

Université du Québec  
Institut national de la recherche scientifique  
Centre Eau Terre Environnement

**Étude de la répartition subcellulaire des éléments du groupe platine et des terres rares chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii***

Par  
Kim Racine

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

Jury d'évaluation

Président du jury et  
examinatrice externe

Marie-Noële Croteau  
USGS

Examineur interne

Patrice Couture  
INRS-ETE

Directeur de recherche

Claude Fortin  
INRS-ETE

Codirecteur de recherche

Peter G.C. Campbell  
INRS-ETE



## REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Claude Fortin, pour m'avoir donné la chance de faire partie de son équipe. Son sens du détail, sa confiance, ses réponses à mes nombreuses questions et son temps disponible m'ont permis de bien réaliser ce projet. J'aimerais aussi remercier mon co-directeur Peter Campbell pour ses bons conseils et son aide.

Je veux remercier les membres du soutien technique des laboratoires de l'INRS qui m'ont apporté une grande aide lors des analyses à l'ICP-MS et avec qui j'ai pu avoir de belles discussions. Je remercie particulièrement Julie Perreault, Anissa Bensadoune et Jean-François Dutil.

Je tiens à remercier mes collègues pour leur aide et leur présence au laboratoire. Vous m'avez permis de vivre de bons moments au cours de ces deux dernières années. Je remercie Cédrick Beaubien, Anne Crémazy, Vincent Laderrière, Sébastien Leguay, Camille Guilleux, Caroline Doose, Geneviève Rioux, Fengjie Liu, ainsi qu'Isabelle Lavoie pour son aide dans les statistiques.

Je remercie également tous les étudiants que j'ai côtoyés pendant ma maîtrise dont Alexandre Royer Lavallée, Khalid Oubennaceur, Antony Laberge et Rosemarie Gagnon. J'aimerais remercier mes parents, mon frère et mes sœurs qui ont toujours cru en moi. Leur support au niveau moral et financier ainsi que leur motivation dans ce que je fais ont été grandement appréciés. Un merci spécial à ma sœur Karine pour avoir relu mon mémoire.

La dernière personne que je veux remercier est mon copain Bartosz Sitar pour son soutien, ses nombreux encouragements et pour son intérêt face à mon projet. Merci d'avoir été présent à chaque moment.



## RÉSUMÉ

Les éléments du groupe platine et les terres rares sont des éléments très convoités, ce qui est susceptible d'augmenter leur présence dans les eaux de surface et le risque d'accumulation chez les organismes aquatiques. Cette étude a permis de mieux comprendre l'accumulation et la toxicité de ces éléments peu connus chez les organismes aquatiques. L'objectif spécifique était d'examiner la gestion intracellulaire de quatre éléments (Pd, Pt, La, Eu) chez une algue verte (*C. reinhardtii*) grâce au fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle. Elle visait aussi à déterminer l'influence que le pH et le temps d'exposition peuvent avoir sur la distribution subcellulaire. Suite aux expositions ( $[M] < 200 \text{ nM}$ ) dans un milieu sans phosphate, afin d'éviter la précipitation des terres rares, les quantités de terres rares dans différentes fractions – granules, organites, débris, HSP (*heat stable peptides*) et HDP (*heat denatured proteins*) – ont été déterminées après analyse par ICP-MS. La somme des quantités de métaux dans ces fractions a ensuite été comparée avec celles observées sur des cellules entières afin d'établir un bilan de masse. Les expositions aux pH 6, 7 et 8 ont donné des résultats similaires. Une proportion importante de Pd et de Pt (éléments « mous ») a été observée dans la fraction organites (dite sensible). Les éléments La et Eu (éléments « durs ») se sont retrouvés davantage dans la partie granules (dite détoxiquée). Les expériences avec un temps différent ( $t = 1 \text{ h}$  ou  $14 \text{ h}$ ) ont montré les mêmes résultats. Cela suggère que la distribution des éléments dans les différentes fractions de la cellule atteint un état stationnaire assez rapidement. Finalement, la distribution relative obtenue parmi les différentes parties suggère un potentiel relativement élevé pour le transfert trophique de Pd et Pt par rapport au transfert de La et Eu.

**Mots - clés :** Algue unicellulaire, *Chlamydomonas reinhardtii*, lanthane, europium, palladium, platine, pH, répartition subcellulaire, toxicité



## TABLE DES MATIÈRES

|  |      |
|--|------|
| REMERCIEMENTS .....  | iii  |
| RÉSUMÉ.....  | v    |
| TABLE DES MATIÈRES .....   | vii  |
| Liste des figures.....   | xi   |
| Liste des tableaux .....   | xiii |
| Chapitre 1 : Introduction .....                                    | 1    |
| 1.1    Éléments du groupe platine .....                            | 1    |
| 1.1.1    Caractéristiques.....                                     | 1    |
| 1.1.2    Utilisations.....   | 3    |
| 1.2    Contamination de l'environnement aquatique par les EGP..... | 5    |
| 1.2.1    Sources d'éléments dans l'environnement .....             | 5    |
| 1.2.2    Toxicité.....   | 6    |
| 1.3    Lanthanides.....  | 8    |
| 1.3.1    Caractérisation.....                                      | 8    |
| 1.3.3    Utilisations.....   | 11   |
| 1.4    Contamination de l'environnement par les terres rares ..... | 11   |
| 1.4.1    Sources d'éléments dans l'environnement .....             | 12   |
| 1.4.2    Toxicité.....   | 13   |
| 1.5. Biodisponibilité des métaux .....                             | 15   |
| 1.5.1    Détoxification du métal dans la cellule.....              | 16   |
| 1.5.2    Répartition subcellulaire du métal dans la cellule.....   | 17   |
| 1.6    Objectifs du projet .....                                   | 18   |
| Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....                            | 21   |
| 2.1    Organismes d'étude.....                                     | 21   |

|   |    |
|---|----|
| 2.1.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> et parties des cellules.....               | 21 |
| 2.1.2 Entretien et culture des algues .....                                       | 24 |
| 2.2 Milieu de culture et d'exposition.....  | 24 |
| 2.2.1 Produits, réactifs et solutions intermédiaires.....                         | 25 |
| 2.2.2 Milieu MHSM-1.....  | 25 |
| 2.2.3 Milieu de rinçage .....   | 26 |
| 2.2.4 Milieux d'exposition.....   | 27 |
| 2.3 Méthode de fractionnement.....  | 28 |
| 2.3.1 Récupération des algues.....  | 28 |
| 2.3.2 Rinçages des algues.....  | 30 |
| 2.3.3 Homogénéisation des cellules.....   | 30 |
| 2.3.4 Fractionnement subcellulaire .....  | 31 |
| 2.3.5 Minéralisation .....  | 32 |
| 2.3.6 Analyse par ICP-MS.....   | 33 |
| 2.3.7 Analyses statistiques .....   | 34 |
| Chapitre 3 : Résultats et discussion.....   | 35 |
| 3.1 Exposition de <i>C. reinhardtii</i> aux Pd, Pt, La et Eu.....                 | 35 |
| 3.1.1 Influence de la variation du pH.....  | 35 |
| 3.1.2 Effet de Pd et de Pt sur la distribution subcellulaire de La et de Eu ..... | 44 |
| 3.1.3 Effet de La et de Eu sur la distribution subcellulaire de Pd et de Pt ..... | 46 |
| 3.2 Exposition de <i>C. reinhardtii</i> aux lanthanides.....                      | 48 |
| 3.2.1 Influence du temps d'exposition .....                                       | 53 |
| 3.3 Mécanismes de détoxication.....   | 55 |
| 3.4 Répercussion de la distribution subcellulaire sur le transfert trophique..... | 56 |
| Chapitre 4 : Conclusions.....   | 61 |
| Chapitre 5 : Références.....  | 65 |
| ANNEXE A.....   | 71 |

|               |    |
|---------------|----|
| ANNEXE B..... | 72 |
| ANNEXE C..... | 74 |



## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| Figure 1.1 : Pourcentages (%) des principaux pays producteurs de platine dans le monde.....   | 2  |
| Figure 1.2 : Pourcentages (%) des principaux pays producteurs du palladium dans le monde.....   | 3  |
| Figure 1.3 : Transformation des molécules dans un catalyseur de voiture .....   | 4  |
| Figure 1.4 : Emplacements qui représentent un potentiel pour l'exploitation des terres rares au Québec ( <a href="https://www.mern.gouv.qc.ca/mines/industrie/metaux/metaux-exploration-terres-rares.jsp">https://www.mern.gouv.qc.ca/mines/industrie/metaux/metaux-exploration-terres-rares.jsp</a> ; consulté le 25 octobre 2015) ..... | 10 |
| Figure 2.1 : <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (wikipedia).....  | 22 |
| Figure 2.2 : Cellule de l'algue <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....  | 23 |
| Figure 3.1 : Pourcentage (%) des éléments obtenus dans la fraction « organites » de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; a = différence non significative, b = différence significative avec a, a,b = différence non significative avec a et b.....   | 37 |
| Figure 3.2 : Pourcentage (%) des éléments obtenus dans la fraction « granules » de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....   | 38 |
| Figure 3.3 : Pourcentage (%) des éléments obtenus dans la fraction « débris » de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....   | 39 |
| Figure 3.4 : Pourcentage (%) des éléments obtenus dans la fraction « HDP » de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....  | 40 |
| Figure 3.5 : Pourcentage (%) des éléments obtenus dans la fraction « HSP » de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....  | 41 |
| Figure 3.6 : Pourcentages moyens du lanthane obtenus lors du fractionnement subcellulaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> sans et avec Pd et Pt.....  | 44 |

|   |    |
|---|----|
| Figure 3.7 : Pourcentages moyens de l'europlum obtenus lors du fractionnement subcellulaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> avec et sans Pd et Pt.....        | 45 |
| Figure 3.8 : Pourcentages moyens du palladium obtenus lors du fractionnement subcellulaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> sans et avec La et Eu.....         | 46 |
| Figure 3.9 : Pourcentages moyens du platine obtenus lors du fractionnement subcellulaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> sans La et Eu .....                  | 47 |
| Figure 3.10 : Pourcentages moyens de chaque métal obtenus lors du fractionnement subcellulaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....                          | 49 |
| Figure 3.11 : Concentrations (amol/cell) des différents éléments obtenues lors du fractionnement de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....                        | 51 |
| Figure 3.12 : Concentrations (amol/cell) des différents éléments obtenues lors du fractionnement de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....                        | 52 |
| Figure 3.13 : Concentrations (amol/cell) totales des éléments à l'intérieur de la cellule .....   | 53 |
| Figure 3.14 : Pourcentages moyens de chaque métal obtenus lors du fractionnement subcellulaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> pour un temps de 1 heure ..... | 54 |
| Figure 3.15 : Pourcentages moyens de chaque métal lors du fractionnement subcellulaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> pour un temps de 14 heures.....        | 54 |
| Figure 3.16 : Variation du TAM ( <i>Trophically Available Metal</i> ) selon la capacité digestive et d'assimilation du brouteur/prédateur .....                   | 57 |

## LISTE DES TABLEAUX

|   |    |
|---|----|
| Tableau 2.1 : Composition du milieu MHSM-1 .....  | 26 |
| Tableau 2.2 Paramètres des différents milieux d'expositions .....                                   | 28 |
| Tableau 2.3 : Dilution à faire pour les fractions solides.....                                      | 33 |
| Tableau 3.0 : Taux de récupération moyen (pH 6-7-8) des éléments dans la cellule ...                | 43 |
| Tableau 3.1 : Différences significatives observées dans les différentes parties de la cellule ..... | 50 |



# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

## 1.1 Éléments du groupe platine

Le platine (Pt), le palladium (Pd), le rhodium (Rh), l'osmium (Os), l'iridium (Ir) et le ruthénium (Ru) sont les métaux qui font partie des éléments du groupe platine (EGP) (Encyclopédie canadienne, 2006). Ce sont des éléments qui appartiennent aux métaux de transition dans le tableau périodique.

### 1.1.1 Caractéristiques

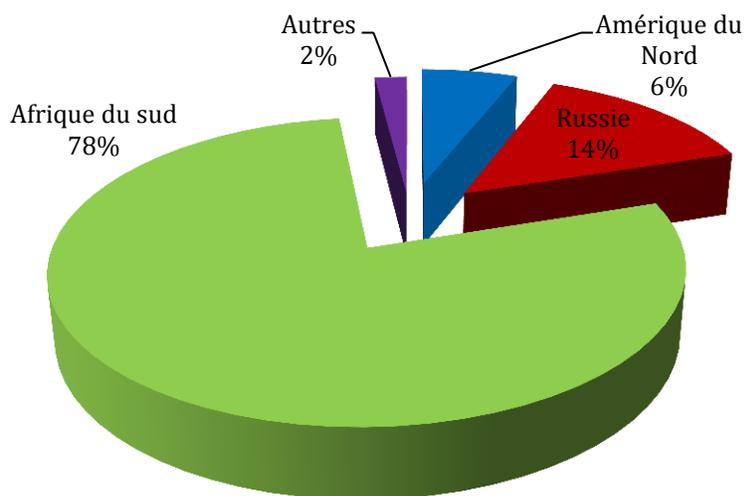
L'exploration des éléments du groupe platine a débuté dans l'antiquité avec la découverte du platine. Il était considéré comme un métal impur par les Espagnols et ces derniers le nommaient « petit argent ». Ils n'y trouvaient aucun intérêt particulier (USGS, 2015). C'est au cours du 20<sup>e</sup> siècle que les éléments du groupe platine ont pris plus d'importance dans le marché. À ce moment, les prix ont fortement augmentés vu la forte demande (Ek *et al.*, 2004).

Aujourd'hui, le Pt et le Pd sont les EGP qui se retrouvent le plus en abondance dans l'environnement en raison de leurs nombreuses utilisations (voir sections 1.1.2). Roy (2009) a observé des concentrations en Pd dans la rivière Lorette et Duberger (Québec, QC) allant jusqu'à 39 ng L<sup>-1</sup> et 74 ng L<sup>-1</sup> respectivement. Ce sont des éléments très convoités et la production de ceux-ci est rarement à égalité avec la demande (Ravindra *et al.*, 2004). Un total de 14 200 tonnes métriques d'EGP a été produit entre 1900 et 2011 : de cette somme, 95% ont été extraits à partir de 1960 (USGS, 2014).

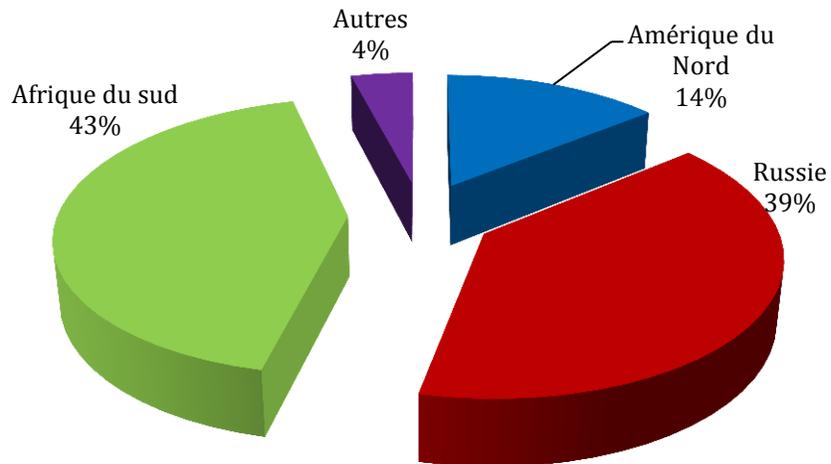
Le Pd et le Pt possèdent des caractéristiques très particulières. Ils ont un point de fusion élevé, ils sont résistants à l'érosion et à l'oxydation à des températures élevées et ils ont d'importantes capacités catalytiques (Ravindra *et al.*, 2004; USGS, 2014). Le

Pd et le Pt sont retrouvés habituellement sous l'état d'oxydation +2. Leur position dans le tableau périodique fait en sorte qu'ils ont entre 10 et 12 électrons dans leur orbitale extérieure et ils sont facilement déformables par les charges voisines. Ils sont des métaux mous et font partie des cations de classe B (Fortin *et al.*, 2012; Sigg *et al.*, 2000; Stumm *et al.*, 1996). Ils ont une tendance à se lier facilement aux ligands S et N (Sigg *et al.*, 2000).

L'Afrique du Sud, la Russie et l'Amérique du Nord sont les trois plus grands producteurs d'EGP (Ek *et al.*, 2004). La figure 1.1 montre les quantités de Pt produites par les différents pays en 2013 et la figure 1.2 montre celles pour le Pd (USGS, 2007).



**Figure 1.1 : Pourcentages (%) des principaux pays producteurs de platine dans le monde**



**Figure 1.2 : Pourcentages (%) des principaux pays producteurs du palladium dans le monde**

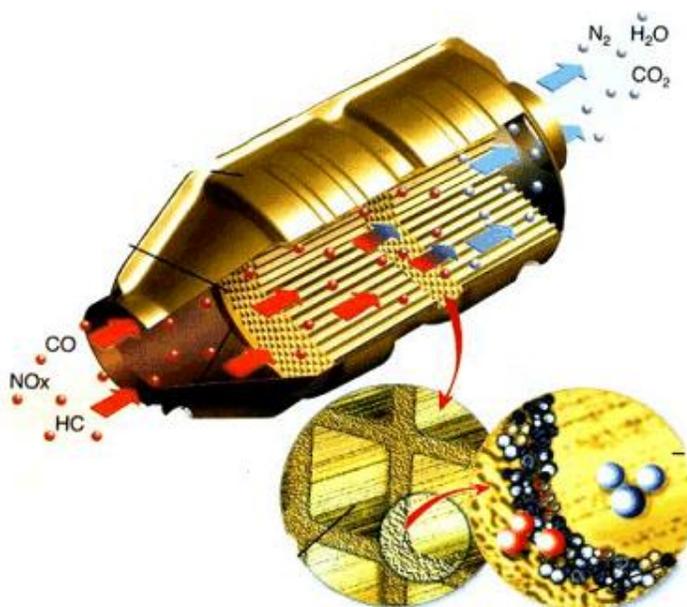
Le Canada est le troisième plus grand producteur d'EGP dans le monde. On estimait en 2013 que l'Afrique du Sud possédait 95% des réserves en éléments du groupe platine sur la planète (USGS, 2015).

### 1.1.2 Utilisations

Les nombreuses utilisations des éléments du groupe platine proviennent de leurs caractéristiques particulières qui ont déjà été mentionnées à la section 1.1.1.

La fabrication des catalyseurs de voitures nécessite une grande quantité d'EGP (Wiseman *et al.*, 2009). Les catalyseurs sont composés d'une pièce métallique où environ 300 à 400 canaux sont présents et donnent l'impression d'une forme de nid d'abeille. Ensuite, sur ces canaux, il y a présence d'une fine couche composée à 90% de  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ , des éléments tels que le cérium (Ce), le zirconium (Zr), le lanthane (La), le nickel (Ni), le fer (Fe), de métaux alcalins ainsi que des EGP. Le Pd, le Pt et le Rh sont

les trois éléments retrouvés dans les catalyseurs. Ils permettent, lorsque les gaz s'échappent du moteur et entrent dans le catalyseur, d'obtenir des réactions d'oxydation et de réduction (Ravindra *et al.*, 2004). Le catalyseur sert principalement à transformer le monoxyde de carbone, l'oxyde d'azote et les hydrocarbures non brûlés en diazote, en eau et en dioxyde de carbone (voir figure 1.3). Le Pd et le Pt permettent d'oxyder le CO et les hydrocarbures pour les transformer en CO<sub>2</sub> et en H<sub>2</sub>O, puis le Rh réduit les NO<sub>x</sub> (Ek *et al.*, 2004). Habituellement, lorsque tout fonctionne bien, 90% des réactions ci-haut sont complétées lorsque la voiture est en fonction (Ravindra *et al.*, 2004).



**Figure 1.3 : Transformation des molécules dans un catalyseur de voiture**

(<http://www.carbon-cleaning.com/techniques/catalyseur-pot-catalytique> ; site web consulté le 3 novembre 2015)

Bien que les EGP soient principalement utilisés dans le catalyseur des voitures, ils sont aussi employés dans d'autres domaines. Par exemple, ils sont présents dans les hôpitaux pour les traitements contre les cancers en chimiothérapie (Kelland, 2007), dans les bijoux pour les alliages (Biggs *et al.*, 2005) ainsi que chez les dentistes pour

les alliages (Ravindra *et al.*, 2004). Aussi, vu leur point de fusion élevé, ils sont également utilisés dans l'industrie du verre pour faire les pièces servant à la fabrication du verre (Couderc, 2010).

## **1.2 Contamination de l'environnement aquatique par les EGP**

Tel que mentionné au paragraphe précédent, l'exploitation et l'utilisation courante des éléments du groupe platine font en sorte que ces éléments se retrouvent dans l'environnement. Dans cette section nous nous attarderons aux sources et aux effets des EGP dans l'environnement.

### **1.2.1 Sources d'éléments dans l'environnement**

Les éléments du groupe platine sont présents à de faibles concentrations dans la croûte terrestre (Ek *et al.*, 2004). Le Pd et le Pt se trouvent à 0,4 ng/g et le Rh est à 0,05 ng/g (Hans Wedepohl, 1995). Dans l'environnement, les EGP peuvent venir de différentes sources et parmi les principales, il y a le catalyseur des voitures et les rejets d'eaux usées provenant des hôpitaux (Ravindra *et al.*, 2004). Par exemple, Helmers *et al.* (1998) ont retrouvé 2,2 µg/L de Pt dans les effluents d'hôpitaux en Allemagne.

Concernant les voitures, les EGP sont libérés avec les gaz d'échappement en faible quantité mais malgré tout ceux-ci peuvent se retrouver dans l'environnement et être ainsi biodisponibles. Après 30 000 km, une voiture libère entre 1 et 17 ng km<sup>-1</sup> de Pt et entre 2 et 22 ng km<sup>-1</sup> de Pd (Moldovan *et al.*, 2002). Comme le nombre de véhicules automobiles sur les routes est en croissance, la quantité d'EGP émis dans l'environnement est à la hausse également (Wiseman *et al.*, 2009). Les fines particules

qui s'échappent des voitures peuvent se déposer sur le sol et se retrouver dans les cours d'eau (Zereini *et al.*, 1997). Les voies de transport les plus fréquentes pour les EGP sont les eaux de ruissellement (Ravindra *et al.*, 2004).

De plus, dans les hôpitaux, le platine est présent dans les médicaments antinéoplasiques qui sont administrés aux patients pour traiter les cancers. Ensuite, ceux-ci les rejettent par l'urine et dû à cela, les éléments se retrouvent présents dans l'environnement. Par contre, des auteurs qui ont fait l'étude de plusieurs sources de contamination par les EGP considèrent que celle des hôpitaux est peu inquiétante face aux différentes sources anthropiques, dont les catalyseurs (Ravindra *et al.*, 2004).

Les autres sources possibles proviennent des eaux usées des différentes industries comme celles des bijoux et de la fabrication du verre (Kümmerer *et al.*, 1999).

### **1.2.2 Toxicité**

L'augmentation des concentrations des éléments du groupe platine peut avoir des risques pour la santé humaine ainsi que pour le milieu environnant (Colombo *et al.*, 2008). Un certain nombre d'études ont été faites sur ce sujet vu l'augmentation des voitures sur les routes qui émettent des EGP dans l'environnement.

Il a été montré que l'exposition des humains aux EGP pouvait avoir différents effets sur les voies respiratoires. Elle peut aussi augmenter la présence de problèmes tels que les dermatites, l'asthme, les nausées et le gonflement des lèvres (Colombo *et al.*, 2008; Ravindra *et al.*, 2004; WHO, 2002). Un groupe d'étude a exposé des rats par inhalation au Pt pendant 90 jours et les résultats ont montré que 77% du Pt inhalé franchissait la membrane des poumons. Cela suggère que les particules inhalées peuvent se lier à des cellules pulmonaires et ainsi avoir des effets néfastes sur le corps humain (Artelt *et al.*, 1999; Colombo *et al.*, 2008).

Les éléments du groupe platine peuvent aussi se retrouver dans l'eau et être nuisibles pour les organismes aquatiques. Une équipe de recherche a exposé des anguilles dans une eau contaminée au Pt et Rh. Les anguilles ont été exposées à une concentration de 170 µg/L en Pt et 260 µg/L en Rh. Il est important de mentionner que ces concentrations sont beaucoup plus élevées que celles trouvées dans les eaux naturelles. Les résultats ont montré que les éléments se retrouvaient dans différentes parties de l'anguille, mais pas dans le sang. Des concentrations variant entre 68 et 840 ng/g de poids sec en Pt et entre 35 à 155 ng/g en Rh ont été observées dans différentes parties de l'anguille, soit la bile, le foie, les reins et l'intestin de l'organisme (Zimmermann *et al.*, 2004). Ces éléments peuvent ensuite être assimilés par les organismes qui vont se nourrir de ces animaux faisant ici référence à la possibilité d'un transfert trophique.

Aussi, chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*, des études ont montré que les EGP pouvaient être toxiques pour une cellule (Roy, 2009; Tétrault, 2014). Une des particularités des effets de Pd et de Pt est qu'ils ont tendance à retarder l'atteinte de la phase exponentielle de croissance. Des cellules algales ont été exposées à différentes concentrations de Pd et de Pt ainsi qu'à différents pH afin de voir l'influence que cela pouvait avoir chez l'organisme. Les algues ont été exposées aux pH 6, 7 et 8 en présence du palladium et ce, à différentes concentrations. Le pH 7 est celui où il y a une augmentation la plus marquée du temps pour atteindre la phase exponentielle de croissance des algues comparativement aux pH 6 et 8. Une différence dans la croissance de l'algue était observable après 24 heures pour les pH 6 et 7, mais elle ne l'était pas au pH 8. À ce temps, les concentrations efficaces médianes (CE<sub>50</sub>) obtenues à pH 6 et 7 en utilisant la densité cellulaire pour suivre la croissance des algues étaient respectivement de 10 et 7 µg/L. Les mêmes expériences ont été faites avec le platine et les résultats obtenus étaient très semblables à ceux du Pd. La CE<sub>50</sub> obtenue pour cet

élément était de 5 µg/L à pH 7, ce qui est légèrement plus faible que celle obtenue pour le palladium (Tétrault, 2014).

Une autre étude fait par Roy (2009) avec l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* a déterminé la toxicité du Pd à pH 7. Les EC50 calculées à partir des concentrations mesurées de Pd étaient de 10,1 µg L<sup>-1</sup>, 8,7 µg L<sup>-1</sup>, 6,5 µg L<sup>-1</sup> et 5,7 µg L<sup>-1</sup> pour des temps de 24 h, 48 h, 72 h et 96 h. Ces résultats montrent une diminution de la EC50 de Pd en fonction du temps, ce qui signifie que la toxicité augmente avec des temps d'exposition plus longs, ce qui est souvent observé en toxicologie (Roy, 2009).

### **1.3 Lanthanides**

Les lanthanides sont présents dans la rangée IIIA du tableau périodique et leur numéro atomique se trouve entre 57 et 71. Le lanthane (La), le cérium (Ce), le praséodyme (Pr), le néodyme (Nd), le prométhium (Pm), le samarium (Sm), l'euporium (Eu), le gadolinium (Gd), le terbium (Tb), le dysprosium (Dy), l'holmium (Ho), l'erbium (Er), le thulium (Th), l'ytterbium (Yb) et le lutécium (Lu) sont les 15 éléments faisant partie des lanthanides (Castor *et al.*, 2006). Dans le terme « terres rares », l'yttrium (Y) et le scandium (Sc) sont considérés comme des éléments faisant partie de ce groupe (Alonso *et al.*, 2012), mais le Sc est habituellement exclu des descriptions comme il a un petit rayon atomique (Henderson, 2013). On retrouve principalement ces éléments dans les minéraux de basnaésite, monazite et xénotime (Kanazawa *et al.*, 2006).

#### **1.3.1 Caractérisation**

Les terres rares ont commencé à être découvertes à partir du XVIII<sup>e</sup> siècle. C'est l'yttrium qui a été trouvé en premier dans la ville d'Ytterby d'où il porte son nom. Plusieurs autres terres rares portent le nom d'une ville située en Europe du Nord, car

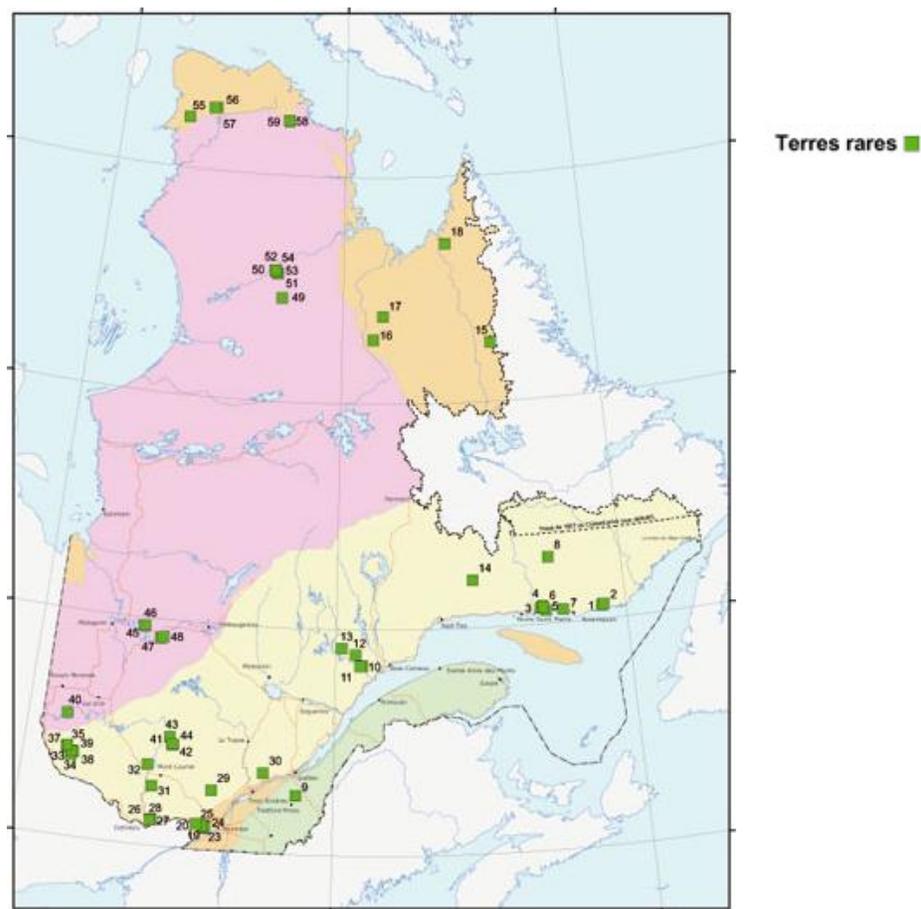
elles ont été découvertes sur ce continent. Par exemple, le thulium a été découvert en Thulé, une île de l'Europe du Nord qui porte maintenant le nom de Scandinavie (Bondaz, 2012).

Les terres rares sont divisées en deux groupes dont les terres rares légères (*Light Rare Earth Elements* (LREEs)) et les terres rares lourdes (*Heavy Rare Earth Elements* (HREEs)) (Kanazawa *et al.*, 2006). Le premier groupe comprend les éléments entre le lanthane et l'euporium inclusivement et le deuxième groupe comprend ceux entre le gadolinium et le lutécium. L'yttrium fait partie du deuxième groupe d'élément vu ses propriétés physiques et chimiques (Castor *et al.*, 2006). Les terres rares se retrouvent naturellement ensemble et généralement présentes sous forme trivalente (Castor *et al.*, 2006).

Les éléments de ce groupe sont retrouvés habituellement sous l'état d'oxydation 3+ comme il a été mentionné ci-dessus. Ce sont des cations ayant une configuration comme les gaz inertes faisant partie des cations de classe A. Leur enveloppe d'électrons est peu déformable par les charges voisines, car leur orbitale extérieure est complète et sphérique. Le terme employé pour ces éléments est «sphères dures». La stabilité des complexes formés dépend de la relation charge/rayon. Ces cations ont tendance à se lier aux fluorures, aux hydroxydes, aux carbonates et aux phosphates (Sigg *et al.*, 2000; Stumm *et al.*, 1996).

En 1991, la quantité produite par les principaux producteurs des terres rares s'élevait à 48 kilotonnes métriques et en 2001, elle était de 94 kilotonnes métriques (Castor *et al.*, 2006). Depuis 2003, plus de 90% de la production mondiale des terres rares se fait par la Chine (Kanazawa *et al.*, 2006). À partir de cette même année, elle exerce un contrôle sur l'exportation des terres rares (Castor *et al.*, 2006).

Les autres pays, comme le Canada, ont donc décidé de commencer à étudier les ressources de terres rares sur leur territoire (Comité permanent des ressources naturelles - Chambre des communes, 2014). Le Québec a aussi un plan d'exploitation des terres rares et la figure 1.4 montre les différents endroits où il y a possibilité d'exploiter les lanthanides. Les endroits où il y en a davantage sont dans le secteur du Lac Bisson, au Nunavik, à Kipawa et au Témiscamingue (Énergie et ressources naturelles du Québec).



**Figure 1.4 : Emplacements qui représentent un potentiel pour l'exploitation des terres rares au Québec**

(<https://www.mern.gouv.qc.ca/mines/industrie/metaux/metaux-exploration-terres-rares.jsp> ; consulté le 25 octobre 2015)

### **1.3.3 Utilisations**

Les terres rares ont commencé à être utilisées de façon importante à partir des années 60. Entre 1960 et 1980, les prix ainsi que la production de celles-ci ont beaucoup augmenté en raison de toutes les nouvelles technologies (Castor *et al.*, 2006). Elles sont très utilisées dans le secteur de l'énergie, dans l'industrie militaire, l'agronomie, la médecine ainsi que dans l'électronique (Gonzalez *et al.*, 2014). Aussi, les terres rares sont souvent ajoutées en petites quantités à des métaux comme l'aluminium et le fer afin d'améliorer les propriétés physiques des alliages (Goonan, 2011)

Dans le secteur de l'automobile, les aimants de néodyme et de fer sont utilisés pour les moteurs électriques ainsi que pour les générateurs. Les petits moteurs contenant ces aimants font fonctionner la musique, les fenêtres et les autres applications retrouvées dans une voiture. Puis, dans les gros moteurs comme ceux des voitures électriques, il peut y avoir jusqu'à 200 g de néodyme et 30 g de dysprosium (Goonan, 2011).

Il est à prévoir une augmentation de l'utilisation des terres rares, notamment dans le catalyseur des voitures, dans les aimants permanents, dans les fibres optiques, dans les applications médicales ainsi que dans les batteries au lithium qui sont de plus en plus utilisées. Toutefois on note une diminution de certaines utilisations comme dans les tubes cathodiques des téléviseurs en raison de l'augmentation des écrans plats (Castor *et al.*, 2006).

### **1.4 Contamination de l'environnement par les terres rares**

Les terres rares sont dites rares, mais ce terme n'est pas en lien avec leur abondance. Il fait référence à leur faible concentration dans les dépôts. Dans la croûte terrestre, le cérium est l'élément des terres rares le plus abondant (il est 100 fois plus présent que le Cd) et le plus étudié dans le domaine de l'écotoxicologie (Gonzalez *et al.*, 2014).

Tel que discuté dans la section 1.3, les terres rares sont beaucoup utilisées depuis les dernières années. L'augmentation de l'extraction et la production de déchets contenant ces éléments augmenteront possiblement les apports dans l'environnement.

#### **1.4.1 Sources d'éléments dans l'environnement**

Les terres rares dans l'environnement proviennent de différentes sources. Leur abondance naturelle suit la règle d'Oddo-Harkins (Gonzalez *et al.*, 2014). Les éléments ayant un numéro atomique impair sont moins abondants que ceux ayant un numéro atomique pair (Nikanorov, 2009). Généralement, les terres rares sont peu solubles dans l'environnement comme le cérium qui peut s'oxyder de Ce(III) en Ce(IV) (El-Akl *et al.*, 2015). Leur solubilité dépend de leur degré d'oxydation, des ligands anioniques et du pH de l'eau.

L'extraction de ces éléments à partir de minerais (section 1.3) fait en sorte qu'ils peuvent se retrouver dans l'environnement proche des mines d'exploitation et avoir des effets sur les milieux récepteurs. À titre d'exemple, des chercheurs ont étudié différents sites qui se trouvaient à proximité d'un barrage de résidus miniers dans la ville de Baoutou en Chine. Des échantillons de sols ont été pris à différentes distances du barrage. À 400 mètres, une concentration de 6,9 g/kg de poids secs était présente et elle était de 0,05 g/kg à 7000 m. Les concentrations totales en terre rares ont atteint 28 g/kg près du site (Li *et al.*, 2010).

Aussi, l'utilisation fréquente des différents appareils contenant ces éléments ainsi que l'utilisation des engrais phosphatés sont toutes des sources possibles de contamination (Carpenter *et al.*, 2015). Les lanthanides qui sont ajoutés dans le sol par ces engrais peuvent se trouver dans les racines et les tiges des plantes. Les

concentrations retrouvées dans ces parties augmentent lorsque la concentration retrouvée dans le sol est élevée et les éléments ont tendance à rester dans le sol en raison de leur faible mobilité. Zhang *et al.* (2001) ont exposé des plantes à un engrais appelé « Changle » contenant du La (24%), Ce (41%), Pr (4%) et Nd (14%). La concentration dans le sol pour le La était de 80 mg/kg de poids sec et cela donnait une concentration de 2,6 µg/g de La dans les plantes et de 17,7 µg/g de La dans les racines. Pour une même concentration en Ce, les concentrations dans la plante étaient de 5,1 µg/g de Ce et de 32,3 µg/g de Ce dans les racines. Aussi, l'utilisation de ces éléments comme suppléments alimentaires pour améliorer la croissance des animaux peut contribuer à augmenter la présence de ces éléments dans les sols (Gonzalez *et al.*, 2014; He *et al.*, 2001).

À ce jour, étant donné l'augmentation de produits contenant des terres rares et la possibilité d'exploiter ces éléments au Canada, de plus en plus d'équipes de recherche travaillent sur ce groupe d'éléments. Les questions sont nombreuses sur la toxicité qu'ils peuvent avoir dans l'environnement.

#### **1.4.2 Toxicité**

L'utilisation fréquente des terres rares amène un risque d'exposition et de toxicité pour les organismes aquatiques et pour les humains. L'accumulation de faibles concentrations de ces éléments par des organismes peut également représenter un risque pour la santé à différents niveaux trophiques (Zhang *et al.*, 2001). Aussi, les lanthanides tels que le Ce, La et Gd ont montré des effets sur la santé des humains. Les autres éléments n'ont pas révélé d'effets dans la littérature, mais le nombre de publications sur ce sujet est en croissance (Pagano *et al.*, 2015).

Une étude de trois groupes de population a été réalisée en Chine, portant sur des populations vivant dans un environnement dont l'air est contaminé par (i) les HREE

(Groupe A) ou (ii) les LREE (Groupe B) ainsi que (iii) sur un groupe témoin vivant dans un environnement sain (Groupe C). L'âge de la population échantillonnée se trouvait entre 20 et 45 ans. Les résultats ont montré que ceux vivant en milieu contaminé avaient une présence significativement plus faible de protéines dans leur sérum que ceux étant dans le milieu non contaminé. Par exemple, la moyenne obtenue des protéines totales pour le groupe A était de 67 g/L, une concentration significativement plus faible que celle du groupe C, le groupe témoin, de 73 g/L. Aucun dommage dans le foie n'a été détecté chez les individus (Pagano *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2005).

Aussi, chez les animaux, des souris ont été exposées au chlorure de cérium ( $\text{CeCl}_3$ ) par gavage à des concentrations de 200 mg/kg de poids corporel et de 500 mg/kg. Les souris exposées à la plus forte concentration sont mortes après 48 heures et celles exposées à 200 mg/kg ont survécu pendant 8 semaines. La présence du Ce(III) a provoqué des hémorragies pulmonaires ainsi que plusieurs autres symptômes qui indiquent une toxicité de cet élément chez l'organisme (Kawagoe *et al.*, 2008). Une autre étude a aussi été faite avec sur des rats qui ont été gavés d'une solution de  $\text{LaCl}_3$  et les résultats ont montré des déficits au niveau du comportement, de l'apprentissage et de la mémoire de ces animaux et cela est en relation direct avec l'exposition au lanthane (Feng *et al.*, 2006).

De plus, les différents paramètres mentionnés à la section 1.4.1 sur la solubilité des terres rares influencent la toxicocinétique et la biodisponibilité des éléments. Par exemple, il a été démontré que la présence de Ce(III) à une concentration se trouvant entre 10 et 100  $\mu\text{M}$  causait une malformation chez les embryons d'oursin tandis que la présence du Ce(IV) dans les mêmes concentrations ne provoquait aucun effet chez les embryons (Pagano *et al.*, 2015).

Chez l'algue *Chlorella kessleri*, une étude a été faite par Fujiwara *et al.* (2008) afin d'évaluer les  $CI_{50}$  de 33 métaux, dont le lanthane et l'euporium. Les algues ont été exposées dans un milieu dont le pH se trouvait à 7. L'inhibition de la croissance a été mesurée après 96 heures pour calculer les  $CI_{50}$ . Pour le La, la  $CI_{50}$  était de 313  $\mu M$  et la  $CI_{50}$  pour l'Eu était de 287  $\mu M$ . Les concentrations des ions libres présents en solution ont été calculées avec Visual MINTEQ et ont donné de plus faibles résultats de  $CI_{50}$ . La valeur obtenue pour le lanthane était de 59  $\mu M$  et 54  $\mu M$  pour l'euporium. Par contre, il y a eu présence d'agrégations et de précipitations des cellules algales avant d'observer les effets néfastes. Stauber *et al.* (2000) ont étudié la toxicité du lanthane chez l'algue *Selenastrum capricornutum* (maintenant connue sous le nom de *Pseudokirchneriella subcapitata*). La valeur de la  $CE_{50}$  obtenue après 72 heures était de 3,4  $\mu M$ . Dans ces expériences, l'inhibition de croissance de l'algue a été observée à partir de 0,1  $\mu M$  de La. Les auteurs expliquent leurs résultats par le fait que les phosphates en solution précipitent pour donner un phase solide de phosphate lanthane, ce qui limiterait la croissance de l'algue (Stauber *et al.*, 2000). Aussi, une algue brune, *Turbinaria conoide*, a été utilisée pour comprendre les mécanismes d'interactions avec les terres rares dans un milieu où les pH variaient entre 2 et 5. Les résultats des expositions obtenus après exposition aux La, Ce, Eu et Y ont montré qu'il y avait une biosorption importante des quatre éléments par l'algue et la plus élevée se trouvait à pH 5 (Vijayaraghavan *et al.*, 2011).

### **1.5. Biodisponibilité des métaux**

Les métaux peuvent se retrouver dans l'air, dans le sol et dans l'eau (Leventhal, 1995). La concentration totale des métaux retrouvée dans les milieux aquatiques n'est pas un bon indice pour connaître leur biodisponibilité. La spéciation du métal va affecter la disponibilité pour les organismes aquatiques (Campbell, 1995). Depuis les 30 dernières années, les recherches sont nombreuses à étudier le lien entre la spéciation

des métaux et leur biodisponibilité dans le milieu aquatique (Campbell *et al.*, 2009). Le modèle de l'ion libre est actuellement le paradigme accepté par la communauté scientifique pour prédire la biodisponibilité du métal dans l'eau (Campbell, 1995). Selon ce modèle, pour un pH et une dureté donnés, l'accumulation et la toxicité d'un métal sont proportionnelles à sa concentration sous la forme libre (Campbell *et al.*, 2009).

### 1.5.1 Détoxification du métal dans la cellule

Dans l'environnement aquatique, les organismes sont exposés aux métaux qui se trouvent sous différentes formes physicochimiques (Rainbow *et al.*, 2011). Une fois bioaccumulés, les métaux peuvent être toxiques lorsqu'ils sont en excès à l'intérieur de l'organisme. Le processus d'assimilation du métal par la cellule se fait par la liaison du métal à des sites spécifiques de transport sur la cellule, suivie du transport à travers la membrane cellulaire (Campbell, 1995).

Le mécanisme de détoxification d'un métal dans la cellule peut expliquer les différentes résistances des espèces d'algues aux métaux en solution. Par exemple, *Chlamydomonas reinhardtii* est une espèce qui tolère davantage la présence de cadmium dans les milieux aqueux que l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*. Cette tolérance relative s'explique par une meilleure détoxification du Cd par *C. reinhardtii* au niveau intracellulaire (Lavoie *et al.*, 2009).

En effet, les cellules algales vont mettre en branle différents mécanismes pour contrôler la concentration intracellulaire du métal. Les stratégies de détoxification d'un métal par les différentes espèces d'algues peuvent être connues en suivant la distribution subcellulaire. Les métaux vont se lier fortement à certaines molécules (ex. peptides) pouvant mener à une détoxification par exemple par la formation de

granules. Inversement, le métal peut se lier à des molécules ou des sites sensibles tels que les organites (ex. mitochondries) ou les enzymes (Campbell *et al.*, 2009).

### 1.5.2 Répartition subcellulaire du métal dans la cellule

Le métal, une fois traversé la membrane de la cellule, se lie à des ligands et se loge dans différentes fractions subcellulaires. La distribution que les métaux ont dans les différentes parties des cellules peut être influencée par la compétition entre les ligands présents dans les cellules et par les propriétés de complexation des métaux (Crémazy *et al.*, 2013). Les métaux de classe A comme le lanthane et l'yttrium vont avoir tendance à former des complexes avec les ligands comme les hydroxydes, les carbonates et les phosphates, c'est-à-dire ceux dont les atomes donneurs sont l'oxygène. Les métaux de classe B comme le Pd et le Pt vont, par exemple, se lier davantage à l'azote réduit qu'aux atomes d'oxygène (Sigg *et al.*, 2000).

Les métaux peuvent se trouver associés à des sites sensibles pour la cellule comme les protéines thermosensibles (HDP) et les organites. Ils peuvent aussi se lier aux protéines thermorésistantes (HSP) qui, avec les granules, sont connues pour être des fractions liées à la détoxification des métaux. La fraction débris est aussi une partie où le métal peut se loger chez l'algue (Lavoie *et al.*, 2009). Par exemple, Crémazy *et al.* ont exposé l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* au scandium (Sc) et à l'aluminium (Al) pendant 72 heures. Ils ont obtenu, pour le Sc, 5,2% dans les débris, 16,4% dans les granules, 0,54% dans les HSP ainsi que 0,3% dans les HDP. Les pourcentages obtenus pour l'aluminium étaient similaires à ceux du Sc. (Crémazy *et al.*, 2013). Lavoie *et al.* ont observé une augmentation du pourcentage de cadmium dans les HSP lorsqu'ils exposaient *C. reinhardtii* à de plus fortes concentrations. Ils ont déduit que les peptides thermorésistants peuvent jouer un rôle important pour la séquestration du cadmium. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* (Lavoie, 2008).

## 1.6 Objectifs du projet

Les concentrations en platine et en palladium dans l'environnement ont augmenté ces dernières années (Ravindra *et al.*, 2004). La forte hausse des voitures en circulation sur les routes est en lien avec cette augmentation puisque le Pt et Pd se trouvent dans des quantités non négligeables dans les gaz d'échappement qui sortent des catalyseurs de voitures. Les conséquences sur l'environnement peuvent être nombreuses et il est important d'avoir des données écotoxicologiques pour évaluer les risques environnementaux.

Il est de même pour les terres rares qui sont aussi un groupe d'éléments de plus en plus utilisés grâce à leurs propriétés chimiques et électriques. La forte utilisation de ces éléments et l'exploitation minière prévue au Québec sont des raisons pour lesquelles il est nécessaire d'étudier les conséquences que ces éléments peuvent avoir sur l'environnement puisqu'ils risquent d'augmenter en concentration dans les prochaines années.

Ce mémoire de recherche s'insère dans un projet financé par Environnement Canada sur les métaux peu connus afin de produire des données sur la toxicité, la biodisponibilité et la mobilité de ces éléments. Il poursuit les travaux réalisés par Guillaume Tétrault au cours de sa maîtrise sur la toxicité du palladium, du platine et du rhodium. Il est aussi une suite des travaux réalisés par Cédrick Beaubien qui étudiait la toxicité des lanthanides. Ce projet consiste à comprendre la gestion intracellulaire des éléments du groupe platine et des terres rares chez une algue verte unicellulaire. Le milieu d'exposition choisi est sans phosphate, pour minimiser les risques de précipitation des terres rares. Les différences entre la distribution des éléments durs et mous y sont étudiées afin de comprendre le comportement des deux types de classe de métaux. Le palladium et le platine sont les EGP utilisés dans ces

expériences puisque ce sont les deux EGP les plus présents dans l'environnement. Alors que dans le cas des terres rares, qui sont toujours retrouvées conjointement dans l'environnement, nous avons choisi d'étudier le lanthane et l'euporium.

Les objectifs de ce projet sont les suivants :

- évaluer la biodisponibilité et le destin intracellulaire des éléments du groupe platine et des terres rares chez une algue verte;
- étudier l'influence du pH sur la distribution subcellulaire de ces éléments;
- déterminer l'influence des EGP sur la distribution subcellulaire des TR ainsi que celle des TR sur la distribution subcellulaire des EGP;
- évaluer l'influence du temps d'exposition sur la répartition subcellulaire des EGP et des TR.

L'hypothèse retenue pour ces objectifs est que les terres rares et les éléments du groupe platine n'auront pas la même distribution subcellulaire. Les terres rares étant des métaux durs, ils auront le même comportement que le scandium et l'aluminium qui avaient déjà été étudiés dans l'équipe du laboratoire (Crémazy *et al.*, 2013). Elles auront tendance à se loger davantage dans la partie « granules ». Un plus haut pourcentage du Pd et Pt (éléments « mous ») dans la partie « organites » ou dans des fractions détoxiquées comme les HSP est anticipé. Nous croyons que le pH va influencer la distribution subcellulaire sur la base des résultats de Tétrault (2014) qui a démontré que les CE<sub>50</sub> de Pd étaient similaires à pH 6 et 7 alors que l'accumulation était plus importante à pH 7, ce qui pourrait laisser croire que les mécanismes de détoxification diffèrent selon le pH d'exposition. De plus, nous voulons vérifier si la présence d'un groupe d'éléments pourrait modifier la distribution subcellulaire d'un autre groupe d'élément. Finalement, il est anticipé que le temps d'exposition n'aura pas d'influence sur la distribution des éléments chez la cellule comme elle atteint un état stationnaire rapidement.



## CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1 Organismes d'étude

L'organisme qui a été sélectionné pour l'étude est une algue verte unicellulaire. Celle-ci est utilisée couramment au laboratoire et beaucoup de données scientifiques sont disponibles sur cet organisme dans la littérature. L'algue est présente dans les cours d'eau, les lacs et dans les sols. De plus, celle-ci se trouve en bas de la chaîne alimentaire, ce qui rend possible une contamination vers tous les organismes présents dans la chaîne trophique si elle se voit contaminée. Elle représente donc un bon vecteur de contamination des maillons trophiques supérieurs.

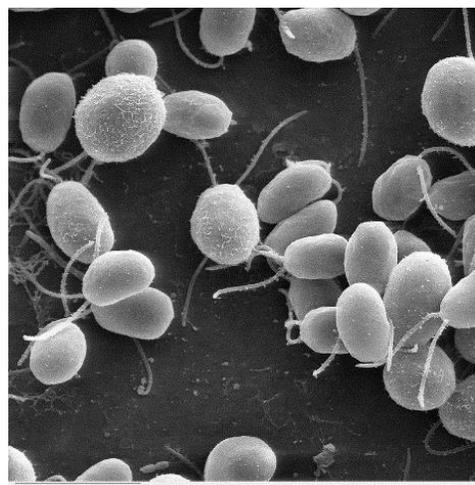
Les algues sont faciles à manipuler et à cultiver dans différents milieux. De plus, il est possible d'obtenir rapidement la quantité et la taille exactes d'algues à l'aide d'un compteur de particules. Cela permet de normaliser les résultats en fonction de la biomasse présente lors des expériences.

#### 2.1.1 *Chlamydomonas reinhardtii* et parties des cellules

L'algue verte qui a été sélectionnée pour les expériences est *Chlamydomonas reinhardtii* (figure 2.1). Cette algue est utilisée dans de nombreuses études afin de bien comprendre les mécanismes de prise en charge des métaux. Elle possède deux flagelles qui lui permettent de se déplacer et son diamètre est d'environ 5  $\mu\text{m}$ . L'algue *C. reinhardtii* vit habituellement dans un milieu où le pH varie de 6.2 à 8 (Harris *et al.*, 2009). La prise en charge des métaux par cette algue a été beaucoup étudiée au sein de l'équipe du professeur Fortin. Notons également que *C. reinhardtii* est une algue qui se lyse facilement et il est donc possible d'étudier l'accumulation des métaux dans chacune de ses parties à l'aide du fractionnement subcellulaire (voir section 2.3.4).

Dans le cadre de cette étude, l'algue a été exposée aux éléments du groupe platine ainsi qu'à différentes terres rares afin de comprendre leur distribution subcellulaire.

La souche sélectionnée pour *Chlamydomonas reinhardtii* (CPCC 11; souche autochtone avec paroi cellulaire) provient du *Canadian Phycological Culture Centre* de l'université de Waterloo (CPCC, Waterloo, ON, Canada).

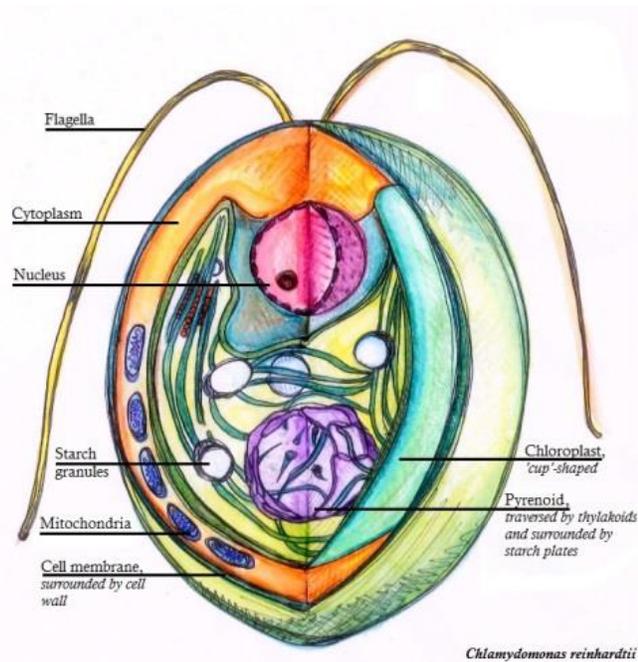


**Figure 2.1 : *Chlamydomonas reinhardtii* (wikipedia)**

Les cinq parties étudiées des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* sont les organites «Org», les granules «Gr», les débris «Db», les protéines (ou peptides) thermorésistantes «HSP» et les protéines thermosensibles «HDP». Les principaux organites des cellules sont les mitochondries, le chloroplaste, le noyau et les microsomes. Il y a aussi des organites avec une densité plus faible qui comprennent le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, et certaines autres vacuoles qui font partie du compartiment « microsomes » (Lavoie, 2008).

La fraction « granules » est liée à la détoxification des métaux et vient protéger les parties de la cellule qui sont plus sensibles aux contaminants. Les granules, comme il a été mentionné dans la thèse de M. Lavoie, ont été découvertes grâce à des structures de haute densité qui ont été observées à partir d'un microscope électronique. Deux types de granules ont été observés dont celles constituées de polyphosphates et celles contenant de fortes teneurs en azote/soufre.

Les protéines thermorésistantes (HSP) sont une classe de protéines dites chaperonnes dues au fait qu'elles aident à la stabilisation des autres protéines. Plusieurs classes sont présentes dont les HSP60 et HSP70 qui sont nécessaires pour stabiliser la structure des protéines. Elles permettent aussi à celles qui se trouvent à l'intérieur de la cellule de se dégrader et d'être transférées (Lavoie, 2008). De plus, les phytochélatines qui sont des peptides riches en cystéine sont retrouvés dans la fraction HSP. Ces peptides ont une tendance à lier fortement les métaux mous comme l'argent et le cadmium et jouent un rôle détoxifiant pour la cellule (Callahan *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2009).



**Figure 2.2 : Cellule de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii***

[https://en.wikipedia.org/wiki/Chlamydomonas\\_reinhardtii](https://en.wikipedia.org/wiki/Chlamydomonas_reinhardtii)

La deuxième catégorie de protéines présente lors du fractionnement de la cellule se révèle être les protéines thermosensibles (HDP) qui sont des enzymes. Les HDP ainsi que les HSP font partie du cytosol.

Puis, la fraction des débris comprend les structures brisées (ex. : paroi cellulaire). Elle est considérée comme une fraction utile pour déterminer l'efficacité de la rupture des cellules. Par contre, elle est moins utile sur le plan toxicologique.

### **2.1.2 Entretien et culture des algues**

Les cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* sont maintenues dans un bon état physiologique par un repiquage hebdomadaire. Pour ce faire, 0,5 mL de la solution algale est transféré dans 100 mL du milieu de culture MHSM-1 (voir section 2.2) et ce, dans un erlenmeyer de 250 mL. Cette manipulation s'effectue sous une hotte laminaire en présence de flamme afin d'avoir un milieu stérile qui empêche la contamination de la culture. Un coton stérile est ensuite déposé sur les erlenmeyers. Ils sont ensuite placés sur une plaque d'agitation orbitale dans un incubateur où la luminosité est de  $100 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  dont l'éclairage provient de fluorescent blanc froid. La photopériode pour ces cultures est de 24 h pour favoriser la croissance rapide des algues et éviter la division synchrone.

Précédant l'expérience, les algues sont gardées en phase exponentielle pendant 8 jours avant l'exposition. Le transfert s'effectue toutes les 48 heures dans les mêmes conditions qui ont été présentées ci-dessus. Le volume transféré est de 2 mL dans un volume de 100 mL de MHSM-1. De plus, lors du dernier transfert qui se fait 48 heures avant l'exposition, un volume de 10 mL d'algues est transféré dans 500 mL du milieu MHSM-1. Cette étape se fait dans un erlenmeyer de 1 L afin d'avoir une grande quantité de cellules pour les milieux d'exposition.

## **2.2 Milieu de culture et d'exposition**

La section suivante présente le milieu de culture de l'algue *C. reinhardtii* ainsi que les différents milieux utilisés pour les expositions avec ou sans métaux.

### 2.2.1 Produits, réactifs et solutions intermédiaires

Les solutions intermédiaires pour le milieu de culture sont préparées avec de l'eau Milli-Q afin d'être les plus pures possible et elles sont ensuite filtrées sur une membrane de polycarbonate de 0,2 µm de porosité. La solution de NaOH 1 M est filtrée sur un filtre en polyethersulfone (PES) de 0,2 µm qui est trempé dans l'eau Milli-Q pendant 48 heures avant la filtration. Les solutions sont toutes conservées dans un réfrigérateur à 4°C.

### 2.2.2 Milieu MHSM-1

Le milieu de culture utilisé pour l'algue *C. reinhardtii* est MHSM-1. Celui-ci a été adapté par Fortin *et al.* (2000)-à partir du milieu de Macfie *et al.* (1994). Les concentrations de phosphate et d'ammonium sont plus faibles que le milieu d'origine. Ce même milieu a été utilisé par Gabrielle Roy, Guillaume Tétrault et Anne Crémazy dans les dernières années (Crémazy *et al.*, 2013; Roy, 2009; Tétrault, 2014). Ceux-ci utilisaient aussi *C. reinhardtii* pour leur recherche.

Les descriptions des compositions et des sources des solutions utilisées pour faire le milieu de culture MHSM-1 sont présentées dans le tableau 2.2. Pour faire le milieu MHSM-1, il faut ajouter, dans une fiole jaugée de 1 L, 5 mL de la solution « ammonium #2 », 250 µL de phosphore #2, 4 mL de nitrate de potassium (KNO<sub>3</sub>) 1 M et 100 mL de MOPS 0,1 M. Ensuite, après avoir jaugé avec de l'eau Milli-Q, le pH est ajusté à 7 avec du NaOH 1 M. La solution est ensuite autoclavée à 121°C pendant 15 minutes et est mise sous une hotte à flux laminaire pendant 24 h pour atteindre la température de la pièce. L'ajout de 1 mL de la solution AAP se fait par la suite dans le milieu stérile. Le milieu est placé au réfrigérateur à 4°C en absence de la lumière.

**Tableau 2.1 : Composition du milieu MHSM-1**

| Solution intermédiaire                           | Produit                                | Concentration dans MHSM-1 (M) | Fournisseur    |
|--|--|-------------------------------|----------------|
| Acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique (100 mM) | MOPS                                   | 1,00E-02                      | Sigma Aldrich, |
| Ammonium #2                                      | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>        | 9,37E-04                      | Fisher         |
|  | MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O | 8,12E-05                      | Caledon        |
|  | Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4  |                               |                |
|  | H <sub>2</sub> O                       | 6,80E-05                      | Sigma Aldrich  |
| Phosphate # 2                                    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | 5,44E-05                      | EMD            |
|  | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>        | 8,27E-05                      | EMD            |
| KNO <sub>3</sub> (1 M)                           | KNO <sub>3</sub>                       | 4,00E-03                      | EMD Fisher     |
| NaOH (1 M)                                       | NaOH                                   | 4,25E-03                      | Fisher         |
| AAP<br>(ajouté 24 h après autoclavage)           | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>         | 3,01E-06                      | Sigma Aldrich  |
|  | MnCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O | 2,10E-06                      | Fisher         |
|  | FeCl <sub>3</sub> , 6 H <sub>2</sub> O | 5,92E-07                      | Sigma          |
|  | Na <sub>2</sub> EDTA, 2                |                               |                |
|  | H <sub>2</sub> O                       | 8,02E-07                      | Sigma Aldrich  |
|  | Zn (1 g/L)                             | 2,43E-08                      | SCP science    |
|  | Co (1 g/L)                             | 1,09E-08                      | SCP science    |
|  | Cu (1 g/L)                             | 7,03E-11                      | SCP science    |
| Mo (1 g/L)                                       | 3,00E-08                               | SCP science                   |                |

### 2.2.3 Milieu de rinçage

Le milieu de rinçage des algues est préparé sans phosphore afin d'enlever toutes traces de cet élément et éviter les précipitations possibles des métaux au moment des expositions avec les lanthanides. Pour faire ce milieu, 10 mL de solution MOPS ainsi que 1 mL d'une solution composée de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> et Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> sont ajoutés dans une

fiolle jaugée de 1 L afin d'obtenir une concentration finale en Ca est de 68,0 mM et de 81,2 mM en Mg. Une fois jaugée avec de l'eau Milli-Q, la solution est ajustée au pH désiré pour l'expérience soit pH 6, 7 ou 8 avec une solution de NaOH 1,0 M et une solution HNO<sub>3</sub> 10%. Une fois que le NaOH ou l'acide nitrique 10% sont ajoutés, il faut ajouter du NaNO<sub>3</sub> 1,5 M pour ajuster la force ionique de la solution de rinçage afin qu'elle soit presque identique à celle du milieu de culture. La force ionique du milieu MHSM-1 est de  $8,4 \times 10^{-3}$  éq/L. Au besoin, le pH est réajusté avant l'utilisation des solutions.

#### **2.2.4 Milieux d'exposition**

Les milieux d'exposition sont tous faits à partir du même protocole présenté ci-dessous. La variable changeante pour chaque milieu est l'élément et les différentes expositions sont présentées au tableau 2.2.

Dans une fiolle jaugée de 1 L, un volume de 10 mL de la solution MOPS et 1 mL de solution Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> et Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> est ajouté afin d'obtenir une concentration finale de 68,0 mM en Ca et 81,2 mM en Mg. Ensuite, dépendamment de l'expérience, il y a l'ajout de 1 mL ou 2 mL des solutions d'éléments qui sont tous à une concentration de  $1 \times 10^{-4}$  M. La concentration finale de chaque élément se trouve entre 28 et 90 nM dans les milieux d'exposition (voir tableaux B.1, B.2 et B.3 en annexe). Le volume de 1 L est complété avec de l'eau Milli-Q. Les solutions de chaque élément utilisées pour faire les milieux d'exposition proviennent des étalons d'ICP-MS d'une concentration de 1000 µg/mL dans une matrice de HNO<sub>3</sub> 2%. Une solution intermédiaire est préparée pour avoir une concentration de  $1 \times 10^{-4}$  M comme il a été mentionné ci-dessus. Ensuite, le pH du milieu est ajusté avec du NaOH 1,0 M et du HNO<sub>3</sub> 10%. Dépendamment du volume ajouté de NaOH, la force ionique est ensuite ajustée avec du NaNO<sub>3</sub> 1,5 M pour avoir la même force présente dans le milieu de culture MHSM-1 qui est habituellement de  $8,4 \times 10^{-3}$  éq/L. Cela permet d'éviter de perturber les algues par un changement de

force ionique. Le milieu d'exposition est fait 48 heures avant l'expérience afin de laisser toutes les réactions se produire et ainsi favoriser l'atteinte de l'équilibre thermodynamique. Pendant ce temps, le pH est ajusté deux fois par jour. La variation du pH est en moyenne de  $\pm 0,2$  pour un temps de 8 heures.

**Tableau 2.2 Paramètres des différents milieux d'expositions**

| <b>Expositions</b> | <b>Métaux</b>   | <b>pH</b> |
|--------------------|---|-----------|
| 1                  | Pd, Pt, La, Eu  | 6         |
| 2                  | Pd, Pt, La, Eu  | 7         |
| 3                  | Pd, Pt, La, Eu  | 8         |
| 4                  | La, Eu  | 7         |
| 5                  | Pd, Pt  | 7         |
| 6                  | La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd,<br>Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu | 7         |

## **2.3 Méthode de fractionnement**

Dans cette section, il sera question de chaque étape à faire avant le fractionnement des cellules d'algue, de la méthode du fractionnement subcellulaire et des manipulations à faire pour la digestion et l'analyse des échantillons.

### **2.3.1 Récupération des algues**

La récupération des algues présentes dans le milieu de culture de 500 mL décrit à la section 2.1.3 se fait par filtration sur un filtre de 2  $\mu\text{m}$  en polycarbonate. Pour ce faire, un volume de 25 mL de la solution algale (nombre de cellules  $\sim 16\,000\,000$  cellules/mL) est filtré et les algues recueillies sur le filtre sont rincées trois fois avec 10 mL du milieu de rinçage (voir section 2.2.3). Les filtrations se font à l'aide d'une rampe à filtration sous pression manuelle. Lorsque les trois rinçages sont faits, le filtre

est déposé dans un tube de 50 mL contenant 20 mL de la solution de rinçage. Le tube est brassé pour remettre les cellules en suspension. Ensuite, un nouveau filtre est remis sur l'appareil à filtration et les étapes se font à répétition pour filtrer la totalité de la solution algale. Le volume filtré doit toujours être de 25 mL à la fois pour éviter de surcharger le filtre.

Une fois la filtration terminée, il faut déterminer la densité cellulaire à l'aide du compteur de particules *Coulter Counter Multisizer III* de la compagnie Beckman Coulter. Pour ce faire, dans une cuvette, un volume de 50 µL de la solution d'algues récupérée après filtration est ajouté dans 9,95 mL d'Isoton® II de Beckman Coulter. Le calcul suivant est fait pour déterminer le volume exact à mettre dans les contenants afin d'avoir une densité cellulaire de 150 000 cellules/mL.

Le sigma( $\sigma$ ) est la valeur obtenue du compteur de particules.

$$\text{Densité du concentré filtré: } \frac{\sigma \times 200}{0,5 \text{ mL}}$$

$$\text{Volume: } \frac{150\,000 \text{ cell/mL} \times 400 \text{ mL}}{\text{Densité du concentré filtré}}$$

Lorsque le volume est déterminé, il est ajouté dans les milieux d'exposition de 400 mL et l'exposition débute ( $t=0$ ). Un barreau d'agitation magnétique est mis dans chaque bouteille avant de les déposer sur une plaque agitatrice. Lorsque le temps d'exposition qui est de 1 heure ou de 14 heures est terminé, un volume de 4 mL de la solution EDTA 0,1 M est ajouté dans chaque bouteille pour complexer les métaux et ainsi arrêter le transfert des éléments vers les cellules. Les bouteilles sont agitées pendant 2 minutes pour permettre à l'EDTA de lier les métaux présents en solution.

### **2.3.2 Rinçages des algues**

Le rinçage des algues s'effectue après l'ajout d'EDTA dans les solutions. Pour ce faire, les bouteilles sont mises dans la centrifugeuse (Sorwall® RC 5C Plus, Du Pont) pendant 8 minutes à 9000 rpm. Le surnageant est enlevé de chaque contenant après centrifugation et un volume d'environ 30 mL est laissé dans les bouteilles. Elles sont ensuite agitées pour remettre les algues en suspension, puis les suspensions sont transférées dans des bouteilles NALGENE de 30 mL. Ces bouteilles sont centrifugées pendant 4 minutes à 9000 rpm. Lorsque la centrifugation est terminée, le surnageant est enlevé en entier pour laisser seulement le culot. Un volume de 10 mL de la solution de rinçage est ajouté dans les contenants et ils sont centrifugés dans les mêmes conditions soit 9000 rpm pendant 4 min. Cette dernière étape est répétée deux autres fois pour rincer les algues dans le but d'avoir seulement les métaux qui se trouvent à l'intérieur de la cellule.

Lorsque le dernier rinçage est terminé et qu'il y a seulement le culot dans les bouteilles, il faut ajouter 1 mL de la solution de rinçage. Les contenants sont ensuite mis au vortex et le volume est transféré dans un tube de 7 mL. Cette dernière étape est répétée une deuxième fois afin d'avoir un volume final de 2 mL dans les tubes de 7 mL. À partir de ce moment, les contenants doivent toujours demeurer dans la glace.

### **2.3.3 Homogénéisation des cellules**

Les cellules rincées sont homogénéisées dans le but de les fractionner pour obtenir les différentes parties. À partir du 2 mL restant à l'étape précédente, 0,5 mL est mis de côté pour avoir la concentration totale intracellulaire de métal et la densité cellulaire des essais. La quantité restante de 1,5 mL est mise au sonicateur pendant 4 min à 22 W avec une pulsation de  $0,2 \text{ s}\cdot\text{s}^{-1}$  pour briser les cellules. La densité cellulaire est déterminée afin d'être certain que les cellules ont bien été fractionnées lors de la

sonication. Un volume de 20  $\mu$ L est mis dans 9,98 mL d'Isoton® II pour chaque essai. Le calcul suivant permet de savoir la quantité de cellules qui a été fractionnée par mL :

$$\text{Densité des cellules entières} \left( \frac{\text{cell}}{\text{mL}} \right) = \frac{\sigma \times 500}{0,5 \text{ mL}}$$

La masse des contenants est prise pour déterminer le volume exact de cellules et dépendamment du résultat, la multiplication est faite pour avoir le nombre de cellules qui ont été fractionnées.

#### **2.3.4 Fractionnement subcellulaire**

L'étape du fractionnement subcellulaire débute immédiatement après avoir fait la sonication des cellules (Crémazy *et al.*, 2013; Wallace *et al.*, 2003). Un schéma du fractionnement subcellulaire est présenté en annexe A. D'abord, un volume de 1,5 mL est transféré dans l'ependorf «Gr» et ce dernier est mis à l'ultracentrifugeuse (WX ultra series, Thermoscientific) à une vitesse de 1500 g et à une température de 4°C pendant 15 minutes. Ensuite, le surnageant est transféré dans l'ependorf «Org» et est mis à l'ultracentrifugeuse à une vitesse de 100 000 g à 4°C pendant 60 minutes. Il est à noter que les eppendorfs sont toutes préalablement pesées avant les expériences.

Pendant la centrifugation, l'ajout de 0,5 mL d'eau Milli-Q est fait dans l'ependorf «Gr». Celle-ci est mise dans un bain d'huile à 100°C pendant 2 minutes. Les eppendorfs sont ensuite transférées dans un deuxième bain d'huile à 70°C pendant 10 minutes. Une fois que le temps est écoulé, 0,5 mL de NaOH 1 M est ajouté dans chaque échantillon, puis ils sont déposés dans le bain d'huile à 70°C pendant 60 minutes. Lorsque le temps est écoulé, il est important de toujours mettre les eppendorfs dans la glace afin de réduire l'activité des lysosomes à l'intérieur de la cellule. Ensuite, lorsque les fractions «Org» ont terminé leur cycle de 60 minutes dans la centrifugeuse, le

surnageant qui est le cytosol est transféré dans une eppendorf appelée «HDP». Le culot présent dans l'eppendorf «Org» est mis de côté et la fraction des organites est terminée. Les eppendorfs «Gr» sont mis dans l'ultracentrifugeuse à 10 000 g à 4°C pendant 15 minutes. Pendant ce temps, la fraction «HDP» est déposée dans un bain d'huile à 80°C pendant 10 minutes et transférée dans un bain de glace pendant 60 minutes. Cela permet à la fraction HDP d'être séparée de la fraction «HSP». Lorsque la fraction «Gr» est sortie de la centrifugeuse, le surnageant est transféré dans un tube de 13 mL appelé «Db» alors que le culot présent dans l'eppendorf «Gr» représente la fraction granule. Ensuite, après 60 minutes dans la glace, la fraction «HDP» est mise dans l'ultracentrifugeuse à 50 000 g à une température de 4°C pendant 15 minutes. Le surnageant est transféré dans un tube de 13 mL appelé «HSP» après la centrifugation. Cette dernière étape permet d'obtenir les deux dernières fractions des cinq parties de la cellule.

### **2.3.5 Minéralisation**

La minéralisation des échantillons se fait avec de l'acide nitrique et du peroxyde d'hydrogène (Crémazy *et al.*, 2013). D'abord, immédiatement après l'expérience, c'est l'acide nitrique qui est ajouté dans les contenants de la façon suivante. Un volume de 400 µL est ajouté dans les culots «Gr», «HDP» et «Org» ainsi que 500 µL dans les tubes «total intracellulaire». Également, un volume de 300 µL est ajouté dans les tubes comprenant les fractions «Db» et «HSP». Un volume de 400 µL est ajouté dans les échantillons liquides récoltés tout au long de l'expérience.

Ensuite, après 48 heures dans l'acide nitrique, le peroxyde est ajouté dans les eppendorfs et les contenants dans lesquels se trouve le total intracellulaire. Un volume de 160 µL de peroxyde est ajouté dans les culots «Gr», «HDP» et «Org» et 400 µL est ajouté dans les tubes de 13 mL nommés «total intracellulaire». Une période de 72 heures est nécessaire avant de préparer les échantillons pour l'analyse à l'ICP-MS.

### 2.3.6 Analyse par ICP-MS

L'analyse des échantillons se fait par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS), un appareil de la compagnie ThermoScientific (modèle X series II). Cet appareil peut détecter de très faibles concentrations. Les limites de détection se trouvent entre 2 et 4 ng/L pour les éléments étudiés. Les étalons sont préparés dans une solution HNO<sub>3</sub> 10% et les concentrations utilisées pour établir la courbe d'étalonnage se trouvent entre 0.1 µg/L et 20 µg/L. Les échantillons analysés sont également dans une matrice de HNO<sub>3</sub> 10%.

Les fractions qui ont été digérées à l'aide du peroxyde (section 2.3.5) sont transférées dans des tubes pour avoir la dilution désirée pour l'analyse. Les volumes utilisés pour faire les dilutions sont présentés dans le tableau 2.3. Les parties des cellules présentes dans le surnageant ainsi que tous les autres échantillons n'ont pas besoin d'être transférés et dilués puisqu'ils sont déjà dans une solution d'acide nitrique 10%.

**Tableau 2.3 : Dilution à faire pour les fractions solides**

| Fractions             | Volume de la fraction | Volume d'eau Milli-Q |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Granules              | 0,5 mL                | 4,5 mL               |
| HSP                   | 0,5 mL                | 4,5 mL               |
| Organites             | 0,5 mL                | 4,5 mL               |
| Total intracellulaire | 0,75 mL               | 3 mL                 |

De plus, la courbe d'étalonnage a été vérifiée avec des étalons certifiés plasmaCal C00 - 061 - 409 (Pd et Pt) et C00 - 061 - 406 (La et Eu). Les concentrations des solutions faites à partir de ces étalons étaient de 0,5 et 5 µg/L.

Les isotopes choisis pour analyser les éléments sont le <sup>108</sup>Pd, <sup>194</sup>Pt, <sup>139</sup>La et <sup>151</sup>Eu. Concernant le Pd, le Pt et le Eu, les valeurs obtenues pour les différents isotopes de

chaque élément sont très similaires. Par exemple, dans la partie « organites » à pH 7, la concentration obtenue pour  $^{151}\text{Eu}$  est 1,44 nM et pour  $^{153}\text{Eu}$  elle est de 1,43 nM.

### **2.3.7 Analyses statistiques**

Des analyses de variances (ANOVA à un facteur et à deux facteurs) ont été réalisées avec le logiciel SYSTAT afin de déterminer s'il y avait une différence significative entre les traitements (pH, éléments, temps) et entre l'accumulation de métaux dans les différentes parties des cellules algales. Suite à une différence significative déterminée par les ANOVAs, le test de Tukey a été utilisé afin d'évaluer quels traitements étaient différents les uns des autres.

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 3.1 Exposition de *C. reinhardtii* aux Pd, Pt, La et Eu

Les premières expositions avec l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* ont été réalisées avec le palladium, le platine, le lanthane et l'euporium. Ces expositions ont permis de comprendre le destin de ces éléments dans la cellule. Elles ont aussi permis de déterminer si les EGP ont une influence sur la distribution subcellulaire des TRs et si les TRs ont une influence sur les EGP.

#### 3.1.1 Influence de la variation du pH

Un des objectifs de ce mémoire était de savoir si le pH avait une influence sur la distribution subcellulaire des algues. Il était donc question de déterminer s'il y avait une influence marquée du pourcentage des métaux présents dans les différentes parties de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*. Le but était de savoir si le pH venait aussi affecter la distribution subcellulaire des éléments chez la cellule algale. Les résultats obtenus dans les expériences de ce mémoire ont permis de constater quelques différences significatives dans l'accumulation entre les pH 6, 7 et 8.

D'abord, pour ces expériences, le milieu d'exposition qui a été utilisé est celui présenté à la section 2.2.4. La seule variation importante entre les différentes expériences était la valeur du pH qui était de 6, 7 ou 8. Le temps d'exposition était de 1 h et, pour chaque expérience, trois essais ont été faits ainsi qu'un blanc pour avoir un témoin non contaminé.

Les résultats dans les figures sont tous présentés en pourcentages. Ceux-ci ont été calculés avec la concentration d'un élément obtenue dans une fraction par rapport à la

somme des concentrations obtenues dans les cinq parties de la cellule, et ce pour le même élément. Les résultats présentés pour chaque section correspondent à la moyenne des trois essais afin d'incorporer l'incertitude sur nos mesures. Aussi, les écarts-types sont présentés au niveau inférieur et supérieur des moyennes pour chaque élément.

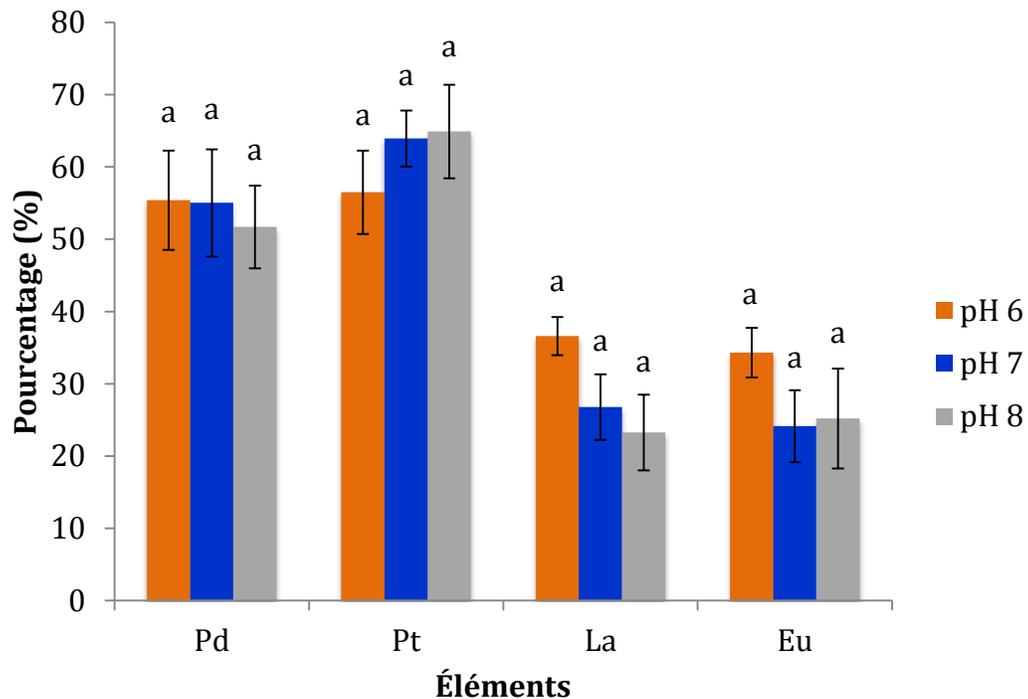
L'équation utilisée pour le calcul du pourcentage d'un métal dans une partie de cellule est montrée ci-dessous. L'exemple est fait pour le Pd dans la fraction organite.

$$\% \text{ de Pd dans Org.} = \frac{\text{Conc. de Pd dans Org}}{\text{Conc. de Pd dans Org} + \text{Gr} + \text{Db} + \text{HSP} + \text{HDP}} \times 100$$

Les concentrations sont toutes en mol/cellule.

La figure 3.1 montre les pourcentages des quatre éléments dans les organites. On peut y observer que les pourcentages des éléments du groupe platine sont plus élevés dans cette fraction que ceux des terres rares. Il n'y a pas d'écart significatif entre les pH, et ce pour les quatre éléments de cette fraction.

Les Pd et le Pt ont des pourcentages qui se trouvent entre 52 et 65% dans cette partie de cellule. De ce fait, environ 50% des éléments du groupe platine se logent dans la fraction organite des cellules qui est connue pour être une fraction sensible aux métaux. Aussi, les terres rares se situent entre 25 et 35% dans cette fraction, et ce pour tous les pH.

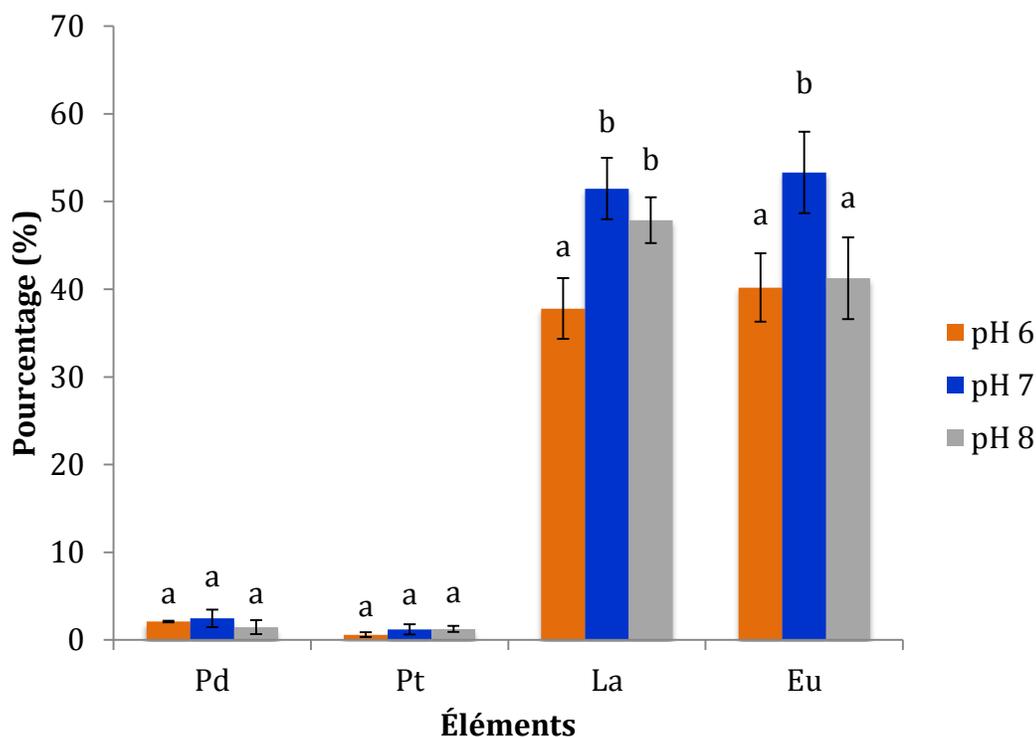


**Figure 3.1 : Pourcentage (%) des éléments obtenus dans la fraction « organites » de *Chlamydomonas reinhardtii* ; a = différence non significative, b = différence significative avec a, a,b = différence non significative avec a et b.**

Dans la figure 3.2, qui représente la fraction « granules », le pourcentage obtenu est de 23% pour le La et 21% pour l'Eu à pH 6. Au pH 7, il est de 51% pour le La et 53% pour l'Eu, puis à pH 8, il est de 48% et 41%. Pour le La, il y a une différence significative à pH 6 en le comparant avec pH 7 (valeur-p = 0,002) et 8 (valeur-p = 0,009). Puis, pour l'euprotinium, c'est au pH 7 qu'il y a une différence significative avec les pH 6 (valeur-p = 0,0005) et 8 (valeur-p = 0,0005).

Les EGP se trouvent entre 0 et 1% dans cette fraction, et ce pour les trois pH et il n'y a pas de différence significative. C'est dans cette partie qu'ils ont le moins tendance à se loger. Il est mentionné, dans la section 2.1.1, que cette fraction est un indice de la capacité de détoxification des métaux dans la cellule. À partir des résultats montrés sur

la figure 3.2, les TRs auront tendance à être moins toxiques que les EGP pour les cellules algales puisqu'une partie se loge dans les granules (Campbell *et al.*, 2009).

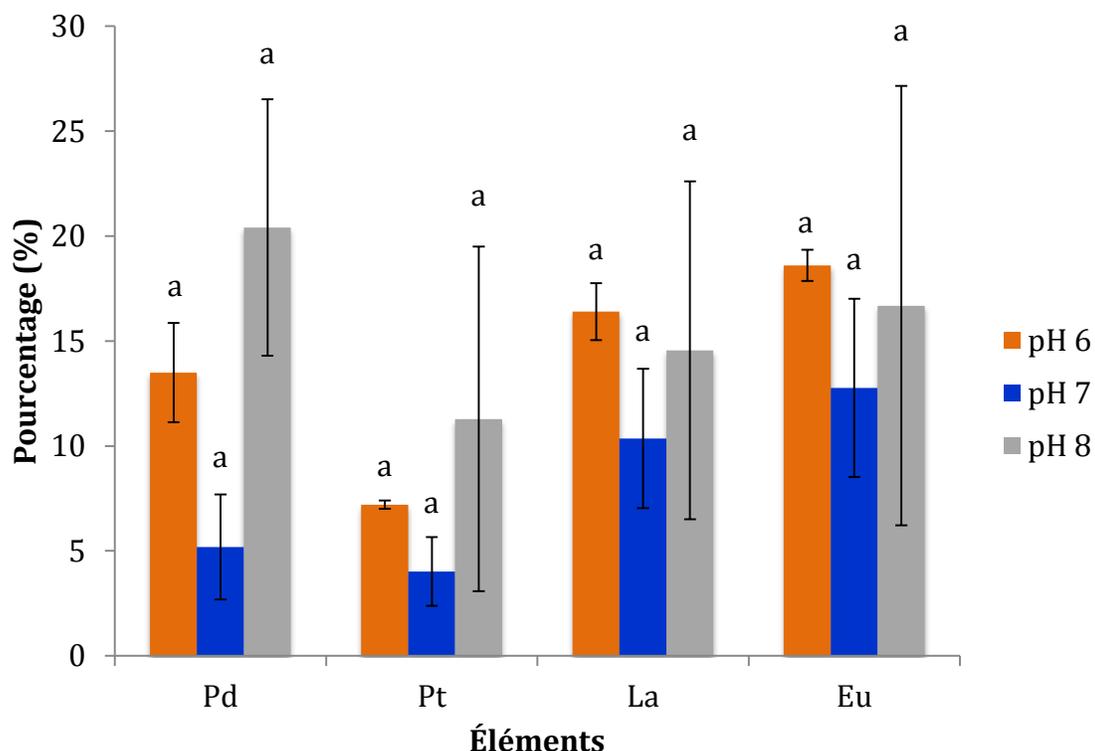


**Figure 3.2 : Pourcentage (%) des éléments obtenus dans la fraction « granules » de *Chlamydomonas reinhardtii***

De plus, la capacité des métaux bivalents tels que les EGP à rester dans la cellule dépend de l'affinité qu'ils ont avec les ligands intracellulaires (Cossa *et al.*, 1999). La tendance des EGP à être stockés dans les granules de polyphosphates semble donc quasi nulle dans les cellules de l'algue unicellulaire. Ils ont une tendance à se loger davantage dans les organites comme il est montré à la figure 3.1.

Dans la figure 3.3, les pourcentages présentés sont ceux obtenus dans la fraction débris. Les valeurs sont dispersées, mais en raison des grands écarts-types, il n'y a pas de différence significative entre les pH et ce, pour tous les éléments. Les EGP sont en

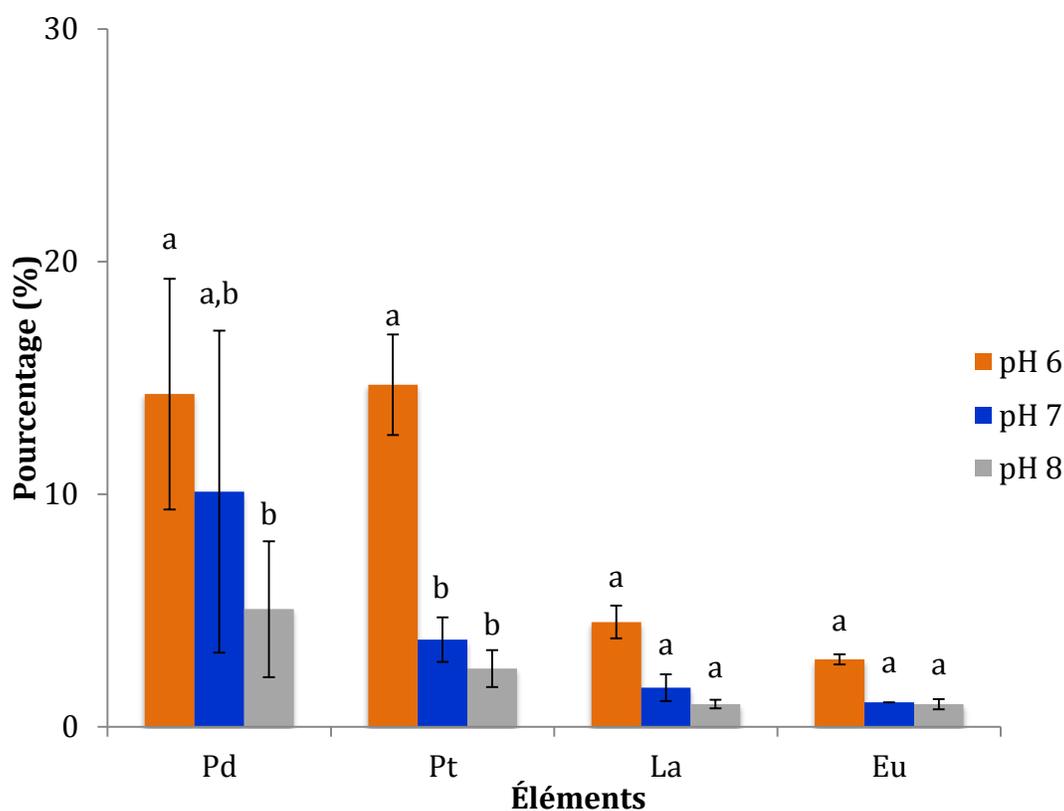
plus faibles pourcentages dans cette fraction que les TRs, mais dans les deux groupes d'éléments, les résultats ne sont pas élevés.



**Figure 3.3 : Pourcentage (%) des éléments obtenus dans la fraction « débris » de *Chlamydomonas reinhardtii***

Dans les résultats obtenus pour la fraction HDP présentés à la figure 3.4, les éléments du groupe platine montrent un plus fort pourcentage à pH 6 qu'aux pH 7 et 8. Pour le Pd, c'est seulement entre le pH 6 et le pH 8 qu'il y a une différence significative. Puis, pour le Pt, le pourcentage obtenu à pH 6 est le seul à être différent significativement. Ensuite, concernant le lanthane et l'euprium, ils ne semblent pas se loger dans cette fraction de façon importante puisque le pourcentage est entre 1 et 2% pour tous les pH. On peut toutefois remarquer, pour La et Eu, une diminution du pourcentage en fonction de l'augmentation du pH dans cette fraction malgré l'absence de différences significatives. La partie HDP est une fraction peu importante pour la localisation de

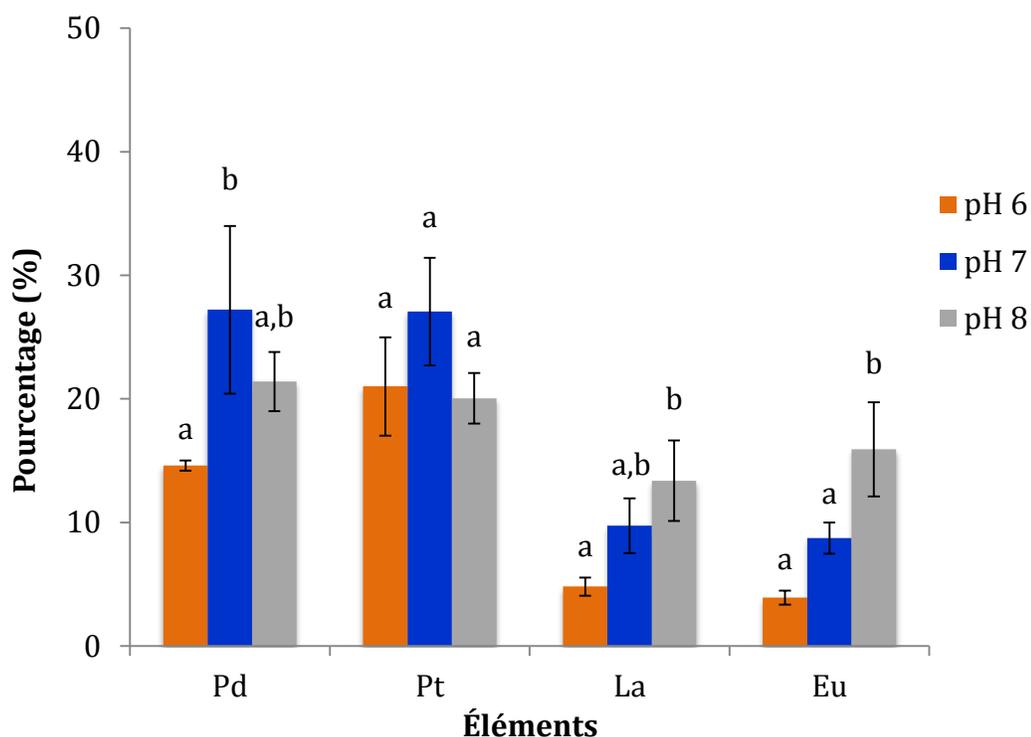
ces éléments dans la cellule; ils ont plutôt tendance à se loger dans les autres parties. Les enzymes de la fraction HDP, qui est une fraction dite « sensible aux métaux », vont pouvoir vraisemblablement continuer leurs activités biochimiques sans être trop perturbés par la présence de contaminants.



**Figure 3.4 : Pourcentage (%) des éléments obtenus dans la fraction « HDP » de *Chlamydomonas reinhardtii***

La figure 3.5 montre les résultats obtenus pour les HSP. Dans cette partie, les deux groupes d'éléments sont présents à de faibles pourcentages. Les EGP se retrouvent à des pourcentages légèrement plus élevés que ceux des TRs. Pour le Pd, il y a une différence significative à pH 7 mais pas pour le platine. Concernant les terres rares, elles montrent une augmentation du pH 6 jusqu'au pH 8. La valeur-p de l'Eu entre le pH 6 et 8 est de 0,000009 ce qui montre une différence très significative. Celle entre le

pH 7 et 8 est de 0,02 et montre que la différence n'est pas très grande comparativement au pH 6 et 8. Pour le La et l'Eu, les résultats obtenus à pH 8 sont significativement différents des autres pH. On peut donc observer une augmentation du pH 6 au pH 8 pour les deux éléments. Les EGP et les TRs sont plus associés à cette fraction que dans les HDP où les pourcentages sont relativement faibles pour chaque élément.



**Figure 3.5 : Pourcentage (%) des éléments obtenus dans la fraction « HSP » de *Chlamydomonas reinhardtii***

En effet, le changement de pH montre certaines différences, mais celles-ci sont faibles. Il est possible de voir, pour le La et Eu, une diminution du pourcentage dans les HDP ainsi qu'une augmentation du pourcentage dans les HSP en fonction de l'augmentation du pH. L'ordre pour les TRs à pH 6 et 7 est le suivant Gr > Org > Db > HSP > HDP et

celui pour pH 8 est Gr > Org > HSP > Db > HDP. Les distributions relatives des TRs observée dans les différentes parties de *C. reinhardtii* sont similaires à ceux obtenus par Crémazy avec l'aluminium et le scandium (Crémazy *et al.*, 2013).

Pour les EGP, les valeurs de EC<sub>50</sub> obtenues dans les expériences de Guillaume Tétrault ainsi que la toxicité observée à différents pH (Tétrault, 2014) n'indiquent pas de lien avec les résultats de distribution subcellulaire obtenus dans ce mémoire. En partant de la fraction la plus élevée vers celle qui contient une concentration plus faible en EGP pour les pH 6 et 7, l'ordre le plus fréquent est le suivant : Org > HSP > HDP > Db > Gr. Pour les mêmes éléments à pH 8, l'ordre est Org > HSP > Db > HDP > Gr.

Les valeurs prises pour les ordres ne tiennent pas compte des écarts-types pour les deux groupes d'éléments. Elles démontrent que le pH montre une légère différence entre la fraction débris et les HDP pour les éléments du groupe platine ainsi qu'entre les débris et les HDP pour les terres rares. Il est important de mentionner que cette distribution est différente dépendamment du groupe d'éléments étudié puisque ceux-ci n'ont pas les mêmes destins dans la cellule.

De plus, les tableaux B.1, B.2 et B.3 présentant les concentrations en amol/cell (attomoles ou 10<sup>-18</sup> mol) dans les fractions montrent que les concentrations diffèrent parfois, dépendamment du pH. Par contre, en observant les figures ci-dessus, on peut constater que malgré les variations de concentration dans la cellule, la distribution subcellulaire suit habituellement le même ordre.

Puis, le taux de récupération des éléments a été calculé afin d'être certain de ne pas avoir un pourcentage élevé de perte des éléments lors des manipulations. Les résultats obtenus sont calculés à partir du total intracellulaire qui représente la concentration de métal dans la cellule entière. Les concentrations dans chaque fraction subcellulaire (exprimée en moles par cellule) ont été additionnées, puis

divisées par la concentration totale intracellulaire (également exprimée en moles par cellule). Le pourcentage calculé permet d'avoir le taux de récupération des éléments par cellule.

L'équation utilisée pour calculer le pourcentage de récupération est la suivante :

$$\% \text{ de récup. du Pd} = \frac{\text{Conc. de Pd dans Org} + \text{Gr} + \text{Db} + \text{HSP} + \text{HDP}}{\text{Conc. total intracellulaire du Pd}}$$

Les moyennes des pourcentages de récupération aux pH 6-7-8 ont été mises ensemble et sont montrées dans le tableau suivant.

**Tableau 3.0 : Taux de récupération moyen (pH 6-7-8) des éléments dans la cellule**

|                             | <b>Pd<br/>(%)</b> | <b>Pt<br/>(%)</b> | <b>La<br/>(%)</b> | <b>Eu<br/>(%)</b> |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Taux de récupération</b> | 73                | 72                | 80                | 82                |
| <b>Écart-type</b>           | 2                 | 11                | 16                | 13                |

Les pourcentages obtenus montrent des taux de récupération des métaux dans les fractions, par rapport à ce qui se trouve dans l'ensemble de la cellule, qui sont jugés acceptables. Concernant les EGP, ce sont des métaux pour lesquels on observe beaucoup d'adsorption sur le matériel de laboratoire et cela peut expliquer des pourcentages de récupération inférieurs à ceux des TRs. Une perte des éléments peut aussi être due aux différents transferts des solutions lors des expériences. Crémazy *et al.* (2013) ont obtenus un pourcentage de récupération de 94% pour Sc et 89% pour Al avec l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*.

### 3.1.2 Effet de Pd et de Pt sur la distribution subcellulaire de La et de Eu

Dans le but de savoir si la distribution subcellulaire était différente en absence d'un groupe d'éléments, la distribution intracellulaire des terres rares a été analysée en absence des éléments du groupe platine. Le milieu d'exposition est présenté à la section 2.2.6 et le pH d'exposition était de 7,0. Les résultats obtenus pour le lanthane (figure 3.6) montrent que la distribution des éléments pour l'expérience avec La et Eu est très semblable à celle pour l'expérience avec La, Eu, Pd et Pt. Les différences observées n'étant pas significatives, et ces résultats montrent que les EGP n'ont pas d'influence sur le comportement des terres rares dans la cellule. Les résultats sont les mêmes pour le cas de l'euporium présenté à la figure 3.7 à l'exception de la fraction organites où le pourcentage obtenu est plus faible significativement en présence du Pd et Pt.

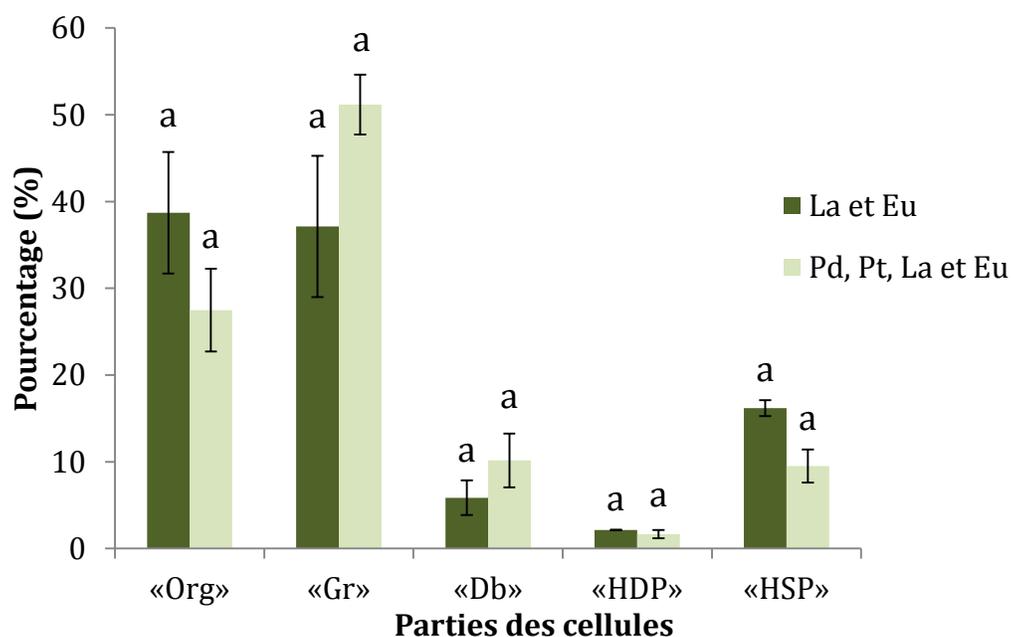
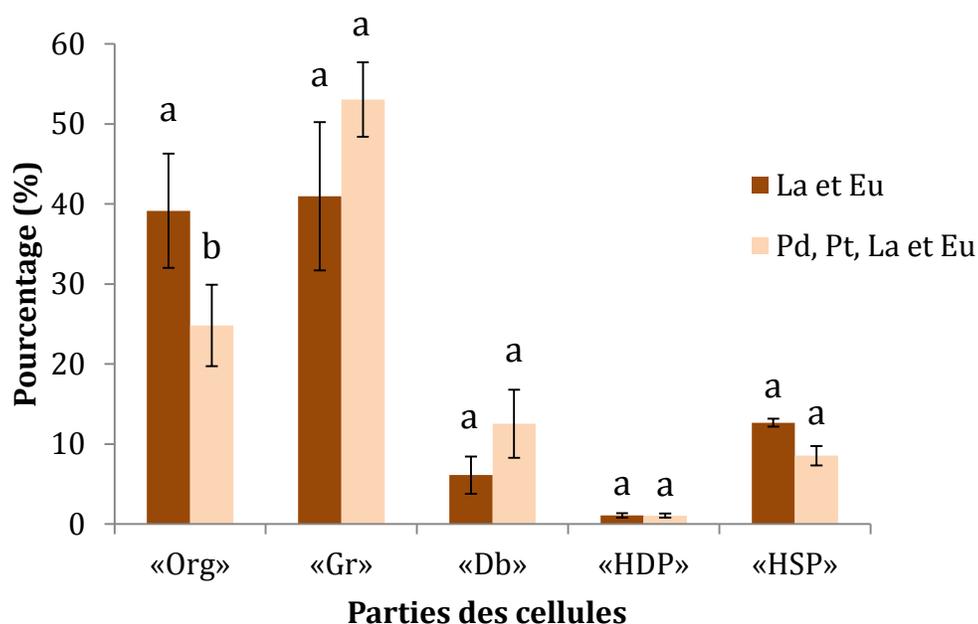


Figure 3.6 : Pourcentages moyens du lanthane obtenus lors du fractionnement subcellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* sans et avec Pd et Pt



**Figure 3.7 : Pourcentages moyens de l'euporium obtenus lors du fractionnement subcellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* avec et sans Pd et Pt**

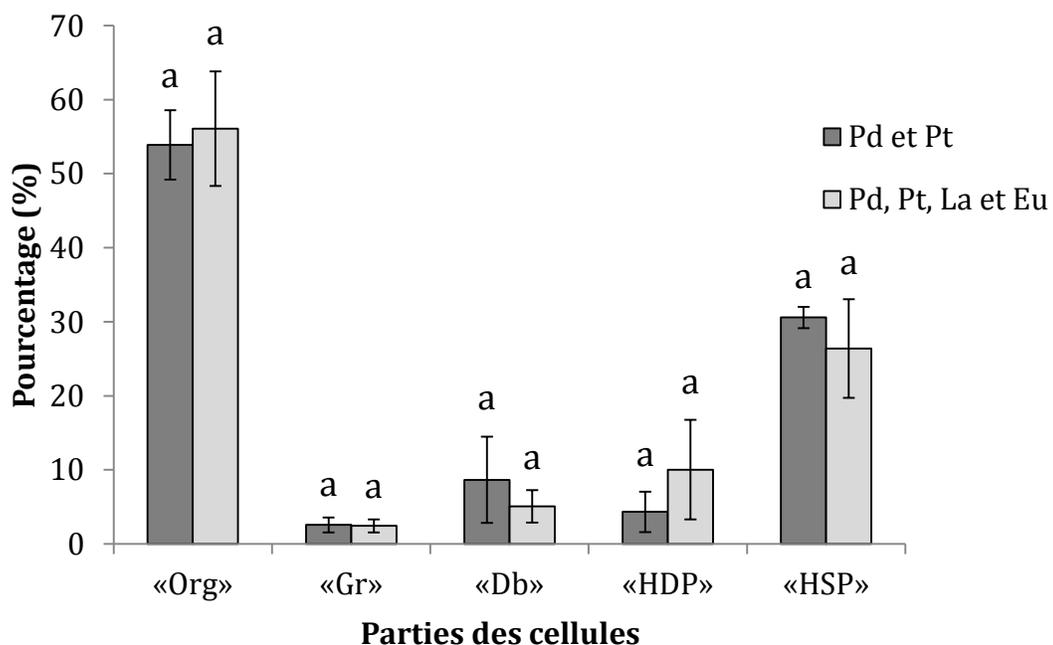
En général, les TRs se trouvent en majorité dans les organites et les granules comme il a été vu dans les expériences précédentes. En effet, 39% du La et 39% de l'Eu sont présents dans les organites alors que 37% du La et 41% de l'Eu sont dans les granules. Il y a entre 76 et 80% des éléments qui se logent dans ces deux parties et cela est aussi observé dans les expositions en présence de Pd et Pt.

Il n'y a pas de différence significative observable en général dans la distribution du lanthane et de l'euporium en présence ou en absence des EGP, du moins pas dans nos conditions expérimentales. Par contre, dans la fraction « organites », le résultat obtenu pour l'euporium est significativement différent lorsque les EGP sont présents dans le milieu d'exposition. Comme il n'y a pas de différences significatives dans les autres fractions, il est difficile de proposer une explication pour le déplacement des métaux parmi les fractions.

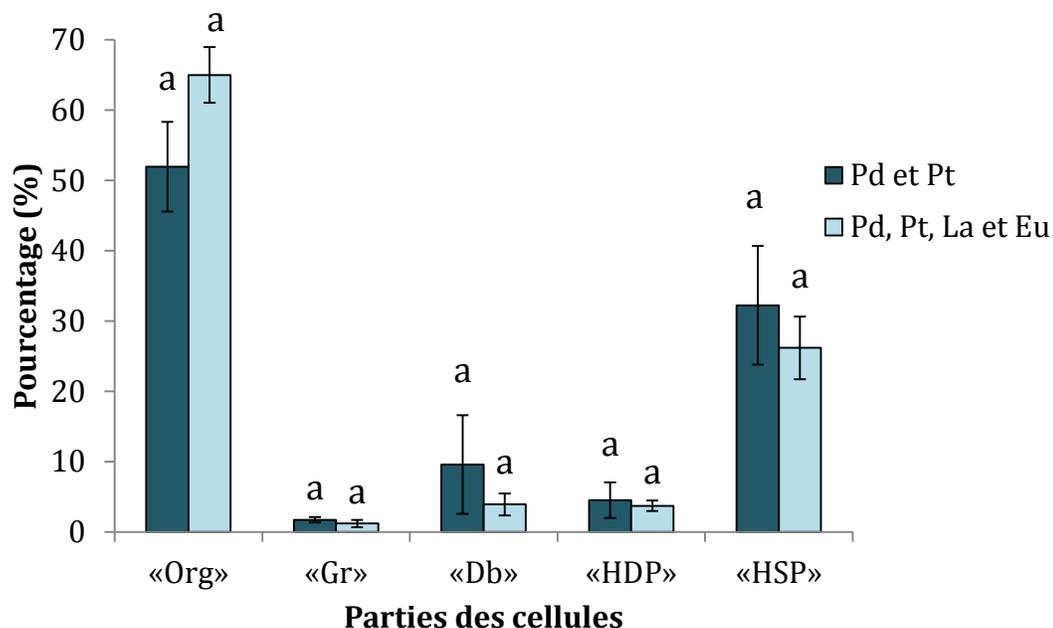
### 3.1.3 Effet de La et de Eu sur la distribution subcellulaire de Pd et de Pt

L'exposition sans La et Eu a été réalisée dans le même but que l'expérience décrite dans la section précédente. Les résultats de distribution subcellulaire de Pd et de Pt obtenus en absence et en présence des terres rares sont très similaires. Dans la figure 3.8, qui représente les résultats obtenus pour le palladium, les pourcentages d'éléments retrouvés dans la fraction organites sont de 54% en absence de TRs et de 55% en présence des TRs. Cette similarité dans la distribution relative du palladium entre les expériences est aussi observable pour toutes les fractions et montre que la présence des terres rares ne vient pas influencer la distribution des éléments du groupe platine dans la cellule.

De plus, dans la figure 3.9, les pourcentages obtenus pour le platine sont très proches de ceux du palladium et les conclusions sont les mêmes. La similarité des résultats obtenus en présence et en absence de La et Eu sont presque identiques. Il n'y a pas de différence significative observable entre les deux expériences.



**Figure 3.8 : Pourcentages moyens du palladium obtenus lors du fractionnement subcellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* sans et avec La et Eu**



**Figure 3.9 : Pourcentages moyens du platine obtenus lors du fractionnement subcellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* sans La et Eu**

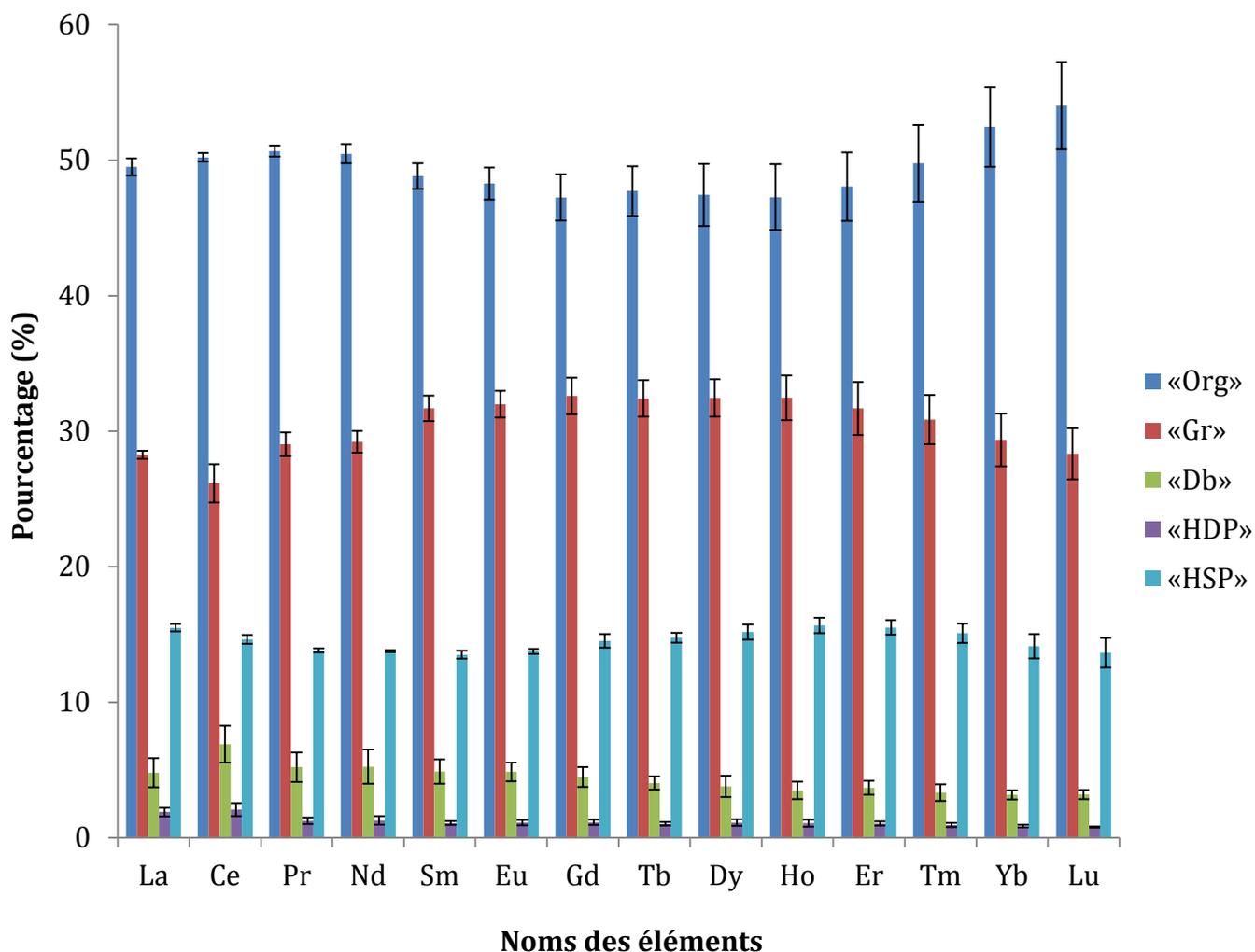
D'après les résultats obtenus en présence et en absence des TRs, les EGP se trouvent majoritairement dans les fractions organites et HSP. Puis, comme il a déjà été mentionné, les éléments du groupe platine n'ont pas tendance à se retrouver dans la fraction « granules » comparativement aux terres rares.

Les résultats présentés dans les sections 3.1.2 et 3.1.3 suggèrent que les différents groupes d'éléments (TRs et EGP) n'ont aucune influence sur les uns sur les autres dans la distribution subcellulaire dans nos conditions expérimentales. Les cellules peuvent être exposées aux deux groupes (éléments du groupe platine et terres rares) en même temps ou à un seul et cela ne semble pas modifier le comportement que ces éléments ont une fois à l'intérieur de la cellule.

### 3.2 Exposition de *C. reinhardtii* aux lanthanides

Il est mentionné dans plusieurs articles (Haxel *et al.*, 2002; Henderson, 2013) que les terres rares ont des propriétés de complexation et des comportements géochimiques très similaires. Il était donc intéressant de déterminer si cela était aussi observable dans le cas de leur répartition subcellulaire dans les cellules algales. Dans ces expériences, les algues ont été exposées aux 14 lanthanides et les résultats obtenus ont permis de constater que la distribution des éléments était très semblable (figure 3.10). Les éléments se trouvent majoritairement dans les organites et les granules. Puis, ils vont se loger de façon moins marquée dans les HSP, les débris et les HDP.

Aussi, dans les résultats obtenus à la section 3.1.1 sur l'influence du pH, la fraction « granules » est celle où les terres rares se retrouvent en plus fort pourcentage. Dans cette expérience, la fraction « organites » est celle où les terres rares se trouvent majoritaires comparativement aux autres parties de la cellule. Ce résultat peut être causé par une bioaccumulation globale des terres rares plus importante que dans les expériences précédentes. En effet, chaque métal était présent à une concentration nominale de 100 nM (concentrations mesurées entre 70 et 90 nM ; Tableau B.3) et donc il y avait, dans le milieu, une concentration totale de 1,4 µM TRs contrairement aux autres expériences où la concentration totale en terres rares était entre 100 et 200 nM. De plus, la somme des concentrations des terres rares est nettement plus élevée que celle habituellement présente dans le milieu naturel typique (0,15 à 500 nM ; Leguay, INRS, données non publiées).



**Figure 3.10 : Pourcentages moyens de chaque métal obtenus lors du fractionnement subcellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii***

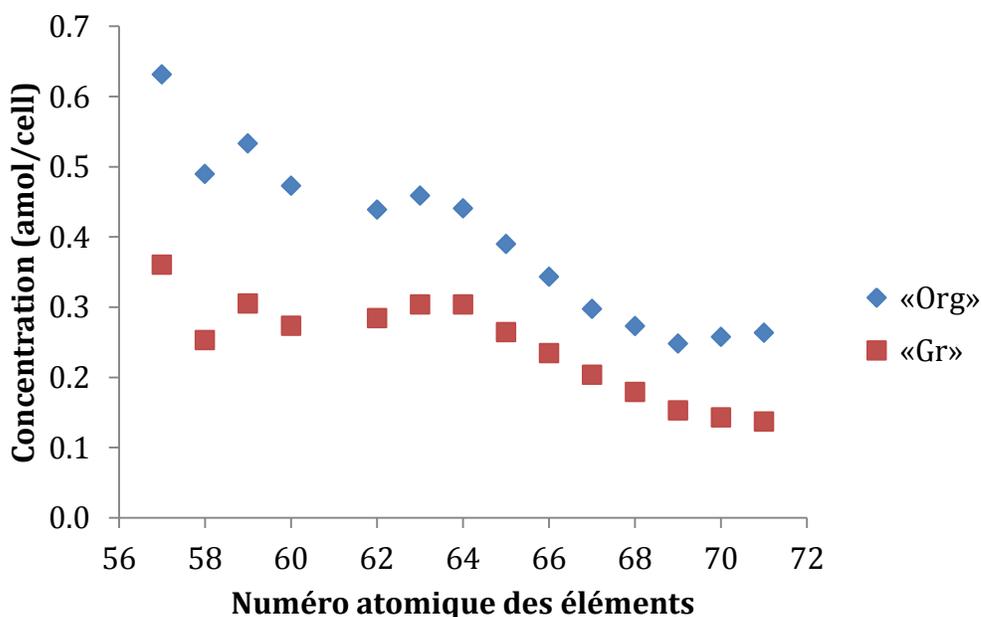
Certains éléments ont des différences significatives avec d'autres pour certaines fractions et celles-ci sont présentées dans le tableau 3.1. L'élément 1 est celui qui a une interaction avec l'élément 2. Les HSP et les HDP sont les parties où il y a davantage de différences significatives comparativement aux autres parties. Pour les trois autres parties, il y a entre 2 et 6 éléments qui possèdent une différence significative.

**Tableau 3.1 : Différences significatives observées dans les différentes parties de la cellule**

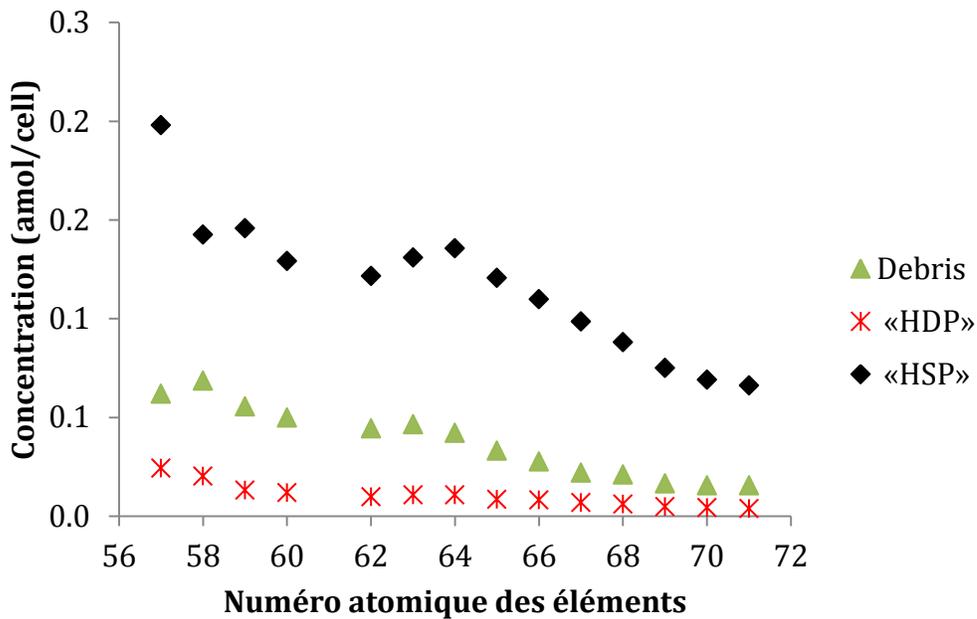
| Partie de cellule | Élément 1 | Élément 2 | Partie de cellule | Élément 1 | Élément 2 |
|-------------------|-----------|-----------|-------------------|-----------|-----------|
| <b>HSP</b>        | Ce        | Eu        | <b>Organites</b>  | Lu        | Tb        |
|                   |           | La        |                   |           | Ho        |
|                   |           | Lu        |                   |           | Gd        |
|                   |           | Sm        |                   |           | Er        |
|                   |           | Yb        |                   |           | Dy        |
|                   | Dy        | Eu        | <b>Débris</b>     | Ce        | Dy        |
|                   |           | Lu        |                   |           | Er        |
|                   |           | Nd        |                   |           | Ho        |
|                   |           | Pr        |                   |           | Tb        |
|                   |           | Sm        |                   |           | Tm        |
|                   |           | Yb        |                   |           | Yb        |
|                   | Er        | Eu        | <b>Granules</b>   | Gd        | La        |
|                   |           | Gd        |                   |           | Eu        |
|                   |           | Lu        | <b>HDP</b>        | Ce        | Dy        |
|                   |           | Nd        |                   |           | Er        |
|                   |           | Pr        |                   |           | Eu        |
|                   |           | Sm        |                   |           | Gd        |
|                   |           | Yb        |                   |           | Ho        |
|                   | Eu        | Ho        | Lu                | La        | Nd        |
|                   |           | La        |                   |           | Pr        |
|                   |           | Tm        |                   |           | Sm        |
|                   | Gd        | La        | Lu                | La        | Tb        |
|                   |           | Eu        |                   |           | Tm        |
|                   | Ho        | Lu        | Lu                | La        | Yb        |
|                   |           | Nd        |                   |           | Dy        |
|                   |           | Yb        |                   |           | Er        |
|                   | La        | Lu        | Lu                | La        | Eu        |
|                   |           | Nd        |                   |           | Lu        |
|                   |           | Pr        |                   |           | Sm        |
|                   |           | Sm        |                   |           | Tb        |
|                   |           | Tb        |                   |           | Tm        |
|                   |           | Tm        |                   |           | Yb        |
|                   |           | Yb        |                   |           | Dy        |
|                   | Lu        | Pr        | Lu                | Lu        | Eu        |
|                   |           | Tb        |                   |           | Nd        |
|                   |           | Tm        |                   |           | Pr        |
| Sm                | Tb        | Lu        | Lu                |           |           |
|                   | Tm        |           |                   |           |           |

Ensuite, les figures 3.11 et 3.12 représentent les concentrations des éléments en amol/cell obtenues dans les différentes fractions pour les 14 terres rares. En abscisse, les terres rares sont placées en fonction de leur numéro atomique, donc du plus léger au plus lourd, et ce de gauche à droite. Le premier étant le lanthane (numéro atomique 57) jusqu'au lutécium (numéro atomique 71).

Les deux figures montrent que la concentration dans les différentes parties de la cellule diminue en fonction de l'augmentation de la masse de l'élément. Les cellules algales accumulent davantage les terres rares ayant une masse plus faible que celles ayant une masse plus élevée. Par exemple, la fraction organite passe de 0,63 amol/cell pour le La à 0,28 amol/cell pour le Lu. La diminution de concentration est la plus marquée pour cette fraction, mais il est aussi possible de l'observer dans chacune des parties.

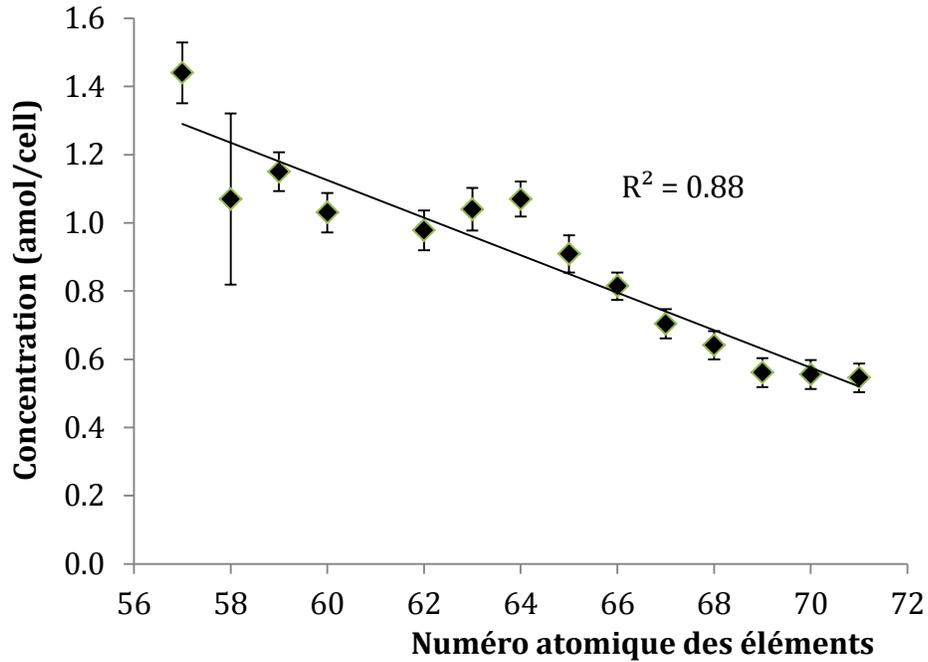


**Figure 3.11 : Concentrations (amol/cell) des différents éléments obtenues lors du fractionnement de *Chlamydomonas reinhardtii***



**Figure 3.12 : Concentrations (amol/cell) des différents éléments obtenues lors du fractionnement de *Chlamydomonas reinhardtii***

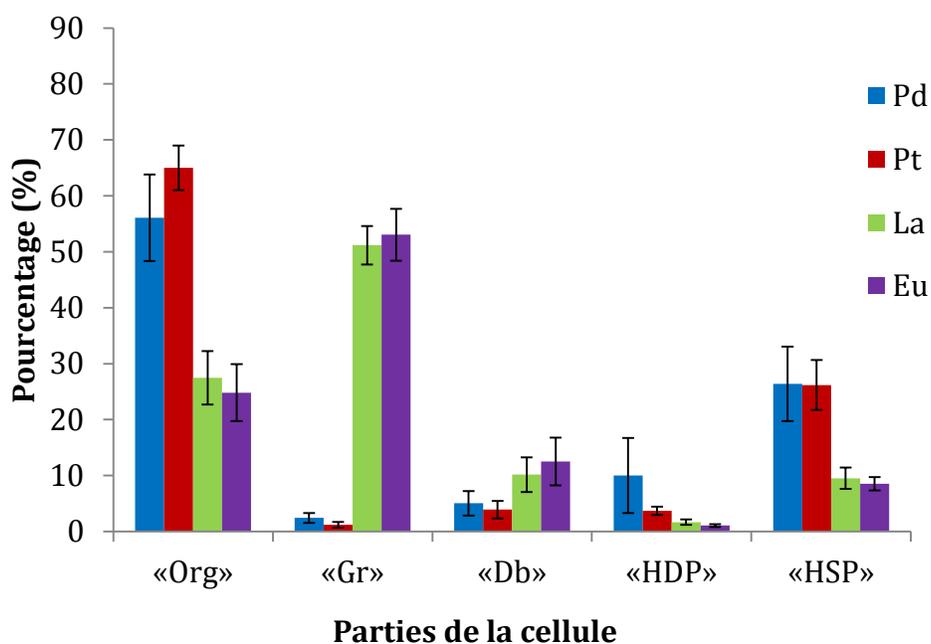
En additionnant les quantités obtenues dans les différentes fractions, les concentrations totales à l'intérieur de la cellule ont été calculées et sont montrées dans la figure 3.13. Les valeurs obtenues sont celles calculées en faisant la moyenne des concentrations des différents essais pour les 14 éléments analysés dans l'expérience. Les résultats montrent aussi une diminution de la concentration des éléments lorsque le numéro atomique augmente. Le coefficient de détermination de la régression linéaire sur les données est de 0,88. Cette diminution progressive de l'accumulation pourrait être causée par l'augmentation du rayon atomique des éléments. Plus précisément, pour des éléments dont les propriétés chimiques sont très similaires, nous proposons l'hypothèse que l'augmentation du rayon atomique peut possiblement réduire la capacité d'entrer à l'intérieur de la cellule.



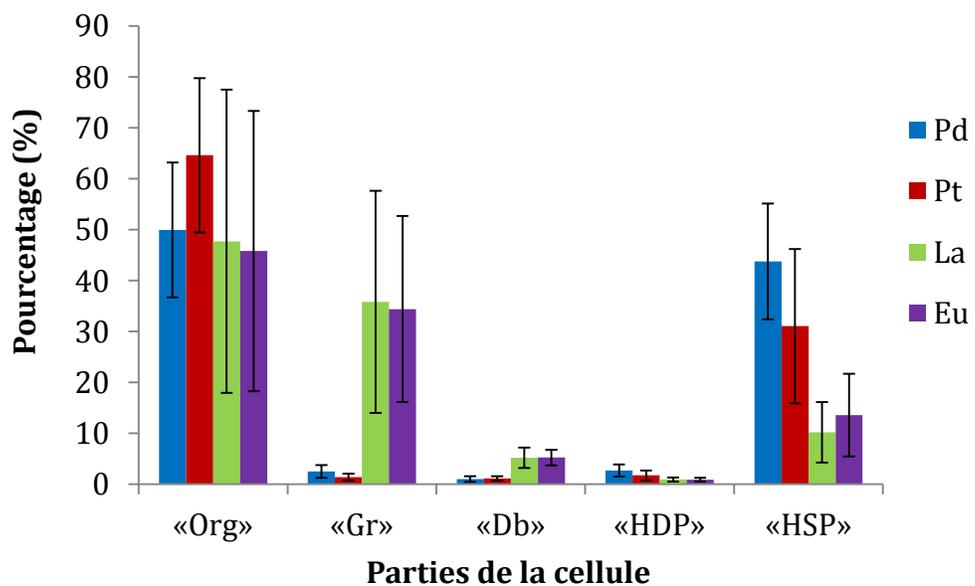
**Figure 3.13 : Concentrations (amol/cell) totales des éléments à l'intérieur de la cellule**

### 3.2.1 Influence du temps d'exposition

Il est possible que la distribution subcellulaire évolue au fil du temps pendant l'exposition. Afin de vérifier si la distribution observée après 1 h d'exposition est représentative d'une exposition de plus longue durée, la distribution subcellulaire des EGP et des TRs chez l'algue verte a été déterminée après 14 h d'exposition. Le milieu utilisé est décrit à la section 2.2.7, le pH dans les deux expériences est de 7,0 et les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées pour les EGP et les TRs. Les figures 3.14 et 3.15 présentent les pourcentages de distributions obtenus pour les deux temps d'exposition.



**Figure 3.14 : Pourcentages moyens de chaque métal obtenus lors du fractionnement subcellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* pour un temps de 1 heure**



**Figure 3.15 : Pourcentages moyens de chaque métal lors du fractionnement subcellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* pour un temps de 14 heures**

La figure 3.14 montre les pourcentages obtenus dans les différentes parties des cellules lors de l'expérience avec un temps d'exposition de 1 heure et la figure 3.15 montre ceux pour une exposition de 14 heures. Les pourcentages observés pour les deux temps d'exposition diffèrent légèrement, par contre la tendance se maintient pour l'ordre de l'accumulation. Dans aucun cas, les EGP ne se trouvent dans les granules en forts pourcentages et ils se situent plutôt à plus de 50% dans la fraction organites. Les terres rares se logent à plus de 75% dans la fraction « organites » et « granules » dans l'expérience à court terme et à long terme.

Les grands écarts-types obtenus dans la figure 3.15 sont probablement dus au fait qu'après un certain temps, ce n'est pas toutes les cellules qui vont réagir de la même façon. Certaines peuvent être affectées par les contaminants après plusieurs heures et d'autres peuvent rester dans un bon état. Aussi, pendant 14 heures, il peut y avoir une plus grande multiplication des cellules que lors d'une exposition de 1 heure et il n'est pas étonnant que la variabilité soit plus grande. Seule une différence significative pour le palladium et l'euprasiolite dans la fraction débris a été observée entre les deux temps d'exposition. La valeur-p pour le palladium est de 0,045 et elle est de 0,023 pour l'euprasiolite, ce qui montre une faible influence du temps malgré le fait que ce soit significatif. Les autres fractions ne montrent aucune différence significative, ce qui vient confirmer que le temps d'exposition (entre 1 h et 14 h) influence peu la distribution subcellulaire.

### **3.3 Mécanismes de détoxication**

Les cellules ont toutes besoin d'éléments essentiels pour leur survie. Par contre, lorsque ceux-ci sont en excès par rapport aux besoins métaboliques, les mécanismes de détoxication de la cellule sont très importants afin de la protéger. La présence

d'éléments non essentiels (tels que les EGP et les TRs) peut également mettre en branle des mécanismes de détoxification.

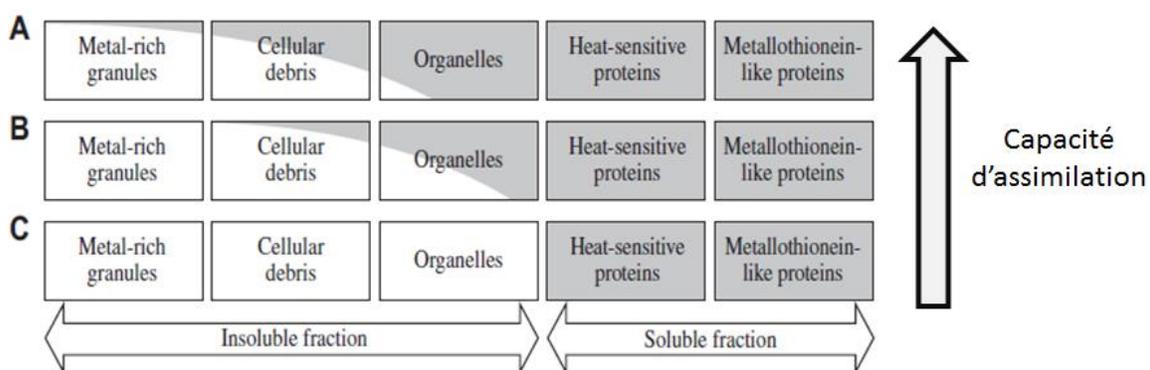
Il a déjà été mentionné que certaines fractions subcellulaires pouvaient donner un indice de la capacité de détoxification des métaux par une espèce. Chez les espèces phytoplanctoniques comme chez les algues, les granules ainsi que les HSP sont considérés comme des fractions qui donnent un indice de la capacité de détoxification d'une cellule. Ces parties viennent protéger les fractions plus sensibles aux métaux comme les organites (Campbell *et al.*, 2009; Lavoie, 2008)

Les métaux peuvent être stockés dans les granules à l'intérieur des cellules. À ce moment, cela diminue la possibilité que ces métaux se logent dans les autres parties. Puis, les HSP sont des protéines et des peptides (ex. : phytochélatines) dont la synthèse peut être induite par un stress métallique. Les éléments se lient à ces peptides et cela vient diminuer le risque des éléments à se diriger vers d'autres parties. Par contre, dans cette fraction, il est probable que les éléments ne restent pas indéfiniment liés à ces peptides et aillent ainsi se diriger vers d'autres fractions.

### **3.4 Répercussion de la distribution subcellulaire sur le transfert trophique**

Le transfert trophique est une bioaccumulation d'un contaminant via la voie alimentaire (Newman *et al.*, 2003). Les contaminants présents dans le milieu naturel tel que l'eau sont accumulés par différents organismes qui peuvent être consommés par des organismes supérieurs (Reinfelder *et al.*, 1994). Les algues qui se trouvent au début de la chaîne trophique, c'est-à-dire les producteurs primaires, vont accumuler des métaux depuis l'eau alors que les brouteurs utilisent les algues pour se nourrir et sont donc contaminés par l'ingestion (Munger *et al.*, 1997).

Les expériences réalisées permettent de mieux comprendre la distribution subcellulaire des métaux chez une algue verte. À partir de cette information, il est possible d'anticiper le potentiel de transfert trophique de ces métaux vers un autre organisme selon la partie où l'élément se trouve dans la cellule (Rainbow *et al.*, 2011). Le contaminant qui se trouve dans le cytosol (ex : fractions « HSP » et « HDP ») est normalement plus facilement assimilé par les brouteurs que le contaminant associé aux granules.-Concernant les parties dans lesquelles se retrouvent les éléments, selon l'article de Rainbow *et al.* (2011), ce qui se trouve dans les fractions « granules » et « débris » est transférable au réseau trophique à de faibles pourcentages, voire quasi nuls. Les métaux qui se trouvent dans la fraction « organites » sont transférables, mais cela dépend de la capacité de digestion du brouteur/prédateur. Alors, si la capacité de digestion est faible, la fraction « organites » ne sera pas ou peu transférable vers le prédateur. Par contre, si elle est élevée, le transfert des métaux de la proie au brouteur peut devenir important. Les fractions HSP et HDP sont solubles et, selon Rainbow, toujours transférables au niveau trophique. La figure suivante, adaptée de Rainbow *et al.* (2011) illustre de façon conceptuelle ce phénomène.



**Figure 3.16 : Variation du TAM (*Trophically Available Metal*) selon la capacité digestive et d'assimilation du brouteur/prédateur**

Les terres rares, selon les résultats obtenus au cours des expériences, seraient transférables, mais à de faibles pourcentages pour le brouteur, car seulement environ

30% des TRs se trouvent dans la partie « organites ». Par ailleurs, un grand pourcentage se trouve dans les fractions « granules » et « débris », qui sont peu assimilables vers le réseau trophique supérieur.

En revanche, les éléments du groupe platine seraient plus facilement transférés vers les brouteurs, car ils se trouvent dans les fractions « organites », les HDP et les HSP. Les HDP et les HSP sont des fractions qui devraient être transférables au niveau trophique à près de 100%. Les éléments du groupe platine viendraient contaminer davantage les proies qui se nourrissent de cellules algales dues aux parties dans lesquelles ils se retrouvent.

Aussi, dans le transfert trophique, la catégorie des éléments peut influencer la contamination. Comme il a été mentionné à la section 1.1.1, les EGP font partie des éléments mous (Classe B) et les terres rares font partie des éléments durs (Classe A) (Sigg *et al.*, 2000). Il y a, selon les résultats obtenus, une différence entre la distribution des éléments durs et mous dans la cellule. Cette différence concorde avec les résultats qui avaient déjà été obtenus au sein de l'équipe du professeur Fortin. Les résultats obtenus pour une exposition de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* à l'argent (Ag) qui est un métal mou faisant partie de la Classe B ont donné des pourcentages plus élevés dans la fraction « organites » et dans les HSP (Chen *et al.*, 2013). Puis, une exposition de la même algue au scandium (Sc) et à l'aluminium (Al) qui sont des métaux trivalents faisant partie de la Classe A ont donné de forts pourcentages dans la fraction « organites » ainsi que dans la partie « granules » (Crémazy *et al.*, 2013).

Dans le cas des résultats obtenus dans ce mémoire, des proportions importantes du Pd et Pt se sont retrouvées dans la fraction « organites » et dans les HSP. De plus, les TRs se sont dirigées dans les organites et les granules et ce, dans des pourcentages similaires à ceux obtenus pour Sc et Al. Les éléments de Classe A ont donc une

tendance à se loger dans les fractions « organites » et « granules » et les éléments de Classe B se dirigent majoritairement dans les fractions « organites » et HSP.



## CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS

Les importantes propriétés catalytiques des éléments du groupe platine (EGP) ont fait grandement augmenter leur demande depuis 1960. Leur utilisation dans de nombreuses applications telles que la médecine et l'industrie du verre s'ajoutent à leur essor dans le monde. Dans les catalyseurs de voitures, ces éléments permettent des réactions d'oxydation et de réduction avec les gaz qui s'échappent du moteur. Les molécules sont transformées pour être moins dommageables pour l'environnement. Par contre, cela apporte aussi de fines particules d'EGP dont les apports vers l'environnement sont toujours en augmentation. Le platine et le palladium sont les deux métaux parmi les EGP les plus présents dans les catalyseurs et ce sont ces deux éléments qu'on retrouve en plus grandes concentrations dans le sol et dans l'eau. Les organismes vivants dans l'eau sont donc possiblement affectés par ces métaux.

Les propriétés physico-chimiques des terres rares font aussi en sorte que leurs domaines d'utilisations ne cessent de grandir depuis quelques années. Elles sont utilisées dans les nouvelles technologies tel que les téléphones cellulaires, dans les automobiles, dans l'agriculture, etc. La forte augmentation de ces éléments dans l'industrie vient augmenter leur concentration dans l'environnement. L'extraction de ce groupe d'éléments a aussi des conséquences néfastes sur leur présence dans le milieu terrestre et aquatique. La Chine étant le plus grand producteur mondial des terres rares, elle a récemment mis en place un contrôle sur ses exportations et ses ventes dues à la grande demande. Le Québec a donc son plan d'exploitation et cela apportera possiblement des conséquences sur l'environnement.

Les métaux, une fois dans le milieu aquatique, peuvent se retrouver disponibles pour les organismes. La distribution subcellulaire des éléments dans la cellule est une bonne technique pour étudier les endroits où se logent les éléments une fois qu'ils

sont bioaccumulés. Cela permet d'étudier la toxicité potentielle des éléments, car en fonction des endroits où ils se lient, il y aura présence de toxicité ou non pour l'organisme étudié. De plus, l'organisme qui ingère des cellules algales pour se nourrir peut ou non être affecté par la contamination du métal dû au transfert trophique. Dans ces expériences, il a d'abord été question d'étudier la gestion intracellulaire des éléments chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* sous l'influence des pH 6, 7 et 8.

Les pourcentages de distribution des EGP dans la fraction « organites » étaient, à pH 7, de 52% pour le palladium et 65 % pour le platine. Il est à remarquer que plus de 50 % des éléments du groupe platine se logent dans cette fraction qui est dite sensible. Le lanthane se trouve présent à 27% et l'euprium à 25 %, ce qui indique qu'environ 25% de ce groupe d'élément, à pH neutre, se lie à des sites appartenant aux organites. Ensuite, dans la fraction « granules », le Pd et le Pt se trouvent à des pourcentages inférieurs à 1 %. Il est différent pour le lanthane qui se trouve à 51% et à l'euprium qui est à 53%. Les deux éléments faisant partie des terres rares se trouvent à un fort pourcentage dans la fraction « granules » qui est dite détoxiquée. Les éléments stockés dans ces fractions ne seraient pas toxiques pour la cellule puisqu'ils devraient rester à l'intérieur des granules. Quelques variantes sont observées au pH 6 et 8, mais montrent peu d'écarts significatifs. Les différences de toxicité obtenues au pH 6 et 8 par Guillaume Tétrault (2014) ne se reflètent pas dans la répartition subcellulaire.

Dans le présent travail, il a été démontré que la présence d'un groupe d'élément ne venait pas affecter la distribution subcellulaire d'un deuxième groupe d'éléments. L'exposition aux éléments du groupe platine donne des résultats similaires à une exposition où il y a l'ajout des terres rares. Les résultats obtenus indiquent une proportion de Pd dans les organites de 54% en absence des terres rares et de 55% en présence des terres rares (Figure 3.8). Cette indépendance a aussi été observée dans les expositions aux terres rares, seules ou en présence des EGP.

Le dernier objectif était de voir si le temps avait une influence sur la répartition subcellulaire. Il a été montré qu'il n'y avait pas de différence entre des temps d'exposition de 1 heure ou de 14 heures. À un temps de 1 heure, le Pd et le Pt sont présents à moins de 1% dans les granules et la même observation est faite après 14 heures. Il est donc à supposer qu'un état stationnaire est atteint rapidement au niveau de la cellule lors des expositions. Les grands écarts types observés après 14 heures peuvent être dus au fait qu'une certaine toxicité commence à se manifester et les cellules ne seront pas affectées de la même manière.

Les résultats obtenus par la distribution subcellulaire des éléments dans la cellule permettent d'anticiper le potentiel de transfert trophique. Il a été expliqué par une équipe de recherche (Rainbow *et al.*, 2011) que la partie dans laquelle se trouve le métal pouvait être transférable ou non pour le prédateur. Ce transfert dépend de la capacité de digestion et d'assimilation de ce dernier. Les protéines (HSP et HDP) ainsi que les organites sont considérés comme des fractions transférables au niveau trophique à de forts pourcentages. Les éléments qui seraient présents dans les granules et les débris auraient très peu de chance d'être transférés lors de l'ingestion. Selon les résultats obtenus dans ce mémoire, il serait probable que le Pd et le Pt qui se trouvent dans les organites et dans les protéines soient davantage assimilés par les brouteurs que le La et Eu qui sont, à au moins 50%, dans les granules.

Les expériences ont été réalisées avec l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*. Il serait intéressant de vérifier si les résultats sont reproductibles avec d'autres espèces d'algues en utilisant la distribution subcellulaire. Aussi, les concentrations des terres rares dans l'environnement ne sont pas identiques dépendamment du lieu d'étude (ex. : site naturel vs une rivière près d'un site minier). La concentration de 100 nM utilisée dans les expériences a été choisie en fonction de plusieurs sites qui avaient été échantillonnés au Québec. Les concentrations se trouvaient entre  $10^{-5}$  M et  $10^{-12}$  M. Il serait donc intéressant d'étudier la répartition des éléments en faisant varier les

concentrations dans le milieu d'exposition. Aussi, les résultats obtenus supposent d'un potentiel de transfert trophique plus élevé pour les EGP, mais cela n'a pas été vérifié. De ce fait, il serait bien, pour explorer davantage les résultats obtenus, de vérifier le transfert trophique à l'aide d'un organisme qui se nourrit d'algues préalablement contaminées aux métaux.

## CHAPITRE 5 : RÉFÉRENCES

- Alonso E, Sherman AM, Wallington TJ, Everson MP, Field FR, Roth R & Kirchain RE (2012) International journal of environmental research and public health Evaluating rare earth element availability: a case with revolutionary demand from clean technologies. *Environmental Science & Technology* 46(6):3406-3414.
- Artelt S, Creutzenberg O, Kock H, Levsen K, Nachtigall D, Heinrich U, Rühle T & Schlögl R (1999) Bioavailability of fine dispersed platinum as emitted from automotive catalytic converters: A model study. *Science of the Total Environment* 228(2-3):219-242.
- Biggs T, Taylor SS & van der Lingen E (2005) The hardening of platinum alloys for potential jewellery application. *Platinum Metals Review* 49(1):2-15.
- Bondaz A (2012) *Les terres rares en Chine: une politique de plus en plus contestée*. Institut des hautes études de défense nationale, Paris. 8 p
- Callahan DL, Baker AJ, Kolev SD & Wedd AG (2006) Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 11(1):2-12.
- Campbell P (1995) *Interactions between Trace Metals and Aquatic Organisms: A critique of the Free-ion Activity Model. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. J. Wiley & Sons, Chichester, Angleterre. 45 - 102 p
- Campbell PG & Hare L (2009) Metal detoxification in freshwater animals. Roles of metallothioneins. *Metal Ions in Life Sciences* 5:239-277.
- Carpenter D, Boutin C, Allison JE, Parsons JL & Ellis DM (2015) Uptake and effects of six rare earth elements (REEs) on selected native and crop species growing in contaminated soils. *PLoS ONE* 10(6).
- Castor SB & Hedrick JB (2006) Rare earth elements. *Industrial minerals volume, 7th edition*:769-792.
- Chen Z, Porcher C, Campbell PG & Fortin C (2013) Influence of humic acid on algal uptake and toxicity of ionic silver. *Environmental Science & Technology* 47(15):8835-8842.
- Colombo C, Monhemius AJ & Plant JA (2008) Platinum, palladium and rhodium release from vehicle exhaust catalysts and road dust exposed to simulated lung fluids. *Ecotoxicol Environ Saf* 71(3):722-730.
- Comité permanent des ressources naturelles - Chambre des communes (2014) *L'industrie des éléments de terres rares au Canada -Résumé des témoignages*. La Reine, Ottawa
- Cossa D & Ficht A (1999) *La dynamique du mercure*. IFREMER, Plouzané, France
- Couderc C (2010) Platinum Group Metals in Glass Making. *Platinum Metals Review* 54(3):186-191.

- Crémazy A, Levy JL, Campbell PG & Fortin C (2013) Uptake and subcellular partitioning of trivalent metals in a green alga: comparison between Al and Sc. *Biometals* 26(6):989-1001.
- Ek KH, Morrison GM & Rauch S (2004) Environmental routes for platinum group elements to biological materials--a review. *Science of the Total Environment* 334-335:21-38.
- El-Akl P, Smith S & Wilkinson KJ (2015) Linking the chemical speciation of cerium to its bioavailability in water for a freshwater alga. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34(8):1711-1719.
- Encyclopédie canadienne (2006) *Platine*.  
<http://www.encyclopediecanadienne.ca/fr/article/platine/> (Consulté le 23 novembre)
- Énergie et ressources naturelles du Québec (*Exploration minière des Terres rares au Québec*. <https://www.mern.gouv.qc.ca/mines/industrie/metaux/metaux-exploration-terres-rares.jsp> (Consulté le 24 novembre 2015)
- Feng L, Xiao H, He X, Li Z, Li F, Liu N, Chai Z, Zhao Y & Zhang Z (2006) Long-term effects of lanthanum intake on the neurobehavioral development of the rat. *Neurotoxicology and Teratology* 28(1):119-124.
- Fortin C & Campbell PG (2012) *Notes de cours : Complexation dans les eaux naturelles*. 84 p
- Fortin C & Campbell PGC (2000) Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas Reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(11):2769-2778.
- Fujiwara K, To YM, Kawakami H, Aoki M & Tuzuki M (2008) Evaluation of metal toxicity in *Chlorella kessleri* from the perspective of the periodic table. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 81(4):478-488.
- Gonzalez V, Vignati DA, Leyval C & Giamberini L (2014) Environmental fate and ecotoxicity of lanthanides: are they a uniform group beyond chemistry? *Environment International* 71:148-157.
- Goonan TG (2011) Rare Earth Elements—End Use and Recyclability. *Scientific Investigations Report 2011-5094*:15.
- Hans Wedepohl K (1995) The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59(7):1217-1232.
- Harris EH, Stern DB & Witman G (2009) *The Chlamydomonas sourcebook*. Academic Press, Burlington, MA, 2
- Haxel GB, Hedrick JB, Orris GJ, Stauffer PH & Hendley II JW (2002) *Rare earth elements: critical resources for high technology*. U.S. Geological Survey. 4 p
- He ML, Ranz D & Rambeck WA (2001) Study on the performance enhancing effect of rare earth elements in growing and fattening pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 85(7-8):263-270.
- Helmers E & Mergel N (1998) Platinum and rhodium in a polluted environment: studying the emissions of automobile catalysts with emphasis on the application of CSV rhodium analysis. *Fresenius' journal of analytical chemistry* 362(6):522-528.

- Henderson P (2013) *Rare Earth Element Geochemistry*. Elsevier Science, New York. 510 p. <https://books.google.ca/books?id=31HgBAAAQBAI>
- Kanazawa Y & Kamitani M (2006) Rare earth minerals and resources in the world. *Journal of Alloys and Compounds* 408-412:1339-1343.
- Kawagoe M, Ishikawa K, Wang SC, Yoshikawa K, Arany S, Zhou XP, Wang JS, Ueno Y, Koizumi Y, Kameda T, Koyota S & Sugiyama T (2008) Acute effects on the lung and the liver of oral administration of cerium chloride on adult, neonatal and fetal mice. *J Trace Elem Med Biol* 22(1):59-65.
- Kelland L (2007) The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7(8):573-584.
- Kümmerer K, Helmers E, Hubner P, Mascart G, Milandri M, Reinthaler F & Zwakenberg M (1999) European hospitals as a source for platinum in the environment in comparison with other sources. *Science of the Total Environment* 225(1-2):155-165.
- Lavoie M (2008) *Synthèse de peptides thiolés et distribution intracellulaire du cadmium chez deux algues vertes (Chlamydomonas reinhardtii et Pseudokirchneriella subcapitata)*. (Université du Québec, INRS-Eau, Terre et Environnement, 2008, Québec). 229 p. Accès au document <http://espace.inrs.ca/1828/1/T000468.pdf>
- Lavoie M, Le Faucheur S, Fortin C & Campbell PGC (2009) Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquatic Toxicology* 92(2):65-75.
- Leventhal DA, Jais (1995) Bioavailability of metals. *United States Geological Survey*:10-18.
- Li J, Hong M, Yin X & Liu J (2010) Effects of the accumulation of the rare earth elements on soil macrofauna community. *Journal of Rare Earths* 28(6):957-964.
- Macfie SM, Tarmohamed Y & Welbourn PM (1994) Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27(4):454-458.
- Moldovan M, Palacios MA, Gómez MM, Morrison G, Rauch S, McLeod C, Ma R, Caroli S, Alimonti A, Petrucci F, Bocca B, Schramel P, Zischka M, Pettersson C, Wass U, Luna M, Saenz JC & Santamaría J (2002) Environmental risk of particulate and soluble platinum group elements released from gasoline and diesel engine catalytic converters. *Science of the Total Environment* 296(1-3):199-208.
- Munger C & Hare L (1997) Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): Implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environmental Science and Technology* 31(3):891-895.
- Newman MC & Unger MA (2003) *Fundamentals of ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla., 2nd. 458 p. p
- Nikanorov AM (2009) The Oddo-Harkins rule and distribution of chemical elements in freshwater ecosystems. *Doklady Earth Sciences* 426(1):600-604.

- Pagano G, Aliberti F, Guida M, Oral R, Siciliano A, Trifuoggi M & Tommasi F (2015) Rare earth elements in human and animal health: State of art and research priorities. *Environmental Research* 142:215-220.
- Rainbow PS, Luoma SN & Wang WX (2011) Trophically available metal--a variable feast. *Environ Pollut* 159(10):2347-2349.
- Ravindra K, Bencs L & Van Grieken R (2004) Platinum group elements in the environment and their health risk. *Science of the Total Environment* 318(1-3):1-43.
- Reinfelder JR & Fisher NS (1994) Retention of elements absorbed by juvenile fish (*Menidia menidia*, *Menidia beryllina*) from zooplankton prey. *Limnology and Oceanography* 39(8):1783-1789.
- Roy G (2009) *Les éléments du groupe platine (Pd, Pt et Rh) dans les eaux de surface et leur toxicité chez l'algue verte : Chlamydomonas reinhardtii*. (Université du Québec, INRS-Eau, Terre et Environnement, 2009, Québec). xv, 145 p. p. Accès au document <http://espace.inrs.ca/482/1/T000522.pdf>
- Sigg L, Behra P & Stumm W (2000) *Chimie des milieux aquatiques : chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement*. Dunod, Paris, 3e éd. rev. et augm. xxiv, 567 p. p. Résumé <http://www.uqtr.ca/biblio/notice/resume/03-2239731R.html>
- Table des matières <http://www.uqtr.ca/biblio/notice/tablemat/03-2239731TM.html>
- Stauber J & Binet M (2000) Canning River Phoslock field trials--Ecotoxicity testing final report. (CSIRO Centre for Advanced Analytical Chemistry Energy Technology. Report no. ET317R. Prepared for CSIRO Land and Water and the WA Water and Rivers Commission).
- Stumm W & Morgan JJ (1996) *Aquatic chemistry : chemical equilibria and rates in natural waters*. Wiley, New York ; Toronto, 3rd. xvi, 1022 p. p
- Tétrault G (2014) *Influence de la physico-chimie du milieu (ph, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) sur l'internalisation et la toxicité du platine et du palladium chez l'algue verte : Chlamydomonas reinhardtii*. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Québec. xiii, 93 pages p. Accès au document <http://espace.inrs.ca/2078/1/T000669.pdf>
- USGS (2007) *Platinum-group metals*. <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/platinum/mcs-2015-plati.pdf>
- USGS (2014) *Platinum-Group Elements—So Many Excellent Properties*. <http://pubs.usgs.gov/fs/2014/3064/pdf/fs2014-3064.pdf>
- USGS (2015) *Platinum-Group Metals*. <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/platinum/> (Consulté le 10 novembre 2015)
- Vijayaraghavan K, Sathishkumar M & Balasubramanian R (2011) Interaction of rare earth elements with a brown marine alga in multi-component solutions. *Desalination* 265(1-3):54-59.
- Wallace WG, Lee BG & Luoma SN (2003) Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and

- biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series* 249:183-197.
- WHO (2002) *International Programme on Chemical Safety: Environmental Health Criteria 226-Palladium*. Geneva.  
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc226.htm#1.7>
- Wiseman CL & Zereini F (2009) Airborne particulate matter, platinum group elements and human health: a review of recent evidence. *Science of the Total Environment* 407(8):2493-2500.
- Zereini F, Skerstupp B, Alt F, Helmers E & Urban H (1997) Geochemical behaviour of platinum-group elements (PGE) in particulate emissions by automobile exhaust catalysts: experimental results and environmental investigations. *Science of the Total Environment* 206(2-3):137-146.
- Zhang S & Shan XQ (2001) Speciation of rare earth elements in soil and accumulation by wheat with rare earth fertilizer application. *Environmental Pollution* 112(3):395-405.
- Zhu W, Xu S, Shao P, Zhang H, Wu D, Yang W, Feng J & Feng L (2005) Investigation on liver function among population in high background of rare earth area in South China. *Biological Trace Element Research* 104(1):1-7.
- Zimmermann S, Baumann U, Taraschewski H & Sures B (2004) Accumulation and distribution of platinum and rhodium in the European eel *Anguilla anguilla* following aqueous exposure to metal salts. *Environmental Pollution* 127(2):195-202.



## ANNEXE A

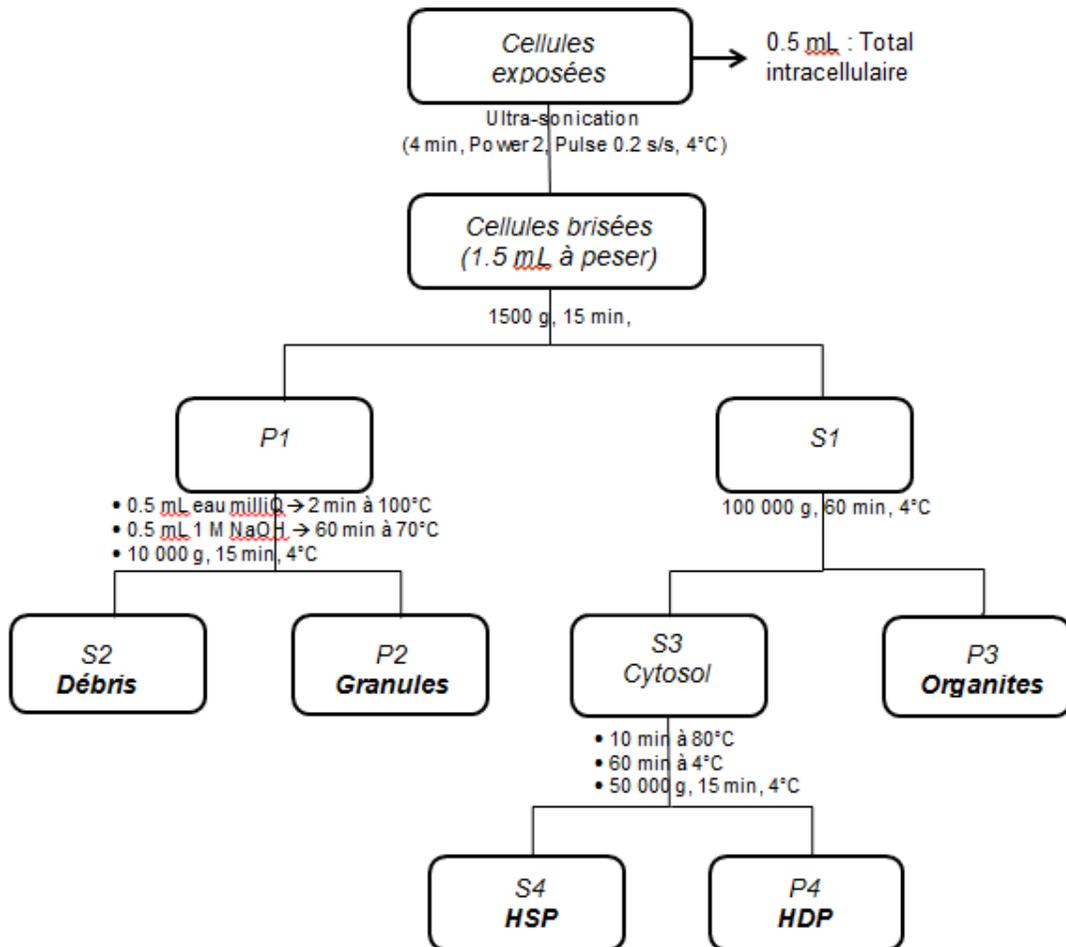


Tableau A.1 : Étapes du fractionnement subcellulaire

## ANNEXE B

**Tableau B.1 : Concentrations (nM) des différents éléments obtenues à t = 0 h lors des expositions à différents pH**

|           | pH 6    | pH 7    | pH 8   |
|-----------|---------|---------|--------|
| <b>Pd</b> | 50 ± 22 | 28 ± 4  | 83 ± 3 |
| <b>Pt</b> | 86 ± 2  | 86 ± 2  | 88 ± 3 |
| <b>La</b> | 51 ± 12 | 63 ± 9  | 31 ± 7 |
| <b>Eu</b> | 41 ± 18 | 57 ± 12 | 31 ± 6 |

**Tableau B.2 : Concentrations (nM) des différents éléments obtenues à t = 0 h lors des expositions aux EGP et TRs à pH 7**

|           | Exposition TRs | Exposition EGP |
|-----------|----------------|----------------|
| <b>Pd</b> | NA             | 60 ± 3         |
| <b>Pt</b> | NA             | 88 ± 4         |
| <b>La</b> | 44 ± 14        | NA             |
| <b>Eu</b> | 29 ± 12        | NA             |

NA : ne s'applique pas

**Tableau B.3: Concentrations (nM) des différents éléments obtenues à t = 0 h lors de l'exposition au TRs**

|           | <b>Exposition TRs</b> |
|-----------|-----------------------|
| <b>La</b> | 90 ± 5                |
| <b>Ce</b> | 83 ± 5                |
| <b>Pr</b> | 83 ± 6                |
| <b>Nd</b> | 79 ± 5                |
| <b>Sm</b> | ND                    |
| <b>Eu</b> | 75 ± 6                |
| <b>Gd</b> | 75 ± 5                |
| <b>Tb</b> | ND                    |
| <b>Dy</b> | 74 ± 5                |
| <b>Ho</b> | 74 ± 4                |
| <b>Er</b> | 74 ± 4                |
| <b>Tm</b> | 71 ± 4                |
| <b>Yb</b> | 70 ± 4                |
| <b>Lu</b> | 71 ± 4                |

ND : non disponible

## ANNEXE C

**Tableau C.1 : Concentrations (amol/cell) des différents éléments obtenues lors du fractionnement de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 6**

|                     | <b>Pd</b> | <b>Pt</b> | <b>La</b> | <b>Eu</b> |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>pH 6 «org» B</b> | 0,147     | 0,014     | 0,069     | 0,009     |
| <b>pH 6 «org» 1</b> | 11,880    | 15,151    | 3,004     | 1,744     |
| <b>pH 6 «org» 2</b> | 12,783    | 3,353     | 1,899     | 1,504     |
| <b>pH 6 «org» 3</b> | 10,370    | 3,082     | 1,400     | 1,188     |
| <b>pH 6 «Gr» B</b>  | 0,132     | 0,003     | 0,281     | 0,007     |
| <b>pH 6 «Gr» 1</b>  | 0,253     | 0,126     | 3,501     | 2,285     |
| <b>pH 6 «Gr» 2</b>  | 0,513     | 0,145     | 1,515     | 1,005     |
| <b>pH 6 «Gr» 3</b>  | 0,296     | 0,090     | 1,300     | 0,889     |
| <b>pH 6 «Db» B</b>  | 0,895     | 0,009     | 0,062     | 0,017     |
| <b>pH 6 «Db» 1</b>  | 2,733     | 2,215     | 3,288     | 2,825     |
| <b>pH 6 «Db» 2</b>  | 8,232     | 2,681     | 4,228     | 3,774     |
| <b>pH 6 «Db» 3</b>  | 10,620    | 3,460     | 4,235     | 3,894     |
| <b>pH 6 «HDP» B</b> | 0,479     | 0,038     | 0,032     | 0,002     |
| <b>pH 6 «HDP» 1</b> | 1,593     | 0,583     | 0,042     | 0,014     |
| <b>pH 6 «HDP» 2</b> | 3,219     | 0,117     | 0,073     | 0,043     |
| <b>pH 6 «HDP» 3</b> | 0,851     | 0,235     | 0,092     | 0,071     |
| <b>pH 6 «HSP» B</b> | 0,122     | 0,012     | 0,028     | 0,005     |
| <b>pH 6 «HSP» 1</b> | 6,393     | 6,938     | 0,329     | 0,138     |
| <b>pH 6 «HSP» 2</b> | 6,934     | 1,718     | 0,427     | 0,255     |
| <b>pH 6 «HSP» 3</b> | 9,248     | 2,209     | 0,438     | 0,291     |

- La signification des abréviations des tableaux B.1 à B.6 est la suivante : (B = Blanc), (B1= Blanc 1), (B2 = Blanc 2), (1 = Essai 1), (2= Essai 2), (3 = Essai 3) et (4 = Essai 4)

**Tableau C.2 : Concentrations (amol/cell) des différents éléments obtenues lors du fractionnement de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 7**

|                     | <b>Pd</b> | <b>Pt</b> | <b>La</b> | <b>Eu</b> |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>pH 7 «org» B</b> | 0,622     | 0,013     | 0,048     | 0,010     |
| <b>pH 7 «org» 1</b> | 2,986     | 9,868     | 1,144     | 0,663     |
| <b>pH 7 «org» 2</b> | 4,453     | 7,473     | 1,697     | 1,294     |
| <b>pH 7 «org» 3</b> | 3,091     | 9,370     | 1,503     | 0,966     |
| <b>pH 7 «org» 4</b> | 3,109     | 7,018     | 0,940     | 0,374     |
| <b>pH 7 «Gr» B</b>  | 0,072     | 0,001     | 0,072     | 0,006     |
| <b>pH 7 «Gr» 1</b>  | 0,098     | 0,215     | 2,558     | 1,760     |
| <b>pH 7 «Gr» 2</b>  | 0,323     | 0,220     | 2,448     | 1,969     |
| <b>pH 7 «Gr» 3</b>  | 0,085     | 0,102     | 2,782     | 2,190     |
| <b>pH 7 «Gr» 4</b>  | 0,148     | 0,098     | 1,963     | 0,898     |
| <b>pH 7 «Db» B</b>  | 0,088     | 0,002     | 0,006     | 0,002     |
| <b>pH 7 «Db» 1</b>  | 0,210     | 0,542     | 0,495     | 0,391     |
| <b>pH 7 «Db» 2</b>  | 0,316     | 0,274     | 0,392     | 0,385     |
| <b>pH 7 «Db» 3</b>  | 0,197     | 0,495     | 0,410     | 0,363     |
| <b>pH 7 «Db» 4</b>  | 0,530     | 0,763     | 0,588     | 0,334     |
| <b>pH 7 «HDP» B</b> | 0,039     | 0,013     | 0,000     | 0,000     |
| <b>pH 7 «HDP» 1</b> | 0,826     | 0,687     | 0,063     | 0,033     |
| <b>pH 7 «HDP» 2</b> | 0,382     | 0,384     | 0,091     | 0,055     |
| <b>pH 7 «HDP» 3</b> | 0,187     | 0,441     | 0,065     | 0,027     |
| <b>pH 7 «HDP» 4</b> | 1,013     | 0,4733    | 0,093     | 0,019     |
| <b>pH 7 «HSP» B</b> | 0,097     | 0,051     | 0,015     | 0,004     |
| <b>pH 7 «HSP» 1</b> | 1,124     | 3,166     | 0,421     | 0,258     |
| <b>pH 7 «HSP» 2</b> | 3,150     | 3,939     | 0,430     | 0,365     |
| <b>pH 7 «HSP» 3</b> | 1,083     | 3,247     | 0,426     | 0,267     |
| <b>pH 7 «HSP» 4</b> | 1,568     | 3,428     | 0,504     | 0,178     |

**Tableau C.3 : Concentrations (amol/cell) des différents éléments obtenues lors du fractionnement de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 8**

|                      | <b>Pd</b> | <b>Pt</b> | <b>La</b> | <b>Eu</b> |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>pH 8 «Org» B1</b> | 0,747     | 0,013     | 0,004     | 0,002     |
| <b>pH 8 «Org» B2</b> | 0,091     | 0,074     | 0,215     | 0,003     |
| <b>pH 8 «Org» 1</b>  | 8,806     | 3,162     | 1,054     | 9,579     |
| <b>pH 8 «Org» 2</b>  | 4,464     | 0,837     | 0,481     | 0,226     |
| <b>pH 8 «Org» 3</b>  | 10,600    | 1,003     | 0,969     | 0,418     |
| <b>pH 8 «Org» 4</b>  | 5,584     | 0,756     | 0,465     | 0,228     |
| <b>pH 8 «Gr» B1</b>  | 0,012     | 0,003     | 0,023     | 0,003     |
| <b>pH 8 «Gr» B2</b>  | 0,000     | 0,005     | 0,103     | 0,003     |
| <b>pH 8 «Gr» 1</b>   | 0,237     | 0,054     | 1,993     | 0,706     |
| <b>pH 8 «Gr» 2</b>   | 0,214     | 0,013     | 1,104     | 0,514     |
| <b>pH 8 «Gr» 3</b>   | 0,220     | 0,015     | 1,518     | 0,551     |
| <b>pH 8 «Gr» 4</b>   | 0,087     | 0,025     | 1,335     | 0,497     |
| <b>pH 8 «Db» B1</b>  | 0,281     | 0,012     | 0,013     | 0,003     |
| <b>pH 8 «Db» B2</b>  | 0,162     | 0,017     | 0,028     | 0,008     |
| <b>pH 8 «Db» 1</b>   | 3,634     | 0,429     | 0,493     | 0,206     |
| <b>pH 8 «Db» 2</b>   | 1,592     | 0,078     | 0,267     | 0,144     |
| <b>pH 8 «Db» 3</b>   | 2,455     | 0,090     | 0,260     | 0,135     |
| <b>pH 8 «Db» 4</b>   | 3,536     | 0,321     | 0,743     | 0,418     |
| <b>pH 8 «HDP» B1</b> | 0,129     | 0,009     | 0,003     | 0,000     |
| <b>pH 8 «HDP» B2</b> | 0,620     | 0,012     | 0,117     | 0,006     |
| <b>pH 8 «HDP» 1</b>  | 1,262     | 0,087     | 0,042     | 0,019     |
| <b>pH 8 «HDP» 2</b>  | 0,168     | 0,026     | 0,024     | 0,013     |
| <b>pH 8 «HDP» 3</b>  | 0,564     | 0,053     | 0,035     | 0,013     |
| <b>pH 8 «HDP» 4</b>  | 0,987     | 0,032     | 0,020     | 0,009     |
| <b>pH 8 «HSP» B1</b> | 0,178     | 0,007     | 0,005     | 0,001     |
| <b>pH 8 «HSP» B2</b> | 0,311     | 0,016     | 0,027     | 0,003     |
| <b>pH 8 «HSP» 1</b>  | 3,642     | 0,947     | 0,570     | 0,289     |
| <b>pH 8 «HSP» 2</b>  | 1,869     | 0,271     | 0,275     | 0,170     |
| <b>pH 8 «HSP» 3</b>  | 4,358     | 0,301     | 0,588     | 0,288     |
| <b>pH 8 «HSP» 4</b>  | 2,299     | 0,236     | 0,270     | 0,145     |

**Tableau C.4 : Concentrations (amol/cell) des différents éléments obtenues dans les cellules non fractionnées de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 6**

|                            | <b>Pd</b> | <b>Pt</b> | <b>La</b> | <b>Eu</b> |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>pH 6 Total intra. B</b> | 0,340     | 0,054     | 0,267     | 0,016     |
| <b>pH 6 Total intra. 1</b> | 25,580    | 32,380    | 11,200    | 7,660     |
| <b>pH 6 Total intra. 2</b> | 38,936    | 13,290    | 10,200    | 7,950     |
| <b>pH 6 Total intra. 3</b> | 65,710    | 19,530    | 12,000    | 10,000    |

**Tableau C.5 : Concentrations (amol/cell) des différents éléments obtenues dans les cellules non fractionnées de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 7**

|                            | <b>Pd</b> | <b>Pt</b> | <b>La</b> | <b>Eu</b> |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>pH 7 Total intra. B</b> | 0,102     | 0,169     | 0,107     | 0,023     |
| <b>pH 7 Total intra. 1</b> | 6,460     | 22,690    | 6,706     | 4,072     |
| <b>pH 7 Total intra. 2</b> | 9,598     | 16,026    | 8,378     | 5,580     |
| <b>pH 7 Total intra. 3</b> | 6,881     | 24,400    | 7,949     | 5,384     |
| <b>pH 7 Total intra. 4</b> | 9,425     | 23,200    | 7,099     | 3,397     |

**Tableau C.6 : Concentrations (amol/cell) des différents éléments obtenues dans les cellules non fractionnées de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 8**

|                             | <b>Pd</b> | <b>Pt</b> | <b>La</b> | <b>Eu</b> |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>pH 8 Total intra. B1</b> | 0,940     | 0,047     | 0,068     | 0,006     |
| <b>pH 8 Total intra. B2</b> | 1,159     | 0,062     | 0,164     | 0,011     |
| <b>pH 8 Total intra. 1</b>  | 25,620    | 6,350     | 4,543     | 2,003     |
| <b>pH 8 Total intra. 2</b>  | 11,640    | 1,763     | 2,440     | 1,237     |
| <b>pH 8 Total intra. 3</b>  | 26,130    | 1,890     | 3,634     | 1,516     |
| <b>pH 8 Total intra. 4</b>  | 17,400    | 2,010     | 3,205     | 1,448     |