

Université du Québec
INRS-Eau, Terre et Environnement

**MÉCANISMES DE PRISE EN CHARGE ET TOXICITÉ DU CADMIUM EN
PRÉSENCE DE THIOSULFATE CHEZ UNE ALGUE VERTE,
*CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

Par
Frédéric Boily

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

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Jean-Christian Auclair, INRS-ETE

Examineur externe

Danielle Fortin,
Département des Sciences de la Terre
Université d'Ottawa

Directeur de recherche

Peter G. C. Campbell, INRS-ETE

Codirecteur de recherche

Claude Fortin, INRS-ETE

© droits réservés de Frédéric Boily,
2004

*La qualité de la vie d'une personne est en rapport direct avec sa volonté d'exceller,
quel que soit le domaine où elle s'exerce.*

Vince Lombardi

REMERCIEMENTS

L'accomplissement de mes recherches de maîtrise a été possible grâce à la collaboration de plusieurs personnes et je tiens à remercier ces personnes qui m'ont aidé à cheminer sur le plan scientifique.

Tout d'abord, je voudrais remercier tout spécialement mon directeur de recherche, Mr. Peter Campbell, pour la confiance qu'il m'a démontré, pour la qualité de son encadrement et pour ses commentaires constructifs. Je remercie également mon codirecteur de recherche, M. Claude Fortin, pour le travail qu'il a fait précédemment et pour ces nombreuses recommandations qui m'ont permis de réaliser plus facilement cette recherche. Finalement, l'apprentissage du travail en laboratoire avec Amiel Boullemant m'a permis de démarrer ma maîtrise sur des bases solides.

Mes années à l'INRS-ETE ont été des plus agréables grâce aux personnes qu'y ai rencontrées. Je pense particulièrement à Luc Bérubé, Marc-André Bureau, Jean-François Dolbec et Alain Perron, pour ne nommer que ceux-là.

Enfin, je tiens à remercier aussi ma copine, Julie Gingras, pour son sourire, sa compréhension et son appui tout au long de ma maîtrise.

RÉSUMÉ

Le Modèle du Ligand Biotique (BLM) explique généralement la prise en charge, la bioaccumulation et la toxicité des métaux chez les organismes aquatiques. Selon ce modèle, la complexation d'un métal par un ligand devrait provoquer un décroissement des phénomènes mentionnés, comme par exemple la prise en charge du métal. Cependant, certains complexes hydrophiles (ML_n^{\pm}) semblent déroger à cette prédiction. Ces cas d'exception au BLM impliquent souvent des ligands qui sont eux-mêmes assimilables, comme le thiosulfate. Si le thiosulfate se comportait comme un ligand simple, la biodisponibilité du cadmium en sa présence devrait suivre le BLM, c'est-à-dire que l'on devrait pouvoir prédire la bioaccumulation et la toxicité du cadmium comme fonction unique de la concentration de Cd^{2+} libre dans le milieu d'exposition, peu importe que le thiosulfate soit présent ou non. Pour vérifier cette prédiction, nous avons utilisé une algue verte unicellulaire, *Chlamydomonas reinhardtii*, comme organisme cible et un radio-isotope du cadmium (^{109}Cd) comme traceur. Dans un premier temps, nous avons exposé cette algue verte à une concentration fixe de Cd^{2+} (2,75 nM) en présence (1 mM) et en absence de thiosulfate pendant de courtes périodes de temps (< 1 h) et nous avons suivi l'accumulation du cadmium intracellulaire. Les résultats de cette expérience ont montré que l'algue accumule de 1,5 à 2 fois plus de cadmium en présence de thiosulfate qu'en son absence, selon que le sulfate est présent (81 μM) ou absent (0 μM) du milieu, et ce même si la concentration de Cd^{2+} libre était identique dans les trois milieux. À la lumière de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que le complexe CdS_2O_3 puisse entrer dans la cellule algale via un transporteur membranaire de sulfate et de thiosulfate (présent chez toutes les algues vertes) et ainsi offrir une deuxième voie possible pour la prise en charge du cadmium (l'autre voie étant le transporteur cationique). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons fait varier la concentration de sulfate entre 0 et 400 μM pour observer son effet sur la prise en charge du cadmium. Les résultats ont montré que la concentration de sulfate dans le milieu d'exposition a un effet inhibiteur sur la prise en charge du cadmium, mais seulement lorsque le thiosulfate est présent.

Des expériences menées sur une période de 72 h ont confirmé que la prise en charge du cadmium par *C. reinhardtii* était plus élevée en présence du thiosulfate qu'en son absence, et ce pour des concentrations en Cd^{2+} équivalentes dans les milieux avec ou sans thiosulfate. Paradoxalement, selon ces mêmes expériences avec plusieurs concentrations différentes de Cd^{2+} libre, la toxicité du cadmium pour une concentration donnée de Cd^{2+} est atténuée dans les milieux contenant du thiosulfate, même si la concentration intracellulaire de cadmium dans les cellules (après 72 h) est plus élevée dans ces conditions (présence de thiosulfate). Cet effet protecteur du thiosulfate pourrait être expliquée en partie par la persistance du complexe CdS_2O_3 dans le milieu intracellulaire, ce qui limiterait la biodisponibilité interne du Cd accumulé.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
RÉSUMÉ.....	v
TABLES DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xix
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique du cadmium.....	3
1.1.1 Production mondiale et demande en cadmium.....	4
1.1.2 Le cadmium dans l'environnement.....	6
1.1.3 Rejets de cadmium dans l'environnement.....	8
1.2 Spéciation du cadmium en milieu aquatique.....	10
1.2.1 Affinité du cadmium pour le thiosulfate.....	11
1.2.2 Thiosulfate en milieu aquatique.....	12
1.3 Toxicité et bioaccumulation du cadmium.....	14
1.3.1 Les algues.....	14
1.3.2 Les invertébrés.....	16
1.3.3 Les poissons.....	18
1.4 Interactions métaux-algues (Modèle du ligand biotique).....	19
1.4.1 Hypothèses du BLM.....	23
1.4.2 Transport trans-membranaire du Cd.....	26
1.4.2.1 Transporteur membranaire cationique.....	26
1.4.2.2 Transporteur membranaire de sulfate.....	26
1.5 Objectifs et hypothèses.....	28
2. MÉTHODE EXPÉRIMENTALE.....	31
2.1 Algues.....	31
2.2 Milieux de culture et de rinçage.....	32
2.2.1 Préparation des milieux de culture et de rinçage.....	34
2.3 Équipements, produits, réactifs et eau ultra-pure.....	36
2.4 Méthodologie expérimentale générale.....	36
2.4.1 Expériences de cinétique.....	38
2.4.2 Expériences de toxicité.....	39
2.4.2 Dosage du cadmium (^{109}Cd) intracellulaire.....	39
2.5 Calculs théoriques.....	41
2.5.1 Spéciation du cadmium.....	41
2.6 Prise en charge du complexe cadmium-thiosulfate.....	43
2.6.1 Méthodologie expérimentale.....	44
2.6.2 Cinétique d'accumulation à court terme (< 1 h).....	44

2.6.2.1	<i>Préparation des milieux</i>	46
2.6.3	<i>Cinétique d'accumulation à long terme (72 h)</i>	47
2.6.3.1	<i>Préparation des milieux</i>	49
2.7	<i>Toxicité du complexe cadmium-thiosulfate</i>	50
2.7.1	<i>Méthodologie expérimentale</i>	51
2.7.2	<i>Milieux d'exposition pour les expériences avec ou sans thiosulfate</i>	52
2.7.2.1	<i>Préparation des milieux</i>	53
2.8	<i>Calcul du taux de croissance relatif et du rendement relatif</i>	54
2.9	<i>Technique d'échange ionique (TEI)</i>	55
2.9.1	<i>Théorie</i>	56
2.9.2	<i>Équipements, produits et réactifs</i>	58
2.9.3	<i>Méthodologie expérimentale</i>	58
2.9.4	<i>Schématisation expérimentale</i>	60
2.10	<i>Analyses statistiques</i>	60
3.	RÉSULTATS	61
3.1	<i>Cinétique d'accumulation du cadmium</i>	61
3.1.1	<i>Expériences de prise en charge à court terme (< 1 h)</i>	61
3.1.2	<i>Expériences de variation de la concentration de sulfate</i>	62
3.1.3	<i>Expériences de prise en charge à long terme (72 h)</i>	65
3.1.4	<i>Expériences de prise en charge en fonction du cadmium libre calculé</i>	69
3.2	<i>Toxicité du cadmium</i>	70
3.2.1	<i>Résultats exprimés en fonction de la $[Cd^{2+}]$ calculée</i>	75
3.2.1.1	<i>Taux de croissance relatifs</i>	75
3.2.1.2	<i>Rendements relatifs</i>	78
3.2.2	<i>Résultats exprimés en fonction du quota cellulaire</i>	81
3.3	<i>Devenir du cadmium libre en solution sur 72 h</i>	85
4.	DISCUSSION	89
4.1	<i>Difficultés rencontrées durant le projet</i>	90
4.1.1	<i>Survie de l'organisme</i>	90
4.1.2	<i>Limitation à la concentration maximum du cadmium</i>	91
4.1.3	<i>Expériences de longue durée</i>	92
4.2	<i>Interprétations et comparaisons des résultats de prise en charge</i>	95
4.2.1	<i>Prise en charge du complexe cadmium-thiosulfate (< 1 h)</i>	95
4.2.2	<i>Prise en charge du complexe cadmium-thiosulfate (72 h)</i>	100
4.3	<i>Influence des algues sur leur milieu d'exposition</i>	105
4.4	<i>Interprétations et comparaisons des résultats de toxicité</i>	107
4.4.1	<i>Résultats exprimés en fonction du Cd^{2+}</i>	107
4.4.2	<i>Résultats exprimés en fonction des quotas cellulaires de Cd</i>	110
4.4.3	<i>Explication de l'effet protecteur apparent du thiosulfate</i>	110
4.5	<i>Retour sur nos hypothèses</i>	111
5.	CONCLUSION	113
6.	BIBLIOGRAPHIE	117

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1.1 : Émissions anthropiques mondiales de cadmium en 1983 en en 1995 (tiré de Pacyna et Pacyna, 2001).</u>	9
<u>Tableau 1.2 : Toxicité du cadmium chez différentes espèces d'algue, tel que rapportée dans la littérature (tiré du rapport EPA-822-R-01-001 du US EPA, 2001).</u>	15
<u>Tableau 1.3 : Toxicité du cadmium chez différentes espèces d'invertébré, tel que rapportée dans la littérature (toxicité aiguë) (tiré du rapport EPA-822-R-01-001 du US EPA, 2001).</u>	17
<u>Tableau 1.4 : Bioaccumulation de cadmium chez différentes espèces d'invertébré (tiré du rapport EPA-822-R-01-001 du US EPA, 2001).</u>	18
<u>Tableau 1.5 : Toxicité du cadmium chez différentes espèces de poisson, tel que rapportée dans la littérature (toxicité aiguë) (tiré du rapport EPA-822-R-01-001 du US EPA, 2001).</u>	19
<u>Tableau 2.1 : Concentrations molaires des cations et anions qui composent les milieux de culture (MHSM-1) et de rinçage (MHSM-R1, MHSM-R2 et MHSM-R3). Le pH était maintenu à 7 dans ces trois milieux.</u>	33
<u>Tableau 2.2 : Composition et concentrations des solutions mères utilisées pour la préparation des milieux MHSM-1, MHSM-R1, MHSM-R2 et MHSM-R3.</u>	35
<u>Tableau 2.3 : Volumes de solutions mère utilisées pour la préparation des milieux MHSM-1, MHSM-R1, MHSM-R2 et MHSM-R3.</u>	35
<u>Tableau 2.4 : Constantes de formation utilisées avec le Cd et le proton pour effectuer les calculs de spéciation ($I = 0$).</u>	42
<u>Tableau 2.5 : Conditions d'exposition au cadmium pour l'expérience de cinétique (< 1 h).</u>	45
<u>Tableau 2.6 : Conditions d'exposition pour les expériences de prise en charge en fonction de la concentration de SO_4^{2-}.</u>	46
<u>Tableau 2.7 : Compositions chimiques et concentrations des milieux E_1 à E_6 et F_1 à F_6. Concentration en Cd^{2+} constante à 2,75 nM dans tous les milieux.</u>	47

<u>Tableau 2.8 : Conditions d'exposition pour les expériences de prise en charge après 72 h dans les milieux d'exposition avec ou sans thiosulfate.</u>	48
<u>Tableau 2.9 : Conditions d'exposition pour les expériences sur le suivi de la [Cd²⁺] et la [Cd_T] sur 72 h dans les milieux d'exposition avec ou sans thiosulfate.</u>	49
<u>Tableau 2.10 : Conditions d'exposition pour l'expérience de toxicité du cadmium en absence de thiosulfate (EDTA seulement).</u>	53
<u>Tableau 2.11 : Conditions d'exposition pour l'expérience de toxicité du cadmium en présence de thiosulfate (thiosulfate-EDTA).</u>	54
<u>Tableau 3.1 : Résultats de l'ANOVA pour la prise en charge du Cd par <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> à pH 7 (figure 3.1). Les différences significatives (P < 0,05) sont représentées par un signe +, sinon on note -.</u>	62
<u>Tableau 3.2 : Résultats de l'ANOVA sur l'effet de la concentration ambiante de sulfate sur la prise en charge de cadmium par <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> lorsque les milieux d'exposition contiennent du thiosulfate (figure 3.3). Les différences significatives (P < 0,05) sont représentées par un signe +, sinon on note -.</u>	65
<u>Tableau 3.3 : Résultats de l'ANOVA pour la prise en charge de cadmium par <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> à pH 7 (figure 3.4). [Cd²⁺] = 0,01 µM. Les différences significatives (P < 0,05) sont représentées par un signe +, sinon on note -.</u>	66
<u>Tableau 3.4 : Résultats de l'ANOVA pour la prise en charge de cadmium par <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> à pH 7 (figure 3.5). [Cd²⁺] = 1 µM. Les différences significatives (P < 0,05) sont représentées par un signe +, sinon on note -.</u>	68
<u>Tableau 3.5 : Résultats de l'ANOVA pour la prise en charge de cadmium par <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en fonction de la concentration en cadmium libre en solution (figure 3.6). Les différences significatives (P < 0,05) sont représentées par un signe +, sinon on note -.</u>	70
<u>Tableau 3.6 : Valeurs de CE calculées pour les rendements relatifs dans les milieux avec ou sans thiosulfate. Valeurs exprimées en cadmium libre ± écart-type (N = 3).</u>	80

<u>Tableau 3.7 : Valeurs de CE calculées pour les rendements relatifs dans les milieux avec ou sans thiosulfate. Valeurs exprimées en quota cellulaire de Cd, \pm écart-type (N = 3).</u>	85
<u>Tableau 4.1 : Comparaison entre des $[Cd^{2+}]_{mesurées}$ par une technique d'échange ionique et des $[Cd^{2+}]_{calculées}$ avec le modèle de spéciation chimique MINEQL+.</u>	93
<u>Tableau 4.2 : Comparaison entre les $[Cd^{2+}]_{mesurées}$ par une technique d'échange ionique (TÉI) et les $[Cd^{2+}]_{calculées}$ avec MINEQL+ lors de l'expérience (72 h) sans thiosulfate. La [EDTA] était constante à $1,5 \times 10^{-5}$ M. La $[Cd^{2+}]_{mesurée}$ est la moyenne de deux mesures.</u>	94
<u>Tableau 4.3 : Comparaison entre les $[Cd^{2+}]_{mesurées}$ par une technique d'échange ionique (TÉI) et les $[Cd^{2+}]_{calculées}$ avec MINEQL+ lors de l'expérience (72 h) avec thiosulfate. La [EDTA] était constante à $1,5 \times 10^{-5}$ M et celle du thiosulfate à 1×10^{-3} M. La $[Cd^{2+}]_{mesurée}$ est la moyenne de deux mesures.</u>	94
<u>Tableau 4.4 : Valeurs de vitesse d'accumulation (V_{max}) et de demi-saturation (K_m) pour les milieux sans thiosulfate.</u>	103

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1.1 :</u>	<u>Production canadienne de cadmium affiné à partir de minerais canadiens et étrangers ainsi qu'à partir de métaux recyclés. Données provenant de Ressources naturelles Canada.</u>	5
<u>Figure 1.2 :</u>	<u>Utilisation mondiale du cadmium selon l'International Cadmium Association. La masse totale de cadmium utilisée en 2000 étant de 17,9 Mt.</u>	6
<u>Figure 1.3 :</u>	<u>Spéciation de cadmium selon la concentration de thiosulfate calculée à l'aide du logiciel MINEQL+ 4.5 en utilisant un concentration totale de Cd de 1 μM à pH 7,0 en milieu ouvert à l'atmosphère.</u>	12
<u>Figure 1.4 :</u>	<u>Modèle schématique illustrant le rôle du thiosulfate dans le cycle d'oxydoréduction théorique du soufre.</u>	13
<u>Figure 1.5 :</u>	<u>Représentation conceptuelle des interactions métaux-organismes. M^{z+} = ion libre ; ML = métal complexé ; L^{z-} = ligand (acide aminé, citrate, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, CO_3^{2-}, Cl^-) ; M-X = métal complexé à la surface (modifié de Campbell, 1995).</u>	23
<u>Figure 1.6 :</u>	<u>Représentation conceptuelle du transport trans-membranaire de métaux non-essentiels comme le Cd. La voie I représente un système de transport de métaux essentiels comme le Ca, la Cu et le Zn. La voie II représente un système de transport d'acides aminés ou d'anions ($\text{Y} = \text{Cl}^-$, CO_3^{2-}, SO_4^{2-} ou $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$). La voie III représente la diffusion passive de complexes lipophiles (modifié de Fortin, 2000 ; Thèse de doctorat).</u>	26
<u>Figure 2.1 :</u>	<u>Courbe de croissance typique de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.</u>	31
<u>Figure 2.2 :</u>	<u>Schéma expérimental de la technique d'échange ionique (TÉI).</u>	60
<u>Figure 3.1 :</u>	<u>Prise en charge du cadmium en fonction du temps à une concentration de Cd^{2+} constante à 2,75 nM. Le milieu (■) représente la prise en charge en présence de thiosulfate (1 mM) mais en absence de sulfate. Le milieu (▲) représente la prise en charge en présence de thiosulfate (1 mM) et de sulfate (81 μM). Le milieu (●) représente la prise en charge en présence de sulfate et de NTA (100 nM) mais en absence de thiosulfate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.</u>	61

<u>Figure 3.2 :</u>	<u>Prise en charge du cadmium à concentration constante de Cd^{2+} (2,75 nM) et à concentration variable de sulfate (en absence de thiosulfate). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.</u>	63
<u>Figure 3.3 :</u>	<u>Effet de la concentration ambiante de sulfate dans les milieux d'exposition avec thiosulfate sur la prise en charge du cadmium à concentration constante de Cd^{2+} (2,75 nM). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. La ligne pointillée représente la courbe de tendance sur l'ensemble des valeurs moyennes.</u>	64
<u>Figure 3.4 :</u>	<u>Prise en charge du cadmium en fonction du temps à une concentration de Cd^{2+} initiale constante (0,01 μM). Le milieu (●) représente la prise en charge lorsque la $[Cd_T] = 12,1 \mu$M et que le milieu est tamponné avec une $[EDTA] = 1,5 \times 10^{-5}$ M. Le milieu (○) représente la prise en charge lorsque la $[Cd_T] = 12,2 \mu$M et que le milieu est tamponné avec un mélange thiosulfate-EDTA ($[S_2O_3^{2-}] = 1$ mM et $[EDTA] = 1,5 \times 10^{-5}$ M). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.</u>	66
<u>Figure 3.5 :</u>	<u>Prise en charge du cadmium en fonction du temps à une concentration de Cd^{2+} constante. Le milieu (●) représente la prise en charge lorsque la $[Cd_T] = 15,4 \mu$M, la $[Cd^{2+}] = 1,05 \mu$M et que le milieu est tamponné avec une $[EDTA] = 1,5 \times 10^{-5}$ M. Le milieu (○) représente la prise en charge lorsque la $[Cd_T] = 22,2 \mu$M, la $[Cd^{2+}] = 1,08 \mu$M et que le milieu est tamponné avec un mélange thiosulfate-EDTA ($[S_2O_3^{2-}] = 1$ mM et $[EDTA] = 1,5 \times 10^{-5}$ M). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.</u>	68
<u>Figure 3.6 :</u>	<u>Prise en charge du cadmium après 72 h en fonction de la concentration de Cd^{2+} mesurée avec MINEQL+ lorsque $[Cd_T]_{nominale}$ est variable. Le milieu (●) représente la prise en charge lorsque le milieu est tamponné avec une $[EDTA] = 1,5 \times 10^{-5}$ M. Le milieu (○) représente la prise en charge lorsque le milieu est tamponné avec un mélange thiosulfate-EDTA ($[S_2O_3^{2-}] = 1$ mM et $[EDTA] = 1,5 \times 10^{-5}$ M). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.</u>	69

- Figure 3.7 : Effet du Cd^{2+} libre sur la croissance de *C. reinhardtii* (logarithme naturel de la densité cellulaire en fonction du temps) lorsque les milieux d'exposition sont tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). (+) témoin, (-) témoin avec ligand, (■) = 0,010 μM Cd^{2+} libre, (▲) = 0,088 μM , (◆) = 0,30 μM , (×) = 0,76 μM , (●) = 1,05 μM . Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL+..... 72
- Figure 3.8 : Effet du Cd^{2+} libre sur la croissance de *C. reinhardtii* (logarithme naturel de la densité cellulaire en fonction du temps) lorsque les milieux d'exposition sont tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et du thiosulfate (1×10^{-3} M (+) témoin, (-) témoin avec ligand, (□) = 0,011 μM Cd^{2+} libre, (Δ) = 0,091 μM , (◇) = 0,31 μM , (×) = 0,77 μM , (○) = 1,08 μM . Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL+..... 75
- Figure 3.9 : Taux de croissance relatif (μ/μ_0) de *C. reinhardtii* entre 5 et 24 h en fonction du Cd^{2+} libre en solution calculée avec MINEQL+ lorsque $[Cd_T]_{nominale}$ est variable. μ = taux de croissance pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; μ_0 = taux de croissance du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures..... 76
- Figure 3.10 : Taux de croissance relatif (μ/μ_0) de *C. reinhardtii* entre 24 et 29 h en fonction du Cd^{2+} libre en solution calculée avec MINEQL+ lorsque $[Cd_T]_{nominale}$ est variable. μ = taux de croissance pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; μ_0 = taux de croissance du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures..... 77

Figure 3.11 : Taux de croissance relatif (μ/μ_0) de *C. reinhardtii* entre 29 et 48 h en fonction du Cd^{2+} libre en solution calculée avec MINEQL+ lorsque $[\text{Cd}_T]_{\text{nominale}}$ est variable. μ = taux de croissance pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; μ_0 = taux de croissance du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Le signe (*) représente les points où il y a une inhibition significative. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.....78

Figure 3.12a : Rendement relatif (R/R_0) de *C. reinhardtii* après 72 h en fonction du Cd^{2+} libre en solution calculée avec MINEQL+ lorsque $[\text{Cd}_T]_{\text{nominale}}$ est variable. R = rendement pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; R_0 = rendement du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les points encadrés sont significativement différents (verticalement). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.1^{er} essai.....79

Figure 3.12b : Rendement relatif (R/R_0) de *C. reinhardtii* après 72 h en fonction du Cd^{2+} libre en solution calculée avec MINEQL+ lorsque $[\text{Cd}_T]_{\text{nominale}}$ est variable. R = rendement pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; R_0 = rendement du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les points encadrés sont significativement différents (verticalement). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.2^{ème} essai.....80

Figure 3.13 : Taux de croissance relatif (μ/μ_0) de *C. reinhardtii* entre 5 et 24 h en fonction du quota cellulaire du Cd. μ = taux de croissance observé pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; μ_0 = taux de croissance du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.....81

- Figure 3.14 : Taux de croissance relatif (μ/μ_0) de *C. reinhardtii* entre 24 et 29 h en fonction du quota cellulaire du Cd. μ = taux de croissance observé pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; μ_0 = taux de croissance du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. 82
- Figure 3.15 : Taux de croissance relatif (μ/μ_0) de *C. reinhardtii* entre 29 et 48 h en fonction du quota cellulaire du Cd. μ = taux de croissance observé pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; μ_0 = taux de croissance du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. 82
- Figure 3.16a : Rendement relatif (R/R_0) de *C. reinhardtii* après 72 h en fonction du quota cellulaire du Cd. R = rendement observé pour un quota cellulaire donné ; R_0 = rendement du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les points encadrés sont significativement différents (verticalement). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. 1^{er} essai 84
- Figure 3.16b : Rendement relatif (R/R_0) de *C. reinhardtii* après 72 h en fonction du quota cellulaire du Cd. R = rendement observé pour un quota cellulaire donné ; R_0 = rendement du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les points encadrés sont significativement différents (verticalement). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. 2^{ème} essai 84

<u>Figure 3.17 :</u>	<u>Pourcentage de diminution du Cd libre en solution en fonction du temps. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). La concentration initiale de cadmium libre était de $0,01 \mu\text{M}$ et la concentration initiale en Cd dissous était de $12,1$ à $15,4 \mu\text{M}$. Les signes (*) représentent les points où il y a une diminution significative. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.</u>	86
<u>Figure 4.1 :</u>	<u>Modèle conceptuel du transport du Cd chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en présence de thiosulfate.</u>	100
<u>Figure 4.2 :</u>	<u>Comparaison entre la prise en charge de cadmium mesurée (●) et calculée (○) après 72 h lorsque le milieu ne contient pas de thiosulfate (<i>C. reinhardtii</i> : temps d'exposition de 72 h).</u>	104
<u>Figure 4.3 :</u>	<u>Prise en charge du cadmium provenant du complexe CdS_2O_3 en fonction du ratio des concentrations de thiosulfate libre et du complexe cadmium-thiosulfate (voir le texte pour les détails du calcul de la contribution du complexe $\text{Cd-S}_2\text{O}_3$ à la prise en charge totale du Cd). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.</u>	105

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ANOVA :	Analyse de variance à une voie
BLM :	Modèle du ligand biotique
CE ₃₀ :	Concentration effective sur 30 % de la population testée
CE ₅₀ :	Concentration effective sur 50 % de la population testée
CPM :	Comptes par minute
DPM :	Désintégrations par minute
EDTA :	Acide éthylènediamine-tétraacétique
HDPE :	Polyéthylène à haute densité
HEPES :	Acide N-2-hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthanesulfonique
HSM :	<i>High salt medium</i>
I :	Force ionique
IARC :	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IUPAC :	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K :	Constante d'équilibre chimique
K _m :	Constante de demi-saturation
L :	Ligand
M ^{z+} :	Ion métallique libre
MHSM :	<i>Modified high salt medium</i>
MIL :	Modèle de l'ion libre
ML :	Métal complexé
ML _n ⁰ :	Complexe neutre lipophile
ML _n [±] :	Complexe hydrophile
NIST :	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NRCAN :	<i>Natural Resources Canada</i>
NTA :	Acide nitrilotriacétique
OCDE :	<i>Organisation de coopération et de développement économiques</i>
PP :	Polypropylène
PTFE :	Polymère de tétrafluoroéthylène
PVC :	Polychlorure de vinyle
TFE :	Tétrafluoroéthylène
USEPA :	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USGS :	<i>United States Geological Survey</i>
UTCC :	<i>University of Toronto Culture Collection</i>
V _{max} :	Vitesse maximale d'entrée
W :	<i>Wild</i>
WL :	<i>Wall-less</i>
WT :	<i>Wild type</i>

1. Introduction

La dégradation de notre environnement et les contaminants menant à cette détérioration environnementale sont étudiés depuis plusieurs décennies. Depuis le début de cette prise de conscience, les contaminants sont considérés selon deux groupes distincts, soit les inorganiques (~ 80 métaux et métalloïdes selon le Tableau Périodique des Éléments) et les organiques. Dans le cadre de cette recherche, nous nous sommes attardés seulement à un métal, soit le cadmium. Tout d'abord, il faut noter que, contrairement aux composés organiques, les métaux sont naturellement présents dans la croûte terrestre et que l'on ne peut ni les créer, ni les détruire. De plus, les métaux ne sont pas sujets à la biodégradation, mais peuvent subir des transformations réversibles (changements de spéciation, c'est-à-dire modification de l'état redox, complexation, précipitation, adsorption, assimilation, etc.). Les métaux ne sont pas tous néfastes pour l'environnement et plusieurs sont même indispensables pour la vie biologique (notamment le cuivre (Cu), le cobalt (Co), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le nickel (Ni) et le zinc (Zn)). L'assimilation de ces métaux essentiels par les organismes vivants implique généralement la prise en charge de formes hydrophiles par des systèmes de transport constitutifs. Toutefois, certains métaux non-essentiels (argent (Ag), cadmium (Cd), plomb (Pb), mercure (Hg), etc.) peuvent aussi entrer dans les organismes via les différents mécanismes de prise en charge. La régulation de la concentration interne des différents métaux essentiels s'effectue par plusieurs mécanismes efficaces (contrôle homéostatique) développés par les organismes. Dans un contexte écotoxicologique, tous les métaux, essentiels ou non, présents dans le Tableau Périodique des Éléments peuvent être classifiés en trois catégories (adapté de Wood, 1976 ; Campbell *et al.*, 1985) :

Éléments inoffensifs (A)

Calcium (Ca)
Fer (Fe)
Potassium (K)
Lithium (Li)
Magnésium (Mg)
Manganèse (Mn)
Sodium (Na)

Éléments très toxiques et relativement accessibles (B)

Argent (Ag)
Aluminium (Al)
Arsenic (As)
Cadmium (Cd)
Cobalt (Co)
Chrome (Cr)
Cuivre (Cu)¹
Mercure (Hg)
Nickel (Ni)¹
Plomb (Pb)
Zinc (Zn)¹

¹ Lorsque leur concentration est élevée.

Éléments insolubles ou très rares (C)

Baryum (Ba)
Gallium (Ga)
Indium (In)
Lanthane (La)
Titane (Ti)

En milieu aquatique, la spéciation de certains métaux non-essentiels de la classe (B) (notamment l'Ag et le Cd) est fortement influencée par la matière organique dissoute et par certains ligands inorganiques (comme le thiosulfate). La spéciation des métaux toxiques joue un rôle important sur leur toxicité (voir section 1.4). Selon le modèle de l'ion libre, la toxicité d'un métal face à un organisme cible dépend uniquement de la concentration de sa forme libre ($[M^{z+}]$) en solution (Morel,1983). Le phytoplancton est un organisme unicellulaire simple qui en fait

un bon modèle d'étude lors d'expérimentations en laboratoire qui ont pour but de démystifier les mécanismes de prise en charge et d'observer les effets des métaux toxiques sur un organisme aquatique. L'utilisation de ces organismes est pertinente en raison de leur rôle de producteurs primaires. De plus, il est facile d'obtenir rapidement une grande quantité de cellules en laboratoire. Nous avons utilisé pour cette recherche l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.

1.1 Problématique du cadmium

D'un point de vue écotoxicologique, le cadmium a été classifié dans la catégorie des éléments très toxique et relativement accessible au même titre que l'argent, le zinc, le mercure et le plomb (Wood, 1976). Le Cd a une grande affinité pour plusieurs ligand que l'on peut retrouver en milieu aquatique, par exemple le soufre sous forme de « thiol ». La préférence du Cd pour les différents atomes donneurs suit l'ordre suivant : $S > I > Br > Cl = N > O > F$, et $NH_3 > H_2O$. Ce métal est aussi considéré comme non essentiel et intervient très rarement dans les processus biologiques chez les plantes ou les animaux. Cependant, chez la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii*, Lee *et al.* (1995) ont observé que le cadmium pouvait remplacer partiellement le zinc comme nutriment et ainsi intervenir dans la croissance de cet organisme. La nature problématique du cadmium, en tant que contaminant environnemental, provient de sa toxicité inhérente et de la persistance des dépositions atmosphériques ou autres sources anthropiques dans les sédiments lacustres et océaniques (von Gunten *et al.*, 1997 ; Kähkönen *et al.*, 1998 ; Lorey et Driscoll, 1999). Une fois enfoui dans les sédiments, le cadmium peut retourner à l'interface sédiment-eau par diffusion (Van Den Berg *et al.*, 1999), par la resuspension des sédiments (ten Hulsher *et al.*, 1992) ou par bioturbation (Wilson et Chang, 2000). Une fois à l'interface sédiment-eau, le métal peut diffuser dans la colonne d'eau et peut plus facilement être transporté et entrer dans la chaîne alimentaire. Des sources ponctuelles, comme les processus miniers, les eaux de ruissellement en zone minière et les effluents urbains, contribuent à la problématique environnementale du cadmium. En plus de contaminer en Cd, ces

sources ponctuelles contiennent parfois du thiosulfate (voir section 1.2.2), l'autre variable que nous allons étudier dans cette recherche. Comme la formation du complexe hydrophile cadmium-thiosulfate est susceptible de se produire en milieu perturbé, il est important d'étudier l'effet que ce complexe peut avoir sur la biodisponibilité du Cd. En déterminant les effets de cette complexation sur l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, nous pourrions peut-être extrapoler les effets sur l'ensemble des organismes primaires de la chaîne alimentaire aquatique.

1.1.1 Production mondiale et demande en cadmium

Comme les gisements de cadmium ne se retrouvent pas en quantité suffisante pour justifier une exploitation minière, la production de ce métal provient principalement (85-90 %) des sous-produits d'activité minière, de fonderie et de raffinage de minerais riches en zinc, plomb ou cuivre. Le pourcentage restant de sa production (10-15%) résulte du recyclage du fer et de l'acier. Entre 1950 et 1990, la production mondiale de cadmium s'est accrue d'un facteur 4 passant de ~5000 à ~20 000 t•an⁻¹ (USGS, 2004). Depuis 1990, la production annuelle s'est stabilisée à ~20 000 t•an⁻¹. Au Canada (voir la figure 1.1), la production totale de cadmium, provenant à la fois de minerai de zinc et de métaux recyclés, a suivi la tendance mondiale entre 1975 et 2001. Cependant, depuis 1995, la production canadienne a diminué de 17 % (NRCAN, 1995). Cette diminution s'est effectuée au profit des pays d'Asie (Chine et Corée du Sud).

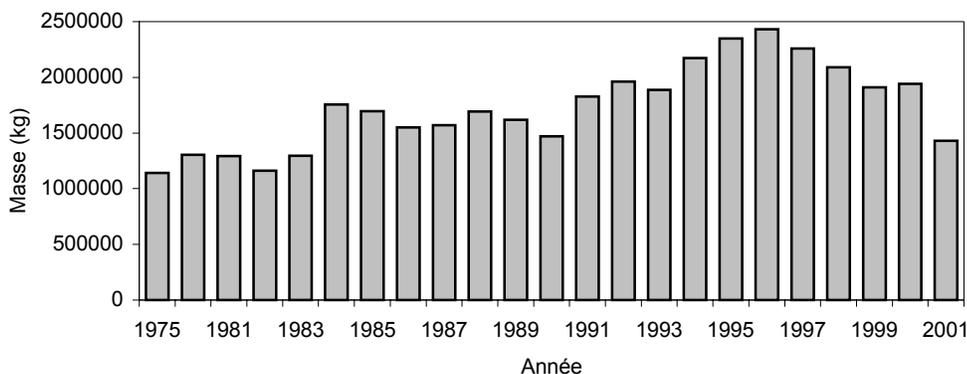


Figure 1.1 : Production canadienne de cadmium affiné à partir de minerais canadiens et étrangers ainsi qu'à partir de métaux recyclés. Données provenant de Ressources naturelles Canada.

Les 5 principaux pays producteurs de cadmium sont le Japon (13%), les États-Unis (10 %), la Corée du Sud (10%), la Chine (11 %) et le Canada (10 %) (les valeurs indiquent le rapport relatif de la production d'un pays sur l'ensemble de la production mondiale pour l'année 2000 ; NRCAN, 2001). De tous ces pays, seul le Canada a diminué sa part de marché entre 1995 et 2001 (de 12 % en 1995 à 10 % en 2001). Les États-Unis est le pays ayant connu la meilleure croissance de sa part de marché pour la même période (+ 4 %).

Entre 1995 et 2000, ~90 % du cadmium produit annuellement était utilisé. Des pays utilisateurs de cadmium, le Japon est celui qui l'emploie le plus avec > 35 % de l'utilisation mondiale. Pour ce qui est du Canada, notre usage du cadmium est minime avec < 1 % de l'utilisation globale. Le Cd est principalement utilisé pour la fabrication des piles nickel-cadmium et argent-cadmium qui sont rechargeable (accumulateur) ainsi que dans revêtements anticorrosion appliqués sur le fer et l'acier (enduit appliqué sur les navires ou en aérospatiale). Le Cd est aussi utilisé pour produire les pigments jaune et rouge dans les verres et les plastiques, comme stabilisateur du polychlorure de vinyle (PVC) pour le protéger contre la dégradation attribuable aux produits chimiques, à la lumière du soleil ou à la chaleur, et dans certains alliages métalliques (voir la figure 1.2).

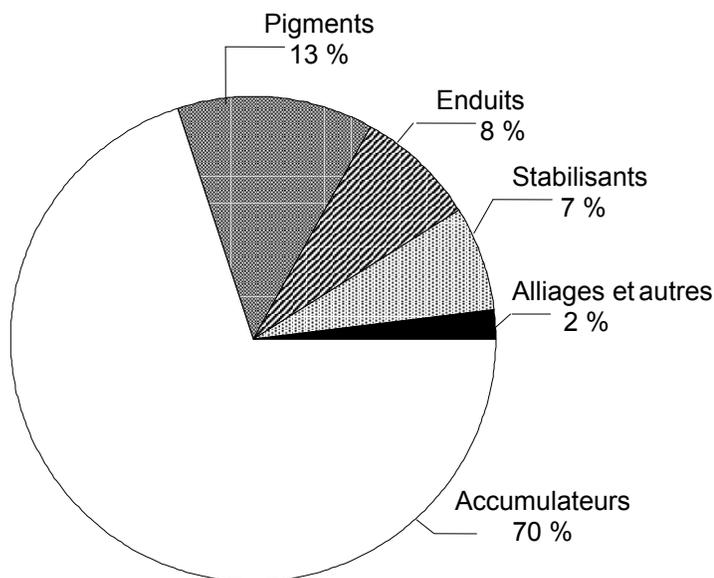


Figure 1.2 : Utilisation mondiale du cadmium selon l'International Cadmium Association. La masse totale de cadmium utilisée en 2000 étant de 17,9 Mt.

1.1.2 Le cadmium dans l'environnement

Le Cd est un métal blanc argenté, ductile et malléable que l'on retrouve naturellement dans la croûte terrestre à des concentrations variant entre 0,1 et 11 mg•kg⁻¹ (Vig *et al.*, 2003) avec une moyenne de 0,2 mg•kg⁻¹ (Lindsay, 1979). En excluant les masses d'eau douce, la commission géologique du Canada a calculé que le premier mètre de roche de la croûte terrestre contenait 4 950 000 t de cadmium. La grande variabilité de la concentration de cadmium dans les sols non altérés par l'activité humaine dépend grandement de l'origine minérale du sol. Par exemple, Eisler (1985) a déterminé que la concentration de cadmium pouvait être 450 fois plus élevée dans les sols d'origine volcanique comparativement à ceux d'origine non volcanique. Ce métal est principalement répandu dans les zones où l'on exploite les minerais zincifères et il se retrouve principalement sous forme de greenockite (CdS) (NRCAN, 2001). Pour chaque tonne de zinc affiné, on obtient en moyenne 3 kg de cadmium comme sous-produit. Il a aussi été démontré que pour une zone minière cible dont on connaissait la concentration de cadmium dans le sol avant la perturbation humaine, la concentration moyenne en cadmium était ~ 3 fois

plus élevée que la concentration dite de fond après l'activité minière (Kempler et Sommer., 2002). Des concentrations en Cd de plus de $800 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ont aussi été observées dans le sol de certains sites pollués, soit un facteur de concentration de 4000 par rapport à la concentration moyenne (IARC, 1993).

Dans l'eau interstitielle de sols qui ne sont pas perturbés par des apports anthropiques, la concentration en cadmium totale ($[\text{Cd}]_T$) est généralement comprise entre $0,3$ et $23 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Helmke, 1999). Cette $[\text{Cd}]_T$ dépend beaucoup des propriétés du sol. Par exemple, dans les sols servant à l'agriculture et qui sont peu sablonneux, la concentration de Cd_T que l'on retrouve en solution excède rarement $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Kookana *et al.*, 1999). Généralement, la concentration du cadmium total dissous augmente avec la force ionique et la concentration de carbone organique dissous (Fotovat et Naidu, 1998).

Dans l'atmosphère, la concentration totale en cadmium que l'on y retrouve est généralement inférieure à $1 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$. Cependant, sa concentration est largement supérieure en zones urbaine et minière atteignant $40 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$, soit 40 fois plus que le bruit de fond habituel (Davidson *et al.*, 1985 ; Eisler, 1985 et Elinder, 1985). Le Cd atmosphérique est fréquemment lié aux petites particules produites par les processus de combustion (source principale des rejets atmosphériques). Les principales formes chimiques de cadmium, que l'on retrouve dans l'air, sont les oxydes de cadmium et les chlorures de cadmium qui sont formés durant l'incinération (IARC, 1993). Ces composés sont stables et ne subissent aucune transformation chimique durant leur dispersion par le vent.

Le Cd est aussi présent de façon naturelle dans les milieux aquatiques. En zone non perturbée par des sources anthropiques, la concentration moyenne de cadmium est de $2,7 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ dans les sédiments (Mason et Moore, 1982). En milieu marin, la gamme de $[\text{Cd}]$ se situe entre $0,9$ et $9,0 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ (Thornton, 1992). Lorsque des sources externes perturbent l'apport naturel en cadmium, comme c'est le cas sur le réservoir Patroon dans l'État de New York, la concentration moyenne peut atteindre

10 nmol•g⁻¹, soit un facteur d'enrichissement ~ 6 (Arnason et Fletcher, 2003). Dans une zone très industrialisée de la Baie de Newark, au New Jersey, Bonnevie *et al.* (1994) ont observé une concentration moyenne de cadmium de 89 ± 53 nmol•g⁻¹ (concentration maximale de 260 nmol•g⁻¹) dans les sédiments de surface. Dans les sédiments du lac Tantaré, Alfaro De la Torre et Tessier (2002) ont mesuré une concentration maximale de cadmium de 34,3 nmol•g⁻¹. Dans les eaux douces, la concentration de cadmium dissous est généralement comprise entre 0,09 et 4,4 nmol•L⁻¹ (Shiller et Boyle, 1987). Pour ce qui est des milieux océaniques, Elinder (1992) a démontré que la concentration moyenne de cadmium sur l'ensemble du profil était comprise entre 0,2 et 0,9 nmol•L⁻¹, les plus faibles concentrations étant observées en surface et les plus élevées en profondeur.

1.1.3 Rejets de cadmium dans l'environnement

Le Cd peut être libéré dans l'environnement de façon naturelle et anthropique. Les principales sources de mobilisation naturelle du cadmium sont l'activité volcanique, l'érosion rocheuse et les feux de forêt. En 1983, les émissions atmosphériques provenant des volcans étaient estimées entre 140 et 1500 t•an⁻¹ tandis que les émissions totales naturelles se situaient entre 150 et 2600 t•an⁻¹ (Nriagu, 1989). Les émissions naturelles étaient évaluées à 15 % des émissions totales, qui se situaient entre 3200 et 15 000 t•an⁻¹ (sources naturelles et anthropiques). La réduction de la mobilisation du cadmium est par contre encourageante puisqu'en supposant que les flux d'origines naturelles sont stables d'une année à l'autre, les rejets anthropiques de cadmium dans l'atmosphère ont pour leur part grandement diminué (61 %) entre 1983 et le milieu des années 90, passant d'une valeur médiane de 7570 t•an⁻¹ en 1983 à 2983 t•an⁻¹ en 1995 (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Émissions anthropiques mondiales de cadmium en 1983 en en 1995 (tiré de Pacyna et Pacyna, 2001).

Secteur économique	Émissions en 1983		Émissions en 1995		Pourcentage de changement
	tonnes	%	tonnes	%	
Combustion de carburant	673	9	691	23	+ 3
Production de métaux non-ferreux	5427	72	2171	73	- 60
Production du fer et de l'acier	156	2	64	2	- 60
Production de ciment	271	4	17	0,6	- 94
Autres	1043	13	40	1,4	- 96
Totale	7570	–	2983	–	- 61

En 1995, sur les 2983 t de cadmium émises annuellement dans l'atmosphère, l'Asie était le principal continent émetteur en contribuant pour 49 % des émissions. L'Amérique du Nord occupait le deuxième rang avec 16 % suivi de l'Amérique du Sud (15 %), l'Europe (12 %), l'Afrique (6 %) et l'Australie (2 %) (Pacyna et Pacyna, 2001).

Le temps de séjour du cadmium dans l'atmosphère est peu étudié. Cependant, en se basant sur le temps de résidence des autres métaux, nous pouvons supposer que le cadmium demeure dans l'air de quelques jours à quelques semaines (Salomons, 1986). Même si ce temps de résidence est relativement court, le cadmium atmosphérique parcourt plusieurs centaines de kilomètres et retombe dans les lacs et rivières sous forme de précipitations sèches ou humides.

Les rejets anthropiques non-atmosphériques de cadmium, effectués directement en milieu aquatique ou terrestre, sont difficiles à estimer par ce qu'ils dépendent de

plusieurs facteurs comme la proximité de villes, d'installations minières ou d'autres sources émettrices. Nriagu et Pacyna (1988) ont cependant fait une estimation globale des rejets dans le sol et dans l'écosystème aquatique. Ils ont déterminé que les rejets se situaient entre 9900 et 45 000 t•an⁻¹ en milieu terrestre et entre 2100 et 17 000 t•an⁻¹ en milieu aquatique pour l'année 1983. En milieu terrestre, les principales sources sont les cendres de combustion (1500 - 13 000 t•an⁻¹), les retombées atmosphériques (2200 - 8400 t•an⁻¹), les ordures urbaines (880 - 7500 t•an⁻¹), les résidus miniers (2100 - 4100 t•an⁻¹) et les résidus de fonderies (1600 - 3300 t•an⁻¹). En milieu aquatique, les principales sources sont le ruissellement provenant des boues d'épuration (80 000 - 130 000 t•an⁻¹), l'ensemble des processus miniers et de raffinage de métaux non-ferreux (610 - 8200 t•an⁻¹), les dépôts atmosphériques (900 - 3600 t•an⁻¹) et les eaux usées domestiques (180 - 1800 t•an⁻¹).

Les apports de Cd venant de sources naturelles sont sensibles aux conditions environnementales. Par exemple, l'acidification des environnements terrestres, des eaux douces de surface et des sédiments affecte la géochimie de plusieurs métaux lourds y compris le cadmium (Nelson et Campbell, 1991). Plus la solution de sol est acide, plus la mobilité du cadmium sera élevée. De même, Nelson et Campbell (1991) ont aussi déterminé que dans les lacs du Bouclier canadien, les concentrations élevées en cadmium provenaient en majorité de l'acidification du bassin versant, plutôt que des dépôts atmosphériques directs sur les lacs. L'acidification peut aussi permettre la remobilisation du cadmium présent dans les sédiments, ce qui contribuera à augmenter sa concentration dissoute dans les eaux sus-jacentes.

1.2 Spéciation du cadmium en milieu aquatique

La spéciation du cadmium en milieu aquatique est ardue à généraliser puisqu'elle est très dépendante des conditions que l'on retrouve dans le milieu. À titre

d'exemple, en eau douce, la spéciation du cadmium est très variable d'un milieu à l'autre puisque quant plus des nombreux complexes qui peuvent se former, le cadmium peut aussi s'associer à la matière particulaire. La proportion du cadmium qui peut se retrouver sous forme particulaire peut être très variable même si les milieux aquatiques communiquent entre eux. Ainsi, Lum (1987) a rapporté que dans le Lac Supérieur, 78 % du cadmium était sous forme particulaire, dans le Lac Érié cette proportion était de 13 % tandis que dans le Lac Huron, aucun cadmium associé à la matière particulaire n'a été détecté. Dans le fleuve St-Laurent, entre 31 et 44 % du cadmium n'était pas libre. Xue et Sigg (1998) ont déterminé qu'en milieu lacustre eutrophe (Suisse), la presque totalité du cadmium total dissous (0,03 à 0,09 nM) était complexée à la matière organique (moins de 4 % sous forme libre ; $[Cd^{2+}] = 0,7 \text{ à } 3,5 \text{ pM}$). Ces mêmes auteurs ont déterminé (par la même technique) qu'en rivière, ~ 9 % du cadmium dissous était sous forme libre.

En milieu marin, la chimie du cadmium est dominée par la complexation par les chlorures. Ainsi, Byrne *et al.* (1988) ont déterminé que 97 % du cadmium total était sous forme de complexe cadmium-chlorure ($CdCl^+$ et $CdCl_2$ en prédominance). Pour leur part, Millero et Hawke (1992) ont mesuré une plus grande proportion (8,7 %) du cadmium total qui était sous forme libre en milieu marin.

1.2.1 Affinité du cadmium pour le thiosulfate

La spéciation du cadmium aqueux est influencée par la présence de ligands simples comme le chlorure ($\log K_1 = 1,98$), le sulfate ($\log K_1 = 2,37$), l'ion carbonate ($\log K_1 = 4,38$) et le thiosulfate ($\log K_1 = 3,92$). Ainsi, lorsque l'environnement aquatique est perturbé par des apports anthropiques de thiosulfate, ce ligand inorganique simple peut former une série de complexes stables avec le cadmium (CdS_2O_3 , $Cd(S_2O_3)_2^{2-}$, $Cd(S_2O_3)_3^{4-}$, $Cd(S_2O_3)_3^{6-}$, $Cd_2(S_2O_3)_2$; $\log \beta = 3,92, 6,30, 6,40, 8,20, 12,30$; NIST : Martell *et al.*, 2001). Cependant, pour avoir une concentration de complexes cadmium-thiosulfate significative, le thiosulfate doit être présent en concentration élevée dans le milieu. Par exemple, pour complexer 80 % du Cd dissous, il faudrait une concentration de ~ 0,6 mM de thiosulfate

(figure 1.3). De telles concentrations de thiosulfate ne se retrouvent pas en milieu naturel s'il ne reçoit pas d'apports externes.

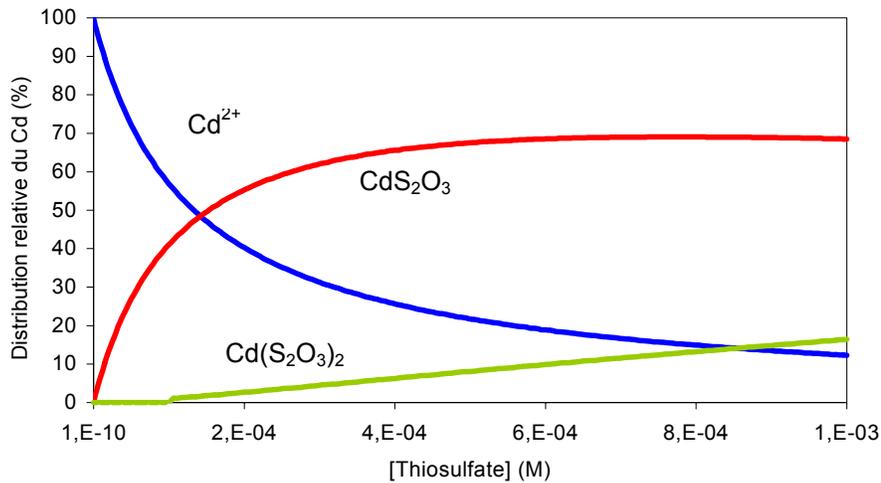


Figure 1.3 : Spéciation de cadmium selon la concentration de thiosulfate calculée à l'aide du logiciel MINEQL+ 4.5 en utilisant une concentration totale de Cd de 1 μM à pH 7,0 en milieu ouvert à l'atmosphère.

1.2.2 Thiosulfate en milieu aquatique

L'occurrence en milieu aquatique de composés de soufre réduits comme le thiosulfate est provoquée par des processus biologiques et géochimiques naturels ainsi que par des rejets anthropiques contenant du thiosulfate ou des composés à base de soufre. Le thiosulfate est un élément clé dans le cycle du soufre (figure 1.4), ce qui expliquerait sa présence dans les sédiments non perturbés (Jørgensen, 1990 a ; Jørgensen, 1990 b).

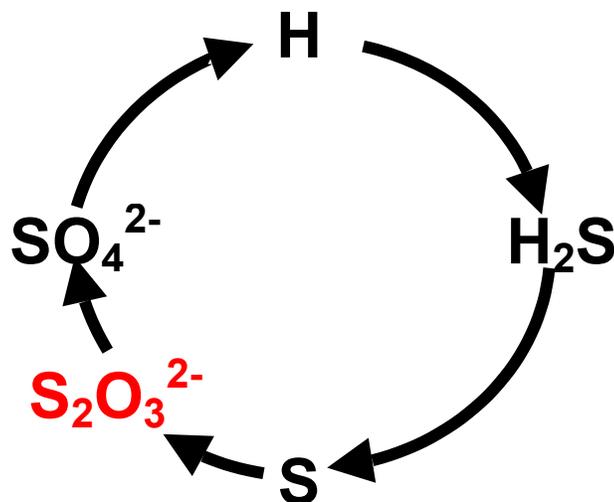


Figure 1.4 : Modèle schématique illustrant le rôle du thiosulfate dans le cycle d'oxydoréduction théorique du soufre.

En milieu naturel, non perturbé par une source externe riche en thiosulfate, la réduction de sulfate par des bactéries, en conditions anoxiques, est la source principale de thiosulfate (Ciglencéki et Čosović, 1997), alors que l'oxydation des sulfures en $S_2O_3^{2-}$ est la seconde source en importance en milieu sub-oxique sans apport externe (Jørgensen et Bak, 1991 ; Schippers et Jørgensen, 2001). D'un point de vue anthropique, le thiosulfate est surtout présent en quantité appréciable dans les effluents des industries photographiques (de l'ordre du mM ; Purcell et Peters, 1998) ainsi que dans les eaux usées de procédés miniers et dans les eaux de drainage minier (Druschel *et al.*, 1999).

Les concentrations de thiosulfate que l'on retrouve en milieu marin et dans les eaux douces sont très variables. Dans les sédiments marins, Thamdrup *et al.* (1994) ont mesuré des concentrations de thiosulfate allant jusqu'à 500 nM dans les eaux interstitielles côtières du Danemark. À l'interface oxique/anoxique des eaux océaniques, la $[S_2O_3^{2-}]$ se situe la plupart du temps entre 1 et 20 μM (Ciglencéki et Čosović, 1997). Dans les eaux douces, Kondo *et al.* (2000) ont déterminé que la concentration de thiosulfate dans l'eau sous la thermocline, du lac Suigetsu au Japon (un lac méromictique) se situait entre <1 et 60 μM (concentration moyenne

de 15 μM). Plus près de nous, dans la Baie Saint-François du lac St-Pierre, le thiosulfate a été mesuré à des concentrations allant jusqu'à 1,3 μM (B. Vigneault, communication personnelle). En dernier lieu le thiosulfate est aussi présent en concentrations appréciables en milieux marécageux ($[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}] \approx 104 \mu\text{M}$) (Luther III *et al.*, 1986) et dans les eaux hydrothermales ($[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}]$ entre 35 et 45 μM) (Xu *et al.*, 2000)

1.3 Toxicité et bioaccumulation du cadmium

La toxicité et la bioaccumulation du cadmium ont été abondamment étudiées chez divers organismes aquatiques et terrestres. Cependant, la comparaison entre les différentes études demeure ardue puisque la réponse biologique, les paramètres d'exposition et les organismes cibles utilisés sont souvent différents. Pour le besoin de notre recherche, nous nous sommes attardés seulement aux études touchant les organismes aquatiques.

1.3.1 Les algues

Macfie *et al.* (1994) ont déterminé la toxicité du cadmium envers *Chlamydomonas reinhardtii* à deux pH différents, soit 5,0 et 6,8. Ils ont mesuré la concentration effective de Cd^{2+} libre nécessaire pour diminuer la densité cellulaire finale de 30 % (CE_{30}) par rapport à celle observée dans un milieu témoin sans cadmium. À pH 5,0, les auteurs ont établi que la CE_{30} était de 4,5 μM (exprimée en terme de Cd^{2+}), tandis qu'à pH 6,8 la CE_{30} (Cd^{2+}) n'était que de 0,1 μM . Cette différence (de plus de 40 \times) entre les $[\text{Cd}^{2+}]$ nécessaires pour diminuer de 30 % de la densité algale après 5 jours à pH 5 et à pH 6,8 peut être expliquée par la compétition entre le Cd^{2+} libre et le proton (H^+) pour les sites de transport membranaire cationique. Errécalde *et al.* (1998) ont pour leur part mesuré la CE_{50} pour l'algue verte *Selenastrum capricornutum* après 72 h à pH = 7,3. Lorsque le milieu était tamponné avec de l'acide nitrilotriacétique (NTA, 0,1 mM), la CE_{50} (Cd^{2+}) était de $0,28 \pm 0,02 \mu\text{M}$.

Plusieurs autres expériences ont porté sur la toxicité du cadmium chez diverses espèces d'algues vertes (tableau 1.2).

Tableau 1.2 : Toxicité du cadmium chez différentes espèces d'algue, tel que rapportée dans la littérature (tiré du rapport EPA-822-R-01-001 du US EPA, 2001).

Espèce	Temps d'exposition	Réponse	[Cd _T] ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Référence
<i>C. reinhardtii</i>	4 j	CE ₅₀ (rendement)	1,8	Schafer <i>et al.</i> , 1993
<i>C. saccharophila</i>	4 j	CE ₅₀ (rendement)	0,9	Rachlin <i>et al.</i> , 1984
<i>Chara vulgaris</i>	7 j	mortalité complète	0,5	Heumann, 1987
<i>Chara vulgaris</i>	14 j	CE ₅₀ (croissance)	0,1	Heumann, 1987
<i>Chlorella vulgaris</i>	–	CE ₅₀ (croissance)	0,5	Rosko et Rachlin, 1977
<i>S. capricornutum</i>	3 j	CE ₅₀ (chlorophylle)	0,9	Van der Heever et Grobbelaar, 1996
<i>S. capricornutum</i>	4 j	CE ₅₀ (croissance)	0,2	Thellen <i>et al.</i> , 1989
<i>S. capricornutum</i>	4 j	CE ₅₀ (croissance)	1,2	Versteeg, 1990
<i>S. capricornutum</i>	3 j	CE ₅₀ (rendement)	0,8	Radetski <i>et al.</i> , 1995

Tout comme la toxicité, la bioaccumulation dépend aussi beaucoup des conditions d'exposition et de l'organisme cible. Très peu d'études tiennent compte de la spéciation des métaux en solution. Macfie et Welbourn (2000) ont tenté d'évaluer l'impact de la paroi cellulaire sur la prise en charge du cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii*. Pour ce faire, ils ont exposé une souche avec paroi cellulaire (W) et une souche mutant sans paroi (WL) à une concentration initiale de cadmium totale de 10 μM pendant 24 h. La méthodologie qu'ils ont employée était rigoureuse et ils prenaient un grand soin pour désorber le cadmium adsorbé sur la cellule. Ils ont déterminé qu'après 24 h, la concentration interne de Cd était de $5,75 \pm 0,21 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ pour la souche W et de $3,00 \pm 0,24 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ pour la souche WL. Cette

concentration de cadmium interne plus élevée chez les cellules avec une paroi cellulaire confirme l'affinité élevée d'un constituant de cette paroi pour le Cd ionique (Cd^{2+}). Errécalde *et al.* (1998) ont pour leur part déterminé le flux de prise en charge du cadmium par *Selenastrum capricornutum* entre 0 et 6 min. Pour ce faire ils ont exposé cette algue verte à une concentration initiale de cadmium libre de $0,25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans un milieu tamponné avec du NTA et un autre avec du citrate. Le flux trans-membranaire en Cd dans le milieu avec NTA était de $10,1 \pm 0,1 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et de $20,8 \pm 0,3 \text{ pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pour les cellules exposées dans le milieu avec citrate. Cette différence peut être expliquée en partie par la prise en charge du complexe cadmium-citrate via un transporteur présent chez les algues servant généralement pour le transport des acides aminés de faible poids moléculaire (Flynn et Syrett, 1986). Le mécanisme exact reste cependant à déterminer chez *Selenastrum capricornutum*.

1.3.2 Les invertébrés

Un grand nombre d'expériences de toxicité ont aussi été réalisées avec des invertébrés. Nous pouvons remarquer dans le tableau 1.3 que pour une même espèce, la CE_{50} (Cd_T) peut varier d'une expérience à l'autre, notamment parce toutes ces expériences n'ont pas été effectuées dans les mêmes conditions de dureté. Toutes les expériences rapportées dans le tableau 1.3 sont conformes aux normes du US EPA.

Tableau 1.3 : Toxicité du cadmium chez différentes espèces d'invertébré, tel que rapportée dans la littérature (toxicité aiguë) (tiré du rapport EPA-822-R-01-001 du US EPA, 2001).

Espèce	Dureté (mg•L ⁻¹ de CaCO ₃)	CE ₅₀ ([Cd _T] en μmol•L ⁻¹)	Référence
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	90	0,5	Bitton <i>et al.</i> , 1996
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	80	0,5	Diamond <i>et al.</i> , 1997
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	90	0,5	Lee III <i>et al.</i> , 1997
<i>C. reticulata</i>	120	1,0	Hall <i>et al.</i> , 1986
<i>Daphnia magna</i>	105	0,3	Canton et Sloof, 1982
<i>Daphnia magna</i>	120	0,4	Hall <i>et al.</i> , 1986
<i>Daphnia magna</i>	170	0,2	Stuhlbacher <i>et al.</i> , 1993
<i>Daphnia magna</i>	91	0,2	Barata <i>et al.</i> , 1998
<i>Daphnia pulex</i>	120	0,7	Hall <i>et al.</i> , 1986
<i>Daphnia pulex</i>	85	0,9	Roux <i>et al.</i> , 1993

La bioaccumulation du cadmium par les invertébrés est très souvent mesurée après plus d'une journée. Nous n'avons pas trouvé d'exemple où l'accumulation du cadmium était déterminée après moins de 24 h. Dans la plupart des cas, l'accumulation de ce métal était mesurée après un minimum de 2 j. Dans le tableau 1.4, nous avons répertorié quelques exemples de facteur de bioconcentration chez divers invertébrés. Ce facteur est très dépendant de la spéciation des métaux en solution. Par conséquent, la comparaison entre deux études est possible seulement si la concentration du métal libre (par exemple le cadmium) en solution est semblable. Le facteur de bioconcentration peut être défini comme étant le ratio entre la concentration du composé étudié (Cd) dans le milieu (eau/sol) et la concentration dans l'organisme et permet d'établir la bioaccumulation.

Tableau 1.4 : Bioaccumulation de cadmium chez différentes espèces d'invertébré (tiré du rapport EPA-822-R-01-001 du US EPA, 2001).

Espèce	Tissu	Temps d'exposition	Facteur de bioconcentration	Référence
<i>D. magna</i>	Entier	2 - 4 j	320	Poldoski, 1979
<i>D. magna</i>	Entier	7 j	484	Winner, 1984
<i>Orconectes propinquus</i>	Entier	8 j	184	Gillespie <i>et al.</i> , 1977
<i>P. dorsata</i>	Entier	28 j	373	Spehar <i>et al.</i> , 1978
<i>Hydropsyche sp.</i>	Entier	2 - 8 j	228	Dressing <i>et al.</i> , 1982

1.3.3 Les poissons

Le dernier maillon de la chaîne trophique aquatique n'est pas épargné par le cadmium. La majorité des expériences réalisées se penchent uniquement sur la toxicité du cadmium chez les différentes espèces de poissons. Le tableau 1.5 répertorie quelques-unes de ces expériences de toxicité portant sur les poissons. Ce tableau montre aussi que le stade de vie d'un poisson influence grandement sa tolérance face au cadmium en solution. Par exemple, chez le saumon (*Oncorhynchus kisutch*), la valeur de CE_{50} est 10 fois plus élevée pour le stade adulte ($40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cd_T) que pour le stade juvénile ($4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cd_T) (US EPA, 2001).

Tableau 1.5 : Toxicité du cadmium chez différentes espèces de poisson, tel que rapportée dans la littérature (toxicité aiguë) (tiré du rapport EPA-822-R-01-001 du US EPA, 2001).

Espèce (stade de vie)	Dureté (mg•L ⁻¹ de CaCO ₃)	CE ₅₀ ([Cd _T] en µmol•L ⁻¹)	Référence
<i>Oncorhynchus kisutch</i> (juvénile)	41	0,04	Buhl et Hamilton, 1991
<i>Oncorhynchus kisutch</i> (adulte)	22	0,40	Chapman, 1975
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> (jeune)	23	0,04	Chapman, 1975 et 1978
<i>Oncorhynchus kisutch</i> (juvénile)	25	0,02	Finlayson et Verrue, 1982
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (juvénile)	41	0,02	Buhl et Hamilton, 1991
<i>Salmo trutta</i> (n.d.)	44	0,01	Spehar et Carlson, 1984
<i>Salvenilus fontinalis</i> (n.d.)	42	< 0,02	Carroll <i>et al.</i> , 1979
<i>Carrassius auratus</i> (n.d.)	20	0,05	McCarty <i>et al.</i> , 1978
<i>Cyprinus carpio</i> (jeune)	100	0,08	Suresh <i>et al.</i> , 1993
<i>Cyprinus carpio</i> (alevin)	100	0,02	Suresh <i>et al.</i> , 1993

Dans la plupart des études recensées dans cette section, il y a peu ou pas d'information sur la composition des milieux d'exposition. Cette étude, qui porte sur le rôle du thiosulfate sur la prise en charge et la toxicité du cadmium aidera, par la connaissance précise des milieux d'exposition, à mieux définir le rôle de l'ion libre lorsque le cadmium se trouve dans un milieu propice à la complexation par le thiosulfate.

1.4 Interactions métaux-algues (Modèle du ligand biotique)

Avec l'introduction de logiciels permettant de déterminer la spéciation des métaux dans les milieux d'exposition, soit au début des années 70, les chercheurs ont

radicalement changé l'approche expérimentale qui était utilisée pour déterminer la réponse biologique (prise en charge, micro-nutrition et toxicité) d'un organisme aquatique face à un métal d'étude. Avant cette percée technologique, l'accent était mis sur l'organisme cible plutôt que sur le milieu d'exposition. Depuis les 30 dernières années, la connaissance des phénomènes de complexation des métaux a permis à plusieurs chercheurs de démontrer des liens évidents entre la spéciation des métaux dans le milieu d'exposition et leur biodisponibilité. Ces mêmes chercheurs ont, par le fait même, établi que la concentration de l'ion métallique libre (M^{Z+} ou $M^{Z+}(H_2O)_n$), qui est déterminée par la concentration totale du métal dissous et par la nature et la concentration des ligands en solution, régissait la réponse biologique sollicitée par un métal (Templeton *et al.*, 2000).

Toutes ces recherches ont mené à la première formulation du modèle de l'ion libre (MIL) qui stipule que la prise en charge, la nutrition et la toxicité des métaux traces cationiques varient en fonction de la concentration de l'aquo-ion (Morel, 1983). Le MIL, qui est aujourd'hui connu sous le nom du modèle du ligand biotique (BLM), a par la suite été nuancé par Campbell (1995) et Hudson (1998) tout en validant l'énoncé selon laquelle la meilleure prédiction de la réponse biologique à une exposition aux métaux demeure la concentration des ions métalliques libres. Le BLM insiste aussi sur l'importance de la chimie des équilibres qui s'établissent à la surface de l'organisme, soit entre ce dernier et son milieu. Cette formulation tient aussi compte du fait que l'interaction du métal avec la surface cellulaire peut impliquer non seulement la forme libre en solution (M^{Z+}), mais aussi la forme complexée (ML). Dans les deux cas, la relation entre le métal et la surface cellulaire peut être représentée par une réaction de complexation de surface, donnant lieu à la formation du complexe M-X-cellule (M = métal et X-cellule = ligand cellulaire). L'étape lente demeure le transport trans-membranaire subséquent du métal. La relation entre la surface de la cellule et le métal peut être décrite en fonction de la concentration du métal libre peu importe la forme, libre ou complexée, qui est impliquée dans la réaction initiale de complexation avec le ligand cellulaire.

Tout d'abord, la réaction de complexation de surface, lorsque c'est l'ion métallique libre qui entre en contact avec la surface cellulaire (\bar{X} -cellule), peut être représentée selon les équations suivantes :

Équilibre en solution



$$K_1 = \frac{[ML]}{[M^{z+}] \cdot [L]} \quad (1.2)$$

Réaction de surface de M^{z+}

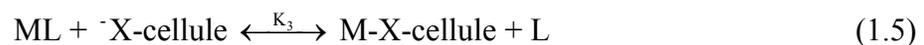


$$\{ M\text{-X-cellule} \} = K_2 \{ \bar{X}\text{-cellule} \} \cdot [M^{z+}] \quad (1.4)$$

où K_1 et K_2 sont des constantes et L un ligand en solution dont la charge négative n'est pas indiquée pour simplifier les équations. Si la réponse biologique varie en fonction de la concentration du complexe $\{M\text{-X-cellule}\}$, c'est-à-dire selon le degré de saturation des sites \bar{X} -cellule, et si la concentration des sites \bar{X} -cellule libres demeure approximativement constante dans la gamme d'exposition, on peut déduire à partir de l'équation (1.4) que la réponse biologique suivra la concentration de l'ion métallique libre, $[M^{z+}]$, en solution.

La concentration du complexe M-X-cellule peut aussi varier en fonction de la concentration de l'ion métallique libre en solution si la réaction avec le ligand cellulaire s'effectue par échange de ligands (Campbell, 1995) :

Réaction de surface de ML



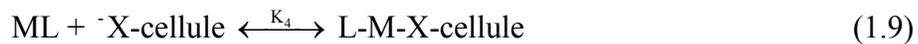
$$\frac{[ML]}{[L]} = K_3 \cdot [M^{z+}] \quad (1.6)$$

$$\{ \text{M-X-cellule} \} = K_3 \frac{\{ \text{X-cellule} \} \cdot [\text{ML}]}{[\text{L}]} \quad (1.7)$$

$$\{ \text{M-X-cellule} \} = K_3 \cdot K_1 \cdot \{ \text{X-cellule} \} \cdot [\text{M}^{z+}] \quad (1.8)$$

En réarrangeant l'équation (1.2), on obtient l'équation (1.6) que l'on peut substituer dans l'équation (1.7) pour donner l'équation (1.8). Selon cette dernière équation, la concentration du complexe clé M-X-cellule, et donc la réponse biologique, montrent la même dépendance sur la concentration de métal libre en solution que nous avons établi dans l'équation (1.4). Donc, peu importe l'espèce qui se présente à la surface biologique, M^{z+} ou ML, la réponse biologique sera fonction de la concentration de l'ion métallique libre, à condition que le produit de la réaction soit le complexe simple M-X-cellule.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, pour pouvoir démontrer cette dépendance, la réaction doit se produire par échange de ligands, ce qui sous-entend que le ligand L ne doit plus être dans la sphère de coordination du métal lorsque celui-ci se lie au ligand cellulaire X-cellule présent à la surface membranaire (voir l'équation (1.5)). Si la réaction s'effectue sans échange de ligand, nous serions en présence d'un complexe ternaire {L-M-X-cellule} :



$$\{ \text{L-M-X-cellule} \} = K_4 \cdot \{ \text{X-cellule} \} \cdot [\text{ML}] \quad (1.10)$$

La formation de tels complexes ternaires donnerait lieu à une exception au BLM (ou MIL), car dans ce cas-ci, la concentration de métal lié à la surface membranaire serait fonction de la concentration en solution du complexe ML plutôt que de la concentration du métal libre M^{z+} .

1.4.1 Hypothèses du BLM

Étant donné l'importance accordée au BLM dans le domaine de la toxicologie aquatique, et le rôle clé qu'il joue dans ce mémoire, il importe de bien identifier les hypothèses de base qui le sous-tendent (Campbell, 1995 ; Campbell *et al.*, 2002) :

- La membrane plasmique constitue le site primaire de l'interaction d'un métal en solution avec un organisme aquatique (équation (1.3)).
- L'interaction du métal avec la membrane biologique peut être décrite par la formation d'un complexe de surface M-X-cellule (équations (1.3) et (1.5)).
- La propagation du métal en solution à travers la couche de diffusion (voir figure 1.5) vers la paroi cellulaire et sa complexation subséquente sur la surface biologique se produisent plus rapidement que sa prise en charge par l'organisme aquatique. Ainsi, un pseudo-équilibre s'établit entre l'ion métallique en solution et la surface biologique.

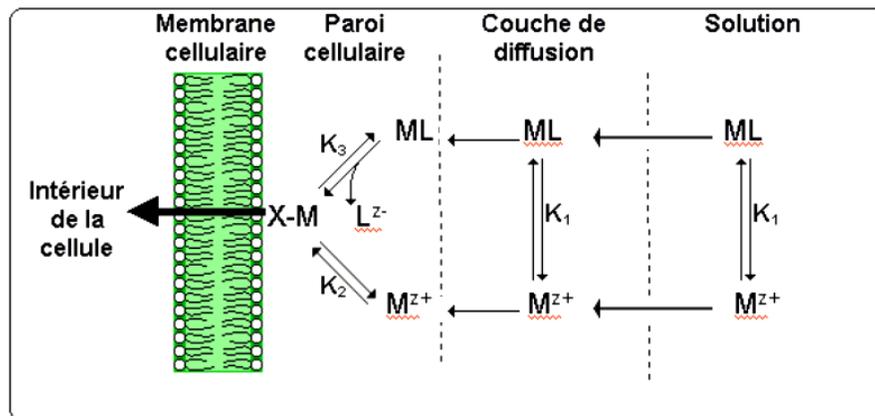


Figure 1.5 : Représentation conceptuelle des interactions métaux-organismes. M^{z+} = ion libre ; ML = métal complexé ; L^{z-} = ligand (acide aminé, citrate, $S_2O_3^{2-}$, CO_3^{2-} , Cl^-) ; $M-X$ = métal complexé à la surface (modifié de Campbell, 1995).

- La réponse biologique, qui peut être définie comme étant la prise en charge, la micro-nutrition ou la toxicité, est proportionnelle à la concentration du complexe de surface $\{M-X\text{-cellule}\}$.

- Dans la gamme de concentrations d'intérêt toxicologique du métal, la concentration des sites de liaisons libres, {X-cellule}, doit demeurer pratiquement constante. De plus, les variations du {M-X-cellule} suivent celles de $[M^{Z+}]$ en solution (équations (1.4) et (1.8)).
- Durant l'exposition de l'organisme au métal d'intérêt, la nature de la surface biologique doit demeurer constante.
- D'autres cations, comme l'ion H^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+} , peuvent être en compétition avec le métal d'intérêt toxicologique, en occurrence le Cd^{2+} , pour les sites de liaisons libres sur la surface membranaire. Si nous supposons que les transporteurs de cations sont non sélectif (figure 1.6, voie I), une augmentation de la concentration des ions compétiteurs aura pour effet de diminuer la prise en charge du métal d'étude car la probabilité que le métal forme un complexe M-X-cellule sera plus faible puisqu'il y aura aussi formation des complexes H-X-cellule, Ca-X-cellule et Mg-X-cellule. Cette compétition entre le métal non-essentiel et le proton ou les métaux divalents pour les transporteurs membranaires de cations aura aussi pour effet de diminuer sa toxicité. Des réductions de toxicité, lorsque la concentration des ions compétiteurs augmentait, ont été observées pour le cuivre et *Daphnia magna* (De Schamphelaere *et al.*, 2002) et pour le cuivre et le nickel avec *Primephales promelas* (tête de boule) (Meyer *et al.*, 1999).

Des exceptions au modèle du ligand biotique peuvent survenir si une des hypothèses n'est pas respectée. Ces dérogations au BLM sont habituellement regroupées en trois catégories distinctes :

- Le premier groupe d'exceptions implique la formation de complexes neutres lipophiles (ML_n^0) avec des ligands tels le diéthylthiocarbamate, les xanthates ou les oxines. Ces complexes organiques augmentent la biodisponibilité d'un métal comparativement à celle observée avant la complexation (Block et Pärt, 1986 ; Block et Wicklund Glynn, 1992 ; Phinney et Bruland, 1994, 1997a et 1997b ; Croot *et al.*, 1999, Boullemant *et al.*, 2004). De tels complexes peuvent

traverser la membrane biologique sans utiliser les transporteurs des métaux essentiels (figure 1.6, voie III).

- Le deuxième groupe d'exceptions implique la formation de complexes hydrophiles avec des ligands assimilables de faible poids moléculaire comme les acides aminés, le citrate et le thiosulfate (Campbell, 1995 ; Errécalde *et al.*, 1998 ; Errécalde et Campbell, 2000 ; Fortin et Campbell, 2001 ; Hiriart-Baer *et al.*, en préparation). Ces complexes contribuent à augmenter la biodisponibilité du métal au-delà des prédictions du BLM. Si le transporteur du métabolite Y est peut sélectif, le métal pourra accompagner ce ligand et traverser la membrane biologique (figure 1.6, voie II). Donc, en plus de la voie normale de transport (figure 1.6, voie I), ce complexe donne une seconde voie d'entrée supplémentaire.
- Le dernier type d'exception implique que l'étape limitante, qui est habituellement la prise en charge du métal par l'organisme, soit le transport à travers la couche diffuse (Gutknecht, 1981) ou la cinétique de complexation/dissociation du métal (Hudson et Morel, 1990).

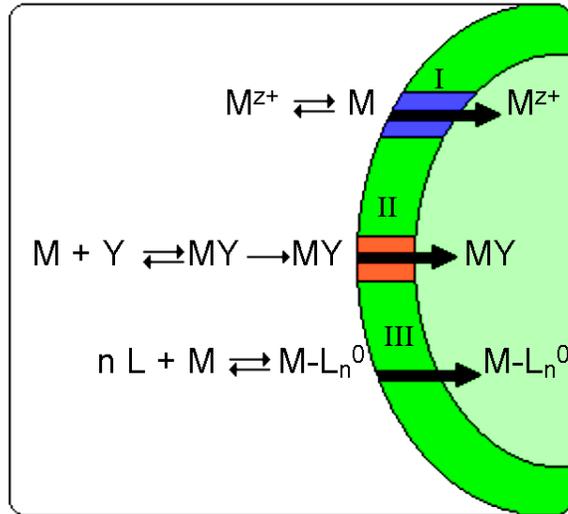


Figure 1.6 : Représentation conceptuelle du transport trans-membranaire de métaux non-essentiels comme le Cd. La voie I représente un système de transport de métaux essentiels comme le Ca, la Cu et le Zn. La voie II représente un système de transport d'acides aminés ou d'anions ($Y = Cl^-$, CO_3^{2-} , SO_4^{2-} ou $S_2O_3^{2-}$). La voie III représente la diffusion passive de complexes lipophiles (modifié de Fortin, 2000 ; Thèse de doctorat).

1.4.2 Transport trans-membranaire du Cd

1.4.2.1 Transporteur membranaire cationique

En absence de ligands organiques ou inorganiques, la spéciation du cadmium sera relativement simple (une grande proportion du Cd_T est sous forme Cd^{2+}) et la réponse biologiques (prise en charge, micro-nutrition et toxicité) d'un organisme aquatique face à ce métal non-essentiel sera proportionnelle à la $[Cd^{2+}]$ libre comme le prédit le BLM. Comme il est sous-entendu dans ce modèle, le cadmium pourra entrer dans la cellule algale uniquement via le mécanisme I (figure 1.6) non spécifique servant pour l'assimilation de métaux essentiels comme le Ca, le Cu et le Zn.

1.4.2.2 Transporteur membranaire de sulfate

À la section 1.4.1, nous avons identifié deux types d'exception (par transport accidentel). Le deuxième type de transport accidentel fait intervenir le mécanisme de transport II (figure 1.6). La formation de complexes hydrophiles (ML_n^{\pm}) avec des ligands assimilables de faible poids moléculaire comme les acides aminés, le citrate et le thiosulfate à potentiellement pour effet d'augmenter la prise en charge d'un métal puisqu'elle procure une seconde voie d'entrée (Campbell, 1995 ; Errécalde *et al.*, 1998 ; Errécalde et Campbell, 2000 ; Fortin et Campbell, 2001 ; Campbell *et al.* 2002 ; Hiriart-Baer *et al.*, en préparation). La complexation des métaux par des ligands assimilables est beaucoup plus susceptible de se produire en milieu naturel puisque la concentration de ces ligands peut, dans certains milieux perturbés, être de l'ordre du mM. Comme nous voulions étudier les différents effets de la complexation du cadmium par le thiosulfate et que la plupart de nos hypothèses découlent d'études précédentes, nous avons mis l'accent sur le transporteur membranaire de sulfate qui a été identifié par Fortin et Campbell (2001) comme étant responsable de la prise en charge accrue de l'argent via la prise en charge du complexe argent-thiosulfate.

Tout d'abord, plusieurs recherches ont démontré que le transporteur membranaire était présent à la fois chez les bactéries (Stahlmann *et al.*, 1991 ; Sirko *et al.*, 1995) et les algues (Vallée et JeanJean, 1968 et Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998) et qu'il servait à la fois au transport du sulfate et du thiosulfate. D'ailleurs, lors d'expérience de prise en charge du sulfate par des algues vertes unicellulaires, il y a un effet compétitif entre le sulfate et le thiosulfate pour le transporteur membranaire de sulfate (Vallée et JeanJean, 1968 ; Biedlingmaier et Schimdt, 1989 et Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998). Donc, comme le cadmium forme un complexe stable avec le thiosulfate, ce dernier entrera peut être via le même transporteur que le sulfate et le thiosulfate comme il a été démontré pour l'argent.

1.5 Objectifs et hypothèses

En se basant sur les prémisses du BLM et sur les différentes exceptions déjà démontrées, nous nous sommes questionnés sur le rôle que le thiosulfate pouvait avoir sur la prise en charge et la toxicité du cadmium et si cette complexation était en contradiction avec ce modèle.

Objectif 1 : Déterminer si la complexation du cadmium par le thiosulfate aura un effet sur la biodisponibilité de ce métal.

Hypothèse 1 : Le thiosulfate étant un ligand assimilable, nous croyons que le complexe cadmium-thiosulfate pourra entrer dans la cellule via deux types de transporteur membranaires différents. Étant en contradiction avec le BLM, le cadmium traversera parallèlement par la voie I (figure 1.6) qui sert à la prise en charge des métaux essentiels et par la voie II (figure 1.6) qui sert habituellement au transport d'acides aminés et d'anions (figure 1.5).

Objectif 2 : Établir via quel transporteur membranaire le complexe cadmium-thiosulfate sera pris en charge par la cellule.

Hypothèse 2 : Étant donné la proximité de forme chimique entre le sulfate et le thiosulfate, nous pensons que la prise en charge du complexe cadmium-thiosulfate se fera par mimétisme via le transporteur de sulfate.

Objectif 3 : Déterminer la toxicité du cadmium assimilé en présence de thiosulfate versus le cadmium pris en charge en absence de thiosulfate.

Hypothèse 3 :

L'augmentation ou la diminution de la toxicité du cadmium pris en charge en présence de thiosulfate dépendra grandement de la dissociation du complexe à l'intérieur de la cellule algale. Peu d'étude s'attarde sur la toxicité du cadmium en présence de ligand assimilable. Cependant, Hiriart-Baer *et al.* (en préparation) ont déterminé que chez *Chlamydomonas reinhardtii*, le thiosulfate avait un effet protecteur face l'argent accumulé (c'est-à-dire que le quota cellulaire en Ag nécessaire pour inhiber la croissance de *C. reinhardtii* était plus élevé en présence de thiosulfate dans le milieu d'exposition). Donc, nous croyons que le thiosulfate jouera le même rôle protecteur face au cadmium.

2. Méthode expérimentale

2.1 Algues

Pour l'étude des différents objectifs de recherche, nous avons utilisé des cultures axéniques de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* en raison de son utilisation comme organisme test pour l'étude des interactions Ag-algues en présence de thiosulfate effectué par Fortin et Campbell (2001). Nous avons aussi utilisé cette algue verte puisqu'elle a été très étudiée au niveau génétique. Cette algue a été obtenue de l'Université de Toronto (*University of Toronto Culture Collection*) et la souche avec paroi cellulaire (UTCC11 : *C. reinhardtii* WT) a été utilisée. Cette algue verte unicellulaire est de forme ellipsoïdale, possède deux flagelles et a un diamètre se situant entre 4 et 5 μm . Sa croissance est caractérisée par une courte phase de latence (~ 12 h) suivie d'une brève phase exponentielle (~ 24 h). À la troisième journée de croissance, les cellules atteignent une phase stationnaire.

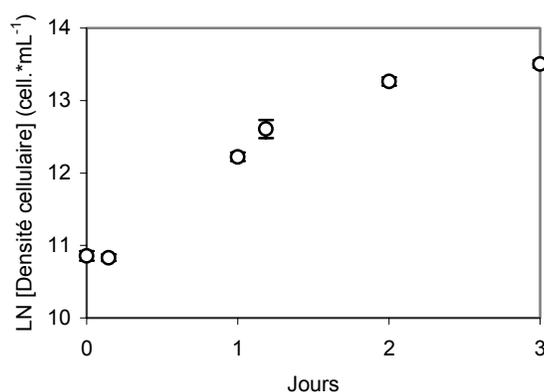


Figure 2.1 : Courbe de croissance typique de *Chlamydomonas reinhardtii*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Les algues étaient cultivées de façon axénique dans des fioles Erlenmeyer en verre de 250 mL contenant 100 ml de milieu de culture MHSM-1 (tableau 2.1), sous une

luminosité ($100 \pm 10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) et une température ($20,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$) constantes. Ces conditions permanentes étaient obtenues en cultivant les algues dans une chambre de croissance (Convicon, CMP3023). Pour prévenir l'agglomération des cellules, les fioles Erlenmeyer contenant les cultures étaient soumises à une agitation stable à l'aide d'une table agitatrice ($\sim 50 \text{ rpm}$). Pour permettre de maintenir un bon état physiologique de la culture, environ 1 mL de la culture d'algue était prélevé à tous les 3-4 j et inoculé dans un milieu de culture MHSM-1 frais et stérile ($\text{pH} = 7$). Après 14 repiquages, la culture était jetée et de nouvelles cellules étaient cultivées. L'absence de contamination bactérienne était vérifiée par placage sur agar (*Difco-Bacto Agar*). Toutes les manipulations des cultures d'algues s'effectuaient sous une hotte à flux laminaire avec du matériel stérile.

2.2 Milieux de culture et de rinçage

Le milieu de culture utilisé pour la culture de *Chlamydomonas reinhardtii* était une modification du milieu HSM que l'on retrouve dans Macfie *et al.* (1994). Dans notre milieu de culture MHSM-1 (force ionique de $6 \text{ méq}\cdot\text{L}^{-1}$), nous avons diminué les concentrations de phosphate et d'ammonium principalement pour des raisons de géochimie. À une concentration égale à celle observée dans le milieu HSM, le phosphate avait tendance à précipiter. Des expériences préliminaires, effectuées par Claude Fortin (Fortin, 2000 ; Thèse de doctorat), ont montré que ces modifications n'affectaient ni le taux de croissance, ni le rendement des algues qui étaient obtenus avec le milieu HSM original. Pour permettre de maintenir le pH constant dans le milieu de culture ($\text{pH} = 7$), nous avons ajouté du tampon d'acide N-2-hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthanesulfonique (HEPES = 10 mM).

Les milieux MHSM-R1 et MHSM-R2 ont été utilisés pour rincer les algues avant de les inoculer dans les milieux d'exposition servant aux expériences sur une brève période de temps (milieux A, B et D ; tableau 2.5). La différence majeure entre les deux milieux de rinçage est la concentration de sulfate. Dans le milieu de rinçage MHSM-R2, qui est utilisé avant les milieux d'exposition sans sulfate, le sulfate a

été substitué par du nitrate pour obtenir une solution de rinçage sans sulfate (tableau 2.1). Les deux milieux sont semblables en composition chimique aux milieux d'exposition pour les expériences de cinétique à court terme (< 1 h). Le milieu de rinçage MHSM-R3 nous servait lors des expériences de cinétique et de toxicité à long terme (72 h). Ce milieu était semblable au milieu de culture MHSM-1, mais comme les deux autres milieux de rinçage, il ne contenait pas les oligo-éléments contenus dans le milieu MHSM-1.

Tableau 2.1 : Concentrations molaires des cations et anions qui composent les milieux de culture (MHSM-1) et de rinçage (MHSM-R1, MHSM-R2 et MHSM-R3). Le pH était maintenu à 7 dans ces trois milieux.

Ions	HSM ⁽¹⁾	MHSM	MHSM-R1	MHSM-R2	MHSM-R3
NH ₄	9,35 x 10 ⁻³	9,37 x 10 ⁻⁴	9,37 x 10 ⁻⁴	9,37 x 10 ⁻⁴	9,37 x 10 ⁻⁴
Cl	9,49 x 10 ⁻³	5,98 x 10 ⁻⁶	–	–	–
K	2,20 x 10 ⁻²	4,22 x 10 ⁻³	2,24 x 10 ⁻³	2,34 x 10 ⁻³	4,22 x 10 ⁻³
PO ₄	1,37 x 10 ⁻²	1,37 x 10 ⁻⁴	1,37 x 10 ⁻⁴	1,37 x 10 ⁻⁴	1,37 x 10 ⁻⁴
CO ₃	atm ⁽²⁾	atm ⁽²⁾	atm ⁽²⁾	atm ⁽²⁾	atm ⁽²⁾
NO ₃	–	5,07 x 10 ⁻³	3,17 x 10 ⁻³	3,43 x 10 ⁻³	5,07 x 10 ⁻³
SO ₄	8,12 x 10 ⁻⁵	8,12 x 10 ⁻⁵	8,12 x 10 ⁻⁵	–	8,12 x 10 ⁻⁵
Mg	8,12 x 10 ⁻⁵	8,12 x 10 ⁻⁵	8,12 x 10 ⁻⁵	7,80 x 10 ⁻⁵	8,12 x 10 ⁻⁵
Ca	6,80 x 10 ⁻⁵	6,80 x 10 ⁻⁵	6,80 x 10 ⁻⁵	6,80 x 10 ⁻⁵	6,80 x 10 ⁻⁵
Na	1,02 x 10 ⁻⁴	1,02 x 10 ⁻⁴	1,02 x 10 ⁻⁴	1,02 x 10 ⁻⁴	1,02 x 10 ⁻⁴
BO ₃	3,01 x 10 ⁻⁶	3,01 x 10 ⁻⁶	–	–	–
Mn	2,10 x 10 ⁻⁶	2,10 x 10 ⁻⁶	–	–	–
EDTA ⁽³⁾	8,06 x 10 ⁻⁷	8,06 x 10 ⁻⁷	–	–	–
Fe	5,92 x 10 ⁻⁷	5,92 x 10 ⁻⁷	–	–	–
MoO ₄	3,00 x 10 ⁻⁸	3,00 x 10 ⁻⁸	–	–	–
Zn	2,43 x 10 ⁻⁸	2,43 x 10 ⁻⁸	–	–	–
Co	1,09 x 10 ⁻⁸	1,09 x 10 ⁻⁸	–	–	–
Cu	7,04 x 10 ⁻¹¹	7,04 x 10 ⁻¹¹	–	–	–

¹ Macfie *et al.* (1994).

² La concentration du carbonate s'ajuste par équilibre gazeux avec l'atmosphère.

³ Acide éthylènediamine-tétraacétique.

2.2.1 Préparation des milieux de culture et de rinçage

À partir des solutions mères décrites dans le tableau 2.2, nous avons préparé les milieux de culture et de rinçage. Toutes ces solutions mères avaient été préalablement filtrées (0,2 µm, polycarbonate ; Poretics) pour enlever les particules abiotiques pouvant causer un changement dans la composition de ces solutions en adsorbant les métaux en solution. La filtration prévient aussi la contamination bactérienne, qui peut modifier la composition chimique des solutions et affecter la croissance des algues. Pour prévenir toute dégradation par la lumière ou la température, les solutions mères étaient conservées dans l'obscurité à 4 °C. La solution intermédiaire contenant l'ammonium #2 (ou ammonium #3), le phosphate #2 et le KNO₃ était stérilisée dans un autoclave à 121 °C pendant au moins 15 min. L'ajout des oligo-éléments (AAP, voir tableau 2.2), pour le milieu MHSM-1 seulement, s'effectuait 24 h après la stérilisation pour prévenir la précipitation de composés peu soluble à haute température (Price *et al.*, 1989). En dernier lieu, nous ajoutons le tampon HEPES (10 mM) et le pH était ajusté à 7 à l'aide d'une solution de NaOH 0,10 M (Aristar, BDH).

Tableau 2.2 : Composition et concentrations des solutions mères utilisées pour la préparation des milieux MHSM-1, MHSM-R1, MHSM-R2 et MHSM-R3.

Solution (filtrée sur 0,2 µm)	Produits	Concentration⁽¹⁾	Fournisseur
Ammonium #2	NH ₄ NO ₃	15,0 g•L ⁻¹	Omega
	MgSO ₄ •7H ₂ O	4,00 g•L ⁻¹	Omega
	Ca(NO ₃)•4H ₂ O	3,21 g•L ⁻¹	Baker
Ammonium #3	NH ₄ NO ₃	15,0 g•L ⁻¹	Omega
	Mg(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	4,00 g•L ⁻¹	Fisher
	Ca(NO ₃)•4H ₂ O	3,21 g•L ⁻¹	Baker
Phosphate #2	KH ₂ PO ₄	29,6 g•L ⁻¹	Fisher
	K ₂ HPO ₄	57,6 g•L ⁻¹	Fisher
AAP	H ₃ BO ₃	186 mg•L ⁻¹	ACP
	MnCl ₂ •4H ₂ O	415 mg•L ⁻¹	Fisher
	FeCl ₃ •6H ₂ O	160 mg•L ⁻¹	BDH
	Na ₂ EDTA•2H ₂ O	300 mg•L ⁻¹	Fisher
	Zn (1 g•L ⁻¹) ⁽²⁾	1,59 mg•L ⁻¹	Fisher
	Co (1 g•L ⁻¹) ⁽²⁾	0,64 mg•L ⁻¹	Fisher
	Mo (1 g•L ⁻¹) ⁽²⁾	2,88 mg•L ⁻¹	Fisher
Cu (1 g•L ⁻¹) ⁽²⁾	4,47 µg•L ⁻¹	Fisher	
Tampon (gamme de pH entre 6,8 - 8,2)	HEPES	2,383 g•L ⁻¹	Sigma

¹ Concentration finale des produits dans chacune des solutions.

² Étalon ICP.

Tableau 2.3 : Volumes de solutions mère utilisées pour la préparation des milieux MHSM-1, MHSM-R1, MHSM-R2 et MHSM-R3.

Solutions	MHSM-1	MHSM-R1	MHSM-R2	MHSM-R3
Ammonium #2	5 mL•L ⁻¹	5 mL•L ⁻¹		5 mL•L ⁻¹
Ammonium #3	–	–	5 mL•L ⁻¹	–
Phosphate #2	250 µL•L ⁻¹	250 µL•L ⁻¹	250 µL•L ⁻¹	250 µL•L ⁻¹
KNO ₃ (1,0 M)	4,0 mL•L ⁻¹	2,1 mL•L ⁻¹	2,2 mL•L ⁻¹	4,0 mL•L ⁻¹
AAP*	1 mL•L ⁻¹	–	–	–
NaOH (0,10 M)*	variable	variable	variable	variable
HEPES*	2,383 g•L ⁻¹	2,383 g•L ⁻¹	2,383 g•L ⁻¹	2,383 g•L ⁻¹

* 24 h après l'autoclavage.

2.3 Équipements, produits, réactifs et eau ultra-pure

Tous les sels utilisés pour la préparation des milieux de culture (MHSM-1), de rinçage (MHSM-R1, MHSM-R2 et MHSM-R3), et d'exposition étaient de grade analytique ou ultrapur. La solution acidifiée de cadmium radioactif (^{109}Cd , activité spécifique entre 376 et 81085 Ci/mol) servant pour les expériences de prise en charge et de toxicité provenait de Amersham Canada. De l'eau ultrapure (~ 18 Mohms•cm) était utilisée pour la préparation de tous les milieux servant à la culture, au rinçage et à l'exposition des cellules. Les solutions décrites dans les tableaux 2.2 et 2.3 étaient conservées dans des contenants en Téflon[®] (TFE, PTFE) pour minimiser l'adsorption des différents éléments sur les parois. L'utilisation de contenants en Téflon[®] a aussi été privilégiée pour conserver la solution de cadmium radioactif. Les milieux d'exposition, quant à eux, étaient conservés dans des fioles Erlenmeyer (Nalgene). Tous les contenants servant à l'expérimentation ainsi que les unités de filtration servant à la récolte des cellules post exposition étaient fabriqués en polysulfone (Nalgene).

Pour prévenir la contamination bactérienne et métallique pouvant provenir du matériel utilisé lors des expérimentations, tous les contenants, unités de filtration et pointes de pipette étaient trempés dans l'acide nitrique (10 - 15 %) pendant une période d'au moins 24 h. Ensuite, le matériel était rincé intensivement 7 fois avec de l'eau ultrapure (~ 18 Mohms•cm) et séché sous une hotte à flux laminaire.

2.4 Méthodologie expérimentale générale

La méthodologie employée pour l'ensemble des expériences effectuées est standard et a été abondamment utilisée par plusieurs chercheurs dans notre laboratoire (Bates *et al.*, 1982, 1983 ; Harrison *et al.*, 1986 ; Schenck *et al.*, 1988). Les cellules étaient tout d'abord inoculées dans un milieu de culture standard (MHSM-1) à une densité d'environ 40000 cellules•mL⁻¹. Comme l'état physiologique des algues joue un rôle important sur la prise en charge des métaux (Bates *et al.*, 1983), pour

obtenir une meilleure répétabilité entre les expériences, les algues étaient toujours récoltées en phase exponentielle (~48 h après l'inoculation initiale). Lors de la récolte, la densité algale se situait entre 700 000 cellules•mL⁻¹ et 740 000 cellules•mL⁻¹. Les cellules étaient récoltées par centrifugation (Sorvall® RC 5C) à ~12 000 rpm entre 19 et 21 °C et rincées avec 10 mL de solution de rinçage ne contenant pas de métaux traces (MHSM-R1 ou MHSM-R2 selon que le milieu d'exposition suivant le rinçage contenait ou non du sulfate ; voir tableau 2.1). Ce cycle de centrifugation et rinçage était répété 5 fois (une centrifugation de 10 min et quatre centrifugations de 5 min). L'étape de rinçage était primordiale pour enlever les métaux (Cu, Fe, Mn, Zn) pouvant entrer en compétition avec le cadmium pour les transporteurs membranaires des algues et par le fait même, fausser nos résultats. Le rinçage permettait aussi d'enlever les différents ligands présents dans le milieu de culture (EDTA, exsudats d'algue) pouvant influencer la spéciation du cadmium libre en solution dans nos milieux d'exposition. Par la suite, les algues étaient resuspendues dans 10 mL de la même solution simplifiée (MHSM-R1 ou MHSM-R2 selon le cas). La densité algale ainsi que la superficie des algues étaient ensuite déterminées à partir de cette resuspension avec un compteur de particules (Beckman Coulter Counter Multisizer III, dilution de 0,1 mL de suspension dans 9,9 mL de solution isotonique, Isoton® III).

Le principe de fonctionnement du compteur de particules est relativement simple. La solution électrolytique contenant les cellules est aspirée dans un tube possédant une ouverture de 70 µm qui sépare deux électrodes parcourues par un faible courant électrique. Quand la particule traverse l'ouverture, elle déplace son propre volume de liquide isotonique ce qui augmente momentanément l'impédance de l'ouverture. Ce changement de résistance est transformé en concentration de particules par un détecteur. À partir de cette concentration algale, les algues étaient rapidement réparties dans les fioles Erlenmeyer d'exposition (3 répétitions pour chaque exposition) contenant une concentration connue de cadmium libre selon les conditions décrites pour chaque expérience (30 000 cellules•mL⁻¹, < 60 min ; 45 000 cellules•mL⁻¹, 72 h). Pour minimiser les changements dans les conditions

d'exposition, les fioles Erlenmeyer d'exposition contenant les cellules étaient gardées à température ($20,0 \pm 0,1$ °C) et luminosité ($100 \pm 10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) constantes jusqu'à leur manipulation.

2.4.1 Expériences de cinétique

À la suite de l'inoculation des cellules dans les milieux contenant le cadmium, soit une fois le temps d'exposition écoulé, les algues ($50 \text{ mL} \times 30\,000 \text{ cellules}\cdot\text{mL}^{-1} = 1\,500\,000$ cellules pour les expériences avec un temps de < 60 min ; $10 - 20 \text{ mL} \times \sim 350\,000 - \sim 700\,000 \text{ cellules}\cdot\text{mL}^{-1} = \sim 6\,000\,000 - \sim 7\,000\,000$ cellules pour les expériences sur 72 h) étaient récoltées sur deux filtres superposés de $2 \mu\text{m}$ en polycarbonate (Nuclepore®). Pour garder les cellules intactes lors de la filtration, nous avons utilisé un système de pompe manuelle procurant un faible vide (10 cm de Hg). Pour évaluer le cadmium qui pourrait être adsorbé et / ou absorbé sur le filtre, nous avons fait la différence de signal gamma entre le premier et le deuxième filtre. Cette soustraction nous permettait ainsi de déterminer le signal provenant du radio-métal pris en charge par les algues, après avoir désorbé des cellules le métal à leur surface (voir la section 2.6.5). La distinction entre le métal adsorbé et le métal intracellulaire est primordiale pour l'interprétation des résultats qui vont suivre. D'un point de vue théorique, l'adsorption du métal à la surface de l'algue s'effectue très rapidement (premières minutes), suivie d'une saturation des sites d'adsorption, ce qui est caractérisée par un plateau (Bates *et al.*, 1982 ; Schenck *et al.*, 1988). Pour ce qui est du métal absorbé par l'algue, le métal intracellulaire, il augmente de façon linéaire jusqu'à l'atteinte d'un état stationnaire entre le taux d'entrée et le taux de sortie, ce qui peut prendre plusieurs heures (section 3.1.3). Dans certains cas, l'algue peut modifier le taux d'entrée ou de sortie, ce qui peut influencer l'allure des courbes de prise en charge (Errécalde *et al.*, 2000).

Pour ne pas tenir compte de la fraction du signal qui provient du métal adsorbé, et ainsi surestimer la prise en charge de ce dernier par les cellules, nous avons rincé les algues avec une solution contenant de l'EDTA (10^{-4} M). Des expériences ont montré antérieurement que pour des métaux bivalents comme le Cd, le Cu, le Mn et

le Zn, la désorption du métal à la surface des cellules s'effectuait facilement avec de l'EDTA (10^{-3} à 10^{-5} M ; Bates *et al.*, 1982 ; Harrison *et al.*, 1986 ; Schenck *et al.*, 1988 ; Hassler *et al.*, 2004) De plus, l'EDTA possède deux qualités essentielles pour être un bon ligand de désorption, soit avoir une grande affinité pour le métal à d'étude ($\log K_{CdEDTA} = 18,26$) et être non assimilable. Nous n'avons pas utilisé de moyen alternatif pour désorber le métal de la surface des cellules, comme la substitution isotopique. Le signal gamma provenant de l'assimilation du cadmium radioactif était en dernier lieu normalisé en fonction de la surface totale des algues (en m^2). Cette normalisation facilite la comparaison entre espèces d'algues, ainsi qu'entre expériences successives (voir section 2.4.3).

2.4.2 Expériences de toxicité

Pour les expériences de toxicité, notre méthodologie s'apparentait beaucoup à celle employée par Errécalde *et al.* (1998). Les étapes préliminaires jusqu'à l'inoculation dans les milieux d'expositions étaient les mêmes que celles énoncées dans la section 2.4 (Méthodologie expérimentale). Le plus rapidement possible après avoir inoculé les cellules dans chaque milieu d'exposition (section 2.7), nous avons prélevé 1 mL de chaque réplicat. Nous avons dilué ce sous-échantillon avec 9 mL de solution isotonique (Isoton[®] III) et mesuré la densité algale avec le compteur de particules. Cette étape de détermination de la concentration cellulaire était répétée à plusieurs pas de temps (3½, 24, 32, 48, 72 h) sur une période totale de 72 heures. À partir de ces densités algales, nous avons tracé des courbes de croissance (densité cellulaire en fonction du temps) pour chacune des conditions expérimentales (section 2.7).

2.4.2 Dosage du cadmium (¹⁰⁹Cd) intracellulaire

L'activité du cadmium radioactif était mesurée avec un compteur gamma (Wallac 1480 Wizard™ 3"). Pour vérifier l'efficacité du compteur pour le cadmium, nous avons effectué plusieurs dilutions ($N \geq 3$) de la source originale. Dans le cas du cadmium, l'efficacité du compteur gamma était d'environ $40,00 \pm 0,01$ %. Le compteur Wallac fonctionne avec des protocoles préétablis. Donc, l'utilisateur

détermine le temps (2000 s) et le nombre limite de comptes (100 000) et lorsque l'un de ces paramètres est atteint, l'appareil passe à l'échantillon suivant. Ce temps de comptage s'est avéré optimal puisqu'il permettait d'obtenir une erreur sur l'activité relativement faible ($\leq 5\%$). La fenêtre pour mesurer les désintégrations peut aussi être déterminée par l'utilisateur. Comme nous avons seulement le cadmium à doser, la fenêtre était restreinte entre 16 et 36 keV (pic principal à 22 keV).

La préparation des échantillons différait un peu si l'on voulait doser le cadmium intracellulaire ou le cadmium en solution. Ainsi, pour le dosage du cadmium intracellulaire, chaque filtre était replié sur lui-même et déposé dans un flacon à scintillation de 5 mL (Opticlear, borosilicate, 5 mL) préalablement rempli avec 2 mL d'eau ultrapure pour uniformiser la géométrie du comptage. Pour le dosage du cadmium en solution, 2mL était prélevé et injecté dans le même type de flacons. Cependant, pour les échantillons avec une activité élevée (100 000 comptes en deçà des 2000 s), une dilution échantillon : eau (1 : 1) était effectuée pour diminuer l'activité et obtenir un temps de comptage semblable aux échantillons moins concentrés (2000 s).

La normalisation du signal gamma en fonction de la surface totale des algues (en m^2) était obtenue à partir de la transformation du résultat brut donné par l'appareil. En premier lieu, les comptes par minute (CPM) étaient transformés en désintégrations par minute (DPM) en divisant le CPM par l'efficacité (%) du compteur. Les DPM étaient ensuite converties en nCi en les divisant par 2220 ($2220 \text{ DPM} \cdot \text{nCi}^{-1}$) puis transformées en concentration totale de l'élément (nmol) en utilisant l'activité spécifique du cadmium (Amersham ; $3,45 \text{ mCi} \cdot \text{mg}^{-1}$, $743,90 \text{ mCi} \cdot \text{mg}^{-1}$). L'activité spécifique corrigée du cadmium est déterminée, dans un premier temps, à partir de l'activité spécifique initiale fournie par Amersham en corrigeant pour la décroissance radioactive selon l'équation 2.1 :

$$N = N_0 \cdot e^{-\frac{\ln 2 \cdot t}{t_{1/2}}} \quad (2.1)$$

où N est l'activité à un temps t , N_0 est l'activité initiale et $t_{1/2}$ est la demi-vie du radio-isotope ($^{109}\text{Cd} = 462,3$ jours). La quantité totale de cadmium (nmol) était obtenue à partir de l'activité mesurée en utilisant l'activité spécifique corrigée. Cette dernière devait tenir compte de toute dilution isotopique. Ce rapport isotopique correspond au taux de dilution du cadmium chaud (^{109}Cd) avec du cadmium froid (^{112}Cd). L'étape finale consistait à normaliser ce résultat pour la surface algale ($\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}$).

2.5 Calculs théoriques

Le cadmium, en milieu aqueux, peut former des complexes stables avec les ligands présents dans les milieux d'exposition. Pour les expériences de toxicité, comme les milieux d'exposition sont complets (afin de favoriser la croissance de l'algue), le cadmium est susceptible de se complexer avec des anions. Pour bien comprendre son comportement, la planification des expériences s'est effectuée en premier lieu en effectuant des simulations à l'aide d'un modèle d'équilibres chimiques (MINEQL+, v. 4.5). Donc, en connaissant d'avance le comportement du cadmium dans les milieux d'exposition, il nous était possible de toujours contrôler la proportion de cadmium qui était sous forme libre, peu importe la quantité de ligands présents dans le milieu. L'interprétation des résultats était, par le fait même, grandement simplifiée.

2.5.1 Spéciation du cadmium

Les calculs de spéciation du cadmium en milieu aqueux ont été effectués à partir de constantes thermodynamiques corrigées. En effet, certaines données dans la banque de données fournie avec le logiciel étaient erronées, et il fallait les remplacer avant de faire les simulations. Nous avons identifié les données à remplacer, et avons choisi de nouvelles valeurs à insérer en consultant deux banques standards (NIST : Martell *et al.*, 2001 ; IUPAC v. 5.15, 2001). Les principales constantes de formation utilisées lors de nos simulations sont indiquées dans le tableau 2.4. Pour

alléger le tableau, nous avons indiqué seulement les constantes avec les ligands d'intérêt, soit le thiosulfate, l'EDTA et le NTA.

Tableau 2.4 : Constantes de formation utilisées avec le Cd et le proton pour effectuer les calculs de spéciation ($I = 0$).

Complexe	Log K	Complexe	Log K
CdS_2O_3	3,920	HEDTA^{3-}	11,014
$\text{Cd}(\text{S}_2\text{O}_3)_2$	6,300	$\text{H}_2(\text{EDTA})^{2-}$	17,330
$\text{Cd}(\text{S}_2\text{O}_3)_3^{4-}$	6,400	$\text{H}_3(\text{EDTA})^-$	20,460
$\text{Cd}(\text{S}_2\text{O}_3)_4^{6-}$	8,200	H_4EDTA	22,680
$\text{Cd}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2$	12,300	H_5EDTA^+	24,180
CdEDTA^{2-}	18,260	HNNTA^{2-}	10,334
CdNTA^-	11,100	H_2NTA^-	13,274
$\text{Cd}(\text{NTA})_2^{4-}$	15,050	H_3NTA	14,900
HS_2O_3^-	1,600	H_4NTA^+	15,900
$\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$	2,200		

Lors des expériences de court terme (< 1 h), comme les milieux d'exposition étaient simplifiés, la spéciation du cadmium était plus facile à gérer. De plus, comme il avait été démontré précédemment, par Errécalde et Campbell (2000), que la concentration de l'ion métallique libre ne variait pas dans le temps pour une incubation inférieure à 1 h, le pourcentage de cadmium qui était sous forme de cadmium libre n'était pas une variable significative. Cette stabilité s'est confirmée lors de nos expériences du suivi de la $[\text{Cd}^{2+}]$ et de la $[\text{Cd}_T]$ sur une période de 72 h avec une technique d'échange ionique (TÉI) (section 2.9).

Pour ce qui est des expériences de long terme (72 h), la proportion de cadmium qui était sous forme libre devait être gardée le plus faible possible pour minimiser la perte de cadmium lors de l'expérience. Compte tenu de l'affinité modeste du thiosulfate pour le cadmium et de la complexité des milieux d'exposition (milieux avec oligo-nutriments), notre marge de manœuvre pour maintenir une force ionique

similaire entre les milieux d'exposition et les réplicats de référence était mince. Donc, nous n'avons pas utilisé seulement du thiosulfate pour complexer le cadmium. Le compromis que nous avons fait a été d'utiliser un mélange d'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et de thiosulfate (1 mM).

2.6 Prise en charge du complexe cadmium-thiosulfate

Le BLM nous indique que la réponse biologique (nutrition, prise en charge et toxicité) d'un organisme aquatique à une exposition métallique est proportionnelle à la concentration du métal libre en solution ($[M^{Z+}]$). Ce modèle sous-entend par le fait même que seule la forme cationique du métal peut être assimilée par l'organisme via des transporteurs membranaires servant en temps normal au transport de micro-nutriments essentiels. Lorsque le métal est non essentiel, comme le cadmium, on parle de transport accidentel. Il existe aussi à la surface des cellules des transporteurs anioniques servant à l'assimilation d'anions essentiels comme le sulfate et le phosphate. Comme ces transporteurs sont généralement peu spécifiques, l'absorption accidentelle de complexes métal-ligand (M-SO₄ et M-PO₄) pourrait être possible (Campbell, 1995). Cependant, comme la complexation des métaux avec le sulfate ou le phosphate est très faible, il est improbable, à des concentrations en métaux et en ligands retrouvées dans les eaux douces, que la proportion des complexes M-SO₄ et M-PO₄ stables jouent un rôle dans le transport accidentel des métaux comme le cadmium. Toutefois, certains ligands assimilables, comme le thiosulfate et le citrate, peuvent former des complexes relativement stables, avec les métaux non essentiels dans les conditions que l'on peut retrouver en eaux douces. Si cela était le cas, ces complexes pourraient jouer un rôle dans la prise en charge accidentelle par voie anionique.

Comme le thiosulfate, qui est un ligand assimilable, forme des complexes hydrophiles stables avec le cadmium (CdS₂O₃, Cd(S₂O₃)₂ : Log K₁=3,92, Log β₂ = 6,30), nous avons formulé l'hypothèse que le complexe cadmium-thiosulfate puisse entrer dans la cellule algale et ainsi contribuer à augmenter la prise en charge du

cadmium. Selon cette hypothèse, ce complexe cadmium-thiosulfate pourrait traverser la membrane cellulaire par un transporteur membranaire de sulfate. Ce transport accidentel se ferait donc par mimétisme moléculaire via le transporteur de sulfate. Comme c'est le cas pour toutes les algues unicellulaires, *Chlamydomonas reinhardtii*, possède un système de transport trans-membranaire pour l'assimilation du sulfate (Biedlingmaier et Schmidt, 1989 ; Yildiz *et al.*, 1994 ; Pérez-Castañeira *et al.*, 1998). Cette algue a été choisie comme modèle biologique pour confirmer ou infirmer que notre hypothèse selon laquelle le thiosulfate et le complexe cadmium-thiosulfate utilisent le même transporteur membranaire que le sulfate pour entrer dans la cellule.

2.6.1 Méthodologie expérimentale

Pour vérifier si la complexation du cadmium par le thiosulfate augmente la prise en charge de ce métal par *Chlamydomonas reinhardtii* et ainsi être en contradiction avec le BLM, nous avons réalisé six expériences : trois dont le temps d'exposition était en deçà d'une heure, et trois avec un temps d'exposition de 72 h. Pour chacune des expériences, les cellules étaient récupérées lors de la phase exponentielle pour maximiser la répétabilité des expériences. Les algues étaient ensuite rincées avec le milieu de rinçage approprié et inoculées dans les milieux d'exposition (voir la section 2.4 pour le détail de la méthodologie). Pour chaque expérience, nous avons trois réplicats de chaque milieu d'exposition.

2.6.2 Cinétique d'accumulation à court terme (< 1 h)

Lors de la première expérience, nous avons étudié la cinétique d'accumulation (11, 20, 31 et 41 minutes) dans trois milieux d'exposition différents (tableau 3.1 ; milieux A, B et D). La concentration en cadmium libre (Cd^{2+}) était constante à 2,75 nM dans chacun des milieux d'exposition. Comme le modèle du ligand biotique stipule que la biodisponibilité du métal est proportionnelle à la concentration de son ion libre en solution et que certains cations (H^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+}) peuvent rivaliser avec notre métal d'étude pour les transporteurs membranaires, il était essentiel de garder les concentrations de Cd^{2+} libre et de cations majeurs constantes dans chacun des

milieux d'exposition, afin de faciliter l'interprétation de la prise en charge dans les différents milieux. Les milieux A et B contenaient tous les deux une concentration de 1 mM en thiosulfate et par le fait même, possédaient une spéciation identique du cadmium. Le milieu A et le milieu B étaient différenciés par leur concentration en sulfate. Le milieu A ne contenait pas de sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ remplacé par du $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) tandis que la concentration en sulfate du milieu B était de 81 μM . Le milieu D, pour sa part, ne renfermait pas de thiosulfate, le NTA (100 nM) servait à complexer le cadmium à 2,75 nM de Cd^{2+} . Notons que nous n'avons pas fait le suivi de la concentration en cadmium libre durant l'expérience avec la technique d'échange ionique (TÉI) parce que nous avons démontré que la concentration de Cd^{2+} libre en solution ne changeait pas pour une période d'incubation inférieure à 1 h (section 3.3).

Tableau 2.5 : Conditions d'exposition au cadmium pour l'expérience de cinétique (< 1 h)

Milieux	$[\text{Cd}]_T$ (nM)	$[\text{Cd}^{2+}]$ (nM)	$[\text{SO}_4^{2-}]$ (μM)	$[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}]$ (mM)	[NTA] (nM)
A	17,8	2,75	–	1,00	–
B	18,0	2,75	81,20	1,00	–
D	8,65	2,75	81,20	–	100

Pour déterminer si le complexe cadmium-thiosulfate entrait dans la cellule via un transporteur membranaire de sulfate, nous avons réalisé deux expériences. Dans la première expérience, nous avons mesuré la prise en charge du cadmium en absence de thiosulfate après ~ 31 min en fonction de la concentration ambiante de sulfate. Cette dernière variait entre 0 μM et 400 μM pour des milieux d'exposition ne contenant pas de thiosulfate (tableau 2.6 ; milieu E : 0, 80, 160, 240, 320 et 400 μM de sulfate). La concentration en cadmium libre était maintenue constante à 2,75 nM dans chaque milieu par le NTA (100 nM). Nous avons ensuite refait l'expérience

(prise en charge après ~31 min) dans des milieux contenant du thiosulfate (1 mM). Encore une fois, la concentration de Cd^{2+} était constante à 2,75 nM et six concentrations de sulfate ont été utilisées (tableau 2.6 ; milieu F : 0, 80, 160, 240, 320 et 400 μM de sulfate).

Tableau 2.6 : Conditions d'exposition pour les expériences de prise en charge en fonction de la concentration de SO_4^{2-} .

Milieux	[Cd] _T (nM)	[Cd ²⁺] (nM)	[SO ₄ ²⁻] (μM)	[S ₂ O ₃ ²⁻] (mM)	[NTA] (nM)
E	8,65	2,75	0 – 400	–	100
F	17,8	2,75	0 – 400	1,00	–

2.6.2.1 Préparation des milieux

Tous les milieux d'exposition ont été préparés à partir des solutions mères (préalablement filtrées ; 0,2 μm , Poretics) décrites dans le tableau 2.2. Deux jours avant l'expérience, une solution intermédiaire contenant l'ammonium #2 (ou ammonium #3), le phosphate #2 et le KNO_3 était stérilisée par autoclavage à 121°C pendant 15 min. Ensuite, 24 h avant l'expérience, nous faisons l'ajout du ligand (thiosulfate ou NTA), du tampon HEPES et du cadmium radioactif. Il est à noter que le volume à injecter de la solution contenant le cadmium dépendait des dilutions préalables effectuées sur la solution mère de CdCl_2 .

Pour les deux expériences servant à vérifier l'effet de la concentration ambiante de sulfate, avec ou sans thiosulfate présent dans les milieux d'exposition, le sulfate était ajouté sous forme de KHSO_4 (solution mère de KHSO_4 à 0,01 M). En premier lieu, nous avons pensé ajouter une concentration croissante de sulfate sous forme de MgSO_4 , mais comme le magnésium est bivalent comme le cadmium, il aurait pu y avoir une compétition entre les deux cations pour des sites de transport et ainsi fausser nos résultats. Par souci de détail, la quantité de KNO_3 que nous ajoutions dans les milieux E et F variait de façon à maintenir une force ionique constante

dans tous les milieux d'exposition. Ainsi, plus nous augmentons la quantité de sulfate (sous forme de KHSO_4), moins nous ajoutons de KNO_3 .

Tableau 2.7 : Compositions chimiques et concentrations des milieux E₁ à E₆ et F₁ à F₆. Concentration en Cd^{2+} constante à 2,75 nM dans tous les milieux.

	E ₁ et F ₁	E ₂ et F ₂	E ₃ et F ₃	E ₄ et F ₄	E ₅ et F ₅	E ₆ et F ₆
Amm. #3	5mL•L ⁻¹	–	–	–	–	–
Amm. #2	–	5mL•L ⁻¹				
Phos. #2	250 µL•L ⁻¹					
KNO ₃ (1,0 M)	2,2 mL•L ⁻¹	2,1 mL•L ⁻¹	1,9 mL•L ⁻¹	1,7 mL•L ⁻¹	1,5 mL•L ⁻¹	1,3 mL•L ⁻¹
KHSO ₄ (0,01 M)	–	–	8 mL•L ⁻¹	16 mL•L ⁻¹	24 mL•L ⁻¹	32 mL•L ⁻¹
NaOH (0,10 M)*	Variable	variable	variable	variable	variable	variable
HEPES*	2,383 g•L ⁻¹					

* 24 h après l'autoclavage.

2.6.3 Cinétique d'accumulation à long terme (72 h)

Trois expériences de cinétique sur 72 h ont été effectuées pour confirmer les résultats obtenus sur moins d'une heure de prise en charge. La première série d'expériences (2 expériences distinctes) consistait à déterminer la prise en charge du cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii* après 72 h. Dans la première, les cellules étaient exposées à une concentration croissante de cadmium libre comprise entre 10 et 1050 nM (tableau 2.8 ; milieux G₁ à G₆). Chaque milieu d'exposition contenait une concentration constante d'EDTA de $1,5 \times 10^{-5}$ M. Dans la seconde expérience de cette série, les algues étaient en contact avec une concentration de Cd^{2+} comprise entre 11 et 1080 nM (tableau 2.8 ; milieux H₁ à H₆). Dans cette

expérience, pour complexer le cadmium, nous avons utilisé un mélange d'EDTA-thiosulfate ($[EDTA] = 1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ et $[S_2O_3^{2-}] = 1 \text{ mM}$). Comme nous l'avons mentionné précédemment (section 2.5.1), nous n'avons pas utilisé uniquement le thiosulfate pour complexer le cadmium, car la quantité de thiosulfate à ajouter pour bien tamponner le métal aurait été astronomique. De tels ajouts auraient donné une force ionique très élevée comparativement au milieu de culture standard (MHSM-1).

Tableau 2.8 : Conditions d'exposition pour les expériences de prise en charge après 72 h dans les milieux d'exposition avec ou sans thiosulfate.

	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	G ₆
Cd _T (μM)	12,1	12,9	13,6	14,3	15,0	15,4
Cd ²⁺ (nM)	10,2	30,4	88,4	302	756	1050
EDTA (μM)	15	15	15	15	15	15
	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆
Cd _T (μM)	12,2	13,1	14,1	16,0	19,6	22,2
Cd ²⁺ (nM)	11,2	32,6	91,1	308	766	1080
EDTA (μM)	15	15	15	15	15	15
S ₂ O ₃ ²⁻ (mM)	1	1	1	1	1	1

Dans la seconde série d'expériences, la cinétique d'accumulation (6, 12, 24, 36, 48 et 72 heures) a été suivie dans quatre milieux d'exposition (tableau 2.9 ; milieux I₁, I₂, J₁ et J₂). Les milieux I₁ et I₂ contenaient une concentration d'EDTA de $1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ tandis que le cadmium présent dans les milieux J₁ et J₂ était complexé par un mélange d'EDTA-thiosulfate ($[EDTA] = 1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ et $[S_2O_3^{2-}] = 1 \text{ mM}$). Les concentrations totales et libres de Cd étaient respectivement de 12,1 μM et 10,2 nM pour le milieu I₁ et de 15,4 μM et 1,05 μM pour le milieu I₂. Pour l'expérience avec le mélange EDTA-thiosulfate, les concentrations de Cd total et libre pour le milieu J₁ étaient de 12,2 μM et 11,2 nM. Pour le milieu J₂, elles étaient de 22,6 μM

et 1,08 μM . Il est à noter que toutes les concentrations qui viennent d'être mentionnées sont nominales. Comme nous ne savions pas comment ces concentrations évolueraient sur une période de 72 h et que nous anticipions un épuisement progressif du pool de Cd et/ou la présence d'exsudats pouvant potentiellement complexer le Cd et modifier sa spéciation, nous avons fait un suivi de la concentration réelle du cadmium libre avec une technique d'échange ionique (Fortin et Campbell, 1998 ; section 2.9 pour les détails). De plus, pour ne pas biaiser la prise en charge du cadmium, tous les milieux d'exposition contenaient les micronutriments nécessaires à une bonne croissance.

Tableau 2.9 : Conditions d'exposition pour les expériences sur le suivi de la $[\text{Cd}^{2+}]$ et la $[\text{Cd}_T]$ sur 72 h dans les milieux d'exposition avec ou sans thiosulfate.

	I1	I2	J1	J2
Cd_T (μM)	12,1	15,4	12,2	22,2
Cd^{2+} (nM)	10,2	1050	11,2	1080
EDTA (μM)	15	15	15	15
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (mM)	–	–	1	1

2.6.3.1 Préparation des milieux

La préparation des milieux d'exposition pour les expériences sur 72 h était semblable à celle pour les expériences à court terme. Après avoir passé à l'autoclave la solution intermédiaire contenant l'ammonium #2 (ou ammonium #3), le phosphate #2 et le KNO_3 à 121 °C pendant 15 min, nous ajoutons le ligand (EDTA ou mélange EDTA-thiosulfate), le cadmium radioactif, le tampon à pH (HEPES) et les oligo-éléments (AAP). Comme les algues devaient être présentes dans ces milieux d'exposition pendant 72 h, il était important d'éviter que les cellules soient carencées en oligo-éléments, car un mauvais état physiologique aurait pu grandement modifier positivement ou négativement la prise en charge du cadmium. Comme des tests préliminaires ont montré que sans l'ajout d'oligo-

éléments, les algues n'atteignaient pas la croissance exponentielle, nous en avons ajouté pour faciliter la croissance des cellules. Puisque ces milieux d'exposition étaient très complexes, les simulations de spéciation chimique étaient appuyées par un suivi du cadmium libre en solution à l'aide d'une technique d'échange ionique. Ce dosage devenait très important pour déterminer si les conditions d'exposition étaient stables.

2.7 Toxicité du complexe cadmium-thiosulfate

Les effets toxiques du cadmium chez les algues unicellulaires ont été abondamment étudiés au cours de trois dernières décennies. Généralement, le paramètre servant à quantifier la toxicité du cadmium (et d'autres métaux) est la concentration du métal inhibant 50 % de la croissance de l'algue (CE₅₀). Ce paramètre est très variable d'une espèce à une autre et dépend aussi des conditions d'exposition. Dans plusieurs études que nous avons recensées, les auteurs ne tenaient pas compte de la spéciation de cadmium, mais plutôt de la concentration totale en cadmium (parfois mesurée, souvent nominale). Comme la réponse biologique (toxicité) d'un organisme vivant face à un métal est proportionnelle à la concentration de l'ion métallique libre, plusieurs de ces études sont peu fiables puisqu'elles ne tenaient pas compte de la spéciation de cadmium. Pour ce qui est de l'effet du thiosulfate sur la toxicité du cadmium une fois à l'intérieur de la cellule, il n'y a pas d'études qui en démontrent l'effet chez une algue verte. Cependant, en présence d'argent, le thiosulfate réduit l'effet toxique de ce métal chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Hiriart-Baer *et al.*, en préparation) pour un quota cellulaire donné. L'évaluation de cette concentration effective a été faite à l'aide d'une technique de culture en continue.

Nous avons d'abord fait une expérience sans thiosulfate, afin d'obtenir une valeur de CE₅₀ de référence chez *Chlamydomonas reinhardtii*. À partir de cette valeur de référence, qui tient compte de la spéciation du métal, nous étions en mesure de quantifier l'effet du thiosulfate sur la toxicité du cadmium chez cette même algue

verte. Pour déterminer la toxicité du cadmium en présence ou non de thiosulfate, nous avons suivi le taux de croissance des algues (μ) et le rendement (R) après 72 h dans plusieurs milieux très bien tamponnés en Cd ($< 7\%$ du cadmium sous forme Cd^{2+}). Le rapport $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}_T$ était gardé le plus faible possible pour maintenir des conditions d'exposition stables durant la période d'exposition (72 h). À la lueur des résultats de toxicité obtenus avec l'argent, nous avons émis l'hypothèse que le cadmium assimilé en présence de thiosulfate soit moins toxique que celui assimilé en son absence. Selon le BLM, le taux de croissance et le rendement final dans les expériences avec ou sans thiosulfate devraient être identiques. Une augmentation ou une diminution de la valeur de ces paramètres, dans les expériences avec thiosulfate par rapport à celles mesurées dans les expériences, nous indiquerait que la toxicité du cadmium mesurée en présence de thiosulfate serait contradictoire au modèle du ligand biotique. Pour pouvoir comparer les résultats des différentes expériences, nous avons exposé les cellules à des concentrations de cadmium libre semblables dans les expériences avec ou sans thiosulfate, ce qui facilitera l'interprétation des résultats.

2.7.1 Méthodologie expérimentale

Pour vérifier si le thiosulfate a un effet sur la toxicité du cadmium chez une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*, nous avons réalisé deux expériences distinctes sur une période de 72 h. Pour minimiser les changements de concentrations en Cd_T et en Cd^{2+} , le cadmium était tamponné avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) dans la première expérience, tandis que dans la deuxième, le cadmium était tamponné avec un mélange thiosulfate-EDTA ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-} = 1 \times 10^{-3}$ M ; EDTA = $1,5 \times 10^{-5}$ M). Dans les deux expériences, le rapport $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}_T$ était inférieur à 10 %.

L'expérience sans thiosulfate nous permettait d'obtenir une valeur de CE_{50} de référence, à comparer avec celle obtenue en présence de thiosulfate, afin d'observer si ce dernier avait un effet sur la toxicité du cadmium. Pour chacune des deux expériences, nous avons trois réplicats de huit milieux différents. Le premier milieu était un milieu de culture standard (MHSM-1) pour obtenir une valeur de

taux de croissance et un rendement de référence. Le deuxième milieu consistait en un milieu de culture standard à lequel nous ajoutons le ligand à la concentration utilisée pour tamponner le cadmium (EDTA ou thiosulfate-EDTA). Ce milieu servait à vérifier que le changement de croissance des cellules provenait du cadmium libre en solution et non de ligand lui-même, qui aurait pu diminuer la disponibilité d'oligo-éléments pour les algues (forme libre). Les six autres milieux consistaient en des milieux de culture standards, avec les quantités de ligand choisies (tableau 2.10 et 2.11) et une concentration croissante de cadmium libre allant de 10 nM à 1 µM. Il est à noter que pour favoriser la croissance algale dans chacun des milieux, nous avons utilisé un milieu de culture standard et non un milieu simplifié comme dans le cas des expériences de prise en charge à court terme. La méthodologie pré-expérimentale est semblable que celle effectuée dans les autres expériences et est décrite en détail dans la section 2.4.

2.7.2 Milieux d'exposition pour les expériences avec ou sans thiosulfate

Lors de la première expérience, qui consistait à déterminer la toxicité du cadmium en absence de thiosulfate, nous avons suivi le taux de croissance ainsi que la densité algale après 72 h dans 8 milieux différents (voir tableau 2.10 ; milieux L₁ à L₈). Le milieu L₁ (milieu MHSM-1) et le milieu L₂ (MHSM-1 + EDTA = 1,5 × 10⁻⁵ M) ne contenaient pas de cadmium. Pour ce qui est des milieux L₃ à L₈, la concentration de cadmium total était comprise entre 12,1 µM et 15,4 µM tandis que celle en cadmium libre se trouvait entre 10,2 nM et 1,05 µM, la concentration de l'EDTA était constante à 1,5 × 10⁻⁵ M. Chacun des milieux d'exposition contenait les oligo-éléments nécessaires pour la croissance algale.

Pour déterminer si le cadmium pris en charge en présence de thiosulfate avait le même effet que celui absorbé en absence de ce ligand, nous avons aussi suivi le taux de croissance ainsi que le rendement après 72 h dans 8 milieux différents (voir tableau 2.11 ; milieux M₁ à M₈). Comme dans le cas de l'expérience sans thiosulfate, nous avons un milieu de référence (M₁ ; MHSM-1), un milieu de référence auquel nous avons ajouté le mélange de ligand thiosulfate-EDTA (M₂ ;

MHSM-1 + thiosulfate = 1 mM et EDTA = $1,5 \times 10^{-5}$ M) et six milieux de culture complet avec une concentration croissante de cadmium (M_3 à M_8). La concentration en cadmium libre variait entre 11,2 nM et 1080 nM et celle du cadmium total entre 12,2 μ M et 22,2 μ M.

2.7.2.1 Préparation des milieux

Les milieux d'exposition et de référence utilisés pour les expériences de toxicité ont été préparés à partir des solutions mères décrites dans le tableau 2.2. La méthodologie utilisée est la même que celle que nous avons employée pour la préparation des milieux de culture standard (section 2.2.1). Après avoir stérilisé, dans un autoclave à 121 °C pendant au moins 15 min, la solution intermédiaire contenant l'ammonium #2 (5 mL•L⁻¹), le phosphate #2 (250 μ L•L⁻¹) et le KNO₃ 1 M (4 mL•L⁻¹), nous avons ajouté les oligo-éléments (AAP ; 1 mL•L⁻¹), le tampon (HEPES ; 2,383 g•L⁻¹), les ligands (EDTA ou mélange thiosulfate-EDTA) et la solution de cadmium radioactif pour obtenir la concentration voulue. Finalement, le pH était ajusté à 7,0 avec du NaOH (0,10 M).

Tableau 2.10 : Conditions d'exposition pour l'expérience de toxicité du cadmium en absence de thiosulfate (EDTA seulement).

Milieux	[Cd] _T (μ M)	[Cd ²⁺] (nM)	Cd ²⁺ /Cd _T (%)	[EDTA] (μ M)	[S ₂ O ₃ ²⁻] (mM)
L ₁ ⁽¹⁾	–	–	–	–	–
L ₂ ⁽²⁾	–	–	–	15	–
L ₃	12,1	10	0,1	15	–
L ₄	12,9	30	0,2	15	–
L ₅	13,6	88	0,7	15	–
L ₆	14,3	302	2,1	15	–
L ₇	15,0	756	5,0	15	–
L ₈	15,4	1050	6,8	15	–

¹ L₁ est un milieu de culture standard servant de référence.

² L₂ est un milieu sans cadmium, avec l'EDTA pour déterminer l'effet de ce dernier sur les cellules.

Tableau 2.11 : Conditions d'exposition pour l'expérience de toxicité du cadmium en présence de thiosulfate (thiosulfate-EDTA).

Milieux	[Cd] _T (μM)	[Cd ²⁺] (nM)	[CdS ₂ O ₃] (nM)	[Cd(S ₂ O ₃) ₂ ²⁻] (nM)	[Cd ₂ (S ₂ O ₃) ₂] (nM)	Cd ²⁺ /Cd _T (%)	[EDTA] (μM)	[S ₂ O ₃ ²⁻] (mM)
M ₁ ⁽¹⁾	–	–	–	–	–	–	–	–
M ₂ ⁽²⁾	–	–	–	–	–	–	15	1
M ₃	12,2	11	47	11	0,07	0,1	15	1
M ₄	13,1	33	140	33	0,6	0,2	15	1
M ₅	14,1	91	393	92	44	0,6	15	1
M ₆	16,0	308	1320	310	50	1,9	15	1
M ₇	19,6	766	3210	751	297	3,9	15	1
M ₈	22,2	1080	4520	1050	590	4,9	15	1

¹ M₁ est un milieu de culture standard servant de référence.

² M₂ est un milieu sans cadmium, mais avec le mélange thiosulfate-EDTA pour déterminer l'effet de ce dernier sur les cellules.

2.8 Calcul du taux de croissance relatif et du rendement relatif

Le taux de croissance (μ ; divisions•h⁻¹) a été déterminé pendant la phase exponentielle de croissance (entre 3,5 et 24 h et entre 24 et 48 h), pour les huit milieux de chacune des deux expériences que nous avons réalisées, à partir de l'équation (2.2) :

$$\mu = \frac{\ln D_t - \ln D_{t_0}}{t - t_0} \quad (2.2)$$

où D_{t₀} et D_t sont la densité cellulaire mesurée d'un sous-échantillon (1 mL dilué dans 9 mL de solution isotonique) aux temps t₀ (initial) et t (final). En divisant le taux de croissance obtenu pour chacun des milieux avec cadmium (μ) par celui obtenu pour le milieu de référence MHSM-1 sans cadmium (μ_0) et en le multipliant par 100, nous obtenons un taux de croissance relatif (μ/μ_0) en pourcentage. Ce taux de croissance relatif peut ensuite être porté en graphique en fonction de la concentration de Cd²⁺, ce qui permet de comparer les expériences avec ou sans

thiosulfate et ainsi déterminer l'effet du thiosulfate sur la toxicité du cadmium vis à vis de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Comme deuxième paramètre de toxicité, nous avons suivi le rendement cellulaire (R ; cellules \bullet mL $^{-1}$) après 72 h dans les huit milieux de chacune des expériences. Ce rendement a été déterminé à partir d'un sous-échantillon de chaque milieu à la fin de l'expérience. Par la suite, en divisant le rendement obtenu pour chaque milieu avec cadmium (R) par le rendement du milieu de référence MHSM-1 (R_0) et en le multipliant par 100, nous obtenons un rendement relatif (R/R_0 ; %). Des graphiques, semblables à ceux obtenus avec le taux de croissance relatif, sont ensuite tracés pour comparer entre les expériences avec et sans ligand assimilable.

Le paramètre de toxicité qui découle des graphiques (taux de croissance et rendement relatif) et qui est le plus souvent utilisé dans la littérature s'exprime en concentration effective (CE) pour une diminution donnée du taux de croissance ou du rendement. Par exemple, la concentration de métal qui a pour effet de réduire le rendement de 30 % par rapport à celui observé dans le milieu de référence sera noter CE_{30} . Donc, en comparant la valeur de la concentration efficace que nous allons obtenir pour l'expérience avec thiosulfate et celle sans thiosulfate, nous allons pouvoir déterminer si ce ligand assimilable a un effet sur la toxicité du cadmium.

2.9 Technique d'échange ionique (TÉI)

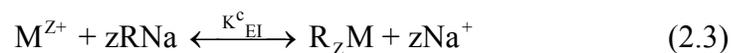
La technique d'échange ionique (TÉI) permet de doser l'ion métallique libre dans des milieux aqueux. La méthode a été utilisée en premier lieu pour mesurer la concentration de Ni^{2+} dans les eaux usées (Cantwell, 1982). Pour leurs analyses, une quantité de 25 g de résine (Dowex 50-X8, 50-100 mailles) était nécessaire et leurs milieux synthétiques servant à la calibration de cette dernière contenaient une concentration d'EDTA et de glycyl-L-alanine de l'ordre de 10^{-6} et 10^{-7} M. Par la suite, la méthode a été miniaturisée (1-2 mg de résine Dowex 50W-X8) par Treit *et*

al. (1983) pour doser le cuivre libre. Dans nos laboratoires, Fortin et Campbell (1998) ont testé cette TÉI en présence de ligands qui peuvent former des complexes anioniques ou cationiques en mettant l'accent sur les complexes chargés positivement. Par la suite, Laforte (2003 ; RI 145) a utilisé cette même technique pour déterminer la concentration de cadmium libre en présence de thiosulfate pour des milieux simples.

Puisque le modèle du ligand biotique nous indique que la réponse biologique des organismes aquatiques à un métal dépend de la concentration de son ion libre en solution (M^{Z+}), cette TÉI devenait intéressante pour déterminer la concentration de l'ion libre dans nos milieux d'exposition. De plus, comme la $[M^{Z+}]$ est très variable et dépend de plusieurs facteurs comme la complexation, l'adsorption et la précipitation, il devenait important de connaître l'évolution de la concentration des métaux traces lors d'expositions de longues durées. Dans de telles conditions, les facteurs pouvant influencer la concentration du cadmium libre sont difficiles à contrôler (ex. : complexation possible du métal par les exsudats). Nous avons donc dosé le Cd^{2+} pour connaître sa concentration de façon précise et ainsi, tirer les bonnes conclusions. De plus, comme ces milieux sont beaucoup plus complexes (présence de micronutriments), nous voulions vérifier si les valeurs calculées avec le modèle de spéciation chimique étaient semblables à celles mesurées avec la résine.

2.9.1 Théorie

La technique d'échange ionique s'appuie sur plusieurs principes théoriques qui sont détaillés par Fortin et Campbell (1998). La réaction (2.3), qui représente l'équilibre entre la résine échangeuse d'ions (sous forme sodique) et un métal M^{Z+} (en concentration trace), est décrite par la constante d'équilibre K_{EI}^c (2.4) :



$$K_{EI}^c = \frac{[R_zM] [Na^+]^z}{[M^{Z+}] [RNa]^z} \quad (2.4)$$

où R est la résine, RNa est un site de la résine occupé par un ion Na^+ , R_zM est un site de la résine occupé par un ion M^{Z+} et z le nombre de sites impliqués dans la rétention du métal M. Lorsque le métal trace est dans un milieu électrolytique fort ($NaNO_3 = 0,2 M$), la concentration de sodium en solution ($[Na^+]$) et adsorbé sur la résine ($[RNa]$) ne sont pas affectées de façon significative par l'adsorption du métal trace sur la résine parce qu'il occupe moins de 1 % des sites ($[RNa^+] \gg [R_zM]$). Par conséquent, à force ionique et pH fixe, l'équation (2.4) peut être réarrangée en fonction d'un coefficient de distribution $\lambda_{0,i,pH}$ (L/g) :

$$\lambda_{0,i,pH} = K_{EI}^c \frac{[RNa]^z}{[Na^+]^z} = \frac{[R_zM]}{[M^{Z+}]} \quad (2.5)$$

L'éluion de la résine avec un acide fort ($HNO_3 = 1,5 M$) permet de mesurer la quantité de métal qui est adsorbée sur la résine ($[R_zM]$) :

$$[R_zM] = \frac{[M_{ÉLUANT}]}{m_r} \times V \quad (2.6)$$

où V est le volume d'éluat et m_r la masse de la résine (7,481 mg). En calibrant la résine avec une concentration connue de métal libre en solution, nous pouvons déterminer le coefficient de distribution ($\lambda_{0,i,pH}$) spécifique au métal d'étude :

$$\lambda_{0,i,pH} = \frac{[M]_{ÉLUANT} \times V}{[M^{Z+}] \times m_r} \quad (2.7)$$

À partir du coefficient de distribution calculé, nous pouvons combiner et réarranger les équations (2.6) et (2.7) pour mesurer la concentration de métal libre dans une solution inconnue :

$$[M^{Z+}] = \frac{[M] \times V}{\lambda_{0,i,pH} \times m_r} \quad (2.8)$$

2.9.2 Équipements, produits et réactifs

Toutes les solutions servant au dosage du cadmium libre en solution étaient préalablement filtrées (0,2 μm ; Poretics). L'eau ultrapure ($\sim 18 \text{ Mohms}\cdot\text{cm}^{-1}$) était utilisée pour la préparation de ces solutions. La solution servant à rendre la résine sous forme sodique et celle employée pour l'élution étaient préparées respectivement à partir d'hydroxyde de sodium (Aristar) et d'acide nitrique (Qualité *Trace Metal*, Fisher). Pour augmenter la force ionique (0,2 M) de notre solution d'équilibration et celle avec le cadmium, nous avons utilisé du nitrate de sodium (BHD AnalaR). Pour fabriquer la résine échangeuse d'ion, nous avons utilisé une résine avec groupements sulfonates qui retiennent les cations (Dowex 50W-X8, grosseur 50-100 mailles). Tout le matériel servant à la conservation ou à toutes autres manipulations était en polyéthylène de haute densité (HDPE), en polypropylène (PP), en polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou en Teflon[®] (TFE, PTF). Une pompe péristaltique a été utilisée pour les manipulations (Minipuls3, GILSON[®]) et le pH a été déterminé à l'aide d'une électrode (PerpHect[®], 9206BN, ThermoOrion) et d'un pH-mètre (PHM240, MeterLab[®]).

2.9.3 Méthodologie expérimentale

La méthodologie utilisée pour la détermination du cadmium libre dans nos milieux d'exposition est décrite dans Fortin et Campbell (1998). Dans un premier temps, nous avons effectué des expériences préliminaires avec une version simplifiée du milieu de culture MHSM-1 (sans métaux AAP, phosphate et ligand), auquel nous avons ajouté une concentration connue de Cd_T . Nous avons ensuite ajusté la force ionique à $0,2 \text{ \acute{e}q}\cdot\text{L}^{-1}$ avec du NaNO_3 . Ces expériences nous ont servi à déterminer le coefficient de distribution du Cd^{2+} en fonction du pH et de la force ionique ($\lambda_{0,i,\text{pH}}$). À partir de ce coefficient ($0,86 \pm 0,02 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}$), nous avons effectué des tests avec des milieux de culture complets avec ligand (avec ou sans métaux, AAP et phosphate) et des concentrations connues de cadmium total et libre, pour vérifier si les valeurs calculées avec le modèle de spéciation chimique étaient semblables à celles mesurées avec la résine échangeuse d'ions.

Pour l'ensemble des expériences avec la résine d'échange cationique, incluant les expériences préliminaires, le protocole expérimental était le même. La résine était rincée à l'eau ultrapure ($\sim 18 \text{ Mohms}\cdot\text{cm}^{-1}$) pendant 8 min avec un débit de $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Par la suite, la résine était convertie sous forme sodique avec 10 ml de NaOH 0,1 M ($5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). La résine était par la suite rincée à l'eau ultrapure pendant 4 min. Le pH de la colonne était ajusté avec une solution du milieu de culture simplifié ne contenant ni métaux ni phosphate ($I = 0,2 \text{ éq}\cdot\text{L}^{-1}$). Nous prenions de petits volumes à la sortie de la résine et nous mesurions le pH à l'aide du pH-mètre. Lorsque le pH était stable à 7,0, la colonne était considérée comme étant à l'équilibre avec le milieu de culture complet contenant le cadmium dont nous voulions déterminer la concentration de Cd^{2+} libre et dont la force ionique était ajustée à $0,2 \text{ éq}\cdot\text{L}^{-1}$ avec du NaNO_3 . L'atteinte de l'équilibre prenait 4 min à un débit de $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La résine était ensuite rincée à l'eau ultrapure pendant 5 s et éluée avec du HNO_3 (1,5 M) à un débit de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 4 min. L'éluat était recueilli dans un flacon de 5 mL (Opticlear, borosilicate, 5 mL) préalablement pesé. Une fois l'éluat recueilli, nous le pesions à nouveau et avec la densité de l'acide nitrique ($1,055 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$), nous pouvions déterminer le volume exact d'éluat. En dernier lieu, le nombre de comptes par minute était déterminé à l'aide d'un compteur gamma (Wallac 1480 Wizard™ 3").

À partir des étapes de normalisation décrites dans la section 2.4.2, Dosage du cadmium (^{109}Cd) intracellulaire, nous avons converti les CPM en $[\text{Cd}]$ ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). En connaissant le coefficient de distribution du Cd^{2+} ($\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$), le volume exact d'éluant (mL), la masse de la résine (mg) et la concentration de cadmium dans l'éluant ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), nous avons tous les termes de l'équation 2.8 pour déterminer la concentration de cadmium libre dans chaque échantillon.

2.9.4 Schématisation expérimentale

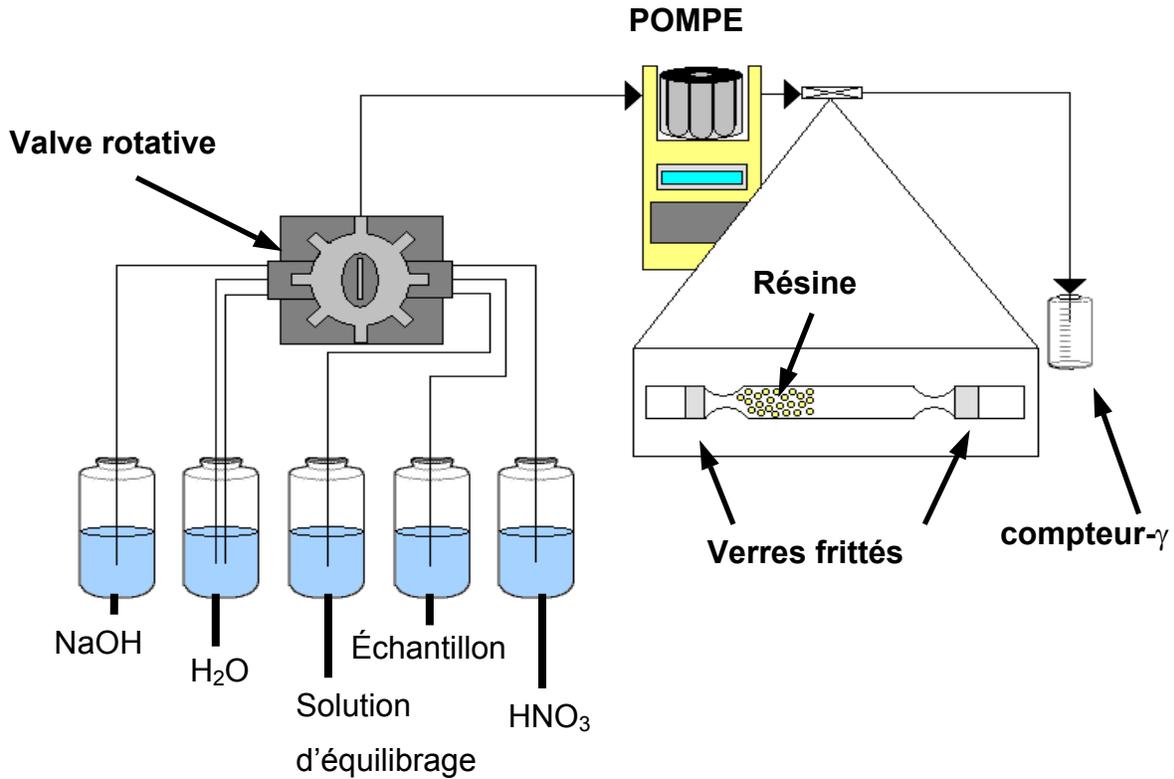


Figure 2.2 : Schéma expérimental de la technique d'échange ionique (TÉI).

2.10 Analyses statistiques

Pour comparer et déterminer s'il existe une différence significative entre les points issus des expériences avec ou sans thiosulfate dans les milieux d'exposition, nous avons réalisé des analyses statistiques. Pour ce faire, nous avons utilisé dans un premier temps le logiciel SYSTAT, version 10 de SPSS Science Marketing Department, Chicago, IL, USA en procédant par analyse de variance à une voie (ANOVA). Ce type de test sous-entend que la normalité des données et l'homogénéité des variances soient respectées (Test de Kolmogorov-Smirnov). Si ces conditions étaient observées, le test *a posteriori* SNK (Student-Newman-Keuls) nous servait à déterminer quels étaient les points significativement différents ($P < 0,05$).

3. Résultats

3.1 Cinétique d'accumulation du cadmium

3.1.1 Expériences de prise en charge à court terme (< 1 h)

Le premier objectif de cette recherche était de déterminer l'effet du thiosulfate sur la biodisponibilité du cadmium. Pour ce faire, nous avons déterminé la prise en charge du cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii* dans trois milieux simplifiés (sans oligoéléments nutritifs (AAP), sans PO_4^{3-} et sans NO_3) après 11, 20, 31 et 41 min d'exposition. La concentration de cadmium libre était constante à 2,75 nM dans les trois milieux (A, B et D ; voir le tableau 2.5 pour les autres spécifications).

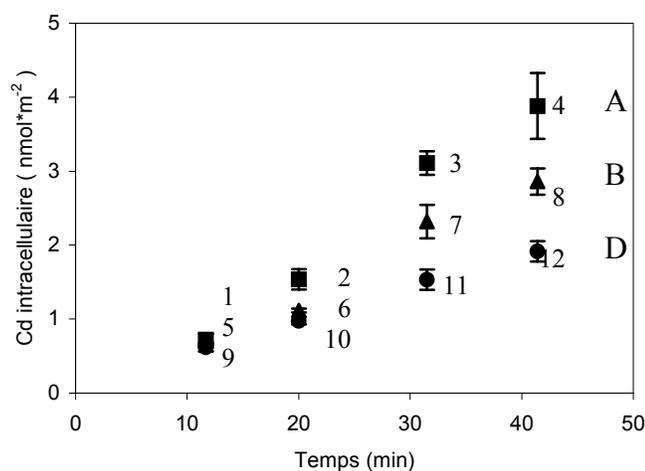


Figure 3.1 : Prise en charge du cadmium en fonction du temps à une concentration de Cd^{2+} constante à 2,75 nM. Le milieu (■) représente la prise en charge en présence de thiosulfate (1 mM) mais en absence de sulfate. Le milieu (▲) représente la prise en charge en présence de thiosulfate (1 mM) et de sulfate (81 μM). Le milieu (●) représente la prise en charge en présence de sulfate et de NTA (100 nM) mais en absence de thiosulfate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Tableau 3.1 : Résultats de l'ANOVA pour la prise en charge du Cd par *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 7 (figure 3.1). Les différences significatives ($P < 0,05$) sont représentées par un signe +, sinon on note -.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-											
2	+	-										
3	+	+	-									
4	+	+	+	-								
5	-	+	+	+	-							
6	-	-	+	+	+	-						
7	+	+	+	+	+	+	-					
8	+	+	-	+	+	+	+	-				
9	-	+	+	+	-	+	+	+	-			
10	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-		
11	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	
12	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-

Nous pouvons remarquer sur la figure 3.1 que l'accumulation du cadmium par cette algue verte était linéaire sur une période en deçà d'une heure et que l'accumulation de cadmium intracellulaire ($\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}$) en présence de thiosulfate (points 1 \rightarrow 4 et 5 \rightarrow 8) était plus élevée que dans le milieu témoin (points 9 \rightarrow 12). Après 40 min, l'accumulation était supérieure d'un facteur 2 dans le milieu A (présence de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, absence de SO_4^{2-}) et d'un facteur 1,5 dans le milieu B (présence de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, présence de SO_4^{2-}) comparativement au milieu D sans thiosulfate (milieu témoin tamponné avec du NTA). Une différence significative ($P < 0,05$) entre les trois milieux était observée après 31 min d'exposition (points 3, 7 et 11) et elle se maintient après 41 min (points 4, 8 et 12) (voir le tableau 3.1).

3.1.2 Expériences de variation de la concentration de sulfate

Sur la figure 3.1, nous pouvons aussi constater que pour une même concentration de thiosulfate (1 mM) et de cadmium libre en solution (2,75 nM), la concentration ambiante de sulfate dans le milieu d'exposition semblait avoir un effet sur la prise

en charge du cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii*. Si on compare les milieux A et B, on remarque qu'une diminution de la concentration ambiante de sulfate (81 μM (B) à 0 μM (A)) a causé une augmentation de la prise en charge du cadmium en présence de thiosulfate. Pour mesurer l'impact de la concentration ambiante de sulfate sur la prise en charge du complexe cadmium-thiosulfate, nous avons tout d'abord mesuré le cadmium intracellulaire ($\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}$) après 31 min dans 6 milieux (milieu E ; tableau 2.6) ne contenant pas de thiosulfate et ayant des concentrations ambiantes croissantes de sulfate : 0, 80, 160, 240, 320 et 400 μM . Cette expérience était importante puisqu'elle nous a permis d'établir que la concentration ambiante de sulfate n'avait pas d'effet significatif (ANOVA ; $P < 0,05$) sur l'accumulation de cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii* lorsque le thiosulfate était absent des milieux d'exposition (figure 3.2). Rappelons que le cadmium était tamponné à une $[\text{Cd}^{2+}]$ libre de 2,75 nM à l'aide de NTA (100 nM).

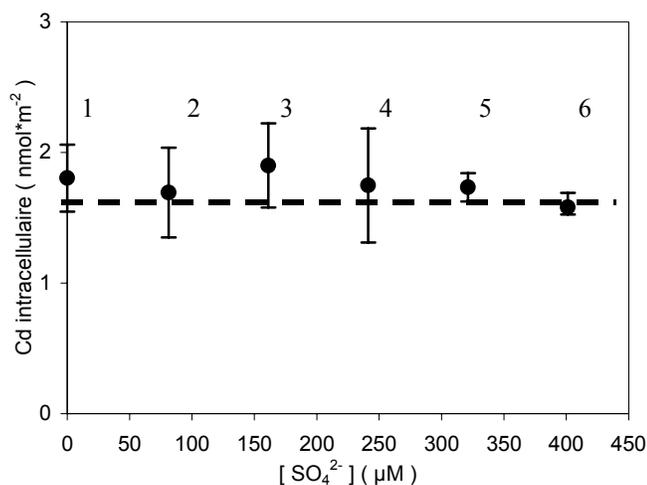


Figure 3.2 : Prise en charge du cadmium à concentration constante de Cd^{2+} (2,75 nM) et à concentration variable de sulfate (en absence de thiosulfate). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Comme la concentration ambiante de sulfate n'avait pas d'effet sur la prise en charge du cadmium lorsque les milieux d'exposition ne contenaient pas de thiosulfate, nous avons ensuite refait varier les concentrations ambiantes de sulfate

de 0 μM à 400 μM dans des milieux tamponnés à une $[\text{Cd}^{2+}]$ de 2,75 nM, mais cette fois en présence de thiosulfate (1 mM ; milieu F ; tableau 2.6). Cette expérience avait pour but déterminer si le complexe cadmium-thiosulfate était transporté à l'intérieur de la cellule algale via un transporteur de sulfate. Sur la figure 3.3, nous pouvons remarquer que la concentration de sulfate avait un effet significatif ($P < 0,05$) sur la prise en charge du cadmium lorsque le thiosulfate était présent dans les milieux d'exposition. Cet effet compétiteur du sulfate sur l'accumulation du complexe cadmium-thiosulfate par cette algue verte unicellulaire se produisait jusqu'à des concentrations de sulfate de 400 μM (point 6). Pour le milieu d'exposition dont la concentration de sulfate était de 320 μM (point 5), la variation de la prise en charge n'était pas significativement différente de celle obtenue lorsque la $[\text{SO}_4^{2-}]$ était de 160 et 240 μM (voir tableau 3.2).

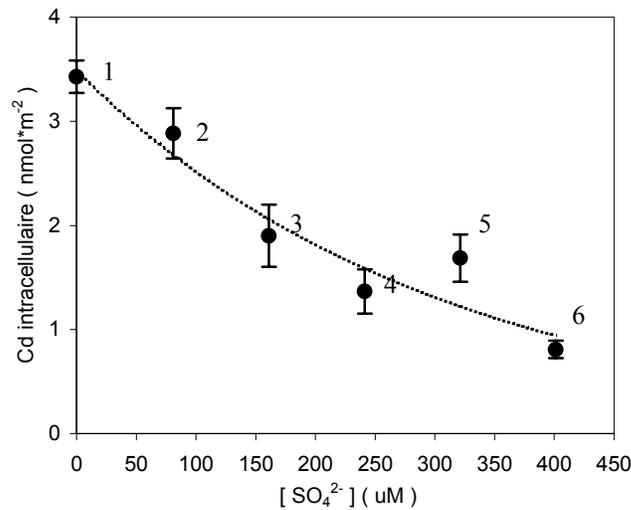


Figure 3.3 : Effet de la concentration ambiante de sulfate dans les milieux d'exposition avec thiosulfate sur la prise en charge du cadmium à concentration constante de Cd^{2+} (2,75 nM). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. La ligne pointillée représente la courbe de tendance sur l'ensemble des valeurs moyennes.

Tableau 3.2 : Résultats de l'ANOVA sur l'effet de la concentration ambiante de sulfate sur la prise en charge de cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii* lorsque les milieux d'exposition contiennent du thiosulfate (figure 3.3). Les différences significatives ($P < 0,05$) sont représentées par un signe +, sinon on note -.

	1	2	3	4	5	6
1	-					
2	+	-				
3	+	+	-			
4	+	+	+	-		
5	+	+	-	-	-	
6	+	+	+	+	-	-

3.1.3 Expériences de prise en charge à long terme (72 h)

Pour confirmer que la prise en charge du cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii* était plus élevée lorsque le thiosulfate était présent dans les milieux d'exposition, nous avons mesuré la prise en charge du cadmium sur une période de 72 h et ce, pour deux concentrations de Cd^{2+} (0,01 et 1 μM).

Dans la première expérience, la concentration de cadmium libre était de 0,01 μM dans le milieu tamponné seulement avec une $[\text{EDTA}] = 1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ (milieu I₁ ; tableau 2.9) et dans celui tamponné avec un mélange de thiosulfate et d'EDTA ($[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}] = 1 \text{ mM}$ et $[\text{EDTA}] = 1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$) (milieu J₁ ; tableau 2.9). La figure 3.4 indique que la prise en charge était supérieure sur toute la période d'exposition lorsque le milieu contenait du thiosulfate. Les résultats des tests statistiques pour établir les différences significatives entre les milieux sont présentés dans le tableau 3.3.

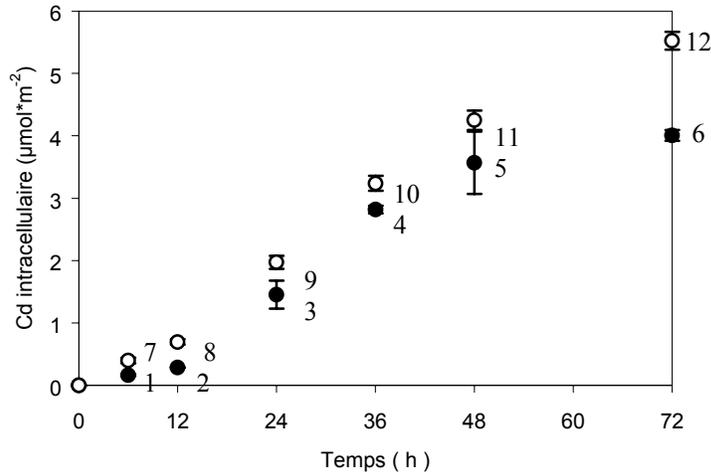


Figure 3.4 : Prise en charge du cadmium en fonction du temps à une concentration de Cd^{2+} initiale constante ($0,01 \mu\text{M}$). Le milieu (●) représente la prise en charge lorsque la $[\text{Cd}_T] = 12,1 \mu\text{M}$ et que le milieu est tamponné avec une $[\text{EDTA}] = 1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$. Le milieu (○) représente la prise en charge lorsque la $[\text{Cd}_T] = 12,2 \mu\text{M}$ et que le milieu est tamponné avec un mélange thiosulfate-EDTA ($[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}] = 1 \text{ mM}$ et $[\text{EDTA}] = 1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Tableau 3.3 : Résultats de l'ANOVA pour la prise en charge de cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 7 (figure 3.4). $[\text{Cd}^{2+}] = 0,01 \mu\text{M}$. Les différences significatives ($P < 0,05$) sont représentées par un signe +, sinon on note -.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-											
2	-	-										
3	+	+	-									
4	+	+	+	-								
5	+	+	+	+	-							
6	+	+	+	+	+	-						
7	-	-	+	+	+	+	-					
8	-	-	+	+	+	+	-	-				
9	+	+	-	+	+	+	+	+	-			
10	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-		
11	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

La même augmentation de prise en charge du cadmium a été observée lorsque les milieux étaient tamponnés avec un mélange de thiosulfate et d'EDTA ($[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}] = 1 \text{ mM}$ et $[\text{EDTA}] = 1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$) et que la concentration ambiante de cadmium libre était $100 \times$ supérieure (milieux I₂ et J₂ ; tableau 2.9). La figure 3.5 nous montre que lorsque la $[\text{Cd}^{2+}]$ était de $1 \text{ } \mu\text{M}$, la prise en charge de ce métal était supérieure en présence de thiosulfate (○) dans le milieu d'exposition, et ce peu importe le temps d'exposition. Par exemple, la prise en charge du cadmium après 72 h était de $14 \pm 1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ pour les cellules exposées au cadmium en absence de thiosulfate (milieu I₂ ; tableau 2.9) et de $20 \pm 1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ lorsque le milieu était tamponné avec un mélange thiosulfate-EDTA. Si on compare les valeurs de prise en charge obtenues après 72 h lorsque la concentration ambiante de cadmium libre était de $1 \text{ } \mu\text{M}$ (figure 3.5) avec celles obtenues pour une $[\text{Cd}^{2+}]$ de $0,01 \text{ } \mu\text{M}$ (figure 3.4), on peut remarquer que la prise en charge augmentait d'un facteur de $3,5 \times$ et ce, en présence ou non de thiosulfate. Pour ce qui est du facteur d'augmentation de la concentration interne de cadmium en présence de thiosulfate après 72 h, il est demeuré constant (30 % d'augmentation) pour les deux concentrations initiales de cadmium libre ($0,01$ et $1 \text{ } \mu\text{M}$).

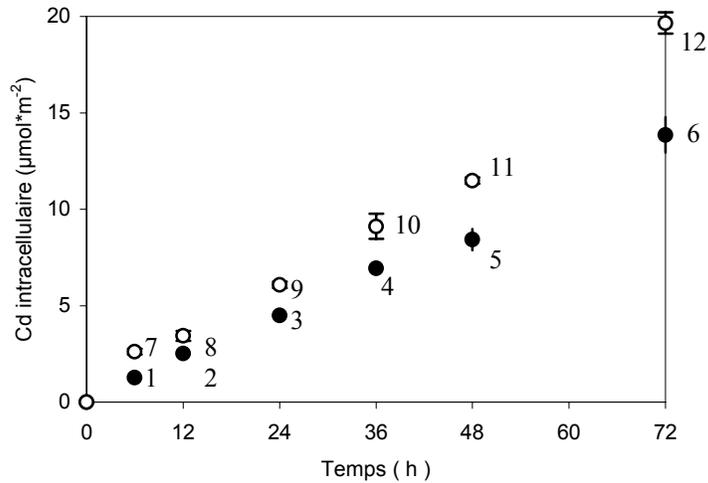


Figure 3.5 : Prise en charge du cadmium en fonction du temps à une concentration de Cd^{2+} constante. Le milieu (●) représente la prise en charge lorsque la $[Cd_T] = 15,4 \mu M$, la $[Cd^{2+}] = 1,05 \mu M$ et que le milieu est tamponné avec une $[EDTA] = 1,5 \times 10^{-5} M$. Le milieu (○) représente la prise en charge lorsque la $[Cd_T] = 22,2 \mu M$, la $[Cd^{2+}] = 1,08 \mu M$ et que le milieu est tamponné avec un mélange thiosulfate-EDTA ($[S_2O_3^{2-}] = 1 mM$ et $[EDTA] = 1,5 \times 10^{-5} M$). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Tableau 3.4 : Résultats de l'ANOVA pour la prise en charge de cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 7 (figure 3.5). $[Cd^{2+}] = 1 \mu M$. Les différences significatives ($P < 0,05$) sont représentées par un signe +, sinon on note -.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-											
2	-	-										
3	-	-	-									
4	+	-	-	-								
5	+	+	-	-	-							
6	+	+	+	+	+	-						
7	-	-	-	-	+	+	-					
8	-	-	-	-	+	+	-	-				
9	+	-	-	-	-	+	-	-	-			
10	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-		
11	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

3.1.4 Expériences de prise en charge en fonction du cadmium libre calculé

Nous avons aussi déterminé la prise en charge du cadmium après 72 h en fonction de la concentration de cadmium libre en solution dans des milieux tamponnés avec de l'EDTA ou avec un mélange thiosulfate-EDTA. Dans les deux expériences, la concentration de ligands était constante d'un milieu à l'autre mais celle de Cd_T était variable. On remarque sur la figure 3.6 que lorsque le cadmium était complexé avec de l'EDTA, la prise en charge de ce métal par *Chlamydomonas reinhardtii* augmentait rapidement en fonction de la $[Cd^{2+}]$ libre. Le même type de relation pouvait être observée lorsque le cadmium est complexé avec un mélange EDTA-thiosulfate. Cette figure (3.6) nous indique aussi que l'accumulation intracellulaire de cadmium n'était pas significativement différente entre les milieux sans thiosulfate et avec thiosulfate pour les quatre plus faibles concentrations de cadmium libre en solution (différence non significative entre les points 1-7, 2-8, 3-9 et 4-10 ; tableau 3.5).

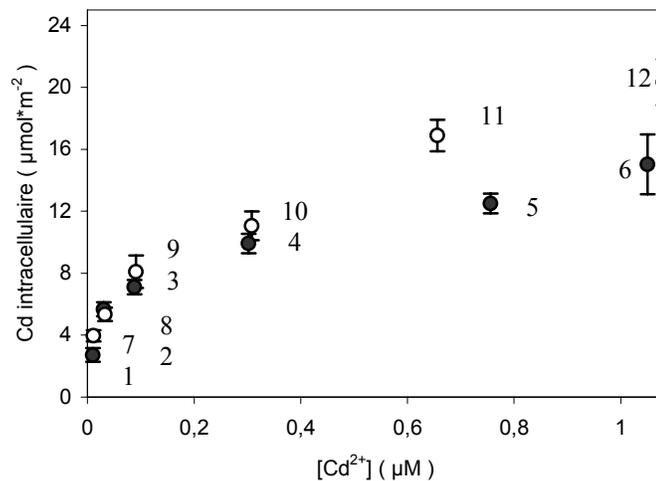


Figure 3.6 : Prise en charge du cadmium après 72 h en fonction de la concentration de Cd^{2+} mesurée avec MINEQL+ lorsque $[Cd_T]_{nominale}$ est variable. Le milieu (●) représente la prise en charge lorsque le milieu est tamponné avec une $[EDTA] = 1,5 \times 10^{-5}$ M. Le milieu (○) représente la prise en charge lorsque le milieu est tamponné avec un mélange thiosulfate-EDTA ($[S_2O_3^{2-}] = 1$ mM et $[EDTA] = 1,5 \times 10^{-5}$ M). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Tableau 3.5 : Résultats de l'ANOVA pour la prise en charge de cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction de la concentration en cadmium libre en solution (figure 3.6). Les différences significatives ($P < 0,05$) sont représentées par un signe +, sinon on note -.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-											
2	-	-										
3	+	-	-									
4	+	+	+	-								
5	+	+	-	-	-							
6	+	-	+	+	-	-						
7	-	-	-	+	+	+	-					
8	-	-	-	+	+	+	-	-				
9	+	+	-	-	+	+	+	-	-			
10	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-		
11	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

3.2 Toxicité du cadmium

Le second objectif de cette recherche consistait à déterminer la toxicité du cadmium pris en charge en absence ou en présence de thiosulfate pour établir si ce ligand modifiait l'effet du Cd accumulé chez cette algue verte. Pour ce faire, nous avons réalisé deux séries d'expériences (séries a et b) dans lesquelles nous avons exposé l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* à plusieurs concentrations de cadmium libre en solution dans des milieux tamponnés avec une concentration fixe d'EDTA de $1,5 \times 10^{-5}$ M et dans des milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) (voir les tableaux 2.10 et 2.11 pour les spécifications complètes de milieux d'exposition). Après l'inoculation initiale et à plusieurs occasions durant les 72 h de l'expérience, la densité cellulaire était déterminée dans les différents milieux d'exposition (figures 3.7 et 3.8). Dans les deux traitements (des deux séries d'expériences), l'augmentation de cadmium libre en solution a eu pour effet de retarder la croissance de cette algue verte unicellulaire. La comparaison entre les figures 3.7 et 3.8 ne nous permet cependant

pas d'établir directement l'implication du thiosulfate dans la toxicité du cadmium sur une algue verte. Pour ce faire, nous avons mesuré le taux de croissance relatif ainsi que le rendement relatif à la fin des 72 h d'exposition pour chacun des milieux (avec et sans thiosulfate). Notons que seuls les résultats de la première série (série a) sont présentés pour les différents taux de croissance relatifs, car ceux de l'autre série (série b) étaient trop erratiques. Alors que pour les rendements relatifs, les résultats des deux séries sont exposés.

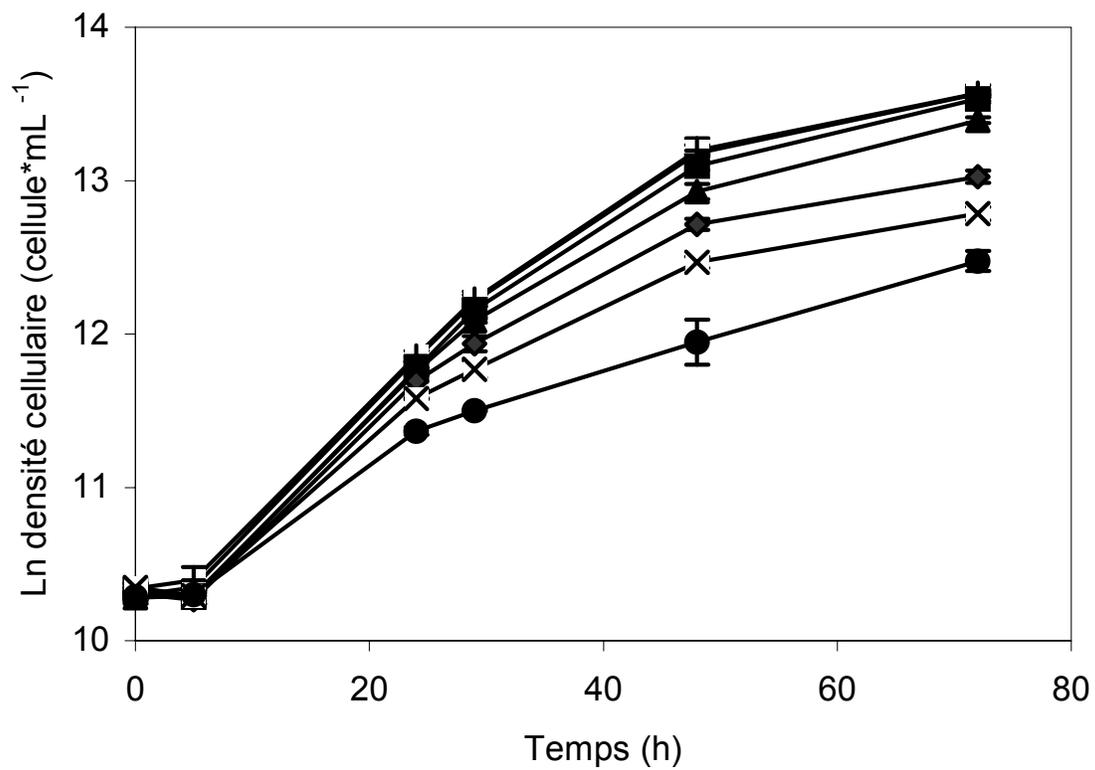


Figure 3.7 : Effet du Cd²⁺ libre sur la croissance de *C. reinhardtii* (logarithme naturel de la densité cellulaire en fonction du temps) lorsque les

milieux d'exposition sont tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). (+) témoin, (-) témoin avec ligand, (■) = 0,010 μM Cd^{2+} libre, (▲) = 0,088 μM , (◆) = 0,30 μM , (×) = 0,76 μM , (●) = 1,05 μM . Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL+.

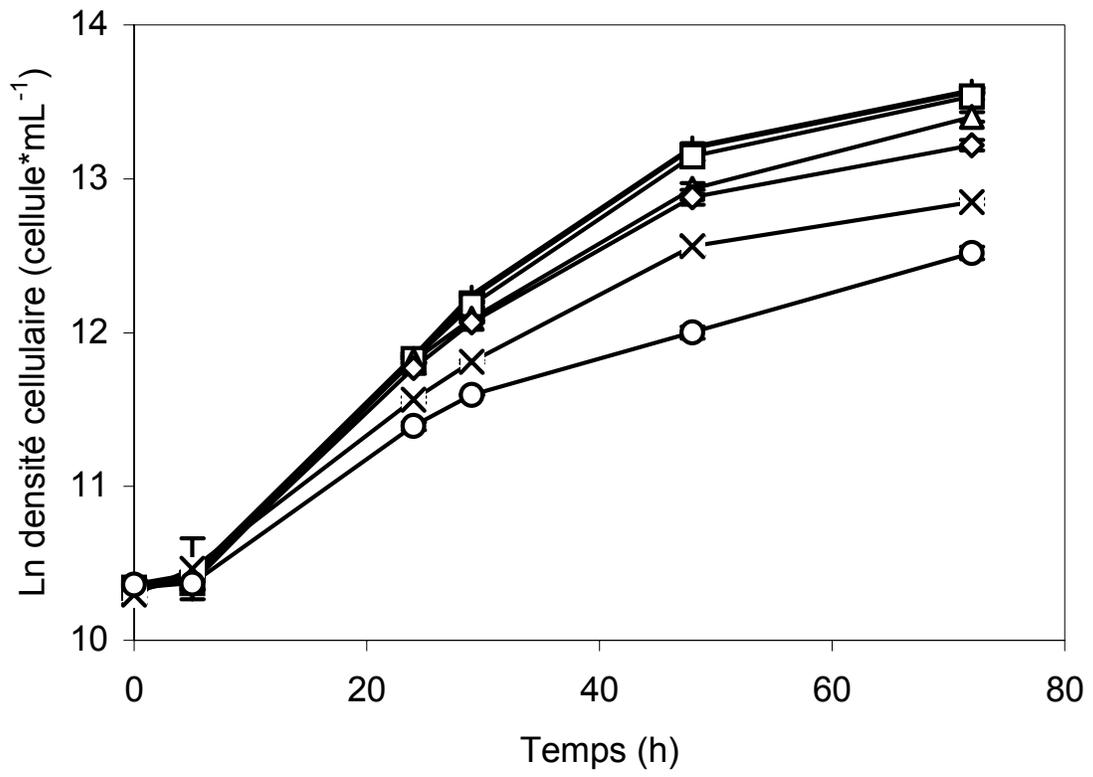


Figure 3.8 : Effet du Cd^{2+} libre sur la croissance de *C. reinhardtii* (logarithme naturel de la densité cellulaire en fonction du temps) lorsque les milieux d'exposition sont tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et du thiosulfate (1×10^{-3} M) (+) témoin, (-) témoin avec ligand, (\square) = 0,011 μM Cd^{2+} libre, (Δ) = 0,091 μM , (\diamond) = 0,31 μM , (\times) = 0,77 μM , (\circ) = 1,08 μM . Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL+.

3.2.1 Résultats exprimés en fonction de la $[\text{Cd}^{2+}]$ calculée

3.2.1.1 Taux de croissance relatifs

Pour déterminer l'influence du thiosulfate sur la toxicité du cadmium, nous avons calculé en premier lieu le taux de croissance relatif (μ/μ_0) (voir la section 2.8) pour chacune des concentrations de cadmium libre à différents stades de la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii*, soit pendant la phase exponentielle (entre 5 et 24 h, et entre 24 et 29 h), ainsi qu'au début de la phase stationnaire (entre 29 et 48 h).

En comparant la courbe obtenue lorsque les milieux sont tamponnés avec de l'EDTA seulement (\bullet) avec celle obtenue avec le mélange EDTA-thiosulfate (\circ), et ce pendant la période de 5 à 24 h (figure 3.9), nous pouvons constater que la présence de thiosulfate dans les milieux d'exposition ne modifiait pas la toxicité du cadmium puisque les deux courbes se superposent. La figure 3.9 démontre que l'effet du cadmium libre en solution (inhibition de la croissance) commençait à se faire sentir significativement ($P < 0,05$) à une $[\text{Cd}^{2+}]$ de 0,76 μM pour les milieux sans thiosulfate ($\mu/\mu_0 = 88$ %) et avec thiosulfate ($\mu/\mu_0 = 78$ %). Aux concentrations inférieures testées, les taux de croissances relatifs n'étaient pas significativement différents ($P < 0,05$) et étaient très près de 100 %. Il n'y avait pas de différences significatives entre les milieux avec ou sans thiosulfate et ce, peu importe la concentration de cadmium libre.

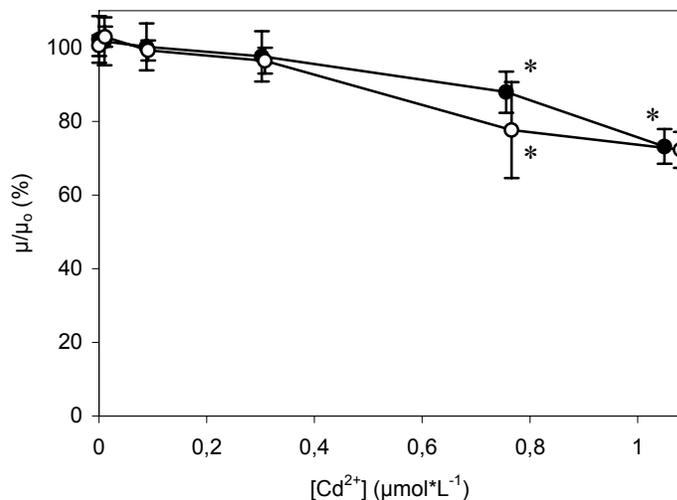


Figure 3.9 : Taux de croissance relatif (μ/μ_0) de *C. reinhardtii* entre 5 et 24 h en fonction du Cd^{2+} libre en solution calculée avec MINEQL+ lorsque $[\text{Cd}_T]_{\text{nominale}}$ est variable. μ = taux de croissance pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; μ_0 = taux de croissance du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Pendant la période suivante, toujours en phase exponentielle (24 → 29 h), la croissance de *C. reinhardtii* semblait légèrement plus sensible au Cd que pendant la période précédente, c'est-à-dire que les taux de croissance relatifs diminuaient à des concentrations en Cd libre plus faibles ($< \sim 0,3 \mu\text{M}$; figure 3.10). Cependant, encore une fois dans cette phase de croissance, nous n'observons pas de différences significatives, pour une concentration semblable de cadmium libre, entre les milieux contenant ou non du thiosulfate.

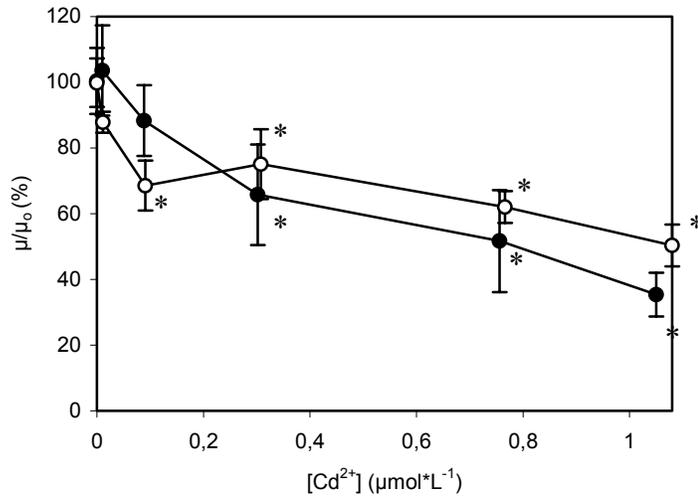


Figure 3.10 : Taux de croissance relatif (μ/μ_0) de *C. reinhardtii* entre 24 et 29 h en fonction du Cd^{2+} libre en solution calculée avec MINEQL+ lorsque $[\text{Cd}_T]_{\text{nominale}}$ est variable. μ = taux de croissance pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; μ_0 = taux de croissance du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

La dernière période considérée, entre 29 et 48 h, était caractérisée par une diminution de la croissance algale (voir les figures 3.7 et 3.8). Comme dans la phase exponentielle (figures 3.9 et 3.10), la présence de thiosulfate n'avait pas d'effet significatif sur les taux de croissance relatifs chez cette algue verte, les deux courbes de réponse étant presque superposées l'une sur l'autre (figure 3.11). L'effet du Cd se faisait sentir dans les milieux avec ou sans thiosulfate à partir de concentrations supérieures à $\sim 0,8 \mu\text{M}$. Pour le milieu tamponné avec de l'EDTA, le taux de croissance relatif (μ/μ_0) pour une $[\text{Cd}^{2+}]$ de $1,02 \mu\text{M}$ était de $46 \pm 16 \%$, et pour le milieu tamponné avec un mélange EDTA-thiosulfate, il se situait à $42 \pm 4 \%$ pour une $[\text{Cd}^{2+}]$ de $1,08 \mu\text{M}$.

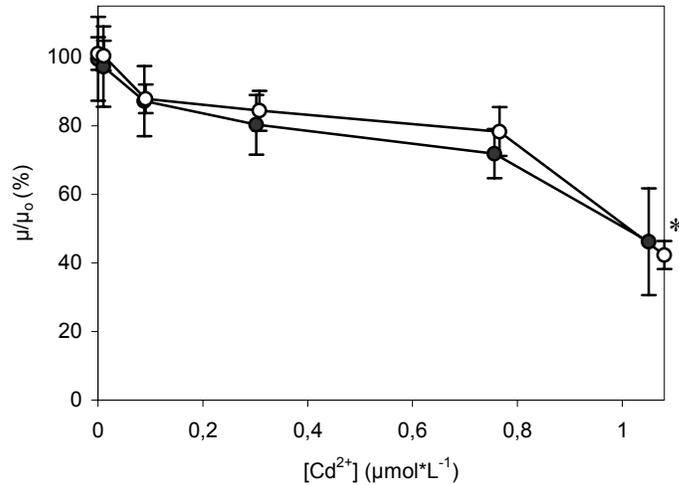


Figure 3.11 : Taux de croissance relatif (μ/μ_0) de *C. reinhardtii* entre 29 et 48 h en fonction du Cd^{2+} libre en solution calculée avec MINEQL+ lorsque $[\text{Cd}_T]_{\text{nominale}}$ est variable. μ = taux de croissance pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; μ_0 = taux de croissance du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Le signe (*) représente les points où il y a une inhibition significative. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

3.2.1.2 Rendements relatifs

L'impact du thiosulfate sur la toxicité du cadmium a aussi été mesuré en calculant le rendement relatif (biomasse) à la fin de l'exposition (72 h) (figures 3.12a et 3.12b). Notons tout d'abord que des différences significatives ($P < 0,05$) de rendement relatif étaient observées à partir de $0,09 \mu\text{M}$ et ce, pour le milieu sans thiosulfate (●) et avec thiosulfate (○). Entre les milieux, une différence significative ($P < 0,05$) s'observait seulement lorsque la $[\text{Cd}^{2+}] = 0,3 \mu\text{M}$ dans la première série (figure 3.12a ; les points sont encadrés). Dans la seconde série d'expérience (figure 3.12b), les diminutions significatives de rendement relatif ($P < 0,05$) s'observaient à la même concentration de cadmium libre.

Pour les deux séries, pour une concentration donnée de Cd^{2+} , les rendements relatifs semblaient légèrement supérieurs dans les milieux avec thiosulfate, quoique

cette différence entre les milieux ne soit pas significative pour la seconde série (figure 3.12b, pour toutes les concentrations de cadmium libre supérieures à 0,1 μM). À partir de ces deux courbes (des deux séries), nous avons calculé la concentration effective (CE) de cadmium libre nécessaire pour réduire la densité cellulaire finale d'un pourcentage donné (tableau 3.6).

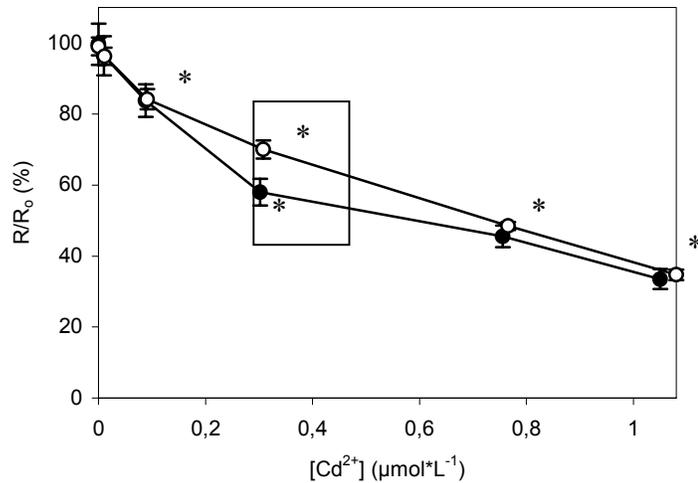


Figure 3.12a : Rendement relatif (R/R_0) de *C. reinhardtii* après 72 h en fonction du Cd^{2+} libre en solution calculée avec MINEQL+ lorsque $[\text{Cd}_T]_{\text{nominale}}$ est variable. R = rendement pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; R_0 = rendement du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les points encadrés sont significativement différents (verticalement). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. 1^{er} essai.

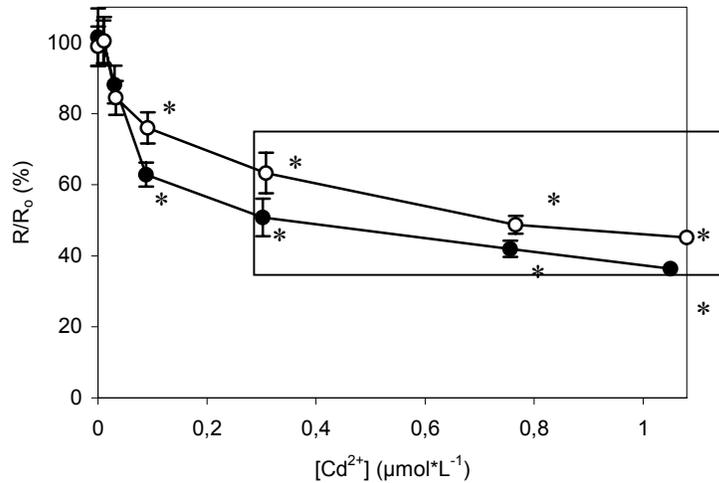


Figure 3.12b : Rendement relatif (R/R_0) de *C. reinhardtii* après 72 h en fonction du Cd^{2+} libre en solution calculée avec MINEQL+ lorsque $[Cd_T]_{nominale}$ est variable. R = rendement pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; R_0 = rendement du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les points encadrés sont significativement différents (verticalement). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. 2^{ème} essai.

Tableau 3.6 : Valeurs de CE calculées pour les rendements relatifs dans les milieux avec ou sans thiosulfate. Valeurs exprimées en cadmium libre \pm écart-type (N = 3).

	CE ₃₀ ($\mu\text{mol Cd}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$)		CE ₅₀ ($\mu\text{mol Cd}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$)	
	Série a	Série b	Série a	Série b
Avec $S_2O_3^{2-}$ (○)	$0,31 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,01^{(1)}$	$0,73 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,1^{(1)}$
Sans $S_2O_3^{2-}$ (●)	$0,20 \pm 0,04$	$0,072 \pm 0,008^{(1)}$	$0,60 \pm 0,10^{(2)}$	$0,3 \pm 0,2^{(1)(2)}$

(1) Différence significative ($P < 0,05$) entre les valeurs d'une même série.

(2) Différence significative ($P < 0,05$) entre les valeurs d'un même milieu.

3.2.2 Résultats exprimés en fonction du quota cellulaire

En calculant la concentration interne de cadmium pour une cellule (quota cellulaire), il est possible d'examiner les relations entre les taux de croissance relatifs et les rendements relatifs en fonction de ce quota. Cette façon de présenter les résultats nous donne une perspective d'interprétation différente pour mesurer l'impact du thiosulfate sur la toxicité du cadmium. Dans le cas des taux de croissance aux différents stades de croissance (5 → 24 ; 24 → 29 ; 29 → 48), les tendances observées pour les courbes des milieux avec thiosulfate (○) et sans thiosulfate (●) se ressemblaient (figures 3.13 à 3.15). De plus, ces tendances observées étaient semblables à celle notées lorsque les courbes étaient exprimées en fonction de la concentration de cadmium libre en solution (figures 3.9 à 3.11). Cependant, les courbes des milieux avec ou sans thiosulfate se différenciaient d'avantage lorsque les résultats étaient exprimés en fonction des quotas cellulaires. Ceci nous permet de mieux distinguer l'effet du thiosulfate sur la toxicité du cadmium intracellulaire.

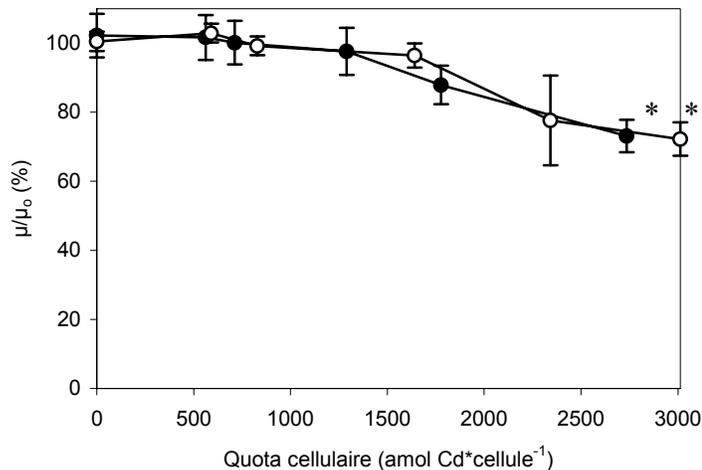


Figure 3.13 : Taux de croissance relatif (μ/μ_0) de *C. reinhardtii* entre 5 et 24 h en fonction du quota cellulaire du Cd. μ = taux de croissance observé pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; μ_0 = taux de croissance du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

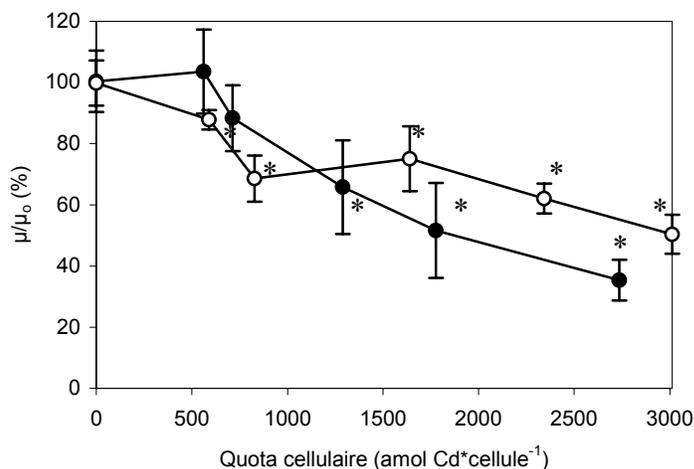


Figure 3.14 : Taux de croissance relatif (μ/μ_0) de *C. reinhardtii* entre 24 et 29 h en fonction du quota cellulaire du Cd. μ = taux de croissance observé pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; μ_0 = taux de croissance du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

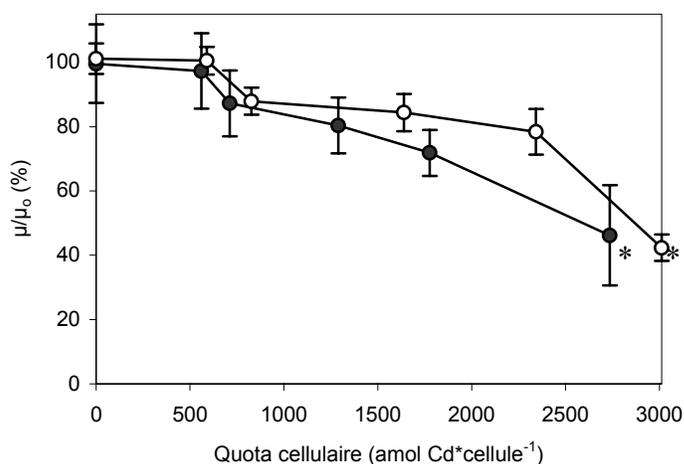


Figure 3.15 : Taux de croissance relatif (μ/μ_0) de *C. reinhardtii* entre 29 et 48 h en fonction du quota cellulaire du Cd. μ = taux de croissance observé pour une concentration de Cd^{2+} donnée ; μ_0 = taux de croissance du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Sur les graphiques de rendements relatifs (figures 3.16a et 3.16b), on observe de façon plus marquée l'effet protecteur du thiosulfate (○) sur la toxicité du cadmium accumulé chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Les courbes ne se superposent plus, comme c'était le cas quand les rendements relatifs étaient exprimés en fonction de la concentration de cadmium libre en solution. En traçant ces graphiques en fonction du quota cellulaire, on peut observer des tendances là où il était impossible d'en voir lorsque les résultats étaient exprimés en fonction de la concentration de cadmium libre en solution. Notons que le thiosulfate ne semblait pas jouer un rôle appréciable pour les diminutions de rendements inférieures à 20 %. Cependant, la protection du thiosulfate face à la toxicité du cadmium s'observait clairement à partir d'une diminution du rendement relatif de > 30 % puisque pour une telle diminution, la quantité interne de cadmium était supérieure lorsque les milieux étaient tamponnés avec du thiosulfate. Les valeurs de CE₃₀ et CE₅₀ (exprimées en fonction du quota cellulaire) pour les milieux avec thiosulfate (○) et celles sans thiosulfate (●) sont données dans le tableau 3.7. Comme on peut le remarquer dans ce tableau, pour diminuer la densité algale de 50 %, la quantité interne de cadmium était ~ 2 × plus importante lorsque les cellules étaient exposées au thiosulfate. Cette différence majeure entre les milieux avec thiosulfate et sans thiosulfate ne s'observait pas dans le graphique de R/R₀ en fonction de cadmium libre en solution.

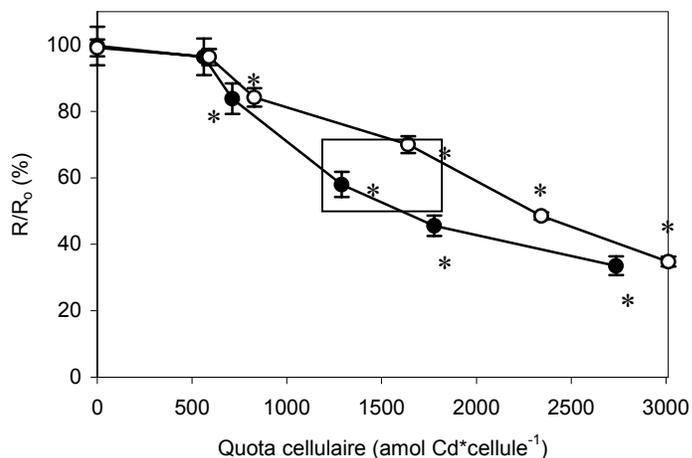


Figure 3.16a : Rendement relatif (R/R_0) de *C. reinhardtii* après 72 h en fonction du quota cellulaire du Cd. R = rendement observé pour un quota cellulaire donné ; R_0 = rendement du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les points encadrés sont significativement différents (verticalement). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. 1^{er} essai.

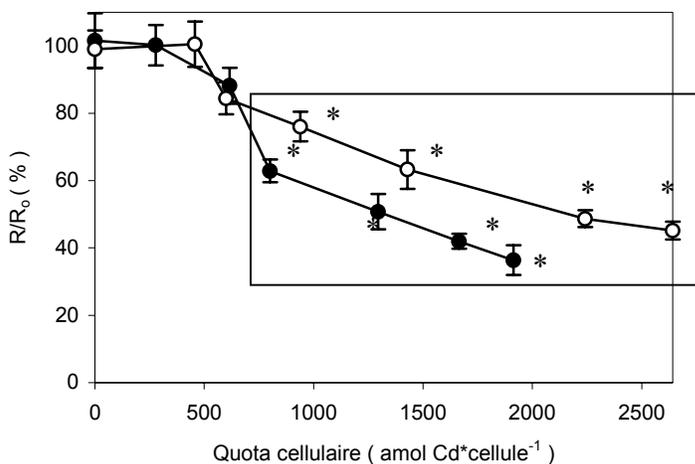


Figure 3.16b : Rendement relatif (R/R_0) de *C. reinhardtii* après 72 h en fonction du quota cellulaire du Cd. R = rendement observé pour un quota cellulaire donné ; R_0 = rendement du témoin. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Les signes (*) représentent les points où il y a une inhibition significative. Les points encadrés sont significativement différents (verticalement). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. 2^{ème} essai.

Tableau 3.7 : Valeurs de CE calculées pour les rendements relatifs dans les milieux avec ou sans thiosulfate. Valeurs exprimées en quota cellulaire de Cd, \pm écart-type (N = 3).

	CE ₃₀ (fmol Cd•cellule ⁻¹)		CE ₅₀ (fmol Cd•cellule ⁻¹)	
	Série a	Série b	Série a	Série b
Avec S ₂ O ₃ ²⁻ (○)	1,64 \pm 0,04 ⁽¹⁾⁽²⁾	1,2 \pm 0,2 ⁽¹⁾⁽²⁾	2,29 \pm 0,04 ⁽¹⁾	2,2 \pm 0,2 ⁽¹⁾
Sans S ₂ O ₃ ²⁻ (●)	1,02 \pm 0,09 ⁽¹⁾	0,75 \pm 0,03 ⁽¹⁾	1,66 \pm 0,06 ⁽¹⁾	1,3 \pm 0,2 ⁽¹⁾

(1) Différence significative (P < 0,05) entre les valeurs d'une même série.

(2) Différence significative (P < 0,05) entre les valeurs d'un même milieu.

3.3 Devenir du cadmium libre en solution sur 72 h

Finalement, nous avons suivi la concentration ambiante de cadmium libre en solution pour vérifier si les conditions d'exposition étaient stables pendant toute la période d'exposition. Pour ce faire, nous prélevions 20 mL du filtrat obtenu lors de la collection des algues (force ionique ajustée à 0,2 $\text{éq}\cdot\text{L}^{-1}$ avec du NaNO₃) et nous l'analysions à l'aide d'une technique de chromatographie à échange ionique (voir la section 2.9). Sur la figure 3.17, on note que la concentration de cadmium libre en solution était stable pendant les 12 premières heures en présence (○) ou non de thiosulfate (●). Par la suite, entre 12 et 24 h, il y avait une diminution de cadmium libre de \sim 20 % dans les deux types de milieux. Après cette chute, la concentration en Cd libre est restée stable de nouveau (\sim 60 – 70 % de la valeur initiale), et ce peu importe le milieu d'exposition. Pendant toute cette période (de 0 \rightarrow 72 h), la concentration totale en Cd dissous est demeurée sensiblement stable (diminution de \leq 10 %).

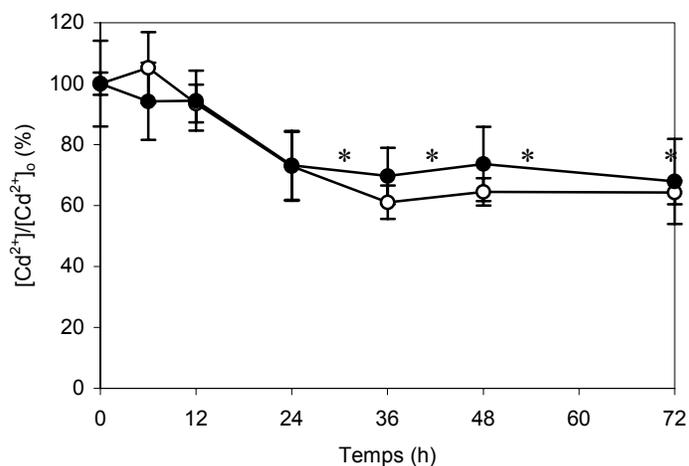


Figure 3.17 : Pourcentage de diminution du Cd libre en solution en fonction du temps. (●) représente les milieux tamponnés avec de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et (○) représente les milieux tamponnés avec du thiosulfate (1×10^{-3} M) et de l'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M). La concentration initiale de cadmium libre était de $0,01 \mu\text{M}$ et la concentration initiale en Cd dissous était de $12,1$ à $15,4 \mu\text{M}$. Les signes (*) représentent les points où il y a une diminution significative. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

4. Discussion

Comme nous l'avons mentionné précédemment, cette recherche avait pour but premier de définir l'effet de la complexation du cadmium par le thiosulfate sur la biodisponibilité de ce métal. L'hypothèse que nous avons émise préalablement soulignait que le thiosulfate augmenterait la prise en charge du cadmium chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* puisque ce ligand peut être assimilé via un transporteur anionique présent chez toutes les algues vertes (Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998) et servant à la prise en charge de sulfate. Par le fait même, nous avons indiqué que le complexe cadmium-thiosulfate entrerait par mimétisme via le même transporteur membranaire et ajouterait une voie d'accumulation du cadmium (l'autre étant celle impliquant un transporteur cationique servant à la prise en charge de métaux essentiels, comme le Mn (Sunda et Huntsman, 1998)). Pour répondre à cette première interrogation, nous avons suivi la prise en charge du cadmium, en présence ou non de thiosulfate, à court (< 1 h) et long terme (72 h).

Le second objectif consistait à déterminer si le complexe cadmium-thiosulfate traversait la membrane plasmique via un transporteur membranaire de sulfate. Pour ce faire nous avons mesuré la prise en charge du cadmium en présence ou non de thiosulfate dans différents milieux contenant des concentrations croissantes de sulfate (0 → 400 μM).

Le troisième objectif consistait à déterminer la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* dans plusieurs milieux d'exposition contenant une large gamme de concentrations de cadmium en présence ou non de thiosulfate. Le suivi de la densité cellulaire sur 72 h dans les différents milieux d'exposition et la comparaison des résultats obtenus dans les milieux avec ou sans thiosulfate nous ont permis de déterminer l'effet du thiosulfate sur la toxicité du cadmium intracellulaire. Parallèlement à ce dernier objectif, nous avons étudié le comportement du

cadmium libre dans les milieux d'exposition sur une période de 72 h à l'aide d'une technique de chromatographie à échange ionique.

4.1 Difficultés rencontrées durant le projet

Avant d'interpréter les résultats et de répondre aux objectifs et hypothèses de cette recherche, nous allons expliquer les différentes difficultés (ou limitations) majeures rencontrées durant le projet et expliquer comment celles-ci ont été surmontées. Les complications expérimentales, rencontrées après la période initiale d'assimilation des techniques de base au laboratoire, peuvent être classées en trois grandes catégories :

- La survie de l'organisme (pré-exposition)
- La limitation de la concentration maximum du cadmium
- Les expériences de longue durée (prise en charge, toxicité et TÉI)

4.1.1 Survie de l'organisme

Tout d'abord, la croissance algale et le maintien d'une culture saine nous ont causé quelques complications lors des premières inoculations de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. Dans nos premiers essais de croissance, la majorité des cellules algales mourraient à la quatrième journée après l'inoculation initiale (début de la phase de stationnaire) et pendant la phase exponentielle précédente, nous remarquons que le diamètre moyen des cellules était nettement supérieur à celui attendu, ce qui indiquait une mauvaise division cellulaire. Après avoir refait quelques essais infructueux avec une nouvelle souche algale, nous avons remarqué que le pH de notre milieu de culture diminuait drastiquement (de pH 7 à ~ 3) à la troisième journée, ce qui entraînait la mort de la majorité des cellules puisqu'elles supportent très mal un pH inférieur à 5,0. Cette baisse de pH était due à l'assimilation préférentielle (chez *Chlamydomonas reinhardtii*) de l'azote sous

forme d'ammonium par transfert de proton vers la solution. Pour remédier à la situation, nous avons ajouté du tampon HEPES à notre milieu de culture (concentration finale 10 mM). Cette concentration de 10 mM de HEPES est celle qui est le plus fréquemment utilisée pour tamponner les milieux de culture et d'exposition (Knauer *et al.*, 1997). De plus, ce tampon (gamme de pH entre 6,8 et 8,2 ; $pK_a = 7,5$) a été largement utilisé et étudié par Good *et al.* (1966) et n'a pas d'effets biologiques connus (Stoll et Blanchard, 1990). Lage *et al.* (1996) ont aussi démontré que le tampon HEPES ([HEPES] = 25 mM) n'avait pas d'effet toxique sur l'algue *A. carterae*. Soares et Conde (2000) ont pour leur part démontré, à l'aide d'une méthode électrochimique (differential pulse anodic stripping voltammetry ; DPASV) que le tampon HEPES ne complexait pas les métaux bivalents comme le zinc et le cadmium dans les conditions expérimentales qu'ils ont utilisées. Par la même technique, certains auteurs ont établi que le tampon HEPES avait un effet surfactant sur le dosage du cuivre seulement lorsque sa concentration était supérieure à 10 mM ([HEPES] = 25 mM) (Vasconcelos *et al.*, 1996 ; Vasconcelos et Almeida, 1998). Donc, comme HEPES (dans la gamme de concentration utilisée) ne semble pas avoir d'effets sur l'organisme ou le métal d'étude, et comme il est recommandé par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (dans Vasconcelos et Leal, 2002), nous avons utilisé ce tampon pour minimiser le changement de pH dans nos milieux de culture et d'exposition.

4.1.2 Limitation à la concentration maximum du cadmium

La seconde limitation provient de l'affinité relativement faible du thiosulfate pour le cadmium. Comme nous l'avons mentionné précédemment, pour complexer 80 % du cadmium en solution ($[Cd] = 1 \mu M$) sous forme de cadmium-thiosulfate, la concentration de thiosulfate nécessaire serait approximativement 0,6 mM. Comme nous voulions toujours garder la force ionique de nos milieux d'exposition semblable à celle de notre milieu de culture, et ainsi minimiser la perturbation des cellules face à une variation de force ionique, il nous était impossible de travailler à

des concentrations en Cd supérieures à 2 μM sans devoir augmenter la concentration de thiosulfate, ce qui aurait contribué à augmenter la force ionique.

4.1.3 Expériences de longue durée

La dernière limitation expérimentale découle indirectement de la faible affinité du thiosulfate pour le cadmium. Pour les expériences de long terme (72 h) avec thiosulfate, il fallait garder la proportion de cadmium libre (Cd^{2+}) le plus faible possible (c'est-à-dire qu'il fallait tamponner le mieux possible le milieu en Cd), afin de minimiser la perte de cadmium dans la solution d'exposition lors des expériences. Nous ne pouvions pas utiliser seulement du thiosulfate pour complexer le cadmium, car la quantité de ligand à utiliser aurait été astronomique (ce qui aurait eu pour effet d'augmenter la force ionique de nos milieux d'exposition). Comme notre marge de manœuvre pour maintenir une force ionique similaire entre les milieux d'exposition et les milieux de référence était mince, nous avons fait le compromis d'utiliser un mélange d'EDTA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et de thiosulfate (1 mM) pour complexer efficacement le Cd.

Le choix du ligand non-assimilable pour les expériences sur 72 h nous a aussi posé un défi. En premier lieu, nous voulions utiliser le même ligand que celui employé lors des expériences sur < 1 h, soit le NTA. Cependant, plusieurs tests préliminaires avec une technique d'échange ionique (TÉI) nous ont donné des résultats de concentration de cadmium libre ($[\text{Cd}^{2+}]_{\text{mesurée}}$) différents de ceux obtenus avec le modèle de spéciation chimique MINEQL+ ($[\text{Cd}^{2+}]_{\text{calculée}}$) lorsque la majorité du cadmium était sous forme Cd-NTA. Pour nos tests, plusieurs concentrations de NTA, de Cd^{2+} et Cd_T ont été utilisées (voir le tableau 4.1 pour un extrait partiel de ces résultats). Lorsque la concentration de NTA était de 1×10^{-7} M (celle utilisée pour les expériences de prise en charge pendant des périodes d'exposition de courte durée), il n'y avait que très peu de différence entre la concentration mesurée et calculée. Cependant, nous ne pouvions pas utiliser cette [NTA] pour les expériences de longue durée puisque le pourcentage du complexe Cd-NTA n'était pas suffisamment élevé pour bien tamponner le milieu. Dans ce type d'expérience,

nous voulions avoir la plus haute proportion possible de cadmium complexé pour agir comme réservoir de cadmium et ainsi minimiser les changements de concentration en cadmium libre tout au long des 72 h d'exposition. Dans ce même tableau, nous pouvons observer que lorsque > 99 % du cadmium était complexé, la concentration de cadmium libre mesurée était ~ 6,5, 35 ou 53 fois plus élevée que celle calculée.

Tableau 4.1 : Comparaison entre des $[Cd^{2+}]_{mesurées}$ par une technique d'échange ionique et des $[Cd^{2+}]_{calculées}$ avec le modèle de spéciation chimique MINEQL+.

$[Cd]_T$	$[NTA]$	$[Cd^{2+}]_{mesurée}$	$[Cd^{2+}]_{calculée}$	Ratio*	CdNTA (%)
$2,00 \times 10^{-6} M$	$1,00 \times 10^{-7} M$	$1,13 \times 10^{-6} M$	$1,21 \times 10^{-6} M$	–	39,5
$2,00 \times 10^{-6} M$	$1,00 \times 10^{-7} M$	$1,16 \times 10^{-6} M$	$1,21 \times 10^{-6} M$	–	39,5
$2,00 \times 10^{-6} M$	$1,00 \times 10^{-5} M$	$8,16 \times 10^{-8} M$	$1,23 \times 10^{-8} M$	6,6	99,4
$2,00 \times 10^{-6} M$	$1,00 \times 10^{-5} M$	$7,85 \times 10^{-8} M$	$1,23 \times 10^{-8} M$	6,4	99,4
$4,50 \times 10^{-6} M$	$1,00 \times 10^{-4} M$	$1,04 \times 10^{-7} M$	$2,00 \times 10^{-9} M$	53	≥ 99,9
$4,50 \times 10^{-6} M$	$1,00 \times 10^{-4} M$	$1,06 \times 10^{-7} M$	$2,00 \times 10^{-9} M$	53	≥ 99,9
$1,80 \times 10^{-5} M$	$1,00 \times 10^{-4} M$	$3,55 \times 10^{-7} M$	$1,01 \times 10^{-8} M$	35	≥ 99,9
$1,80 \times 10^{-5} M$	$1,00 \times 10^{-4} M$	$3,53 \times 10^{-7} M$	$1,01 \times 10^{-8} M$	35	≥ 99,9

* Ces résultats sont obtenus en divisant la $[Cd^{2+}]_{mesurée}$ par la $[Cd^{2+}]_{calculée}$.

Pour remédier à la situation, nous avons utilisé l'EDTA (ligand également non-assimilable) et nous avons fait plusieurs tests avec des concentrations variables d'EDTA, de Cd^{2+} et Cd_T . Dans toutes ces expériences préliminaires, nous avons obtenu une bonne concordance entre les concentrations en Cd^{2+} mesurées et calculées et ce, même quand la majorité du cadmium était complexée. Dans les tableaux 4.2 et 4.3, nous avons noté les valeurs de concentrations mesurées et calculées pour les expériences avec ou sans thiosulfate.

Tableau 4.2 : Comparaison entre les $[Cd^{2+}]_{mesurées}$ par une technique d'échange ionique (TEI) et les $[Cd^{2+}]_{calculées}$ avec MINEQL+ lors de l'expérience (72 h) sans thiosulfate. La [EDTA] était constante à $1,5 \times 10^{-5}$ M. La $[Cd^{2+}]_{mesurée}$ est la moyenne de deux mesures.

$[Cd]_T$	$[Cd^{2+}]_{calculée}$	$[Cd^{2+}]_{mesurée}$	Écart-type
$1,21 \times 10^{-5}$ M	$1,02 \times 10^{-8}$ M	$1,4 \times 10^{-8}$ M	$0,1 \times 10^{-8}$ M
$1,29 \times 10^{-5}$ M	$3,04 \times 10^{-8}$ M	$2,8 \times 10^{-8}$ M	$0,2 \times 10^{-8}$ M
$1,36 \times 10^{-5}$ M	$8,84 \times 10^{-8}$ M	$8,3 \times 10^{-8}$ M	$0,4 \times 10^{-8}$ M
$1,43 \times 10^{-5}$ M	$3,02 \times 10^{-7}$ M	$2,97 \times 10^{-7}$ M	$0,02 \times 10^{-7}$ M
$1,50 \times 10^{-5}$ M	$7,56 \times 10^{-7}$ M	$7,3 \times 10^{-7}$ M	$0,2 \times 10^{-7}$ M
$1,54 \times 10^{-5}$ M	$10,5 \times 10^{-7}$ M	$9,84 \times 10^{-7}$ M	$0,04 \times 10^{-7}$ M

Tableau 4.3 : Comparaison entre les $[Cd^{2+}]_{mesurées}$ par une technique d'échange ionique (TEI) et les $[Cd^{2+}]_{calculées}$ avec MINEQL+ lors de l'expérience (72 h) avec thiosulfate. La [EDTA] était constante à $1,5 \times 10^{-5}$ M et celle du thiosulfate à 1×10^{-3} M. La $[Cd^{2+}]_{mesurée}$ est la moyenne de deux mesures.

$[Cd]_T$	$[Cd^{2+}]_{calculée}$	$[Cd^{2+}]_{mesurée}$	Écart-type
$1,22 \times 10^{-5}$ M	$1,12 \times 10^{-8}$ M	$1,3 \times 10^{-8}$ M	$0,2 \times 10^{-8}$ M
$1,31 \times 10^{-5}$ M	$3,26 \times 10^{-8}$ M	$2,65 \times 10^{-8}$ M	$0,01 \times 10^{-8}$ M
$1,41 \times 10^{-5}$ M	$9,11 \times 10^{-8}$ M	$1,35 \times 10^{-7}$ M	$0,01 \times 10^{-7}$ M
$1,60 \times 10^{-5}$ M	$3,08 \times 10^{-7}$ M	$3,2 \times 10^{-7}$ M	$0,1 \times 10^{-7}$ M
$1,96 \times 10^{-5}$ M	$7,66 \times 10^{-7}$ M	$8,10 \times 10^{-7}$ M	$0,02 \times 10^{-7}$ M
$2,22 \times 10^{-5}$ M	$10,8 \times 10^{-7}$ M	$10,6 \times 10^{-7}$ M	$0,5 \times 10^{-7}$ M

4.2 Interprétations et comparaisons des résultats de prise en charge

4.2.1 Prise en charge du complexe cadmium-thiosulfate (< 1 h)

Dans un premier temps, pour déterminer le rôle du thiosulfate dans la prise en charge du cadmium chez *Chlamydomonas reinhardtii*, nous avons réalisé des expériences de cinétique avec différents milieux simplifiés (en présence ou non de thiosulfate) sur une période de temps en deçà d'une heure (11, 20, 31 et 41 min). Nous avons choisi ces courts temps d'exposition pour minimiser les changements de concentrations de Cd_T , Cd^{2+} , $S_2O_3^{2-}$ et autres anions et cations qui pourraient survenir durant l'expérience et ainsi faciliter l'interprétation de nos résultats. La constance de la $[Cd^{2+}]$, sur une période de moins d'une heure, a été établie par une technique d'échange ionique (figure 3.17) et sera discutée ultérieurement. Signalons aussi que nous nous sommes assurés, lors d'expériences préliminaires de courte durée (< 1 h), que la prise en charge de ^{109}Cd était facilement décelable.

Lors d'expériences précédentes dans nos laboratoires (Fortin, 2000 ; Thèse de doctorat), il a été démontré que le thiosulfate augmentait la prise en charge de l'argent ($[Ag^+]$ fixe à 10 nM) chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Nous avons également observé une augmentation de la prise en charge du cadmium en présence de thiosulfate chez cette même algue verte (figure 3.1, comparer les courbes A et B avec la courbe D, sans thiosulfate). Comme la concentration de cadmium libre était constante (2,75 nM) dans les trois milieux, l'augmentation de la prise en charge du cadmium ne peut être expliquée que par la présence de thiosulfate (1 mM) dans les milieux A et B. En comparant les courbes B et D, on note que ~ 35 % (soustraction des courbes B - D) du cadmium intracellulaire mesuré chez les cellules du milieu B ne peut pas être expliqué par la prise en charge du cadmium libre lorsque qu'il y a présence de thiosulfate et de sulfate dans le milieu d'exposition. Ainsi, l'ajout de thiosulfate dans le milieu d'exposition (milieu B) provoquait une augmentation de la prise en charge de cadmium chez *Chlamydomonas reinhardtii* (d'un facteur 1,5 après une exposition de 41 min). De plus, sur la figure 3.1, on peut remarquer que l'absence de sulfate dans le milieu A avait pour effet d'augmenter encore plus la prise en charge du cadmium après 41 min (comparaison des courbes A et D ;

facteur d'augmentation de 2 après 41 min). Dans le milieu A sans sulfate et avec thiosulfate (après 41 min), ~ 51 % du cadmium intracellulaire mesuré chez les algues exposées à ce milieu ne provient pas de la prise en charge du cadmium libre en solution (soustraction des courbes A - D).

L'accumulation accrue de Cd en absence de sulfate suggère que le complexe CdS_2O_3 traverse la membrane plasmique par mimétisme via un transporteur membranaire de sulfate et de thiosulfate. Ces systèmes, qui servent à la fois pour le transport du sulfate et du thiosulfate, ont été caractérisés chez plusieurs types d'algues y compris chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Vallée et JeanJean, 1968 et Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998). Prieto *et al.* (1997) ont par leurs recherches confirmé la présence d'un tel transporteur et identifié chez *Chlamydomonas reinhardtii* une enzyme permettant la réduction du thiosulfate. L'analyse des trois courbes illustre aussi que ce mécanisme de transport (et la prise en charge du complexe CdS_2O_3) est affecté par la concentration ambiante de sulfate dans le milieu d'exposition puisque lorsque nous diminuons la $[\text{SO}_4^{2-}]$ de 81 à 0 μM , on note une augmentation de 52 % (après 41 min) du cadmium intracellulaire provenant de la prise en charge du complexe CdS_2O_3 (voir formule 4.1).

$$\%_{\text{augmentation}} = \left(1 - \left(\frac{[\text{B}] - [\text{D}]}{[\text{A}] - [\text{D}]} \right) \right) \times 100 \quad (4.1)$$

Dans cette équation, le pourcentage d'augmentation représente l'accroissement du cadmium intracellulaire provenant de la prise en charge du complexe CdS_2O_3 et [A], [B] et [D] sont les concentrations totales en cadmium intracellulaire observées dans chacun des milieux respectifs après 41 min.

Un effet compétitif entre le sulfate et le thiosulfate pour le transporteur membranaire a été observé lors d'expériences de prise en charge du sulfate par des algues vertes unicellulaires (Vallée et JeanJean, 1968 ; Biedlingmaier et Schimdt, 1989 ; Pérez-Castiñeira *et al.*, 1998). Donc, comme le complexe CdS_2O_3 entre via le même transporteur que le sulfate et le thiosulfate, on s'attendrait à ce que l'effet

compétitif se fasse aussi sentir sur la prise en charge de ce complexe (comparaison des courbes A et B).

Pour vérifier si le sulfate n'influencait que la prise en charge du cadmium associé au thiosulfate, nous avons d'abord fait varier la concentration de sulfate entre 0 et 400 μM dans différents milieux ne contenant pas de thiosulfate et ayant une $[\text{Cd}^{2+}]$ constante (2,75 nM). À ces concentrations, le sulfate ne complexe pas le cadmium de façon significative ($\log K = 2,37$). La figure 3.2 montre qu'une augmentation progressive de la $[\text{SO}_4^{2-}]$ n'affecte pas la prise en charge du cadmium (temps d'exposition de 30 min). En effet, en absence de thiosulfate dans les milieux d'exposition, le Cd ne peut entrer à l'intérieur de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* que par un transporteur cationique, possiblement celui servant à la prise en charge de Mn (Sunda et Huntsman, 1998), et ce système de transport est insensible à la concentration ambiante de sulfate.

Comme l'absence de sulfate dans le milieu d'exposition a mené à une prise en charge accrue du complexe CdS_2O_3 comparativement à celle observé dans un milieu contenant 80 μM de sulfate (comparaison des courbes A et B ; figure 3.1), nous avons ajouté une concentration croissante de sulfate (0, 80, 160, 240, 320, 400 μM) à des milieux ayant une $[\text{Cd}^{2+}]$ constante à 2,75 nM et contenant du thiosulfate (1 mM) (figure 3.3). L'ajout progressif de sulfate dans ces milieux contenant du thiosulfate nous a permis d'observer une diminution de la prise en charge du cadmium ; les valeurs mesurées aux plus fortes concentrations en sulfate s'approchent de celles observées dans les milieux sans thiosulfate. L'influence du sulfate sur la prise en charge du cadmium supporte notre interprétation initiale (transport du complexe par mimétisme via un transporteur anionique) car elle indique clairement un effet compétitif entre le SO_4^{2-} et le complexe CdS_2O_3 pour le même transporteur membranaire. Si nous présumons que le site de transport $\equiv\text{X}$ est à l'équilibre, les interactions compétitives entre le SO_4^{2-} et le CdS_2O_3 pour un site de transport $\equiv\text{X}$ peuvent être décrites par le modèle mécaniste suivant :

$$\{\equiv X- CdS_2O_3\} = K_1 \cdot \{\equiv X\} \cdot [CdS_2O_3] \quad (4.2)$$

$$\{\equiv X- SO_4\} = K_2 \cdot \{\equiv X\} \cdot [SO_4^{2-}] \quad (4.3)$$

où K_1 et K_2 sont des constantes d'équilibre. Le nombre total de sites X_T peut quant à lui être représenté par l'équation suivante :

$$X_T = \{\equiv X\} + \{\equiv X- SO_4\} + \{\equiv X- CdS_2O_3\} + \{\equiv X- S_2O_3\} \quad (4.4)$$

En réarrangeant les équations (4.2) et (4.4) et en supposant que le nombre de sites occupés par le thiosulfate ($\{\equiv X-S_2O_3\}$) et par le complexe CdS_2O_3 ($\{\equiv X-CdS_2O_3\}$) soit négligeable par rapport aux sites libres ($\{\equiv X\}$) et ceux occupés par le sulfate ($\{\equiv X-SO_4^{2-}\}$), nous obtenons la relation suivante :

$$\{\equiv X- CdS_2O_3\} = \frac{X_T \cdot K_1 \cdot [CdS_2O_3]}{(1 + K_2 \cdot [SO_4^{2-}])} \quad (4.5)$$

En combinant les deux sites de transport possible menant à la prise en charge du cadmium, soit le transporteur de Cd^{2+} ($\{\equiv Y\}$) et celui pour le complexe CdS_2O_3 ($\{\equiv X\}$), le flux cellulaire peut être décrit par :

$$\varphi_{Cd_{cell}} = k_1 \cdot \{Y \equiv Cd\} + k_2 \cdot \{X \equiv CdS_2O_3\} \quad (4.6)$$

Comme le site $\{\equiv Y\}$ est en équilibre avec l'ion Cd^{2+} , on peut agencer les équations (4.5) et (4.6) en regroupant les éléments constants de ces équations en deux nouveaux termes (α et β) pour obtenir un modèle de transport à deux sites de prise en charge exprimant les résultats de la figure 3.3 :

$$\varphi_{Cd_{cell}} = \alpha \cdot [Cd^{2+}] + \frac{\beta \cdot [CdS_2O_3]}{1 + K_2 \cdot [SO_4^{2-}]} \quad (4.7)$$

où ϕ représente le flux cellulaire de Cd ($\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$). Cette vitesse d'internalisation est exprimée en fonction des deux types de transporteur possibles servant à l'assimilation du cadmium lorsqu'il y a présence de thiosulfate dans le milieu d'exposition. Le premier terme de l'équation (4.7) représente le système de transport cationique et est dépendant de la concentration de Cd^{2+} ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) tandis que le second terme correspond au transporteur de SO_4^{2-} ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ et CdS_2O_3) et répond à la fois à la concentration de CdS_2O_3 ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) et celle du SO_4^{2-} ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$). En effectuant une régression non-linéaire (Sigmaplot 2000) de cette équation à partir des résultats de la figure 3.3, nous pouvons déterminer la valeur des termes constants de l'équation (4.7) : $\alpha = 10^{-12,23}$ (IC 95 % = 0,03) ; $\beta = 10^{-2,03}$ (IC 95 % = 0,007) ; $K_2 = 10^{3,63}$ (IC 95 % = 1×10^{-5}) (figure 3.3 ; $R^2 = 0,90$). Il faut cependant souligner que dans l'expérience où la concentration en sulfate était variable, nous avons conservé la concentration en Cd^{2+} constante. Par conséquent, nous avons très peu de précision sur le terme α , lequel est en principe sensible aux changements en $[\text{Cd}^{2+}]$. Pour ce qui est du terme K_2 , qui est dépendant de la concentration de sulfate, il est comparable à celui obtenu ($K_2 = 10^{3,89}$) lors d'expériences servant à déterminer le flux intracellulaire d'Ag en présence de thiosulfate et de sulfate chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Fortin, 2000 ; Thèse de doctorat).

À partir des résultats (voir les figures 3.1, 3.2 et 3.3) des trois expériences de court terme (< 1 h), nous avons démontré qu'en présence de thiosulfate, un deuxième système de transport, indépendant du système cationique (i), est impliqué dans la prise en charge du cadmium (ii) (figure 4.1). Ce second mécanisme de transport sert principalement pour le sulfate et le thiosulfate et implique une prise en charge "accidentelle" du complexe cadmium-thiosulfate. Le transport du complexe CdS_2O_3 est donc influencé par la concentration ambiante de sulfate.

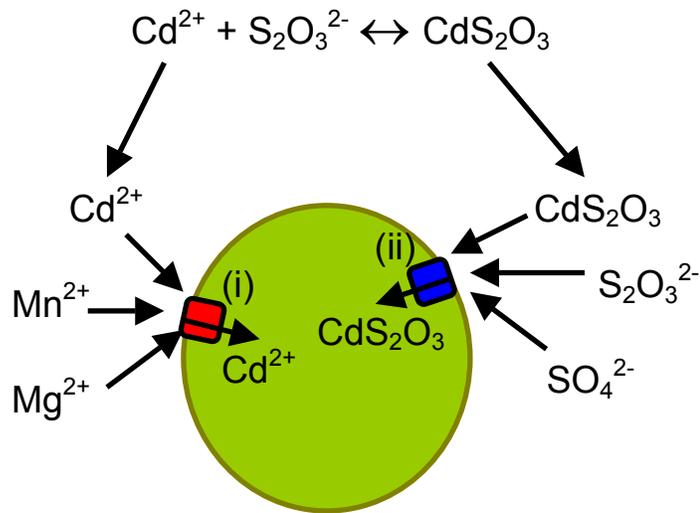


Figure 4.1 : Modèle conceptuel du transport du Cd chez *Chlamydomonas reinhardtii* en présence de thiosulfate.

4.2.2 Prise en charge du complexe cadmium-thiosulfate (72 h)

Pour confirmer les résultats obtenus pour les expositions de courte durée, nous avons réalisé des expériences de cinétique avec des milieux nutritifs complets (en présence ou non de thiosulfate) sur une période de 72 h. Comme dans le cas des expériences de courte durée (< 1 h), nous avons mis en évidence une prise en charge accrue du cadmium en présence de thiosulfate chez *Chlamydomonas reinhardtii* et ce, pour les deux concentrations de Cd^{2+} libre que nous avons utilisées (figure 3.4, $[\text{Cd}^{2+}] = 0,01 \mu\text{M}$; figure 3.5, $[\text{Cd}^{2+}] = 1,1 \mu\text{M}$). En comparant la prise en charge du cadmium dans les milieux sans thiosulfate (●) avec celle observée dans les milieux avec thiosulfate (○) des deux figures (3.4 et 3.5), on note encore une fois l'importance du transporteur membranaire de sulfate et de thiosulfate pour la prise en charge du complexe CdS_2O_3 . Pour une concentration de Cd^{2+} constante, on observe une prise en charge de cadmium supérieure dans les milieux avec thiosulfate. Sur la figure 3.4 ($[\text{Cd}^{2+}] = 0,01 \mu\text{M}$), en comparant la courbe de prise en charge en présence de thiosulfate avec celle mesurée en absence de ce ligand, on note que ~ 28 % du cadmium intracellulaire mesuré chez les cellules exposées au cadmium en présence de thiosulfate provient de l'accumulation

de complexe CdS_2O_3 (après 72 h). Lorsque la $[\text{Cd}^{2+}]$ est de $1,1 \mu\text{M}$ (figure 3.5), c'est environ 30 % du cadmium intracellulaire qui peut être expliqué par la prise en charge du complexe CdS_2O_3 lorsque les algues sont exposées au cadmium et au thiosulfate (après 72 h). Autrement dit, dans les deux conditions ($0,01$ et $1 \mu\text{M}$ Cd^{2+}) l'ajout de thiosulfate dans les milieux d'exposition mène à une augmentation de la prise en charge de cadmium par un facteur de $\sim 1,4$ après 72 h. On peut remarquer que même si la concentration de cadmium libre était différente, les facteurs d'amplification de prise en charge et les pourcentages de Cd intracellulaire provenant du complexe CdS_2O_3 étaient semblables dans les deux expériences. Ceci peut être expliqué par les rapports $[\text{CdS}_2\text{O}_3] : [\text{Cd}^{2+}]$, qui sont eux aussi semblables dans les deux cas (~ 4). Donc, la probabilité que le complexe CdS_2O_3 et que le Cd^{2+} soient pris en charge par les cellules était la même dans les deux expériences. Par contre, cette conclusion est vraie seulement si les deux systèmes de transport (cationique et anionique) ne soient pas saturés, c'est-à-dire si les concentrations utilisées étaient inférieures aux constantes de demi-saturation (K_m) des transporteurs.

Lorsque l'on exprime les résultats de cadmium intracellulaire mesurés après 72 h d'exposition en fonction de la $[\text{Cd}^{2+}]$ dans les milieux (figure 3.6), on observe tout d'abord que la prise en charge du cadmium après 72 h est plus élevée lorsqu'il y a présence de thiosulfate dans le milieu d'exposition (comme observée dans les autres expériences de cinétique à court terme). On note aussi qu'en présence ou non de thiosulfate, la relation entre le cadmium intracellulaire et le cadmium libre est croissante mais non linéaire et tend vers une valeur maximale pour les $[\text{Cd}^{2+}]$ les plus élevées.

À partir des valeurs de la figure 3.6, nous pouvons utiliser l'approche Michaelis-Menten pour calculer la vitesse d'accumulation (V_{max}) et la constante de demi-saturation (K_m) des milieux sans thiosulfate. Ces constantes (V_{max} et K_m) ont été déterminées à partir du logiciel Sigmaplot 2000 qui utilise l'algorithme d'ajustement non-linéaire de Marquardt-Levenberg. Une approche de ce type n'est

possible que pour les milieux sans thiosulfate, car en présence de ce ligand assimilable, deux mécanismes de prise en charge opèrent parallèlement, chacun avec sa valeur de V_{\max} et de K_m . À partir des expériences que nous avons réalisées, il nous était impossible de dissocier les valeurs propres à chacun des deux processus de prise en charge. Néanmoins, en absence de thiosulfate, l'équation suivante nous permet d'obtenir ces valeurs :

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [Cd^{2+}]}{K_m + [Cd^{2+}]} \quad (4.8)$$

où V_{\max} correspond à la vitesse d'accumulation maximale en $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, K_m la constante de demi-saturation en $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et $[Cd^{2+}]$ la concentration de cadmium libre dans le milieu d'exposition (en $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Dans le tableau 4.4 qui suit, nos valeurs de V_{\max} et K_m sont comparées avec celles de la littérature pour *C. reinhardtii*. Comme nous pouvons le remarquer, nos valeurs de V_{\max} et K_m sont beaucoup plus faibles que celles observées par Kola et Wilkinson (2004) chez *C. reinhardtii* (39 fois plus faible pour la valeur de V_{\max} et ~ 1,4 fois plus faible pour la valeur de K_m). Ces différences peuvent être expliquées par notre design expérimental. En général, pour déterminer ces paramètres, la prise en charge doit être mesurée en deçà d'une heure (comme c'est le cas pour Kola et Wilkinson (2004)) et non après une exposition de 72 h. Vigneault et Campbell (sous presse) ont déterminé des valeurs de V_{\max} et K_m beaucoup plus faibles que les nôtres chez *P. subcapitata* et n'ont pas observé de saturation chez *C. reinhardtii* en raison des faibles concentrations utilisées.

Tableau 4.4 : Valeurs de vitesse d'accumulation (V_{\max}) et de demi-saturation (K_m) pour les milieux sans thiosulfate.

	V_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	K_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
<i>C. reinhardtii</i> (milieu sans thiosulfate, la présente étude)	$0,20 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,02$
<i>C. reinhardtii</i> (pH = 7) ⁽¹⁾	$7,8 \pm 0,6$	$0,99 \pm 0,01$
<i>C. reinhardtii</i> (pH = 5) ⁽²⁾	>0,005	> 0,036
<i>P. subcapitata</i> (pH = 7) ⁽²⁾	$0,010 \pm 0,001$	$0,0069 \pm 0,0007$

⁽¹⁾ tiré de Kola et Wilkinson (2004)

⁽²⁾ tiré de Vigneault et Campbell, sous presse

À partir de ces valeurs, nous pouvons comparer la courbe mesurée ((●) ; semblable à la figure 3.6) avec la courbe calculée (○) dans les milieux sans thiosulfate (voir la figure 4.2). On observe une légère différence entre les valeurs mesurées et calculées, notamment aux plus fortes concentrations de Cd^{2+} , où les valeurs mesurées n'atteignent pas de plateau comme la courbe calculée semble le suggérer.

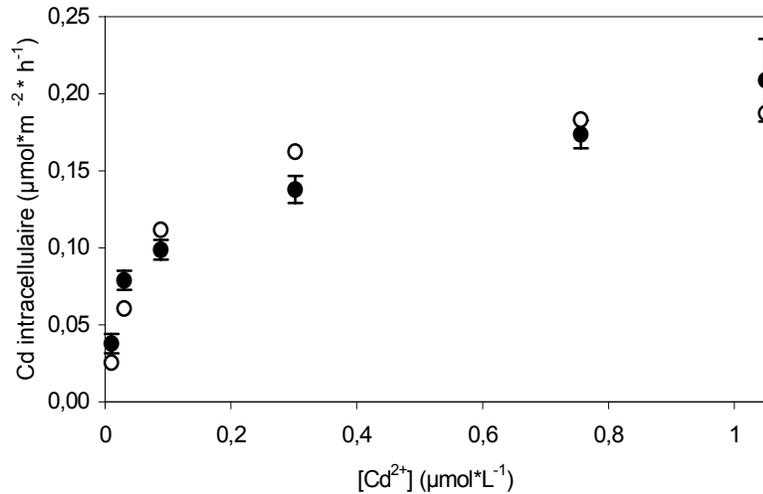


Figure 4.2 : Comparaison entre la prise en charge de cadmium mesurée (●) et calculée (○) après 72 h lorsque le milieu ne contient pas de thiosulfate (*C. reinhardtii* : temps d'exposition de 72 h).

En isolant la concentration de cadmium intracellulaire provenant de la prise en charge du complexe CdS_2O_3 (soustraction des deux courbes de la figure 3.6) et en exprimant ces résultats en fonction du ratio $[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}] : [\text{CdS}_2\text{O}_3]$ (figure 4.3), on remarque la concentration de cadmium intracellulaire (provenant du complexe CdS_2O_3) diminue rapidement avec l'augmentation du ratio et atteint un seuil limite. En observant le modèle conceptuel du transport du cadmium chez *Chlamydomonas reinhardtii* (figure 4.1), on note que le sulfate n'est pas le seul anion à concurrencer le complexe CdS_2O_3 pour le transporteur membranaire de sulfate. Le thiosulfate libre rivalise aussi avec le sulfate et le complexe CdS_2O_3 pour le même transporteur. Cette compétition pourrait expliquer les résultats de la figure 4.3 qui montre une diminution rapide de la prise en charge provenant du complexe CdS_2O_3 avec l'augmentation du ratio $[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}] : [\text{CdS}_2\text{O}_3]$.

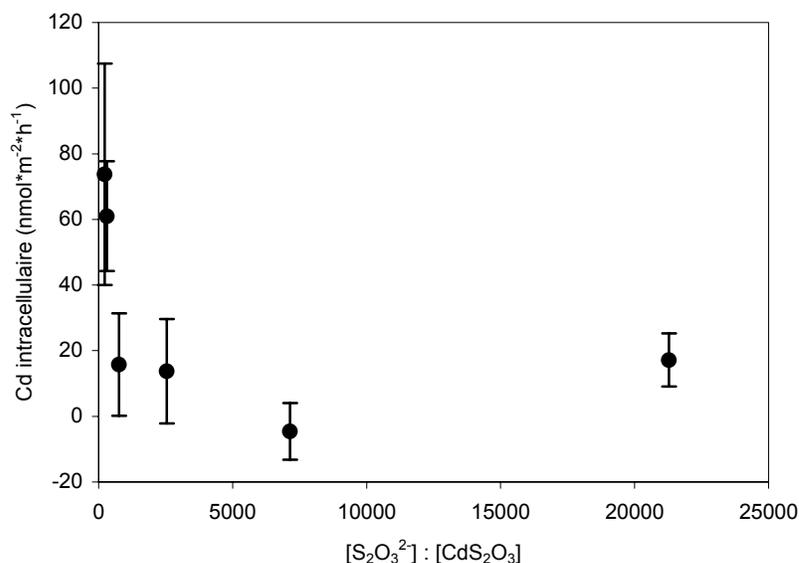


Figure 4.3 : Prise en charge du cadmium provenant du complexe CdS_2O_3 en fonction du ratio des concentrations de thiosulfate libre et du complexe cadmium-thiosulfate (voir le texte pour les détails du calcul de la contribution du complexe $\text{Cd-S}_2\text{O}_3$ à la prise en charge totale du Cd). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures.

Jusqu'à maintenant, nous avons démontré que la présence de thiosulfate dans les milieux d'exposition a pour effet d'augmenter la prise en charge du cadmium chez *Chlamydomonas reinhardtii* (figures 3.1, 3.4 et 3.5). Nous avons établi que le complexe CdS_2O_3 traverse la membrane plasmique via un transporteur de sulfate (et de thiosulfate) et que la probabilité que ce complexe soit pris en charge par les cellules algales dépend de la concentration ambiante de sulfate (et de thiosulfate) dans les milieux d'exposition (figure 3.3). En absence de thiosulfate, le Cd entre dans les cellules seulement via les transporteurs cationiques (transporteurs qui ne sont pas influencés par la concentration en $[\text{SO}_4^{2-}]$; figure 3.2).

4.3 Influence des algues sur leur milieu d'exposition

Pour évaluer l'influence de *C. reinhardtii* sur la spéciation du Cd dans son milieu de culture, nous avons suivi le pourcentage de Cd^{2+} libre dans le milieu

extracellulaire au cours des expériences de toxicité. En examinant les résultats obtenus à la figure 3.17, nous pouvons remarquer que lorsque le cadmium est fortement tamponné (< 7 % sous forme Cd^{2+} dans les milieux avec (○) ou sans thiosulfate (●)), la concentration de cadmium libre est pratiquement stable pendant les 12 premières heures d'exposition. Soulignons que ce pourcentage de Cd^{2+} libre correspond bien à la spéciation théorique du cadmium dans les milieux d'exposition, telle que calculée avec le logiciel MINEQL+. Cette période initiale correspond à la phase de latence, suivie du début de la croissance exponentielle. La croissance algale est lente et les cellules (relativement peu nombreuses) perturbent peu le milieu d'exposition. Par la suite, entre 12 et 24 h (suite de la phase exponentielle de croissance), la concentration en Cd^{2+} libre diminue d'environ 35 % dans les deux milieux, sans que la concentration totale en Cd diminue. Il ne s'agit donc pas d'une perte de Cd, mais plutôt d'un changement de sa spéciation en solution. Cette diminution de la concentration de cadmium libre correspond à la période de temps où les cellules commencent à répondre à l'exposition au cadmium (voir les figures 3.7 et 3.8). Après la première journée d'exposition, la concentration de cadmium libre demeure stable à ~ 65 % de la concentration initiale et ce, peu importe le milieu d'exposition.

Le changement de spéciation du Cd provient probablement de l'excrétion d'un (ou des) ligand (s) par *C. reinhardtii*. Un certain nombre de ces monomères simples et spécifiques ont déjà été identifiés en laboratoire (ex. : sidérophores et ferrichromes pour le Fe). Plusieurs microorganismes ont une capacité de conditionner leurs milieux de culture pour les rendre plus propices à leur propre croissance. Pour concourir avec l'EDTA et le thiosulfate pour complexer le Cd en solution et ainsi perturber la spéciation du Cd, le ligand doit avoir une constante de complexation conditionnelle relativement élevée puisque les concentrations excrétées sont fort probablement faibles (Leal *et al.*, 1999 ; Vasconcelos et Leal, 2001 ; Vasconcelos *et al.*, 2002 et Rijstenbil et Gerringa, 2002).

4.4 Interprétations et comparaisons des résultats de toxicité

Après avoir déterminé que le thiosulfate augmente la prise en charge du cadmium par l'entremise du complexe CdS_2O_3 qui, comme nous l'avons aussi démontré, entre dans les cellules algales via un transporteur membranaire, nous avons comme second objectif d'évaluer l'effet du thiosulfate sur la toxicité du Cd chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Pour ce faire, nous avons réalisé deux expériences distinctes (une expérience avec et une sans thiosulfate) avec 5 concentrations de Cd^{2+} libre en solution et 2 milieux témoin dans chacune des expériences. Dans chaque milieu, nous avons suivi la densité cellulaire sur une période de 72 h (voir les figures 3.7 et 3.8).

4.4.1 Résultats exprimés en fonction du Cd^{2+}

En exprimant les densités algales en fonction du temps, on remarque qu'en absence (figure 3.7) ou en présence de thiosulfate (figure 3.8), plus la $[\text{Cd}^{2+}]$ est élevée, plus la croissance algale est retardée. Il est cependant difficile de préciser le rôle du thiosulfate sur la toxicité du cadmium directement à partir des figures 3.7 et 3.8. Pour faire ressortir l'influence du thiosulfate, nous avons d'abord analysé les taux de croissance relatifs (μ/μ_0) pour chacune des concentrations de cadmium libre (des milieux avec ou sans thiosulfate) à différents stades de la croissance de *C. reinhardtii* (voir les figures 3.9 à 3.11) Cette analyse s'est avérée très peu discriminante puisque les courbes des milieux avec ou sans thiosulfate se superposent pour la plupart des intervalles de temps que nous avons étudiés. Cependant on peut remarquer, toujours sur les mêmes figures, que les taux de croissance relatifs varient selon la période de croissance considérée (5 → 24 , 24 → 29 et 29 → 48 h). Si on prend seulement le cas des algues exposées aux concentrations en Cd les plus élevées (milieux avec ou sans thiosulfate), on observe sur les figures 3.7 et 3.8 que leur courbe de croissance est décalée vers la droite, ce qui fait en sorte qu'à la fin de la période d'exposition (72 h), lorsque les témoins ont atteint leur état stationnaire, les cellules exposées aux concentrations élevées de Cd poursuivent leur croissance lentement puisqu'elles n'ont pas épuisé les éléments nutritifs présent dans les milieux d'exposition. Donc à la fin de l'exposition au

cadmium, les algues dont la croissance a été retardée croissent à un taux plus élevé que les témoins (résultats non montrés).

Puisque les résultats des taux de croissance relatifs ne nous permet pas de fixer le rôle du thiosulfate sur la toxicité du cadmium, nous avons mis l'accent sur les relations entre les rendements relatifs après 72 h (R/R_0) et les concentrations en Cd^{2+} libre, de nouveau dans les milieux avec ou sans thiosulfate (voir les figures 3.12a et 3.12b). Cette approche nous a permis de mieux discriminer entre les milieux d'exposition et d'extraire des valeurs de CE (concentration effective, exprimées en Cd^{2+} ; voir le tableau 3.6). D'un point de vue théorique, les valeurs de CE obtenues à partir de la biomasse sont plus facilement interprétables puisqu'elles ne sont pas dépendantes du mode de croissance de l'organisme ; elles sont plus sensibles que les mesures du taux de croissance et elles intègrent tous les processus physiologiques contenus dans la courbe de croissance (Nyholm, 1985 ; Nyholm et Kallqvist, 1989). Pour ce qui est des valeurs que l'on peut obtenir à partir des taux de croissances relatifs, elles sont plus pertinentes dans un contexte écologique puisqu'elles reflètent la compétitivité des algues dans un milieu naturel (Nyholm, 1985). Cependant, comme nous n'avons pas une très grande inhibition de la croissance et ce, même pour les concentrations de Cd^{2+} libre les plus élevées, nous avons choisi de travailler avec les rendements relatifs pour déterminer nos valeurs de CE.

Très peu d'articles tiennent compte de la spéciation de cadmium en solution et aucun n'a tenté de déterminer le rôle du thiosulfate sur la toxicité de ce métal. Donc, la comparaison de nos valeurs de CE avec celle de la littérature est très limitée. Pour ce qui est de notre valeur de CE_{30} qui est de $0,14 \mu M$, elle est semblable à celle mesurée par Macfie et al. (1994) qui est de $0,1 \mu M$. En comparant nos valeurs de CE_{30} et CE_{50} (rendements relatifs) obtenues pour les milieux contenant du thiosulfate avec celles des milieux sans thiosulfate (moyenne des séries a et b), on constate que pour diminuer la densité algale de 30 % (CE_{30}), la $[Cd^{2+}]$ nécessaire dans le milieu d'exposition est 2 fois plus élevée dans les milieux

avec thiosulfate que ceux sans thiosulfate. Par la même approche, on peut calculer que pour une diminution de 50 % (CE_{50}) du rendement final, c'est une concentration en Cd^{2+} 1,8 fois plus élevée qu'il faut dans les milieux avec thiosulfate. Ces résultats exprimés en fonction de la concentration de Cd^{2+} libre dans les milieux avec ou sans thiosulfate nous démontrent que le thiosulfate joue un certain rôle protecteur face au cadmium chez *C. reinhardtii*, et cela même si on tient compte de la complexation du métal par le thiosulfate.

Ce résultat est inattendu puisque selon le BLM, la réponse biologique ($CE(Cd^{2+})$) doit être identique, peu importe la présence ou l'absence de thiosulfate, puisqu'elle ne dépend que de la concentration de Cd^{2+} en solution. Pour notre part, en déterminant que la prise en charge était plus importante en présence de thiosulfate, on aurait pu s'attendre à un résultat contraire (CE plus faible en présence de thiosulfate) puisqu'une seconde voie d'entrée pour le Cd est disponible. Cependant, même si les résultats que nous avons obtenus sont en contradiction avec ce qui est prédit par le BLM, il concordent avec ceux déterminés par Hiriart-Baer *et al.* (en préparation) pour le complexe $AgS_2O_3^-$ et *C. reinhardtii*. Ces auteurs ont déterminé que le thiosulfate avait un effet protecteur contre la toxicité de l'Ag chez *C. reinhardtii* puisque la $CE(Ag^+)$ est $\sim 1,6$ fois plus élevée en présence de thiosulfate ($CE_{50} = 13,9 \pm 0,9$ nM en absence de thiosulfate et de $21,0 \pm 1,6$ nM en présence de thiosulfate). Ils ont aussi observé que le thiosulfate n'avait pas d'effet protecteur sur la toxicité de l'Ag chez *P. subcapitata*, ce qui suggère que l'espèce utilisée semble jouer un rôle important dans la toxicité d'un métal, ce qui rend la généralisation des conclusions beaucoup plus ardue. L'explication du rôle protecteur du thiosulfate sur la toxicité du cadmium chez *C. reinhardtii* provient de l'analyse des rendements relatifs exprimés en fonction du quota cellulaire (voir aussi la section 4.4.3).

4.4.2 Résultats exprimés en fonction des quotas cellulaires de Cd

Lorsque les résultats de rendements relatifs sont exprimés en fonction du quota cellulaire, l'effet protecteur du thiosulfate sur la toxicité du cadmium s'observe facilement, car les courbes tendent à se séparer (voir les figures 3.16a et 3.16b). Pour une même diminution de rendement, la concentration interne de cadmium dans une cellule est plus élevée lorsque le cadmium est accumulé en présence de thiosulfate. En comparant les valeurs de CE_{30} et CE_{50} pour les milieux avec ou sans thiosulfate (tableau 3.7), on remarque que pour une diminution du rendement de 30 %, la cellule doit accumuler 1,6 fois plus de cadmium lorsqu'elle est exposé au Cd en présence de thiosulfate. Pour une diminution de 50 %, c'est $1,5 \times$ plus de Cd qui doit être accumulé lorsque le thiosulfate est présent dans les milieux d'exposition. Ces résultats suggèrent que même si la cellule accumule plus de cadmium en présence de thiosulfate, le complexe Cd-thiosulfate n'est que partiellement disponible à l'intérieur de la cellule. En dernier lieu, à partir des figures 3.16a et 3.16b, on remarque qu'il semble y avoir un quota cellulaire d'environ $500 \text{ amol} \cdot \text{cellule}^{-1}$ qui est toléré par l'algue, et ce en présence ou non de thiosulfate. Une fois ce seuil dépassé, le rôle protecteur de thiosulfate sur la toxicité du cadmium intracellulaire entre en jeu.

4.4.3 Explication de l'effet protecteur apparent du thiosulfate

Deux facteurs peuvent expliquer l'effet protecteur du thiosulfate que nous avons démontré à partir de nos résultats de taux de croissance et de rendements relatifs. Tout d'abord, comme nous l'avons mentionné à la section précédente, nous croyons que le cadmium pris en charge par *Chlamydomonas reinhardtii* via le complexe CdS_2O_3 (transporteur de sulfate) n'est pas entièrement disponible pour la cellule une fois qu'il se trouve à l'intérieur de cette dernière. En demeurant complexé au thiosulfate, ce cadmium pris en charge parallèlement à celui accumulé via la voie cationique aura moins d'effets délétères sur cette algue. Le thiosulfate libre qui est pris en charge peut lui aussi aider à maintenir le complexe stable à l'intérieur de la cellule et du même coup, diminuer la toxicité du complexe CdS_2O_3 . Le thiosulfate intracellulaire pourrait aussi permettre de complexer le cadmium pris en charge via

la voie cationique et ainsi le rendre moins disponible pour la cellule. À partir de nos résultats, nous pouvons affirmer qu'en plus de la spéciation extracellulaire (BLM et FIAM) il faut maintenant s'attarder d'avantage à la spéciation intracellulaire, un domaine très peu exploré à ce jour.

4.5 Retour sur nos hypothèses

Nous avons émis trois hypothèses sur la prise en charge et la toxicité du cadmium en présence de thiosulfate. La première était que le complexe Cd-thiosulfate allait entrer dans la cellule algale via une seconde voie (servant à la prise en charge de sulfate) puisque le thiosulfate est un ligand assimilable. La deuxième hypothèse était que la prise en charge du complexe Cd-thiosulfate s'effectuerait par mimétisme via le transporteur membranaire de sulfate puisque le thiosulfate et le sulfate partagent une structure moléculaire et une charge ionique similaire et que tous les deux peuvent être assimilés par la même voie. En se basant sur les résultats de Hiriart-Baer *et al.* (en préparation), la troisième hypothèse de notre recherche était en contradiction avec le BLM et suggérait que le thiosulfate aurait un effet protecteur sur la toxicité du cadmium. Nos travaux corroborent donc avec ces trois hypothèses.

5. Conclusion

Le cadmium a été classifié dans la catégorie des éléments très toxiques et relativement accessibles au même titre que l'argent, le zinc, le mercure et le plomb (Wood, 1976). Jusqu'à maintenant, le Cd a fait l'objet de plusieurs études écotoxicologiques sur plusieurs espèces des différents maillons de la chaîne trophique aquatique. Comme dans le cas des autres métaux d'intérêt toxicologique, la spéciation du cadmium influe de manière importante sur sa prise en charge par les organismes aquatiques et sur sa toxicité envers ces mêmes organismes. Le Cd a une grande affinité pour plusieurs ligands que l'on peut retrouver en milieu aquatique, par exemple le soufre sous forme de « thiols », et il peut former une série de complexes stables avec le thiosulfate. Chez d'autres métaux comme l'argent, la formation de complexe argent-thiosulfate a mené à une prise en charge plus élevée de ce métal chez *Chlamydomonas reinhardtii*. À partir des résultats obtenus par Fortin et Campbell (2001), nous nous sommes demandés si la formation de complexes cadmium-thiosulfate conduirait aussi à une exception au BLM.

Pour répondre à cette question, nous avons identifié trois objectifs principaux pour cette recherche. Le premier consistait à déterminer la prise en charge à court (< 1 h) et à long terme (72 h) du cadmium en présence ou en absence de thiosulfate (un test du BLM). Le deuxième objectif était d'établir le mécanisme de transport responsable de la prise en charge du complexe cadmium-thiosulfate et le dernier était de déterminer la toxicité du cadmium en présence ou en absence du thiosulfate (également un test du BLM). Les différentes expériences ont été réalisées avec une algue verte unicellulaire, *Chlamydomonas reinhardtii*, comme organisme cible et avec un radio-isotope du cadmium (^{109}Cd) nous a servi de traceur.

À la fois pour les expériences de courte et de longue durée, nous avons démontré que la prise en charge du cadmium (pour une même concentration de cadmium

libre) est accentuée en présence de thiosulfate. Cette augmentation de la prise en charge du Cd chez *Chlamydomonas reinhardtii* est en contradiction avec le BLM puisqu'elle conduit à un taux d'accumulation qui n'est pas proportionnelle à la concentration de Cd²⁺ libre en solution. Par exemple, contrairement à ce qui aurait été prédit par le BLM, la prise en charge du cadmium après 40 min est de 1,5 à 2 fois plus élevée en présence de thiosulfate qu'en son absence.

Nous avons voulu déterminer le mécanisme responsable de l'augmentation de la prise en charge du cadmium en présence de thiosulfate. En faisant varier la concentration ambiante de sulfate dans des milieux d'exposition contenant du thiosulfate, nous avons démontré que le complexe CdS₂O₃ entre dans les cellules de *C. reinhardtii* via le transporteur de SO₄²⁻, et que la prise en charge du complexe dépend de la concentration ambiante de sulfate et de thiosulfate. Ces résultats, ainsi que ceux obtenus pour une période d'exposition de 72 h, ont mis en évidence l'importance du transporteur anionique de sulfate pour la prise en charge du complexe CdS₂O₃.

Pour évaluer la pertinence environnementale de ces résultats, il faut considérer la probabilité que le complexe CdS₂O₃ soit en proportion importante en milieu aquatique, pour qu'il puisse contribuer à augmenter la prise en charge de cadmium en entrant dans la cellule algale via le transporteur membranaire de sulfate et de thiosulfate. Selon les résultats d'une simulation faite à l'aide du logiciel de spéciation chimique MINEQL+ pour un milieu peu perturbé en cadmium ([Cd]_T de 0,09 à 4,4 nM) et en thiosulfate ([S₂O₃²⁻] = 1,3 µM), il n'y aurait pratiquement pas de cadmium complexé avec le thiosulfate dans de telles conditions. Ce résultat nous indique qu'en milieu peu pollué en thiosulfate, ce ligand assimilable n'aura pas d'effet notable sur la prise en charge du cadmium par le phytoplancton. Nous avons aussi fait une simulation pour un milieu fortement pollué en thiosulfate (effluents des industries photographiques ; [S₂O₃²⁻] = 1 mM) et dont la concentration de cadmium est normale ([Cd]_T de 0,09 à 4,4 nM). Dans ce type de milieu, 87 % du cadmium serait complexé par le thiosulfate et la gamme de concentrations du

complexe CdS_2O_3 serait du même ordre de grandeur que ce que l'on retrouvait dans nos expériences à court terme. Donc, en milieu fortement perturbé en thiosulfate, ce dernier pourrait jouer un rôle appréciable en faisant augmenter de façon significative la prise en charge du cadmium chez le phytoplancton.

Les résultats que nous avons obtenus avec *C. reinhardtii* ne s'appliquent pas à l'ensemble de la chaîne trophique aquatique puisque le système de transport transmembranaire de sulfate et de thiosulfate n'est pas généralisé chez tous les organismes aquatiques. Ce type de transporteur n'est présentement reconnu que chez les algues et les bactéries. Donc, il est peu probable que la prise en charge du complexe CdS_2O_3 s'observe directement chez les organismes supérieurs puisqu'ils ne possèdent pas de transporteurs membranaires de sulfate et de thiosulfate. Cependant, cette prise en charge accrue du cadmium (via la prise en charge du complexe CdS_2O_3) chez les micro-organismes aura potentiellement une influence sur l'accumulation du Cd chez les prédateurs puisque ces derniers accumulent majoritairement le cadmium de leur nourriture (Munger et Hare, 1997). Donc la relation entre la concentration de Cd^{2+} et la prise en charge du cadmium ne tiendra plus aussi chez les organismes supérieurs en présence de thiosulfate comme nous l'avons démontré pour *Chlamydomonas reinhardtii*.

Pour ce qui est de nos résultats de toxicité, ils sont aussi en contradiction avec le BLM puisque pour une même diminution de rendement relatif (50 % après 72 h), la concentration interne de cadmium est 1,5 × fois plus élevée chez les cellules exposées au cadmium en présence de thiosulfate. Selon le BLM, puisque les cellules étaient exposées à la même gamme de concentrations de cadmium libre dans les milieux avec ou sans thiosulfate, la probabilité d'avoir une formation du complexe Cd-X-cellule avec le ligand cellulaire devait être la même (X-cellule = ligand cellulaire). Par le fait même, la concentration interne de cadmium causant une diminution de rendement aurait dû être la même, peu importe la présence ou non de thiosulfate.

Les résultats de toxicité sont difficiles à transposer en milieu naturel puisque nous avons effectué nos expériences avec des concentrations élevées de cadmium (peu susceptible d'être retrouvées en milieu naturel) et que nous n'avons utilisé qu'un seul organisme cible. Des expériences avec l'argent et le thiosulfate ont démontré que le thiosulfate n'avait pas le même effet chez deux espèces d'algue différentes (*Hiriart et al.*, en préparation). De plus, même si le thiosulfate semble diminuer la toxicité du cadmium intracellulaire chez *C. reinhardtii*, les organismes supérieurs (brouteurs) dans la chaîne trophique seront peut-être perturbés puisque l'on ne connaît pas la persistance du complexe CdS_2O_3 une fois que la cellule algale est ingérée.

Pour donner suite à notre recherche, on pourrait étudier l'effet de variations de la concentration en SO_4^{2-} sur le transport du Cd en présence de faibles concentrations de thiosulfate (et du complexe CdS_2O_3), afin de déterminer si nous sommes en présence d'un co-transport du Cd^{2+} et du thiosulfate plutôt que d'un transport du complexe entier. On pourrait aussi charger *C. reinhardtii* avec une sonde sensible au Cd^{2+} et tester si le Cd assimilé en présence du thiosulfate est effectivement moins "disponible" dans le milieu intracellulaire que le Cd assimilé en absence du thiosulfate.

6. Bibliographie

- Alfaro-De la Torre M.C. et A. Tessier (2002). Cadmium deposition and mobility in the sediments of an acidic oligotrophic lake. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 66, 3549-3562.
- Arnason J.G. et B.A. Fletcher (2003). A 40 + year record of Cd, Hg, Pb, and U deposition in sediments of Patroon Reservoir, Albany County, NY, USA. *Environ. Pollut.*, 123, 383-291.
- Barata C., D.J. Baird et S.J. Markich (1998). Influence of genetic and environmental factors on the tolerance of *Daphnia magna* Straus to essential and non-essential metals. *Aquat. Toxicol.*, 42, 115-137.
- Bates S.S., A. Tessier, P.G.C. Campbell et J. Buffle (1982). Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (CHLOROPHYCEAE) grown in semicontinuous culture. *J. Phycol.*, 18, 521-529.
- Bates S.S., M. Létourneau, A. Tessier et P.G.C. Campbell (1983). Variation in zinc adsorption and transport during growth of *Chlamydomonas variabilis* (CHLOROPHYCEAE) in batch culture with daily addition of zinc. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40, 895-904.
- Biedlingmaier S. et A. Schimdt (1989). Sulfate transport in normal and S-deprived *Chlorella fusca*. *Z. Naturforsch.*, 44c, 495-503.
- Bitton G., K. Rhodes et B. Koopman (1996). Ceriofast™: an acute toxicity test based on *Ceriodaphnia dubia* feeding behavior. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 123-125.
- Block M et P. Pärt (1986). Increased availability of cadmium to perfused rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Rich.) gills in the presence of the complexing agents diethyldithiocarbamate, ethyl xanthate and isopropyl xanthate. *Aquat. Toxicol.*, 8, 295-302.
- Block M. et A. Wicklund Glynn (1992). Influence of xanthates on the uptake of ¹⁰⁹Cd by Eurasian dace (*Phoxinus phoxinus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 11, 873-879.
- Bonnevie N.L., S.L. Huntley, B.W. Found, et R.J. Wenning (1994). Trace metal contamination in surficial sediments for Newark Bay, New Jersey. *Sci. Tot. Environ.*, 144, 1-16.

- Boullemant A., B. Vigneault, C. Fortin et P.G.C. Campbell (2004). Uptake of neutral metal complexes by a green alga : Influences of pH and humic substances. *Aust. J. Chem.*, 57, 931-936.
- Buhl K.J. et S.J. Hamilton (1991). Relative sensitivity of early life stages of arctic grayling, coho salmon, and rainbow trout to nine inorganics. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 22, 184-197.
- Byrne R.H., L.R. Kemp et K.J. Cantrell (1988). The influence of temperature and pH on trace metal speciation in seawater. *Mar. Chem.*, 25, 163-181.
- Campbell P.G.C. et P.M. Stokes (1985). Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.*, 42, 2034-2049.
- Campbell, P.G.C. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms : A critique of the free-ion activity model. Dans A. Tessier et D.R. Turner (éds), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. New York, NY, USA : John Wiley & Sons. p. 45-102.
- Campbell P.G.C., O. Errécalde , C. Fortin, V. Hiriart-Baer et B Vigneault (2002). Metal bioavailability to phytoplankton – applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 133, 189-206.
- Canton J.H. et W. Slooff (1982). Toxicity and accumulation studies of cadmium (Cd^{2+}) with freshwater organisms of different trophic levels. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 6, 113-128.
- Cantwell F.F. (1982). Free nickel ion concentration in sewage by an ion exchange column-equilibration method. *Anal. Chem.*, 54, 1498-1503.
- Carroll J.J., S.J. Ellis et W.S. Oliver (1979). Influences of hardness constituents on the acute toxicity of cadmium to brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 22, 575-581.
- Chapman G.A. (1975). Toxicity of copper, cadmium and zinc to Pacific Northwest salmonids. Interim report, Task 002 ROAP 10 CAR, USEPA, Corvallis, Oregon, USA. 27 p.
- Chapman G.A. (1978). Toxicities of cadmium, copper, and zinc to four juvenile stages of chinook salmon and steelhead. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107, 841-847.
- Ciglencečki I. et B. Čosović (1997). Electrochemical determination of thiosulfate in seawater in the presence of elemental sulfur and sulfide. *Electroanalysis*, 9 (10), 775-780.

- Croot P.L., B. Karlson, J.T. Van Elteren et J.J. Kroon (1999). Uptake of ^{64}Cu -oxine by marine phytoplankton. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 3615-3621.
- Davidson C.I., W.D. Goold, T.P. Mathison, G.B. Wiersama, K.W. Brown, et M.T. Reilly (1985). Airborne Trace Element in Great Smoky Mount (1985). Airborne trace elements in Great Smokey Mountains, Olympic, and Glacier National Parks. *Environ. Sci. Technol.*, 19, 27-35.
- De Schampelaere K.A.C., D.G. Heijerick et C.R. Janssen (2002). Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting acute copper toxicity to *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 133, 243-258.
- Diamond J.M., D.E. Koplisch, J. McMahon III et R. Rost (1997). Evaluation of the water-effect ratio procedure for metals in a riverine system. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 509-520.
- Dressing S.A., R.P. Maas et C.M. Weiss (1982). Effect of chemical speciation on the accumulation of cadmium by the caddisfly, *Hydropsyche sp.* *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 28, 172-180.
- Druschel G.K., R.J. Hamers et J.F. Banfield (1999). Rates and products of thiosulfate and polythionate oxidation by Fe^{3+} and O_2 : Implications for sulfide oxidation, microbial energy utilization, and mass balance in acid mine drainage environments. GSA Annual Meeting, Abstract 52270, Denver, CO.
- Eisler R. (1985). Cadmium hazards to fish, wildlife, and invertebrates : A synoptic view. U.S. Fish Wild Service, Biol. Rep. 85 (1.2), 1-46.
- Elinder C.G. (1985). Cadmium : Uses, occurrence and intake. Dans : Friberg L., C.G. Elinder, T. Kjellstrom et G. Nordberg (Eds.), Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal. Vol. I. exposure, dose, and metabolism. Effects and response. Boca Raton, FL, USA : CRC Press, p. 23-64.
- Elinder C.G. (1992). Cadmium as an environmental hazard. *IARC Sci. Publ.*, 118, 123-132.
- Errécalde O., M. Seidl et P.G.C. Campbell (1998). Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum* : An exception to the free-ion model. *Wat. Res.*, 32, 419-429.
- Errécalde O. et P.G.C. Campbell (2000). Cadmium and zinc bioavailability to *Selenastrum capricornutum* (*CHLOROPHYCEAE*): Accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate. *J. Phycol.*, 36, 473-483.

- Finlayson B.J. et K.M. Verrue (1982). Toxicities of copper, zinc and cadmium mixtures to juvenile chinook salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 111, 645-650.
- Flynn K.J. et P.J. Syrett (1986). Characteristics of the uptake of L-lysine and L-arginine in *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Biol.*, 90, 151-158.
- Fortin C. (2000). *Mécanismes de prise en charge et toxicité de l'argent chez une algue verte en relation avec la spéciation chimique*. Thèse de doctorat. INRS-Eau, Université du Québec. Québec. 159 p.
- Fortin C. et P.G.C. Campbell (1998). An ion-exchange technique for free-metal ion measurements (Cd^{2+} , Zn^{2+}): Applications to complex aqueous media. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, 72, 173-194.
- Fortin C. et P.G.C. Campbell (2001). Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: Role of anion transporters in metal uptake. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 2214-2218.
- Fotovat A. et R. Naidu (1998). Changes in composition of soil aqueous phase influence chemistry of indigenous heavy metals in alkaline sodic and acidic soils. *Geoderma.*, 84, 213-234.
- Gillespie R., T. Reisine et E.J. Massaro (1977). Cadmium uptake by the crayfish, *Orconectes propinquus propinquus* (Girard). *Environ. Res.*, 13, 364-368.
- Good N.E., G.D. Winget, W. Winter, T.N. Connolly, S. Izawa et R.M.M. Singh (1966). Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, 5, 467-477.
- Gutknecht J. (1981). Inorganic mercury (Hg^{2+}) transport through lipid bilayer membranes. *J. Membrane Biol.*, 61, 61-66.
- Hall W.S., R.L. Paulson, L.W. Hall, Jr. et D.T. Burton (1986). Acute toxicity of cadmium and sodium pentachlorophenate to daphnids and fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 37, 308-316.
- Harrison G.I., P.G.C. Campbell et A. Tessier (1986). Effects of pH changes on zinc uptake by *Chlamydomonas variabilis* grown in batch culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43, 687-693.
- Hassler C.S., V.I. Slaveykova et K.J. Wilkinson (2004). Discrimination between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol. Oceanogr.*, Methods 2, 237-247.

- Helmke P.A. (1999). Chemistry of cadmium in soil solution. Ds McLaughlin, M.J. et B.R. Singh (éds.), *Cadmium in Soils and Plants*. Netherlands : Kluwer Academic. p. 29-64.
- Heumann H.G. (1987). Effects of heavy metals on growth and ultrastructure of *Chara vulgaris*. *Protoplasma*, 136, 37-48.
- Hiriart-Baer V.P., C. Fortin, D.-Y. Lee et P.G.C. Campbell (2005). Toxicity of silver to the freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, growth under continuous culture. *Aquat. Toxicol.* (en preparation)
- Hudson R.J.M. (1998). Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Observations and predictions of non-equilibrium effects. *Sci. Tot. Environ.*, 219, 95-115.
- Hudson R.J.M. et F.M.M. Morel (1990) Iron transport in marine phytoplankton : Kinetics of cellular and medium coordination reactions. *Limnol. Oceanogr.*, 35, 1002-1020.
- IARC. (1993). Cadmium and certain cadmium compounds. Dans IARC Monographs on Evaluation of the Carciogenic Risk of Chemicals to Humans. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. IARC monographs, Vol. 58. Lyon, France: World Health Organization. International Agency for Research on Cancer, 119-146, 210-236.
- Jørgensen B.B. (1990 a). A thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science*, 249, 152-154.
- Jørgensen B.B. (1990 b). The sulfur cycle of freshwater sediments : Role of thiosulfate. *Limnol. Oceanogr.*, 35, 1329-1342.
- Jørgensen B.B. et F. Bak (1991). Pathway and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark). *Environ. Microbiol. Mar.*, 57, 847-856.
- Kähkönen M.A., K.P. Suominen, P.K.G. Manninen et M.S. Salkinoja-Salonen (1998). 100 years of sediment accumulation history of organic halogens and heavy metals in recipient and nonrecipient lakes of pulping industry in Finland. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 1741-1746.
- Kempler T. et S. Sommer (2002). Estimate of heavy metal contamination in soils after a minning accident using reflectance spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 2742-2747.

- Knauer K., R. Behra et L. Sigg (1997). Effects of free Cu^{2+} ad Zn^{2+} ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 220-229.
- Kola H. et K.J. Wilkinson (2004). Steady-state uptake of cadmium by green alga. *Environ. Sci. Technol.*, Soumis.
- Kondo R., N. Kasashima, H. Matsuda et Y. Hata (2000). Determination of thiosulfate in ameromictic lake. *Fish. Sci.*, 66, 1076-1081.
- Kookana R.S., R. Naidu, D.A. Barry, Y.T. Tran et K. Bajracharua (1999). Sorption-desorption of cadmium during transport in soil. Dans Selim, H.M. et I.K. Iskandar (éds.), *Fate and Transport of Heavy Metals in the Vadose Zone*. Boca Raton, FL, USA : Lewis Publishers, p. 59-90.
- Laforte L. (2003). Étude de la complexation du cadmium par le thiosulfate par échange ionique. *INRS-ETE*, RI-145, 18 p.
- Lage O.M., M.T.S.D. Vasconcelos, H.M.V.M. Soares, J.M. Osswald, F. Sansonetty, A.M. Parente et R. Salema (1996). Suitability of the pH buffers 3-[*N-N-bis*(hydroxyethyl)amino]-2- hydroxypropanesulfonic acid and *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid for *in Vitro* copper toxicity studies. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 31, 199-205.
- Leal M.F.C., M.T.S.D. Vasconcelos et C.M.G. van den Berg (1999). Copper-induced release of complexing ligands similar to thiols by *Emiliana huxleyi* in seawater cultures. *Limnol. Oceanogr.*, 44,1750-1762.
- Lee J.G., S.B. Roberts et F.M.M. Morel (1995). Cadmium : A nutrient for marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnol. Oceanogr.*, 40, 1056-1063.
- Lee III S., E.J. Na, Y.O. Cho, B. Koopman et G. Bitton (1997). Short-term toxicity test based on algal uptake by *Ceriodaphnia dubia*. *Water Environ. Res.*, 69, 1207-1210.
- Lindsay W.L. (1979). *Chemical Equilibria in soils*. New York, NY, USA : John Wiley & Sons.
- Lorey P. et C.T. Driscoll (1999). Historical trends of mercury deposition in Adirondack lakes. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 718-722.
- Lum K.R. (1987). Cadmium in fresh waters: the Great Lakes and the St. Lawrence River. *Adv. Environ. Sci. Technol.*, 19, 35-50.
- Luther III G.W., T.M. Church, J.R. Scudlark et M. Cosman (1986). Inorganic and organic sulfur cycling in salt-marsh pore water. *Science*, 232, 746-749.

- Macfie S.M., Y Tarmohamed et P.M. Welbourn (1994). Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influence of the cell wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 27, 454-458.
- Macfie S.M. et P.M. Welbourn (2000). The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (CHLOROPHYCEAE). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39, 413-419.
- Martell A.E., R.M. Smith et R.J. Motekaitis (2001). NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes Database (version 5.15) [NIST Standard Reference Database 46]. Gaithersburg, MD, USA : U.S. Department of Commerce.
- Mason B. et C.B. Moore (1982). Principles of Geochemistry, 4th ed.. New York, NY, USA : John Wiley & Sons. 344 p.
- McCarty L.S., J.A.C. Henry et A.H. Houston (1978). Toxicity of cadmium to goldfish, *Carassius auratus*, in hard and soft water. *J. Fish. Res. Board Can.*, 35, 35-42.
- Meyer J.S., R.C. Santore, J.P. Bobbitt, L. Debrey, C.L. Boese, P.R. Paquin, H.E. Allen, H.L. Bergman et D.M. Di Toro (1999). Binding of nickel and copper to fish gills predicts toxicity when water hardness varies, but free-ion activity does not. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 913-916.
- Millero F.J. et D.J. Hawke (1992). Ionic interactions of divalent metals in natural waters. *Mar. Chem.*, 40, 19-48.
- Morel F.M.M. (1983). Principles of Aquatic Chemistry. New York, NY, USA: John Wiley & Sons. 446 p.
- Munger C. et L. Hare (1997). Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 891-895.
- Nelson W.O. et P.G.C. Campbell (1991). The effects of acidification on the geochemistry of Al, Cd, Pb and Hg in freshwater environments : A literature review. *Environ. Pollut.*, 71, 91-130.
- Nyholm N. (1985). Response variable in algal growth inhibition tests-biomass or growth rate ? *Wat. Res.*, 19, 273-279.
- Nyholm N et T. Kallqvist (1989). Methods for growth-inhibition toxicity tests with fresh-water algae. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 689-703.

- Nriagu J.O. et J.M. Pacyna (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333, 134-139.
- Nriagu J.O. (1989). A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, 338, 47-49.
- Pacyna J.M. et E.G. Pacyna (2001). An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environ. Rev.*, 269-298.
- Pérez-Castiñeira J.R., J.L. Prieto, J.G. González-Arroyo et J.M. Vega (1998). Kinetic properties of sulfate uptake in two types of eukaryotic green microalgae. *J. Plant Physiol.*, 153, 324-331.
- Phinney J.T. et K.W. Bruland (1994). Uptake of a lipophilic organic Cu, Cd and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 1781-1790.
- Phinney J.T. et K.W. Bruland (1997a). Trace metal exchange in solution by the fungicides Ziram and Maneb (dithiocarbamates) and subsequent uptake of lipophilic organic zinc, copper and lead complexes in phytoplankton cells. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 2046-2053.
- Phinney J.T. et K.W. Bruland (1997b). Effects of dithiocarbamate and 8-hydroxyquinoline additions on algal uptake of ambient copper and nickel in south San Francisco bay water. *Estuaries*, 20, 66-76.
- Poldoski J.E. (1979). Cadmium bioaccumulation assays. Their relationship to various ionic equilibria in Lake Superior water. *Environ. Sci. Technol.*, 13, 701-706.
- Price N.M., G.I. Harrison, J.G. Hering, R.J. Hudson, P.M. Nirel, B. Palenik et F.M.M. Morel (1989). Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium Aquil. *Biol. Oceanogr.*, 6, 443-461.
- Prieto J.L., J.R. Pérez-Castiñeira et J.M. Vega (1997). Thiosulfate reductase from *Chlamydomonas*. *J. Plant. Physiol.*, 151, 385-389.
- Purcell T.W. et J.J. Peters (1998). Sources of silver in the environment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 539-546.
- Rachlin J.W., T.E. Jensen et B. Warkentine (1984). The toxicological response of the algae *Anabaena flos-aquae* (CYANOPHYCEAE) to cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 13, 143-151.

- Radetski C.M., J.F. Ferard et C. Blaise (1995). A semistatic microplate-based phytotoxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 299-302.
- Ressources naturelles Canada (NRCAN) (1995). *L'Annuaire des minéraux du Canada*. p. 40.11-40.16.
- Ressources naturelles Canada (NRCAN) (2001). *L'Annuaire des minéraux du Canada*. p. 15.1-15.6.
- Rijstenbil J. W. et L.J.A. Gerringa (2002). Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aqua. Toxicol.*, 56, 115-131.
- Rosko J.J. et J.W. Rachlin (1977). The effect of cadmium, copper, mercury, zinc and lead on cell division, growth, and chlorophyll a content of the chlorophyte *Chlorella vulgaris*. *Bull. Torrey Bot. Club*, 104, 226-233.
- Roux D.J., P.L. Kempster, E. Truter et L. van der Merwe (1993). Effect of cadmium and copper on survival and reproduction of *Daphnia pulex*. *Water SA.*, 19, 269-274.
- Salomons W. (1986) Impact of atmospheric inputs on the hydropheric trace metal cycle. Dans Nriagu J.O. et C.I. Davidson (éds.), *Toxic Metals in the Atmosphere*. New York, NY, USA: John Wiley & Sons. p. 410-466.
- Schafer H., H. Hettler, U. Fritsche, G. Roderer et W. Traunspurger (1993). Long-term effects of selected xenobiotics on freshwater green algae : development of a flow-through test system. *Sci. Total Environ.*, Supplemental Part I, 735-740.
- Schenck R.C., A. Tessier et P.G.C. Campbell (1988). The effect of pH on iron and manganese uptake by green alga. *Limnol. Oceanogr.*, 33, 538-550.
- Schippers A. et B.B. Jørgensen (2001). Oxidation of pyrite and iron sulfide by manganese dioxide in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 65, 915-922.
- Shiller A.M. et E.A. Boyle (1987). Variability of dissolved trace metals in the Mississippi River. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 51, 3273-3277.
- Sirko A., M Zatyka, E. Sadowy et D.Hulanicka (1995). Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: Evidence for a functional overlapping of sulfate- and thiosulfate-binding proteins. *J. Bacteriol.*, 177, 4134-4136.

- Soares H.M.V.M. et P.C.F.L. Conde (2000). Electrochemical investigations of the effect of N-substituted aminosulfonic acids with a piperazinic ring pH buffers on heavy metal processes which may have implications on speciation studies. *Anal. Chim. Acta.*, 412, 103-111.
- Spehar R.L., R.L. Anderson et J.T. Fiandt (1978). Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic invertebrates. *Environ. Pollut.*, 15, 195-208.
- Spehar R.L. et A.R. Carlson (1984). Derivation of site-specific water quality criteria for cadmium and the St. Louis River Basin, Duluth, Minnesota. *Environ. Toxicol. Chem.*, 3, 651-655.
- Stahlmann J.R., R. Warthmann et H. Cypionka (1991). Na⁺-dependent accumulation of sulfate and thiosulfate in marine sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.*, 155, 554-558.
- Stoll V.S. et J.S. Blanchard (1990). Buffers : principles and practice. *Methods Enzym.*, 182, 24-38.
- Stuhlbacher A., M.C. Bradley, C. Naylor et P. Calow (1993). Variation in the development of cadmium resistance in *Daphnia magna* Straus ; effect of temperature, nutrition, age and genotype. *Environ. Pollut.*, 80, 153-158.
- Sunda W.G., et S.A. Huntsman (1998). Control of Cd concentrations in a coastal diatom by interactions among free ionic Cd, Zn, and Mn in seawater. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 2961-2968.
- Suresh A., B. Sivaramakrishna et K. Radhakrishnaiah (1993). Effect of lethal and sublethal concentrations of cadmium on energetics in the gills of fry and fingerlings of *Cyprinus carpio*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, 920-926.
- Templeton D.M., F. Ariese, R. Cornelis, L.-G. Danielsson, H. Muntau, H.P. Van Leeuwen et R. Lobinski (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure App. Chem.*, 72, 1453-1470.
- ten Hulscher T.E.M., G.A.J. Mol et F. Luers (1992). Release of metals from polluted sediments in a shallow lakes; quantifying resuspension. Dans Hart, B.T. et P.G. Sly (éds.), *Sediment/water Interactions; Proceedings of Fifth International Symposium. Hydrobiologia*, 235-236, 97-105.
- Thamdrup B., K. Finster, H. Fossing, J.W. Hansen et B.B. Jørgensen (1994). Thiosulfate and sulfite distributions in porewater of marine sediments related to manganese, iron, and sulfur geochemistry. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 58, 67-73.

- Thellen C., C. Blaise, Y Roy et C. Hickey (1989). Round robin testing with *Selenastrum capricornutum* microplate toxicity assay. *Hydrobiol.*, 188 / 189, 259-268.
- Thornton, I. (1992). Sources and pathways of cadmium in the environments. *IARC Sci. Publ.*, 118, 149-162.
- Treit J., J.S. Nielsen, B. Kratochvil et F.F. Cantwell (1983). Semiautomated ion exchange/atomic absorption system for free metal ion determinations. *Anal. Chem.*, 55, 1650-1653.
- USEPA (2001) Update of Ambient Water Quality Criteria for Cadmium. Report No. EPA-822-R-01-001. Washington, D.C., USA : Office of Science and Technology. 266p.
- USGS. Buttermann W.C. et J. Plachy (2004). Mineral Commodity Profiles : Cadmium. Report No. 02-238 (Version 1.0). Reston, VA, USA. 25 p.
- Vallée M. et R Jeanjean (1968). Le système de transport de SO_4^{2-} chez *Chrorella pyrenoidosa* et sa régulation. I. Étude cinétique de la perméation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 150, 599-606.
- Van Den Berg G.A., J.P.G. Loch, L.M. Van Der Heijdt et J.J.G. Zwolsmann (1999). Mobilisation of heavy metals in contaminated sediments in the river Meuse, The Netherland. *Water, Air, Soil Pollut.*, 116, 567-586.
- Van der Heever J.A. et J.U. Grobbelaar (1996). The use of *Selenastrum capricornutum* growth potential as a measure of toxicity of a few selected compounds. *Water SA*, 22, 183-191.
- Vasconcelos M.T.S.D. et C.M.R. Almeida (1998). Electrochemical study of proton ionisation, copper(II) complexation and surfactant properties of piperazine-*N-N'*-bis[2-hydroxypropanesulfonic acid] pH buffer. Comparaison with other N-substituted aminosulfonic acids pH buffers. *Anal. Chim. Acta*, 369, 115-122.
- Vasconcelos M.T.S.D., M.A.G.O. Azenha et O.M. Lage (1996). Electrochemical evidence of surfactant activity of the HEPES pH buffer which may have implications on trace metal availability to cultures *in Vitro*. *Anal. Biochem.*, 241, 248-253.
- Vasconcelos M.T.S.D. et M.F.C. Leal (2001). Adsorption and uptake of Cu by *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 508-515.

- Vasconcelos M.T.S.D. et M.F.C. Leal (2002) Influence of *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid pH buffer of marine algae. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, 404-412.
- Vasconcelos M.T.S.D., M.F.C. Leal et C.M.G. van den Berg (2002). Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake, and exudation of *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Mar. Chem.*, 77, 187-210.
- Versteeg D.J. (1990). Comparison of short and long-term toxicity test results for the green alga, *Selenastrum capricornutum*. Ds Plants for Toxicity Assessment. ASTM STP 1091. Wang W., J.W. Gorsuch et W.R. Lower (éds.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia. p. 40-48.
- Vig K., M. Megharaj, N. Sethunathan et R. Naidu (2003). Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil : a review. *Adv. Environ. Res.*, 8, 121-135.
- Vigneault B. et P.G.C. Campbell (2004). Uptake of cadmium by freshwater green algae – Effects oh pH and aquatic humic substances. *J. Phycol.*, sous presse.
- von Gutten H.R., M. Sturm et R.N. Moser (1997). 200-year record of metals in lake sediments and natural background concentrations. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 2193-2197.
- Wilson D.J. et E. Chang (2000). Bioturbation and oxidation of sulfide in sediments. *J. Tenn. Acad. Sci.*, 75, 76-85.
- Winner R.W. (1984). The toxicity and biaccumulation of cadmium and copper as affected by humic acid. *Aquat. Toxicol.*, 5: 267-274.
- Wood J.M. (1976). Les métaux toxiques dans l'environnement. *La Recherche*, 70, 711-719.
- Xu Y., M.A.A. Schoonen, D.K. Nordstrom, K.M. Cunningham et J.W. Ball (2000). Sulfur geochemistry of hydrothermal waters in Yellowstone National Park, Wyoming, USA. II. Formation and decomposition of thiosulfate and polythionate in Cinder Pool. *J. Volcan. Geotherm. Res.*, 97, 407-423.
- Xue H.B. et L. Sigg (1998). Cd speciation and complexation by natural organic ligands in freshwater. *Anal Chim. Acta.*, 363, 249-259.
- Yildiz F.H., J.P. Davies et A.R. Grossman (1994). Characterization of sulfate transport in *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur-limited and sulfur-sufficient growth. *Plant Physiol.*, 104, 981-987.