poids sec). De plus, Wood et McDonald (1987) ont démontré que la bioaccumulation de l'Al était inversement corrélée avec la concentration de Na plasmatique dans les branchies. Par ailleurs, pour des concentrations semblables d'aluminium en solution, les espèces de poisson les plus sensibles accumulent moins d'aluminium branchial (*i.e.* [Al] branchiale après 48 h: achigan à petite bouche (≈15 µg Al/g branchie poids humide) < omble de fontaine (≈50 µg Al/g branchie poids humide) < truite arc-en-ciel (≈100 µg Al/g branchie poids humide)- *v.* Wood et McDonald, 1987). Ce résultat, quelque peu contradictoire, pourrait s'expliquer en termes d'une production accrue de mucus chez les poissons les plus aptes à survivre l'exposition à l'aluminium. Comme l'interaction entre l'aluminium et la surface branchiale semble donner lieu aux effets toxiques observés, nos efforts de modélisation tenteront de déterminer comment la spéciation d'Al en solution influera sur les réactions de l'Al à la surface branchiale.

1.2.2 Effets de la complexation organique

La plupart des complexes organiques de l'aluminium ne sont pas directement disponibles pour les organismes aquatiques; divers auteurs ont d'ailleurs mis en évidence que l'ajout de matière organique diminuait la toxicité de l'aluminium, tout comme le prédit le modèle de l'ion libre (Driscoll *et al.*, 1980; Baker, 1981; Kramer et Hummel, 1985; Van Coillie *et al.*, 1983; Lydersen *et al.*, 1990; Parkhurst *et al.*, 1990; Peterson *et al.*, 1990).

Par exemple, Driscoll *et al.* (1980) ont ajouté une concentration constante d'un ligand organique simple (citrate ≅ 116 μM) pour complexer la majorité de l'aluminium en solution ([Al] total = 19 μM). Ils ont trouvé que le temps de survie des poissons était mieux corrélé avec la fraction inorganique d'Al qu'avec l'aluminium total. Van Coillie *et al.* (1983) ont observé que la matière humique (10 mg L^{-1}) a considérablement atténué la toxicité létale de l'aluminium à pH 4.5 et à pH 5.6 chez le saumon atlantique (*Salmo salar,* âge 1^{+}). Parkhurst *et al.* (1990) ont déterminé que les concentrations des formes inorganiques monomères étaient le principal facteur affectant la survie des alevins d'omble de fontaine exposés à 0-50 μM Al et 1 à 9 mg C L^{-1} de carbone organique dissous (COD). De même, Lydersen *et al.* (1990) n'ont pu attribuer d'effet toxique aigu à l'aluminium lié à la matière organique. Finalement, pour une concentration en aluminium inorganique monomère constante (2.8 μM), Neville (1985) a trouvé que 8-10 mg L^{-1} d'acides organiques naturels n'ont pas modifié la réponse de la truite arc-en-ciel à pH 5.0. Cependant à pH 4.5, la réponse était légèrement accrue en présence de ces ligands organiques.

1.2.3 Effets de la complexation inorganique

L'aluminium inorganique est généralement considéré comme étant "plus toxique" que l'aluminium organique. Plusieurs auteurs ont essayé de distinguer entre les effets de différents complexes inorganiques et l'ion libre, mais souvent sans pouvoir en arriver à des conclusions sans équivoque.

L'équilibre entre les hydroxo-espèces d'aluminium et l'ion libre est rapide; ainsi, à un pH constant, la proportion de chacune des espèces (Al^{3+}, $Al(OH)^{2+}$, $Al(OH)_2^{+}$,...) restera constante, de telle sorte qu'on ne peut pas distinguer entre l'effet de Al^{3+} et celui des hydroxo-complexes si on réalise le bio-essai à un pH donné. Si on varie la concentration d'autres ligands (*e.g.*: sulfates, fluorures) ou la concentration totale en aluminium, on change obligatoirement les concentrations de toutes les espèces Al^{3+}, $Al(OH)^{2+}$, $Al(OH)_2^{+}$, ... Par ailleurs, si on fait varier le pH afin de changer les proportions relatives de ces espèces, on perturbe simultanément les équilibres entre le proton et les membranes biologiques et on ne peut attribuer sans équivoque l'effet observé à une des espèces d'Al.

Le ligand SO_4^{2-} se lie faiblement à l'aluminium et les sulfato-complexes sont généralement peu importants dans les eaux naturelles; il s'en suit que l'on trouve peu d'études sur les effets des complexes $Al(SO_4)_x^{3-2x}$. On peut citer comme rare exemple l'étude de Kinraide et Parker (1987) sur l'orge - ces auteurs ont proposé la "non-toxicité" des sulfato-complexes. De façon semblable, Birchall *et al.* (1989) ont déterminé qu'il faillait des ajouts importants de silice (93 µM H_4SiO_4; Si:Al = 13) pour attenuer la toxicité de l'aluminium chez le saumon atlantique.

Utilisant les alevins de truite (*Salvelinus fontinalis*), Baker (1981, figure 1.3) a conclu que les formes labiles d'aluminium (Al monomère inorganique) constituaient les espèces "les plus toxiques". Les complexes Al-citrate s'avéraient "très peu toxiques" pour ce poisson alors que les fluoro-complexes d'aluminium semblaient avoir "une toxicité intermédiaire" entre celle d'Al-citrate et celle des hydroxo-complexes. A un pH de 5.2, pour une concentration de 500 µg F^{-} L^{-1} (26.3 µM) et 500 µg Al L^{-1} (18.5 µM), environ 45% des poissons survivaient après 14 j. Pour ces mêmes concentrations à un pH de 4.4, la survie des truites exposées se situait à environ 71% des témoins à pH 4.4, lesquels avaient un taux de survie de 95% (voir la figure 1.3).

Les calculs thermodynamiques faits sur ces milieux indiquent qu'en présence de fluorures une faible quantité d'aluminium devait se retrouver sous forme d'ion libre. D'après Baker, la toxicité réduite en présence de fluorures s'expliquait par "une toxicité moindre pour l'espèce $Al(F)_y^{3-y}$"; l'auteur n'a pas tenu compte de la diminution des concentrations en Al^{3+} ou de $Al(OH)_x$.

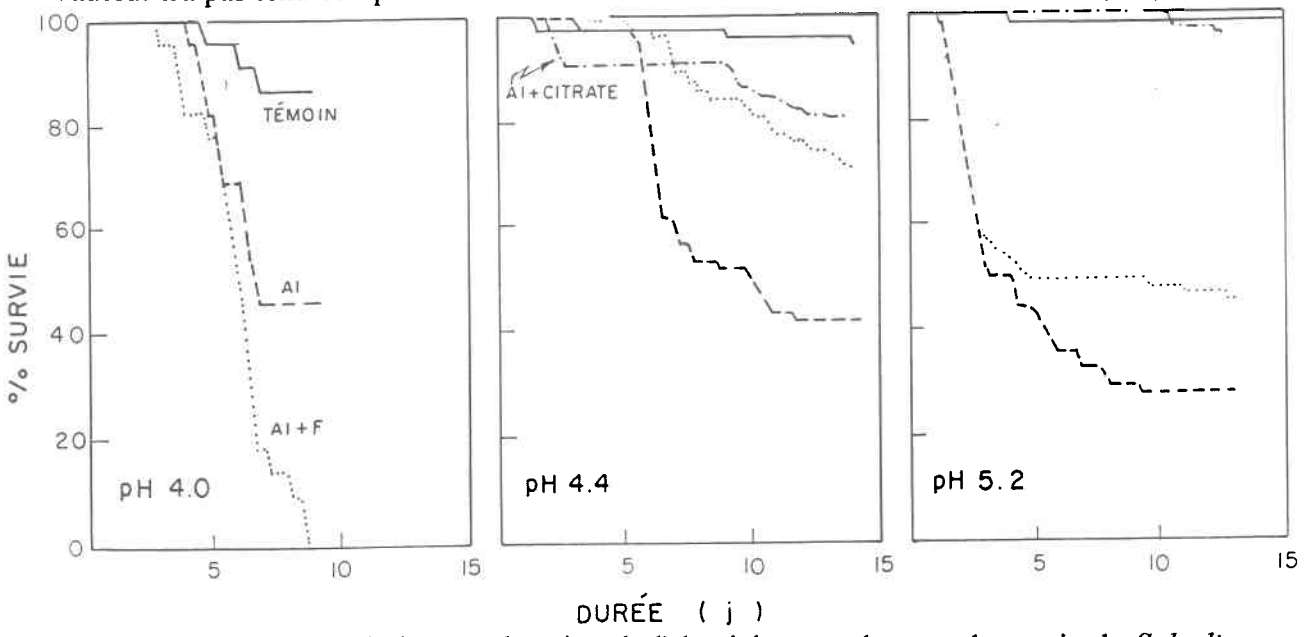


Figure 1.3. Effet de la complexation de l'aluminium sur le taux de survie de *Salvelinus fontinalis*. Adapté de Baker (1981). Voir les légendes de la figure à pH 4.0 pour l'explication des courbes.

Avec des rapports molaires F_T/Al_T de 5, la toxicité de l'aluminium était supprimée chez le mené à nageoires rouges (*Notropis cornutus*) à pH 5 et pour une concentration de 10 µM en aluminium (Kramer et Hummel, 1985). Pour une solution équimolaire, $F_T/Al_T = 1$, une hyperplasie des branchies apparaissait et la couche épithéliale présentait également des ruptures. Il y avait augmentation de la production de mucus et fusion des lamelles secondaires lorsque le rapport molaire de F_T/Al_T était de 3.5. Selon ces auteurs, ceci démontre que pour cette espèce la suppression de la toxicité de l'aluminium par F^- "n'est pas stoéchiométrique". Il a fallu cinq ions fluorure pour chaque ion d'aluminium afin de ne plus observer les effets d'Al. Finalement, Parkhurst *et al.* (1990) ont corrélé l'effet toxique aigu de l'aluminium chez l'omble de fontaine

avec les concentrations en aluminium inorganique monomère, même en présence d'une grande variation des concentrations de fluorures (F^-: 0.5→17 µM; Al: 0→47 µM).

1.2.4 Effets d'autres espèces d'Al

Jusqu'ici on a surtout discuté de l'effet de formes dissoutes de l'aluminium. Cependant, il existe quelques indications dans la littérature (Schofield et Trojnar, 1980; Dickson, 1983) que des formes colloïdales ou des précipités d'aluminium (*e.g.*: $Al(OH)_3(s)$) puissent, eux aussi, exercer un effet toxique sur les poissons. Il est toutefois probable que dans ces cas, le mécanisme toxique soit différent de celui postulé pour l'aluminium dissous. L'hypothèse proposée par Neville et Campbell (1988) ou par Playle et Wood (1989) est celle d'une sorption d'aluminium sur la membrane, soit comme précipité ($Al(OH)_3$) ou comme polymère (*e.g. Al-13**), c'est-à-dire que la toxicité serait liée à un effet physique plutôt qu'à un effet biochimique. Dans ces cas, l'aluminium agirait pour provoquer une barrière physique au transport de gaz, au lieu d'affecter les équilibres osmotiques comme dans le cas de l'aluminium monomère. En effet, l'accumulation de l'aluminium colloïdal ou précipité sur l'épithélium branchial pourrait provoquer une irritation au niveau des branchies, donnant lieu à une production accrue de mucus, à une inflammation du tissu branchial ou à une séparation de couches épitheliales, avec des effets subséquents sur le transport de gaz.

---

* L'existence de l'espèce *Al-13* a été démontrée par des méthodes physicochimiques (Bertsch, 1987; 1989). Elle consiste en une molécule tetrahédrale d'aluminium (AlO_4) entourée de douze molécules équivalentes d'aluminium (i.e. $AlO_4Al_{12}(OH)_{(24+n)}(H_20)_{(12-n)}^{(7-n)+}$.

1.3 L'INTERACTION DE L'Al À LA SURFACE BRANCHIALE

1.3.1 Introduction

La prédiction des effets biologiques de l'aluminium nécessite certaines connaissances sur les mécanismes d'action du métal. Pour exercer son effet biologique, l'aluminium doit évidemment interagir avec l'organisme aquatique, au moins initialement au niveau de la membrane biologique* (branchies dans le cas du poisson; Pagenkopf, 1983; Laurén 1991). Pour les poissons, on peut imaginer que cette interaction se produit en quatre étapes importantes: (i) la diffusion du métal dans la couche stagnante à l'extérieur du mucus; (ii) la diffusion / réaction à travers le mucus; (iii) la réaction chimique (sorption) à la surface membranaire; (iv) la prise-en-charge (internalisation) du métal (Williams, 1981; Campbell, 1993; figure 1.4). Une cinquième réaction (v), soit l'interconversion du métal entre ses différentes formes en solution est particulièrement importante dans le cas de l'aluminium. La prédiction des effets toxiques de l'aluminium dépendra des vitesses relatives de ces différentes étapes.

---

* On peut imaginer aussi le cas où le mucus et non pas la membrane biologique contiendrait les "sites sensibles". L'idée classique du rôle du mucus est celui d'un réservoir qui contient des groupements fonctionnels capables de lier les métaux, sans qu'il y ait de sites sensibles. Cependant, il est concevable qu'il y ait des enzymes ou des sites sensibles où le métal réagirait pour exercer un effet toxique direct; un rôle semblable a été prédit pour la paroi cellulaire des plantes (Wolfe, 1985). Dans le cas des poissons, l'aluminium pourrait réagir avec des protéines fonctionnelles dans le mucus telles que les enzymes Na-K ATPase et l'anhydrase carbonique (Staurnes et al., 1984) ou avec l'activateur du transport de calcium, la calmoduline (Haug et Caldwell, 1985). Dans ces cas, l'action toxique serait indirecte; la réduction de l'activité des ces biomolécules provoquerait une modification du fonctionnement des branchies.

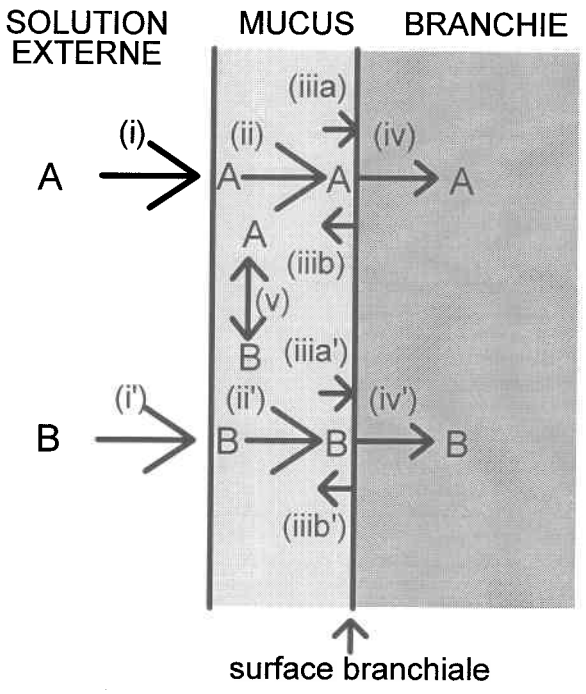


Figure 1.4. Figure schématique des processus de la prise-en-charge d'un métal à travers une membrane biologique: (i) diffusion dans la couche stagnante, (ii) diffusion à travers / réaction dans le mucus, (iiia et b) sorption / désorption à la surface biologique, (iv) prise-en-charge ou internalisation du métal, (v) interconversion des formes de métal. Les lettres A et B signifient deux espèces différentes d'Al.

1.3.2 Processus clefs

(a) Diffusion

Le flux diffusif (J) d'une espèce du métal peut être décrit par la première loi de Fick (équation 1.1):

$$J=\frac{D_i}{d}\bullet([M_i]_1-[M_i]_2) \qquad (1.1)$$

où D_i est le coefficient de diffusion, *d* est la distance entre les plans 1 et 2, et $[M_i]_1$ et $[M_i]_2$ sont les concentrations de métal dans les plans 1 et 2.

Le coefficient de diffusion (D_i) a une valeur de l'ordre de 10^{-5} cm^2s^{-1} pour les cations bivalents en solution aqueuse (0.6×10^{-5} cm^2s^{-1} pour les cations trivalents; Buffle, 1988). Le coefficient de

diffusion d'un ion dans l'eau dépend de sa charge (z) et de son rayon ionique (r) qui détermineront le diamètre effectif de la sphère d'hydratation. Par exemple, l'ion Al^{3+} est fortement chargé avec un petit rayon moléculaire, ce qui diminuera son coefficient de diffusion étant donné que sa sphère d'hydratation aura un grand diamètre. On s'attend ainsi à ce que le coefficient de diffusion du polycation, *Al-13*$^{(7+)}$ soit grandement réduit par rapport à celui des ions monomères. Notons que le diamètre des complexes a aussi une influence appréciable; le coefficient de diffusion dans l'eau varie en fonction de la masse moléculaire (équation 1.2, valide pour des molécules organiques de masse moléculaire (M_w) $<10^5$ daltons; Buffle, 1988). Les complexes organiques ou colloïdaux impliquant la MOD devraient donc avoir des coefficients de diffusion grandement réduits par rapport à l'ion libre ou des complexes simples.

$$D_i = 3.3 \text{ X } 10^5 / M_w^{1/3} \qquad (1.2)$$

Par ailleurs, la diffusion sera également réduite par contact avec des polysaccharides et des protéines constituant le mucus associé à la surface branchiale. En effet, le mucus contient des groupements phosphates, carboxyliques et sialiques (pK_a: phosphate ≈2.1, acide sialique ≈ 2.6, α-COOH ≈ 3 - 3.2, β-COOH ≈ 3.0 - 4.7, γ-COOH ≈ 4.5; Dawson *et al.*, 1986; Buffle, 1988), tous avec un fort potentiel à lier l'aluminium. De plus, la charge négative du mucus, même à des pH acides, augmente l'ordre de l'eau dans le mucus (capacité d'hydratation du mucus) et répousse les cations (potentiel électrostatique du mucus), réduisant ainsi la diffusion des ions vers la surface branchiale.

En résumé, plusieurs facteurs auront une influence sur la diffusion de l'aluminium vers la surface branchiale: la charge et le rayon hydraté de l'ion, de même que la capacité d'hydratation, le potentiel électrostatique (densité de charge), et le potentiel complexant du mucus, contribueront à

modifier le coefficient de diffusion effectif. D'ailleurs, il est aussi évident (équation 1.1) que le flux diffusif sera fonction de l'épaisseur de la couche de diffusion (d) que doit traverser le métal. La combinaison de ces six facteurs contribuerait à réduire la diffusion de l'aluminium vers la surface branchiale par rapport à celle d'autres ions dans des milieux plus simples.

Si l'on se fie aux vitesses de diffusion d'autres métaux (Ca, Hg et Cd) à travers une solution de mucus (Pärt et Lock, 1983), on s'attendra à ce que la diffusion de l'Al dans une solution de mucus soit ralentie de 10-70% par rapport à l'eau pure. Par ailleurs, la diffusion d'ions à travers la membrane cellulaire des plantes ou des algues (analogue au transport à travers le mucus des branchies?) est grandement réduite (facteur d'environ 100000) par rapport à la diffusion de ces mêmes ions dans l'eau ($D_{effectif}$: $0.05 \rightarrow 8 \times 10^{-10}$ $cm^2 s^{-1}$; Walker et Pitman, 1976; Buffle, 1988).

Notons qu'une partie de la réduction du flux diffusif par le mucus pourrait être transitoire. En effet, la capacité de complexation et la charge électrostatique résiduelle du mucus diminueront à mesure que l'Al s'y lie. Par ailleurs, l'exposition préalable de l'aluminium pourrait induire une augmentation de la production ou secrétion du mucus, ce qui modifiera l'épaisseur de la couche de diffusion.

L'épaisseur de la couche de mucus sur les branchies varie entre 1-10 µm (Randall et Wright, 1989). Une couche stagnante additionnelle peut se former à l'extérieur de la couche du mucus, mais comme la largeur du canal lamellaire se situe en dessous de 25 µm, il est improbable que l'épaisseur de la couche stagnante excède 10 µm. Comme les ions sont généralement fortement retenus par le mucus et que par conséquent leur diffusion y est très fortement ralentie, on peut supposer que:

(1) Le transport des ions est plus retardé dans le mucus que dans la couche diffuse qui se retrouve à l'extérieur du mucus, *i.e.*, on suppose que la limitation à la vitesse de diffusion se produit non pas dans la couche stagnante de la solution externe (i; figure 1.4), mais plutôt dans le mucus (ii; figure 1.4).

De plus, nous allons supposer que la complexation de l'aluminium par le mucus ne provoque aucun effet physiologique, *i.e.*, absence de sites sensibles dans le mucus- *v.* remarque en bas de la page 17.

(2) La complexation de l'aluminium par le mucus n'occasionne aucun effet nuisible direct pour le poisson.

On peut donc estimer la diffusion rélative de chaque espèce d'Al à traverser la couche de mucus associé à la surface branchiale*. Le diamètre et la charge des différentes espèces d'aluminium influenceront leur diffusion à traverser le mucus: on s'attendrait à ce que les petits cations mono- ou bivalents (AlF^{2+}, $Al(OH)^{2+}$, $Al(OH)_2^{+}$, etc.) franchissent relativement rapidement le mucus, alors que l'Al-MOD ou le polycation *Al-13* seraient significativement ralentis (figure 1.5) et l'ion libre Al^{3+} aurait un coefficient de diffusion intermédiare.

---

* Pour le faire, on doit négliger la capacité de chaque ion à provoquer des modifications dans la production du mucus, i.e. l'ion ne stimule pas de processus physiologiques.

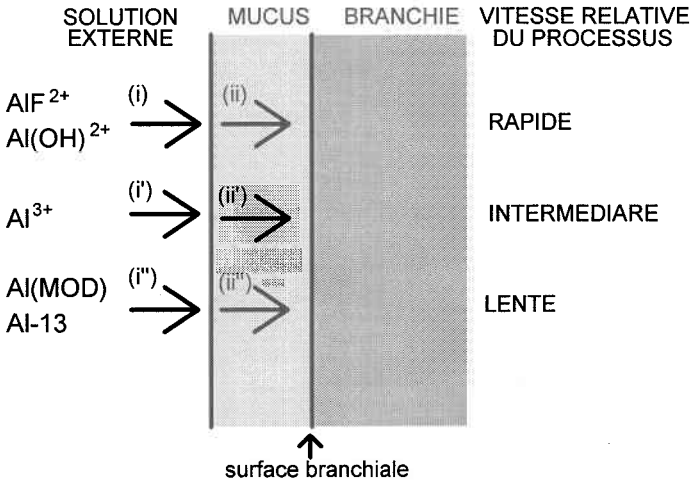


Figure 1.5. Vitesses relatives de diffusion de différentes espèces d'Al de la solution mère vers les branchies.

(b) Réaction à la surface membranaire

Il est probable que plusieurs espèces d'Al puissent réagir avec les sites sensibles de la surface biologique (équations 1.3-1.4, négligeant les charges sur M)

$$Al(H_2O)_6^{3+} + \text{L-branchie} \underset{k_{d1}}{\overset{k_{f1}}{\leftrightarrow}} \text{Al-L-branchie} \qquad (1.3)$$

$$X\text{-}Al(H_2O)_5 + \text{L-branchie} \underset{k_{d2}}{\overset{k_{f2}}{\leftrightarrow}} \text{X-Al-L-branchie} \qquad (1.4)$$

où L-branchie est un ligand à la surface branchiale.

Les réactions 1.3 et 1.4 se produisent en deux étapes, soit par la formation d'un complexe "*outer sphere*" (*e.g.*, équation 1.5) suivie de l'expulsion d'une molécule d'eau (équation 1.6). Comme la première réaction est typiquement rapide et la deuxième réaction (deshydratation = étape limitante) dépend principalement de la nature du cation, il est possible de prédire la cinétique rélative de ces réactions à partir des vitesses d'échange des molécules d'eau d'hydratation.

$$Al(H_2O)_6^{3+} + \text{L-branchie} \xrightarrow{k_f} Al(H_20)_6 \quad \text{L-branchie} \qquad (1.5)$$

$$Al(H_2O)_6 \quad \text{L-branchie} \xrightarrow{k_{dés}} Al(H_20)_5\text{-L-branchie} + H_20 \qquad (1.6)$$

où k_f, k_d et $k_{dés}$ sont des constantes de vitesse de formation, de désorption et de déshydratation, respectivement.

La complexation de l'aluminium par un ligand tend à augmenter la vitesse d'expulsion de l'eau et donc la réaction 1.6. Par exemple, le cation bivalent, $Al(OH)^{2+}$, réagira 10^4 fois plus rapidement que l'ion libre Al^{3+} (Basolo et Pearson, 1967; Crumbliss et Garrison, 1988). ***Pour cette raison, pour des concentrations égales de Al^{3+} et de $Al(OH)^{2+}$ dans la couche réactionnelle de la membrane biologique, on s'attendrait à ce que la réaction de l'espèce bivalente à la surface branchiale soit dominante.*** Par ailleurs, la complexation de l'ion $Al\text{-}X^{z+}$ par un deuxième ligand (par exemple, comme dans les cas de $Al(OH)F^+$ ou $Al(OH)_2^+$) réduira le nombre possible d'orientations lors de la réaction à la surface biologique (Schindler, 1990). D'ailleurs, la vitesse relative de la réaction de chacune des espèces d'aluminium est évaluée à la figure 1.6. Notons qu'il est difficile de prédire la vitesse de réaction de l'aluminium polynucléaire, étant donné l'absence complète de données pertinentes.

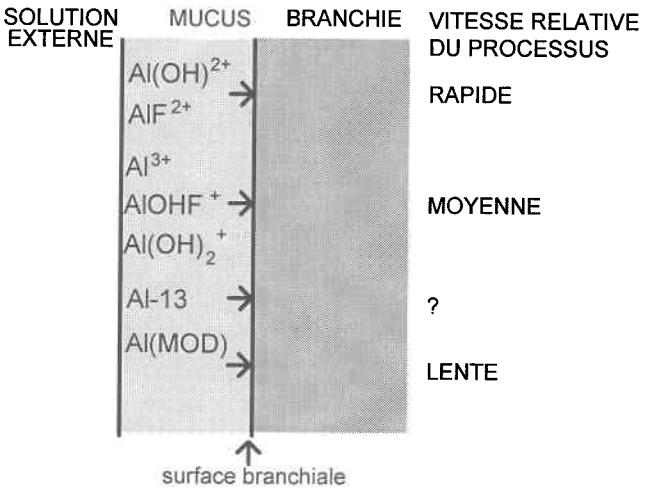


Figure 1.6. Vitesses relatives de réaction de différentes espèces d'Al à la surface branchiale.

Considérons maintenant l'inverse de ces réactions d'adsorption ou de complexation, à savoir la désorption. Rappelons que l'aluminium est très fortement complexé par la surface branchiale; lorsque celle-ci est exposée à des concentrations réalistes d'Al (μM), on peut négliger la réaction (iiib):

(3) La constante de désorption est beaucoup plus petite que la constante de sorption, ce qui implique que, pour nos conditions expérimentales, k_f•[Al]•[L-branchie]>k_d•[Al-L-branchie], la désorption (iiib) est être plus lente que l'adsorption (iiia).

(c) Internalisation

Pour la plupart des métaux bivalents, la prise-en-charge d'espèces chargées est probablement lente par rapport à leur sorption à la surface branchiale ou leur interconversion dans la couche réactionnelle. Il y a très peu de données par rapport à l'internalisation de l'aluminium par des poissons. Les quelques études disponibles (Hunter *et al.*, 1980; Brumbaugh et Kane, 1985; Neville, 1985; Berg et Burns, 1987; Haines *et al.*, 1987; Wood et McDonald, 1987; Galle *et al.*, 1990) suggèrent que pour des conditions environmentales, l'internalisation est très lente ou

négligeable. Il est même possible (tel que suggéré par Wood et McDonald, 1987) que l'aluminium exerce son effet toxique à la surface de la branchie, sans traverser l'épithélium (pas besoin d'invoquer la dissociation du complexe branchial dans le mécanisme toxique).

(d) Interconversion

D'après les résultats de Plankey et Patterson (1988), en milieux acides (pH 2.9 → 4.4) et pour des températures approchant celles de la fonte de neige, la complexation de l'Al par l'acide fulvique (FUL; équations 1.9-1.10) se produit à des taux plus élevés que celle par les fluorures (équation 1.7-1.8; Plankey et Patterson, 1988). Si l'on accepte que la vitesse de réaction entre l'aluminium et la matière organique naturelle est semblable à celle pour la réaction de l'aluminium à la surface branchiale, il faut conclure que l'interconversion des espèces de l'aluminium en présence de fluorures est légérement moins rapide que la réaction à la surface branchiale. Cependant, il est très probable que la restriction d'orientation des ligands sur les branchies donne lieu à une vitesse de réaction réduite entre l'Al et la surface branchiale.

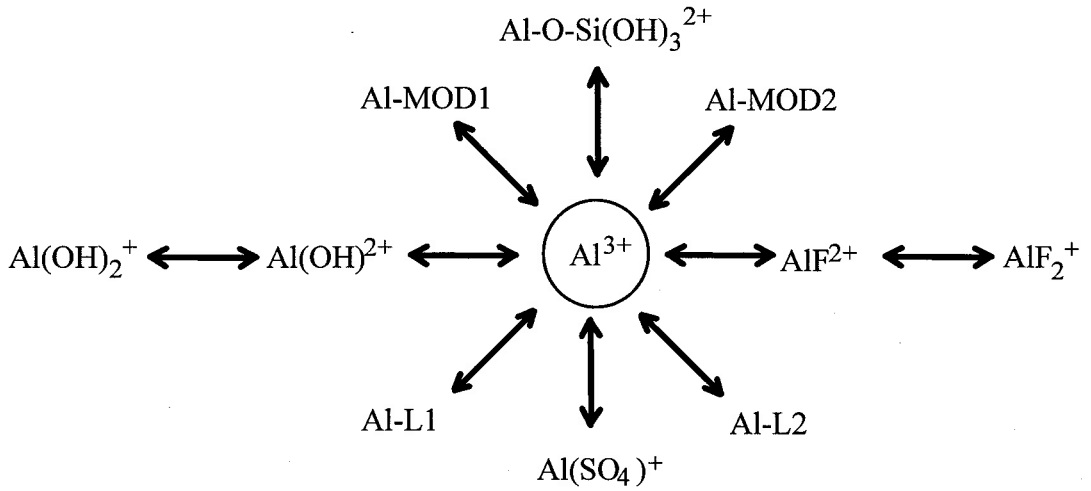


Figure 1.7. Quelques équilibres chimiques de l'aluminium dans les eaux naturelles.

(4) L'équilibre entre l'ion libre et les espèces monomères d'Al est rapide (Baes et Mesmer, 1976; Plankey *et al.*, 1986; Anderson et Bertsch, 1988) par rapport à la réaction de surface; il s'en suit que l'équilibre en solution devrait être atteint plus rapidement que celui pour la réaction à la surface branchiale, *i.e.* l'interconversion de l'aluminium près de la membrane se produit rapidement par rapport à la sorption sur les branchies.

$$Al^{3+} + F^- \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} AlF^{2+} \qquad (1.7)$$

$$Al(OH)^{2+} + F^- \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\leftrightarrow}} Al(OH)F^{+} \qquad (1.8)$$

$$Al^{3+} + FUL^{2-} \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\leftrightarrow}} Al(FUL)^{+} \qquad (1.9)$$

$$Al(OH)^{2+} + FUL^{2-} \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\leftrightarrow}} Al(FUL)OH \qquad (1.10)$$

1.3.3 Modèle général

Outres les hypothèses 1 à 4 déjà enoncées dans la section précédente, quelques suppositions additionelles sont essentielles à l'emploi du modèle général (Pagenkopf, 1983; Neville et Campbell, 1988; Tessier *et al.,* 1993), soit:

(5) Les branchies comprennent des sites sensibles où réagit l'aluminium (NRCC, 1986; Laurén, 1991). De plus, on considère que la réponse toxique du poisson à l'aluminium sera proportionnelle à la concentration d'une (ou de quelques) espèce(s) à des sites sensibles à la surface des branchies, {X-Al-branchie}, où X = F, OH, ou OH_2. Cependant, on s'attend à ce que l'aluminium puisse se lier ailleurs sur la branchie (sites non-sensibles) sans provoquer de réponse toxique.

(6) Pour les fins de modélisation, les sites de surface ont des constantes de formation discrètes (par opposition à un continuum ou une distribution de constantes) et les concentrations d'Al en solution et de sites de surface sur les branchies peuvent être considérés constantes (pas de baisse de concentration de l'aluminium dissous causée par sa liaison aux branchies).

En accord avec la supposition (6), l'interaction de l'aluminium à la surface des branchies peut être représentée par la formation d'un complexe {Al-L-branchie} comme il a déjà été proposé pour d'autres métaux M tels le Cd, le Cu et le Zn (Eq 1.11, ici L-branchie = ligand cellulaire à la surface des branchies; K = constante de formation).

$$M^{z+} + \text{L-branchie} \overset{K}{\leftrightarrow} \text{M-L-branchie} \quad (1.11)$$

$$Al^{3+} + \text{L-branchie} \leftrightarrow \text{Al-L-branchie} \quad (1.12)$$

Dans la discussion qui suit, on élaborera quelques idées relativement à la prédiction d'effets toxiques pour certaines conditions clef. Deux possibilités notables sont signalées selon que l'internalisation branchiale est plus rapide, ou plus lente, que la diffusion ou la réaction à la surface branchiale. L'élaboration de ces deux modèles spécifiques suit.

1.3.4 Modèle d'équilibre chimique (Modèle de l'ion libre)

Dans une eau douce, il est probable que la sorption du métal sur les branchies (iiia) est rapide par rapport à sa désorption (iiib) ou à sa prise-en-charge (iv). Dans le cas où l'interconversion des formes du métal est plus rapide que la réaction à la surface branchiale, un état de pseudo-équilibre s'établira.

(7A) La diffusion de l'aluminium vers la surface branchiale et sa sorption subséquente seront plus rapides que la prise-en-charge du métal (*Internalisation limitée*).

Cette supposition mérite un regard attentif. Si l'on accepte que la surface branchiale est en équilibre avec les espèces monomères en solution, et que l'équilibre précède l'expression de la réponse biologique, il s'en suit que ***peu importe l'identité de l'espèce qui réagit à la surface branchiale, aucune espèce en solution ne peut être considérée comme plus (ou moins) toxique qu'une autre***. Puisque l'équilibre parmi les espèces monomères (Al^{3+}, $AlOH^{2+}$, $Al(OH)_2^+$, AlF^{2+},...) s'effectue rapidement (Baes et Mesmer, 1976; Plankey *et al.*, 1986), la supposition d'équilibre nous semble raisonnable pourvu que la limite de solubilité d'$Al(OH)_3$ ne soit pas dépassée.

Dans de telles conditions (sans dépassement de la limite de solubilité de $Al(OH)_3(s)$), l'adsorption pourrait être décrite par un isotherme de Langmuir (équation 1.12) et la réponse biologique serait proportionnelle à la concentration du complexe à la surface de la membrane {Al-L-cellule} (équation 1.13-1.14; Morel, 1983; Pagenkopf, 1983; Tessier *et al.*, 1993).

$$K_a = \theta/(1-\theta)\cdot[Al^{3+}]_o \qquad (1.13)$$

où K_a (cm^3 $mole^{-1}$) est la constante d'équilibre pour l'adsorption, θ est la proportion de sites occupée par Al et $[Al^{3+}]_o$ est la concentration de Al^{3+} près des sites L-branchie à la surface biologique. Le flux d'internalisation sera proportionnel à la concentration de sites occupés par Al:

$$J = k_b \cdot \theta \qquad (1.14)$$

où k_b (moles cm^{-2} s^{-1}) est la constante de vitesse pour le transport de Al à travers la membrane.

D'après la réaction (1.12), il s'en suit que:

$$\text{réponse biologique} \propto \{\text{Al-L-branchie}\} = K \cdot \{\text{L-branchie}\} \cdot [Al^{3+}] \qquad (1.15)$$

Cette approche s'est révélée utile pour expliquer la toxicité des métaux (autres que l'aluminium) chez plusieurs espèces d'organismes aquatiques (Nelson *et al.*, 1981; Petersen, 1982; Morel et Morel-Laurens, 1983; Sunda et Huntsman, 1983; Sunda, 1991; Campbell, 1993) y compris les poissons (Pagenkopf, 1983). Par analogie avec ces résultats, on peut présumer qu'à un pH donné, selon ce modèle, la concentration en Al^{3+} sera le meilleur prédicteur de la toxicité de l'aluminium.

Neville et Campbell (1988) ont modifié le MIL pour tenir compte de la compétition entre l'aluminium et le proton à la surface des branchies des poissons. Pour expliquer la diminution de toxicité observée à faible pH, ils ont suggéré que l'ion H^+ puisse réagir avec la membrane biologique (équations. 1.16-1.17)*, attribuant un pK_a de 4.5 aux groupements fonctionnels des branchies impliqués dans l'adsorption (équation 1.16; Pagenkopf, 1983). Selon leur simulations, la concentration en {Al-L-branchie} atteindrait son maximum à un pH de 5, et diminuerait aux pH plus ou moins élevés (équations 1.16-1.17; figure 1.8). L'ajustement des valeurs de pK_a

---

* L'interaction du proton ne se limite pas nécessairement à un simple déplacement des métaux de la surface biologique; des variations de pH pourraient également provoquer des changements allostériques dans des protéines qui s'y trouvent, modifiant ainsi leur affinité pour les métaux. De plus, on s'attendrait à ce que le proton exerce une gamme d'effets physiologiques chez le poisson, modifiant ainsi la surface branchiale, le micro-environment entourant la surface branchiale ou le flux de matières dans la proximité des branchies.

correspond à modifier l'importance de la compétition du proton, ce qui a pour effet de déplacer le maximum de toxicité à des valeurs de pH plus ou moins élevées.

$H^+ + \text{L-branchie} \leftrightarrow \text{H-L-branchie}$ (1.16)

$2H^+ + \text{L-branchie} \leftrightarrow H_2\text{-L-branchie}$ (1.17)

$Al^{3+} + \text{L-branchie} \leftrightarrow \text{Al-L-branchie}$ (1.18)

$Al^{3+} + OH^- + \text{L-branchie} \leftrightarrow \text{HO-Al-L-branchie}$ (1.19)

Par ailleurs, notons qu'on peut reproduire les mêmes courbes (semblables à celle de la figure 1.8) en supposant que la réaction 1.19 est dominante mais qu'elle se produit à une autre valeur de pK_a.

L'importance de l'ion libre est souvent considérée à tort comme si cet ion était la seule forme du métal qui soit disponible pour l'organisme. Tel que discuté auparavant, son importance vient plutôt du fait que la réactivité du métal est contrôlée par l'équilibre chimique entre l'ion libre et les divers ligands cellulaires. A un pH donné, l'effet physiologique dépendra de la concentration du métal libre dans le milieu externe, indépendamment des autres formes du métal qui s'y trouvent. Rappelons qu'on peut voir la dépendance de toutes les espèces d'aluminium sur l'ion libre dans la figure 1.7.

Selon cette approche, la toxicité de l'aluminium en présence de ligands (*e.g.* fluorures, MOD, $Si(OH)_4$, SO_4, etc.) serait réduite par la complexation de l'aluminium. Ceci entraînerait une baisse de la concentration de l'ion libre, et donc une réduction de la concentration de l'espèce {Al-L-branchies}. En d'autres termes, le MIL simple prédit que lorsque complexé par un ligand en solution, l'aluminium ne devrait pas s'avérer "toxique".

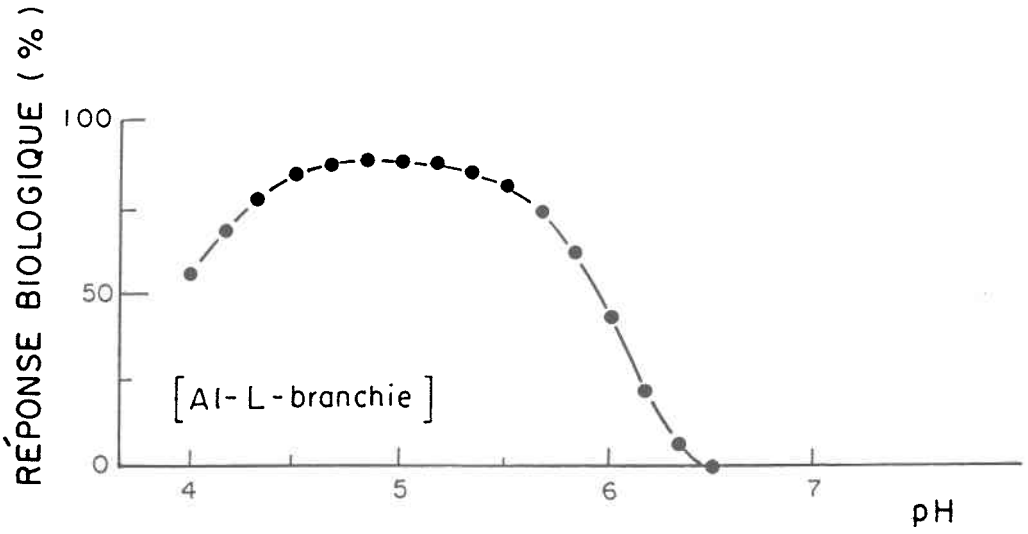


Figure 1.8. Représentation de l'interaction Al-branchie pour le modèle ion libre simple: proportion de sites occupés par l'aluminium en fonction du pH. Adapté de Neville et Campbell (1988).

Malgré le succès du modèle de l'ion libre dans l'interprétation des interactions des métaux bivalents (*e.g.*: Cu^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}) chez les micro-organismes, le modèle simple est peut être inadapté pour expliquer la toxicité d'un métal aussi complexe que l'aluminium chez les poissons. En effet, à cause de sa charge élévée, l'ion Al^{3+} a une forte tendance à s'hydrolyser ou à former des complexes mixtes, contrairement à ce qu'on observe pour les métaux bivalents. Il n'est guère évident que les expériences qui ont contribué au dévelopement du MIL puissent être généralisées à des expériences portant sur le microenvironnement complexe des branchies. Il parait donc essentiel de réexaminer les suppositions du modèle par rapport aux conditions physiologiques particulières des poissons.

1.3.5 Modèle cinétique

On peut considérer deux cas. Dans le premier cas, si l'adsorption (iiia) de l'Al était plus lente que son internalisation (iv), la réponse biologique serait fonction du taux de réaction de *l'espèce toxique* (*i.e.* l'espèce qui réagit le plus vite à la surface biologique); la sorption de l'aluminium serait la réaction limitante.

(7B) La sorption de l'aluminium à la surface branchiale est moins rapide que la diffusion vers la membrane ou l'internalisation de l'aluminium (*Sorption limitée*).

Dans de telles conditions, l'organisme agira effectivement comme réservoir pour le métal et la concentration du métal associé aux sites sensibles n'atteindra jamais l'équilibre avec la solution d'exposition. En effet, dans ce modèle à contrôle cinétique, on *peut* parler d'espèces toxiques quoiqu'on fasse toujours la supposition que la réponse toxique est proportionnelle à {X-Al-L-branchie}; {X-Al-L-branchie} sera fonction du taux de réaction de chacune des *espèces toxiques* (équation 1.21). En effet, sous ces conditions, la réaction limitante serait probablement la perte d'une molécule d'eau du complexe "*outer sphere*" (Basolo et Pearson, 1967; équation 1.20). On s'attendrait donc à ce que l'ion libre Al^{3+} réagisse moins rapidement que $Al(Y)_1$ à la surface biologique, *i.e.* que le $Al(OH)^{2+}$ soit *plus toxique* que le Al^{3+}:

$$Al(Y)_x(H_20)_{6-x} + \text{L-branchie} \leftrightarrow (H_20)_{6-x}(Y)_x\cdots\text{Al-L-branchie} \xrightarrow{k_{lent}} \begin{matrix}(H_20)_{6-x-1}\text{-}(Y)_x\text{-Al-L-branchie} \\ \text{ou} \\ (H_20)_{6-x}(Y)_{x-1}\text{-Al-L-branchie}\end{matrix} \quad (1.20)$$

$$\{\text{X-Al-L-branchie}\} = \frac{k_1 \bullet [Al - Y_1] + k_2 \bullet [Al - Y_2] + \ldots}{k_{int}} \quad (1.21)$$

où Y_1 and Y_2 sont des ligands en solution, L-branchie est un ligand branchial et X-Al-L-branchie est la somme de toutes les espèces branchiales.

Puisque l'on suppose que l'interconversion entre les différentes espèces inorganiques de Al est rapide par rapport à la sorption de l'Al à la surface branchiale, la concentration de {X-Al-L-branchie} (proportionelle à la réponse biologique) sera fonction de la concentration totale des espèces inorganiques labiles (*i.e. "fast-reacting species" en solution*). Dans ces conditions, il importe peu si le métal est transporté (i) par protéine porteuse ou (ii) via un canal de protéine qui traverse la couche lipidique. L'étape clef du processus sera la réaction chimique avec les sites sensibles à la surface branchiale.

Un deuxième cas de contrôle cinétique peut être envisagé. Si la diffusion est moins rapide que l'internalisation, que l'adsorption et que l'interconversion (*i.e.* supposition 7C), la concentration totale d'aluminium qui réagit avec la branchie sera fonction de la concentration d'espèces transportées vers la surface branchiale.

(7C) La diffusion de l'aluminium vers la surface branchiale est moins rapide que la sorption ou l'internalisation de l'aluminium (*Diffusion limitée*).

La proportion de sites occupés, {X-Al-L-branchie}, sera donc fonction de la vitesse à laquelle l'Al traverse la couche de diffusion. En effet, l'aluminium qui se rend à la surface branchiale provoquera une réponse biologique proportionnelle au flux diffusif total d'Al. La sorption de l'*espèce toxique* sera suivie d'une interconversion rapide d'espèces en solution, effectivement régénérant l'espèce toxique. Dans ce cas, le meilleur prédicteur de la réponse biologique sera la concentration d'espèces d'Al participant effectivement à la diffusion à travers de la couche de mucus.

1.3.6 Distinction entre les deux modèles d'après les résultats expérimentaux

Si l'on accepte les suppositions 1-6, alors, d'après nos cas limitants théoriques (7A→7C), on peut s'attendre à trois possibilités expérimentales:

(i) Dans le cas d'une internalisation limitante, un (pseudo)-équilibre s'établira entre les espèces en solution et celles à la surface branchiale. La réponse biologique sera fonction de la concentration d'espèces {X-Al-L-cellule}, ***i.e. réponse biologique*** α ***[Al^{3+}] (à condition que X=$H_2$0).***.

(ii) Si la réaction chimique à la surface biologique est limitante, les espèce(s) réactive(s) seront celles pour lesquelles l'interconversion est plus rapide que l'adsorption, ***i.e. réponse biologique*** α ***Al inorganique ou une fraction de l'Al inorganique (Al-labile)***.

(iii) Si la diffusion limite les concentrations d'Al dans la couche réactive, alors les espèces disponibles seront celles qui diffusent rapidement (relativement à l'internalisation et à la sorption) vers la surface biologique, ***i.e. réponse biologique*** α ***Al inorganique ou une fraction de l'Al inorganique (pas nécessairement la même fraction que dans (ii): Al diffusible).***

Cependant, dans la plupart des conditions expérimentales ($[L]_{inorg}$ constante, $[L]_{org}$ variable), il est difficile, sinon impossible de distinguer entre ces possibilités. A des conditions de pH et de [ligand] constantes, la concentration de l'ion libre, Al^{3+}, sera une fraction constante de $[Al]_{totale}$ ou de $[Al]_{inorg}$; faire varier $[Al^{3+}]$ revient à modifier $[Al]_{labile}$ ou $[Al]_{diffusible}$.

1.3.7 Limites de la modélisation

Outre les facteurs physico-chimiques évoquées jusqu'à présent, l'interaction entre l'aluminium et les membranes biologiques peut également dépendre d'autres variables physicochimiques. Parmi celles-ci, la concentration en calcium du milieu extérieur s'avère particulièrement importante puisque les ions Ca^{2+} se lient à la membrane protégeant ainsi l'organisme contre la perte d'ions plasmatiques (McWilliams, 1982; McDonald *et al.*, 1983a et b). D'autres variables, telles que la température, le pH, et la teneur de l'eau en matière organique dissoute, agiront sur l'état

physiologique de l'organisme cible. De plus, puisque le poisson peut agir sur son propre environnement, on doit également considérer la rétroaction du poisson sur son milieu parmi les variables pouvant moduler l'action de l'aluminium, ce qui augmente le degré de complexité des interactions. Par exemple, en milieu artificiel, les poissons peuvent modifier leur milieu extérieur en excrétant des cations (Na^+, K^+, etc.) ou du CO_2 et du NH_3 à travers leurs branchies (Wright *et al.*, 1986; Playle et Wood, 1989; Lin et Randall, 1991). En milieu naturel, bien que l'influence des poissons sur leur macro-environnement soit négligeable, le micro-environnement qui entoure leurs branchies peut avoir un pH significativement différent de celui de l'eau extérieure. De plus, le saumon peut activement chercher une eau moins acide. Sa mobilité favorise le passage d'une quantité d'eau beaucoup plus grande à la surface des branchies que celle qui entre en contact, par exemple, avec la membrane extérieure d'une algue stationnaire.

1.4 RESUME

L'effort de modélisation nécessite de nombreuses suppositions:

(1) Le transport des ions est plus retardé dans le mucus que dans la couche diffuse qui se retrouve à l'extérieur du mucus, *i.e.*, on suppose que la limitation à la vitesse de diffusion se produit non pas dans la couche stagnante (i; figure 1.4), mais plutôt dans le mucus (ii; figure 1.4).

(2) La complexation de l'aluminium par le mucus n'occasionne aucun effet nuisible direct pour le poisson.

(3) La constante de désorption est beaucoup plus petite que la constante de sorption, ce qui implique que, pour nos conditions expérimentales, $k_p \cdot [Al] \cdot [L\text{-branchie}] > k_d \cdot [Al\text{-}L\text{-branchie}]$, la désorption (iiib) est être plus lente que l'adsorption (iiia).

(4) L'équilibre entre l'ion libre et les espèces monomères d'Al est rapide (Baes et Mesmer, 1976; Plankey et Patterson, 1986; Anderson et Bertsch, 1988) par rapport à la réaction de surface; il s'en suit que l'équilibre en solution devrait être atteint plus rapidement que celui pour la réaction à la surface branchiale, *i.e.* l'interconversion de l'aluminium près de la membrane se produit rapidement par rapport à la sorption sur les branchies.

(5) Les branchies comprennent des sites sensibles où réagit l'aluminium (NRCC, 1986; Laurén, 1991). De plus, on considère que la réponse toxique du poisson à l'aluminium sera proportionnelle à la concentration d'une (ou de quelques) espèce(s) à des sites

sensibles à la surface des branchies, {X-Al-branchie}, où X = F, OH, ou OH_2. Cependant, on s'attend à ce que l'aluminium puisse se lier ailleurs sur la branchie (sites non-sensibles) sans provoquer de réponse toxique.

(6) Pour les fins de modélisation, les sites de surface ont des constantes de formation distinctes (par opposition à un continum ou une distribution de constantes) et les concentrations d'Al en solution et de sites de surface sur les branchies peuvent être considérés constants (pas de baisse de concentration de l'aluminium dissous causée par sa liaison aux branchies).

(7A) La diffusion de l'aluminium vers la surface branchiale et sa sorption subséquente seront plus rapides que la prise-en-charge du métal (*Internalisation limitée*).

ou

(7B) La sorption de l'aluminium à la surface branchiale est moins rapide que la diffusion vers la membrane ou l'internalisation de l'aluminium (*Sorption limitée*).

ou

(7C) La diffusion de l'aluminium vers la surface branchiale est moins rapide que la sorption ou l'internalisation de l'aluminium (*Diffusion limitée*).

2. Objectifs

Les travaux se situent dans la perspective d'études concernant les interactions entre l'aluminium, le fluorure et des cibles biologiques. Les recherches ont pour objectif général de **déterminer la biodisponibilité relative des complexes *inorganiques* de l'aluminium qui se retrouvent dans les eaux susceptibles à l'acidification**. L'accent sera mis sur l'interaction entre les hydroxo-complexes ($Al(OH)_x^{3-x}$) et les fluoro-complexes ($Al(F)_y^{3-y}$) et le saumon atlantique (*Salmo salar*; âge 1+). De plus, un des buts principaux de ce travail est d'améliorer les connaissances sur les mécanismes de la prise en charge de l'aluminium par le poisson. Ce type d'études revêt une importance particulière compte tenu d'une part de l'importance des fluoro-complexes de l'aluminium dans les eaux courantes lors de la fonte printanière des neiges, et d'autre part de la confusion apparente dans la littérature en ce qui concerne la bio-disponibilité de ces complexes.

La première phase des travaux, décrite dans le Chapitre III, porte sur la biodisponibilité de l'aluminium en présence ou en absence de fluorures. Ces recherches permettent l'identification de plusieurs questions importantes; ces questions sont élaborées à la fin du Chapitre III. Parmi les questions ainsi identifiées, mentionnons la vérification du modèle général de toxicité des métaux (Whitfield et Turner 1979, Tessier *et al.* 1993) et l'examen de son application dans le cas de la réaction de l'Al à la surface branchiale. Dans le chapitre ultime, on propose un modèle simple adapté (*e.g.* MIL, *v.* Neville et Campbell 1988) où on modifie le modèle général afin de tenir compte de la complexité à la fois (i) de la chimie de l'Al en solution et (*e.g.* Crumbliss et Garrison 1988) et (ii) des processus physiologiques du poisson pouvant affecter les interactions métaux-branchies.

3. Effet de la complexation des fluorures sur la toxicité de l'aluminium chez les juveniles du saumon atlantique (*Salmo salar*)

(Effect of fluoride complexation on aluminium toxicity towards juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*, Wilkinson, K.J., Campbell P.G.C. et P. Couture. 1990. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47: 1446-1452)

Mots-clés: Al / F / modèle de l'ion libre / effets biologiques / poisson / saumon atlantique

3.1 INTRODUCTION

Pour un bassin versant situé sur le Bouclier canadien et soumis à des précipitations acides, on note souvent une mobilisation des métaux (Mn, Zn et surtout Al) du milieu terrestre vers le milieu aquatique (Johannessen *et al.*, 1980; Driscoll *et al.*, 1980; Lachance *et al.*, 1983; Hansen et Campbell, 1987; Campbell *et al.*, 1992). Cette mise en circulation est généralement de nature épisodique, suite à des événements hydrologiques particuliers (*e.g.*: fonte de la neige; crue automnale). En effet, l'activité de l'ion hydrogène augmente de façon marquée (*i.e.* Δ pH: 1-2 unités) lors de la fonte printanière. Au cours de cette période, on observe non seulement une augmentation des concentrations en aluminium dissous mais aussi une modification de la spéciation de cet élément. Par exemple, pour un bassin versant situé dans les montagnes Adirondacks, Driscoll *et al.*, (1980) ont démontré au printemps une augmentation de la proportion de fluoro complexes d'Al. Des résultats semblables ont été observés au Québec pendant le choc acide printantier: la proportion de fluoro-complexes d'Al a augmenté dans trois rivières à saumon sur la Côte-Nord du Golfe St-Laurent - les rivières Trinité, McDonald et Aux Rochers (Campbell *et al.*, 1992). D'après des mesures expérimentales ainsi que des calculs thermodynamiques, les formes de l'aluminium dans l'eau au cours de cette période critique étaient surtout l'ion libre (Al^{3+}), les fluoro-complexes d'Al (AlF_y^{3-y}), et l'aluminium lié à la matière organique (Al-MOD). Des concentrations moindres de complexes mixtes (*e.g.* $Al(OH)F^{+}$) sont aussi présentes, de même qu'une fraction mineure de l'aluminium lié à d'autres ligands inorganiques ($AlOH^{2+}$, $Al(OH)_2^{+}$, Al-SiO_4, Al-SO_4). De plus, une dernière portion de l'aluminium ne réagit pas avec le pyrocatéchol violet; cette fraction peut être composée de formes polynucléaires d'Al, de colloïdes, ou de formes fortement liés à la matière organique (Campbell *et al.*, 1992).

Des concentrations élevées en aluminium ont été associées avec une réponse toxique aggravée chez plusieurs espèce aquatiques (NRCC, 1986), surtout les salmonidés (Cronan et Schofield,

1979; Henricksen *et al.*, 1984). Cependant, en dépit de leur importance géochimique évidente, il n'y a que peu d'information disponible relative à la toxicité des fluoro complexes d'aluminium vis-à-vis du biote aquatique. L'examen de la littérature n'en est que peu révélateur: les effets toxiques documentés de la complexation de l'Al par des fluorures varient d'une suppression complète (racines de l'orge- *Hordeum vulgare*: Cameron *et al.*, 1986) à une toxicité inaffecté (oeufs et têtards d'amphibiens- *Bufo americanus*, *Rana sylvatica*: Clark et LaZerte 1985) en passant par une atténuation partielle (des alevins du catostome- *Catastomus commersoni*: Driscoll *et al.*, 1980).

L'objectif de cette première phase de recherche est de déterminer les effets toxiques de l'aluminium dans des conditions acides simulant celles rencontrées au printemps dans les rivières à saumon de la Côte-Nord (*e.g.* pH 4.9-5.5, [Al] dissous 5-8 µM, [Al] inorganique 0.8-4 µM, $[F^-]_{total} \approx 1.5$ µM; Campbell *et al.*, 1989; Campbell *et al.*, 1992). Ce type d'études revêt une importance particulière compte tenu, d'une part de l'importance des fluoro-complexes de l'aluminium dans les eaux courantes lors de la fonte printanière des neiges, et d'autre part de la confusion apparente dans la littérature en ce qui concerne la bio-disponibilité de ces complexes.

3.2 METHODOLOGIE

3.2.1 Généralités

Tableau 3.1. Conditions expérimentales (concentrations nominales)[a]

Expérience[b,c]	[Al] (µM)	[F^-] (µM)	pH
A	9	0-12	4.5
B	0-12	0-11	4.5
C	0-12	0-11	4.9
$D_{i,ii}$	0-11	0	4.5
E	0-11	7	4.5
F	0-11	18	4.5

[a]Concentrations mesurées moyennes qui sont présentées dans le texte et dans les figures. Les données complètes se retrouvent dans Wilkinson *et al.* (1989).
[b]Pour les expériences B et C, $\Sigma([Al^{3+}] + [Al(OH)_x^{3-x}]) = cte. = 1.4\ \mu M$.
[c]Les indices (i, ii) pour l'expérience D indiquent deux grandeurs différentes de poissons sous un régime de conditions expérimentales identiques.

Dans une série d'expériences semi-statiques (renouvellement de l'eau aux 8 à 12 h), des juveniles du saumon atlantique (Salmo salar, âge 1+) ont subi un traitement de diverses solutions d'aluminium, de fluorures et de H^+ (tableau 3.1). Les poissons utilisés pour les fins de cette expérience provenaient de la station piscicole de l'Anse Pleureuse (ministère du Loisir, Chasse et Pêche du Québec (MLCP)). Des tacons (5.9 ± 2.2 g; $\bar{x}$± ET) ont été employés pour les expériences A, D_{ii} et F tandis que des saumoneaux (30.3 ± 9.0 g; $\bar{x}$ ± ET) ont été utilisés dans les expériences B, C, D_i et E. On a employé de l'eau synthétique (tableau 3.2) très douce (USEPA; Van Coillie *et al.*, 1983) préparée à partir de l'eau déminéralisée (Culligan, R>1 MΩ). L'acclimatation des poissons à l'eau synthétique durait deux jours. Pendant cette période, l'eau était graduellement acidifiée à pH 5.0. Finalement, les poissons étaient transférés dans les bassins expérimentaux. On s'est servi de onze à douze bassins de polypropylène (capacité de 64 L, 8-10 poissons par bassin) et dans chacun, un sac en polyethylène y était parfaitement ajusté. Les expériences furent realisées dans une chambre froide où la température (9-11 °C), l'aération (0.6 L min^{-1}) et la photopériode (16 h de lumière par jour) étaient contrôlées. La température de l'eau (10 ± 1 °C) était sensiblement constante pendant l'exposition. L'oxygène dissous (10 ± 2 mg L^{-1})

ainsi que les concentrations des ion majeurs ont été maintenus constants ([Ca] = 45 ± 2 µM; [Mg] = 59 ± 2 µM; $\bar{x}$± ET). Plus de 90% des lectures de pH se trouvaient à ± 0.1 unités du pH nominal (ET = 0.06).

Tableau 3.2. Concentrations des composants de l'eau synthétique (adapté de Van Coillie *et al.*, 1983)[a]

Composant	Concentration ($mg \cdot L^{-1}$)	Concentration (µM)
$NaHCO_3$	12.0	143
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	7.5	44
$MgSO_4$	7.5	62
KCl	0.5	7

[a][Na] mesurée = 128±15 µM, [Ca] mesurée = 45±2 µM, [Mg] mesurée = 59±2 µM, [K] mesurée = 9±1 µM.

Pour des expériences toxicologiques traitant de l'aluminium, il faut prendre en considération les propriétés physicochimiques uniques de cet élément, c'est à dire, sa faible solubilité aux pH circumneutres, des réactions de précipitation et de dissolution qui sont lentes, une tendance à s'adsorber sur des surfaces, et sa capacité à former des espèces polynucleaires ou colloïdales- *v.* Burrows (1977). Les conditions d'exposition ont été choisies afin d'éviter la formation d'espèces polynucléaires ou particulaires en vue de maintenir l'aluminium sous forme d'aluminium inorganique monomère. En effet, plus de 90% de l'Al ajouté aux bassins se retrouvait sous cette forme. Nous renouvelions l'eau deux à trois fois par jour pour minimiser l'influence de l'adsorption de l'aluminium sur le sac, et pour minimiser l'accumulation de produits d'excrétion. De plus, les poissons n'étaient pas nourris pendant la durée de l'expérience. Cette façon de procéder a permis d'éviter l'accumulation de matière organique (mucus, matières fécales), dont la présence favorise la complexation organique de l'Al et donc son élimination. Rappellons que ce sont les effets de l'Al inorganique qui nous intéressent.

3.2.2 Physico-chimie des solutions

Les solutions d'exposition étaient vieillies 24 heures avant l'introduction des poissons afin d'assurer l'équilibre du milieu. Le pH était maintenu constant en ajoutant de l'acide nitrique (Aristar) ou de l'hydroxyde de sodium. L'$Al(NO_3)_3$ et le NaF étaient les sources d'aluminium et de fluorures. Puisque des variations en [Na] peuvent en principe affecter les concentrations de Na plasmatique, on a essayé de minimiser cet artefact potentiel en diminuant les concentrations de $NaHCO_3$ pour assurer des [Na] équivalentes (± 9 µM) dans tous les bassins expérimentaux.

Les concentrations en aluminium total dissous étaient déterminées par spectrophotométrie d'absorption atomique au four de graphite. On distinguait entre l'aluminium monomère total, l'aluminium monomère organique et l'aluminium monomère inorganique en utilisant une méthode colorimétrique automatisée impliquant la réaction de l'aluminium labile avec le pyrocatéchol violet (Rogeberg et Henriksen, 1985; Røyset, 1986). Dans chaque bassin expérimental, on prélevait un échantillon d'eau au début de l'expérience; de plus, chaque fois que l'eau était renouvelée dans un bassin, on prélevait d'autres échantillons avant et après le changement d'eau (c'est-à-dire un échantillon du milieu vieilli ainsi qu'un du milieu frais). Les étapes analytiques (Annexe 2) comprenaient d'abord une filtration (0.4 µm, Nuclepore). Une portion du filtrat était ensuite acidifiée (0.1 mL HCl ou HNO_3 par mL de filtrat) et l'aluminium filtrable était dosé par absorption atomique au four de graphite. La seconde portion du filtrat servait à la détermination colorimétrique des concentrations en aluminium monomère. L'équilibre chimique des diverses formes d'aluminium inorganique était ensuite calculé à partir du modèle d'équilibre MINEQL (Westall *et al.*, 1976) en utilisant les résultats obtenus pour l'aluminium inorganique, les fluorures totaux et le pH avec les constantes d'équilibre qui sont retrouvées dans Neville et Campbell (1988).

L'emploi d'une électrode sélective aux fluorures permettait l'évaluation de [F^-]. On se servait du tampon commercial TISAB II (Orion 940909), avec et sans l'agent complexant CDTA (l'acide cyclohexylène-1,2-diamine-tétracétique), pour effectuer ces mesures. En comparant chaque paire de valeurs obtenues (sans et avec CDTA), on vérifiait la validité de nos mesures pour une concentration en aluminium connue en employant des calculs d'équilibres chimiques (MINEQL). La méthode détailée est celle donnée par le manufacturier (Orion Research Inc., 1983). Des valeurs répresentatives se retrouvent dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3. Concentrations de fluorures mesurées et calculées pour l'expérience F

Bassin expérimental	[F^-] mesurée (µM)	[F^-] calculée (µM)
1	14.4	14.2
2	12.0	12.8
3	11.6	11.6
4	10.8	10.1
5	9.0	9.0
6	7.5	7.5
7	6.7	6.8
8	6.0	6.0
9	5.0	5.0
10	3.9	4.5

De plus, un échantillon de chaque séquence expérimentale était prélevé et analysé pour son contenu en ions majeurs (Ca, Na, Mg, K) et en certains métaux traces, dont l'aluminium, par spectrophotométrie d'émission atomique à plasma (ICP).

3.2.3 Réponse biologique du saumon

Le poisson était considéré mort sur cessation du mouvement des opercules. Les survivants étaient anesthésiés avec du MS 222 (acide éthyle 3-aminobenzoate méthanesulfonique). Les branchies étaient ensuite prélevées et les concentrations en Al y étaient déterminées. Les concentrations en Al étaient déterminées selon un protocole analogue à celui développé par Bates *et al.*, (1982) de façon à pouvoir distinguer entre l'Al adsorbé (Al extractible à l'EDTA) et l'Al internalisé ([Al] total - [Al] extractible à l'EDTA). Ainsi, un premier sous-échantillon de branchies était immergé dans une solution d'EDTA 10^{-3} M (acide éthylène-1,2-diamine-tétracétique) pendant 15 minutes pour tenter d'y enlever l'aluminium relativement faiblement lié, alors qu'un second sous-échantillon de branchies ne subissait aucun traitement. Les deux sous-échantillons étaient ensuite entreposés au congélateur jusqu'au moment d'être séchés et pesés. Finalement, ils étaient soumis à une digestion à l'acide nitrique au four à micro-ondes (Annexe 3) et l'aluminium était dosé par spectrophotométrie d'émission atomique au plasma (ICP).

Egalement après anesthésie à l'aide de MS 222, environ 0.5 mL de sang (≈20 mg) étaient prélevés de l'artère caudale de chaque poisson et centrifugé; la centrifugation était effectuée peu après le prélèvement (7000 X g pendant 8 min.). Le plasma séparé de cette façon était pesé et ensuite congelé jusqu'à sa dilution (HCl ultrapur, H_20 déminéralisée). Le contenu en Na était déterminé par spectrophotométrie d'absorption atomique à la flamme.

3.3 RESULTATS

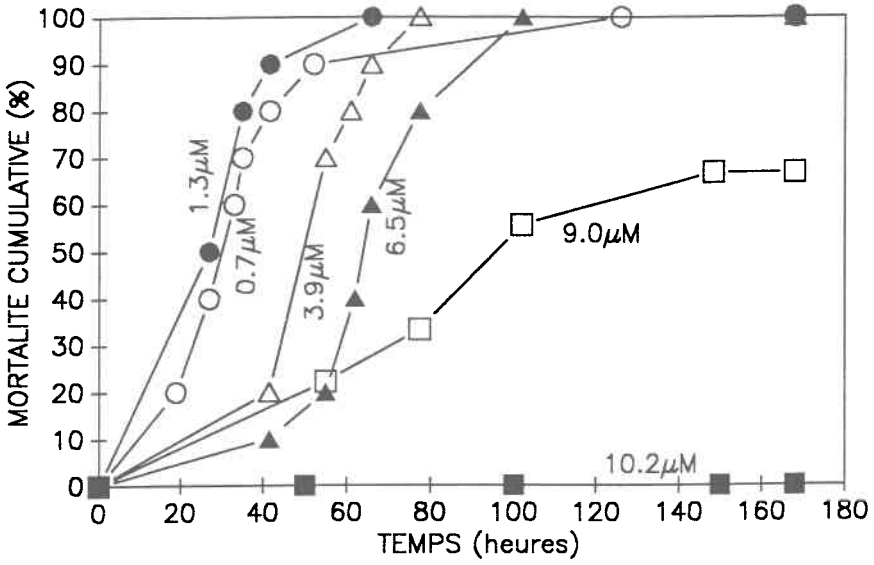


Figure 3.1. Mortalité cumulative (%) des tacons du *Salmo salar*: Expérience A, pH 4.5, [Al] monomère inorganique = 8.7 ± 1.0 µM et fluorures (0.7- 10.2 µM) tels qu'indiqués.

3.3.1 Physico-chimie des solutions expérimentales

Les concentrations les plus élevées en aluminium monomère inorganique utilisées (≈12 µM) sont un peu plus élevées que celles observées au printemps dans quelques rivières à saumon de la Côte-Nord ([Al] inorganique (étendue): 5→8 µM; Campbell *et al.*, 1989). Cependant, on remarque que des concentrations en Al inorganique inférieures à 4 µM se sont avérées toxiques chez les tacons étudiés ici (voir ci-dessous). La pertinence d'étudier des concentrations plus élevées que 4 µM découle de la relation évidente entre l'acidification des eaux de surface et la mobilisation/mise en circulation de l'aluminium. Pour plusieurs cours d'eau de la Côte-Nord, Campbell *et al.* (1989) ont mis en évidence une relation entre le pAl^{3+} et le pH, comme anticipée pour la dissolution acide de la gibbsite microcristalline. On peut donc formuler l'hypothèse que si les concentrations de l'ion hydrogène augmentent dans les années à venir, il pourra en résulter une augmentation importante des concentrations en aluminium dissous, ce qui pourrait engendrer de très graves problèmes chez le saumon atlantique, comme il a déjà été observé ailleurs (Jensen et

Snekvik, 1972; Dickson, 1983; Watt *et al.*, 1983; Skogheim *et al.*, 1984). Les concentrations étudiées en aluminium se situent donc dans une gamme de concentrations réaliste.

3.3.2 Tests de toxicité

La figure 3.1 (Expérience A) met en évidence l'atténuation de la toxicité observée lors d'une augmentation de la concentration en fluorures pour une concentration constante d'aluminium (8.7 ± 1.0 µM). En effet, on remarque une diminution de la mortalité des tacons avec une augmentation de la concentration de fluorures (augmentation également de la concentration des fluoro-complexes). Une telle réponse, *i.e.* diminution de toxicité en fonction de $[Al^{3+}]$, correspond à celle prédite par le MIL. En effet, les calculs de spéciation indiquent que la concentration de l'ion libre Al^{3+} diminue de 6.1 µM (68% des espèces inorganiques) à 0.4 µM (5%) en augmentant la concentration de fluorures de 0.7 à 10.2 µM.

On présente aux figures 3.2A et 3.2B l'effet de l'augmentation de la concentration en fluoro-complexes d'aluminium en présence d'une concentration constante de l'ion libre et ses hydroxo-complexes (expériences B et C). Afin de vérifier le modèle de l'ion libre, on augmentait à la fois les concentrations totales en aluminium et en fluorures de sorte que $[Al^{3+}]$ demeure constante d'une expérience à l'autre. Si les fluoro-complexes d'aluminium ne contribuaient pas à la réponse biologique, les courbes de toxicité seraient indépendantes des concentrations en fluorures. Ce n'est évidement pas le cas. Bien que $[Al^{3+}]$ et les concentrations des divers hydroxo-complexes dans les différents bassins expérimentaux soient semblables, on note une mortalité accrue avec l'augmentation de la concentration des fluoro-complexes d'aluminium. On peut aussi noter un effet apparent du pH; pour des concentrations semblables en Al^{3+}, et en $Al(F)_y^{3-y}$, la mortalité semble se produire plus tôt aux pH élevés. Les poissons témoins ($[Al]_{ajoutée}=[F]_{ajoutée}=0$; pH=6.3) n'ont montré aucune mortalité significative (Test de student, $P<0.05$).

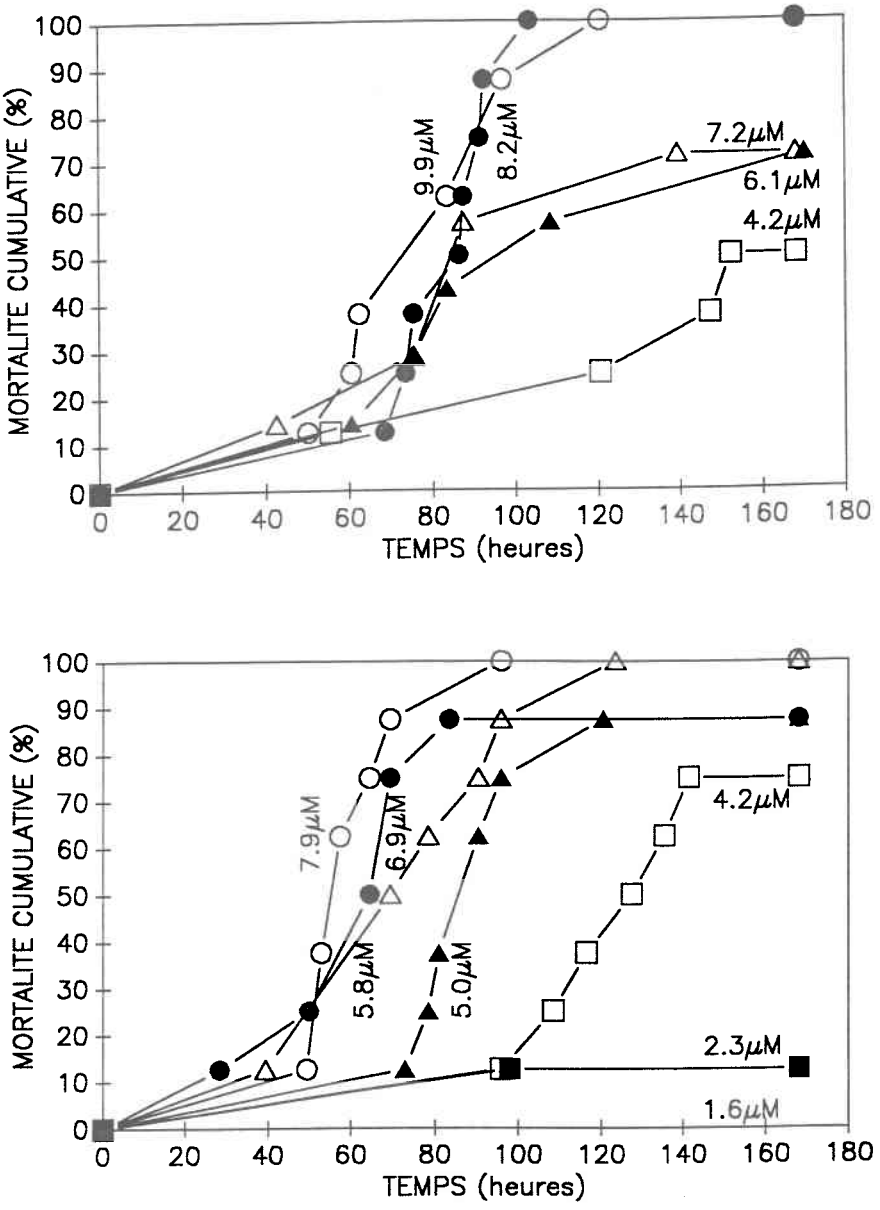


Figure 3.2. Mortalité cumulative (%) des tacons du *Salmo salar*: (A) Expérience B, pH 4.5, $\Sigma([Al^{3+}] + [Al(OH)_x^{3-x}]) = 1.3 \pm 0.1$ µM et $[AlF_y^{3-y}]$ (4.2- 9.9 µM) tel qu'indiqué. (B) Expérience C, pH 4.9, $\Sigma([Al^{3+}] + [Al(OH)_x^{3-x}]) = 1.4 \pm 0.1$ µM et $[AlF_y^{3-y}]$ (1.6- 7.9 µM) tel qu'indiqué sur la figure.

La figure 3.3 met en évidence l'évolution de la toxicité en fonction de $[Al^{3+}]$ pour différentes concentrations de fluorures (Expériences Di, Dii, E et F). Pour une concentration donnée de Al^{3+}, on remarque une augmentation de la mortalité des tacons avec une augmentation de la concentration en fluorures. Ce graphique confirme l'incapacité du modèle de l'ion libre à prédire la réponse toxique de l'aluminium en présence de fluorures.

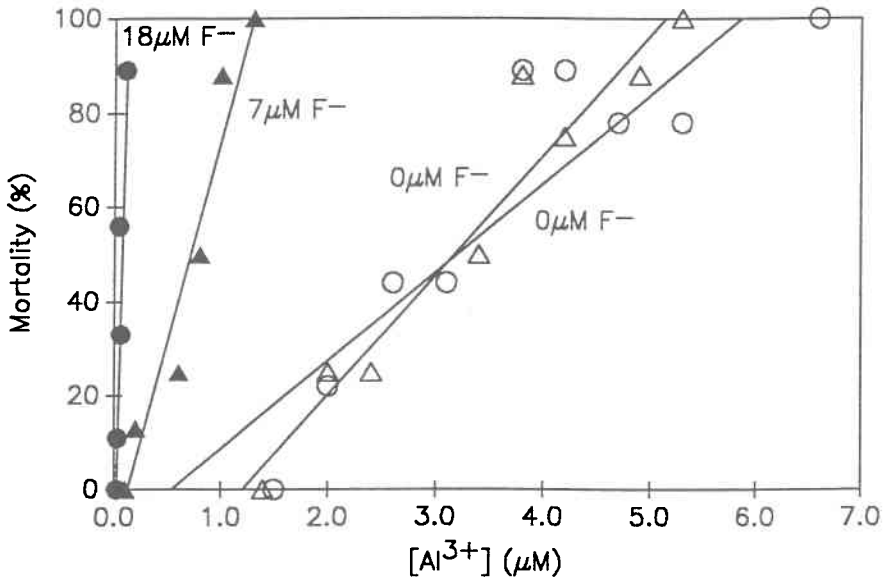


Figure 3.3. Courbes de toxicité: Pourcentage de mortalité après 7 jours en fonction de la concentration de l'ion libre (Al^{3+}) pour différentes concentrations de fluorures ajoutés: 0 (Di: Δ), 0 (Dii: O), 6.6 ± 0.2 µM (E: Δ) et 18.2 ± 0.2 µM (F: ●). Voir le texte et le tableau 3.1 pour les détails.

L'ensemble des résultats démontre l'effet atténuant des fluorures vis-à-vis de la toxicité de l'aluminium. Cependant, bien que cette toxicité soit réduite, une toxicité résiduelle persiste même en présence d'un excès de ligand complexant. De toute évidence, la concentration de Al^{3+} seule ne s'avère pas un bon indicateur de l'effet biologique de l'aluminium, même en solutions inorganiques relativement peu complexes.

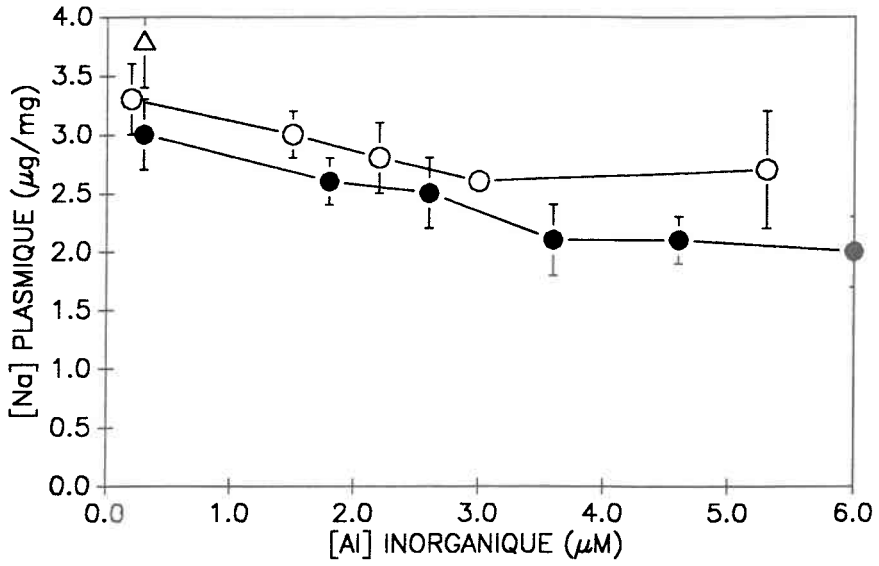


Figure 3.4. Variation de la concentration du sodium plasmatique dans les poissons en fonction de la concentration d'aluminium dissous pour l'expérience B (pH 4.5: ●), C (pH 4.9: O) et dans les poissons témoins (pH 6.3: Δ). Les moyennes et écarts-types sont présentés; $3<n<8$. $\Sigma([Al^{3+}] + [Al(OH)_x^{3-x}])$ est constant; une augmentation de l'Al inorganique sur l'axe des abcisses correspond à une augmentation en $[AlF_y^{3-y}]$.

3.3.3 Concentrations en Na plasmatique

Les variations des concentrations en sodium dans le plasma de tacons ayant survécu sept jours d'exposition à des concentrations constantes de Al^{3+} sont présentées dans la figure 3.4. Bien que les unités (µg Na / mg plasma) ne soient pas standards, elles ont été choisies à cause des très petits volumes de sang prélevés; il s'avère plus facile de déterminer leur poids que de mesurer le volume avec précision. Les concentrations en Na plasmatique mesurées après 7 jours ont diminué significativement jusqu'à 33% de leurs valeurs initiales en fonction de la concentration en aluminium inorganique dissous à pH 4.5 et à pH 4.9 (ANOVA, test de Tukey, $P<0.05$). Il est à noter que des artefacts expérimentaux possibles dus à l'addition incrémentale de NaF (petites augmentations de [Na] dans le milieu d'exposition avec une augmentation de AlF_y^{3-y}) auraient donné une tendance contraire à celle observée dans la figure 3.4.

A un pH donné, la concentration de Na plasmatique était différente (ANOVA, Test de Tukey, $P<0.05$) du témoin du même pH (cercles à l'extrême gauche de la figure 3.4 - pas d'Al). L'effet d'une diminution de pH est aussi mis en évidence: pour chaque concentration en Al inorganique, la concentration de Na plasmatique à pH 4.5 est moins élevée qu'à pH 4.9. Pour les témoins (pas d'Al ajouté), la concentration en Na a diminué avec les variations de pH de 6.3 (Δ) à 4.9 (O) à 4.5 (●) (ANOVA, test de Tukey, $P<0.05$).

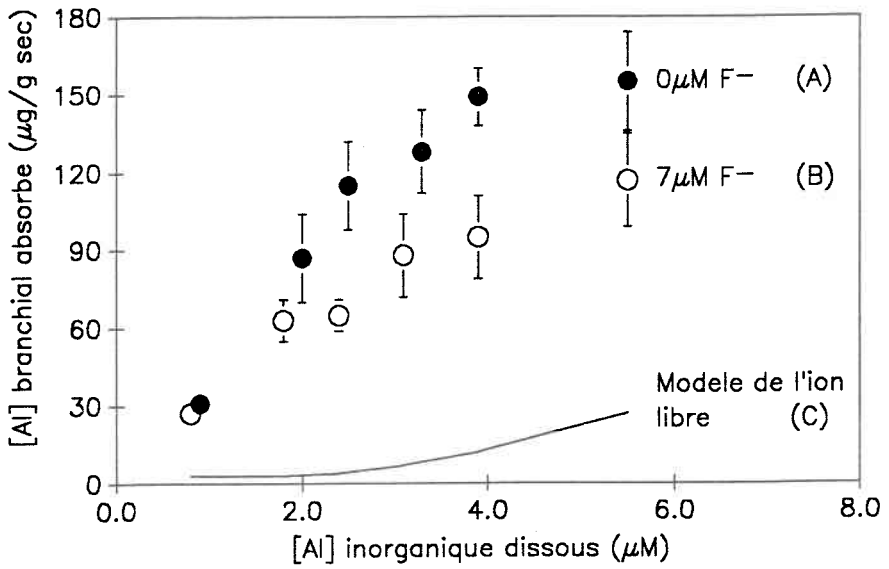


Figure 3.5. Concentration en aluminium branchial non-extractible à l'EDTA en fonction de l'aluminium inorganique en solution après 7 j (traitement sous-létal). La courbe (A) représente l'expérience sans fluorures ajoutés aux bassins (Expérience Di: ●). La courbe (B) représente l'expérience avec 6.6 ± 0.2 µM de fluorures ajoutés (Expérience E: O). Les moyennes et écarts-types sont présentés; $3<n<9$. La courbe (C) représente la bioaccumulation calculée d'après le MIL sans formation de complexes mixtes. Cette courbe est calibrée par rapport à la courbe (A) obtenue en absence de fluorures.

3.3.4 Bioaccumulation de l'aluminium

Tel que prévu, les concentrations en aluminium branchial non-extractible à l'EDTA ont varié en fonction de la concentration de Al inorganique dissous (figure 3.5). En présence de fluorures (6.6 ± 0.2 µM), l'Al accumulé par les branchies était réduit par rapport aux bassins sans fluorures.

3.4 DISCUSSION

La prédominance de l'aluminium monomère fut favorisée en travaillant à des concentrations n'excédant pas la limite de solubilité de la gibbsite microcrystalline. Selon les concentrations dosées, on a réussi à éviter la formation d'espèces polynucléaires et la précipitation subséquente de $Al(OH)_3(s)$. De plus, l'absence d'Al organique dans les milieux simplifie l'analyse des résultats. Enfin, la période de 24 heures pour le vieillissement des solutions semble avoir été suffisante pour que celles-ci atteignent un état d'équilibre avant l'introduction des poissons.

Nos résultats démontrent de façon univoque que la complexation de l'Al par les fluorures atténue sa toxicité chez le saumon atlantique. Cependant, la toxicité résiduelle de l'aluminium en présence de fluorures est plus importante que celle prédite par les concentrations en Al^{3+} (et des hydroxo complexes d'Al). La discussion suivante traite de cette toxicité résiduelle: on considère d'abord la réponse physiologique du poisson, de même que la bioaccumulation de l'Al en présence de fluorures. Ensuite, on examinera la relation entre la toxicité et la chimie de la solution dans laquelle baignent les poissons.

3.4.1 Sodium plasmatique

Dans des conditions acides et à des concentrations élevées en aluminium, on s'attend à une diminution de la concentration en sodium dans le plasma du sang des poissons (Muniz et Leivestad, 1980; Leivestad, 1982; Neville, 1985; Rosseland *et al.*, 1986; Booth *et al.*, 1988). Par contre, pour l'Al ($[Al]_{inorg}$ = 2.8 µM) à pH circumneutre (6.3), Neville (1985) a démontré que même en absence d'une réponse osmorégulatrice, les truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ont montré une mortalité plus élevée que les poissons témoins à pH 6.3. La réponse toxique aiguë a été attribuée à une détérioration de l'échange d'oxygène au travers des branchies. Dans nos expériences, la concentration en Na dans le plasma a été suivie afin de déterminer si le mécanisme toxique de l'aluminium en présence de fluorures et de l'ion H^+ impliquait une perturbation de la capacité osmorégulatrice du poisson.

D'après la figure 3.4, l'aluminium seul, tout comme l'aluminium et les fluorures, provoque une diminution du Na plasmatique, même à des concentrations sous-létales (expériences B et C). Puisque les concentrations en Al^{3+} et en hydroxo-complexes correspondants sont maintenues constantes, la diminution observée peut être attibuée à une augmentation de AlF_y^{3-y}. Cette diminution ressemble à la réponse osmorégulatrice observée en milieux acides pour l'Al inorganique en absence de fluorures (Fivelstad et Leivestad, 1984; Neville, 1985; Wood et McDonald, 1987). Apparemment, le mécanisme toxique est semblable dans les deux cas: une perturbation osmorégulatrice causée par la perte d'ions plasmatiques mène à la mort des poissons par hémoconcentration. L'ion hydrogène a, lui aussi, un effet important sur l'osmorégulation du *Salmo salar*; ceci est mis en évidence par les différences entre les expériences B et C. En examinant les résultats obtenus pour le Na plasmatique, on ne voit pas d'évidence d'une protection réciproque des ions H^+ et Al^{3+}; les concentrations en sodium dans le plasma des témoins (H^+ seul) sont toujours plus fortes que celles dans les poissons des bassins expérimentaux (Al^{3+}, F^- ajoutés). Finalement, signalons que les poissons exposés aux concentrations sous-létales en

aluminium ou en aluminium + fluorures ont été affectés par des concentrations aussi faibles que 1 ou 2 µM d'aluminium inorganique.

3.4.2 Bioaccumulation de l'aluminium

Tel que démontré dans la figure 3.5, parmi les survivants (t=7 j), la bioaccumulation branchiale a augmenté pour atteindre un plateau en présence ou en absence de fluorures (6.6 ± 0.2 µM). Tel que prédit, la courbe (B) obtenue en présence de fluorures se retrouve en dessous de la courbe (A) obtenue sans fluorures. Cependant, la réduction en bioaccumulation branchiale s'est avérée moins importante que celle prédite en fonction du modèle de l'ion libre (courbe C). Par exemple, à pH 4.5, pour une concentration d'aluminium inorganique de 2 µM, l'ajout de 7 µM de F a fait diminuer la $[Al^{3+}]$ de 97% (1.4→0.04 µM); toutefois, l'aluminium branchial (corrigé en soustrayant l'Al branchial des témoins) n'a été réduit que de ≈30% (*v.* figure 3.5). Le rapprochement entre les résultats de bioaccumulation et ceux de toxicité est notable: la complexation de l'aluminium inorganique par les fluorures réduit sa toxicité et son accumulation dans les branchies. Toutefois, cette atténuation s'avère moins importante que celle prédite; la toxicité résiduelle de l'aluminium en présence de fluorures dépasse de beaucoup celle qui aurait été prédite en fonction des concentrations de l'ion libre, $[Al^{3+}]$, et de ses hydroxo-complexes, $[Al(OH)_x^{3-x}]$.

3.4.3 Rapport entre la toxicité et la physico-chimie des solutions

Une asphyxie et une détérioration de l'ionorégulation ont toutes les deux été proposées pour expliquer la mortalité des poissons en présence de l'aluminium (Haines, 1981). Dans les deux cas, l'aluminium doit évidemment interagir avec une barrière biologique (membrane branchiale) pour provoquer une réponse toxique chez l'organisme cible. Cette interaction peut être représentée par la formation d'un complexe {M-L-cellule} à la surface de la membrane comme il a déjà été

proposé pour d'autres métaux tels le Cd, le Cu et le Zn (équation 3.1, ici L-cellule = ligand cellulaire; M=métal).

$$M^{z+} + \text{L-cellule} \quad \leftrightarrow \quad \text{M-L-cellule} \qquad (3.1)$$

Selon ce modèle de l'ion libre (MIL), élaboré par Morel (1983) et Pagenkopf (1983), la réponse biologique serait proportionnelle à la concentration du complexe à la surface de la membrane [M^{z+}-L-cellule] (équation 3.1).

$$\text{réponse biologique} \; \alpha \; [M^{z+}\text{-L-cellule}] \quad = \quad K \bullet [\text{L-cellule}] \bullet [M^{z+}] \qquad (3.2)$$

Cette approche s'est révélée utile pour expliquer la toxicité des métaux vis-à-vis de plusieurs espèces d'organismes aquatiques (Nelson *et al.*, 1981; Petersen 1982; Morel et Morel-Laurens 1983; Sunda et Huntsman 1983) y compris des poissons (Pagenkopf 1983). Si cette approche s'appliquait intégralement à l'aluminium, la concentration en Al^{3+} serait le meilleur prédicteur de la toxicité de l'aluminium.

Selon les résultats de la présente étude, l'aluminium ne se conforme donc pas au modèle général de toxicité des métaux traces (le "modèle d'ion libre"). En effet, on ne peut utiliser les concentrations en Al^{3+} seules pour prédire l'effet biologique de l'aluminium vis-à-vis du *Salmo salar* (*v.* figure 3.3). Vu cet échec évident du MIL, on a étudié la possibilité de déterminer des relations empiriques capables de prédire la toxicité de l'aluminium en fonction de la spéciation d'Al en solution. En nous inspirant de l'approche de Fivelstad et Leivestad (1984), nous avons réalisé une analyse de régression multiple avec le pourcentage de mortalité comme variable dépendante et les diverses espèces inorganiques d'aluminium comme prédicteurs. Les deux groupes de poissons

(tacons, saumoneaux) ont été traités séparément. Dans les deux cas, la meilleure relation prédictive obtenue est celle exprimant le pourcentage de mortalité en fonction de Al^{3+} et $Al(F)^{2+}$ (tableau 3.4, figure 3.6).

Tableau 3.4. Pourcentage de mortalité de *Salmo salar* tel qu'expliqué par les différentes espèces d'aluminium inorganiques à pH 4.5 (coefficients de détermination, r^2). Les prédicteurs sont dérivés d'une analyse de régression multiple (moindres carrés) de la toxicité de l'aluminium en fonction des espèces inorganiques d'aluminium. Les éléments sont inclus lorsque $p<0.01$. Les variables colinéaires ont été éliminées (*i.e.*, $Al(OH)^{2+}$ et $Al(OH)_2^+$).

Prédicteur	saumoneaux[a]	tacons[b]
Al^{3+} (ou $Al(OH)^{2+}$ ou $Al(OH)_2^+$)	0.69	0.72
AlF^{2+}	0.61	0.35
AlF_2^+	0.04	0.15
Al^{3+} et AlF^{2+}	0.93	0.83

[a]Mortalité prédite = $16.3 \bullet [Al^{3+}] + 10.3 \bullet [AlF^{2+}]$, N=22, ET de l'estimation =17.6 (Expériences B, Di, E).
[b]Mortalité prédite = $15.5 \bullet [Al^{3+}] + 7.2 \bullet [AlF^{2+}]$, N=18, ET de l'estimation = 28.0 (Expériences A, Dii, F).

3.4.4 Modélisation

Pour améliorer la compréhension des interactions Al + F^- (+OH^-) à la surface des branchies et ainsi expliquer les résultats de toxicité, il convient de développer un modèle simple des réactions à la surface biologique (*cf.* Neville et Campbell, 1988). En plus des équilibres d'aluminium en solution, les réactions suivantes sont considérées dans le modèle (les charges sur les espèces sont négligées pour fins de simplicité):

Al^{3+} + L-branchie	$\leftrightarrow$	Al-L-branchie	(3.3)	$\log K_1 = 6.5$
Al^{3+} + OH^- + L-branchie	$\leftrightarrow$	HO-Al-L-branchie	(3.4)	$\log K_2 = 14.5$
H^+ + L-branchie	$\leftrightarrow$	H-L-branchie	(3.5)	$\log K_3 = 4.5$
$2H^+$ + L-branchie	$\leftrightarrow$	H_2-L-branchie	(3.6)	$\log K_4 = 9.1$
Ca^{2+} + L-branchie	$\leftrightarrow$	Ca-L-branchie	(3.7)	$\log K_5 = 3.7$
Al^{3+} + F^- + L-branchie	$\leftrightarrow$	F-Al-L-branchie	(3.8)	$\log K_6 = 13.5$

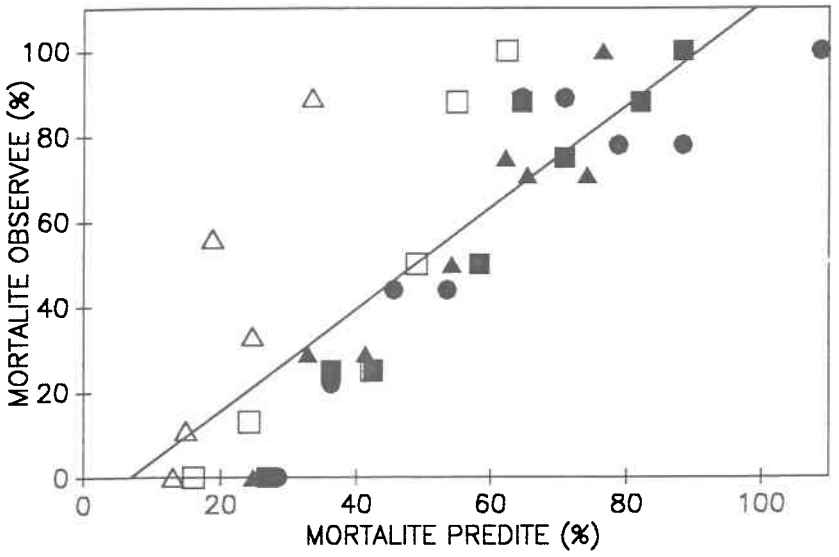


Figure 3.6. Variation de la mortalité observée de Salmo salar en fonction de la mortalité prédite pour les expériences A(□), B(■), D(●), E(Δ) et F(Δ). Mortalité observée = 1.5• mortalité prédite - 33; r^2=0.86. La mortalité prédite est calculée à partir de l'équation dans le tableau 3.4 pour les saumoneaux.

L'interaction de l'aluminium à la surface branchiale est réprésentée par les réactions 3.3-3.4, donnant, respectivement, un complexe d'aluminium-branchie et un complexe mixte d'aluminium-branchie et OH^- (Neville et Campbell, 1988). Les réactions 3.5-3.6 correspondent à une compétition des protons pour les sites branchiaux (Pagenkopf, 1983; Campbell et Stokes, 1985). Finalement, selon ce schéma, les ions de dureté (Ca^{2+}, Mg^{2+}) pourraient protéger la cible biologique de deux façons: par une compétition avec l'aluminium et l'ion hydrogène, et/ou en protégeant l'intégrité de la membrane. Plusieurs auteurs (McWilliams, 1982; McDonald *et al.*, 1983a; 1983b) indiquent que c'est surtout le deuxième mécanisme qui s'applique chez les salmonidés.

L'ensemble des réactions 3.3-3.6 correspond au MIL modifié de Neville et Campbell (1988). Les constantes d'équilibre sont les mêmes (réactions 3.4, 3.5 et 3.6) ou sont très peu modifiées

(réactions 3.3-3.4) pour expliquer les résultats obtenus en absence de fluorures (expérience D). Cependant, lors de l'application du modèle avec les résultats des expériences B ou C (avec fluorures), on constate que l'on ne peut pas prédire l'effet toxique de l'aluminium en ne considérant que les réactions 3.3-3.6. Même avec l'augmentation de $[Al]_T$ et de $[F]_T$, les valeurs calculées de {Al-L-branchie} et de {HO-Al-L-branchie} demeurent constantes en dépit de l'augmentation observée de mortalité (*v.* figure 3.2A). Cette augmentation en mortalité a été simulée en ajoutant au MIL la formation d'un complexe mixte {F-Al-L-branchie} (équation 3.8), proportionelle à la concentration de AlF^{2+} en solution (équation 3.11, où $K_{67} = K_6 \div K_7$). La corrélation apparente entre la mortalité et la concentration de $Al(F)^{2+}$ s'expliquerait donc par la formation d'un complexe mixte {F-Al-L-branchie}.

$Al^{3+} + F^-$	$\leftrightarrow$	$Al\text{-}F^{2+}$	(3.9)	$\log K_7 = 7.0$
$[AlF^{2+}]$	=	$K_7 [Al^{3+}] [F^-]$	(3.10)	
{F-Al-L-branchie}	=	$K_6 [Al^{3+}] [F^-]$ [L-branchie]	(3.11)	
	=	$K_{67} [AlF^{2+}]$ [L-branchie]	(3.12)	

Le modèle est donc compatible avec les résultats de l'analyse de régression multiple.

3.5 CONCLUSION

L'aluminium seul, tout comme la combinaison aluminium + fluorures, provoque une diminution du Na plasmatique, même dans des conditions sous-létales. L'action toxique de l'aluminium serait donc liée à une perturbation de l'osmorégulation: une perte d'ions plasmatiques qui mène à la mort des poissons. La complexation de l'aluminium inorganique par les fluorures réduit sa toxicité. Cependant, cette atténuation s'avère moins importante que celle prédite; en effet, la toxicité résiduelle de l'aluminium en présence de fluorures dépasse de beaucoup celle qui aurait été prévue en fonction des concentrations de l'ion libre, $[Al^{3+}]$, et de ses hydroxo-complexes, $[Al(OH)_x^{3-x}]$. Selon les résultats de ces expériences initiales, l'aluminium ne se conforme donc

pas au modèle général de la toxicité des métaux traces (modèle de l'ion libre). La meilleure relation prédictive est plutôt celle obtenue en exprimant le pourcentage de mortalité en fonction de la somme pondérée de Al^{3+} et $Al(F)^{2+}$.

3.6 PERSPECTIVES DE RECHERCHE

D'après ce modèle, des complexes mixtes {F-Al-L-branchie} se formeront à la surface branchiale et contribueront à la toxicité (explication i). Par ailleurs, l'échec partiel du MIL peut être expliqué en ayant recourt à deux autres possibilités: (ii) la vitesse d'une ou des deux réactions branchiales (3.3-3.4) est lente par rapport à la vitesse d'expression de la réponse toxique ou (iii) le pH dans le micro-environment à l'interface branchie-eau est significativement plus élevé que celui de la solution globale. On examinera la possibilité de la formation d'un complexe mixte (i) dans les chapitres 4 et 5 et la cinétique du processus d'adsorption (ii) dans le chapitre 6. Dans la discussion finale (chapitre 7), on synthétisera l'information des cinq premiers chapitres en tenant compte du pH dans le microenvironnement des branchies afin de proposer un mécanisme global pour la toxicité et la bioaccumulation de l'aluminium chez le saumon atlantique.

4. Complexation de l'aluminium par des composantes de membranes

(Aluminum binding to membrane components: Implications for bioavailability and toxicity, Wilkinson, K.J., P.M. Bertsch, P.G.C. Campbell et D.B. Hunter, à soumettre: *Chem. Spec. Bioavail.*)

Mots-clés: Al / F / phospholipides / calmoduline / acide sialique / sorption / résonance magnétique nucléaire / microélectrophorèse / dialyse /

4.1 INTRODUCTION

Des variations de la spéciation de l'aluminium en solution et à la surface biologique ont une influence importante sur la réponse toxicologique de l'organisme cible. En effet, la toxicité de l'Al est partiellement atténuée en présence d'une concentration équimolaire de fluorures (Driscoll *et al.*, 1980; Wilkinson *et al.*, 1990), de silicates (Birchall *et al.*, 1989) ou de sulfates (Kinraide et Parker, 1987) et presque complètement atténuée en présence d'une concentration équimolaire de citrate (Driscoll *et al.*, 1980) ou de matière organique naturelle (Lydersen *et al.*, 1990; Peterson *et al.*, 1990). Tous ces ligands* se retrouvent dans l'environnement naturel.

Pour que les métaux provoquent une réponse biologique, ils doivent d'abord se complexer avec des sites sensibles, situés à la surface de la membrane biologique (*e.g.* Sunda, 1991). La toxicité de l'aluminium a été attribuée à sa complexation avec la membrane et à la rigidification subséquente de la membrane (Deleers, 1985; Deleers *et al.*, 1987), ou à la complexation de l'Al par des protéines membranaires, y compris certains enzymes (Staurnes *et al.*, 1984).

Dans une expérience précédente (Wilkinson *et al.*, 1990; chapitre 3), nous avons invoqué la formation de complexes ternaires entre l'aluminium, les fluorures, et la surface biologique (branchie) pour expliquer nos résultats toxicologiques. Les objectifs de la présente expérience étaient (i) de déterminer comment la spéciation chimique de l'aluminium en solution peut affecter sa complexation par divers composants des membranes biologiques (équation 4.1), avec une attention spéciale pour la sorption des fluoro-complexes (équation 4.2) et (ii) de généraliser ces

---

* Les concentrations de citrate dans l'environnement naturel sont cependant beaucoup plus faibles que celles employées dans l'étude de Driscoll *et al.* (1980).

observations afin d'expliquer les mécanismes de complexation de l'aluminium vis-à-vis de membranes intactes.

Al^{3+} + ligand $\leftrightarrow$ Al-ligand (4.1)

Al^{3+} + F + ligand $\overset{?}{\leftrightarrow}$ Al-F-ligand (4.2)

où le ligand est un composant membranaire.

Bien que la complexation de l'Al par des composants membranaires soit bien documentée en absence de ligands en solution, très peu d'études ont examiné la réactivité des complexes de l'Al, y compris le AlF_y^{3-y}. Les composants examinés dans cette étude sont présents à la surface biologique, ou représentatifs des molécules qui s'y trouvent (*e.g.* Siegel et Haug, 1983; Bolis *et al.*, 1984; Staurnes *et al.*, 1984; Haug et Caldwell, 1985; Lewis *et al.*, 1990) et sont susceptibles de complexer l'aluminium, soit: deux phospholipides (phosphatidylcholine, phosphatidylsérine), une protéine (calmoduline), un mucopolysaccaride (l'acide sialique) et une molécule organique (le citrate) analogue à d'autres se retrouvant à l'interface biologique.

4.2 METHODOLOGIE

4.2.1 Préparation et analyse des solutions

Les solutions d'Al étaient préparées dans des contenants de polypropylène, lavés à l'acide nitrique (15%). La concentration totale d'aluminium dans les milieux d'exposition était déterminée par l'absorption atomique au four de graphite (GFAAS) sur des échantillons acidifiés (1% HNO_3 ultrapur). Les concentrations en fluorures totaux étaient déterminées par potentiométrie avec une électrode sélective aux fluorures (Orion, modèle no 940909) en présence du tampon TISAB II (Fisher). La spéciation de l'aluminium dans les milieux d'exposition était calculée en employant les

valeurs d'Al inorganique, de pH et de fluorures totaux et le modèle d'équilibres chimiques, MINEQL+ (Westall *et al.*, 1976; Schecher et McAvoy, 1991) avec des données thermodynamiques telles que résumées dans Schecher et Driscoll (1988a) et Couturier (1986). Trois plans expérimentaux ont été employés pour les expériences d'électrophorèse et de dialyse: (i) [Al] était augmentée en absence de fluorures; (ii) [Al] était maintenue à 10 μM pendant que la concentration en fluorures était augmentée (de 0 à 10 μM par incrément de 2 μM); et (iii) [Al] et [F] ont été covariées de façon à maintenir constante la concentration de l'ion libre, $[Al^{3+}]$, tout en augmentant la concentration totale d'espèces AlF_y^{3-y} (tableau 4.1). Le pH était maintenu constant à 4.5 afin de pouvoir comparer les résultats obtenus *in vitro* avec les expériences *in vivo* (Wilkinson et al., 1990, chapitre 3).

4.2.2 Produits chimiques

Les phospholipides (PC: L-α-phosphatidylcholine, dimyristoyl and PS: L-α-phosphatidylsérine), calmoduline (CaM: phosphodiestérase 3':5'- activateur de nucléotides cycliques) et l'acide sialique (l'acide N-acétyl-neuraminique) ont été achetés chez Sigma Co. Le mucus étaient prélevé en essuyant la peau de plusieurs achigans à grande bouche (*Micropterus salmoides*); un étalon de Al-F (10:20 mM) a été ajouté et mélangé au mucus (concentration finale en fluorures = 2 mM) et le tout entreposé à 4°C jusqu'à l'analyse (<2 j). Les produits chimiques étaient utilisés, tels que fournis, sans d'autres étapes de purification.

4.2.3 Préparation des vésicules de phospholipides

Les expériences sur les liposomes de phospholipides ont été conçues en fonction des travaux de Akeson *et al.* (1989). Les vésicules de phospholipides ont été préparées de la même façon qu'Akeson et collaborateurs, d'après la méthode de Mayer *et al.* (1986). En résumé, une suspension de 20 mg mL^{-1} de phosphatidylcholine était ajoutée à une solution de 0.1 M NaCl à pH

4.5. Le contenant était immergé dans un bain d'eau glacée, sonifié puis congélé-decongélé (5X) dans l'azote liquide et l'eau tiède. La suspension de liposomes était ensuite filtrée dix fois à travers deux filtres de polycarbonate (Nuclepore) de 0.1 μm. Mayer *et al.* (1986) ont démontré qu'un protocole semblable lui a donné des vésicules unilamellaires de 0.1 μm avec 50% de phospholipides à la surface extérieure. Cependant, puisque même de faibles concentrations en Al induisent une précipitation des suspensions pures de PS, les vésicules de PS contenaient 10% PS et 90% PC par poids. Afin de minimiser la possibilité d'oxydation du PS, les vésicules de PS ont été manipulées sous une atmosphère d'argon lorsque possible. Les liposomes étaient gardés à 4°C jusqu'à l'utilisation; les expériences étaient réalisées le plus rapidement possible après la préparation initiale (<6 h).

Plusieurs méthodes étaient employées afin d'examiner la formation de complexes d'Al avec les composants de la membrane biologique:

4.2.4 Mesure de la sorption d'Al et d'Al-F_x par la mobilité électrophorétique

La mobilité électrophorétique des vésicules a été déterminée par spectroscopie de corrélation de photons couplée à la vélocimétrie laser à effet Doppler. Un potentiel de 80 V était appliqué à travers une cellule cylindrique (diamètre de 4 mm) de quartz à 25°C. Trois mesures consécutives (20 sec) étaient obtenues; les distributions de vélocité ont été corrigées pour le mouvement Brownien par correction pour mouvement à un voltage appliqué de zéro. Les mesures ont été vérifiées avec des étalons carboxylés (Malvern Instruments).

Tableau 4.1. Plan expérimental pour les expériences de mobilité électrophorétique et de dialyse (pH 4.5; milieu d'eau synthétique tel que donné dans le tableau 3.2).

Série	[Al] (μM)	[F] (μM)	$[Al^{3+}]$ calculée† (μM)
A‡	20	0	18.4
	15	0	13.9
	10	0	9.1
	5	0	4.6
	0	0	0
B	10	0	9.1
	10	2	7.4
	10	4	5.8
	10	6	4.4
	10	8	3.2
	10	10	2.3
C	10	0	9.1
	12	2.05	9.1
	14	4.20	9.2
	16	6.35	9.2
	18	8.60	9.3
	20	10.85	9.3

†$[Al^{3+}]$ calculée avec des valeurs de [Al] mesurée, [F] totale and de pH.
‡La série A ne se rapporte qu'aux expériences de mobilité électrophorétique.

Les dimensions et la charge de surface des vésicules influent sur leur mobilité dans un gradient électrique; la charge de surface sera influencée par la sorption spécifique d'ions. Dans un milieu expérimental contrôlé, une relation simple peut être déduite entre les paramètres d'ionisation de la surface et le comportement électrocinétique des vésicules ou des particules (Hunter, 1980; Hunter, 1981). L'adsorption spécifique d'ions se déroulera à l'intérieur du plan de Stern, et nécessairement à l'intérieur de la surface de cisaillement (qui se trouve à l'extérieur du plan de Stern). La sorption de petits cations provoque donc des variations en mobilité électrophorétique, *i.e.*, une diminution dans la mobilité absolue de vésicules chargées négativement ou une augmentation de la mobilité absolue des vésicules chargées positivement. Dans nos expériences, les mobilités électrophorétiques mesurées sont toujours comparées à un témoin (absence de métal ou de ligand ou les deux), ce qui assure une mesure de sorption sans équivoque. Les moyennes et

les écarts-types ont été calculés, l'analyse de variance réalisée (α=0.05) et les différences significatives entre les points déterminées par le test de Scheffé (S test, α=0.05); l'homogénéité des variances étaient vérifiée par le test de Hartley (α=0.05).

4.2.5 Mesure de la complexation d'Al-F_x par la dialyse

La dialyse se prête bien à des mesures sur de faibles quantités de produit, ce qui était le cas pour la calmoduline. Des membranes de dialyse (limite d'exclusion de poids moléculaire de 1000 daltons, lavées à l'EDTA, Spectrapor Ltée.) étaient bien rincées à l'eau désionisée avant l'utilisation. Deux concentrations de calmoduline étaient employées, soit 40 mg L^{-1} ou 80 mg L^{-1}; pour chaque condition expérimentale, un sous-échantillon de 1 mL de chaque solution de calmoduline était enfermé dans un sac de dialyse et suspendu dans 100 mL de solution expérimentale dans un contenant de polypropylène. Les solutions étaient ensuite agitées pendant 24 h à la température de la pièce (22°C). Une portion de chaque solution de calmoduline (0.4 mL) était prélevée puis diluée dans 1 mL d'acide nitrique (3%) en attendant l'analyse par GFAAS. Par ailleurs, trois sous-échantillons de 1.5 mL de la solution externe était recueillis, acidifiés et analysés par GFAAS. Le plan expérimental est résumé dans le tableau 4.1.

4.2.6 Mesure de la complexation d'Al-F_x par la RMN

Pour des expériences où la complexation de l'aluminium était examinée en présence de fluorures, l'environnement de coordination du noyau ^{19}F a été étudié par la résonance magnétique nucléaire (RMN). Les spectres ont été enregistrés à 376.5 MHz sur un spectromètre Bruker AM-400 muni d'une sonde 5 mm aux fluorures. La durée d'exposition employée était de 9.8 µsec (44°). L'acide tetrafluoroacétique était employé comme étalon externe. Les spectres étaient traités avec un processus numérique à 3 Hz (élargissement de lignes). L'ajustement de pH était accompli avec une solution de 20% D_20 (pH ajusté à 3.8 ou 4.5) employée comme étalon interne. La résonance

magnétique nucléaire était employée pour les études sur les phospholipides, la calmoduline, le citrate, l'acide sialique et le mucus prélevé du corps du poisson. La technique étant peu sensible, les concentrations d'Al étaient augmentées d'un facteur 100 par rapport à celles employées dans les expériences de mobilité électrophorétique ou de dialyse (*i.e.* Al (1 mM) et F (2 mM)). De façon générale, les concentrations nominales de ligands ajoutés étaient de 1 mM (citrate, PC, PS), *i.e.* Al:F:L 1:2:1, sauf dans le cas de la calmoduline (0.2 mM), *i.e.* Al:F:L de 1:2:0.2.

Une solution de Al/F (10:20 mM) à pH 4.5 a été ajoutée au mucus prélevé du corps de l'achigan; le pH final n'a pas été vérifié mais il a peut-être légèrement varié. Comme l'acide sialique domine les groupements fonctionnels du mucus, nous avons, de plus, examiné sa réaction avec l'Al ou l'AlF_y^{3-y} avec des acides sialiques purs. Dans cet essai, la concentration de fluorures a varié significativement des concentrations nominales, à la fois pour l'étalon (Al:F $\approx$ 1:1.2) et pour l'échantillon en présence de l'acide sialique (Al:F:AS $\approx$ 1:1.2:1 mM). Malgré ces différences par rapport à la concentration nominale (Al:F 1:2 mM), on a pu comparer ces échantillons entre eux puisque la même "erreur" s'est manifestée pour l'étalon et pour l'échantillon.

4.3 RESULTATS ET DISCUSSION

4.3.1 Complexation de l'aluminium par le citrate

Les déplacements chimiques des pics dans un spectre RMN (^{19}F) sont déterminés par la densité d'électrons autour du noyau et sont comparés à l'environnement chimique de l'étalon externe (l'acide tetrafluoroacétique). L'étalon démontre quatre pics (figure 4.1A): un pic correspondant aux fluorures libres (-47 ppm, pas montré) et trois pics plus à droite du spectre ($\approx$-80 ppm). La complexation des fluorures par l'aluminium (équations 4.3-4.5) donne lieu à une augmentation de la densité des électrons autour de l'ion F, effectivement déplaçant le pic vers la droite. Par un

raisonnement semblable, les complexes AlF_2^+ et AlF_3 sont également déplacés par rapport aux fluorures libres, mais d'un degré moindre (densité d'électrons moindre par noyau équivalent de fluorure).

$$Al^{3+} + F^- \leftrightarrow AlF^{2+} \quad (4.3)$$
$$Al^{3+} + 2F^- \leftrightarrow AlF_2^+ \quad (4.4)$$
$$Al^{3+} + 3F^- \leftrightarrow AlF_3 \quad (4.5)$$

Lorsque le citrate est ajouté au système, les équilibres des équations 4.6-4.8 sont déplacés et les concentrations des complexes modifiés. La formation de complexes ternaires entre le citrate, l'aluminium et le fluorure (équations 4.7-4.8) engendre des pics additionnels dans le spectre de ^{19}F; chaque pic correspond à une espèce en solution. En effet, l'ajout de citrate occasionne la génération de deux pics additionnels, qui sont attribués à la formation des espèces F-Al-citrate ou F_2-Al-citrate; le déplacement des pics vers la droite témoigne la capacité du citrate à fournir des électrons au noyau de F par l'intermédiare de l'aluminium (figure 4.1B).

$$Al^{3+} + H_3\text{-citrate} \leftrightarrow \text{Al-citrate} + 3\ H^+ \quad (4.6)$$
$$Al^{3+} + F^- + H_3\text{-citrate} \leftrightarrow \text{F-Al-}H_{(3-n)}\text{citrate}^- + nH^+ \quad (4.7)$$
$$Al^{3+} + 2F^- + H_3\text{-citrate} \leftrightarrow F_2\text{-Al-}H_{(3-n)}\text{citrate}^{2-} + nH^+ \quad (4.8)$$

Equations générales:

$$AlF_y^{3-y} + \text{citrate} \leftrightarrow F_{(y-1)}\text{-Al-citrate} + F^- \quad (4.9)$$
$$AlF_y^{3-y} + \text{citrate} \leftrightarrow F_y\text{-Al-citrate} \quad (4.10)$$

Par ailleurs, en présence des fluorures, la complexation de l'aluminium par le citrate (équation 4.6, pK= 4.7; Sillén et Martel, 1971) peut déplacer les équilibres 4.3-4.5 vers la gauche, ce qui augmente la concentration de fluorures libres dans le système (équation 4.9).

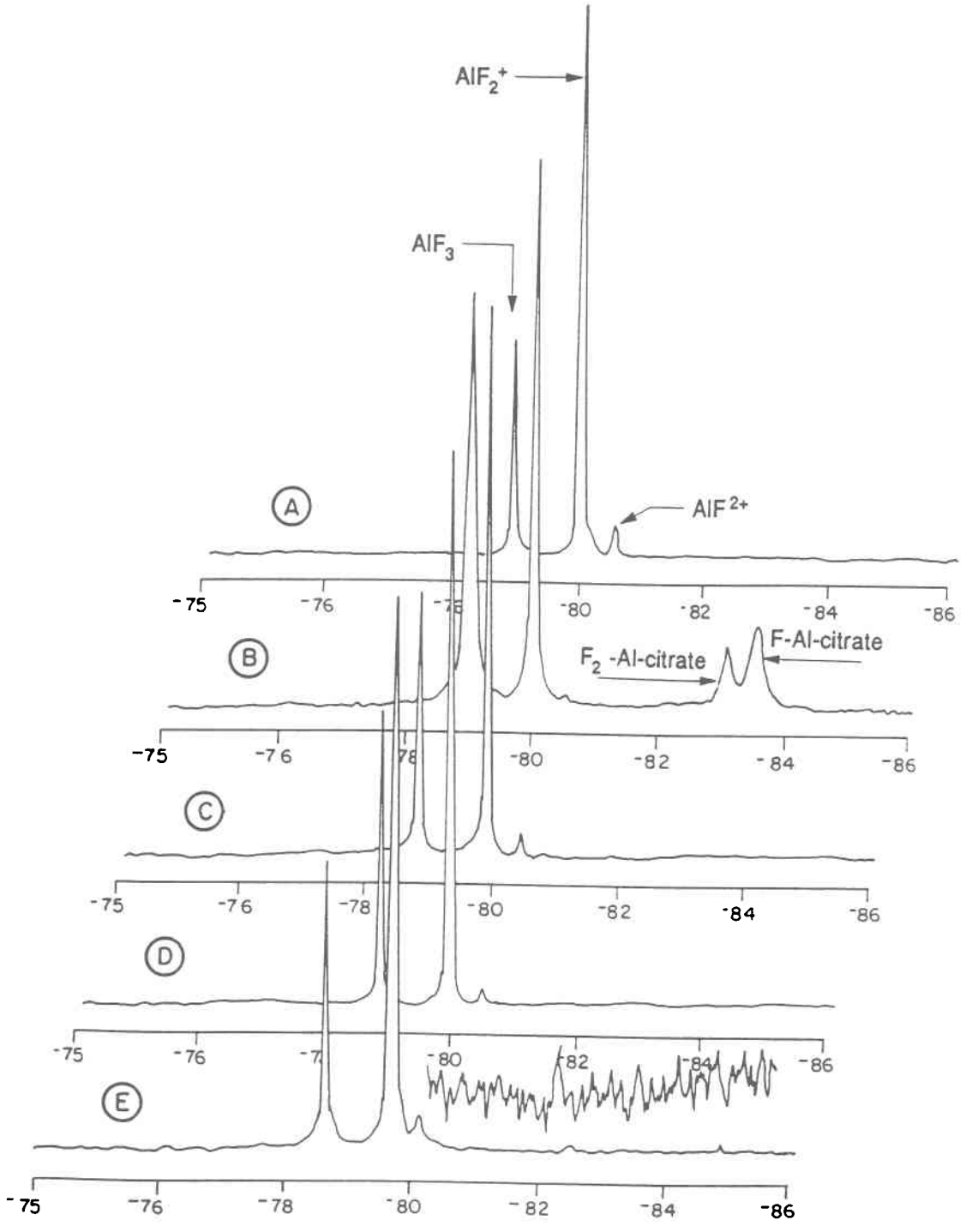


Figure 4.1. Spectres ^{19}F RMN de: (A) Etalon Al:F 1:2 mM à pH 3.8; ou l'étalon en présence de 1 mM de (B) citrate; (C) phosphatidylcholine; (D) phosphatidylserine; (E) calmoduline et agrandissement du spectre demontrant le pic à ≈-82.5 ppm.

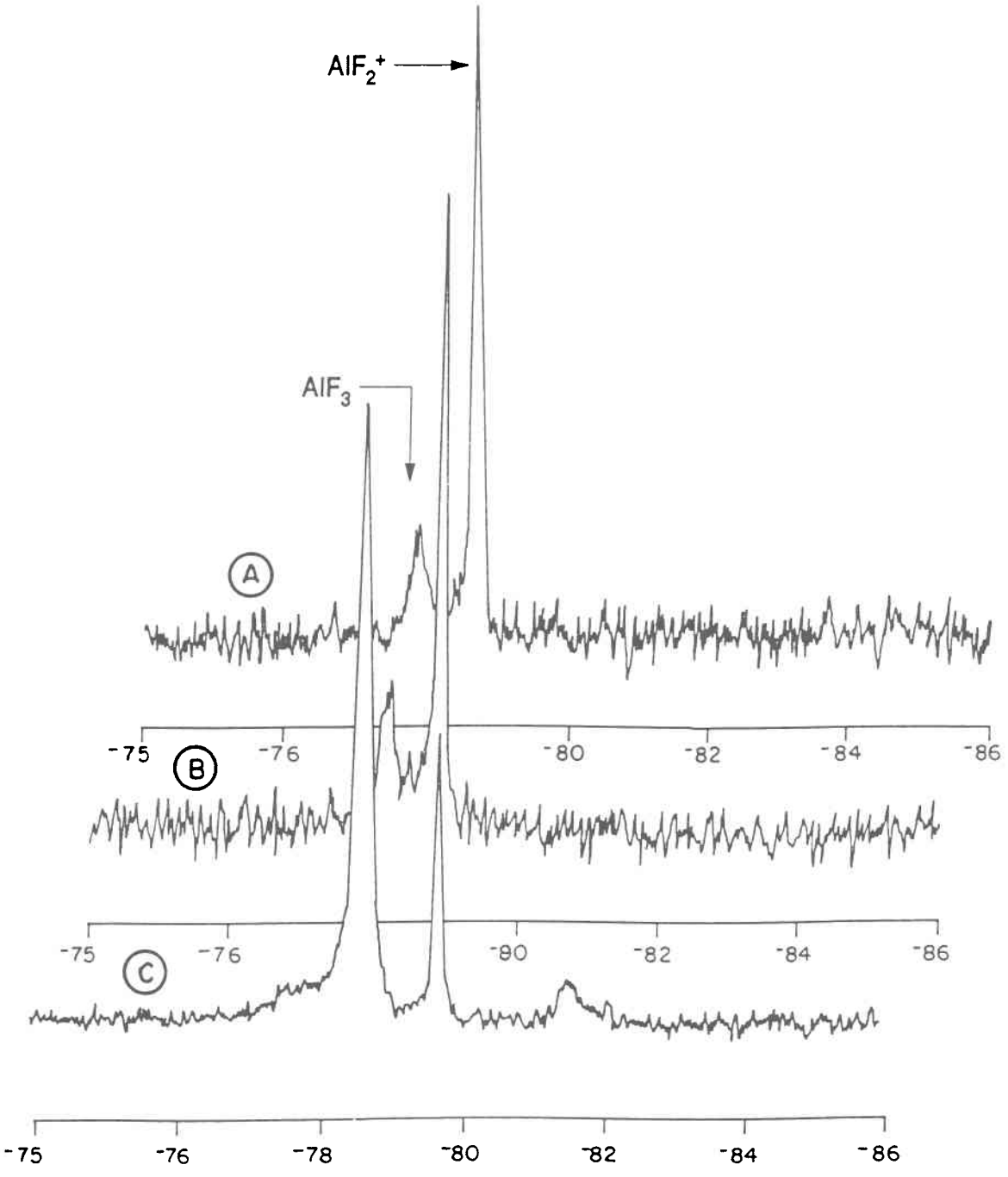


Figure 4.2. Spectres ^{19}F RMN de: (A) Etalon Al:F 1:2 mM à pH 4.5; (B) l'étalon en présence de 1 mM phosphatidylserine; ou (C) le mucus du corps de l'achigan avec un ajout de Al:F 10 mM à pH 4.5.

4.3.2 Complexation de l'aluminium par les phospholipides

Les résultats précedents nous démontrent qu'en présence de fluorures, l'aluminium peut former des complexes du type F_n-Al-L, où L est un acide carboxylique simple (le citrate). Le but du présent travail était de vérifier si ce genre de complexe se forme en présence de composants membranaires se retrouvant à la surface branchiale. Plusieurs chercheurs ont démontré la capacité de l'aluminium à se lier à la phosphatidylcholine ou la phosphatidylsérine (Deleers, 1985; Deleers *et al.*, 1987; Akeson *et al.*, 1989; Hunter, 1991; Turner, 1990). Cependant, d'après leurs expériences de dialyse, Akeson *et al.* (1989) ont conclu qu'*en présence de fluorures*, la sorption de l'aluminium par des vésicules de PC pourrait être expliquée en termes de la concentration de Al^{3+}, sans invoquer les fluoro-complexes d'aluminium. Nos résultats confirment les constatations de ces chercheurs: l'ajout de PC (figure 4.1C) n'a pas modifié le spectre ^{19}F- RMN par rapport au spectre de l'étalon de Al:F (figure 4.1A). De même, le spectre de la solution contenant de la phosphatidylsérine (1:2:1 Al:F:PS) n'a pas été modifié par rapport à l'étalon, ni à pH 3.8 (figure 4.1D), ni à pH 4.5 (figure 4.2B).

Aux concentrations d'aluminium et de fluorures plus près de celles qu'on retrouverait sur le terrain, les conclusions de la ^{19}F RMN ont été validées par les résultats de microélectrophorèse. La mobilité électrophorétique des vésicules de phospholipides est devenue plus positive en présence de l'Al; l'Al se lie aux vésicules de PC ou de PC-PS (figure 4.3). Pour des expériences à [Al] constante, on s'attendrait à ce que l'ajout de fluorures diminue la sorption de l'Al aux vésicules en diminuant la concentration de Al^{3+} (figure 4.4). Une telle réponse serait anticipée si la complexation de l'Al à la surface de la vésicule était fonction de la concentration de Al^{3+}*. En effet, pour les vésicules de PC ou de PC-PS, à une concentration constante de Al^{3+}, la mobilité

---

* Notons qu'à un pH constant, une diminution de la concentration en Al^{3+} est nécessairement accompagnée d'une diminution proportionelle des hydroxo-complexes, $[Al(OH)_n^{(3-n)+}]$.

électrophorétique n'était pas modifiée en présence d'une concentration croissante de AlF_y^{3-y} (figure 4.5). Il semble donc que ni le phosphatidylcholine, ni le phosphatidylsérine ne peut lier significativement les fluoro-complexes d'aluminium (équations 4.13-4.14).

$$Al + 2\ DMPC \leftrightarrow Al\text{-}(DMPC)_2 \quad (4.11)$$

$$Al + PS \leftrightarrow Al\text{-}PS \quad (4.12)$$

$$Al + F + PC \not\leftrightarrow F\text{-}Al\text{-}PC \quad (4.13)$$

$$Al + F + PS \not\leftrightarrow F\text{-}Al\text{-}PS \quad (4.14)$$

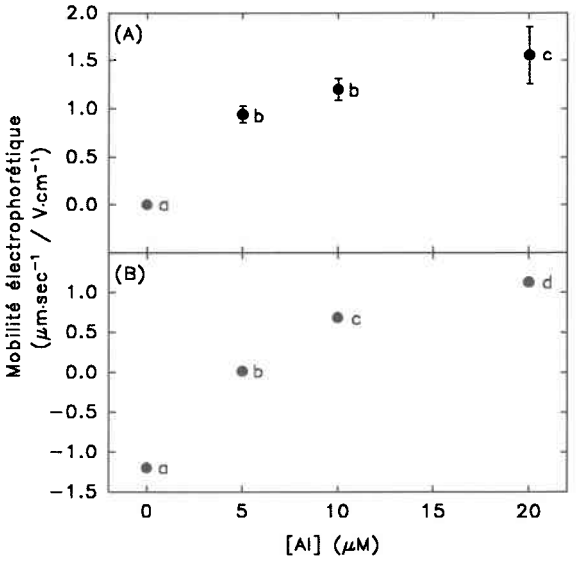


Figure 4.3. Mobilité électrophorétique des vesicules de (A) phosphatidylcholine ou (B) phosphatidylcholine-phosphatidylserine (90-10%) en fonction d'Al inorganique à pH 4.5. Des lettres différentes signifient des valeurs statistiquement différentes de mobilité (Test de Tukey, α =0.05). Les erreurs standards sont indiquées lorsqu'elles sont plus grandes que les points (n=3).

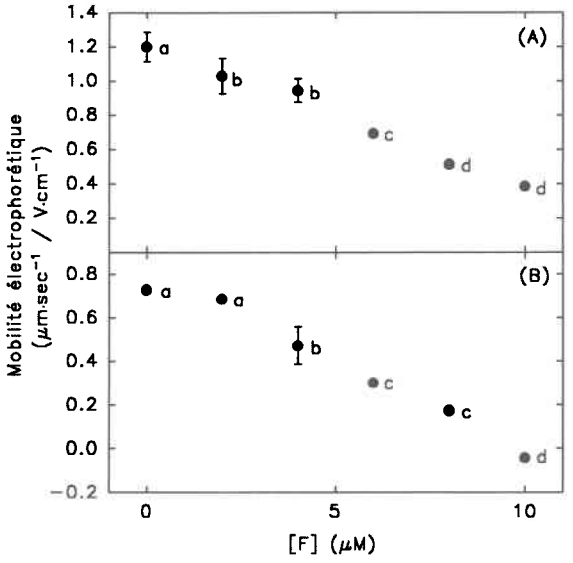


Figure 4.4. Mobilité électrophorétique des vesicules de (A) phosphatidylcholine ou (B) phosphatidylcholine-phosphatidylserine (90-10%) en fonction de [F] à [Al] = 10 μM et pH = 4.5. Des lettres différentes signifient des valeurs statistiquement différentes de mobilité (Test de Tukey, α=0.05). Les erreurs standards sont indiquées lorsqu'elles sont plus grandes que les points (n=3).

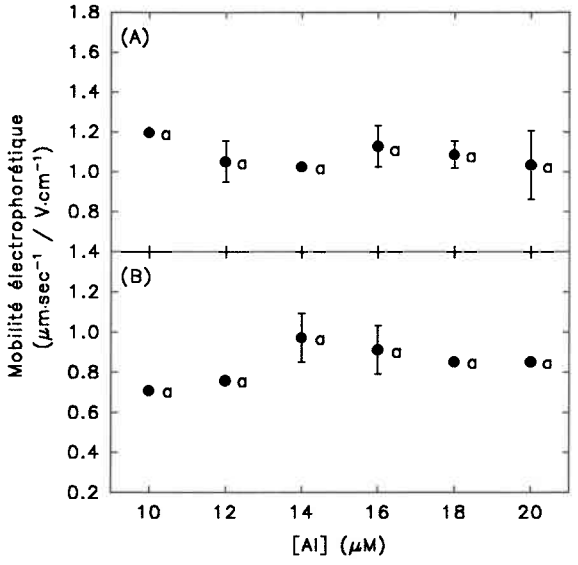


Figure 4.5. Mobilité électrophorétique des vesicules de (A) phosphatidylcholine ou (B) phosphatidylcholine-phosphatidylserine (90-10%) en fonction des concentrations qui augmentent en Al et F = 10 μM à pH = 4.5; [Al^{3+}] est constante à 9.1 μM. Les lettres 'a' signifient que les valeurs de mobilité n'étaient pas statistiquement différentes les unes des autres (Test de Tukey, α =0.05). Les erreurs standards sont indiquées lorsqu'elles sont plus grandes que les points (n=3).

4.3.3 Complexation de l'aluminium par la calmoduline

La capacité de la calmoduline à complexer l'aluminium est bien documentée (Siegel et Haug, 1983; Siegel *et al.*, 1983; Suhayda et Haug, 1984). Cette interaction peut perturber la conformation de la calmoduline (diminution du contenu en α-hélice) et induire une majoration de l'exposition de surfaces hydrophobes. On s'attend à ce que de tels changements de conformation modifient la capacité de la calmoduline à activer des enzymes essentiels à la fonction osmorégulatrice de la branchie, ce qui pourrait mener à la réponse toxique (Haug et Caldwell, 1985). Quelques chercheurs (Flik *et al.*, 1984; Lewis *et al.*, 1990) ont démontré des concentrations non-négligeables de calmoduline dans le mucus ou dans les branchies de la truite arc-en-ciel exposée à l'aluminium. Flik *et al.* (1984) ont proposé que la présence de calmoduline dans le mucus peut être liée à une régulation enzymatique de la perméabilité intégumentale: une réduction de l'activité de la calmoduline pourrait expliquer en partie la perturbation ionorégulatrice associée avec la toxicité de l'acide et de l'aluminium.

L'ajout d'une petite quantité de calmoduline (0.2 mM) à l'étalon d'AlF_y^{3-y} a donné lieu à un petit pic reproductible dans le spectre de RMN (^{19}F) (figure 4.1E, ≈-82.5 ppm), une indication de la formation d'un complexe mixte entre l'aluminium, les fluorures et la calmoduline. Les résultats de l'expérience de dialyse semblent confirmer ces observations (figure 4.6). En effet, les concentrations dans la partie inférieure du graphique sont corrigées pour la concentration d'aluminium dissous, en soustrayant les valeurs d'Al en solution des valeurs totales qui se retrouvaient à l'intérieur du sac. En absence de fluorures, si l'aluminium est lié par la calmoduline, on s'attendrait à ce que les concentrations d'aluminium à l'intérieur du sac excèdent celles de la solution externe, ce qui est bien le cas dans la figure 4.6B (première colonne: [Al] > 0).

En présence de fluorures, si le complexe mixte {F-Al-CaM} n'est pas formé, alors la concentration de {Al-CaM} devrait diminuer brusquement à mesure que la concentration en fluorures augmente, i.e les concentrations d'Al dans la figure 4.6B devraient diminuer avec une augmentation de [F]. Par contre, selon la figure 4.6B, ceci n'est pas le cas: en présence de 2 ou 4 μM F, les concentrations d'aluminium lié à la calmoduline semblent rester stables, ce qui suggère la formation d'un complexe mixte {F-Al-CaM}. Pour des concentrations plus importantes de fluorures, la diminution observée pourrait être attribuée à un déplacement de l'équilibre vers l'ion AlF_2^+. Les résultats de la figure 4.6 sont qualitatifs; on ne peut pas les quantifier, faute de valeurs de [F] mesurées en solution à la fin de expérience. Cependant, ensemble avec les résultats de la RMN, ils suggèrent la formation d'un complexe mixte semblable à celui de l'équation 4.16.

$$Al + CaM \leftrightarrow Al\text{-}CaM \quad (4.15)$$

$$Al + F + CaM \leftrightarrow F\text{-}Al\text{-}CaM \quad (4.16)$$

Notons que des expériences sur des solutions témoin (absence de calmoduline) ont démontré que une partie importante de l'aluminium était perdue vers les membranes de dialyse. En effet, des calculs de bilan massique ont établi que seulement 22-45% de l'aluminium initialement ajouté était récupéré dans la solution externe ou à l'intérieur du sac de dialyse. Ces pertes ont probablement résulté de l'emploi d'un rapport trop faible entre le volume externe et le volume à l'intérieur des sacs de dialyse.

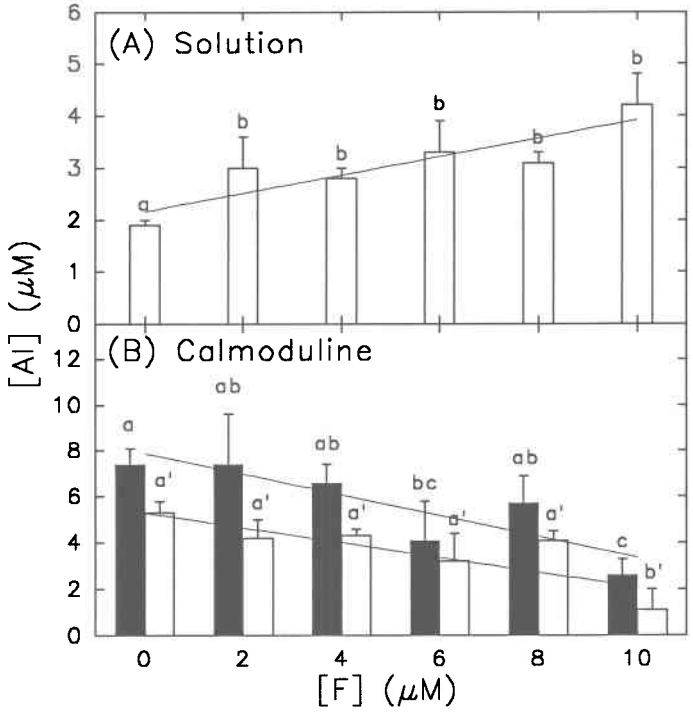


Figure 4.6. Expérience de dialyse: les concentrations d'Al en solution se retrouvent en haut du graphique (A) et les concentrations d'Al lié à la calmoduline (Σ[Al-CaM] et [F-Al-CaM]; [Al] à l'intérieur des sacs de dialyse - [Al] en solution) se retrouvent dans la partie inférieure du graphique (B: foncé: 80 mg CaM L^{-1}, ouvert: 40 mg CaM L^{-1}). Pour toutes les solutions expérimentales, le pH = 4.5 et [Al] initiale = 10 μM. [F] varie de 0 à 10 μM selon l'axe des x. Des lettres différentes signifient des valeurs statistiquement différentes d'Al (Test de Tukey, α=0.05). Les erreurs standards sont indiquées sur les graphiques, n=3.

4.3.4 Complexation de l'aluminium par le mucus du corps du poisson

Le spectre RMN (^{19}F) du mucus en présence de l'aluminium et des fluorures (figure 4.2C) a donné un petit pic avec un déplacement chimique semblable à ceux observés en présence du citrate ou de la calmoduline. Ce résultat n'est pas inattendu: le mucus présente une gamme complexe de groupements fonctionnels, parmi lesquels plusieurs pourraient se lier à l'Al ou à l'AlF_y^{3-y}. En effet, dans une étude précédente (Wilkinson et Campbell, 1993a), nous avons démontré qu'en présence de fluorures, plus d'aluminium est lié par le mucus des branchies qu'aurait été prédit par les concentrations en Al^{3+}, ce qui a indiqué la formation d'un complexe ternaire {F-Al-mucus}.

4.3.5 Complexation de l'aluminium par l'acide sialique

L'acide sialique (AS) est un composant important dans le mucus (43% du poids sec des protéines dans le mucus; Handy, 1989). Suite à la démonstration de la formation de complexes ternaires dans le mucus du corps de l'achigan (figure 4.2C), nous avons examiné le système Al/F/acide sialique. Quoique aucun pic de RMN (^{19}F) n'ait été observé pour un complexe du genre {F-Al-acide sialique}, le rapport de AlF_2^+:AlF^{2+} en solution a diminué de 0.99:1.0 à 0.53:1.0 à pH 4.5, sans évidence de pic correspondant à l'AlF_3. Une telle réponse serait attendue si des complexes ternaires impliquant l'acide sialique étaient formés, *i.e.* une diminution de fluorures libres dans le système (équations 4.17-4.19), donnant lieu à une diminution du rapport entre le AlF_2^+ et le AlF^{2+}. Des simulations avec le modèle d'équilibres chimiques *MINTEQ* démontrent qu'un tel décalage en faveur de AlF^{2+} ne peut se produire que dans le cas de la formation de complexes mixtes.

$$Al + SA^- \leftrightarrow Al\text{-}AS \quad (15)$$
$$AlF_y^{3-y} + SA^- \leftrightarrow F_{(y-1)}\text{-}Al\text{-}AS + F^- \quad (16)$$
$$Al + F^- + SA^- \leftrightarrow F\text{-}Al\text{-}AS \quad (17)$$
$$Al + 2F^- + SA^- \leftrightarrow F_2\text{-}Al\text{-}AS \quad (18)$$
$$AlF_y^{3-y} + SA^- \leftrightarrow F_y\text{-}Al\text{-}AS \quad (19)$$

4.3.6 Implications de la complexation d'AlF_y^{3-y}

La spéciation des métaux traces en solution influe sur la réactivité et la toxicité du métal à la surface biologique. De façon générale, l'activité de l'ion libre est le meilleur prédicteur de la disponibilité des métaux (surtout pour des métaux tels que le Cd, le Cu, et le Zn) vis-à-vis des organismes aquatiques (*v.* Campbell, 1993). Pour l'aluminium, plusieurs études ont démontré une diminution non-stoechiométrique de toxicité en présence des ligands inorganiques; la formation des complexes ternaires {X-Al-branchie} à la surface biologique peut être invoquée pour expliquer la toxicité "résiduelle", c'est-à-dire, la toxicité additionnelle qui ne peut être expliquée par {Al-branchie}.

Dans cette étude, nous avons démontré la formation de plusieurs complexes ternaires du type {F-Al-ligand}, où le ligand était le citrate, la calmoduline, l'acide sialique ou le mucus du poisson. Par contre, nous avons démontré qu'il est peu probable qu'il y ait formation de complexes ternaires en présence de phospholipides comme la phosphatidylsérine ou la phosphatidylcholine. Rappelons que les phospholipides ont été proposés comme site d'initiation de la réponse toxique à la surface membranaire (Deleers, 1985). Cependant, compte tenu de nos résultats de toxicité obtenus pour le saumon atlantique (Wilkinson *et al.*, 1990, chapitre 3), impliquant la formation de complexes ternaires, nous suggérons qu'au moins pour les salmonidés, la réponse toxique est initiée par la complexation de l'aluminium non pas par les phospholipides mais plutôt par une protéine telle que la calmoduline, présente dans le mucus ou à la surface branchiale. Bien que l'induction de rigidité chez les phospholipides ait déjà été invoquée pour expliquer la toxicité de l'aluminium en absence de ligands, ce même mécanisme ne peut être invoqué pour expliquer la capacité des complexes AlF_y^{3-y} à induire des effets toxiques.

4.4 CONCLUSIONS

La complexation de l'aluminium et du fluoro-complexe de l'aluminium par des branchies de poissons est un phénomène important *in vivo*. Pour les expériences *in vitro*, nous avons démontré que plusieurs composants membranaires peuvent imiter les capacités de complexation de la membrane biologique intacte. En présence de fluorures, des complexes ternaires {X-Al-ligand} ont été formés avec le citrate, la calmoduline, le mucus du poisson et peut-être l'acide sialique. Les complexes ternaires impliquant les fluorures n'ont pas été détectés lorsque le ligand était la phosphatidylsérine ou la phosphatidylcholine, dimyristoyl. Ces résultats appuient le modèle/mécanisme de toxicité proposé par Haug et Caldwell (1985) qui ont suggéré que l'aluminium peut interagir avec des protéines telles que la calmoduline pour provoquer une réponse toxique. Par ailleurs, ces résultats n'appuient pas le modèle de toxicité de DeLeers (1985),

c'est-à-dire, une interaction de l'aluminium avec des lipides membranaires qui mène à la rigidité des membranes - aucune complexation d'AlF_y^{3-y} par les phospholipides typiquement retrouvées dans les branchies n'a été indiquée. Des travaux futurs devraient examiner les effets d'autres ligands en solution (*e.g.* H_4SiO_4, matière organique naturelle) sur la complexation de l'aluminium à la surface biologique en plus d'identifier les sites sensibles se retrouvant à la surface biologique qui sont susceptibles de complexer l'aluminium.

5. Complexation de l'aluminium par des cellules de branchies isolées.

(Surface complexation of aluminum on isolated fish gill cells, Wilkinson, K.J., P.M. Bertsch, C.H. Jagoe et P.G.C. Campbell. 1993, *Environ. Sci. Technol.* 27(6): 1132-1138)

Mots-clés: Al / F / poisson / branchie / cellule / mobilité électrophorétique / ^{19}F RMN / complexation de surface / matière organique dissoute /

Lexique anglais-français: Shear plane: surface de cisaillement / Brownian motion: mouvement Brownien / chemical shift: déplacement chimique / spectral window: fenêtre spectrale

L'INRS ne détient pas les droits pour diffuser cette version de l'article. Vous pouvez le consulter à l'adresse suivante :

Wilkinson, K.J., Bertsch, P.M., Jagoe, C.H. et Campbell, P.G.C. (1993). Surface complexation of aluminum on isolated fish gill cells. *Environ. Sci. Technol.* 27(6): 1132-1138.

http://dx.doi.org/10.1021/es00043a012

6. Bioconcentration de l'Al à la surface branchiale.

(Aluminum bioconcentration at the gill surface of juvenile Atlantic salmon in acidic media, Wilkinson, K.J. et P.G.C. Campbell. 1993, Environ. Toxicol. Chem. 12(11): 00-00)

Mots-clés: Al / F / modèle de l'ion libre / effets biologiques / poisson / saumon atlantique /

L'INRS ne détient pas les droits pour diffuser cette version de l'article. Vous pouvez le consulter à l'adresse suivante :

Wilkinson, K.J. et Campbell, P.G.C. (1993). Aluminum bioconcentration at the grill surface of juvenile atlantic salmon in acidic media. *Environ. Toxicol. Chem.* 12(11): 2083-2095.
http://dx.dio.org/10.1897/1552-8618(1993)12[2083:ABATGS]2.0.CO;2

7. Mécanismes de toxicité et bioaccumulation de l'Al chez le saumon atlantique - synthèse des connaissances.

(Mechanisms of Al bioaccumulation and toxicity to salmonids. Wilkinson, K.J., R.L. Roy et P.G.C. Campbell, à soumettre: *CRC Crit. R. Toxicol.*)

Mots-clés: Al / F / modèle de l'ion libre / effets biologiques / poisson / saumon atlantique /

7.1 INTRODUCTION

Des effets biologiques délétères chez les organismes aquatiques ont été attribués à des fortes concentrations d'acide et d'aluminium (*e.g.* Cronan et Schofield, 1979; Grahn, 1980; Dickson, 1983; Henricksen *et al.*, 1984; NRCC, 1986). La toxicité de l'aluminium varie non seulement en fonction de la concentration totale en Al, mais aussi en fonction de sa spéciation: ses effets toxiques sont atténués en présence de fluorures (Wilkinson *et al.*, 1990, chapitre 3), de l'acide silicique (Birchall *et al.*, 1990) et de la matière organique naturelle (Lydersen *et al.*, 1990; Petersen *et al.*, 1990). De plus, des variations de concentrations de cations majeurs, de métaux traces ou de protons peuvent influer sur la toxicité de l'aluminium; par exemple, il est bien documenté que sa toxicité est plus aiguë dans les eaux très douces. Bien que quelques auteurs aient récemment avancé des bases mécanistiques de la toxicité de l'aluminium (Neville et Campbell, 1988; Exley *et al.*, 1991; Playle et Wood, 1991), une compréhension plus globale de sa complexation en solution et à l'interface biologique s'avère nécessaire. Une telle compréhension contribuerait non seulement au développement d'une explication mécanistique de la toxicité de l'Al, mais augmenterait notre capacité de prédire les conditions potentiellement toxiques basées uniquement sur la chimie de l'aluminium en solution.

Quoique plusieurs études aient été publiées pendant les 10 à 15 dernières années au sujet de la géochimie de l'aluminium et sa toxicité chez le poisson, peu de synthèses ont été avancées pour décrire les relations qui relient les deux compartiments. ***L'objectif ultime de ce chapitre est donc de décrire les liens qui existent entre la spéciation de l'aluminium en solution, sa sorption à l'interface biologique et les effets biologiques qui sont induits***.

7.2 CHIMIE DE L'ALUMINIUM EN SOLUTION

La géochimie de l'aluminium a récemment été examinée en détail (*e.g.* Driscoll et Schecher, 1990; Nelson et Campbell, 1991). Cette section compare la chimie aqueuse de l'aluminium dans une expérience toxicologique typique conçue pour simuler les conditions expérimentales qui prédominent sur le terrain. Étant donné leur pertinence (ou manque de), deux cas spécifiques sont examinés: (i) des solutions en dessous de la limite de solubilité et (ii) des solutions sursaturées.

7.2.1 Solutions en dessous de la limite de solubilité d'Al

Dans le passé, les études toxicologiques de l'aluminium ont été limitées par nos connaissances partielles de la spéciation chimique de l'aluminium en solution. En effet, Burrows (1977) a conclu que la plupart des études réalisées antérieures à son article de revue étaient peu utiles, fautes d'un manque d'information sur les milieux expérimentaux.

Quoique l'aluminium soit peu soluble aux pH circumneutres, la présence de ligands complexants (*e.g.* F^-, SO_4^{2-}, $Si(OH)_4$, MOD), ou une diminution de pH, augmentera sa concentration aqueuse. Parmi les espèces monomères se retrouvant dans les eaux naturelles lors d'un épisode critique d'acidité, ce sont, en général, les espèces inorganiques qui prédominent sur les espèces liées à la matière organique (Driscoll et Schecher, 1990). Dans les eaux acides, les espèces inorganiques importantes sont l'ion libre (Al^{3+}) en dessous de pH 5.0, le AlF^{2+} entre pH 4.5 et 5.5, et le $Al(OH)^{2+}$ aux pH>5.0 (Driscoll et Schecher, 1990). D'autres espèces présentes dans les eaux acides incluent des proportions variables de AlF_2^+, F-Al-OH^+, F_2-Al-OH, F-Al-OH_2, $Al(OH)_2^+$, Al-SO_4^+, $Al(SO_4)^{2-}$, $Al(H_{(4-x)}SiO_4)^{3-x}$ et plusieurs espèces organiques (*e.g.* Couturier, 1986; Driscoll et Schecher, 1990; Campbell *et al.*, 1992; figures 1.1 et 1.2).

Aucune technique analytique ne permet des mesures directes des différentes espèces inorganiques d'aluminium se retrouvant dans l'environnement naturel (*cf.* Bertsch et Anderson, 1989). Plutôt, on doit déterminer les concentrations totales de l'Al inorganique par une méthode opérationnelle (*e.g.* Campbell *et al.*, 1983; Driscoll, 1984; LaZerte, 1984) et calculer les proportions relatives de chacune des espèces inorganiques à l'aide d'un modèle d'équilibres chimiques (*e.g.* AlCHEMI, MINEQL, MINTEQ). De tels calculs nécessitent l'emploi de constantes d'équilibre bien définies, obtenues au laboratoire. Heureusement, des bonnes données thermodynamiques existent, au moins pour les complexes/espèces qui prédominent aux pH acides (pH < 5.5) ou circumneutres/basiques (pH > 6.5) (Schecher et Driscoll, 1988a; 1988b).

Malheureusement, la chimie de l'aluminium dans les bioessais menés en laboratoire ne ressemble pas toujours à celle de l'environnement naturel. Par example, pour des bioessais réalisés en absence de ligands, la concentration de l'aluminium dépasse souvent sa limite de solubilité ($\{Al^{3+}\}/\{H^{+}\}=10^{8.8}$; Kinraide et Parker, 1989), alors qu'il n'y a que des évidences limitées pour une sursaturation dans l'environnement naturel (*i.e.* la concentration en Al inorganique dissous est souvent bien expliquée par la limite de solubilité de la gibbsite microcristalline; *e.g.* Driscoll *et al.*, 1984).

7.2.2 Solutions sursaturées en Al

La solubilité de l'aluminium augmente exponentiellement autour d'un minimum de pH se situant à environ pH 6.2. En absence de ligands, seulement de faibles concentrations d'Al sont solubles aux pH légèrement acides (pH 5 à pH 6.5). Tel que discuté dans la section 7.2.1, une partie importante des expériences histologiques, physiologiques et toxicologiques sur les poissons a examiné les effets induits dans des solutions sursaturées (et donc non-réalistes!) d'aluminium. L'utilisation d'un excès d'aluminium n'entraîne pas simplement une amplification des effets

biologiques, ce qui peut être le cas pour d'autres métaux (*e.g.* Cu, Zn, Cd). En effet, *la spéciation de l'aluminium est elle-même considérablement modifiée à des concentrations excédant les concentrations environnementales, ce qui donne lieu à des variations importantes de la réaction de l'aluminium à la surface biologique*.

Bertsch (1989; 1990) a soigneusement examiné la littérature en ce qui trait à la chimie des solutions sursaturées en Al, *i.e.* pour des conditions qui favorisent la formation d'espèces polynucléaires d'aluminium. En solution sous-saturée, l'équilibre parmi des espèces monomères est rapide (Baes et Mesmer, 1976; Plankey et Patterson, 1986; 1987); cependant, dans des solutions excédant la limite de solubilité des espèces monomères, des espèces polynucléaires telles le *Al-13* ($AlO_4Al_{12}(OH)_{(24+n)}(H_2O)_{(12-n)}^{(7-n)+}$) peuvent se former. Ces espèces sont métastables; elles ne sont pas à l'équilibre et ne peuvent donc pas être prédites par des constantes d'équilibres. La formation de *Al-13* est fonction non seulement de la composition de la solution mais aussi des conditions de synthèse (*i.e.* taux d'injection de base, taux d'agitation, etc.; Bertsch, 1987; Parker et Bertsch, 1992b). Le problème est aggravé par le fait qu'à présent, on ne peut détecter des concentrations environmentalement réalistes (<20 µM) de l'Al polynucléaire, quoique des progrès récents aient été fait dans cette direction (Parker et Bertsch, 1992a).

De plus, le fait de dépasser la limite de solubilité de l'aluminium ne garantit pas la formation de *Al-13,* même si sa production est favorisée par des conditions non-homogènes de pH dans la solution ou à une interface (Tennakoon *et al.*, 1986; Bertsch, 1987). Des travaux récents indiquent que le *Al-13* se forme autour d'un centre transitoire de $Al(OH)_4^-$ via une condensation rapide avec 12 atomes d'Al octagonalement coordonnés (Bertsch, 1987; 1989). Bien qu'elle est une espèce "métastable", le *Al-13* démontre une stabilité avec le temps et pour une grande gamme de compositions de solution (Bertsch, 1990).

Playle et Wood (1990) ont simulé des variations de pH qui pourraient exister à la surface branchiale afin de déterminer si la précipitation de l'aluminium (probablement la formation de *Al-13*) était assez rapide pour expliquer les pertes d'Al qu'ils ont observées dans une solution passant près des branchies. Les solutions d'aluminium étaient mélangées avec du NH_4OH dans un joint-en-T puis filtrées à travers une membrane de polycarbonate de 0.2 µm. Quoiqu'ils ont démontré que la "précipitation" de l'aluminium était rapide, il n'est pas évident que les effets localisés de concentration qui existent dans leur dispositif expérimental (semblable à celui de Bertsch, 1987) ressemblent à l'excrétion répandue de base qui a lieu à la surface branchiale. Cette question sera examinée plus en détail dans la section 7.4.

7.3 EFFETS BIOLOGIQUES DE L'Al

7.3.1 Introduction

Les effets biologiques de l'aluminium chez une variété d'organismes aquatiques, y compris le poisson, ont été considérés par Rosseland *et al.* (1990). Cette revue de littérature servira comme point de départ pour la discussion qui suit, dans laquelle qu'on tentera de relier des effets biologiques observés à la spéciation de l'aluminium en solution et à l'interface biologique.

Dans les études de laboratoire, il a été démontré que l'exposition à l'acide seule ne provoque pas le stress physiologique observé dans l'environnement naturel (Muniz et Leivestad, 1980). La recherche de la contribution "manquante" de toxicité a conduit à l'identification de l'aluminium comme facteur causal. En effet, dans les eaux susceptibles à l'acidification, des concentrations élevées d'Al "biodisponible" ont été reliées à un déclin de population ou à une toxicité aiguë chez le poisson (*e.g.* NRCC, 1986). Pour les salmonidés, cette toxicité apparente peut être attribuée à

un échec de reproduction, à une mortalité chez les stades juvéniles, ou à une toxicité létale ou sous-létale parmi les stades adultes.

Des revues de littérature récentes ont présenté les mécanismes physiologiques du stress aigu provoqué par l'aluminium et/ou le proton chez le poisson (Wood et McDonald, 1987; Wood, 1989). L'action toxique de l'aluminium est généralement attribuée à une détérioration des propriétés ionorégulatrices de l'épithélium branchial. La perte de Na et de Cl plasmatique (résultant d'une augmentation du flux vers l'extérieur et une réduction du flux vers l'intérieur; Dalziel *et al.*, 1986; 1987) induirait une hémoconcentration du sang, suivie dans des cas sévères d'un échec circulatoire général. Par ailleurs, un dysfonctionnement respiratoire est parfois observé, surtout à des valeurs de pH excédant 5.0 (*e.g.* Rosseland, 1980; Muniz et Leivestad, 1980; Neville, 1985) ou à une forte concentration de [Ca] (Wood et McDonald, 1987). Par exemple, pour des concentrations élevées en calcium ([Ca]= 1 mM), Wood (1989) a observé non seulement une perte importante d'ions plasmatiques (Na, Cl) et l'hémoconcentration associée, mais aussi une détérioration de l'échange branchial de O_2 et de CO_2 pour des poissons en présence de 12.3 µM Al à pH 4.8. La pression partielle de l'oxygène artériel a diminué pendant que la pCO_2 a augmenté. Par ailleurs, le stress respiratoire a également été démontré chez la truite arc-en-ciel, par des augmentations du taux de ventilation, de la concentration d'acide lactique sanguin, et de la pression partielle de CO_2; ces symptomes se manifestaient en présence de 2.8 µM Al à pH 6.1, mais pas à pH 4.5 (Neville, 1985). Notons que des calculs d'équilibre chimiques indiquent que les solutions d'exposition dans ces deux études étaient sursaturées par rapport à la gibbsite naturelle (Al dissous: 38% dans Wood, 1989; 4% dans Neville, 1985). Soulignons qu'à notre connaissance, personne n'a démontré de détresse respiratoire chez le poisson pour des conditions expérimentales sous-saturées en aluminium.

L'exposition à l'acide/aluminium induit des augmentations de la production de mucus (Muniz et Leivestad, 1980), de l'hypertrophie des cellules de mucus (Ingersoll *et al.*, 1990a) ou du nombre de cellules de mucus (Mueller *et al.*, 1991). Les implications d'une augmentation de la production du mucus sont examinées en détail dans le chapitre 6, dans la section 7.6 et dans l'annexe 4. Des examens histologiques de branchies exposées à l'aluminium dévoilaient des cas de fusion lamellaire et/ou l'oedème, qui augmentaient à la fois la distance de diffusion entre le sang et l'eau (Karlsson-Norrgren *et al.*, 1986a; Jagoe *et al.*, 1987) et le degré d'exposition des cellules de chlorures (Karlsson-Norrgren *et al.*, 1986a; Youson et Neville, 1987). L'accroissement de l'exposition des cellules de chlorures résultait probablement de leur hypertrophie, laquelle était induite par des conditions de stress ionorégulateur (Karlsson-Norrgren *et al.*, 1986a).

7.3.2 Complexation de l'Al par des ligands se retrouvant dans l'environnement

Dans la littérature générale, on considère que l'aluminium inorganique (AlF_y^{3-y}, $Al(SO_4)_x^{3-2x}$, $Al(H_{(4-z)}SiO_4)^{3-z}$) induit une toxicité plus importante que celle provoquée par l'aluminium organique (*e.g.* $Al(citrate)_m$; $Al(DOM)_n$)). Par exemple, Driscoll *et al.* (1980) ont déterminé que la mortalité des alevins de l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) était mieux corrélée avec la fraction labile d'Al (Al inorganique) que toute autre fraction. La complexation de l'aluminium par le citrate a réduit sa toxicité au niveau des témoins, tandis que les fluorures (26.3 µM F: 18.5 µM Al) n'ont contribué qu'une protection partielle (45% de la survie des témoins) à pH 5.2. Pour les mêmes concentrations d'aluminium et de fluorures à pH 4.4, 71% des poissons exposés ont survécu relativement aux témoins (95% survie). Par ailleurs, nos résultats (Wilkinson *et al.*, 1990, chapitre 3) ont démontré que la complexation de l'aluminium par les fluorures a réduit sa toxicité et sa bioaccumulation branchiale chez les tacons de *Salmo salar*.

A notre connaissance, aucune étude n'a examiné l'effet de la complexation de l'aluminium par des sulfates sur sa toxicité chez le poisson, bien que ces complexes ne semblent pas être disponibles aux plantes (Kinraide et Parker, 1987). Birchall *et al.* (1989) ont déterminé que l'ajout d'un grand excès de silicates (93 µM Al:7 µM Al) était nécessaire pour atténuer la toxicité de l'Al chez le saumon atlantique. Cependant, Lacroix (communication personnelle, 1993) a déterminé que la présence de ces complexes a contribué à la toxicité de l'aluminium chez le saumon, c'est-à-dire des résultats allant à l'encontre de ceux de Birchall. Les sulfates et les silicates forment des complexes faibles avec l'aluminium ($K_{Al\text{-}SO_4} = 10^{3.01}$, Ball *et al.*, 1980; $K = 10^{1.07}$, $Al^{3+} + H_4SiO_4 \leftrightarrow Al(OSi(OH)_3)^{2+} + H^+$, Browne and Driscoll, 1992); ces complexes sont donc négligeables (<5%) dans les eaux naturelles sauf aux cas où la concentration de ligand est très importante. Enfin, Parkhurst *et al.* (1990) ont corrélé la réponse toxique aiguë de l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) avec la concentration en aluminium inorganique et le pH sans avoir recours ni aux concentrations de fluorures ou de carbone organique dissous, ni à la température.

7.3.3 Rôle du proton, des cations majeurs et d'autres métaux

La toxicité de l'aluminium varie avec le pH, la concentration des cations majeurs et la concentration totale en aluminium (Havas et Jaworski, 1986; Neville et Campbell, 1988). Des études effectuées au laboratoire ont suggéré que la toxicité s'avère la plus importante entre pH 5.0 et 5.5, diminuant dans des conditions plus acides (Muniz et Leivestad, 1980; Schofield et Trojnar, 1980; Baker, 1982). Quelques-unes de ces études ont été entreprises dans des conditions de sursaturation; l'interprétation de celles-ci n'était donc pas sans ambiguités. A pH 4.5, l'aluminium semble pourvoir au poisson une protection transitoire contre les effets du proton (Baker, 1982; Van Coillie *et al.*, 1983; Neville, 1985). Une telle protection peut être expliquée par une compétition entre le proton et l'aluminium (espèces cationiques) pour les sites sensibles à la surface biologique (Campbell et Stokes, 1985).

Les effets du calcium sur la toxicité de l'aluminium sont bien documentés (*e.g.* Brown, 1981; Dalziel *et al.*, 1986; Bergman *et al.* 1988; Mount *et al.*, 1990; Ingersoll *et al.*, 1990b; Wood *et al.*, 1990a; 1990b). En effet, le calcium est un antagoniste effectif aux effets létaux et sous-létaux attribués à l'aluminium. L'ajout de Ca réduit les pertes ioniques branchiales chez le poisson (McDonald *et al.*, 1989); le mécanisme semble impliquer une réduction de la perte passive d'ions due à l'imperméabilité accrue des jonctions des canaux paracellulaires (Leivestad *et al.*, 1980; Brown, 1983; Wood et McDonald, 1987; Rosseland et al, 1990). Par ailleurs, la présence de l'aluminium et du proton inhibe la complexation de calcium par les branchies excisées de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*; Reid *et al.*, 1991).

7.4 MODELES CINETIQUES VS. MODELES D'EQUILIBRE

7.4.1 Introduction

Parmi d'autres facteurs, la biodisponibilité de l'aluminium chez le poisson devrait dépendre de sa spéciation chimique en solution et de la nature de l'interface entre le milieu abiotique et la surface branchiale. Des modèles prédictifs se doivent donc de fournir un lien mécanistique entre les concentrations au coeur de la solution et l'organisme cible. Un tel modèle augmentera non seulement notre capacité prédictive mais aussi notre compréhension du système.

Le modèle général de la prise-en-charge des métaux traces par les organismes aquatiques (Whitfield et Turner, 1979; Tessier *et al.*, 1993) incorpore deux cas limitants, un basé sur les principes de cinétique, l'autre sur les principes d'équilibres chimiques. Dans le modèle à base cinétique, les espèces d'Al peuvent se lier à la surface branchiale à des vitesses différentes; en présence de ligands complexants, la toxicité et la bioaccumulation résultantes sont fonction du

taux auquel chaque espèce réagit et de son activité subséquente à la surface branchiale (*i.e.* toxicité α $k_1 \cdot [Al^{3+}] + k_2 \cdot [Al(OH)^{2+}] + k_3 \cdot [AlF^{2+}] + ...$). Dans le modèle à base d'équilibres chimiques, les ligands en solution sont en compétition avec ceux de la surface branchiale pour l'aluminium en solution. Dans sa forme la plus simple, ce modèle prédit que la toxicité de l'aluminium en solution devrait être proportionnelle à la concentration de l'ion libre en solution (*e.g.* modèle de l'ion libre (MIL); Morel, 1983; Pagenkopf, 1983; équations 7.1-7.2),

$$Al^{3+} + \text{L-cellule} \overset{K}{\leftrightarrow} \text{Al-L-cellule} \qquad (7.1)$$

$$\text{réponse biologique} \alpha [\text{Al-L-cellule}] = K [\text{L-cellule}] [Al^{3+}] \qquad (7.2)$$

où [L-cellule] est un site sensible à la surface branchiale.

Pour évaluer ces deux approches, il faut d'abord comprendre les processus clés dans la prise-en-charge du métal (figure 7.1).

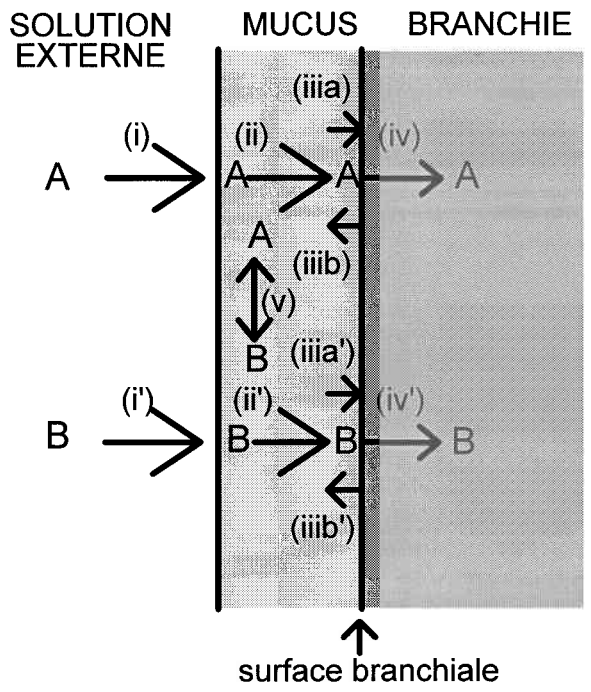


Figure 7.1 Figure schématique des processus de la prise-en-charge d'un métal à travers une branchie: (i) diffusion dans la solution externe, (ii) diffusion à travers / réaction dans le mucus, (iii) sorption / désorption à la surface biologique, (iv) prise-en-charge du métal, (v) interconversion des formes du métal. Les lettres A et B signifient deux espèces différentes d'Al.

A toute surface submergée dans l'eau, une couche stagnante existe près de la surface à travers laquelle tout transport est par diffusion. A la surface branchiale, la diffusion a deux composants (Randall et Daxboeck, 1984; Shephard, 1989; Shephard, 1992; Figure 7.1): (i) diffusion à travers une couche non-perturbée, adjacente au mucus, et (ii) diffusion à travers la couche de mucus. La sorption d'un métal à la surface branchiale (iiia) sera suivie par sa désorption (iiib) ou par son internalisation (iv). L'aluminium près de la surface branchiale réagira selon des gradients chimiques près de la surface biologique en se redistribuant parmi les diverses espèces d'Al. Dans la section qui suit, on examinera les suppositions de bases par rapport à ces processus clés.

Plusieurs suppositions sont essentielles au processus de modélisation (*v.* discussion détaillé dans le chapitre 1 et à la section 1.4):

(A) Les branchies constituent le site d'interaction de l'aluminium et le lieu de l'induction des effets toxiques.

(B) Les sites d'interaction à la surface branchiale ont des constantes de formation distinctes.

(C) La réponse toxique du poisson vis-à-vis de l'aluminium sera proportionnelle à la concentration d'une (ou de quelques) espèce(s) à la surface branchiale.

(D) L'interconversion de l'aluminium près de l'interface branchie-eau (v) se produit rapidement par rapport à la sorption (iiia) sur les branchies (Baes and Mesmer, 1976; Plankey and Patterson, 1986; 1987; Anderson et Bertsch, 1988).

(E) L'internalisation de l'aluminium a lieu (Hunter et al., 1980; Berg and Burns, 1985; Brumbaugh and Kane, 1985; Haines et al. 1987; Galle et al., 1990) mais se déroule à un taux très lent ou négligeable*.

D'ailleurs, les taux calculés de ces processus seront basés sur les données suivantes:

(F) La concentration d'aluminium branchial qui résistait à une immersion (15 min) dans 10 mM EDTA, suivie d'un épongeage, peut être employée comme estimée de l'Al internalisé (Wilkinson et Campbell, 1993, chapitre 6). Lors d'une exposition à 10 µM Al à pH 4.5, les juvéniles de saumon atlantique ont "internalisé" un maximum de 400 µg Al g^{-1} branchie après 7 j. L'accumulation était beaucoup plus lente au début de l'expérience: seulement 50 µg g^{-1} était accumulé après 2 j (Wilkinson *et al.*, 1990, chapitre 3; Wilkinson et Campbell, 1993a, chapitre 6).

(G) Les corbeilles branchiales pesaient à peu près 20 mg chacune (poids sec).

(H) La surface branchiale d'un saumon atlantique (6 g) est semblable à celle d'une truite arc-en-ciel du même poids (*ca.* 1560 mm^2 / poisson; Hughes, 1988).

---

* Notons que basé sur leur incapacité (et celle de Neville, 1985) à detecter des concentrations significatives d'aluminium dans le sang, le foie ou d'autres tissus du corps de poissons exposés pendant 10 j à des concentrations létales d'Al en solution, Wood et McDonald (1987) ont proposé que l'aluminium doit réagir comme toxique de surface. Cette possibilité n'est pas négligée; en effet, l'internalisation =0 est un cas spécial, équivalent au MIL.

7.4.2 Processus clés

Dans cette section, les taux relatifs de diffusion, de sorption et d'internalisation sont comparés afin d'identifier l'étape limitante et de déterminer si la prise-en-charge est mieux prédite par un modèle basé sur les principes de cinétique ou des principes d'équilibres chimiques.

Internalisation (réaction iv, figure 7.1). Bien que la concentration totale d'aluminium accumulé par la branchie du saumon soit importante, une forte proportion est enlevée par un lavage simple à l'EDTA suivi d'un épongeage (Al internalisé), (figure 6.3). La concentration d'Al internalisé semble croître de façon exponentielle avec le temps: les valeurs d'Al branchial se sont maintenues un peu au-dessus du niveau des témoins à court-terme pour ensuite accroître de façon importante (figure 6.3C) à plus long terme. On s'est servi d'un taux d'internalisation de 25 $\mu g\ Al\ g^{-1}\ j^{-1}$, ce qui correspond à l'estimé du taux initial de l'apparence de l'Al internalisé (*v.* supposition **F**; après 7 j, le taux avait augmenté à >100 $\mu g\ Al\ g^{-1}\ j^{-1}$).

Taux d'internalisation $= (25\ \mu g\ Al\ g^{-1}\ j^{-1} / 0.027\ \mu g\ Al\ nmole^{-1}) \cdot 0.020\ g\ branchie^{-1} / 15.6\ cm^2\ branchie^{-1}$
$= \underline{\underline{1.2}}\ nmole\ Al\ cm^{-2}\ j^{-1}$

Diffusion (réactions i et ii, figure 7.1). Le flux diffusif peut être estimé par l'équation 7.3:

$$J=\frac{D_i}{\delta}\cdot([Al_i]_\mu-[Al_i]_0) \qquad (7.3)$$

où μ est près de la surface et 0 est au coeur de la solution.

où le flux (J) est une fonction de la distance de diffusion (δ), le gradient de concentration ($[M_i]_\mu$-$[M_i]_0$) et le coefficient de diffusion (D_i). La diffusion se produit à travers deux compartiments: dans la couche non-perturbée à l'interface du mucus et de l'eau et dans la couche mince de mucus

(≈3 µm; Randall et Wright, 1989) qui adhère à la surface branchiale (figure 7.1). Comme la couche non-perturbée est probablement moins épaisse que la couche de mucus, on peut supposer que le transport est plus lent dans le mucus que dans la couche non-perturbée (*v.* supposition 1, section 1.3.2). En milieu aqueux, le coefficient de diffusion pour les ions bivalents se situe à environ 10^{-5} cm^2 s^{-1} (Li et Gregory, 1974; Buffle, 1988). Par ailleurs, Pärt et Lock (1983) ont déterminé que la vitesse de diffusion de Hg dans une solution de mucus (10%) était 25% de celle dans l'eau (tampon de borate). Le mucus complexe très fortement l'aluminium (Wilkinson et Campbell, 1993b; annexe 4). Il en résulte que le coefficient de diffusion devrait être grandement réduit par rapport au coefficient dans l'eau pure. En effet, dans nos expériences (annexe 4), la diffusion d'aluminium était réduite de façon sufisamment importante pour empêcher sa mesure! Pour un gradient de concentration de 10 µM (*i.e.* gradient maximum si la branchie réagissait comme un réservoir de concentration nulle: 10 µM en solution et 0 µM à la surface branchiale):

$$\text{Flux diffusif (J)} = (8.6 \times 10^{-2}\ cm^2\ j^{-1} / 3 \times 10^{-4}\ cm) \cdot (10\text{-}0\ nmole\ cm^{-3})$$
$$= \underline{\underline{2900}}\ nmole\ Al\ cm^{-2}\ j^{-1}$$

Un gradient de concentration de 1 µM (*i.e.* 10%) serait plus réaliste. Dans ce cas, le flux diffusif serait d'environ 290 nmole Al cm^{-2} j^{-1}.

Sorption (réaction iiia, figure 7.1). Des données pour la vitesse de réaction des métaux à la surface branchiale sont à peu près introuvables. Heureusement, les métaux réagissent à un taux qui peut être estimé selon le taux de déshydratation du complexe de transition, d'après le mécanisme d'Eigen-Wilkens (Burgess, 1988; Hudson et Morel, 1993; équation 7.4).

$$M(H_2O)_6^{z+} + L \overset{K_{os}}{\leftrightarrow} M(H_2O)_6^{z+}\cdots L \overset{k_{-H_2O}}{\rightarrow} ML(H_2O)_5 \qquad (7.4)$$

Le taux de formation du complexe est le produit de la constante de formation du complexe "outer sphere" (K_{os}) et le taux de déshydratation (équation 7.5):

$$k_f = K_{os} \bullet k\text{-}_{H_2O} \qquad (7.5)$$

La complexation de l'aluminium par des ligands inorganiques peut accélérer le taux de déshydratation si l'aluminium est lié moins par ces ligands que par les groupements fonctionnels présents à la surface branchiale. Par exemple, pour un même ligand, la déshydratation du complexe de transition impliquant l'ion $AlOH^{2+}$ est 10^4 fois plus rapide que celle impliquant l'Al^{3+} (Basolo et Pearson, 1967; Crumbliss et Garrison, 1988).

Si l'on suppose que la saturation de la surface branchiale a lieu à *ca.* 1.4 µmole Al g^{-1} poids sec de branchie (*i.e.* 10X les valeurs obtenues par Reid et McDonald (1991) pour le lanthane (III) et pour des poids humides de branchies), alors la concentration de sites par unité de surface branchiale (Facteur de conversion branchial: FCB) peut être estimée par:

$$\begin{aligned} FCB &= (1.4 \times 10^3 \text{ nmole Al } g^{-1} \bullet 0.02 \text{ g}) / 15.6 \text{ cm}^2 \text{ branchie}^{-1} \\ &= 1.8 \text{ nmole Al cm}^{-2} \end{aligned}$$

Cette valeur se compare bien avec les valeurs de saturation pour une surface algale (*e.g.* 6.5 nmole Cu cm^{-2}; Xue *et al.*, 1988) ou la surface d'un oxyhydroxyde de fer (0.4 nmole cm^{-2}; Davis et Kent, 1990).

Pour les ligands organiques en solution, Plankey et Patterson (1987) ont déterminé les taux de réaction (pseudo premier ordre) entre l'aluminium et un acide fulvique à 25°C et à pH 3.7 (équations 7.6 et 7.7).

$$Al^{3+} + H\text{-}L^{-} \overset{k_1}{\leftrightarrow} Al\text{-}L^{+} + H^{+}\ ; \qquad k_1 = 2.3\ M^{-1}s^{-1} \qquad (7.6)$$

$$AlOH^{2+} + H_2\text{-}L \overset{k_2}{\leftrightarrow} HO\text{-}Al\text{-}L + 2H^{+}\ ; \qquad k_2 = 1.1 \times 10^{3}\ M^{-1}s^{-1} \qquad (7.7)$$

Le taux de réaction de l'aluminium à la surface branchiale à pH 4.5 peut être évalué en supposant que les ligands à la surface branchiale se comportent comme l'acide fulvique en solution, *i.e.*,

$$\begin{aligned}
\text{Taux de réaction } (Al_i) &= k_i \bullet [Al_i] \bullet FCB \\
\text{Taux de réaction } (Al^{3+}) &= 2.0 \times 10^{5}\ M^{-1}\ d^{-1} \bullet 8.8 \times 10^{-6}\ M \bullet 1.8 \text{ nmole Al cm}^{-2} \\
&= \underline{\underline{3.2}} \text{ nmole Al cm}^{-2}\ j^{-1} \\
\text{Taux de réaction } (Al(OH)^{2+}) &= 9.5 \times 10^{7}\ M^{-1}\ j^{-1} \bullet 1.0 \times 10^{-6}\ M \bullet 1.8 \text{ nmole Al cm}^{-2} \\
&= \underline{\underline{171}} \text{ nmole Al cm}^{-2}\ j^{-1}
\end{aligned}$$

D'ailleurs, ces taux sont probablement des limites supérieures; il est possible que la perte de mobilité des ligands se retrouvant à la surface branchiale, par rapport aux ligands en solution, occasionne un ralentissement du taux de réaction.

Tableau 7.1. Résumé des taux calculés d'internalisation, de diffusion et de sorption de l'aluminium à la surface branchiale.

Processus	Taux minimum* (nmole Al $cm^{-2}\ j^{-1}$)	Taux maximum (nmole Al $cm^{-2}\ j^{-1}$)
Internalisation	1.2	4.8
Diffusion	287	2870
Réaction Al^{3+}		3.2
Réaction $Al(OH)^{2+}$		171

*Le taux minimum de diffusion correspond à un gradient de concentration de 1 µM, tel que décrit dans le texte. En effet, on peut s'attendre à ce que la diffusion soit réduite de quelques ordres de grandeurs pour d'autres espèces d'Al, par exemple, dans le cas de polymères très étendus ou très chargés.

7.4.3 Modèles basés sur les principes d'équilibres chimiques

Pour les métaux bivalents tels que le Cd, le Cu, le Pb ou le Zn, il existe beaucoup d'évidences à l'effet que la réponse biologique provoquée par un métal dissous dépend de la concentration de l'aquo ion, M^{z+} (Nelson *et al.*, 1981; Petersen, 1982; Sunda et Huntsman, 1983; Pagenkopf, 1983). Si l'on suppose (tel que suggéré par les calculs précédents) que l'internalisation du métal est l'étape limitante, alors l'équilibre parmi les espèces en solution et celles à la surface branchiale devrait être atteinte rapidement par rapport à la réponse biologique. Dans ces conditions, la concentration de l'espèce toxique à la surface branchiale, {X-Al-L-branchie}, peut être prédite par la concentration d'ion libre en solution (MIL). Le MIL ***ne présume pas*** que l'ion Al^{3+} est l'espèce qui réagit à la surface branchiale (Morel, 1983; Neville et Campbell, 1988). En effet, on ne peut pas présumer de l'identité de l'espèce toxique basée seulement sur des corrélations entre les espèces chimiques en solution et la réponse biologique observée à travers une gamme de pH. A un pH donné, l'ion libre est en équilibre rapide avec les hydroxo-espèces (Baes et Mesmer, 1976). Si l'équilibre entre les espèces en solution et les espèces à la surface branchiale est établi rapidement, l'identité de l'ion qui réagit avec la surface branchiale n'a pas d'importance (Neville et Campbell, 1988)- aucune espèce ne peut être considérée plus toxique qu'une autre (à condition que ce soit M^{z+} qui soit transporté à travers la membrane). Toute réaction à la surface branchiale sera suivie par une nouvelle répartition des espèces en solution. A un pH donné, les concentrations d'Al^{3+} et des hydroxo-espèces sont corrélées; pour une gamme de pH, on doit non seulement considérer l'effet du pH sur la spéciation chimique de l'aluminium mais aussi des modifications induites à la surface branchiale suite aux interactions avec le proton (Campbell et Stokes, 1985). Ce point n'est pas simplement d'intérêt académique. De la même façon qu'on doit tenir compte de la concentration en calcium en comparant la toxicité de l'eau de deux lacs de duretés différentes, on ne peut justifier la comparaison des effets d'aluminium à travers une gamme de pH (*cf.* Helliwell *et al.*, 1983; Fivelstad et Leivestad, 1984; Sadler et Lynam, 1986; Playle et Wood, 1991). Des corrélations entre la spéciation chimique d'aluminium à plusieurs pH et des réponses biologiques observées ne

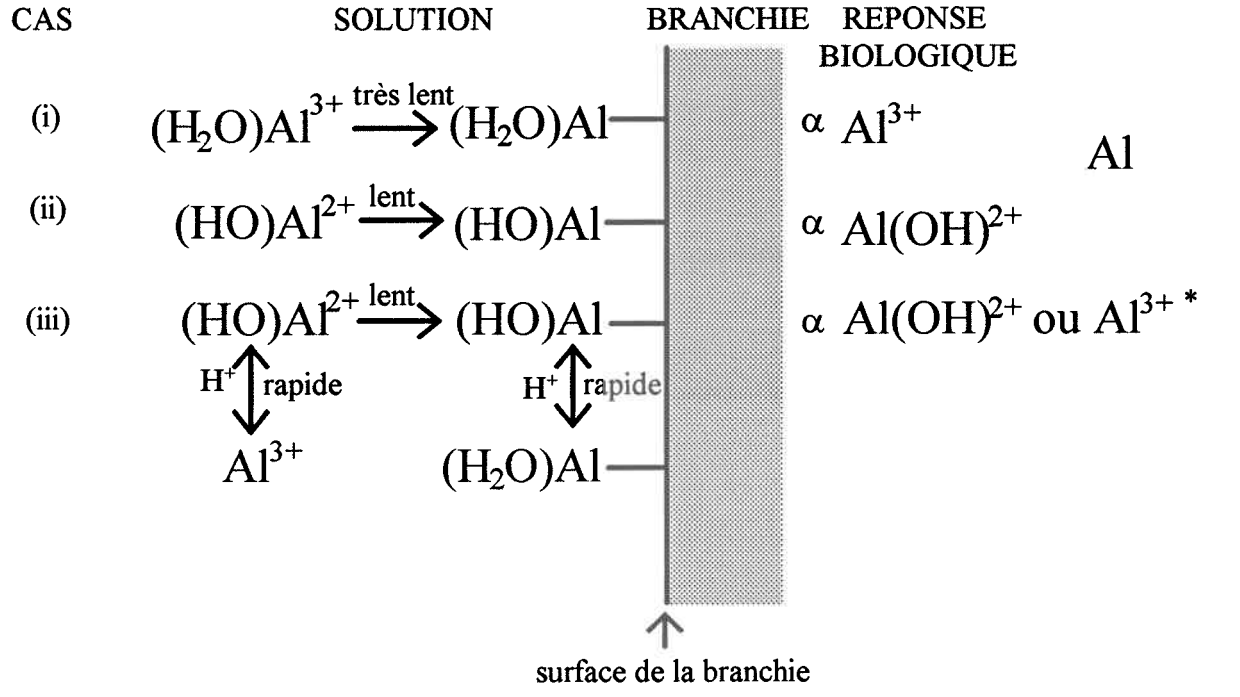
peuvent donc servir à identifier l'espèce toxique; ce genre d'analyse néglige certains aspects du rôle du proton.

Nous avons démontré qu'en présence des fluorures, le modèle de l'ion libre simple ne réussit pas à expliquer la toxicité de l'aluminium chez le saumon (Wilkinson *et al.*, 1990; chapitre 3). Ces résultats peuvent être expliqués dans le contexte d'un modèle modifié d'équilibres chimiques: nous avons également établi que l'aluminium peut former des complexes mixtes à la surface branchiale, {F-Al-L-branchie} (Wilkinson *et al.*, 1993; chapitre 5). Dans le modèle modifié, les effets biologiques de l'Al en présence de fluorures seraient fonction à la fois de la concentration totale des complexes de surface à l'équilibre et de leur configuration électronique (*i.e.* toxicité $\alpha \sum f_1 \bullet [\text{Al-L-gill}] + f_2 \bullet [\text{F-Al-L-gill}] + f_3 \bullet [\text{X-Al-L-gill}] + ...$).

A un pH donné et en absence de ligands complexants en solution autres que OH^-, si les conditions de pseudo-équilibre sont respectées, le meilleur prédicteur de toxicité serait la concentration de l'ion libre ou d'un des hydroxo-complexes d'Al. Sur une gamme de pH, la situation se complique; non seulement le rapport parmi les espèces en solution n'est plus constant mais on doit aussi tenir compte des équilibres du proton à la surface biologique.

Autre que le complexe {F-Al-L-branchie}, l'existence d'aucune autre espèce n'a été identifiée à la surface branchiale par des moyens physiques. A l'aide d'arguments cinétiques (section 7.2.2), on a démontré que c'est l'ion $Al(OH)^{2+}$ et non pas l'ion libre Al^{3+} qui devrait réagir à la surface branchiale. Cependant, tel que signalé à la figure 7.2, il est impossible de distinguer entre la réaction à la surface branchiale de Al^{3+} (cas i) et celle de $Al(OH)^{2+}$ (cas iii), suivie d'une protonation rapide du complexe mixte {HO-Al-L-branchie}, *i.e.* il est possible que l'espèce de

Figure 7.2 Schématique de quelques réactions possibles à la surface branchiale et de leurs implications vis-à-vis de la toxicité de l'aluminium (modèle d'équilibre).



*Cas (iii):

$Al^{3+} + OH^-$	$\rightleftharpoons$	$Al(OH)^{2+}$	K_1	(7.8)
$Al(OH)^{2+}$ + L-branchie	$\rightleftharpoons$	(HO)-Al-L-branchie	K_2	(7.9)
(HO)-Al-L-branchie + H^+	$\rightleftharpoons$	Al-L-branchie	K_3	(7.10)
$H^+ + OH^-$	$\rightleftharpoons$	H_20	K_w	(7.11)

réponse biologique α [Al-L-branchie] ou [(OH)-Al-L-branchie] ou f_1•[Al-L-branchie] + f_2•[(OH)-Al-L-branchie] (7.12)

Si l'hydrolyse est importante et le complexe de surface {Al-L-branchie} prédomine, ou si ce complexe de surface est responsable de la toxicité, alors,

$Al(OH)^{2+}$	=	$[Al^{3+}]•[OH^-]•K_1$	(7.13)
(HO)-Al-L-branchie	=	$[Al(OH)^{2+}]•[L\text{-branchie}]•K_2$	(7.14)
Al-L-branchie	=	$[(HO)\text{-Al-L-branchie}]•[H^+]•K_3$	(7.15)
Al-L-branchie	=	$K_1•K_2•K_3•K_w•[Al^{3+}]•[L\text{-branchie}]$	(7.16)
réponse biologique	α	$[Al^{3+}]$	(7.17)

surface {HO-$(H_2O)_5$-Al-L-branchie} soit rapidement protonée pour donner {$(H_2O)_6$-Al-L-branchie} (figure 7.2). Dans les deux cas, la réponse biologique sera proportionnelle à la concentration de l'ion libre en solution.

7.4.4 Modèles basés sur des principes cinétiques

Les estimations grossières des taux calculés de diffusion et de réaction à la surface branchiale ne sont que deux ordres de grandeur plus élevés que le taux mesuré d'internalisation. Dans ce cas, l'hypothèse du pseudo-équilibre n'est pas nécessairement valide (tableau 7.1). Si les taux de diffusion ou de sorption réels sont plus faibles, ceci pourrait donner lieu à une prise-en-charge limitée par un de ces processus. En effet, on s'attendrait à ce que l'aluminium lié à la matière organique ou le *Al-13* hautement chargé diffuse plus lentement que les espèces inorganiques monomères. Dans le cas d'une limitation par diffusion, le taux de formation des espèces {X-Al-L-branchie} serait fonction de la concentration des espèces qui peuvent diffuser rapidement à travers le mucus, probablement équivalent à une combinaison des espèces inorganiques de petites tailles.

Bien que le taux d'adsorption de Al^{3+} (et probablement d'autres espèces telles que la $Al(OH)_2^+$, le AlF^+ et le Al-MOD) ne soit pas assez rapide pour expliquer l'internalisation observée, c'est le taux de réaction du $Al(OH)^{2+}$ qui est généralement le plus important. D'après nos calculs et malgré la prédominance de l'ion libre à pH 4.5 (88% Al^{3+}, 10% $Al(OH)^{2+}$), la réaction de $Al(OH)^{2+}$ devrait prédominer la sorption d'Al à la surface branchiale à pH 4.5. Par ailleurs, une augmentation du pH (*e.g.* pH 4.5 à pH 5.5), augmenterait la proportion de $Al(OH)^{2+}$dissous, favorisant ainsi cette réaction à la surface branchiale. La redistribution des espèces monomères étant rapide en solution, même dans le cas où seulement le $Al(OH)^{2+}$ réagirait à la surface, d'autres espèces, telles le Al^{3+} réagiraient indirectement, *i.e.* $Al^{3+} \rightarrow Al(OH)^{2+} \rightarrow$ HO-Al-L-branchie. A un pH donné, l'identité de l'espèce réactive n'est pas importante (les concentrations de toutes les espèces sont

corrélées entre elles); sur une gamme de pH, dans un système limité par les réactions de sorption, le meilleur prédicteur de la toxicité serait donc la concentration des espèces monomères non pas celle de l'ion libre, Al^{3+}.

7.5 CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES A L'INTERFACE BRANCHIE-EAU: IMPLICATIONS POUR LA COMPLEXATION DE L'ALUMINIUM

Récemment, plusieurs chercheurs ont déterminé que dans les eaux douces, l'eau qui passe sur les branchies peut être modifiée par l'excrétion de produits respiratoires, surtout l'ammoniaque et le dioxyde de carbone (Wright *et al.*, 1986; Playle et Wood, 1989; Lin et Randall, 1991). L'eau expirée des branchies contient des quantités variables de CO_2 et de NH_3, qui tamponnent l'eau selon les équations 7.18-7.19 (constantes données pour 25°C).

$$CO_2\,(aq) + H_2O \quad \leftrightarrow \quad H_2CO_3 \quad \overset{pK_1=6.3}{\leftrightarrow} \quad H^+ + HCO_3^- \quad \overset{pK_2=10.3}{\leftrightarrow} \quad H^+ + CO_3^{2-} \qquad (7.18)$$

$$NH_3 + H^+ \quad \overset{pK'=-9.21}{\leftrightarrow} \quad NH_4^+ \qquad (7.19)$$

Le degré observé d'acidification ou d'alcalinisation de l'eau branchiale dépend (i) du pH de l'eau inspirée, (ii) du rapport entre le débit d'eau et l'excrétion de CO_2/NH_3, (iii) de la capacité tampon de l'eau et (iv) des concentrations relatives de CO_2/NH_3 (Randall *et al.*, 1991). A ce sujet, l'excrétion de CO_2 est généralement 10X plus importante que celle de l'ammoniaque (Wright et Randall, 1987; Randall *et al.*, 1991). Pour les eaux de pH>5.8 (Playle et Wood, 1989) ou pH>5.3 (Lin et Randall, 1991), l'eau expirée serait acidifiée à cause de la prédominance de la conversion de CO_2 à bicarbonate (HCO_3^-) ou carbonate (CO_3^{2-}) (équation 7.18). Dans les eaux acides (pH<5.0), >99% de l'ammoniaque excrétée est complexée par des protons pour donner

NH_4^+; le CO_2 excrété reste surtout en forme de H_2CO_3. Dans ces conditions, le pH de l'eau expirée est surtout modifiée par l'excrétion de l'ammoniaque; le pH près de la surface branchiale (2-10 mm) peut être 0.5 à 1 unités de pH plus élevé que le pH en solution.

Pour la branchie du poisson, le microclimat d'intérêt est la couche aqueuse entre l'eau qui circule librement et la membrane biologique. Cependant, les techniques employées pour mesurer le pH près de la surface biologique fournissent un estimé de pH près de la surface branchiale (2-10 mm) et non pas dans le microenvironnement de la surface (1-10 μm) ni dans la couche réactionnelle (1-2 nm). Pour ce dernier cas, on peut invoquer la théorie de Gouy-Chapman qui permet le calcul du pH près des surfaces inorganiques (Stumm et Morgan, 1981). Des surfaces chargées négativement devraient attirer un excès de protons tandis que les surfaces positives devraient attirer des anions. Par exemple, en présence de groupements fortement acides et pour un potentiel négatif (ζ) de -20 mV (Wilkinson *et al.*, 1993; chapitre 5), on s'attendrait à une diminution de pH d'environ 0.3 unités.*

L'eau traverse les lamelles branchiales dans ce qui ressemble à un couloir très long et étroit (sa largeur étant *ca.* 1/5 de son hauteur et 1/25 de sa longueur; figure 7.3). Le temps de transport de l'eau est seulement 100-200 ms pour les poissons au repos et moins pour les poissons actifs. Plusieurs facteurs (Scheid et Piiper,1971) peuvent contribuer à diminuer notre capacité à prédire le débit près de la surface branchiale: (i) la vitesse de l'eau peut varier à cause du mouvement operculaire des poissons, qui résulte en un débit minimum et un débit maximum qui sont très

---

* En supposant que ζ= la potentiel de surface (pour que cette supposition soit valable, le produit κa doit être >1; dans notre cas, $\kappa a \approx 5600$). Le pH à la surface peut être estimé comme étant $\cong$ pH de la solution externe - 0.0169• (le potentiel de surface).

différents du débit moyen; (ii) les lamelles peuvent s'entrelacer, modifiant le débit de l'eau; (iii) la ventilation des poissons peut augmenter jusqu'à un ordre de grandeur dans des poissons actifs par rapport aux poissons au repos; et (iv) les unités d'espaces interlaméllaires ne sont pas fonctionnellement ni histologiquement égales.

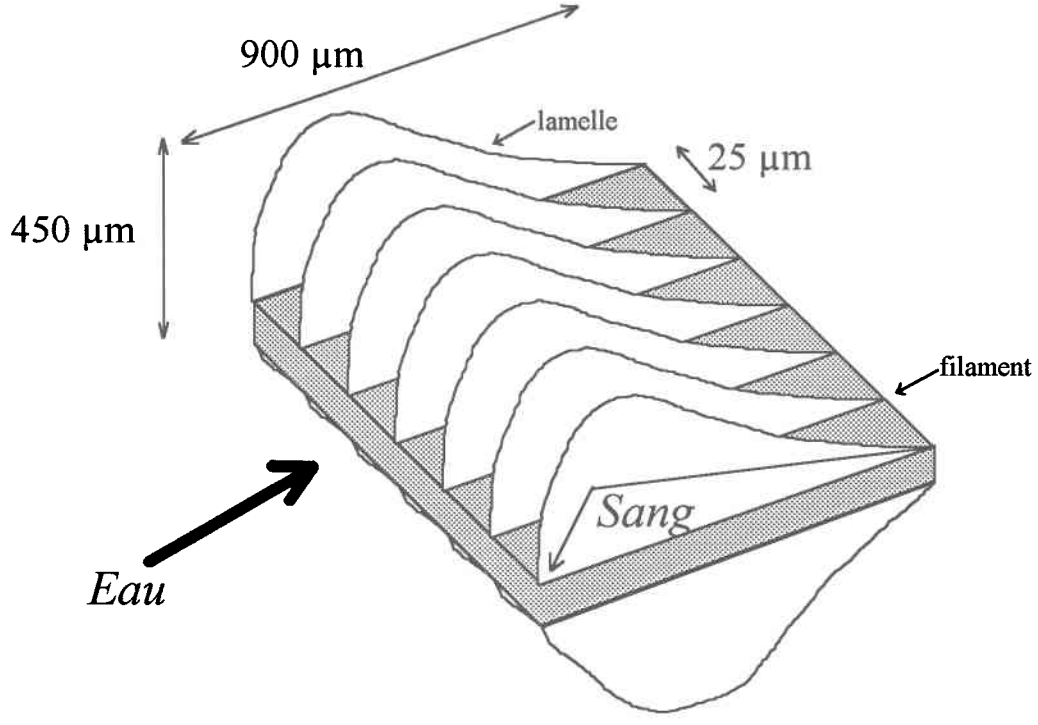


Figure 7.3. Dessin schématique des filaments et des lamelles des branchies. Adapté de Scheid et Piiper, 1971.

En résumé, la chimie de l'interface eau-branchie sera substantiellement différente de celle de la solution externe. Quoique le pH réel influençant la complexation de l'Al à la surface branchiale dépende d'où l'étape limitante se produit (*i.e.* diffusion, sorption ou internalisation), dans le cas d'un pH acide (<5.5) dans l'influx d'eau, le gradient de protons est susceptible de varier d'une faible à une forte concentration de H^+ (i) entre la solution et la surface lamellaire (effet Gouy-

Chapman) et (ii) entre la fin et le début du canal lamellaire (gradient de concentration de NH_3). Comme les mesures branchiales de pH (Playle et Wood, 1989; Lin et Randall, 1991) s'effectuent à l'extérieur des canaux lamellaires, le pH mesuré surestime le pH influençant la sorption d'Al. D'ailleurs, les mesures calculées de pH (Gouy-Chapman) fournissent vraisemblablement une sous-estimation du pH effectif parce que pour effectuer le calcul, on doit supposer que (i) tous les groupements fonctionnels contribuant à la charge de surface sont des groupements acides forts, et (ii) que le mucus ne contribue aucun pouvoir tampon, deux suppositions peu probables.

7.6 SITE D'INITITIATION DE LA RÉPONSE TOXICOLOGIQUE

Le modèle des interactions de surface branchiale de Pagenkopf (1983), et d'autres modèles basés sur le même concept, *i.e.* ceux basés sur une réponse toxique initiée par la complexation de l'aluminium à la surface branchiale (*e.g.* Sadler et Lynam, 1986; Neville et Campbell, 1988), nécessitent que l'aluminium réagisse à la surface membranaire avant que la réponse toxique ne se manifeste. En effet, les branchies sont le site primaire de la perte d'ions par diffusion (McDonald, 1983) et de la prise-en-charge des métaux toxiques et l'induction subséquente de la réponse biologique (Laurén, 1991). Par ailleurs, de bonnes corrélations existent entre la bioaccumulation branchiale et divers paramètres physiologiques. Par exemple, Booth *et al.* (1988) ont identifié un seuil de bioaccumulation au-dessus duquel une toxicité aiguë est déclenchée chez l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*). Wood et McDonald (1987) ont démontré que la bioaccumulation de l'aluminium était bien corrélée avec les pertes mesurées de Na plasmatique (truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*). Dans nos expériences sur le saumon Atlantique (*Salmo salar*) en présence de fluorures, nous avons démontré que la toxicité, la concentration d'aluminium branchial et de Na plasmatique ont tous réagi de façon semblable à une exposition à l'aluminium à pH 4.5 (Wilkinson *et al.*, 1990; chapitre 3). Enfin, pour une exposition à des concentrations comparables et probablement sous-létales d'aluminium, les poissons les plus sensibles à l'aluminium sont ceux qui

accumulent le moins d'aluminium branchial (*i.e.* [Al] branchial: l'achigan à petite bouche<l'omble de fontaine<truite arc-en-ciel; Wood et McDonald, 1987).

A la surface branchiale, l'aluminium est lié par une variété de groupements fonctionnels qui font partie d'une diversité de biomolécules (Haug, 1984)- parmi ces groupements fonctionnels, l'oxygène est le donateur d'électrons le plus répandu. On s'attendrait à ce que la complexation de l'aluminium par des phosphates ou les carboxylates soit favorisée par leur forte concentration au niveau de la membrane branchiale. Les phospholipides sont omniprésents dans les membranes biologiques et l'affinité *in vitro* de l'aluminium pour les phospholipides est bien documentée (*e.g.* Akeson *et al.*, 1989). Des expériences *in vitro* ont démontré que l'aluminium induit des séparations importantes des vésicules de phospholipides, menant à une rigidité qui pourrait contribuer à la réponse toxique provoquée par l'aluminium *in situ*. Cependant, nos études *in vitro* de l'interaction de l'aluminium et des fluorures avec des phospholipides et des protéines (Wilkinson *et al.*, 1993b; chapitre 4) n'appuient pas ce modèle de toxicité- aucune complexation de l'AlF_y^{3-y} n'a été observée en présence de phospholipides typiquement retrouvées à la surface branchiale (Bolis *et al.*, 1984). Cette observation va à l'encontre des résultats *in vivo,* qui indiquent que l'AlF_y^{3-y} exerce un effet toxique chez le saumon atlantique *in situ* (Wilkinson *et al.*, 1990, chapitre 3).

Sauf pour quelques exceptions, les interactions entre l'aluminium et les protéines n'ont pas été étudiées en détail. Parmi les interactions qui sont bien documentées, mentionnons celles impliquant la calmoduline (un médiateur du transport du Ca), qui est dénaturée suite à sa complexation par l'Al. Cette modification de sa structure tertiaire a été proposée comme étant le processus clé dans la réponse toxique à l'aluminium (Siegel et Haug, 1983; Haug et Caldwell, 1985). Staurnes *et al.* (1984) ont démontré une activité réduite de l'anhydrase carbonique et du

Na-K-ATPase dans les branchies des salmonidés suivant l'exposition des poissons à l'aluminium et à l'acidité. Contrairement à la situation pour les phospholipides, pour lesquels les sites sensibles font partie de la structure membranaire, les protéines peuvent être associées de façons variées à la surface membranaire. En effet, il est même concevable que le site sensible soit extérieur à la surface membranaire; par exemple, la calmoduline et l'anhydrase carbonique ont déjà été retrouvés dans le mucus des poissons (Lewis *et al.*, 1990). En principe, leur déactivation extracellulaire pourrait influer sur le transport ionique, tel qu'observé pour les cas de toxicité de l'aluminium. Notons cependant que l'intensité de l'effet de la réaction de l'aluminium au site sensible risque de s'atténuer en fonction de la distance entre le site et la barrière membranaire.

Outre ces molécules fonctionnelles, il existe plusieurs sites ou groupements fonctionnels capables de complexer l'aluminium sans initier de réponse toxique quelconque. Des molécules telles que le citrate, les acides fulviques et humiques, l'acide sialique et les acides polygalacturoniques peuvent entrer en compétition pour l'Al avec les sites sensibles de la surface branchiale et ainsi réduire la toxicité du métal.

7.7 ROLE DU MUCUS

7.7.1 Composition du mucus

Le mucus est présent comme couche protectrice à la surface branchiale. A la surface branchiale, le mucus est surtout composé d'eau (95-99%), mais il existe en forme concentrée tout juste en dessous de la surface épithéliale (Shephard, 1981; Handy, 1989). Des groupements fortement acides se trouvent dans le mucus; l'acide sialique ($pK_a \approx 2.6$; Dawson *et al.*, 1986) et des sulfates d'esters ($pK_a \approx 3$; Handy, 1989) ont déjà été identifiés. Ce sont les résidus d'acide sialique qui

constituent la proportion la plus importante de groupements fonctionnels dans le mucus, *e.g.* 43% du poids sec des protéines (Handy, 1989).

7.7.2 Effet de la couche de mucus.

Les parois des lamelles sont recouvertes d'une couche de mucus renouvelable. Son épaisseur est variable, mais doit être au moins assez épaisse pour recouvrir les stries de l'épithélium (>1 μm; Randall et Wright, 1989). La vitesse du transport des solutés est contrôlée par les concentrations voisines de la surface biologique (Barry et Diamond, 1984), non pas celles de la solution externe. Comme le mélange ne se fait pas dans la couche de mucus, le mouvement d'ions dans le volume contigu à la surface est limité aux flux diffusifs (Shephard, 1989). De plus, la couche de mucus est polyanionique; des effets électrostatiques devraient augmenter la concentration totale de cations et de protons près de l'interface membrane-eau. Par exemple, un des rôles du mucus est de réduire les pertes de sodium en augmentant sa concentration près de la surface branchiale (Shephard, 1992). Il est possible que la concentration du proton augmente de façon semblable, réduisant ainsi le pH effectif dans le microenvironnement branchial (*v.* section 7.4).

A part ses effets sur le transport d'ions, la production excessive de mucus peut augmenter la distance "sang-eau", diminuant ainsi le transport des gaz vers les branchies. De cette façon, une sécrétion importante de mucus serait responsable d'une diminution de l'oxygène sanguin, d'une augmentation de l'acidose du sang, et de la détresse respiratoire résultante (Harris and Hunt, 1973).

La complexation de l'aluminium par le mucus résulterait en une faible diminution de la concentration d'Al libre près de la surface branchiale. En effet, nous avons démontré que pour une exposition à court-terme, jusqu'à 95% de l'aluminium branchial était lié au mucus branchial

(Wilkinson et Campbell, 1993a; chapitre 6). L'augmentation de l'aluminium branchial en fonction du temps était attribuée à une augmentation du nombre de sites (*i.e.* augmentation de la quantité de mucus) plutôt qu'à un chargement de la membrane biologique. Le transfert subséquent de l'aluminium du mucus à la surface branchiale était associé à la réponse toxicologique.

7.8 MECANISME DE LA COMPLEXATION DE L'ALUMINIUM

Dans cette section, des arguments mécanistiques sont avancés pour expliquer comment la spéciation d'aluminium en solution influe sur sa sorption à la surface branchiale et la réponse toxicologique subséquente. Trois fractions d'Al sont examinées séparément: (i) l'Al monomère (y compris quelques petites espèces organiques telles que l'Al-citrate), (ii) l'Al lié à la matière organique naturelle (surtout des acides fulviques et humiques) et (iii) des espèces polymères ou précipitées d'Al (*Al-13*, $Al(OH)_3(s)$).

7.8.1 Al monomère

On peut supposer que l'interconversion des espèces monomères est rapide; ces formes devraient être à l'équilibre en solution. Tel que démontré plus tôt, il est probable que l'internalisation soit lente par rapport à la diffusion de l'aluminium ou à sa sorption à la surface branchiale. Etant donné la validité de ces suppositions, la réponse biologique peut être prédite par la réaction de Al^{3+} (ou de $Al(OH)_x^{3-x}$) à la surface branchiale (équations 7.20-7.21).

$$Al^{3+} + \text{L-cellule} \overset{K}{\leftrightarrow} \text{Al-L-cellule} \qquad (7.20)$$

$$\text{réponse biologique} \propto [\text{Al-L-cellule}] = K\,[\text{L-cellule}]\,[Al^{3+}] \qquad (7.21)$$

En présence de fluorures, les complexes mixtes forment à la surface branchiale (équations 7.22-7.23; chapitres 3, 4 et 5),

$$AlF^{2+} + \text{L-cellule} \overset{K}{\leftrightarrow} \text{F-Al-L-cellule} \quad (7.22)$$

$$\text{réponse biologique} \propto [\text{F-Al-L-cellule}] = K\,[\text{L-cellule}]\,[AlF^{2+}] \quad (7.23)$$

Tel que discuté dans la section 7.3, la formation de plusieurs complexes de surface est possible (*i.e.* Al-L-branchie, HO-Al-L-branchie, F-Al-L-branchie). Si l'un de ces complexes était dominant, la réponse biologique serait proportionnelle à la concentration de l'espèce de surface, qui elle serait proportionnelle à la concentration du cation correspondant, *e.g.* réponse biologique $\alpha[Al^{3+}]$ ou $[Al(OH)^{2+}]$ ou $[AlF^{2+}]$. Plus probablement, une famille de complexes se formera à la surface branchiale. Dans ce cas, la réponse biologique serait proportionnelle à $\Sigma(f_1[Al^{3+}] + f_2[AlF^{2+}] + f_3[Al(OH)^{2+}] + ...)$. Par ailleurs, on s'attendrait à ce que chaque espèce, *e.g.* {(H_2O)-Al-L-cellule}, {HO-Al-L-cellule}, {F-Al-L-cellule}, provoque une gradation de réponses, *i.e.* pour un {L-cellule} semblable, on s'attendrait que l'environnement électronique immediat de l'aluminium influe sur sa capacité d'induire des effets toxiques.

Pour une série de valeurs de pH ou de [Ca], la compétition pour les sites cellulaires doit être incluse dans les relations d'équilibre (équations 7.24-7.26; Neville et Campbell, 1988).

$$Ca^{2+} + \text{L-cellule} \leftrightarrow \text{Ca-L-cellule} \quad (7.24)$$

$$H^{+} + \text{L-cellule} \leftrightarrow \text{H-L-cellule} \quad (7.25)$$

$$2\,H^{+} + \text{L-cellule} \leftrightarrow H_2\text{-L-cellule} \quad (7.26)$$

Par ailleurs, l'ajout d'un ligand ne formant pas de complexe mixte à la surface (*e.g.* citrate) aurait tendance à déplacer le pseudo équilibre vers les espèces dissoutes, réduisant ainsi la concentration des espèces de surface qui sont responsable de la réponse toxique. Dans ce contexte, l'augmentation relative de la toxicité entre pH 5 et 6 pourrait être attribuée à une augmentation de la concentration totale d'Al branchial ou à un déplacement de la distribution des espèces de surface (*i.e.*, de Al-L-branchie à HO-Al-L-branchie) ou à une diminution de la compétition du

proton pour les sites sensibles. A notre connaissance, aucune étude n'a été complétée dans des milieux bien définis (*i.e.* sous-saturé) aux pH circumneutres. Une augmentation de la toxicité ou de la bioaccumulation en allant de pH 6 à 7 pourrait être attribuée à la formation de Al particulaire (*v.* discussion de la section 7.7.3.

7.8.2 Al organique

Les effets de la matière organique de haut poids moléculaires (*e.g.* acides humiques et fulviques) se distinguent des effets des acides organiques de faible poids moléculaires. Même si le citrate, l'EDTA (acide éthylène-1,2-diamine-tétraacétique) et le NTA (l'acide nitrilotriacétique) sont employés comme modèles pour la matière organique naturelle, ils ressemblent peu à leurs analogues naturels. Tout comme l'EDTA ou le NTA, la MOD peut complexer l'Al en solution, réduisant ainsi la concentration de l'ion libre. Cependant, les acides organiques sont aussi des surfactants qui réagissent directement avec des surfaces (Tipping, 1990), même des surfaces biologiques (Wilkinson *et al.*, 1993a; chapitre 5). Karlsson-Norrgren *et al.* (1986b) ont observé que l'ajout des substances humiques a réduit ou empêché les lésions branchiales chez la truite brune (*Salmo trutta*) à pH 5.5. Cependant, il n'y avait pas de diminution significative de l'aluminium branchial comparé aux témoins sans acides humiques. Ce résultat semble contredire le modèle de l'ion libre - on s'attendrait à ce que l'ajout d'acides humiques réduise la concentration de l'ion libre, Al^{3+}, ce qui réduirait la quantité d'aluminium adsorbé à la surface branchiale. La constance relative d'Al branchial suggère la formation d'un complexe mixte du type {MOD-Al-L-branchie} (*cf.* Wilkinson *et al.*, 1993a; chapitre 5). La réduction de l'effet toxicologique observé résulterait des modifications de la chimie de coordination de l'aluminium lié à la surface branchiale. Si les besoins de coordination de l'Al étaient satisfaits par la MOD, la formation d'un complexe ternaire {MOD-Al-L-branchie} ne serait pas suffisante pour déclencher la réponse toxique observée en absence de MOD.

Par ailleurs, la MOD pourrait également influer indirectement sur la toxicité des métaux. La complexation des acides organiques par des surfaces biologiques *in vivo* pourrait modifier la structure, la fluidité et la perméabilité de la membrane branchiale, avec des effets physiologiques correspondants. De plus, la matière organique naturelle contient une quantité variable de métaux traces, d'ions majeurs et de nutriments qui peuvent réagir comme agents atténuants vis-à-vis de la réponse toxique/biologique.

7.8.3 Al polynucléaire, et précipités de Al (Al-13, Al(OH)3(s), etc.)

La pertinence environnementale d'une exposition à des solutions sursaturées en Al est douteuse, sauf peut-être dans des cas particuliers tel que dans des zones de mélange des eaux (Weatherly *et al.*, 1991). Cependant, quelques chercheurs ont suggéré que la précipitation d'Al ou la sorption du polymère *Al-13* pourrait expliquer la toxicité de solutions sous-saturées en Al due à la présence d'une augmentation localisée du pH à la surface branchiale (Neville et Campbell, 1988; Playle et Wood, 1990; 1991).

Jusqu'à tout récemment, la toxicité de précipités ou de polymères d'aluminium n'a pas été bien étudiée parce que leur chimie en solution n'était pas bien définie (Parker et Bertsch, 1992a; 1992b). La littérature est chargée d'exemples où on pourrait se douter de la présence de mélanges mal définis de $Al(OH)_3(s)$ et de *Al-13*. Par ailleurs, l'évidence pour la toxicité des colloïdes ou des précipités est équivoque (Schofield et Trojnar, 1980; Dickson, 1983). Par exemple, Weatherly *et al.* (1991) ont déterminé qu'en conditions susceptibles de promouvoir la formation de Al polymère, les solutions étaient hautement toxiques aux poissons. Leivestad *et al.* (1987) ont attribué une augmentation de mucus et l'asphyxie subséquente aux conditions de sursaturation

qui existaient dans leurs milieux expérimentaux. Dans les cas précédents, la toxicité observée peut être attribuée à un effet physique plutôt qu'à un effet biochimique, puisqu'il est peu probable que le *Al-13* ou le $Al(OH)_3$ puisse traverser la membrane biologique; il s'en suit que le mécanisme toxique s'initie probablement à la surface branchiale. En effet, après avoir exposé des poissons (truite arc-en-ciel) à des solutions qui étaient probablement sursaturées d'aluminium à pH 5.5 ou 6.1, Youson et Neville (1987) ont identifié des particules minérales (*electron dense particles*) à la surface des cellules épithéliales des branchies. La précipitation de l'hydroxyde d'aluminium à la surface des branchies pourrait réduire la diffusion des gas plutôt que perturber les fonctions ionorégulatrices de la branchie. On s'attendrait à ce que la sorption de l'*Al-13* initie une précipitation à la surface membranaire ou empêche le fonctionnement normal des canaux d'ions.

Contrairement aux études précédentes, Fivelstad et Leivestad (1984) ont élevé des alevins de saumon atlantique dans de l'eau contenant de 2.2 à 14.8 µM d'Al à pH 6.5; 50% de l'aluminium existait sous la forme particulaire. Ils ont conclu qu'il était peu probable (*highly unlikely*) que cette fraction soit toxique pour les poissons. Cependant, la fraction particulaire d'Al n'a pas été caractérisée et il est probable qu'elle contenait de fortes concentrations de matière organique.

Bien qu'il semble que des colloïdes ou des précipités d'$Al(OH)_x^{3-x}$, formés *à priori*, peuvent provoquer une réponse toxique chez le poisson, il n'est pas évident que ces espèces puissent se former dans un système où la solution externe est sous-saturée. Quelques constatations nous font croire que les valeurs de sursaturation, telles qu'estimées à partir du pH de l'eau expirée (Playle et Wood, 1991), fournissent une surestimation de la contribution de l'Al polynucléaire ou de l'Al précipité. Le très court temps de passage de l'eau dans le canal lamellaire (*ca.* 200 ms; Scheid et Piiper, 1971) pourrait ne pas être suffisamment long pour laisser former le polymère *Al-13*, surtout en conditions de faible acidité (*e.g.* conditions d'excrétion diffuse de base). Tel que

discuté dans la section 7.4, il est probable que la concentration des protons augmente entre la solution externe et la surface branchiale; le pH à la surface branchiale est probablement plus acide que celui de l'eau dans le canal lamellaire. Si l'on suppose que la diffusion de *Al-13* est réduite par rapport à l'aluminium monomère, alors ses interactions avec la membrane branchiale seraient moins importantes que prédites. Vraisemblablement, d'autres recherches sont nécessaires dans ce domaine pour évaluer la toxicité des formes colloidales ou polynucléaires.

7.9 EXPOSITION A L'ALUMINIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

Tel que discuté plus tôt, la spéciation de l'aluminium dans l'environnement naturel ne ressemble pas toujours à celle dans les expériences faites au laboratoire. Sur le terrain, la concentration et la spéciation de l'Al varient pendant l'acidification épisodique; il est peu probable que les conditions physico-chimiques demeurent stables pendant des périodes de temps relativement longues. De plus, on peut s'attendre à ce que les poissons évitent des conditions hautement toxiques (Muniz *et al.*, 1978; Rosseland, 1986; Pedder et Maly, 1987), bien que la pré-exposition à des concentrations sous-létales d'aluminium puisse diminuer cette capacité (Klaprat *et al.*, 1988). L'exposition chronique peut aussi servir à acclimater les poissons, les protégeant d'une exposition aiguë ultérieure (Orr et al., 1986; Mueller et al., 1991).

Le réalisme d'un plan expérimental qui néglige des ligands complexants tels que la MOD ou les fluorures doit être mis en question. Dans l'environnement naturel, ces ligands peuvent augmenter la solubilité de l'aluminium, diminuant ainsi la formation d'espèces polymères ou de précipités. Ces systèmes sont néanmoins nécessaires; le système naturel est extrêmement complexe et l'isolation du système en composants peut nous aider à mieux comprendre les éléments importants de la réponse toxicologique.

7.10 PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Beaucoup de travail reste à accomplir par rapport aux effets de l'aluminium sur les poissons exposés à des conditions pertinentes à l'environnement naturel (concentration réaliste en Al; présence de la matière organique naturelle; présence des mélanges de métaux; etc.). A date, la plupart des travaux ont examiné les effets de l'aluminium dans des solutions simples sans ligands complexants. Dans une autre fraction importante de la littérature disponible, la spéciation de l'aluminium n'était pas examinée en détail. Dans ces expériences, les poissons sont souvent exposés à des conditions sursaturées et mal définies, sûrement très différentes des conditions naturelles et probablement sans pertinence environnementale. A l'avenir, des travaux devraient examiner la toxicité de l'Al en présence de conditions se retrouvant dans l'environnement naturel, et devraient vérifier les réactions d'autres métaux traces à des sites secondaires (absence de compétition) ou l'interaction de la MOD à la surface biologique. De plus, peu d'études ont examiné la formation ou l'interaction des précipités ou des espèces polynucléaires à la surface biologique. La formation de ces espèces devrait être vérifiée dans des conditions qui ressemblent à celles retrouvées à la surface branchiale. Évidemment, il serait très utile de démontrer leur formation par le poisson pour les conditions *in vivo*. Finalement, d'autres études sont requises afin d'examiner les processus impliqués dans la prise-en-charge de l'aluminium. Des constantes de diffusion, des constantes du taux de sorption, et des taux d'internalisation devraient être déterminés avec une plus grande précision.

8. Conclusions générales.

Des concentrations élevées en aluminium ont été associées à une réponse toxique aggravée chez plusieurs espèces aquatiques, surtout les salmonidés. L'aluminium seul, tout comme la combinaison aluminium + fluorures, provoque une diminution du Na plasmatique, même pour des conditions d'exposition sous-létales. Aux pH acides, l'action toxique de l'aluminium serait donc liée à une perturbation de l'osmorégulation: une perte d'ions plasmatiques que mène à la mort des poissons.

L'interaction de l'aluminium à la surface des branchies implique trois étapes: la diffusion à travers une couche non-perturbée, la sorption du métal à la surface branchiale et l'internalisation du métal. Une comparaison des vitesses relatives probables pour ces différentes étapes suggère que c'est l'internalisation du métal qui est l'étape limitante. En effet, l'interconversion entre des espèces monomères est très rapide, et quant à la diffusion de l'aluminium et sa sorption à la surface branchiale, elles semblent plus rapides que l'internalisation. Sur la base de ces suppositions, la réponse biologique devrait-être prédite par la réaction de Al^{3+} (ou de $Al(OH)_x^{3-x}$) à la surface branchiale.

$$Al^{3+} + \text{L-cellule} \overset{K}{\leftrightarrow} \text{Al-L-cellule}$$

$$\text{réponse biologique} \propto [\text{Al-L-cellule}] = K\,[\text{L-cellule}]\,[Al^{3+}]$$

Par ailleurs, la complexation de l'aluminium inorganique par les fluorures réduit sa toxicité. Cependant, cette atténuation s'avère moins importante que celle prédite; en effet, la toxicité résiduelle de l'aluminium en présence de fluorures dépasse de beaucoup celle qui aurait été prévue en fonction des concentrations de l'ion libre, $[Al^{3+}]$, et de ses hydroxo-complexes, $[Al(OH)_x^{3-x}]$. La meilleure relation prédictive est plutôt celle obtenue en exprimant le pourcentage de mortalité en fonction de la somme pondérée de Al^{3+} et $Al(F)^{2+}$. Nous avons expliqué ces résultats en

modifiant le modèle de l'ion libre pour tenir compte de la formation d'un complexe mixte {F-Al-L-branchie} à la surface branchiale.

$$AlF^{2+} + \text{L-cellule} \overset{K}{\leftrightarrow} \text{F-Al-L-cellule}$$

réponse biologique α [F-Al-L-cellule] = K [L-cellule] [AlF^{2+}]

Par analogie avec ces résultats, on s'attendrait à ce que d'autres complexes de surface se forment (*e.g.* (H_20)-Al-L-branchie, HO-Al-L-branchie, F-Al-L-branchie); si l'un de ces complexes étaient dominant, la réponse biologique serait proportionnelle à la concentration de l'espèce de surface, qui elle serait proportionnelle à la concentration du cation correspondant, *e.g.* réponse biologique $\alpha[Al^{3+}]$ ou $[Al(OH)^{2+}]$ ou $[AlF^{2+}]$. De même, il pourrait y avoir toute une famille de complexes à la surface branchiale. Dans ce cas, la réponse biologique serait proportionnelle à $\Sigma(f_1[Al^{3+}] + f_2[AlF^{2+}] + f_3[Al(OH)^{2+}] + ...)$. Par ailleurs, on s'attendrait à ce que chaque espèce, *e.g.* {(H_2O)-Al-L-gill}, {HO-Al-L-gill}, {F-Al-L-gill}, provoque une gradation de réponses.

Pour les expériences *in vitro*, nous avons démontré que plusieurs composants membranaires peuvent imiter les capacités de complexation de la membrane biologique intacte. Au moyen de la RMN (^{19}F) et de la microélectrophorèse, nous avons établi qu'en présence de fluorures, des complexes ternaires {F-Al-ligand} ont été formés avec le citrate, la calmoduline, le mucus du poisson et probablement l'acide sialique. Les complexes ternaires impliquant les fluorures n'ont cependant pas été détectés lorsque le ligand était la phosphatidylsérine ou la phosphatidylcholine. De même, l'aluminium se lie aux cellules isolées de branchies de la même manière qu'il se lie aux branchies *in vivo*. En présence des fluorures, les résultats *in vitro* impliquent la complexation d'Al et d'Al-F_n et la formation subséquente de {Al-L-cellule} et {F-Al-L-cellule}, respectivement, ce qui correspond à ce que nous avons proposé pour les branchies *in vivo*. Contrairement aux effets provoqués par l'Al ou l'ion H^+, l'addition de la matière organique dissoute à pH 4.5 a rendu la

charge de surface des cellules branchiales plus négatives, ce qui implique une sorption hydrophobe de cette matière organique à la surface branchiale.

Finalement, nos résultats démontrent que la production et la sécrétion du mucus jouent un rôle important dans l'accumulation de l'aluminium par les branchies du saumon. Dans des expériences dynamiques *in situ,* on a démontré que la bioconcentration de l'aluminium par les branchies avait lieu initialement dans le mucus et était suivie par une internalisation lente par les branchies. Par ailleurs, une augmentation substantielle de l'aluminium internalisé est observée pour des expériences à plus long terme (>3j); l'association de faibles concentrations d'Al aux sites sensibles (0→2 j) provoquerait la séparation de l'épithélium branchial ou induirait des variations physiologiques telles qu'une augmentation de la ventilation, ce qui expliquerait la croissance exponentielle de l'aluminium internalisé. Dans des expériences *in vitro*, on a déterminé que la diffusion de l'aluminium au travers du mucus isolé du corps du *Salmo salar* était réduite de façon suffisante pour empêcher sa mesure. Puisque la capacité de complexation de l'aluminium par le mucus est très importante et le taux de renouvellement du mucus *in situ* est extrêmement rapide, nous croyons que le mucus agirait comme couche proctectrice, effectivement retardant la complexation de l'aluminium à la surface branchiale. Notons que cette protection est transitoire: nos résultats de bioconcentration indiquent que l'aluminium exercerait des effets toxiques seulement une fois la capacité de renouvellement ou la capacité complexante du mucus excédée.

9. Bibliographie

Akeson, M.A., D.N. Munns et R.G. Burau. 1989. Adsorption of Al^{3+} to phosphatidylcholine vesicles. Biochim. Biophys. Acta. 986: 33-40.

American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation. 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Anderson P.D. et P.A. Spear. 1980. Copper pharmacokinetics in fish gills - I. Kinetics in pumpkinseed sunfish, *Lepomis gibbosus*, of different body sizes. Water Res. 14: 1101-1105.

Anderson, M.S., L.W. Zelazny, P.M. Bertsch. 1991. Fluoro-aluminum complexes on model and soil exchangers. Soil Sci. Soc. Am. J. 55: 71-75.

Baes, C.F. et R.E. Mesmer. 1976. The Hydrolysis of Cations, John Wiley and Sons Ltd., New York, NY. pp. 317-381.

Baker, J.P. 1981. Aluminum toxicity to fish as related to acid precipitation and Adirondack surface water chemistry. Thèse de doctorat, Université de Cornell, Ithaca, New York.

Baker J.P. 1982. Effects on fish of metals associated with acidification. Dans: Acid Rain/Fisheries. Proc. Int. Sym. Acidic Precip. Fish. Impact. J. Johnston [ed.]. American Fisheries Society, Bethesda, MD. pp. 165-176.

Ball, J.W., D.K. Nordstrom et E.A. Jenne. 1980. Additional and revised thermochemical data for WATEQ2, computerized model for trace and major element speciation in mineral equilibria of natural waters. U.S. Geol. Surv. Water Resour. Invest., Menlo Park, Calif.

Barry, P.H. et J.M. Diamond. 1984. Effects of unstirred layers on membrane phenomena. Physiol. Rev. 64: 763-871.

Basolo, F. et R.G. Pearson. 1967. Mechanisms of inorganic reactions. J. Wiley and Sons Ltd., New York, NY, pp. 142-145.

Bastille, C., S. St-Pierre et B. Dubreuil. 1989. Digestion de matière biologique par four à micro-ondes, méthode DIG 050.1, Manuel des méthodes de laboratoire, INRS-Eau. Available from INRS-Eau, C.P.7500, Ste.-Foy, QC, G1V 4C7.

Bates, S.S., Tessier, A., Campbell, P.G.C., Buffle, J. 1982. Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Scenedesmus chlorophyceae* grown in semi-continous culture. J. Phycol. 18: 521-529.

Berg, D.J. et T.A. Burns. 1985. The distribution of aluminum in the tissues of three fish species. J. Freshwater Ecol. 3: 113-120.

Bergman, H.L. J.S. Mattice et D.J.A. Brown. 1988. Lake acidification and fisheries project: adult brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45: 1563-1574.

Bertsch, P.M. 1987. Conditions for *Al-13* polymer formation in partially neutralized aluminum solutions. Soil Sci. Soc. Am. J. 51: 825-828.

Bertsch, P.M. 1989. Aqueous polynuclear aluminum species: Dans: G. Sposito (ed.), The Environmental Chemistry of Aluminum, Chapter 4. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp. 87-115.

Bertsch, P.M. 1990. The hydrolytic products of aluminum and their biological significance. Environ. Geochem. Health. 12: 7-14.

Bertsch, P.M. et M.A. Anderson. 1989. Speciation of aluminum in aqueous solutions using ion chromatography. Anal. Chem. 61: 535-539.

Birchall, J.D., C. Exley, J.S. Chappell et M.J. Phillips. 1989. Acute toxicity of aluminum to fish eliminated in silicon-rich acid waters. Nature. 338: 146-148.

Block, M. et P. Pärt. 1991. Uptake of ^{109}Cd by cultured gill eithelial cells from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquat. Toxicol. 23:137-151.

Bolis, C.L., A. Cambria et M. Fama. 1984. Effects of acid stress on fish gills. Dans: C.L. Bolis (ed.), Toxins, Drugs, and Pollutants in Marine Animals. pp. 122-129.

Booth, C.E., D.G. McDonald, B.P. Simons et C.M. Wood. 1988. Effects of aluminum and low pH on net ion fluxes and ion balance in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45: 1563-1574.

Borg, H. 1986. Metal speciation in acidified mountain streams in central Sweden. Water Air Soil Pollut. 30: 1007-1014.

Brown, D.J.A. 1981. The effects of various cations on the survival of brown trout, *Salmo trutta,* at low pHs. J. Fish Biol. 18: 31-40.

Browne, B.A. et C.T. Driscoll. 1992. Soluble aluminum silicates: Stoichiometry, stability, and implications for environmental geochemistry. Science 256: 1667-1670.

Brumbaugh, W.G. et D.A. Kane. 1985. Variability of aluminum concentrations in organs and whole bodies of smallmouth bass (*Micropterus dolomieui*). Environ. Sci. Technol. 19: 828-831.

Buffle, J. 1988. Complexation Reactions in Aquatic Systems: An Analytical Approach. Ellis Horwood Limited. John Wiley and Sons. New York.

Burgess, J. 1988. Ions in solution: Basic Principles of Chemical Interactions. Wiley-Interscience, New York (NY), 191 pp.

Burrows, W.D. 1977. Aquatic Aluminum: Chemistry, Toxicology, and Environmental Prevalence. CRC, Crit. Rev. Environ. Control, 7: 167-216.

Cameron, R.C., G.S.P. Ritchie et A.D. Robson. 1986. Relative toxicities of inorganic aluminum complexes to barley. Soil Sci. Soc. Am. J. 50: 1231-1236.

Campbell, P.G.C. 1993. Interactions between trace metals and organisms: critique of the free-ion activity model. Dans: A. Tessier et D.R. Turner [eds.], Metal Speciation and Bioavailability, Chap. 2. Lewis Publishers. Boca Raton. Soumis.

Campbell, P.G.C., M. Bisson, R. Bougie, A. Tessier et J.-P. Villeneuve. 1983. Speciation of aluminum in Acidic Freshwaters. Anal. Chem., 55, 2246-2252.

Campbell, P.G.C. et P.M. Stokes. 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42: 2034-2049.

Campbell, P.G.C., B. Dubreuil et H.J. Hansen. 1989. Comportement géochimique de l'aluminium dans quelques rivières à saumons de la Côte-Nord (golfe du Saint-Laurent). Rapport Technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques no. 1697. 80p.

Campbell, P.G.C., H.J. Hansen, B. Dubreuil et W.O. Nelson. 1992. Geochemistry of Quebec North Shore salmon rivers during snowmelt: Organic acid pulse and aluminum mobilization. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 1938-1952.

Clark, K.L. et B.D. LaZerte. 1985. A laboratory study of the effects of aluminum and pH on amphibian eggs and tadpoles. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42: 1544-1551.

Cleveland, L., D.R. Buckler et W.G. Brumbaugh. 1991. Residue dynamics and effects of aluminum on growth and mortality in brook trout. Environ. Toxicol. Chem. 19: 243-248.

Cleveland, L., E.E. Little, S.J. Hamilton, D.R. Buckler et J.B. Hunn. 1986. Interactive toxicity of aluminum and acidity to early life stages of brook trout. Trans. Am. Fish. Soc. 115: 610-620.

Collins, Y.E. et G. Stotzky. 1992. Heavy metals alter the electrokinetic properties of bacteria, yeasts, and clay minerals. Applied and Environmental Microbiology. 58: 1592-1600.

Couturier, Y. 1986. Contribution à l'étude des complexes mixtes de l'aluminium (III) avec les ions fluorure et hydroxyde. Bull. Soc. Chim. France. 2: 171-177.

Cronan, C.S et C.L. Schofield. 1979. Aluminum leaching response to acid precipitation: effects on high-elevation watersheds in the Northeast. Science 204: 304-306.

Crumbliss, A.L. et J.M. Garrison. 1988. A comparison of some aspects of the aqueous coordination chemistry of aluminum (III) and iron (III). Comments Inorg. Chem. 8: 1-26.

Dalziel, T.R.K., R. Morris et D.J.A. Brown. 1986. The effects of low pH,. low calcium concentrations and elevated aluminum concentrations on sodium fluxes in brown trout, *Salmo trutta* L. Water, Air, Soil Pollut. 30: 569-577.

Dalziel, T.R.K., R. Morris et D.J.A. Brown. 1987. Sodium uptake inhibition in brown trout, Salmo trutta, exposed to elevated aluminium concentrations at low pH. Annls. Soc. R. Zool. Belg. 117: 421-434.

Davis, J.A. et D.B. Kent. 1990. Surface complexation modeling in aqueous geochemistry. In: M.F. Hocheella et A.F. White (eds.) Mineral-Water Interface Geochemistry. Reviews in Mineralogy. Vol. 23. Mineralogical Society of America. Washington. pp. 177-260.

Dawson, R.M.C., D.C. Elliot, W.H. Elliot, K.M. Jones. 1986. Data for biochemical research. 3rd edition. Clarendon Press. Oxford. pp. 148.

Deleers, M. 1985. Cationic atmosphere and cation competition binding at negatively charged membranes: pathological implications of aluminum. Res. Commun. Chem. Path. Pharmac. 49: 277-294.

Deleers, M., J.-P. Servais et E. Wülfert. 1987. Aluminum-induced lipid phase separation and membrane fusion does not require the presence of negatively charged phospholipids. Biochem. Intern. 16: 1023-1034.

Dickson, W. 1983. Liming toxicity of aluminium to fish. Vatten 39: 400-404.

Dietrich, D. et Ch. Schlatter. 1989. Low levels of aluminium causing death of brown trout (*Salmo trutta* fario, L.) in a Swiss alpine lake. Aquat. Sci. 51: 279-295.

Dixon D.G. et J.B. Sprague. 1981. Copper bioaccumulation and hepatoprotein synthesis during acclimatation to copper by juvenile rainbow trout. Aquat. Toxicol. 1: 69-81.

Driscoll, C.T. 1984. A procedure for the fractionation of aqueous aluminum in dilute acidic waters. International J. Environ. Analyt. Chem. 16: 267-283.

Driscoll, C.T., J.P. Baker, J.J. Bisogni et C.L. Schofield. 1980. Effect of aluminum speciation on fish in acidified waters. Nature 284: 161-164.

Driscoll, C.T., J.P. Baker, J.J. Bisogni et C.L. Schofield. 1984. Aluminum speciation in dilute acidified surface waters in the Adirondack region of New York State. Dans: O.R. Bricker [ed.] Precipitation: Geological Aspects, Butterworth, Boston. pp. 55-75.

Driscoll, C.T. et W.D. Schecher. 1988. Aluminum in the environment. Dans: H. Sigel et A. Sigel [eds.], Aluminum and its Role in Biology. Metal Ions in Biological Systems, Vol. 24, Marcel Dekker Inc., New York, NY. pp. 59-122.

Driscoll, C.T. et W.D. Schecher. 1990. The chemistry of aluminum in the environment. Environ. Geochem. Health. 12: 28-49.

Evans, D.H. 1987. The fish gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. Environ. Health Perspec. 71: 47-58.

Exley, C., J.S. Chappell et J.D. Birchall. 1991. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. J. Theor. Biol. 151: 417-428.

Fivelstad, S. et H. Leivestad. 1984. Aluminium toxicity to Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) and Brown Trout (*Salmo trutta* L.): Mortality and Physiological Response. Inst. Freshwat. Res. Drottningham 61: 69-77.

Flik, G., J.H. Van Rijs et S.L. Wendelaar Bonga. 1984. Evidence for the presence of calmodulin in fish mucus. Eur. J. Biochem. 138: 651-654.

Galle, C., C. Chassard-Bouchaud, J.C. Massabuau, F. Escaig, P. Boumati, M. Bourges et D. Pépin. 1990. Localisation subcellulaire de l'aluminium véhiculé par les pluies acides dans les reins et branchies de truite des Vosges. Données préliminaires. C.R. Acad. Sci. Paris. 311: 301-307.

Goenaga, X. et D.J.A. Williams. 1988. Aluminium speciation in surface waters from a Welsh upland area. Environ. Pollut. 52: 132-149.

Grahn, O. 1980. Fish kills in two moderately acid lakes due to high aluminum concentration. Dans: D. Drablos et A. Tollan [eds.], Ecological Impact of Acidic Precipitation, SNSF Project, Oslo, Norway, pp. 310-311.

Haines, T.A. 1981. Acidic precipitation and its consequences for aquatic ecosystems: A review. Trans. Amer. Fish. Soc. 110: 669-707.

Haines, T., S.J. Pauwels, C.H. Jagoe et S.A. Norton. 1987. Effects of acidity-related water and sediment chemistry variables on trace metal burdens in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Annls. Soc. R. Zool. Belg. 117: 45-55.

Handy, R.D. 1989. The ionic composition of rainbow trout body mucus. Comp. Biochem. Physiol. 93A: 571-575.

Hansen, H.J. et P.G.C. Campbell. 1987. Aluminum speciation in rivers on the Canadian Precambrian Shield (Côte-Nord du St-Laurent, Québec) during snowmelt. Dans: R. Perry, R.M. Harrison, J.N.B. Bell, et J.N. Lester [eds.], Acid Rain: Scientific and Technical Advances. Selper Ltd.

Harris, J. et S. Hunt. 1973. Epithelial mucins of the Atlantic salmon, *Salmo salar* (L.). Trans. Biochem. Soc. 1: 153-155.

Harvey, H.H. et J.M. McArdle. 1986. Physiological responses of rainbow trout *Salmo gairdneri* exposed to Plastic Lake inlet and outlet stream waters. Water Air Soil Pollut. 30: 687-694.

Haug, AR. 1984. Molecular aspects of aluminum toxicity. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 1: 345-373.

Haug, A.R. et C.R. Caldwell. 1985. Aluminum toxicity in plants: The role of the root plasma membrane and calmodulin. Dans: J.B. St. John, E. Berlin et P.C. Jackson [eds.], Frontiers of membrane research in agriculture, Rowman and Allanheld, Totowa.

Havas, M. et J.F. Jaworski. 1986. Aluminum in the Canadian environment. NRCC no. 24759.

Helliwell, S., G.E. Batley, T.M. Florence et B.G. Lumsden. 1983. Speciation and toxicity of aluminum in a model fresh water. Environ. Technol. Lett. 4: 141-144.

Hendershot, W.H., A. Dufresne, H. Lalande et F. Courchesne. 1986. Temporal variation in aluminum speciation and concentration during snowmelt. Water Air Soil Pollut. 31: 231-237.

Henriksen, A., O.K. Skogheim, et B.O. Rosseland. 1984. Episodic changes in pH and aluminium speciation kill fish in a Norwegian salmon river. Vatten 40: 255-260.

Hudson, R.J.M. et F.M.M. Morel. 1993. Trace metal transport by marine microorganisms: Implications of metal coordination kinetics. Deep-Sea Res. Sous presse.

Hughes, G.M. 1988. An introduction to the study of gills. Dans: D.F. Houlihan, J.C. Rankin et T.J. Shuttleworth, Gills, Society for Experimental Biology Seminar Series 16. Cambridge University Press. pp. 1-24.

Hunter, D.B. 1991. Aluminum binding to phosphatidylcholine bilayers. PhD thesis. University of Vermont. 98 pp.

Hunter, J.B., S.L. Ross et J. Tannahill. 1980. Aluminum pollution and fish toxicity. Water, Pollut. Contr. 79: 413-420.

Hunter, K.A. 1980. Microelectrophoretic properties of natural surface-active organic matter in coastal seawater. Limnol. Oceanogr. 25: 807-822.

Hunter, R.J. 1981. Zeta potential in colloid science. Principles and Applications. Academic Press. London. pp. 68-73.

Hutchinson, N.J., K.E. Holtze, J.R. Munro et T.W. Pawson. 1989. Modifying effects of life stage, ionic strength and post-exposure mortality on lethality of H^+ and Al to lake trout and brook trout. Aquat. Toxicol. 15: 1-26.

Ingersoll, C.G., D.D. Gulley, D.R. Mount, M.E. Mueller, J.D. Fernandez, J.R. Hockett et H.L. Bergman. 1990a. Aluminum and acid toxicity to two strains of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47: 1641-1648.

Ingersoll, C.G., D.R. Mount, D.D. Gulley, T.W. LaPoint et H.L. Bergman. 1990b. Effects of pH, aluminum, and calcium on survival and growth of eggs and fry of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47: 1580-1592.

Jagoe, C.H., T.A. Haines et D.R. Buckler. 1987. Abnormal gill development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry exposed to aluminium at low pH. Annales Soc. Roy. Zool. Belge 11: 375-386.

Jensen, K.W. et E. Snekvik. 1972. Low pH wipe out salmon and trout populations in Southernmost Norway. Ambio 1: 223-226.

Johannesen, M. et A. Henriksen. 1978. Chemistry of snow meltwater: changes in concentration during melting. Water Resour. Res. 14: 615-619.

Johannessen, M., A. Skartveit et R.F. Wright. 1980. Streamwater chemistry before, during and after snowmelt, pp. 224-225. Dans: D. Drablos et A. Tollan [eds.], Ecological Impact of Acidic Precipitation, SNSF Project, Norway.

Karlsson-Norrgren, L., W. Dickson, O. Ljungberg et P. Runn. 1986a. Acid water and aluminum exposure: gill lesions and aluminum accumulation in farmed brown trout, Salmo trutta L. J. Fish Diseases 9: 1-9.

Karlsson-Norrgren, L., W. Dickson, O. Ljungberg et P. Runn. 1986b. Acid water and aluminum exposure: experimentally induced gill lesions in brown trout (*Salmo trutta*). J. Fish Diseases 9: 11-25.

Kinraide, T.B. et D.R. Parker. 1987. Nonphytotoxicity of the aluminum sulphate ion, $AlSO_4^+$. Physiol. Plantarum 71: 207-212.

Kinraide, T.B. et D.R. Parker. 1989. Assessing the phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum. Plant, Cell and Environ. 12: 479-487.

Klaprat, D.A., S.B. Brown et T.J. Hara. 1988. The effect of low pH and aluminium on the olfactroy organ of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Envir. Biol. Fishes 22: 69-77.

Kramer, J.R. et J. Hummel. 1985. Acute effect of aluminium to shiner minnows. Poster, Int. Symp. Acidic Precipitation, le 15-20 septembre, Muskoka, Ontario.

Lachance, M., Brouard, D., Van Coillie, R. et J.D. Dutil. 1983. Composition chimique des eaux de la rivière Sainte-Marguerite en période de fonte. Water Pollut. Res. J. Can. 18: 85-102.

Lacroix, G.L. 1985. Plasma ionic composition of the Atlantic salmon (*Salmo salar*), white sucker (*Catostomus commersoni*), and alewife (*Alosa pseudoharengus*) in some acidic rivers of Nova Scotia. Can. J. Zool. 63: 2254-2261.

Lacroix, G.L. 1989. Ecological and physiological responses of Atlantic salmon in acidic organic rivers of Nova Scotia, Canada. Water Air Soil Pollut. 46; 375-386.

Lacroix, G.L. et K.T. Kan. 1986. Speciation of aluminum in acidic rivers of Nova Scotia suppporting Atlantic salmon: A methodological evaluation. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 1501: iii+ 12p.

Lacroix, G.L., D.J. Hood, C.S. Belfry et T.J. Rand. 1990. Plasma electrolytes, gill aluminum content, and gill morphology of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Brook trout (*Salvelinus fontinalis*) indigenous to acidic streams of Nova Scotia. Can. J. Zool. 68: 1270-1280.

Lacroix, G.L. et D.R. Townsend. 1987. Responses of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) to episodic increases in acidity of Nova Scotia rivers. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45: 1475-1484.

Laurén, D.J. 1991. The fish gill: A sensitive target for waterborne pollutants. Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Fourteenth Volume, ASTM STP 1124, M.A. Mayes et M.G. Barron [ed.], American Society for Testing and Materials, Philadelphia. pp. 223-244.

Lawrence, G.B., C.T. Driscoll et R.D. Fuller. 1988. Hydrologic control of aluminum chemistry in an acidic headwater stream. Water Resour. Res. 24: 659-669.

LaZerte, B.D. 1984. Forms of aqueous aluminum in acidified catchments of central Ontario: a methodological analysis. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 41: 1664-1677.

LaZerte, B.D. et P.J. Dillon. 1984. The relative importance of anthropogenic versus natural sources of acid in lakes and streams of central Ontario. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 41: 1664-1677.

Leivestad, H. 1982. Physiological effects of acid stress on fish. Dans: Acid Rain/Fisheries. Proc. Int. Sym. Acidic Precip. Fish. Impact. J. Johnston [ed.]. American Fisheries Society, Bethesda, MD. pp. 157-164.

Leivestad, H., E. Jensen, H. Kjartansson et L. Xingfu. 1987. Aqueous speciation of aluminium and toxic effects on Atlantic salmon. Ann. Soc. R. Zool. Belg. 117: 387-398.

Lewis, T.E., S. Yuan et A. Haug. 1990. Calmodulin concentration in mucus of rainbow trout, Salmo gairdneri, exposed to combinations of acid, aluminum and calcium. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 44: 449-455.

Li, Y.H. et S. Gregory. 1974. Diffusion of ions in sea water and in deep-sea sediments. Geochim. Cosmochim. Acta 38: 703-714.

Lin, H. et D.J. Randall. 1991. The effect of varying water pH on the acidification of expired water in rainbow trout. J. Exp. Biol. 149: 149-160.

Lydersen, E., A.B.S. Poleo, I.P. Muniz, B. Salbu et H.E. Bjornstad. 1990. The effects of naturally occuring high and low molecular weight inorganic and organic species on the yolk-sack larvae of Atlantic salmon (*Salmo salar* L) exposed to acidic aluminium-rich lake water. Aquat. Toxicol. 18: 219-229.

Marklund, E., S. Sjöberg et L.-O. Ohman. 1986. Equilibrium and structural studies of silicon and aluminium (III) in aqueous solution. 14. Speciation and equilibria in the aluminium (III)-lactic acid-OH- system. Acta Chem. Scand. A40: 367-373.

Mathiessen, P. et A.E. Brafield. 1977. Uptake and loss of dissolved zinc on the gills of the stickleback (*Gasterosteus aculeatus* (L)). J. Fish. Biol. 10: 399-410.

Mayer, L.D., M.J. Hope et P.R. Cullis. 1986. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. Biochim. Biophys. Acta 858: 161-168.

McAvoy, D.C. 1989. Episodic response of aluminum chemistry in an acid-sensitive Massachusetts catchment. Water Resour. Res. 25: 233-240.

McCormick, J.H. et K.M. Jensen. 1992. Osmoregulatory failure and death of first-year largemouth bass (*Micropterus salmonides*) exposed to low pH and elevated aluminum, at low temperatures in soft water. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 1189-1197.

McDonald, D.G. 1983. The effects of H^+ upon the gills of freshwater fish. Can. J. Zool. 61: 691-703.

McDonald, D.G., J.P. Reader et T.R.K. Dalziel. 1989. The combined effects of pH and trace metals on fish ionoregulation. Dans: R. Morris, E.W. Taylor, D.J.A. Brown et J.A. Brown [eds.], Acid Toxicity and Aquatic Animals. Cambridge University Press. New York. pp. 125-152.

McDonald, D.G., R.L. Walker et P.R.H. Wilkes. 1983a. The interaction of environmental calcium and low pH on the physiology of the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*, I. Branchial and renal net ion and H^+ fluxes. J. Exp. Biol. 102: 123-140.

McDonald, D.G., R.L. Walker et P.R.H. Wilkes. 1983b. The interaction of environmental calcium and low pH on the physiology of the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*, II. Branchial ionoregulatory mechanisms. J. Exp. Biol. 102: 141-155.

McDonald, D.G., C.M. Wood, R.G. Rhem, M.E. Mueller, D.R. Mount et H.L. Bergman. 1991. Nature and time course of acclimation to aluminum in juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). I. Physiology. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48: 2006-2015.

McWilliams, P.G. 1982. The effect of calcium on sodium fluxes in the brown trout, Salmo trutta, in neutral and acid water. J. Exp. Biol. 96: 439-442.

Morel, F.M.M. 1983. Principles of Aquatic Chemistry. Wiley International, Toronto (Can).

Morel, F.M.M. et N.M.L. Morel-Laurens. 1983. Trace metals and plankton in the oceans: facts and speculations. Dans: C.S. Wong, E. Boyle, K.W. Bruland, J.D. Burton et E.D. Goldberg [eds.], Trace metals in sea water, Plenum Press, New York, N.Y., pp. 841-869.

Mount, D.R., M.J. Swanson, J.E. Breck, A.M. Farag et H.L. Bergman. 1990. Responses of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) fry to fluctuating acid, aluminum, and low calcium expposure. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47: 1623-1630.

Mueller, M.E., D.A. Sanchez, H.L. Bergman, D.G. McDonald, R.G. Rhem et C.M. Wood. 1991. Nature and time course of acclimation to aluminum in juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). II. Gill histology. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48: 2016-2027.

Muniz, I.P. et H. Leivestad. 1980. Toxic effects of aluminum on the brown trout, *Salmo trutta* L., pp. 320-321. Dans: D. Drablos et A. Tollan [eds.], Ecological Impact of Acidic Precipitation, SNSF Project, Norway.

Muniz, I.P., H. Leivestad et B.O. Rosseland. 1978. Stress measurements on fish in acidic rivers. Nordforsk, 2: 233-247.

Nelson, P.O., A.K. Chung et M.C. Hudson. 1981. Factors affecting the fate of heavy metals in the activated sludge process. J. Water Pollut. Control Fed., 53: 1323-1333.

Nelson, W.O. et P.G.C. Campbell. 1991. The effects of acidification on the geochemistry of Al, Cd, Pb and Hg in freswater environments: A literature review. Environ. Pollut. 71: 91-130.

Neville, C.M. 1985. Physiological réponse of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to acid and aluminium-predication of field responses from laboratory data. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42: 2004-2019.

Neville, C.M. et P.G.C. Campbell. 1988. Possible mechanisms of aluminum toxicity in a dilute, acidic environment to fingerlings and older life stages of salmonids. Water, Air Soil Pollut. 42: 311-327.

NRCC (National Research Council of Canada). 1986. Aluminum in the Canadian Environment. National Research Council of Canada, Associate Comittee on Scientific Criteria for Environmental Quality, NRCC Rep. 24759, 331 pp.

Orion Research Incorporated. 1983. Instruction manual fluoride electrodes: model 94-09-00.

Orr, P.L., R.W. Bradley, J.B. Sprague et N.J. Hutchinson. 1986. Acclimation-induced change in toxicity of aluminum to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Fish Aquat. Sci. 43: 243-246.

O'Shea, P., J. Walters, I. Ridge, M. Wainright et A.P.J. Trinci. 1990. Zeta potential measurements of cell wall preparations from *Regnellidium diphyllum* and *Nympohides peltata.* Plant, Cell and Environment. 13: 447-454.

Pagenkopf, G.K. 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. Environ. Sci. Technol. 17: 342-347.

Papelis, C., K.F. Hayes et J.O. Leckie. 1988. HYDRAQL: A program for the computation of chemical equilibrium composition of aqueous batch systems including surface-complexation modeling of ion adsorption at the oxide / solution interface. Environmental Engineering and Science, Dept. Civil Eng., Technical report No. 306, Stanford University, CA, 130 pp.

Parent L. 1992. Biodisponibilité de l'aluminium dans les eaux douces en relation avec les pluies acides. Ph.D. Thesis. INRS-Eau, Université du Québec, Ste.-Foy, Québec (CAN).

Parker, D.R. et P.M. Bertsch. 1992a. Identification and quantification of the "Al_{13}" tridecameric polycation using ferron. Environ. Sci. Technol. 26: 908-914.

Parker, D.R. et P.M. Bertsch. 1992b. Formation of the "Al_{13}" tridecameric polycation under diverse synthesis conditions. Environ. Sci. Technol. 26: 914-921.

Parkhurst, B.R., H.L. Bergman, J. Fernandez, D.D. Gulley, J.R. Hocket et D.A. Sanchez. 1990. Inorganic monomeric aluminum and pH as predictors of acidic water toxicity to brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47: 1631-1640.

Pärt, P. et R.A.C. Lock. 1983. Diffusion of calcium, cadmium and mercury in a mucous solution from rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. 76C: 259-263.

Pedder, S.C.J. et E.J. Maly. 1987. The effect of avoidance on the plasma cation concentration of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) subjected to varying levels of acidity. Aquat. Toxicol. 10: 29-39.

Petersen, R. 1982. Influence of copper and zinc on the growth of a freshwater alga, *Scenedesmus quadricauda*: the significance of chemical speciation. Environ. Sci. Technol., 16, 443-447.

Peterson, R.H., R.A. Bourbonniere, G.L. Lacroix, D.J. Martin-Robichaud, P. Takats et G. Brun. 1990. Responses of Atlantic salmon (*Salmo salar*) alevins to dissolved organic carbon and dissolved alumnum at low pH. Water Air Soil Pollut. 46: 399-413.

Pettersson, A., L. Hällborn et B. Bergman. 1986. Aluminum uptake by *Anabaena cylindrica*. J. Gen. Microbiol. 132: 1771-1774.

Plankey, B.J., H.H. Patterson et C.S. Cronan. 1986. Kinetics of aluminum fluoride complexation in acidic waters, Environ. Sci. Technol. 20: 160-165.

Plankey, B.J. et H.H. Patterson. 1987. Kinetics of aluminum-fulvic acid complexation in acidic waters. Environ. Sci. Technol. 21: 595-601.

Plankey, B.J. et H.H. Patterson. 1988. Effect of fulvic acid on the kinetics of aluminum fluoride complexation in acidic waters. Environ. Sci. Technol. 22: 1454-1459.

Playle, R.C., R.W. Gensemer et D. Dixon. 1992. Copper accumulation on gills of fathead minnows: Influence of water hardness, complexation and pH of the micro-environment. Environ. Toxicol. Chem. 11: 381-391.

Playle, R.C., G.G. Goss et C.M. Wood. 1989. Physiological disturbances in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during acid and aluminum exposures in soft water of two calcium concentrations. Can. J. Zool. 67: 314-324.

Playle, R.C. et C.M. Wood. 1989. Water chemistry changes in the gill micro-environment of rainbow trout: experimental observations and theory. J. Comp. Physiol. B. 159: 527-537.

Playle, R.C. et C.M. Wood. 1990. Is precipitation of aluminum fast enough to explain aluminum deposition on fish gills? Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47: 1558-1561.

Playle, R.C. et C.M. Wood. 1991. Mechanisms of aluminum extraction and accumulation at the gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in acidic soft water. J. Fish Biol. 38: 791-805.

Poléo, A.B.S., E. Lydersen et I.P. Muniz. 1991. The influence of temperature on aqueous aluminium chemistry and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fingerlings. Aquat. Toxicol. 21: 267-278.

Randall, D.J. et C. Daxboeck. 1984. Oxygen and carbon dioxide transfer across fish gills. Dans: W.S. Hoar et D.J. Randall [ed.], Fish physiology. Academic Press. Orlando. pp 263-314.

Randall, D.J. et P.A. Wright. 1989. The interaction between carbon dioxide and ammonia excretion and water pH in fish. Can. J. Zool. 67: 2936-2942.

Randall, D., H. Lin et P.A. Wright. 1991. Gill water flow and the chemistry of the boundary layer. Physiol. Zool. 64: 26-38.

Reid, S.D., D.G. McDonald et R.R. Rhem. 1991. Acclimation to sublethal aluminum: modifications of metal - gill surface interactions of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48: 1996-2005.

Reid, S.D. et D.G. McDonald. 1991. Metal binding activity of the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48: 1061-1068.

Rogeberg, E.J.S. et A. Henriksen. 1985. An automatic method for fractionation and determination of aluminum species in fresh-waters. Vatten 41: 48-53.

Rosseland, B.O. 1980. Physiological responses to acid water in fish. 2. Effects of acid water on metabolism and gill ventilation in brown trout, *Salmo trutta* L., and brook trout, *Savelinus fontinalis* Mitchell. Dans: D. Drablos et A. Tollan [eds.], Ecological Impact of Acid Precipitation, pp. 348-349. SNSF Project.

Rosseland, B.O. 1986. Ecological effects of acidification on tertiary consumers. Fish population responses. Water, Air, Soil Pollut. 30: 451-460.

Rosseland, B.O. et O.K. Skogheim. 1984. A comparative study on salmonid fish species in acid aluminium-rich water. II. Physiological stress and mortality of one and two year old fish. Rep. Inst. Freshwat. Drott. 61: 186-194.

Rosseland, B.O., O.K. Skogheim, F. Kroglund et E. Hoell. 1986. Mortality and physiological stress of year classes of landlocked and migratory Atlantic salmon, brown trout and brook trout in acid aluminum-rich soft water. Water, Air, Soil Pollut. 30, 751-756.

Rosseland, B.O., T.D. Eldhuset et M. Staurnes. 1990. Environmental effects of aluminium. Environ. Geochem. Health 12: 17-27.

Rϕyset, O. 1986. Flow injection spectrophotometric determination of aluminium in water with pyrocatechol violet. Analytica Chimica Acta 185: 75-81.

Sadler, K. et S. Lynam. 1986. Some effects on the growth of brown trout from exposure to aluminium at different pH levels, *Salmo trutta* L. J. Fish. Biol. 29: 313-324.

Sadler, K. et S. Lynam. 1988. The influence of calcium on aluminium-induced changes in the growth rate and mortality of brown trout, *Salmo trutta* L. J. Fish. Biol. 33: 171-179.

Sanjuan, B. et G. Michard. 1987. Aluminum hydroxide solubility in aqueous solutions containing fluoride ions at 50 °C. Geochim. Cosmochim. Acta 51: 1823-1831.

Schecher, W.D. et C.T. Driscoll. 1988a. An evaluation of the equilibrium calculations within acidification models. Water Resour. Res. 224: 525-533.

Schecher, W.D. et C.T. Driscoll. 1988b. An evaluation of the equilibrium calculations within acidification models: The effect of uncertainty in measured chemical components. Water Resour. Res. 224: 533-540.

Schecher, W.D. et D.C. McAvoy. 1991. MINEQL+: A chemical equilibrium program for personal computers, User Manual Version 2.1. Proctor and Gamble Co.

Scheid, P. et J. Piiper. 1971. Theoretical analysis of respiratory gas equilibration in water passing through fish gills. Respir. Physiol. 13: 305-318.

Schenck, R.C., A. Tessier et P.G.C. Campbell. 1988. The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. Limnol. Oceanogr. 33: 538-550.

Schindler, P.W. 1990. Co-adsorption of metal ions and organic ligands: Formation of ternary surface complexes. Dans: M.F. Hochella et A.F. White [eds.], Mineral-Water Interface Geochemistry. Reviews in Mineralogy. Vol. 23. Mineralogical Society of America. Washington, D.C. Chap. 7: 281-307.

Schnitzer, M. et J.G. Desjardins. 1969. Can. J. Soil. Sci. 49: 151-158.

Schofield, C.L. et J.R. Trojnar. 1980. Aluminum toxicity to brook trout, (*Salvelinus fontinalis*) in acidified waters. Dans: T. Toribara, M. Miller et P. Morrow [eds.], Polluted Rain. Plenum Press, New York, N.Y., pp. 341-346.

Seip, H.M., L. Muller et A. Naas. 1984. Aluminium speciation: comparison of two spectrophotometric analytical methods and observed concentrations in some acidic aquatic systems in southern Norway. Water Air Soil Pollut. 23: 81-95.

Shephard, K.L. 1981. The influence of mucus on the diffusion of water across fish epidermis. Physiol. Zool. 54: 224-229.

Shephard, K.L. 1982. The influence of mucus on the diffusion of ions across the esophagus of fish. Physiol. Zool. 55: 23-34.

Shephard, K.L. 1989. The effects of mucus and mucilaginous materials on ion distributions at epitherlial surfaces. Dans: E. Chantler et N.A. Ratcliffe [eds.], Mucus and related topics, Company of Biologists. Cambridge, pp. 123-130.

Shephard, K.L. 1992. Studies on the fish gill microclimate. J. Comp. Physiol. B. 162: 231-240.

Siddens, L.K., W.K. Seim, L.R. Curtis et G.A. Chapman. 1986. Comparison of continous and episodic exposure to acidic, aluminum-contaminated waters of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 43: 2036-2040.

Siegel, N., R. Coughlin et A. Haug. 1983. A thermodynamic and electron paramagnetic resonance study of structural changes in calmodulin induced by aluminum binding. Biochem. Biophys. Res. Comm. 115: 512-517.

Siegel, N. et A. Haug. 1983. Calmodulin-dependent formation of membrane potential in barley root plasma membrane vesicles: A biochemical model of aluminum toxicity in plants. Physiol. Plant. 59: 285-291.

Sillén, L.G. et A.E. Martell. 1971. Stability constants of metal-ion complexes. Supplement No. 1. The Chemical Society. Burlington House. London.

Skogheim, O.K. et B.O. Rosseland. 1986. Mortality of smolt of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at low levels of aluminium in acidic softwater. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 37: 258-265.

Skogheim, O.K., B.O. Rosseland, E. Hoell, F. Kroglund. 1986. Effect of humic acid on acute aluminium toxicity to smolts of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in acidic soft water. Manuscrit nonpublié (communication personnelle).

Skogheim, O.K., B.O. Rosseland et I. Sevaldrud. 1984. Deaths of spawners of salmon in River Ogna, southwest Norway, caused by acidified aluminium-rich water. Rep. Inst. Freshwat. Res. Drotting. 61: 195-202.

Snucins, E.J. et B.J. Shuter. 1991. Survival of introduced smallmouth bass in low-pH lakes. Trans. Am. Fish. Soc. 120: 209-216.

Stansley, W. et G. Cooper. 1990. An acidic snowmelt event in a New Jersey stream- Evidence of effects on an indigenous trout population. Water, Air, Soil Pollut. 53: 227-237.

Staurnes, M., T. Sigholt et O.B. Reite. 1984. Reduced carbonic anhydrase and Na-K-ATPase activity in gills of salmonids exposed to Al containing acid water. Experientia 40: 226-227.

Stella II kinetic modeling software. 1990. High Performance Systems Inc. Hanover, NH 03755.

Stumm, W. et J.J. Morgan. 1981. Aquatic Chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. John Wiley and Sons. New York.

Suhayda, C.G. et A. Haug. 1984. Organic acids prevent aluminum-induced conformational changes in calmodulin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 19: 376-381.

Sunda, W.G. 1991. Trace metal interactions with marine phytoplankton. Biol. Oceanogr. 6: 411-442.

Sunda, W.G. et S.A. Huntsman. 1983. Effect of competitve interactions between manganese and copper on cellular manganese and growth in estuarine and oceanic species of the diatom Thalassiosira. Limnol. Oceanogr., 28, 924-934.

Tennakoon, D.T.B., J.M. Thomas, W. Jones, T.A. Carpenter et S. Ramadas. 1986. Characterization of clays and clay organic systems - Cation diffusion and dehydroxylation. J. Chem. Soc. Faraday 82: 545-562.

Tessier, A., J. Buffle et P.G.C. Campbell. 1993. Uptake of trace metals by aquatic organisms. Dans: J. Buffle [ed.], Chemical and Biological regulation of Aquatic Processes. Lewis Publishers, Inc. Chelsea (MI).

Tipping, E. 1990. Interactions of organic acids with inorganic and organic surfaces. Dans: E.M. Perdue et E.T. Gjessing [eds.], Organic acids in aquatic ecosystems. John Wiley and Sons, Chichester, pp. 209-221.

Turner, J. 1990. Binding of aluminum to aqueous suspensions of phosphatidylcholine and phosphatidylserine at pH 5. Thèse de maîtrise. University of Vermont. 79 pp.

Van Coillie, R., C. Thellen, P.G.C. Campbell et Y. Vigneault. 1983. Effets toxiques de l'aluminium chez les salmonidés en relation avec des conditions physico-chimiques acides. Rapp. techn. can. sci. halieut. et aquat. no 1237: ix + 88 p.

Visser, S.A. 1982. Surface active phenomena by humic substances of aquatic origin. Rev. Fr. Sci. Eau. 1: 285-295.

Walker, N.A. et M.G. Pitman. 1976. Dans: V. Luttge et M.G. Pittman [eds.], Transport in Plants, Vol. II, Ch. 5. Springer-Verlag, Berlin.

Watt, W.D., C.D. Scott et W.J. White. 1983. Evidence of acidification of some Nova Scotian rivers and its impact on Atlantic salmon, *Salmo salar*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40: 462-473.

Weatherley, N.S., A.P. Rogers, X. Goenaga et S.J. Ormerod. 1990. The survival of early life stages of brown trout (*Salmo trutta* L.) in relation to aluminium speciation in upland Welsh streams. Aquat. Toxicol. 17: 213-230.

Weatherley, N.S., G.P. Rutt, S.P. Thomas et S.J. Ormerod. 1991. Liming acid streams: Aluminium toxicity to fish in mixing zones. Water, Air, Soil Pollut. 55: 345-353.

Westall, J.C., J.L. Zachary et F.M.M. Morel. 1976. MINEQL, a Computer Program for the Calculation of the Chemical Equilibrium Composition of Aqueous Systems, Massachusetts Institute of Technology, Dept. Civil Eng., Tech. Report No. 18, 91 p.

Whitfield, M. et D.R. Turner. 1979. Critical assessment of the relationship between biological, thermodynamic and electrochemical availability. Dans: E.A. Jenne [ed.], Chemical Modeling in Aqueous Systems, Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 93: 657-680. Amer. Chem. Soc. Washington (DC).

Wigington, P.J., T.D. Davies, M. Trantner et K.N. Eshleman. 1990. Episodic acidification of surface waters due to acidic deposition. U.S. National Acid Precipitation Assessment Program, State-of-Science/Technology Report No. 12, Washington, D.C., 314 pp.

Wilkinson, K.J., P.G.C. Campbell et P. Couture. 1990. Effect of fluoride complexation on aluminum toxicity towards juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47: 1446-1452.

Wilkinson, K.J., P.M. Bertsch, C.H. Jagoe et P.G.C. Campbell. 1993a. Surface complexation of aluminum on isolated fish gill cells. Environ. Sci. Technol. 27: 1132-1138.

Wilkinson, K.J., P.M. Bertsch, P.G.C. Campbell et D.R. Hunter. 1993b. Aluminum binding to membrane components in the presence of fluoride: Implications for bioavailability and toxicity. En préparation.

Wilkinson, K.J., P. Couture and P.G.C. Campbell. 1989. Biodisponibilité des fluoro-complexes d'aluminium chez des juveniles du saumon atlantique, *Salmo salar*. Scientific Report no. R266, INRS-Eau, C.P. 7500, Ste-Foy (QC), G1V 4C7

Wilkinson, K.J. et P.G.C. Campbell. 1993a. Aluminum bioconcentration at the gill surface of juvenile Atlantic salmon in acidic media. Environ. Toxicol. Chem. In press.

Wilkinson, K.J. et P.G.C. Campbell. 1993b. Aluminium dynamics at the gill surface of Atlantic salmon: The role of mucus. Sous presse: Proceedings of the International Conference of Heavy Metals in the Environment.

Williams R.J.P. 1981. Physico-chemical aspects of inorganic element transport through membranes. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 294: 57-74.

Witters, H.E., J.H.D. Vangenechten, S. Van Puymbroeck et O.L.J. Vanderborght. 1987. Physiological study on the recovery of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) from acid and Al stress. Dans: H. Barth [ed.], Proceedings CEC Workshop on Reversibility of Acidification. Elsevier Applied Science, London. pp. 67-75.

Wolfe, S.L. 1985. Cell Ultrastructure. Wadsworth Publishing Co. Belmont, Ca, pp. 73-74.

Wood, C.M. 1989. The physiological problems of fish in acid waters. Dans: R. Morris, E.W. Taylor, D.J.A. Brown et J.A. Brown [eds.], Acid Toxicity and Aquatic Animals. Cambridge University Press. New York. pp. 125-152.

Wood, C.M. et D.G. McDonald. 1987. The physiology of acid/aluminum stress in trout. Dans: H. Witters et O. Vanderborght, [eds.], Physiology of acid stress in aquatic organisms. Ann. Soc. R. Zool. Belg. 117 (Suppl 1): 399-410.

Wood, C.M., D.G. McDonald, C.G. Ingersoll, D.R. Mount, O.E. Johannsson, S. Lansburger et H.L. Bergman. 1990a. Effects of water acidity, calcium, and aluminum on whole body ions of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) continously exposed from fertilization to swim-up: a study by instrumental neutron activation analysis. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47: 1593-1603.

Wood, C.M., et D.G. McDonald, C.G. Ingersoll, D.R. Mount, O.E. Johannsson, S. Lansburger et H.L. Bergman. 1990b. Whole body ions of brook trout (Salvelinus fontinalis) alevins: responses of yolk-sac and swim-up stages to water acidity, calcium, and aluminum, and recovery effects. Can. J. Fish. Sci. 47: 1604-1615.

Woodward, D.F., A.M. Farag, M.E. Mueller, E.E. Little et F.A. Vertucci. 1989. Sensitivity of endemic Snake River cutthroat trout to acidity and elevated aluminum. Trans. Am. Fish. Soc. 118: 630-643.

Wright, P.A., T.A. Heming et D. Randall. 1986. Downstream pH changes in water flowing over the gills of rainbow trout. J. Exp. Biol. 126: 499-512.

Wright, P.A. et D.J. Randall. 1987. The interaction between ammonia and carbon dioxide stores and excretion rates in fish. Annls. Soc. R. Zool. Belg. 117: 321-321-329.

Wright, P.A., D.J. Randall et S.F. Perry. 1989. Fish gill water boundary layer: A site of linkage between carbon dioxide and ammonia excretion. J. Comp. Physiol. B. 158: 627-635.

Wright, P.A., D.J. Randall et S.F. Perry. 1989. Fish gill water boundary layer: A site of linkage between carbon dioxide and ammonia excretion. J. Comp. Physiol. B. 158: 627-635.

Xue, H.-B., W. Stumm et L. Sigg. 1988. The binding of heavy metals to algal surfaces. Wat. Res. 22: 917-926.

Youson, J.H. et C.M. Neville. 1987. Deposition of aluminum in the gill epithelium of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) subjected to sublethal concentrations of the metal. Can. J. Zool. 65: 647-656.

10. Glossaire

AF: acides fulviques
AS: acide sialique
ANOVA: analyse de variance
CaM: calmoduline
COD: carbone organique dissous
CDTA: acide cyclohexylène-1,2-diamine-tétracétique
EDTA: acide éthylène-1,2-diamine-tétracétique
ET: écart-type
GFAAS: absorption atomique au four de graphite
ICP: spectrométrie d'émission atomique à plasma
MIL: modèle de l'ion libre
MOD: matière organique dissoute
MS 222: acide éthyle 3-aminobenzoate méthanesulfonique
PC: phosphatidylcholine
PS: phosphatidylserine
TISAB: total ionic strength activity buffer

11. Annexes.

ANNEXE 1

COMPILATION DE RÉPONSES TOXIQUES DE L'Al CHEZ LE POISSON

Table A1.1. Compilation de réponses toxiques de l'Al chez le poisson (Tiré en partie de Campbell *et al.*, 1992 et d'une communication personnelle avec R. Roy, 1992).

A. Etudes de plusieurs espèces

Genre d'étude	Espèce	[Al] (µM)	pH	[Ligand] et [Ca] (µM)	Résultats	Référence
Laboratoire	*Salvelinus fontinalis* *Catostomus commersoni*	0-18.5	4.4 5.2	[F]=26.3 [citrate]=116 [Ca] = 5-10	Mortalité: Al(OH)n>AlFx; Al(OH)n>>Al-citrate	Baker *et al.*, 1980 Driscoll *et al.*, 1980
Laboratoire	*Salmo salar* *Salvelinus fontinalis*	0-50	4.6 5.5	[Matière humique] = 10 mg L^{-1} [Ca]+[Mg] =10 ou 30 mg L^{-1}	Mortalité attenuée en présence de matières humiques et en présence de ↑[Ca] CL-50(7 j)= (pH 4.6, *S salar*) CL-50(7 j)= (pH 5.5, *S salar*) CL-50(7 j)= (pH 4.6, *S fontinalis*) CL-50(7 j)= (pH 5.5, *S fontinalis*) *S salar* plus sensible que *S fontinalis*	Van Coillie *et al.*, 1983
Laboratoire	*Salmo salar* *Salmo trutta*	1.9-6.7	5.3		Mortalité, ventilation, ions plasmatiques pas proportionelles à Al^{3+} Alevins: TL-50 (pH 5.16, $[Al_{inorg}]$=5.5)=26 h TL-50 (pH 5.29, $[Al_{inorg}]$=4.0)=27 h TL-50 (pH 4.85, $[Al_{inorg}]$=3.2)=41 h TL-50 (pH 4.89, $[Al_{inorg}]$=2.5)=52 h TL-50 (pH 5.18, $[Al_{inorg}]$=2.2)=60 h TL-50 (pH 5.00, $[Al_{inorg}]$=1.6)=89 h ↑production de mucus, ↑de fréquence de tousse, ↑ventilation	Fivelstad et Leivestad, 1984
Terrain	*Salmo salar* *Catostomus commersoni*	7.4	5.1		Hematocrite ↑10%; Na plasmatique ↓17% *S salar* plus sensible que *C commersoni* Sensibilité: *S salar* saumoneau >*S salar* tacons; *S salar* tacons (0+) >*S salar* tacons (1+)	Lacroix, 1985

B. *Salvelinus namycush*

Genre d'étude	[Al] (µM)	pH	[Ligand] et [Ca] (µM)	Résultats	Référence
Laboratoire	0-7	4.4	[Ca]= 100	Toxicité surtout corrélée à [H^+] plutôt que [Al] CL-50 (8 j) = 2 µM	Hutchinson *et al.*, 1989
		4.6		CL-50 (8 j) >11 µM	

C. *Oncorhynchus clarki*

Genre d'étude	[Al] (µM)	pH	[Ligand] et [Ca] (µM)	Résultats	Référence
Laboratoire	2	6.5-4.5	[Ca] = 35	Mortalité augmentée et croissance réduite à 2 µM Al et pH < 6.0	Woodward *et al.*, 1989

D. *Micropterus salmonides*

Genre d'étude	[Al] (µM)	pH	[Ligand] et [Ca] (µM)	Résultats	Référence
Laboratoire	1	4.5 5.0	[Ca] =38-335	Toxicité (mortalité, osmorégulation) d'Al: pH 4.5 >pH 5 TL-50≈65 j (pH 4.5)	McCormick et Jensen, 1992

E. *Micropterus dolomieui*

Genre d'étude	[Al] (µM)	pH	[Ligand] et [Ca] (µM)	Résultats	Référence
Laboratoire	0.2	4.9-6.0	[Ca] =40-48	Mortalité = 0%	Snucins et Shuter, 1991
Terrain	1.3	4.9-6.0	[Ca] =50-78	Mortalité =0-98%	
Terrain	2-8	4.9-6.0	[Ca] =50-78	Mortalité =100%	

F. *Notropis cornutus*

Genre d'étude	[Al] (µM)	pH	[Ligand] et [Ca] (µM)	Résultats	Référence
Laboratoire	10	5.0	[F]= 10 [Ca] = 5	Toxicité: $Al(OH)_n \approx AlF_x$	Kramer et Hummel, 1985
	10	5.0	[F]= 35 [Ca] = 5	Toxicité: $Al(OH)_n > AlF_x$	
	10	5.0	[F]= 50 [Ca] = 5	Toxicité: $Al(OH)_n >> AlF_x$	

G. *Salmo trutta*

Genre d'étude	[Al] (µM)	pH	[Ligand] et [Ca] (µM)	Résultats	Référence
Laboratoire	0-3.7	4.3-6.5	[Ca] = 25	En présence d'Al,pas d'effet de pH sur la croissance; En absence d'Al, effet de pH sur la croissance ↑de la production de mucus	Sadler et Lynam, 198 6
Laboratoire	0-3	5.2	[Ca] = 4-400	Pour [Ca] = 10 µM, CL-50 ≈ 1.2 µM Al_{inorg}	Sadler et Lynam, 1988
Terrain (lac)	4.5	5.4	[Ca] = 12.5	Pour des études en cage: mortalité, diminution significative des ions plasmatiques, stimulation de la production de mucus	Dietrich et Schlatter, 1989
Terrain	2-18.5	v*		Alevins: Mortalité proportionelle à Al monomère et pH CL-50 (28 j) = 0.7 µM $Al_{,mono}$, 2.9 µM Al filtré CL-50 (42 j) = 0.6 µM Al_{mono}, 2.7 µM Al filtré Tacons: CL-50 (28 j) = 3.5 µM Al filtré Mortalité de 100% (18 h) à pH 4.8, 32.6 µM	Weatherley *et al.*, 1990

* variable: conditions naturelles du terrain

H. *Salmo salar*

Genre d'étude	[Al] (µM)	pH	[Ligand] et [Ca] (µM)	Résultats	Référence
Terrain	1.5	5.1	[Ca] = 20	Mortalité observée	Henricksen *et al.*, 1984
Terrain (bioessai)	2.3	4.6	[Ca] = 15	Mortalité de 100% (6 j)	Rosseland et Skogheim, 1984
Laboratoire (eau du lac)	8.4	5.1	[Ca]= 26 µM	[Cl] diminution significative LT-50 = 50-70 h	Rosseland *et al.*, 1986
Terrain	1.9-3.0	5.0	[Ca] = 20	Mortalité observée	Skogheim *et al.*, 1986
	1.4	5.1	[Ca] = 33 Ajout d'acides humiques	Mortalité de 0% Réduction de toxicité en présence d'acides humiques	
Terrain (bioessai)	2.5	4.8	[Ca] = 33	Mortalité de 100% (6 j)	Rosseland et Skogheim, 1986
Terrain (bioessai)	2.2	4.6	[Ca] = 15	Mortalité de 100% (2.5 j)	Rosseland *et al.*, 1986
Terrain (bioessai)	1.4	5.1	[Ca] = 33	Mortalité de 0%	Skogheim et Rosseland, 1986
	2.8	5.1		Mortalité de 100% (TL-50 = 108 h)	
	5.1	4.9		Mortalité de 100% (TL-50 = 38 h)	
	6.6	4.9		Mortalité de 100% (TL-50 = 32 h)	
Laboratoire	2-13	4.8-6.5		Mortalité, Cl plasmatique, Na-K ATPase sont corrélées à [Al]	Leivestad *et al.*, 1987
Laboratoire	0-7	5	[SiO4]= 0-93	Mortalité réduite à Si:Al =13	Birchall *et al.*, 1989
		<4.7	[COD] élevée	Na et Cl plasmatiques corrélés à pH et non [Al]	Lacroix, 1989
Terrain (lac)	0.5-10	4.6-6.3	[COD] élevée [Ca]=20-32	Bioaccumulation, Na et Cl plasmatiques corrélés à Al_{inorg} $Al_{total} >> Al_{inorg}$	Lacroix *et al.*, 1990

H. *Salmo salar (cont.)*

Genre d'étude	[Al] (µM)	pH	[Ligand] et [Ca] (µM)	Résultats	Référence
Terrain (lac)	24 17	4.85 5.24	[COD] = 2-12 mg L^{-1} [Ca] = 1500	Mortalité proportionelle à Al_{inorg} LT-50=24.6 h	Lydersen *et al.*, 1990
Laboratoire (eau du ruisseau)	0 6.7 67	5.0	[COD] =6.8 ou 24 mg L^{-1} [salicylate] =1 ou 10 [citrate]=1.3 ou 13 [oxalate]=4 ou 40 [Ca]=10	Alevins: TL-50 (pH_i =4.8, $[Al_{inorg}]$=6.7) = 12 j TL-50 (pH_i =4.8, $[Al_{inorg}]$=6.7, [salicylate]=1) = 11 j TL-50 (pH_i =4.8, $[Al_{inorg}]$=6.7, [salicylate]=10) = 24 j TL-50 (pH_i =4.8, $[Al_{inorg}]$=6.7, [citrate]=1.3) = 21 j TL-50 (pH_i =4.8, $[Al_{inorg}]$=6.7, [citrate]=13) = >43 j TL-50 (pH_i =4.8, $[Al_{inorg}]$=6.7, [oxalate]=4) = 40 j TL-50 (pH_i =4.8, $[Al_{inorg}]$=6.7, [oxalate]=40) = >43 j Tous les acides organiques synthétiques ont protegé les branchies Al a réduit la croissance des alevins La concentration de l'aluminium inorganique monomère n'a pas été suffisant pour prédire la mortalité des alevins	Peterson *et al.*, 1990
Laboratoire	4.5		[Ca] = 44	Toxicité (mortalité, Na plasmatique, bioconcentration): $Al^{3+}(AlOH)_X$ >AlF_X	Wilkinson *et al.*, 1990
Terrain	8.4 9.1 9.0	6.41 5.64 4.89		Mortalité significative due aux espèces polynucléaires	Poléo *et al.*, 1992

I. *Oncorhynchus mykiss*

Genre d'étude	[Al] (µM)	pH	[Ligand] et [Ca] (µM)	Résultats	Référence
Laboratoire	2.8	4.0 4.5 5.0 5.5 6.1 6.5	[Acides organiques] =8-10 mg L^{-1} [Ca]=1.8-6.1	Toxicité fonction de Al^{3+} pH 4.0-4.5 (+Al): ↓ions plasmatiques pH 6.1 (+Al): ↑ventilation Les acides organiques semblent retarder la reponse physiologique à Al	Neville, 1985
Terrain	16	4.1	[Ca]=40	Pertes d'ions plasmatiques	Harvey et McArdle, 1986
Laboratoire	3.2	5.2	[Ca]=73	CL-50 (120 h) sans pré-exposition = 6.5 µM Pré-exposition (3.2 µM Al) a augmenté (1.8X) la CL-50 (120 h)=11.7 µM Pré-exposition (5.7 µM Al) a augmenté (1.7X) la CL-50 (120 h)=11.0 µM	Orr *et al.*, 1986
Laboratoire	3.7	5	[Ca]=25	Mortalité = 90%; pertes de Na et de Cl (corps) Ajout de 475 µM Ca n'a pas aidé la récupération des poissons	Witters *et al.*, 1987
Laboratoire	4	4.8 5.2	[Ca] =45	CL-50 (30-66 h) = 4 µM CL-50 (30-66 h) > 4 µM	Playle *et al.*, 1989
Terrain	0-10	6.2-4.5		Toxicité surtout corrélée à $[H^+]$ plutôt que [Al] Échec de recruitement	Stansley et Cooper, 1990
Laboratoire	1 4.4	5.2	[Ca] =15	Al et H^+ étaient de puissants antagonistes du Ca^{2+} Modifications de l'épithélium branchiale après exposition à 1 µM Al	Reid *et al.*, 1991

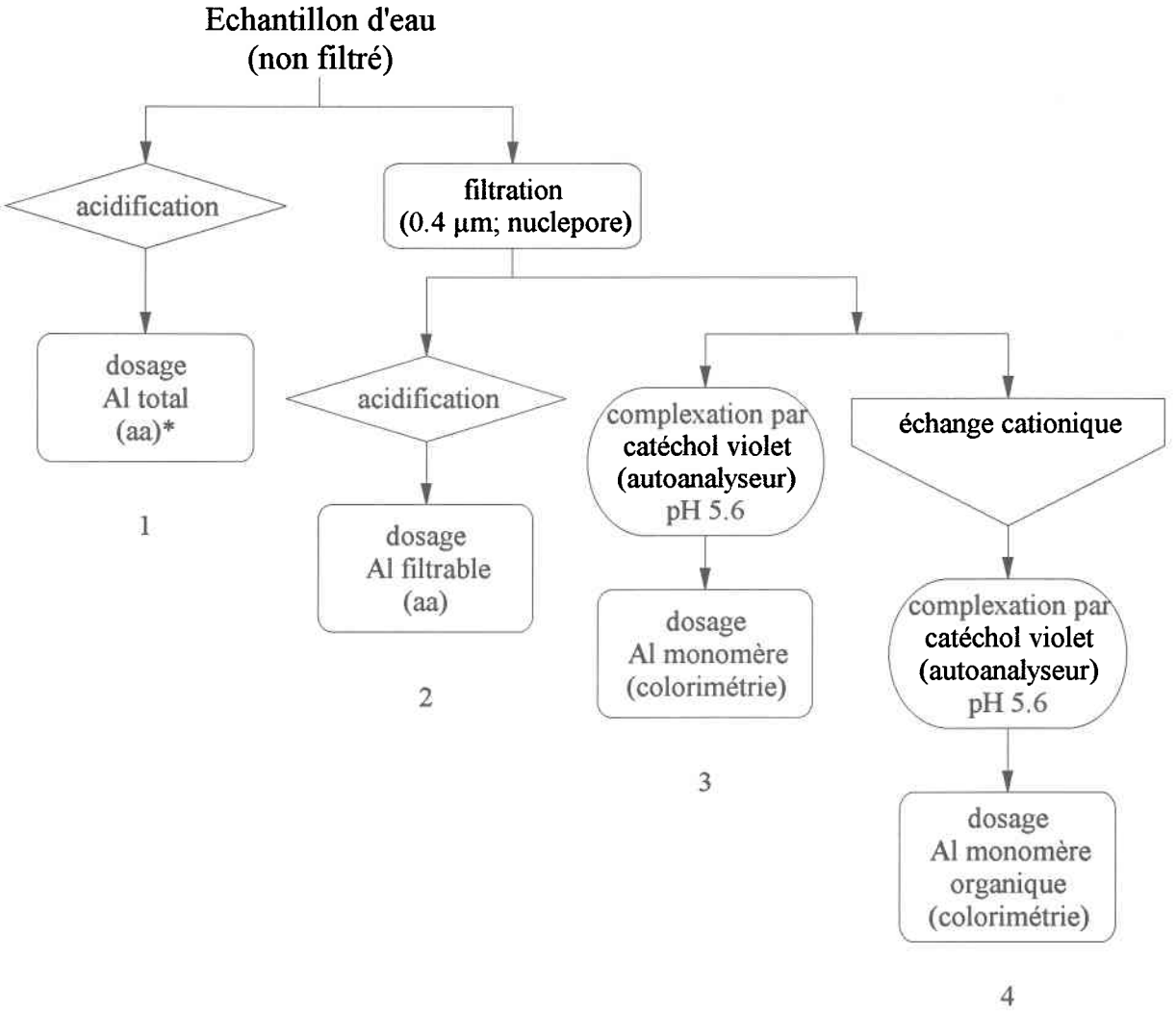
J. *Salvelinus fontinalis*

Genre d'étude	[Al] (µM)	pH	[Ligand] et [Ca] (µM)	Résultats	Référence
	11	4.5 5.5 7.2		Jeunes stades de vie sont plus sensibles Toxicité: pH seul (pH 4.5>5.5>7.2); pH + Al (pH 7.2≈ 5.5>4.5)	Cleveland *et al.*, 1986
Laboratoire	7-44	4.4 4.9		Expositions répétées et discontinues Pour les expositions discontinues, toxicité: pH 4.9>4.4 Pour les expositions répétées, croissance: pH 4.4>4.9	Siddens *et al.*, 1986
Laboratoire	0 4 12 37	4.4 4.8 5.2	[Ca]=12.5 ou 200	Threshold of toxicity: 90% des poissons ayant perdus 4% de la teneur corporelle en Na dans les premières 24 h sont morts L'ajout d'Al a augmenté les pertes de Na corporel	Booth *et al.*, 1988
Laboratoire	0-7	4.2 4.8	[Ca]=100	CL-50 (8 j) = 2 µM CL-50 (8 j) = 2 µM	Hutchinson *et al.*, 1989
Laboratoire	1.9 12.2	5.2 4.6	[Ca]=60 [Ca]=60	Mortalité ≅ 25% (18 j); acclimatation indiquée Mortalité ≅ 100% (18 j)	Mount *et al.*, 1990
Laboratoire	0-47	4.4 4.8 5.2 5.6 6.5	[F]= 0-17 µM [COD]= 0-9.2 ppm [Ca] = 55	Mortalité proportionelle à Al_{inorg}	Parkhurst *et al.*, 1990
Laboratoire	0-9	4.4-5.2		Effet significatif de Ca, pH et Al sur mortalité, poids et histologie des branchies	Ingersoll *et al.*, 1990
Laboratoire	7.5	5.0 6.0 7.2		Al bioconcentration: pH 5>6>7.2	Cleveland *et al.*, 1991
Laboratoire	2.8	5.2	[Ca]=12.5	Acclimatation des poissons attribuée en partie à la production de mucus	Mueller *et al.*, 1991

ANNEXE 2

SCHEMA ANALYTIQUE POUR DETERMINER LA SPECIATION DE L'Al

(adapté de Rogeberg et Henriksen, 1985)



Déductions possibles:

1	Al total
2	Al filtrable = Al dissous
1-2	Al particulaire
3	Al monomère
4	Al monomère organique
2-3	Al polynucléaire
3-4	Al monomère inorganique

*déterminé par l'absorption atomique au four de graphite

ANNEXE 3

METHODOLOGIE DE DIGESTION DES BRANCHIES POUR DETERMINATION D'Al

(Bastille *et al.* 1989)

Des tests ont révélé que certains métaux ne peuvent être dissociés de la matière organique qu'à très haute température. Cela signifie aussi une pression de vapeur plus élevée pour atteindre cette température. Il faut donc être très prudent lors de l'utilisation de cet équipement et bien lire les instructions ci-jointes et celles du fabricant.

Afin de mieux se protéger, le manipulateur doit porter un sarrau, des lunettes ou une visière, des gants propres et des chaussures fermées. L'acide est un puissant corrosif lorsque chauffé.

PROCEDURE DE DIGESTION:

1. Nettoyer la table de travail et y déposer du papier propre.

2. Placer l'échantillon séché dans le contenant de téflon propre et sec (voir lavage des contenants).

3. Ajouter les volumes d'acide nitrique et d'eau requis (voir tableau A2.1).

4. Placer le couvercle et transférer le contenant de téflon dans la bombe. Fermer ensuite le couvercle de la bombe de 1/8 de tour après un contact ferme.

5. Déposer la bombe au centre du plateau du four micro-ondes.

6. Digérer ensuite à 360 Watts (med-low) pendant 30 secondes et vérifier la pression interne (1/64 de pouce vaut 250 psi ou 0,015 po.). Il ne faut pas dépasser 1000 psi. Si la pression n'est pas assez haute, l'on peut ajouter des séquences de 20 secondes supplémentaires tout en vérifiant la pression après chacune d'elles.

Ne pas chauffer plus de 2 minutes consécutives puisqu'une déformation du téflon pourrait s'en suivre.

7. Sortir avec précaution la bombe et la déposer sur la table une dizaine de minutes puis environ 15 minutes dans l'eau froide afin d'abaisser la température du liquide.

8. Ouvrir sous la hotte et manipuler avec précaution la bombe. Sortir le téflon en poussant sous la bombe avec un doigt. Ouvrir ensuite le téflon et vérifier la digestion par la présence d'une couleur jaune pâle à limpide. Si elle n'est pas complète, passer à l'étape 10.

9. Diluer le liquide avec de l'eau Millipore et le transférer dans une bouteille de plastique.

10. Si le fond du téflon n'est pas recouvert de liquide et que l'on peut apercevoir de petites particules, l'on pourra ajouter autant d'eau Millipore que d'acide requis au départ. Bien mélanger et recommencer à l'étape 4.

LAVAGE DES CONTENANTS:

Bien rincer à l'eau Millipore tout le matériel et contenants nécessaires. Les déposer ensuite dans un bain d'eau renfermant 0,5% HNO_3 conc. Aristar pendant 24 heures avant de s'en servir.

Tableau A2.1. Quantités requises d'acide nitrique et d'eau pour effectuer une digestion.

Masse (mg)	Volume HNO_3 (µL)	Volume H_2O (µL)	Facteur (mL/mg)
0.03-0.29	50	50	13-1.3
0.3-0.9	100	100	2.7-0.8
1.0-1.9	150	100	1.2-0.6
2.0-2.9	200	-	0.8-0.6
3.0-4.9	400	-	1.1-0.6
5.0-7.9	600	-	1.0-0.6
8.0-10.0	800	-	1.0-0.6

ANNEXE 4

LE ROLE DE MUCUS DANS LA SORPTION ET LA DIFFUSION DE L'Al

(ALUMINUM DYNAMICS AT THE GILL SURFACE OF ATLANTIC SALMON: ROLE OF MUCUS, Wilkinson, K.J. et P.G.C. Campbell. Soumis: Proceedings of the 9th International conference on heavy metals in the environment)

Mots-clés: Al / F / modèle de l'ion libre / effets biologiques / poisson / saumon atlantique /

L’INRS ne détient pas les droits pour diffuser cette version de l’article. Vous pouvez le consulter à l’adresse suivante :

Wilkinson, K. J. et Campbell, P. G. C.(1993) Aluminium dynamics at the grill surface of Atlantic salmon - role of mucus. Dans: Allan, R.J. et Nriagu, J.O., (Eds.) International Conference on Heavy Metals in the Environment pp. 33-36 Edinburgh : CEP Consultants Ltd