

Université du Québec
INRS-Eau, Terre et Environnement

Influence de paramètres physico-chimiques (dureté, pH et présence d'un agent chélateur, l'EDTA) sur la réponse toxique au cadmium de l'algue verte d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Par
Frédéric Maloney

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

Jury d'évaluation

Examineur externe	Philippe Eullaffroy, Université de Reims Champagne-Ardenne
Président du jury et examinateur interne	Jean-Christian Auclair, INRS-ETE
Directeur de recherche	Peter G.C. Campbell, INRS-ETE
Codirecteurs de recherche	Claude Fortin, INRS-ETE Louis Martel, CEAEQ, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Gouvernement du Québec

La meilleure façon de ne pas avancer est de suivre une idée fixe.

Jacques Prévert

REMERCIEMENTS

La réalisation de ces travaux a bénéficié de l'apport de plusieurs personnes que je tiens à remercier pour leur aide et collaboration.

D'abord, pour la confiance et l'encadrement dont il a fait preuve, je tiens à remercier mon directeur de recherche, M. Peter Campbell. Pour les mêmes considérations, je remercie également mes codirecteurs de recherche, MM. Claude Fortin et Louis Martel. La collaboration notoire des membres du Centre d'expertise en analyse expérimentale du Québec (CEAEQ) est également à souligner, principalement de MM. Christian Bastien et Richard Cardin. De plus, pour leur aide en laboratoire et leurs judicieux conseils, je tiens à remercier MM. Amiel Boullemant et Frédéric Boily.

Le soutien technique de l'équipe du laboratoire de l'INRS-ETE fut également grandement apprécié, particulièrement de la part de Michèle Bordeleau, Stéfane Prémont et Lise Rancourt. Toujours à l'INRS-ETE, la disponibilité et la dévotion de Mme Suzanne Dussault envers les étudiants furent très appréciées.

Ces années à l'INRS-ETE ont été agrémentées par la présence de plusieurs collègues étudiants. Parmi ceux-ci, j'ai une pensée spéciale pour Jean-Philippe Chenel, Valérie Ouellet et Steve Turgeon.

Finalement, pour leur présence, merci à Francis, Johanne, Jean-Marc et Gaétane Maloney, Amélie, Ariane et Simon-Olivier Boudreau. Sans oublier la compréhension, l'appui et le sourire de ma compagne, Amélie Beauregard.

RÉSUMÉ

La conscientisation face à la pollution environnementale qui est survenue au cours des années 1970 a permis d'identifier les métaux comme un facteur de risque important face à l'intégrité des écosystèmes. La mise en place de critères et de normes fixes réglementaires ou non, devant servir de référence pour l'établissement des concentrations susceptibles de nuire à cette intégrité, s'est avéré un outil incomplet pour assurer la protection des milieux aquatiques tout en s'avérant surprotecteur dans certaines conditions. Le développement d'approches qui tiennent compte du milieu récepteur comme les études de suivi des effets sur l'environnement (ESEE) et l'établissement d'objectifs environnementaux de rejet (OER), devient maintenant une étape incontournable dans la protection adéquate de l'environnement et de son intégration auprès des entreprises et institutions. Les tests de toxicité fait avec des algues font partie intégrante de ces approches. Dans certaines conditions (pH, dureté, matière organique dissoute (MOD), présence d'un agent chélateur, suppléments en apports nutritifs, etc.), qui peuvent être présentes dans les effluents miniers ou les effluents de papetières par exemple, ces tests peuvent mener à des résultats de type « faux positif » ou « faux négatif » qui cachent le risque environnemental réel lié à la présence d'un contaminant métallique aquatique pour le milieu récepteur. Afin de vérifier l'effet de la présence de certains de ces facteurs, nous avons effectué des expériences de toxicité au cadmium de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* selon le protocole afférent en vigueur au Québec (CEAEQ 2003). Nous avons étudié l'effet sur la réponse toxique au cadmium de la présence d'un agent chélateur (l'EDTA), de l'utilisation d'un tampon (HEPES ou MOPS), et de l'augmentation de la dureté (de 9 à 600 mg CaCO₃L⁻¹). Nous nous sommes particulièrement attardés aux effets de la perturbation des concentrations en certains micro-éléments (Cu, Fe et Zn) en présence d'une dureté élevée.

Nos travaux nous ont permis d'établir que l'utilisation d'EDTA, dans le cadre de tests de toxicité effectués sur des effluents de nature inconnue, n'était pas appropriée à cause de sa capacité de liaison des métaux en solution. Par contre, l'utilisation d'un tampon pH dans de telles conditions devrait être considérée de façon à réduire l'augmentation du pH induite par la croissance algale dans les milieux d'exposition. La toxicité apparente du cadmium pour *P. subcapitata* a été plus faible en présence d'une dureté élevée. Par contre, cette diminution apparente de la toxicité ne serait pas attribuable à la concentration en magnésium ou en calcium du milieu. En effet, cette diminution apparente de la toxicité du cadmium serait plutôt attribuable à l'augmentation des concentrations ioniques libres en Fe³⁺ et Zn²⁺, cette augmentation étant provoquée par l'augmentation de la concentration en calcium dans le milieu, en présence d'EDTA.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	v
RÉSUMÉ	vii
TABLE DES MATIÈRES	ix
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xv
Liste des abréviations	xix
1. Introduction	1
1.1 Les métaux	1
1.1.1 Importance économique des métaux	1
1.1.2 Production canadienne de cadmium	4
1.1.3 Disponibilité et présence du cadmium dans l'environnement	7
1.1.3.1 Écosystèmes terrestres	7
1.1.3.2 Écosystèmes aquatiques	10
1.1.4 Rejets et apports de cadmium dans l'environnement	11
1.2 Écotoxicologie des métaux	12
1.2.1 Généralités	12
1.2.2 Spéciation des métaux	14
1.2.3 Modèle de l'ion libre (MIL) / Modèle du ligand biotique (BLM)	15
1.3 Cas du cadmium	19
1.3.1 Généralités	19
1.3.2 Toxicité du cadmium envers les algues	21
1.3.3 Facteurs pouvant influencer sur la toxicité du cadmium	23
1.3.3.1 pH	23
1.3.3.2 Dureté	26
1.3.3.3 Présence d'un agent chélateur	28
1.4 Considérations pratiques	29
1.5 Méthodes de détermination de la toxicité avec <i>P. subcapitata</i>	31
1.5.1 Protocole du CEAEQ	32
1.6 Hypothèses et objectifs	33
2. Méthodes expérimentales	37
2.1 Organisme cible	37
2.1.1 Présentation	37
2.1.2 Méthode de culture	39
2.2 Calculs théoriques de la spéciation du cadmium	40
2.3 Milieux de culture et de rinçage	41
2.3.1 Milieu de culture	42
2.3.2 Milieu de rinçage	43
2.4 Équipements, produits, réactifs et eau-ultra pure	45
2.5 Méthodologie expérimentale	46
2.5.1 Expériences de toxicité	46
2.5.2 Mesures de prise en charge	49
2.5.3 Expériences de toxicité à pH ajusté sans tampon	51
2.5.4 Expériences de toxicité avec modification de la dureté	51

2.5.5	Considérations pour les expériences de toxicité avec modification des concentrations en micro-éléments.....	53
2.5.6	Dosage du cadmium (^{109}Cd).....	54
2.5.6.1	Efficacité du compteur gamma	54
2.5.6.2	Calculs de concentrations et quotas en cadmium.....	54
2.6	Technique d'échange ionique (TEI).....	55
2.6.1	Théorie	56
2.6.2	Équipement, produits et réactifs.....	57
2.6.3	Méthodologie expérimentale.....	58
2.7	Traitement des données.....	60
2.7.1	Calcul du rendement relatif.....	60
2.7.2	Calcul des CI_{50}	60
2.7.3	Intégration des valeurs de CI_{50}	61
2.7.4	Erreurs associées aux valeurs calculées de CI_{50}	62
2.7.5	Comparaison des valeurs de CI_{50}	62
3.	Résultats	63
3.1	Toxicité du cadmium dans le milieu de référence.....	63
3.2	Effet de la présence d'EDTA sur la réponse toxique.....	63
3.3	Effet de la présence d'un tampon sur la réponse toxique.....	66
3.3.1	Maintient du pH manuellement.....	68
3.3.2	Effet de la présence du tampon HEPES sur la réponse toxique.....	71
3.3.3	Effet de la présence du tampon MOPS sur la réponse toxique	72
3.4	Effet de la dureté sur la réponse toxique	77
3.4.1	Concentration en magnésium.....	77
3.4.2	Concentration en calcium.....	80
3.4.2.1	Variation des concentrations en micro-éléments	80
3.4.2.2	Avec ajustement des concentrations en cuivre, fer et zinc libres.....	81
3.4.2.3	Sans ajustement des concentrations en cuivre, fer et zinc libres.....	85
3.4.2.4	Sans ajustement de la concentration en cuivre libre	86
3.4.2.5	Sans ajustement de la concentration en zinc libre.....	87
3.4.2.6	Sans ajustement de la concentration en fer libre.....	88
3.5	Vérification des concentrations en cadmium	90
3.5.1	Technique d'échange ionique (TEI) ; concentrations en Cd^{2+}	90
3.5.2	Devenir du cadmium en solution	91
4.	Discussion	93
4.1	Difficultés rencontrées pendant nos travaux	93
4.1.1	Croissance et survie de l'organisme cible.....	93
4.1.2	Concentrations en oligo-éléments dans les milieux d'exposition	94
4.2	Interprétation des tests de toxicité ; présence d'un chélate	95
4.2.1	Présence d'EDTA.....	95
4.3	Interprétation des tests de toxicité ; pH et tampons	97
4.3.1	pH ajusté manuellement.....	98
4.3.2	Tampon de pH.....	99
4.4	Interprétation des tests de toxicité ; effet de la dureté.....	100
4.4.1	Concentration en Mg^{2+}	100

4.4.2	Concentration en Ca^{2+}	100
4.4.3	Ajustement des concentrations en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+}	101
4.5	Perspectives pour le CEAEQ	103
5.	Conclusion	105
6.	Bibliographie.....	109

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1	Statistiques sur l'industrie minière canadienne (Association minière du Canada 2006)	2
Tableau 1-2	Concentration en cadmium de la croûte terrestre (source : CNRC 1979).	8
Tableau 1-3	Concentration en cadmium de divers minéraux (source : CNRC 1979). ...	9
Tableau 1-4	Classification des éléments métalliques en fonction d'un contexte environnemental (tiré de Campbell et Couillard 2004).	13
Tableau 1-5	Recommandations canadiennes et critères de qualité au Québec applicables au cadmium en milieu aquatique (pour une dureté appliquée de 50 mg·L ⁻¹ CaCO ₃ lorsque la recommandation ou le critère varie en fonction de la dureté) (sources : CCME 2002 et MENV 2001).	19
Tableau 1-6	Résumé des données toxicologiques (nM Cd) pour le cadmium (organismes aquatiques). Données tirées de EU (2003).	20
Tableau 1-7	Résumé des expériences de toxicité du cadmium envers les algues, tirées de la littérature.	22
Tableau 1-8	Résumé des conditions d'essai du protocole du CEAEQ (2003).	32
Tableau 2-1	Description de la taxonomie de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (Miller et al. 1978).	38
Tableau 2-2	Constantes de formation modifiées pour les calculs de spéciation.	41
Tableau 2-3	Concentrations des éléments dans les solutions concentrées utilisées pour préparer les milieux de culture, de rinçage et d'exposition (CEAEQ 2003).	42
Tableau 2-4 :	Concentrations des éléments dans les milieux de culture, d'exposition et de rinçage utilisés (CEAEQ 2003).	44
Tableau 2-5	Principales expériences de toxicité et caractéristiques des milieux d'exposition utilisés.	47
Tableau 2-6	Concentration totales et ioniques libres en calcium et magnésium dans les milieux d'exposition des expériences de toxicité avec modification	

	de la dureté (simulations faites avec MINEQL; exemples donnés pour des solutions sans ajout de cadmium).	52
Tableau 3-1	Résultats des expériences de toxicité au cadmium effectuées dans le milieu d'exposition du CEAEQ (2003) avec (expérience 2) et sans EDTA (expérience 1). Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL.	64
Tableau 3-2	Résultats des expériences de toxicité au cadmium effectuées dans le milieu d'exposition du CEAEQ (2003) en présence d'EDTA avec (expérience 3A) et sans ajustement de pH (expérience 2). Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL.	69
Tableau 3-3	Résultats des expériences de toxicité au Cd effectuées dans le milieu d'exposition du CEAEQ (2003) avec EDTA, avec et sans ajustement de pH ou en présence des tampons HEPES (10 mM) ou MOPS (10 mM). Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL.	75
Tableau 3-4	CI_{50} obtenues lors de la variation de la concentration en Mg^{2+} libre des milieux d'exposition au cadmium de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . ..	78
Tableau 3-5	Effet de l'ajout de calcium et de cadmium sur les concentrations en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} dans les milieux de culture et d'exposition.....	81
Tableau 3-6	CI_{50} obtenues lors de la variation de la concentration en Ca^{2+} libre (expériences 5A à 5E) des milieux d'exposition au cadmium de <i>P. subcapitata</i>	83
Tableau 3-7	CI_{50} obtenues lors de la variation des concentrations en oligo-éléments (cuivre, fer, zinc) libres dans les milieux d'exposition, expériences 7A,7B et 7C.....	90

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1	Communautés dépendantes, à au moins cinquante pourcent, des mines au Canada en 1996 (modifié de Ressources naturelles Canada 2003a).....	3
Figure 1-2	Production annuelle canadienne de cadmium de 1928 à 2004 (sources : U.S. Geological Survey, Bureau of Mines 1958-1980 ; Ressources naturelles Canada 1945b-2005b ; Deir 1957).....	5
Figure 1-3	Répartition de la production mondiale du cadmium en 2003 (ICA 2005).....	6
Figure 1-4	Production québécoise annuelle de cadmium de 1960 à 2004 (sources : Ressources naturelles Canada 1962b-2005b ; Vallières 1988).....	7
Figure 1-5	Schématisation de la surface cellulaire et de ses sites de liaison membranaire (tirée de Campbell et Couillard 2004).....	18
Figure 1-6	Évolution des critères applicables pour le cadmium en fonction de la dureté de l'eau.....	27
Figure 2-1 :	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ; grossissement 100 X.....	38
Figure 2-2 :	Courbe de croissance de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> dans le milieu CEAEQ (2003). Les points représentent les valeurs moyennes de trois mesures de densité cellulaire avec les écart-types qui y sont rattachés.	39
Figure 2-3	Schéma expérimental général des expériences de toxicité.....	51
Figure 2-4	Schéma simplifié du montage expérimental utilisé pour la TÉI.....	59
Figure 3-1	Rendement relatif de <i>P. subcapitata</i> en fonction de la concentration en cadmium total (nM) dans les milieux d'exposition (■) sans EDTA et (●) avec EDTA. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI ₅₀ et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI ₅₀ sur les droites respectives.....	65
Figure 3-2	Rendement relatif de <i>P. subcapitata</i> en fonction de la concentration en Cd ²⁺ (nM) dans les milieux d'exposition (■) sans EDTA et (●) avec EDTA. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI ₅₀ et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI ₅₀ sur les droites respectives. Les concentrations en Cd ²⁺ ont été calculées avec le logiciel MINEQL.....	65

Figure 3-3	Rendement relatif de <i>P. subcapitata</i> en fonction des quotas intracellulaires de cadmium (amol Cd·cellule ⁻¹) dans les milieux d'exposition (■) sans EDTA et (●) avec EDTA. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI ₅₀ et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI ₅₀ sur les droites respectives.....	66
Figure 3-4	Évolution des pH moyens des milieux d'exposition en fonction du temps. Exemple pour une exposition en cadmium total de 0,0 nM (◆), 735 nM (Δ), 772 nM (■), 839 nM (◇), 872 nM (●) et 958 nM (+) dans un milieu avec EDTA (expérience 2).....	67
Figure 3-5	Évolution de la concentration en Cd ²⁺ (nM) en fonction du pH dans les milieux d'exposition (■) sans EDTA et (▲) avec EDTA. Exemple à partir d'une concentration de 139 nM Cd ²⁺ à pH 7,0. Les concentrations en Cd ²⁺ ont été calculées avec le logiciel MINEQL.....	68
Figure 3-6	Rendement relatif de <i>P. subcapitata</i> en fonction de la concentration en cadmium total (nM) dans les milieux d'exposition (■) avec EDTA avec ajustements de pH et (●) avec EDTA sans ajustement de pH. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI ₅₀ et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI ₅₀ sur les droites respectives.	70
Figure 3-7	Rendement relatif de <i>P. subcapitata</i> en fonction de la concentration en Cd ²⁺ (nM) dans les milieux d'exposition (■) avec EDTA avec ajustements de pH et (●) avec EDTA sans ajustement de pH. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI ₅₀ et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI ₅₀ sur les droites respectives. Les concentrations en Cd ²⁺ ont été calculées avec le logiciel MINEQL.	70
Figure 3-8	Rendement relatif de <i>P. subcapitata</i> en fonction des quotas intracellulaires (amol Cd·cellule ⁻¹), (■) avec EDTA avec ajustements de pH et (●) avec EDTA sans ajustement de pH. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI ₅₀ et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI ₅₀ sur les droites respectives.....	71
Figure 3-9	Rendement relatif de <i>P. subcapitata</i> en fonction de la concentration en cadmium total (nM) dans les milieux d'exposition (■) avec ajustements de pH, (●) sans ajustement de pH, (X) avec 10 mM de HEPES et (Δ) avec 10 mM de MOPS. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI ₅₀	75
Figure 3-10	Rendement relatif de <i>P. subcapitata</i> en fonction de la concentration en Cd ²⁺ (nM) dans les milieux d'exposition (■) avec ajustements de pH, (●) sans ajustement de pH, (X) avec 10 mM de HEPES et (Δ) avec 10	

	mM de MOPS. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} . Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL.	76
Figure 3-11	Rendement relatif de <i>P. subcapitata</i> en fonction des quotas intracellulaires ($amol\ Cd \cdot cellule^{-1}$), (■) avec ajustements de pH, (●) sans ajustement de pH, (X) avec 10 mM de HEPES et (Δ) avec 10 mM de MOPS. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50}	76
Figure 3-12	Rendement relatif de <i>P. subcapitata</i> en fonction de la concentration en cadmium total (nM) dans les milieux d'exposition (■) $74,6\ \mu M\ Mg^{2+}$ (CEAEQ 2003), (●) $41,1\ \mu M\ Mg^{2+}$, (X) $289\ \mu M\ Mg^{2+}$. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI_{50} sur les droites respectives. Tous les milieux contenaient de l'EDTA (1 μM) et du MOPS (10 mM).....	79
Figure 3-13	Rendement relatif de <i>P. subcapitata</i> en fonction de la concentration en Cd^{2+} (nM) dans les milieux d'exposition (■) $74,6\ \mu M\ Mg^{2+}$ (CEAEQ 2003), (●) $41,1\ \mu M\ Mg^{2+}$, (X) $289\ \mu M\ Mg^{2+}$. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI_{50} sur les droites respectives. Tous les milieux contenaient de l'EDTA (1 μM) et du MOPS (10 mM). Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL.	79
Figure 3-14	Rendement relatif de <i>P. subcapitata</i> en fonction des quotas intracellulaires ($amol\ Cd \cdot cellule^{-1}$), (■) $74,6\ \mu M\ Mg^{2+}$ (CEAEQ 2003), (●) $41,1\ \mu M\ Mg^{2+}$, (X) $289\ \mu M\ Mg^{2+}$. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI_{50} sur les droites respectives. Tous les milieux contenaient de l'EDTA (1 μM) et du MOPS (10 mM).	80
Figure 3-15	CI_{50} (et $IC_{95\%}$) exprimées en concentration en cadmium total dans les milieux d'exposition pour <i>P. subcapitata</i> à une concentration en Ca^{2+} de (■) $1,87 \times 10^{-5}\ M$, (●) $1,25 \times 10^{-4}\ M$, (X) $4,25 \times 10^{-4}\ M$, (Δ) $1,42 \times 10^{-3}\ M$, (▲) $2,92 \times 10^{-3}\ M$ et (◆) $5,92 \times 10^{-3}\ M$. Les concentrations en Ca^{2+} ont été calculées à partir de MINEQL.....	84
Figure 3-16	CI_{50} (et $IC_{95\%}$) exprimées en concentration en Cd^{2+} dans les milieux d'exposition pour <i>P. subcapitata</i> à une concentration en Ca^{2+} de (■) $1,87 \times 10^{-5}\ M$, (●) $1,25 \times 10^{-4}\ M$, (X) $4,25 \times 10^{-4}\ M$, (Δ) $1,42 \times 10^{-3}\ M$, (▲) $2,92 \times 10^{-3}\ M$ et (◆) $5,92 \times 10^{-3}\ M$. Les concentrations en Ca^{2+} et Cd^{2+} ont été calculées à l'aide de MINEQL.	84

Figure 3-17 CI_{50} (et $IC_{95\%}$) exprimées en quotas intracellulaires de cadmium pour *P. subcapitata* à une concentration en Ca^{2+} de (■) $1,87 \times 10^{-5}$ M, (●) $1,25 \times 10^{-4}$ M, (⊗) $4,25 \times 10^{-4}$ M, (Δ) $1,42 \times 10^{-3}$ M, (▲) $2,92 \times 10^{-3}$ M et (◆) $5,92 \times 10^{-3}$ M. Les concentrations en Ca^{2+} ont été calculées à l'aide de MINEQL. 85

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAPBT	Algal Assay Procedure Bottle Test (US EPA 1971)
BLM	Modèle du ligand biotique
CCME	Conseil canadien des ministres de l'environnement
CI ₃₀	Concentration inhibant 30% du paramètre testé
CI ₅₀	Concentration inhibant 50% du paramètre testé
CEAEQ	Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs)
CSEM	Concentration maximale sans effet mesurable
COREM	Consortium de recherche minérale
CMEQ	Concentration minimale avec un effet observable
CPM	Comptes par minute
CSEO	Concentration sans effet observable
DIPSO	acide 3-(N-N-bis(2-hydroxyéthyl)-amino)-2-hydroxypropanesulfonique
DPM	Désintégrations par minutes
EDTA	Acide éthylènediamine-tétraacétique
ÉTM	Éléments traces métalliques
HDPE	Polyéthylène à haute densité (High-density polyethylene)
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine-éthanesulfonique
HEPPSO	N-(2-hydroxyéthyl)piperazine-N'-(acide 2-hydroxypropanesulfonique)
I	Force ionique
IC ₉₅	Intervalle de confiance comprenant 95% de la population
ICA	<i>International Cadmium Association</i>
K	Constante d'équilibre chimique
L	Ligand
MDDEP	Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs, Gouvernement du Québec
MIL	Modèle de l'ion libre
ML	Métal complexé
MLB	Modèle du ligand biotique
MOPS	Acide 3-N-morpholino-propanesulfonique
M ^{z+}	Ion métallique libre
NTA	Acide nitrilotriacétique
OCDE	Organisation de coopération et de développement économique
PIPES	1,4-piperazinebis (acide éthanesulfonique)
POPSO	piperazine-N-N'-bis(acide 2-hydroxypropanesulfonique)
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
UTCC	<i>University of Toronto Culture Collection</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
μ	Taux de croissance

1. Introduction

Depuis les années 1960, un effort considérable est fourni afin de comprendre, d'identifier et de réduire la contamination de l'environnement imputable aux activités humaines. Les substances toxiques présentes dans l'environnement sont généralement séparées en deux classes : les composés organiques et les composés inorganiques. La contamination organique fait référence à des substances xénobiotiques ou synthétiques. Dans le cas des substances inorganiques, particulièrement en milieu aquatique, le terme contamination fait généralement référence aux métaux. Les deux types de contaminants sont donc distincts et comme nos travaux se sont concentrés sur un métal, le cadmium, ce sont particulièrement les métaux qui nous intéressent dans le cas présent.

1.1 Les métaux

Les métaux sont depuis bon nombre d'années des matériaux recherchés. L'ère industrielle a provoqué une demande croissante en ces matériaux. Ils ont des caractéristiques variées, ce qui fait qu'ils sont appréciés dans plusieurs domaines et pour plusieurs utilisations. Leur versatilité en fait des composés d'une utilisation très répandue et d'une importance économique de premier plan dans beaucoup de pays, dont le Canada.

1.1.1 Importance économique des métaux

Au Canada les métaux, et plus globalement l'industrie minière, ont une grande importance au point de vue économique. En 2004, la valeur de la production des industries canadiennes de l'exploitation minière et de la métallurgie était de soixante milliards de dollars dont 22 % (i.e. 13,2 G\$) liés à la production des mines de métaux (Ressources Naturelles Canada 2005a). Le tableau 1-1 présente certaines caractéristiques de l'industrie minière canadienne au cours des dernières années.

Tableau 1-1 Statistiques sur l'industrie minière canadienne (Association minière du Canada 2006)

Caractéristiques	Valeur
Nombre d'emploi	388 000
Contribution au produit intérieur brut (PIB) annuel en 2005	42 G\$
Pourcentage du produit intérieur brut (PIB) annuel en 2005	4,0 %
Valeur de la production minérale	26,4 M\$
Pourcentage des exportations totales	14 %
Exportations de minéraux et de leurs produits	64,3 M\$
Importations de minéraux et de leurs produits	56,7 M\$
Bilan commercial de l'industrie minérale	7,6 M\$
Production minérale de métaux du Canada en 2004	12,4 G\$
Total de la production minière du Canada en 2005	24,3 G\$
Nombre de fournisseurs de services au secteur minier	2 360
Pourcentage du trafic portuaire canadien	70 %
Pourcentage du fret commercial des chemins de fer canadien	60 %
Montant versé par les industries des mines et des matériaux en impôt des sociétés en 2004	1,57 G\$
Rémunération hebdomadaire moyenne dans l'industrie minière en 2005	1 099 \$
Investissements des sociétés minières canadiennes en recherche et développement	504 M\$
- extraction minière	54 M\$
- métaux de première fusion	274 M\$
- transformation	176 M\$
Nombre de mines au Canada en 2006	190
Dépenses d'exploration et d'évaluation des gisements au Canada en 2005	1,4 G\$
Dépenses d'exploration et d'évaluation des gisements au Québec en 2006	226,6 M\$
Nombre d'ouverture et de réouverture de mines au Canada en 2005	10
Nombre de fermeture de mines au Canada en 2005	4
Mines productives au Canada en 2005	134
Mines productives au Québec en 2005	20

D'après Ressources naturelles Canada (2003a), 115 communautés canadiennes dépendaient à 50 % ou plus d'industries minières ou du traitement des minéraux en 1996 (figure 1-1). De celles-ci, 41 étaient situées au Québec.

La production minérale canadienne compte l'exploitation de plusieurs métaux. Le plus important est le fer avec une production annuelle en 2005 de 28 300 kilotonnes (Statistique Canada 2005). Par la suite, on compte le zinc (623 000 tonnes), le cuivre (571 000 tonnes), le nickel (175 000 tonnes) et le plomb (72 800 tonnes). Le cadmium se situe au 12^e rang avec une production annuelle de 588 tonnes (Statistique Canada 2005). La section suivante décrit plus en détail la production canadienne de cadmium.

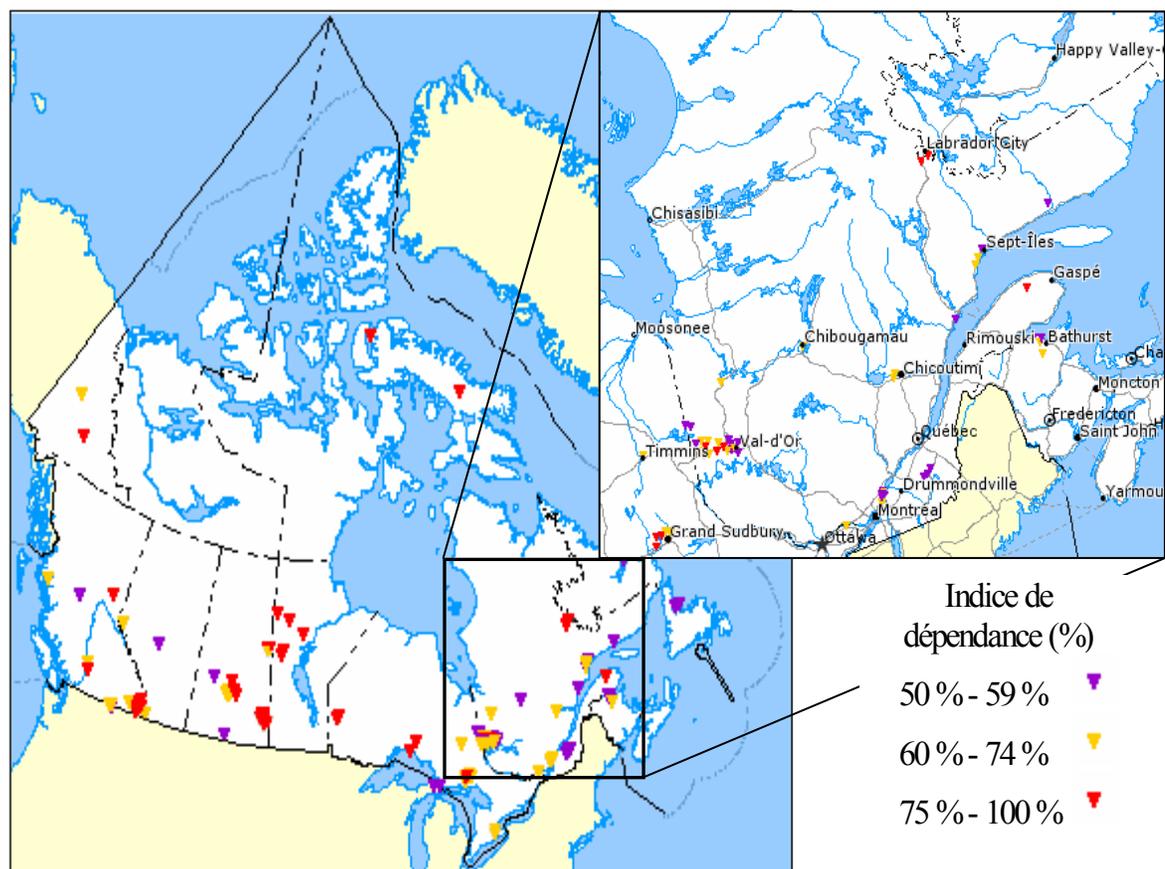


Figure 1-1 Communautés dépendantes, à au moins cinquante pourcent, des mines au Canada en 1996 (modifié de Ressources naturelles Canada 2003a).

1.1.2 Production canadienne de cadmium

L'exploitation des ressources minérales mène inévitablement à une augmentation des flux biogéochimiques des métaux. Le cadmium se trouve parmi les métaux les plus problématiques à cet égard (Pacyna et al. 1995). Les premières données retrouvées sur la production canadienne de cadmium réfèrent à 1928 (Deir 1957, U.S. Geological Survey 1937), avec une production annuelle de 246 tonnes. Selon Deir (1957), la première production de cadmium métallique au Canada serait attribuable à la *Hudson Bay Mining & Smelting Company* en 1936, dans la municipalité de Flin Flon, Manitoba. Ces installations sont d'ailleurs toujours en fonction à ce jour. Par contre, c'est à la *Consolidated Mining & Smelting Co. of Canada Ltd* à Trail, Colombie-Britannique, qu'est attribuée l'entièreté de la production canadienne de cadmium avant 1936 (U.S. Geological Survey 1937). Cette exploitation est également toujours en opération à ce jour.

La production canadienne de cadmium a fluctué au cours des années (figure 1-2). La tendance de la production canadienne ressemble à celle de la production mondiale de cadmium, bien qu'elle soit plus instable. Elle augmente jusqu'à la fin des années 1980, avec une légère baisse au milieu des années 1940. Du début des années 1990 à ce jour, la production canadienne semble connaître un léger ralentissement.

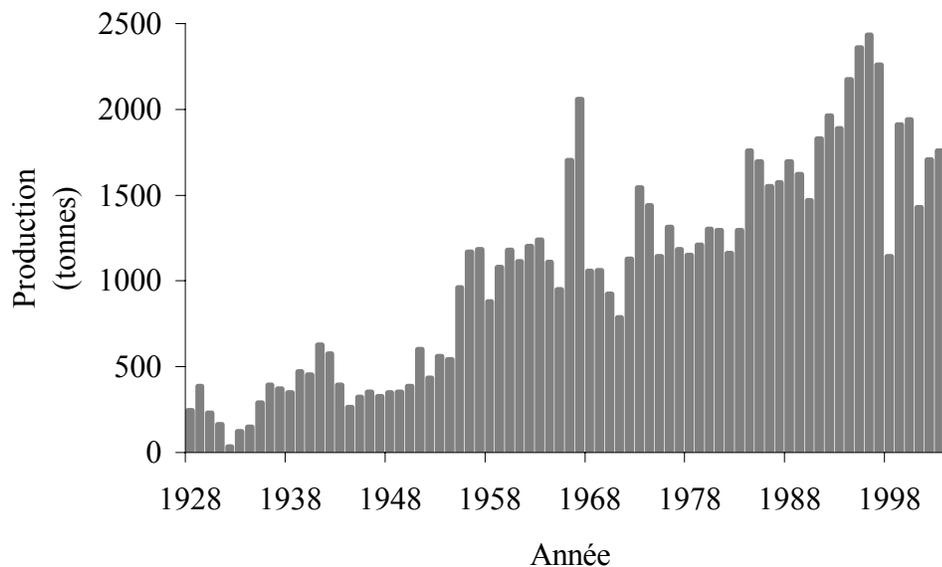


Figure 1-2 Production annuelle canadienne de cadmium de 1928 à 2004 (sources : U.S. Geological Survey, Bureau of Mines 1958-1980 ; Ressources naturelles Canada 1945b-2005b ; Deir 1957).

Le Canada est un important producteur de cadmium (figure 1-3). Ceci est en partie imputable au fait qu'il détient environ 100 000 des 1 800 000 tonnes des réserves mondiales estimées en cadmium (U.S. Geological Survey 2005), soit environ 6 %. En 2003, sa production comptait pour 10 % de la production mondiale (ICA 2005), soit 1880 tonnes de cadmium affiné (Ressources naturelles Canada 2004b). Ceci le plaçait au quatrième rang à l'échelle mondiale dans ce domaine. Cependant, au cours de cette même année, environ 90 % de la production canadienne de cadmium a été destinée à l'exportation, majoritairement à destination des États-Unis et du Japon. À l'image de l'utilisation faite de diverses de ses ressources, la Canada est principalement un producteur au niveau primaire du cadmium.

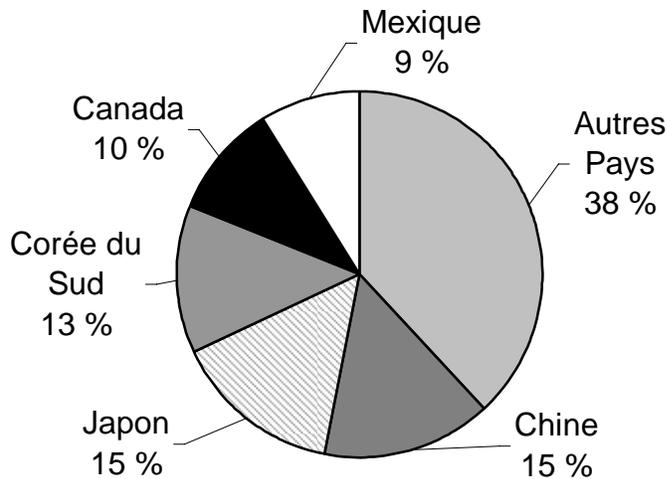


Figure 1-3 Répartition de la production mondiale du cadmium en 2003 (ICA 2005).

Le plafonnement de la production mondiale du cadmium est au moins en partie imputable aux efforts de recyclage qui sont déployés dans les pays développés. Plusieurs efforts ont été faits pour minimiser les apports de cadmium dans l'environnement et le recyclage des produits contenant du cadmium est de plus en plus commun. En 1995, la première usine de recyclage de piles au cadmium voyait le jour en Amérique du Nord, avec une capacité de traitement de 3 000 tonnes par année. De 10 à 15 % du métal produit dans les pays occidentaux provient de matières recyclées (Ressources naturelles Canada 2004b), principalement des accumulateurs.

L'exploitation de cadmium au Québec s'est initiée plus tard que dans le reste du Canada. Les premières données retrouvées font référence à 1960 comme étant la première année d'activité du Québec dans ce domaine (Ressources naturelles Canada 1964b ; figure 1-4). La production québécoise de cadmium représentait approximativement 16 % de la production canadienne en 2004.

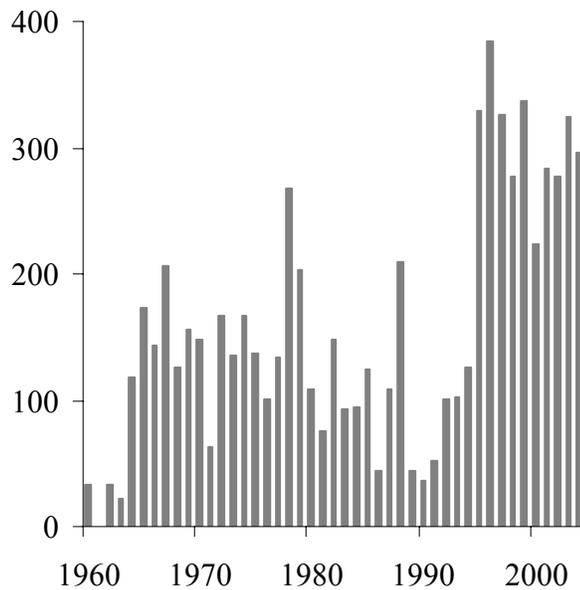


Figure 1-4 Production québécoise annuelle de cadmium de 1960 à 2004 (sources : Ressources naturelles Canada 1962b-2005b ; Vallières 1988).

L'importance économique de l'industrie minière au Québec et au Canada est associée à un risque environnemental significatif. Le cadmium, et dans une vision plus globale les métaux, représentent des substances pour lesquelles les effets sur l'environnement ont fait l'objet de plusieurs études, tel que présenté dans les sections suivantes.

1.1.3 Disponibilité et présence du cadmium dans l'environnement

1.1.3.1 Écosystèmes terrestres

Dans la croûte terrestre, la concentration de cadmium est généralement relativement faible. Ce métal ne représente qu'approximativement 10^{-5} % de la croûte terrestre (Armand et al. 1970), soit entre 0,1 et 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (ICA 2005) avec une moyenne de 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (WHO 2000). Le tableau 1-2 présente les concentrations en cadmium selon les types de roches considérées. Les plus fortes concentrations sont présentes dans les sédiments récents des fleuves et cours d'eau (0,60 à 74 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Tableau 1-2 Concentration en cadmium de la croûte terrestre (source : CNRC 1979).

Type de roche	Intervalle de concentration en cadmium (mg·kg ⁻¹)
ROCHES IGNÉES	
Roches ultrabasiques	aucune donnée
Roches basiques	
Intrusives	< 0,005 à 0,43
Extrusives	0,04 à 7,00
Roches intermédiaires	
Intrusives	0,10 à 1,00
Extrusives	aucune donnée
Roches acides	
Intrusives	<0,02 à 1,50
Extrusives	<0,02 à 0,48
Feldspathoïdes	<0,4 à 0,16
ROCHES SÉDIMENTAIRES	
Sédiments récents	
Fleuve /cours d'eau	0,60 à 74
Lac	aucune donnée
Océan	0,02 à 0,97
Grès, arkose, conglomérat, etc.	<1 à 1,00
Schiste et argillite	
Schiste, mudstone et argillite	<1 à 1,00
Argile schisteuse carbonifère, schiste bitumineux, etc.	<1 à 3,00
Calcaire, dolomite, etc.	<1
Sédiments d'évaporation	
Gypse, anhydre, halite, sylvite	<1
Roche phosphatée	<7.2
ROCHES MÉTAMORPHIQUES	
Quartzite, etc.	<1 à 1,00
Amphibolite	<1
Cornéenne et skam	<1 à 5
Schiste	<1 à 3
Gneiss	0,12 à 1,00
Marbre, cristaux de dolomie, etc.	<1

La greenockite est parfois considéré comme le seul véritable minerai de cadmium. Il s'agit en fait du sulfure de cadmium (CdS). Normalement le cadmium est plutôt présent sous forme de composé avec le zinc, la blende. Le cadmium a tendance à pénétrer le réseau cristallin de ce composé lors de sa formation. Le tableau 1-3 présente les concentrations en

cadmium de certains minéraux. Il est possible d'y observer que le cadmium ne se retrouve pas à l'état pur en milieu naturel. Le cadmium est généralement naturellement présent en association avec des minerais de sulfures de zinc, mais aussi de plomb ou de cuivre. Pour sa production, le cadmium est généralement un sous-produit de l'extraction et de l'affinage de ces trois métaux, principalement du zinc. Il est estimé que pour chaque tonne de zinc, un peu moins de trois kilogrammes de cadmium sont extraits (Ressources naturelles Canada 1986b).

Tableau 1-3 Concentration en cadmium de divers minéraux (source : CNRC 1979).

Minéraux	Composition chimique	Concentration en Cd (ppm, si non spécifié)
Sphalérite	(Zn, Cd)S	0,0001 à 2%
Greenockite	CdS	77,8 %
Hawleyrite	CdS	77,8 %
Chalcopyrite	CuFeS ₂	< 0,4 à 110
Marcassite	FeS ₂	< 0,3 à <50
Arsenopyrite	FeAsS	<5
Sulfure de plomb	PbS	<0,1 à 3000
Pyrite	FeS ₂	<0,006 à 42
Pyrrhotine	Fe _(1-x) S	Traces
Tetraédrite	(Cu,Fe,Zn,Ag) ₁₂ SbAs ₄ S ₁₃	80 à 2000
Magnétite	Fe ₃ O ₄	0 à 0,31
Oxyde de cadmium	CdO	87,5 %
Limonite	Oxydes de fer hydratés	<5 à 1000
Minerai et oxydes de	Oxydes de manganèse	<10 à 1000
Anglésite	PbSO ₄	120 à >1000
Baryte	BaSO ₄	< 0,2
Anhydrite et gypse	CaSO ₄ ; CaSO ₄ .2H ₂ O	< 0,2
Calcaire d'Islande	CaCO ₃	<1 à 23
Smithsonite	ZnCO ₃	0,1 à 2,35%
Otavite	CdCO ₃	65,18 %
Pyromorphite	Pb ₅ Cl(PO ₄) ₃	<1 à 8
Scorodite	FeAsO ₄ .2H ₂ O	<1 à 5,8
Beudantite	PbFe ₃ (AsO ₄)(SO ₄)(OH) ₆	100 à 1000
Apatite	Ca ₅ (F,Cl)(PO ₄) ₃	0,14 à 0,15
Bindheimite	Pb ₂ (Sb ₂ O ₆ (O,OH))	100 à 1000
Silicates	sans objet	0,03 à 5,8

1.1.3.2 Écosystèmes aquatiques

Le cadmium est naturellement présent dans les eaux de surface (ICA 2005). Pour les eaux douces superficielles, des concentrations en cadmium inférieures à 0,04 nM (WHO 1992), de 0,04 à 0,18 nM (OECD 1994 ; Jensen et Bro-Rasmussen 1992), de 0,98 nM (LIDE ET AL. 1996) et de 0,09 à 0,89 nM¹ (Elinder 1985) sont rapportées par l'ICA (2005). Au Canada, des concentrations moyennes en cadmium inférieures à 0,89 nM ont été mesurées à la sortie du lac Ontario près de l'île Wolfe en 1996 et des concentrations de 0,12 nM près de Québec entre 1995 et 2002 (Rondeau 2002).

Au Québec, les concentrations en cadmium, cuivre et zinc dans l'eau de lacs situés dans la région de Rouyn-Noranda (600 km au nord-ouest de Montréal) ont été mesurées à plusieurs reprises au cours des dernières années (Tessier et al. 1993; Couillard et al. 1993; Wang et al. 1999; Giguère et al. 2004; Perceval et al. 2006). Les lacs de cette région sont affectés par des activités minières et pyrométallurgiques depuis 1926. Les concentrations mesurées en cadmium varient de plus de deux ordres de grandeur, selon la localisation des lacs : 0,018 et 2,37 nM Cd (Tessier et al. 1993); 0,8 à 2,8 nM (Couillard et al. 1993); 0,11 à 7,72 nM (Giguère et al. 2004) et 0,03 à 0,93 nM Cd²⁺ (Perceval et al. 2006).

Selon une étude récente de 14 lacs dans cette région (Fortin et al. 2007) ; manuscrit en préparation), les proportions de cadmium total dissous mesurées sous forme de Cd²⁺ sont relativement constantes dans les 14 lacs à l'étude, malgré une grande variabilité de pH (~ 4,5 à 8 unités) et de matière organique dissoute (MOD) (~ 3 à 23 mg C·L⁻¹). Les proportions étaient également similaires dans le cas du zinc, mais dans le cas du cuivre, les proportions totales de cuivre dissous présentes sous forme de Cu²⁺ étaient affectées par le pH et la concentration de MOD.

1.1.4 Rejets et apports de cadmium dans l'environnement

Pour le milieu aquatique, le lessivage et l'érosion des sols et des roches constituent des apports naturels en cadmium. L'activité humaine contribue également à l'apport de cadmium en milieu aquatique. Il peut s'agir d'apports ponctuels (effluents miniers ou d'usine) ou encore diffus (retombées atmosphériques provenant de fonderies ou relargage par acidification des sols suite aux précipitations acides). Par exemple, de par les activités qui y sont, ou y ont été pratiquées, les opérations minières représentent des sources potentielles importantes de contamination par les métaux. L'exploitation minière contribue à l'accélération de l'oxydation des sulfures, ce qui favorise le relargage et la mobilisation des métaux, y compris le cadmium. Les fonderies et les établissements de raffinage sont aussi des industries particulièrement susceptibles de représenter des sources d'apports via les déchets industriels produits et la lixiviation des décharges. L'industrie agricole peut également représenter une source de cadmium via l'épandage des boues et d'engrais phosphatés.

D'autre part, le cadmium peut se retrouver dans l'air via la combustion du charbon et de produits pétroliers, la production d'accumulateurs, la production de métaux non-ferreux ou l'incinération de déchets. Il y possède par contre un temps de résidence relativement court (quelques jours ou semaines; ICA 2005). Le cadmium atmosphérique, suite à sa déposition, peut quant à lui représenter une source d'apport pour les eaux naturelles. La majorité du cadmium qui atteint les eaux de surface, de sources naturelles ou anthropiques, se dépose dans les sédiments.

Les effluents miniers liquides et les milieux aquatiques récepteurs affectés par ces effluents présentent souvent des particularités sur le plan physico-chimique. Outre la présence de métaux (souvent présents à de fortes concentrations), une de ces particularités est le niveau parfois élevé de dureté de ces eaux. En effet, le chaulage des effluents miniers conduit parfois à des duretés particulièrement élevées.

1.2 Écotoxicologie des métaux

1.2.1 Généralités

Les métaux ne se dégradent pas et peuvent représenter une problématique majeure eu égard à leur potentiel de bioaccumulation dans les organismes et la chaîne trophique. Certains d'entre eux ont également un potentiel toxique élevé. Les métaux sont associés à divers dysfonctionnements cellulaires dont des altérations de la structure des protéines et de fonctions de la membrane cellulaire, des inhibitions d'activité enzymatiques et des perturbations de l'activité photosynthétique. Ils peuvent donc s'avérer la source, de façon directe ou indirecte, de conséquences physiologiques susceptibles d'affecter la survie, la croissance et la reproduction d'organismes touchés (Campbell et al. 2006 ; Chapman et Wang 2000 ; Mason et Jenkins 1995).

Depuis plusieurs années, il y a un effort concerté de la part de la communauté internationale afin de comprendre et de réduire les effets des métaux sur l'environnement. Cela a mené au développement de divers systèmes de classification des métaux en fonction de leur toxicité. Une telle classification a d'abord été tentée par Wood (1976) en tenant compte de la toxicité inhérente de chaque métal et de son « accessibilité » environnementale. Cette classification, bien que plutôt subjective, permet d'identifier les éléments du tableau périodique qui sont susceptibles de représenter des problèmes environnementaux. Une version de ce tableau, révisée par Campbell et Couillard (2004), est présentée au tableau 1-4.

Il faut noter que certains métaux sont des oligo-éléments nutritifs et sont donc essentiels aux organismes vivants. C'est le cas du cuivre, du cobalt, du fer, du manganèse, du nickel et du zinc. Leur bioaccumulation est donc naturel et nécessaire pour le métabolisme des organismes. Afin d'obtenir de leur environnement les concentrations internes suffisantes en ces éléments, plusieurs organismes ont développé des mécanismes de contrôle homéostatique. Ces mêmes mécanismes peuvent également servir à la détoxification de métaux non-essentiels, comme le cadmium.

Tableau 1-4 Classification des éléments métalliques en fonction d'un contexte environnemental (tiré de Campbell et Couillard 2004).

A. Éléments inoffensifs		B. Éléments très toxiques et relativement accessibles		C. Éléments toxiques mais insolubles ou très rares	
Ca	calcium	Ag	argent	Ba	baryum
Fe	fer	Al ^{2,4}	aluminium	Ga	gallium
K	potassium	As ^{3,4}	arsenic	Hf	hafnium
Li	lithium	Au	or	In	Indium
Mg	magnésium	Be	béryllium	La	lanthane
Mn ¹	manganèse	Bi	bismuth	Nb	niobium
Na	sodium	Cd ⁴	cadmium	Os	osmium
Rb	rubidium	Co	cobalt	Re	rhénium
Si	silicium	Cr ⁴	chrome	Rh	rhodium
Sr	strontium	Cu ⁴	cuivre	Ru	ruthénium
		Hg ⁴	mercure	Ta	tantale
		Ni ⁴	nickel	Ti	titane
		Pb ⁴	plomb	W	tungstène
		Pd	palladium		
		Pt	platine		
		Sb ³	antimoine		
		Se ³	sélénium		
		Sn ⁴	étain		
		Te ³	tellure		
		Tl	thallium		
		Zn ⁴	zinc		

Notes :

1. Wood (1976) n'a pas classifié le manganèse, puisque selon lui cet élément «couvrait plus d'une catégorie», et il semble avoir «oublié» le chrome.
2. Wood (1976) a caractérisé l'aluminium d' «inoffensif», mais actuellement, à la lumière notamment des recherches réalisées sur les précipitations acides, il faudrait le placer dans la catégorie **B**.
3. L'arsenic, l'antimoine et le tellure sont des métalloïdes et le sélénium est non-métallique.
4. Élément identifié par Environnement Canada comme «Substance d'intérêt prioritaire ». Cr = Cr(VI); Sn = composés organométalliques; Al = sels utilisés dans le traitement des eaux; Cu = rejets des fonderies de Cu; Zn = rejets des fonderies de Zn. Pour de plus amples informations sur l'établissement des listes de substances prioritaires (LSP) dans le cadre de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement, voir Environnement Canada (1997).

1.2.2 Spéciation des métaux

Les métaux sont naturellement présents dans la croûte terrestre, donc dans l'environnement. Ils ne sont ni créés, ni détruits par l'activité humaine. Ils sont sujets à des changements de forme (spéciation) dans l'environnement via des réactions réversibles (oxydation, réduction, sorption, complexation, précipitation, solubilisation, etc.).

La spéciation d'un métal correspond à sa distribution parmi différentes formes physiques et chimiques (Templeton et al. 2000). La spéciation physique d'un métal correspond à sa distribution entre les formes particulaire (> 200 nm), colloïdales (10–200 nm) ou dissoutes (< 10 nm) (Campbell et Couillard 2004). La spéciation chimique d'un métal fait référence soit à son état d'oxydation (ex. : Fe(II) et Fe(III); Cu(I) et Cu(II)), soit à sa distribution parmi divers complexes de coordination impliquant le métal et un ligand. Les ligands peuvent être organiques, soit des molécules monomères simples (par exemple des acides aminés ou des acides polycarboxyliques), soit des polymères complexes (par exemple des acides humiques ou fulviques). Les ligands peuvent aussi être inorganiques, comme par exemple les chlorures, les carbonates, les hydroxydes ou les sulfates. La forme la plus simple des espèces chimiques représente le métal sous forme ionique libre¹ (par exemple le Cd^{2+}). Il importe de mentionner que normalement toutes ces espèces sont en équilibre, les unes avec les autres. Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la spéciation des métaux, dont la nature du métal, la concentration de ligands inorganiques et organiques (y compris la MOD), le pH et la dureté.

Les équilibres de complexation ont été étudiés en laboratoire ($\text{M} + n\text{L} = \text{ML}_n$, où les charges sur le métal et le ligand ont été enlevées pour simplifier) pour plusieurs métaux et plusieurs ligands. Ces études avaient pour but de déterminer les constantes de complexation ($K_{\text{ML}_n} = [\text{ML}_n] / [\text{M}][\text{L}]^n$). À partir de ces constantes d'équilibre chimique, on a pu développer des modèles de spéciation, qui permettent de calculer la distribution d'un métal parmi ses différentes espèces en solution. Par contre, ces modèles ne sont utiles que pour des milieux pour lesquels toute la composition est connue et définie (par

¹ En réalité un métal présent sous la forme ionique libre est plutôt associé à des molécules d'eau (sphère d'hydratation) i.e. $\text{M}^{z+}(\text{H}_2\text{O})_n$, avec n généralement égal à 4 ou 6. Par convention et pour faciliter la compréhension, la sphère d'hydratation ne sera pas indiquée.

exemple : pH; concentrations totales des cations majeurs dissous (Ca, Mg, Na, K) et des anions majeurs dissous (Cl, HCO₃, CO₃, SO₄); concentrations de tous les métaux traces dissous; concentrations des ligands organiques en présence). On peut difficilement les appliquer avec confiance à des milieux naturels ou à des milieux synthétiques contenant de la matière organique naturelle (par exemple des acides fulviques et/ou humiques). On peut par contre s'en servir avec confiance pour calculer la spéciation d'un métal dans un milieu de culture algale par exemple, étant donné qu'il s'agit d'un milieu défini. Dans le cas présent, c'est-à-dire pour le cadmium dissous dans le milieu de culture algale préconisé par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ – voir la section 2.3), la spéciation du métal s'avère très simple : approximativement 99 % du cadmium se trouve sous forme de l'ion métallique libre, Cd²⁺.

Un certain nombre de logiciels informatiques sont disponibles afin de calculer la spéciation des métaux en solution. Dans le cas présent, le logiciel MINEQL (Schecher et McAvoy 2001) a été utilisé. La spéciation des métaux est à la base des théories du Modèle de l'ion libre (MIL) et du Modèle du Ligand Biotique (MLB), qui sont décrits dans la section suivante.

1.2.3 Modèle de l'ion libre (MIL) / Modèle du ligand biotique (BLM)

L'essor de la modélisation informatique de la spéciation chimique des métaux présents en solution dans les milieux d'exposition (début des années 1970) a permis de démontrer l'importance de la spéciation des métaux par rapport à la réponse biologique. Le succès de cette approche a permis de mettre l'accent des recherches sur l'influence du milieu d'exposition sur la toxicité des métaux, plutôt que sur l'organisme cible.

Le modèle de l'ion libre (MIL) est basé sur l'hypothèse selon laquelle la toxicité (mais aussi la disponibilité pour fins nutritionnelles et la prise en charge) d'un cation en solution est fonction de la concentration de l'ion libre en solution (Morel 1983). La concentration de l'ion libre en solution est quant à elle définie par la concentration totale du métal en solution, par la concentration et la nature des ligands présents dans le milieu d'exposition, par le pH et les concentrations des autres métaux en solution.

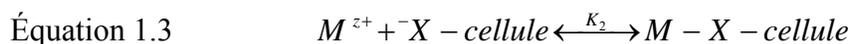
Cette première formulation du MIL a par la suite été revue et révisée par Campbell (1995) sans toutefois que l'hypothèse de base ne soit modifiée. Le MIL a évolué vers le modèle du ligand biotique (BLM) afin de refléter l'importance de la surface cellulaire dans le processus de détermination de la toxicité et l'importance des équilibres chimiques dynamiques opérant à la surface membranaire de l'organisme cible. Les notions d'équilibre du BLM ont dû tenir compte non seulement des équilibres chimiques entre l'ion libre et les sites de liaison sur la membrane cellulaire mais aussi de ceux incorporant le complexe métal-ligand (ML). La réaction de l'ion métallique libre ou complexé à la surface de la cellule (voir équation 1.1) peut être comparée à une complexation de surface et la concentration du complexe de surface est définie par la concentration de l'ion métallique libre en solution. Cette étape est considérée comme étant rapide comparativement à la seconde étape, soit le transport transmembranaire du métal qui est considérée comme l'étape lente.

Équilibres en solution :



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

Réaction de M^{z+} à la surface cellulaire :



Équation 1.4
$$\{M - X - cellule\} = K_2 \{X - cellule\} [M^{z+}]$$

où : K_1 et K_2 = constantes d'équilibres;

L = ligand (charge non indiquée)

{ } = concentration d'espèces à la surface cellulaire

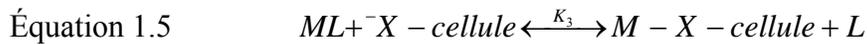
[] = concentrations d'espèces en solution.

En considérant la réponse biologique comme proportionnelle à la concentration du complexe de surface $\{M-X-cellule\}$ et en supposant que la concentration de sites de

liaison libres, $\{^-X-cellule\}$, ne varie pas, la réponse biologique variera en fonction de $[M^{z+}]$ (équation 1.4), soit la concentration de l'ion libre métallique en solution.

Avec un complexe métal-ligand (ML), et si la réaction impliquée est un échange de ligand, la réponse biologique variera également en fonction de $[M^{z+}]$.

Réaction de ML à la surface cellulaire :



$$\text{Équation 1.6} \quad \{M - X - cellule\} = K_3 \frac{\{^-X - cellule\} [ML]}{[L]}$$

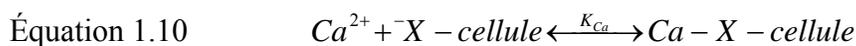
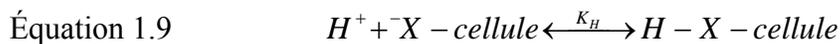
En réarrangeant l'équation 1.2, il est possible d'obtenir :

$$\text{Équation 1.7} \quad \frac{[ML]}{[L]} = K_1 [M^{z+}]$$

Puis en substituant l'équation 1.7 dans l'équation 1.6 on obtient l'équation 1.8 qui, à l'image de l'équation 1.4, démontre la relation entre la réponse biologique et la concentration de l'ion métallique libre M^{z+} .

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

La figure 1-5 présente une schématisation des sites de liaison à la surface cellulaire. Les réactions de l'ion métallique libre (M^{z+}) et de l'ion métallique complexé (ML) avec ces sites de liaison y sont représentées. En plus de ces deux réactions, les réactions du proton (l'ion H^+) et des cations responsables de la dureté de l'eau (Ca^{2+} , Mg^{2+}) avec ces mêmes sites de liaison doivent être considérées (équations 1.9 et 1.10).



Cette compétition avec le proton ou avec les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} aura pour effet de diminuer la concentration du complexe $M - X - cellule$ à la surface cellulaire. Il en résultera une

certain « protection » contre la toxicité du métal M dans les eaux dures (à fortes concentrations en ions constituant la dureté, principalement le Ca^{2+} et aussi le Mg^{2+}), ou dans les eaux acides (Campbell et Couillard 2004).

Toujours en référence à la figure 1-5, l'ajout d'un ligand « L » dans la solution d'exposition aura pour conséquence de favoriser la formation du complexe ML au dépend de l'ion métallique libre (déplacement à droite de l'équilibre représenté par l'équation 1.1). La diminution de la concentration de l'ion métallique libre $[\text{M}^{Z+}]$ se traduira par une baisse de la concentration du complexe $M - X - \text{cellule}$ à la surface cellulaire, c'est-à-dire par une baisse de la biodisponibilité du métal.

Ce sont ces trois facteurs abiotiques (pH, dureté et présence de ligands complexants) qui influencent le plus la biodisponibilité des métaux.

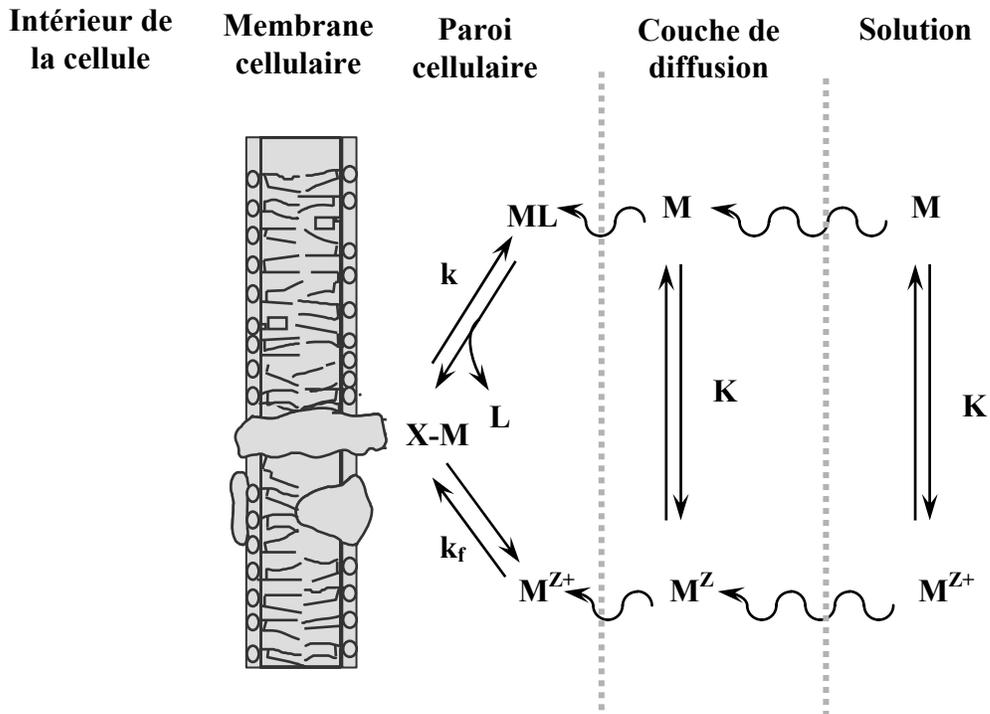


Figure 1-5 Schématisation de la surface cellulaire et de ses sites de liaison membranaire (tirée de Campbell et Couillard 2004).

1.3 Cas du cadmium

1.3.1 Généralités

Le cadmium est reconnu comme ayant un potentiel toxique élevé. Par exemple, il est classé comme une des substances d'intérêt prioritaire dans le cadre de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement. Le cadmium est un élément très toxique pour l'homme et l'exposition pour l'humain s'effectue principalement via la fumée du tabac et la nourriture. Le cadmium peut aussi se retrouver dans les eaux de consommation via les apports environnementaux précités à la section 1.1.4, mais également via la corrosion et la dégradation de certains matériaux servant à la fabrication de tuyaux galvanisés et de conduites de distribution d'eau. Le tableau 1-5 présente les différentes valeurs quant aux recommandations et critères de qualité de l'eau applicables pour le cadmium au Canada et au Québec.

Tableau 1-5 Recommandations canadiennes et critères de qualité au Québec applicables au cadmium en milieu aquatique (pour une dureté appliquée de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ lorsque la recommandation ou le critère varie en fonction de la dureté²) (sources : CCME 2002 et MENV 2001).

Référence	Application	[Cd] ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	[Cd] (nM)
Recommandations Conseil canadien des ministres de l'environnement (CCME)	Vie aquatique	0,017	0,15
	Eau potable	5	44
Critères Gouvernement du Québec	Vie aquatique (toxicité aiguë)	2,1	19
	Vie aquatique (toxicité chronique)	1,4	12
	Eau potable (concentration maximale acceptable)	5	44

² Voir section 1.3.4

Plusieurs études de toxicité ont été réalisées sur ce métal au cours des dernières décennies. Afin de simplifier la démarche, et en considérant que nos travaux ont été orientés sur les algues, nous avons surtout traité de la toxicité du cadmium envers les algues dans les sections qui suivent. Cependant, pour situer les algues par rapport à d'autres organismes aquatiques, le tableau 1-6 présente un résumé des données de toxicité du cadmium envers les poissons/amphibiens, les invertébrés aquatiques, et les producteurs primaires. Ce tableau est tiré de la version préliminaire d'une évaluation de risque environnemental qui est toujours en cours au sein de la Communauté européenne (EU 2003). Il importe de mentionner que les auteurs de ce rapport ont fait une analyse détaillée de toutes les études avant de les inclure dans leur analyse, ne retenant que celles dont les données satisfaisaient aux critères de qualité préétablis.

A l'examen du tableau 1-6, on constate que la sensibilité au cadmium a tendance à diminuer dans l'ordre invertébrés aquatiques > poissons/amphibiens > producteurs primaires.

Tableau 1-6 Résumé des données toxicologiques (nM Cd) pour le cadmium (organismes aquatiques). Données tirées de EU (2003).

Concentration sans effet observable (CSEO, toxicité chronique)					
	Minimum	5 ^e percentile	médiane	maximum	Nombre
Poissons / amphibiens	4,2	7,6	37	550	170
Invertébrés aquatiques	1,4	1,9	18	98	200
Producteurs primaires	8,5	12,4	61	290	70
Concentration minimale avec effet observable (CMEO, toxicité chronique)					
	Minimum	5 ^e percentile	médiane	maximum	Nombre
Poissons / amphibiens	6,9	15	98	1170	180
Invertébrés aquatiques	2,5	2,6	17	210	170
Producteurs primaires	17	28	160	890	80
Concentration effective sur ≥ 50 % de la population testée (CE _{x\geq50} , toxicité chronique)					
	Minimum	5 ^e percentile	médiane	maximum	Nombre
Poissons / amphibiens	30	43	180	5780	60
Invertébrés aquatiques	9	15	40	280	120
Producteurs primaires	54	88	440	9000	110
Concentration effective sur ≥ 50 % de la population testée (CE _{x\geq50} , toxicité aiguë)					
	Minimum	5 ^e percentile	médiane	maximum	Nombre
Poissons / amphibiens	8	20	13 000 μ M	358000	280
Invertébrés aquatiques	62	218	1480	660000	540

1.3.2 Toxicité du cadmium envers les algues

Les algues accumulent des contaminants via l'eau environnante. Un nombre considérable d'études portant sur la toxicité du cadmium envers les algues a été publié. Les résultats de certaines de ces études sont présentés dans le tableau 1-7. En comparant les valeurs présentées dans le tableau 1-7, il faut considérer le paramètre de suivi utilisé (normalement soit le taux de croissance, soit le rendement à la fin de la période d'exposition; voir Nyholm 1985) ainsi que la spéciation du cadmium dans le milieu (résultats exprimés en termes de Cd dissous total ou de Cd²⁺ libre). La très grande majorité des études avec les algues ont été réalisées dans les conditions statiques (c'est-à-dire en lots), où des densités cellulaires élevées sont obtenues. Dans de telles conditions il arrive souvent qu'une proportion importante du métal se trouve associée aux algues, ce qui résulte en une diminution de la concentration du métal dans la solution d'exposition. En d'autres termes, la concentration réelle à laquelle les algues sont exposées est nettement plus faible que la concentration nominale du métal, et la toxicité réelle du métal est ainsi sous-estimée. Il est à noter que pour les deux expériences réalisées en chémostat (cultures continues : voir Lawrence et al. 1989, Chen et Lin 1997, Chen et al. 1997), la CI₅₀ ou la CSEM sont nettement plus faibles (Cd plus toxique) que pour l'ensemble des autres expériences réalisées en lots. L'emploi des cultures en continue devrait conséquemment permettre de garder la concentration du Cd plus constante.

Le cadmium est généralement considéré comme un élément non-essentiel. Certaines études lui attribuent par contre un rôle nutritionnel limité. Lane et Morel (2000) dans leur étude portant sur la diatomée *Thalassiosira weissflogii* ont rapporté une diminution du taux de croissance de l'algue en présence de faibles concentrations de zinc et de CO₂ dans le milieu. L'ajout de zinc et de CO₂ dans le milieu carencé en ces deux composés a conduit à une augmentation du taux de croissance. L'ajout de cadmium dans le milieu carencé a également conduit à une augmentation du taux de croissance de *T. weissflogii* mais de façon moins marquée que dans le cas de l'ajout de zinc (0,95 comparativement à 1,3 j⁻¹ en moyenne). Dans de telles conditions de carence en zinc, l'algue utiliserait le cadmium comme cofacteur enzymatique de l'anhydrase carbonique, enzyme participant au processus d'acquisition du carbone inorganique.

Tableau 1-7 Résumé des expériences de toxicité du cadmium envers les algues, tirées de la littérature.

Espèce d'algue et classe d'algue	Référence	Paramètre de suivi	Résultat	Spéciation du Cd	Milieu d'exposition
<i>Asterionella formosa</i>	Conway et Williams 1979	μ (1 j) (CMEO)	7,6 nM	Cd total	CHU-10 (sans chélate)
		μ (1 j) (CSEM)	17 nM		
<i>C. reinhardtii</i>	Boily 2004	μ (72h- CI_{50})	450 nM	Cd^{2+}	MHSM-1 avec EDTA (0,8 μM)
<i>C. reinhardtii</i>	Lawrence et al. 1989	culture en continu (7 j); biomasse à état stationnaire (CMEO)	67 nM	Cd total	Milieu modifié sans chélate
<i>Coelastrum proboscideum</i>	Muller et Payer 1979	biomasse (1 j) (CSEM)	56 nM	Cd total	Milieu "maison", avec EDTA (5 μM)
<i>Chlorella sp.</i>	Franklin et al. 2002	μ (48h- CI_{50})	850 nM	Cd total	USEPA eau douce synthétique modifiée (0,8 μM)
		et 72h- CI_{50})	(810-1500 nM)		
<i>Chlorella vulgaris</i>	Wong et al. 1979	prise en charge $^{14}CO_2$	5 340 μM	Cd total	CHU-10 (sans chélate)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>			890 nM		
<i>Scenedesmus quadricauda</i>			180 nM		
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Kuhn et Pattard 1990	biomasse ; μ (72 h- CI_{50})	550 nM	Cd total	Milieu "maison" avec EDTA (54 nM)
<i>P. subcapitata</i>	Bartlett et al. 1974	croissance ¹ (CMEO)	440 nM	Cd total	AAP avec EDTA (0,8 μM)
		croissance ¹ (inhibition complète)	710 nM	Cd total	AAP avec EDTA (0,8 μM)
<i>P. subcapitata</i>	Thellen et al. 1989	μ (96h- CI_{50})	500 nM	Cd total	AAP avec EDTA (0,8 μM)
			206 nM	Cd total	AAP sans EDTA
<i>P. subcapitata</i>	Érrecalde et al. 1998	biomasse (72h- CI_{50})	400 nM	Cd^{2+}	FRAQUIL chélate
			280 nM	Cd^{2+}	FRAQUIL avec NTA (10 μM)
<i>P. subcapitata</i>	Lin et al. 1996	μ (culture continue ; 24h- CI_{50})	285 nM	Cd total	SAAM avec EDTA (0,8 μM)
<i>P. subcapitata</i>	Chen et Lin 1997 ; Chen et al. 1997	μ (conditions statiques ; CI_{50} ; EDTA= 1 μM)	3030 nM	Cd total	US EPA (1985) modifié avec EDTA (80 nM)
		μ (culture continue ; 24h- CI_{50} ; EDTA = 0.1 μM)	116 nM	Cd total	
		EDTA = 0.1 μM)	36 nM	Cd^{2+}	
<i>P. subcapitata</i>	Turbak et al. 1986	Biomasse (14-21 j)	510	Cd total	AAM avec EDTA (0,8 μM)

1.3.3 Facteurs pouvant influencer sur la toxicité du cadmium

Ces facteurs sont généralement externes, c'est-à-dire du milieu environnant à l'organisme, comme le pH, la dureté, la concentration en CO₂ (Tukaj et al. 2007), la présence de ligands inorganiques, la présence de ligands organiques (y compris la matière organique dissoute naturelle ou « MOD »), la température, etc. Dans le cas présent, le pH, la dureté et la présence d'un ligand nous intéressent particulièrement.

1.3.3.1 pH

Comme pour les autres métaux cationiques, le pH influence théoriquement à la fois la spéciation du cadmium dans la solution et la formation du complexe $Cd - X - cellule$ à la surface cellulaire (Campbell et Stokes 1985). Une baisse du pH en solution défavorise généralement la complexation des métaux (compétition accrue de l'ion H⁺ pour les ligands en solution), ce qui favorise donc la spéciation chimique du métal sous la forme de l'ion libre. Cependant, par comparaison avec d'autres métaux comme le cuivre ou le mercure, dont la spéciation en solution est très sensible à des variations de pH dans la gamme normalement rencontrée dans les eaux naturelles, le Cd dissous est relativement insensible à de telles variations de pH (Campbell et Tessier 1987).

D'autre part, une baisse de pH occasionnera une compétition accrue de l'ion H⁺ pour les sites de complexation $X - cellule$ présents à la surface cellulaire, ce qui mènera normalement à une certaine protection de l'algue (prise en charge réduite). Une baisse de pH provoque ainsi deux effets compensatoires, une augmentation de la proportion de l'ion métallique libre en solution et une diminution de l'affinité de la surface algale pour cet ion. Pour le cadmium, puisque le premier effet est plutôt modeste, on pourrait s'attendre à ce que l'effet protecteur à la surface algale prédomine. Par exemple, Vigneault et Campbell (2005) ont exposé l'algue *P. subcapitata* au Cd (~ 2 nM) à pH 7 et à pH 5; la prise en charge sur de courtes périodes de temps (20 min) était plus de 20 fois moins rapide au pH acide. De même, avec l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*, Macfie et al. (1994) ont démontré une toxicité réduite du cadmium à pH 5,0 comparativement à un pH de 6,8, soit une valeur de CI₃₀ (rendement relatif) de 4,5 versus 0,1 µM Cd²⁺ pour la souche avec paroi cellulaire. Skowroński et al. (1991) ont observé une diminution de la

toxicité du cadmium (concentration totale) pour l'algue verte *Stichococcus bacillaris* à des pH de 9,0 et de 3,0 comparativement à la toxicité mesurée à pH 7,0. Une diminution de la toxicité du Cd avec une baisse de pH a également été démontrée chez les invertébrés aquatiques et les poissons d'eaux douces (Campbell et Stokes 1985, Cusimano et al. 1986, Schubauer-Berigan, 1993).

Compte tenu de l'influence potentielle du pH sur la spéciation, la prise en charge par les algues et la toxicité du cadmium, le pH devrait logiquement être contrôlé dans nos milieux d'exposition. Cependant, la croissance des algues dans un milieu de culture peut elle-même provoquer une variation du pH du milieu. Par leur activité photosynthétique et la consommation des bicarbonates et des nitrates en solution, les algues induisent la libération d'ions hydroxyde (Smith et Raven 1976). Dans un milieu à faible pouvoir tampon³, l'augmentation du pH est proportionnelle à la libération des ions hydroxydes et ainsi, proportionnelle à la croissance des algues. Dans des conditions de croissance en laboratoire, les variations de pH observées peuvent être de l'ordre de près de 3 unités de pH pendant une période de 96 h.

1.3.3.1.1 Tampon pH

Des variations de pH de l'ordre de ce qui est observé dans les conditions de croissances en laboratoire peuvent résulter en une variation de la spéciation des ions présents en solution, dont le cadmium. Une approche possible pour minimiser les variations de pH est d'employer un tampon de pH. L'effet de la présence d'un tampon en solution sur la réponse toxique des organismes cibles est cependant controversé. Certains auteurs n'attribuent aucun effet à la présence d'un tampon sur la réponse toxique et/ou les organismes cibles, d'autres auteurs jugent que les effets sont moindres que l'effet lié à l'augmentation du pH du milieu, alors que d'autres attribuent aux tampons des effets certains sur l'organisme et/ou la réponse toxique.

³ Le pouvoir tampon est défini comme le nombre de moles d'acide fort ou de base forte que l'on peut ajouter à 1,0 L de solution avant qu'elle ne subisse une variation de 1,0 unité de pH.

Lage et al. (1996) ont observé une augmentation de la toxicité du cuivre en présence du tampon HEPES (acide 4(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonique; 25 mM) pour l'algue marine *Amphidinium carterae*. Ils rapportent également que HEPES ne complexerait pas de façon significative le cuivre. Vasconcelos et al. (1996) ont observé une augmentation de l'activité de surface (tensioactif) de HEPES (25 mM) et posent l'hypothèse que cela pourrait mener à une plus grande biodisponibilité du cuivre. Fernandez-Piñas et al. (1991) ont conclu que les tampons HEPES et Tricine (N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxyméthyl)éthyl)glycine) avaient la capacité de lier le cadmium en solution et ainsi de réduire la concentration de cadmium libre en solution et sa toxicité pour la cyanobactérie *Nostoc* UAM 208. À première vue leur résultat pour le tampon HEPES (25 mM) est quelque peu surprenant ; si ce tampon ne complexe pas le Cu^{2+} (Lage et al. 1996), pourquoi complexerait-il le Cd^{2+} (qui normalement affiche des constantes de complexation plus faibles que le Cu^{2+})? Cependant, Fernandez-Piñas et al. (1991) ont travaillé à des concentrations en Cd très élevées ($\sim 66 \text{ mg Cd}\cdot\text{L}^{-1}$, ou $\sim 580 \mu\text{M}$), ce qui aurait pu favoriser des réactions de complexation avec le HEPES. Vasconcelos et al. (1998) ont conclu que HEPES et PIPES (1,4-piperazinebis (acide éthanesulfonique)) ne complexaient pas le cuivre de façon significative alors que POPSO (piperazine-*N-N'*-bis(acide 2-hydroxypropanesulfonique)), HEPPSO (*N*-(2-hydroxyéthyl)piperazine-*N'*-bis(acide 2-hydroxypropanesulfonique)) et DIPSO (acide 3-(*N-N*-bis(2-hydroxyéthyl)-amino)-2-hydroxypropanesulfonique) complexeraient le cuivre.

Heijerick et al. (2003) n'ont pas remarqué d'effet significatif associé à la présence de MOPS (acide 3-*N*-morpholino propanesulfonique; jusqu'à $\sim 4,8 \text{ M}$) sur la reproduction de *D. magna*. De même, De Schamphelaere et al. (2004) n'ont pas observé d'effet sur la réponse toxique au zinc et au cuivre de *P. subcapitata* et *D. magna* en présence de MOPS ($\sim 4,8 \text{ nM}$).

Kandegerada et Rorabachter (1999) ont démontré que MOPS est un tampon non-complexant pour les métaux. L'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (US EPA 1991) recommande également l'usage du tampon MOPS car il ne modifierait pas la toxicité d'effluents non-toxiques ou toxique de même que la toxicité d'eau

interstitielle de sédiments. Soares et al. (1999) ont également conclu que le tampon MOPS (de même que le MES et le MOPSO) ne complexait pas le cadmium et le plomb.

Selon cet examen de la littérature, nous avons choisi de tester deux tampons, le HEPES et le MOPS, dans nos expériences.

1.3.3.2 Dureté

La présence d'une activité minière peut induire une oxydation des affleurements de minéraux sulfurés par contact avec l'air ou avec l'eau. Ces sulfures métalliques sont spontanément oxydés, ce qui provoque la libération d'acide sulfurique qui favorise la solubilisation des métaux dû à la diminution du pH des eaux environnantes. Afin de traiter ces eaux acides résultantes (le « drainage minier acide », ainsi que les eaux provenant des procédés miniers proprement dits) on fait souvent appel au chaulage. Le chaulage permet une augmentation du pH des effluents et favorise également la précipitation des métaux pour réduire leurs concentrations en solution. L'ajout de chaux procure aux eaux un pH neutre, mais également des concentrations en calcium anormalement élevées. Comme le calcium et le magnésium sont les composants majeurs de la dureté, des concentrations très élevées en calcium vont induire une dureté très élevée.

La dureté est reconnue comme étant un facteur influant sur la toxicité du cadmium, surtout pour les poissons et les invertébrés aquatiques. Au niveau gouvernemental, l'établissement de critères et de recommandations pour la qualité de l'eau et la protection de la vie aquatique tient d'ailleurs compte de ce paramètre. Plusieurs études ont été effectuées quant à l'effet de la dureté sur la réponse toxique aux métaux et ce, pour divers organismes cibles. Les équations 1.11, 1.12 et 1.13 représentent les relations utilisées au Québec et au Canada pour l'établissement de ces recommandations et critères variables pour le cadmium (exprimées en $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$). La figure 1-6 illustre les critères applicables en fonction de la dureté du milieu.

$$[\text{Cd}] = e^{[1,128(\ln \text{dureté}) - 3,6867]} / 1000$$

Équation 1.11 : Protection de la vie aquatique
(toxicité aiguë) (MENV 2001)

$$[Cd] = e^{[0,7852(\ln \text{dureté}) - 2,715]} / 1000$$

Équation 1.12 : Protection de la vie aquatique (toxicité chronique) (MENV 2001)

$$[Cd] = 10^{[0,86(\log \text{dureté}) - 3,2]}$$

Équation 1.13 : Protection de la vie aquatique (CCME 2002)

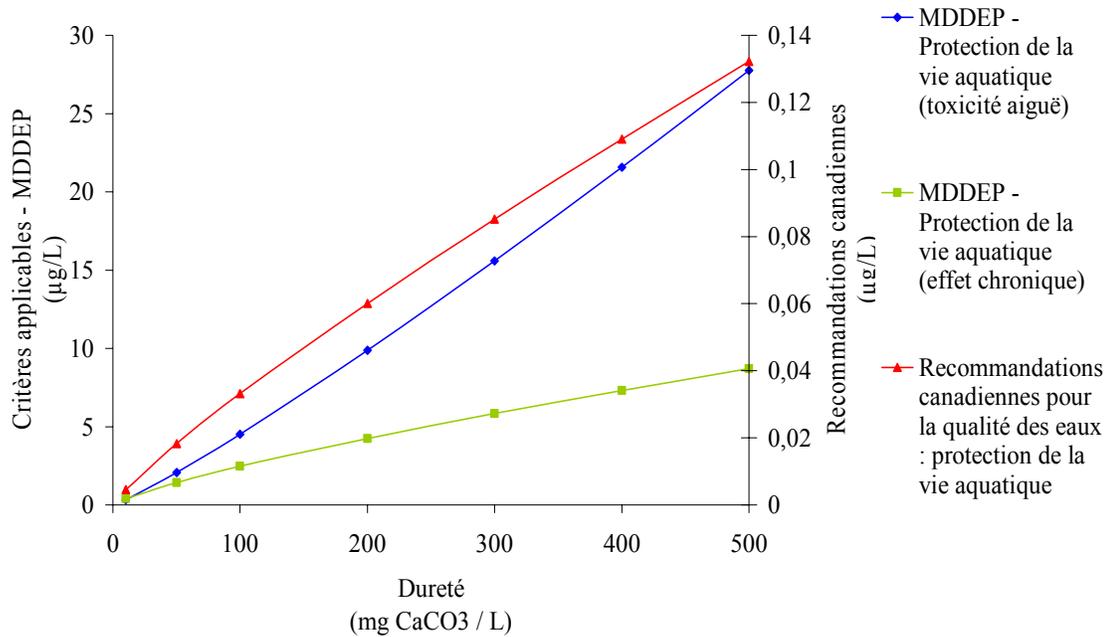


Figure 1-6 Évolution des critères applicables pour le cadmium en fonction de la dureté de l'eau.

Pour un milieu donné, la toxicité du cadmium sera ainsi fonction de la dureté de ce milieu, en attribuant une capacité « protectrice » à la dureté. La dureté diminuerait donc l'effet toxique du cadmium sur les organismes aquatiques. En considérant que le composant majeur de la dureté est le calcium, cet effet protecteur pourrait être imputable à un effet de compétition de l'ion libre Ca^{2+} avec l'ion métallique libre M^{z+} . Un tel facteur correctif est également appliqué à d'autres métaux, comme par exemple le baryum, le cuivre, le nickel, le plomb et le zinc.

Tel que mentionné auparavant, la majorité des études effectuées sur l'influence de la dureté sur la toxicité des métaux a été réalisée avec des animaux aquatiques. L'étude de

Heijerick et al. (2002) constitue une rare exception à cette généralisation. Ils ont noté que pour une augmentation de la concentration en calcium de 0,25 à 2 mM, la toxicité du Zn (72h- CI_{50}) pour l'algue *P. subcapitata* diminuait d'un facteur 1,7. Ces expériences ont été réalisées dans le milieu ISO (ISO 1989) avec du carbone organique dissous artificiel (acide humique Aldrich) au lieu de l'EDTA. Une diminution de la toxicité du zinc a également été notée pour une augmentation de la concentration en sodium de 2,7 à 7,2 nM (facteur 2,1). Une augmentation de la concentration en magnésium de 0,25 à 2,5 nM a résulté en une diminution de la toxicité du zinc d'un facteur 6,5. Issa et al. (1995) ont également observé une diminution de la toxicité (taux de croissance) et de la prise en charge du cadmium, du cobalt, du manganèse et du nickel pour *Kirchneriella lunaris* avec une augmentation des concentrations de calcium en solution de 0,09 à 5 mM Ca. Fernandez-Piñas et al. (1995) ont également observé une diminution de la toxicité et de l'accumulation du Cd en présence d'une concentration plus élevée de Ca en solution, pour la cyanobactérie *Nostoc* UAM 208. Mosulén et al. (2003), ont obtenu des résultats comparables qui démontrent que l'ajout du calcium (1 mM) à leur milieu d'exposition a pour effet de réduire la toxicité du Cd (concentration nominale de 300 μ M) ainsi que son accumulation intracellulaire (- 35 %) par *Chlamydomonas reinhardtii*.

De Schamphelaere et al. (2003) ont étudié l'effet de la dureté sur la réponse toxique au cuivre pour *P. subcapitata*. Aucun effet important de la dureté (de 25 à 500 mg $CaCO_3 \cdot L^{-1}$) n'a été identifié sur la réponse toxique. Markich et al. (2005) n'ont également pas observé d'effet significatif de la dureté (de 44 à 375 mg $CaCO_3 \cdot L^{-1}$) sur la réponse toxique au cuivre, mais avec l'algue *Chlorella* sp.

1.3.3.3 Présence d'un agent chélateur

Dans le cadre de tests de toxicité impliquant des métaux, les agents chélateurs sont généralement utilisés pour améliorer la solubilité et la disponibilité de certains éléments nutritifs comme le fer et pour maintenir la concentration totale du métal et sa spéciation les plus constantes possibles pendant le test. En effet, on emploie l'agent chélateur comme « tampon métallique » qui influe directement sur la spéciation du métal et conséquemment sur la disponibilité des métaux.

Dans la section traitant du modèle BLM (section 1.2.3), en discutant du rôle des ligands « L » en solution, nous avons signalé que l'ajout d'un ligand non-assimilable devait faire diminuer la concentration de l'ion métallique libre en solution et, par conséquent, faire baisser la toxicité apparente du métal (exprimée en fonction de la concentration totale du métal en solution). Par ailleurs, si on exprime la toxicité du métal en fonction de la concentration de l'ion métallique libre, elle ne devrait pas être influencée par la présence du ligand libre ou des complexes ML_n en solution.

Comme exemple de ce genre d'expérience, Errécalde et al. (1998) ont obtenu des valeurs de 72 h- CI_{50} de 550 ± 60 nM Cd^{2+} sur *P. subcapitata* dans un milieu sans tampon métallique et de 650 ± 30 nM Cd^{2+} dans un milieu avec l'acide nitrilotriacétique (NTA) comme tampon métallique. Les réponses toxiques observées avec et sans NTA n'étaient cependant pas significativement différentes ($P > 0,05$).

Chiaudani et Vighi (1978) ont établi qu'en utilisant ou non de l'EDTA, l'ordre de toxicité de six métaux variait pour l'algue *P. subcapitata*. Ainsi, sans la présence d'EDTA, l'ordre des toxicités relatives (96h- CI_{50}) obtenues pour les métaux était : $Zn < Cd < Cr(III) < Co < Ni < Cu$. Avec la présence d'EDTA (0,8 μM), l'ordre était plutôt $Cu < Cr(III) < Zn < Co < Ni < Cd$.

Thellen et al. (1989) ont rapporté une diminution de la toxicité du cadmium envers l'algue verte *P. subcapitata* d'un facteur ~ 2 (croissance, 96h- CI_{50} de 200 à 500 nM) en présence d'EDTA comparativement à un milieu sans EDTA. En travaillant avec l'algue *P. subcapitata* (croissance, 96h- CI_{50} , méthode US EPA avec microplaques), Geis et al. (2000) ont observé une diminution significative de la toxicité de plusieurs métaux (Cd, Cu, Pb et Zn) en présence d'EDTA, comparativement à des expositions réalisées sans EDTA avec l'algue *P. subcapitata*.

1.4 Considérations pratiques

Le contrôle des effluents industriels est une préoccupation constante ayant pour but de protéger l'environnement aquatique. Les tests de toxicité ont été développés afin de répondre à ce besoin et pour fournir un outil de caractérisation du niveau de risque associé

aux apports de contaminants des effluents industriels pour le milieu récepteur. Par contre l'établissement d'une valeur limite sans égard au milieu récepteur pour les contaminants métalliques peut s'avérer une approche réglementaire trop conservatrice. La nécessité de tenir compte des caractéristiques des milieux récepteurs est un élément qui se doit de plus en plus d'être considéré et ce, d'un commun accord de la part des gouvernements, des industriels et de la communauté scientifique. En considération de quoi, les approches gouvernementales pour la protection de l'environnement tendent à s'adapter par l'élaboration de méthodes de suivi qui tiennent compte de milieux récepteurs et de leur usage.

Au Canada, les études de suivi des effets sur l'environnement (ESEE) sont des outils qui sont maintenant utilisés dans un cadre réglementaire (Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers et Règlement sur les effluents des mines de métaux (REMM)) et non-réglementaire. Le protocole pour le programme ESEE préconise un suivi chimique et biologique (i) de la qualité des effluents se déversant dans un milieu donné, et (ii) du milieu récepteur lui-même (zones de référence et zones en aval du point de rejet). On vise à évaluer les effets des effluents sur les poissons et sur leur habitat. Le suivi de la qualité des effluents s'effectue par des études de toxicité des effluents en laboratoire.

Au Québec, un premier pas a été franchi par l'élaboration et la mise en place du programme de réduction des rejets industriels (PRRI). L'établissement d'objectifs environnementaux de rejet (OER), qui représente une approche jumelle au programme ESEE, est désormais couramment utilisé au Québec comme méthode de vérification et de suivi du risque environnemental des effluents industriels.

Les tests de toxicité des effluents réalisés avec les algues sont des outils importants dans l'établissement des OER. Dans le cadre de travaux conjoints entre le COREM, le CEAEQ et l'INRS-ETE, des essais ont été effectués avec une série d'organismes soit : *Vibrio fisheri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Oncorhynchus mykiss* et *Pimephales promelas* (Martel 2004). Les tests de toxicité effectués avec *P. subcapitata* se sont avérés les plus adaptés et les plus sensibles. Les tests effectués avec *P. subcapitata* ont également été effectués avec et sans EDTA. Cette étude

comparative a permis de mettre en évidence une diminution de la sensibilité du test en présence d'EDTA dans les cas de contamination métallique dans les effluents (résultats non publiés).

1.5 Méthodes de détermination de la toxicité avec *P. subcapitata*

Les tests de toxicité ont été élaborés de façon à établir des méthodes standardisées pour évaluer la toxicité de diverses solutions (notamment les échantillons d'effluents et d'eaux réceptrices). Compte tenu de la complexité et du nombre de solutés présents dans les effluents et dans les milieux naturels, les tests de toxicité se sont avérés des méthodes de vérification de la toxicité fiables, peu coûteuses et relativement rapides. Ces tests ont donc été appliqués à la détermination de la toxicité des eaux de rejet des divers secteurs industriels (pâtes et papiers, textiles, minières, etc.).

Les algues se sont avérées des organismes particulièrement bien adaptés à ces tests. Les algues possèdent plusieurs caractéristiques qui ont favorisé leur utilisation répandue pour les essais de toxicité, dont : facilité de culture et d'entretien, sensibilité aux contaminants, versatilité (possibilité d'utilisation pour une vaste gamme de types de contaminants), et reproductibilité des résultats expérimentaux obtenus. De même, le fait qu'elles représentent la base de la chaîne trophique de la grande majorité des écosystèmes aquatiques confère aux tests de toxicité effectués avec des algues une pertinence écologique certaine.

Un effort de standardisation des tests de toxicité a été consenti par la communauté scientifique pendant la période s'échelonnant de 1970 à 1990. L'algue verte d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* (anciennement connue sous l'appellation *Selenastrum capricornutum*) est l'une des espèces qui s'est avérée la plus adaptée aux exigences des tests de toxicité. La communauté scientifique a consacré des efforts importants pour optimiser les méthodes de culture et d'entretien de cette algue, et pour standardiser la façon de réaliser les tests de toxicité. Une de ces standardisations les plus communes est celle effectuée par l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (US EPA 1971).

Au Québec, le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ), qui fait partie du Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs (MDDEP), standardise des méthodes de détermination de la toxicité. Le test de détermination de la toxicité avec l'algue *P. subcapitata* du CEAEQ (2003) est présenté dans la section suivante.

1.5.1 Protocole du CEAEQ

Le protocole du CEAEQ intitulé : « Détermination de la toxicité : inhibition de la croissance avec l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* (CEAEQ, 2003) » est principalement basé sur le test du US EPA (1989; 2002). Le tableau 1-8 résume les points principaux de ce protocole expérimental.

Tableau 1-8 Résumé des conditions d'essai du protocole du CEAEQ (2003).

Type de test	Statique
Température	24°C ± 2°C
Type d'éclairage	Fluorescent de type « Cool White »
Intensité lumineuse	4 300 lux ± 10%
Photopériode	Continue
Dimension des cuvettes	30 mL
Volume de solution	10 mL
Densité cellulaire initiale	10 000 cellules/mL
Nombre de réplicats par concentration et pour le contrôle	3
Âge des algues pour l'inoculum	4 à 7 jours
Agitation	100 tours/minute
Eau de dilution	Milieu de culture sans EDTA
Nombre de concentrations	5 à 10 plus le témoin
Durée du test	96 h
Effet mesuré	Croissance (compte cellulaire)
Expression des résultats	CI ₂₅ 96h et CI ₅₀ 96h
Acceptabilité du test	Densité cellulaire des contrôles ≤ ± 2S (l'écart-type) de la moyenne historique; variabilité des contrôles inférieure à 20%; toxique de référence à l'intérieur de ± 2S

Tel que mentionné à la section 1.4, les tests de toxicité effectués avec *P. subcapitata* se sont avérés les plus adaptés et les plus sensibles lors des essais réalisés dans le cadre d'un projet conjoint COREM – CEAEQ – INRS-ETE sur l'impact des effluents miniers sur les eaux courantes (Martel 2004). Lors de ces tests de toxicité, l'effluent testé est normalement dilué avec différentes proportions d'un milieu enrichi en nutriments et en micro-éléments; selon la croissance algale mesurée, la toxicité de l'effluent peut être déterminée. Ce type de test de toxicité permet de considérer les particularités des effluents qui seront rejetés dans le milieu récepteur. Par contre, selon l'importance de certaines de ces particularités (par exemple un pH faible, une dureté élevée, ou des concentrations élevées en phosphore), les résultats des tests de toxicité peuvent démontrer des irrégularités (présence de « faux positifs » ou encore de « faux négatifs »). C'est en considérant certaines de ces particularités des effluents et l'utilisation incontournable du protocole du CEAEQ dans le cadre de l'établissement et du suivi des OER, que nous avons établis les hypothèses et les objectifs de nos travaux.

1.6 Hypothèses et objectifs

Avant de décrire explicitement les hypothèses que nous voulons vérifier dans ce mémoire, et les objectifs spécifiques de nos travaux, rappelons les origines du projet. Dans une étude des effets sur le milieu aquatique des éléments traces métalliques (ÉTM) provenant des rejets miniers, les tests de toxicité sur les eaux du milieu récepteur menés au laboratoire avec une algue d'eau douce (*Pseudokirchneriella subcapitata*) se sont avérés plus sensibles que les autres tests standardisés. La réponse de ce test peut cependant être fortement influencée par d'autres facteurs que les ÉTM, notamment le pH, la dureté et la présence d'agents chélateurs dans l'échantillon d'eau ou dans l'eau de dilution. Ainsi, l'interprétation des résultats obtenus avec ce test demeure ambiguë, le protocole standard utilisé ne permettant pas de différencier entre les effets (inhibition ou stimulation de la croissance de la population algale) causés par un agent toxique (ex. : les ÉTM) et ceux imputables à la présence d'éléments nutritifs ou à des conditions physico-chimiques particulières (pH, dureté, etc.). Ce projet de maîtrise, réalisé en partenariat avec le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ), avait pour but d'optimiser

le protocole standard et de développer des tests complémentaires, à réaliser parallèlement à ce protocole, afin de mieux interpréter les résultats d'inhibition ou de stimulation de croissance observés avec le protocole standard. Il devait contribuer à minimiser les risques d'obtenir des résultats de type « faux positifs » ou « faux négatifs ».

Dans ce cadre, et en considérant les différences entre le protocole utilisé par le CEAEQ et celui préconisé par d'autres agences gouvernementales (ex. : Environnement Canada), nous avons élaboré des objectifs spécifiques, chacun avec une hypothèse à vérifier. Le cadmium a été choisi comme ÉTM représentatif, et l'algue verte d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* a été retenue comme algue test.

1^{er} objectif : Évaluer l'effet de la présence d'un agent complexant (EDTA) sur la toxicité et la biodisponibilité du cadmium envers l'algue test.

1^{re} hypothèse : La présence d'un ligand comme l'EDTA dans le milieu d'exposition diminue la proportion de cadmium disponible pour les algues. Si la toxicité est exprimée en fonction de la concentration totale en cadmium, alors la présence d'EDTA fera augmenter la valeur descriptive de la toxicité du cadmium (CI_{50}), de sorte que le cadmium paraîtra moins toxique en présence d'EDTA. En considérant la spéciation du métal, l'utilisation de l'EDTA permet également le maintien d'une exposition constante pendant la durée des expériences en créant une « réserve » de cadmium. En termes de cadmium libre, ceci devrait se traduire par une augmentation apparente de la toxicité du métal, puisque la concentration de l'ion libre (Cd^{2+}) restera constante tout au long du test de toxicité (contrairement à la situation qui prévaut dans les milieux sans EDTA). Les algues seront donc exposées à des concentrations effectives en Cd plus élevées que dans les expériences sans EDTA.

2^e objectif : Déterminer l'effet de la présence d'un tampon pH (HEPES et MOPS) sur la toxicité et la biodisponibilité du cadmium.

2^e hypothèse : La présence d'un tampon augmente la toxicité du cadmium, à cause de la stabilité du pH dans les milieux d'exposition. Ce raisonnement découle du fait qu'à un pH élevé (provoqué par l'activité photosynthétique des algues), la concentration de l'ion libre diminue. Par contre, dans de telles conditions, la compétitivité métal-proton serait plus faible pour les sites de liaison sur la membrane (concentration en protons H⁺ plus faible dans un milieu alcalin), ce qui peut atténuer l'effet de la diminution de la concentration de l'ion libre Cd²⁺ pré-mentionné.

3^e objectif : Déterminer l'effet de la dureté sur la toxicité et la biodisponibilité du cadmium.

3^e hypothèse : Une augmentation de la dureté dans le milieu d'exposition devrait diminuer la biodisponibilité et la toxicité du cadmium de par l'augmentation de la compétition ion libre – calcium ionique. Cet effet devrait être quantifiable pour le calcium. Pour une augmentation de la concentration en magnésium, aucun effet sur la réponse toxique ne devrait être identifié d'une part dû aux plus faibles concentrations qui seront testées (selon ce qui est présenté dans COREM ; Olsen et al. 2004) et principalement parce que nous attribuons l'effet « protecteur » de la dureté à la compétition calcium-cadmium à la surface membranaire.

Dans tous les cas, aucune variation significative de la toxicité ne devrait être identifiée si la réponse toxique est exprimée en fonction des quotas de cadmium intracellulaires.

2. Méthodes expérimentales

2.1 Organisme cible

Dans le cadre des présents travaux de recherche, l'organisme cible a été l'algue verte d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* en raison de son utilisation dans le protocole à l'étude du CEAEQ (CEAEQ 2003) et parce que cette espèce s'est avérée très sensible (USEPA 2002) pour la détermination de la toxicité de diverses substances toxiques, dont les éléments traces métalliques (ÉTM), tel que mentionné à la section 1.6.

2.1.1 Présentation

La désignation de l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* a été, et demeure toujours, sujet à controverse. Elle était anciennement connue sous l'appellation *Selenastrum capricornutum*, mais son appartenance au genre *Selenastrum* a été fortement remise en question au point que son nom a été changé. Ce changement représentait un « avantage » au niveau de la nomenclature taxonomique car pas moins de 25 variétés au total étaient classifiées sous l'appellation *S. capricornutum* (Miller et al. 1978, Lund 2004). Ainsi, sa dénomination est devenue *Raphidocelis subcapitata*. Encore une fois, cette appellation ne satisfaisait pas l'ensemble des taxonomistes. Il a été proposé que sa désignation soit *Kirchneriella subcapitata* (Hindak 1988, de Lund 2004). Toutefois, cette dénomination n'était pas particulièrement fonctionnelle puisqu'elle était déjà utilisée. Ainsi, Hindak (1990, de Lund 2004) a proposé l'adoption de son identification actuelle, soit *Pseudokirchneriella subcapitata*. La taxonomie de cet organisme unicellulaire d'eau douce est présentée au tableau 2-1 et une photographie de cette algue est présentée à la figure 2-1.

Tableau 2-1 Description de la taxonomie de *Pseudokirchneriella subcapitata* (Miller et al. 1978).

Royaume	Plantes
Division	Chlorophycota (algues vertes)
Classe	Chlorophyceae
Ordre	Chlorococcales
Famille	Oocystaceae
Genre	Kirchneriella
Espèce	subcapitata

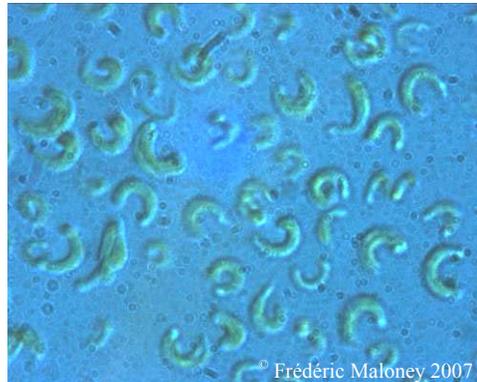


Figure 2-1 : *Pseudokirchneriella subcapitata*; grossissement 100 X.

L'algue est en forme de demi-lune et mesure environ de 4 à 6 μm de diamètre. La croissance de cette algue est caractérisée par une phase de latence d'approximativement 24 h, suivie d'une phase exponentielle d'une durée avoisinant 36 h avant l'atteinte d'un plateau de croissance (figure 2-2).

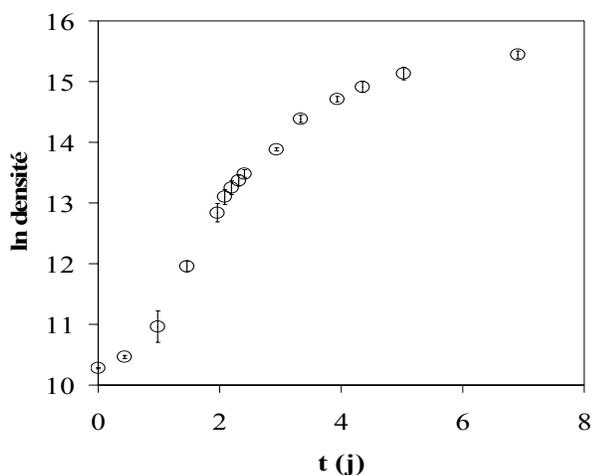


Figure 2-2 : Courbe de croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata* dans le milieu CEAEQ (2003). Les points représentent les valeurs moyennes de trois mesures de densité cellulaire avec les écart-types qui y sont rattachés.

2.1.2 Méthode de culture

Les algues étaient cultivées dans 100 mL de milieu axénique (CEAEQ 2003), dans des erlenmeyers de 250 mL en verre. Les algues étaient placées dans une chambre de croissance (Convicon CMP3023), afin de permettre des conditions ambiantes constantes de température ($20,0 \pm 0,1$ °C) et de luminosité ($100 \pm 10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Une table agitatrice permettait une agitation constante (~ 100 rpm) pour éviter que les algues ne s'agglomèrent et se déposent au fond des erlenmeyers, tout en favorisant l'homogénéisation des conditions de culture (nutriments, pH, et intensité lumineuse).

La culture mère initiale de cette algue a été obtenue de l'Université de Toronto (UTCC 37). Simultanément au repiquage de la première culture fille, un repiquage sur gélose a été effectué. Ceci a permis de conserver la même souche pour l'ensemble des expérimentations. Les cultures étaient initiées à des intervalles de 4 ou 5 jours en

transférant ~ 1 mL de la suspension algale dans un milieu frais et stérile à pH $7,00 \pm 0,10$ pour maintenir les algues dans un bon état physiologique (soit une concentration initiale de 20 000 à 35 000 cellules·mL⁻¹). Un maximum de 14 repiquages étaient ainsi effectués, après quoi la culture était jetée et une autre culture mère initiée à partir de la culture sur gélose. Pour vérifier l'absence de contamination bactérienne, les cultures étaient régulièrement vérifiées par observations microscopiques et analyses des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies (BHAA) (CEAEQ 2005). Les manipulations se rapportant aux cultures d'algues (excepté pour la filtration et la centrifugation) s'effectuaient « sous une flamme », sous une hotte à flux laminaire et avec des instruments stériles.

2.2 Calculs théoriques de la spéciation du cadmium

En considérant l'importance de la spéciation du cadmium pour nos expériences de toxicité et la complexité des milieux d'exposition, il était essentiel de connaître le comportement du cadmium en solution. Les calculs théoriques de spéciation du cadmium ont été effectués à partir du logiciel MINEQL (version 4.5, Schecher et al. 2001) afin de connaître la concentration de cadmium ionique libre en solution lors des expositions.

Certaines des constantes d'équilibres initiales du logiciel étaient inappropriées ou absentes et elles ont donc été ajustées ou encore ajoutées. Les constantes ont été ajustées en se référant aux valeurs inscrites de Martell et al. (2004 – NIST) et IUPAC version 5.15 (Academic Software 2001). Les constantes de formation modifiées pour les calculs de spéciation des composés présents dans les milieux d'exposition et de culture sont présentées et comparées aux valeurs initiales présentes dans le logiciel MINEQL dans le tableau 2-2.

Tableau 2-2 Constantes de formation modifiées pour les calculs de spéciation

Forme	Log K		Forme	Log K	
	Initial	Modifié		Initial	Modifié
Zn(OH) ₂	-17,794	-16,9	NaHPO ₄	---	13,23
CdH[EDTA]	21,5	21,6	CdHPO ₄	---	16,17
FeHPO ₄	22,292	22,48	KOH	---	-13,78
H ₄ [EDTA]	22,5	23,48	NaOH	---	-13,9
H ₅ [EDTA]	24	25	Mn ₂ OH	---	-7,2
CuCl ₂	-0,26	0,16	Mn ₂ (OH) ₃	---	-23,9
CoCO ₃	4,228	4,03	Mn(OH) ₂	---	-22,2
MgPO ₄	4,654	6,59	MnHPO ₄	---	15,96
Na[EDTA]	2,7	3,29	NaPO ₄	---	1,43
CdH ₂ EDTA	---	23,48	NaH ₂ PO ₄	---	19,9
ZnH ₂ EDTA	---	22,92	Na ₂ PO ₄	---	2,59
NaNO ₃	---	-0,55	Na ₂ HPO ₄	---	13,32
KNO ₃	---	-0,19	ZnH ₂ PO ₄	---	21,2
CaCl	---	0,64	KPO ₄	---	1,37
KCl	---	-0,5	KH ₂ PO ₄	---	19,9
MgCl	---	0,6	K ₂ PO ₄	---	2,2
NaCl	---	-0,5	K ₂ HPO ₄	---	13,44
CuHPO ₄	---	16,46	CuH ₂ PO ₄	---	21,3
ZnHPO ₄	---	15,66	Zn(CO ₃) ₂	---	7,3
MgH ₂ PO ₄	---	21,07	---	---	

2.3 Milieux de culture et de rinçage

Tel que recommandé par le protocole du CEAEQ (2003), les milieux de culture et de rinçage des algues étaient préparés à partir de solutions concentrées d'éléments nutritifs et de micronutriments. Les solutions étaient préparées et conservées dans des contenants en Téflon® ou en HDPE (Polyéthylène à haute densité). Les constituants des sept solutions concentrées sont présentés dans le tableau 2-3.

La solution 4 (métaux) était préparée à partir de quatre solutions concentrées de zinc, cobalt, molybdène et cuivre (tableau 2-3). Pour constituer la solution 4, 1 mL des solutions 4a (zinc), 4b (cobalt), 4c (molybdène) et 4d (cuivre) étaient ajoutés à la solution 4 en plus des autres composés cités dans le tableau 2-3. Toutes les solutions de métaux étaient conservées dans des contenants en Téflon®.

Tableau 2-3 Concentrations des éléments dans les solutions concentrées utilisées pour préparer les milieux de culture, de rinçage et d'exposition (CEAEQ 2003).

Identification des Solutions	Composé	Concentration
		(M)
1	NaNO ₃	3,00 x 10 ⁻¹
2	MgCl ₂ ·6H ₂ O	6,00 x 10 ⁻²
3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,00 x 10 ⁻²
4	H ₃ BO ₃	3,00 x 10 ⁻³
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	2,10 x 10 ⁻³
	ZnCl ₂	2,41 x 10 ⁻⁵
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	5,91 x 10 ⁻⁴
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	6,00 x 10 ⁻⁶
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	3,00 x 10 ⁻⁵
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	7,04 x 10 ⁻⁸
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O*	8,10 x 10 ⁻⁴
5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	6,00 x 10 ⁻²
6	K ₂ HPO ₄	5,97 x 10 ⁻³
7	NaHCO ₃	1,79 x 10 ⁻¹
4a	ZnCl ₂	1,20 x 10 ⁻²
4b	CoCl ₂ ·6H ₂ O	3,00 x 10 ⁻³
4c	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,50 x 10 ⁻²
4d	CuCl ₂ ·2H ₂ O	5,52 x 10 ⁻⁵

Note : *Lorsque présent dans les milieux

Les solutions étaient filtrées sur une membrane 0,2 µm (membrane Isopore, polycarbonate, Millipore) et conservées au maximum six mois à 4 °C et à l'obscurité.

2.3.1 Milieu de culture

Les milieux de culture utilisés dans le cadre des travaux de recherche étaient ceux prescrits par le MDDEP (CEAEQ 2003), auxquels certaines modifications ont été apportées au besoin. Afin de préparer les milieux de culture, 1 mL de chacune des

solutions concentrées présentées à la précédente section (2.3) était ajouté à approximativement 900 mL d'eau ultra-pure (~ 18 Mohms·cm) en agitant la solution entre chaque ajout. Après ajout d'eau ultra-pure (~ 40 mL), le pH était ajusté à $7,0 \pm 0,10$ unités avec du HCl (0,10 M) ou du NaOH (0,10 M ; Aristar, BDH) et le volume ajusté à 1 L. Le milieu était ensuite passé à l'autoclave pendant 15 min à 121 °C. Les milieux n'étaient pas conservés pendant plus de deux mois après leur préparation. Ils étaient conservés à 4 °C et à l'obscurité dans des erlenmeyers en polycarbonate (Nalgene).

Afin de minimiser les risques de faux positifs ou de faux négatifs attribuables à un stress pour les algues, ces dernières étaient acclimatées aux conditions d'exposition (sans ajout de cadmium) pendant trois générations (périodes de ~5 jours).

Lors des expériences traitant de l'effet de la présence d'un tampon, de l'EDTA ($1,0 \times 10^{-6}$ M) a été utilisé afin de mieux contrôler les concentrations en oligo-éléments et en cadmium en solution. Lors des expériences traitant de l'effet de la dureté et des expériences traitant de l'effet des concentrations en oligo-éléments, le tampon MOPS (10^{-2} M) a été utilisé afin de maintenir le pH et de favoriser le maintien constant de la spéciation des métaux dans le milieu d'exposition. L'EDTA a également été utilisé lors de ces expérimentations, pour les raisons pré-mentionnées.

2.3.2 Milieu de rinçage

Les milieux de rinçage utilisés lors des filtrations (voir figure 2-3) étaient préparés de façon similaire aux milieux de culture à la différence qu'elles ne contenaient pas de métaux. Les milieux utilisés sont présentés au tableau 2-4.

Tableau 2-4 : Concentrations des éléments dans les milieux de culture, d'exposition et de rinçage utilisés (CEAEQ 2003).

Élément	Concentrations			
	Milieu de culture	Milieu d'exposition	Milieu de rinçage	Solution de rinçage (EDTA)
	(mol·L ⁻¹)	(mol·L ⁻¹)	(mol·L ⁻¹)	(mol·L ⁻¹)
N ¹ total, dans les milieux avec EDTA	3,016 x 10 ⁻⁴	1,885 x 10 ⁻⁴	---	---
N ¹ total, dans les milieux sans EDTA	3,000 x 10 ⁻⁴	1,875 x 10 ⁻⁴	1,875 x 10 ⁻⁴	---
Mg	1,195 x 10 ⁻⁴	7,466 x 10 ⁻⁵	7,466 x 10 ⁻⁵	---
Ca	2,993 x 10 ⁻⁵	1,871 x 10 ⁻⁵	1,871 x 10 ⁻⁵	---
S	5,964 x 10 ⁻⁵	3,728 x 10 ⁻⁵	3,728 x 10 ⁻⁵	---
P	5,971 x 10 ⁻⁶	3,732 x 10 ⁻⁶	3,732 x 10 ⁻⁶	---
Na	4,803 x 10 ⁻⁴	3,002 x 10 ⁻⁴	3,002 x 10 ⁻⁴	---
B	3,002 x 10 ⁻⁶	1,876 x 10 ⁻⁶	---	---
Mn	2,102 x 10 ⁻⁶	1,314 x 10 ⁻⁶	---	---
Zn	2,407 x 10 ⁻⁸	1,504 x 10 ⁻⁸	---	---
Co	6,002 x 10 ⁻⁹	3,751 x 10 ⁻⁹	---	---
Cu	7,039 x 10 ⁻¹¹	4,399 x 10 ⁻¹¹	---	---
Mo	3,001 x 10 ⁻⁸	1,875 x 10 ⁻⁸	---	---
Fe	5,912 x 10 ⁻⁷	3,695 x 10 ⁻⁷	---	---
C	1,786 x 10 ⁻⁴	1,116 x 10 ⁻⁴	1,116 x 10 ⁻⁴	---
K	1,194 x 10 ⁻⁵	7,464 x 10 ⁻⁶	7,464 x 10 ⁻⁶	---
Cl	7,010 x 10 ⁻⁵	4,381 x 10 ⁻⁵	4,004 x 10 ⁻⁵	---
EDTA ^{4*}	8,103 x 10 ⁻⁷	1,000 x 10 ⁻⁶	---	2,00 x 10 ⁻⁴
HEPES *	1,000 x 10 ⁻²	6,250 x 10 ⁻³	6,250 x 10 ⁻³	---
MOPS *	1,000 x 10 ⁻²	6,250 x 10 ⁻³	6,250 x 10 ⁻³	---

Note :

¹ Les deux atomes d'azote de l'EDTA sont inclus dans la concentration indiquée.

* Lorsque présent dans les milieux.

2.4 Équipements, produits, réactifs et eau-ultra pure

Les milieux de culture, de rinçage et d'exposition de même que les solutions concentrées ont tous été préparés à partir d'eau ultra pure (~ 18 Mohms·cm). Les solutions concentrées étaient filtrées à l'aide de filtres 0,2 µm (membrane Isopore, polycarbonate, Millipore) et de tulipes en polycarbonate (Nalgene). Les milieux de culture, d'exposition et de rinçage étaient stérilisés à l'autoclave pendant 15 min à 121 °C. Les oligo-éléments, l'EDTA et si applicable le cadmium étaient ajoutés 24 h après la stérilisation, une fois les milieux à la température de la pièce. Tous les composés (sels) utilisés pour fabriquer les milieux et solutions étaient au minimum de grade analytique. Les contenants utilisés étaient en Téflon[®], en HDPE ou en polycarbonate. Les solutions de cadmium radioactif, d'oligo-éléments et les milieux d'exposition étaient conservées dans des contenants en Téflon[®]. Les milieux de culture et de rinçage étaient conservés dans des contenants en polycarbonate. Tous les contenants et le matériel réutilisable (embouts de pipettes, agitateurs magnétiques, etc.) utilisés étaient trempés dans l'acide nitrique (10 %) pendant un minimum de 8 h et lavés intensivement 5 fois à l'eau distillée puis 2 fois à l'eau ultra-pure, laissés à tremper pendant 24 h dans l'eau ultra-pure puis séchés sous une hotte à flux laminaire.

Lors des décomptes cellulaires, une solution isotonique (Isoton III[®]) était utilisée. En cas de besoin (non-disponibilité d'Isoton III[®]), la solution pouvait également être fabriquée tel que décrit par le CEAEQ (2003). Des expériences préliminaires ont démontré que les comptes cellulaires effectuées avec l'Isoton III[®] ou la solution isotonique prescrite par le CEAEQ ne comportaient pas de différences significatives, sauf que la solution isotonique du CEAEQ permettait d'obtenir un plus faible bruit de fond sur les lectures faites par le compteur de particules utilisé (Beckman Multisizer[™] 3 Coulter Counter[®]).

Lors des expériences de toxicité, le cadmium utilisé était en partie composé de cadmium radioactif. Le ¹⁰⁹Cd a été utilisé de façon à définir précisément les concentrations en cadmium présentes dans les milieux d'exposition de même que les quotas intracellulaires de cadmium. La solution de cadmium chaud (¹⁰⁹Cd ; solution mère) utilisée était composée de chlorure de cadmium dans une solution de 0,1 N d'acide chlorhydrique en

provenance de Amersham. La solution mère avait une radioactivité de 1 mCi (37 MBq ; $0,83 \text{ mCi}\cdot\text{mL}^{-1}$) et une concentration en cadmium de $1,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Le ^{109}Cd possède une demi-vie de 462,3 jours et dans nos expériences l'activité spécifique initiale était de $754,54 \text{ mCi}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Une quantité connue ($\sim 0,500$ à $0,700 \text{ g}$) de solution mère de même qu'une faible quantité de solution étalon ICP (1000 ppm Cd dans HNO_3 2 % Perkin-Elmer; $\sim 0,600$ à $2,000 \text{ g}$) était transférée dans un contenant de 100 mL en Téflon[®]. Un volume d'eau ultrapure (18 Mohms·cm) précis était ajouté de façon à compléter la solution à $\sim 30,0 \text{ mL}$. Les masses utilisées de la solution mère de ^{109}Cd , de solution étalon en Cd et d'eau ultrapure étaient mesurées précisément ($\pm 0,0001 \text{ g}$) de façon à connaître la concentration précise de cadmium total et chaud des solutions intermédiaires. Ces solutions intermédiaires de ^{109}Cd étaient ensuite utilisées pour constituer les milieux d'exposition, tels que décrits dans la section ci-après.

Afin d'obtenir les concentrations désirées en cuivre, fer et zinc ioniques libres lors des expériences de toxicité, des solutions concentrées en ces éléments ont été préparées dans des contenants de 500 mL en Téflon[®]. Les solutions ont été préparées à partir de solutions étalon (1000 ppm Cu, Fe ou Zn dans HNO_3 2 % Perkin-Elmer). Le volume nécessaire de la solution étalon était ajouté à $\sim 250 \text{ mL}$ d'eau ultrapure ($\sim 18 \text{ Mohms}\cdot\text{cm}$), la solution était acidifiée (2 % m / v HNO_3 ; Fisher Scientific, grade métal trace) et son volume ajustée à 500 mL avec de l'eau ultra-pure. Les concentrations en cuivre, fer et zinc des trois solutions ainsi obtenues étaient respectivement de 15,7 nM Cu, 17,9 nM Fe et 15,3 nM Zn.

2.5 Méthodologie expérimentale

2.5.1 Expériences de toxicité

Le tableau 2-5 présente les principales expériences effectuées dans le cadre de nos travaux et les caractéristiques des milieux d'exposition afférents.

Tableau 2-5 Principales expériences de toxicité et caractéristiques des milieux d'exposition utilisés.

No	Caractéristiques des milieux d'exposition
Expérience de départ; CEAEQ (2003)	
1	Milieu de référence (CEAEQ 2005); [Ca] = 18,7 µM et [Mg ²⁺] = 74,7 µM
1^{er} objectif : ajout d'un chélate, l'EDTA	
2	Milieu 1 + 1,0 µM EDTA
2^e objectif : ajout d'un tampon pH	
3A	Milieu 2, pH ajusté à 7,0
3B	Milieu 2 + 10 mM HEPES
3C	Milieu 2 10 mM MOPS
3^e objectif : modification de la dureté; concentration en Mg	
4A	Milieu 3C, [Mg ²⁺] = 289 µM
4B	Milieu 3C, [Mg ²⁺] = 41,1 µM
3^e objectif : modification de la dureté; concentration en Ca	
5A	Milieu 3C, [Ca ²⁺] = 125 µM, [Cu ²⁺], [Fe ³⁺] et [Zn ²⁺] ajustées
5B	Milieu 3C, [Ca ²⁺] = 425 µM, [Cu ²⁺], [Fe ³⁺] et [Zn ²⁺] ajustées
5C	Milieu 3C, [Ca ²⁺] = 1420 µM, [Cu ²⁺], [Fe ³⁺] et [Zn ²⁺] ajustées
5D	Milieu 3C, [Ca ²⁺] = 2920 µM, [Cu ²⁺], [Fe ³⁺] et [Zn ²⁺] ajustées
5E	Milieu 3C, [Ca ²⁺] = 5920 µM, [Cu ²⁺], [Fe ³⁺] et [Zn ²⁺] ajustées
3^e objectif : modification de la dureté; concentrations en Cu²⁺, Fe³⁺ et Zn²⁺	
6	Milieu 3C, [Ca ²⁺] = 5920 µM, [Cu ²⁺], [Fe ³⁺] et [Zn ²⁺] non ajustées
7A	Milieu 3C, [Ca ²⁺] = 5920 µM, [Fe ³⁺] et [Zn ²⁺] ajustées
7B	Milieu 3C, [Ca ²⁺] = 5920 µM, [Cu ²⁺] et [Fe ³⁺] ajustées
7C	Milieu 3C, [Ca ²⁺] = 5920 µM, [Cu ²⁺] et [Zn ²⁺] ajustées

Lors de nos tests de toxicité, afin de s'assurer que les algues soient approximativement au même stade physiologique, 96 h avant le début de l'exposition nous avons transféré 2 mL d'une culture âgée de 4 ou 5 jours dans un erlenmeyer de 250 mL en verre contenant approximativement 100 mL de milieu stérile. Pendant la phase initiale de croissance de cette culture, les milieux d'exposition étaient préparés. Le pH de ces milieux était ajusté à $7,00 \pm 0,1$ avec une solution de HCl (0,1 N) et/ou de NaOH (0,1 N), 24 h avant le début de la période d'exposition. Le pH était vérifié à nouveau avant l'inoculation des algues et ajusté à nouveau si nécessaire.

Pour fins d'analyse au compteur gamma, 1 mL de chacun des milieux était prélevé afin de confirmer les concentrations en cadmium dans les milieux d'exposition (y compris le témoin). Les solutions d'exposition étaient conservées dans des bouteilles en Téflon la nuit durant. Le lendemain, après avoir vérifié à nouveau le pH, les milieux étaient séparés en triplicatas (70 mL chacun) avant l'inoculation.

Le milieu concentré initié 96 h auparavant était transféré en volumes égaux dans quatre tubes à centrifuger (± 20 mL). Ces tubes étaient par la suite centrifugés à 12 000 rpm pendant 5 min à 20 °C. Le surnageant était jeté, en prenant soin de ne pas perdre la pastille d'algues. Les algues étaient remises en suspension dans 5 mL de milieu de culture puis transférées dans un seul tube qui était centrifugé à nouveau (20 °C, 12 000 rpm pendant 5 min). Le surnageant était à nouveau jeté et les algues remises en suspension, mais cette fois dans 10 mL de milieu de culture.

Un volume de 100 μ L de cette solution algale concentrée était prélevé et ajouté à 9,90 mL d'Isoton avant d'être analysé au compteur de particules. À l'aide de la relation 2.1, le volume nécessaire pour obtenir une densité initiale de 10 000 cellules \cdot mL⁻¹ était déterminé :

Équation 2.1
$$C_1V_1 = C_2V_2$$

où : C_1 = concentration en algues déterminée à l'aide du compteur de particules;

V_1 = volume de l'inoculum désiré;

C_2 = concentration souhaitée en algues (10 000 cellules \cdot mL⁻¹); et

V_2 = volume total dans le triplicata (70 mL).

Le volume d'inoculum calculé (V_1) était introduit dans chaque réplicat dans le plus court laps de temps possible. Les échantillons étaient placés dans une chambre environnementale (Conviro) sur la plaque agitatrice pendant 5 min et agités doucement afin de s'assurer qu'ils étaient homogènes. Les échantillons étaient ensuite ramenés sous la hotte à flux laminaire et 1 mL de chaque réplicat était transféré dans un flacon de polystyrène (Dilu-Vial®) contenant 9 mL d'Isoton. Ce temps était marqué comme étant le

t_0 . Les répliquats étaient ramenés dans le Conviron, placés de façon aléatoire sur la plaque et incubés.

Le contenu des flacons était analysé au compteur de particules après un léger brassage (pour ne pas endommager les cellules et induire la présence de bulles qui pourraient biaiser l'analyse). À chaque trois échantillons analysés, les flacons en attente d'être analysés étaient brassés légèrement afin d'éviter tout dépôt d'algues dans le fond du contenant. Pour chaque concentration à l'étude, le diamètre, la surface et le volume algal étaient notés. La densité algale était mesurée à 24, 36, 48, 60, 72, 84 et 96 h. Après 96 h d'exposition le pH des milieux était mesuré de même qu'à 24, 36, 48, 60, 72 et 84 h (pour les expériences 1, 2, 3B et 3C; voir le tableau 2-5) et à 12, 24, 36, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84 et 90 h (pour l'expérience 3A; voir le tableau 2-5). Pour les expériences 1 à 3C, lorsque le pH avait varié de plus de 0,2 unité de pH en cours d'expérience, il était ajusté à $7,0 \pm 0,1$ avec une solution de HCl (0,1 N) et/ou de NaOH (0,1 N).

2.5.2 Mesures de prise en charge

Les expériences de toxicité ont été réalisées de façon à mesurer la toxicité du cadmium en solution mais également afin de déterminer la prise en charge du cadmium par les algues. C'est particulièrement dans cette optique que le cadmium utilisé était composé en partie de cadmium radioactif (^{109}Cd ; voir section 2.4).

Les milieux d'exposition étaient filtrés sur des filtres 2,0 μm (membrane Isopore, polycarbonate, Millipore) insérés dans des tulipes à filtration en polycarbonate (Nalgene). Le volume utilisé pour la filtration des milieux d'exposition était défini selon la concentration algale maximale mesurée dans les milieux, de façon à ne pas bloquer les filtres (obstruction vers 8×10^6 algues). Généralement, un volume de 7 mL était utilisé pour la filtration.

Dans chaque tulipe, deux filtres étaient superposés. Le filtrat (milieu d'exposition sans algues) était recueilli dans des contenants de 100 mL en HDPE. Une portion (1 mL) du filtrat était transférée dans des contenants de 5 mL en borosilicate (Opticlear) et analysée à

l'aide du compteur gamma (Wallac 1480 Wizard™ 3"). Ensuite une solution de rinçage d'EDTA (5 mL, 2×10^{-4} M) était ajoutée dans les tulipes et laissée en contact avec les algues pendant 10 min. Après ce temps, le vide était appliqué et les algues rincées avec 5 mL supplémentaire de la solution d'EDTA. Ce deuxième filtrat était recueilli dans des contenants de 50 mL en HDPE; 1 mL de ce filtrat (contenant l'EDTA et le cadmium anciennement lié à la surface des cellules) était transféré dans des contenants de 5 mL en borosilicate (Opticlear) et analysé à l'aide du compteur gamma.

Après l'étape d'extraction / lessivage avec l'EDTA, 5 mL d'une solution du milieu d'exposition sans métaux et sans EDTA étaient ajoutés dans les tulipes et laissés en contact avec les algues pendant 10 s. Après ce temps, le vide était appliqué et les algues rincées à deux reprises avec 5 mL supplémentaires du milieu d'exposition sans métaux et sans EDTA. Ceci permettait d'éliminer les restes de la solution d'EDTA (et possiblement des traces de cadmium) sur les filtres de façon à réduire les interférences dans les mesures de cadmium intracellulaire.

Les filtres étaient ensuite séparés et transférés individuellement dans un contenant de 5 mL en borosilicate (Opticlear). De l'eau ultra-pure (2 mL) était ajoutée dans les contenants de façon à uniformiser le contenu et les filtres étaient analysés à l'aide du compteur gamma. Le filtre du dessus retenait les algues contenues dans le milieu d'exposition, alors que celui du dessous était utilisé pour mesurer le bruit de fond associé aux manipulations (adsorption du ^{109}Cd sur le filtre) et au compteur gamma. Le schéma expérimental général est présenté à la figure 2-3.

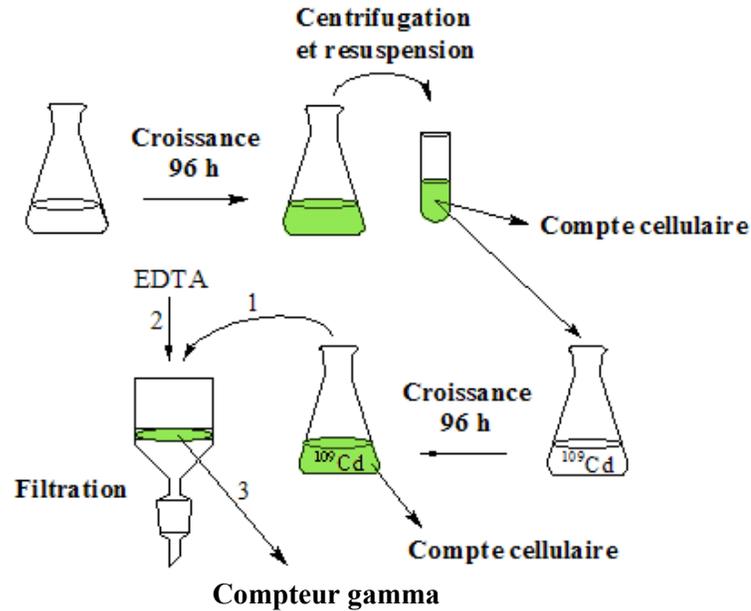


Figure 2-3 Schéma expérimental général des expériences de toxicité.

2.5.3 Expériences de toxicité à pH ajusté sans tampon

En plus des étapes décrites en 2.5.1, lorsque nécessaire le pH dans les milieux était ajusté manuellement à $7,0 \pm 0,1$ avec des solutions de HCl (0,1 N) et de NaOH (0,1 N) après 12, 24, 36, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84 et 90 h d'exposition. Ces expériences sont identifiées « 3A » dans le tableau 2-5.

2.5.4 Expériences de toxicité avec modification de la dureté

Les algues utilisées lors de ces tests étaient acclimatées à la dureté définie pour l'exposition pendant trois repiquages avant de procéder aux expériences de toxicité.

Deux concentrations en magnésium libre ont été ciblées en fonction des données recueillies par le COREM, soit la concentration en Mg^{2+} maximale ($2,89 \times 10^{-4}$ M) (expérience 4A, tableau 2-5) et la concentration minimale ($4,11 \times 10^{-5}$ M) (expérience 4B, tableau 2-5) retrouvées dans les échantillons analysés des trois rivières influencées par des effluents miniers (Olsen et al. 2004). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec la

concentration en magnésium libre recommandée par le CEAEQ soit $7,46 \times 10^{-5}$ M de Mg^{2+} (expérience 3C, tableau 2-5). La concentration en Ca^{2+} utilisée lors de ces expériences était de $1,85 \times 10^{-5}$ M.

Pour les expériences de toxicité sur l'effet de la concentration en calcium libre sur la réponse toxique, cinq valeurs de calcium libre ont été ciblées en fonction des données recueillies par le COREM (Olsen et al. 2004). Les réponses toxiques obtenues à des concentrations en calcium libre de $1,25 \times 10^{-4}$ (expérience 5A, tableau 2-5), $4,25 \times 10^{-4}$ (expérience 5B, tableau 2-5), $1,42 \times 10^{-3}$ (expérience 5C, tableau 2-5), $2,92 \times 10^{-3}$ (expérience 5D, tableau 2-5) et $5,92 \times 10^{-3}$ M (expérience 5E, tableau 2-5) ont été comparées à celles obtenues avec la concentration recommandée par le CEAEQ, soit $1,85 \times 10^{-5}$ M de Ca^{2+} (expérience 3C, tableau 2-5). La concentration en Mg^{2+} utilisée lors de ces expériences de toxicité était de $7,47 \times 10^{-5}$ M. Les concentrations en Ca^{2+} et en Mg^{2+} étaient ajustées en ajoutant en solution du $CaCl_2$ ou du $MgCl_2$ (Fisher Scientific, grade ACS) selon le cas. Le tableau 2-6 présente les détails de ces expériences avec le calcium et le magnésium.

Tableau 2-6 Concentration totales et ioniques libres en calcium et magnésium dans les milieux d'exposition des expériences de toxicité avec modification de la dureté (simulations faites avec MINEQL; exemples donnés pour des solutions sans ajout de cadmium).

Milieux et paramètres modifiés	Concentrations en éléments		Concentrations en ions libres		Dureté
	[Ca]	[Mg]	[Ca ²⁺]	[Mg ²⁺]	
	(M)	(M)	(M)	(M)	(méq·L ⁻¹) CaCO ₃
Milieu de culture du CEAEQ, voir tableau 2-4	$3,11 \times 10^{-4}$	$1,20 \times 10^{-3}$	$3,00 \times 10^{-4}$	$1,19 \times 10^{-3}$	15,0
Milieu d'exposition du CEAEQ, exp. 3C	$1,98 \times 10^{-5}$	$7,52 \times 10^{-5}$	$1,87 \times 10^{-5}$	$7,47 \times 10^{-5}$	9,3
Milieu d'exposition, $\pm 0,5 \times [Mg^{2+}]$, exp. 4A	$1,87 \times 10^{-5}$	$4,14 \times 10^{-5}$	$1,87 \times 10^{-5}$	$4,11 \times 10^{-5}$	6,0
Milieu d'exposition, $\pm 4 \times [Mg^{2+}]$, exp. 4B	$1,89 \times 10^{-5}$	$2,91 \times 10^{-4}$	$1,87 \times 10^{-5}$	$2,89 \times 10^{-4}$	30,8
Milieu d'exposition, $\pm 7 \times [Ca^{2+}]$, exp.5A	$1,26 \times 10^{-4}$	$7,51 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-4}$	$7,47 \times 10^{-5}$	20,0
Milieu d'exposition, $\pm 23 \times [Ca^{2+}]$, exp.5B	$4,29 \times 10^{-4}$	$7,53 \times 10^{-5}$	$4,25 \times 10^{-4}$	$7,47 \times 10^{-5}$	50,0
Milieu d'exposition, $\pm 78 \times [Ca^{2+}]$, exp.5C	$1,42 \times 10^{-3}$	$7,56 \times 10^{-5}$	$1,45 \times 10^{-3}$	$7,47 \times 10^{-5}$	150,0
Milieu d'exposition, $\pm 156 \times [Ca^{2+}]$, exp.5D	$2,99 \times 10^{-3}$	$7,61 \times 10^{-5}$	$2,92 \times 10^{-3}$	$7,47 \times 10^{-5}$	300,0
Milieu d'exposition, $\pm 317 \times [Ca^{2+}]$, exp.5E	$6,11 \times 10^{-3}$	$7,68 \times 10^{-5}$	$5,92 \times 10^{-3}$	$7,47 \times 10^{-5}$	600,0

2.5.5 Considérations pour les expériences de toxicité avec modification des concentrations en micro-éléments

Les modélisations avec le logiciel MINEQL ont permis de constater qu'en augmentant la concentration en calcium dans les milieux d'exposition, et en présence de cadmium en solution, les concentrations de certains micro-éléments (Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} libres) augmentaient de beaucoup en comparaison avec les concentrations « normales » dans le milieu CEAEQ. En effet, avec l'augmentation de la concentration de calcium dans le milieu d'exposition, surtout pour des concentrations en calcium élevées, l'EDTA se lie de façon prédominante au calcium et au cadmium, ce qui a pour effet de libérer des ions Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} dans le milieu. Bien que les concentrations en fer demeurent faibles (1×10^{-17} M), elles sont tout de même grandement augmentées comparativement à celles qui se retrouvent dans les conditions d'exposition « usuelles » (10^{-23} M; facteur 10^6). Un effet similaire est observé au niveau des concentrations en cuivre. Dans les conditions de base, les concentrations en Cu^{2+} libre sont de $5,91 \times 10^{-16}$ M et elles augmentent jusqu'à $1,27 \times 10^{-13}$ M en présence de $6,11 \times 10^{-3}$ M Ca. Il en va de même pour le zinc; la concentration dans le milieu CEAEQ est de $1,2 \times 10^{-12}$ M, et elle augmente jusqu'à des concentrations de 7×10^{-9} M, dans les milieux avec la concentrations maximales de calcium ($6,11 \times 10^{-3}$ M). Ces concentrations pourraient avoir un effet direct sur la croissance de l'algue et la réponse toxique apparente de l'algue au cadmium.

Afin d'éviter toute influence de ces modifications sur la réponse toxique et pouvoir interpréter avec plus de certitude les effets éventuels d'une variation de la dureté sur la réponse toxique au cadmium de *Pseudokirchneriella subcapitata*, il a été décidé que ces concentrations en micro-éléments devaient être maintenues constantes, dans la mesure du possible.

Les modélisations effectuées avec MINEQL ont permis d'observer qu'en augmentant la concentration en EDTA dans les milieux riches en calcium, la diminution de la concentration en Zn libre n'était pas suffisante pour ramener la concentration en Zn^{2+} libre à $1,2 \times 10^{-12}$ M Zn^{2+} , soit la concentration dans le milieu CEAEQ (2003). Une augmentation de la concentration en EDTA supérieure à $1,8 \mu\text{M}$ n'avait qu'un effet très

restreint sur la concentration de Zn libre du milieu. Une variation de la concentration en EDTA ne semblait donc pas appropriée dans le cas présent pour ajuster la concentration en Zn libre du milieu.

Afin de reproduire le plus fidèlement possible les conditions d'exposition au cadmium, une diminution des concentrations totales en cuivre, fer et zinc a ainsi été utilisée (expériences 5A à 5E et 7A à 7C). Dans ces conditions, les concentrations ioniques libres de ces éléments diminuent également. Bien que les concentrations totales aient du être diminuées d'un facteur avoisinant 10^3 , il est peu probable que ceci résulte en une déficience en ces oligo-éléments pour les algues. En effet, puisque la concentration de M^{z+} est \sim constante, il ne devrait pas y avoir d'effet sur la nutrition des algues.

2.5.6 Dosage du cadmium (^{109}Cd)

Les concentrations en cadmium en solution et les quotas cellulaires de cadmium étaient déterminées en mesurant l'activité du radio-isotope 109 du cadmium à l'aide d'un compteur gamma (Wallac 1480 Wizard™ 3").

2.5.6.1 Efficacité du compteur gamma

L'efficacité du compteur a été déterminée en diluant la source originale à trois concentrations différentes. Une efficacité de $37,3 \pm 0,4 \%$ a été définie pour le cadmium. La fenêtre de comptage utilisée était située entre 16 et 36 keV, en considérant que seul le cadmium était dosé (pic principal à 22 keV). Le protocole de comptage était défini de manière à ce qu'après un temps maximal de 2 000 s ou dès l'atteinte d'un compte total de 1×10^5 , le compteur passait à l'échantillon suivant. Dans de telles conditions, l'erreur de comptage sur la mesure de la radioactivité était relativement faible ($< 5 \%$).

2.5.6.2 Calculs de concentrations et quotas en cadmium

Le compteur gamma donne des résultats en comptes par minute (CPM). En divisant le nombre de CPM obtenu par l'efficacité du compteur (%), un nombre de désintégrations par min est obtenu (DPM). En divisant ensuite ce nombre par 2220 ($\text{DPM} \cdot \text{nCi}^{-1}$) l'activité

est exprimée en nCi. En considérant la désintégration naturelle du cadmium, il est nécessaire de calculer l'activité spécifique corrigée pour la décroissance radioactive à partir de l'équation 2.2 :

Équation 2.2
$$N = N_0 \cdot e^{-\frac{\ln 2 \cdot t}{t_{1/2}}}$$

où : t = temps;

N = activité à t (temps);

N₀ = activité à t = 0; et

t_{1/2} = demi-vie du ¹⁰⁹Cd soit 462,3 jours.

En considérant une activité spécifique (N₀) de 754,54 mCi·mg⁻¹ (Amersham, 1 mCi) l'activité à un temps t est calculée selon la décroissance radioactive. La quantité totale de cadmium (nmol) pouvait ensuite être définie en tenant compte de l'activité spécifique au temps t de ¹⁰⁹Cd en solution, soit la concentration de ¹⁰⁹Cd par rapport à la concentration en cadmium total.

Pour les calculs de quotas internes de cadmium, la quantité totale de cadmium retenue sur le filtre après rinçage avec la solution d'EDTA (2 x 10⁻⁴ M) était exprimée en fonction de la quantité d'algues contenues dans les échantillons soumis à l'analyse. Cette dernière était calculée en fonction de la concentration algale en solution et du volume de solution utilisé lors de la filtration des milieux d'exposition à la fin des périodes d'exposition.

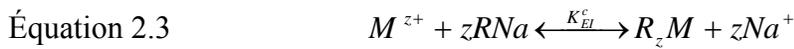
2.6 Technique d'échange ionique (TÉI)

La méthode utilisée pour déterminer la spéciation de cadmium en solution est celle décrite par Fortin et Campbell (1998). Cette méthode est utilisée pour doser l'ion métallique libre de métal en solution. Lors de nos expériences, la TÉI permettait de valider les calculs théoriques de concentrations de l'ion libre en solution effectués avec MINEQL. En considérant l'importance accordée à l'ion métallique libre (M^{Z+}) dans les milieux d'exposition (voir section 1.2.3), il nous apparaissait essentiel de procéder à cette

vérification, surtout pour les milieux récupérés à la fin de l'exposition (présence possible d'exsudats).

2.6.1 Théorie

Selon les principes de la T^ÉI, un équilibre est atteint entre la résine échangeuse d'ions (liée à des ions sodium) et un métal M^{z+} à l'état de trace, selon la réaction suivante (équation 2.3).



où : R = résine;

RNA = site de liaison sur la résine occupé par un ion Na^+ ;

R_zM = site(s) de liaison sur la résine occupé(s) par un ion métallique trace M^{z+} ;

z = nombre de sites de liaison sur la résine impliqués dans la liaison de M^{z+} .

La constante d'équilibre K_{EI}^c est décrite selon l'équation 2.4 :

Équation 2.4
$$K_{IE}^c = \frac{[R_zM] \cdot [Na^+]^z}{[M^{z+}] \cdot [RNA]^z}$$

En présence d'une concentration suffisante d'un électrolyte fort tel que le $NaNO_3$, les concentrations de sodium en solution $[Na^+]$ et sur la résine $[RNA]$ ne seront pas significativement affectées par la liaison des métaux à l'état de traces sur la résine. En considérant les faibles concentrations de l'ion métallique (M^{z+}), par rapport à celle de Na^+ , l'occupation des sites de liaison sur la résine par M^{z+} sera inférieure à 1% du total des sites (c'est-à-dire, $[RNA] \gg [R_zM]$). À un pH et une force ionique fixes, l'équation 2.4 peut donc être réarrangée pour donner un coefficient de distribution $\lambda_{o,i,pH}$ (en $L \cdot g^{-1}$) spécifique au métal à l'étude.

Équation 2.5
$$\lambda_{o,i,pH} = K_{IE}^c \frac{[RNA]^z}{[Na^+]^z} = \frac{[R_zM]}{[M^{z+}]}$$

Ce coefficient de distribution peut être déterminé en utilisant une solution d'une concentration connue de métal libre en solution (M^{z+}). En éluant la résine avec un volume V d'acide fort, le métal lié à la résine peut être mesuré dans l'éluat. En connaissant la quantité de résine utilisée (m_r) et la concentration de métal dans l'éluat, l'équation 2.6 peut être utilisée pour calculer $[R_zM]$.

$$\text{Équation 2.6} \quad [R_zM] = \frac{[M_{\text{Éluat}}] * V}{m_r}$$

En combinant et en réarrangeant les équations 2.5 et 2.6, il est possible d'obtenir une relation (équation 2.7), qui décrit la concentration de l'ion libre en solution (M^{z+}) en fonction de la concentration du métal dans l'éluat ($M_{\text{Éluat}}$) et ainsi de calculer la concentration de l'ion M^{z+} en solution.

$$\text{Équation 2.7} \quad [M^{z+}] = \frac{[M_{\text{Éluat}}] * V}{\lambda_{o,i,pH} * m_r}$$

2.6.2 Équipement, produits et réactifs

Toutes les solutions ont été préparées à partir d'eau ultra-pure (~ 18 Mohms·cm) et filtrées avec des filtres $0,2 \mu\text{m}$ (membrane Isopore, polycarbonate, Millipore). De l'hydroxyde de sodium (Aristar) a été utilisée pour préparer la solution de conditionnement de la résine sous forme sodique. Le nitrate de sodium (BHD AnalaR) a servi pour préparer la solution servant à augmenter la force ionique ($0,20$ M) des solutions d'équilibration et de cadmium. L'acide nitrique utilisé pour la solution d'éluat était de grade « métal trace » (Fisher).

Les colonnes d'échange ionique ont été fabriquées à partir de résine Dowex 50W-X8 (50-100 mailles). Elles étaient préparées en insérant une section de verre fritté (porosité de $50 \mu\text{m}$, diamètre de $1,5$ mm et longueur de ~ 2 mm) dans un tube en TFE (Tétrafluoroéthylène). Cette section était chauffée afin de rétrécir le diamètre du tube à cet endroit et ainsi de fixer le verre fritté. La masse de la résine était mesurée précisément (~ 7 mg, mesurée à $\pm 0,001$ mg), mise en suspension dans de l'eau ultra-pure et injectée dans le

tube à l'aide d'une micropipette. Une seconde section de verre fritté (similaire à la précédente) était insérée dans l'autre section du tube et cette section était également chauffée en portant une attention particulière à ne pas chauffer la section contenant la résine afin de ne pas l'altérer. La résine était ainsi fixée entre deux portions de verre fritté dans le tube en TFE. L'une des extrémités du tube était reliée par des tubes en Tygon à une pompe péristaltique, alors que l'autre extrémité conduisait vers un contenant qui servait à collecter l'éluat.

Le débit de la pompe utilisée pour injecter les solutions dans le montage expérimental a été calibré en mesurant la masse d'eau ultra-pure passant par la résine en un temps donné.

2.6.3 Méthodologie expérimentale

La méthode utilisée pour déterminer la spéciation de cadmium en solution a été constante pour toute la durée des expérimentations et est celle décrite par Fortin et Campbell (1998). Des expériences préliminaires ont été effectuées avec une solution à concentration connue en Cd^{2+} (81 nM). Ces expériences ont permis de définir le coefficient de distribution $\lambda_{0,i}$, pH (en $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$). Un montage avec quatre résines en parallèle a été utilisé afin d'optimiser les expériences de TÉL.

La résine était rincée à l'eau ultra-pure ($\sim 18 \text{ Mohms}\cdot\text{cm}$) à raison de $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 8 min. La conversion de la résine sous forme sodique (RNa) était ensuite effectuée avec du NaOH (0,10 M) à un débit de $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 2 min avant d'être rincée à nouveau à l'eau ultra-pure pendant 4 min ($5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Afin de stabiliser le pH à 7,0 unités, 10 mL de NaNO_3 (0,20 M) était injectés dans la résine ($0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 2 min). Les expériences préliminaires ont démontré que cette quantité de NaNO_3 était suffisante pour obtenir un pH stable de 7,0. L'échantillon à analyser était ensuite injecté à un débit de $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 4 min (soit 20 mL de solution). De l'eau ultra-pure était injectée pendant 5 s ($5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) afin de rincer la résine et de ne pas contaminer la solution subséquente. Une petite quantité d'air était ensuite injectée ($\sim 5 \text{ s}$) afin d'expulser les dernières gouttes d'eau de la résine et de créer un marqueur permettant de suivre le mouvement de la solution suivante dans le montage expérimental. Finalement la résine

était éluée avec 2,0 mL d'une solution de HNO_3 (1,5 M) pendant 4 min ($0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). L'éluat était récupéré dans des contenants de 5 mL en borosilicate (Opticlear) pré-pesés et identifiés.

Une fois l'éluat recueilli, les contenants étaient pesés à nouveau de façon à définir la quantité exacte de solution de HNO_3 contenue dans chaque contenant. Le volume de la solution pouvait ainsi être calculé précisément en considérant la densité de l'acide nitrique ($1,055 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) et la masse de solution recueillie pour une injection donnée. Les solutions étaient ensuite analysées à l'aide d'un compteur gamma afin de déterminer le nombre de comptes par min et de calculer la concentration de cadmium dans la solution analysée. La figure 2-4 présente une schématisation simplifiée du montage expérimentale utilisé pour la TÉI.

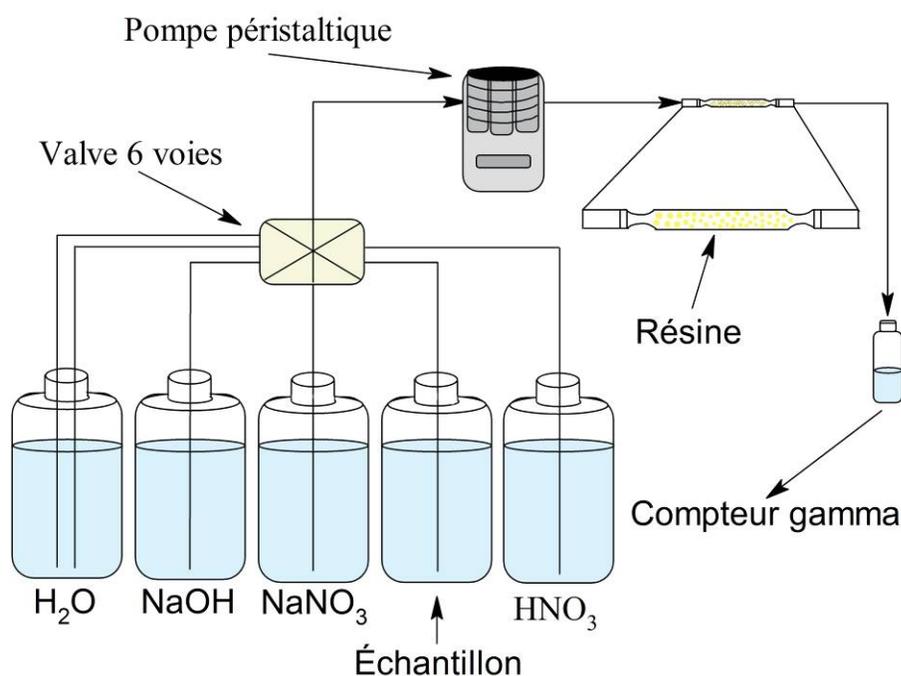


Figure 2-4 Schéma simplifié du montage expérimental utilisé pour la TÉI.

2.7 Traitement des données

2.7.1 Calcul du rendement relatif

Pour chaque milieu (réplicat) à analyser au compteur de particules, 1 mL de solution était transféré dans 9 mL d'Isoton dans un flacon Dilu-Vial®. Trois lectures étaient prises par le compteur par échantillon analysé. La moyenne de ces trois lectures était calculée, puis convertie en densité algale en considérant le facteur de conversion de l'ouverture du compteur (0,52171), tel que démontré à l'équation 2.8.

Équation 2.8
$$Densité = \frac{moyenne(comptes) \cdot 10mL}{0,52171 \cdot 1mL}$$

Une densité algale moyenne était calculée de cette manière à partir des triplicatas des densités algales mesurées pour le témoin et pour chacune des concentrations en cadmium testées. La densité cellulaire finale moyenne du témoin était utilisée comme référence. Pour chaque concentration en cadmium testée, la densité algale moyenne mesurée (à t = 96 h) était divisée par la densité algale mesurée pour le témoin. Ce ratio représentait le rendement relatif (R) qui était utilisé pour les calculs de CI₅₀.

2.7.2 Calcul des CI₅₀

Le paramètre de suivi de la toxicité a été le rendement relatif. Lors du suivi de chacune des séries d'expositions, un triplicata de croissance algale témoin (sans cadmium) était également suivi. Les résultats de croissance des milieux d'exposition avec cadmium étaient comparés à ceux du milieu de référence. En divisant la croissance mesurée à partir d'un milieu avec cadmium par la croissance du milieu de référence après 96 h, il était possible de définir un rendement relatif (R) pour chacune des concentrations en cadmium testées lors d'une expérience de toxicité. Ces rendements ont par la suite été portés en graphique en fonction de la concentration en cadmium (Cd total ou Cd²⁺ libre) du milieu d'exposition ou en fonction des quotas intracellulaires de cadmium, ce qui a permis d'établir trois courbes dose-réponse pour chaque série d'expositions.

Les résultats des expériences de toxicité ont été exprimés en fonction de la concentration en cadmium qui réduisait de 50 % le rendement dans les milieux d'exposition après 96 h (96h-CI₅₀). Les toxicités exprimées en fonction de la concentration totale en cadmium du milieu d'exposition, de la concentration en cadmium libre dans le milieu et des quotas internes ont été retenues comme modes d'expression de la réponse toxique au cadmium.

La méthode de détermination de la CI₅₀ utilisée est basée sur la méthode de Hill (équation 2.9). À partir de cette relation, il a été possible d'obtenir une relation entre la concentration de cadmium dans le milieu d'exposition et une réponse algale (rendement).

Équation 2.9

$$f(x) = \frac{x^{nH}}{x^{nH} + CI_{50}^{nH}}$$

où :

f(x) = concentration du métal (Cd total, Cd²⁺ ou Cd intracellulaire)

nH = nombre de Hill ~ 2,9 (valeur par défaut de REGTOX (Vindimian 2003))

Les calculs de CI₅₀ ont été effectués à partir de la macro Excel™ REGTOX (Vindimian 2003) en utilisant l'équation de Hill (équation 2.9).

2.7.3 Intégration des valeurs de CI₅₀

Toutes les expériences de toxicité ont été effectuées à deux reprises, à des temps différents, afin de vérifier leur reproductibilité. Pour chacune des expériences réalisées, trois valeurs de CI₅₀ étaient calculées, soit en fonction des concentrations en cadmium total et ionique libre (Cd²⁺) du milieu d'exposition, de même qu'en fonction des quotas intracellulaires de cadmium. Les quotas intracellulaires ont été définis comme étant le cadmium qui a pénétré dans les cellules algales et qui y est fortement lié, c'est-à-dire qui n'a pas été désorbé lors du contact et du lavage avec la solution d'EDTA (2 x 10⁻⁴ M) et du milieu de rinçage.

Dans un premier temps, les valeurs de CI_{50} calculées à partir d'une expérience de toxicité et sa reprise ont été comparées entre elles à partir des intervalles de confiance 95 % (voir section 2.7.5 ci-après). Lorsque les résultats obtenus d'une expérience n'étaient pas significativement différents de la reprise qui lui était associée, les résultats des deux expériences ont été joints lors des calculs des valeurs de CI_{50} telles que présentées dans le cadre de ce mémoire.

2.7.4 Erreurs associées aux valeurs calculées de CI_{50}

Toutes les expériences de toxicité ont été effectuées à deux reprises, à des temps différents, afin de vérifier leur reproductibilité. La macro Excel™ REGTOX (Vindimian 2003) a été utilisée pour effectuer les calculs des valeurs de CI_{50} associées aux valeurs d'un intervalle de confiance de 95 ou de 99 %. Les intervalles de confiances étaient calculés selon une méthode non paramétrique de type « Bootstrap », selon une méthode de rééchantillonnage aléatoire avec $n = 500$.

2.7.5 Comparaison des valeurs de CI_{50}

Les intervalles de confiances 95 % ($\alpha = 0,05$) ont servi de base statistique afin de déterminer si les écarts calculés entre les valeurs de CI_{50} obtenues pour les diverses conditions d'exposition étaient significatifs. Lorsque les intervalles de confiance s'entrecoupaient, les valeurs étaient considérées comme similaires alors que si les intervalles de confiance ne s'entrecoupaient pas, les valeurs de CI_{50} étaient considérées comme significativement différentes (pour $\alpha = 0,05$).

3. Résultats

3.1 Toxicité du cadmium dans le milieu de référence

Le premier objectif de nos travaux était de déterminer l'influence de la présence d'EDTA sur la réponse toxique au cadmium de *Pseudokirchneriella subcapitata*. La toxicité du cadmium a d'abord été déterminée dans le milieu d'exposition de base du CEAEQ (2003). Dans ces conditions (expérience 1), la valeur de 96h- CI_{50} au cadmium calculée a été de 84,4 nM Cd total ($IC_{95\%}$ de 79,1 – 90,0 nM Cd). La toxicité exprimée en cadmium libre calculée a été de 83,3 nM Cd^{2+} ($IC_{95\%}$ de 78,4 – 88,7 nM Cd^{2+}) et de 36,4 amol $Cd \cdot cellule^{-1}$ ($IC_{95\%}$ de 33,8 – 39,3 amol $Cd \cdot cellule^{-1}$) pour la CI_{50} exprimée en fonction des quotas cellulaires de Cd.

Les concentrations en ions libres Cd^{2+} ont été calculées à partir du logiciel MINEQL et validées à l'aide de la TEI (section 2.6). Les résultats sont présentés selon les valeurs de concentrations en Cd nominal (total) et Cd^{2+} libre de même que des quotas internes de Cd correspondant aux 96h- CI_{50} calculées. Les valeurs associées aux intervalles de confiance à 95 % sont également présentées (tableau 3-1).

3.2 Effet de la présence d'EDTA sur la réponse toxique

L'objectif ici était de déterminer l'effet de la présence d'EDTA sur la toxicité et la biodisponibilité du cadmium. Dans ces conditions (expérience 2), la valeur de 96h- CI_{50} au cadmium calculée a été de 721 nM Cd total ($IC_{95\%}$ de 714 – 729 nM Cd). La toxicité exprimée en cadmium libre calculée a été de 69,2 nM Cd^{2+} ($IC_{95\%}$ de 64,1 – 73,6 nM Cd^{2+}) et de 43,6 amol $Cd \cdot cellule^{-1}$ ($IC_{95\%}$ de 40,8 – 46,8 amol $cellule^{-1}$) pour la CI_{50} exprimée en fonction des quotas cellulaires de Cd.

Tel qu'attendu, la présence d'EDTA diminue considérablement la toxicité du cadmium lorsqu'elle est exprimée selon la concentration en cadmium total en solution comparativement à un milieu d'exposition sans EDTA (CI_{50} respectives de 721 et 84,4 nM Cd total). Lorsque la CI_{50} est exprimée en fonction de la concentration en Cd libre, les

valeurs de toxicité sont plus rapprochées mais demeurent tout de même significativement différentes. La valeur de CI_{50} observée dans le milieu sans EDTA (83,3 nM Cd^{2+} ; $IC_{95\%} = 78,4 - 88,7$ nM Cd^{2+}) est significativement plus élevée que celle obtenue à partir du milieu avec EDTA (69,2 nM Cd^{2+} ; $IC_{95\%} = 64,1 - 73,6$ nM Cd^{2+}).

Les valeurs de CI_{50} exprimées en fonction des quotas intracellulaires de cadmium sont également significativement différentes. En présence d'EDTA, la valeur de CI_{50} calculée (43,6 amol $Cd \cdot cellule^{-1}$; 40,8 – 46,8 amol $\cdot cellule^{-1}$) est légèrement mais significativement plus élevée que celle calculée à partir des expositions sans EDTA (36,4 amol $Cd \cdot cellule^{-1}$; $IC_{95\%} = 33,8 - 39,3$ amol $\cdot cellule^{-1}$).

La croissance des témoins a été similaire avec ou sans la présence d'EDTA dans le milieu de culture ($\sim 1,5 \times 10^6$ cellules $\cdot mL^{-1}$). Les résultats de toxicité du cadmium sans et avec EDTA ont ainsi été comparés au tableau 3-1 et la croissance relative de *P. subcapitata* en fonction des concentrations en cadmium total et en Cd^{2+} des milieux d'exposition, de même qu'en fonction des quotas intracellulaires de cadmium, est présenté respectivement aux figures 3-1, 3-2 et 3-3.

Tableau 3-1 Résultats des expériences de toxicité au cadmium effectuées dans le milieu d'exposition du CEAEQ (2003) avec (expérience 2) et sans EDTA (expérience 1). Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL.

Conditions	CI_{50} (μM)	$IC_{95\%}$	
		$\alpha \leq 0,025$	$\alpha \geq 0,975$
CI_{50} : Cd total (nM)			
Sans EDTA	84,4	79,1	90,0
Avec EDTA	721	714	729
CI_{50} : Cd^{2+} (nM)			
Sans EDTA	83,3	78,4	88,7
Avec EDTA	69,2	64,1	73,6
CI_{50} : quotas internes Cd (amol $\cdot cellule^{-1}$)			
Sans EDTA	36,4	33,8	39,3
Avec EDTA	43,6	40,8	46,8

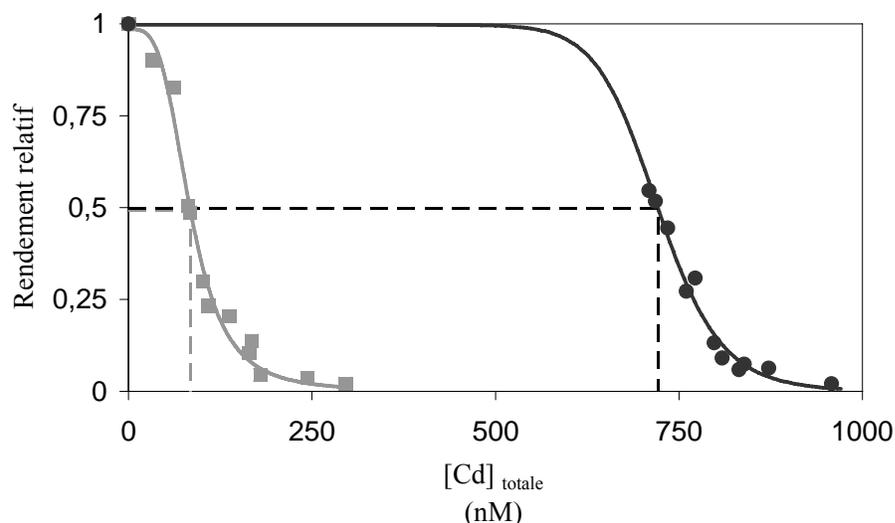


Figure 3-1 Rendement relatif de *P. subcapitata* en fonction de la concentration en cadmium total (nM) dans les milieux d'exposition (■) sans EDTA et (●) avec EDTA. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI_{50} sur les droites respectives.

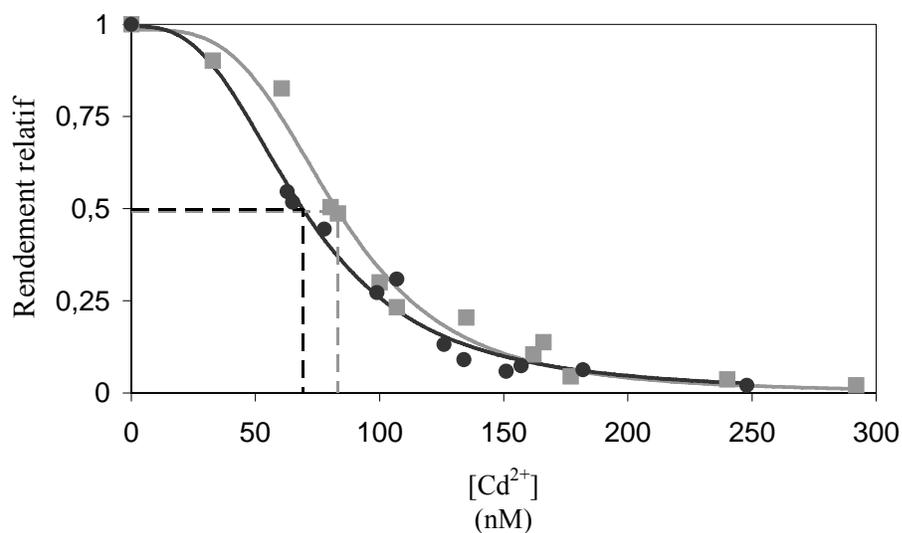


Figure 3-2 Rendement relatif de *P. subcapitata* en fonction de la concentration en Cd^{2+} (nM) dans les milieux d'exposition (■) sans EDTA et (●) avec EDTA. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI_{50} sur les droites respectives. Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL.

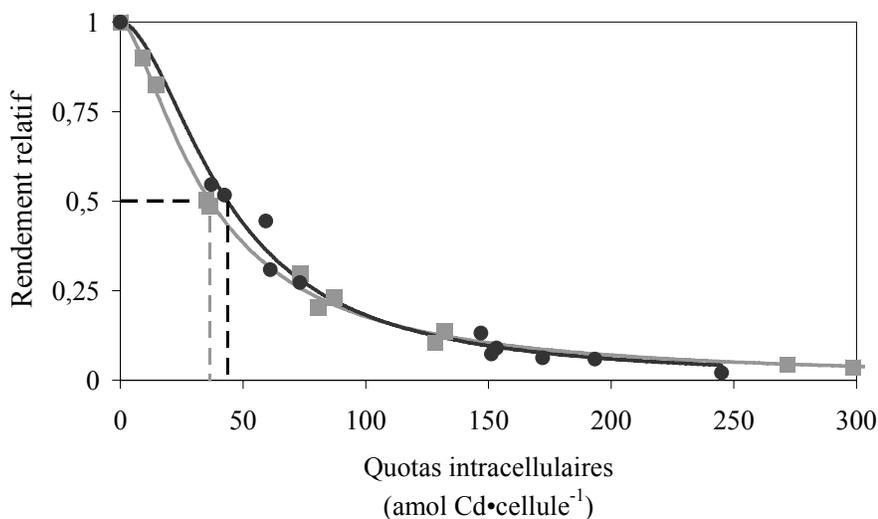


Figure 3-3 Rendement relatif de *P. subcapitata* en fonction des quotas intracellulaires de cadmium ($\text{amol Cd}\cdot\text{cellule}^{-1}$) dans les milieux d'exposition (■) sans EDTA et (●) avec EDTA. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI_{50} sur les droites respectives.

3.3 Effet de la présence d'un tampon sur la réponse toxique

Le deuxième objectif du mémoire était de déterminer l'impact de la présence d'un tampon sur la toxicité et la biodisponibilité du cadmium. Lors des expositions précédentes, des variations de pH importantes ont été notées dans les milieux d'exposition. D'abord, le relargage acide en provenance des parois des erlenmeyers en polycarbonate avait pour effet de diminuer le pH du milieu au début des expositions (variant entre ~ 24 et 60 h selon la croissance algale du milieu). Ensuite, le pH du milieu augmentait en fonction de la croissance algale, attribuable à la libération de métabolites cellulaires dans le milieu et au pouvoir tampon limité des milieux d'exposition utilisés. La figure 3-4 présente un exemple de l'évolution du pH mesuré dans les milieux d'exposition en fonction du temps, tel qu'obtenu lors de l'exposition de *P. subcapitata* au cadmium en présence d'EDTA (expérience 2).

Nous avons vérifié la spéciation du cadmium en fonction des pH mesurés lors de nos expériences d'exposition au cadmium (c'est-à-dire pour une gamme de pH variant entre

7,0 et 9,5). La figure 3-5 présente l'évolution de la concentration en Cd^{2+} calculée avec MINEQL en fonction du pH dans les milieux sans et avec EDTA. Il est possible d'y observer une diminution très rapide de la concentration en Cd^{2+} dans le milieu en présence d'EDTA, soit d'approximativement 85% (écart relatif) pour un pH augmentant de 7,0 (139 nM Cd^{2+}) à 7,5 (55,8 nM Cd^{2+}) unités. Sans EDTA, la diminution de la concentration en Cd^{2+} dans le milieu devient importante pour des pH supérieurs à 8,0. Avec et sans EDTA, la diminution des concentrations de Cd^{2+} en solution est attribuable à des changements de la spéciation du cadmium en solution par la formation de complexes CdCO_3^0 et $\text{Cd}(\text{CO}_3)_2^{2-}$. En présence d'EDTA, la diminution nette plus importante de la concentration en Cd^{2+} observée (comparativement au milieu sans EDTA), est attribuable à la formation accrue du complexe Cd-EDTA en solution.

Afin de réduire l'effet du pH sur les résultats obtenus, des expériences de toxicité ont été effectuées en maintenant le pH manuellement le plus près possible de 7,0, de façon à réduire les variations de pH et simuler la présence d'un tampon dans le milieu.

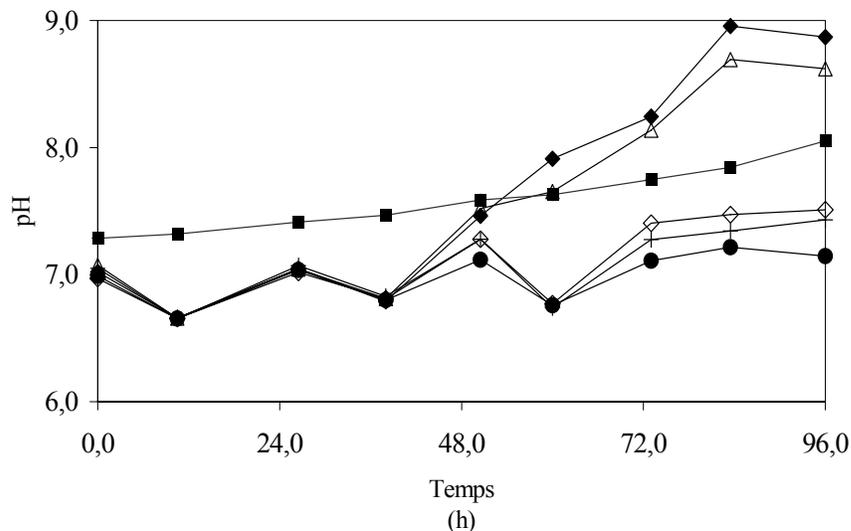


Figure 3-4 Évolution des pH moyens des milieux d'exposition en fonction du temps. Exemple pour une exposition en cadmium total de 0,0 nM (◆), 735 nM (Δ), 772 nM (■), 839 nM (◇), 872 nM (●) et 958 nM (+) dans un milieu avec EDTA (expérience 2).

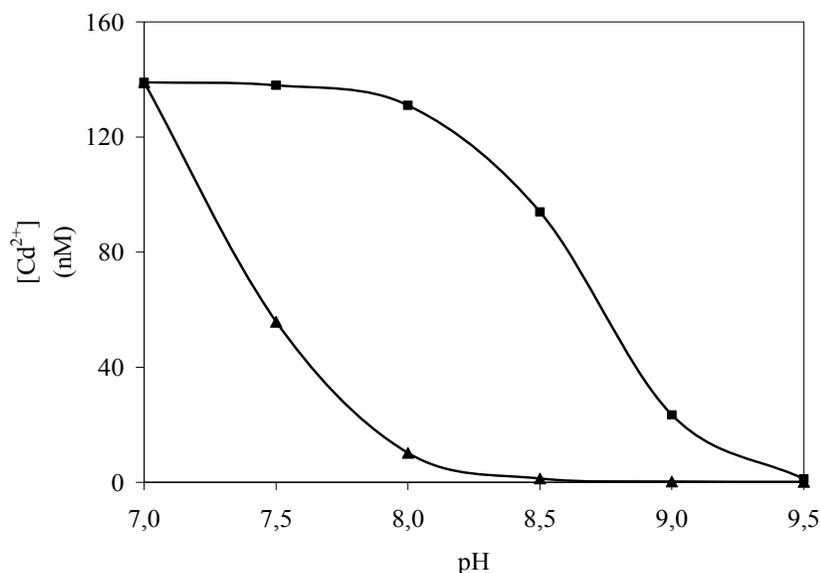


Figure 3-5 Évolution de la concentration en Cd^{2+} (nM) en fonction du pH dans les milieux d'exposition (■) sans EDTA et (▲) avec EDTA. Exemple à partir d'une concentration de 139 nM Cd^{2+} à pH 7,0. Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL.

3.3.1 Maintient du pH manuellement

Dans un premier temps, nous avons effectué l'exposition dans le milieu du CEAEQ (2003) avec de l'EDTA (1,0 μM), sans tampon mais en ajustant le pH à $7,0 \pm 0,2$ unités au cours de l'exposition soit ~ 24, 36, 52, 58, 66, 74, 80, 86 et 91 h après l'inoculation (expérience 3A). Les variations de pH observées ont été maintenues à l'intérieur de 1,51 unités ($6,70 \leq \text{pH} \leq 8,51$). La croissance des témoins après 96h, avec ajustement du pH de façon périodique, a été similaire à celle obtenue lors des expériences précédentes pour lesquelles le pH n'était pas ajusté ($\sim 1,5 \times 10^6$ cellules·mL⁻¹).

Dans de telles conditions, la valeur de 96h- CI_{50} obtenue en fonction des concentrations en cadmium total a été de 668 nM Cd total ($\text{IC}_{95\%}$ de 648 – 686 nM Cd total). Cette concentration est significativement inférieure à celle obtenue dans des conditions similaires mais sans maintien manuel du pH. Ce résultat est conforme à ce que nous avons établi comme hypothèse.

En considérant la concentration en Cd^{2+} des milieux d'exposition, une valeur de CI_{50} significativement inférieure à celle qui avait été obtenue sans ajustement de pH (69,2 nM Cd^{2+}) a également été calculée lors des expériences effectuées à pH ajusté. La valeur de CI_{50} obtenue a été de 36,3 nM Cd^{2+} ($\text{IC}_{95\%} = 28,7 - 43,6$ nM Cd^{2+}). Ce résultat est conforme à notre hypothèse initiale.

La valeur de CI_{50} exprimée en fonction des quotas intracellulaires de cadmium était de 41,5 amol Cd/cellule⁻¹ ($\text{IC}_{95\%}$ de 33,7 – 50,0 amol Cd/cellule⁻¹). Cette valeur de CI_{50} n'est pas significativement différente de celle obtenue sans ajustement du pH soit, 43,6 amol Cd/cellule⁻¹ (40,8 – 46,8 amol/cellule⁻¹). Ce résultat est également conforme à ce que nous avons établi comme hypothèse.

Le tableau 3-2 compare les valeurs de CI_{50} obtenues pour les expositions réalisées sans et avec ajustement du pH des milieux d'exposition. La croissance relative de *P. subcapitata* en fonction des concentrations totales en cadmium et en Cd^{2+} des milieux d'exposition de même que des quotas intracellulaires de cadmium est présentée respectivement aux figures 3-6, 3-7 et 3-8.

Tableau 3-2 Résultats des expériences de toxicité au cadmium effectuées dans le milieu d'exposition du CEAEQ (2003) en présence d'EDTA avec (expérience 3A) et sans ajustement de pH (expérience 2). Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL.

Conditions	CI_{50} (μM)	$\text{IC}_{95\%}$	
		$\alpha \leq 0,025$	$\alpha \geq 0,975$
CI_{50} : Cd total (nM)			
Sans ajustement pH	721	714	729
Avec ajustements de pH	668	648	686
CI_{50} : Cd^{2+} (nM)			
Sans ajustement pH	69,2	64,1	73,6
Avec ajustements de pH	36,3	28,7	43,6
CI_{50} : quotas internes Cd (amol·cellule⁻¹)			
Sans ajustement pH	43,6	40,8	46,8
Avec ajustements de pH	41,5	33,7	50,0

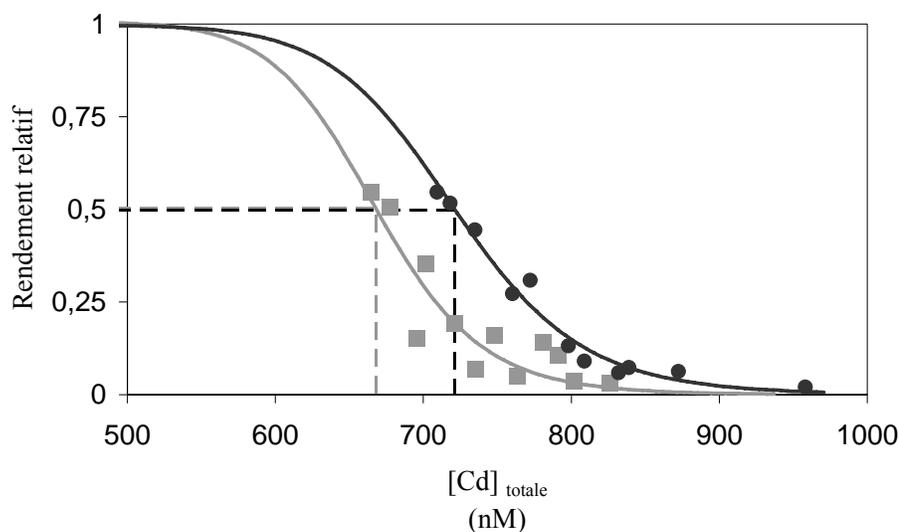


Figure 3-6 Rendement relatif de *P. subcapitata* en fonction de la concentration en cadmium total (nM) dans les milieux d'exposition (■) avec EDTA avec ajustements de pH et (●) avec EDTA sans ajustement de pH. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI_{50} sur les droites respectives.

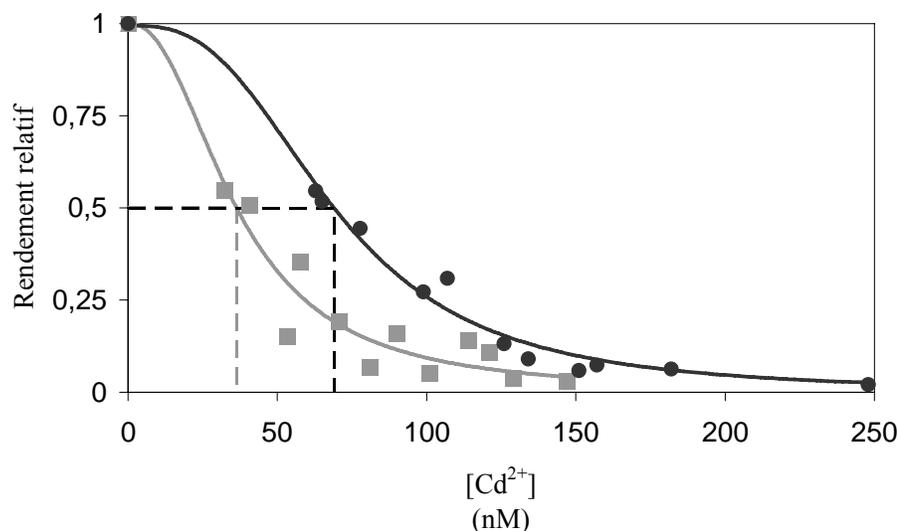


Figure 3-7 Rendement relatif de *P. subcapitata* en fonction de la concentration en Cd^{2+} (nM) dans les milieux d'exposition (■) avec EDTA avec ajustements de pH et (●) avec EDTA sans ajustement de pH. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI_{50} sur les droites respectives. Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL.

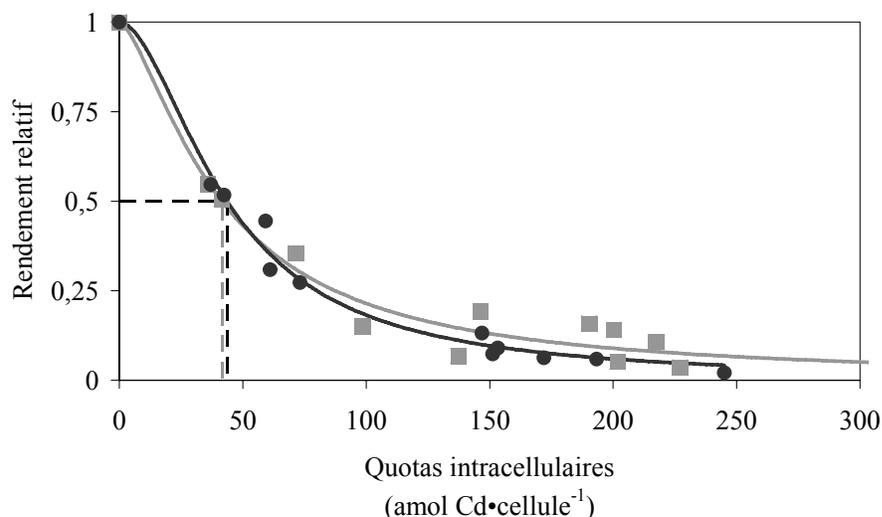


Figure 3-8 Rendement relatif de *P. subcapitata* en fonction des quotas intracellulaires ($\text{amol Cd}\cdot\text{cellule}^{-1}$), (■) avec EDTA avec ajustements de pH et (●) avec EDTA sans ajustement de pH. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI_{50} sur les droites respectives.

3.3.2 Effet de la présence du tampon HEPES sur la réponse toxique

L'effet de la présence du tampon HEPES sur la réponse toxique au cadmium a été testé, en employant une concentration de 10 mM de HEPES dans le milieu de culture (expérience 3B). Dans de telles conditions, la valeur de 96h- CI_{50} obtenue a été de 732 nM de Cd total ($\text{IC}_{95\%} = 709 - 753$ nM Cd total). Cette valeur est comparable à celle obtenue dans le milieu sans ajustement du pH (721 nM Cd total ; $\text{IC}_{95\%}$ de 714 – 729 nM Cd) mais est significativement plus élevée que celle obtenue à partir des expositions effectuées à pH ajustés (668 nM Cd total ; $\text{IC}_{95\%}$ de 648 – 686 nM Cd total). Ces résultats ne correspondent pas avec nos hypothèses initiales alors que nous estimions que les valeurs de CI_{50} ne seraient pas significativement différentes des valeurs obtenues en ajustant le pH, et seraient plus faibles (toxicité plus prononcée du cadmium) que celle obtenues sans ajustement du pH.

Lorsqu'elle est exprimée en considérant la concentration en Cd^{2+} en solution, la valeur de CI_{50} calculée pour les expositions réalisées en présence de HEPES est de 75,9 nM Cd^{2+} ($\text{IC}_{95\%} = 68,0 - 85,7$ nM Cd^{2+}). Cette valeur est également comparable à celle obtenue dans le milieu sans ajustements du pH (69,2 nM Cd^{2+} ; $\text{IC}_{95\%}$ de 64,1 – 73,6 nM Cd^{2+}) mais elle est significativement plus élevée que celle obtenue à partir des expositions effectuées à pH ajustés (36,3 nM Cd^{2+} ; $\text{IC}_{95\%} = 28,7 - 43,6$ nM Cd^{2+}). Selon nos hypothèses initiales nous estimions que les valeurs de CI_{50} ne seraient pas significativement différentes des valeurs obtenues en ajustant le pH et seraient plus faibles (toxicité plus prononcée du cadmium) que celle obtenues sans ajustement du pH. Ce n'est pas ce qui a été observé en présence du tampon HEPES.

La valeur de CI_{50} calculée en considérant les quotas intracellulaires de cadmium en présence de 10 mM HEPES est de 28,1 amol $\text{Cd}\cdot\text{cellule}^{-1}$ ($\text{IC}_{95\%} = 21,1 - 35,4$ amol $\cdot\text{cellule}^{-1}$). Cette valeur est significativement inférieure à celle obtenue à partir des expositions réalisées sans ajustement du pH (43,6 amol $\text{Cd}\cdot\text{cellule}^{-1}$; $\text{IC}_{95\%}$ de 40,8 – 46,8 amol $\cdot\text{cellule}^{-1}$), mais elle n'est pas différente de celle obtenue avec ajustement du pH (41,5 amol $\text{Cd}\cdot\text{cellule}^{-1}$; $\text{IC}_{95\%}$ de 33,7 – 50,0 amol $\cdot\text{cellule}^{-1}$). Ces résultats ne correspondent pas avec nos hypothèses initiales, alors que nous estimions que les valeurs de CI_{50} exprimées en fonction des quotas de cadmium intracellulaires ne seraient pas significativement différentes.

Nous pouvons supposer que les valeurs de CI_{50} obtenues à partir des expériences de toxicité effectuées en ajustant le pH dans les milieux d'exposition ont été influencées par un autre facteur. Cet autre facteur pourrait être les variations du pH dans les milieux d'exposition. Cette hypothèse a été vérifiée en partie par l'utilisation d'un autre tampon, le MOPS, pour les tests de toxicité.

3.3.3 Effet de la présence du tampon MOPS sur la réponse toxique

Les expériences réalisées avec un tampon ont été effectuées à nouveau, mais en utilisant le tampon MOPS plutôt que le tampon HEPES, toujours à une concentration de 10 mM. Dans de telles conditions, la valeur de 96h- CI_{50} obtenue a été de 714 nM de Cd total

($IC_{95\%} = 704 - 724$ nM Cd total). Comme cela a été observé avec le tampon HEPES, cette valeur est comparable à celle obtenue dans le milieu sans ajustements du pH (721 nM Cd total ; $IC_{95\%}$ de 714 – 729 nM Cd) mais est significativement plus élevée que celle obtenue à partir des expositions effectuées à pH ajustés (668 nM Cd total ; $IC_{95\%}$ de 648 – 686 nM Cd total). Ceci ne correspond donc pas avec nos hypothèses initiales selon lesquelles les valeurs de CI_{50} exprimées en concentrations de cadmium total ne seraient pas significativement différentes des valeurs obtenues en ajustant le pH et seraient plus faibles (toxicité plus prononcée du cadmium) que celles obtenues sans ajustement du pH. La valeur de CI_{50} calculée pour MOPS (concentration en cadmium total) est comparable à celle obtenue en présence de HEPES dans les milieux d'exposition (732 nM de Cd total ; $IC_{95\%} = 709 - 753$ nM Cd total).

En considérant la concentration en Cd^{2+} en solution, la valeur de CI_{50} calculée pour les expositions réalisées en présence de MOPS est de 66,0 nM Cd^{2+} ($IC_{95\%} = 60,8 - 71,3$ nM Cd^{2+}). Cette valeur est encore une fois comparable à celle obtenue dans le milieu sans ajustements du pH (69,2 nM Cd^{2+} ; $IC_{95\%}$ de 64,1 – 73,6 nM Cd^{2+}) mais est significativement plus élevée que celle obtenue à partir des expositions effectuées à pH ajustés (36,3 nM Cd^{2+} ; $IC_{95\%} = 28,7 - 43,6$ nM Cd^{2+}). Selon nos hypothèses initiales nous estimions que les valeurs de CI_{50} obtenues en présence de MOPS ne seraient pas significativement différentes des valeurs obtenues en ajustant le pH et seraient plus faibles (toxicité plus prononcée du cadmium) que celle obtenues sans ajustement du pH. Comme cela a été observé en considérant les concentrations en cadmium total, la valeur de CI_{50} exprimée en fonction de la concentration en cadmium ionique libre des milieux d'exposition ne diffère pas significativement selon que le tampon présent soit MOPS ou HEPES (75,9 nM Cd^{2+} ($IC_{95\%} = 68,0 - 85,7$ nM Cd^{2+})).

La valeur de CI_{50} calculée en fonction des quotas intracellulaires de cadmium en présence de MOPS a été de 37,2 amol Cd/cellule⁻¹ ($IC_{95\%} = 33,7 - 41,4$ amol·cellule⁻¹). Cette valeur de CI_{50} n'est pas significativement ($\alpha = 0,05$) différente de celle calculée pour les exposition réalisées sans ajustement du pH (46,3 amol Cd·cellule⁻¹ ; $IC_{95\%}$ de 40,8 – 46,8 amol·cellule⁻¹), de la valeur de CI_{50} calculée à partir des expositions au cadmium avec ajustements du pH (41,5 amol Cd·cellule⁻¹ ; $IC_{95\%}$ de 33,7 – 50,0 amol·cellule⁻¹) ni de la

CI₅₀ obtenue à partir des milieux d'exposition contenant le tampon HEPES (28,1 amol Cd·cellule⁻¹ ; IC_{95%} = 21,1 – 35,4 amol·cellule⁻¹). Ces résultats correspondent avec nos hypothèses initiales, alors que nous estimions que les valeurs de CI₅₀ exprimés en fonction de quotas internes ne seraient pas significativement différentes. Nous nous attendions également à ce que les résultats obtenus à partir des expériences réalisées en présence des tampons HEPES et MOPS ne diffèrent pas significativement.

Suite à l'expérimentation décrite ci-haut, nous avons considéré qu'il était préférable de réduire les variations de pH dans les milieux d'exposition de façon à favoriser la stabilité des conditions d'exposition au cadmium pour la durée de l'exposition. L'ajustement manuel du pH des milieux pendant le déroulement des expositions semble induire un effet sur la croissance algale, tel que démontré par les valeurs de CI₅₀ obtenues pour les expositions effectuées dans les milieux à pH ajustés manuellement. La valeur de CI₅₀ exprimée en fonction des quotas intracellulaires de cadmium obtenue à partir des expositions réalisées en présence du tampon HEPES (10 mM) était moins élevée (bien que non significatif pour $\alpha = 0,05$) que celles obtenues en présence de MOPS et est significativement plus basse que celle obtenue sans tampon et sans ajustement de pH. Les intervalles de confiances obtenus pour les expériences réalisées avec MOPS sont plus étroits que ceux obtenus en présence de HEPES, indice d'une plus grande reproductibilité des résultats (même si les expériences n'ont été effectuées qu'à deux reprises). MOPS s'est également avéré plus efficace à maintenir le pH dans les milieux d'exposition que HEPES (variations maximales de pH respectives de 1,17 et 1,71). Le choix de continuer les expériences avec le tampon MOPS nous a donc paru plus approprié. Il est à noter que la croissance des témoins après 96 h dans les milieux contenant le tampon HEPES ou MOPS étaient comparable ($\sim 2,1 \times 10^6$ cellules·mL⁻¹), par contre elle était plus importante que dans les milieux sans tampon et ce, avec ou sans ajustement manuel du pH en solution ($\sim 1,5 \times 10^6$ cellules·mL⁻¹). Les valeurs de CI₅₀ obtenues pour les expériences effectuées avec et sans ajustement de pH de même que celles effectuées en présence de HEPES ou de MOPS sont présentées au tableau 3-3. Les figures 3-9 à 3-11 présentent la croissance relative de *P. subcapitata* en fonction des concentrations totales en cadmium et en Cd²⁺ des milieux d'exposition de même qu'en fonction des quotas intracellulaires de cadmium.

Tableau 3-3 Résultats des expériences de toxicité au Cd effectuées dans le milieu d'exposition du CEAEQ (2003) avec EDTA, avec et sans ajustement de pH ou en présence des tampons HEPES (10 mM) ou MOPS (10 mM). Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL.

Conditions	CI ₅₀ (μM)	IC _{95%}	
		$\alpha \leq 0,025$	$\alpha \geq 0,975$
CI₅₀ : Cd total (nM)			
Sans ajustement pH, exp. 2	721	714	729
Avec ajustements de pH, exp. 3A	668	648	686
HEPES (10 mM), exp. 3B	732	709	753
MOPS (10 mM), exp. 3C	714	704	724
CI₅₀ : Cd²⁺ (nM)			
Sans ajustement pH, exp. 2	69,2	64,1	73,6
Avec ajustements de pH, exp. 3A	36,3	28,7	43,6
HEPES (10 mM), exp. 3B	75,9	68,0	85,7
MOPS (10 mM), exp. 3C	66,1	60,8	71,3
CI₅₀ : quotas internes Cd (amol·cellule⁻¹)			
Sans ajustement pH, exp. 2	43,6	40,8	46,8
Avec ajustements de pH, exp. 3A	41,5	33,7	50,0
HEPES (10 mM), exp. 3B	28,1	21,2	35,4
MOPS (10 mM), exp. 3C	37,3	33,7	41,4

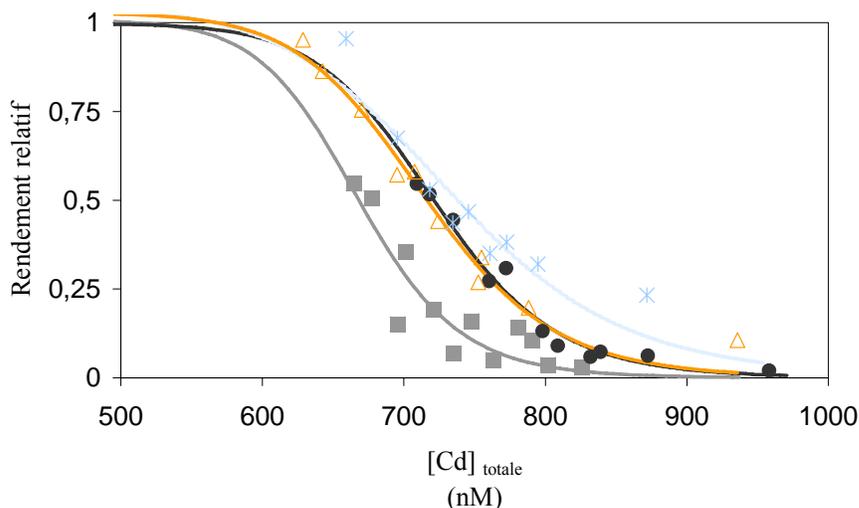


Figure 3-9 Rendement relatif de *P. subcapitata* en fonction de la concentration en cadmium total (nM) dans les milieux d'exposition (■) avec ajustements de pH, (●) sans ajustement de pH, (X) avec 10 mM de HEPES et (Δ) avec 10 mM de MOPS. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI₅₀.

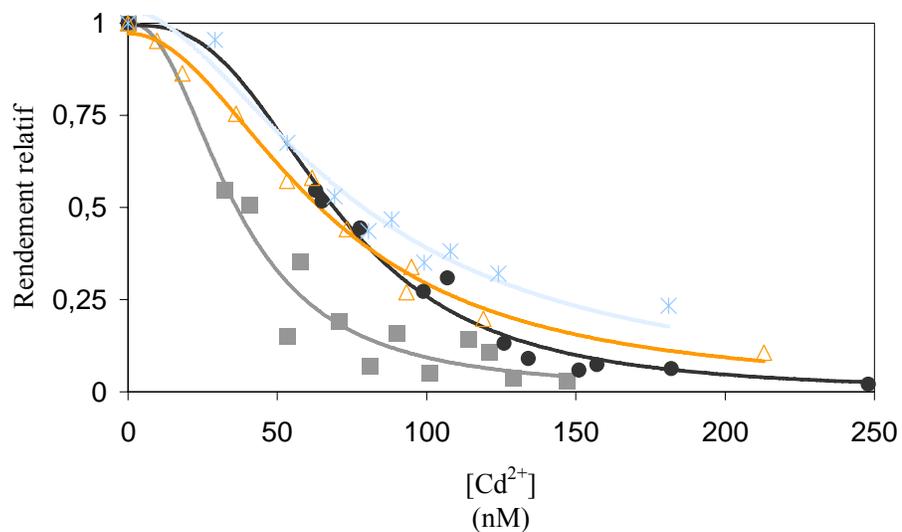


Figure 3-10 Rendement relatif de *P. subcapitata* en fonction de la concentration en Cd^{2+} (nM) dans les milieux d'exposition (■) avec ajustements de pH, (●) sans ajustement de pH, (⊗) avec 10 mM de HEPES et (Δ) avec 10 mM de MOPS. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} . Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL.

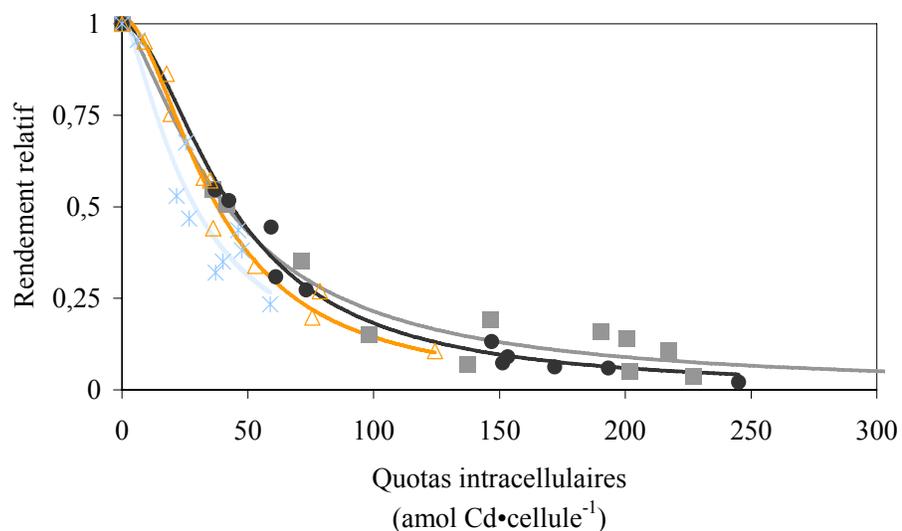


Figure 3-11 Rendement relatif de *P. subcapitata* en fonction des quotas intracellulaires (amol Cd·cellule⁻¹), (■) avec ajustements de pH, (●) sans ajustement de pH, (⊗) avec 10 mM de HEPES et (Δ) avec 10 mM de MOPS. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} .

3.4 Effet de la duresé sur la réponse toxique

Le troisième objectif de nos travaux était de déterminer l'impact de la duresé sur la toxicité et la biodisponibilité du cadmium. Afin de mieux comprendre l'effet de la duresé sur la réponse toxique au cadmium de *Pseudokirchneriella subcapitata*, deux scénarios ont été élaborés puis testés séparément, soit l'effet d'une variation de la concentration en magnésium libre de même qu'une augmentation de la concentration en calcium libre dans les milieux d'exposition (voir les tableaux 2-5 et 2-6).

3.4.1 Concentration en magnésium

Deux concentrations en magnésium ionique libre ont été testées en considérant les données de Olsen et al. (2004) pour des rivières de l'Abitibi influencées par des rejets miniers, soit la concentration en Mg^{2+} minimale ($4,11 \times 10^{-5}$ M) (expérience 4B) et à la concentration maximale ($2,89 \times 10^{-4}$ M) (expérience 4A). Les valeurs de CI_{50} exprimées en fonction des concentrations totales en cadmium ont été respectivement de 709 nM ($IC_{95\%} = 692 - 726$ nM Cd total) et de 696 nM ($IC_{95\%} = 660 - 730$ nM Cd total). Tel qu'anticipé par nos hypothèses, ces valeurs ne sont pas significativement différentes ($\alpha = 0,05$) de la CI_{50} calculée dans le milieu CEAEQ en présence d'EDTA (1,0 μ M) et de MOPS (10 mM) qui était de 714 nM ($IC_{95\%} = 704 - 724$ nM Cd total).

La même situation a été observée en exprimant les valeurs de CI_{50} en fonction des concentrations en Cd^{2+} . La valeur obtenue à faible concentration en Mg^{2+} (41 μ M) a été de 62,6 nM Cd^{2+} ($IC_{95\%} = 51,7 - 70,6$ nM Cd^{2+}) et celle obtenue en présence de 289 μ M Mg^{2+} de 57,8 nM Cd^{2+} ($IC_{95\%} = 44,0 - 70,1$ nM Cd^{2+}). Ce résultat respectait également nos hypothèses.

La valeur de toxicité, exprimée en quotas intracellulaires de cadmium et calculée pour les milieux d'exposition avec une concentration en Mg^{2+} de 41,1 μ M, a été de 41,9 amol $Cd \cdot cellule^{-1}$ ($IC_{95\%} = 39,1 - 44,7$ amol $\cdot cellule^{-1}$) et elle n'est pas significativement différente de celle obtenue à plus forte concentration en Mg^{2+} (289 μ M), soit 35,6 amol $Cd \cdot cellule^{-1}$ ($IC_{95\%} = 33,0 - 38,3$ amol $\cdot cellule^{-1}$). La valeur obtenue pour les expositions à 289 μ M Mg^{2+} ne diffère pas significativement de celle obtenue dans le milieu CEAEQ

(74,6 $\mu\text{M Mg}^{2+}$), soit 37,3 $\text{amol Cd}\cdot\text{cellule}^{-1}$ ($\text{IC}_{95\%} = 33,7 - 41,4 \text{ amol}\cdot\text{cellule}^{-1}$). La CI_{50} calculée pour les expositions réalisées à 41,1 $\mu\text{M Mg}^{2+}$ ne diffère pas significativement non plus de celle calculée pour la concentration en Mg^{2+} présente dans le milieu d'exposition du CEAEQ (2003). Ceci correspond avec nos hypothèses initiales selon lesquelles il n'y aurait pas de différence significative au niveau des CI_{50} calculées pour les milieux à concentrations modifiées en Mg^{2+} .

Les valeurs de CI_{50} obtenues pour les différentes concentrations en Mg^{2+} libre dans le milieu d'exposition sont présentées au tableau 3-4. Les courbes concentration-réponse utilisées pour les calculs de CI_{50} sont présentées aux figures 3-12, 3-13 et 3-14.

Tableau 3-4 CI_{50} obtenues lors de la variation de la concentration en Mg^{2+} libre des milieux d'exposition au cadmium de *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Conditions	CI_{50} (μM)	$\text{IC}_{95\%}$	
		$\alpha \leq 0,025$	$\alpha \geq 0,975$
CI_{50} : Cd total (nM)			
Milieu CEAEQ ; $[\text{Mg}^{2+}] = 7,46 \times 10^{-5} \text{ M}$	714	704	724
$[\text{Mg}^{2+}] = 4,11 \times 10^{-5} \text{ M}$	709	692	726
$[\text{Mg}^{2+}] = 2,89 \times 10^{-4} \text{ M}$	696	660	730
CI_{50} : Cd^{2+} (nM)			
Milieu CEAEQ	66,1	60,8	71,3
$[\text{Mg}^{2+}] = 4,11 \times 10^{-5} \text{ M}$	62,6	51,7	70,6
$[\text{Mg}^{2+}] = 2,89 \times 10^{-4} \text{ M}$	57,8	44,0	70,1
CI_{50} : quotas internes Cd ($\text{amol}\cdot\text{cellule}^{-1}$)			
Milieu CEAEQ	37,3	33,7	41,4
$[\text{Mg}^{2+}] = 4,11 \times 10^{-5} \text{ M}$	41,9	39,1	44,7
$[\text{Mg}^{2+}] = 2,89 \times 10^{-4} \text{ M}$	35,6	33,0	38,3

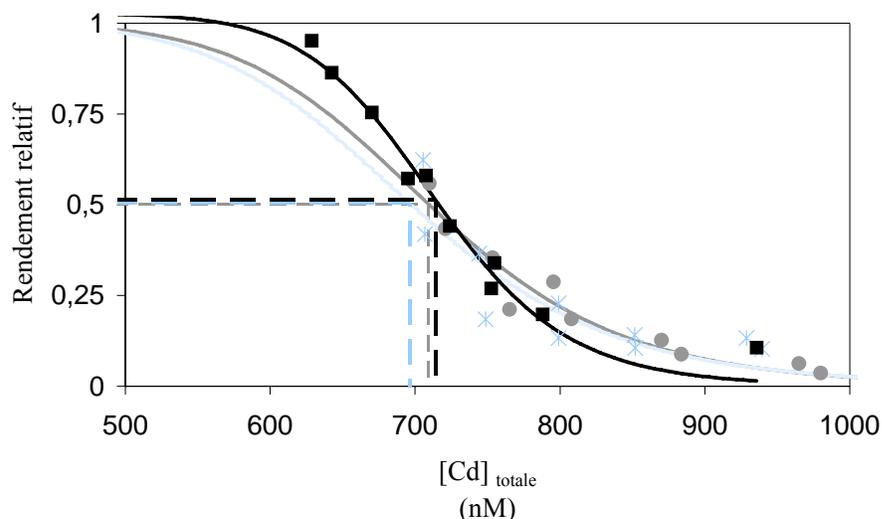


Figure 3-12 Rendement relatif de *P. subcapitata* en fonction de la concentration en cadmium total (nM) dans les milieux d'exposition (■) 74,6 $\mu\text{M Mg}^{2+}$ (CEAEQ 2003), (●) 41,1 $\mu\text{M Mg}^{2+}$, (×) 289 $\mu\text{M Mg}^{2+}$. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI_{50} sur les droites respectives. Tous les milieux contenaient de l'EDTA (1 μM) et du MOPS (10 mM).

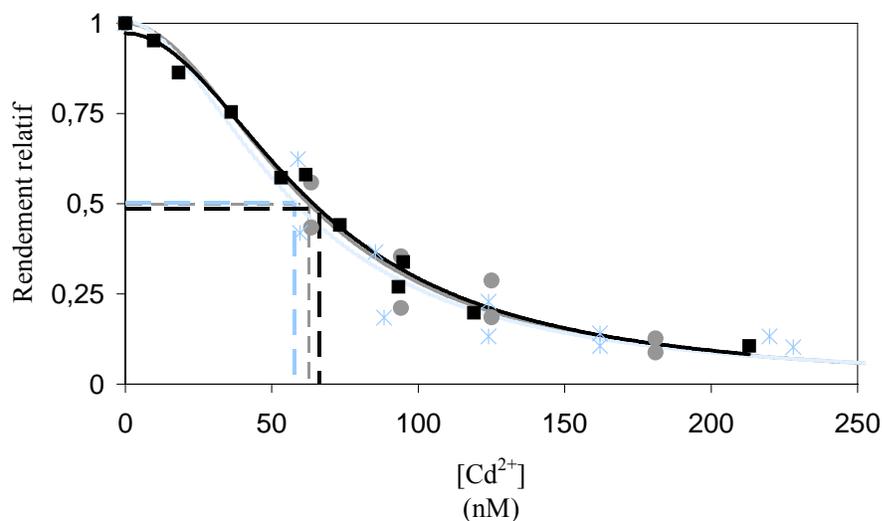


Figure 3-13 Rendement relatif de *P. subcapitata* en fonction de la concentration en Cd^{2+} (nM) dans les milieux d'exposition (■) 74,6 $\mu\text{M Mg}^{2+}$ (CEAEQ 2003), (●) 41,1 $\mu\text{M Mg}^{2+}$, (×) 289 $\mu\text{M Mg}^{2+}$. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI_{50} sur les droites respectives. Tous les milieux contenaient de l'EDTA (1 μM) et du MOPS (10 mM). Les concentrations en Cd^{2+} ont été calculées avec le logiciel MINEQL.

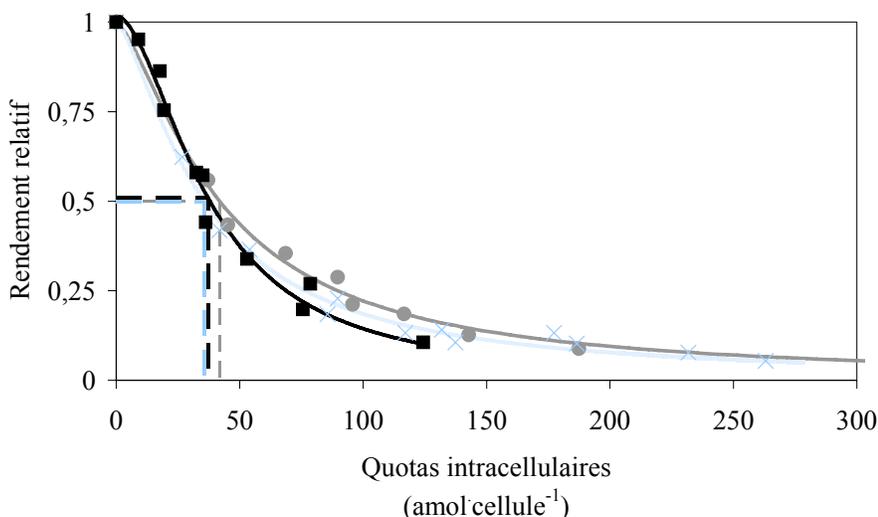


Figure 3-14 Rendement relatif de *P. subcapitata* en fonction des quotas intracellulaires ($\text{amol Cd}\cdot\text{cellule}^{-1}$), (■) $74,6 \mu\text{M Mg}^{2+}$ (CEAEQ 2003), (●) $41,1 \mu\text{M Mg}^{2+}$, (×) $289 \mu\text{M Mg}^{2+}$. Les courbes pleines représentent les courbes de calculs des valeurs de CI_{50} et les lignes droites pointillées représentent la localisation des valeurs de CI_{50} sur les droites respectives. Tous les milieux contenaient de l'EDTA ($1 \mu\text{M}$) et du MOPS (10 mM).

3.4.2 Concentration en calcium

3.4.2.1 Variation des concentrations en micro-éléments

Les calculs de spéciation des espèces présentes dans les milieux d'exposition avec le logiciel MINEQL ont permis d'identifier une augmentation des concentrations de certains ions libres en solution lorsque la concentration en calcium était augmentée, notamment pour les ions Cu^{2+} ($1,41 \times 10^{-13} \text{ M}$ comparativement à $5,91 \times 10^{-16} \text{ M}$)⁴, Fe^{3+} ($1,24 \times 10^{-16} \text{ M}$ versus $3,36 \times 10^{-19} \text{ M}$) et Zn^{2+} ($7,87 \times 10^{-9} \text{ M}$ versus $6,98 \times 10^{-11} \text{ M}$) – voir le tableau 3-5). En considération de ces variations dans les concentrations en ions libres et des hypothèses du BLM, il a été jugé opportun d'apporter des ajustements dans les concentrations totales de ces éléments de façon à ce que les concentrations en ces ions libres soient équivalentes à celles présentes lors des expositions précédentes (sections 3.2 à 3.4). Les tests de toxicité effectués en modifiant la concentration en Ca^{2+} des milieux

⁴ Les valeurs indiquées entre parenthèses sont une comparaison des concentrations ioniques des éléments, calculées pour une concentration en calcium de $6,11 \times 10^{-3} \text{ M Ca}$ et de $1,87 \times 10^{-5} \text{ M Ca}$ (milieu de référence CEAEQ). Ces concentrations ont été calculées avec le logiciel MINEQL.

d'exposition ont été réalisés dans ces conditions de manière à mieux cibler l'effet de la concentration en Ca^{2+} sur la réponse toxique de *P. subcapitata* au cadmium.

Tableau 3-5 Effet de l'ajout de calcium et de cadmium sur les concentrations en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} dans les milieux de culture et d'exposition.

Milieux et paramètres modifiés	Concentrations en éléments		Concentrations en ions		
	[Ca]	[Cd]	[Cu^{2+}]	[Fe^{3+}]	[Zn^{2+}]
	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
Milieu d'exposition du CEAEQ	1,87E-05	0,00	5,91E-16	3,36E-19	6,98E-11
Ajout de calcium (6,09 mM)	6,11E-03	0,00	3,11E-15	4,07E-18	3,60E-10
Ajout de calcium (6,09 mM) et de cadmium (0,12 μM)	6,11E-03	1,20E-07	4,14E-14	5,04E-17	3,87E-09
Ajout de calcium (6,09 mM) et de cadmium (1,2 μM)	6,11E-03	1,19E-06	1,41E-13	1,24E-16	7,87E-09

3.4.2.2 Avec ajustement des concentrations en cuivre, fer et zinc libres

Les valeurs de CI_{50} calculées à partir des concentrations en cadmium total des milieux d'exposition pour les concentrations élevées en Ca^{2+} ($1,25 \times 10^{-4}$ à $5,92 \times 10^{-3}$ M) (expériences 5A à 5E) ont été significativement plus élevées que celles calculées pour les milieux avec la concentration en Ca^{2+} de référence du protocole du CEAEQ ($1,87 \times 10^{-5}$ M). Par contre, les valeurs obtenues pour des milieux enrichis en Ca^{2+} n'ont pas démontré de différences significatives ($\alpha = 0,05$) entre elles, sauf pour les expositions réalisées à $[\text{Ca}^{2+}] = 1,42 \times 10^{-3}$ M et à $[\text{Ca}^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M Ca^{2+} . Ces expériences ont conduit à des valeurs de CI_{50} respectives de 956 nM ($\text{IC}_{95\%} = 930 - 976$ nM Cd total) et 987 nM ($\text{IC}_{95\%} = 937 - 1018$ nM Cd total), qui sont significativement plus basses que celles obtenues pour les milieux à concentrations en Ca^{2+} de $1,25 \times 10^{-4}$ M, $4,25 \times 10^{-4}$ M et $2,92 \times 10^{-3}$ M (tableau 3-6).

Les expériences réalisées en ajustant les concentrations ioniques libres en cuivre, fer et zinc (aux concentrations présentes dans le milieu d'exposition du CEAEQ, avec ajout d'EDTA (1 μM) et de MOPS (10 mM)) et avec variation de la concentration en Ca^{2+} , ont donné des résultats qui ne sont pas entièrement conformes à nos hypothèses. Nous avons

estimé que les valeurs de CI_{50} exprimées en fonction des concentrations en cadmium total du milieu seraient influencées par la concentration de calcium du milieu d'exposition.

Les valeurs de CI_{50} exprimées en concentrations de cadmium libre dans les milieux d'exposition ont également divergé de nos hypothèses initiales. L'unique différence significative a été observée pour la CI_{50} obtenue pour le milieu contenant $2,92 \times 10^{-3}$ M Ca^{2+} (85,1 nM ; $IC_{95\%} = 72,9 - 102$ nM Cd^{2+}) en comparaison avec la CI_{50} utilisée comme référence, soit pour le milieu contenant $1,87 \times 10^{-5}$ M Ca^{2+} (66,1 nM ; $IC_{95\%} = 60,8 - 71,3$ nM Cd^{2+}). Nous avons estimé que les valeurs de CI_{50} exprimées en fonction des concentrations en cadmium libre du milieu seraient influencées par la concentration de calcium du milieu d'exposition.

En considérant la réponse toxique exprimée en quotas intracellulaires de cadmium, les résultats ne se conforment pas à nos hypothèses. Nous avons estimé que les valeurs de toxicité exprimées en considérant les quotas intracellulaires de cadmium seraient constantes, même en présence de concentrations différentes en Ca^{2+} dans les milieux d'exposition. Les CI_{50} obtenues pour les milieux avec $4,25 \times 10^{-4}$ M Ca^{2+} (26,7 amol $Cd \cdot cellule^{-1}$; $IC_{95\%} = 21,6 - 32,5$ amol $\cdot cellule^{-1}$) et $5,92 \times 10^{-3}$ M Ca^{2+} (26,2 amol $Cd \cdot cellule^{-1}$; $IC_{95\%} = 23,9 - 28,2$ amol $\cdot cellule^{-1}$) sont significativement différentes de celles obtenue avec la concentration de référence en Ca^{2+} (37,3 amol $Cd \cdot cellule^{-1}$; $IC_{95\%} = 33,7 - 41,4$ amol $\cdot cellule^{-1}$) de même qu'en présence de $2,92 \times 10^{-3}$ M Ca^{2+} (38,3 amol $Cd \cdot cellule^{-1}$; $IC_{95\%} = 33,9 - 43,9$ amol $\cdot cellule^{-1}$).

Les valeurs de CI_{50} obtenues dans les milieux à concentrations variables en Ca^{2+} , de même que les intervalles de confiance correspondants, sont présentés au tableau 3-6. Ces mêmes valeurs de CI_{50} sont également comparées aux figures 3-15 à 3-19, présentées ci-après.

Tableau 3-6 CI_{50} obtenues lors de la variation de la concentration en Ca^{2+} libre (expériences 5A à 5E) des milieux d'exposition au cadmium de *P. subcapitata*.

Conditions	CI_{50} (μM)	$IC_{95\%}$	
		$\alpha \leq 0,025$	$\alpha \geq 0,975$
CI_{50} : Cd total (nM)			
Milieu CEAEQ, $[Ca^{2+}] = 1,87 \times 10^{-5} M$	714	704	724
$[Ca^{2+}] = 1,25 \times 10^{-4} M$	1035	1018	1052
$[Ca^{2+}] = 4,25 \times 10^{-4} M$	1063	1037	1085
$[Ca^{2+}] = 1,42 \times 10^{-3} M$	956	930	976
$[Ca^{2+}] = 2,92 \times 10^{-3} M$	1075	1038	1119
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3} M$	987	937	1018
CI_{50} : Cd²⁺ (nM)			
Milieu CEAEQ, $[Ca^{2+}] = 1,87 \times 10^{-5} M$	66,1	60,8	71,3
$[Ca^{2+}] = 1,25 \times 10^{-4} M$	73,7	62,4	83,7
$[Ca^{2+}] = 4,25 \times 10^{-4} M$	61,3	37,2	84,7
$[Ca^{2+}] = 1,42 \times 10^{-3} M$	63,9	52,3	72,9
$[Ca^{2+}] = 2,92 \times 10^{-3} M$	85,1	72,9	102
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3} M$	65,1	55,4	74,6
CI_{50} : quotas internes Cd ($amol \cdot cellule^{-1}$)			
Milieu CEAEQ, $[Ca^{2+}] = 1,87 \times 10^{-5} M$	37,3	33,7	41,4
$[Ca^{2+}] = 1,25 \times 10^{-4} M$	29,8	23,9	35,6
$[Ca^{2+}] = 4,25 \times 10^{-4} M$	26,7	21,6	32,5
$[Ca^{2+}] = 1,42 \times 10^{-3} M$	32,3	30,5	34,4
$[Ca^{2+}] = 2,92 \times 10^{-3} M$	38,3	33,9	43,9
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3} M$	26,2	23,9	28,2

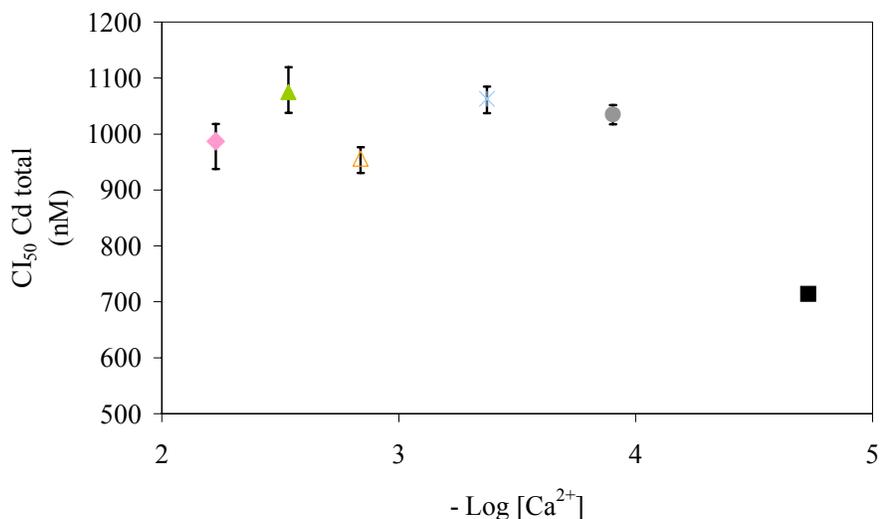


Figure 3-15 CI₅₀ (et IC_{95%}) exprimées en concentration en cadmium total dans les milieux d'exposition pour *P. subcapitata* à une concentration en Ca²⁺ de (■) 1,87 x 10⁻⁵ M, (●) 1,25 x 10⁻⁴ M, (×) 4,25 x 10⁻⁴ M, (△) 1,42 x 10⁻³ M, (▲) 2,92 x 10⁻³ M et (◆) 5,92 x 10⁻³ M. Les concentrations en Ca²⁺ ont été calculées à partir de MINEQL.

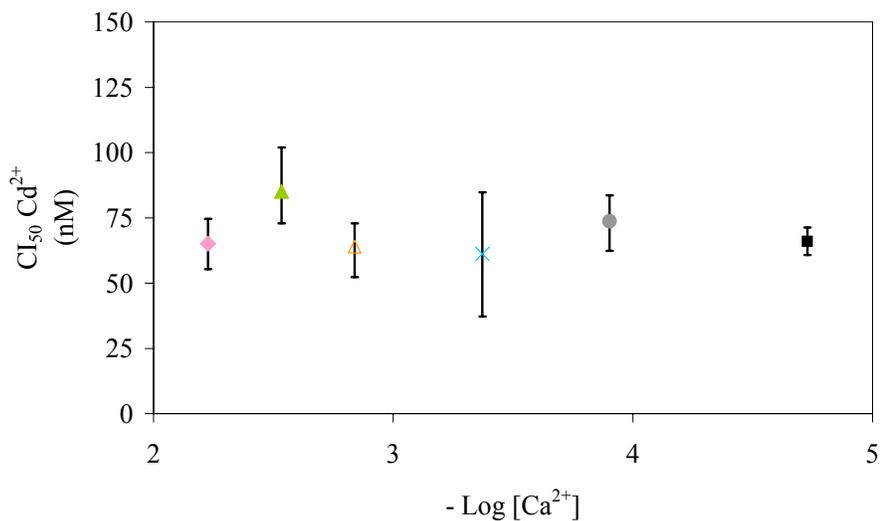


Figure 3-16 CI₅₀ (et IC_{95%}) exprimées en concentration en Cd²⁺ dans les milieux d'exposition pour *P. subcapitata* à une concentration en Ca²⁺ de (■) 1,87 x 10⁻⁵ M, (●) 1,25 x 10⁻⁴ M, (×) 4,25 x 10⁻⁴ M, (△) 1,42 x 10⁻³ M, (▲) 2,92 x 10⁻³ M et (◆) 5,92 x 10⁻³ M. Les concentrations en Ca²⁺ et Cd²⁺ ont été calculées à l'aide de MINEQL.

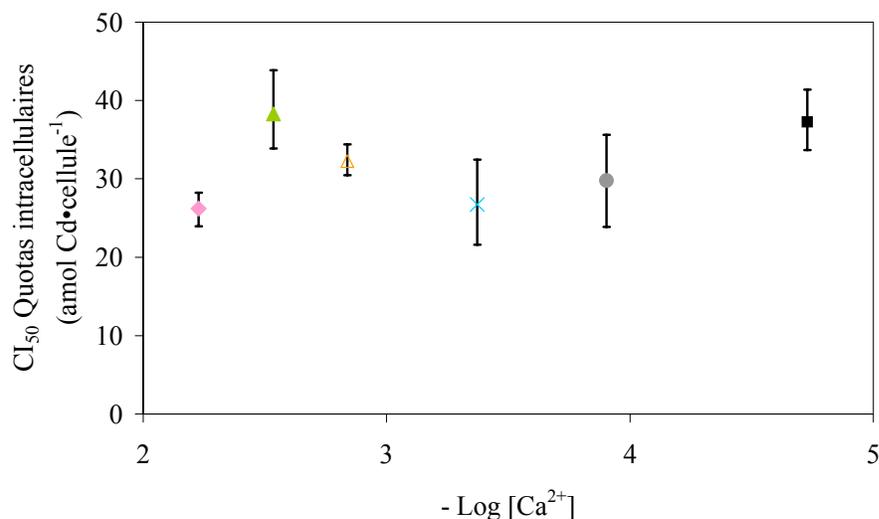


Figure 3-17 CI₅₀ (et IC_{95%}) exprimées en quotas intracellulaires de cadmium pour *P. subcapitata* à une concentration en Ca²⁺ de (■) 1,87 x 10⁻⁵ M, (●) 1,25 x 10⁻⁴ M, (×) 4,25 x 10⁻⁴ M, (△) 1,42 x 10⁻³ M, (▲) 2,92 x 10⁻³ M et (◆) 5,92 x 10⁻³ M. Les concentrations en Ca²⁺ ont été calculées à l'aide de MINEQL.

3.4.2.3 Sans ajustement des concentrations en cuivre, fer et zinc libres

De manière à vérifier si la réponse toxique de *P. subcapitata* pouvait être influencée par les variations des concentrations en cuivre, fer ou zinc observées en présence d'une forte concentration en Ca²⁺ dans le milieu d'exposition au cadmium, une exposition sans ajustement des concentrations en ces oligo-éléments a été réalisée (expérience 6). La concentration en Ca²⁺ utilisée pour cette expérience a été de 5,92 x 10⁻³ M Ca²⁺. Cette concentration représentait la concentration maximale en Ca²⁺ identifiée dans les rivières du projet de COREM (Olsen et al. 2004). La valeur de CI₅₀ obtenue en fonction des concentrations totales en cadmium du milieu d'exposition a été de 982 nM Cd (IC_{95%} de 930 – 1060 nM Cd) et elle n'est pas significativement différente ($\alpha = 0,05$) de celle obtenue avec ajustement des concentrations en oligo-éléments dans les milieux, soit 987 nM Cd (IC_{95%} de 937 – 1018 nM Cd).

D'autre part, une différence significative a été observée entre les CI₅₀ obtenues à partir des milieux avec et sans ajustement des concentrations en Cu²⁺, Fe³⁺ et Zn²⁺ lorsque exprimées en fonction des concentrations en cadmium libre. Sans ajustement des concentrations en ces oligo-éléments, la CI₅₀ calculée a été de 176 nM Cd²⁺ (IC_{95%} de 158

– 209 nM Cd²⁺) comparativement à 65,1 nM (IC_{95%} = 55,4 – 74,6 nM Cd²⁺) obtenue à partir des expositions réalisées avec ajustement des concentrations en Cu²⁺, Fe³⁺ et Zn²⁺.

La CI₅₀ obtenue sans ajustement des concentrations en Cu²⁺, Fe³⁺ et Zn²⁺, et exprimée en fonction des quotas intracellulaires de cadmium, a été de 35,2 amol Cd/cellule⁻¹ (IC_{95%} de 32,1 à 39,1 amol·cellule⁻¹). Cette valeur est significativement différente de celle obtenue avec ajustement des concentrations en ces oligo-éléments, qui a été de 26,2 amol Cd·cellule⁻¹ (IC_{95%} de 23,9 à 28,2 amol·cellule⁻¹). Tel que mentionné précédemment, nous avons estimé que la toxicité exprimée en fonction des quotas internes de cadmium ne serait pas significativement différente entre les diverses conditions d'exposition.

Afin de définir si un oligo-élément en particulier était à l'origine des résultats observés à la section précédente, les concentrations en ions libres de deux des trois éléments étaient fixées, alors que pour le troisième élément, aucun ajustement de sa concentration n'était effectué et la concentration de l'ion libre variait au fur et à mesure que la concentration en calcium augmentait.

3.4.2.4 Sans ajustement de la concentration en cuivre libre

Lors de ces expérimentations, les concentrations en zinc et en fer ionique libre étaient ajustées en fonction des conditions d'exposition, de façon à ce que les concentrations ioniques en ces éléments soient constantes (expérience 7A). Le cuivre était ajouté en fonction de la concentration nominale seulement, sans considération de la concentration en cuivre libre du milieu. Dans de telles conditions, la valeur de CI₅₀ obtenue en fonction de la concentration en cadmium total dans les milieux d'exposition était de 1033 nM cadmium total (IC_{95%} = 971 – 1096 nM Cd total). Cette valeur ne diffère pas significativement des valeurs obtenues pour les expositions réalisées avec ou sans ajustement des concentrations en Cu²⁺, Fe³⁺ et Zn²⁺ des milieux d'exposition.

En exprimant le potentiel toxique en fonction de la concentration en Cd²⁺, la valeur de CI₅₀ calculée est de 81,8 nM (IC_{95%} = 68,9 – 98,4 nM Cd²⁺) et elle est significativement différente de celle obtenue sans ajustement des concentrations en Cu²⁺, Fe³⁺ et Zn²⁺ des milieux d'exposition (176 nM ; IC_{95%} = 158 – 209 nM Cd²⁺). Elle ne diffère pas

significativement des valeurs de CI_{50} obtenues pour les milieux avec des concentrations ajustées en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} (65,1 nM ; $IC_{95\%} = 55,4 - 74,6$ nM Cd^{2+}) ou obtenues pour les expositions réalisées à des concentrations en Ca^{2+} de $1,87 \times 10^{-5}$ M (66,1 nM ; $IC_{95\%} = 60,8 - 71,3$ nM Cd^{2+}).

La CI_{50} obtenue en fonction des quotas internes de cadmium a été de 26,4 amol Cd·cellule⁻¹ ($IC_{95\%} = 24,0 - 29,1$ amol·cellule⁻¹) ce qui est significativement différent de la CI_{50} calculée pour le milieu sans ajustement des concentrations ioniques en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} (35,2 amol Cd·cellule⁻¹ ; $IC_{95\%} = 32,1 - 39,1$ amol·cellule⁻¹). La CI_{50} n'est toutefois pas significativement différente de celle obtenue à partir des expositions au cadmium effectuées avec ajustement des concentrations en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} (26,2 amol Cd·cellule⁻¹ ; $IC_{95\%} = 23,9 - 28,2$ amol·cellule⁻¹).

Les valeurs de CI_{50} obtenues à partir des expositions réalisées sans ajustement de la concentration de cuivre libre dans le milieu sont présentées au tableau 3-7.

3.4.2.5 Sans ajustement de la concentration en zinc libre

Les concentrations en cuivre libre et en fer ionique libre étaient ajustées de façon à être équivalentes à celles présentes dans le milieu d'exposition de référence (CEAEQ 2003). Le zinc était ajouté en fonction de la concentration nominale seulement, sans égard de la concentration en Zn^{2+} dans les milieux d'exposition (expérience 7B). La CI_{50} obtenue lors des expositions réalisées sous ces conditions a été de 1210 nM Cd total ($IC_{95\%}$ de 1165 – 1258 nM Cd total). Cette valeur de CI_{50} est significativement différente de celles obtenues pour des expositions réalisées avec et sans ajustement des concentrations en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} ; il en va de même pour les expositions réalisées sans ajustement de la concentration en Cu^{2+} des milieux d'exposition (section 3.4.2.4).

En fonction de la concentration en Cd^{2+} , la valeur de CI_{50} calculée a été de 154 nM ($IC_{95\%}$ de 129 – 175 nM Cd^{2+}), ce qui n'est pas significativement différent de la CI_{50} obtenue sans ajustement des concentrations ioniques libre en cuivre, fer et zinc dans le milieu d'exposition (176 nM ; $IC_{95\%} = 158 - 209$ nM Cd^{2+}). Cette valeur est toutefois significativement différente de celle obtenue pour les expositions réalisées avec

ajustement de la concentration en Cu^{2+} du milieu d'exposition (81,8 nM ; $\text{IC}_{95\%} = 68,9 - 98,4$ nM Cd^{2+}) de même qu'avec des concentrations en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} ajustées (66,1 nM ; $\text{IC}_{95\%} = 60,8 - 71,3$ nM Cd^{2+}) dans le milieu d'exposition.

La toxicité du cadmium exprimée en fonction des quotas internes a été de 34,4 amol $\text{Cd}\cdot\text{cellule}^{-1}$ ($\text{IC}_{95\%}$ de 31,9 – 36,8 amol·cellule⁻¹). Cette valeur de CI_{50} n'est pas significativement différente de la CI_{50} obtenue sans ajustement des concentrations ioniques libres en cuivre, fer et zinc dans les milieux d'exposition (35,2 amol $\text{Cd}\cdot\text{cellule}^{-1}$; $\text{IC}_{95\%} = 32,1 - 39,1$ amol·cellule⁻¹). Cette valeur est toutefois significativement différente de celle obtenue pour les expositions réalisées avec ajustement de la concentration en Cu^{2+} du milieu d'exposition (26,4 amol $\text{Cd}\cdot\text{cellule}^{-1}$; $\text{IC}_{95\%}$ de 24,0 – 29,1 amol·cellule⁻¹) de même qu'avec des concentrations en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} ajustées (26,2 amol $\text{Cd}\cdot\text{cellule}^{-1}$; $\text{IC}_{95\%} = 23,9 - 28,2$ amol·cellule⁻¹) dans les milieux d'exposition.

Les valeurs de CI_{50} obtenues à partir des expositions réalisées sans ajustement de la concentration de zinc libre dans le milieu sont présentées au tableau 3-7.

3.4.2.6 Sans ajustement de la concentration en fer libre

Lors de ces expositions, les concentrations en cuivre et en zinc libres des milieux d'exposition étaient ajustées de façon à correspondre à celles présentes dans le milieu d'exposition de référence (CEAEQ 2003). Le fer était ajouté de façon nominale, sans égard à la concentration en Fe^{3+} dans les milieux d'exposition (expérience 7C). La valeur de CI_{50} obtenue dans ces conditions a été de 1001 nM Cd ($\text{IC}_{95\%}$ de 921 à 1080 nM Cd). Cette valeur n'est significativement différente que de celle obtenue à partir des expositions avec des concentrations en Cu^{2+} et Fe^{3+} ajustées (1210 nM Cd total ; $\text{IC}_{95\%}$ de 1165 à 1258 nM Cd total) – voir tableau 3-7.

En considérant la concentration en cadmium ionique libre dans les milieux lors des expositions, la valeur de CI_{50} obtenue a été de 185 nM ($\text{IC}_{95\%}$ de 158 à 214 nM Cd^{2+}), ce qui ne diffère pas significativement des valeurs de CI_{50} obtenues pour des expositions où les concentrations en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} n'étaient pas ajustées (176 nM Cd^{2+} ; $\text{IC}_{95\%}$ de 158 à 209 nM Cd^{2+}) et pour des expositions au cadmium effectuées dans des milieux où les

concentrations en Cu^{2+} et Fe^{3+} étaient ajustées (154 nM ; $\text{IC}_{95\%}$ de 129 à 175 nM Cd^{2+}). Par contre, elle est significativement différente de celles obtenues pour des expositions réalisées dans des conditions où les concentrations en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} étaient ajustées (65,1 nM ; $\text{IC}_{95\%}$ de 55,4 – 74,6 nM Cd^{2+}) de même que pour des expositions avec ajustement des concentrations en Fe^{3+} et Zn^{2+} (81,8 nM ; $\text{IC}_{95\%}$ de 68,9 – 98,4 nM Cd^{2+}).

En considérant les quotas intracellulaires de cadmium, la CI_{50} calculée pour des conditions d'exposition a été de 34,2 amol $\text{Cd}\cdot\text{cellule}^{-1}$ ($\text{IC}_{95\%}$ de 28,3 à 40,6 amol $\cdot\text{cellule}^{-1}$). Cette valeur ne diffère pas significativement des valeurs obtenues pour les expositions réalisées sans ajustement des concentration en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} , avec ou sans ajustement des concentrations en Fe^{3+} Zn^{2+} , de même qu'avec ajustement des concentrations en Cu^{2+} et en Fe^{3+} des milieux d'exposition.

Les valeurs de CI_{50} obtenues à partir des expositions réalisées sans ajustement de la concentration de fer libre dans le milieu sont présentées au tableau 3-7.

Tableau 3-7 CI_{50} obtenues lors de la variation des concentrations en oligo-éléments (cuivre, fer, zinc) libres dans les milieux d'exposition, expériences 7A,7B et 7C.

Conditions	CI_{50} (μM)	IC95%	
		$\alpha \leq 0,025$	$\alpha \geq 0,975$
CI_{50} : Cd total (nM)			
Milieu CEAEQ, $[Ca^{2+}] = 1,87 \times 10^{-5}$ M	714	704	724
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M, oligo-éléments ajustés	987	937	1018
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M; oligo-éléments non ajustés	982	930	1060
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M; $[Fe^{3+}]$ et $[Zn^{2+}]$ ajustés	1033	971	1096
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M; $[Cu^{2+}]$ et $[Fe^{3+}]$ ajustés	1210	1165	1258
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M; $[Cu^{2+}]$ et $[Zn^{2+}]$ ajustés	1001	921	1080
CI_{50} : Cd^{2+} (nM)			
Milieu CEAEQ, $[Ca^{2+}] = 1,87 \times 10^{-5}$ M	66,1	60,8	71,3
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M, oligo-éléments ajustés	65,1	55,4	74,6
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M; oligo-éléments non ajustés	176	158	209
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M; $[Fe^{3+}]$ et $[Zn^{2+}]$ ajustés	81,8	68,9	98,4
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M; $[Cu^{2+}]$ et $[Fe^{3+}]$ ajustés	154	129	175
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M; $[Cu^{2+}]$ et $[Zn^{2+}]$ ajustés	185	158	214
CI_{50} : quotas internes Cd ($amol \cdot cellule^{-1}$)			
Milieu CEAEQ, $[Ca^{2+}] = 1,87 \times 10^{-5}$ M	37,3	33,7	41,4
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M, oligo-éléments ajustés	26,2	23,9	28,2
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M; oligo-éléments non ajustés	35,2	32,1	39,1
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M; $[Fe^{3+}]$ et $[Zn^{2+}]$ ajustés	26,4	24,0	29,1
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M; $[Cu^{2+}]$ et $[Fe^{3+}]$ ajustés	34,4	31,9	36,8
$[Ca^{2+}] = 5,92 \times 10^{-3}$ M; $[Cu^{2+}]$ et $[Zn^{2+}]$ ajustés	34,2	28,3	40,6

3.5 Vérification des concentrations en cadmium

3.5.1 Technique d'échange ionique (TEI) ; concentrations en Cd^{2+}

Afin de valider les concentrations ioniques libres de cadmium fournies par MINEQL, nous avons utilisé la technique d'échange ionique (TEI ; voir section 2.6) sur certains des milieux d'exposition utilisés lors de nos travaux. Les solutions utilisées pour l'exposition au cadmium dans le milieu de référence (expérience 1) ont été analysées à l'aide de la TEI. La comparaison des concentrations ioniques libres de cadmium obtenues à partir de

la TEI et de MINEQL nous ont permis d'obtenir un écart relatif maximal de 17 % (27,6 comparativement à 32,8 nM Cd²⁺). Le même test a été effectué avec les milieux d'exposition contenant du tampon HEPES (expériences 3B) et l'écart relatif maximal calculé à été de 22 % entre les concentrations en Cd²⁺ mesurée avec la TEI comparativement à celles calculées à l'aide de MINEQL (23,3 comparativement à 29,1 nM Cd²⁺). Pour les milieux contenant le tampon MOPS, l'écart maximal calculé entre les concentrations calculées à l'aide de MINEQL et mesurées à l'aide de la TEI ont été de 28 % (85,7 comparativement à 113 nM Cd²⁺).

Pour les trois milieux testés à l'aide de la TEI, les concentrations en cadmium sont comparables aux concentrations calculées à l'aide de MINEQL.

3.5.2 Devenir du cadmium en solution

Lors de nos expériences de toxicité, nous mesurons systématiquement les concentrations totales de cadmium en solution à l'aide d'un compteur gamma (section 2.5.6) avant le début des périodes d'exposition. Afin de vérifier si des diminutions importantes de la concentration totale en cadmium se sont produites pendant la période d'exposition, les filtrats (milieux d'exposition sans les algues) obtenus lors de la filtration des algues après des périodes d'exposition étaient analysés à l'aide du compteur gamma. L'analyse des filtrats nous a permis de déterminer que les pertes dans le cadmium total présent en solution n'excèdent pas 43 % pour l'ensemble des expériences de toxicité effectuées. Les pertes maximales mesurées étaient de 43 % pour l'expérience 1 (milieu de référence), 38 % pour les expériences 2 (avec ajout d'EDTA), 32 % pour les expériences 3B (en présence de HEPES), 34 % pour les expériences 3 C (en présence de MOPS) et 37 % pour les expériences 3A (milieux à pH ajustés de façon manuelle).

Pour les expériences numéro 1, 2 et 3, la diminution des concentrations de cadmium total en solution étaient ~ 30 % ± 4 %. Pour les milieux contenant plus de cadmium en solution, soit les milieux avec une concentration élevée de calcium en solution, la diminution des concentrations de cadmium en solution étaient beaucoup moins importantes (jusqu'à ~ 5 % en moyenne).

Le devenir du cadmium ionique libre en solution n'a pas été déterminé. Boily (2004) a démontré que les concentrations de cadmium ionique libre dans le milieu d'exposition diminuaient ~ 20 % pour une durée d'exposition de 72 h (aucune diminution significative de la concentration 24 h après le début de la période d'exposition).

4. Discussion

Le but global visé par nos travaux était de vérifier l'influence de paramètres physico-chimiques (dureté, pH et présence d'un agent chélateur, l'EDTA) sur la réponse toxique au cadmium de l'algue verte d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata*. Pendant nos travaux, certaines difficultés ont été rencontrées. Avant de procéder à l'analyse des résultats que nous avons obtenus, nous considérons à propos de faire état des difficultés majeures que nous avons rencontrées.

4.1 Difficultés rencontrées pendant nos travaux

Des difficultés ont été rencontrées lors de l'apprentissage des techniques de base de même que lors des expériences de toxicité réalisées plus après. Nous avons regroupé les difficultés majeures rencontrées en deux classes comme suit :

- Croissance et survie de l'organisme cible
- Constances de concentrations en oligo-éléments dans les milieux d'exposition

4.1.1 Croissance et survie de l'organisme cible

La survie de l'organisme *Pseudokirchneriella subcapitata* nous a causé quelques problèmes lors de nos manipulations initiales. L'organisme semblait cesser sa croissance approximativement deux jours après l'inoculation d'un nouveau milieu. Nous avons remarqué qu'à ce moment, les cellules avaient un diamètre moyen de beaucoup supérieur au diamètre initial. Ceci peut être attribuable à une division cellulaire incomplète, ce qui dénote que l'organisme n'a pas toutes les conditions nécessaires pour une croissance optimale. Il y avait une croissance initiale, mais elle était inhibée après un court laps de temps.

Nous avons fait des essais à partir d'une nouvelle souche algale, mais ils ont conduit aux mêmes observations. Par contre, des essais avec un autre milieu de culture algale (MHSM-1, voir Fortin 2000) ont été réalisés avec succès. Le milieu MHSM-1 avait été stérilisé (autoclave) avant l'ajout de la solution concentrée contenant les métaux (ce que nous ignorions initialement). Les cultures d'algues ont donc été reprises avec le milieu CEAEQ (2003) et nous avons ciblé notre milieu de culture algale (et non la souche algale) afin de résoudre les problèmes de survie rencontrés.

Afin de vérifier si tous les éléments étaient bien présents dans le milieu de culture, nous avons analysé nos solutions concentrées à l'aide d'un spectromètre d'émission atomique avec plasma à couplage inductif (ICP-AES). Les concentrations mesurées se sont avérées relativement cohérentes avec celles prescrites dans le protocole du CEAEQ (2003). Une vérification du pH deux jours après l'inoculation nous a démontré une baisse du pH des milieux de culture de l'ordre de 1,5 unités de pH (pH \sim 5,56 unités, en moyenne). Il a donc été entrepris de laisser les erlenmeyers tremper pendant 24 h dans l'eau ultra-pure après le lavage à l'acide afin de réduire le dégagement d'acide à partir des parois des erlenmeyers dans les milieux de culture. De plus, le pH était mesuré après 24 et 48 h et ajusté si nécessaire. Le problème principal serait par contre imputable à une précipitation des métaux lors la stérilisation (autoclave) des solutions de culture (Les analyses par ICP-AES ont uniquement été effectuées sur des solutions non passées à l'autoclave). Les métaux avaient été ajoutés avant la stérilisation des solutions et la température de même que la pression élevées auraient provoqué la précipitation de certains composés. Lorsque les métaux ont été ajoutés après la stérilisation des solutions, le problème de la survie des organismes dans le milieu CEAEQ (2003) a été résolu, même sans ajustement du pH après 24 et 48 h.

4.1.2 Concentrations en oligo-éléments dans les milieux d'exposition

Tel que mentionné dans la section 2.5.4, les modélisations avec le logiciel MINEQL ont permis de constater qu'en augmentant la concentration en calcium dans les milieux d'exposition et suite à l'ajout de cadmium à la solution, les concentrations en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} étaient considérablement plus élevées que dans le milieu de référence (CEAEQ

2003). En ajoutant le calcium, nous perturbions les équilibres avec l'EDTA. Une portion non négligeable de ce ligand se trouvait liée au calcium, ce qui avait pour effet de libérer des ions Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} dans le milieu d'exposition. Les concentrations en fer demeuraient faibles (10^{-17} M), mais elles étaient tout de même grandement augmentées comparativement à celles qui se retrouvent dans les conditions d'exposition « usuelles » (10^{-23} M; facteur 10^6). Un effet similaire était observé au niveau des concentrations en cuivre. Dans les conditions de base, les concentrations en Cu^{2+} libre sont de $5,91 \times 10^{-16}$ M et elles augmentaient jusqu'à $1,27 \times 10^{-13}$ M dans le milieu avec la concentration la plus élevée en calcium ($6,11 \times 10^{-3}$ M Ca^{2+}). De même, les concentrations en Zn^{2+} libre sont de $1,2 \times 10^{-12}$ M dans le milieu CEAEQ de référence (sans Cd et avec $[\text{Ca}^{2+}] = 1,87 \times 10^{-5}$ M), alors qu'elles augmentaient jusqu'à 7×10^{-9} M dans le milieu avec la concentration la plus élevée en calcium.

Afin de reproduire le plus fidèlement possible les conditions d'exposition au cadmium et de cibler l'effet du calcium sur la réponse toxique, une diminution des concentrations totales en cuivre, fer et zinc a ainsi été utilisée. La possibilité de créer une éventuelle déficience en ces oligo-éléments pour les algues, en diminuant les concentrations totales de ces éléments, a été jugée comme moins contraignante que l'augmentation des concentrations ioniques libres en solution. En effet, puisque les concentrations ioniques libres des oligo-éléments étudiés (Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+}) sont à peu près constantes, il ne devrait pas y avoir d'effet sur la nutrition. Cette problématique nous a mené à considérer l'effet de chacun de ces éléments (Cu, Fe et Zn) sur la réponse toxique au cadmium, en fonction des concentrations ioniques libres à concentrations élevées en calcium dans les milieux d'exposition.

4.2 Interprétation des tests de toxicité ; présence d'un chélate

4.2.1 Présence d'EDTA

Nos travaux visaient à vérifier l'effet de la présence d'EDTA sur la réponse toxique au cadmium de l'algue verte d'eau douce *P. subcapitata*. Selon nos hypothèses, la présence d'EDTA devait diminuer la toxicité du cadmium lorsque les valeurs de CI_{50} étaient

exprimées en fonction des concentrations en cadmium total (nominales), parce que l'EDTA diminuerait le ratio cadmium biodisponible / cadmium total. Les modélisations effectuées à l'aide du logiciel MINEQL démontrent en effet qu'en l'absence d'un agent chélateur comme l'EDTA, le ratio Cd^{2+} sur Cd total dans le milieu CEAEQ est approximativement de 99 %. Lors des expositions effectuées en présence d'EDTA, les ratios Cd^{2+} sur Cd total se situeraient entre 3 et 17 %. La valeur de CI_{50} obtenue pour une exposition sans EDTA a été de 84,4 nM Cd total ($\text{IC}_{95\%}$ de 79,1 – 90,0 nM Cd) comparativement à 721 nM Cd total ($\text{IC}_{95\%}$ de 714 – 729 nM Cd) en présence d'EDTA (10^{-6} M). La valeur de CI_{50} obtenue lors de nos travaux avec EDTA correspondrait à la valeur d'inhibition complète de Bartlett et al. (1974), soit 710 nM Cd total pour un milieu contenant lui aussi de l'EDTA à une concentration de 10^{-6} M. Cependant, une telle valeur de CI_{50} a peu de signification pratique, dans le sens qu'elle variera en fonction de la concentration en EDTA dans le milieu.

En fonction de notre première hypothèse, la présence d'EDTA dans les milieux d'exposition aurait pour effet d'augmenter la valeur de CI_{50} (exprimée en fonction de la concentration totale en Cd), ce qui est conforme à nos observations. D'autre part, théoriquement la valeur de CI_{50} exprimée en termes de Cd^{2+} libre ne devrait pas changer par rapport à celle obtenue dans le milieu sans EDTA. Cependant, si la concentration totale en Cd diminue au cours du test de toxicité, alors en absence d'EDTA, l'exposition effective de l'algue au Cd sera moins forte, et la toxicité apparente de Cd^{2+} sera moins grande qu'en présence d'EDTA. En effet, c'est ce dernier scénario qui semble se produire dans nos expériences. La valeur de CI_{50} obtenue pour une exposition au cadmium dans des milieux sans EDTA (83,2 nM - $\text{IC}_{95\%}$ de 78,4 – 88,7 nM Cd^{2+}) est significativement plus élevée comparativement à celle obtenue en présence d'EDTA (10^{-6} M) soit 69,2 nM Cd^{2+} ($\text{IC}_{95\%}$ de 64,1 – 73,6 nM Cd^{2+}). Dans les expériences réalisées en présence d'EDTA, ce dernier agit comme réservoir de Cd et maintient $[\text{Cd}^{2+}]$ à peu près constante, au moins au début de l'exposition.

Toujours selon notre première série d'hypothèses, aucune différence significative n'aurait dû se manifester entre les valeurs de CI_{50} exprimées en fonction des quotas internes. Par contre, nos travaux ont permis d'obtenir des valeurs de CI_{50} de 36,4 amol Cd/cellule⁻¹

(IC_{95%} de 33,8 – 39,3 amol Cd·cellule⁻¹) pour une exposition au cadmium effectuée dans des milieux sans EDTA et de 43,6 amol Cd·cellule⁻¹ (IC_{95%} de 40,8 – 46,8 amol·cellule⁻¹) en présence d'EDTA (10⁻⁶ M) dans les milieux d'exposition. C'est donc dire que le cadmium intracellulaire serait légèrement moins toxique en présence d'EDTA, quoique l'effet (la différence de toxicité) demeure quantitativement faible (36 comparativement à 44 amol Cd·cellule⁻¹). Cette observation laisse entendre que le cadmium intracellulaire serait moins biodisponible en présence d'EDTA. La nature du cadmium intracellulaire pourrait diverger selon l'absence ou la présence d'EDTA dans le milieu d'exposition. En principe, il serait également possible d'attribuer ces résultats à un meilleur état physiologique des algues en présence d'EDTA, dû à une meilleure disponibilité des oligo-éléments. Cependant, la comparaison des rendements relatifs mesurés pour les témoins utilisés lors des expériences de toxicité avec et sans EDTA ne permet pas d'appuyer cette hypothèse. En effet, les croissances moyennes mesurées pour les témoins sont toutes ~ 2 x 10⁶ cellules·mL⁻¹ après 96 h.

4.3 Interprétation des tests de toxicité ; pH et tampons

La production d'ions hydroxydes par les algues favorise une augmentation du pH du milieu qui est fonction de la croissance algale du milieu. Cette augmentation du pH a été observée dans les milieux avec ou sans Cd. Dans la figure 3-4, la concentration 0,0 M Cd correspond à un milieu sans Cd et c'est également ce milieu qui a la plus forte augmentation du pH à une plus forte croissance algale. L'utilisation d'un tampon de pH peut réduire l'impact de la croissance algale sur l'augmentation du pH du milieu. Par contre, tel que mentionné à la section 1.3.3.2, l'utilisation d'un tampon de pH dans le cadre de travaux servant à vérifier la toxicité des éléments traces métalliques est controversée. Selon certaines études, il y aurait un effet synergique sur la toxicité de certains métaux lorsqu'un tampon est utilisé dans les milieux d'exposition (Lage et al. 1996 ; Vasconcelos et al. 1996) alors que d'autres études ne rapportent pas de différence significative sur l'expression toxique d'un métal en présence d'un tampon (Heijerick et al. 2003 ; De Schamphelaere et al. 2004). Nous avons ainsi décidé de vérifier si l'utilisation

d'un tampon dans nos conditions pouvait avoir un impact significatif sur la réponse toxique.

Le deuxième objectif de nos travaux était donc de vérifier l'effet de la présence d'un tampon de pH sur la réponse toxique au cadmium de l'algue *P. subcapitata*. De façon à cibler l'effet de la présence d'un tampon de manière plus spécifique, nous avons préalablement procédé à des tests de toxicité du cadmium dans des milieux d'exposition sans tampon, à pH ajustés manuellement à des intervalles réguliers.

4.3.1 pH ajusté manuellement

Les valeurs de CI_{50} exprimées en fonction des concentrations en cadmium total et en Cd^{2+} , obtenues suite aux expositions effectuées à pH ajustées, sont significativement inférieures à celles obtenues dans des conditions similaires, mais sans ajustement de pH. Ceci est conforme à notre hypothèse de base en considérant qu'une exposition à pH ajusté atténuerait les diminutions des concentrations en cadmium libre dans le milieu d'exposition. Dans un milieu où le pH n'est pas contrôlé, la production d'ions hydroxydes par les algues provoque une augmentation significative du pH, ce qui conduit à une réduction importante de la concentration en Cd^{2+} dans le milieu d'exposition (figure 3-5), et donc à une réduction de l'expression toxique du cadmium. La diminution de la concentration en Cd^{2+} découle surtout de changements de spéciation du cadmium en solution, provoqués par la hausse du pH (formation de complexes $CdCO_3^0$ et $Cd(CO_3)_2^{2-}$, et en présence d'EDTA formation accrue du complexe Cd-EDTA). Par contre, nous n'avions pas anticipé une différence aussi marquée au niveau des valeurs de CI_{50} exprimées en fonction des concentrations en Cd^{2+} sans et avec ajustements du pH (respectivement 69,2 et 36,3 nM Cd^{2+}). Tel que mentionné précédemment, les variations de pH attribuables aux ajustements effectués sur une base périodique ont pu causer un stress chez les organismes. Une conséquence de ce stress peut être une augmentation de la sensibilité au cadmium de *P. subcapitata*.

Les valeurs de CI_{50} exprimées en fonction des quotas intracellulaires de cadmium ne diffèrent pas significativement de celles obtenues sans ajustement du pH, tel qu'anticipé

dans nos hypothèses. Cependant, l'ajustement des pH manuellement ne devrait pas être utilisé dans le cadre d'expériences de toxicité en considérant les variations de pH qui se produisent entre les ajustements et l'effet potentiel de celles-ci sur la sensibilité des organismes cibles.

4.3.2 Tampon de pH

Les expériences effectuées dans les milieux tamponnés n'ont pas donné les résultats escomptés. Les valeurs de CI_{50} exprimées en fonction des concentrations en cadmium total et libre des milieux tamponnés ont été équivalentes à celles calculées à partir des expositions réalisées à pH non ajustés et elles étaient significativement plus élevées que celles obtenues pour les milieux à pH ajustés manuellement. Tel que mentionné précédemment, les variations de pH des milieux d'exposition dues aux ajustements périodiques du pH ont pu représenter un stress pour les algues. Ceci pourrait expliquer les différences observées dans les CI_{50} de ces milieux.

D'autre part, l'expression de la toxicité en fonction des quotas intracellulaires de cadmium dans les milieux avec HEPES a été significativement plus faible que celle calculée pour les milieux à pH non ajustés (28,1 vs. 43,6 amol Cd-cellule⁻¹). Une telle différence n'a pas été observée dans le cas du MOPS. La plus forte toxicité apparente du cadmium dans les milieux tamponnés avec HEPES pourrait peut-être résulter d'un effet négatif, du tampon lui-même (Lage et al. 1996, Vasconcelos et al. 1996) ou encore du pH, qui n'aurait pas été identifié dans les milieux contenant le tampon MOPS. Le tampon MOPS s'est également avéré plus efficace à maintenir le pH dans les milieux d'exposition que HEPES (variations maximales de pH respectives de 1,17 et 1,71).

Ayant identifié les variations de pH dans le milieu d'exposition comme facteur plus limitant que l'utilisation d'un tampon, et ayant noté la toxicité plus forte du Cd en présence de HEPES, nous avons poursuivi nos expérimentations en présence du tampon MOPS.

4.4 Interprétation des tests de toxicité ; effet de la duresté

Une duresté élevée peut avoir un effet « protecteur » sur la réponse toxique d'un organisme à un métal. Cependant les études traitant de l'effet de la duresté sur la réponse toxique à un métal ont rarement été effectuées sur des algues. Heijerick et al. (2002) ont identifié un effet « protecteur » de la duresté sur la toxicité du zinc pour *P. subcapitata* alors que De Schampelaere et al. (2003) n'ont pas identifié d'effet important de la duresté pour la réponse toxique au cuivre de *P. subcapitata* tout comme Markich et al. (2005) avec *Chlorella* sp. (voir section 1.3.3.2).

Deux facteurs principaux ont été testés afin de déterminer l'effet de la duresté sur la réponse toxique au cadmium de *P. subcapitata* soit la concentration en magnésium libre et la concentration en calcium libre.

4.4.1 Concentration en Mg^{2+}

Tel qu'anticipé lors de l'émission de nos hypothèses, la variation de la concentration en Mg^{2+} du milieu d'exposition n'a pas résulté en une variation significative de la réponse toxique de l'algue au cadmium lorsque cette réponse a été exprimée en fonction de la concentration en cadmium total ou ionique libre en solution, de même qu'en fonction des quotas intracellulaires de cadmium. C'est donc dire que la concentration en Mg^{2+} des milieux d'exposition, dans la gamme des concentrations testées et selon les conditions expérimentales employées, n'aurait pas d'incidence significative sur la réponse toxique au cadmium de *P. subcapitata*. Il est à noter que les concentrations en magnésium définies pour effectuer nos expériences ont été choisies en fonction de concentrations en magnésium mesurées dans trois échantillons prélevés dans des rivières du Québec par COREM (Olsen et al. 2004).

4.4.2 Concentration en Ca^{2+}

Tel que mentionné précédemment, nous avons dû effectuer des ajustements des concentrations en cuivre, fer et zinc dans les milieux d'exposition afin de respecter les

conditions d'exposition du milieu de référence (CEAEQ 2003). Les résultats obtenus à partir des expositions à des concentrations variables en Ca^{2+} dans les milieux d'exposition ont conduit à des résultats contraires à nos hypothèses initiales. Nous anticipions une diminution de l'expression toxique du cadmium lorsque la concentration en Ca^{2+} du milieu d'exposition augmenterait.

En considérant les CI_{50} exprimées en fonction de la concentration en Cd^{2+} des milieux d'exposition, seule la valeur obtenue à partir des expositions réalisées à une concentration en Ca^{2+} de $2,92 \times 10^{-3}$ M a été différente de la CI_{50} obtenue dans les conditions de référence pour cette série d'expérimentations (milieu CEAEQ avec 1 μM d'EDTA et 10 mM de MOPS). La différence entre les limites des intervalles de confiance ($\alpha = 0,05$) pour ces deux valeurs est de 1,6 nM Cd^{2+} , ce qui nous porte à considérer que la concentration en Ca^{2+} , dans les conditions en présence lors de nos expérimentations, en ajustant les concentrations en cuivre, fer et zinc ioniques libres dans les milieux d'exposition, n'a pas d'impact toxicologique significatif sur la réponse toxique au cadmium de l'algue verte *P. subcapitata*. De plus, en considérant la réponse toxique au cadmium obtenue pour les expositions réalisées à des concentrations croissantes en calcium dans le milieu, aucune tendance générale n'a pu être identifiée en fonction des concentrations de calcium présentes dans le milieu. Ces observations vont à l'encontre de nos hypothèses initiales de même que de ce qui a été observé dans le cadre d'autres travaux (Heijerick et al. 2002, Issa et al. 1995, Fernandez-Piñas et al. 1995, Mosulén et al. 2003). Par contre, dans ces travaux antérieurs, les modifications des concentrations en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} en solution n'avaient pas été considérées.

4.4.3 Ajustement des concentrations en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+}

En réalisant une exposition au cadmium de *P. subcapitata* dans un milieu avec $5,92 \times 10^{-3}$ M Ca^{2+} mais sans ajuster les concentrations en cuivre, fer et zinc ioniques libres, nous avons pu observer une modification de la réponse toxique au cadmium. Dans ces conditions, un effet protecteur apparent du calcium a été identifié. C'est donc dire que la diminution de la réponse toxique au cadmium ne serait pas directement attribuable à la

dureté ; de même, elle ne pourrait être imputable à un simple effet protecteur du Ca^{2+} en solution.

Dans le cas où les concentrations en Cu^{2+} n'étaient pas ajustées, aucun effet protecteur n'a été identifié sur la réponse toxique au cadmium. La valeur de CI_{50} (Cd^{2+}) obtenue est similaire à celle obtenue pour les milieux à concentrations ajustées en Cu^{2+} , Fe^{3+} et en Zn^{2+} . L'effet protecteur apparent du calcium n'est donc pas imputable à l'augmentation de la concentration en Cu^{2+} dans le milieu d'exposition. Pour les expositions réalisées avec des concentrations en Fe^{3+} et en Zn^{2+} non ajustées, la réponse toxique a été similaire à celle obtenue sans ajustement des concentrations ioniques libres en ces trois oligo-éléments. C'est donc dire que l'effet protecteur observé serait imputable à une augmentation de la concentration en Fe^{3+} ou en Zn^{2+} dans le milieu d'exposition. Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi Heijerick et al. (2002) ont identifié un effet de la dureté sur la réponse toxique au zinc de *P. subcapitata* alors que De Schampelaere et al. (2003) n'ont pas identifié d'effet de la dureté sur la réponse toxique au cuivre, toujours pour la même algue. L'effet protecteur attribuable à l'augmentation de la concentration en Fe^{3+} et en Zn^{2+} dans le milieu d'exposition pourrait, par exemple, être attribuable à une compétition entre Cd^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} pour les sites de liaisons cellulaires. La compétition pourrait se faire particulièrement au niveau des sites de liaisons intracellulaires également utilisés par le cadmium pour son expression toxique. En effet, les valeurs de CI_{50} exprimées en fonction des quotas intracellulaires de Cd obtenus pour les milieux avec des concentrations ajustées en Cu^{2+} et Fe^{3+} , de même que sans ajustement des concentrations en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} , sont significativement différentes des valeurs de CI_{50} obtenues avec ajustement des concentrations en ces oligo-éléments et avec des concentrations ajustées en Fe^{3+} et Zn^{2+} . La valeur de CI_{50} (toujours en fonction des quotas intracellulaires de cadmium) obtenue avec des concentrations ajustées en Cu^{2+} et Zn^{2+} diffère également de celle obtenue avec ajustement des concentrations en Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} . Nárcisz Sas et al. (2006) ont posé l'hypothèse que le Cd^{2+} pourrait remplacer le Zn^{2+} sur certaines enzymes (comme l'anhydrase carbonique) pour expliquer l'inhibition de la photosynthèse de la cyanobactérie *Synechocystis* PCC 6803 observée en présence de cadmium. Ils ont également posé l'hypothèse que la toxicité du cadmium pourrait s'expliquer par le remplacement du fer (et d'autres micronutriments) par l'ion cadmium sur une métallo-

enzyme. Dans le cadre de nos travaux, la présence d'une concentration plus importante de Fe^{3+} ou de Zn^{2+} en solution pourrait ainsi réduire le potentiel toxique du cadmium par une plus grande compétition pour les sites de liaison enzymatiques.

Nos observations vont à l'encontre de plusieurs théories impliquant l'effet protecteur de la dureté et/ou de la concentration en calcium du milieu d'exposition sur la réponse toxique.

4.5 Perspectives pour le CEAEQ

L'une des principales utilités du protocole du CEAEQ (2003) est de définir le potentiel toxique d'effluents de natures diverses par des dilutions de ces effluents avec de l'eau contenant des éléments nutritifs. C'est dans cette optique que nous avons abordé nos travaux. En considérant, dans un premier temps, l'effet de la présence d'EDTA sur la réponse toxique, nous pouvons constater que la présence d'un ligand modifie considérablement la spéciation du métal dans le milieu d'exposition. Ainsi, le ratio cadmium libre sur cadmium total diminue rapidement en présence d'un ligand comme l'EDTA. La toxicité d'un métal est intimement liée à sa spéciation et particulièrement à la fraction ionique libre du métal en solution (en considération également à toutes les exceptions applicables au BLM). L'ajout d'un ligand dans le milieu d'exposition du CEAEQ aurait un effet direct sur la réponse toxique mesurée pour un effluent donné, en considérant qu'un métal est la principale raison de sa toxicité. En effet, l'ajout de l'EDTA est souvent utilisé comme outil diagnostique, pour déterminer si la toxicité d'un effluent donné est imputable à des métaux cationiques (US EPA 1991, 1992 et 1996). Tel que nous l'avons observé dans le cadre de nos travaux, en considérant la réponse de l'algue en fonction de la concentration totale de cadmium en solution, la réponse toxique est significativement différente. Dans notre cas, l'écart relatif entre les deux valeurs de CI_{50} est de $\sim 160\%$. L'ajout d'EDTA (ou d'un autre agent chélateur) dans le cadre de tels tests de toxicité ne serait donc pas approprié et pourrait conduire à des résultats de type « faux négatif ». Il ne serait donc pas recommandé d'utiliser un agent chélateur pour déterminer le potentiel de toxicité d'un effluent de nature inconnu.

Nous percevons par contre l'usage d'un tampon de pH d'une manière différente. Le protocole du CEAEQ (2003) implique que les expositions soient toutes effectuées dans des milieux d'exposition à pH $7,00 \pm 0,20$ unités. Le pH a un effet sur la spéciation des ions métalliques en solution. Les expositions réalisées sans tampon lors de nos travaux ont démontré des variations de pH importantes au cours de la période d'exposition. Dans notre cas, nous avons observé dans les milieux d'exposition sans tampon que la surface cellulaire moyenne des algues était plus grande que dans les milieux avec tampon. La présence d'un tampon permet également de diminuer grandement les variations temporelles de pH en solution. La présence d'un tampon en solution pourrait réduire les risques de modifications à la surface cellulaire, comme la perméabilité membranaire.

La présence d'une dureté élevée dans les effluents testés pourrait également avoir un impact sur la réponse observée lors de tests de toxicité réalisés avec *P. subcapitata* selon le protocole CEAEQ (2003). Le magnésium (Mg^{2+}) n'aurait pas d'effet sur la réponse toxique, du moins à l'intérieur de la gamme de concentrations testée dans le cadre de nos travaux. Ceci ne serait pas le cas pour le calcium (Ca^{2+}). La présence de concentrations élevées en Ca^{2+} dans le milieu d'exposition diminuerait la toxicité du cadmium, du moins en présence d'EDTA. Tel que mentionné, cet effet serait en fait imputable à une modification des concentrations en certains oligo-éléments dans les milieux d'exposition. Il est important de considérer que la diminution de la toxicité du cadmium observée en présence de concentrations plus élevées en Fe^{3+} et Zn^{2+} dans le milieu d'exposition ne devrait pas avoir d'incidence pour le CEAEQ, dans le cas où des effluents ayant une dureté élevée sont testés. Dans de telles conditions, l'absence d'EDTA dans le milieu prévient l'augmentation des concentrations en Fe^{3+} et Zn^{2+} dans le milieu d'exposition et donc, la diminution de la toxicité du cadmium qui en découle. Ceci peut représenter un argument défavorable à l'utilisation d'EDTA dans le milieu du CEAEQ, en considérant les utilisations qui sont faites du test. Par contre, dans le cas où des effluents enrichis en Fe^{3+} et Zn^{2+} en solution sont testés, une diminution de la toxicité devrait être observée, ce qui conduirait à un résultat de type « faux négatif ». Pour de tels effluents, des résultats de toxicité obtenus à partir du protocole du CEAEQ devraient être interprétés avec prudence.

5. Conclusion

La mise en place de critères et de normes fixes (réglementaires ou non), visant à définir des concentrations maximales admissibles en certains éléments traces métalliques (ÉMT), s'est avéré un outil incomplet pour assurer la protection des milieux aquatiques tout en étant surprotecteur dans certaines conditions. Ceci a mené au développement d'approches qui tiennent compte du milieu récepteur comme les études de suivi des effets sur l'environnement (ESEE) et l'établissement d'objectifs environnementaux de rejet (OER) qui utilisent dans l'établissement des objectifs et dans le processus de suivi, des tests de toxicité. Le test de toxicité avec *P. subcapitata* du CEAEQ (2003) est un test de référence dans ce domaine au Québec. Par contre, en présence de conditions particulières de dureté, de matière organique dissoute (MOD) ou d'un agent chélateur, c'est-à-dire dans des conditions qui peuvent prévaloir dans les effluents miniers ou les effluents de papetières par exemple, ces tests peuvent mener à des résultats de type « faux positif » ou « faux négatif », qui cachent le risque environnemental réel lié à la présence d'un contaminant métallique aquatique pour le milieu récepteur. En considérant un métal en particulier, soit le cadmium, nous nous sommes questionnés sur l'effet de certains de ces facteurs sur la toxicité du cadmium envers l'algue *P. subcapitata*. Les facteurs choisis dans le cadre de nos travaux ont été la présence d'un agent chélateur (l'EDTA), la présence d'un tampon pH (HEPES et MOPS) de même que l'effet de la dureté sur la réponse toxique au cadmium.

Nous avons donc fixé trois objectifs principaux pour orienter nos recherches. Le premier objectif visait à évaluer l'effet de la présence d'un agent complexant (EDTA) sur la toxicité et la biodisponibilité du cadmium envers l'algue test. Le deuxième objectif était de déterminer l'effet de la présence d'un tampon pH (HEPES et MOPS) sur la toxicité et la biodisponibilité du cadmium. Le troisième objectif était de déterminer l'effet de la dureté sur la toxicité et la biodisponibilité du cadmium. Les expériences de toxicité ont été

effectuées en se basant sur le protocole du CEAEQ (2003), et en utilisant du ^{109}Cd comme traceur pour faciliter le suivi de la bioaccumulation du cadmium.

Dans un premier temps, nous avons démontré que la présence d'EDTA (1 μM) dans le milieu d'exposition diminue la toxicité du cadmium. La présence d'un chélate comme l'EDTA dans le milieu diminue la quantité de cadmium biodisponible. Ce cadmium non (ou moins) biodisponible dû à la présence d'EDTA devient également une réserve de cadmium ce qui explique que la toxicité du cadmium exprimée en fonction de la concentration en Cd^{2+} du milieu augmente en présence d'EDTA. La réduction de la biodisponibilité du cadmium applicable à la présence d'EDTA dans le milieu rend inapplicable l'utilisation d'un chélate dans le cadre de tests de toxicité effectués sur des effluents de nature inconnue à cause de sa capacité de liaison des métaux en solution. Nos résultats laissent également entendre que le cadmium intracellulaire est légèrement moins biodisponible en présence d'EDTA.

Par la suite, nous avons déterminé l'effet de la présence de deux tampons de pH sur la réponse toxique au cadmium. En présence de HEPES dans le milieu, la toxicité du Cd exprimée en fonction des quotas intracellulaires était plus élevée que dans les milieux sans tampon. Aucune différence significative de la réponse toxique n'a été identifiée en présence du tampon MOPS. Les expériences réalisées à pH ajusté manuellement ne se sont pas avérées concluantes ; les variations de pH qui se sont produites entre les ajustements semblent avoir nuit à la croissance de l'organisme.

La concentration en magnésium du milieu d'exposition n'a pas eu d'impact sur la réponse toxique au cadmium de *P. subcapitata* dans les conditions utilisées lors de notre étude. De même, les concentrations en calcium n'ont pas eu d'impact sur la réponse toxique observée lors de nos travaux. L'effet protecteur attribué à la dureté et plus précisément dans certains cas à la concentration en calcium, magnésium ou sodium, ou encore au ratio Ca : Mg, serait en fait attribuable à une augmentation des concentrations ioniques libres en fer et en zinc. L'augmentation de la concentration en cuivre n'était pas la cause de cet effet protecteur.

Ces résultats ont une pertinence environnementale certaine. Certaines agences gouvernementales, dont Environnement Canada, préconisent l'utilisation de milieux d'exposition contenant de l'EDTA. Nos résultats démontrent que l'EDTA complexe les métaux et réduit considérablement la proportion ionique libre d'un métal. L'EDTA est donc susceptible d'affecter la sensibilité du test de toxicité et de diminuer la toxicité apparente d'un effluent contenant des concentrations en ÉTM pouvant représenter un risque environnemental.

Dans le cadre de tests de toxicité avec des algues effectués dans un milieu statique, comme c'est le cas pour notre protocole de référence, la production d'ions hydroxydes par les algues amène une augmentation graduelle du pH dans le milieu d'exposition. La spéciation de certains métaux est fortement affectée par le pH, ce qui fait que sans contrôle de ce paramètre, des variations importantes des concentrations en M^{z+} peuvent survenir et avoir des répercussions sur la réponse toxique. L'utilisation d'un tampon de pH, en l'occurrence MOPS, dans les conditions d'utilisation du protocole du CEAEQ devrait être considérée de façon à réduire l'augmentation du pH induite par la croissance algale dans les milieux d'exposition. L'utilisation de protocoles dynamiques, comme les cultures en chémostat, pourrait également être considérée.

Les effluents miniers et certaines eaux industrielles présentent des duretés élevées. Les critères de qualité appliqués aux métaux de plusieurs agences gouvernementales dont ceux du Gouvernement du Québec attribuent à la dureté un effet protecteur quant à la toxicité du baryum, du cadmium, du cuivre, du nickel, du plomb et du zinc. Or selon nos résultats avec le cadmium, la dureté et les concentrations en Ca et Mg ne seraient pas responsables de cet effet protecteur chez *P. subcapitata*. Les changements dans la spéciation du Fe et du Zn en seraient responsables. C'est donc dire que dans certaines conditions, les critères de qualité actuels pourraient s'avérer sous-protecteurs quant aux concentrations en certains métaux en solution. Il faut admettre, cependant, que nous n'avons étudié que l'espèce *P. subcapitata*.

Pour donner suite à nos recherches, il pourrait être envisagé d'effectuer la même démarche mais en utilisant d'autres métaux comme l'argent, le baryum, le cuivre, le nickel, le plomb

et le zinc par exemple, particulièrement pour nos travaux qui ont traité de l'effet de la concentration en calcium et des teneurs en oligo-éléments dans le milieu. Il serait également intéressant d'effectuer des tests de toxicité semblables à ceux faits dans le cadre de nos recherches, mais en utilisant des cultures en continues (ex. : chémostats).

6. Bibliographie

- ACADEMIC SOFTWARE. (2001). IUPAC Stability Constants Database, version 5.15, Academic Software, Otley, Yorkshire, UK.
- ARMAND, L., PERRIN, F., ROSTAND, J., AUGER, P. et AIGRAIN, P (1970). L'encyclopédie internationale des sciences et des technologies, Les Presses de la Cité, France, 787 p. (pp. 565-568).
- ASSOCIATION MINIÈRE DU CANADA. (2006). Faits et chiffres 2006. L'Association minière du Canada, Ottawa, ON, Canada, 38 p. + annexes.
- BARTLETT, L., RABE, F.W. et FUNK, W.H. (1974). Effects of copper Zn and Cd on *Selenastrum capricornutum*. *Water Res.* 8 : 179-185.
- BOILY, F. (2004). Mécanismes de prise en charge et toxicité du cadmium en présence de thiosulfate chez une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-ETE, Québec, QC Canada, 124 p.
- CAMPBELL, P.G.C., CHAPMAN, P.M. et HALE, B.A. (2006). Risk assessment of metals in the environment. *Issues Environ. Sci. Technol.* 21 : 102-131.
- CAMPBELL, P.G.C. et COUILLARD, Y. (2004). Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques. Dans : E. Pelletier, P.G.C. Campbell, et F. Denizeau (éds), *Écotoxicologie moléculaire - Principes fondamentaux et perspectives de développement*, Les Presses de l'Université du Québec, Ste-Foy, QC, Canada, pp. 9-61.
- 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*, John Wiley & Sons Ltd., New York, NY, USA, pp. 45-102.
- CAMPBELL, P.G.C. et TESSIER, A. (1987). Metal speciation in natural waters: Influence of environmental acidification. Dans : R.A. Hites et S.J. Eisenreich (éds), *Sources and Fates of Aquatic Pollutants*, American Chemical Society, Washington, DC, USA, Advances in Chemistry Series, No. 216, Chapter 7, pp. 185-207.
- CAMPBELL, P.G.C. et STOKES, P.M. (1985). Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42 : 2034-2049.

- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC (CEAEQ). (2005). Recherche et dénombrement des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives : méthode par incorporation à la gélose. MA 700. BHA35 1.0, Rev. 2. Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, Québec, QC, Canada, 15 p.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC (CEAEQ). (2003). Détermination de la toxicité : inhibition de la croissance chez l'algue *Selenastrum capricornutum*. MA. 500 – S.cap. 2.0. Ministère de l'Environnement du Québec, Québec, QC, Canada, 26 p.
- CHAPMAN, P.M. et WANG, F., (2000). Issues in ecological risk assessment of inorganic metals and metalloids. *Human Ecol. Risk Assess.* 6 : 965-988.
- CHEN, C.Y., LIN, K.C. et YANG, D.T. (1997). Comparison of the relative toxicity relationships based on batch and continuous algal toxicity tests. *Chemosphere* 35 : 1959-1965.
- CHEN, C.Y. et LIN, K.C. (1997). Optimization and performance evaluation of the continuous algal toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.* 16 : 1337-1344.
- CHIAUDANI, G. et VIGHI, M. (1978). The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.* 21 : 317-329.
- CONSEIL CANADIEN DES MINISTRES DE L'ENVIRONNEMENT (CCME). (2002). Recommandations canadiennes pour la qualité des eaux : protection de la vie aquatique – tableau sommaire, mis à jour, dans *Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement*, Winnipeg, MB, Canada.
- CONSEIL NATIONAL DE RECHERCHÉ DU CANADA (NRCC). (1979). Effects of Cadmium in the Canadian Environment, (éd. NRCC : Subcommittee on heavy metals and certain other elements), NRCC Publication #16743, Ottawa.
- CONWAY, H.L. et WILLIAMS, S.C. (1979). Sorption of cadmium and its effect on growth and the utilization of inorganic carbon and phosphorus of two freshwater diatoms. *J. Fish. Res. Board Can.* 36 : 579-586.
- COUILLARD, Y., CAMPBELL, P.G.C. et TESSIER, A. (1993). Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Limnol. Oceanogr.* 38 : 299-313.
- CUSIMANO, R.F., BRAKKE, D.F. et CHAPMAN, G.A. (1986). Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43 : 1497-1503.

- DEIR, A. R. (1957). Canadian Mineral Statistics 1886 - 1956 Mining Events 1604 - 1956. Minister of Trade and Commerce, Ottawa, ON, Canada, p. 14, 50.
- DE SCHAMPHELAERE, K.A.C., HEIJERICK, D.G. et JANSSEN, C.R. (2004). Comparison of the effect of different pH buffering techniques on the toxicity of copper and zinc to *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology* 13 : 697-705.
- DE SCHAMPHELAERE, K.A.C., VASCONCELOS, F.M., HEIJERICK, D.G., TACK, F.M.G., DELBEKE, K., ALLEN, H.E. et JANSSEN, C.R. (2003). Development and field validation of a predictive copper toxicity model for the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22 : 2454 – 2465.
- ELINDER, C.-G. (1985). Cadmium: Uses, Occurrence, and Intake, Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- ENVIRONNEMENT CANADA. (1997). Environmental Assessments of Priority Substances under the Canadian Environmental Protection Act, Guidance Manual Version 1.0, EPS/2/CC/3E:1-1 à 8-10, xvii + 86 p.
- ERRÉCALDE, O., SEIDL, M. et CAMPBELL, P.G.C., (1998). Influence of a low weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: an exception to the free-ion model. *Water. Res.* 32 : 419-429.
- EUROPEAN UNION (EU). (2003). European Union Risk Assessment Report. Risk assessments on cadmium metal and oxide. EC Regulation 793/93. Draft version of 3 July 2003 (environment). Belgium:Rapporteur. 1. 2003. Brussels, Belgium.
- FERNANDEZ-PIÑAS, F., MATEO, P. et BONILLA, I. (1995). Cadmium toxicity in *Nostoc* UAM208: protection by calcium. *New Phytol.* 131 : 403-407.
- FERNANDEZ-PIÑAS, F., MATEO, P. et BONILLA, I. (1991). Binding of cadmium by cyanobacterial growth media: free ion concentration as a toxicity index to the cyanobacterium *Nostoc* UAM 208. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21 : 425-431.
- FORTIN, C., COUILLARD, Y., VIGNEAULT, B., CAMPBELL, P.G.C. et TESSIER, A. (2007). Determination of free Cd, Cu and Zn concentrations in lake water by *in situ* dialysis followed by a column equilibration ion-exchange method. Manuscrit en préparation.
- FORTIN, C. (2000). Mécanismes de prise en charge et de toxicité de l'argent sur une algue verte en relation avec la spéciation chimique. Thèse de doctorat, Université du Québec. INRS-Eau, Québec, QC, Canada, 159 p.

- FORTIN, C. et CAMPBELL, P.G.C. (1998). An ion-exchange technique for free-metal ion measurements (Cd^{2+} , Zn^{2+}): applications to complex aqueous media. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 72 : 173-194.
- FRANKLIN, N.M., STAUBER, J.L., RICHARD, P.L. et PETOCZ, P. (2002). Toxicity of metal mixture to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*): the effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 : 2412-2422.
- GEIS, S.W., FLEMING, K.L., KORTHALS, E.T., SEARLE, G., REYNOLDS, L. et KARNET, D.A. (2000). Modification to the growth inhibition test for use as a regulatory assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 19 : 36-41.
- GIGUÈRE, A., CAMPBELL, P.G.C., HARE, L., McDONALD, D.G. et RASMUSSEN, J. (2004). Influence of lake chemistry and fish age on cadmium, copper, and zinc concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61 : 1702-1716.
- HEIJERICK, D.G., JANSSEN, C.R. et DE COEN, W.M. (2003). The combined effect of hardness, pH and dissolved organic carbon on the chronic toxicity of Zn to *D. magna*: development of a surface response model. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44 : 210 – 217.
- HEIJERICK, D.G., DE SCHAMPHELAERE, K.A.C. et JANSSEN, C.R. (2002). Biotic ligand model development predicting Zn toxicity to the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: possibilities and limitations. *Comp. Biochem. and Physiol. C.* 133 : 207-218.
- HINDAK, F. (1990). *Biologicke Prace*, 5, 209 p.
- HINDAK, F. (1988). *Biologicke Prace*, 34 (1-2), 216 p.
- ICA. (2005). INTERNATIONAL CADMIUM ASSOCIATION. Site Internet : <http://www.cadmium.org/>.
- ISSA, A.A., ABDEL-BASSET, R. et ADAM, MS, (1995). Abolition of heavy metal toxicity on *Kirchneriella lunaris* (Chlorophyta) by calcium. *Ann. Bot.* 75 : 189-192.
- ISO. (1989). ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION. ISO 8692, Water Quality - Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Raphidocelis subcapitata*. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- JENSEN, A. et BRO-RASMUSSEN, F. (1992). Environmental contamination in Europe. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 125 : 101-181.

- KANDEGERADA, A. et RORABACHER, D.B. (1999). Non complexing tertiary amines as “better” buffers covering the range of pH 3-11. Temperature dependence of their acid dissociation constants. *Anal. Chem.* 77 : 3140-3144.
- KUHN, R. et PATTARD, M. (1990). Results of the harmful effects of water pollutants to green algae (*Scenedesmus subspicatus*) in the cell multiplication inhibition test. *Water Res.* 24 : 31-38.
- LAGE, O.M., VASCONCELOS, M.T.S.D., SOARES, H.M.V.M., OSSWALD, J.M., SANSONETTY, F., PARENTE, A.M. et SALEMA, R. (1996). Suitability of the pH buffer 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.
- LANE, T. W. et MOREL, F.M.M. (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 : 4627-4631.
- LAWRENCE, S.G., HOLOKA, M.H. et HAMILTON, R.D. (1989). Effects of cadmium on a microbial food-chain, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Tetrahymena vorax*. *Sci. Tot. Environ.* 87-8 : 381-395.
- LIDE, [D.R.](#) et FREDERIKSE, [H.P.R eds.](#) *CRC Handbook of Chemistry and Physics* 77th Edition. (1996). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA.
- LIN K.C., LIN C.I., et CHEN C.Y. (1996). The effect of limiting nutrient on metal toxicity to *Selenastrum capricornutum*. *Toxicol. Environ. Chem.* 56: 47-61.
- LUND, J.W.G. (2004). The Fritsch Collection of Illustrations of Freshwater & Terrestrial Algae, <http://windermere.ceh.ac.uk/fritsch/Features.htm>.
- MACFIE, S.M., TARMOHAMED, Y. et WELBOURN, P.M. (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 : 454-498.
- MARKICH, S.J., BATLEY, G.E., STAUBER, J.L., ROGERS, N.J., APTE, S.C., HYNE, R.V., BOWLES, K.C. WILDE, K.L. et CREIGHTON, N.M. (2005). Hardness corrections for copper are inappropriate for protecting sensitive freshwater biota. *Chemosphere.* 60 : 1 – 8.
- MASON, A.Z. et JENKINS, K.D. (1995). Metal detoxification in aquatic organisms. Dans : A. Tessier et D.R. Turner (éds), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, John Wiley & Sons Ltd., New York, NY, USA, pp. 479-608.

- MARTELL, A.E., SMITH, R.M. et MOTEKAITIS, R.J. (2004). NIST Critically selected Stability Constants of Metal Complexes. NIST Standard reference database 46, version 8.0, U.S. Department of Commerce, Gaithersburg, MD, USA.
- MARTEL, L. (2004). Étude de la toxicité à l'aide de tests en laboratoire. Rapport sectoriel Projet R-13. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Ministère de l'Environnement du Québec, Québec, QC, Canada, 23 p.
- MENV. (2001). *Critères de qualité de l'eau de surface au Québec*. Ministère de l'Environnement du Québec, Québec, QC, Canada. http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/criteres_eau/index.htm.
- MILLER, W.E., GREENE, J.C., SHIROYAMA, T. (1978). The *Selenastrum capricornutum* Printz Algal Assay Bottle Test: Experimental design, Application, and Data Interpretation Protocol. Corvallis Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR, USA, 126 p.
- MOSULÉN, S., DOMÍNGUEZ, J.M., VIGARA, J., VÍLCHEZ, C., GUIRAUM, A. et VEGA, J.M. (2003). Metal toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*, effect on sulphate and nitrate assimilation. *Biomol. Eng.* 20 : 199-203.
- MOREL, F.M.M. (1983). *Principles of Aquatic Chemistry*. Wiley-Interscience, New York, NY, USA, pp. 301-305.
- MULLER, K.W. et PAYER, H.D. (1979). Influence of pH on cadmium repressed growth of the alga *Coelastrum proboscideum*. *Plant Physiol.* 45 : 415-418.
- NÁRCISZ SAS, K., KOVÁCS, L., ZSIROS, O., GOMBOS, Z., GARAB, G., HEMMINGSEN, L. et DANIELSEN, E. (2006). Fast cadmium inhibition of photosynthesis in cyanobacteria *in vivo* and *in vitro* studies using perturbed angular correlation of γ -rays. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11 : 725-734.
- NYHOLM, N. (1985). Response variable in algal growth inhibition tests - biomass or growth rate? *Water Res.* 19 : 273-279.
- OLSEN, C., DUFOUR, M. et BOIVIN, J.A. (2004). Spéciation et caractérisation géochimique et limnologique de trois rivières recevant un effluent minier : Évaluation spatiale et temporelle de la qualité des eaux réceptrices et des sédiments, COREM, Québec, QC, Canada, 31 p. + annexes.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). (1994). Risk Reduction Monograph No. 5: Cadmium OECD Environment Directorate, Paris, France.

- PACYNA, J.M., SCHOLTZ, M.T. et LI, Y.-F.A. (1995). Global budget of trace metal sources. *Environ. Rev.* 3 : 145-159.
- PERCEVAL, O., COUILLARD, Y., PINEL-ALLOUL, B., BONNERIS, E. et CAMPBELL, P.G.C. (2006). Long-term trends in accumulated metals (Cd, Cu and Zn) and metallothionein in bivalves from lakes within a smelter impacted area. *Sci. Tot. Environ.* 369 : 403-416.
- RESSOURCES NATURELLES CANADA (2005a). L'industrie des minéraux et des métaux du Canada, Un aperçu économique. Gouvernement du Canada. http://www.nrcan.gc.ca/mms/pdf/econo05_f.pdf.
- RESSOURCES NATURELLES CANADA (2003a). Atlas du Canada. Gouvernement du Canada. <http://atlas.gc.ca/site/francais/maps/economic/rdc96/min96> .
- RESSOURCES NATURELLES CANADA (1945b-2005b). Annuaire des minéraux du Canada 1944-2004. 15.1-15.5 (annuaires individuels cités dans le texte comme « Ressources naturelles Canada 1964 » ou « Ressources naturelles Canada 2004 », etc.).
- RONDEAU, B. (2002). Suivie de l'état du Saint-Laurent : la qualité de l'eau du secteur fluvial – Fiche d'information, Saint-Laurent Vision 2000, Direction de la conservation de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa, ON, Canada, 6 p.
- SCHECHER, W.D. et MCAVOY, D.C. (2001). MINEQL+, version 4.5. Environmental Research Software, Hallowell, ME, USA.
- SCHUBAUER-BERIGAN, M.K., DIERKES, J.R., MONSON, P.D. et ANKLEY, G.T. (1993). pH-dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyaella azteca*, and *Lumbriculus variegatus*: *Environ. Toxicol. Chem.* 12 : 1261-1266.
- SKOWROŃSKI, T., SZUBIŃSKA, S., PAWLIK, B., JAKUBOWSKI, M., BILEWICZ, R. et CUKROWSKA, E. (1991). The influence of pH on cadmium toxicity to the green alga *Stichococcus bacillaris* and on the cadmium forms present in the culture medium. *Environ. Pollut.* 74 : 89-100.
- SMITH, F.A. et RAVEN, J.A. (1976). H⁺ transport and regulation of cell pH. Dans : A. Pirson et M.H. Zimmermann (éds), *Encyclopedia of Plant Physiology*, Springer-Verlag, New York, NY, USA, pp. 317-346.
- SOARES, H.M.V.M., CONDA, P.C.F.L., ALMEIDA, A.A.N. et VASCONCELOS, M. T.M.D. (1999). Evaluation of n-substituted aminosulfonic pH buffers with a morpholinic ring for cadmium and lead speciation studies by electroanalytical techniques. *Anal. Chem. Acta* 394 : 325-335.

- STATISTIQUE CANADA (2005). Production minérale du Canada. Ministère de l'industrie, Gouvernement du Canada, Ottawa, ON, Canada.
- TEMPELTON, D.M., ARIESE, F., CORNELIS, R., DANIELSSON, L.-G. MUNTAU, H., VAN LEEUWEN, H.P. et ŁOBINIŃSKI, R. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure Appl. Chim.* 72 : 1453-1470.
- THELLEN, C., BLAISE, C., ROY, Y. et HICKEY, C. (1989). Round robin testing with the *Selenastrum capricornutum* microplate toxicity assay. *Hydrobiologia* 188-189 : 259-268.
- TESSIER, A., COUILLARD, Y., CAMPBELL, P.G.C. et AUCLAIR, J.C. (1993). Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anodonta grandis*. *Limnol. Oceanogr.* 38 : 1-17.
- TUKAJ, Z., BAŚCIK-REMISIEWICZ, A., SKOWROŃSKI, T. et TUKAJ, C. (2007). Cadmium effect on the growth, photosynthesis, ultrastructure and phytochelatin content of green microalga *Scenedesmus armatus*: A study at low and elevated CO₂ concentration. *Environ. Exp. Bot.* 60 : 291-299.
- TURBAK, S.C., OLSON, S.B. et McFETERS, G.A. (1986). Comparison of algal assay systems for detecting waterborne herbicides and metals. *Water Res.* 20 : 91-96.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). (2002). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms (Fourth edition), EPA-821-R-02-013. Office of Water, Washington, DC, USA, 335 p.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). (1996). Marine toxicity identification evaluation (TIE): Phase I Guidance Document. EPA-600-R-95/054. Environmental Effects Research Laboratory, Narragansett, RI, USA, 66 p.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). (1994). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms (Third edition), EPA-600-4-91-002. Cincinnati, OH, USA, 314 p.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). (1992). Toxicity identification evaluation: Characterization of chronically toxic effluents, Phase I, EPA-600-6-91/005F. Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, Duluth, MN, USA, 60 p.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). (1991). Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase I toxicity characterization

- procedures (Second edition), EPA-600-6-91-003. Environmental Research Lab, Office of Research and Development, Duluth, MN, USA, 100 p.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). (1989). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA/600/4-89/001, PB89-207013. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, OH, USA, 230 p.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). (1985). Freshwater algae acute toxicity test. *Fed. Reg.* 50 : 39, 323–39, 333.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). (1971). Algal assay procedure bottle test. National Eutrophication Research Program, 82 p.
- U.S. GEOLOGICAL SURVEY (USGS). (1937-1980). Bureau of Mines Mineral Yearbook 1936-1980. U.S. Department of the Interior, Reston, VA, USA.
- U.S. GEOLOGICAL SURVEY (USGS). (1958 – 1980). Bureau of Mines Minerals Yearbooks 1954 to 1980 ; Metals and Minerals. U.S. Department of the Interior, Reston, VA, USA. <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/usbmmyb.html>.
- U.S. GEOLOGICAL SURVEY (USGS). (2005). Mineral Commodity Summaries, U.S. Department of the Interior, Reston, VA, USA, pp. 40-41.
- VALLIÈRES, M. (1988). Des mines et des hommes : histoire de l'industrie minière au Québec. Les publications du Québec, QC. Canada, 439 p. (p. 424).
- VASCONCELOS, M.T.S.D. et ALMEIDA, C.M.R. (1998). Electrochemical study of proton ionisation, copper (II) complexation and surfactant properties of pH buffer comparison with other N-substituted aminosulfonic acids buffers. *Anal. Chim. Acta* 369 : 115-122.
- VASCONCELOS, M.T.S.D., AZENHA, M.A.G.O. et LAGE, O.M. (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.
- VINDIMIAN, E. (2003). REGTOX: macro Excel™ for dose-response modelling.
- VIGNEAULT, B. et CAMPBELL, P.G.C. (2005). Uptake of cadmium by freshwater green algae: effects of pH and aquatic humic substances. *J. Phycol.* 41 : 55-61.
- WANG, D., COUILLARD, Y., CAMPBELL, P.G.C. et JOLICOEUR, P. (1999). Changes in subcellular metal partitioning in the gills of freshwater bivalves (*Pyganodon*

grandis) living along an environmental cadmium gradient. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56 : 774-784.

WONG, P.T.S., BURNISON, G. et CHAU, Y.K. (1979). Cadmium toxicity to freshwater algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23 : 487-490.

WOOD, J.M. (1976). Métaux toxiques dans l'environnement. *La Recherche* 70 : 711-719.

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO). (2000). Air Quality guidelines (Second edition). WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, pp. 1-4.

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO). (1992). Environmental health criteria 134 - Cadmium International Programme on Chemical Safety (IPCS) Monograph. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>.