

Université du Québec
Institut National de la Recherche scientifique
Centre Eau Terre Environnement

**TOXICITÉ DU LANTHANE CHEZ L'ALGUE VERTE
CHLORELLA FUSCA EN PRÉSENCE DE MATIÈRE
ORGANIQUE NATURELLE**

Par
Rahma Rahal

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Isabelle Lavoie
INRS-ETE

Examineur externe

Laure Giamberini
Université de Lorraine

Directeur de recherche

Claude Fortin
INRS-ETE

Codirecteur de recherche

Peter G.C. Campbell
INRS-ETE

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes directeurs de recherche, Claude Fortin et Peter Campbell pour leur appui pendant ce projet au sein de l'INRS.

La contribution des membres du personnel de l'équipe technique en laboratoire de l'INRS a joué un rôle important dans la réalisation de mon projet. Je tiens à remercier Anissa Bensadoune et Jean-François Dutil pour le support avec l'ICP-AES.

Je remercie énormément tous les membres de l'équipe, spécialement Kim Racine qui était toujours là pour m'informer par rapport aux différents appareillages et le principe de fonctionnement dans notre laboratoire.

Je remercie aussi mes parents, Adnen Rahal et Thouraya Zouaoui pour tous les sacrifices qu'ils ont fait tout au long de mes études pour que je puisse réussir ce que j'ai réussi jusqu'à aujourd'hui.

Je tiens aussi à remercier une personne qui m'est très chère et m'est très proche et que j'aime, Ouail Messari qui m'a supporté et aidé à plusieurs reprises quand j'en avais besoin.

RÉSUMÉ

Une augmentation des concentrations environnementales des lanthanides est anticipée, attribuable à une utilisation et une exploitation de plus en plus importantes de ces métaux. Pour évaluer les risques environnementaux posés par ces éléments, il faudra tenir compte de la composition du milieu récepteur. L'un des paramètres importants qui peuvent moduler la toxicité de ces métaux vis-à-vis des organismes aquatiques est la matière organique naturelle (MON). Ce ligand peut complexer les lanthanides, ce qui devrait réduire leur biodisponibilité et avoir un effet sur leur internalisation et par conséquent leur toxicité.

Dans une étude antérieure réalisée dans notre laboratoire, la toxicité des lanthanides pour l'algue unicellulaire *Chlorella fusca* a été déterminée dans des milieux synthétiques. Cependant, ces milieux synthétiques ne contenaient pas de MON. La première étape du présent projet consistait donc à caractériser la complexation d'un des lanthanides, le lanthane, par la MON (SRHA : *Suwannee River Humic Acid*) en utilisant deux approches : une technique d'échange ionique ainsi que l'ultrafiltration partielle. Le modèle WHAM a aussi été utilisé afin d'estimer la spéciation de ce métal en présence de la SRHA. Les résultats expérimentaux obtenus ont ensuite été comparés à ceux prédits par WHAM. Les concentrations de lanthane utilisées étaient comprises entre 350 et 5000 nM, et celles de SRHA étaient comprises entre 1 et 3 mg C/L. Les concentrations de lanthanides ont été mesurées par spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif.

Pour évaluer la toxicité du lanthane en présence de la MON, l'algue verte unicellulaire *Chlorella fusca* a été exposée à différentes concentrations du métal, tout en considérant sa spéciation dans le milieu en présence de MON. Les CE_{50} calculées en présence de la MON étaient plus faibles qu'en son absence ce qui suggère une toxicité plus importante. Les quantités de lanthane internalisées mesurées ont démontré que la MON facilitait l'assimilation du lanthane et suggèrent ainsi que la toxicité accrue du lanthane en présence de MON est due à son internalisation.

Mots-clés : *Chlorella fusca*, toxicité, lanthane, internalisation, MON, spéciation

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE	1
1 INTRODUCTION.....	3
1.1 LES METAUX EN MILIEUX AQUATIQUES.....	3
1.2 LES TERRES RARES (TR)	7
1.2.1 <i>Caractéristiques</i>	7
1.2.2 <i>Utilisations</i>	9
1.2.3 <i>Production mondiale</i>	11
1.2.4 <i>Contamination environnementale</i>	13
1.2.5 <i>Toxicité des lanthanides chez les organismes aquatiques</i>	14
1.3 PROBLEMATIQUE	16
1.4 OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....	17
2 MATERIELS ET METHODES	19
2.1 ORGANISME SELECTIONNE	19
2.2 MILIEUX DE CULTURE ET D'EXPOSITION	19
2.2.1 <i>Milieu de culture</i>	19
2.2.2 <i>Milieu d'exposition au lanthane</i>	20
2.2.3 <i>Solution de rinçage</i>	21
2.3 SPECIATION CHIMIQUE DU LANTHANE	21
2.4 TESTS DE TOXICITE.....	21
2.5 EXPLOITATION DES DONNEES	22
2.5.1 <i>Calculs des CE₅₀</i>	22
2.5.2 <i>Analyses statistiques</i>	23
3 RESULTATS ET DISCUSSION.....	23
3.1 SPECIATION DU LANTHANE	23
3.2 TOXICITE DU LANTHANE CHEZ L'ALGUE <i>CHLORELLA FUSCA</i>	23
3.3 TOXICITE DU LANTHANE CHEZ L'ALGUE <i>CHLORELLA FUSCA</i> EN PRESENCE D'ACIDE HUMIQUE	25
3.4 BIOACCUMULATION ET INTERNALISATION DU LANTHANE EN PRESENCE D'ACIDE HUMIQUE	27
4 CONCLUSION	31
5. REFERENCES.....	33

6 ANNEXE	40
CHAPITRE 2 : ARTICLE	43
ABSTRACT.....	48
1 INTRODUCTION.....	49
2 MATERIALS AND METHODS	50
2.1 ALGAL CULTURE CONDITIONS	50
2.2 LANTHANUM SPECIATION.....	51
2.3 TOXICITY TEST	54
3 RESULTS AND DISCUSSION	55
3.1 SPECIATION OF LANTHANUM.....	55
3.2 LANTHANUM IN THE EXPOSURE MEDIA.....	57
3.2.1 <i>Effect of NOM on cells growth</i>	58
3.2.2 <i>Effect on La internalization</i>	62
4. CONCLUSION	66
5. REFERENCES.....	67
SUPPORTING INFORMATION	69

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 3.1 : VALEURS CALCULEES DES CE_{50} DE LA POUR L'ALGUE *CHLORELLA FUSCA* APRES 120 H
D'EXPOSITION POUR DES CONCENTRATIONS D'ACIDE HUMIQUE DE 0, 1, 2 ET 3 MG C/L. 27

LISTE DES FIGURES

Chapitre1 : Synthèse

FIGURE 1.1: SCHEMA PRESENTANT LES REACTIONS PRISES EN COMPTE DANS LE MODELE DU LIGAND BIOTIQUE. ADAPTE DE (JANSSEN ET AL., 2003).	5
FIGURE 1.2: REPRESENTATION DE TROIS MECANISMES POSSIBLES DE PRISE EN CHARGE DE METAUX PAR DES ORGANISMES AQUATIQUES (PELLETIER & CAMPBELL, 2008).	6
FIGURE 1.3: TABLEAU PERIODIQUE MONTRANT LA POSITION DES TERRES RARES, TIREE DE HTTP://TABLEAU-PERIODIQUE.FR	8
FIGURE 1.4: RESUME DES PRINCIPAUX USAGES DES TERRES RARES. ADAPTE DE (ZEPF, 2013)	9
FIGURE 1.5: ILLUSTRATIONS DES DIFFERENTES UTILISATIONS DES TERRES RARES DANS UNE VOITURE ELECTRIQUE OU HYBRIDE (MAIL, 2011)	10
FIGURE 1.6 : ÉVOLUTION DE LA PRODUCTION MONDIALE D'OXYDES DE TERRES RARES (EN TONNES, ECHELLE DE GAUCHE) ET DU PRIX ANNUEL MOYEN DES OXYDES DE TERRES RARES EN \$ US PAR TONNE (ECHELLE DE DROITE), TIREE DE HTTPS://WWW.ECONOMIE.GOUV.FR/	12
FIGURE 1.7: LES RESERVES MONDIALES DES TERRES RARES EN 2013 (USGS, 2013).....	12
FIGURE 3.1: COURBES DE CROISSANCE DE <i>C. FUSCA</i> EXPOSEE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DU LANTHANE	24
FIGURE 3.2: COURBES DE CROISSANCE DE <i>C. FUSCA</i> EXPOSEE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DU LANTHANE EN PRESENCE DE 1 MG C/L	25
FIGURE 3.3: COURBES DE CROISSANCE DE <i>C. FUSCA</i> EXPOSEE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DU LANTHANE EN PRESENCE DE 2 MG C/L	26
FIGURE 3.4: COURBES DE CROISSANCE DE <i>C. FUSCA</i> EXPOSEE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DU LANTHANE EN PRESENCE DE 3 MG C/L	26
FIGURE 3.5: VARIATION DE LA QUANTITE INTERNALISEE DE LANTHANE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION TOTALE MESUREE.	28
FIGURE 3.6: VARIATION DE LA QUANTITE INTERNALISEE DE LANTHANE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE L'ION LIBRE ESTIMEE	28
FIGURE 3.1: GROWTH CURVES OF <i>C. FUSCA</i> EXPOSED TO DIFFERENT CONCENTRATIONS OF LA. (A): IN ABSENCE OF NOM, (B): IN PRESENCE OF 1 MG C/L, (C); IN PRESENCE OF 2 MG C/L, (D): IN PRESENCE OF 3 MG C/L	58
FIGURE 3.2: VARIATION OF CELL CONCENTRATIONS AS A FUNCTION OF MEASURED LA.(A): IN ABSENCE OF NOM, (B) : IN PRESENCE OF 1 MG C/L OF NOM, (C): IN PRESENCE OF 2 MG C/L, (D): IN PRESENCE OF 3 MG C/L.	60
FIGURE 3.3: VARIATION OF CELL CONCENTRATION AS A FUNCTION OF La^{3+} (A): IN ABSENCE OF NOM, (B) : IN PRESENCE OF 1 MG C/L OF NOM, (C): IN PRESENCE OF 2 MG C/L, (D): IN PRESENCE OF 3 MG C/L.	61

FIGURE 3.4: CELL CONCENTRATION AFTER 120 H AS A FUNCTION OF LANTHANUM INTERNALIZED BY ALGAE IN THE ABSENCE AND PRESENCE OF HUMIC ACID	63
FIGURE 3.5: VARIATION IN THE CONCENTRATION OF INTERNALIZED LA AS A FUNCTION OF MEASURED TOTAL LA CONCENTRATION IN THE EXPOSURE MEDIUM.....	63
FIGURE 3.6: VARIATION IN THE CONCENTRATION OF INTERNALIZED LA AS A FUNCTION OF FREE ION La^{3+} CONCENTRATION IN THE EXPOSURE MEDIUM.....	64

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE

1 INTRODUCTION

1.1 Les métaux en milieux aquatiques

Suite à une contamination à grande échelle de l'environnement par des pesticides organochlorés et la mise en évidence de leurs effets insidieux sur des espèces non ciblées, l'écotoxicologie a émergé comme domaine scientifique au cours des années 1970 (Carson, 2002). Ainsi, l'écotoxicologie se définit comme la science qui cherche à prédire les impacts des apports en substances potentiellement toxiques sur l'écosystème (Pelletier & Campbell, 2008). Parmi les substances toxiques qui sont de plus en plus étudiées, on cite les métaux.

Les métaux sont naturellement présents dans la croûte terrestre. Par conséquent, on peut les trouver dans les cours d'eau à cause de l'érosion ou une résuspension. Toutefois, ils peuvent être aussi de source anthropique (exploitation minière, pesticide...). Ils existent surtout sous formes hydrophiles et hydratées en milieu aquatique (Pelletier & Campbell, 2008). Plusieurs études ont démontré clairement que les activités anthropiques ont perturbé les cycles géochimiques de plusieurs métaux, dont Ag, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb et Zn (Olendrzyński *et al.*, 1996, Richardson *et al.*, 2003). Par ailleurs, une contamination par le gadolinium (Gd) d'origine anthropique a été observée aussi dans certaines eaux de rivières (Zhu *et al.*, 2004, Verplanck *et al.*, 2005). Ces concentrations relativement élevées sont attribuées aux chélates de Gd utilisés comme agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) à usage médical (Bünzli & Choppin, 1989). Le Gd est un métal qui fait partie de la famille des lanthanides ou ce qu'on appelle les terres rares. Ces derniers sont de plus en plus utilisés par différentes industries tels que celles des éoliennes, des voitures hybrides et des films photovoltaïques (Bauer *et al.*, 2011). Différentes normes dans différents pays ont été mises en place dans le but de contrôler ces activités et de limiter la contamination environnementale par les métaux.

Les éléments métalliques tels que les lanthanides sont infiniment persistants. Un métal peut être sous différentes formes en milieux aquatiques d'où le terme de spéciation qui représente la distribution de cet élément sous différentes formes chimiques. En effet, un métal en milieu aquatique peut être sous sa forme d'ion libre M^{2+} , peut former des hydroxocomplexes, des complexes inorganiques ($M-X$; $X = Cl^-$, F^- , SO_4^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, HCO_3^- , CO_3^{2-}), des complexes organiques ($M-L$; $L =$ acides aminés, acides polycarboxyliques) et peut se complexer aussi avec les substances humiques (acides fulviques et acides humiques) qui sont présentes dans les milieux aquatiques. La formation des différentes espèces métalliques implique souvent des réactions de complexation (formation ou bris de liaisons coordonnées faibles) ou des réactions d'oxydation/réduction. Ces réactions sont normalement réversibles, ce qui veut dire que la spéciation d'un métal est largement déterminée par la chimie du milieu dans lequel il se trouve (Pelletier & Campbell, 2008).

L'existence des différentes espèces métalliques en milieux aquatiques joue un rôle sur l'effet toxique des métaux sur les organismes aquatiques. En effet, l'évaluation des risques écologiques engendrés par les métaux et métalloïdes ne s'intéresse pas uniquement à leur caractère persistant, bioaccumulable et toxique, mais également à leur solubilité, leur toxicité, leur occurrence naturelle, leur essentialité, et enfin à leur spéciation et à leur biodisponibilité (Chapman, 2008). C'est pour cette raison que plusieurs études sont faites de nos jours sur la toxicité des métaux vis-à-vis des organismes aquatiques tout en considérant leurs spéciations et leurs biodisponibilités, et ceci dans le but de mieux caractériser leur effet sur la flore et la faune aquatique.

Afin de prédire ces effets sur ces derniers, il faut d'abord déterminer comment les métaux interagissent avec ces organismes (Campbell, 1995, Campbell & Couillard, 2004). Plusieurs modèles théoriques ont été élaborés afin de mieux comprendre la toxicité des métaux vis-à-vis des organismes aquatiques. Le GSIM « *Gill Site Interaction Model* » (Pagenkopf, 1983) est un modèle qui permet d'estimer les interactions de surface au niveau des branchies de poissons. Il prend en considération l'effet du pH et de l'alcalinité sur la spéciation d'un métal, par exemple sa complexation par des anions majeurs. En revanche, ce modèle ne prend pas en compte les interactions avec la matière organique.

Un autre modèle appelé « Free-Ion Activity Model - FIAM » ou le modèle de l'ion libre repose sur l'hypothèse que la toxicité d'un métal est essentiellement liée à sa concentration sous la forme d'ion libre en solution. Ce modèle focalise principalement sur les interactions entre les cations métalliques et les sites d'action sur la membrane biologique des algues. Ce modèle considère les interactions potentielles avec la matière organique dissoute (MOD) (Niyogi & Wood, 2004).

Un modèle a intégré toutes ces informations issues des deux modèles précédemment cités, soit le « *Biotic Ligand Model* (BLM) » ou « Modèle du ligand biotique ». Ce modèle tient compte aussi la compétition entre le métal libre et les cations majeurs (Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} et H^+) dans le milieu. L'ensemble des mécanismes considérés par ce modèle est présenté à la figure 1.1 en prenant comme exemple l'ion métallique de cuivre.

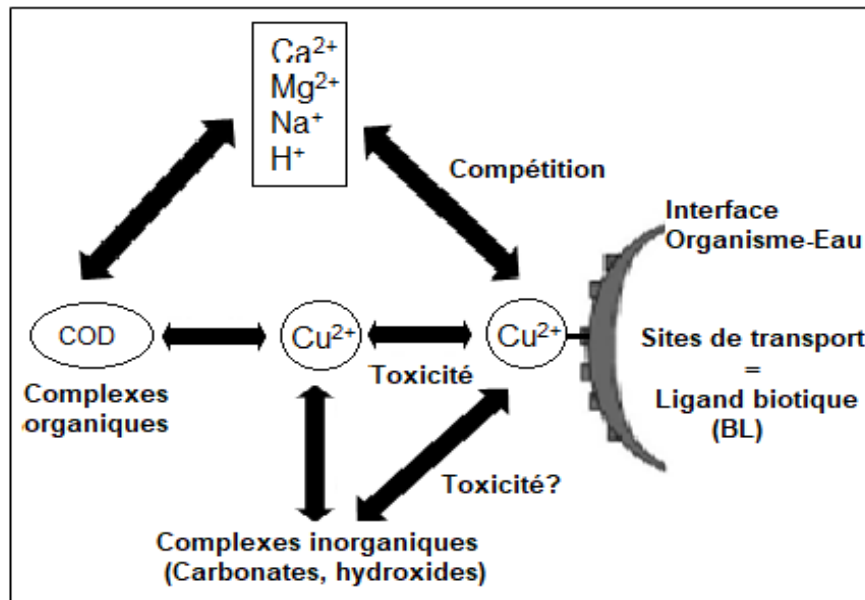


Figure 1.1: Schéma présentant les réactions prises en compte dans le modèle du ligand biotique. Adapté de (Janssen et al., 2003).

La prise en charge des métaux se fait selon trois voies, telles qu'illustrées à la figure 2.2 : i) par transport passif par simple diffusion d'un complexe métallique neutre (ML_n^0) et lipophile ; (ii) par transport facilité d'un cation (M^{z+}), impliquant soit un

transporteur transmembranaire protéique, soit un canal transmembranaire ; et (iii) par transport facilité d'un complexe métallique anionique (MZ^-), impliquant un transporteur d'anions relativement peu sélectif (transport « accidentel » de l'anion et du métal qui y est associé). Normalement, c'est la voie (ii) qui prédomine, et dans de tels cas, c'est le modèle BLM qui s'applique (Pelletier & Campbell, 2008).

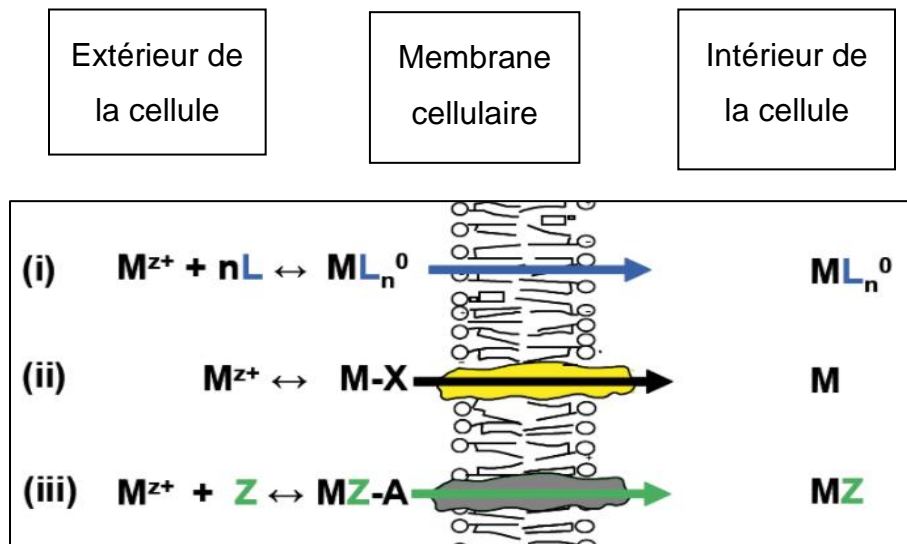


Figure 1.2: Représentation de trois mécanismes possibles de prise en charge de métaux par des organismes aquatiques (Pelletier & Campbell, 2008).

Selon le modèle BLM (Paquin *et al.*, 2002), le métal se lie à la membrane cellulaire grâce à des sites de liaison dits « X-membranes » ou encore appelés « ligands biotiques ». Si un équilibre s'établit rapidement entre le métal en solution et les surfaces biologiques, la réponse biologique sera en fonction du nombre de sites « sensibles » occupés par le métal.

Afin de prévoir la toxicité d'un métal vis-à-vis des organismes aquatiques il est essentiel de prendre en considération les paramètres qui peuvent modifier la spéciation d'un métal et donc sa biodisponibilité, tel que :

- Le pH : le proton H^+ entre en compétition avec l'ion métallique M^{z+}
- La dureté : compétition entre Ca^{2+} ou Mg^{2+} et M^{z+} pour les sites actifs de la membrane cellulaire.

- La concentration en MON qui est capable de complexer l'ion M^{2+} , incluant les terres rares (Pourret *et al.*, 2007), grâce à ses groupements fonctionnels (ex. sites carboxyliques).

La MON joue donc un grand rôle dans la mobilité et la biodisponibilité des éléments traces (Citeau, 2004).

Des modèles ont été élaborés dans le but de modéliser cette complexation et décrire au mieux la spéciation des métaux, tel que le modèle développé par Tipping, le « *Windermere Humic Aqueous Model* » WHAM (Model VII). Il permet de simuler les équilibres chimiques en présence de matière organique naturelle dans l'eau, les sédiments et les sols (Tipping, 1994). Ce modèle simule les interactions de la matière organique et le métal tout en combinant les interactions chimiques et électrostatiques. Une base de données émanant du Model VI a également été formalisée (Tipping, 1998).

Comme mentionné plus haut, l'intérêt pour les lanthanides a augmenté avec l'émergence des énergies renouvelables (Bauer *et al.*, 2011). Ces entreprises doivent atténuer les impacts environnementaux et il est essentiel de pouvoir évaluer les risques toxicologiques des terres rares. Au cours de ce projet, nous nous sommes intéressés à un lanthanide afin de mieux comprendre son comportement en milieu naturel et évaluer sa toxicité pour le biote aquatique.

1.2 Les terres rares (TR)

3.1.1 Caractéristiques

Les lanthanides, aussi connus sous le nom des terres rares (TR) sont des éléments chimiques naturellement présents dans la croûte terrestre à des concentrations variées (Tchounwou *et al.*, 2012). On les retrouve à la sixième période et à la troisième colonne de la table de Mendeleïev (Figure 1.3). Ils contiennent 17 éléments comprenant le scandium (Sc), l'yttrium (Y) et les éléments de la série des lanthanides (Ln), soit 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 (Tm), l'ytterbium (Yb) et le lutécium (Lu). Les lanthanides sont classés en deux sous-groupes : les terres rares légères (*Light Rare Earth Elements*, LREEs) qui incluent les éléments allant du lanthane au gadolinium et les terres rares lourdes (*Heavy Rare Earth Elements*, HREEs) qui comprennent les éléments allant du terbium au lutécium.

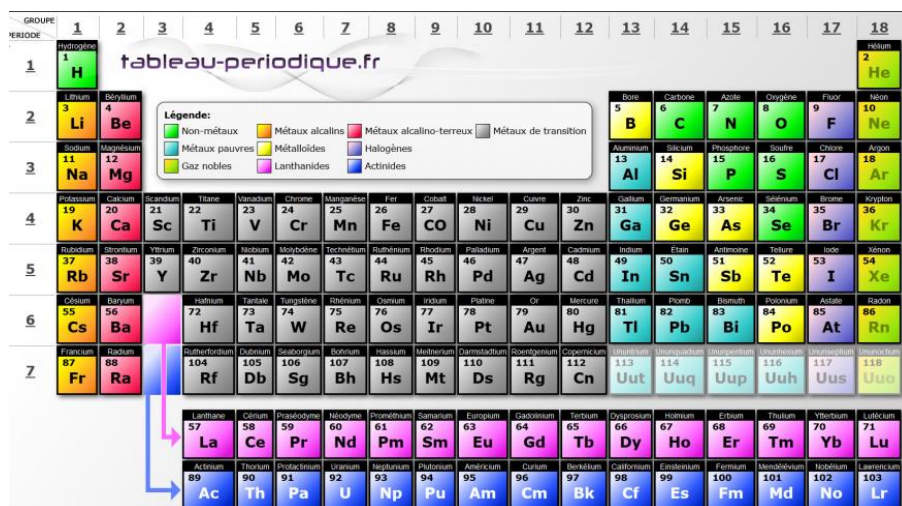


Figure 1.3: Tableau périodique montrant la position des terres rares, tirée de <http://tableau-periodique.fr>

La structure électronique particulière des lanthanides leur procure des propriétés chimiques très similaires, ce qui les rend difficiles à séparer. Cette similarité est causée par l'ajout d'électron sur la couche électronique interne 4f lorsque le numéro atomique augmente plutôt que sur les couches électroniques externes. Les orbitales 4f ne participent alors pas aux liaisons chimiques, car elles sont blindées par les orbitales 5s et 5p (Schijf, 1992, Cotton, 2006). Leurs propriétés physiques sont utilisées principalement dans les produits industriels et de nouvelles technologies vertes (Dam et al., 2007). Les lanthanides se retrouvent généralement sous l'état d'oxydation 3+, mais il est possible de les retrouver sous l'état d'oxydation 2+ (Sm, Eu, Tm, Yb) et 4+ (Ce, Pr, Tb) (Habashi, 1997).

Les terres rares, malgré leur appellation, ne sont pas du tout rares et ont une abondance comparable à celle d'autres métaux dans la croûte terrestre. Le cérium, par exemple, est plus abondant que le cuivre dans la croûte terrestre (environ 62 µg/g) (Castor & Hedrick, 2006). Le néodyme (env. 33 µg/g) et le lanthane (environ 32 µg/g),

sont plus abondants que le cobalt et le nickel. Les autres terres rares sont beaucoup moins présentes, particulièrement le thulium et l'euporium (0,5 µg/g).

3.1.2 Utilisations

Les TR sont de plus en plus utilisées dans les domaines de la haute technologie (électronique, optique, automobile ...), en agriculture (engrais et pesticides) et en médecine (imagerie par résonance magnétique, médicaments) grâce à leurs propriétés chimiques, optiques, magnétiques, etc. La Figure 1.4 résume les différentes utilisations des différents éléments des terres rares.

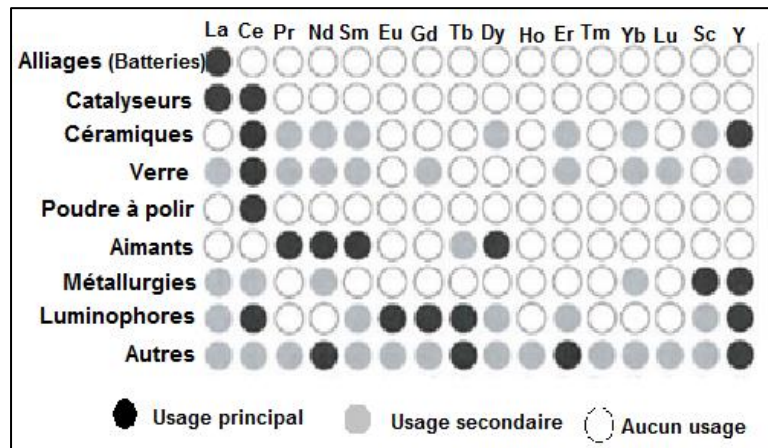


Figure 1.4: Résumé des principaux usages des terres rares. Adapté de (Zepf, 2013)

Les lanthanides sont utilisés dans les télévisions dans lesquelles l'image est reproduite grâce à l'excitation cathodique sélective de trois luminophores (bleu, vert et rouge) à base de lanthanides déposés sur la face interne de l'écran. De nombreuses TR ont des propriétés de luminescence intéressantes. Tous les ions lanthanides, sauf La(III) et Lu(III) de configurations électroniques $4f_0$ et $4f_{14}$ respectivement, sont luminescents (Bünzli & Piguet, 2005) Un domaine privilégié de la luminescence des TR est celui de la radiographie médicale. En effet, l'image radiologique est transformée en image optique par un écran renforçateur utilisant la capacité d'un luminophore à transformer le rayonnement X en lumière visible, lumière à laquelle les émulsions photographiques sont bien plus sensibles qu'aux rayons X. Cela conduit de nos jours au développement de l'imagerie médicale.

Dans le même domaine, le Gd(III) est utilisé comme agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique grâce à sa propriété paramagnétique issue de la présence d'au moins un électron non apparié dans leurs orbitales 4f. L'utilisation de substances paramagnétiques est également nécessaire dans le but d'augmenter et de contrôler la relaxation nucléaire dans les techniques de résonance magnétique nucléaire pour l'imagerie et le diagnostic médical (Caravan *et al.*, 1999).

En ce qui concerne l'industrie automobile, les lanthanides sont de plus en plus utilisés dans les voitures électriques et hybrides (Figure 1.5). Ils peuvent contenir deux fois la quantité trouvée dans les voitures à essence.

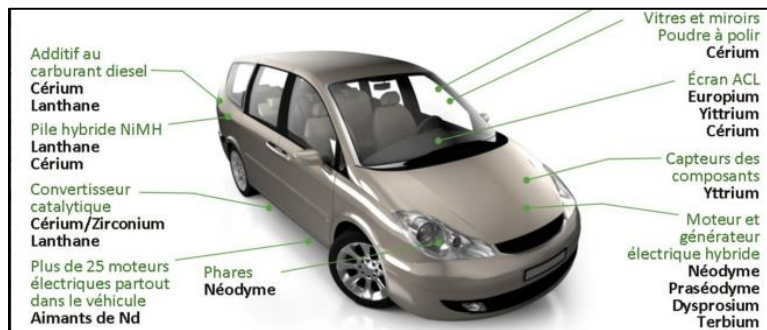


Figure 1.5: Illustrations des différentes utilisations des terres rares dans une voiture électrique ou hybride (Mail, 2011)

La mise au point de catalyseurs à base de terres rares pour le craquage du pétrole a augmenté de façon considérable la demande pour ces éléments. La catalyse du craquage des pétroles a consommé 14 750 t d'oxyde de terres rares en 2012, soit 13 % des usages globaux des terres rares à l'échelle mondiale. Elle est la principale filière d'utilisation du lanthane (44 %). Cette étape de catalyse consiste à scinder les fractions lourdes des hydrocarbures en produits plus légers, utilisables comme carburant (diesel, kérosène). La zéolithe est le catalyseur utilisé (alumino-silicate hydraté, naturel ou de synthèse), activé et stabilisé grâce au lanthane. Ce métal permet d'augmenter les rendements de la réaction de 10 %. Pour traiter la zéolithe il existe un mélange utilisé et qui est très enrichi en Lanthane (80 La_2O_3 , 10% CeO_2 et 5% de NdO_3) (Bru *et al.*, 2015).

En agriculture, les TR ont été utilisées pour enrichir les engrais afin de stimuler la croissance des plantes (Brioschi, 2012). Par exemple, une étude faite sur certaines plantes comme le maïs (*Zea mays*) et le cocotier (*Cocos nucifera*) a montré que pour des faibles concentrations d'une solution de lanthane (1 $\mu\text{mol/L}$) sur le sol, on observe un taux de croissance relativement élevé suite à l'exposition des plantes (Wahid *et al.*, 2000, Liu & Hasenstein, 2005). Il se trouve qu'à des faibles concentrations les TR stimulent l'absorption de certains éléments cationiques (cuivre, fer, magnésium, potassium et manganèse) tandis que les fortes concentrations diminuent leur absorption (Xie *et al.*, 2002). Les agriculteurs chinois utilisent de plus en plus les TR, comme le lanthane, dans les engrais pour leurs cultures. Une autre utilisation possible du lanthane est pour la précipitation du phosphore qui peut causer une prolifération algale importante (Haghseresht *et al.*, 2009).

3.1.3 Production mondiale

Les TR sont extraites à partir de trois principaux minerais. Ce sont la bastnaésite, la monazite et le xénotime (Brown *et al.*, 2017). Ils sont devenus disponibles commercialement que dans les années 1940 (Castor & Hedrick, 2006). Entre 1965 et 1985, les États-Unis étaient les plus importants producteurs mondiaux des terres rares, grâce à l'exploitation de la mine de Mountain Pass, située dans le comté de San Bernardino, en Californie. L'exploitation minière s'est toutefois arrêtée en 2002 à cause des bas prix qu'offrait la Chine. Depuis ce temps, la Chine détient le quasi-monopole de la production des terres rares et retient en Chine 80 % de la production mondiale de ces derniers (Castor & Hedrick, 2006). La Figure 1.6 donne un aperçu de la production mondiale des TR entre 1990 et 2010.

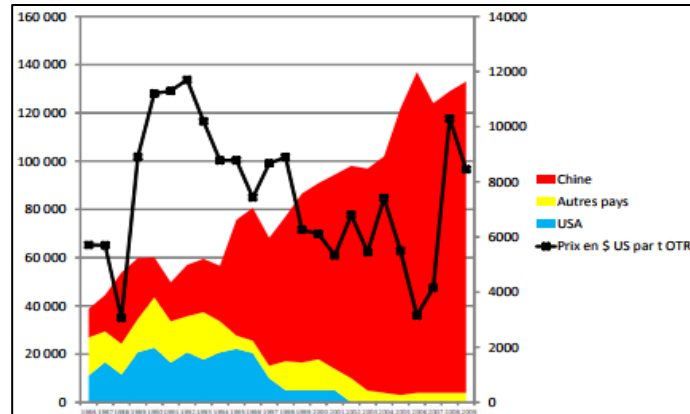


Figure 1.6 : Évolution de la production mondiale d'oxydes de terres rares (en tonnes, échelle de gauche) et du prix annuel moyen des oxydes de terres rares en \$ US par tonne (échelle de droite), tirée de <https://www.economie.gouv.fr/>

Les statistiques chinoises relatives aux ressources, aux réserves et à la production existent, mais sont maintenant considérées comme confidentielles par le gouvernement chinois (Tse, 2011). Il est important de souligner que si la Chine produit plus de 95 % des terres rares mondiales, ses réserves représentent 38% des réserves mondiales (147 millions de tonnes) (Figure 1.7).

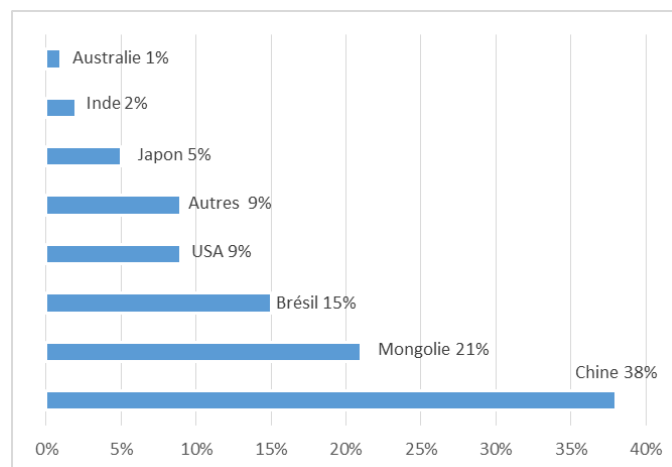


Figure 1.7: Les réserves mondiales des terres rares en 2013 (USGS, 2013)

Actuellement, l'utilisation des terres rares est de plus en plus importante et la croissance démographique, de même que l'émergence des pays en voie de développement, sont des facteurs qui accentuent leur demande. Le Canada est l'un des pays qui disposent de réserves importantes en TR (Schüler *et al.*, 2011). Les

principales minéralisations en TR au Québec se trouvent notamment dans les secteurs du lac Brisson (Strange Lake), du lac Misery au Nunavik et de Kipawa au Témiscamingue. De nombreux travaux d'exploration sont en cours en Amérique du Nord, dont ceux de la rivière Kwyjibo, du lac Strange et de la fosse du Labrador (projet Eldor) au Québec (Nguimgou Signing, 2017). Auparavant, le Québec n'a jamais exploité ses richesses en ces éléments et ceci représente une opportunité importante pour la société québécoise (MERN, 2016)

3.1.4 Contamination environnementale

C'est au cours des étapes d'extraction et d'affinage que les terres rares sont libérées dans le milieu aquatique ou dans l'atmosphère. L'emploi d'engrais contenant les TR peut également provoquer leur accumulation dans les sols agricoles. En revanche, dans le cas de l'utilisation de catalyseurs à base de TR, leurs émissions proviennent principalement des effluents industriels. Par exemple, une contamination récente du Rhin à Worms par le lanthane et le samarium a été découverte proche d'une fabrique de catalyseurs destinés aux raffineries de pétrole (Kulaksiz & Bau, 2013). Cette contamination a pu être suivie dans le Rhin moyen et inférieur jusqu'en Hollande.

Les sédiments représentent un puits de stockage des terres rares. Aux Pays-Bas, une étude indique l'existence des dépôts d'éléments de terres rares associés aux engrais phosphatés et aux rejets des industries. Ceci a entraîné la contamination des sédiments de l'estuaire du Rhin avec 170 mg/kg de cérium, 80 mg/kg de néodyme, et 20 mg/kg samarium (Sneller *et al.*, 2000). En 1998, tout au long de l'estuaire du Rhin moyen les concentrations en TR dans les sédiments ont été mesurées et variaient entre 6,3 et 93 mg/kg (Tijink & Yland, 1998). D'autre part, une analyse de l'eau de surface du port de Rotterdam aux Pays-Bas a révélé que des concentrations dissoutes de lanthanides se situaient entre 0,5 nM pour le dysprosium et 12 nM pour le cérium (Zhu *et al.*, 1998). Par ailleurs, à proximité de la ville de Prague en République Tchèque, l'analyse des cours d'eau effectuée dans cette région a révélé des concentrations dissoutes de 1 à 500 pM de lanthanides (Möller *et al.*, 2002). Dans le lac Ontario, le lac

Érié et la rivière Niagara, les concentrations dissoutes en lanthanides variaient entre 1 et 1 000 pM (Bau *et al.*, 2006)

Des études ont été faites dans des eaux salées afin de mesurer les concentrations des lanthanides. Dans la mer Méditerranée, des concentrations dissoutes en terres rares ont été mesurées et atteignaient environ 10 pmol/kg d'eau (Bau *et al.*, 1997), alors que dans l'océan Pacifique, les concentrations variaient de 0,1 à 36 pmol/kg dépendamment de la profondeur de l'échantillonnage. Plus la profondeur est importante plus la concentration des lanthanides mesurée augmente (Wang & Yamada, 2007). En Australie, des mesures dans l'estuaire du fleuve Elimbah ont relevé des concentrations dissoutes en lanthanides qui variaient entre 0,01 et 1,7 nmol/kg (Lawrence & Kamber, 2006). En 1998, des concentrations dissoutes en lanthane entre 0,02 et 0,2 µg/L dans les eaux de surface tout au long de l'estuaire du Rhin moyen ont été mesurées (Tijink & Yland, 1998).

Les concentrations moyennes en cérium et en lanthane dans la croûte terrestre sont respectivement de 66 et 35 µg/g de poids sec (Greenwood, 1984). Une étude a été faite sur des sols en Chine afin de mesurer les concentrations moyennes de cérium et de lanthane. Les valeurs trouvées pour ces deux métaux sont respectivement de 86 et 44 µg/g de poids sec (Tyler & Olsson, 2002). Encore en Chine, dans la ville de Baotou, à proximité d'un barrage de résidus miniers solides, une étude a démontré que la concentration de terres rares totales dans le sol pouvait atteindre des valeurs de 28 mg/g de poids sec (Jinxia *et al.*, 2010). Les mines à proximité de Baotou produisent environ dix millions de tonnes d'eaux usées chaque année. Aussi une contamination en terres rares sur de longues distances à partir de la mine de Bayan Obo a été constatée (Kynicky *et al.*, 2012). En plus des contaminations environnementales qu'entraînent les TR, il y a aussi le problème des éléments radioactifs comme le thorium et l'uranium liés à l'extraction et au raffinement des TR (Kynicky *et al.*, 2012).

3.1.5 Toxicité des lanthanides chez les organismes aquatiques

Les connaissances actuelles sous-estiment très probablement le potentiel toxique des terres rares (Gonzalez *et al.*, 2014). Pas ou peu de données existent sur le comportement de mobilité de ces éléments dans l'environnement, et leur toxicité sur les

organismes vivants est encore mal connue (Paul & Campbell, 2011). Parmi les organismes vivants, les organismes aquatiques sont les plus étudiés afin d'établir des tendances claires et universelles de l'écotoxicité des terres rares. La contamination des milieux aquatiques par les TR entraîne leur bioaccumulation au sein de la chaîne trophique.

Les paramètres utilisés pour évaluer la toxicité aiguë (à court terme) et chronique (à long terme) sont principalement la concentration effective ou concentration létale (CE_{50} et CL_{50} , respectivement) (Rodier *et al.*, 2009). Dans les laboratoires de l'INRS, l'équipe de recherche du Prof. Fortin a mené une étude sur la toxicité de deux lanthanides (lanthane et cérium) chez l'algue verte *Chlorella fusca* (Beaubien, 2015). Dans cette étude, les algues ont été cultivées en présence de phosphates. Toutefois, afin d'éviter la précipitation des lanthanides avec le phosphate, les expositions pour évaluer la toxicité des lanthanides ont été réalisées sans phosphate. Ces expériences ont été faites en présence et en absence d'acide malique afin de mieux comprendre le comportement de ces deux métaux sous ces deux conditions. Beaubien avait remarqué qu'à des faibles concentrations de lanthane ou de cérium il y a un effet stimulateur de la croissance algale qui parfois était supérieure à celle des témoins. Cet effet a été observé pour beaucoup de TR et sur différentes espèces (d'Aquino *et al.*, 2009). La toxicité du cérium est similaire à celle du lanthane pour l'algue verte *C. fusca*. En effet, les CE_{50} obtenues après 120 h en présence de malate étaient de 260 ± 30 nM pour le La^{3+} et de 270 ± 60 nM pour le Ce^{3+} ; ces valeurs ont été exprimées en fonction des concentrations de l'ion libre. En absence de ligands, les CE_{50} obtenues étaient de 430 ± 60 nM La^{3+} et 170 ± 60 nM Ce^{3+} (Beaubien, 2015). Chez l'algue *Chorella kessleri*, après 96 h d'exposition, l'inhibition de la croissance par le lanthane a été évaluée par Fujiwara *et al.* (2008). Ils ont déterminé une CE_{50} de 313 μ M à partir des concentrations nominales alors que celle calculée en fonction de la concentration d'ion libre était de 59 μ M. Ils ont noté une agrégation et une précipitation des algues avant l'apparition d'effets toxiques. Stauber et Binet (2000) ont rapporté des CE_{50} de 3,3 μ M La suite à une exposition de 72 h de l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*. Toutefois, les auteurs précisent que la toxicité observée est probablement causée par la précipitation des phosphates en solution.

Les algues ne sont pas les seuls organismes aquatiques sur lesquels des essais de toxicité des lanthanides ont été menés. Certaines études se sont intéressées aux daphnies. Une étude faite sur l'espèce *Ceriodaphnia dubia*, suite à des expositions au lanthane pendant 48 h, a permis d'obtenir une CE₅₀ de 36 µM (Stauber & Binet, 2000). Cependant, les auteurs ont noté que les résultats sont entachés d'incertitude en raison de la précipitation du lanthane en solution lorsque la concentration excédait ~7 µM.

Les bactéries ont aussi été des organismes cibles afin de caractériser la toxicité des lanthanides en milieux aquatiques. Des expériences de toxicité avec le lanthane sur la bactérie *Vibrio fisheri* ont été effectuées. Une valeur de CE₅₀ de 322 µM calculée en fonction de la concentration libre de La³⁺ a été rapportée (McCloskey *et al.*, 1996). Une autre étude avec la même espèce, mais en présence de lutécium, a permis d'obtenir des CE₅₀ (calculées à base de l'ion libre) de 0,5 à 2 µM (Weltje *et al.*, 2004).

Finalement, la lentille d'eau *Lemna minor* L. a été exposée au lanthane (Weltje *et al.*, 2002). À des concentrations nominales totales de 10 nM aucune toxicité n'a été observée. Notons que le milieu utilisé contenait de l'EDTA et que 99,9 % du lanthane était complexé d'après les calculs thermodynamiques effectués.

1.3 Problématique

Malgré le nombre d'études faites afin d'évaluer la toxicité des métaux, la littérature offre peu d'informations pour les effets à court et à long terme que pourraient engendrer les lanthanides sur la flore et la faune aquatiques. Il est donc essentiel d'évaluer les risques toxicologiques de ces lanthanides sur le biote aquatique. Il a été montré pour plusieurs cations divalents (Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺), que l'ion libre joue un rôle clé comme étant un prédicteur de la biodisponibilité et la toxicité des métaux (Campbell & Fortin, 2013).

Le rôle de la MON est important pour comprendre et prédire le comportement d'un contaminant tel qu'un métal dans un milieu donné (Lamelas *et al.*, 2005). Pourtant peu d'études sont disponibles sur l'influence de la MON sur la toxicité et la prise en charge des métaux. Celles-ci suggèrent que la complexation des métaux par la MON contribue à réduire leur biodisponibilité (Vigneault & Campbell, 2005).

Comme mentionné précédemment, ce ligand peut complexer les lanthanides, ce qui devrait réduire leur biodisponibilité et avoir un effet sur leur internalisation et par conséquent leur toxicité pour les algues. Peu d'études ont été faites sur le rôle que peut jouer la matière organique naturelle sur la biodisponibilité des lanthanides, d'où l'intérêt de ce projet de maîtrise.

1.4 Objectifs de la recherche

L'utilisation croissante des lanthanides nous permet d'anticiper une augmentation de la concentration environnementale de ces métaux. Cette tendance pose la problématique des risques potentiels que peuvent représenter ces métaux. Ce mémoire s'inscrit dans un projet appuyé et financé par Environnement et Changement climatique Canada, qui s'intéresse à la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité de métaux pour lesquels peu de données sont disponibles. Il représente une suite des travaux de Cédric Beaubien (2015) et de Bienvenu Nguimgou Signing (2017) sur le cérium et le lanthane lors de leurs maîtrises. Ils ont étudié la toxicité et l'applicabilité du modèle de l'ion libre (BLM) pour prédire la toxicité du lanthane et du cérium chez l'algue verte unicellulaire *Chlorella fusca*. Cependant, ceci a été fait en absence du ligand naturel qui est la MON. Dans la présente étude, nous avons tenu compte de l'ajout de la MON dans les milieux d'exposition afin d'évaluer l'effet de cet ajout. Le lanthane a été sélectionné pour cette étude, car il fait partie des lanthanides qu'on retrouve en plus grande concentration dans les milieux environnementaux. De plus, le lanthane est l'un des lanthanides pour lesquels on trouve le plus d'études (Gonzalez *et al.*, 2014). Aussi, on dispose d'un plus grand nombre de données thermodynamiques pour le lanthane, ce qui permet de calculer la spéciation chimique avec un meilleur degré de confiance.

Les objectifs de recherche de ce projet étaient :

- Caractériser la complexation du lanthane en présence de la MON (SRHA : *Suwannee River humic acid*) dans un milieu synthétique en absence de phosphore à pH 5,0.

- Évaluer la toxicité du lanthane sur l'algue verte *Chlorella fusca* dans ces conditions et caractériser l'effet de la présence de la MON sur la biodisponibilité et la toxicité du La.

Nous posons l'hypothèse que la toxicité du lanthane diminuera en présence de matière organique dans le milieu en raison de la complexation du métal par ce ligand et qu'il sera donc moins disponible et moins toxique pour *Chlorella fusca*. Les résultats obtenus au cours de cette étude permettront une meilleure compréhension du comportement du lanthane en milieux aquatiques et une vérification de l'applicabilité du BLM dans nos conditions.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Organisme sélectionné

L'algue verte unicellulaire *Chlorella fusca* a été sélectionnée comme matériel biologique pour nos essais de toxicité. Elle a été isolée pour la première fois en 1923 d'un tronc d'arbre à Philadelphie par le Dr Emerson (Krauss & Shihira, 1965). Les cellules de la *C. fusca* sont globulaires ou ellipsoïdales avec un diamètre qui varie entre 3 et 9 µm. Le choix de cette espèce a été fait en se basant sur le fait qu'elle est capable d'accumuler et de stocker le phosphore du milieu de culture, ce qui lui permet de se développer dans un milieu inorganique sans phosphore sur une période d'environ 5 jours, en présence ou en absence de MON. Une autre propriété de cette algue c'est qu'elle est tolérante à un milieu relativement acide (Parent, 1991). La souche utilisée dans la présente étude a été obtenue du *Canadian Phycological Culture Centre* (CPCC) à l'Université de Waterloo. Les cellules provenaient d'une culture en phase liquide. Un volume de 2 mL de la suspension d'algues a été transféré dans 100 mL de milieu de culture *Modified High Salt Medium* (MHSM-1) stérile à température ambiante et à pH 5,0, afin de les acclimater. Pour maintenir la culture algale, un transfert de 2 mL de cette culture était réalisé chaque 2 semaines. Dans l'optique d'éviter toute contamination, ce transfert a été effectué sous une hotte à flux laminaire à proximité d'un bec de Bunsen. La culture était maintenue sur une table d'agitation à l'intérieur d'une chambre de croissance éclairée (Convicon CMP 4030) à 20 °C.

2.2 Milieux de culture et d'exposition

2.2.1 Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour cultiver *Chlorella fusca* est le MHSM-1 à pH 5,0 et une force ionique de 0,02 M. La composition du milieu est représentée en annexe (Tableaux S1 et S2 du « Supporting information » du chapitre 2). La préparation de 1 L du milieu de culture nécessitait 5 mL de la solution Ammonium, 4 mL de la solution

KNO_3 et 250 μL de la solution Phosphate. Le maintien du pH à une valeur de 5,0 a nécessité l'ajout de 100 mL du tampon 2-(N-morpholino) ethanesulfonate (MES ; 10 mM). Ce tampon est habituellement utilisé pour stabiliser le pH à des valeurs entre 5,0 et 6,5. Le volume a été complété avec de l'eau MilliQ puis le milieu était stérilisé à l'autoclave. Après 24 h, 1 mL de la solution AAP était ajouté dans la solution. Le pH était vérifié de nouveau et ajusté au besoin. Finalement, le milieu était conservé à 4 °C au réfrigérateur à l'abri de la lumière. La solution AAP a été stérilisée par filtration sur une membrane en polycarbonate (0,2 μm , Millipore).

2.2.2 Milieu d'exposition au lanthane

Le milieu d'exposition au lanthane préparé (MHSM-2) est similaire au MHSM-1, en éliminant les éléments traces et l'EDTA mais aussi la solution Phosphate afin d'éviter la précipitation du lanthane. Sa composition est détaillée en Annexe (Tableau S2 du «Supporting information » du chapitre 2). À chaque erlenmeyer Nalgene™ de 250 mL en polycarbonate qui contenait 100 mL de la solution du MHSM-2, un volume précis de solution mère de lanthane a été ajouté. Les concentrations retenues étaient de 50 nM, 100 nM, 300 nM, 500 nM, 1000 nM et 5000 nM en absence de matière organique. Pour les expositions en présence d'acide humique SRHA, les concentrations utilisées étaient 1, 2 et 3 mg C/L et le pH était ajusté à 5,0 avec des ajouts d'une solution de NaOH 1 M. La concentration moyenne en substances humiques dans les eaux de surfaces est de 5 mg C/L (Thurman, 1985). Les concentrations choisies sont donc pertinentes d'un point de vue environnemental. Nous avons travaillé à des concentrations plus basses que la valeur moyenne en raison de la forte complexation du lanthane par l'acide humique. En effet, des tests préliminaires réalisés à 5 mg C/L de SRHA ont révélé que >96% du métal était lié à l'acide humique. Lorsque la complexation est élevée, il devient difficile de quantifier par ultrafiltration la concentration de métal qui n'est pas lié à l'acide humique, car celle-ci devient très faible. Nous avons donc opté pour de faibles concentrations d'acide humique.

2.2.3 Solution de rinçage

La solution utilisée pour rincer les algues après leur exposition était composée de 68 μM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et 1 mM d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) afin de récupérer le métal adsorbé à la surface algale. Cette solution était préparée de façon identique au milieu MHSM-2, sans oligo-éléments et à pH à 5,0. La solution de rinçage sans ajout d'EDTA a été utilisée pour laver les algues avant leur inoculation dans les milieux d'exposition.

2.3 Spéciation chimique du lanthane

La spéciation du lanthane en présence de SRHA, dans le milieu d'exposition, à pH 5,0 et à une force ionique de 0,02 M, a été vérifiée expérimentalement par ultrafiltration (cette technique est décrite dans le chapitre 2, section 2.3. Cette force ionique est celle du milieu d'exposition et les algues sont capables d'y croître normalement. En premier lieu, cette technique a été validée par la technique de l'IET (*ion-exchange technique*) à une force ionique de 0,1 M, tout en sachant que l'IET avait été déjà mise au point dans notre laboratoire de recherche auparavant à pH 5,0 et à une force ionique égale à 0,1 M pour le lanthane (Leguay *et al.*, 2016). Ceci nous a permis de prévoir les fractions de lanthane liées à la SRHA et par conséquent d'estimer la concentration de métal libre utilisée. Une estimation de la spéciation a également été faite dans ces conditions par des calculs en utilisant le logiciel WHAM VII (Tipping *et al.*, 2011). Les valeurs calculées par ce logiciel ont été comparées à celles obtenues expérimentalement par ultrafiltration. La technique de dialyse a été sélectionnée au début pour caractériser la spéciation, mais les résultats obtenus étaient non reproductibles, d'où l'usage de l'ultrafiltration. Une description et quelques résultats de la technique de dialyse sont représentés en annexe (A1)

2.4 Tests de toxicité

Une fois la spéciation du lanthane caractérisée, l'algue *Chlorella fusca* a été exposée à différentes concentrations de lanthane en présence et en absence de SRHA

pendant 120 h. Une aliquote de 3 mL était prélevée au début et à la fin de chaque expérience (après filtration) afin de mesurer la concentration de lanthane dans le milieu d'exposition en utilisant la spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES). Les paramètres suivis au cours de l'exposition étaient le pH et la densité cellulaire. Pour se faire, un compteur de particules (*Coulter Counter Multisizer III*) et un pH-mètre ont été utilisés. La récolte des algues s'est faite à la fin de l'expérience d'exposition avec filtration sur deux membranes superposées en polycarbonate de 2,0 µm (Fisher Scientific). Un lavage des algues avec la solution de rinçage a été effectué. Les filtres ont été récupérés dans des tubes de 50 mL en polypropylène, puis digérés afin de déterminer la quantité de lanthane internalisée par les algues par la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). Les étapes de la digestion sont détaillées dans la section 2.4 du Chapitre 2.

L'échantillon de référence *Aquatic Plant (Lemna minor, BCR@670)* a été utilisé pour avoir des concentrations certifiées en lanthane. Cet échantillon, le blanc (contenant la solution de digestion, c'est-à-dire les acides utilisés) et des filtres en polycarbonate ont servi de contrôle. Les concentrations mesurées en lanthane, les densités cellulaires suivies ainsi que la quantité de lanthane internalisée par les algues en absence de SRHA sont présentées en Annexe (Tableau S3 du « Supporting information » du chapitre 2). En présence de SRHA, ces valeurs ainsi que la concentration de l'ion libre dans chaque expérience figurent aussi en Annexe (Tableau S4 du « Supporting information » du chapitre 2).

2.5 Exploitation des données

2.5.1 Calculs des CE₅₀

Les concentrations efficaces moyennes inhibant de 50 % (CE₅₀) le rendement de la culture d'algues après 5 jours ont été calculées par rapport à la densité cellulaire moyenne des cultures témoins. Pour ce faire, le logiciel Sigmaplot 14.0 a été utilisé pour le calcul des paramètres de toxicité et leurs intervalles de confiance à 95 %. Les CE₅₀ ont été calculées en fonction des concentrations mesurées en lanthane pour

chaque expérience et aussi en fonction de la concentration de l'ion libre dans le milieu d'exposition, estimée par ultrafiltration.

2.5.2 Analyses statistiques

Les comparaisons entre les traitements et les sous-traitements des expériences en absence ou en présence de la matière organique dans les milieux d'exposition ont été réalisées par des analyses statistiques. Une analyse de variance à deux voies (ANOVA) avec mesures répétées a été appliquée. Le test de Student a ensuite permis de déterminer quels traitements étaient significativement différents. Le logiciel utilisé pour réaliser ces tests statistiques est MATLAB 8.

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Spéciation du Lanthane

La spéciation du lanthane a été caractérisée par ultrafiltration partielle à pH 5,0 et une force ionique 0,02 M. Cette technique est décrite dans la section 2.3 dans le chapitre 2 et les résultats obtenus sont présentés à la section 3.1 du chapitre 2 également.

En absence d'acide humique, 98,8% du La se trouvait sous sa forme libre. En revanche, en présence de 1 à 3 mg C/L d'acide humique, la proportion de La³⁺ se situait entre 67% et 7% (résultats obtenus en utilisant l'ultrafiltration partielle à une force ionique de 0,02 M). Les fractions du La lié à la MON sont représentées dans le tableau 3.1 du chapitre 2 .

3.2 Toxicité du lanthane chez l'algue *Chlorella fusca*

Les expériences d'exposition de l'algue *Chlorella fusca* ont permis de tracer les courbes de croissance cellulaire en fonction du temps (120 h ; Figure 3.1). Les densités cellulaires diminuaient au fur et à mesure que la concentration de lanthane augmentait dans le milieu d'exposition. Plus la concentration de cette dernière est importante plus

on observe un effet toxique sur la croissance algale. Un test statistique a été réalisé pour vérifier si la croissance cellulaire était significativement différente en fonction des traitements (témoins versus les différentes concentrations d'expositions). Il y a une différence significative ($p < 0,05$) entre le témoin et les échantillons de concentration 1000 nM et de 5000 nM tout au long des 120 h. Il n'y a pas de différence significative entre le témoin et les échantillons de 10 nM, 50 nM, 100 nM, 300 nM et 500 nM à 24 h d'exposition. À 72 h, il y a une différence significative pour toutes les concentrations ≥ 100 nM. Une différence significative est observée après 96 h d'exposition entre le témoin et l'échantillon de concentration 10 nM. Les barres d'erreurs sur la figure représentent l'écart-type sur les mesures. Les densités cellulaires ainsi que les concentrations du La testées au cours de cette expérience sont présentées en annexe (Tableau S4 du « supporting information » du chapitre 2)

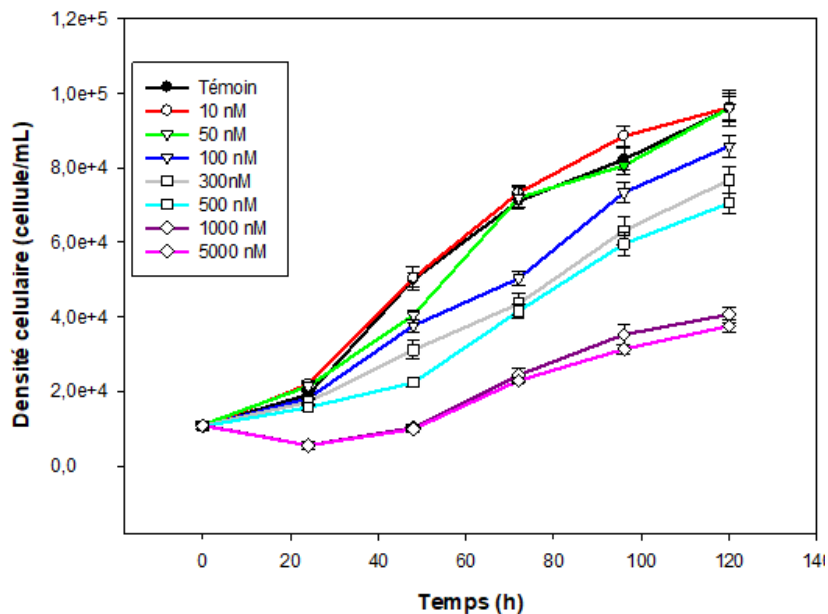


Figure 3.1: Courbes de croissance de *C. fusca* exposée à différentes concentrations du lanthane

3.3 Toxicité du lanthane chez l'algue *Chlorella fusca* en présence d'acide humique

La toxicité du lanthane a été aussi évaluée en présence de la matière organique naturelle, l'acide humique SRHA dans notre cas. Des courbes de croissance en fonction du temps ont été obtenues (Figure 3.2 pour 1 mg C/L, Figure 3.3 pour 2 mg C/L et la Figure 3.4 pour 3 mg C/L) et ont permis de tracer des courbes dose-réponse afin de visualiser cet effet de toxicité (Figures 3.2 et 3.3 du Chapitre 2). Les densités cellulaires mesurées au cours des expositions en présence de SRHA étaient plus faibles que celles en son absence pour une concentration donnée de lanthane. Plus la concentration de SRHA était importante dans le milieu (de 1 à 3 mg C/L), plus la croissance algale était ralentie. La spéciation du lanthane a été vérifiée au début et à la fin de chaque exposition par ultrafiltration, mais la différence était non significative.

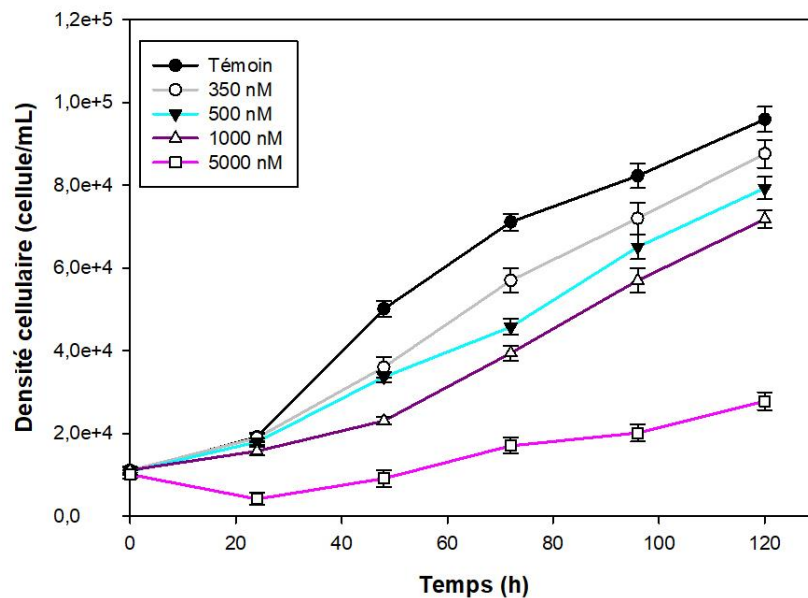


Figure 3.2: Courbes de croissance de *C. fusca* exposée à différentes concentrations du lanthane en présence de 1 mg C/L

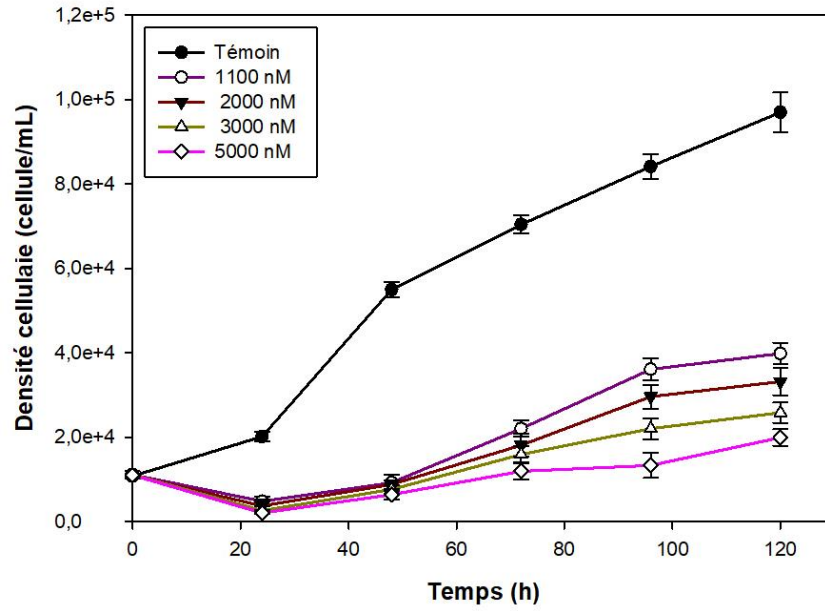


Figure 3.3: Courbes de croissance de *C. fusca* exposée à différentes concentrations du lanthane en présence de 2 mg C/L

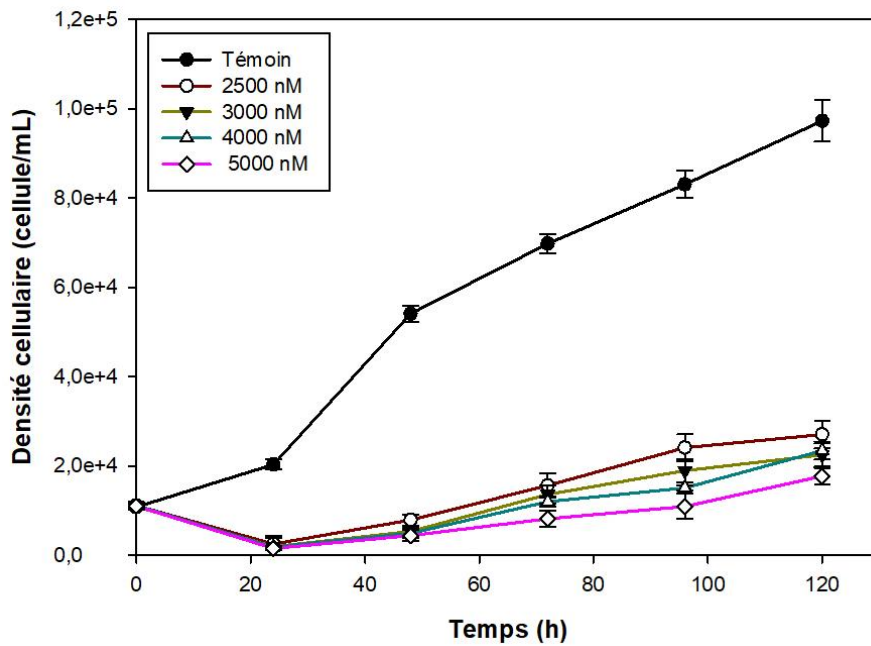


Figure 3.4: Courbes de croissance de *C. fusca* exposée à différentes concentrations du lanthane en présence de 3 mg C/L

Afin de caractériser l'effet de la MON sur la toxicité du lanthane, les CE_{50} ont été calculées pour chaque traitement en présence et en absence de la matière organique. Le Tableau 3.1 résume les différentes valeurs calculées. Nous remarquons que les CE_{50} calculées en fonction de la concentration mesurée de lanthane dans le milieu ($[La_{\text{mesuré}}]$) diminuent lorsque la concentration de la matière organique augmente. Ces valeurs sont plus faibles lorsqu'elles sont calculées en fonction de l'ion libre dans le milieu. Nous déduisons donc que l'augmentation de la concentration de la SRHA dans le milieu d'exposition contribue à l'augmentation de la toxicité du lanthane dans nos conditions.

Tableau 3.1 : Valeurs calculées des CE_{50} de La pour l'algue *Chlorella fusca* après 120 h d'exposition pour des concentrations d'acide humique de 0, 1, 2 et 3 mg C/L.

[SRHA] (mg C/L)	0	1	2	3
CE_{50} (nM)				
$[La_{\text{mesuré}}]$ (nM)	611 ± 150	529 ± 81	364 ± 18	294 ± 47

3.4 Bioaccumulation et internalisation du lanthane en présence d'acide humique

Afin de déterminer l'influence de la MON sur la bioaccumulation du métal, la quantité de lanthane internalisée a été mesurée pour tous les traitements, en absence et en présence de matière organique. La Figure 3.5 illustre la quantité internalisée de lanthane en fonction de la concentration du lanthane mesurée dans le milieu d'exposition, alors que la Figure 3.6 représente la même variation, mais en fonction de l'ion libre en solution.

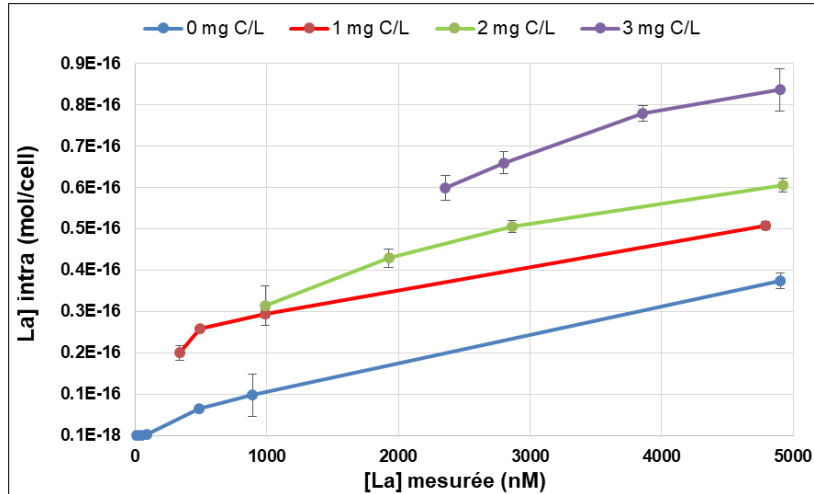


Figure 3.5: Variation de la quantité internalisée de lanthane en fonction de la concentration totale mesurée.

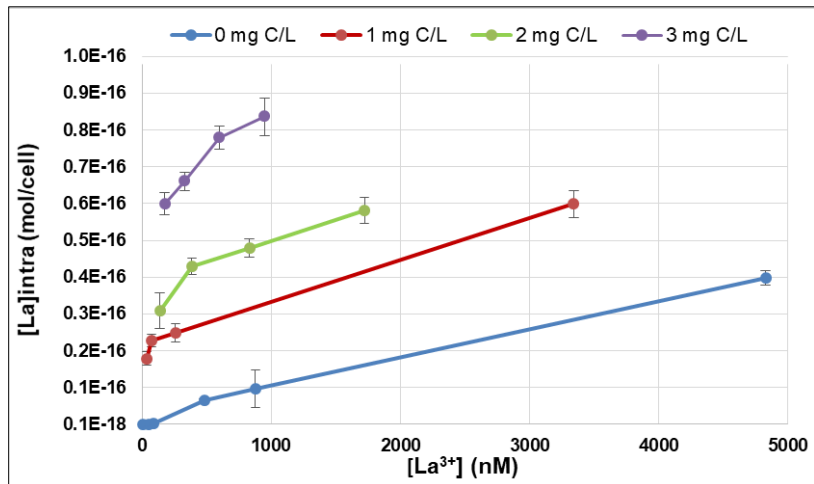


Figure 3.6: Variation de la quantité internalisée de lanthane en fonction de la concentration de l'ion libre estimée

Nous remarquons que plus la concentration d'exposition de lanthane augmente dans le milieu plus la quantité internalisée est importante. Cet effet est accentué en présence de la matière organique. Nous déduisons qu'il y a une bioaccumulation plus marquée en présence de cette dernière ce qui va à l'encontre de ce qui est prédit par le BLM. Ceci peut difficilement être expliqué. Nous avançons l'hypothèse que l'adsorption de la matière organique à la surface de la membrane algale modifie la perméabilité membranaire tel que l'avait suggéré Boulemant *et al.* (2011). Toutefois, cette dernière étude a été réalisée avec des complexes lipophiles de Cd, donc dans un contexte

différent du nôtre. En effet, dans leur cas, la prise en charge à court terme (30-40 min) des complexes CdL_2^0 (L= dithiocarbamate ou xanthate) a été suivie en absence et en présence de SRHA (6,5 mg C/L) chez trois algues *Chlamydomonas reinhardtii*, *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlorella fusca*. Dans notre cas, le lanthane ne forme pas de complexes lipophiles dans nos milieux d'exposition. On notera toutefois que Lamelas *et al.* (2005) ont observé une augmentation de l'assimilation du D-sorbitol en présence de SRHA comparativement à d'autres types de MOD. Ces mêmes auteurs avaient également observé une accumulation de plomb plus grande que prévu en présence de SRHA (Lamelas & Slaveykova, 2007).

4 CONCLUSION

Les propriétés physico-chimiques des lanthanides les rendent de plus en plus utilisés dans différents domaines tels que la médecine, les énergies renouvelables, les voitures hybrides, l'agriculture, etc. Ceci augmente la demande mondiale en TR, ce qui intensifie leurs extractions et leurs traitements. Par conséquent, la hausse des concentrations environnementales de ces métaux est de plus en plus importante, d'où des risques écotoxicologiques potentiels.

Les milieux naturels aquatiques sont complexes. Afin d'évaluer les risques environnementaux des TR, il est donc essentiel de cerner tous les paramètres impliqués : le pH, la dureté de l'eau, la présence de phosphate et de ligands naturels comme la matière organique naturelle, etc. La matière organique est un facteur très important qui peut modifier fortement la spéciation des lanthanides, ce qui affecte sa biodisponibilité et sa toxicité dans les cours d'eau. Dans cette étude, nous avons évalué l'influence de ce ligand sur la toxicité du lanthane.

La première partie de ce projet était de caractériser la spéciation du lanthane en présence de la matière organique naturelle, SRHA, à pH 5,0 par ultrafiltration partielle. Nous avons démontré que pour la même concentration de lanthane lorsque la concentration de matière organique augmente dans le milieu la fraction d'ion libre dans le milieu est moins importante. La deuxième partie consistait à exposer l'algue verte *Chlorella fusca* à différentes concentrations de lanthane en présence de trois concentrations de SRHA.

En absence de SRHA, la valeur de CE_{50} obtenue était de 611 ± 150 nM, alors qu'en présence de SRHA nous avons obtenu des valeurs de 529 ± 81 nM, 364 ± 18 nM et 294 ± 47 nM respectivement pour 1, 2 et 3 mg C/L de SRHA. Ceci nous montre qu'il y a un effet toxique accentué en présence de la matière organique naturelle. Nous avons exprimé aussi les CE_{50} en fonction de la concentration de l'ion libre et les valeurs sont nettement plus faibles que celles exprimées en fonction de la concentration mesurée du lanthane.

La quantité de lanthanide internalisée dans les cellules algales a aussi été explorée pour la prédiction de la toxicité du métal étudié. Les courbes doses réponses tracées ont démontré que l'internalisation du lanthane par les algues est à l'origine de sa toxicité. Ceci suggère que la présence de la matière organique accentue la toxicité du lanthane en favorisant son internalisation. Ceci est contraire au BLM, qui prédit plutôt que la présence de la matière organique devrait rendre le lanthane moins biodisponible en le complexant et donc que sa toxicité vis-à-vis des organismes aquatiques devrait diminuer.

Les résultats de toxicité obtenus dans cette étude pourront contribuer à mieux évaluer la toxicité du lanthane en milieu naturel. Toutefois, il est très important de caractériser le milieu étudié vu que la toxicité du métal est influencée par sa composition. Néanmoins, des études complémentaires doivent être élaborées pour mieux évaluer le risque d'une contamination métallique dans l'environnement. Par exemple, un fractionnement subcellulaire sur l'algue verte unicellulaire *Chlorella fusca* permettrait d'identifier dans quelle fraction le lanthane se retrouve et l'effet que peut avoir la matière organique sur sa répartition dans la cellule. Une étude sur le rôle que peuvent jouer certains éléments protecteurs comme le calcium pour les algues en présence de matière organique naturelle peut être très utile afin d'évaluer la toxicité induite par le lanthane. Enfin, nous pouvons aussi évaluer l'effet que peut avoir un mélange de lanthanides sur les algues d'eau douce vu qu'en milieu naturel ces métaux coexistent : y aura-t-il un effet de compétition ou de synergie ?

RÉFÉRENCES

- Bau M, Knappe A & Dulski P (2006) Anthropogenic gadolinium as a micropollutant in river waters in Pennsylvania and in Lake Erie, northeastern United States. *Chemie der erde-Geochemistry* 66:143-152.
- Bau M, Möller P & Dulski P (1997) Yttrium and lanthanides in eastern Mediterranean seawater and their fractionation during redox-cycling. *Marine Chemistry* 56:123-131.
- Bauer D, Diamond D, Li J, McKittrick M, Sandalow D & Telleen P (2011) Critical Materials Strategy. (US Department of Energy, Washington DC), p 1-166.
- Beaubien C (2015) *Toxicité de deux lanthanides (La, Ce) sur l'algue verte Chlorella fusca*. Mémoire de maîtrise (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique). 109 p
- Boullemant A, Le Faucheur S, Fortin C & Campbell PGC (2011) Uptake of lipophilic cadmium complexes by three green algae: influence of humic acid and its pH dependence. *Journal of Phycology* 47:784-791.
- Brioschi L (2012) *Transfert des terres rares à l'interface géosphère-biosphère: répartition, transfert sol-végétation, et effet sur la physiologie des plantes*. PhD (Université de Franche-comté, France). 220 p
- Brown T, Idoine N, Raycraft E, Shaw R, Deady E, Hobbs S & Bide T (2017) *World Mineral Production 2011-15*. British Geological Survey. 87 p
- Bru, Christmann JF & Labbé GL (2015) Panorama mondial 2014 du marché des Terres Rares. Rapport public. (BRGM/RP-65330-France), p 194.
- Bünzli & Choppin GR (1989) *Lanthanide probes in life, chemical and earth sciences*. Elsevier Amsterdam, Amsterdam. 448 p
- Bünzli & Piguet C (2005) Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chemical Society Reviews* 34:1048-1077.
- Calabrese EJ & Baldwin LA (2002) Applications of hormesis in toxicology, risk assessment and chemotherapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences* 23:331-337.
- Campbell (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, A. Tessier & D. Turner (Édit.) John Wiley, New York, USA. p 45-102
- Campbell & Couillard Y (2004) *Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques. Écotoxicologie moléculaire-Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Edited by E. Pelletier, PGC Campbell, and F. Denizeau. Les Presses de l'Université du Québec, Ste-Foy, Quebec, Canada:9-61.

- Campbell & Fortin (2013) Biotic ligand model. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, Springer. p 237-246.
- Cantwell FF, Nielsen JS & Hrudey SE (1982) Free nickel ion concentration in sewage by an ion exchange column-equilibration method. *Analytical Chemistry* 54:1498-1503.
- Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ & Lauffer RB (1999) Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chemical Reviews* 99:2293-2352.
- Carson R (2002) *Silent spring*. Houghton Mifflin, New York, NY, États-Unis. 378 p
- Castor SB & Hedrick JB (2006) Rare earth elements. *Industrial minerals volume, 7th edition: Society for mining, metallurgy, and exploration, Littleton, Colorado*:769-792.
- Chapman PM (2008) Environmental risks of inorganic metals and metalloids: a continuing, evolving scientific odyssey. *Human and Ecological Risk Assessment* 14:5-40.
- Citeau L (2004) *Etude des colloïdes naturels présents dans les eaux gravitaires de sols contaminés: relation entre nature des colloïdes et réactivité vis-à-vis des métaux (Zn, Cd, Pb, Cu)*. Thèse de doctorat (Institut national d'agronomie de Paris Grignon, Paris). 296 p
- CNUCED (2014) Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement Dans *Coup d'oeil sur les produits de base. Dans Edition spéciale sur les terres rares*), p 50.
- Cotton SA (2006) Scandium, Yttrium & the Lanthanides: Inorganic & Coordination Chemistry. In *Encyclopedia of inorganic chemistry* (John Wiley & Sons LTD, West Sussex, United Kingdom), p 263.
- d'Aquino L, De Pinto MC, Nardi L, Morgana M & Tommasi F (2009) Effect of some light rare earth elements on seed germination, seedling growth and antioxidant metabolism in *Triticum durum*. *Chemosphere* 75:900-905.
- Dam HH, Reinhoudt DN & Verboom W (2007) Multicoordinate ligands for actinide/lanthanide separations. *Chemical Society Reviews* 36:367-377.
- Fujiwara K, Matsumoto Y, 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* 81:478-488.
- 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.
- Greenwood EA (1984) Earnshaw, a., 1984. Chemistry of the elements. *Pergamon Press, Oxford* 5:1339-1345.
- Habashi F (1997) *Handbook of extractive metallurgy, vol 3*. WILEY-VCH, Federal republic of Germany. 1759 p

- Haghseresht F, Wang S & Do D (2009) A novel lanthanum-modified bentonite, Phoslock, for phosphate removal from wastewaters. *Applied Clay Science* 46:369-375.
- Janssen C, Heijerick D, De Schampheleere K & Allen H (2003) Environmental risk assessment of metals: tools for incorporating bioavailability. *Environment International* 28:793-800.
- Jinxia L, Mei H, Xiuqin Y & Jiliang L (2010) Effects of the accumulation of the rare earth elements on soil macrofauna community. *Journal of Rare Earths* 28:957-964.
- Krauss RW & Shihira I (1965) *Chlorella, physiology and taxonomy of forty-one isolates*. (University of Maryland). 101 p
- Kulaksiz S & Bau M (2013) Anthropogenic dissolved and colloid/nanoparticle-bound samarium, lanthanum and gadolinium in the Rhine River and the impending destruction of the natural rare earth element distribution in rivers. *Earth and Planetary Science Letters* 362:43-50.
- Kynicky J, Smith MP & Xu C (2012) Diversity of rare earth deposits: the key example of China. *Elements* 8:361-367.
- Lamelas C & Slaveykova VI (2007) Comparison of Cd(II), Cu(II), and Pb(II) biouptake by green algae in the presence of humic acid. *Environmental Science & Technology* 41:4172-4178.
- Lamelas C, Wilkinson KJ & Slaveykova VI (2005) Influence of the composition of natural organic matter on Pb bioavailability to microalgae. *Environmental Science & Technology* 39:6109-6116.
- Lawrence MG & Kamber BS (2006) The behaviour of the rare earth elements during estuarine mixing—revisited. *Marine Chemistry* 100:147-161.
- Leguay S, Campbell PG & Fortin C (2016) Determination of the free-ion concentration of rare earth elements by an ion-exchange technique: implementation, evaluation and limits. *Environmental Chemistry* 13:478-488.
- Liu M & Hasenstein KH (2005) La³⁺ uptake and its effect on the cytoskeleton in root protoplasts of *Zea mays* L. *Planta* 220:658-666.
- Mail Tga (2011) *Énergie et ressources naturelles du Québec*, http://mern.gouv.qc.ca/wp-content/uploads/fascinantes_terres_rares.pdf (Consulté le 14 Mars 2018)
- McCloskey JT, Newman MC & Clark SB (1996) Predicting the relative toxicity of metal ions using ion characteristics: Microtox® bioluminescence assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15:1730-1737.
- MERN (2016) Choisir le secteur minier du Québec. Édité Ministère de L'Énergie et des Ressources Naturelles GDQ (Gouvernement du Québec), p 62.
- Möller P, Paces T, Dulski P & Morteani G (2002) Anthropogenic Gd in surface water, drainage system, and the water supply of the city of Prague, Czech Republic. *Environmental Science & Technology* 36:2387-2394.

- Morel F (1983) *Principles of Aquatic Chemistry*. Wiley New York, N.J. 446 p.
- Nguimgou Signing B (2017) *Évaluation de la toxicité de deux lanthanides (La et Ce) chez les algues vertes unicellulaires à l'aide d'une source organique de phosphore*. Mémoire de maîtrise (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique). 102 p
- Niyogi S & Wood CM (2004) Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environmental Science & Technology* 38:6177-6192.
- Olendrzyński K, Anderberg S, Stigliani W, Bartnicki J & Pacyna J (1996) Atmospheric emissions and depositions of cadmium, lead, and zinc in Europe during the period 1955–1987. *Environmental Reviews* 4:300-320.
- Pagenkopf GK (1983) Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environmental Science & Technology* 17:342-347.
- Paquin PR, Gorsuch JW, Apte S, Batley GE, Bowles KC, Campbell PGC, Delos CG, Di Toro DM, Dwyer RL & Galvez F (2002) The biotic ligand model: a historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133:3-35.
- Parent L (1991) *Biodisponibilité de l'aluminium dans les eaux douces en relation avec les pluies acides*. Thèse de doctorat (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Québec). 450 p
- Paul J & Campbell G (2011) Investigating rare earth element mine development in EPA region 8 and potential environmental impacts. In *A National Service Center for Environmental Publications* (EPA), p 35.
- Pelletier É & Campbell PGC (2008) L'écotoxicologie aquatique-comparaison entre les micropolluants organiques et les métaux: constats actuels et défis pour l'avenir. *Revue des Sciences de l'eau/Journal of Water Science* 21:173-197.
- Pourret O, Davranche M, Gruau G & Dia A (2007) Rare earth elements complexation with humic acid. *Chemical Geology* 243:128-141.
- Richardson GM, Mitchell IA, Mah-Paulson M, Hackbarth T & Garrett RG (2003) Natural emissions of mercury to the atmosphere in Canada. *Environmental Reviews* 11:17-36.
- Rodier J, Legube B, Merlet N & Brunet R (2009) *L'analyse de l'eau-9^{ème} édition: Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer*. Dunod, Paris. 1528 p
- Schijf J (1992) Aqueous geochemistry of the rare earth elements in marine anoxic basins. *Geologica Ultraiectina*:1-256.
- Schüler, Buchert M, Liu R, Dittrich S & Merz C (2011) Study on rare earths and their recycling. (The Greens/EFA Group in the European Parliament, Öko-Institut eV Darmstadt), p 140.

- Sneller F, Kalf D, Weltje L & Van Wezel A (2000) Maximum permissible concentrations and negligible concentrations for rare earth elements (REEs). (National Institute of Public Health and the Environment), p 66.
- Stauber J & Binet M (2000) Canning River Phoslock field trials—Ecotoxicity testing final report. (CSIRO & the WA Waters and Rivers Commission. Report no. ET317R. Prepared for CSIRO Land and Water and the WA Water and Rivers Commission), p 52.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK & Sutton DJ (2012) Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, A L (Édit.) Springer Basel, Vol 3. p 133-164.
- Thurman (1985) Aquatic humic substances. *Organic geochemistry of natural waters*, Springer. p 273-361.
- Tijink & Yland E (1998) Voorkomen en gedrag van zeldzamen aardmetalen in de Rijnmond en Noordzee. *RIKZ-werkdocument AB-98.110 X (en allemand)*.
- Tipping, Lofts S & Sonke J (2011) Humic Ion-Binding Model VII: a revised parameterisation of cation-binding by humic substances. *Environmental Chemistry* 8:225-235.
- Tipping E (1994) WHAM Chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments, and soils incorporating a discrete site/electrostatic model of ion-binding by humic substances. *Computers & Geosciences* 20:973-1023.
- Tipping E (1998) Humic ion-binding model VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances. *Aquatic Geochemistry* 4:3-47.
- Tse P-K (2011) China's rare-earth industry. (US Department of the Interior, US Geological Survey Reston, Virginia), p 15.
- Tyler G & Olsson T (2002) Conditions related to solubility of rare and minor elements in forest soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165:594-601.
- USGS (2013) *Mineral commodity summaries*, https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/rare_earths/ (Consulté le 14 Mars 2018)
- Verplanck PL, Taylor HE, Nordstrom DK & Barber LB (2005) Aqueous stability of gadolinium in surface waters receiving sewage treatment plant effluent, Boulder Creek, Colorado. *Environmental Science & Technology* 39:6923-6929.
- Vigneault B & Campbell PGC (2005) Uptake of cadmium by freshwater green algae: effects of pH and aquatic humic substances. *Journal of Phycology* 41:55-61.
- Wahid P, Valiathan M, Kamalam N, Eapen J, Vijayalakshmi S, Prabhu RK & Mahalingam T (2000) Effect of rare earth elements on growth and nutrition of coconut palm and root competition for these elements between the palm and *Calotropis gigantea*. *Journal of Plant Nutrition* 23:329-338.

- Wang Z-L & Yamada M (2007) Geochemistry of dissolved rare earth elements in the Equatorial Pacific Ocean. *Environmental Geology* 52:779-787.
- Weltje L, Brouwer AH, Verburg TG, Wolterbeek HT & de Goeij JJ (2002) Accumulation and elimination of lanthanum by duckweed (*Lemna minor* L.) as influenced by organism growth and lanthanum sorption to glass. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:1483-1489.
- Weltje L, Verhoof LR, Verweij W & Hamers T (2004) Lutetium speciation and toxicity in a microbial bioassay: Testing the free-ion model for lanthanides. *Environmental Science & Technology* 38:6597-6604.
- Xie Z, Zhu J, Chu H, Zhang Y, Zeng Q, Ma H & Cao Z (2002) Effect of lanthanum on rice production, nutrient uptake, and distribution. *Journal of Plant Nutrition* 25:2315-2331.
- Zepf V (2013) *Rare earth elements: a new approach to the nexus of supply, demand and use: exemplified along the use of neodymium in permanent magnets*. Thèse de doctorat (University of Augsburg, Germany). 157 p
- Zhu, De Leer E, Kennedy M & Alaerts G (1998) Study of the preconcentration and determination of ultratrace rare earth elements in environmental samples with an ion exchange micro-column. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 360:74-80.
- Zhu Y, Hoshino M, Yamada H, Itoh A & Haraguchi H (2005) Gadolinium anomaly in the distributions of rare earth elements observed for coastal seawater and river waters around Nagoya City. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 77:1835-1842.

ANNEXE

A1: Technique de dialyse

La technique de dialyse est une technique basée sur des principes régissant la diffusion à travers une membrane perméable. Dans notre cas, l'utilisation de sac à dialyse de porosité 100 Da a été choisie pour quantifier la fraction du lanthane lié à la matière organique. Un pré-conditionnement des sacs de dialyse est nécessaire avant leur utilisation. Les sacs de dialyse sont remplis avec de l'isopropanol (10% v/v) et immergés dans la même solution d'alcool pendant 10 minutes pour éliminer la glycérine, puis rincés avec de l'eau ultrapure. Les sacs sont ensuite remplis et immergés dans de l'eau ultrapure pendant 15 minutes (cette étape était répétée trois fois). Afin de déterminer la fraction du métal qui sera complexé avec la SRHA, un récipient en polypropylène de 250 mL était rempli avec 200 mL d'une solution contenant une concentration donnée de SRHA (1-3 mg C/L), les différentes concentrations en La et les différents composants de la solution électrolyte contenant les ions majeurs du milieu MHSM-1. Le pH était maintenu à 5,0. Les sacs à dialyse étaient remplis par 5 mL de la solution électrolyte (pH = 5,0) et submergé dans le récipient de 250 mL préalablement rempli. Une fois le récipient fermé, on le plaçait dans une boîte opaque pour protéger la matière organique (SRHA) de la lumière. Cette boîte était placée sur un agitateur jusqu'à ce que l'équilibre était atteint entre les solutions à l'intérieur et à l'extérieur du sac de dialyse. Les substances ayant une masse molaire inférieure à 100 Da, comme les ions libres et les complexes de faibles tailles moléculaires, vont diffuser à travers les membranes, et ceux ayant une masse molaire supérieure à 100 Da tels les complexes métalliques comme La-SRHA sont conservés à l'extérieur des sacs de dialyse. La concentration des espèces organiques La-SRHA est déterminée par :

$$[La_{\text{extérieur}}] - [La_{\text{intérieur}}] = [La - SRHA]$$

Un volume de 1 mL des solutions à l'intérieur et à l'extérieur des sacs ont été prélevés après l'équilibre (n=3) puis conservés dans l'acide nitrique 2 % à 4°C et dosés

à l'ICP-AES. Avant de mettre le métal avec la SRHA il a fallu déterminer le temps d'équilibre au cours duquel $[La_{intérieure}] = [La_{extérieure}]$ en absence de MON.

À ce niveau nous avons rencontré des complications, car les résultats obtenus étaient non reproductibles. Le tableau ci-dessous est un exemple des résultats obtenus :

n=	1	2	3	4	5	6
% équilibre	98,0	97,3	13,4	6,5	25,7	4,6

Ce tableau représente les résultats pour six répétitions après 10 jours, pour une concentration de La de 500 nM. Nous avons remarqué que pour les deux premiers essais l'équilibre était atteint alors que pour les autres on n'a pas obtenu d'équilibre. Pour faire face à ce problème, nous avons ajouté de l'EDTA à une concentration de 10 μ M pour complexer le métal et ainsi éviter une adsorption du métal au niveau des membranes lors de la diffusion, ce qui peut empêcher sa migration à l'intérieur des sacs. Nous avons enfin reproduit l'expérience avec un mélange de métaux (cuivre, cadmium et manganèse et aussi cuivre, cadmium, manganèse et lanthane). Dans une autre expérience, nous avons aussi changé les sacs à dialyse pour des sacs de plus grande porosité (500 Da). Tout ceci n'a toutefois pas abouti à des résultats reproductibles. Ces mêmes expériences ont été réalisées avec le cérium mais en aucun cas l'équilibre a été atteint pour ce métal. La faible reproductibilité pourrait avoir été causée par un défaut dans les sacs à dialyse. Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de trouver un autre fournisseur. Nous avons donc plutôt opté pour l'ultrafiltration.

CHAPITRE 2 : ARTICLE

AVANT-PROPOS

L'article sera soumis pour une publication dans la revue « Environmental Toxicology and Chemistry » ou “Environmental Science and Technology”

Rahma Rahal

- Réalisation des expériences rapportées dans cet article
- Analyse statistique des données et interprétation des résultats
- Écriture et révision de l'article

Peter G. C. Campbell

- Aide à l'interprétation des résultats
- Révision de l'article

Claude Fortin

- La définition du sujet et des objectifs
- Direction des travaux de recherche de Rahma Rahal
- Aide à l'interprétation des résultats et la révision de l'article

Natural organic matter increases lanthanum toxicity and accumulation in the microalga *Chlorella fusca*

Rahma Rahal^A, Peter G. C. Campbell^A and Claude Fortin^{A,B}

^A Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490 Rue de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9, Canada.

^B Corresponding author. Email: fortincl@ete.inrs.ca

ABSTRACT

The chronic toxicity of lanthanum to the green alga *Chlorella fusca* was studied in the presence of natural organic matter (NOM) (1-3 mg C/L). Before exposing the algae to lanthanum, the metal bound to NOM was determined using partial ultrafiltration (PUF). This technique was first validated using an ion exchange technique (IET) and also compared to predictions using the Windermere Humic Aqueous Model (WHAM). The PUF and IET provided similar results whereas the WHAM model predicted slightly less binding of lanthanum by NOM. We demonstrated that the presence of NOM in the exposure medium accentuates the toxicity of lanthanum. The EC₅₀s calculated as a function of the total measured lanthanum concentrations were 611 ± 46 nM, 529 ± 53 nM, 364 ± 21 nM and 294 ± 72 nM for 0, 1, 2 and 3 mg C/L of NOM, respectively. The EC₅₀s calculated as a function of the measured free lanthanum concentrations were 258 ± 94 nM, 125 ± 9 nM and 89 ± 21 nM for 1, 2, 3 mg C/L respectively. This unanticipated result suggests that lanthanum toxicity to this alga cannot be predicted by the free metal concentration as would be expected based on the Biotic Ligand Model. The total amount of metal internalized by the algae was quantified and showed a greater bioaccumulation of lanthanum in the presence of NOM for a given total dissolved lanthanum exposure concentration. This enhanced accumulation explains the observed toxicity of lanthanum on algal growth.

Keywords: rare earth element, effects, green alga, NOM, metal uptake, bioavailability

1 INTRODUCTION

In the sixth row of the periodic table, we find 15 lanthanides belonging to group IIIb: lanthanum (La), cerium (Ce), praseodymium (Pr), neodymium (Nd), prométhium (Pr), samarium (Sm), europium (Eu), gadolinium (Gd), terbium (Tb), dysprosium (Dy), holmium (Hm), erbium (Er), thulium (Th), ytterbium (Yb) and lutetium (Lu). Lanthanides are often called rare earth elements (REE), a category that also includes scandium (Sc) and yttrium (Y). The REEs, despite what their name suggests, have an abundance comparable to that of the other metals in the earth's crust. For example, Ce is more abundant than copper in the earth's crust (CNUCED, 2014). In surface soils, natural concentrations of lanthanides can reach 100 to 200 mg/kg (Tyler, 2004). However, human activities can contribute to increase these concentrations up to 1000 mg/kg (Li *et al.*, 2013).

They are used in many industrial applications and current technologies (e.g. televisions, computers, telephones, etc.) (Castor & Hedrick, 2006). Moreover, the emergence of new technologies, such as wind turbines, hybrid vehicles and photovoltaic thin films has increased their use and the interest in REEs (Bauer *et al.*, 2011b). These new uses of REEs may increase their mobility and their concentrations in the natural environment. It is therefore essential to be able to evaluate the toxicological risks of REEs for aquatic biota.

For many divalent cations (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}), the key role of the free ion species (M^{2+}) as a predictor of the bioavailability and toxicity of metals has been well established (Campbell & Fortin, 2013). Furthermore, the toxicity and the applicability of the free-ion model to predict the toxicity of lanthanum and cerium to the green algae *Chlorella fusca* has been previously investigated (Beaubien, in prep). In this latter study, the use of several monomeric metal buffers (iminodiacetic acid, IDA, malic acid, nitrilotriacetic acid, NTA) demonstrated that the free-ion was a good indicator of uptake and toxicity of La and Ce. However, recent studies have suggested that the short-term uptake of several REEs (Eu, Sm, Tm) by the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii* in the presence of monomeric organic ligands was much higher than that predicted by the

biotic ligand model (BLM) (Yang *et al.*, 2014, El-Akl *et al.*, 2015, Zhao & Wilkinson, 2015, Tan *et al.*, 2017).

The role of polymeric natural ligands, such as natural organic matter (NOM), is important to understand in order to predict the behavior of contaminants, such as metals, in a given medium (Lamelas *et al.*, 2005b). Few studies have been done on the role that organic matter can play but most of these studies suggest that the complexation of metals by NOM contributes to reduce their bioavailability (Vigneault & Campbell, 2005). NOM can also complex lanthanides, potentially reducing their bioavailability, their internalization and therefore their toxicity to aquatic organisms, including unicellular green algae. A recent study examined the influence of Sm binding by NOM on its bioavailability to the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. It was observed that even a small amount of NOM (0.5 mg C/L) resulted in a significant decrease (10 times) in the Sm internalization fluxes and the free ion was a better predictor for Sm internalization (Rowell *et al.*, 2018b). Overall, there is little data available on the mobility behavior of rare earth elements in the environment, and their toxicity to living organisms is still poorly understood (Paul & Campbell, 2011).

The first objective of the present work was to characterize the complexation of lanthanum in the presence of NOM (Suwannee River humic acid (SRHA)) using two speciation techniques. The second objective was to evaluate the bioavailability and toxicity of lanthanum towards the green alga *Chlorella fusca* in the presence of NOM. We hypothesized that SRHA would contribute to decrease the lanthanum bioavailability through metal complexation, as predicted by the BLM.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Algal Culture Conditions

The green alga *Chlorella fusca* was obtained from the Canadian Phycological Culture Centre (CPCC, Waterloo, ON, Canada). Every 15 days, cell cultures were maintained by transferring 2 mL aliquots into 100 mL of fresh sterile modified high salt medium

(MHSM-1) in 250-mL polycarbonate Erlenmeyer flasks (Lavoie et al., 2009). The culture medium (MHSM-1) was simplified by eliminating the phosphate and AAP and used for the algae exposure experiments (MHSM-2). The composition of MHSM-1 and MHSM-2 is detailed in the supplementary information (Tables S1 and S2). The absence of phosphate from the exposure medium provides experimental conditions in which the risk of precipitation of lanthanum is avoided.

All nutrient stock solutions were filtered through polycarbonate membranes (0.2 μm pore size, Millipore) and kept in previously autoclaved polypropylene bottles (121 °C, 15 min) at 4 °C. The algal cultures were maintained at 22 °C in an environmental growth chamber (Conviron CMP4030) with 50 rpm rotary agitation and under constant illumination ($\sim 100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$).

2.2 Lanthanum speciation

In order to evaluate the effect of NOM (0 – 3 mg C/L) on La toxicity to *Chlorella fusca*, the speciation of lanthanum (350 – 5000 nM) in the exposure media was determined using two techniques: an ion-exchange technique (IET) as well as partial ultrafiltration (PUF). In the absence of NOM, equilibrium speciation calculations were performed using MINEQL+ software as a first estimate of lanthanum speciation. Because lanthanum has a very high affinity for NOM, and both IET and PUF become increasingly difficult to use when the ratio of free to total metal becomes very small (Leguay *et al.*, 2016), the working pH was set to 5.0. In the presence of NOM, Windermere Humic Aqueous Model (WHAM VII) was used to predict metal binding by NOM (Tipping *et al.*, 2011).

The IET is based on the equilibrium between the binding sites of a cation exchange resin and the trace and major cations contained in the solution of interest (Leguay *et al.*, 2016). A polystyrene sulphonate exchange resin (Dowex 50W-8X, 50–100 mesh, Sigma Aldrich) was treated before use to remove inorganic and organic impurities, as described by Cantwell (Cantwell *et al.*, 1982). Briefly, the resin was placed in a 50-mL propylene centrifuge tube (Sarstedt), precisely weighed (9 mg) and exposed to the specified solutions. The solutions were then shaken using a wrist-action shaker

according to the following sequence: (1) 10 mL of 1.5 M HNO₃ for 4 min; (2) 10 mL of ultrapure water for 30 s; (3) 20 mL of 1.0 M NaOH for 4 min; (4) 10 mL of ultrapure water for 30 s; (5) 10 mL of electrolyte solution for 2 min (five times); and (6) 50 mL of sample until equilibrium was reached. Preliminary experiments performed in the presence and absence of NOM showed that equilibrium with the sample (with or without SRHA) was reached after 24 h based on observations made at 5, 24, 72 and 96 h. Following step 6, the resin was centrifuged for 10 min and the supernatant solution was carefully removed, taking care not to remove any resin beads. For each experiment, the total concentration of La in the supernatant was measured by ICP-AES before and after equilibrium was reached.

To recover the fraction of La bound to the resin, represented by the concentration of La in the eluate, additional steps were followed. The resin was rinsed twice with 10 mL of ultrapure water, and then exposed to 10 mL of 1.5 M HNO₃ for 5 h. This extraction step was repeated three times for a total run time of 15 h and the total elution volume was 30 mL. The total lanthanum concentration in the eluate was measured by ICP-AES. According to Leguay et al. (2016) between 90 and 96% of the La adsorbed on the resin was generally eluted within the first 10 mL and 99% with the second elution. This fraction was calculated according to the following equation (supernatant here refers to the procedure described in this paragraph):

$$\frac{[\text{La}]_{\text{supernatant}}^{\text{total eq}} - [\text{La}^{3+}]_{\text{eq}}}{[\text{La}]_{\text{supernatant}}^{\text{total eq}}}$$

where $[\text{La}]_{\text{supernatant}}^{\text{total eq}}$ is the concentration of La measured in the supernatant after 24 h of equilibrium and $[\text{La}^{3+}]_{\text{eq}}$ is the concentration of La measured in the eluate.

Because of the requirements of the IET, the complexation of La³⁺ was determined at an ionic strength of 0.1 M. Since the algae were exposed to a lower ionic strength (0.02 M), complexation under these conditions was also verified using PUF. For the latter technique, La binding by NOM was tested both at 0.1 M (for comparison with the IET) and at 0.02 M (for algal exposure experiments). Concentrations of NOM and La tested

are given in Table S3 (Supporting Information). Each combination of La and NOM was tested at least three times and pH was set to 5.0 for all experiments.

For the ultrafiltration technique, centrifugal devices with ultrafiltration membranes were used (VIVASPIN 20, Membrane 3 kDa PES). First, the filter tubes were washed to remove any glycerine. The membranes were soaked in ultrapure water for 96 h and then 20 mL of ultrapure water was centrifuged four times for 35 minutes. The membranes were then soaked again in ultrapure water for 48 h after which 20 mL ultrapure was centrifuged three times. This latter step was repeated a second time. For each concentration of La tested we checked if the NOM could cross the ultrafiltration membranes. To do so the fluorescence measurement were performed in the retentate and in the filtrate. In this technique the molecules of NOM were excited at a wavelength of 360 nm which causes to emit light at an emission wavelength of 461 nm.

For each experiment, 20 mL of sample was centrifuged for 8 minutes at 6000 rpm. This approach was designed so that after centrifugation, a volume of 5 mL represented the filtrate and a volume of 15 mL for the retentate. This allowed us to minimise changes in speciation that could occur in the retentate; indeed, as its volume decreases with centrifugation time, the concentration of NOM increases, which would lead to an increase in metal binding over time. We estimated that recovering 25% of the volume would not markedly affect La speciation.

The retentate and filtrate were recovered and the concentration of total lanthanum in each was measured by ICP-AES. A mass balance calculation was made to verify the recovery of SRHA and to estimate losses in the filtrate for each experiment. Since the SRHA organic matter has a molecular dimension larger than the pores of the membrane used, both the NOM and the NOM-La complex should be retained in the retentate. The fraction of La bound to SRHA was calculated using the following equation:

$$\text{Fraction of La-SRHA} = 100 - \left[\left(\frac{[La]_{filtrate}}{[La]_{retentate}} \right) * 100 \right]$$

2.3 Toxicity test

In preparation for toxicity tests, the *Chlorella fusca* algae were initially inoculated into fresh growth medium, and then transferred every 36 h of growth, corresponding to the mid-exponential growth phase. Cells were gently harvested on polycarbonate filter membranes (2 μm , Millipore), using a low vacuum pressure (< 10 cm Hg). Harvested cells were rinsed with 3×10 mL of sterile MHSM-2 free of EDTA and trace metals. The algal cells were then re-suspended in 20 mL MHSM-2. The cell density was determined rapidly with a particle counter (Multisizer 3) during the exposure period and was measured daily.

Cells were exposed to lanthanum (350 nM – 5000 nM) and NOM (1, 2 and 3 mg C·L⁻¹) for 120 h at pH 5.0. In the absence of NOM, total La concentrations (La_T) were selected in order to reach the targeted range of initial free La^{3+} concentrations previously determined using ultrafiltration. After 120 h, cells were harvested on polycarbonate filter membranes (2 μm , Millipore,) rinsed with 3×10 mL of sterile MHSM-2 with EDTA (1 mM) to remove metal adsorbed to the membrane and cell wall of the algae. The filter membranes with the algae were kept in 50 mL flasks for subsequent acid digestion. Aliquots from each exposure flask (1 mL) were collected, centrifuged (to eliminate cells) and diluted with 1 mL of ultrapure water (v/v), acidified with HNO_3 (2%) to measure the concentration of the La_T in the exposure medium using ICP-AES. Partial ultrafiltration was used again to verify that the La speciation did not change during the experiment.

The digestion of algae and filters was done using 5 mL of concentrated HNO_3 with 1 mL of H_2O_2 (70%), heated for 4 hours at 95 °C. Then, 500 μL of hydrofluoric acid was added and the solution was heated again for 4 h at 95 °C. The final volume was completed to 50 mL with ultrapure water and an aliquot of 3 mL was measured by ICP-MS. The Aquatic Plant reference sample BCR 670 (*Lemna minor*, BCR® 670) was used as a reference control. It was digested and prepared in the same manner and at the same time as the algae and filter samples.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.2 Speciation of lanthanum

In the absence of organic matter, free La^{3+} was the dominant species in solution. Calculations using the thermodynamic model MINEQL+ indicates that almost 99% of the La is present as the free ion whereas less than 1% is present as complexes with sulphate. There is thus minimal complexation of lanthanum in the absence of NOM. In the presence of NOM (1, 2 and 3 mg C/L) and at different concentrations of total La (a range of 350 nM to 5000 nM) the complexation becomes more important and depends on the concentration of the metal used as well as that of the NOM. Table S3 (supporting information) presents the calculated proportion of La bound by NOM, using WHAM.

The speciation of La in the presence of NOM was first verified using IET and PUF at an ionic strength of 0.1 M. The speciation of La was also further verified using PUF at a lower ionic strength of 0.02 M, representative of that used in the algal exposure experiments.

- *IET*

The IET was first calibrated to determine the free-ion concentration of La as described in Leguay et al. (2016). A distribution coefficient (λ) of 419 ± 31 L/g ($n = 6$; pH = 5.0) was obtained. In comparison, Leguay et al. reported a λ -value of 402 ± 29 L/g ($n = 5$; pH = 3.78–5.55) also for lanthanum. Proportions of La bound to organic matter are shown in Table 3.1.

Compared to the exposure medium without NOM, the concentration of La^{3+} in the presence of DOM decreased and the fraction of La bound to NOM is predominant for the different concentrations of La. As observed in Table 3.1, for a specific concentration of NOM used, when the concentration of La increases, the fraction of La bound to NOM decreases. This can be explained by the progressive binding of La to weaker sites as La concentration increases. Indeed, at low [La], the effective binding constant will be relatively high, but as there are more and more La binded, weaker and weaker binding

sites were involved, and the overall binding constant decreased which resulted in a decrease in the proportion of La bound to NOM.

- *Partial ultrafiltration*

Partial ultrafiltration was used to determine the speciation of La at an ionic strength of 0.02 M. Similar to the results obtained using IET, La is less available in the exposure medium in the presence of NOM (Table 3.1). The results obtained using both IET and PUF were compared (Table 3.1). At an ionic strength of 0.1 M, the fraction of La bound to NOM was approximately the same (the difference was < 3%). A t-test was used to confirm that there were no significant differences between the two techniques ($p > 0.05$) for each concentration of La tested at 0.1 M (Table 3.1: comparison of IET and PUF results at 0.1 M). However, some differences in the percentages of La bound to NOM obtained using PUF at ionic strengths of 0.02 M and 0.1 M were observed. This difference, which reaches up to 20%, is likely due to a screening effect played by the Na ions at high ionic strength which reduces lanthanum complexation by NOM (Table 3.1). A t-test was used to assess if there was a significant difference ($p < 0.05$) between the two ionic strengths used for each concentration of La tested. There was no significant difference between treatments at 3 mg C/L. Statistical significance (p -values) of the differences observed between the two ionic strengths tended to decrease with NOM concentration and La concentration. This can be explained by the fact that the Na screening effect becomes more important at low La:NOM ratios. This technique allowed us to estimate the concentration of the free La^{3+} ion (Table S5). As the dominant dissolved species of inorganic La at pH 5.0 is the free ion (>90%), we estimated that the inorganic fraction is equal to the La free ion.

As previously mentioned, WHAM was used to predict the speciation of La in the presence of NOM (Supporting information, Table S3). If we compare the results of WHAM for the different concentrations of La tested, we note that it predicted less binding La by NOM than what was observed with both techniques (Table 3.1). This difference reflects differences in NOM affinity for La between our conditions and those of data sets used to calibrate WHAM.

Table 3.1: Fraction of La bound to NOM (% ± standard deviation) using IET and PUF

[NOM] mg C/L	[La] _T (nM)	IET (0.1 M)	PUF (0.1 M)	PUF (0.02 M)	p-value (t-test) PUF 0.1 M vs. PUF 0.02 M)
1	350	73 ± 6	76 ± 3	89 ± 4	0.007
	500	65 ± 5	63 ± 9	85 ± 6	0.020
	1000	52 ± 5	49 ± 4	71 ± 5	0.004
	5000	22 ± 3	25 ± 3	33 ± 4	0.042
2	1100	82 ± 4	80 ± 5	87 ± 3	0.087
	2000	76 ± 4	78 ± 2	80 ± 1	0.047
	3000	67 ± 4	64 ± 4	71 ± 2	0.032
	5000	59 ± 4	57 ± 3	65 ± 5	0.076
3	2500	87 ± 3	84 ± 4	92 ± 4	0.070
	3000	85 ± 6	83 ± 4	89 ± 3	0.068
	4000	82 ± 3	81 ± 3	85 ± 1	0.071
	5000	76 ± 4	74 ± 4	81 ± 2	0.056

3.3 Lanthanum in the exposure media

The toxicity of La to *Chlorella fusca* was first studied in the absence of NOM. Monitoring of the La concentration in the control (solution without algae) was carried out over a period of 120 hours. The concentration of La did not significantly vary ($p < 0.001$) over the duration of the experiment in the absence of algae (Figure S1, Supporting information). The decrease in La over time was less than 5%, suggesting that adsorption of La on the walls of Erlenmeyer flasks is negligible in our case. On the other hand, there was a drop in the concentration of La in the presence of algae in the exposure medium of up to 25% (Figure S2, Supporting information). This can be explained by the adsorption and assimilation of lanthanum by the algae. The concentration of lanthanum in the exposure medium did not change significantly in the presence of NOM for all treatments. Throughout all experiments, pH did not vary notably; measurements made indicated pH values comprised between 4.95 and 5.10.

3.3.1 Effect of NOM on cells growth

Typically, the growth of *Chlorella fusca* follows a classic growth curve (Figure 3.1). The first phase is observed at the beginning of the cycle (0-24 h) and corresponds to the lag phase. The second phase is that of exponential growth (24-96 h) followed by the stationary phase (96-120 h). In the presence of La, both the growth rate (number of divisions per day, given by the slope of the growth curve during the exponential phase) and the yield (number of cells at the stationary phase) are reduced. Figure 3.1 illustrates the effects of increasing La concentrations on the green alga *Chlorella fusca*.

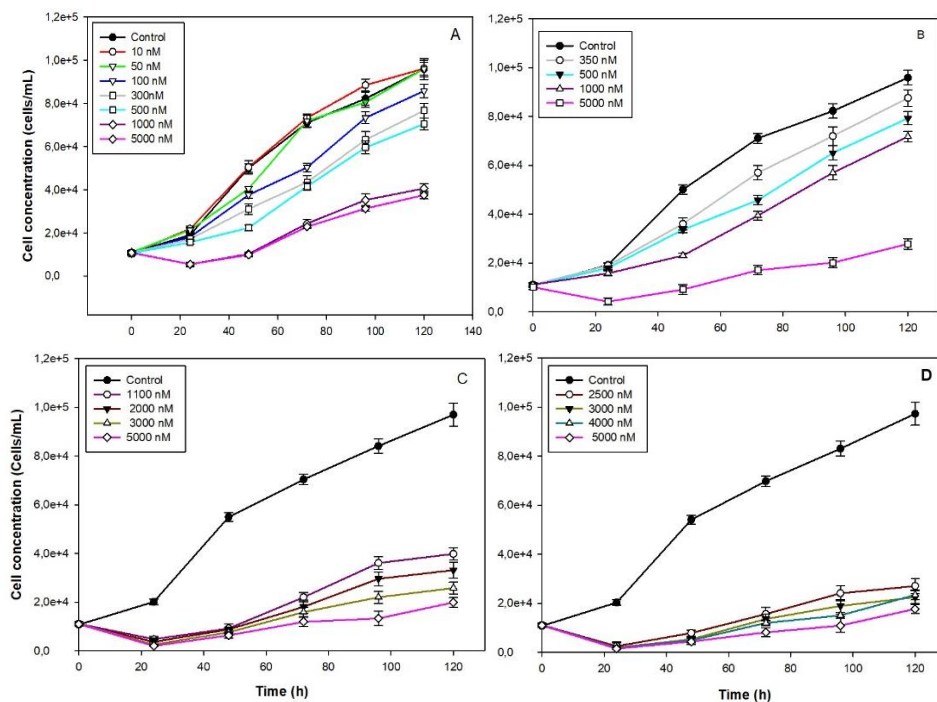


Figure 3.1: Growth curves of *C. fusca* exposed to different concentrations of La. (A): in absence of NOM, (B): in presence of 1 mg C/L, (C); in presence of 2 mg C/L, (D): in presence of 3 mg C/L

In the absence of NOM (Figure 3.1 (A)), after 24 h, there was a decrease in the algal population at the highest concentrations of La (1000 and 5000 nM) tested. This decrease may be due to cell lysis at these high concentrations. These samples (1000 and 5000 nM) were statistically different from the controls ($p < 0.05$).

After an exposure of 48 h, algal growth had increased, marking the beginning of the exponential growth phase of the algal cells. After 72 h of exposure, we note that the concentration of 10 nM of Lanthanum stimulated the cell yield compared to the control group. A similar hormetic effect was observed in previous work under the same conditions but after 120 h of exposure (Nguimgou Signing, 2017a). This mechanism, known as an "hormesis effect", is characterized by a stimulation at low concentrations of contaminants in a living organism (Calabrese & Baldwin, 2002).

Figure 3.1(B) shows the growth curves of algae exposed to different concentrations of La in the presence of 1 mg C/L of NOM. The average concentrations of La in solution in this experiment were 340, 491, 883 and 4980 nM.

After 24 h, algal growth was lower than that of the control for all concentrations of La and cell yields decreased with increasing concentration of La in solution, suggesting a toxic effect. This effect was most marked at the highest La concentration (5000 nM). As can be seen in Figure 3.1(B), cell growth was delayed compared to the control and other exposures. An ANOVA was performed to evaluate if there was a difference in cell growth between treatments and the control ($p = 0.0001$).

Figure 3.1(C) shows the growth curves of algae exposed to different concentrations of La in the presence of 2 mg C/L of NOM. As observed for the experiment with 1 mg C/L following an exposure of 24 h, algal growth was much lower than that of the control for all concentrations of La. The difference in cell growth between the different treatments and the control was significant ($p < 0.05$). The average concentrations of La measured in solution in this experiment were 991, 1890, 2830 and 4880 nM.

Figure 3.1 (D) shows the growth curves of the algae exposed to different concentrations of La in the presence of 3 mg C/L of NOM. For 3 mg C/L of NOM, the toxic effect of La is the most marked among all concentrations tested. For all the concentrations of La measured in the exposure medium, cell growth was significantly lower than in the control. Growth is clearly very weak during the exposure period. The difference between the cell concentrations for the different concentrations of La used in the presence of 3 mg C/L are significantly different from the control ($p = 0.003$). Over the full 120 h of exposure and for all La concentrations tested, the cell growth was virtually absent. The

average concentrations of La measured in solution of this experiment were 2330, 2740, 3810 and 4850 nM.

From the cell densities obtained after 120 hours of exposure, it was possible to determine the effective concentration of total measured La that reduces cell yield by 50% (EC_{50}) using nonlinear regression. The results of the regressions are shown in Figures 3.2 and 3.3. The calculated EC_{50} values are summarized in Table 3.2 The EC_{50} obtained in the absence of NOM was 611 ± 46 nM. This value is close to our previous work (490 ± 70 nM) for the same alga under similar conditions (Beaubien, in prep), and by Nguimgou Signing (2017) ($570 [190-1050]$ nM) in the presence of EDTA and trace elements.

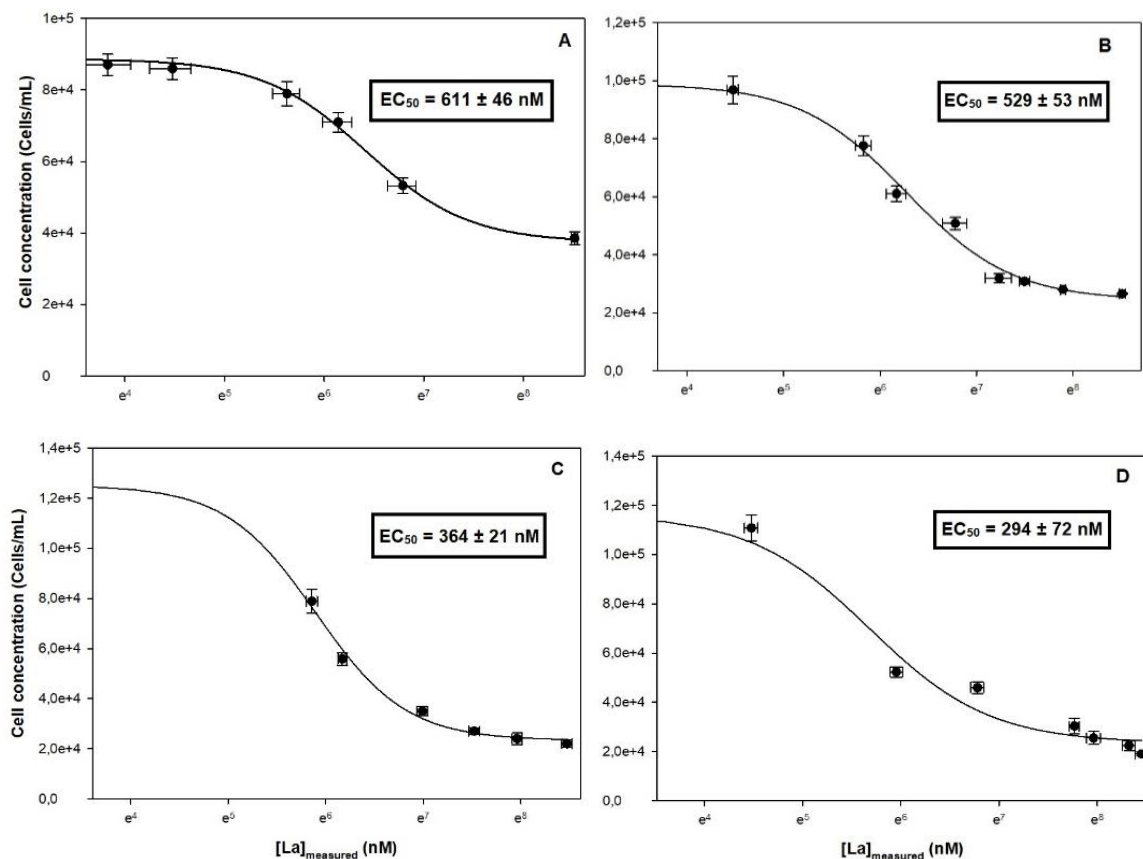


Figure 3.2: Variation of cell concentrations as a function of measured La.(A): in absence of NOM, (B) : in presence of 1 mg C/L of NOM, (C): in presence of 2 mg C/L, (D): in presence of 3 mg C/L.

As expected, compared to the EC_{50} obtained on the basis of the measured total concentrations of La, those obtained with the free ion concentrations are lower. However, surprisingly, the EC_{50} expressed as the free ion concentration were not constant, but decreased as the NOM concentrations increased, suggesting an enhancement of toxicity caused by NOM. For 1 mg C/L the EC_{50} value was lower than that in its absence but fell within the confidence interval For 2 mg C/L and 3 mg C/L, the EC_{50} was significantly lower than that obtained at 0 mg C/L. As can be seen in Table 3.2, there was a reduction in the EC_{50} between the treatment without NOM and the treatments in the presence of 1, 2 and 3 mg C/L. This reduction was 14% for 1 mg C/L, 40% for 2 mg C/L and 52% for 3 mg C/L, respectively. These results suggest that NOM does not have a protective effect for La toxicity to *Chlorella fusca*.

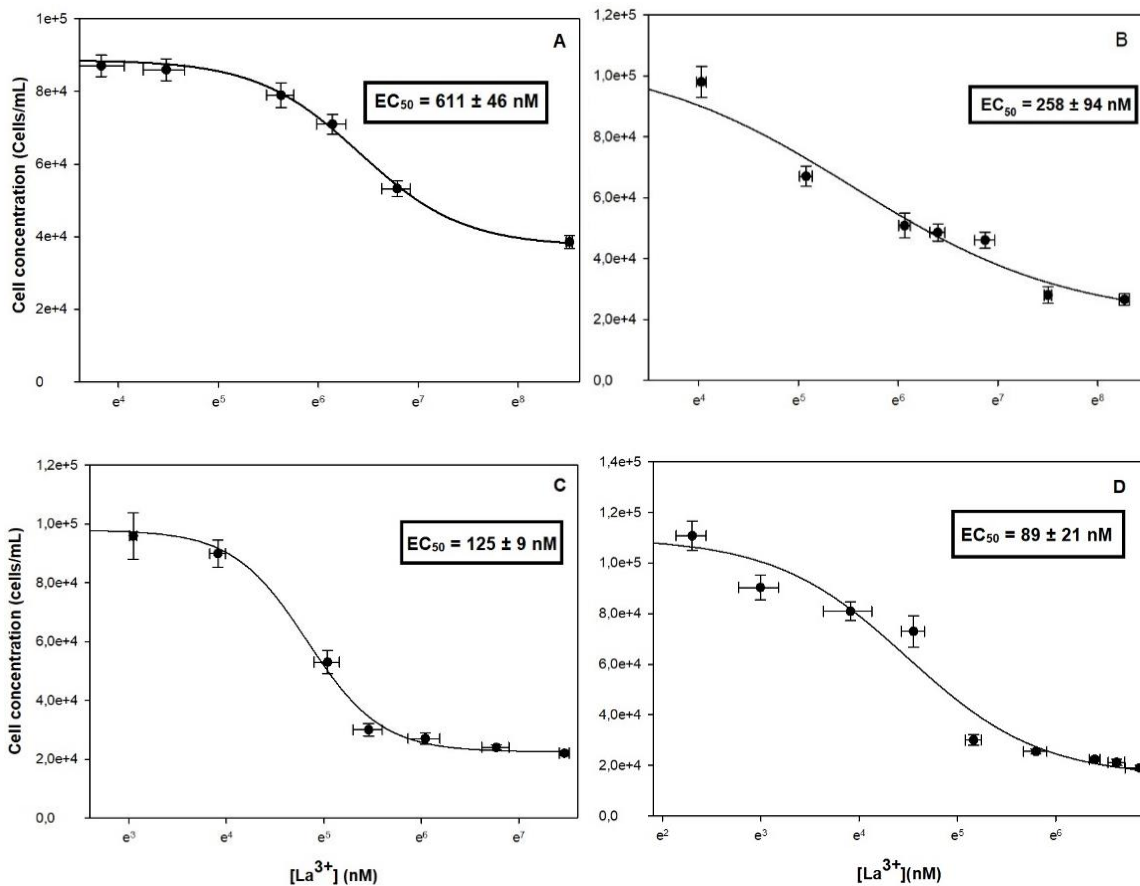


Figure 3.3: Variation of cell concentration as a function of La^{3+} (A): in absence of NOM, (B) : in presence of 1 mg C/L of NOM, (C): in presence of 2 mg C/L, (D): in presence of 3 mg C/L.

For the three experiments conducted with NOM (1, 2 and 3 mg C/L), we verified the La speciation in solution with ultrafiltration before and after the exposure. The difference in the speciation before and after exposure was less than 5% (Tables S4 and S5).

Table 3.2 : The values (\pm SD) of EC₅₀ for *Chlorella fusca* after 120 h of exposure to La

NOM concentration (mg C/L)	0	1	2	3
EC₅₀ (La_{measured}) (nM)	611 \pm 46	529 \pm 53	364 \pm 21	294 \pm 72
EC₅₀ (La³⁺) (nM)	611 \pm 46	258 \pm 94	125 \pm 9	89 \pm 21

3.3.2 Effect on La internalization

The measured concentration of La in the aquatic plant reference sample (*Lemna minor*, BCR, 670) was 0.450 μ g/g. The certified value was 0.487 \pm 0.02 μ g/g, representing a recovery of 92%.

Cellular yields are also reported as a function of the intracellular concentration of La. The results obtained are shown in Figure 3.4. There was a negative correlation between cell growth and internalized La concentration but no dose-response curve could be fitted through non-linear regression. The results obtained are similar to those obtained when the free ion concentration was used as an independent variable to present the dose response curve. This similarity leads us to believe that increased La internalization by the algal cells is the cause of the reduction in cell density for *Chlorella fusca*. The cells accumulate more La in presence of NOM but seem to require a slightly higher internal dose to reach the same inhibition effect. Intracellular La concentrations are also presented as a function of the total measured concentration of La in solution in Figure 3.5 and as a function of the free ion concentration of La in Figure 3.6.

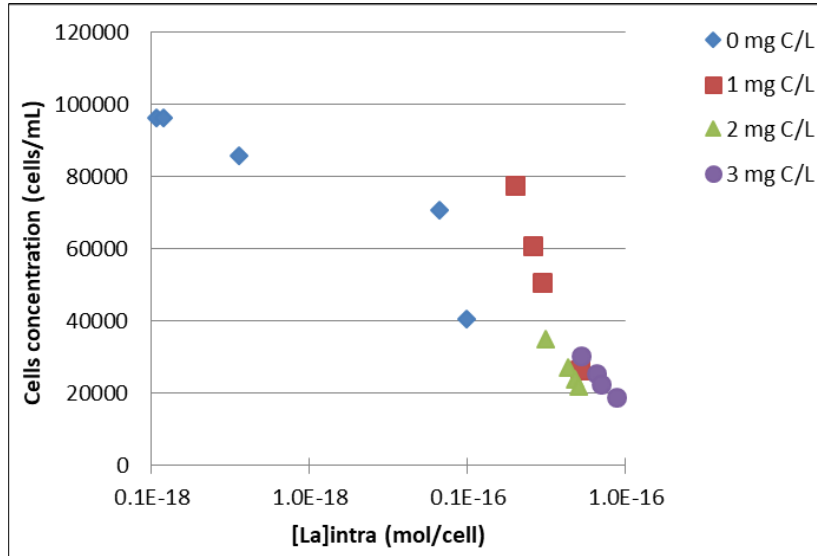


Figure 3.4: Cell concentration after 120 h as a function of lanthanum internalized by algae in the absence and presence of humic acid

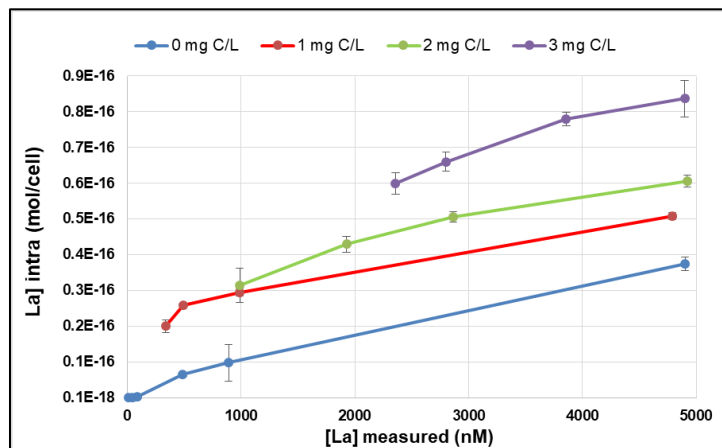


Figure 3.5: Variation in the concentration of internalized La as a function of measured total La concentration in the exposure medium.

The intracellular concentration of La is expected to increase with the measured La concentration in solution (Morel, 1983) and is shown in Figure 3.5. It can be seen that for given concentration of total La uptake increases with an increase in the concentration of NOM used in the experiment. Also there seems to be an increase in the ability of algae to internalize La for a given [La³⁺] (Figure 3.6).

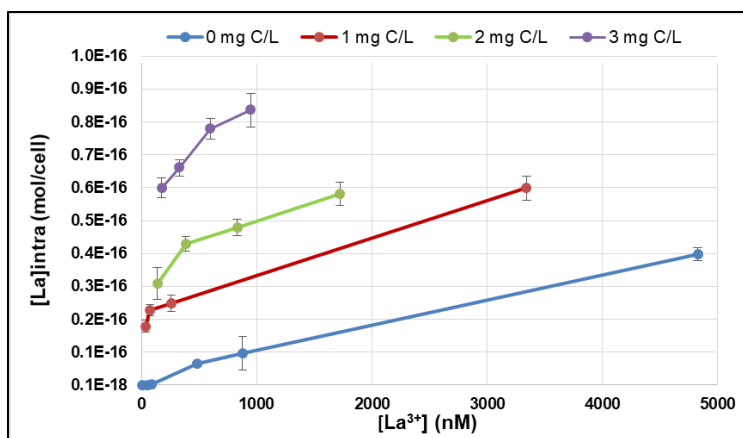


Figure 3.6: Variation in the concentration of internalized La as a function of free ion La³⁺ concentration in the exposure medium.

The intracellular concentration of La is expected to increase with the concentration of free La³⁺ in solution (Morel, 1983) and is shown in Figure 3.6. We can also see that the intracellular concentration of La increases with an increase in the concentration of NOM used in the experiment. Also there seems to be an increase in algae's ability to internalize La. This result does not support the idea that NOM can protect *Chlorella fusca* from uptake and toxicity of La as we had expected. In our case, we observe that more La is taken up by *Chlorella fusca* in the presence of NOM. This trend was not observed with Sm. In fact, in an other study, short term uptake experiments were performed in the presence of 0.5 to 7.0 mg C/L of four humic substances and Sm. They observed that further increases to the NOM concentration decreased Sm biouptake (Rowell *et al.*, 2018).

We considered the hypothesis that the adsorption of organic matter on the surface of the algal membrane changes membrane permeability, as observed in an earlier study (Boullemant *et al.*, 2011). However, this latter study was carried out with lipophilic complexes of Cd, and therefore in a context different from ours. Indeed, in these experiments short-term (30-40 min) uptake of CdL₂⁰ complexes (L = diethyl-dithiocarbamate or ethylxanthate) was followed in the absence and in the presence of SRHA (6.5 mg C/L) in three algae *Chlamydomonas reinhardtii*, *Pseudokirchneriella*

subcapitata and *Chlorella fusca*. In our case, La does not form lipophilic complexes in our exposure environments.

In another study done with the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*, the affinity constants for the binding of Ce to the biological uptake sites (K_s) were established at pH 5.0 and pH 7.0. An apparent affinity constant of $1.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ was observed at pH 5.0 (El-Akl, 2015). It would be interesting to determine this constant (K_s) for La, at pH 5 for *Chlorella fusca* in the absence and presence of NOM through short-term experiments. This could determine the affinity of La for the biological uptake sites in the presence and absence of NOM. Nevertheless, our results do suggest an increase in affinity (slope of the uptake curve; Figure 3.6) and in capacity (uptake at high La concentrations; Figure 3.6). Such an effect of NOM on metal uptake is, to our knowledge, without precedent.

Figure S3 (Supporting information) shows a downward trend in the concentration of La with increasing NOM in the medium, although the slopes were not significantly different from zero ($p > 0.05$). Mass balance calculations (Table S6) showed that the proportion of La present inside the cells was usually less than 1%, suggesting that La uptake does not cause the observed decrease in La concentration.

4 CONCLUSION

The complexity of the composition of aquatic environments makes the process of environmental risk assessment difficult. Several parameters such as pH, hardness and dissolved NOM can influence the toxicity of lanthanides. The toxicity of lanthanum towards the green alga *Chlorella fusca* has been determined and we show that the presence of lanthanum in the exposure medium affects algal growth over a period of 120 h. The concentration of lanthanum in the medium and the cell density are inversely proportional. Several studies have demonstrated the important influence that physicochemical parameters of water such as pH and hardness can have on the toxicity of metallic elements to aquatic organisms. The effect of the presence of the NOM has been less studied, but several studies in the recent literature have shown that the presence of NOM decreased the toxic effect of REE (Vukov, 2015, Rowell *et al.*, 2018).

We demonstrated that the addition of natural organic matter in the absence of La had no measurable effect on algal growth, but in the presence of La the NOM further exacerbated the effect of La and led to even lower algal growth. In order to verify whether or not this effect was due to bioaccumulation, the amount of lanthanum internalized by the algae was measured. We noticed that in the presence of organic matter, more lanthanum was internalized by *Chlorella fusca*, even when free La^{3+} concentrations were considered. However, we can not yet explain this surprising result. Further work will be needed to determine the mechanism of action that results in higher internalisation and toxicity of La in *Chlorella fusca* in the presence of NOM. A cell compartmentalization (subcellular fractionation) study might provide an explanation for these observed effects.

Our results go against the usual toxicity models, and they open the door to new research projects. In this project, the toxicity was observed under laboratory controlled conditions (concentrations, pH, ligand used); it would be interesting to check if the same trend is observed at other pH values and for other sources of NOM. It would also be interesting to check whether the results are reproducible with other rare earth elements such as cerium (another light lanthanide) in the same species or for other algal species.

5 REFERENCES

- Bauer D, Diamond D, Li J, McKittrick M, Sandalow D & Telleen P (2011) Critical Materials Strategy. US Department of Energy, Washington DC, p 1-166.
- Beaubien C, Aharchaou I, Campbell PGC & Fortin C (in prep) Toxicity of La and Ce towards a green alga in the presence of organic ligands.
- Boullemant A, Le Faucheur S, Fortin C & Campbell PG (2011) Uptake of lipophilic cadmium complexes by three green algae: influence of humic acid and its pH dependence. *Journal of Phycology* 47(4):784-791.
- Calabrese EJ & Baldwin LA (2002) Applications of hormesis in toxicology, risk assessment and chemotherapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences* 23(7):331-337.
- Campbell & Fortin (2013) Biotic ligand model. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, Springer. p 237-246.
- Cantwell FF, Nielsen JS & Hrudey SE (1982) Free nickel ion concentration in sewage by an ion exchange column-equilibration method. *Analytical Chemistry* 54(9):1498-1503.
- Castor SB & Hedrick JB (2006) Rare earth elements. *Industrial minerals volume, 7th edition: Society for mining, metallurgy, and exploration, Littleton, Colorado*:769-792.
- CNUCED (2014) Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement in *Coup d'oeil sur les produits de base. In Edition spéciale sur les terres rares*, p 50.
- 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.
- Lamelas C, Wilkinson KJ & Slaveykova VI (2005) Influence of the composition of natural organic matter on Pb bioavailability to microalgae. *Environmental Science & Technology* 39(16):6109-6116.
- Lavoie M, Le Faucheur S, Fortin C & Campbell PG (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.
- Leguay S, Campbell PG & Fortin C (2016) Determination of the free-ion concentration of rare earth elements by an ion-exchange technique: implementation, evaluation and limits. *Environmental Chemistry* 13(3):478-488.
- Li X, Chen Z, Chen Z & Zhang Y (2013) A human health risk assessment of rare earth elements in soil and vegetables from a mining area in Fujian Province, Southeast China. *Chemosphere* 93(6):1240-1246.
- Morel F (1983) *Principles of Aquatic Chemistry*. Wiley New York, N.J. 446 p.

- Nguimgou Signing B (2017) *Évaluation de la toxicité de deux lanthanides (La et Ce) chez les algues vertes unicellulaires à l'aide d'une source organique de phosphore*. Master's thesis (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique). 102 p
- Paul J & Campbell G (2011) Investigating rare earth element mine development in EPA region 8 and potential environmental impacts. in *A National Service Center for Environmental Publications* (EPA), p 35.
- Pourret O, Davranche M, Gruau G & Dia A (2007) Rare earth elements complexation with humic acid. *Chemical Geology* 243(1-2):128-141.
- Rowell JA, Fillion MA, Smith S & Wilkinson KJ (2018) Determination of the speciation and bioavailability of Sm to *Chlamydomonas reinhardtii* in the presence of natural organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry*.
- Tan Q-G, Yang G & Wilkinson KJ (2017) Biotic ligand model explains the effects of competition but not complexation for Sm biouptake by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere* 168:426-434.
- Tipping, Lofts S & Sonke J (2011) Humic Ion-Binding Model VII: a revised parameterisation of cation-binding by humic substances. *Environmental Chemistry* 8(3):225-235.
- Tyler G (2004) Rare earth elements in soil and plant systems-A review. *Plant and Soil* 267(1-2):191-206.
- Vigneault B & Campbell PGC (2005) Uptake of cadmium by freshwater green algae: effects of pH and aquatic humic substances. *Journal of Phycology* 41(1):55-61.
- Vukov O (2015) Developing a site specific understanding of the toxicity of rare earth elements, cerium and dysprosium to *Daphnia pulex* and *Hyalella azteca*. Thesis (Wilfrid Laurier University). 1788 p
- Yang G, Tan QG, Zhu L & Wilkinson KJ (2014) The role of complexation and competition in the biouptake of europium by a unicellular alga. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33(11):2609-2615.
- Zhao CM & Wilkinson KJ (2015) Biotic ligand model does not predict the bioavailability of rare Earth elements in the presence of organic ligands. *Environmental Science and Technology* 49(4):2207-2214

Supporting information

Table S1: Stock solution composition

	Solution	Compound	Concentration (stock solution)
MHSM-1	Ammonium	NH ₄ NO ₃	15.0 g/L
		Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	3.2 g/L
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.0 g/L
	Nitrate	KNO ₃	101.1 g/L
	Phosphate	KH ₂ PO ₄	29.6 g/L
		K ₂ HPO ₄	57.6 g/L
	AAP	H ₃ BO ₃	186 mg/L ¹
		Na ₂ EDTA·2H ₂ O	300 mg/L
		MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/L
		Fe (10 g/L)	160 mg/L
		Zn (1 g/L)	1.59 mg/L
		Co (1 g/L)	0.64 mg/L
		Cu (1 g/L)	4.47 µg/L
Mo (1 g/L)		2.88 mg/L	
Buffer	MES	MES	21.3 g/L
pH adjustment	NaOH	NaOH	40.0 g/L
Exposure	La	LaNO ₃ ·6H ₂ O	43.3 g/L

Table S2: Ionic composition of MHSM-1 and MHSM-2 solutions

Ion	MHSM-1 (M)	MHSM-2 (M)
BO ₃	3.01*10 ⁻⁶	-
Ca	6.80*10 ⁻⁵	6.80*10 ⁻⁵
Cl	4.20*10 ⁻⁶	-
Co	1.09*10 ⁻⁶	-
Cu	7.04*10 ⁻¹¹	-
Fe	5.92*10 ⁻⁷	
K	4.35*10 ⁻³	4.13*10 ⁻³
Mg	8.12*10 ⁻⁵	8.12*10 ⁻⁵
Mn	2.10*10 ⁻⁶	
MoO ₄	3.00*10 ⁻⁸	-
Na	3.10*10 ⁻³	Variable
NH ₄	9.37*10 ⁻⁴	9.37*10 ⁻⁴
NO ₃	5.21*10 ⁻³	5.21*10 ⁻³
PO ₄	1.37*10 ⁻⁴	-
SO ₄	8.12*10 ⁻⁵	8.12*10 ⁻⁵
Zn	2.43*10 ⁻⁸	-
MES	10 ⁻²	1.00*10 ⁻²
EDTA	8.06*10 ⁻⁷	-

Table S3: WHAM calculated fraction of metal bound to NOM using different concentrations of SRHA and La at an ionic strength of 0.1 M. The carbon content of the humic acid was presumed to be 50%.

Concentration of SRHA (mg C/L)	[La_T] (nM)	fraction of metal bound to SRHA
1	350	0.86
	500	0.81
	1000	0.66
	5000	0.24
2	1100	0.87
	2000	0.75
	3000	0.62
	5000	0.46
3	2500	0.83
	3000	0.79
	4000	0.70
	5000	0.63

Table S4: Experimental data for exposure to lanthanum in the absence of organic matter (n = 6) after 120 hours

[La]_{Total} nominal (nM)	[La]_{t₀} measured (nM)	[La]_{t_f} measured (nM)	[La³⁺]_{estimated} (nM)	Cell density (10³ cells/mL)	[La]_{internalised} (mol/cell)
Control (0 nM)	<DL	<DL	-	95.9±5.0	<DL
10 nM	8.8±2.2	8.3±0.3	7.2±1.0	96.2±4.0	1.1±0.1×10 ⁻¹⁸
50 nM	48.7±3.0	45.1±2.0	39.0±2.3	96.1±3.0	1.2±0.2×10 ⁻¹⁸
100 nM	89.3±4.0	87.4±1.0	80.5±1.0	85.8±3.0	3.6±0.3×10 ⁻¹⁸
300 nM	280±12	277±2	255±3	76.8±3.5	-*
500 nM	488±15	485±2	445±3	70.6±3.0	6.6±0.5×10 ⁻¹⁷
1000 nM	892±22	886±3	850±2	40.7±2.0	9.9±5.1×10 ⁻¹⁷
5000 nM	4901±51	4892±3	4677±15	33.6±2.0	3.7±0.2×10 ⁻¹⁶

* Data was accidentally lost

Table S5: Experimental data for exposure of lanthanum in the presence of organic matter after 120 hours (n = 6).

[SRHA] (mg C/L)	[La]_{Total} nominal (nM)	[La]_{t₀} measured (nM)	[La]_{t_f} measured (nM)	[La³⁺]_{estimated} (nM)	Cell density (10³cells/mL)	[La]_{internalised} (mol/cell)
Control 1	-	-	<LD	-	96±3	<LD
1	350	342±3	338±3.0	37±4	88±3	2.0±0.2×10 ⁻¹⁶
	500	490±2	489±3	74±5	76±3	2.5±0.2×10 ⁻¹⁶
	1000	890±10	877±9	258±9	62±2	3.0±0.1×10 ⁻¹⁶
	5000	4990±15	4964±18	3342±12	30±2	5.1±0.1×10 ⁻¹⁶
Control 2	-	-	<LD	-	96±5	<LD
2	1100	994±6	988±4	138±8	36±3	3.8±0.5×10 ⁻¹⁶
	2000	1920±25	1860±45	385±15	30±3	4.3±0.2×10 ⁻¹⁶
	3000	2870±38	2795±54	831±20	26±3	5.0±0.1×10 ⁻¹⁶
	5000	4940±44	4820±83	1722±35	22±2	6.1±0.2×10 ⁻¹⁶
Control 3	-	-	<LD	-	96±5	<LD
3	2500	2370±30	2290±60	165±9	25±3	6.1±0.4×10 ⁻¹⁶
	3000	2790±55	2700±64	308±16	23±3	6.6±0.3×10 ⁻¹⁶
	4000	3870±68	3760±80	579±20	23±2	7.8± 0.3×10 ⁻¹⁶
	5000	4900±60	4800±78	931±30	18±2	8.4±0.5×10 ⁻¹⁶

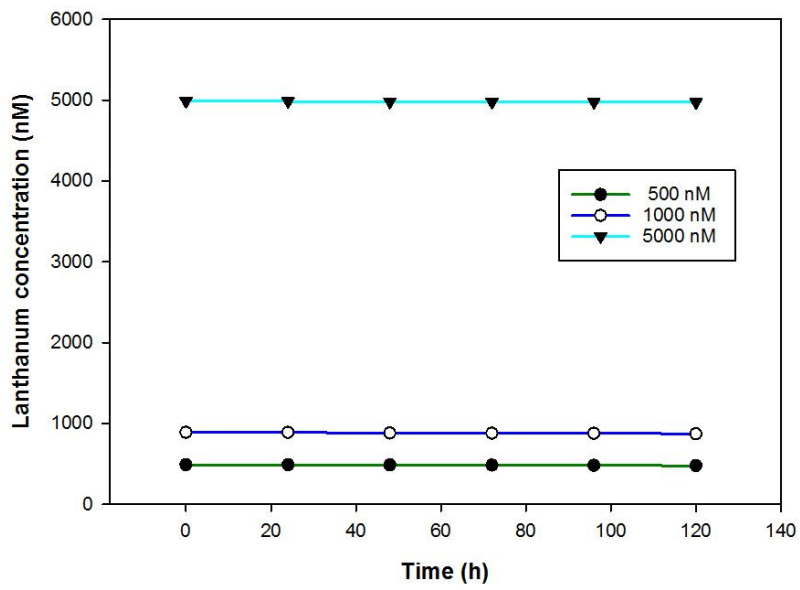
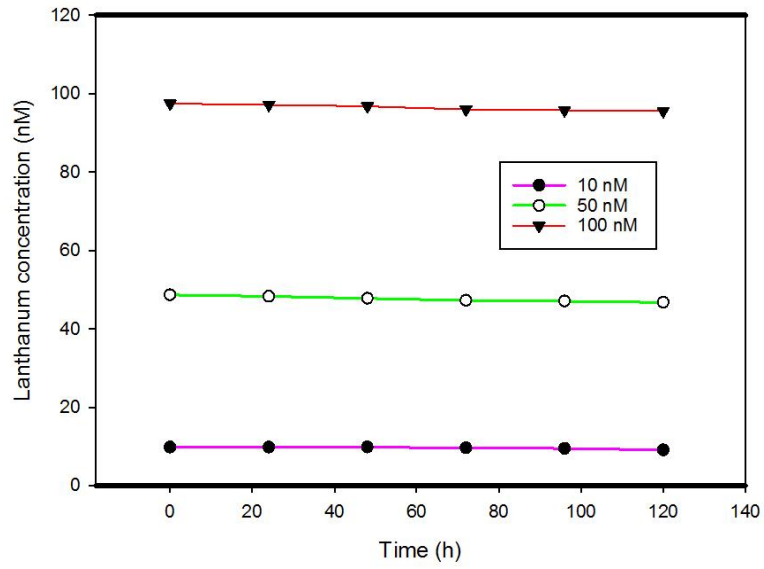


Figure S1: Variation of lanthanum concentrations in the exposure medium alone over 120 h.

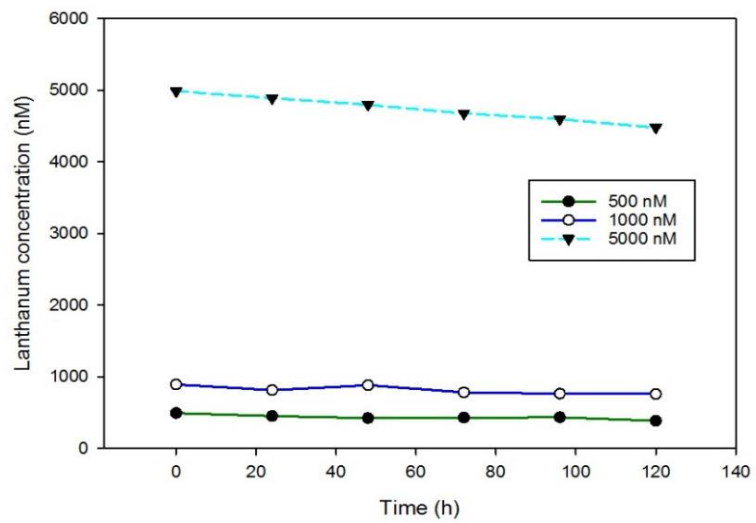
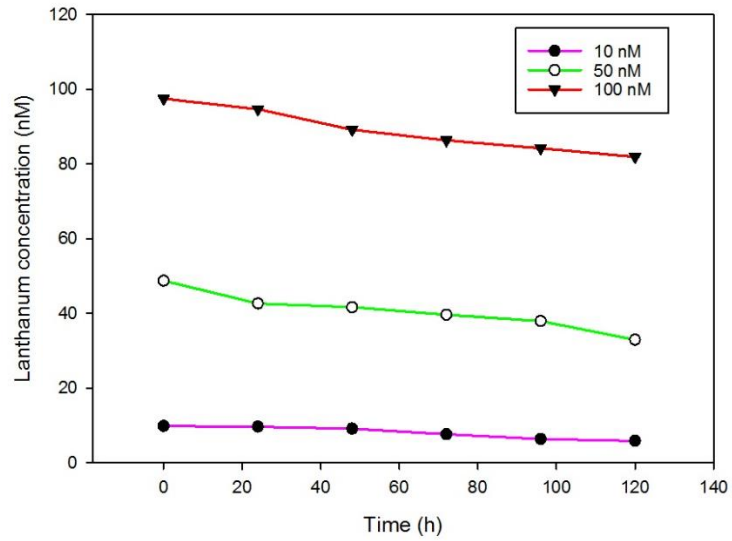


Figure S2 : Variation of lanthanum concentrations in the exposure medium over 120 h in the presence of *Chlorella fusca*.

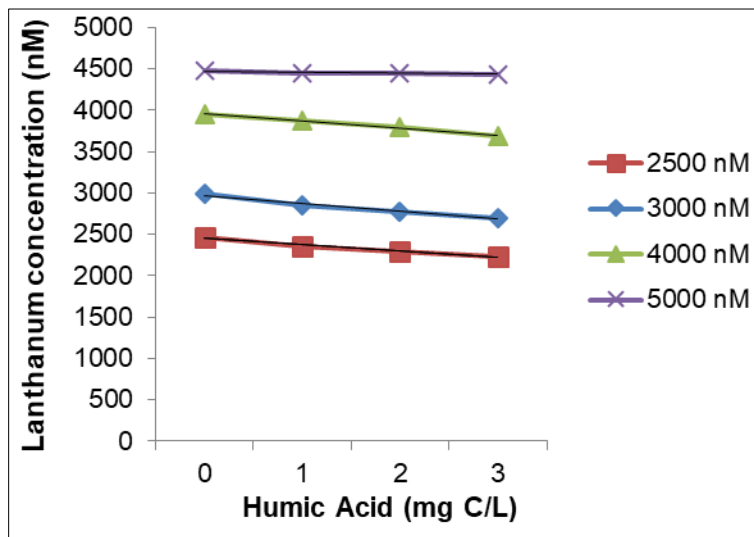


Figure S3: Variation of different La concentrations as a function of the NOM concentration in presence of algae after 120 h of exposure.