

Centre Eau Terre Environnement

**ETUDE DU ROLE DE LA MATIERE ORGANIQUE NATURELLE DANS
L'ACCUMULATION ET LA TOXICITE DU PLATINE CHEZ DIFFERENTS
PRODUCTEURS PRIMAIRES D'EAU DOUCE**

Par
Océane Hourtané

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	Peter Campbell INRS-ETE
Examineur externe	Joël Gauthier Environnement et Changement Climatique Canada
2 ^{ème} examineur externe	Jelle Mertens European Precious Metals Federation
Directeur de recherche	Claude Fortin INRS-ETE
Codirectrice de recherche	Agnès Feurtet-Mazel Université de Bordeaux EPOC-EA
Codirecteur de recherche	Patrice Gonzalez Université de Bordeaux EPOC-EA

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, j'aimerais remercier chaleureusement Nathalie Geneste, Agnès Feurtet-Mazel et Claude Fortin pour m'avoir permis de participer à ce projet de bidiplômation entre l'Université de Bordeaux et l'INRS. Merci de m'avoir donné la chance de découvrir cette magnifique province qu'est le Québec au cours de cette année à l'international. Je suis très heureuse d'avoir pu évoluer dans le monde de la recherche ici comme en France au travers de ce projet d'un an et demi. Tout spécialement, merci à Claude de m'avoir conseillée et aidée pendant la première année et à Agnès et Patrice Gonzalez de m'avoir encadrée pour les six derniers mois. Merci également à Magalie Baudrimont, rapporteur principal pour ses questions pertinentes et sa présence à chaque étape du projet. C'est aussi et surtout grâce aux financements du LabexCOTE, en France ainsi que de ECCC (Environnement et Changement climatique Canada) et du CRSNG (Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada) au Canada que ce projet a pu être mené à bien.

Merci à tous mes amis et collègues de l'INRS pour leurs valeurs d'entraide et de spontanéité qui ont rendu cette année 2018 aussi incroyable. Plus spécialement, merci à Caroline pour son amitié, son aide précieuse, et surtout sa bonne humeur en toutes circonstances !! Merci à Vincent pour ses conseils avisés, son aide pour certaines manip, son soutien dans les moments difficiles et ses blagues « pourries » mémorables. Je suis contente de vous retrouver tous les deux pour le début de mon doctorat, qui coïncide avec la fin des vôtres. Merci à Imad Aharchaou de m'avoir tant aidée et formée ; merci à Kim, Faouzia, Emeric, Flora et Sarah pour leur aide. De plus, j'aimerais témoigner toute ma gratitude à Isabelle Lavoie, pour avoir partagé son savoir sur les diatomées et pour les observations microscopiques. Merci aux techniciens de l'INRS, Anissa, Jean-François pour les analyses au COT, Julie pour l'ICP-MS, Philippe, Sébastien pour la fluorimétrie, Stéfane Prémont le responsable de la sécurité et leur acolyte Gilles.

Je souhaiterais tout spécialement remercier Geneviève Rioux qui avait élaboré le protocole d'exposition des algues vertes au platine en présence de matière organique ainsi que la méthode d'ultrafiltration partielle. Merci à elle d'avoir pris le temps de

répondre à toutes mes questions, que ce soit au début pour m'appropriier son protocole, où à la fin pour que nous puissions comparer nos résultats.

Un grand merci aussi à toute l'équipe de la station marine d'Arcachon du laboratoire EPOC : Bruno, pour ses précieux conseils pour la culture des diatomées, Patrice et Cerise pour la génétique, à Pierre-Yves pour avoir monté la méthode du dosage du platine sur four atomique (AAS). Merci également à tous les autres stagiaires/doctorants pour la bonne ambiance : Zélie, Marc, Pauline, Maëli, Agathe, Joy, Oumou. On retiendra la générosité de Marc en termes d'achat de viennoiseries pour les pauses chocolatine : « Une p'tite douceur ? ».

Merci également à Jean-Paul Maalouf de m'avoir hébergée à la carte à Bordeaux et conseillée (sauvée ?) en statistiques.

Merci à mes amies bordelaises, qui ont toujours été là pour moi, et qui vont me manquer pendant ces quatre années d'expatriation à venir.

Merci à ma famille proche de m'avoir soutenu, que ce soit moralement ou financièrement, tout au long du projet. Tout spécialement, merci à ma grand-mère, Colette Hourtané, qui m'a logée pendant ces six derniers mois sur le bassin d'Arcachon. Merci pour tous ces bons petits plats et ces petites attentions.

RÉSUMÉ

Les éléments du groupe platine (EGP) sont d'un intérêt grandissant en écotoxicologie. La demande pour ces métaux rares est très importante, notamment pour les pots catalytiques dans l'industrie automobile. Cela amène à une contamination de l'environnement due au rejet d'EGP dans les fumées d'échappement. Ils sont principalement émis sous forme de particules, mais peuvent subir des transformations en atteignant les systèmes aquatiques et interagir avec la matière organique naturelle (MON) et les organismes aquatiques. D'après le modèle du ligand biotique (BLM), la formation de complexes réduit la biodisponibilité d'un métal. En conséquence, la toxicité devrait s'en voir réduite, mais certains exemples avec les EGP suggèrent le contraire. Ce projet traite de l'accumulation et la toxicité du platine chez trois microalgues exposées à une gamme de concentrations en platine allant jusqu'à 200 µg/L. Deux espèces d'algues vertes : *Chlorella fusca* et *Chlamydomonas reinhardtii* et une diatomée : *Nitzschia palea* ont été utilisées comme organismes d'étude. L'inhibition de la croissance et l'internalisation du platine ont été déterminées pour trois concentrations (0, 10 et 20 mg C/L) d'acides humiques (AH, Acides Humiques de la Rivière Suwannee). En parallèle, la spéciation du platine en présence d'AH a été déterminée expérimentalement grâce à une méthode d'ultrafiltration partielle. Puis, de façon à mieux comprendre les impacts à l'échelle de la cellule, des analyses transcriptomiques ont été réalisées sur *C. reinhardtii* et *N. palea*. Les résultats montrent que la toxicité du platine était plus importante en présence d'AH pour les deux espèces algues vertes alors qu'un effet protecteur (plus grand que celui prédit par le BLM) est observé chez la diatomée. Le rôle du frustule en silice qui entoure la membrane plasmique dans cet effet protecteur en présence d'AH reste à déterminer. Ces résultats contraires au modèle du ligand biotique démontrent l'importance de ce genre d'études pour mieux prédire la biodisponibilité des métaux en présence de ligands complexes comme la MON. De plus, tout cela soulève des inquiétudes sur l'impact du platine chez les microalgues dans des conditions environnementales réalistes (avec MON ubiquiste), surtout vue l'importance écologique des producteurs primaires.

Mots-clés : platine, matière organique naturelle, acides humiques, algue verte, diatomée, spéciation métallique, biodisponibilité, bioaccumulation, toxicité, transcriptomique

ABSTRACT

There is a growing interest for platinum group elements (PGEs) in ecotoxicology. The demand for these rare metals is very high especially for catalysts in the automobile industry, leading to environmental contamination owing to their release with exhaust fumes. PGEs are mostly emitted as particles, but as they reach aquatic ecosystems they can undergo transformations and interact with natural organic matter (NOM). According to the biotic ligand model (BLM), the formation of complexes reduces metal bioavailability to living cells. As a consequence, overall toxicity should be minimized in presence of NOM but several observations with PGEs suggest otherwise. This study focused on the uptake and toxicity of platinum for three microalgae exposed to a range of platinum concentrations up to 200 µg/L. Two green algae (*Chlorella fusca* and *Chlamydomonas reinhardtii*) and a periphytic diatom (*Nitzschia palea*) were studied as test organisms. Growth inhibition and platinum internalization were determined at three concentrations (0, 10 and 20 mg C/L) of humic acid (HA; Suwannee River Humic Acid). In parallel, platinum speciation in the presence of HA was determined experimentally using a partial ultrafiltration method. To better understand the impact of platinum at the cellular level, transcriptomic analyses were also performed on *C. reinhardtii* and *N. palea*. Results show that the toxicity of platinum is enhanced in the presence of HA for both green algae, whereas a protective effect (greater than that predicted by the BLM) was observed for the diatom. The role of the silica frustule surrounding the cell membrane will be investigated as a potential explanation for the difference in HA impact on PGEs uptake and toxicity compared to green algae. These results appear to be in conflict with the biotic ligand model, demonstrating the importance to continue such studies in order to better predict bioavailability of metals in presence of complex ligands such as NOM. Also, it raises the issue of the impact of platinum on microalgae under realistic environmental conditions (with ubiquitous NOM), primary producers being of great ecological importance.

Keywords: platinum, natural organic matter, humic acid, green algae, diatom, metal speciation, bioavailability, uptake, toxicity, transcriptomics

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT.....	VII
TABLE DES MATIÈRES.....	IX
CHAPITRE 1: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
1.1 ÉLÉMENTS DU GROUPE PLATINE : EGP	1
1.2 SOURCES ET UTILISATIONS DES EGP.....	2
1.2.1 Naturelles	2
1.2.2 Anthropiques	2
1.2.2.1 Pots catalytiques.....	3
1.2.2.2 Industrie pharmaceutique	6
1.2.2.3 Mines	7
1.2.2.4 Les Industries	7
1.3 RISQUES POUR LA SANTÉ HUMAINE	8
1.4 DEVENIR DANS L'ENVIRONNEMENT.....	8
1.4.1 Devenir en milieu aquatique.....	10
1.5 IMPACTS SUR LES ORGANISMES AQUATIQUES.....	10
1.5.1 Accumulation.....	10
1.5.2 Toxicité.....	11
1.6 INTERACTIONS AVEC LA MATIÈRE ORGANIQUE NATURELLE.....	12
1.7 ORGANISMES D'ÉTUDE	16
1.7.1 <i>Chlorella fusca</i>	16
1.7.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17
1.7.3 <i>Nitzschia palea</i>	17
1.8 DEFORMATIONS.....	18
1.9 GÉNÉTIQUE	19
1.10 OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	21
CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	23
2.1 MATÉRIEL DE LABORATOIRE.....	23
2.1.1 Lavage de la verrerie	23
2.1.2 Préparation et conservation des échantillons et solutions.....	23

2.1.2.1	Matière organique naturelle.....	24
2.1.3	Conservation des échantillons	24
2.1.4	Cultures algales.....	25
2.1.4.1	Chlorella fusca et Chlamydomonas reinhardtii.....	26
2.1.4.2	Nitzschia palea	27
2.1.5	Solutions de rinçage et milieux simplifiés	28
2.2	CHOIX DE LA VERRERIE D'EXPOSITION.....	29
2.3	EXPERIENCES D'EXPOSITION.....	30
2.3.1	Principe général.....	30
2.3.2	Culture de pré-exposition.....	31
2.3.3	Contamination en platine des milieux d'exposition.....	32
2.3.4	Conditions de concentrations en MON.....	33
2.3.5	Ajustement du pH.....	34
2.4	MESURE DE LA DENSITE CELLULAIRE.....	34
2.4.1	Principe de fonctionnement du compteur de particules.....	35
2.4.2	Densité cellulaire relative	36
2.5	QUANTIFICATION DU PLATINE	36
2.5.1	Analyses par ICP-MS.....	36
2.5.1.1	Principe de fonctionnement de l'ICP-MS.....	36
2.5.1.2	Paramètres d'analyse	37
2.5.2	Analyses par spectroscopie d'absorption atomique (GFAAS)	38
2.5.2.1	Principe de fonctionnement du four graphite	38
2.5.2.2	Paramètres d'analyse	38
2.5.2.3	Inter calibration avec l'ICP-MS.....	38
2.6	SUIVI DE LA CONCENTRATION EN ACIDE HUMIQUE	39
2.6.1	Principe de fonctionnement du spectrofluorimètre.....	40
2.6.2	Réglages du spectrofluorimètre	40
2.7	DETERMINATION DE LA SPECIATION	42
2.7.1	Méthode d'ultrafiltration.....	42
2.7.2	Conditionnement des membranes d'ultrafiltration.....	45
2.8	RECUPERATION ET TRAITEMENT DES ALGUES EXPOSEES.....	46
2.8.1	Séparation des métaux adsorbés et absorbés.....	46
2.8.2	Minéralisation/digestion	47
2.8.3	Récupération d'algues pour les analyses transcriptomiques.....	48
2.9	REALISATION DES COURBES DOSE-REPONSE	48
2.10	ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES.....	49
2.10.1	Gènes d'intérêt.....	49
2.10.2	Extraction des ARN	51

2.10.3	<i>Rétro transcription</i>	52
2.10.4	<i>Amplifications</i>	53
2.10.5	<i>Traitement des données de qPCR</i>	55
2.10.6	<i>Limites de la méthode</i>	56
2.11	TRAITEMENTS STATISTIQUES	56
CHAPITRE 3: VERIFICATIONS METHODOLOGIQUES		58
3.1	CONTROLE DE LA CONCENTRATION EN PLATINE PENDANT LES EXPOSITIONS	58
3.2	CONTROLE DE LA CONCENTRATION EN ACIDES HUMIQUES PENDANT LES EXPOSITIONS	61
3.3	VERIFICATION DE LA METHODE D'ULTRAFILTRATION	63
3.4	COMPARAISON DES DEUX ACIDES HUMIQUES DU PROJET	66
3.5	VERIFICATION DE LA METHODE DE DIGESTION	68
CHAPITRE 4: ESSAIS SUR LES ALGUES VERTES		69
4.1	ESSAIS DE TOXICITE SUR <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	69
4.1.1	<i>Récapitulatif des résultats de Rioux (2018) et étude complémentaire</i>	69
4.1.2	<i>Toxicité du platine pour C. reinhardtii en l'absence d'AH</i>	70
4.1.2.1	<i>Analyses transcriptomiques</i>	71
4.1.3	<i>Toxicité du platine pour C. reinhardtii en présence de 20 mg C/L d'AH</i>	75
4.1.3.1	<i>Analyses transcriptomiques</i>	77
4.1.4	<i>Comparaison des CE50, influence de la présence d'AH</i>	80
4.1.5	<i>Bioaccumulation</i>	82
4.1.6	<i>Flux d'internalisation</i>	85
4.1.7	<i>Courbe dose interne-réponse</i>	87
4.2	ESSAIS DE TOXICITE SUR <i>CHLORELLA FUSCA</i>	88
4.2.1	<i>Toxicité du platine pour C. fusca en l'absence d'AH</i>	88
4.2.2	<i>Toxicité du platine pour C. fusca en présence de 10 mg C/L d'AH</i>	91
4.2.3	<i>Toxicité du platine pour C. fusca en présence de 20 mg C/L d'AH</i>	94
4.2.3.1	<i>Analyses transcriptomiques</i>	95
4.2.4	<i>Comparaison des CE50, influence de la présence d'AH</i>	95
4.2.5	<i>Bioaccumulation</i>	97
4.2.6	<i>Flux d'internalisation</i>	101
4.2.7	<i>Courbe dose interne-réponse</i>	102
4.3	COMPARAISON ENTRE LES DEUX ESPECES D'ALGUES VERTES	104
CHAPITRE 5: ESSAIS DE TOXICITE SUR LES DIATOMEES		109
5.1	TOXICITE DU PLATINE	109
5.1.1	<i>Croissance de Nitzschia palea</i>	109
5.1.2	<i>Analyses transcriptomiques</i>	110

5.2	INFLUENCE DE LA PRESENCE D'AH	117
5.2.1	<i>Croissance</i>	117
5.2.1.1	Croissance de <i>N. palea</i> en l'absence d'AH.....	117
5.2.1.2	Croissance de <i>N. palea</i> en présence de 10 mg C/L d'AH.....	118
5.2.2	<i>Analyses transcriptomiques</i>	120
5.2.2.1	Influence des AH seuls.....	122
5.2.3	<i>Rôle protecteur des AH pour les diatomées</i>	123
	CHAPITRE 6: CONCLUSIONS.....	125
	CHAPITRE 7: PERSPECTIVES.....	129
	CHAPITRE 8: REFERENCES.....	131
	ANNEXE I : CALCULS DE FLUX D'INTERNALISATION	140
	ANNEXE II : VERIFICATIONS METHODOLOGIQUES POUR LES TESTS DE TOXICITE SUR LES ALGUES VERTES.....	142
	ANNEXE III : CONCENTRATIONS EN CUIVRE LIBRE.....	145
	ANNEXE IV : SPECIATION INORGANIQUE DU PLATINE DANS LE MILIEU MHSM-1	146
	ANNEXE V : COURBES DE CROISSANCE DE <i>NITZSCHIA PALEA</i>	147
	ANNEXE VI : DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE POUR LES ESSAIS SUR LES DIATOMEES.....	149

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 RECAPITULATIFS DES CONCENTRATIONS EN PLATINE RETROUVEES DANS L'ENVIRONNEMENT, D'APRES JACKSON <i>ET AL.</i> (2007)	9
TABLEAU 2: RECAPITULATIFS DES CONCENTRATIONS EN PALLADIUM RETROUVEES DANS L'ENVIRONNEMENT, D'APRES JACKSON <i>ET AL.</i> (2007).....	9
TABLEAU 3: COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE MHSM-1	26
TABLEAU 4: COMPOSITION DU MILIEU CHU-10 MODIFIE POUR <i>NITZSCHIA PALEA</i>	27
TABLEAU 5: CONDITIONS EXPERIMENTALES DES DIFFERENTES EXPOSITIONS	30
TABLEAU 6: GENES ETUDIES ET FONCTIONS CELLULAIRES ASSOCIEES ; EN NOIR CEUX QUI ONT PU ETRE ETUDIES CHEZ LES DEUX ALGUES, EN BLEU SEULEMENT CHEZ <i>NITZSCHIA PALEA</i> ET EN VERT SEULEMENT CHEZ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	50
TABLEAU 7: NIVEAUX DE CONFIANCE POUR LES STATISTIQUES REALISEES SUR LES ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES	57
TABLEAU 8: POURCENTAGES D'AH DETECTES PAR SPECTROFLUORIMETRIE DANS LES ULTRAFILTRATS POUR CHAQUE MILIEU UTILISE	64
TABLEAU 9: BILANS DE MASSE DU PLATINE QUANTIFIE A L'ICP-MS APRES ULTRAFILTRATION POUR LES MILIEUX D'EXPOSITION UTILISE	64
TABLEAU 10: FACTEURS D'INDUCTION DES GENES ETUDIES CHEZ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> APRES UNE EXPOSITION AU PLATINE PENDANT 96 H ; ORANGE : INDUCTION (>2) ; VERT: REPRESSION (<0,5) ; N=3.....	72
TABLEAU 11: FACTEURS D'INDUCTION DES GENES ETUDIES CHEZ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> APRES UNE EXPOSITION AU PLATINE EN PRESENCE DE 20 MG C/L D'AH PENDANT 96 H ; ORANGE : INDUCTION (>2) ; VERT : REPRESSION (<0,5) ; ND : NON DETERMINE ; N=3	78
TABLEAU 12: FACTEURS D'INDUCTION OBTENUS A 7 JOURS POUR L'EXPOSITION DE <i>NITZSCHIA PALEA</i> A UNE LARGE GAMME DE CONCENTRATIONS SUBLETALES EN PLATINE REALISEE A EPOC, ORANGE : INDUCTION ; VERT : REPRESSION ; ' : DEUXIEME EXPOSITION (N=3).....	112
TABLEAU 13: FACTEURS D'INDUCTION OBTENUS A 14 JOURS POUR L'EXPOSITION DE <i>NITZSCHIA PALEA</i> A UNE LARGE GAMME DE CONCENTRATIONS SUBLETALES EN PLATINE REALISEE A EPOC, ORANGE : INDUCTION ; VERT : REPRESSION ; ' : DEUXIEME EXPOSITION (N=3).....	113
TABLEAU 14: FACTEURS D'INDUCTION OBTENUS A 21 JOURS POUR L'EXPOSITION DE <i>NITZSCHIA PALEA</i> A UNE LARGE GAMME DE CONCENTRATIONS SUBLETALES EN PLATINE REALISEE A EPOC, ORANGE : INDUCTION ; VERT : REPRESSION ; ' : DEUXIEME EXPOSITION (N=3)	114
TABLEAU 15: POPULATION ALGALE MOYENNE PENDANT 28 JOURS D'EXPOSITION ; EXPRIMEE EN 10 ³ CELLULES/ML	120
TABLEAU 16: FACTEURS D'INDUCTION DES GENES D'INTERET PENDANT LES EXPOSITIONS AU PLATINE AVEC ET SANS AH REALISEES A L'INRS CHEZ <i>NITZSCHIA PALEA</i> ; ORANGE : INDUCTION ; VERT : REPRESSION (N=4-	

5) ; CES FACTEURS SONT OBTENUS PAR COMPARAISON AVEC LES VALEURS DES TEMOINS ; / : IDENTIQUE AUX TEMOINS	121
TABLEAU 17: FACTEURS D'INDUCTION MESURES EN PRESENCE DE 10 MG C/L D'AH APRES 28 JOURS D'EXPOSITION DE <i>NITZSCHIA PALEA</i> ; ORANGE : INDUCTION ; VERT : REPRESSION (N=4) ; / : IDENTIQUE AUX TEMOINS SANS AH.....	123
TABLEAU 18: ACTIVITE DU CUIVRE LIBRE DANS DIFFERENTES CONDITIONS DE CONCENTRATIONS EN AH SUR LA GAMME'EXPOSITION AU PLATINE DANS LE MILIEU MHSM-1 (PH=6).....	145
TABLEAU 19: SPECIATION DU PLATINE DANS LE MILIEU MHSM-1 ; PH=6 ; LOGICIEL MINEQL	146
TABLEAU 20: SUIVI DU PH AU COURS DU TEMPS POUR L'EXPERIENCE D'EXPOSITION DE <i>NITZSCHIA PALEA</i> AU PLATINE PENDANT 21 JOURS DANS LE MILIEU CHU-10 MODIFIE (MESURE REALISEE DANS UN SEUL DES ERLENMEYERS)	151

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: TABLEAU PERIODIQUE DES ELEMENTS.....	1
FIGURE 2: DEMANDE MONDIALE EN EGP EN 2012.....	3
FIGURE 3: DEMANDE MONDIALE EN PLATINE EN 2012.	3
FIGURE 4: SCHEMA SIMPLIFIE DE L'HISTORIQUE DE L'UTILISATION DES DIFFERENTS TYPES DE POTS CATALYTIQUE	4
FIGURE 5: SCHEMA D'UN POT CATALYTIQUE (MODIFIE DE LA PRESENTATION D'ANOUEK GALTAYRIES, MAITRE DE CONFERENCE A L'ENSCP (CHIMIE PARIS))	5
FIGURE 6: SCHEMA EXPLICATIF DU ROLE DE CATALYSEURS DES EGP.....	5
FIGURE 7: STRUCTURE CHIMIQUE DES MEDICAMENTS ANTI-CANCEREUX A BASE DE PLATINE LES PLUS UTILISES EN MILIEU HOSPITALIER. SOURCE : KÜMMERER AND HELMERS (1997)	6
FIGURE 8: DELTA DE LA RIVIERE SUWANNEE ET GOLFE DU MEXIQUE (SOURCE: NASA).....	13
FIGURE 9: CELLULES DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> AU MICROSCOPE OPTIQUE (X1000).....	16
FIGURE 10: SCHEMA SIMPLIFIE DE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	17
FIGURE 11: <i>NITZSCHIA PALEA</i> , PHOTO D'UNE CULTURE AU MICROSCOPE OPTIQUE X63, SCHEMA SIMPLIFIE ET IMAGE D'UNE FRUSTULE VIDE (X1000).....	18
FIGURE 12: PROTEINES IMPLIQUEES DANS LE TRANSPORT DES METAUX CHEZ L'ALGUE <i>CHLAMYDOMONAS</i> ET LEUR LOCALISATION (BLABY-HAAS & MERCHANT, 2012).....	20
FIGURE 13: DELTA DE LA RIVIERE SUWANNEE (SOURCE NATGEO)	24
FIGURE 14: SCHEMA GENERAL SIMPLIFIE DES PARAMETRES MESURES PENDANT LES EXPERIENCES D'EXPOSITION	31
FIGURE 15: DISPOSITIF EXPERIMENTAL POUR LES CULTURES D'EXPOSITION DES DIATOMÉES AU LABORATOIRE EPOC	32
FIGURE 16: SCHEMA DESCRIPTIF DU FONCTIONNEMENT D'UN ICP-MS QUADRIPOLAIRE (ROY, 2009).....	37
FIGURE 17: PRINCIPE GENERAL DE LA FLUORESCENCE	39
FIGURE 18: SCHEMA DE FONCTIONNEMENT D'UN SPECTROFLUORIMETRE (RIOUX, 2018).....	40
FIGURE 19: SPECTRE D'EMISSION D'UNE SOLUTION DE AH(III) (SUWANNEE RIVER : N°3S101H) A 3 MG C/L MESURE PAR SPECTROFLUORIMETRIE ; PH=6 ; $\lambda_{EXCITATION} = 350 \text{ NM}$	41
FIGURE 20: SCHEMA SIMPLIFIE DU PRINCIPE D'ULTRAFILTRATION UTILISE	43
FIGURE 21: SCHEMA RECAPITULATIF DE LA RECUPERATION ET DU TRAITEMENT DES ALGUES EN FIN D'EXPERIENCE	46
FIGURE 22: PRINCIPE DE VERIFICATION DE LA METHODE DE DIGESTION.....	47
FIGURE 23: SCHEMA EXPLICATIF DU PROTOCOLE D'EXTRACTION DES ARN TOTAUX CHEZ LES DIATOMÉES ; MVT : MOUVEMENT ; Φ : PHASE.....	52
FIGURE 24: PLAN DE PLAQUE DE qPCR POUR LES ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES SUR <i>CHLAMYDOMONAS</i> <i>REINHARDTII</i>	54
FIGURE 25: PLAN DE PLAQUE DE qPCR POUR LES ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES SUR <i>NITZSCHIA PALEA</i>	54

FIGURE 26: SUIVI DE LA CONCENTRATION EN PLATINE TOTAL MESUREE PAR ICP-MS DANS DES ERLNMEYERS EN PC LORS DE L'EXPOSITION DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> EN PRESENCE DE 10 MG C/L D'AH DANS LE MILIEU MHSM-1; PH=6 (N=3)	59
FIGURE 27: SUIVI DE LA CONCENTRATION EN PLATINE TOTAL MESUREE PAR ICP-MS DANS DES ERLNMEYERS EN PC LORS DE L'EXPOSITION DE <i>NITZSCHIA PALEA</i> EN L'ABSENCE ET EN PRESENCE DE 10 MG C/L D'AH DANS LE MILIEU CHU-10 MODIFIE; PH=7 (N=5)	59
FIGURE 28: SUIVI DE LA CONCENTRATION EN PLATINE MESUREE PAR GFAAS DANS DES ERLNMEYERS EN VERRE LORS DE L'EXPOSITION DE <i>NITZSCHIA PALEA</i> DANS LE MILIEU CHU-10 MODIFIE ; PH=7 (N=3).....	60
FIGURE 29: VARIATION DE LA [AH] DANS LE MILIEU MHSM-1 MESUREE PAR SPECTROFLUORIMETRIE POUR LES DIFFERENTES CONDITIONS D'EXPOSITION AU PTINORG. (0-150 µG/L) AU COURS DU TEMPS DE L'EXPERIENCE POUR 10 MG C/L VISE LORS DE L'EXPOSITION DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> (N=3)	61
FIGURE 30: VARIATION DE LA [AH] MESUREE PAR SPECTROFLUORIMETRIE DANS LE MILIEU MHSM-1 POUR LES DIFFERENTES CONDITIONS D'EXPOSITION AU PT INORG. (0-130 µG/L) AU COURS DU TEMPS DE L'EXPERIENCE POUR 20 MG C/L VISE (EXPOSITION DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> A GAUCHE ET <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> A DROITE) (N=3).....	62
FIGURE 31: VARIATION DE LA [AH] MESUREE PAR SPECTROFLUORIMETRIE DANS LE MILIEU CHU-10 POUR LES DIFFERENTES CONDITIONS D'EXPOSITION AU PT INORG. (0-200 µG/L) AU COURS DU TEMPS DE L'EXPERIENCE D'EXPOSITION DE <i>NITZSCHIA PALEA</i> POUR 10 MG C/L VISE (N=5)	62
FIGURE 32: CONCENTRATIONS EN PLATINE INORGANIQUE DETERMINEES EXPERIMENTALEMENT PAR ULTRAFILTRATION PARTIELLE (UF) DANS LE MHSM-1 AVEC 20 MG C/L D'AH EN DEBUT ET EN FIN D'EXPOSITION DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> ; PH=6 (N=3).....	65
FIGURE 33: CONCENTRATIONS EN PLATINE INORGANIQUE DETERMINEES EXPERIMENTALEMENT PAR ULTRAFILTRATION PARTIELLE(UF) DANS LE CHU-10 AVEC 10 MG C/L D'AH EN DEBUT ET EN FIN D'EXPOSITION DE <i>NITZSCHIA PALEA</i> ; PH=7 (N=3)	66
FIGURE 34: SPECTRE D'EMISSION D'UNE SOLUTION DE AH(III) (SUWANNEE RIVER : N°3S101H) DE 3 MG C/L MESURE PAR SPECTROFLUORIMETRIE ; PH=6 ; L'EXCITATION = 350 NM	67
FIGURE 35: COURBES DE CROISSANCE DE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS NOMINALES DE PLATINE INORGANIQUE DANS LE MILIEU MHSM-1, PH=6 (N=3)	70
FIGURE 36: COURBES DE CROISSANCE DE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS NOMINALES DE PLATINE INORGANIQUE EN PRESENCE DE 20 MG C/L D'AH DANS LE MILIEU MHSM-1, PH=6 (N=3).....	76
FIGURE 37: COURBE DOSE-REPONSE POUR <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> EXPOSEE AU PLATINE SANS AH DANS LE MILIEU MHSM-1 PENDANT 96 H ; PH=6 (N=3) (SOURCE: RIOUX (2018))	80
FIGURE 38: COURBE DOSE-REPONSE POUR <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> EXPOSEE AU PLATINE EN PRESENCE DE 10 MG C/L D'AH DANS LE MILIEU MHSM-1 PENDANT 96 H ; PH=6 (N=3) (SOURCE: RIOUX (2018)).....	81
FIGURE 39: COURBE DOSE-REPONSE POUR <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> EXPOSEE AU PLATINE EN PRESENCE DE 20 MG C/L D'AH DANS LE MILIEU MHSM-1 PENDANT 96 H ; PH=6 (N=3)	81

FIGURE 40: QUANTITE DE PLATINE INTERNALISE PAR CELLULE CHEZ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> AU BOUT DE 96 H EN EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'EXPOSITION MOYENNE EN PLATINE INORGANIQUE MESUREE PAR ULTRAFILTRATION PARTIELLE (N=3); COMPARAISON DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN AH	83
FIGURE 41: QUANTITE DE PLATINE INTERNALISE PAR CELLULE CHEZ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> AU BOUT DE 96 H EN EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'EXPOSITION MOYENNE EN PLATINE INORGANIQUE MESUREE PAR ULTRAFILTRATION PARTIELLE (N=3); COMPARAISON DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN AH (ECHELLE LOGARITHMIQUE)	85
FIGURE 42: FLUX D'INTERNALISATION DU PLATINE PAR <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> CALCULES POUR UNE EXPOSITION DE 96 H EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'EXPOSITION MOYENNE MESUREE EN PLATINE INORGANIQUE MESUREE PAR ULTRAFILTRATION PARTIELLE (N=3); COMPARAISON DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN AH (ECHELLE LOGARITHMIQUE).....	86
FIGURE 43: COURBE DOSE INTERNE-REPONSE POUR <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> EXPOSEE AU PLATINE DANS LE MILIEU MHSM-1 PENDANT 96 H ; PH=6 (N=3) ; COMPARAISON DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN AH	87
FIGURE 44: COURBES DE CROISSANCE DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS NOMINALES DE PLATINE INORGANIQUE EN L'ABSENCE D'AH DANS LE MHSM-1, PH=6 (N=3).....	88
FIGURE 45: COURBES DE CROISSANCE DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS ELEVEES DE PLATINE INORGANIQUE EN L'ABSENCE D'AH DANS LE MHSM-1, PH=6 (N=3).....	90
FIGURE 46: COURBES DE CROISSANCE DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS NOMINALES DE PLATINE INORGANIQUE EN PRESENCE DE 10 MG C/L D'AH DANS LE MILIEU MHSM-1, PH=6 (N=3).....	92
FIGURE 47: COURBES DE CROISSANCE DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE PLATINE INORGANIQUE FAIBLES EN PRESENCE DE 10 MG C/L D'AH DANS LE MILIEU MHSM-1, PH=6 (N=3)	93
FIGURE 48: COURBES DE CROISSANCE DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE PLATINE INORGANIQUE EN PRESENCE DE 20 MG C/L D'AH DANS LE MILIEU MHSM-1, PH=6 (N=3)	94
FIGURE 49: COURBE DOSE-REPONSE POUR <i>CHLORELLA FUSCA</i> EXPOSEE AU PLATINE SANS AH DANS LE MILIEU MHSM-1 PENDANT 96 H ; PH=6 (N=3).....	96
FIGURE 50: COURBE DOSE-REPONSE POUR <i>CHLORELLA FUSCA</i> EXPOSEE AU PLATINE EN PRESENCE DE 10 MG C/L D'AH DANS LE MILIEU MHSM-1 PENDANT 96 H ; PH=6 (N=3)	96
FIGURE 51: COURBE DOSE-REPONSE POUR <i>CHLORELLA FUSCA</i> EXPOSEE AU PLATINE EN PRESENCE DE 20 MG C/L D'AH DANS LE MILIEU MHSM-1 PENDANT 96 H ; PH=6 (N=3)	97
FIGURE 52: QUANTITE DE PLATINE INTERNALISE PAR CELLULE CHEZ <i>CHLORELLA FUSCA</i> AU BOUT DE 96 H EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'EXPOSITION MOYENNE EN PLATINE INORGANIQUE MESUREE PAR ULTRAFILTRATION PARTIELLE (N=3), COMPARAISON DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN AH.....	98
FIGURE 53: QUANTITE DE PLATINE INTERNALISE PAR CELLULE CHEZ <i>CHLORELLA FUSCA</i> AU BOUT DE 96 H EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'EXPOSITION MOYENNE MESUREE EN PLATINE TOTAL (N=3), COMPARAISON DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN AH.....	99

FIGURE 54: QUANTITE DE PLATINE INTERNALISEE PAR CELLULE CHEZ <i>CHLORELLA FUSCA</i> AU BOUT DE 96 H EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'EXPOSITION MOYENNE MESUREE EN PLATINE INORGANIQUE (N=3); COMPARAISON DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN AH (ECHELLE LOGARITHMIQUE).....	100
FIGURE 55: FLUX D'INTERNALISATION DU PLATINE PAR <i>CHLORELLA FUSCA</i> CALCULES POUR UNE EXPOSITION DE 96 H EN EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'EXPOSITION MOYENNE MESUREE EN PLATINE INORGANIQUE MESUREE PAR ULTRAFILTRATION PARTIELLE (N=3); COMPARAISON DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'AH.....	101
FIGURE 56: COURBE DOSE INTERNE-REPOSE POUR <i>CHLORELLA FUSCA</i> EXPOSEE AU PLATINE DANS LE MILIEU MHSM-1 PENDANT 96 H ; PH=6 (N=3) ; COMPARAISON DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN AH	103
FIGURE 57: MODELE CONCEPTUEL DES INTERACTIONS METAL ORGANISME, M : METAL ; L : LIGAND ; K ET K : CONSTANTES ; X : SITE DE TRANSPORT MEMBRANAIRE ; ADAPTE DE CAMPBELL <i>ET AL.</i> (2002).....	105
FIGURE 58: DENSITE RELATIVE DE CULTURES DE <i>NITZSCHIA PALEA</i> POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'EXPOSITION NOMINALES EN PLATINE INORGANIQUE DANS LE CHU-10 A PLUSIEURS TEMPS DE MESURE ; PH=7 (N=3).....	109
FIGURE 59: SCHEMA GENERAL DE LA CIRCULATION DE METAUX DANS UNE CELLULE ALGALE (MORIN <i>ET AL.</i> , 2012)	111
FIGURE 60: COURBES DE CROISSANCE OBTENUES POUR <i>NITZSCHIA PALEA</i> EXPOSEE AU PLATINE EN L'ABSENCE D'AH DANS DANS LE CHU-10 MODIFIE PH=7 (N=5).....	118
FIGURE 61: COURBES DE CROISSANCE OBTENUES POUR <i>NITZSCHIA PALEA</i> EXPOSEE AU PLATINE EN PRESENCE DE 10 MG C/L D'AH DANS LE CHU-10 MODIFIE, PH=7 (N=5)	119
FIGURE 62: SCHEMA RECAPITULATIF ET SIMPLIFIE DES MECANISMES INTRACELLULAIRES MIS EN JEU PAR LES ALGUES SUITE A UNE EXPOSITION AU PLATINE, ARN ETUDIES CORRESPONDANTS EN ITALIQUE.	127
FIGURE 63: SUIVI DE LA CONCENTRATION EN PLATINE DANS DES ERLNMEYERS EN POLYCARBONATE LORS DE L'EXPOSITION DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> EN L'ABSENCE D'AH DANS LE MILIEU MHSM-1; PH=6 (N=3).....	142
FIGURE 64: COURBES DE CROISSANCE TEMOINS DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> AVEC ET SANS AH DANS LE MILIEU MHSM-1, PH=6 (N=3)	143
FIGURE 65: COURBES DE CROISSANCE DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> EXPOSEES A 100 µG/L DE PLATINE. COMPARAISON AVEC ET SANS AH DANS LE MILIEU MHSM-1, PH=6 (N=3)	144
FIGURE 66: COURBES DE CROISSANCE DE LA DIATOMEE <i>NITZSCHIA PALEA</i> EXPOSEE A UNE GAMME DE CONCENTRATION DE PLATINE DANS LE MILIEU CHU-10 MODIFIE, PH=7 (N=3).....	147
FIGURE 67: COURBES DE CROISSANCE DE LA DIATOMEE <i>NITZSCHIA PALEA</i> EXPOSEE A DU PLATINE DANS LE MILIEU CHU-10 MODIFIE, PH=7 (N=3)	148
FIGURE 68: COURBES DE CROISSANCE DE <i>NITZSCHIA PALEA</i> DANS LE CHU-10 AVEC ET SANS TAMPON MES ; PH=6,4 (N=1).....	150
FIGURE 69: SUIVI DU PH AU COURS DU TEMPS POUR L'EXPERIENCE D'EXPOSITION DE <i>NITZSCHIA PALEA</i> AU PLATINE PENDANT 28 JOURS DANS LE MILIEU CHU-10 MODIFIE (MESURE REALISEE DANS UN SEUL DES ERLNMEYERS)	151

FIGURE 70: NOMBRE DE CELLULES EN FONCTION DU VOLUME DE CULTURE ALGALE POUR DEUX METHODES DE COMPTAGE CHEZ <i>NITZSCHIA PALEA</i> DANS LE MILIEU CHU-10 (N=1)	153
FIGURE 71: COMPARAISON DU NOMBRE DE CELLULES ET INCERTITUDES OBTENUES PAR DEUX METHODES DE COMPTAGE CHEZ <i>NITZSCHIA PALEA</i> DANS LE MILIEU CHU-10 (N=10)	153

LISTE DES ÉQUATIONS

ÉQUATION 1: CALCUL DE LA DENSITE CELLULAIRE D'UNE CULTURE	35
ÉQUATION 2: CALCUL DE LA DENSITE CELLULAIRE RELATIVE	36
ÉQUATION 3.....	43
ÉQUATION 4.....	43
ÉQUATION 5.....	44
ÉQUATION 6: EQUATION DE COURBE DOSE-REPONSE.....	48
ÉQUATION 7: CALCUL DE LA PROPAGATION D'INCERTITUDE LORS DE LA DETERMINATION D'UNE DENSITE CELLULAIRE RELATIVE	49
ÉQUATION 8: CALCUL DE LA DIFFERENCE DES MOMENTS DE SORTIE	55
ÉQUATION 9: CALCUL DU FACTEUR D'INDUCTION FI	56
ÉQUATION 10: FONCTION DE MODELISATION DES FLUX D'INTERNALISATION; MODELE DETERMINISTE DE MICHAELIS- MENTEN.....	102

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AF : acide(s) fulvique(s)

AH : acide(s) humique(s)

ARN : acide(s) ribonucléique(s)

ARNm : ARN messenger

ATP : adénosine triphosphate

BLM: modèle du ligand biotique

CE50: concentration efficace 50%

COD : carbone organique dissous

COT : carbone organique total

EDTA: acide éthylènediaminetétraacétique

EGP : éléments du groupe platine

EOMI : diatomée *Eolimna minima*

ERO : espèce(s) réactive(s) de l'oxygène

FI : facteur d'induction

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

LD : limite de détection

LQ : limite de quantification

MES : acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique

MON : matière organique naturelle

ND : non déterminé

NPAL : diatomée *Nitzschia palea*

P53 : tumor protein 53

PC : polycarbonate

PCR : polymerase chain reaction

Pd : palladium

PES : polyéther sulfone

PP : polypropylène

Pt : platine

RT : rétro transcription

UF : ultrafiltration partielle

CHAPITRE 1: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Éléments du Groupe Platine : EGP

Les éléments du groupe platine sont des métaux de transition rares qui sont aujourd'hui très convoités pour leurs caractéristiques particulières et les nombreuses utilisations qui en découlent. Il s'agit d'un groupe de six éléments : platine, palladium, rhodium, ruthénium, osmium et iridium (Figure 1).

Tableau périodique des éléments. Le groupe platine (éléments 44 à 49) est mis en évidence par une bordure rouge.

1																	18	
1	H																	2
	Li	Be											B	C	N	O	F	10
	Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	18
19	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
37	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
55	Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
87	Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Uut	Fl	Uup	Lv	Uus	Uuo
57	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu			
89	Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr			

Figure 1: Tableau périodique des éléments

Ils ont un grand intérêt en industrie en raison de leurs propriétés catalytiques et notamment le fait qu'ils ne s'oxydent pas, même à haute température. Leur demande mondiale a donc fortement augmenté ces dernières années, pour atteindre environ 225 à 230 tonnes/an (Johnson Matthey, 2013). Ils peuvent néanmoins être toxiques pour certains organismes, c'est pourquoi il y a un intérêt nouveau en écotoxicologie. Le platine, le palladium et le rhodium sont les plus étudiés de la catégorie, car ce sont les plus

utilisés. En conséquence, ils sont retrouvés dans les milieux naturels et les organismes, ce qui entraîne une inquiétude sur le plan écologique, mais également pour la santé humaine.

1.2 Sources et utilisations des EGP

1.2.1 Naturelles

Les éléments du groupe platine sont des métaux rares qui ne sont présents qu'en très faible quantité dans la croûte terrestre : 0,05 à 0,4 µg/g d'après Wedepohl (1995). Contrairement aux autres métaux, l'érosion de la roche mère n'est pas la première source d'EGP dans l'environnement. En effet, Barbante *et al.* (2001) ont étudié la contamination en EGP dans des carottes glacières datant d'il y a sept mille ans. Les auteurs ont montré que, naturellement, la part d'EGP provenant des sols et de la roche mère ne correspondait qu'à environ 0,2 à 0,4% des EGP retrouvés dans la glace. Il semblerait que les éruptions causées par des épisodes d'activité volcanique soient être la source naturelle principale de ces éléments (Ravindra *et al.*, 2004) : ce phénomène entraîne une contamination en EGP de l'atmosphère. En effet, ils peuvent s'adsorber sur des particules fines et ainsi voyager sur de grandes distances. Quelle qu'en soit leur provenance, ces éléments atteignent ensuite les eaux de surface par des retombées sèches ou humides. Si ces poussières sont déposées sur le sol, elles peuvent quand même rejoindre le compartiment aquatique par ruissellement. Pour évaluer la contribution anthropique de la façon la plus juste possible, il serait indispensable de soustraire ce bruit de fond de leur présence naturelle. Mais, les EGP étant des éléments rares, leurs concentrations naturelles dans les eaux douces sont quasi-systématiquement en dessous des limites de quantification des appareils de mesure actuels.

1.2.2 Anthropiques

Cependant, la présence de ces métaux dans le milieu naturel est aussi le résultat des activités humaines, surtout que les EGP ont de nombreuses sources anthropiques qui en font aujourd'hui des contaminants d'intérêt.

La Figure 2, qui regroupe des informations issues de la synthèse de Johnson Matthey (2013), fait un point sur la demande mondiale en EGP par domaine d'activité. Ce diagramme met en évidence que les catalyseurs automobiles en sont la première source.

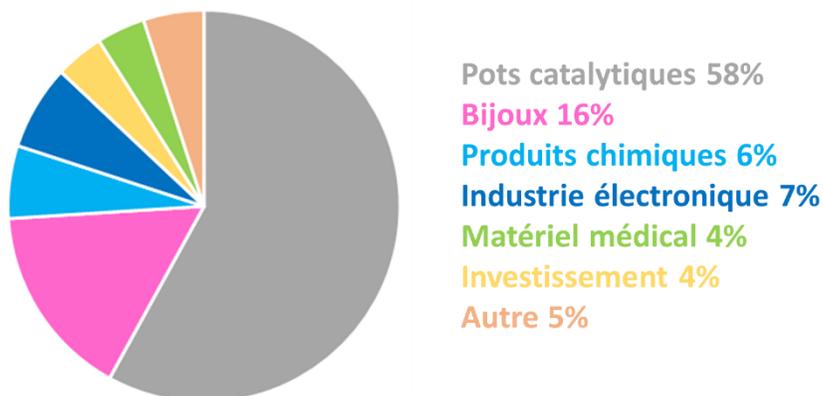


Figure 2: Demande mondiale en EGP en 2012.
Données tirées de Johnson Matthey 2013

C'est également en le cas pour le platine. En effet, la Figure 3 montre qu'environ 45% de la demande mondiale du platine est liée à la fabrication de pots catalytiques. De plus, les autres secteurs d'activités importants comme les bijoux et également l'investissement sont beaucoup moins susceptibles d'entraîner une

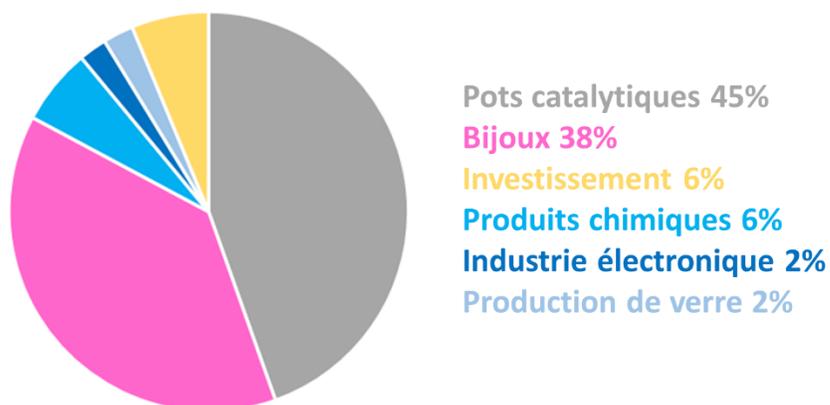


Figure 3: Demande mondiale en platine en 2012.
Données tirées de Johnson Matthey 2013

contamination de l'environnement puisque ces métaux sont alors conservés et/ou recyclés. D'après Johnson Matthey (2013) il y a également une part de recyclage du platine correspondant à environ un tiers de la demande brute pour ce métal. Dépendamment de la durée de vie du véhicule, il y aurait jusqu'à 2000 g d'EGP par tonne de céramique de pots catalytiques et les procédés de récupération permettraient plus de 95% de rendement (de Aberasturi *et al.*, 2011; Hagelüken, 2012).

1.2.2.1 Pots catalytiques

Dans les années 70-80, avec le nombre croissant de véhicules, les rejets de contaminants provenant des gaz d'échappement sont devenus très importants. Dans un souci de réduire les émissions, les constructeurs ont mis en place un système de pots

catalytiques utilisant des métaux précieux en petite quantité afin de catalyser les réactions de ces gaz jusqu'à combustion complète. L'objectif était d'obtenir des rejets de dioxyde de carbone, d'eau et de diazote seulement. Pour ce faire, plusieurs types de pots catalytiques contenant des EGP se sont succédés dans le temps. La Figure 4 montre une frise chronologique simplifiée de l'historique des convertisseurs catalytiques depuis les années 70. Dorénavant, le plus commun est le « three way catalyst » : TWC : Le platine et le palladium servent à oxyder le monoxyde de carbone et les hydrocarbures. Le rhodium sert à réduire les oxydes d'azote. Grâce à cette technologie, les émissions de ces composés sont de nos jours réduites d'environ 90% (Morton *et al.*, 2001).

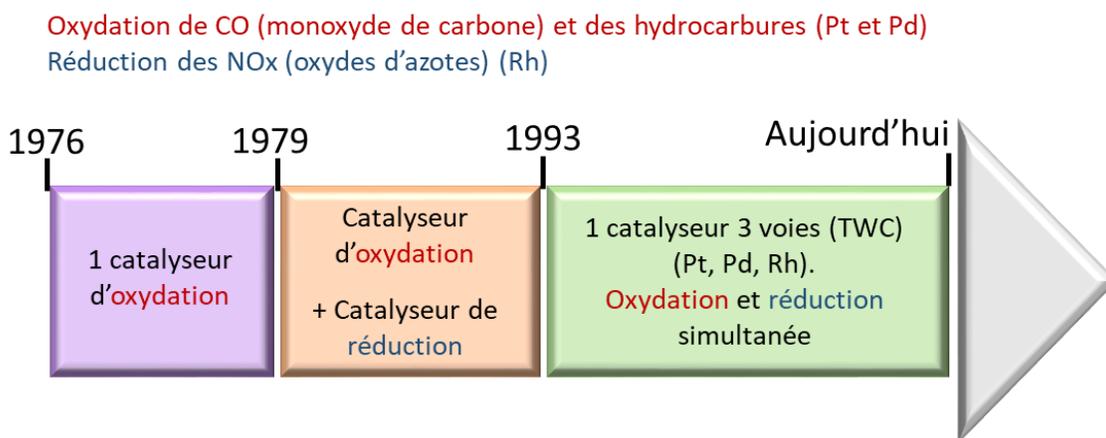


Figure 4: Schéma simplifié de l'historique de l'utilisation des différents types de pots catalytique

Plus précisément, les pots catalytiques sont aujourd'hui constitués d'un support de cordiérite ($\text{Al}_3\text{Mg}_2\text{AlSi}_5\text{O}_{18}$) en forme de nid d'abeille (Figure 5) sur lequel un revêtement intérieur poreux de γ -alumine sert de support à des particules métalliques d'EGP de 1 à 10 nm (Barefoot, 1997; Ravindra *et al.*, 2004). Les concentrations de ces métaux précieux dépendent des constructeurs, mais le pot catalytique moyen d'une voiture familiale contient environ 1,75 g d'EGP (Van Loon & Barefoot, 1991).

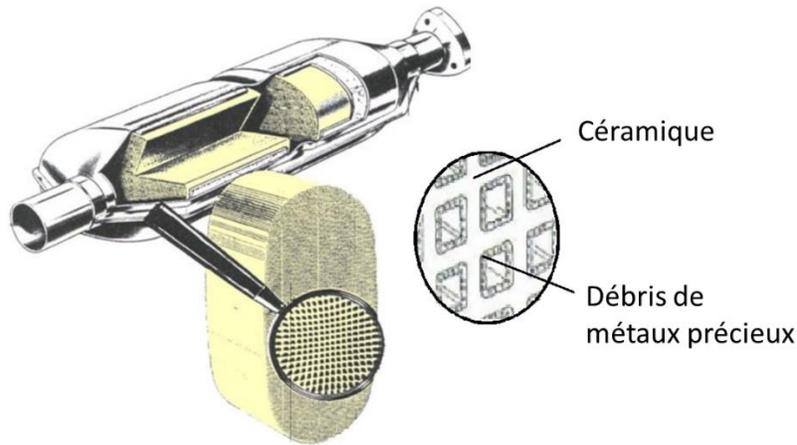


Figure 5: Schéma d'un pot catalytique (modifié de la présentation d'Anouk Galtayries, maître de conférence à l'ENSCP (Chimie Paris))

Ces métaux ont la capacité d'adsorber des gaz à leurs surfaces sans que l'adhérence ne soit assez importante pour retarder les réactions à la surface. Ainsi, les vitesses de certaines réactions chimiques de ces gaz sont grandement accélérées par la présence d'EGP, d'autant plus que, même à très haute température, ces métaux ne s'oxydent pas (Fortin *et al.*, 2011).

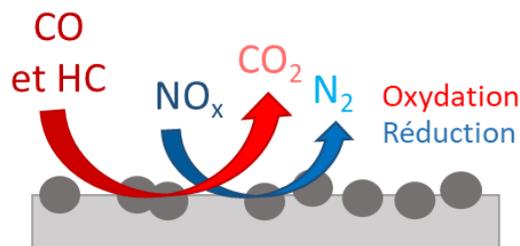


Figure 6: Schéma explicatif du rôle de catalyseurs des EGP

La problématique liée à cette utilisation est que pendant la durée de vie des véhicules, une abrasion du revêtement intérieur du pot entraîne l'émission de particules d'aluminium sur lesquelles des nanocristaux d'EGP sont attachés. Cela amène à la contamination des environnements urbains et périurbains, *via* les poussières de route qui contiennent, entre autres, ces métaux. Les pots catalytiques sont à l'origine d'une contamination locale,

notamment des sols au bord des axes routiers fréquentés (Ely *et al.*, 2001), mais également globale. En effet, les EGP peuvent voyager sur de grandes distances car ils peuvent être adsorbés sur des particules fines et emportés par les vents. Ainsi, ils finissent, éventuellement, par contaminer même les endroits les moins anthropisés de la planète. Barbante *et al.* (2001) ont montré que la contamination en EGP dans des carottes de neige au Groenland provenait de l'utilisation de pots catalytiques dans le monde. Une autre étude a également montré l'origine anthropique d'EGP retrouvés sur le continent antarctique (Soyol-Erdene *et al.*, 2011).

1.2.2.2 Industrie pharmaceutique

Les effluents hospitaliers sont à l'origine de la contamination des eaux par de nombreux composés chimiques, mais sont également une source non négligeable de platine. En effet, ce métal est utilisé dans des molécules actives de médicaments anti-cancer et notamment dans les chimiothérapies, pour ses propriétés d'inhibiteur la division cellulaire (Jakupec *et al.*, 2003). La Figure 7 montre deux molécules chimiques actives utilisées dans ces médicaments et qui, depuis leur introduction dans les années 70, ont montré leur grande efficacité sur de nombreux types de tumeurs (Jakupec *et al.*, 2003; Kümmerer & Helmers, 1997).

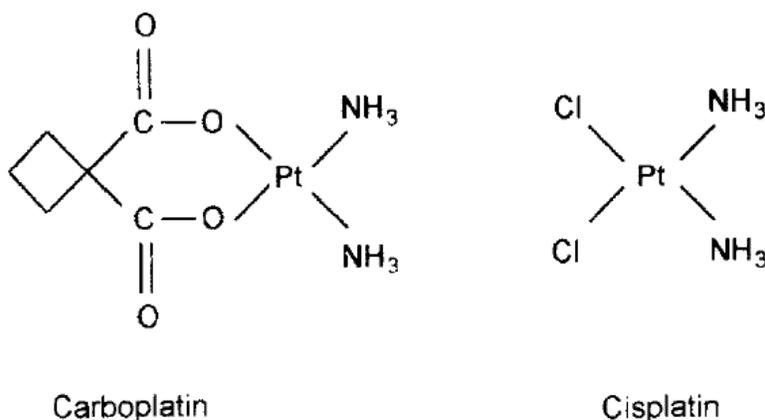


Figure 7: Structure chimique des médicaments anti-cancéreux à base de platine les plus utilisés en milieu hospitalier. Source : Kümmerer and Helmers (1997)

Après ces traitements, le platine est excrété par les patients, que ce soit pendant leur séjour à l'hôpital, ou par la suite, à domicile. En effet, environ 30% du platine est éliminé sur le long terme. La plupart des effluents hospitaliers sont rejetés dans les réseaux d'eaux usées classiques. Le platine, qu'il provienne de sources domestiques ou hospitalières, se retrouve donc dilué avec le reste des eaux usées. Cependant, les stations d'épuration n'ont pas de traitements spécifiques permettant la récupération de ce métal (Kümmerer & Helmers, 1997), bien que les procédés soient très variables et dépendent fortement de la zone géographique. Ainsi, de par son affinité avec les sédiments, le platine devrait majoritairement finir dans les boues des stations d'épuration ainsi que dans les eaux traitées rejetées en rivière. L'épandage éventuel de boues en tant qu'engrais dans l'agriculture et la présence de platine dans les eaux de rejet peuvent contribuer à la contamination en platine de l'environnement.

1.2.2.3 Mines

Les activités d'extraction minière de ces composés, mais aussi d'autres métaux, peuvent être une source de ces éléments dans l'environnement. Notamment, l'extraction de nickel et de chrome s'avère augmenter les concentrations d'EGP retrouvées dans des échantillons environnementaux (Morrisson, 2008). Cependant, les émissions d'EGP dans l'environnement par les activités d'extraction minière n'ont pas été réellement quantifiées.

1.2.2.4 Les Industries

Les propriétés particulières des métaux du groupe platine en font des éléments recherchés pour de nombreuses utilisations industrielles. Ils sont très résistants à la corrosion chimique sur une grande gamme de température et ont un très haut point de fusion. De plus, leur grande résistance mécanique et leur bonne ductilité les rend particulièrement intéressants pour de nombreux domaines (Ravindra *et al.*, 2004) tels que l'industrie électronique. Les EGP sont également utilisés comme catalyseurs ou intermédiaires dans de nombreuses réactions chimiques réalisées à l'échelle industrielle. Finalement, toutes ces utilisations peuvent mener à une contamination de l'environnement par ces métaux *via* des rejets atmosphériques ou des effluents, bien que les pertes soient minimisées en raison de la valeur marchande de ces éléments. Ainsi,

les industries représentent une source de platine dans l'environnement moindre comparée à l'utilisation des pots catalytiques.

1.3 Risques pour la santé humaine

La dispersion globale de ces éléments, normalement rares à la surface de la croûte terrestre, peut amener à se questionner sur les risques pour la santé humaine. En effet, ils sont présents dans les plantes et les animaux et peuvent atteindre les humains par la voie alimentaire. Par exemple, les cultures destinées à l'alimentation qui sont à proximité des autoroutes peuvent être une source de ces éléments dans l'alimentation humaine. De plus, la fertilisation des cultures par des boues de station d'épuration peut contribuer à l'apport d'EGP dans les aliments. En effet, Schäfer *et al.* (1998) ont montré l'accumulation d'EGP dans des plantes supérieures.

De plus, jusqu'à 36% des particules d'EGP et d'oxydes d'aluminium émises par les pots catalytiques sont inférieures à 3 µm et peuvent donc atteindre les alvéoles pulmonaires (König *et al.*, 1992) et pourrait engendrer des réactions allergiques immunitaires chez l'homme (Paolucci *et al.*, 2007). En effet, ces propriétés allergisantes du platine sont bien connues, et cela se fait notamment via un impact sur les cellules dendritiques dont le rôle est de présenter les antigènes et qui sont à l'origine du déclenchement de réactions immunitaires. Cependant les composés allergisants seraient plutôt des chloro-complexes (hexachloro ou tétrachloro), qui ne correspondent pas aux formes émises par les pots catalytiques (Cleare, 1977).

1.4 Devenir dans l'environnement

L'utilisation d'EGP dans tous ces domaines induit une contamination de l'environnement à l'échelle locale, mais aussi globale. Les Tableau 1 et Tableau 2 sont respectivement des récapitulatifs des concentrations de platine et de palladium retrouvées dans l'environnement et sont issus de la revue de littérature de Jackson *et al.* (2007). Notamment pour le platine, la concentration totale maximale mesurée dans une eau de rivière et répertoriée dans cette publication est de 34,6 µg/L (Odiyo *et al.*, 2005). Mais,

pour la catégorie des effluents hospitaliers, cette valeur maximale grimpe jusqu'à 145 µg/L (Lenz *et al.*, 2005). Les valeurs déterminées sont néanmoins très variables selon la localisation et le moment. D'ailleurs les échantillonnages réalisés dans deux rivières dans la ville de Québec par Roy (2009) ont permis de détecter des concentrations de l'ordre du ng/L.

Tableau 1 Récapitulatifs des concentrations en platine retrouvées dans l'environnement, d'après Jackson *et al.* (2007)

A summary of the mean and range of published Pt values in environmental samples

Material (references)	N	Min	Mean	Max
Car exhaust fumes (a) µg m ⁻¹	6	N/A	0.00004	N/A
Hospital effluent (b) µg l ⁻¹		0.1		145.0
Airborne particles (c) µg m ⁻³	368	0.0000006	0.0000060	0.0000570
Road dust (d) ppb	223	0.4	128.3	2252.0
Soil (e) ppb	277	0.0	20.3	330.0
Grass (f) ppb	5	1.2	5.1	1.7
Gully pot sediment (g) ppb	23	3.5	8.0	155.0
Sewage sludges (h) ppb	121	nd	63.3	266.0
Incineration ash (i) ppb	8	60.9	N/A	393.0
River water (j) µg l ⁻¹	11	0.0102	4.620	34.60
River and lake sediments (k) ppb	33	1.0	24.1	103.8
Marine sediments (l) ppb	14	0.1	4.2	12.5

N: number of samples analysed. nd: below detection. N/A: information not available.

Tableau 2: Récapitulatifs des concentrations en palladium retrouvées dans l'environnement, d'après Jackson *et al.* (2007)

A summary of the mean and range of published Pd values in environmental samples

Material (references)	N	Min	Mean	Max
Car exhaust fumes (a) µg m ⁻¹	6		0.000028	
Airborne particles (c) µg m ⁻³	368	0.0000008	0.0000100	0.0001510
Road dust (d) ppb	223	0.0	106.4	556.3
Soil (e) ppb	277	0.0	18.8	125.9
Grass (f) ppb	5	1.2	2.9	8.6
Gully pot sediment (g)	23	N/A	N/A	N/A
Sewage sludges (h) ppb	121	nd	35.8	560.0
Incineration ash (i) ppb	8	161.0	N/A	2360.0
River water (j) µg l ⁻¹	11	0.000	0.939	5.900
River and lake sediments (k) ppb	33	0.1	11.7	61.2
Marine sediments (l) ppb	14	0.5	11.8	39.9

N: number of samples analysed. nd: below detection. N/A: information not available.

1.4.1 Devenir en milieu aquatique

La spéciation désigne les formes chimiques et structurales sous lesquelles se trouve un élément en solution. Les EGP, longtemps peu étudiés dans l'environnement car considérés comme inertes, sont en réalité présents sous plusieurs formes en milieux aquatiques. Notamment, ceux qui sont émis par les pots catalytiques sont principalement liés à des oxydes d'aluminium provenant de la structure en nid d'abeille du pot, mais aussi à d'autres oxydes de métaux (Palacios *et al.*, 2000). Une fraction de 1% des EGP émis par les pots catalytiques serait soluble dans l'eau selon Artelt *et al.* (2000) et environ 10% de ces composés émis sous forme particulaire et soluble pourraient être bioaccumulés (Paolucci *et al.*, 2007).

1.5 Impacts sur les organismes aquatiques

Dans le but de mieux comprendre les risques que pose cette contamination aux EGP, plusieurs études se sont intéressées à leur impact sur le milieu naturel et notamment sur des organismes aquatiques.

1.5.1 Accumulation

Les EGP présents dans le milieu aquatique peuvent être bioaccumulés par certaines espèces. C'est notamment le cas chez l'isopode *Asellus aquaticus* comme le montrent plusieurs articles (Moldovan *et al.*, 2001; Rauch & Morrison, 1999). Cet animal est un bon indicateur de la contamination par ces métaux, car il vit à la surface des sédiments et que les EGP ont tendance à s'accumuler dans ceux-ci. Les facteurs de bioaccumulation (concentration dans l'animal dépuré / concentration dans l'eau) déterminés par Moldovan *et al.* (2001) sont de 150, 85 et 7 respectivement pour le palladium, le platine et le rhodium. Les isopodes échantillonnés en milieu naturel. L'accumulation des EGP par ces crustacés s'est donc avérée quantifiable alors que leur concentration dans l'eau des sites échantillonnés n'était pas détectable. L'ordre de bioaccumulation était aussi le suivant : Pd > Pt > Rh avec des concentrations de platine retrouvées dans *Asellus aquaticus* de 38 ± 35 ng/g de poids sec. Rauch and Morrison (1999) se sont intéressés plus précisément à l'accumulation du platine chez ce même organisme et à sa répartition. De

50 à 85% de métal était présent dans le système digestif de l'animal et de 50 à 75% du reste (après dépuración) était accumulé dans l'exosquelette.

Plusieurs espèces ont été utilisées comme modèles d'études pour l'accumulation des EGP et Sures *et al.* (2005) ont montré que le parasite *Pomphorhynchus laevis* était un meilleur outil de détection des EGP que son hôte le poisson *Barbus barbus*.

Les EGP s'accumulent également chez les végétaux et notamment les plantes supérieures, l'exposition étant plus importante sur les bords des axes routiers fréquentés (Schäfer *et al.*, 1998). D'autres études se sont intéressées à l'accumulation et à la toxicité des EGP chez des producteurs primaires. Notamment, Shams *et al.* (2014) ont montré que l'accumulation des EGP chez *Chlorella stigmatophora* était plus importante pour le rhodium, et plutôt similaire entre platine et palladium. De plus, Roy (2009), Tétraut (2014) et Rioux (2018) se sont intéressés à la toxicité du platine pour l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. Les résultats de ces travaux suggèrent que les concentrations environnementales sont relativement faibles comparées aux valeurs de CE50 (concentration efficace 50%) déterminées. Cependant, certains paramètres comme le pH, les concentrations en cations majeurs ainsi que la présence d'acide humique (AH) peuvent modifier l'impact du platine chez cette algue verte. En particulier, les travaux de Racine (2016) montrent qu'environ la moitié du platine et le palladium accumulé chez cette algue verte se retrouvent dans la fraction cellulaire sensible correspondant aux organites cellulaires. C'est un pourcentage beaucoup plus élevé que celui rapporté pour d'autres métaux et notamment les lanthanides, qui étaient étudiés en parallèle dans ce projet de maîtrise. Cette accumulation d'EGP dans les organismes, et notamment dans ces fractions subcellulaires sensibles, peut entraîner une toxicité voire une mortalité des cellules. La plupart des publications s'intéressent à l'accumulation et à la toxicité et s'appliquent à faire le lien entre les deux.

1.5.2 Toxicité

L'accumulation des EGP chez les organismes vivants peut entraîner une toxicité voire une mortalité des individus. La toxicité de ces éléments a été montrée sur différentes espèces et notamment pour les organismes du biofilm (Rauch *et al.*, 2004), sur des

algues vertes (Rioux, 2018; Roy, 2009; Tétrault, 2014) ou sur *Daphnia magna* (Biesinger & Christensen, 1972). Les travaux de Roy (2009) montrent des inhibitions de la croissance algale chez *Chlamydomonas reinhardtii* exposée à des concentrations en platine inférieures à 100 µg/L. De plus, Rioux (2018) a démontré une toxicité exacerbée du platine en présence d'acides humiques chez cette même espèce, ce qui pose la question des effets du platine dans des conditions environnementales.

Dans la littérature, le platine est souvent documenté comme l'EGP le plus toxique. Malgré cela, le palladium, qui est retrouvé à de plus grandes concentrations dans l'environnement et s'accumule plus dans les organismes aquatiques que le platine, semble poser un risque écologique plus important (Fortin *et al.*, 2011). En effet, les études s'intéressant à des échantillonnages d'organismes sur le terrain montrent souvent une bioaccumulation de palladium beaucoup plus importante par rapport aux autres EGP, même si des exceptions sont documentées (Moldovan *et al.*, 2001). De plus, les travaux de Vannini *et al.* (2011) montrent des effets de dégénération cellulaire provoqués par le palladium chez *Pseudokirchneriella subcapitata* à des niveaux d'exposition de 0,5 mg/L de K₂PdCl₄, un sel de palladium soluble. Un impact important sur les chloroplastes avait été déterminé par analyses protéomiques. Cela avait été expliqué par une accumulation de précipités de palladium qui avait été observée au microscope électronique par les auteurs au niveau de ces chloroplastes.

1.6 Interactions avec la matière organique naturelle.

La matière organique naturelle (MON) est une mixture hétérogène de macromolécules dissoutes. Elle provient de la décomposition d'êtres vivants et de leurs déchets et est ubiquiste dans les eaux naturelles. Deux types de molécules se distinguent : les acides humiques (AH) et fulviques (AF), qui ne sont en réalité séparés que par un critère de solubilité à pH acide. Comme conséquences à ces conditions d'extraction, les molécules ont des caractéristiques générales différentes dont la taille : la limite entre ces deux catégories est d'environ 2000 Da. Les AF, plus petits, sont également plus aliphatiques (Thurman, 1985). Les substances humiques peuvent interagir avec les contaminants et

notamment complexer les métaux, modifiant ainsi leur spéciation dans les eaux naturelles et donc leurs impacts éventuels sur les organismes vivants (Reuter & Perdue, 1977).

Dans le milieu naturel, la plupart de rivières et lacs ont des concentrations allant de 0,5 à 10 mg C/L, mais certains avec des eaux plus troubles, peuvent avoir des concentrations jusqu'à 30 mg C/L. C'est le cas de la rivière Suwannee, aux États-Unis qui est connue pour ses eaux très sombres, chargées en MON (Figure 8). C'est d'ailleurs de cette rivière que provient la matière organique utilisée pour les expériences en laboratoire au cours de ce projet. Dans des marais ou autres systèmes aquatiques très concentrés en substances humiques, des concentrations jusqu'à 60 mg C/L ont été mesurées (Thurman, 1985).

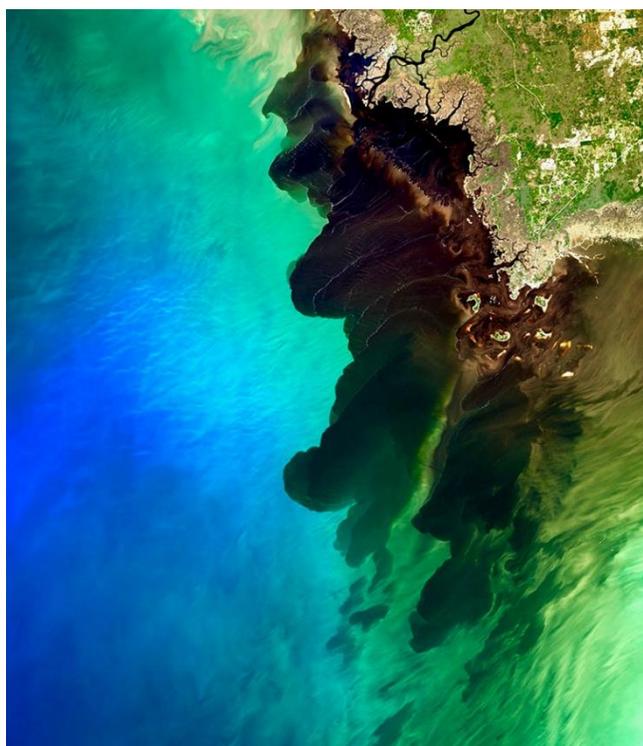


Figure 8: Delta de la rivière Suwannee et Golfe du Mexique (source: NASA)

En milieu aquatique naturel, la MON a une forte influence sur la répartition et la mobilité des espèces chimiques en solution, et notamment des métaux (Reuter & Perdue, 1977). Des études toxicologiques ont aussi montré que la toxicité de certains métaux, comme le cuivre, était ainsi modifiée par la présence de substances humiques (Macoustra *et al.*, 2019; McIntyre & Guéguen, 2013).

D'après le modèle de l'ion libre (Campbell *et al.*, 2002), l'internalisation d'un métal, et donc la réponse biologique associée, dépendent seulement de la concentration en ion métallique libre, M^{z+} , lorsque tous les autres facteurs sont gardés constants. La présence d'un ligand organique en solution devrait donc, en théorie, protéger les organismes vivants exposés, en diminuant la concentration d'ion libre. Cependant, ce n'est pas toujours le cas. Quelques études portant sur les métaux et la MON présentent des résultats contradictoires. Dans la littérature, des exemples de toxicité diminuée ou

exacerbée en présence de MON sont répertoriés. En effet, à titre d'exemple, une diminution de la toxicité du cuivre chez l'algue unicellulaire *Monochrysis lutheri* a été observée par Sunda & Lewis (1978) en présence de matière organique naturelle, validant les hypothèses théoriques du modèle de l'ion libre. Macoustra *et al.* (2019) montrent également un effet protecteur de la MON qui diminue la toxicité du cuivre chez l'algue *Chlorella sp.*, mais les résultats sont très variables selon les différentes origines de la MON. Finalement, ces derniers auteurs concluent que la toxicité du cuivre en présence de carbone organique dissous (COD) provenant de matière organique récoltée en Australie ne serait pas seulement expliquée par la concentration en métal libre. Dans ce même article, ils ont mis en évidence que l'origine et la composition de la matière organique modifie non seulement la complexation d'un métal, mais également la réponse biologique. D'autres études montrent une toxicité exacerbée en présence de substances humiques comme le suggèrent les résultats de Rahal (2018). L'auteure établit que l'internalisation et la toxicité du lanthane sont plus importantes en présence d'AH chez l'algue verte *Chlorella fusca*, allant à l'encontre du modèle de l'ion libre. Le modèle n'est pas respecté non plus pour l'aluminium en présence d'acides fulviques chez cette même algue verte (Parent *et al.*, 1996). Par ailleurs, Campbell (1995) fait une critique du modèle de l'ion libre en citant plusieurs exemples le confortant et d'autres qui sont contradictoires. Ce modèle permet d'expliquer et de modéliser la toxicité des métaux dans de nombreux cas, et notamment pour des données issues de mesures sur le terrain, mais la détermination des exceptions et l'étude de ce qui se passe dans ces cas-là pourrait permettre de le compléter dans le futur.

Pour parler plus particulièrement des EGP, d'après Dubiella-Jackowska *et al.* (2009), la présence d'acides humiques et fulviques modifie leur biodisponibilité en solution. L'étude de l'accumulation de ces composés chez des plantes aquatiques, en culture hydroponique par Diehl and Gagnon (2007), a démontré que *Peltandra virginica*, une plante semi-immersée, accumulait moins de platine en présence de ligands organiques. Au contraire, la plante immergée *Elodea canadensis* accumulait, quant à elle, plus de platine dans ses racines dans ces conditions. L'effet de ces macromolécules organiques sur les mécanismes d'accumulation des végétaux semble donc varier d'une espèce à l'autre. Les travaux de Rioux (2018) sur les EGP vont également à l'encontre des

hypothèses du modèle de l'ion libre et montrent une augmentation de l'accumulation et de la toxicité du platine chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* en présence d'acides humiques. Tous ces résultats contradictoires entre les différentes espèces soulignent l'importance de continuer à examiner le rôle des ligands organiques dans la biodisponibilité des EGP. Puisque l'influence de la présence de matière organique diffère d'un organisme à l'autre pour le même métal d'intérêt, des études cas par cas seraient nécessaires. Un approfondissement des mécanismes d'accumulation des métaux par les cellules permettrait aussi une meilleure compréhension de ces résultats hétérogènes.

Certaines des caractéristiques des substances humiques leur permettent d'interagir avec les membranes cellulaires des organismes aquatiques. Par exemple, les AH sont des surfactants naturels avec des caractéristiques amphiphiles. Ils s'adsorbent et s'accumulent dans la phycosphère des cellules algales (Campbell *et al.*, 1997) et ils peuvent s'insérer dans les phospholipides de la membrane cellulaire (Lamelas *et al.*, 2005; Vigneault *et al.*, 2000). Ceci expliquerait que la présence de MON change la perméabilité de la membrane plasmique. Par contre il semblerait que les membranes cellulaires puissent arriver à saturation d'adsorption de ces composés à relativement basses concentrations (à partir de 5 mg C/L) comme le suggèrent les résultats de Campbell *et al.* (1997) sur *Chlorella fusca* (de son ancien nom *Chlorella pyrenoidosa*) et la cyanobactérie *Synechococcus leopoliensis* pour des molécules d'acides fulviques. Par ailleurs, la quantité d'acides humiques adsorbée sur la membrane biologique est dépendante du pH : à pH faible, la protonation de la membrane diminue les répulsions électrostatiques entre celle-ci et la MON, facilitant l'adsorption de ces composés (Boullemant *et al.*, 2011; Campbell *et al.*, 1997).

Toutes ces caractéristiques ainsi que la grande variabilité de molécules qui sont englobées dans cette catégorie de substances humiques sont probablement les principales raisons de l'hétérogénéité des résultats compilés dans la littérature. Malgré les difficultés méthodologiques qui en découlent pour les études en laboratoire, ces molécules sont une composante omniprésente des milieux aquatiques naturels et devraient être prises en compte pour des études écotoxicologiques plus réalistes par rapport aux conditions naturelles.

1.7 Organismes d'étude

Dans les recherches sur les effets des contaminations sur les écosystèmes aquatiques, il est particulièrement intéressant d'étudier les microorganismes. Ils ont une grande surface comparée à leur volume, ce qui les rend particulièrement exposés à la contamination de leur milieu de vie. D'ailleurs, les producteurs primaires microscopiques sont d'autant plus intéressants, car ils sont à la base des réseaux trophiques et l'accumulation de métaux dans leur système peut se répercuter le long de la chaîne alimentaire et avoir des impacts chez d'autres espèces. L'écosystème peut même être déséquilibré en cas d'effets trop importants de contaminants chimiques sur les communautés de producteurs primaires.

Les microalgues d'eau douce sont des organismes de choix dans les études écotoxicologiques, d'autant plus qu'elles sont ubiquistes, que leur biologie est relativement simple et bien connue et que leur temps de génération est court, ce qui facilite les études en laboratoire. Plus particulièrement, ce projet s'intéresse à trois microalgues d'eau douce, deux algues vertes, *Chlorella fusca* et *Chlamydomonas reinhardtii*, et une diatomée *Nitzschia palea*.

1.7.1 *Chlorella fusca*



Figure 9: Cellules de *Chlorella fusca* au microscope optique (x1000) ;
source : nutriphys.com

Chlorella fusca est une algue verte qui est naturellement en suspension l'eau. Elle a une forme ellipsoïdale et mesure environ 3,5 à 12 μm de diamètre (Figure 9). Elle est facilement cultivable en laboratoire et est, de ce fait, très utilisée pour ce type de travaux.

Certaines de ses caractéristiques, notamment sa capacité à entreposer les phosphates pour ensuite croître dans une solution qui n'en contient pas ainsi qu'à vivre dans des milieux acides (Parent, 1991), lui ont valu d'être étudiée au sein de l'INRS et de l'équipe du professeur Fortin. Les connaissances amassées dans ces études précédentes et notamment son exposition à l'aluminium et au lanthane en présence de

substances humiques (Parent *et al.*, 1996; Rahal, 2018), en faisant un organisme d'intérêt pour ce projet.

1.7.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

Cette algue verte a aussi été largement utilisée dans les études en laboratoire (Harris, 2009) et notamment par des étudiants de l'équipe. C'est également le premier organisme dont le génome a été séquencé au complet en 2007 (Merchant *et al.*, 2007).

Plus précisément, *Chlamydomonas reinhardtii* est une algue unicellulaire qui mesure environ 5 μm de diamètre et qui possède deux flagelles qui lui permettent de se déplacer (Figure 10). Il s'agit d'un organisme ubiquiste dans l'environnement

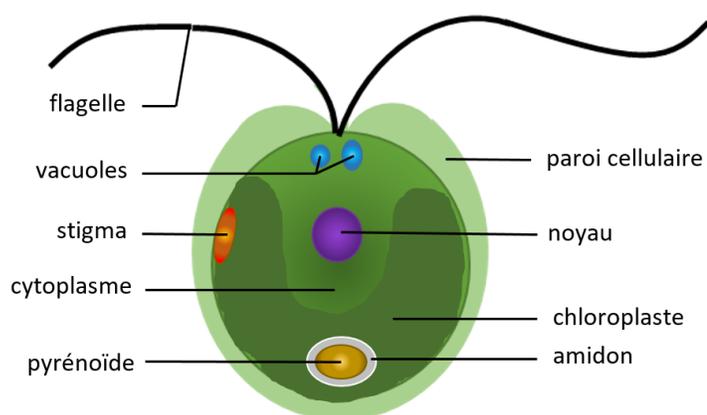


Figure 10: Schéma simplifié de *Chlamydomonas reinhardtii*

La toxicité des EGP a été étudiée chez cette algue par le passé (Racine, 2016; Roy, 2009; Tétrault, 2014) et l'exposition menée au cours de ce projet avait pour but de compléter le travail de Rioux (2018). Ainsi, une comparaison a pu être établie avec les résultats obtenus pour *Chlorella fusca* et même, dans une moindre mesure, *Nitzschia palea*.

1.7.3 *Nitzschia palea*

Nitzschia palea est une diatomée d'eau douce (Figure 11). Pour les besoins du projet, elle a été cultivée en suspension, mais c'est normalement un organisme périphytique. Cette espèce de forme pennée mesure entre 12 et 43 μm de long et entre 2,8 et 4,5 μm de large. Elle est ubiquiste et décrite comme relativement résistante à la contamination métallique (Kim Tiam *et al.*, 2018).

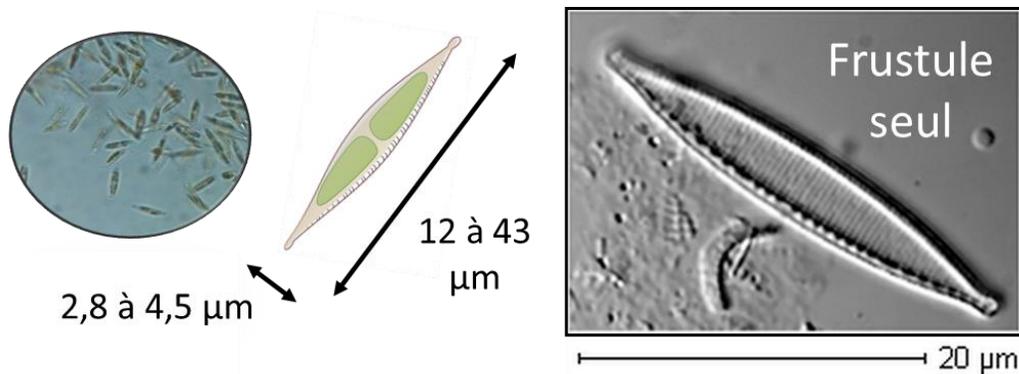


Figure 11: *Nitzschia palea*, photo d'une culture au microscope optique x63, schéma simplifié et image d'une frustule vide (x1000)

Les diatomées ont des propriétés physiologiques différentes des algues vertes ; elles sont protégées par un frustule solide en silice possédant une forme et des stries caractéristiques de l'espèce. Ainsi, le contact entre la membrane phospholipidique et le milieu d'exposition se fait seulement par les pores du frustule. La comparaison des interactions entre platine, AH, et membranes cellulaires entre les deux types d'algues vertes citées ci-dessus ainsi qu'avec une espèce de diatomée a permis de s'intéresser aux différences observées.

1.8 Déformations

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, une augmentation du diamètre moyen des cellules a été observée par Rioux (2018) en présence de platine et d'AH, jusqu'à deux fois la taille normale. Cette observation avait été expliquée par les propriétés du platine en tant qu'inhibiteur de la division cellulaire. En effet, il serait possible que la cellule soit bloquée en phase G2 et dans l'incapacité de se diviser (Sorenson *et al.*, 1990).

Toutefois, c'est chez les diatomées que des difformités physiques importantes peuvent être observées. En effet, exposées à des métaux, elles peuvent subir des déformations de leurs frustules. Cette caractéristique est même utilisée lors de relevés terrain afin de déterminer la qualité de l'eau ou servir d'indicateur de pollution métallique, par rapport aux espèces de diatomées présentes et leurs déformations (Cattaneo *et al.*, 2004; Lavoie *et al.*, 2006; Morin *et al.*, 2012; Morin *et al.*, 2008). Une diminution de la taille des

diatomées ainsi que des déformations des frustules sont attendues après exposition au platine.

1.9 Génétique

Les outils moléculaires permettent de révéler des effets subtils de la contamination, avant même que la croissance algale ne soit affectée, ou que des déformations soient observées. Des modifications de l'information génétique peuvent être mesurées surtout *via* les ARN (acides ribonucléiques) qui peuvent coder pour la production de protéines en réponse à la présence de métaux. En effet, dans le travail de Kim Tiam *et al.* (2012), des différences significatives d'expression des gènes ont été observées alors qu'il n'y avait pas de différence significative pour les valeurs de croissance obtenues en présence de Cd ($10 \pm 3 \mu\text{g/L}$) chez la diatomée *Nitzschia palea*.

La présence de contaminants métalliques, même en faibles concentrations, peut induire un stress oxydant ce qui affecte le fonctionnement des mitochondries et/ou des fonctions photosynthétiques. Kim Tiam *et al.* (2012), dans leur étude de l'impact du cadmium sur la diatomée *Eolimna minima*, ont montré que l'expression de gènes reliés à ces deux fonctions était modifiée en présence de ce métal. Le stress oxydant peut induire la production d'enzymes de défense telles que les superoxydes dimutases (mitochondriale, chloroplastique et cytoplasmique) et la catalase (Kim Tiam *et al.*, 2018) ainsi que la glutathion peroxydase. Cette dernière oxyde un peptide : le glutathion en se servant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) comme substrat, ce qui contribue à réguler le stress oxydant dans la cellule (Sies, 1986). En plus de ce rôle, le glutathion peut lier fortement certains métaux et permettre la séquestration des métaux et possiblement leur excrétion (Glaeser *et al.*, 1991), bien que ce rôle soit également joué par des peptides plus spécifiques aux métaux : les phytochélatines. Elles sont produites par les espèces végétales en réponse à une contamination métallique (Callahan *et al.*, 2006). Elles jouent un rôle dans les mécanismes de détoxification des cellules, leur permettant une accumulation importante de certains métaux, avant que des effets toxiques ne soient observés (Callahan *et al.*, 2006; Campbell & Hare, 2009). Par ailleurs, afin de mieux comprendre les mécanismes d'internalisation et de répartition intracellulaire mis en jeu

dans le transport de ce métal, l'expression de gènes liés à la production de protéines de transport transmembranaire a été investiguée. Notamment, celles permettant le transport d'ions divalents comme Cu^{2+} et Zn^{2+} . Un autre transporteur permettant, entre autres, l'internalisation du Mn^{2+} , Fe^{2+} et Co^{2+} , *nramp1*, a également été étudié. Les protéines codées par ses gènes sont présentées dans un schéma du transport des métaux chez l'algue *Chlamydomonas* et provenant des travaux de Blaby-Haas and Merchant (2012) (Figure 12).

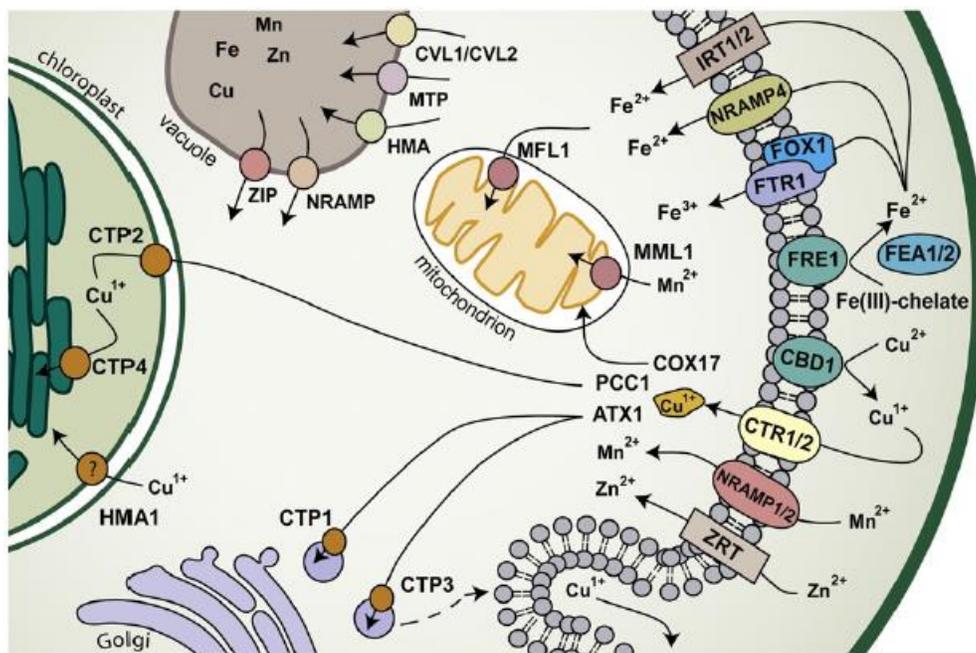


Figure 12: Protéines impliquées dans le transport des métaux chez l'algue *Chlamydomonas* et leur localisation (Blaby-Haas & Merchant, 2012).

Finalement, des gènes en lien avec le stress oxydant, le fonctionnement des mitochondries, du photosystème, de la division cellulaire, de la production de phytochélatines et de la synthèse d'autres transporteurs ont donc été choisis pour être étudiés dans ce projet et ainsi déterminer certains impacts physiologiques de la contamination au platine sur deux des trois espèces d'intérêt : *Nitzschia palea* et *Chlamydomonas reinhardtii*. Plusieurs des gènes de la diatomée avaient déjà été étudiés dans la littérature (Kim Tiam *et al.*, 2012; Kim Tiam *et al.*, 2018; Moisset *et al.*, 2015). De

plus, grâce au travail de l'équipe ENSAT du laboratoire ECOLAB qui ont séquencé le génome complet de *Nitzschia palea* et qui nous ont permis de l'utiliser en collaboration, il a été possible de s'intéresser à plusieurs gènes de cette diatomée au cours de ce projet. Des essais ont également été réalisés chez *Chlamydomonas reinhardtii* dont le génome complet a été séquencé et est disponible dans la littérature (Blaby *et al.*, 2014; Merchant *et al.*, 2007).

1.10 Objectifs de recherche

Le modèle de l'ion libre, selon lequel réponse biologique et accumulation intracellulaire dépendent uniquement de la concentration en métal libre en solution (tous les autres facteurs étant gardés constants), a été vérifié lors de nombreuses études, mais comporte cependant des exceptions (Campbell, 1995; Campbell *et al.*, 2002). Notamment, la toxicité des métaux en présence de ligands organiques naturels est difficilement prévisible et amène à des résultats surprenants, comme c'est le cas pour les travaux de Rioux (2018). L'auteure a en effet montré une toxicité et une bioaccumulation plus importantes du platine chez *Chlamydomonas reinhardtii* en présence d'AH, contrairement à ce qui était attendu.

- Dans ce cadre, mes travaux se sont tout d'abord intéressés à une autre algue verte : *Chlorella fusca*, afin de déterminer si cette même tendance était observée en présence d'AH.
- La conséquence d'une concentration plus importante de ces composés (20 mg C/L) sur bioaccumulation et toxicité du platine chez ses deux mêmes algues vertes a ensuite été investiguée.
- Dans le but d'éventuellement étendre les résultats obtenus à un autre type de producteur primaire, la diatomée *Nitzschia palea* a été exposée au platine, en absence et en présence d'AH.

L'étude des deux types d'algues vertes et d'une espèce de diatomée a permis une comparaison de ces différents producteurs primaires, et notamment de faire des hypothèses sur le rôle protecteur du frustule de silice entourant les diatomées. Pour

chaque expérience d'exposition, la spéciation du platine et notamment la part complexée par l'AH était déterminée.

- Finalement, des analyses génétiques sur *Chlamydomonas reinhardtii* et *Nitzschia palea* ont été réalisées afin de mettre en évidence des impacts plus subtils de la contamination métallique et ainsi observer des différences significatives pour des conditions pour lesquelles la croissance était semblable à celle du témoin. Cela permet également de mieux comprendre les effets de l'exposition au platine sur la physiologie des microalgues.

CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel de laboratoire

2.1.1 Lavage de la verrerie

Avant utilisation, et afin d'éviter tous types de contamination métallique, la verrerie était rincée à trois reprises avec de l'eau déminéralisée puis laissée à tremper pendant 24 h dans de l'acide nitrique à 10% (v/v). Ensuite, trois nouveaux rinçages à l'eau déminéralisée puis trois à l'eau ultrapure ($\geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) étaient réalisés avant que le matériel ne soit laissé à sécher sous une hotte à flux laminaire. En cas de besoin, la verrerie de laboratoire pouvait être passée à l'autoclave à 121°C et sous pression ($P_{\text{max}}=2,5 \text{ bar}$) pendant 15 à 20 minutes. Seuls les matériaux pouvant subir de telles contraintes de température et de pression étaient utilisés dans ce cas.

2.1.2 Préparation et conservation des échantillons et solutions

Les dilutions, quelles qu'elles soient, et les préparations de solutions étaient toujours réalisées avec de l'eau ultrapure et avec des fioles jaugées en polycarbonate (PP). Les solutions intermédiaires de milieux de culture étaient passées sur un filtre de porosité de 0,45 μm en PES (polyéthersulfone) pour éviter les contaminations bactériennes. Une fois les milieux de culture préparés, ceux-ci étaient passés à l'autoclave pendant 20 minutes pour garantir leur stérilité. Pour cette étape, les contenants étaient en PP, polycarbonate (PC) ou en verre pour résister aux conditions d'autoclavage. Les solutions intermédiaires ainsi que les milieux de culture étaient conservés dans une chambre froide à 4°C.

2.1.2.1 Matière organique naturelle

Au cours de ce projet, des acides humiques (AH) provenant d'une matière organique naturelle standard, celle de la rivière Suwannee (Figure 13) ont été utilisés. Les poudres provenaient de l'organisme *International Humic Substances Society* (USA) : numéros de catalogue : 2S101H et 3S101H.



Figure 13: Delta de la rivière Suwannee (source natgéo)

Des solutions mères concentrées d'acides humiques étaient préparées à partir de ces poudres : 250 mg d'AH étaient dissouts dans 1 L d'une solution d'hydroxyde de sodium à 10^{-2} mol/L puis laissés sous agitation à l'obscurité pendant 24 h selon le protocole de Leguay *et al.* (2016). En effet les AH pourraient être affectés par l'exposition à la lumière. À la suite de cette étape, les solutions étaient passées sur un filtre en PES (polyéthersulfone) de porosité $0,45 \mu\text{m}$ puis conservées à 4°C et à l'obscurité, toujours afin d'éviter la dégradation des molécules. La poudre d'AH était quant à elle conservée à température ambiante (environ 20°C) et à l'abri de la lumière et de l'humidité dans un dessiccateur. La concentration de ces solutions mères en carbone organique total était toujours vérifiée avec un analyseur de carbone (carbone organique total) (Shimadzu Vcph) et était variable, autour de 100-110 mg C/L. Cette différence peut s'expliquer entre autres par la durée de conservation de la poudre dans le dessiccateur du laboratoire, et donc potentiellement des erreurs de pesée.

2.1.3 Conservation des échantillons

Tous les échantillons destinés au dosage du platine étaient conservés acidifiés à 10% HCl (v/v). Ceux destinés au dosage des AH étaient conservés à 4°C et à l'obscurité, bien qu'ils étaient, le plus souvent, dosés le jour même. Des algues étaient parfois récupérées en cours, mais surtout en fin d'exposition, pour des analyses transcriptomiques. Un volume de culture était centrifugé à basse vitesse (environ 1500 à 4300 g selon les

besoins) afin de retirer le milieu et le culot algal était repris dans 600 μL de RNA $later$ (Invitrogen) pour éviter la dégradation des ARNm.

2.1.4 Cultures algales

Toutes les algues étaient cultivées dans des conditions axéniques. Les milieux de culture et les contenants étaient systématiquement passés à l'autoclave. De plus, toutes manipulations des souches étaient réalisées sous une hotte à flux laminaire et/ou proche de la flamme d'un bec bunsen. Toutes ces précautions permettaient de maintenir le caractère stérile des cultures qui étaient repiquées de façon régulière : une à trois semaines respectivement pour les algues vertes et les diatomées. Par ailleurs, l'absence de contamination bactérienne était vérifiée périodiquement grâce à des observations au microscope ou des dépôts sur gélose avec une incubation de 3 jours à 37°C. Les algues étaient cultivées dans des erlenmeyers en polycarbonate ou en verre borosilicaté de 250 mL à 1 L de capacité et contenant respectivement 100 mL à 500 mL de milieu de culture préalablement stérilisé. Le niveau de milieu était ainsi volontairement inférieur à la contenance de la verrerie de façon à ce que la surface d'échange liquide/gaz soit assez importante pour maintenir les cultures dans un bon état. De plus, les bouchons des erlenmeyers étaient dévissés, ou remplacés par du coton ouaté stérile afin de permettre les échanges gazeux entre l'intérieur et l'extérieur de la verrerie sans en compromettre la stérilité. A l'INRS, les cultures restaient sous agitation dans une chambre de culture Convion (CMP 4030) avec une température constante de 20°C et une luminosité mesurée de $73 \pm 13 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ en continu. Cet éclairage 24 h sur 24 peut sembler peu naturel, mais il ne devrait pas nuire à la croissance des microalgues d'après Barsanti and Gualtieri (2006). Cela a pour conséquence une croissance plus rapide due à l'activité photosynthétique constante. De plus, cela permet d'éviter la synchronisation journalière des cultures et donc l'apparition de paliers de croissance journaliers qui pourraient nuire à l'interprétation des résultats de croissance. Ainsi la réponse est uniformisée sur la journée puisque la population de cellules reflète tous les stades de croissance au moment de l'échantillonnage. Au laboratoire EPOC, les cultures étaient entreposées dans une chambre de culture Binder, sans agitation, à 17 °C et avec une photopériode de 12/12 et un éclairage de $68 \pm 12 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$.

2.1.4.1 *Chlorella fusca* et *Chlamydomonas reinhardtii*

Les souches algales provenaient toutes deux du *Canadian Phycological Culture Centre* (CPCC) de l'Université de Waterloo, ON, Canada. Plus précisément, il s'agit de *Chlorella fusca* var. *vacuolata* (Shihira & Krauss, 1965) (CPCC#89) et *Chlamydomonas reinhardtii*, de source autochtone avec paroi cellulaire (CPCC#11). Ces deux espèces étaient cultivées dans du milieu de culture MHSM-1 (Modified High Salt Medium) ajusté à pH=6 avec une solution de soude (voir la composition dans le Tableau 3) et repiquées chaque semaine.

Tableau 3: Composition du milieu de culture MHSM-1

Nom de la solution intermédiaire	Composition	Concentrations	Volume pour 1 L de milieu (mL)
Ammonium	MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,00 g/L	5
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	3,21 g/L	
	NH ₄ NO ₃	15,0 g/L	
Phosphate	KH ₂ PO ₄	29,6 g/L	0,250
	K ₂ HPO ₄	57,6 g/L	
Nitrate	KNO ₃	101 g/L	4
AAP	H ₃ BO ₃	186 mg/L	1
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/L	
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	160 mg/L	
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	300 mg/L	
	Zn	1,59 mg/L	
	Co	0,64 mg/L	
	Mo	2,88 mg/L	
	Cu	4,47 µg/L	
Tampon	MES	21,3 g/L	100
Base	NaOH	4,00 g/L (0,1 M)	Variable

2.1.4.2 *Nitzschia palea*

Les diatomées provenaient également de l'Université de Waterloo (CPCC#160), à noter que la même souche a été utilisée pour les expériences à l'INRS et au laboratoire EPOC. Elles étaient cultivées dans des erlenmeyers en verre et dans du milieu CHU-10 modifié (voir Tableau 4).

Tableau 4: Composition du milieu CHU-10 modifié pour *Nitzschia palea*

Composition de la solution mère		Concentrations (g/L)	Volume pour 1 L de milieu (mL)
NaSiO ₃ ·9H ₂ O		5,80	1
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O		57,6	1
K ₂ HPO ₄		10,0	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O		25,0	1
Na ₂ CO ₃		20,0	1
Na ₂ EDTA·2H ₂ O		1,00	1
H ₂ SeO ₃		0,163	0,5
Na ₂ EDTA·2H ₂ O		3,15	1
FeCl ₃ ·6H ₂ O		4,36	
"Oligoéléments"	H ₃ BO ₃	2,86	1
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,222	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,390	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079	
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,094	
Tampon HEPES		0,953	100
Base		4,00 (0,100 M)	Variable

Le pH était ajusté à 7,0, car d'après le fabricant Sigma Aldrich, la gamme de pH optimum pour l'effet tampon du HEPES est entre 6,8 et 8,2. L'ajout d'un volume variable de soude permettait d'ajuster le pH. Les cultures étaient également maintenues stériles et repiquées toutes les 3 semaines environ. Généralement, un volume de 10 mL de culture était dilué dans un volume final de 100 mL de nouvelle culture.

2.1.5 Solutions de rinçage et milieux simplifiés

Des solutions de milieu de culture simplifié ont été utilisées à plusieurs reprises au cours du projet. Notamment pour des rinçages d'algues ou pour préparer des solutions d'étalonnage. Les compositions étaient les mêmes que celles des milieux MHSM-1 et CHU-10 sans l'ajout de la solution mère contenant les oligoéléments (solutions mère AAP pour le MHSM-1 et solution d'oligoéléments pour le CHU-10) et sans les tampons pH.

Ces milieux simplifiés étaient notamment utilisés pour préparer les gammes de calibration du spectrofluorimètre, comme expliqué dans la partie 2.6 concernant le suivi de la concentration en AH.

Ils servaient également comme solutions dites, de rinçage, utilisées pour rincer des algues lorsque celles-ci étaient récupérées sur un filtre. Le pH de ces solutions était ajusté de la même façon que les milieux de culture, même si ce paramètre était moins stable en raison de l'absence de tampon pH. Deux types de solutions de rinçage sont à distinguer. Celle correspondant à la recette décrite ci-dessus est appelée solution de rinçage sans EDTA. L'autre solution est dite, avec EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) qui est un ligand hexadenté et un fort complexant des métaux. Cette solution de rinçage permettait de désorber le platine de la surface des algues en fin d'exposition de façon à ne doser que le platine internalisé par celles-ci, comme expliqué dans la partie 2.8 sur le traitement des échantillons. Pour préparer cette solution, 1 mL d'une solution contenant de l'EDTA à 10^{-2} mol/L était ajouté au milieu simplifié pour 1 L de préparation. Ainsi la concentration finale était de 10^{-5} mol/L.

2.2 Choix de la verrerie d'exposition

Les métaux ont tendance à s'adsorber aux parois des contenants, ce qui peut entraîner une diminution de la concentration d'exposition au cours de l'expérience. C'est d'autant plus marqué pour les EGP. Or, pour faciliter l'interprétation des résultats, il fallait que la concentration d'exposition reste la plus stable possible dans le temps. Dans le but de déterminer le matériau le plus adapté à ce type d'exposition, Roy (2009), une ancienne étudiante de l'équipe qui avait travaillé avec les EGP, en avait testé plusieurs. Ses conclusions sont que le polycarbonate (PC) est le matériau entraînant le moins d'adsorption pour le palladium, qui était le métal le plus problématique. Le choix de ce matériau a été confirmé par Rioux (2018), qui trouvait une adsorption du platine inférieure à 1% sur des erlenmeyers en PC. La présence de ligands organiques augmente cette adsorption, possiblement par interactions hydrophobes entre le plastique et les substances humiques, mais, d'après Cobelo-Garcia *et al.* (2007), la récupération restait supérieure à 90% pour le Pt (IV) dans les conditions expérimentales testées. Pour toutes ces raisons, c'est le PC qui a été choisi pour les expériences d'exposition de ce projet. La capacité des erlenmeyers d'exposition était toujours de 250 mL avec 100 mL de milieu d'exposition.

Pour l'exposition des diatomées, deux types de verreries ont été utilisées. En effet, le PC a posé des problèmes méthodologiques et a donc été remplacé par le verre borosilicaté dans une deuxième expérience d'exposition. Au cours de l'exposition dans les erlenmeyers en PC, les diatomées ont adhéré à des micros aspérités sur les parois. En conséquence, il a été impossible de compter le nombre réel d'algues et donc de comparer les courbes de croissance. Les valeurs mesurées étaient donc seulement qualitatives. Finalement, le verre borosilicaté a été préféré par la suite puisqu'en plus de ne pas permettre aux diatomées d'adhérer, l'adsorption du platine sur ce matériau était inférieure à 10% dans les travaux de Cobelo-Garcia *et al.* (2007). Cependant, en pratique, une diminution de la concentration d'exposition plus importante a été mesurée.

2.3 Expériences d'exposition

2.3.1 Principe général

Diverses expériences d'exposition ont été réalisées au cours de ce projet et le récapitulatif des conditions expérimentales est présenté dans le Tableau 5. À chaque fois, une des trois algues étudiées était exposée à une gamme de concentrations en platine en présence d'une concentration donnée d'acides humiques de 0, 10 ou 20 mg C/L.

Tableau 5: Conditions expérimentales des différentes expositions

Conditions d'exposition \ Algue	<i>Chlorella fusca</i> 	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 	<i>Nitzschia palea</i> 
Température 	20°C		
Luminosité 	24/24	25 < $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ < 86	
Temps d'exposition 	96 heures		28 jours
Milieu de culture 	MHSM-1		CHU-10 + HEPES
[AH] 	0, 10 et 20 mg C/L		0 et 10 mg C/L
[Pt] inorganique nominale 	0 à 150 $\mu\text{g}/\text{L}$		Jusqu'à 200 $\mu\text{g}/\text{L}$
Densité cellulaire initiale 	13 000 cellules/mL		25 000 à 70 000 cellules/mL

À noter que dans ce tableau, les concentrations nominales de platine visées ne sont pas données en platine total, mais en platine inorganique. En effet, si les hypothèses BLM (modèle du ligand biotique) étaient vérifiées, seul le platine inorganique devrait engendrer un effet, puisque la spéciation inorganique est supposée inchangée. Les gammes de concentrations étaient donc choisies de telle sorte que les expériences soient comparables entre elles par rapport à ce paramètre.

Pour chaque expérience d'exposition, plusieurs mesures étaient réalisées et elles sont toutes récapitulées dans la Figure 14. La toxicité était déterminée en mesurant l'inhibition

de la croissance cellulaire par rapport aux témoins et l'accumulation intracellulaire du métal était déterminée en fin d'expérience par minéralisation d'un échantillon d'algues et dosage à l'ICP-MS. De plus, pendant les expositions, plusieurs paramètres étaient suivis au cours du temps : le pH et la concentration en platine avec un ICP-MS (ou un spectromètre d'adsorption en four graphite : GFAAS). Pour les conditions contenant des AH, la concentration de ces composés était également suivie avec un spectrofluorimètre. De plus, la spéciation métallique était déterminée à t=0 ainsi qu'en fin d'expérience grâce à une méthode d'ultrafiltration partielle suivie de la quantification du platine (ICP-MS). Par ailleurs, des algues étaient échantillonnées, le plus souvent en fin d'expérience, mais parfois en cours d'exposition afin de réaliser des analyses transcriptomiques. Cependant, ces analyses n'ont pas été réalisées pour tous les organismes d'étude. En effet, seuls les génomes de *Chlamydomonas reinhardtii* et *Nitzschia palea* étaient entièrement séquencés au moment de réaliser ces expériences.

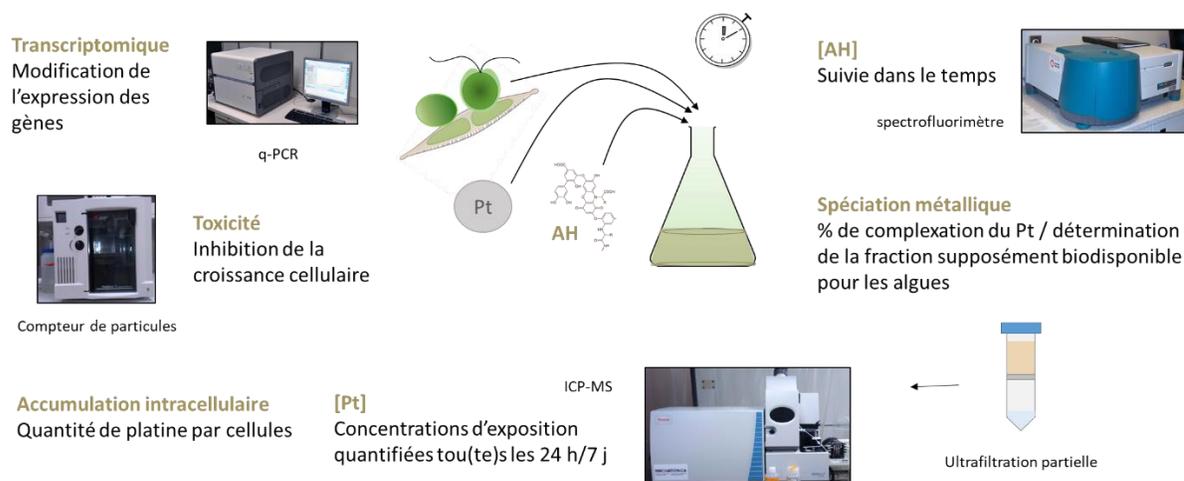


Figure 14: Schéma général simplifié des paramètres mesurés pendant les expériences d'exposition

2.3.2 Culture de pré-exposition

Avant chaque début d'expérience, les algues vertes étaient repiquées plusieurs fois d'affilée afin de s'assurer qu'elles soient en phase de croissance exponentielle au moment de l'inoculation. Un volume de 2 mL d'une culture était repiqué dans deux

erlenmeyers de 250 mL contenant 150 mL de milieu, 96 h avant le début de l'exposition, et 10 mL d'une de ces deux cultures étaient repiqués dans 500 mL de milieu, 48 h avant. C'est à partir de ces 500 mL qu'étaient récupérées les algues pour l'inoculation à $t=0$. Une concentration cellulaire en début d'expérience de 13000 cellules/mL était visée pour les algues vertes. Le dénombrement des algues dans les 500 mL de culture permettait de calculer le volume à filtrer pour en obtenir assez. Elles étaient récupérées sur un filtre en polycarbonate de porosité 2 μm puis resuspendues dans un petit volume de solution de rinçage (sans EDTA, composition décrite dans la partie 2.1.5 sur les solutions de rinçage) afin d'obtenir une suspension cellulaire très concentrée. La densité cellulaire atteinte était ensuite estimée au compteur de particules afin de déterminer le volume d'inoculation. Ainsi, un petit volume était inoculé dans les milieux d'exposition préparés au préalable afin d'éviter une dilution de ces milieux.

Les expositions à l'INRS étaient réalisées à l'intérieur d'une chambre de culture Conviron avec une luminosité 24 h sur 24, comme pour les cultures. Pour les diatomées, une concentration de 25000 à 70000 cellules/mL était visée. Des cellules en phases exponentielle étaient également concentrées dans une solution d'inoculum pour laquelle la densité était déterminée au compteur de particules. Pour les dernières expériences réalisées au laboratoire EPOC, une plaque agitatrice avait été disposée sous des néons allumés 24 h sur 24 (voir Figure 15) avec une luminosité mesurée de $53 \pm 28 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$.



Figure 15: Dispositif expérimental pour les cultures d'exposition des diatomées au laboratoire EPOC

2.3.3 Contamination en platine des milieux d'exposition

Le platine ajouté aux milieux d'exposition provenait de solution ICP (10% HCl) de Plasma CAL (SCP Science). L'ajout d'ions chlorures est non négligeable quand comparé à la composition du milieu MHSM-1, mais ne devrait pas interférer avec la spéciation du platine. En effet, la formation de chloro complexes est très peu favorisée : la forme

Pt(OH)₂ est largement majoritaire (plus de 99,999 %) dans les milieux d'exposition (voir Annexe IV).

La gamme de concentrations d'exposition choisie devait être suffisamment forte pour montrer un effet, mais suffisamment réaliste par rapport aux concentrations environnementales pour être cohérente. Parmi les concentrations trouvées dans la bibliographie et documentées par Jackson *et al.* (2007), le maximum mesuré pour le platine serait de 34,6 µg/L (Odiyo *et al.*, 2005) dans des eaux naturelles et de 145 µg/L (Lenz *et al.*, 2005) dans les effluents hospitaliers. C'est par rapport à ces valeurs environnementales que les gammes de concentration d'exposition ont été choisies. Initialement, il s'agissait d'une gamme allant de 0 à 150 µg/L pour les expositions des algues vertes : *Chlorella fusca* et *Chlamydomonas reinhardtii*, mais en pratique il a parfois fallu augmenter les concentrations d'exposition. En effet, une toxicité suffisamment importante était nécessaire pour appliquer les modélisations de courbes dose-réponse (décrites dans la partie 2.9). Par exemple, des concentrations jusqu'à 300 µg/L ont été testées pour l'exposition de *Chlorella fusca* sans AH. Pour la diatomée *Nitzschia palea*, qui est considérée comme généralement plus résistante à la contamination par les métaux et les pesticides (Kim Tiam *et al.*, 2018), des effets subléthaux ont été étudiés, correspondant à une gamme d'exposition allant jusqu'à 200 µg/L.

Le platine était ajouté au milieu d'exposition et le pH était ajusté à 6 ou à 7 et ce 72 h avant inoculation des algues afin de la solution soit en équilibre à t=0. Des échantillons du milieu d'exposition étaient récoltés régulièrement pour doser le platine total de façon à suivre le niveau de contamination dans le temps. Le pas de temps était de 24 h et de 7 jours respectivement pour des expositions de 96 h et de 28 jours.

2.3.4 Conditions de concentrations en MON

Les concentrations en acides humiques devaient également être cohérentes avec les concentrations environnementales naturelles. Cependant la complexation du platine par les acides humiques est relativement faible par rapport à celles avec d'autres métaux comme le lanthane (Leguay *et al.*, 2016; Rahal, 2018). Or, afin d'utiliser la méthode d'ultrafiltration partielle pour déterminer expérimentalement la spéciation du platine, il

était préférable que la complexation du platine soit entre 20 et 80%. Il fallait donc utiliser des concentrations en AH suffisamment importantes pour les conditions en contenant ; des concentrations de 10 et 20 mg C/L ont été choisies. C'est représentatif de systèmes fortement humiques, mais ces concentrations peuvent être rencontrées à l'état naturel dans des lacs et des rivières. En effet, pour des valeurs au-delà de 30 mg C/L il s'agit plutôt d'eaux de marais ou d'étangs (Thurman, 1985).

2.3.5 Ajustement du pH

Avant chaque expérience, tous les milieux d'exposition étaient ajustés à $\text{pH}=6,00 \pm 0,01$ pour les algues vertes ou $\text{pH}=7,0 \pm 0,1$ pour les diatomées. La mesure du pH était réalisée dans un seul des trois flacons pour limiter les risques de contamination par d'autres organismes vivants. La sonde était passée à l'éthanol et les erlenmeyers restaient sous une hotte à flux laminaire et/ou proche d'une flamme. De cette façon, la contamination de ce flacon par d'autres organismes était minimisée. Le volume de solution de HCl ou de NaOH ajouté pour ajuster le pH était alors noté et le même volume était ajouté aux autres répétitions de la même condition pour ne pas compromettre leur stérilité par la mesure du pH. Finalement, aucune différence de croissance n'a été observée entre répétitions, donc il ne semble donc pas y avoir d'impact lié à cette mesure.

Dans le milieu MHSM-1, le pH restait très stable et une mesure en fin d'exposition (96 h) permettait seulement de constater que ce paramètre n'avait pas varié en cours d'exposition. En effet, une variation de 0,03 unités de pH était observée au maximum. Pour les expériences dans le CHU-10, le pH était suivi au cours du temps et mesuré tous les 7 jours.

2.4 Mesure de la densité cellulaire

Afin de déterminer la toxicité du platine, l'inhibition de la croissance algale par rapport au témoin était déterminée. C'est avec un compteur de particules *Coulter Counter Z3* (et *Z2* pour les deux dernières expériences d'exposition des diatomées) que la densité cellulaire des cultures était mesurée au cours du temps. La seule différence entre les deux

modèles, au-delà de l'âge de l'appareil, est l'interface informatique et la plus large gamme de tailles de particule pouvant être comptabilisées par le modèle Z3.

Les diatomées, étant des organismes périphtiques, ont tendance à se coller entre elles et faire des amas lorsqu'elles sont cultivées en solution. Afin de les décoller, un brassage manuel et léger des cultures était réalisé. Avant le prélèvement d'un sous échantillon de 3 mL, la culture était reprise dans un cône de pipette de 5 ou 10 mL (préalablement stérilisé) afin de l'homogénéiser. Ce sous-échantillon de 3 mL était passé 30 minutes dans un bain à ultrasons avant qu'un volume V inférieur ou égal à 1 mL ne soit utilisé pour le comptage. Ainsi la variabilité due à ces agglomérats était minimisée.

Pour chaque échantillon, ce volume V (en mL) de culture était dilué dans un volume $V'=10-V$ de solution *Isoton II* (Beckman Coulter) qui est la solution électrolytique nécessaire au fonctionnement de l'appareil (le plus souvent $V=1$ mL et $V'=9$ mL). Un volume $V_p=0,5$ mL est alors aspiré par l'appareil pour le comptage. Finalement, un nombre de particules σ est obtenu sur la gamme de taille choisie parmi les paramètres de l'appareil. La densité cellulaire en cellules/mL, N , est alors calculée selon l'équation suivante :

$$N = \frac{\sigma \times 10}{V_p \times V}$$

Équation 1: Calcul de la densité cellulaire d'une culture

2.4.1 Principe de fonctionnement du compteur de particules

D'après le fournisseur Beckman Coulter, le fluide d'intérêt est aspiré par un orifice (de diamètre de 70 μm dans notre cas) d'un tube. Le passage des cellules induit un déplacement de la solution électrolytique qui a pour conséquence une modification de la résistance dont l'amplitude est proportionnelle à la taille de la particule. Ainsi l'appareil peut non seulement compter le nombre de particules, mais aussi déterminer la taille de chacune d'entre elles.

2.4.2 Densité cellulaire relative

Lors de certains essais, la gamme de concentrations de platine choisies n'était pas assez étendue et ne permettait pas un bon ajustement des paramètres des courbes dose-réponse avec les résultats de toxicité. Des essais supplémentaires ont donc parfois été réalisés, mais la pousse des témoins a alors été différente des expériences initiales. Les données de densité cellulaire ont donc été exprimées en densité relative par rapport au témoin afin de comparer les croissances obtenues pour les différentes expériences d'exposition.

$$N_{relatif} = \frac{N_{absolu}}{N_{moyen\ témoin}}$$

Équation 2: Calcul de la densité cellulaire relative

2.5 Quantification du platine

2.5.1 Analyses par ICP-MS

Au vu des faibles concentrations dosées au cours de ce projet, l'ICP-MS était l'appareil le plus adapté pour la quantification du platine. Celui qui a été utilisé était de la marque Thermo instrument, modèle Xseries2 (usiné en 2011) et installé dans une salle blanche de classe 10000, assurant un faible bruit de fond en métaux.

2.5.1.1 Principe de fonctionnement de l'ICP-MS

La Figure 16 décrit le fonctionnement général d'un ICP-MS. Lors de l'analyse, chaque échantillon est pompé jusqu'à la torche à plasma (6 500 à 10 000°C) pour être ionisé à haute température en présence d'argon. Les ions du plasma sont entraînés vers une série de lentilles qui permettent de ne conserver que les ions positifs puis le quadripôle permet de sélectionner des composés d'une certaine masse avant la détection.

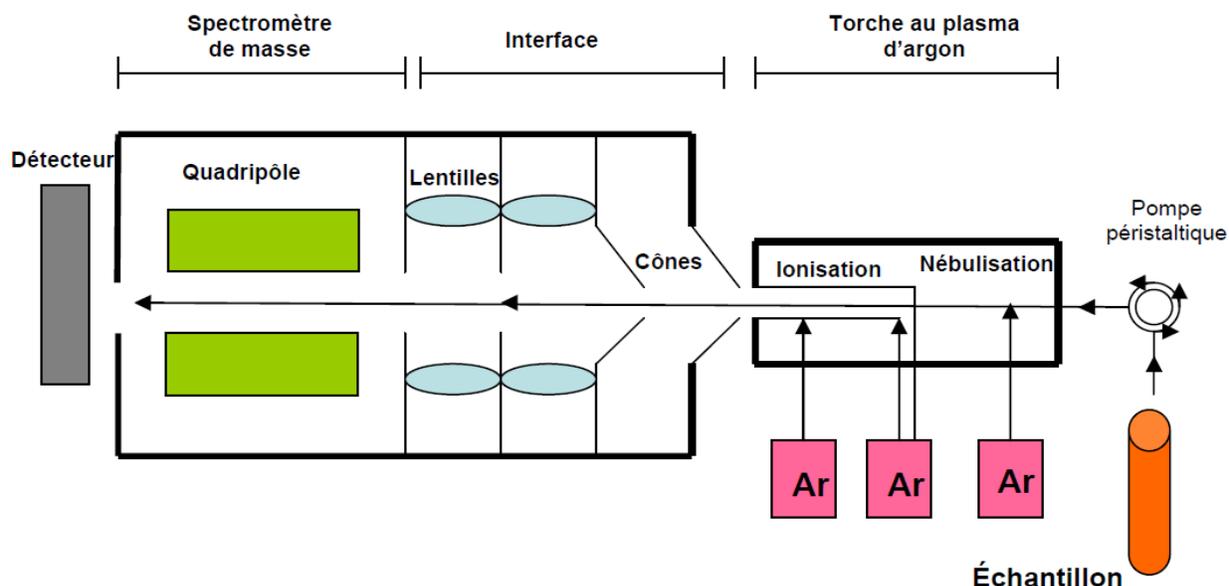


Figure 16: Schéma descriptif du fonctionnement d'un ICP-MS quadripolaire (Roy, 2009)

2.5.1.2 Paramètres d'analyse

Les échantillons étaient acidifiés à 5% HCl (v/v) afin que le platine ne s'adsorbe pas sur les parois du tube en plastique. La gamme d'étalonnage était également conservée à ce niveau d'acidité. Les concentrations des étalons étaient les suivantes : 0 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20 ; 35 ; 50 ; 200 µg/L de platine. Le point à 200 µg/L n'avait été ajouté que pour vérifier la linéarité de la courbe pour l'analyse des échantillons les plus concentrés dans le cadre de l'exposition de *Chlorella fusca* sans AH. Des contrôles à 0,75 et 25 µg/L étaient passés tous les 12 échantillons afin de déterminer les éventuelles variations de sensibilité de l'appareil pendant les analyses et ainsi corriger les résultats bruts obtenus. Afin d'éviter que le platine ne reste dans l'appareil et ne contamine les blancs et les échantillons par « effet mémoire », une eau de rinçage spécifique était passée entre chaque échantillon : de l'eau régale (1/3 HNO₃ + 2/3 HCl) à 5% (v/v). Par la suite, le logiciel PlasmaLab a été utilisé pour récupérer les résultats avant traitement des données avec le logiciel Microsoft Excel.

2.5.2 Analyses par spectroscopie d'absorption atomique (GFAAS)

Au laboratoire EPOC, le suivi de la concentration en platine du milieu d'exposition a été réalisé par spectroscopie d'absorption atomique en four graphite (GFAAS ; AA 240Z, Agilent Technologies).

2.5.2.1 Principe de fonctionnement du four graphite

Il s'agit d'une technique de quantification optique. Le principe est basé sur l'absorption de photons par les atomes de l'élément à quantifier. L'échantillon est porté à haute température et volatilisé dans un tube en graphite pour être sous forme d'atomes libres. Au travers du tube, un faisceau incident de longueur d'onde spécifique, 265,9 nm pour le platine, est envoyé au travers de l'échantillon (Lampe à cathode creuse 37 mm codée – Platine, Symalab, Agilent Technologies). L'énergie permet de faire passer les atomes de l'état fondamental (E0) à un état excité. La concentration en platine est alors déduite de la mesure de l'absorbance de la lumière par les atomes.

2.5.2.2 Paramètres d'analyse

Comme pour les analyses avec l'ICP-MS, les échantillons étaient acidifiés à 5% HCl (v/v). Cependant, des limites de détection moins basses atteintes avec cet appareil comparé à l'ICP-MS : 1,7 µg/L de platine. Par conséquent, une dilution minimum des échantillons a été privilégiée : un volume de solution HCl concentré (37% d'acidité) de 105 µL a été ajouté à 2 mL d'échantillon. Deux gammes d'étalonnage différentes ont été utilisées pour les dosages. Une première gamme avec des concentrations de 0, 2,5, 5, 10, 25, 50 et 100 µg/L était passée avant les échantillons de concentration nominale entre 10 et 50 µg/L et une seconde gamme : 0, 25, 50, 100, 200, 400 µg/L avant les échantillons dont les concentrations attendues étaient de 100 et 200 µg/L. De plus, des solutions étalons de concentrations réelles 10 et 50 µg/L étaient passées tous les 12 échantillons pendant la séquence d'analyse pour vérifier la qualité de la quantification au cours du temps.

2.5.2.3 Inter calibration avec l'ICP-MS

Afin de vérifier que les deux méthodes de quantification du platine utilisées étaient équivalentes, une solution étalon de concentration 35 µg/L a été dosée 3 fois avec l'ICP-

MS puis 5 fois par GFAAS. Les concentrations obtenues n'étaient pas statistiquement différentes (t test ; $p_{value}=0,1001$).

2.6 Suivi de la concentration en acide humique

Pendant les expériences impliquant l'exposition des algues en présence de l'acide humique, les concentrations en AH devaient être suivies dans la solution d'exposition qui contenait d'autres composés organiques (notamment les tampons pH). Le dosage du carbone organique total (COT) n'aurait donc pas été utile. La concentration en AH a été mesurée par spectrofluorimétrie avec un appareil *Cary Eclipse* de la compagnie Varian. En effet, d'après Mostofa *et al.* (2013), les substances humiques ont des propriétés optiques, notamment de fluorescence grâce à la présence de liaisons doubles, triples, ou de cycles aromatiques et donc à la délocalisation d'électrons. Comme illustré dans la Figure 17, le principe de la fluorescence repose sur un changement de niveau d'excitation des électrons.

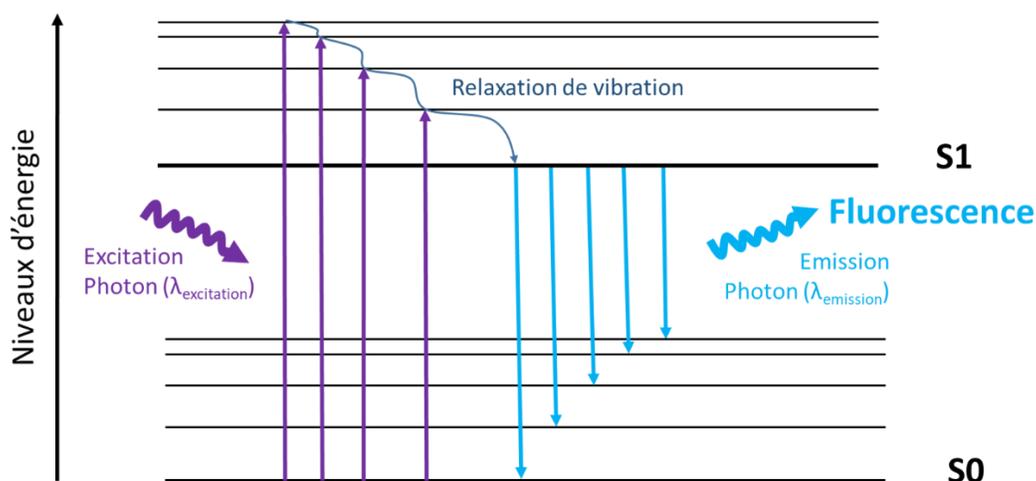


Figure 17: Principe général de la fluorescence

2.6.1 Principe de fonctionnement du spectrofluorimètre

Le spectrofluorimètre avec lequel ont été réalisées les analyses de ce projet fonctionne selon le principe décrit dans la Figure 18. La lumière issue de la source d'émission (*Xenon Flash Lamp*) passe par un monochromateur qui permet de sélectionner une longueur d'onde d'excitation ($\lambda_{\text{excitation}}$) déterminée au préalable. Le faisceau traverse l'échantillon contenu dans une cuve de 1 cm de côté et une lumière de fluorescence est alors émise par les composés optiquement actifs de l'échantillon. Un second monochromateur permettait de sélectionner la longueur d'onde d'émission ($\lambda_{\text{émission}}$) d'intérêt, et il était suivi d'un détecteur placé à 90° afin d'éviter que le faisceau d'excitation n'interfère.

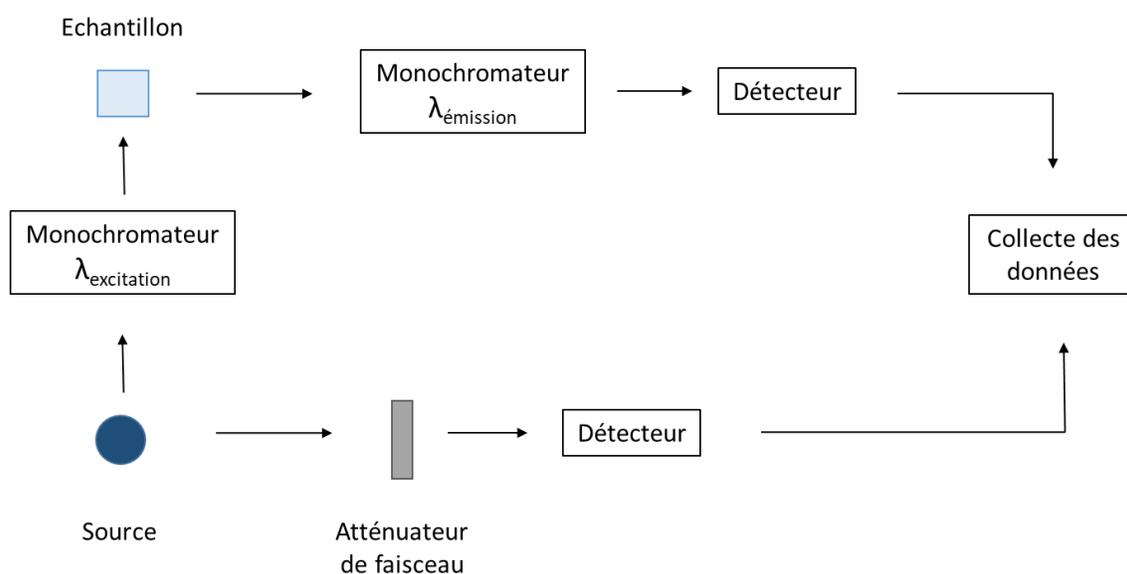


Figure 18: Schéma de fonctionnement d'un spectrofluorimètre (Rioux, 2018)

2.6.2 Réglages du spectrofluorimètre

Coble (1996), qui a étudié les matrices excitation-émission de différentes substances humiques, indique qu'un des deux pics caractéristiques des substances humiques se trouve à $\lambda_{\text{excitation}} = 350 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 420 \text{ à } 480 \text{ nm}$. Rioux (2018) avait déterminé que pour cette longueur d'onde d'excitation, le maximum d'émission avait été obtenu à $\lambda =$

463 nm. Ce sont donc ces derniers réglages qui ont été utilisés au cours de ce projet. Cependant, les nouvelles expériences ont été réalisées avec des AH qui correspondent à un numéro de catalogue différent, comme expliqué dans la section 2.1.2.1. Un nouveau scan d'émission pour $\lambda_{\text{excitation}} = 350 \text{ nm}$ (Figure 19) montre que cette fois $\lambda_{\text{max}} = 467 \text{ nm}$. Les valeurs de λ_{max} ainsi que les profils des courbes étaient similaires entre les deux numéros de catalogue. Finalement, les mêmes paramètres d'analyse ont pu être utilisés pour les deux AH.

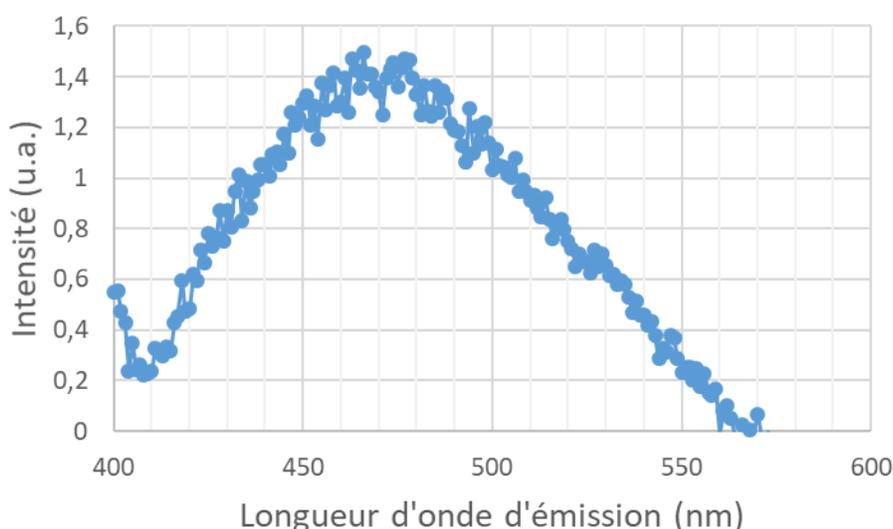


Figure 19: Spectre d'émission d'une solution de AH(III) (Suwannee River : n°3S101H) à 3 mg C/L mesuré par spectrofluorimétrie ; pH=6 ; $\lambda_{\text{excitation}} = 350 \text{ nm}$

Pour diminuer l'incertitude induite par les variations de l'appareil, une gamme préparée à l'avance était passée dans le spectrofluorimètre chaque jour de mesure. La concentration de ces étalons avait été déterminée auparavant par mesure de carbone organique total (COT) avec le Shimadzu Vpch. La gamme était préparée à partir de la solution mère d'acide humique et de milieu de culture simplifié : MSHM-1 simplifié pour l'exposition des algues vertes et CHU-10 simplifié pour l'expérience avec les diatomées (la composition de ces milieux est décrite dans la partie 2.1.5). Ils ne contenaient notamment pas de tampon pH, puisque ces derniers contiennent du carbone organique et auraient faussé

les valeurs de COT obtenues. De petits volumes de solution de tampon concentrée étaient quand même ajoutés après le dosage des AH au COT afin d'ajuster ensuite le pH de chacun des étalons (pH=6 et pH=7 respectivement pour MHSM-1 et CHU-10) et ainsi être le plus représentatif possible de la composition des échantillons. En effet, le pH peut influencer sur la fluorescence (Cabaniss & Shuman, 1987; Mostofa *et al.*, 2013). La présence de certains métaux peut aussi influencer la fluorescence (Chen *et al.*, 2013), bien qu'il ne semblerait pas que ça soit le cas pour le platine dans la gamme de concentration étudiée comme le montrent les résultats de la partie 3.2. La dilution des étalons était alors prise en compte pour connaître leur concentration réelle en AH après cet ajout. Les cuves utilisées au cours de ce projet étaient en quartz pour permettre le passage du faisceau d'excitation $\lambda=350$ nm. En effet, d'autres matériaux tels que le verre ne permettent pas une bonne transmission des longueurs d'onde UV.

2.7 Détermination de la spéciation

Depuis la fin des années 60, de nombreux logiciels permettant de modéliser la spéciation des métaux ont vu le jour. Désormais, certains permettent de prendre en compte des composés complexes comme la MON de façon à être plus représentatifs des conditions environnementales (Di Bonito *et al.*, 2018). Cependant, dans le cas du platine, il y a un manque de connaissances concernant les constantes thermodynamiques ; c'est pourquoi une détermination expérimentale de la spéciation a été privilégiée pour ces travaux.

2.7.1 Méthode d'ultrafiltration

Afin de déterminer la fraction de platine complexée aux acides humiques dans les milieux d'exposition, une méthode d'ultrafiltration partielle a été développée par Rioux (2018). Des tubes (Vivaspin; Sartorius) en polycarbonate avec des membranes en polyéthersulfone de porosité 3 kDa et contenant 20 mL des milieux d'exposition étaient centrifugés (Figure 20). Ainsi, les AH, qui ont des poids moléculaires conséquents, étaient retenus au-dessus de la membrane ainsi que le platine complexé alors que le platine inorganique ($\text{Pt}(\text{OH})_2$) à plus de 99,999 % en absence d'AH d'après l'Annexe IV) pouvait

passer cette membrane et être dosé dans l'ultrafiltrat. A l'issue de cette étape de centrifugation, le platine contenu dans le rétentat ainsi que l'ultrafiltrat était dosé à l'ICP-MS.

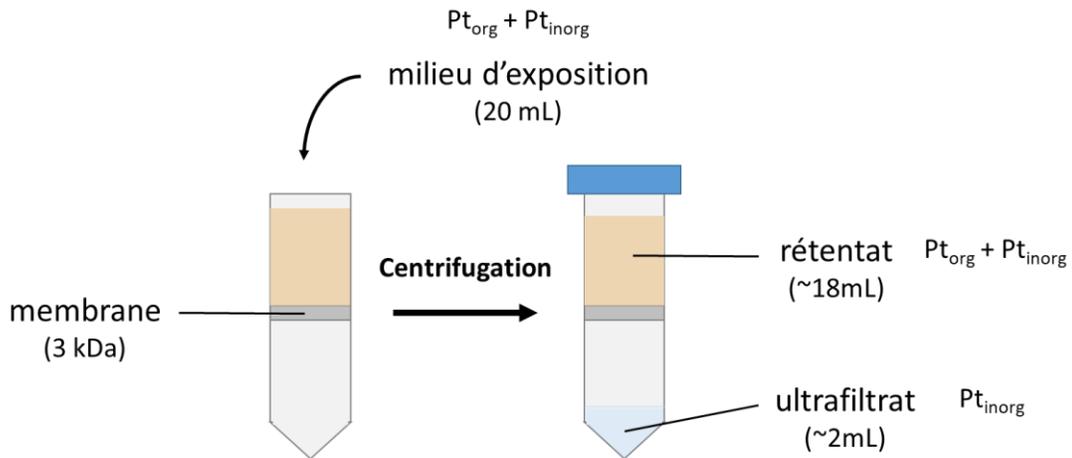


Figure 20: Schéma simplifié du principe d'ultrafiltration utilisé

La centrifugation durait 8 min à 4300 g de façon à ce qu'un faible volume (environ 2 mL) passe la membrane. Ainsi le volume du rétentat ne variait que peu, et la concentration en platine y restait quasi-constante. Elle correspondait à la concentration en platine totale (platine organique et inorganique), alors que la concentration en platine dosée dans l'ultrafiltrat correspondait, quant à elle, seulement au platine inorganique. Ainsi, grâce à la succession d'équations présentées ci-dessous, il était possible de calculer le pourcentage de platine non complexé avec la matière organique et donc de remonter aux concentrations en platine inorganique et organique.

$$fraction\ Pt\ inorg = \frac{[Pt]_{ultrafiltrat}}{[Pt]_{retentat}} \quad \text{Équation 3}$$

$$[Pt]_{inorg} = fraction\ Pt\ inorg \times [Pt]_{tot} \quad \text{Équation 4}$$

$$[Pt]_{org} = [Pt]_{tot} - [Pt]_{inorg}$$

Équation 5

Il a été débattu, pour plus de précision, de faire le calcul de l'Équation 3 avec la concentration en platine totale ($[Pt]_{tot}$) déterminée dans le prélèvement précédant l'étape d'ultrafiltration plutôt que la concentration dans le rétentat. En effet, même si la variation de volume était très petite, il était raisonnable de se demander si ça n'influencerait pas la concentration en platine dans le rétentat.

Tout d'abord, dans la gamme de concentrations en AH étudiée, la complexation était de l'ordre de 50% et le volume dans le rétentat variait d'environ 10% pendant l'ultrafiltration. Il y avait donc hypothétiquement une reconcentration de l'ordre de 5% dans ce rétentat à l'issue de l'opération. Cependant, cette différence a été négligée, l'utilisation de la concentration totale dosée dans des prélèvements réalisés en amont dans les calculs n'aboutissait pas à une différence significative dans les résultats. Considérer le rétentat comme représentatif de la concentration en platine total s'avérait aussi plus rigoureux. En effet, les deux concentrations utilisées dans les calculs avaient été dosées dans le même type d'échantillons, qui étaient tous passés par l'étape d'ultrafiltration. Cela rendait les incertitudes liées à l'ajout de cette technique égales pour les deux parties de la division. Pour toutes les raisons énoncées, c'est bien le calcul présenté dans l'Équation 3 qui a été préféré lors du traitement des données.

Pour vérifier que les AH sont bel et bien retenus par la membrane et ainsi valider les résultats pour chaque réplication, ils étaient dosés dans les rétentats et surtout dans les ultrafiltrats avec un spectrofluorimètre (comme décrit dans une partie 2.6). De cette façon l'efficacité de la technique à séparer le platine inorganique et organique était vérifiée. En effet, les concentrations en AH déterminées dans les ultrafiltrats étaient faibles (voir partie 3.3). Dans le cas d'un passage important de ces composés par la membrane, les mesures de platine inorganique dans l'ultrafiltrat auraient été fausses, et les valeurs correspondantes déterminées aberrantes et exclues du jeu de données.

2.7.2 Conditionnement des membranes d'ultrafiltration

Les membranes d'ultrafiltration étaient en polyéthersulfone (PES), mais avaient été traitées préalablement par le fabricant avec de la glycérine pour être conservées. Cependant ce composé est une source de carbone organique et pourrait fausser les résultats de la mesure des AH dans les rétentats et ultrafiltrats. Pour pallier ce problème, Rioux (2018) a développé une méthode de conditionnement des membranes avec des périodes de trempage et de passage d'eau ultrapure au travers de celles-ci. Son protocole a aussi été utilisé pour rincer les membranes des unités de filtration utilisées pour ce projet.

Dans un premier temps, 20 mL d'eau ultrapure étaient ajoutés et les dispositifs étaient ainsi laissés à tremper pendant 96 h. Après ce temps d'attente, trois filtrations successives d'un volume d'environ 15 mL d'eau ultrapure étaient réalisées. Pour arriver à ce volume filtré, une centrifugation de 35 minutes à 4300 g était réalisée avec le remplacement des 20 mL d'eau à chaque fois. Il était impératif qu'il reste toujours de l'eau en contact avec la membrane, car une fois la glycérine partiellement enlevée, il y a un risque que la membrane sèche et perde ses propriétés. À la suite de cette étape, l'eau était à nouveau changée et les unités de filtrations laissées à tremper 48 h de plus. Quatre filtrations successives, dans les mêmes conditions que celles décrites juste ci-dessus, étaient réalisées après ce temps d'attente. Un nouveau délai de trempage de 48 h était respecté avant de faire trois nouvelles filtrations dans les mêmes conditions, le même jour que les ultrafiltrations du milieu d'exposition. L'eau de la dernière filtration restait dans le tube jusqu'au dernier moment afin d'éviter le séchage de la membrane.

Ce protocole nécessite de commencer les conditionnements au moins 8 jours avant les ultrafiltrations. Dans le cas où l'expérience était décalée, ou, afin d'anticiper des expériences à venir, il est possible de faire une « pause » pendant ces conditionnements. Entre l'étape de quatre filtrations d'eau et les trois dernières filtrations du jour J, il est possible de laisser tremper dans l'eau plus longtemps. La seule contrainte était de vérifier le niveau d'eau pendant ce temps d'attente afin de s'assurer que les membranes ne sèchent pas.

2.8 Récupération et traitement des algues exposées

À la fin des expositions, des algues étaient récupérées pour diverses analyses : détermination de la quantité totale de platine internalisé et parfois pour des analyses transcriptomiques afin de déterminer les modifications de l'expression génique suite à l'exposition.

2.8.1 Séparation des métaux adsorbés et absorbés

À la fin des expériences d'exposition, une série de manipulations qui est décrite dans la Figure 21 permettait de récupérer les algues. La filtration de 40 mL de culture algale sur un filtre en polycarbonate de 2 μm de porosité (diamètre=47 mm ; Millipore Sigma ou Dutscher) permettait de séparer les algues du milieu d'exposition. Les milieux étaient récupérés pour dosage à l'ICP-MS ou d'abord par ultrafiltration partielle puis dosage des rétentats et ultrafiltrats. Un premier rinçage avec 1 mL de solution de rinçage permettait d'éliminer les résidus de milieu d'exposition des filtres. Ensuite, deux rinçages successifs avec 5 mL de solution de milieu de culture simplifié contenant de l'EDTA permettaient d'éliminer le métal adsorbé sur les parois cellulaires (et potentiellement sur le filtre). Le filtre avec les cellules ainsi rincées était ensuite récupéré pour une étape de digestion.

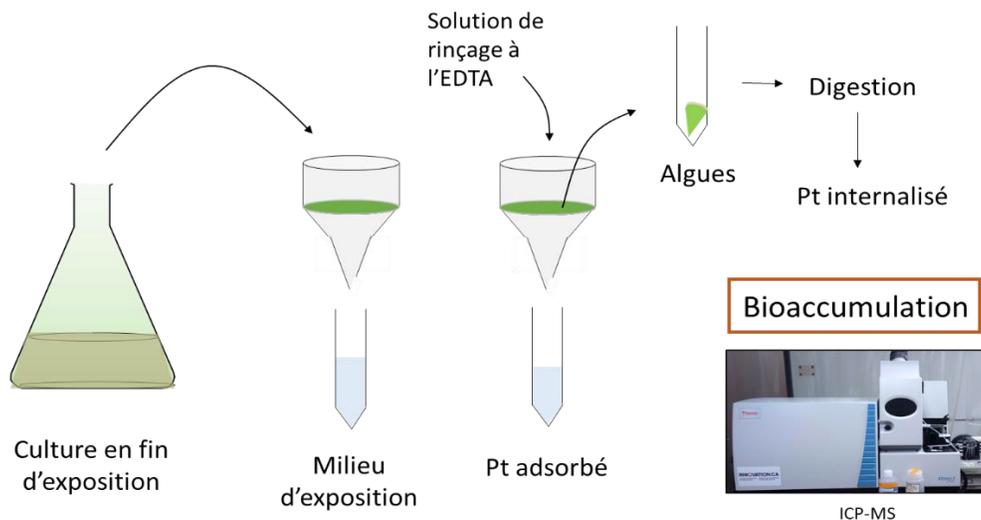


Figure 21: Schéma récapitulatif de la récupération et du traitement des algues en fin d'expérience

2.8.2 Minéralisation/digestion

Il s'agit d'une étape de dissolution des cellules, et donc des métaux qui y sont contenus, dans de l'acide. Les filtres, pliés en quatre, sur lesquels se trouvent les algues, étaient déposés, pointe vers le bas, au fond d'un tube (50 mL, jaugé, Sarstedt). Les tubes les contenant étaient mis à sécher 48 h à 70°C à l'étuve. Puis, 2,5 mL de solution HCl concentrée (37% d'acide ; grade *TraceMetal* ; Fisher Chemicals) étaient ajoutés pour digérer les algues à température ambiante pendant 48 h. À la fin de ce temps, le tube était complété jusqu'au trait de jauge à 50 mL avec de l'eau ultrapure. Ainsi, la teneur en acide finale était de 5% (v/v) comme les autres échantillons. Pour les diatomées, cette technique correspond à une digestion partielle qui laisse les frustules de silice intacts : seul le contenu cellulaire a été solubilisé. En effet, il est très peu probable qu'il y ait eu une accumulation du platine dans les frustules au vu de leur composition et cela permet également de faire une étude des déformations de ces frustules au microscope si besoin. Finalement, le platine des digestats obtenus était quantifié à l'ICP-MS et la masse de platine était rapportée à la densité cellulaire estimée au compteur de particules à la fin de l'expérience. L'internalisation était ainsi calculée en μg de platine par cellule. De plus, l'ajout d'un deuxième filtre, sous le premier pour certaines réplifications, permettait de vérifier qu'il n'y avait pas de surestimation de la bioaccumulation à cause d'une contamination des filtres (Figure 22).

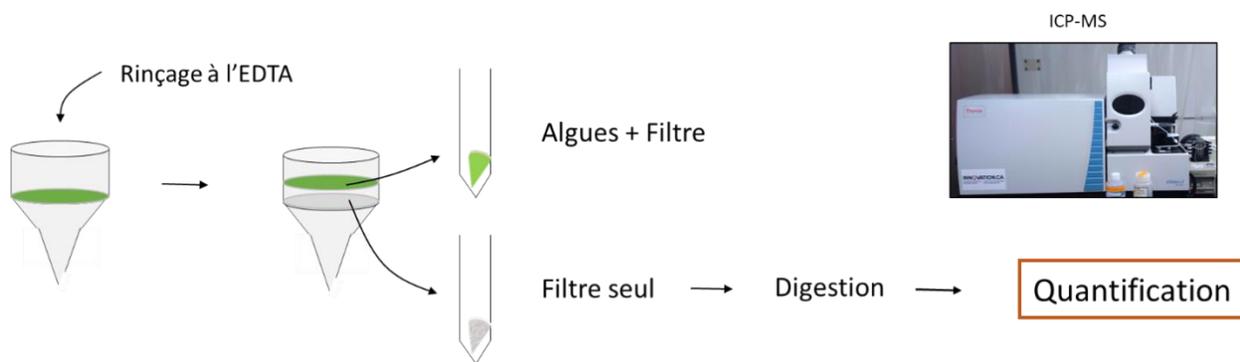


Figure 22: Principe de vérification de la méthode de digestion

2.8.3 Récupération d'algues pour les analyses transcriptomiques

Des échantillons de cultures algales étaient parfois récupérés, en milieu ou en fin d'exposition, pour réaliser des analyses transcriptomiques. Pour cela, les algues étaient centrifugées à basse vitesse (1500 à 4300 g) de façon à obtenir un culot visible. Ce culot était resuspendu dans 600 µL de RNA*later* (Invitrogen) afin de conserver les ARN en bon état et ces solutions étaient conservées à -20°C en attendant les extractions.

2.9 Réalisation des courbes dose-réponse

Pour les essais sur les algues vertes, le logiciel Sigma Plot a été utilisé pour réaliser des courbes dose-réponse en utilisant les densités cellulaires relatives (axe Y) en fonction des concentrations en platine inorganique moyennes mesurées sur toute la durée de l'expérience (axe X).

Un modèle de courbe (Équation 6), proposé par le logiciel, a été appliqué afin de déterminer les CE50, qui indiquent pour quelle concentration de platine dans la solution d'exposition il y a une inhibition de 50% du rendement des cellules algales au bout de 96 h.

$$y = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + \left(\frac{x}{CE50}\right)^{-Hillslope}}$$

Équation 6: Equation de courbe dose-réponse

Une première modélisation avec un point par réplication a permis de déterminer de façon la plus précise possible la valeur de CE50 puis une seconde modélisation avec un point par condition a été réalisée ensuite afin de présenter une courbe plus épurée.

Les incertitudes représentées par les barres d'erreur correspondent à :

- Pour les concentrations en platine mesurées moyennes sur l'expérience : l'écart-type des valeurs de concentration en platine de toutes les répétitions et à tous les temps de mesure (t=0 et t=96 h).
- Pour les densités relatives : un calcul de propagation d'erreur a permis de déterminer l'Équation 7 correspondant à l'incertitude sur la densité cellulaire

relative. Elle prend en compte l'écart-type des valeurs de densité cellulaire des trois réplifications considérées ainsi que l'incertitude sur la moyenne des témoins.

$$\Delta(N_{rel}) = \frac{1}{N_{témoin}} \times \left[\text{écart type } (N) + \frac{N \times \text{écart type } (N_{témoin})}{N_{témoin}} \right]$$

Équation 7: Calcul de la propagation d'incertitude lors de la détermination d'une densité cellulaire relative (N_{rel}). $N_{témoin}$ =valeur de densité cellulaire absolue moyenne des témoins ; N =Densité cellulaire absolue moyenne de la condition considérée.

2.10 Analyses transcriptomiques

2.10.1 Gènes d'intérêt

La réponse biologique des algues exposées au platine a été étudiée en déterminant la surexpression ou la sous-expression de certains gènes d'intérêt chez *Chlamydomonas reinhardtii* et chez *Nitzschia palea*. Ces gènes ont été choisis car leur expression est susceptible d'être modifiée lors d'exposition des organismes au platine. Globalement, ils correspondent à de grandes fonctions cellulaires qui peuvent être associées à la réponse à une contamination métallique (Tableau 6) (Blaby-Haas & Merchant, 2012; Kim *et al.*, 2017; Kim Tiam *et al.*, 2012; Kim Tiam *et al.*, 2018).

Tous les gènes d'intérêt sélectionnés n'ont pas pu être étudiés systématiquement chez les deux espèces, car ils étaient parfois indisponibles dans les banques de données ou les amorces conçues ne permettaient pas de les amplifier. Seuls les gènes dont l'expression a pu être déterminée sont présentés dans le Tableau 6. Ceux marqués en bleu n'ont pu être étudiés que chez *Nitzschia palea*, ceux en vert, que chez de *Chlamydomonas reinhardtii* et ceux en noir chez les deux algues.

Tableau 6: Gènes étudiés et fonctions cellulaires associées ; en noir ceux qui ont pu être étudiés chez les deux algues, en bleu seulement chez *Nitzschia palea* et en vert seulement chez *Chlamydomonas reinhardtii*

Gène d'intérêt	Nom complet	Fonction(s) cellulaire(s) associée(s)
<i>PsaA</i>	Protéine PsaA synthase	Photosynthèse, photosystème 1 : PS1
<i>d1</i>	Protéine D1	Photosynthèse, photosystème 2 : PS2
<i>cox1</i>	Cytochrome C oxydase sous unité I	Métabolisme mitochondrial
<i>nad5</i>	NADH Déshydrogénase sous unité 5	
<i>12S</i>	ARN mitochondrial ribosomique 12S	
<i>sodMn</i>	Superoxyde dismutase mitochondriale	Défenses antioxydantes / métabolisme mitochondrial
<i>sodCu/Zn</i>	Superoxyde dismutase cytoplasmique	Défenses antioxydantes
<i>sodFe</i>	Superoxyde dismutase chloroplasmique	
<i>cat</i>	catalase	
<i>Fad</i>	Flavine adénine dinucléotide synthase	
<i>gst</i>	Glutathion S-transférase	
<i>gpx</i>	Glutathion peroxydase 1	
<i>psc1</i>	Phytochélatine synthase 1	Détoxification
<i>mdr1</i>	MultiDrug resistance	
<i>ctr1</i>	Protéine d'internalisation du cuivre 1	Transporteur, cuivre
<i>ctr2</i>	Protéine d'internalisation du cuivre 2	
<i>ctr3</i>	Protéine d'internalisation du cuivre 3	
<i>nramp1</i>	Protéine associée à la résistance naturelle des macrophages 1	Transporteur, métaux
<i>βact</i>	β actine	Références
<i>EF1α</i>	Elongation factor 1 α	
<i>rpL13</i>	Protéine ribosomale L13	

Les gènes de référence permettent de déterminer des différences d'expression relative des autres gènes et ont donc été choisis car leur expression reste stable dans le temps. Ce sont en général des gènes dits « de ménage »; ils correspondent à des fonctions cellulaires assurant l'intégrité physique des cellules. Ici, il s'agissait de *βact*, *EF1α* et *rpL13* pour *Chlamydomonas reinhardtii*, et *rpL13* pour *Nitzschia palea*.

2.10.2 Extraction des ARN

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à l'aide du Kit « SV Total RNA Isolation System » (Promega). Les cellules étaient séparées du liquide de conservation les contenant (RNA^{later}, invitrogen) par centrifugation ou filtration. En premier lieu, elles étaient broyées dans 1 mL de Trizol (TRI reagent solution, Invitrogen) par l'intermédiaire de billes en verre de diamètre 0,10 à 0,11 mm (B. Braun Biotech International) en utilisant un Fastprep (Biorad, 4 mouvements/s, 40 s) ou un vortex (2 x 30 s). Puis, 200 µL de chloroforme (Fisher Chemicals) étaient ajoutés afin d'effectuer une déprotéinisation (Bienvenu *et al.*, 1999). Après mélange au vortex 10 s, une centrifugation (13 500 rpm soit environ 18 000 g) de 5 minutes permettait ensuite de séparer les phases aqueuses et organiques. La phase aqueuse, contenant les acides nucléiques (ADN et ARN), était récupérée puis mélangée à un volume d'éthanol à 75% avant d'être déposée sur une colonne d'affinité. Les étapes suivantes permettent d'éliminer les protéines hydrophiles restantes grâce à des rinçages avec une solution saline (RNA Wash Solution). Par la suite, un traitement à la DNase I (1 U) était effectué, en incubant 15 minutes à 37°C, afin de casser les molécules d'ADN. Une fois les traitements terminés, les ARN totaux étaient élués avec 30 µL d'eau (Nuclease Free) du kit dans des tubes prévus à cet effet. Les ARN totaux ainsi obtenus ont pu être stockés à -80°C ou utilisés pour réaliser la rétro-transcription (RT). La Figure 23 récapitule les étapes décrites ci-dessus.

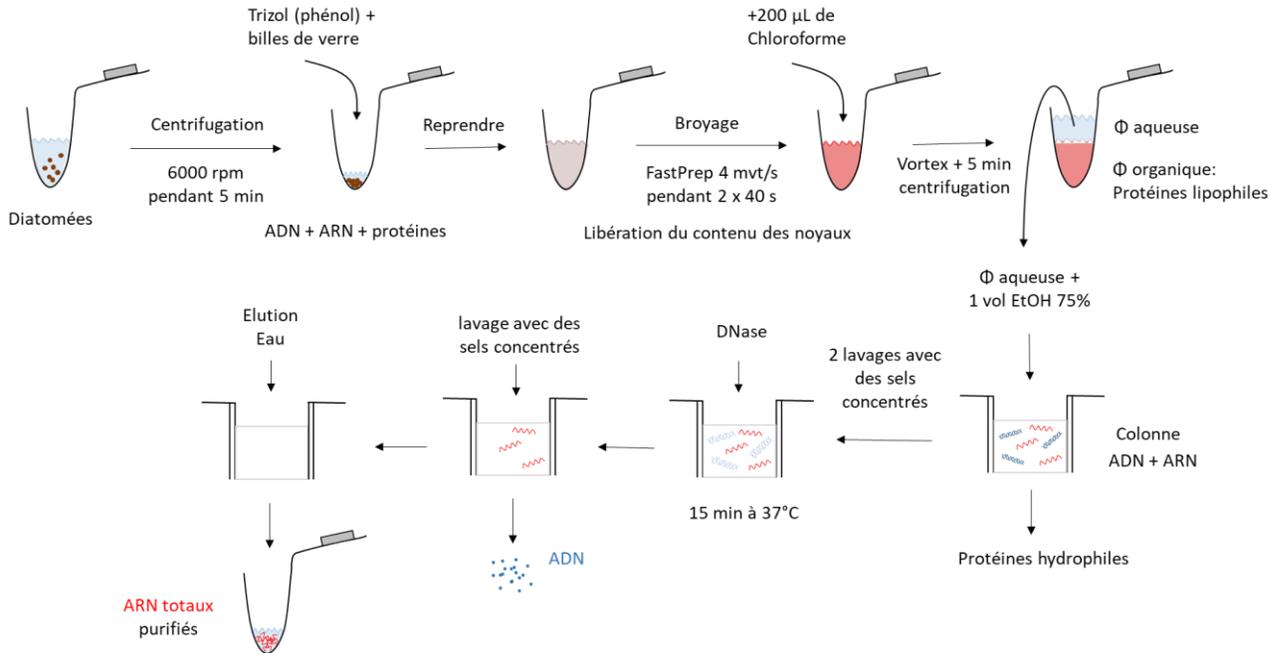


Figure 23: Schéma explicatif du protocole d'extraction des ARN totaux chez les diatomées ; mvt : mouvement ; Φ : phase

Un dosage au spectrophotomètre (Biotek®) permettait d'estimer la pureté des acides nucléiques ainsi extraits. Pour cela, une goutte de 2 μ L de chaque échantillon était déposée sur une plaque spécifique à l'appareil (EPOCH) et les absorbances aux longueurs d'onde 260 et 280 nm étaient simultanément mesurées pour détecter la présence éventuelle de protéines et quantifier les ARN. Un échantillon est considéré suffisamment « pur » en ARN lorsque le ratio de l'absorbance à 260 nm sur l'absorbance à 280 nm est supérieur à 1,8. La quantité d'ARN estimée est également donnée par l'appareil en ng/ μ L et permet de vérifier que l'extraction a bien fonctionné.

2.10.3 Rétro transcription

La RT a été réalisée à l'aide du kit « GoScript Revers Transcription System » (Promega). Cette étape a permis la transformation des ARN purifiés en ADNc (ADN complémentaire). Pour un échantillon, 1 μ L d'oligodT (1 μ mol/L) a été déposé dans un microtube avec 1 μ L d'hexaprimer (1 μ mol/L) et 10 μ L d'ARN purifiés (environ 1 μ g). Le mélange a ensuite subi un cycle au thermocycleur pendant 5 minutes à 70°C suivi d'une descente progressive en température pour atteindre 4°C afin de linéariser les ARN et permettre

aux amorces de se fixer. Après quoi 1 μL d'une solution de dNTP (10 mmol/L), 4 μL de tampon d'activité 5x, 1,5 μL de MgCl_2 (25 mmol/L), 1 μL de reverse transcriptase (1 U/ μL) et 0,5 μL de RNAsine ont été ajoutés. Ce mélange a été replacé dans le thermocycleur avec le protocole suivant : 5 minutes à 25°C, puis 1 heure à 42°C pour réaliser la synthèse des ADNc. Les échantillons contenant les ADNc ainsi synthétisés ont été stockés à -20°C en vue de la qPCR.

2.10.4 Amplifications

La PCR (*polymerase chain reaction*) quantitative en temps réel permet de quantifier le niveau d'expression des gènes. Elle a été réalisée avec le LightCycler 480 (Roche) permettant de suivre en temps réel l'amplification des ADNc grâce à l'ajout d'un agent intercalant fluorescent dans le milieu réactionnel : le SyberGreen. La fluorescence détectée à 530 nm, a été mesurée à la fin de chaque cycle. Ainsi la quantité de fluorescence mesurée permet de déterminer la quantité d'ADNc initiale. Les réactions de PCR ont été réalisées dans des microplaques de 96 puits en utilisant le kit « GoTaq® qPCR Master Mix» (Promega) contenant lui-même le tampon 2x (tampon d'activité, *Taq* polymérase, MgCl_2 , dNTP et le SyberGreen). Au préalable, un mélange des amorces a été réalisé pour chaque gène (2 μM d'amorces sens et 2 μM d'amorces anti-sens). Dans chaque puits ont été ajoutés 13 μL de mélange réactif 2x dilué (10 μL tampon 2x + 3 μL d'eau), 2 μL du mélange d'amorces et 5 μL d'ADNc dilué au 1/10. La Figure 24 et la Figure 25 correspondent respectivement aux plans de plaque utilisés pour les amplifications de gènes chez *Chlamydomonas reinhardtii* et *Nitzschia palea*.

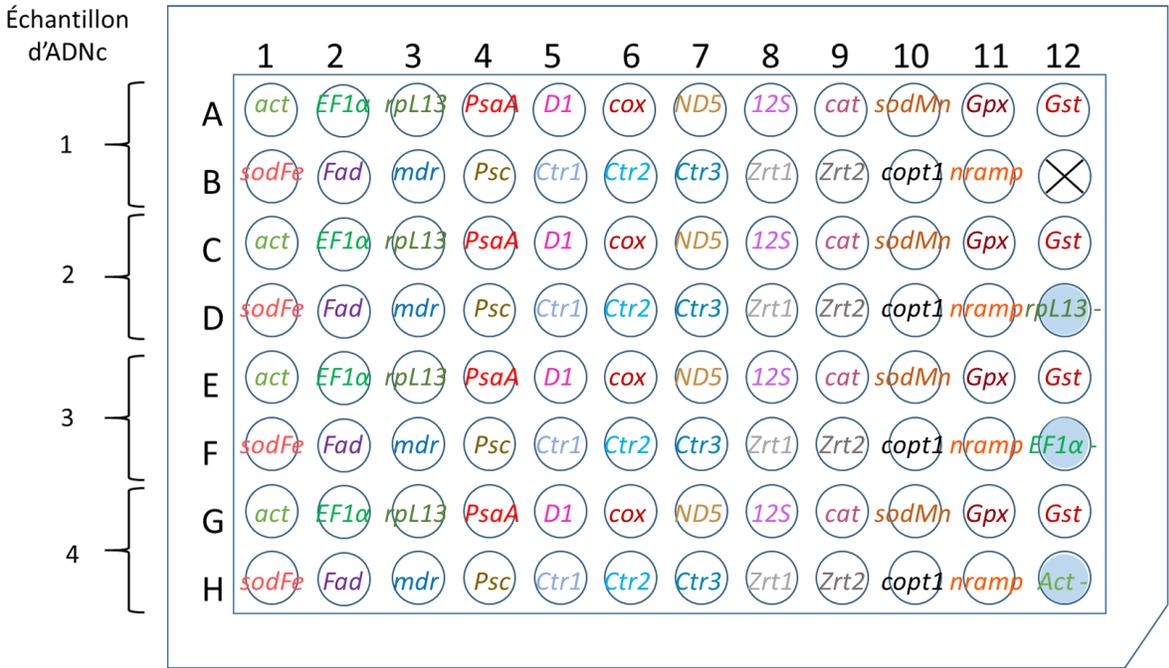


Figure 24: Plan de plaque de qPCR pour les analyses transcriptomiques sur *Chlamydomonas reinhardtii*

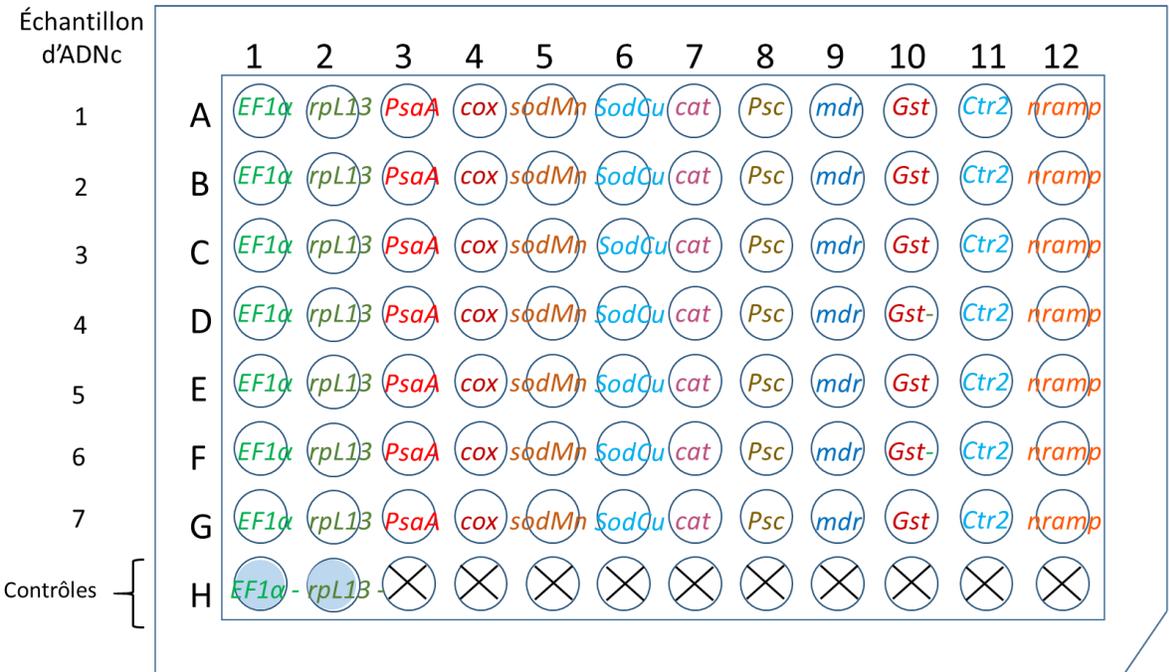


Figure 25: Plan de plaque de qPCR pour les analyses transcriptomiques sur *Nitzschia palea*

Les plaques étaient tout d'abord chauffées à 95°C pendant 2 minutes afin d'activer la *Taq* polymérase avant d'enchaîner 50 cycles de PCR (95°C, 15 s ; 60°C, 1 min). A 95°C, les ADN sont dénaturés et à 60°C la fixation des amorces est favorisée, puis la *Taq* polymérase permet la synthèse du brin complémentaire avant de recommencer un nouveau cycle. À la fin de la réaction, la qualité des amplifications a été déterminée par la réalisation de courbes de fusion à l'issue des 50 cycles. Celles-ci étaient réalisées par une prise de fluorescence en continu lors d'une montée en température progressive de l'appareil de 60°C à 95°C. Elle permettait de déterminer la température de fusion des brins d'ADN amplifiés qui est spécifique à chaque gène.

2.10.5 Traitement des données de qPCR

A l'issue de l'analyse, le logiciel utilisé (LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62.SP3) permettait de calculer le Ct : le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence émise dépasse significativement le niveau basal permettant alors une détection par l'appareil. Il s'agit du nombre de cycles n nécessaires pour atteindre le début de la phase exponentielle de la courbe de PCR qui est dépendante du nombre de copies initiales de la cible. Moins il y a de copies d'un gène au départ, plus le Ct sera élevé. Le niveau d'expression de chaque gène a été déterminé par rapport à celui de gènes de référence (*βact*, *ef1α* et *rpL13*) dont l'expression est stable et ne présente pas de variation en fonction des traitements expérimentaux appliqués. La différence des moments de sortie (ΔCt) entre la moyenne des gènes de référence et le gène d'intérêt a été calculée selon la méthode décrite par Livak and Schmittgen (2001).

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gène ciblé}} - Ct_{\text{gène de référence}}$$

Équation 8: Calcul de la différence des moments de sortie

Pour déterminer la réponse biologique à la contamination, il faut ensuite comparer les différentes concentrations/conditions d'exposition aux témoins, le facteur d'induction FI est calculé selon la formule ci-dessous.

$$FI = \frac{2^{-\Delta Ct \text{ contaminé}}}{2^{-\Delta Ct \text{ témoin}}}$$

Équation 9: Calcul du facteur d'induction FI

Ce sont ces facteurs d'induction qui sont présentés et exploités dans les tableaux de résultats.

2.10.6 Limites de la méthode

Le platine étant connu pour ses interactions avec les molécules d'ADN, il est possible que sa présence ait diminué les performances d'extraction des ARN et donc engendré un biais sur les résultats de PCR. En effet, lors de l'étape du broyage des algues, le platine intracellulaire était relargué dans le milieu, avec les protéines, ADN et ARN. Toutefois, la modification de l'expression de gènes était réalisée par qPCR, qui compare l'expression d'un gène donné avec un gène de référence et permet justement de limiter les biais liés aux performances d'extractions. Malgré cela, les interactions avec le platine pourraient être différentes selon les types d'ARNm. Dans le cas des extractions réalisées au cours de ce projet, les gènes de référence avaient des temps de sortie similaires entre témoins et conditions d'expositions, ce qui montre que la présence de platine n'a pas interféré dans les performances d'extraction ou de PCR en se liant aux ARN.

2.11 Traitements statistiques.

Le logiciel R a été utilisé pour toutes les analyses statistiques de ces travaux.

Pour comparer les courbes de croissance algale entre les différentes conditions de contamination, ce sont des ANOVA à deux voies qui ont été utilisées, suivies de tests post-hoc de Tukey. Pour ce qui est des courbes de bioaccumulation en fonction de la concentration en platine pour les différentes conditions de concentrations en AH, les

conditions de normalité n'étaient pas respectées, c'est donc un test non paramétrique de Kruskal-Wallis qui a été utilisé. Dans le cas où certains groupes étaient différents, un test post-hoc de Wilcoxon a permis de déterminer quels groupes, quelles conditions étaient différentes entre eux/elles. Enfin, pour les analyses transcriptomiques, les conditions d'application étaient vérifiées pour chaque gène étudié et un test paramétrique (ANOVA à une voie) ou non paramétrique (Kruskal-Wallis) était appliqué selon le résultat. Les tests post-hoc correspondant étaient respectivement le test de Tukey et le test de Dunn. Pour ces analyses, plusieurs niveaux de confiance ont été déterminés et correspondent aux p_{value} présentées dans le Tableau 7.

Tableau 7: Niveaux de confiance pour les statistiques réalisées sur les analyses transcriptomiques

Nombre d'astérisques	p_{value} inférieure à
1	0,05
2	0,01
3	0,001

CHAPITRE 3: VÉRIFICATIONS MÉTHODOLOGIQUES

3.1 Contrôle de la concentration en platine pendant les expositions

La concentration en platine total de chaque milieu était mesurée toutes les 24 h, pour les essais de 96 h sur les algues vertes, et tous les 7 jours pendant ceux de 21 à 28 jours pour les diatomées. Dans le cas où des AH étaient ajoutés au milieu d'exposition, les concentrations de platine inorganique étaient mesurées deux fois, en début et en fin d'expérience, grâce à la méthode d'ultrafiltration partielle. Tout cela permettait de vérifier que les valeurs restaient bien autour des concentrations nominales voulues, qu'il n'y avait pas eu trop de variations dues à l'adsorption du métal sur les parois du contenant ou à l'internalisation par les microalgues et surtout pour exprimer certains des résultats en fonction des concentrations réelles mesurées.

Pour les expositions réalisées dans des flacons en polycarbonate, la concentration en platine total restait très stable dans le temps. Une légère diminution était tout de même observée. L'ajout d'une condition sans algues a permis de démontrer que cette perte était due à parts égale au matériau d'exposition et à la présence des algues (la Figure 63 correspondante est présentée dans l'Annexe II).

Les Figure 26 et Figure 27 montrent que la concentration d'exposition en platine diminue légèrement, mais reste très stable dans le PC au cours des expériences, quelle que soit l'espèce exposée et la concentration en AH. Les barres d'erreur sont d'ailleurs si petites qu'elles ne sont pas visibles sur les graphiques correspondants.

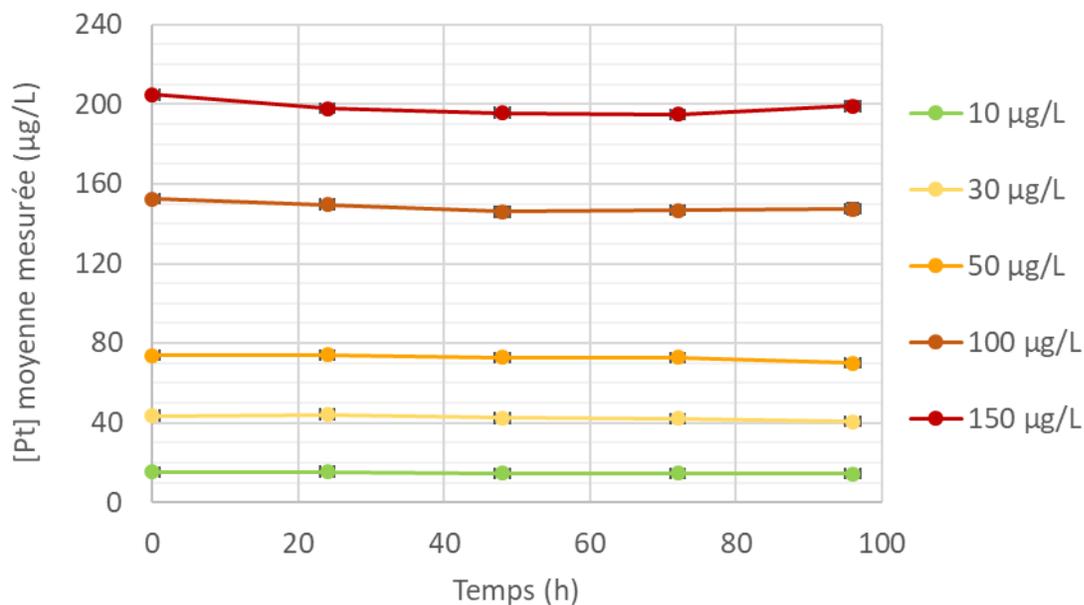


Figure 26: Suivi de la concentration en platine total mesurée par ICP-MS dans des erlenmeyers en PC lors de l'exposition de *Chlorella fusca* en présence de 10 mg C/L d'AH dans le milieu MHSM-1; pH=6 (n=3)

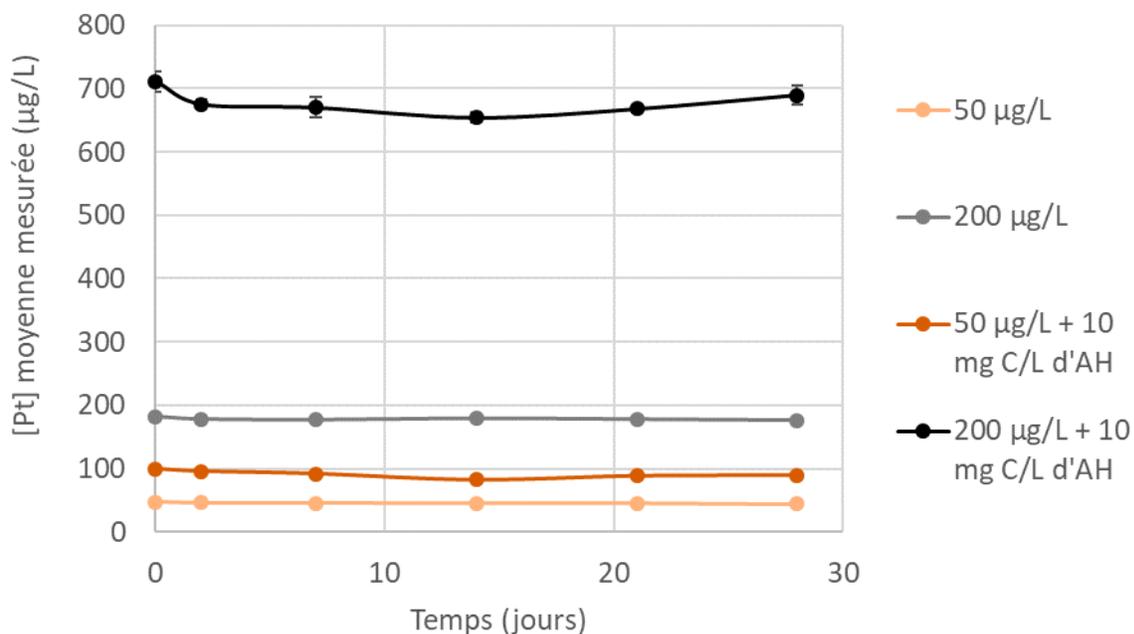


Figure 27: Suivi de la concentration en platine total mesurée par ICP-MS dans des erlenmeyers en PC lors de l'exposition de *Nitzschia palea* en l'absence et en présence de 10 mg C/L d'AH dans le milieu CHU-10 modifié; pH=7 (n=5)

Pour les expositions de 21 jours des diatomées, des erlenmeyers en verre borosilicaté ont été utilisés. Une adsorption plus importante a été observée, contrairement à ce qui était attendu d'après les travaux de Cobelo-Garcia *et al.* (2007). En effet, la concentration en platine était beaucoup moins stable lors de cette exposition des diatomées que lors de celles réalisées dans le PC, avec une forte diminution (jusqu'à 40%) entre 0 et 7 jours (Figure 28). La part de cette perte attribuée à l'adsorption du platine sur le verre sur cette durée et dans des conditions similaires demeure à être vérifiée. Pour pallier ce phénomène, il serait possible de doser régulièrement le platine et d'en rajouter en cours d'exposition.

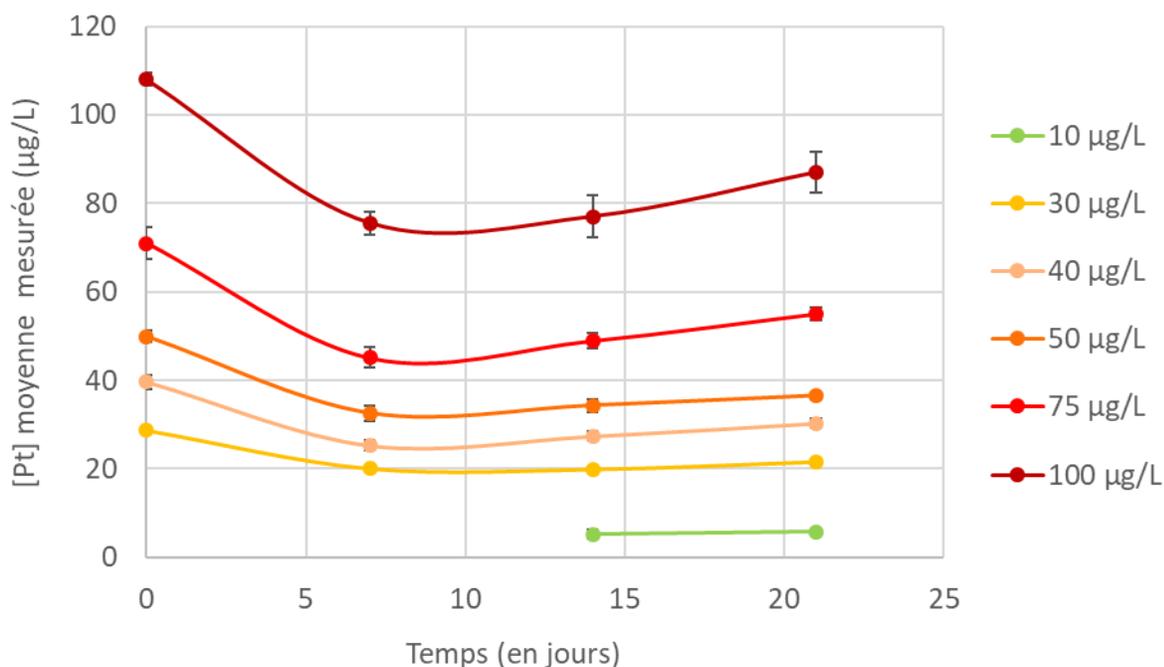


Figure 28: Suivi de la concentration en platine mesurée par GFAAS dans des erlenmeyers en verre lors de l'exposition de *Nitzschia palea* dans le milieu CHU-10 modifié ; pH=7 (n=3)

3.2 Contrôle de la concentration en acides humiques pendant les expositions

La concentration en AH était contrôlée à la même fréquence que la concentration de platine total. Un spectrofluorimètre (Varian) et une gamme d'étalons avec des concentrations variables en carbone organique total était utilisée pour calibrer l'appareil, comme décrit dans la section *Matériel et méthodes*, partie 2.6. D'après les figures représentées ci-dessous, la concentration en AH mesurée est restée stable pour 10 mg C/L dans le MHSM-1 (Figure 29). Elle a parfois tellement fortement augmenté au cours des expositions à 20 mg C/L dans le MHSM-1 (Figure 30) et à 10 mg C/L dans le CH-10 (Figure 31), que cela a parfois engendré de fortes incertitudes et des valeurs moins fiables en fin d'exposition. En effet, au-delà d'une certaine concentration, il n'y avait plus de relation linéaire entre l'intensité lumineuse déterminée par le spectrofluorimètre et la concentration réelle d'AH en solution. En conséquence, il y avait une incertitude plus importante sur les calculs des concentrations en AH correspondantes à ces mesures. Finalement, il a été décidé de ne considérer que la concentration à t=0.

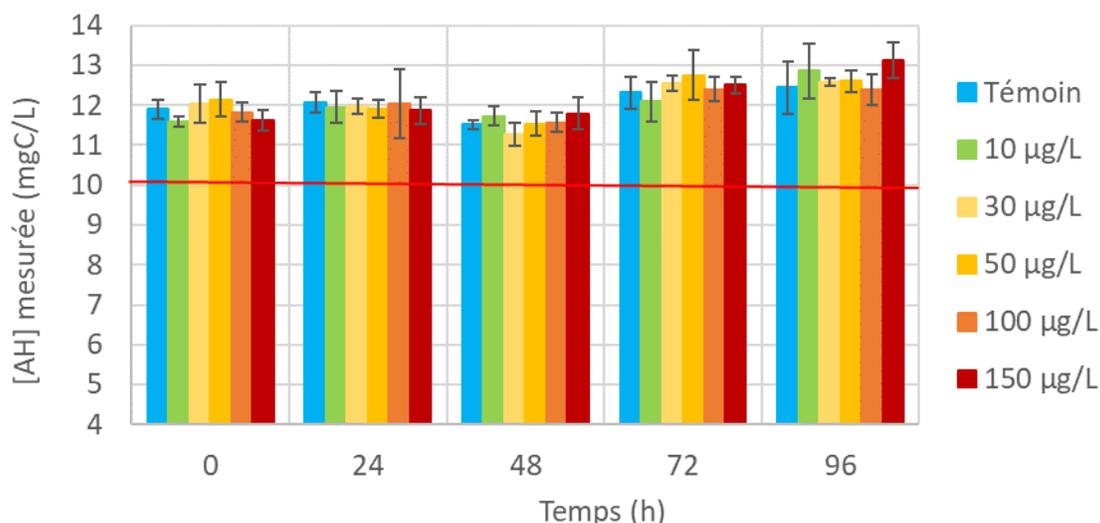


Figure 29: Variation de la [AH] dans le milieu MHSM-1 mesurée par spectrofluorimétrie pour les différentes conditions d'exposition au Pt_{inorg} . (0-150 µg/L) au cours du temps de l'expérience pour 10 mg C/L visé lors de l'exposition de *Chlorella fusca* (n=3)

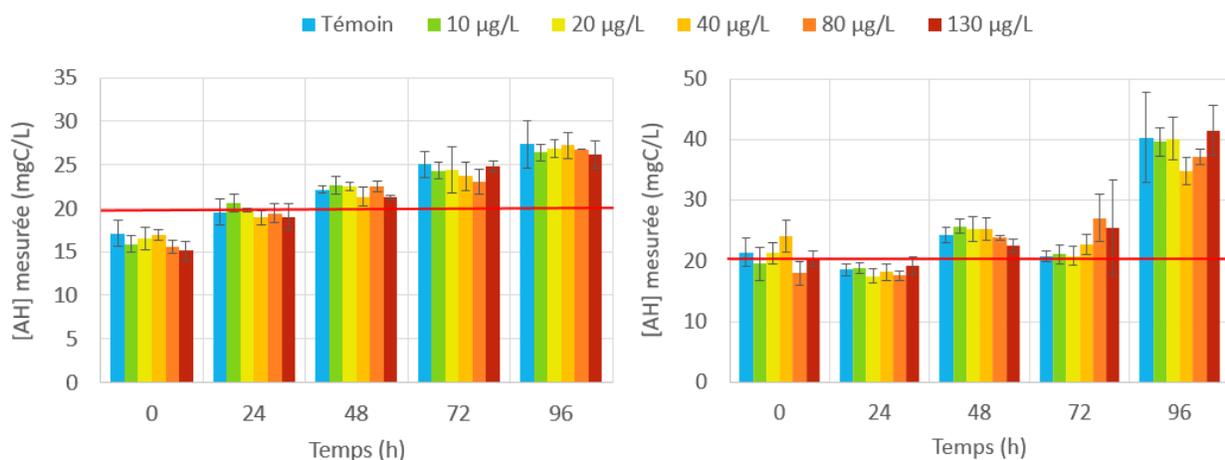


Figure 30: Variation de la [AH] mesurée par spectrofluorimétrie dans le milieu MHSM-1 pour les différentes conditions d'exposition au Pt_{inorg.} (0-130 µg/L) au cours du temps de l'expérience pour 20 mg C/L visé (exposition de *Chlorella fusca* à gauche et *Chlamydomonas reinhardtii* à droite) (n=3)

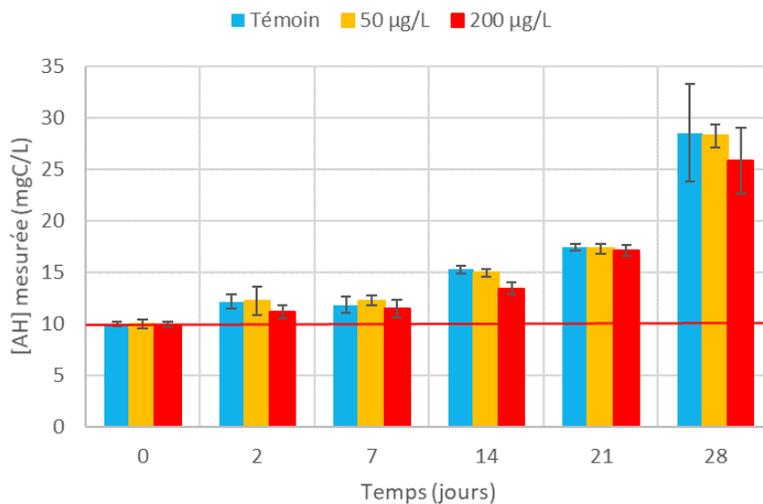


Figure 31: Variation de la [AH] mesurée par spectrofluorimétrie dans le milieu CHU-10 pour les différentes conditions d'exposition au Pt_{inorg.} (0-200 µg/L) au cours du temps de l'expérience d'exposition de *Nitzschia palea* pour 10 mg C/L visé (n=5)

Une hypothèse d'explication de cette surestimation serait que la rupture de certaines liaisons et possiblement le réarrangement spatial de ces macromolécules induisent une activité optique différente, dans ce cas, supérieure, alors que la concentration en mg C/L

provenant des AH reste la même. En effet, d'après Mostofa *et al.* (2013), l'exposition à la lumière ou la dégradation par des microorganismes peut modifier la fluorescence d'un composé et/ou déplacer les pics d'excitation/émission. Cependant, cette piste d'explication est peu plausible en raison de la nature réfractaire des AH de la rivière Suwannee achetés. En effet, les conditions d'extractions amenant à la préparation de la poudre utilisée ont pour conséquence que les molécules soient plutôt stables.

Une autre hypothèse serait une production de composés organiques par excrétion des cellules algales et semble à première vue peu probable. En effet, la mesure de la fluorescence des conditions sans AH ne montrait pas la présence d'un quelconque composé avec des activités optiques interférentes par les algues. De plus, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission correspondaient à un pic de composés « humic like » qui est différencié du pic correspondant aux exsudats algaux (Coble, 1996). Il est néanmoins possible que la présence d'AH adsorbés à la membrane des algues et l'augmentation de la perméabilité qui en résulte mène à l'exsudation de composés d'origine algale qui ne sont normalement pas excrétés et qui interfèrent avec cette mesure. En conséquence, l'excrétion de composés organiques par les cellules pourrait finalement constituer une piste d'explication. L'utilisation d'une méthode de mesure de fluorescence en 3D (matrices d'excitation et d'émission) permettrait de visualiser la modification de l'intensité et de la localisation des différents pics en termes de longueur d'onde d'excitation et d'émission et ainsi permettre d'expliquer cette augmentation. Des exsudats algaux, qui correspondraient à des molécules organiques de plus petite taille que le AH, pourraient aussi engendrer une modification de la spéciation du platine en solution, d'où l'importance de les caractériser par cette méthode.

3.3 Vérification de la méthode d'ultrafiltration

Afin de valider la méthode pour chaque expérience, les acides humiques ont été systématiquement quantifiés dans les ultrafiltrats et ultrarétentats par spectrofluorimétrie. Les pourcentages de carbone organique mesurés dans les ultrafiltrats sont présentés dans le Tableau 8 et était environ entre 1 et 3 %. Les bilans de masse du platine étaient

le plus souvent supérieurs à 96%, les valeurs moyennes et minimales pour les deux milieux de culture utilisés sont présentées dans le Tableau 9.

Tableau 8: Pourcentages d'AH détectés par spectrofluorimétrie dans les ultrafiltrats pour chaque milieu utilisé

Milieu de culture	Concentration en AH visée (mg C/L)	% d'AH détecté dans les ultrafiltrats à t=0	% d'AH détecté dans les ultrafiltrats en fin d'exposition
MHSM-1	10	2,6 ± 0,5	2,2 ± 0,7
MHSM-1	20	1,6 ± 0,7	1,1 ± 0,5
CHU-10 modifié	10	1,9 ± 0,8	1,8 ± 0,7

Tableau 9: Bilans de masse du platine quantifié à l'ICP-MS après ultrafiltration pour les milieux d'exposition utilisés

Bilan de masse Pt (%)	MHSM-1 (10 mg C/L)	MHSM-1 (20 mg C/L)	CHU-10 modifié
Moyen	97,6 ± 5,0	99,7 ± 2,5	96,5 ± 4,2
Minimal	67,0	93,3	86,1

Le pourcentage d'AH qui traverse la membrane de porosité 3 kDa des unités d'ultrafiltration est faible et les bilans de masse du platine sont très bons (au-dessus de 93 et 86 % dans le MHSM-1 et le CHU-10 respectivement). A part quelques rares exceptions dans le jeu de données (comme le bilan de masse minimum de 67 % dans le MHSM-1 avec 10 mg C/L d'AH), la méthode est efficace pour retenir l'AH et les pertes de platine par adsorption sur les parois et la membrane sont négligeables.

Dans le milieu MHSM-1, et pour les concentrations en AH testées, les concentrations en platine inorganique restaient plutôt similaires entre le début et la fin de l'expérience d'exposition, comme présenté dans la Figure 32 qui correspond à l'expérience d'exposition de *Chlorella fusca* en présence de 20 mg C/L d'AH. Il y avait tout de même une diminution notable, bien que seulement significative pour 20 µg Pt/L (test de Student).

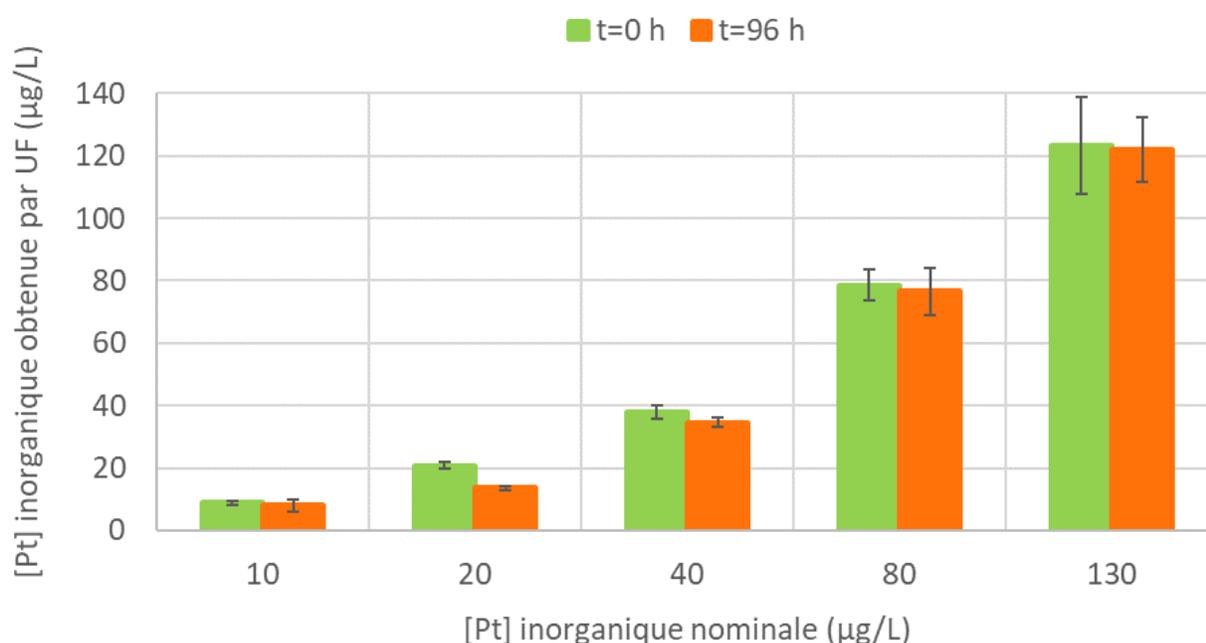


Figure 32: Concentrations en platine inorganique déterminées expérimentalement par ultrafiltration partielle (UF) dans le MHSM-1 avec 20 mg C/L d'AH en début et en fin d'exposition de *Chlorella fusca* ; pH=6 (n=3)

Que ce soit en présence de 10 ou de 20 mg C/L d'AH et pour les expositions de *Chlorella fusca* ou de *Chlamydomonas reinhardtii*, la spéciation organique/inorganique du platine restait stable dans le milieu MHSM-1 pendant les 96 h d'exposition. En conclusion, il est possible de ne mesurer la spéciation qu'à t=0, surtout pour les concentrations d'exposition les plus élevées, car elle est représentative de la spéciation sur les 96 h d'expérimentation.

Pour les expositions dans le CHU-10, le temps d'exposition était plus long : 28 jours. Dans la Figure 33, on observe une diminution significative de la concentration en platine inorganique au cours de l'expérience, et ce pour les deux concentrations d'exposition étudiées : 50 µg/L ($p_{value} < 10^{-6}$), et 200 µg/L ($p_{value} < 0,002$) d'après un test de Student. Il

aurait été intéressant de réaliser un échantillonnage en milieu d'expérience (14 jours) afin de déterminer si cette baisse est progressive tout au long de l'exposition, ou plutôt abrupte.

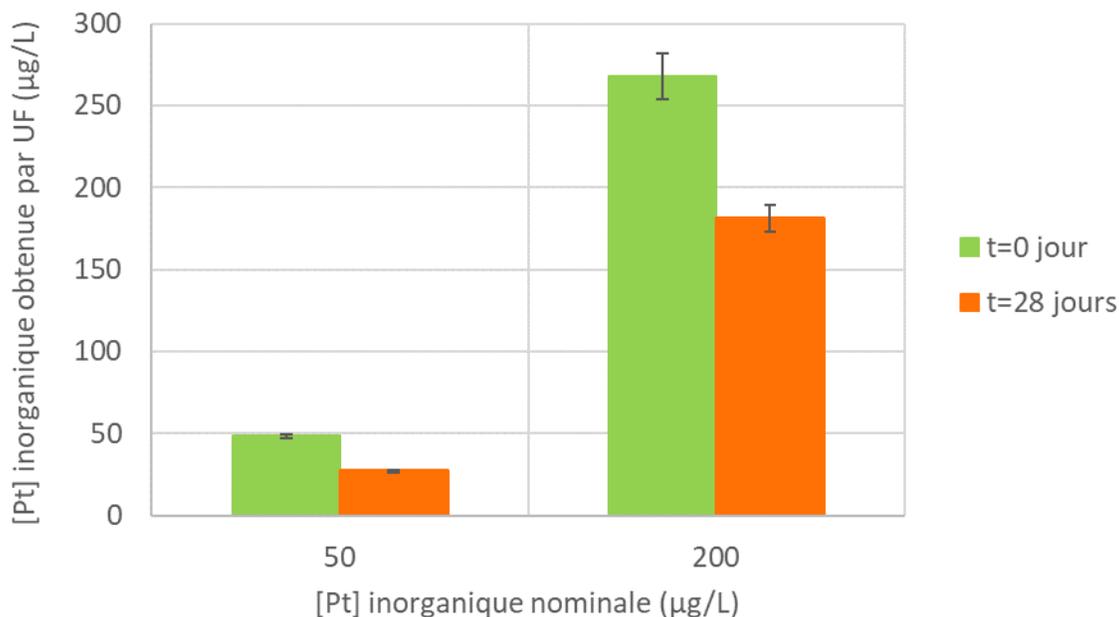


Figure 33: Concentrations en platine inorganique déterminées expérimentalement par ultrafiltration partielle (UF) dans le CHU-10 avec 10 mg C/L d'AH en début et en fin d'exposition de *Nitzschia palea* ; pH=7 (n=3)

Finalement, c'est la concentration en platine inorganique moyenne mesurée sur l'expérience qui a été prise en compte pour réaliser les courbes dose-réponse quand il y avait lieu.

3.4 Comparaison des deux acides humiques du projet

Comme expliqué dans la section *Matériel et méthodes* (Chapitre 2), deux poudres d'acides humiques différentes ont été utilisées au cours du projet : numéros de catalogues 2S101H et 3S101H, respectivement nommés AH(II) et AH(III). Ces deux poudres d'AH provenaient de deux échantillonnages différents par l'organisme *International Humic Substances Society*, et peuvent donc être de composition légèrement différente. Cependant, les conditions d'extractions subies ayant été les mêmes, on peut considérer que les composés ainsi extraits sont de composition assez similaire.

Visuellement, la couleur de la solution mère était un peu différente. D'un marron plus orangé pour les AH(III). Cependant les spectres d'émission à $\lambda_{\text{excitation}} = 350 \text{ nm}$ sont similaires et le maximum d'excitation est atteint pour $\lambda = 467$ pour les AH(III) contre $\lambda = 463$ pour les AH(II), ce qui est très peu différent. En effet, la Figure 34 représente le spectre d'émission obtenu pour les AH(III), qui est similaire à celui obtenu pour les AH(II) présenté dans les travaux de Rioux (2018).

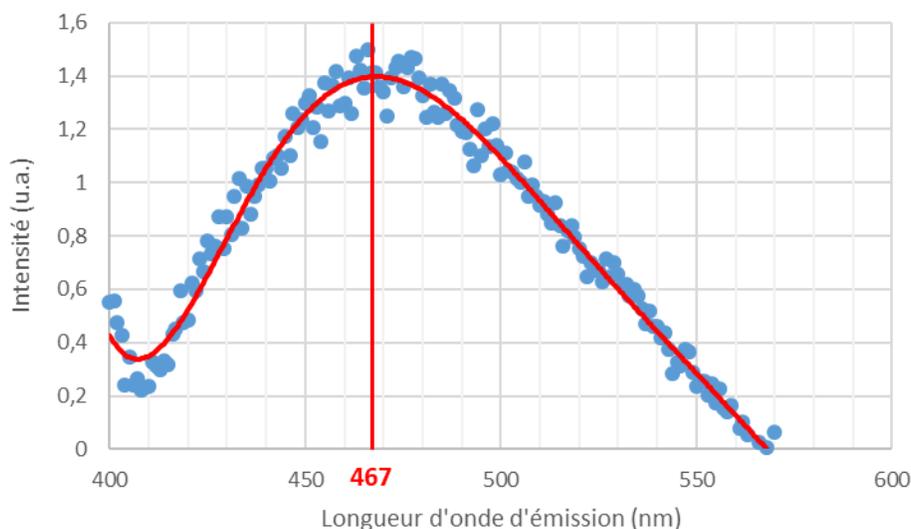


Figure 34: Spectre d'émission d'une solution de AH(III) (Suwannee River : n°3S101H) de 3 mg C/L mesuré par spectrofluorimétrie ; pH=6 ; $\lambda_{\text{excitation}} = 350 \text{ nm}$

Pour vérifier si ce changement de solution mère pouvait apporter un biais méthodologique, des comparaisons ont été réalisées entre les résultats de conditions d'exposition similaires, mais utilisant les différents AH. Finalement, il n'y avait pas de différences significatives en raison de grandes incertitudes, que ce soit en termes de croissance algale, de spéciation ou d'accumulation du platine. En conséquence, il n'a pas été possible de conclure sur ce point. Cette information a tout de même été prise en compte lors de l'étude des résultats, bien que ça ne semble pas avoir eu d'impact sur l'interprétation.

3.5 Vérification de la méthode de digestion

Des filtres seuls ont été digérés afin de vérifier qu'il n'y avait pas de surestimation de l'accumulation du platine par les algues. En effet, une partie de la quantité de métal détectée dans ces échantillons aurait pu provenir de l'adsorption du métal sur les filtres à la suite du passage du milieu d'exposition. Ces filtres « test » étaient obtenus avec le même traitement que ceux sur lesquels étaient récupérées les algues (voir *Matériel et méthodes*, partie 2.8.2). Les rinçages associés ont permis de confirmer que le passage de la solution contenant de l'EDTA était efficace pour désorber le platine des algues comme des filtres. Finalement, pour plus de 68 % des filtres ainsi digérés la concentration retrouvée était strictement inférieure à la limite de détection de l'ICP-MS et pour 100% des échantillons, inférieure à la limite de quantification ($LQ=10 \cdot LD$).

CHAPITRE 4: ESSAIS SUR LES ALGUES VERTES

4.1 Essais de toxicité sur *Chlamydomonas reinhardtii*

4.1.1 Récapitulatif des résultats de Rioux (2018) et étude complémentaire

Ce projet fait suite aux travaux de maîtrise de Rioux (2018). L'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* avait été exposée à la même gamme de concentrations de platine inorganique, en l'absence et en présence d'acides humiques (AH) de la rivière Suwannee. Ces travaux ont démontré que la croissance de cette algue était moins importante en présence de 10 mg C/L d'AH et de platine qu'en présence de platine seul. Cela était la conséquence d'une internalisation plus importante du platine en présence d'AH. Or, d'après les hypothèses du BLM (modèle du ligand biotique) (Campbell *et al.*, 2002), l'accumulation et la toxicité d'un métal dépendent seulement de l'activité de l'ion libre, qui peut ici (en milieu dilué) être assimilée à sa concentration. D'après les résultats de Rioux (2018), ce modèle n'est donc pas respecté pour le platine.

Afin de compléter les données sur cet organisme d'étude et ainsi mieux comprendre les interactions entre AH, platine, et algue, une exposition en présence de 20 mg C/L a été réalisée au cours du présent projet. De plus, des analyses transcriptomiques, dont les résultats sont présentés dans une section du même nom ont été réalisées sur les organismes échantillonnés à l'issue de cette expérience. Cela a permis d'identifier des voies d'entrées possibles du métal ainsi que de potentiels mécanismes biologiques de défense, de répartition intracellulaire et possiblement d'excrétion mis en jeu. La même démarche a été suivie pour une autre exposition sans AH de moins grande envergure ([Pt] = 0, 50 et 100 µg Pt/L) afin de pouvoir comparer les deux jeux de données et de mieux comprendre le rôle joué par les AH.

Les résultats qui sont présentés, notamment pour comparer la bioaccumulation du platine dans les différentes conditions expérimentales, sont parfois regroupés avec les données de Rioux (2018) pour faciliter les interprétations. Ces données sont fortement complémentaires avec le reste du projet et tous ces résultats permettent une vue

d'ensemble sur le rôle des AH dans l'accumulation et la toxicité du platine chez les microalgues d'eau douce.

4.1.2 Toxicité du platine pour *C. reinhardtii* en l'absence d'AH

La Figure 35 présente des courbes de croissance en densité cellulaire absolue de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* exposée à du platine. Des comptages étaient réalisés toutes les 24 h avec un compteur de particules. A noter que l'axe des ordonnées est en échelle logarithmique.

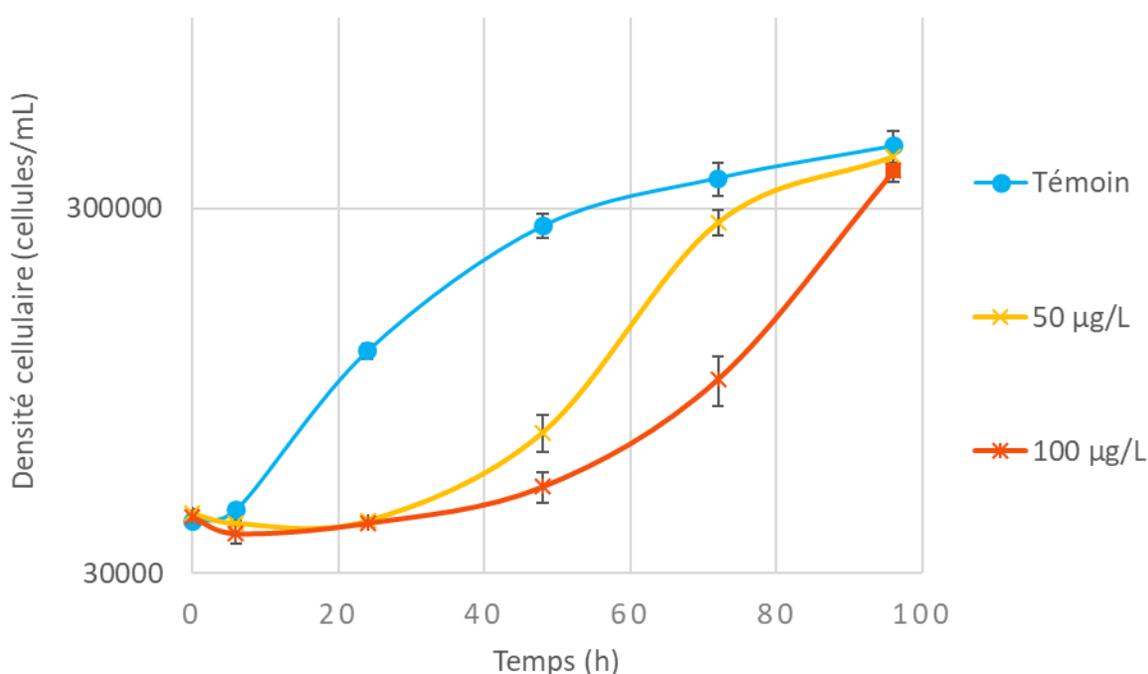


Figure 35: Courbes de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* pour différentes concentrations nominales de platine inorganique dans le milieu MHSM-1, pH=6 (n=3)

Si la population algale est peu affectée après 96 h, la croissance est retardée par rapport au témoin en début d'exposition, comme observée par Rioux (2018). Cet effet d'inhibition ou de retard de croissance, puis de reprise de la croissance est typique du platine (Roy, 2009; Tétrault, 2014). Ce phénomène peut s'expliquer par les propriétés d'inhibiteur de la division cellulaire de ce métal (Jakupec *et al.*, 2003), cependant cette tendance n'a pas

pu être observée pour d'autres métaux que le platine et le palladium. Cela pourrait être dû au fait que la cellule reste bloquée dans la phase G2 de son cycle cellulaire, qui est un des effets déterminés pour le cisplatine (Sorenson *et al.*, 1990). Il est aussi possible que cette reprise de croissance soudaine intervienne au moment où les cellules ont pu mettre en place des mécanismes de défense efficaces comme suggéré dans les résultats des analyses transcriptomiques présentés à la page suivante. L'étude statistique montre des différences significatives entre les courbes de croissance du témoin et des conditions d'exposition ainsi qu'entre 50 et 100 µg Pt/L (Test de Tukey : $p_{value} < 10^{-6}$).

4.1.2.1 Analyses transcriptomiques

Les résultats des analyses transcriptomiques sont toujours présentés à l'aide de tableaux, sous forme de facteurs d'induction (FI), calculés comme décrits dans la partie 2.10.5 de la section *Matériel et méthodes*. La présence d'une barre oblique indique que l'expression génétique est similaire à celle du témoin ($0,5 < FI < 2$) ou que l'intervalle des valeurs de $2^{-\Delta Ct}$ chevauche celui des témoins. Dans les conditions pour lesquelles il n'y a pas d'intervalle de valeurs communes, les FI sont donnés avec un remplissage des cases en vert en cas de répression du gène et en orange en cas d'induction. Des astérisques permettent de différencier les conditions significativement différentes des témoins avec plusieurs niveaux de confiance et les tests statistiques appliqués sont détaillés dans la partie *Matériel et méthodes*.

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, des gènes d'intérêt correspondant à des fonctions pouvant être altérées après exposition à des métaux ont été étudiés. Un récapitulatif des facteurs d'inductions obtenus pour cette expérience d'exposition est présenté dans le Tableau 10.

Tableau 10: Facteurs d'induction des gènes étudiés chez *Chlamydomonas reinhardtii* après une exposition au platine pendant 96 h ; orange : induction (>2) ; vert: répression (<0,5) ; n=3

Gènes d'intérêt	Facteurs d'induction pour chaque [Pt] inorganique nominale (µg/L)	
	50	100
<i>PsaA</i>	/	/
<i>d1</i>	/	/
<i>cox1</i>	4	/
<i>nad5</i>	9	/
<i>12S</i>	4	/
<i>cat</i>	8 ^{***}	/
<i>sodMn</i>	9 ^{**}	/
<i>gpx</i>	/	/
<i>gst</i>	0,02	4.10 ⁻⁵
<i>sodFe</i>	4	/
<i>fad</i>	/	/
<i>mdr1</i>	20	4
<i>pcs1</i>	12	/
<i>Ctr1</i>	25	3
<i>Ctr2</i>	8 ^{**}	/

Dans les conditions d'exposition au platine, il y a une demande en énergie plus importante pour lutter contre les effets de la contamination, ce qui peut d'ailleurs être à l'origine d'un retard de croissance (Lavoie *et al.*, 2016). En effet, on note une augmentation de l'expression des gènes *cox1* et *nad5*, qui codent pour des complexes de la chaîne respiratoire dans les mitochondries (Vedel *et al.*, 1999). On observe aussi une augmentation du niveau d'expression du gène *12S* du même ordre de grandeur, ce qui indique une augmentation du nombre de mitochondries qui permet à la cellule de produire cette énergie (Kim Tiam *et al.*, 2012; Moisset *et al.*, 2015). Cependant, cette acclimatation

des cellules peut aussi avoir des effets négatifs comme la génération d'ERO (espèces réactives de l'oxygène) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'anion superoxyde (O_2^-) et donc aggraver un stress oxydant lié à la présence du métal dans le milieu intracellulaire. Ces ERO sont hautement cytotoxiques et provoquent généralement une réponse de la cellule afin d'en diminuer leurs impacts (Toyo'oka *et al.*, 2003). En effet, on retrouve une réponse physiologique au stress oxydant par l'induction de plusieurs gènes qui suggèrent la présence de ces composés dans plusieurs compartiments de la cellule, notamment dans les mitochondries; en effet, le gène *sodMn* assure la métabolisation de l'anion superoxyde mitochondrial (Hermes-Lima, 2004). Les résultats suggèrent aussi un stress oxydant dans les chloroplastes (surexpression *sodFe*) et dans le cytoplasme par l'induction du gène *cat* qui code pour la synthèse de la catalase, une enzyme permettant la réduction de H_2O_2 .

Par ailleurs, il y a une induction, parfois importante, des gènes qui codent pour des transporteurs. C'est notamment le cas de ceux pour le cuivre (*Ctr1* et *Ctr2*), ce qui pourrait suggérer que ces protéines de transports soient une des voies d'entrée du platine dans la cellule. En effet, les métaux toxiques entrent souvent dans les cellules par des voies biologiques destinées à des métaux essentiels (Sunda & Huntsman, 1998). De plus, Huang *et al.* (2014) ont montré que le gène *Ctr2*, en plus de réguler les échanges de l'ion Cu^+ , joue un rôle dans la sensibilité de cellules de mammifère au cisplatine. Il se pourrait donc que ces transporteurs soient impliqués, d'une façon ou d'une autre dans les mécanismes d'internalisation du platine. Cette utilisation des protéines spécifiques par le platine engendrerait une déplétion en cuivre de la cellule, puisqu'il pourrait y avoir une compétition entre ces deux métaux pour l'internalisation. Par ailleurs, les gènes impliqués dans les mécanismes de détoxification *mdr1* et *psc1* voient leurs niveaux d'expression augmenter. La surexpression de *pcs1* dénote la mise en place d'un mécanisme de détoxification permettant le piégeage du platine. En effet, ce rôle des phytochélatines dans la séquestration des métaux traces est bien connu (Bukhari *et al.*, 2018; Callahan *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 1996). Pour ce qui est du gène *mdr1*, il code pour un ABC transporteur (*ATP Binding Cassette*). Ce dernier joue un rôle dans la détoxification par efflux actif (Bard, 2000). Sa surexpression pourrait dénoter son utilisation par les cellules pour possiblement expulser le platine et ainsi limiter son accumulation et l'apparition de

dommages. En effet ces protéines membranaires utilisent l'énergie disponible sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) pour transporter divers éléments, dont des métaux (Achard *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2017). Ainsi, leur rôle dans le transport du platine dans les membranes biologiques a déjà été décrit (Sprowl *et al.*, 2013). De plus, de nombreux articles décrivent que certaines de ces protéines, largement conservées dans le règne animal, seraient également impliquées dans la détoxification de divers xénobiotiques chez les organismes aquatiques (Ferreira *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2015). Nous pouvons donc penser que la surexpression de *mdr1* mesurée lors des analyses réalisées suggère l'utilisation de cette protéine comme mécanisme de détoxification vis-à-vis du platine. Cependant, peu d'exemples concrets d'excrétion de métaux par des microalgues sont répertoriés dans la littérature, bien que ce soit suggéré par de nombreux auteurs. Lee *et al.* (1996) ont tout de même démontré l'excrétion du cadmium conjointement à des phytochélatines par la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* afin de réduire les concentrations intracellulaires de ce métal. Pour déterminer s'il y a bien excrétion du platine chez *Chlamydomonas reinhardtii*, il serait possible de réaliser une exposition de cette algue au platine et de mesurer la bioaccumulation en fonction du temps tout en suivant l'expression des gènes *pcs1* et *mdr1*. Pour une plus grande sensibilité de mesure, des algues exposées au platine pourraient être remises en suspension dans du milieu frais afin de mesurer s'il y a un relargage de métal et le quantifier.

Pour faire le lien avec les données présentées dans la Figure 35, la croissance est très fortement inhibée en présence de platine, voire inexistante jusqu'à 45 à 55 h, puis elle repart si bien que la densité cellulaire est similaire à celle témoin en fin d'expérience. Ce retard de croissance pourrait être dû à une allocation de l'énergie pour la défense et l'adaptation de la cellule par rapport à la pression de contamination. Une fois que l'algue a trouvé des moyens efficaces pour limiter l'impact de la présence de platine, la croissance peut reprendre. A 50 µg Pt/L, une détoxification pourrait se faire par deux voies : la chélation par les phytochélatines (*pcs1*) et l'efflux actif (*mdr1*). Pour que le platine soit excrété par la pompe de l'efflux actif, il serait probablement complexé à d'autres molécules comme les phytochélatines ou le glutathion (Sears, 2013). A 100 µg Pt/L, l'effet de la contamination est plus fort et l'algue met plus de temps avant de

retrouver une bonne croissance de culture (65 h au lieu de 45 h environ). Il est possible que les mécanismes mis en place à 50 µg Pt/L ne soient pas suffisants pour faire face à la pression de contamination dans ces conditions. Ainsi, il est possible que d'autres mécanismes moléculaires, non-étudiés dans ces travaux, soient mis en place par les cellules. Ils seraient différents de ceux à 50 µg Pt/L, plus efficaces puisqu'ils permettent une reprise de la croissance.

A noter que les analyses transcriptomiques présentées dans le Tableau 10 sont représentatives de l'état physiologique des algues à un instant (t=96 h) d'exposition. On peut supposer que les mécanismes de défense suggérés par l'interprétation de ces données correspondent à des solutions de défenses suffisantes pour permettre une bonne croissance de la souche. En effet, la densité cellulaire des conditions d'exposition est similaire à celle du témoin après les 96 h d'exposition.

Toutefois, des prélèvements au cours du temps auraient pu permettre d'observer plus d'effets de modification de l'expression des gènes ainsi que leur évolution temporelle. En effet, il est possible que l'expression de certains des gènes étudiés ait été modifiée avant 96 h, puis revenue à un niveau normal au moment du prélèvement. L'ajout d'autres temps de prélèvement permettrait d'obtenir plus d'informations et ainsi mieux comprendre ces phénomènes.

Le platine, de par ses propriétés d'inhibiteur de la division cellulaire, qui lui valent d'être utilisé sous forme de complexes dans les traitements anti-cancer (Jakupec *et al.*, 2003; Pyrzńska, 2000), pourrait induire une modification de l'expression de gènes liés à la régulation de la division cellulaire et notamment à l'apoptose. L'ajout de l'étude de gènes liés à la régulation de ces fonctions pourrait apporter des réponses complémentaires quant à la reprise de croissance soudaine observée ici chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

4.1.3 Toxicité du platine pour *C. reinhardtii* en présence de 20 mg C/L d'AH

Les courbes de croissance obtenues pour l'exposition de *Chlamydomonas reinhardtii* au platine en présence de 20 mg C/L d'AH sont présentées dans la Figure 36. Chaque courbe correspond à une concentration nominale d'exposition en platine inorganique.

Celles-ci étaient en fait très proches des valeurs réelles de concentrations en platine inorganique mesurées.

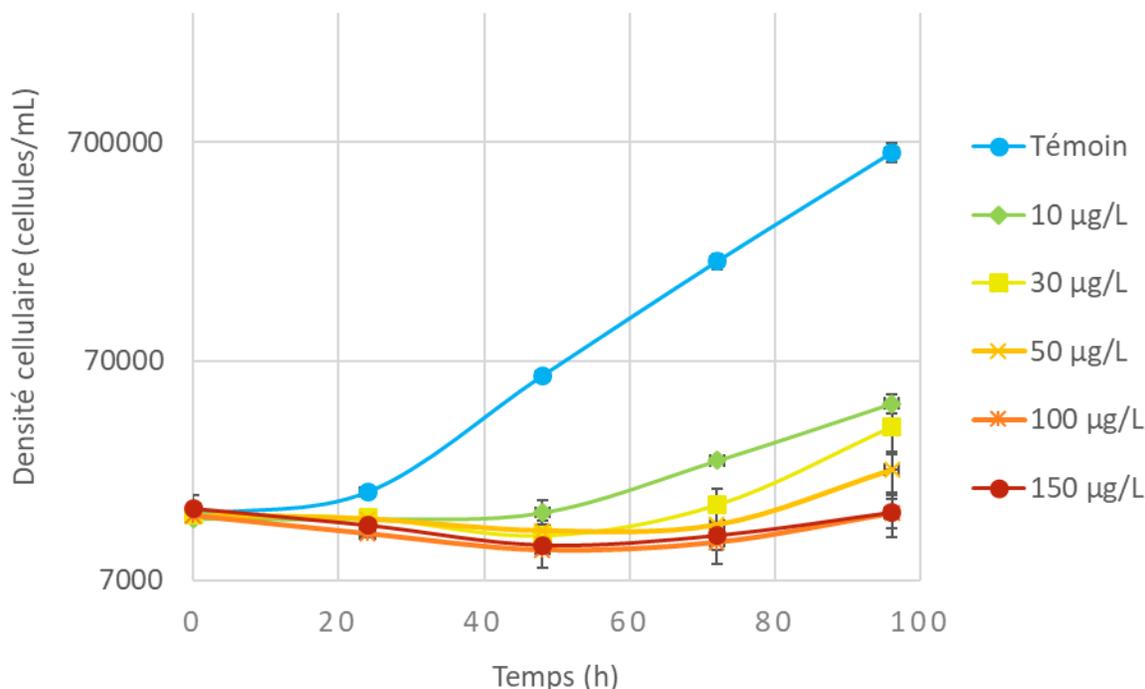


Figure 36: Courbes de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* pour différentes concentrations nominales de platine inorganique en présence de 20 mg C/L d'AH dans le milieu MHSM-1, pH=6 (n=3)

Dans cette figure, l'inhibition de la croissance est beaucoup plus importante que dans les expériences réalisées en présence d'AH (10 mg C/L) par Rioux (2018). En effet, même à 10 µg/L de platine, la densité cellulaire ne représente qu'environ 7% de celle du témoin en fin d'expérience. La CE50 est donc très inférieure à 10 µg Pt/L pour ce temps d'exposition. D'ailleurs, une ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey ont permis de déterminer que toutes les conditions d'exposition au platine étaient significativement différentes du témoin ($p_{value} < 10^{-7}$), et ce sans être différentes entre elles ($p_{value} > 0,56$). Il s'agit d'une toxicité très importante d'autant plus que 10 µg Pt/L est une concentration du même ordre de grandeur que des données environnementales maximales mesurées en rivière et répertoriées dans la revue de littérature de Jackson *et al.* (2007). En effet une valeur maximale de 34,6 µg/L dans des rivières contaminées par des effluents d'eaux

usées et une valeur de 10,4 µg/L dans une eau de rivière avait été mesurée par Odiyo *et al.* (2005). Cela peut amener à se questionner quant aux risques posés par ce métal en milieu naturel. Cependant, il faut prendre en compte qu'il n'y a pas de dégénérescence de la culture même pour les conditions les plus concentrées. En effet, une croissance est tout de même observée même si elle est beaucoup plus tardive. Cette reprise correspond à une acclimatation des algues qui peuvent de nouveau croître, comme dans l'exposition sans AH, mais de façon beaucoup moins marquée. En effet, un tel phénomène est observé au bout de 40 h pour une concentration d'exposition de 10 µg Pt/L, vers 60 h pour 30 µg Pt/L et après 70 h pour les conditions les plus concentrées. Si l'exposition avait été réalisée sur une plus longue durée, elle aurait probablement permis d'observer plus nettement la reprise de la croissance. Cependant, il est possible que celle-ci se fasse à un taux de division inférieur à celui du témoin, comme semble le suggérer la pente faible de la courbe correspondant à 10 µg Pt/L entre 40 et 96 h.

Finalement, les résultats de cette exposition comportent des similarités avec celle réalisée en l'absence d'AH. Il n'y a pas de croissance dans un premier temps puis celle-ci repart une fois que la cellule s'est adaptée à la pression de contamination. Cependant, cet effet se fait à des niveaux de concentration différents et l'effet est beaucoup plus important en présence d'AH. L'ajout de conditions supplémentaires avec des concentrations d'exposition moins importantes pourrait permettre d'observer des effets plus modérés et ainsi de pouvoir déterminer une CE50 après modélisation de la courbe dose-réponse par le logiciel Sigma Plot. En effet, celle-ci est visiblement bien inférieure à 10 µg Pt/L au bout de 96 h.

4.1.3.1 Analyses transcriptomiques

Le Tableau 11 présente les facteurs d'inductions obtenus chez *Chlamydomonas reinhardtii*, après l'exposition de 96 h au platine en présence de 20 mg C/L d'AH. A noter que les algues témoins ont été cultivées en présence de 20 mg C/L d'AH et en l'absence de platine. Ainsi c'est l'effet du platine seul dans ces conditions d'exposition qui a été déterminé dans cette partie. Les résultats des amplifications montrent des modifications de l'expression de la totalité des gènes étudiés pour cette algue. En effet, en présence d'AH, des effets du platine plus importants sont observés, ce qui est cohérent avec la

faible croissance des cultures dans ces conditions. Du plus, de fortes inductions sont observées et montrent une réaction des cellules. Il se pourrait que ce soit cette réaction face à la pression exercée par la présence du métal qui permet une acclimatation puis un début de reprise de la croissance observé en fin d'exposition. Au contraire, l'observation de répressions aurait plutôt été synonyme d'effets délétères, voire de mort cellulaire, et donc d'une absence totale de croissance.

Tableau 11: Facteurs d'induction des gènes étudiés chez *Chlamydomonas reinhardtii* après une exposition au platine en présence de 20 mg C/L d'AH pendant 96 h ; orange : induction (>2) ; vert : répression (<0,5) ;

ND : non déterminé ; n=3

Gènes d'intérêt	Facteurs d'induction pour chaque [Pt] inorganique nominale (µg/L)				
	10	20	40	80	130
<i>PsaA</i>	/	/	3	3	/
<i>d1</i>	/	/	4*	4*	/
<i>cox1</i>	2*	/	/	/	/
<i>nad5</i>	4	/	/	/	/
<i>12S</i>	/	/	/	/	/
<i>cat</i>	6**	3	4*	5**	5*
<i>sodMn</i>	7*	6	4*	6*	10***
<i>sodFe</i>	/	0,2	/	/	0,2
<i>fad</i>	/	/	/	/	2
<i>mdr1</i>	/	/	/	/	8
<i>pcs1</i>	48*	19	8	17	21
<i>ctr1</i>	ND	2	2	4	2
<i>ctr2</i>	7	9	28***	34***	25***
<i>ctr3</i>	/	/	5***	3	/

En présence de 20 mg C/L, on retrouve certains des effets du platine déterminés en l'absence d'AH comme : un stress oxydatif, l'induction des transporteurs du cuivre et des mécanismes de détoxification. Ils semblent généralement plus marqués, comme le suggèrent les inhibitions importantes de la croissance rapportées dans la Figure 36. De plus, d'autres effets sont observés comme l'induction des gènes du photosystème.

Plus précisément, une modification de l'expression des gènes du stress oxydatif est à nouveau mise en évidence : certains d'entre eux sont toujours induits, comme *sodMn* et *cat*, mais d'autres sont plutôt réprimés comme *sodFe*. Il est à noter que la répression de *sodFe* dans ce cas est cohérente avec l'induction des gènes du photosystème *d1* et *PsaA*, qui n'avait pas lieu en l'absence d'AH. En effet, *sodFe* code pour la superoxyde dismutase dans les chloroplastes. Il est possible que son induction en l'absence d'AH permette de diminuer l'impact sur le photosystème. Ici, la répression pourrait éventuellement être la conséquence d'une accumulation de platine dans les chloroplastes. En effet, un tel comportement a déjà été déterminé pour le palladium au niveau des chloroplastes de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* par observations au microscope électronique (Vannini *et al.*, 2011). Cette interprétation reste très hypothétique dans la mesure où la présence d'AH à l'extérieur de la cellule ne devrait pas influencer sur la répartition intracellulaire du métal. Cependant, il est possible que la présence d'AH adsorbé à la paroi cellulaire et le stress qui en résulte modifie la physiologie de l'algue et puisse avoir une conséquence indirecte sur la répartition intracellulaire.

Par ailleurs, il y a aussi une induction des transporteurs du cuivre *Ctr1*, *Ctr2* et *Ctr3* dans ces conditions d'exposition. En revanche, il n'y a pas d'induction de *mdr1* (sauf pour 130 µg Pt/L). En présence d'AH, ce dernier mécanisme de détoxification ne semble plus suffisamment efficace et est abandonné au profit d'autres solutions comme les phytochélatines (*psc1*) qui sont très fortement surexprimées.

Globalement, ces résultats montrent que l'ajout d'AH ne protège pas les cultures de *Chlamydomonas reinhardtii*, mais exacerbe et modifie les effets du platine. Cette toxicité plus importante est due à une favorisation de l'entrée du platine par la présence d'AH chez *Chlamydomonas reinhardtii* comme démontrée dans la partie 4.1.5 :

Bioaccumulation. Des hypothèses d'explication détaillées de ce phénomène sont discutées dans la partie 4.3, qui permet une comparaison entre les deux espèces d'algues vertes (*Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlorella fusca*).

4.1.4 Comparaison des CE50, influence de la présence d'AH

Les courbes dose-réponse présentées dans les figures suivantes proviennent des données d'exposition de Rioux (2018) pour les deux premières, et de l'expérience d'exposition présentée ci-dessus pour la dernière. Pour réaliser ces courbes, la densité cellulaire relative au bout de 96 h d'exposition a été exprimée en fonction de la concentration en platine inorganique moyenne mesurée par ultrafiltration partielle. Cela permet une vue d'ensemble des données des différentes expositions et donc une comparaison de la toxicité avec les différentes concentrations d'AH : 0, 10 et 20 mg C/L.

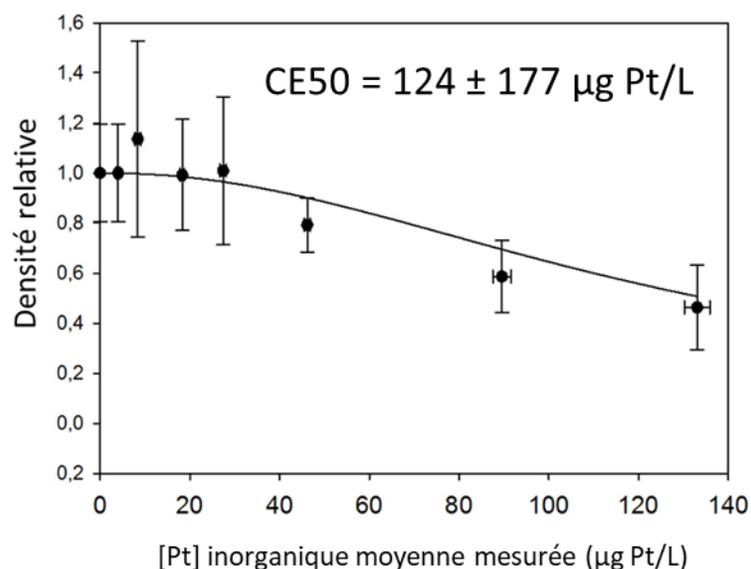


Figure 37: Courbe dose-réponse pour *Chlamydomonas reinhardtii* exposée au platine sans AH dans le milieu MHSM-1 pendant 96 h ; pH=6 (n=3) (source: Rioux (2018))

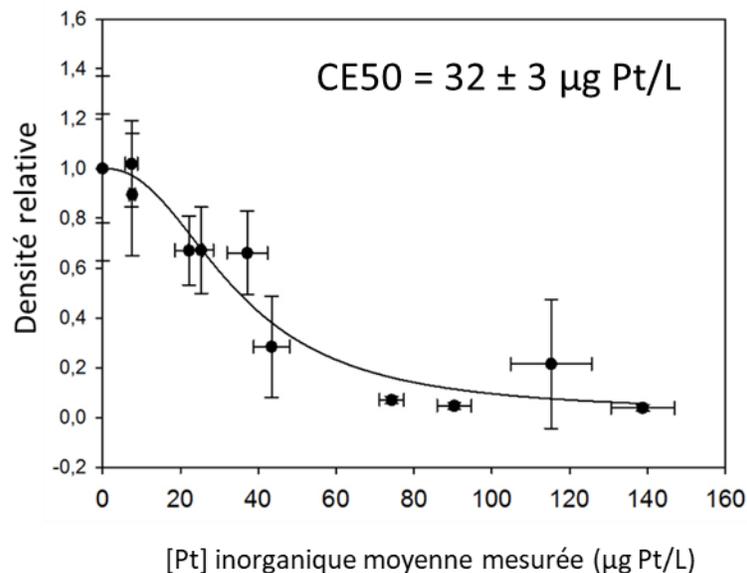


Figure 38: Courbe dose-réponse pour *Chlamydomonas reinhardtii* exposée au platine en présence de 10 mg C/L d'AH dans le milieu MHSM-1 pendant 96 h ; pH=6 (n=3) (source: Rioux (2018))

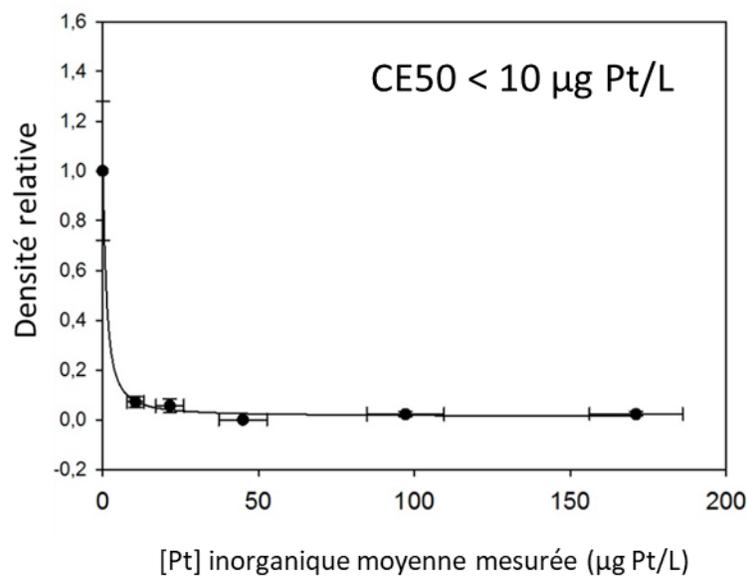


Figure 39: Courbe dose-réponse pour *Chlamydomonas reinhardtii* exposée au platine en présence de 20 mg C/L d'AH dans le milieu MHSM-1 pendant 96 h ; pH=6 (n=3)

La comparaison des trois courbes dose-réponse présentées ci-dessus permet d'établir le classement des CE50 suivant : CE50 (sans AH) > CE50 (10 mg C/L) > CE50 (20 mg C/L). Les CE50 déterminées à 48 h suivent la même tendance : CE50 (sans AH) = $102 \pm 58 \mu\text{g Pt/L}$, CE50 (10 mg C/L) = $32 \pm 3 \mu\text{g Pt/L}$ et CE50 (20 mg C/L) < $10 \mu\text{g Pt/L}$ (la distribution des données ne permet pas d'obtenir une CE50). Les courbes dose-réponse correspondant aux deux premières valeurs sont présentées dans les résultats de Rioux (2018). Cette réponse montre non seulement que la toxicité du platine est exacerbée en présence d'AH, mais aussi qu'elle augmente avec la concentration en substances humiques. Ces résultats sont en contradiction avec les hypothèses du modèle de l'ion libre d'après lequel « la réponse biologique dépend de l'internalisation qui dépend elle-même de la concentration en métal libre dans le milieu d'exposition » (Campbell *et al.*, 2002). En effet, puisque la concentration d'exposition est exprimée en platine inorganique (et en supposant sa spéciation constante), les trois CE50 devraient être similaires dans ces trois conditions expérimentales pour que le modèle soit vérifié. De plus, ces résultats montrent que la toxicité augmente avec la concentration en AH. Tellement, qu'il n'a pas été possible de déterminer la CE50 à 96 h du platine chez *Chlamydomonas reinhardtii* en présence de 20 mg C/L d'AH, sur la gamme de concentration en platine étudiée.

En effet, il semblerait que la présence de ces substances humiques favorise l'entrée du platine dans les cellules, comme la partie suivante le suggère. C'est vraisemblablement cette internalisation plus importante qui induit cette toxicité exacerbée.

4.1.5 Bioaccumulation

La Figure 40 montre la quantité de platine accumulée par cellule en fonction de la concentration en platine inorganique moyenne mesurée par ultrafiltration partielle.

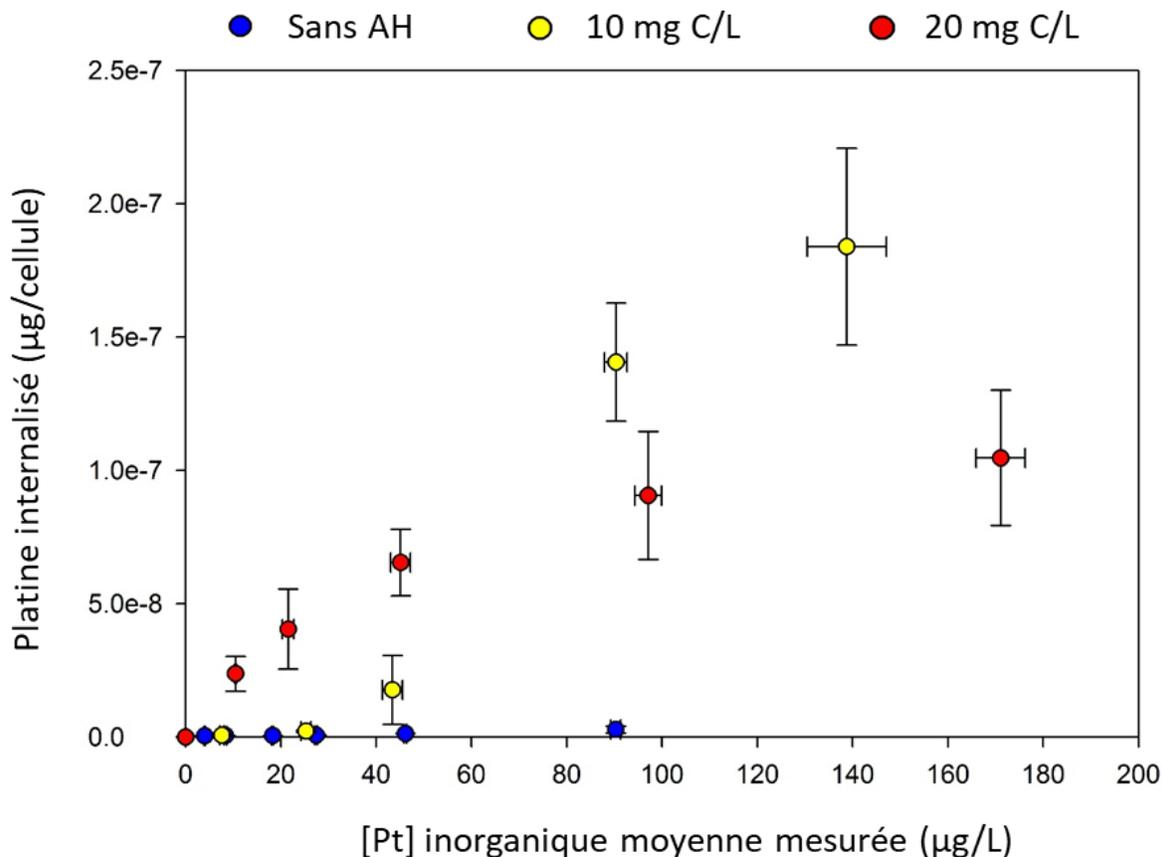


Figure 40: Quantité de platine internalisé par cellule chez *Chlamydomonas reinhardtii* au bout de 96 h en fonction de la concentration d'exposition moyenne en platine inorganique mesurée par ultrafiltration partielle (n=3); comparaison des différentes concentrations en AH

Tout d'abord, les profils d'internalisation sont différents pour les trois conditions expérimentales. En effet, la prise en charge du platine est statistiquement différente pour chaque concentration d'AH d'après un test de Kruskal-Wallis ($p_{value}=0,0001$) suivi d'un test post-hoc de comparaison par paire de Wilcoxon ($p_{value}<0,003$).

La présence d'AH favorise fortement l'internalisation du platine chez *Chlamydomonas reinhardtii*, puisque l'accumulation change d'ordre de grandeur avec l'ajout de ce composé dans le milieu d'exposition. En l'absence d'AH l'internalisation est de l'ordre de 10^{-9} µg Pt/cellule contre plutôt 10^{-7} µg Pt/cellule avec AH. Pour autant, l'internalisation ne suit pas la même tendance entre 10 et 20 mg C/L. En effet, pour les concentrations en platine les plus basses, l'internalisation est largement favorisée en présence de 20 mg C/L par rapport à 10 mg C/L. Cette accumulation favorisée du platine observée dans la

Figure 40 pourrait être expliquée par la présence d'AH adsorbé à la paroi cellulaire et la modification de la perméabilité de la membrane qui en résulterait (Lamelas *et al.*, 2005; Lavoie *et al.*, 2016).

Même si les points ne semblent pas se superposer pour les concentrations les plus concentrées, une saturation de l'internalisation semble être atteinte au-delà d'une quantité de l'ordre de $2 \cdot 10^{-7}$ $\mu\text{g Pt/cellule}$. Cette valeur correspondrait à la quantité maximale de platine qui peut être internalisé sur cette durée de temps. La Figure 41, qui montre les mêmes données représentées avec une échelle logarithmique, permet de mieux visualiser ce plateau potentiel. On peut faire l'hypothèse qu'en augmentant fortement les concentrations d'exposition, les algues exposées en l'absence d'AH arriveraient à des niveaux de concentrations intracellulaires similaires (points bleus). Les pentes de courbes avant la saturation semblent néanmoins différentes, ce qui témoignerait de la favorisation de l'accumulation en augmentant la quantité d'AH.

L'hypothèse d'une accumulation favorisée en présence de 20 mg C/L d'AH avec une excrétion mise en place par les cellules a été envisagée pour expliquer le décalage entre les courbes jaune et rouge dans les conditions les plus concentrées. Toutefois, elle semble peu probable, car il n'y a pas d'induction du gène *mdr1*, qui correspond à la pompe d'efflux, en présence de 20 mg C/L d'AH, à part une surexpression non significative pour 130 $\mu\text{g/L}$ de platine. Ajouté à cela, il y a une incertitude importante sur la quantité de platine internalisé à prendre en compte. De plus, l'existence d'un seuil de saturation de l'internalisation semble être une explication plus pertinente, d'autant plus que des limitations physiologiques de l'algue (affinités des transporteurs, nombre de transporteurs...) peuvent expliquer ce plateau. Le flux d'internalisation maximal V_{max} peut d'ailleurs être calculé en fonction de la concentration intracellulaire maximale atteinte et du taux de division μ avec l'équation 4 de la publication de Lavoie *et al.* (2014). Ce calcul est présenté dans l'Annexe I.

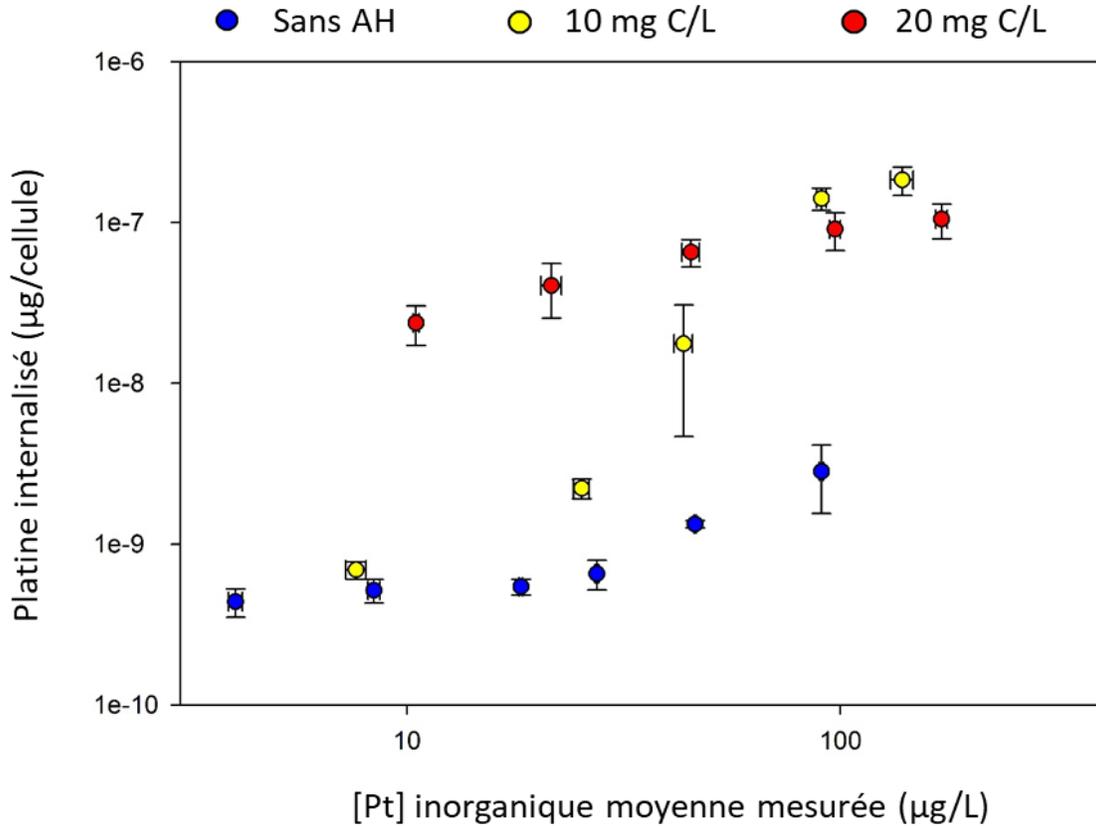


Figure 41: Quantité de platine internalisé par cellule chez *Chlamydomonas reinhardtii* au bout de 96 h en fonction de la concentration d'exposition moyenne en platine inorganique mesurée par ultrafiltration partielle (n=3); comparaison des différentes concentrations en AH (échelle logarithmique).

4.1.6 Flux d'internalisation

La Figure 42 montre les données de platine intracellulaire corrigées avec le taux de division sur 96 h, ce qui permet d'obtenir une approximation du flux d'internalisation du platine tout en limitant le biais induit par la biodilution. Le flux d'internalisation (V(Pt)) a été calculé selon la formule présentée dans les travaux de Lavoie *et al.* (2014) :

$$V(\text{Pt}) = [\text{Pt}]_{\text{intracellulaire}} \cdot \mu$$

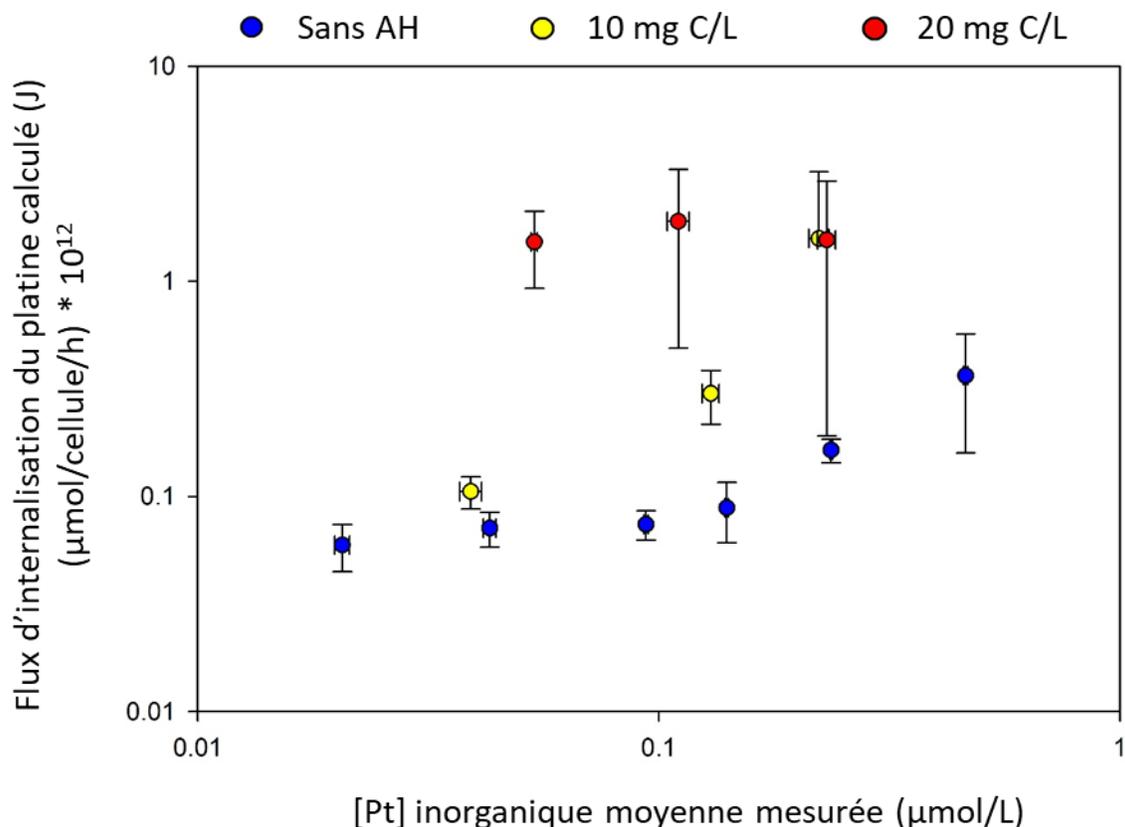


Figure 42: Flux d'internalisation du platine par *Chlamydomonas reinhardtii* calculés pour une exposition de 96h en fonction de la concentration d'exposition moyenne mesurée en platine inorganique mesurée par ultrafiltration partielle (n=3); comparaison des différentes concentrations en AH (échelle logarithmique).

Toutes les valeurs n'ont pas pu être corrigées, car les taux de division μ étaient parfois négatifs en raison d'une absence de croissance. En conséquence, il n'a pas été possible d'appliquer un modèle de type Michaelis-Menten à ces données. Toutefois, la représentation graphique de ces flux semble confirmer l'interprétation des résultats présentée dans la partie précédente, 4.1.5. La réalisation d'expositions à court terme permettrait d'obtenir de déterminer les flux plus précisément.

Finalement, ces résultats suggèrent que la présence d'AH dans la solution d'exposition favorise fortement l'accumulation intracellulaire du platine et sa toxicité. Quand la concentration en AH augmente, la prise en charge du métal est favorisée jusqu'à une valeur de saturation de cette accumulation dans les conditions d'exposition les plus concentrées. Il est possible que les acides humiques s'adsorbent sur la paroi cellulaire

de *Chlamydomonas reinhardtii* et modifient les propriétés de perméabilité de la membrane (Campbell *et al.*, 1997; Vigneault *et al.*, 2000). Ce point sera développé de façon plus détaillée dans la discussion : partie 4.3.

4.1.7 Courbe dose interne-réponse

D'après la Figure 43, la réponse des algues peut être exprimée comme une fonction de la concentration intracellulaire de platine. Cela confirme l'hypothèse selon laquelle l'internalisation du platine est favorisée par la présence d'AH serait responsable de la toxicité exacerbée déterminée.

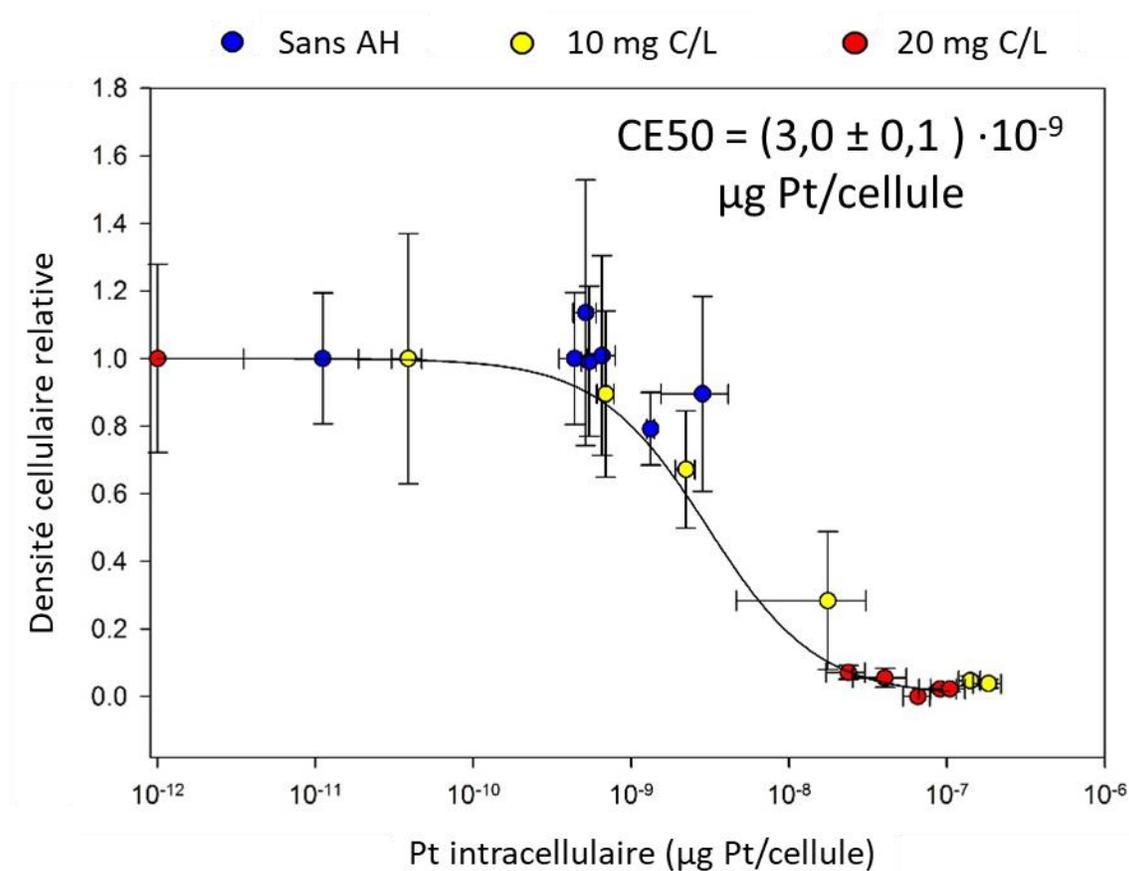


Figure 43: Courbe dose interne-réponse pour *Chlamydomonas reinhardtii* exposée au platine dans le milieu MHSM-1 pendant 96 h ; pH=6 (n=3) ; comparaison des différentes concentrations en AH

4.2 Essais de toxicité sur *Chlorella fusca*

Afin de déterminer le rôle des AH sur la toxicité du platine chez une autre espèce d'algue verte (*Chlorella fusca*), des expositions de 96 h ont été réalisées en utilisant la même méthodologie qu'avec *Chlamydomonas reinhardtii*. Ainsi, une comparaison entre les deux a pu être établie.

4.2.1 Toxicité du platine pour *C. fusca* en l'absence d'AH

Les courbes de croissance pour différentes concentrations de platine dans le milieu d'exposition sont présentées dans la Figure 44.

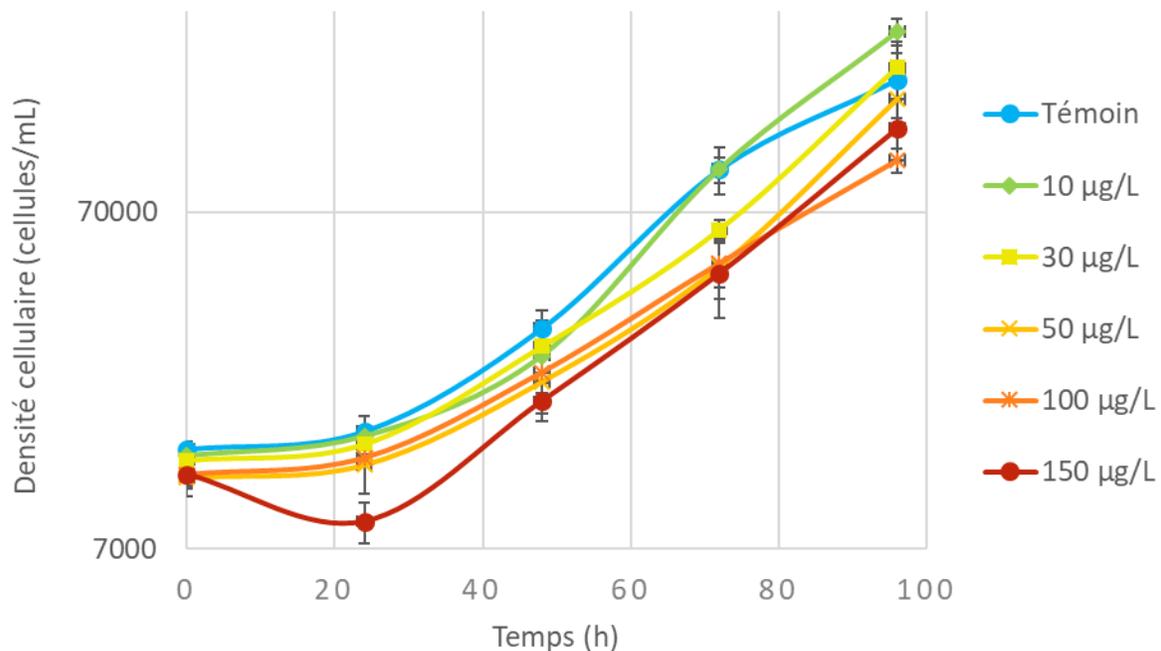


Figure 44: Courbes de croissance de *Chlorella fusca* pour différentes concentrations nominales de platine inorganique en l'absence d'AH dans le MHSM-1, pH=6 (n=3)

En comparaison avec le témoin, la croissance des cultures exposées est retardée, ce qui est surtout visible à partir d'une concentration nominale de 30 µg/L vers 72 h. Ensuite, de 72 à 96 h, la croissance reprend même dans les conditions les plus concentrées puisque la pente de la courbe redevient comparable à celle du témoin. Plus particulièrement, pour

la condition à 30 µg/L, la croissance est retardée jusqu'à 72 h puis devient plus importante par la suite pour que la densité cellulaire soit équivalente à celle dans le témoin au bout de 96 h. Finalement, il semblerait qu'il y ait une acclimatation des cellules à la concentration en platine présente dans le milieu. Un effet similaire est observé entre les conditions plus concentrées, à 100 et 150 µg/L. En effet, jusqu'à 72 h, la croissance semble être affectée de la même façon entre ces deux conditions. Pourtant, après 72 h, la croissance reprend de plus belle dans la condition à 150 µg/L. Une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Tukey a permis de mettre en lumière des différences significatives. Notamment le fait que les conditions à 50, 100 et 150 µg/L sont différentes du témoin et de la condition à 10 µg/L, bien que 50, 100 et 150 µg/L soient non significativement différentes entre elles. Les densités cellulaires à 96 h montrent que la croissance est significativement plus importante pour la condition à 10 µg/L que dans le témoin. Il est possible que la présence de platine en très petite quantité favorise la croissance de *Chlorella fusca*, même si le platine est un métal non essentiel et très peu présent dans les conditions naturelles. En effet, cette stimulation de la croissance à 10 µg/L résulterait d'un effet d'hormèse (Calabrese, 2009). Il s'agit du nom du phénomène lors duquel de faibles concentrations d'un agent potentiellement toxique provoquent une augmentation de la croissance. Ainsi, la réponse biologique à un stress chimique très léger ne conduit pas nécessairement à un effet négatif sur la croissance à court terme.

Afin de pouvoir compléter le jeu de données et ainsi calculer des valeurs de CE50, une seconde expérience d'exposition dans les mêmes conditions a été réalisée (Figure 45). Cette fois, les concentrations d'exposition étaient plus élevées.

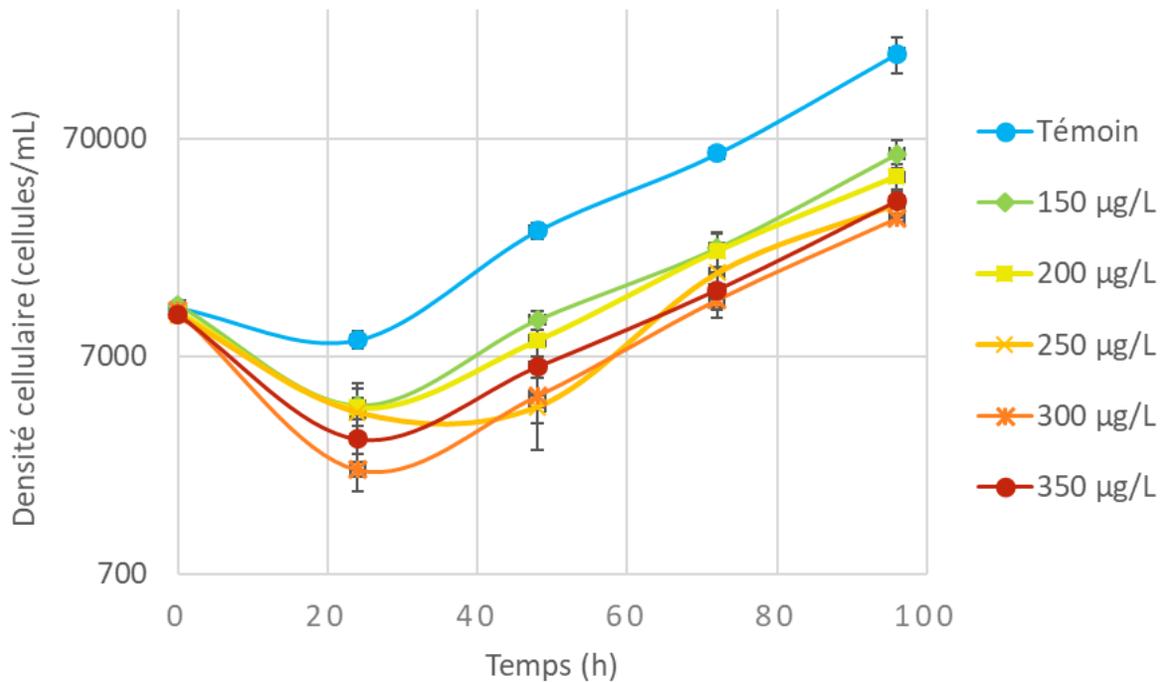


Figure 45: Courbes de croissance de *Chlorella fusca* pour différentes concentrations élevées de platine inorganique en l'absence d'AH dans le MHSM-1, pH=6 (n=3)

La densité cellulaire finale obtenue lors de cette expérience d'exposition (Figure 45) est moins importante que dans l'expérience précédente sans AH (Figure 44). En effet, la phase stationnaire de croissance n'est pas atteinte en 96 h, ce qui semble être le résultat de la baisse de densité cellulaire observée dans les premières 24 h. Pourtant, les forts effets observés ont permis de dégager des différences statistiques. D'après une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test post-hoc de Tukey, toutes les conditions d'exposition au platine sont très significativement différentes du témoin ($p_{value} < 10^{-15}$). De plus, les courbes de croissance à 250, 300 et 350 µg Pt/L sont significativement différentes de celle à 150 µg/L. Comme attendu, il y a une densité cellulaire plus faible obtenue au bout de 96 h d'exposition pour cette expérience. Cependant, de 24 à 96 h, la croissance semble être équivalente pour toutes les conditions sauf celle à 250 µg Pt/L. Il est possible d'argumenter que pour la Figure 44 et la Figure 45, le taux de croissance est similaire entre le témoin et toutes les conditions d'exposition de 24 ou 48 à 96 h. Après la chute de densité observée en début d'expérience, le platine n'engendrerait donc plus

d'inhibition de croissance chez *Chlorella fusca* sur la gamme de concentrations en platine étudiée. Cette interprétation amène à se questionner quant à la toxicité du platine chez cette espèce : peut-on considérer la densité cellulaire comme un descripteur de toxicité, comme c'est le cas ici ? Ou devrait-on plutôt considérer le taux de division entre 48 et 96 h, sachant que cela amènerait à une tout autre conclusion qui serait que le platine n'est pas toxique pour cette espèce, du moins, pas à ces concentrations ? Les deux interprétations sont justifiables, et, dans le cadre de ce projet nous avons choisi d'utiliser la densité cellulaire à 96 h puisque c'était le paramètre le plus sensible. De plus, cette période de latence en début d'exposition avait déjà été montrée par Roy (2009) et Tétrault (2014) chez *Chlamydomonas reinhardtii* et correspond à un effet toxique attendu du platine. L'étude de la densité cellulaire permet de prendre cet effet en compte. Il est néanmoins possible de conclure que l'algue verte *Chlorella fusca* semble être plutôt résistante à l'exposition au platine, d'autant plus que la gamme de concentrations étudiée pour cette expérience est largement supérieure aux concentrations environnementales (Jackson *et al.*, 2007).

4.2.2 Toxicité du platine pour *C. fusca* en présence de 10 mg C/L d'AH

La Figure 46 présente les courbes de croissance de *Chlorella fusca* exposée à plusieurs concentrations de platine en présence de 10 mg C/L d'acide humique. Pendant cette expérience, l'ajout d'une condition témoin supplémentaire (résultats présentés en Annexe II ; Figure 64 et Figure 65) a permis de montrer qu'il n'y avait pas d'effet des AH seuls sur la croissance de *Chlorella fusca*.

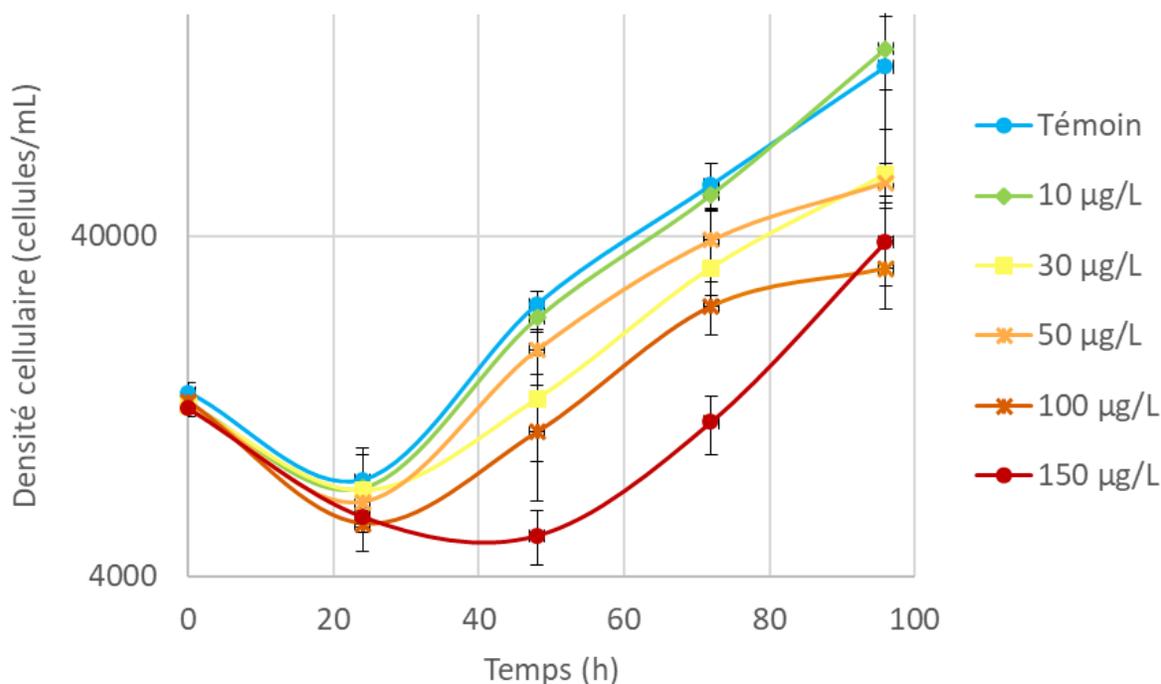


Figure 46: Courbes de croissance de *Chlorella fusca* pour différentes concentrations nominales de platine inorganique en présence de 10 mg C/L d'AH dans le milieu MHSM-1, pH=6 (n=3)

Comme cela a pu être observé chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Rioux, 2018), il y a une toxicité plus importante du platine en présence d'AH. En effet, l'inhibition de la croissance est plus marquée que pour l'exposition au platine seul. Toutefois, une ANOVA à deux facteurs et un test de Tukey ont seulement permis de déterminer que les conditions témoins et 10 µg/L étaient significativement différentes de celles à 30, 50, 100 et 150 µg/L. En effet, cela résulte d'incertitudes plus importantes sur les densités cellulaires mesurées dans les expositions en présence d'AH. De plus les densités sont relativement plus faibles que celles obtenues lors d'autres expériences d'exposition. C'est à cause d'une mortalité des algues en début d'exposition, mise en évidence par une baisse de la densité cellulaire dans les premières 24 h. Ainsi malgré une inhibition de la croissance plus importante qu'en l'absence d'AH, moins de différences significatives sont ressorties de ces courbes.

Pour 150 µg Pt/L, la croissance a été négativement affectée en début d'exposition et il y a même eu une mortalité des algues inoculées. Puis, la croissance commence au bout

de 48 h pour finir avec une densité cellulaire finale similaire à celles des autres conditions d'exposition. Ce profil de courbe rappelle ce qui avait été obtenu chez *Chlamydomonas reinhardtii* avec une reprise de croissance après une période de latence. Il pourrait s'agir, comme cela a été suggéré chez cette algue, d'un temps nécessaire aux cellules pour s'accommoder des conditions de culture, surtout en présence de platine, avant d'entamer une période de forte croissance.

Afin de modéliser correctement la courbe dose-réponse correspondant à ces conditions d'exposition, il a fallu ajouter cette fois une expérience avec des concentrations en platine plus faibles. En effet, la toxicité était trop importante pour permettre la réalisation d'une régression non linéaire par logiciel Sigma Plot et ainsi déterminer une CE50 plus précise avec ce jeu de données. La Figure 47 montre les courbes de croissance obtenues suite à cette expérience supplémentaire.

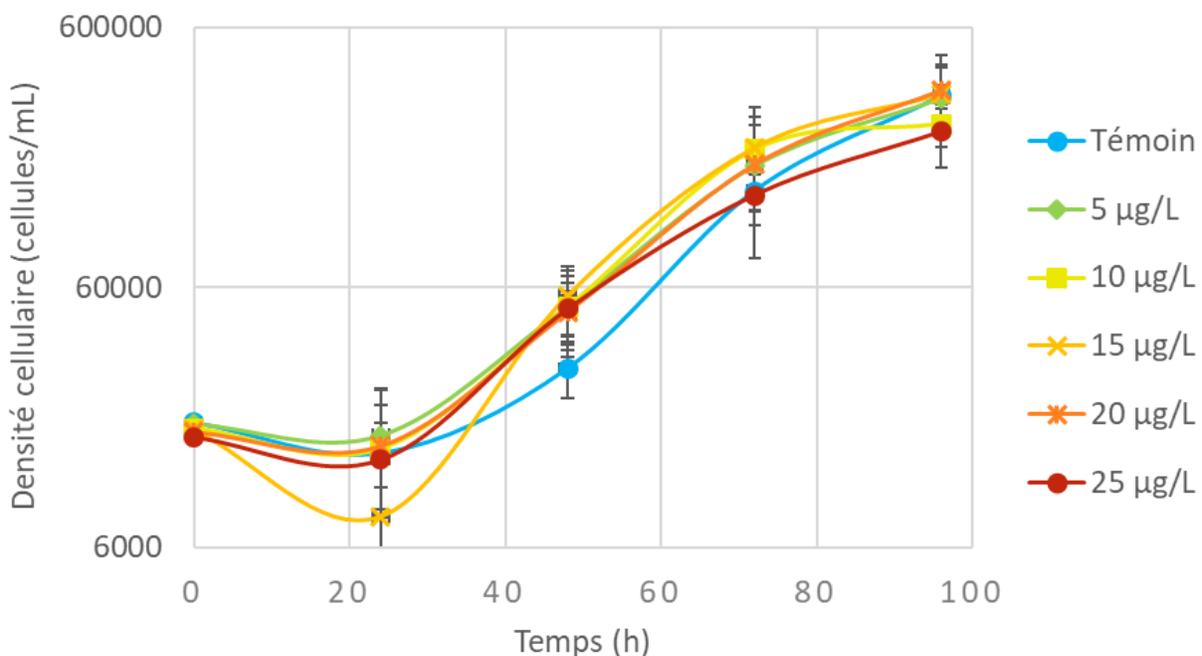


Figure 47: Courbes de croissance de *Chlorella fusca* pour différentes concentrations de platine inorganique faibles en présence de 10 mg C/L d'AH dans le milieu MHSM-1, pH=6 (n=3)

Pour ces concentrations en platine, l'inhibition de la croissance algale est très faiblement affectée, et il n'y a pas de différence significative selon une ANOVA à deux voies ($p_{value} > 0,42$). En effet, il y a une quasi-superposition des courbes. À part une légère mortalité dans les 24 h premières heures d'exposition en présence de 15 $\mu\text{g Pt/L}$, la croissance dans les conditions d'exposition au platine est similaire à celle du témoin, voire même légèrement favorisée entre 48 et 72 h d'exposition.

4.2.3 Toxicité du platine pour *C. fusca* en présence de 20 mg C/L d'AH

La Figure 48 présente les courbes de croissance de *Chlorella fusca* pour une gamme de concentrations en platine en présence de 20 mg C/L d'AH.

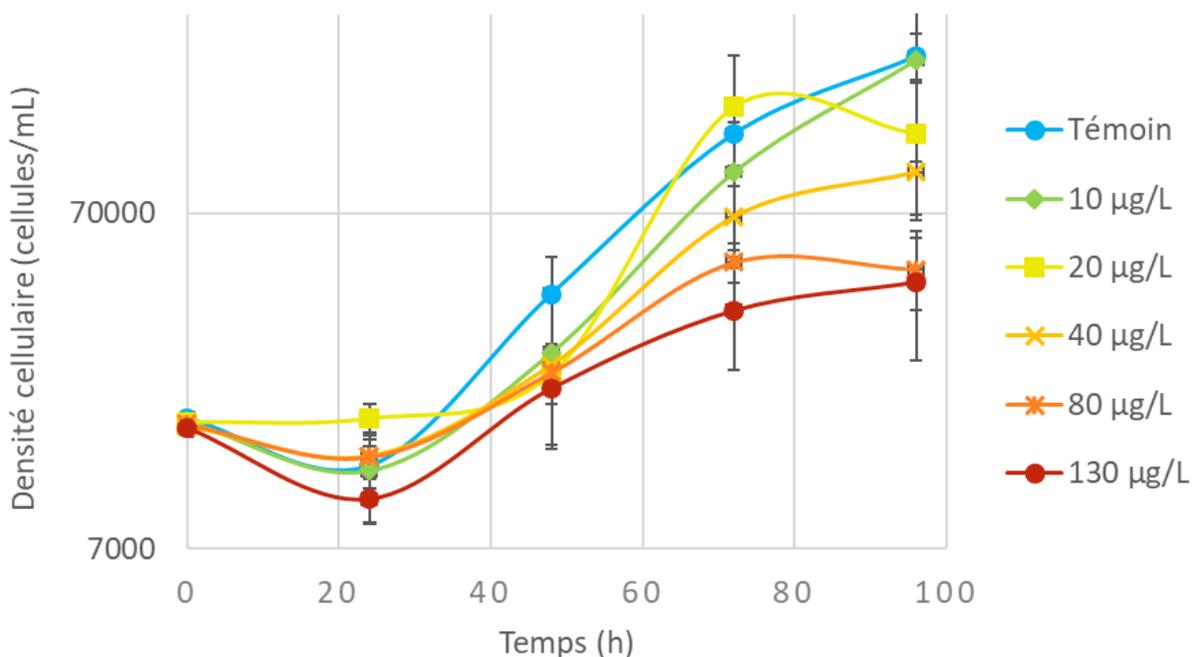


Figure 48: Courbes de croissance de *Chlorella fusca* pour différentes concentrations de platine inorganique en présence de 20 mg C/L d'AH dans le milieu MHS-1, pH=6 (n=3)

À nouveau, il y a un impact négatif de la présence de platine sur la croissance. Une légère diminution de la densité cellulaire est aussi observée au bout de 24 h d'exposition bien que ce soit moins important que lors de l'expérience d'exposition en présence à 10 mg

C/L. Au bout de 48 h, la densité cellulaire est plutôt similaire entre toutes les conditions d'exposition au platine. A 10 µg/L de platine inorganique, la croissance permet d'arriver à une densité cellulaire identique au témoin à 96 h. Pour les conditions à 40, 80 et 130 µg/L de platine inorganique, cette densité à 48 h correspond plutôt à un point d'inflexion et la croissance perd ensuite en intensité, surtout de 72 à 96 h. Une ANOVA à deux facteurs et un test post-hoc de Tukey ont permis de démontrer que les conditions à 130 µg/L et à 80 µg/L étaient significativement différentes du témoin et de celle à 10 µg/L

4.2.3.1 Analyses transcriptomiques

Il aurait été pertinent de réaliser des analyses transcriptomiques pour cet organisme, notamment dans un souci de comparaison avec *Chlamydomonas reinhardtii*. Cependant, le transcriptome de *Chlorella fusca* n'est pas disponible dans les banques de données. Il serait néanmoins intéressant pour compléter ces travaux de tenter de caractériser par clonages, chez *Chlorella fusca*, les mêmes gènes que ceux utilisés chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Une autre solution, plus exhaustive, serait de réaliser le premier transcriptome de cette algue par une approche sans *a priori*.

4.2.4 Comparaison des CE50, influence de la présence d'AH

Les Figure 49, Figure 50 et Figure 51 montrent les courbes dose-réponse à 96 h avec les valeurs de CE50 associées pour *Chlorella fusca*. Ces courbes regroupent les densités cellulaires finales de toutes les expositions présentées pour cette espèce en fonction des concentrations en platine moyennes déterminées par ultrafiltration partielle. Cela permet de visualiser l'ensemble des données de toxicité pour cette algue et ainsi mieux comprendre l'influence des acides humiques.

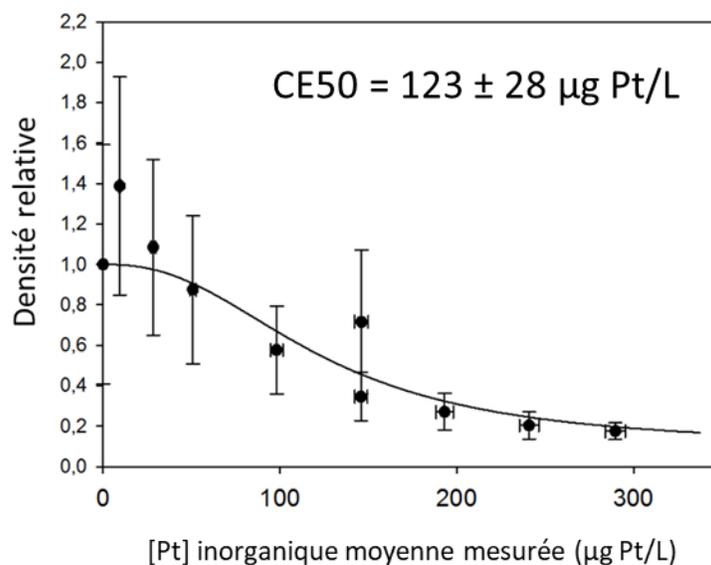


Figure 49: Courbe dose-réponse pour *Chlorella fusca* exposée au platine sans AH dans le milieu MHSM-1 pendant 96 h ; pH=6 (n=3)

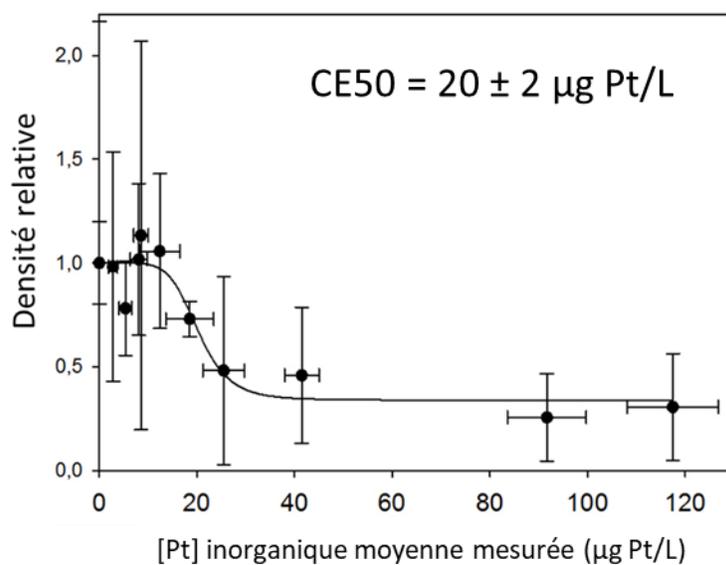


Figure 50: Courbe dose-réponse pour *Chlorella fusca* exposée au platine en présence de 10 mg C/L d'AH dans le milieu MHSM-1 pendant 96 h ; pH=6 (n=3)

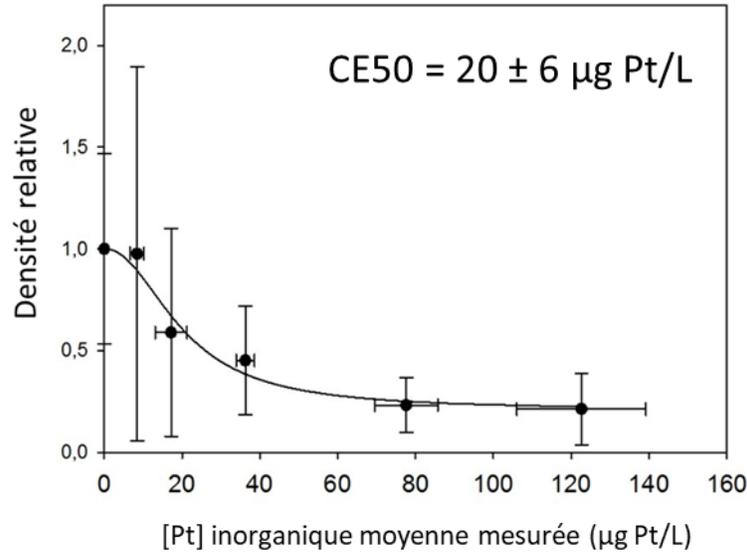


Figure 51: Courbe dose-réponse pour *Chlorella fusca* exposée au platine en présence de 20 mg C/L d'AH dans le milieu MHSM-1 pendant 96 h ; pH=6 (n=3)

D'après ces trois courbes dose-réponse, il semblerait que les CE50 évoluent dans l'ordre suivant : CE50 (sans AH) > CE50 (10 mg C/L) = CE50 (20 mg C/L). Comme Rioux (2018) l'a montré chez *Chlamydomonas reinhardtii*, la présence d'acides humiques exacerbe la toxicité du platine chez *Chlorella fusca* (CE50 autour de 20 µg/L au lieu de 120 µg/L environ), ce qui est contraire au BLM (Campbell *et al.*, 2002). En effet, le platine ne respecte pas ce modèle, et ce pour les deux espèces d'algues vertes étudiées. Toutefois, contrairement à ce qui a pu être observé pour *Chlamydomonas reinhardtii*, il n'y a pas d'augmentation de la toxicité du platine avec l'augmentation de la concentration en AH dans le milieu, de 10 à 20 mg C/L. En effet, les CE50 sont de 20 ± 2 et de 20 ± 6 µg/L de platine.

4.2.5 Bioaccumulation

La Figure 52 montre l'accumulation du platine par l'algue verte *Chlorella fusca* en fonction de la concentration d'exposition en platine inorganique. Les trois courbes représentent les trois conditions expérimentales étudiées : 0, 10 et 20 mg C/L d'acides humiques.

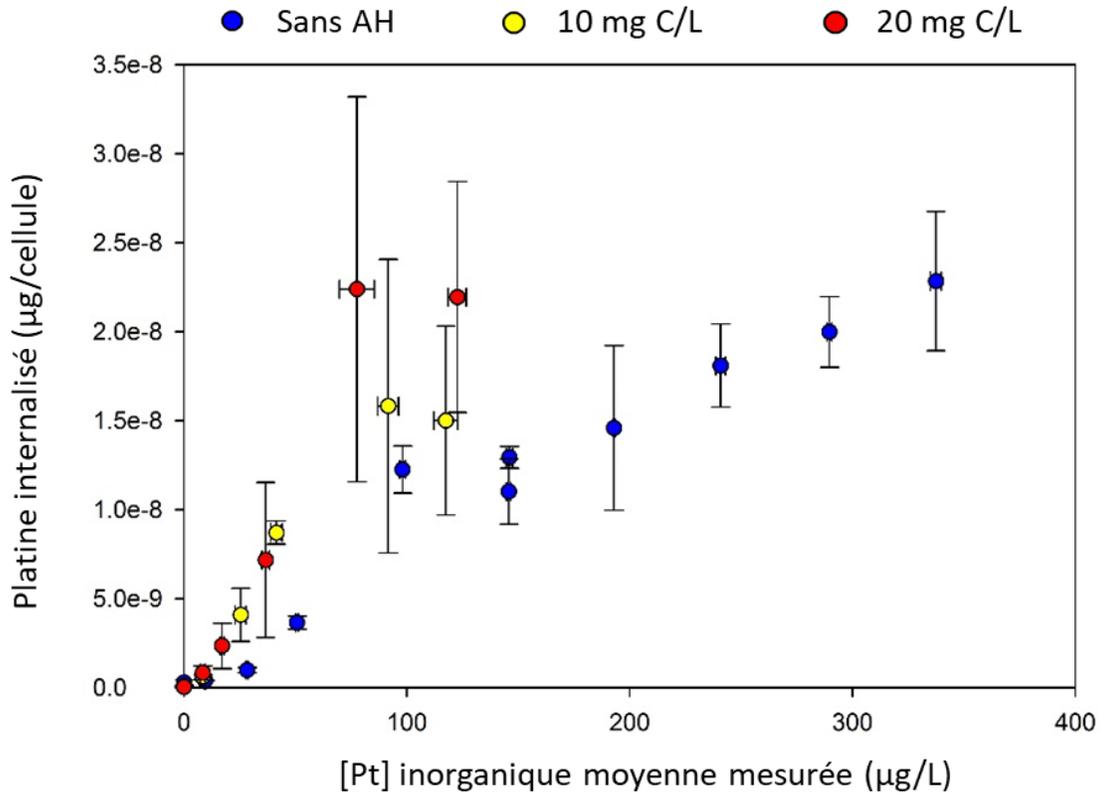


Figure 52: Quantité de platine internalisé par cellule chez *Chlorella fusca* au bout de 96 h en fonction de la concentration d'exposition moyenne en platine inorganique mesurée par ultrafiltration partielle (n=3), comparaison des différentes concentrations en AH

Sur ce graphe, la bioaccumulation semble augmenter légèrement avec la concentration en AH, mais il n'y a pas de différence significative entre aucune de ces conditions d'après un test de Kruskal Wallis ($p_{value}=0,064$). En effet, l'interprétation de ces différences est difficile à cause de grandes barres d'erreur dues à la variabilité des données. La superposition des courbes est néanmoins évidente quand la quantité de platine internalisée est exprimée en fonction de la concentration en platine totale dans le milieu comme le montre la Figure 53.

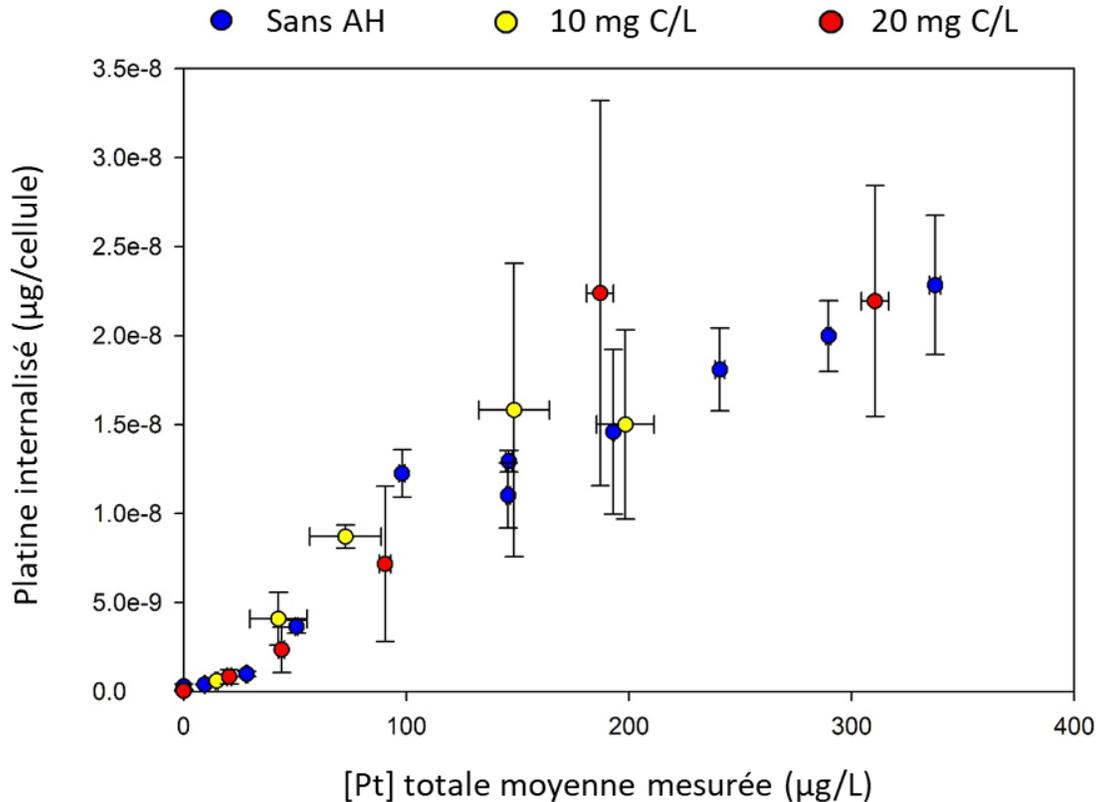


Figure 53: Quantité de platine internalisé par cellule chez *Chlorella fusca* au bout de 96 h en fonction de la concentration d'exposition moyenne mesurée en platine total (n=3), comparaison des différentes concentrations en AH

Les courbes de ces deux figures suggèrent une possible saturation de l'internalisation à environ $2 \cdot 10^{-8}$ µg Pt/cellule, soit une quantité 10 fois inférieure au seuil de saturation déterminé pour *Chlamydomonas reinhardtii*. Les pentes des courbes avant ce plateau semblent similaires entre les deux conditions d'AH d'après la Figure 52 et similaires entre toutes les conditions d'après la Figure 53. Chez *Chlorella fusca*, l'internalisation pourrait dépendre de la concentration en platine total en présence d'acide humique.

Cependant, la Figure 54, qui correspond à la Figure 52, mais en échelle logarithmique, montre une très bonne superposition des courbes jaune et rouge qui correspondent respectivement aux conditions avec 10 et 20 mg C/L d'AH. Ces résultats suggèrent une autre interprétation. En effet, en présence d'AH, la pente de la courbe d'accumulation dans la plage inférieure de concentrations en platine suggère que ce ligand organique facilite l'internalisation du platine, et ce de façon similaire pour les deux concentrations

en AH. D'ailleurs, ces résultats sont cohérents avec la toxicité (CE50) qui est similaire entre 10 et 20 mg C/L.

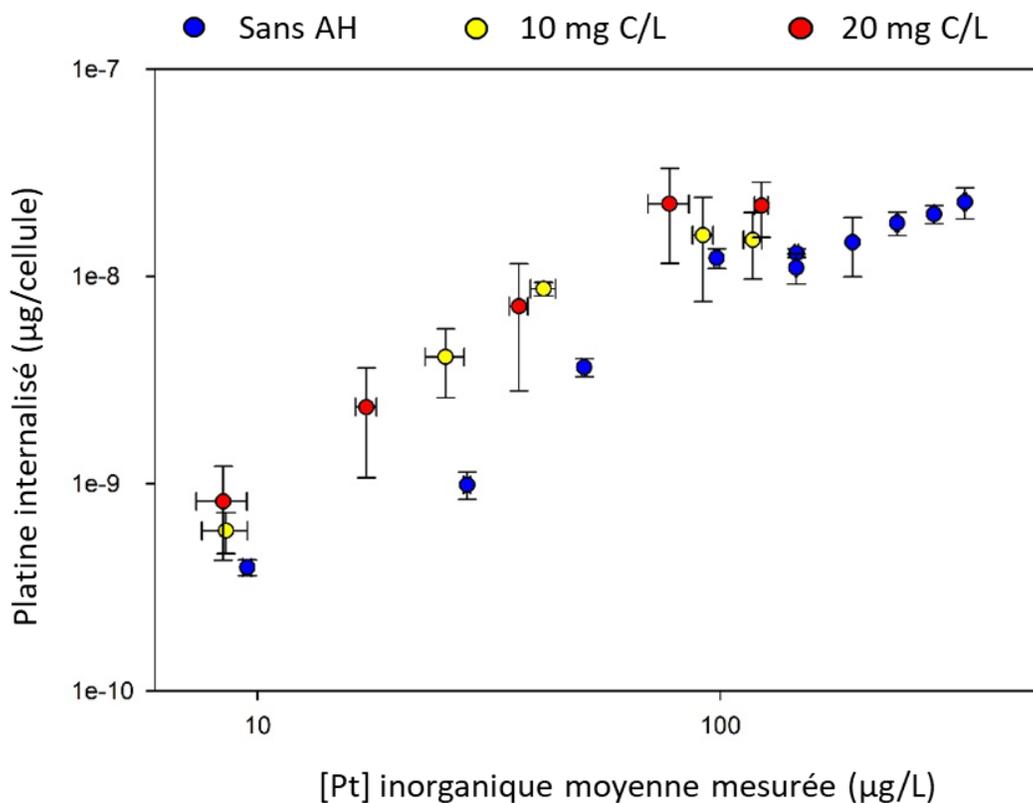


Figure 54: Quantité de platine internalisé par cellule chez *Chlorella fusca* au bout de 96 h en fonction de la concentration d'exposition moyenne mesurée en platine inorganique (n=3); comparaison des différentes concentrations en AH (échelle logarithmique).

Il est possible que les quantités d'AH adsorbés aux cellules algales arrivent à saturation à des concentrations en solution inférieures à 10 mg C/L (Campbell *et al.*, 1997). Or, il semblerait que ce soit cette accumulation d'AH dans la couche limite de la cellule qui engendre cette internalisation favorisée du platine, en modifiant certaines propriétés de la membrane, notamment sa perméabilité (Lamelas *et al.*, 2005; Vigneault *et al.*, 2000). Cela pourrait expliquer qu'il n'y ait pas de modification de l'internalisation ni de la toxicité en augmentant la concentration d'AH en solution.

4.2.6 Flux d'internalisation

Or, en s'intéressant aux valeurs calculées de flux (Lavoie *et al.*, 2014) après 96 h d'exposition, on peut faire une toute autre interprétation (Figure 55).

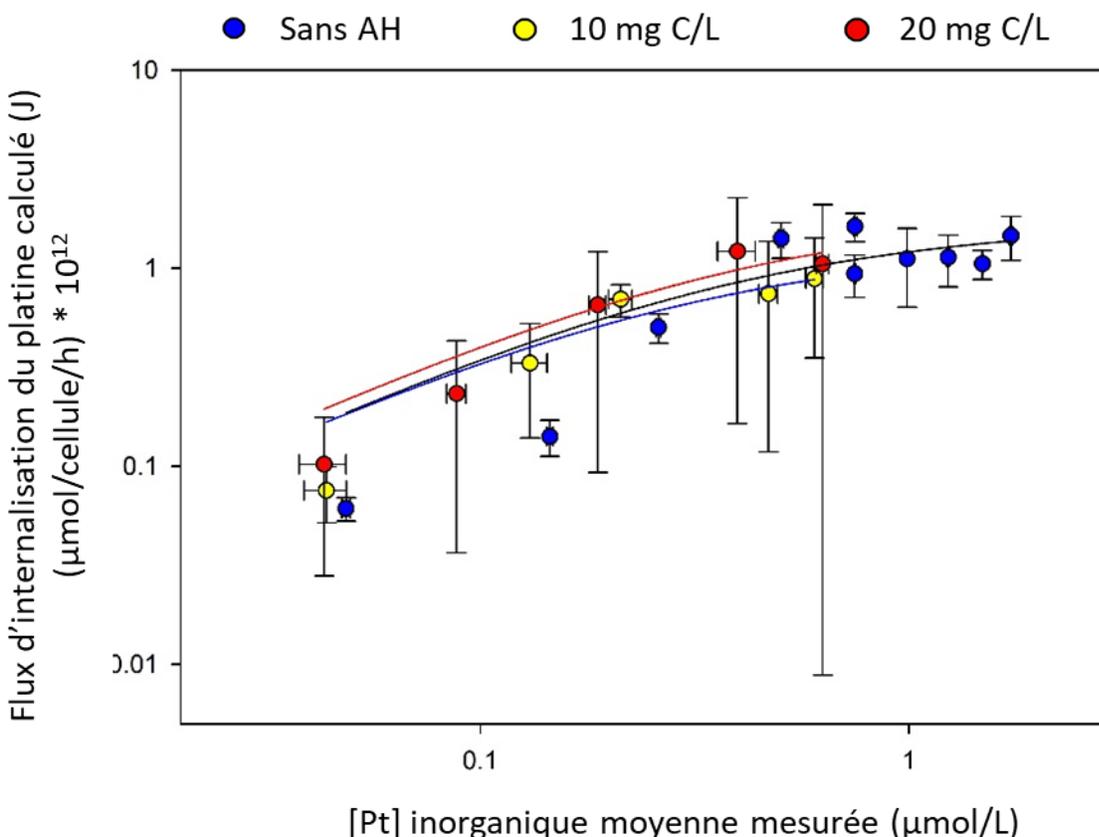


Figure 55: Flux d'internalisation du platine par *Chlorella fusca* calculés pour une exposition de 96 h en fonction de la concentration d'exposition moyenne mesurée en platine inorganique mesurée par ultrafiltration partielle (n=3); comparaison des différentes concentrations d'AH

En effet, les flux d'internalisation semblent être similaires entre les trois conditions de concentrations en AH : 0, 10 et 20 mg C/L. L'application d'un modèle déterministe de Michaelis-Menten (voir Équation 10) a permis de déterminer des paramètres de modélisation similaires entre les trois conditions de concentrations d'AH. Finalement, une seule courbe de tendance peut être appliquée à l'ensemble des données avec un $R^2=0,79$. Dans ce cas, le flux maximal $V_{max}=(1,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-12}$ $\mu\text{mol Pt/cellule/h}$ et $K_m=0,37 \pm 0,15$ $\mu\text{mol Pt/L}$.

$$y = \frac{V_{max} \times x}{K_m + x}$$

Équation 10: Fonction de modélisation des flux d'internalisation; modèle déterministe de Michaelis-Menten

Il semblerait donc que les flux d'internalisation du platine soient similaires pour 0, 10 et 20 mg C/L d'AH chez *Chlorella fusca*. Le décalage observé lors de la description des données de bioaccumulation proviendrait en fait d'une biodilution plus importante, due à une croissance plus importante dans la condition sans AH. Malgré des flux possiblement similaires, la présence d'AH pourrait augmenter la sensibilité de l'algue et induire ce taux de division moins important. Cependant, ces flux ont été déterminés par calcul et ce sont des expériences de prise en charge du platine à court terme qui permettraient de vérifier cette piste d'explication. En effet, ces calculs ont été réalisés en présumant que les flux restaient constants sur les 96 h d'exposition. Or, ce n'est peut-être pas le cas et cela induit possiblement un biais.

4.2.7 Courbe dose interne-réponse

De plus, la Figure 56 semble montrer que l'effet dépend bien de la dose interne de platine chez *Chlorella fusca*, comme c'était le cas pour *Chlamydomonas reinhardtii*. Chez ces deux espèces, les points bleus sur la courbe (sans AH) semblent parfois se démarquer, suggérant qu'à concentration internalisée égale de platine, les AH aurait un léger effet d'inhibition de la croissance. Cependant, puisque les écarts type chevauchent la courbe de tendance, cette condition ne peut pas être significativement différenciée des deux autres.

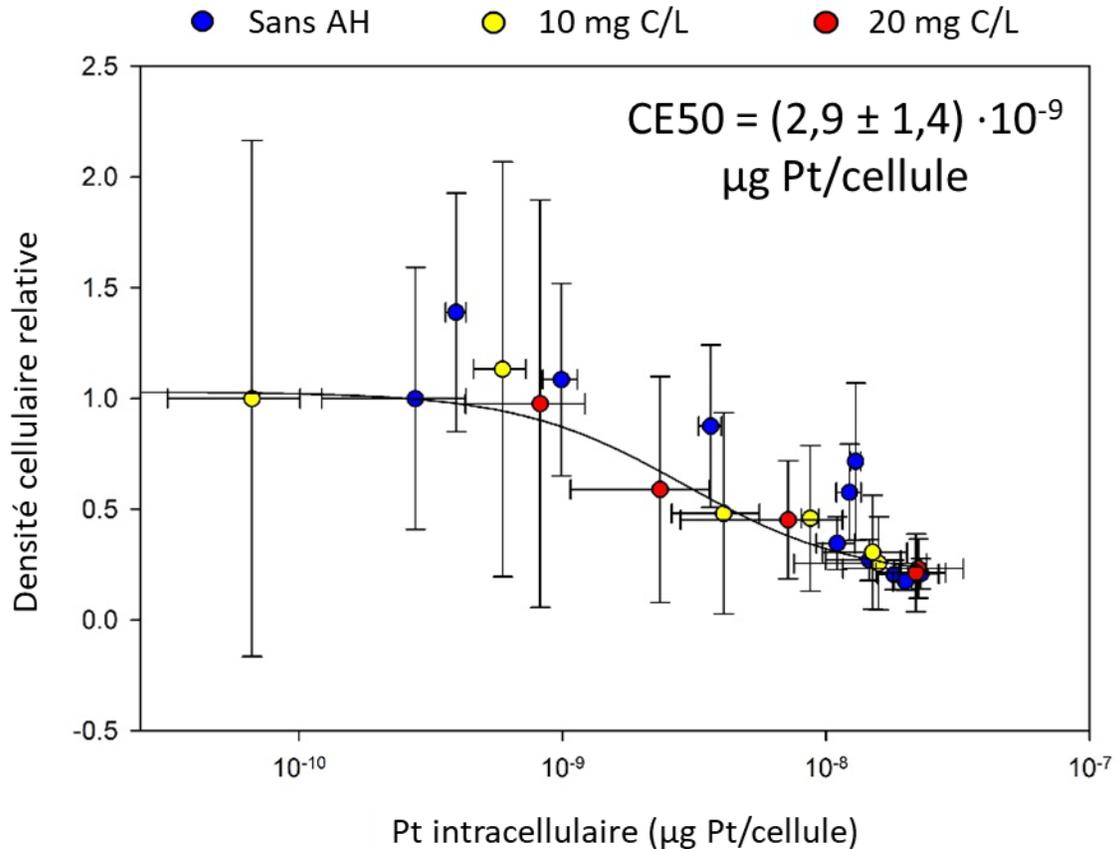


Figure 56: Courbe dose interne-réponse pour *Chlorella fusca* exposée au platine dans le milieu MHSM-1 pendant 96 h ; pH=6 (n=3) ; comparaison des différentes concentrations en AH

La CE50 interne calculée pour *Chlorella fusca* : $(2,9 \pm 1,4) \cdot 10^{-9} \mu\text{g Pt/cellule}$ est proche de la valeur calculée dans la partie pour *Chlamydomonas reinhardtii* : $(3,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-9} \mu\text{g Pt/cellule}$ (partie 4.1.7). Ces résultats suggèrent que la sensibilité de ces deux algues vertes vis-à-vis du platine internalisé est similaire. Toutefois, il y a un facteur 10 entre les quantités de platine maximales internalisées après 96 h (parties 4.1.5 et 4.2.5), ce qui rend, globalement, *Chlamydomonas reinhardtii* plus sensible à une accumulation importante de platine comme observé en présence de 20 mg C/L d'AH.

4.3 Comparaison entre les deux espèces d'algues vertes

Contrairement à ce qui était attendu par rapport aux hypothèses du BLM, la présence d'acides humiques en solution exacerbe la toxicité du platine chez les deux espèces d'algues vertes étudiées : *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlorella fusca*. En effet, selon ce modèle, l'internalisation et donc la toxicité d'un métal sont seulement fonction de la concentration en métal libre. Or, la présence de ligands organiques tels que les AH en solution mène à la complexation du platine qui devrait donc être moins biodisponible pour les algues. Alors, comment expliquer ces résultats ? Quels sont les points communs et les différences entre les deux espèces et quelles sont les pistes d'explication envisagées ?

Tout d'abord, il est possible que les hypothèses d'application du BLM (Modèle du Ligand Biotique) soient non valides dans le cas du platine. Normalement, d'après ce modèle, c'est l'étape d'internalisation du métal qui est limitante. Or, il est possible que dans le cas du platine, la vitesse de diffusion du métal dans la couche limite de l'algue se rapproche de la vitesse d'internalisation par les transporteurs et l'étape de diffusion du métal deviendrait limitante (voir Figure 57) au lieu de l'internalisation. Les équations de cinétique chimique déterminées dans le BLM ne seraient alors plus vérifiées et ainsi l'internalisation ne dépendrait plus seulement de la concentration en métal libre (Campbell *et al.*, 2002; Campbell & Fortin, 2013).

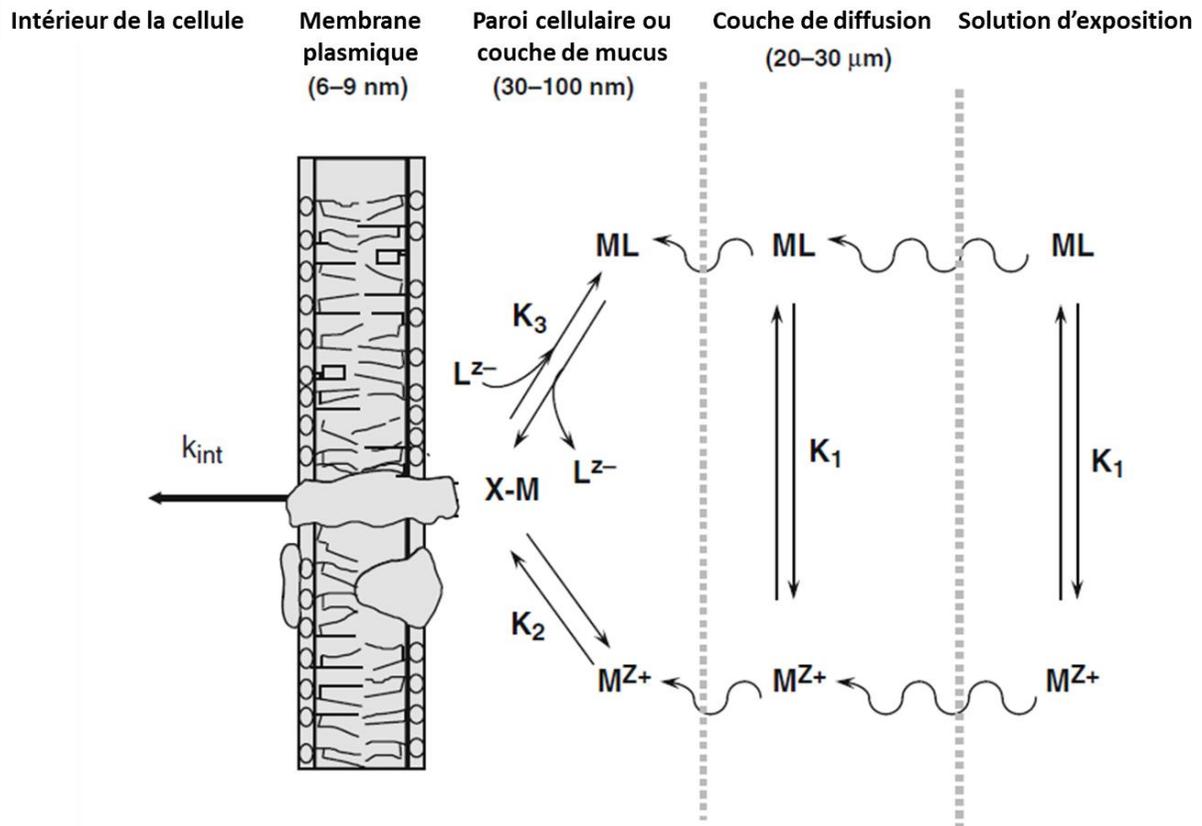


Figure 57: Modèle conceptuel des interactions métal organisme, M : métal ; L : ligand ; k et K : constantes ; X : site de transport membranaire ; adapté de Campbell *et al.* (2002)

Plusieurs méthodes permettraient de vérifier cette hypothèse, l'une expérimentale, l'autre théorique. La première consisterait à tester la prise en charge du platine en présence de différentes concentrations d'un autre ligand (par exemple l'EDTA). En effet, la vitesse de diffusion de l'ion libre est similaire, quel que soit le ligand. Si l'accumulation du platine diminue en augmentant concentration en ligand, alors le BLM serait vérifié et cette hypothèse (la diffusion est l'étape limitante dans la prise en charge du métal) ne serait pas vérifiée. Une deuxième méthode de vérification est d'estimer le flux d'internalisation du platine et de le comparer avec celui d'un autre métal : l'argent. En effet, l'argent est rapidement internalisé par *Chlamydomonas reinhardtii*, au point où son internalisation est parfois limitée par sa diffusion à travers la couche diffuse entourant l'algue (Fortin & Campbell, 2000). Les calculs correspondants sont présentés en Annexe I et permettent de conclure que cette hypothèse est finalement peu probable pour *Chlamydomonas*

reinhardtii, car les flux d'internalisation du platine sont nettement inférieurs à ceux observés pour l'argent. Une vérification expérimentale pourrait permettre de conclure sur ce point.

Par ailleurs, les substances humiques sont connues pour interagir avec les membranes cellulaires des algues et notamment s'accumuler dans la couche limite (Campbell *et al.*, 1997). Cette accumulation d'AH est connue pour entraîner un changement des propriétés de surface des algues, et notamment une perméabilité plus importante de la membrane (Lamelas *et al.*, 2005; Vigneault *et al.*, 2000) puisque ces composés ont des propriétés surfactantes naturelles. Cela peut avoir pour conséquence une modification du fonctionnement des transporteurs membranaires, et donc expliquer cette internalisation favorisée du platine. Une autre piste d'explication des résultats obtenus consiste à faire l'hypothèse que pour les deux algues vertes *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlorella fusca*, la saturation de l'adsorption des AH sur les cellules se produirait à des concentrations en AH différentes : au-dessus de 20 mg C/L pour la première et en dessous de 10 mg C/L pour la deuxième. Cela permettrait d'expliquer l'augmentation de la prise en charge du métal et de la toxicité entre 10 et 20 mg C/L chez *Chlamydomonas reinhardtii*, ainsi que l'effet « tout ou rien » observé chez *Chlorella fusca*. En effet, chez cette dernière la toxicité ainsi que les profils d'internalisation du platine sont similaires à 10 et 20 mg C/L.

Une façon de vérifier cette dernière hypothèse serait de mesurer l'activité électrophorétique des algues (détermination de la charge de surface) pour différentes concentrations en AH. Il serait aussi possible de mettre des cellules en contact avec une solution contenant une concentration d'AH connue et de quantifier la perte d'AH dans cette solution après récupération des algues par filtration. Ces deux méthodes sont décrites dans les travaux de Campbell *et al.* (1997) et la deuxième donnerait des résultats probablement plus précis.

Si cette hypothèse était vérifiée, on peut s'interroger sur la raison pour laquelle cette concentration de saturation de l'adsorption serait différente pour les deux algues. Il se peut que la réponse réside dans la composition des parois cellulaires. En effet, celles-ci peuvent avoir des affinités différentes avec les AH, qui sont adsorbés par liaisons

hydrogènes ou affinité hydrophobe (Campbell *et al.*, 1997). Pour *Chlorella fusca*, elle est de type cellulosée : glucose-mannose (Loos & Meindl, 1982; Takeda, 1991) alors que chez *Chlamydomonas reinhardtii*, elle est plutôt constituée de glycoprotéines (Adair & Snell, 1990), ce qui pourrait permettre plus de liens hydrophobes et donc plus de sites potentiels d'adsorption des AH.

Une autre hypothèse d'explication concerne la spéciation du cuivre dans le milieu. Il est possible que la présence d'AH en solution conduise à une complexation du cuivre, essentiel à la croissance des algues, qui serait alors moins biodisponible dans le milieu. En effet, d'après les auteurs de plusieurs articles scientifiques, la présence de ligands organiques en solution diminue la biodisponibilité du cuivre (Macoustra *et al.*, 2019; Tubbing *et al.*, 1994). Cette déplétion pourrait mener à une acclimatation de la cellule et à la synthèse de plus de transporteurs pour ce métal. Or, les résultats des analyses transcriptomiques chez *Chlamydomonas reinhardtii* suggèrent que le platine puisse emprunter cette voie métabolique. Une diminution de la concentration en cuivre libre pourrait donc favoriser l'internalisation du platine. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats d'une simulation avec le logiciel *WHAM7* qui montrent que l'activité du cuivre libre en solution diminue d'un facteur 26 ± 2 et 69 ± 9 en ajoutant respectivement 10 et 20 mg C/L d'AH. Ainsi, la concentration en cuivre libre est de l'ordre de $6 \cdot 10^{-17}$ et $2 \cdot 10^{-17}$ mol/L respectivement en présence de 10 et 20 mg C/L au lieu de $2 \cdot 10^{-15}$ en l'absence d'AH (voir Annexe III). La croissance algale n'est pas affectée par cette diminution, puisque la densité cellulaire des témoins avec et sans AH sont similaires. Pourtant, les concentrations en cuivre libre sont inférieures aux concentrations recommandées pour une croissance optimale de ces algues : 10^{-11} mol/L pour *Chlamydomonas reinhardtii* et entre 10^{-13} et 10^{-10} mol/L pour *Chlorella fusca* (Knauer *et al.*, 1997). Il est possible qu'une acclimatation des cellules ait lieu en présence d'AH seuls avec une augmentation du nombre de transporteurs du cuivre comme il semblerait que ce soit le cas chez la diatomée *Nitzschia palea* (partie 5.2.2.1). Des analyses transcriptomiques supplémentaires permettant de comparer des témoins avec et sans AH en étudiant l'expression des gènes de synthèse des transporteurs du cuivre permettrait de confirmer cette hypothèse. Par ailleurs, la détermination de flux d'internalisation du platine en fonction de la concentration en cuivre permettrait de vérifier si le cuivre peut inhiber le

transport du platine. En cas de compétition par rapport au transporteur, la valeur de platine internalisé au plateau serait constante alors que ce ne serait pas le cas pour une inhibition non compétitive.

La possibilité d'une accumulation du platine par diffusion passive a aussi été considérée puis exclue. En effet, il n'y a pas d'exemples connus d'internalisation des complexes d'AH par des cellules, et de toute façon, ces molécules complexes sont fort probablement trop grosses pour pouvoir diffuser à travers la membrane. Quant au platine inorganique, il est surtout présent sous forme $Pt(OH)_2$, un complexe polaire malgré sa charge nette nulle. De plus, s'il y avait une diffusion de $Pt(OH)_2$ au travers de la membrane plasmique, il n'y aurait pas de plateau comme ce qui est observé dans la représentation des données de bioaccumulation. En effet, dans un tel cas de figure, l'accumulation serait toujours plus importante en augmentant la concentration d'exposition.

L'hypothèse d'une épaisseur de la couche de diffusion différente entre les deux algues a aussi été investiguée, mais il se trouve que cette épaisseur est fonction de la taille de la cellule (Fortin, 2000). Or, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlorella fusca* ont des tailles comparables.

CHAPITRE 5: ESSAIS DE TOXICITÉ SUR LES DIATOMÉES

5.1 Toxicité du platine

5.1.1 Croissance de *Nitzschia palea*

Plusieurs expériences d'exposition combinées ont permis de déterminer des effets du platine sur la croissance de la diatomée *Nitzschia palea*. Des prélèvements ont été réalisés tous les 7 jours afin de suivre la concentration en platine du milieu d'exposition, faire un dénombrement des algues ainsi que des analyses transcriptomiques. Les résultats de croissance algale des deux expositions réalisées au laboratoire EPOC ont été combinés et sont donc présentés dans la Figure 58 en densité cellulaire relative à celle des témoins.

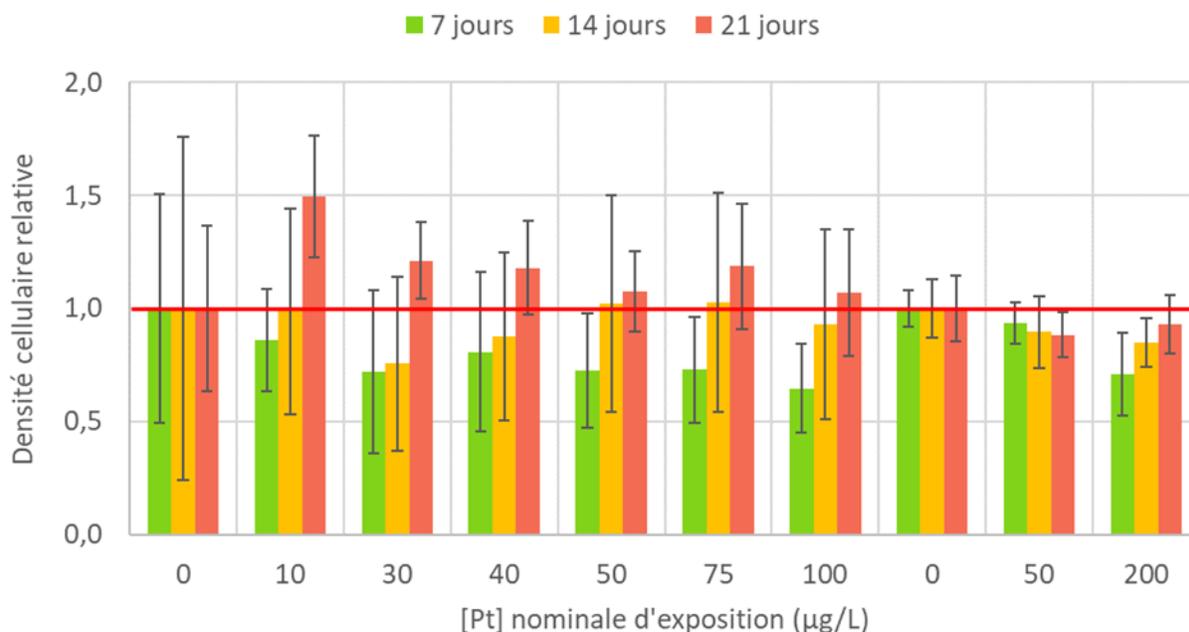


Figure 58: Densité relative de cultures de *Nitzschia palea* pour différentes concentrations d'exposition nominales en platine inorganique dans le CHU-10 à plusieurs temps de mesure ; pH=7 (n=3)

D'après cet histogramme, l'effet le plus marqué est obtenu au bout de 7 jours, suivi ensuite d'une période d'acclimatation des diatomées qui permet une reprise de la croissance. Finalement, la densité cellulaire est comparable à celle du témoin, voire plus importante en fin d'expérience. Cette interprétation se base uniquement sur les différences visibles sur cet histogramme sachant qu'il n'y a aucune différence significative dans ces résultats.

En effet, la variabilité sur ces densités relatives est toujours assez importante, car l'incertitude obtenue résulte d'un calcul de propagation des erreurs qui prend en compte, à chaque fois, les variabilités de la condition d'exposition ainsi que du témoin. Les études statistiques des valeurs de croissance absolues (Annexe V : Figure 66 et Figure 67) par ANOVA à deux voies puis test de Tukey permettent néanmoins de dégager des différences significatives. La densité cellulaire est différente du témoin aux concentrations d'exposition de 30, 40 et 100 µg/L, et dans la deuxième exposition, les nombres de cellules comptées à 50 et 200 µg/L sont différents du témoin sans être différentes entre eux. A noter que l'incertitude est moins importante dans la deuxième expérience réalisée, car il y a eu une croissance plus importante de diatomées.

5.1.2 Analyses transcriptomiques

La diatomée *Nitzschia palea* s'est avérée être relativement résistante au platine pour les concentrations étudiées, qui correspondent à des niveaux d'exposition proches des conditions pouvant être observées dans des effluents contaminés. Les analyses transcriptomiques réalisées ont permis de déterminer certains effets sublétaux du platine sur cet organisme d'étude en s'intéressant à la modification de l'expression des gènes. La Figure 59, qui est tirée des travaux de Morin *et al.* (2012), montre le principe général de circulation d'un métal dans une cellule de diatomée et permet de mieux comprendre les résultats présentés.

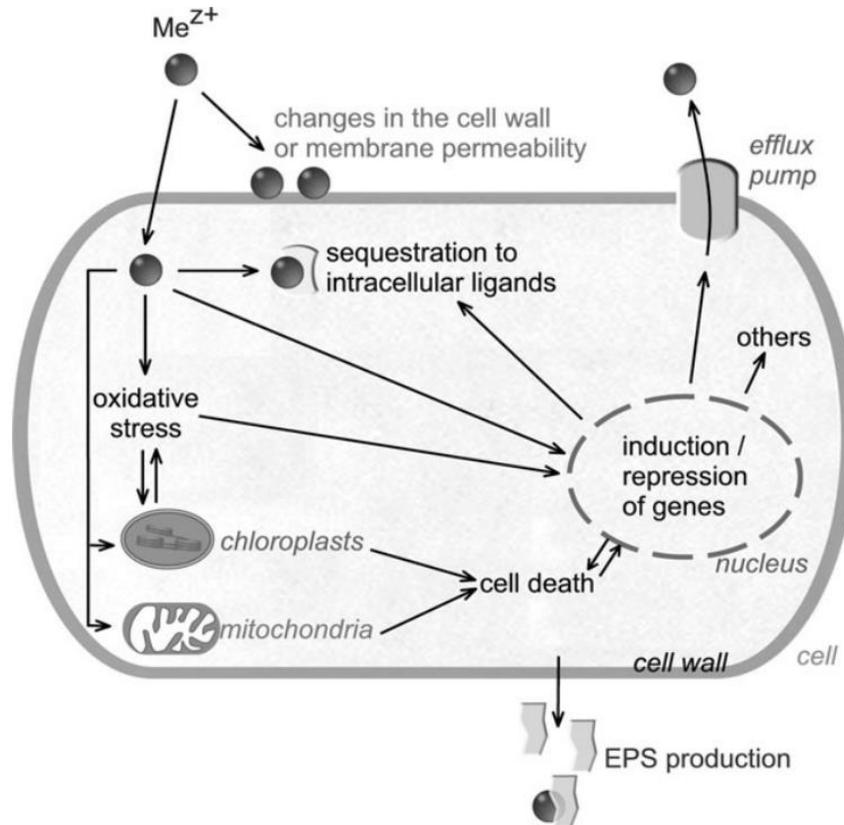


Figure 59: Schéma général de la circulation de métaux dans une cellule algale (Morin *et al.*, 2012)

Les tableaux ci-dessous représentent les facteurs d'induction (FI) des différents gènes étudiés chez la diatomée *Nitzschia palea* pour les différents temps d'échantillonnage : 7, 14 et 21 jours. Comme pour les valeurs de densité cellulaire, les résultats des deux expériences d'exposition réalisées au laboratoire EPOC sont regroupés dans ces tableaux. Les concentrations notées « ' » dans ces tableaux correspondent à la deuxième exposition réalisée. A part ce détail, la présentation des résultats suit la même logique que pour les données chez *Chlamydomonas reinhardtii* et qui est expliquée dans la partie correspondante. D'ailleurs de nombreux effets sont similaires à ceux déjà présentés chez l'algue verte, témoignant d'effets et d'acclimatation analogues.

Tableau 12: Facteurs d'induction obtenus à 7 jours pour l'exposition de *Nitzschia palea* à une large gamme de concentrations sublétales en platine réalisée à EPOC, orange : induction ; vert : répression ; ' : deuxième exposition (n=3)

Gènes d'intérêt	Facteurs d'induction pour chaque [Pt] inorganique nominale (µg/L)							
	10	30	40	50	75	100	50'	200'
<i>PsaA</i>	/	/	/	/	0,4	/	/	/
<i>cox1</i>	/	/	/	/	/	/	/	4*
<i>sodMn</i>	/	3	3	/	/	/	/	5*
<i>sodCu</i>	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>cat</i>	/	3	4	2	/	/	/	/
<i>pcs1</i>	/	/	/	/	/	/	/	5
<i>mdr1</i>	/	2*	/	/	0,4	/	/	/
<i>gst</i>	/	/	/	/	/	/	/	2
<i>Ctr2</i>	/	/	/	/	/	/	/	30*
<i>nramp1</i>	/	/	/	/	/	/	/	7

Tableau 13: Facteurs d'induction obtenus à 14 jours pour l'exposition de *Nitzschia palea* à une large gamme de concentrations sublétales en platine réalisée à EPOC, orange : induction ; vert : répression ; : deuxième exposition (n=3)

Gènes d'intérêt	Facteurs d'induction pour chaque [Pt] nominale (µg/L)							
	10	30	40	50	75	100	50'	200'
<i>PsaA</i>	/	/	/	/	0,3	0,1	/	/
<i>cox1</i>	/	/	0,5*	0,4*	0,3**	0,1**	/	/
<i>sodMn</i>	/	/	/	2	/	0,3	2*	/
<i>sodCu</i>	/	2**	/	/	/	/	/	/
<i>cat</i>	/	3	3*	3	/	0,5	2	/
<i>pcs1</i>	/	/	/	/	/	0,4	2*	/
<i>mdr1</i>	/	/	4***	2	/	/	4	10
<i>gst</i>	/	/	0,6*	/	0,6*	0,4**	/	/
<i>Ctr2</i>	/	3	/	3*	2	/	/	/
<i>nramp1</i>	/	/	/	/	/	0,2*	/	/

Tableau 14: Facteurs d'induction obtenus à 21 jours pour l'exposition de *Nitzschia palea* à une large gamme de concentrations sublétales en platine réalisée à EPOC, orange : induction ; vert : répression ; ' : deuxième exposition (n=3)

Gènes d'intérêt	Facteurs d'induction pour chaque [Pt] nominale (µg/L)							
	10	30	40	50	75	100	50'	200'
<i>PsaA</i>	/	/	/	/	/	0,4	/	/
<i>cox1</i>	/	/	/	/	/	0,4*	/	/
<i>sodMn</i>	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>sodCu</i>	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>cat</i>	/	/	/	/	/	3	/	/
<i>pcs1</i>	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>mdr1</i>	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>gst</i>	/	/	0,4*	0,5	/	/	/	/
<i>Ctr2</i>	/	4*	4*	4*	4*	4*	/	/
<i>nramp1</i>	/	/	/	/	/	/	/	/

Tout d'abord, l'observation d'inductions de gènes montre une réaction de la cellule au platine. Cette acclimatation permet finalement d'observer une densité cellulaire équivalente à celle du témoin en fin d'exposition, bien qu'elle aurait nécessité une demande énergétique, notamment pour répondre aux dommages générés par le stress oxydant (Lavoie *et al.*, 2016). Il peut cependant y avoir un effet pervers de l'augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire, comme la génération d'autres ERO (espèces réactives de l'oxygène) dans les mitochondries, ce qui est souligné par les inductions de *sodMn* observées ici. De plus, l'accumulation intracellulaire de platine induit un stress oxydant chez la diatomée *Nitzschia palea*, comme c'est le cas pour d'autres métaux tels que le cadmium (Kim Tiam *et al.*, 2018). Une forte induction de *Ctr2* est également observée, ce qui suggère la possible utilisation de ces voies métaboliques par le platine

et, potentiellement, une compétition entre platine et cuivre pour l'internalisation chez cette espèce. Les cellules chercheraient ainsi à augmenter la prise en charge du cuivre ce qui aurait pour conséquence une accumulation de platine plus importante. Une autre stratégie d'acclimatation est la mise en place de moyens de séquestration ou d'excrétion du platine afin de diminuer l'impact intracellulaire (surexpression de *mdr1*).

Pour la première exposition, qui impliquait une large gamme de concentrations en platine, aucune réponse n'a été mise en évidence à 10 µg/L de platine inorganique. Après 7 jours, il y a encore peu de réponses. Pour les conditions d'exposition de 30 à 50 µg Pt/L quelques inductions de gènes sont observées, notamment liées à la réponse au stress oxydant (*cat* et *sodMn*). Au-delà de 75 µg/L, ce sont plutôt des répressions modérées qui sont observées : *mdr1* ainsi que *PsaA*. Le fait qu'il n'y ait que très peu d'effets mesurés au-delà de 75 µg/L semble indiquer que les fonctions cellulaires étudiées ne se montrent plus suffisamment efficaces pour protéger la cellule et que sûrement d'autres fonctions, non investiguées dans notre étude, ont été mises en place par les algues dans ces conditions. Après 14 jours d'exposition, des effets délétères sont observés pour des expositions à des concentrations plus élevées (75 et 100 µg Pt/L), notamment de fortes répressions des défenses antioxydantes, du métabolisme mitochondrial et du photosystème. Cela pourrait expliquer une diminution de la croissance algale entre les jours 14 et 21 à ces deux concentrations de platine. Un stress oxydant est généré dans les mitochondries (possiblement dû à une demande énergétique accrue) et dans le cytoplasme (*cat*) pour les conditions entre 30 et 50 µg Pt/L. Pour ces conditions entre 30 et 50 µg/L, il semble y avoir une augmentation du stress oxydant comme en témoignent les inductions de *sodMn* et *cat*. De plus, l'induction du transporteur transmembranaire du cuivre *Ctr2* suggère que les cellules pourraient être carencées en ce métal essentiel. L'utilisation de la pompe d'efflux (*mdr1*) pourrait permettre une excrétion du platine par les cellules. Au bout de 21 jours d'exposition, l'expression de la plupart des gènes est revenue à un niveau normal si ce n'est celui du transporteur du cuivre qui est toujours induit au même niveau pour à peu près toutes les concentrations d'exposition en platine. En fin d'expérience, il y a toujours un manque de cuivre dans les cellules qui pourrait être relié à l'éventuelle compétition avec le platine. Cependant, *mdr1* n'est plus induit ce qui signifie que les cellules ont probablement trouvé un moyen de détoxification plus efficace.

Pour la deuxième exposition, des effets globalement similaires ont été observés. Dans la condition la plus concentrée (200 µg Pt/L), la plupart des gènes étudiés voient leurs niveaux d'expression augmenter après 7 jours. Les diatomées pourraient utiliser surtout les phytochélatines afin de complexer le métal, mais après 14 jours, l'utilisation de la pompe d'efflux (*mdr1*) pourrait être préférée puisque celle-ci est activée. Il est aussi possible que ces deux mécanismes soient complémentaires dans le sens où la pompe d'efflux pourrait permettre de faire sortir les complexes métal-phytochélatine de la cellule. Les travaux de Lee *et al.* (1996) ont montré une excrétion conjointe de phytochélatines et de cadmium chez une diatomée marine : *Thalassiosira weissflogii*, sans pour autant relier ces résultats avec l'utilisation de la pompe d'efflux. Finalement, après 21 jours d'autres mécanismes semblent préférés puisqu'il n'y plus d'induction des gènes des phytochélatines ou de la pompe d'efflux. En effet, l'organisme semble affiner les mécanismes de défense utilisés au cours du temps afin de diminuer la dépense énergétique et donc améliorer la croissance. A 50 µg Pt/L, comparativement à 200 µg/L, la réponse cellulaire est décalée dans le temps. En effet, de fortes inductions sont montrées à 14 jours au lieu de 7 jours dans la condition à 200 µg Pt/L. Cela pourrait s'expliquer par la pression de contamination qui est moins forte : les cellules exposées à 50 µg Pt/L n'auraient pas besoin de s'acclimater aussi tôt que celles exposées à 200 µg Pt/L et favoriseraient plutôt une allocation d'énergie pour la croissance dans les 7 premiers jours (voir Figure 58). Les défenses oxydantes ainsi que la pompe d'efflux sont plutôt sollicitées plus tard. En effet, que ce soit pour 50 ou 200 µg Pt/L d'exposition, un retard de croissance est observé au même temps de prélèvement que les fortes inductions déterminées par analyses transcriptomiques : 14 jours pour 50 µg Pt/L et 7 jours pour 200 µg/L (voir Figure 67 de l'Annexe V). Après 14 et 21 jours, on ne mesure plus d'effet, car les cellules ont probablement mis en place d'autres solutions métaboliques

Finalement, les niveaux d'expression ne sont pas si alarmants, et puisque la croissance est bonne, il semble que les diatomées s'accommodent relativement bien de la présence du platine. Il aurait été intéressant, comme pour les algues vertes, d'étudier des gènes de régulation du cycle cellulaire comme par exemple celui codant pour la protéine P53 (tumor protein 53) qui peut induire la mort programmée de la cellule par apoptose.

5.2 Influence de la présence d'AH

Une expérience de 28 jours a également été réalisée de façon à étudier l'influence de la présence d'AH sur la toxicité du platine chez cette espèce. Les diatomées exposées semblaient être dans un état physiologique différent des expositions présentées dans la partie précédente puisqu'aucune croissance n'a été observée à 200 µg Pt/L et il y a même eu une mortalité des organismes inoculés. Cependant, cette expérience a tout de même permis une comparaison de l'effet du platine en l'absence et en présence de 10 mg C/L d'AH : Figure 60 et Figure 61.

5.2.1 Croissance

A cause d'une adhérence importante des diatomées aux parois des contenants en polycarbonate, les courbes de croissance présentées dans cette partie ne sont pas représentatives des densités cellulaires réelles. Elles sont tout de même présentées, pour donner un aperçu de l'évolution de la croissance au cours du temps, et donc de déterminer l'influence de la présence d'AH sur cette croissance.

5.2.1.1 Croissance de *N. palea* en l'absence d'AH

La Figure 60 montre le suivi de la densité cellulaire en solution en l'absence d'AH. En raison de l'état physiologique altéré de ces diatomées, une toxicité plus importante a été observée par rapport aux expositions présentées dans les parties précédentes.

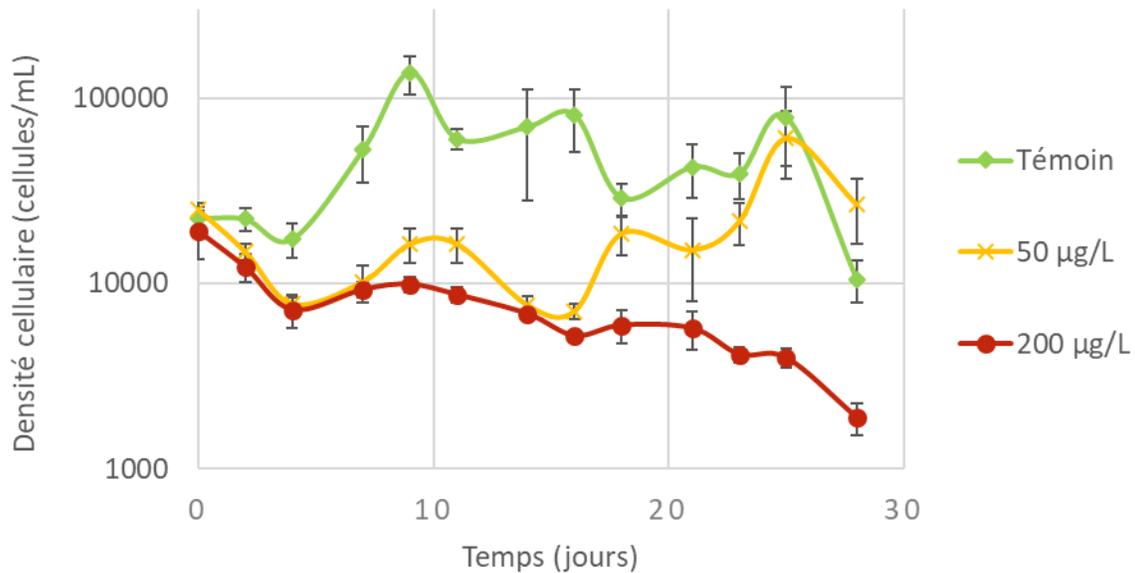


Figure 60: Courbes de croissance obtenues pour *Nitzschia palea* exposée au platine en l'absence d'AH dans le CHU-10 modifié pH=7 (n=5)

La condition d'exposition au Pt à 50 µg/L semble aboutir à une densité cellulaire similaire à celle du témoin en fin d'expérience, et ce d'après la courbe ci-dessus. Cependant, la croissance des diatomées avait tout juste commencé vers le jour 17. L'observation visuelle des cultures permettait une meilleure interprétation des résultats puisqu'une grande partie des diatomées étaient collées sur les parois des erlenmeyers. Cela a permis de constater que la densité cellulaire réelle finale à 50 µg/L était en fait plutôt faible en comparaison au témoin. D'ailleurs, les analyses statistiques des résultats de croissance sont en adéquation avec cette interprétation. Une ANOVA puis un test post hoc de Tukey a permis de déterminer qu'il y avait une différence significative entre le témoin et les conditions d'exposition, mais pas de différence significative entre 50 et 200 µg/L (pvalue= 0,46).

5.2.1.2 Croissance de *N. palea* en présence de 10 mg C/L d'AH

La Figure 61 représente aussi des courbes de croissance de *Nitzschia palea*, mais cette fois pour une exposition au Pt en présence de 10 mg C/L. Puisque les deux expositions avaient été réalisées en parallèle avec les mêmes diatomées inoculées au même moment, alors elles sont comparables quant à l'effet des AH.

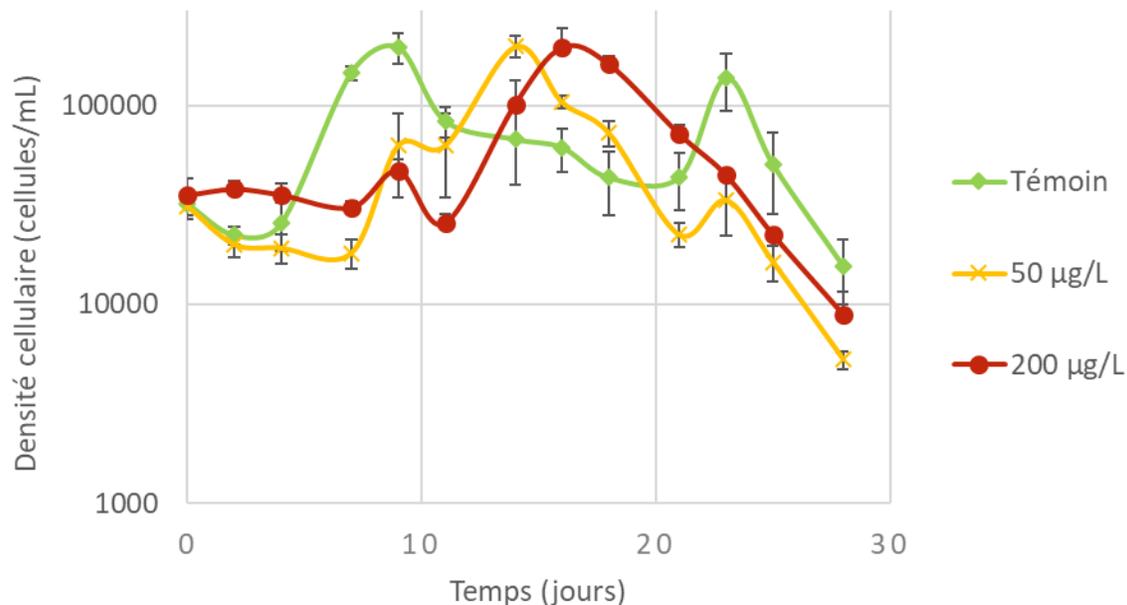


Figure 61: Courbes de croissance obtenues pour *Nitzschia palea* exposée au platine en présence de 10 mg C/L d'AH dans le CHU-10 modifié, pH=7 (n=5)

La succession des pics suggère que la présence de platine a retardé le début de la croissance de la culture, même si la densité cellulaire réelle n'a pas pu être mesurée à cause de l'adhérence des diatomées au matériau. Cette fois, l'observation visuelle ne permettait pas de différencier le témoin des conditions à 50 et 200 µg/L, tant la croissance y avait été importante. L'analyse statistique avec une ANOVA à deux facteurs puis un test post-hoc de Tukey confirment cela puisqu'on ne peut pas différencier statistiquement ces trois conditions.

Le Tableau 15 montre les densités cellulaires en fin d'exposition, avec et sans AH. Cela permet de constater plus clairement l'effet protecteur de la présence d'AH sur la diatomée *Nitzschia palea*. En effet, après 28 jours, la croissance est inhibée par le platine en l'absence d'AH, alors qu'elle ne l'est pas en présence de 10 mg C/L d'AH.

Tableau 15: Population algale moyenne pendant 28 jours d'exposition ; exprimée en 10³ cellules/mL

[Pt] _{inorg} (µg/L)	[HA] = 0 mg C/L	[HA] = 10 mg C/L
0	51 ± 35	71 ± 56
50	19 ± 14	51 ± 53
200	7,7 ± 4,4	63 ± 57

Ces résultats, bien qu'à considérer avec prudence en termes de courbes de croissance, suggèrent tout de même que la présence d'AH en solution a un effet protecteur important pour les diatomées par rapport à une exposition au platine. Cependant, les hypothèses du BLM ne semblent pas être vérifiées pour autant. En effet, les concentrations d'exposition sont exprimées en platine inorganique. Une toxicité similaire entre les deux conditions aurait dû être observée si le modèle était applicable. La présence d'AH en solution apporte donc une protection aux diatomées plus importante qu'anticipée. Sur le point méthodologique, au vu de ces courbes de croissance ainsi que de celles de l'Annexe V (Figure 66 et Figure 67), la réalisation d'une exposition de durée 7 à 14 jours aurait constitué un bon indicateur de la toxicité chez cette espèce de diatomée.

5.2.2 Analyses transcriptomiques

Les expositions présentées ci-dessus montrent le rôle protecteur de la présence d'AH qui diminue la toxicité du platine chez la diatomée *Nitzschia palea*. Ce résultat est confirmé par les analyses transcriptomiques présentées dans le Tableau 16. Il regroupe les facteurs d'induction obtenus pour les algues échantillonnées après 28 jours et correspondant aux courbes présentées dans la Figure 60 et la Figure 61.

Tableau 16: Facteurs d'induction des gènes d'intérêt pendant les expositions au platine avec et sans AH réalisées à l'INRS chez *Nitzschia palea* ; orange : induction ; vert : répression (n=4-5) ; ces facteurs sont obtenus par comparaison avec les valeurs des témoins ; / : Identique aux témoins.

Gène d'intérêt	Facteurs d'induction pour chaque [Pt] inorganique nominale (µg/L)			
	50	200	50 +AH	200 + AH
<i>PsaA</i>	2	Pas de signal	/	0,3*
<i>cox1</i>	/		/	/
<i>sodMn</i>	3	Matériel génétique insuffisant	/	/
<i>sodCu</i>	/		/	/
<i>cat</i>	/		/	/
<i>gst</i>	3*		/	/
<i>mdr1</i>	6	Croissance algale inexistante pour cette condition	0,2	/
<i>pcs1</i>	2*		0,2*	0,3
<i>Ctr2</i>	/		/	/
<i>nramp</i>	3**		/	/

Tout d'abord, les cellules provenant de la condition d'exposition à 200 µg Pt/L en l'absence d'AH n'ont pas pu être exploitées en termes d'analyses transcriptomiques par manque de matériel génétique. En effet, non seulement la croissance avait été inexistante dans cette condition, mais le nombre de cellules a diminué au fil du temps (voir Figure 60). Les diatomées étaient probablement toutes mortes et donc il n'a pas été possible d'extraire d'ARN. Pour ce qui est de l'impact du platine à 50 µg/L, il y a une induction de plusieurs gènes associés au transport (*nramp*), à la photosynthèse (*PsaA*), ainsi qu'aux mécanismes de défenses antioxydantes cellulaires (*sodMn*, *gst*) et de détoxification (*gst*, *pcs1*) ainsi qu'à une potentielle excrétion du platine (*mdr1*). Ces effets sont similaires à ce qui a pu être décrit dans les analyses présentées dans le reste de ces travaux. Il y a également une induction notable du gène *PsaA* lié à la photosynthèse. Chez *Nitzschia palea*, des inductions des gènes *PsaA* et *sodMn* sont documentées dans

la bibliographie en réponse à des expositions à de faibles concentrations d'un autre métal, le cadmium (Kim Tiam *et al.*, 2018).

D'après les données présentées dans ce tableau, il semble y avoir un effet protecteur de la présence de l'acide humique Suwannee River. En effet, il n'y a pas de réponse biologique notable pour les gènes étudiés en présence de 10 mg C/L d'AH. Ainsi, même à 200 µg Pt/L, la majorité des gènes ont un niveau d'expression comparable à celui du témoin. Seules quelques répressions modérées du gène du photosystème *PsaA* et de transporteurs (*pcs1*, *mdr1*) sont mises en évidence. Ces résultats sont en adéquation avec les données de croissance (voir Figure 61). En effet, en présence d'AH une croissance comparable au témoin était observée lors des expositions à 50 et 200 µg Pt/L. Pour cette expérience, les diatomées avaient été échantillonnées en fin d'exposition seulement. Or, en présence d'AH, la concentration en platine avait seulement occasionné un retard de croissance des cultures en début d'exposition. Il aurait été intéressant d'échantillonner des diatomées à ce moment-là, afin de montrer des effets et de mieux comprendre l'impact de la présence couplée de matière organique et de platine.

5.2.2.1 Influence des AH seuls

En comparant les témoins avec et sans AH, des facteurs d'induction correspondant seulement à la présence de substances humiques ont été mesurées à 28 jours et sont présentés dans le Tableau 17. Cela montre que la présence d'AH seul dans le milieu a une incidence sur la physiologie des algues, résultat qui était attendu (Prokhotskaya & Steinberg, 2007; Steinberg, 2014). Il y a une surexpression notable de plusieurs des gènes étudiés, mais qui correspond à une acclimatation de la cellule à ces conditions de culture et n'empêche pas leur croissance. En effet, le facteur d'induction le plus important est obtenu pour le gène *PsaA*, qui code pour une protéine du photosystème I. Cette induction sert possiblement à pallier le manque de lumière dû à la présence des AH en solution. De plus, une activité accrue de la chaîne mitochondriale est suggérée par l'induction des défenses antioxydantes et de *cox1*. La modification de l'expression correspondant aux transporteurs pourrait suggérer une modification de la biodisponibilité de certains oligoéléments en solution avec l'ajout d'AH. Finalement, l'organisme compense seulement la présence d'AH par une activité métabolique plus importante qui

amène possiblement à une demande accrue en énergie. Pour les analyses transcriptomiques présentées dans les parties précédentes, l'expression génétique est toujours comparée à celle du témoin puisque c'est une modification de l'expression des gènes qui est étudié. Cette réponse biologique aux AH seuls est donc prise en compte dans les données présentées. Toutefois, il est possible que des effets dus à cette exposition à différentes sources de stress à la fois mène à des effets supplémentaires. L'ajout d'une période d'acclimatation des cellules à la présence d'AH avant l'exposition permettrait de s'assurer qu'il n'y ait pas de biais expérimental à ce niveau-là.

Tableau 17: Facteurs d'induction mesurés en présence de 10 mg C/L d'AH après 28 jours d'exposition de *Nitzschia palea* ; orange : induction ; vert : répression (n=4) ; / : Identique aux témoins sans AH

Gène d'intérêt	FI, présence d'AH seul
<i>PsaA</i>	13*
<i>cox1</i>	4***
<i>sodMn</i>	5**
<i>sodCu</i>	/
<i>cat</i>	/
<i>pcs1</i>	3*
<i>mdr1</i>	7*
<i>gst</i>	3
<i>Ctr2</i>	3**
<i>nramp</i>	/

5.2.3 Rôle protecteur des AH pour les diatomées

Contrairement à ce qui a été déterminé chez les algues vertes, les AH semblent avoir un rôle protecteur vis-à-vis du platine chez la diatomée *Nitzschia palea*. Les résultats suggèrent que cela va bien au-delà de la chélation et donc de la diminution de la biodisponibilité du platine pour les cellules algales. En effet, puisque la concentration

d'exposition en platine est exprimée en platine inorganique, comme dans les autres expériences de ce projet, la toxicité devrait être similaire avec et sans AH si le BLM était vérifié (Campbell *et al.*, 2002). Ce modèle semble ne pas permettre d'expliquer les résultats obtenus chez cette espèce non plus, bien que l'ajout d'AH ait un effet contraire sur la toxicité du platine par rapport aux algues vertes. Une différence importante entre ces deux types d'organismes est le frustule que possèdent les diatomées. Il constitue une barrière physique entre le milieu d'exposition et la membrane cellulaire et pourrait permettre d'expliquer cet effet de protection. En effet, il pourrait empêcher les AH de s'accumuler trop près de la membrane plasmique et de modifier ses propriétés.

De plus, le frustule, conformément à sa nature siliceuse plutôt inerte, pourrait être moins propice à l'adsorption d'AH. Toutefois, ce n'est pas forcément ce qui a été observé dans la littérature. En effet, le frustule est en réalité recouvert par une sorte de revêtement organique composé d'acides aminés et d'hydrates de carbone (glucose et fructose). Ce manteau joue notamment un rôle dans les mécanismes de fixation de la silice sur le frustule et pourrait avoir des affinités avec les AH (Hecky *et al.*, 1973). Pour autant, ces affinités et cette adsorption éventuelle d'AH ne semblent enlever en rien la protection apportée par le frustule. En effet, Sánchez-Marín *et al.* (2010) ont étudié un autre cation divalent, le plomb, et son internalisation en présence d'AH chez la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii*. Les auteurs suggèrent aussi un rôle protecteur du frustule, car la présence des AH augmentait la quantité de métal adsorbée sur le frustule tout en limitant son internalisation par la diatomée. Du fait de leur revêtement organique (EPS), les diatomées sont entourées de charges positives ce qui diminue les effets de répulsion avec les AH et favorise leur adsorption. Ceci est cohérent avec les observations de Sánchez-Marín *et al.* (2010). Le frustule et ses différentes caractéristiques semblent donc jouer un rôle dans les interactions, AH-métal-cellule sans que celui-ci puisse être clairement défini.

CHAPITRE 6: CONCLUSIONS

Les éléments du groupe platine sont connus pour leur rareté et leur grande valeur marchande. Cependant, ce sont aussi des polluants globaux à cause de leurs nombreuses utilisations dans notre société moderne et surtout dans les pots catalytiques (Barbante *et al.*, 2001; Soyol-Erdene *et al.*, 2011). En effet, l'abrasion mécanique de ces pièces pendant toute la durée de vie des véhicules mène à des rejets de ces métaux *via* les fumées d'échappement. Finalement, il y a une dispersion de ces éléments dans l'environnement, dont les milieux aquatiques où ils peuvent interagir avec des ligands organiques comme les acides humiques (AH). Ce sont des macromolécules de matière organique naturelle (MON) qui proviennent de restes d'organismes vivants et qui sont ubiquistes dans les eaux douces. En tant que chélateurs naturels des métaux, les AH peuvent modifier leur spéciation dans les milieux aquatiques ainsi que leur biodisponibilité pour les organismes vivants. Pour cette raison, la prise en compte du rôle de ces composés complexes dans les mécanismes d'accumulation et de toxicité des EPG semble importante dans un souci de cohérence environnementale.

Le modèle du ligand biotique (BLM) est un outil de prédiction de la toxicité d'un métal en fonction de la concentration libre en solution. Il se révèle représentatif de la réalité environnementale pour de nombreux métaux, mais ce n'est pas le cas pour le platine en présence d'AH. En effet, pour les trois espèces de producteurs primaires étudiées : deux algues vertes et une diatomée, la toxicité ne pouvait pas être prédite par ce modèle.

Chez les algues vertes : *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlorella fusca*, la toxicité du platine est exacerbée et son internalisation par les cellules favorisée par la présence d'AH, contrairement à ce qui pourrait être attendu.

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, la toxicité augmente avec la concentration en AH. Ainsi, CE50 (sans AH) > CE50 (10 mg C/L d'AH) > CE50 (20 mg C/L d'AH). Ceci est cohérent avec les résultats de bioaccumulation puisque celle-ci est plus fortement favorisée en augmentant les concentrations en AH, pour finalement atteindre le même plateau de saturation : environ $2 \cdot 10^{-7}$ $\mu\text{g Pt/cellule}$.

Chez *Chlorella fusca*, la toxicité augmente en présence d'AH, mais reste similaire lorsque l'on passe de 10 à 20 mg C/L. Cela correspond à une internalisation du platine favorisée à la même hauteur en présence de 10 et de 20 mg C/L d'AH par rapport à l'absence de ce composé. Finalement, on observe l'ordre suivant pour les CE50 : CE50 (sans AH) > CE50 (10 mg C/L d'AH) = CE50 (20 mg C/L d'AH). À nouveau, un plateau de saturation de l'accumulation est obtenu, mais pour une concentration intracellulaire dix fois moins importante : environ $2 \cdot 10^{-8}$ µg Pt/cellule.

Ces points communs et différences sont encore difficiles à expliquer, mais il est raisonnable de conjecturer que l'AH affecte la perméabilité de la membrane suite à l'absorption d'AH et qu'une saturation d'adsorption d'AH se produise sur les cellules pour des concentrations différentes chez ces deux organismes. Cela pourrait être expliqué par les compositions différentes des parois cellulaires de ces deux algues. Ainsi la saturation serait obtenue au-dessus de 20 mg C/L pour *Chlamydomonas reinhardtii* et en dessous de 10 mg C/L pour *Chlorella fusca*.

Contrairement à ce qui a été déterminé chez les algues vertes, la présence d'AH a permis de protéger la diatomée *Nitzschia palea* vis-à-vis du platine, sans pour autant que le BLM ne soit vérifié. Une meilleure croissance et une diminution des effets induits par la présence du métal ont été déterminées en présence de 10 mg C/L d'AH. La protection physique apportée par le frustule siliceux pourrait limiter l'adsorption d'AH trop proche de la membrane, la modification des propriétés de celle-ci, ainsi que l'internalisation et donc les effets du platine sur les cellules.

La réalisation d'analyses transcriptomiques au cours de ce projet a également permis de faire des hypothèses sur les mécanismes d'internalisation et les impacts du platine à l'échelle cellulaire sur *Nitzschia palea* et *Chlamydomonas reinhardtii*. Finalement, de nombreux points communs ont été déterminés. Le platine pourrait être internalisé, en partie, par les voies biologiques destinées au cuivre, ce qui aurait pour conséquence une compétition entre ces deux éléments. Aussi, il est possible que la complexation du cuivre par les AH induise une déplétion et donc une production plus importante de ces transporteurs CTR, qui favorisent ainsi l'internalisation du platine. Une fois dans le milieu intracellulaire, le platine serait capable de générer un stress oxydatif, comme c'est le cas

pour d'autres métaux, et parfois affecter la régulation des gènes du photosystème. Enfin, la séquestration par des phytochélatines et/ou une excréation par la pompe d'efflux semblent constituer une bonne solution pour limiter les effets, même s'il semblerait que des mécanismes plus performants, et que nous n'avons pas pu identifier, soient parfois choisis par les cellules. La Figure 62 reprend l'ensemble des mécanismes intracellulaires de répartition du platine qui ont pu être déterminés ou conjecturés chez les algues étudiées, tout en renseignant les gènes correspondants.

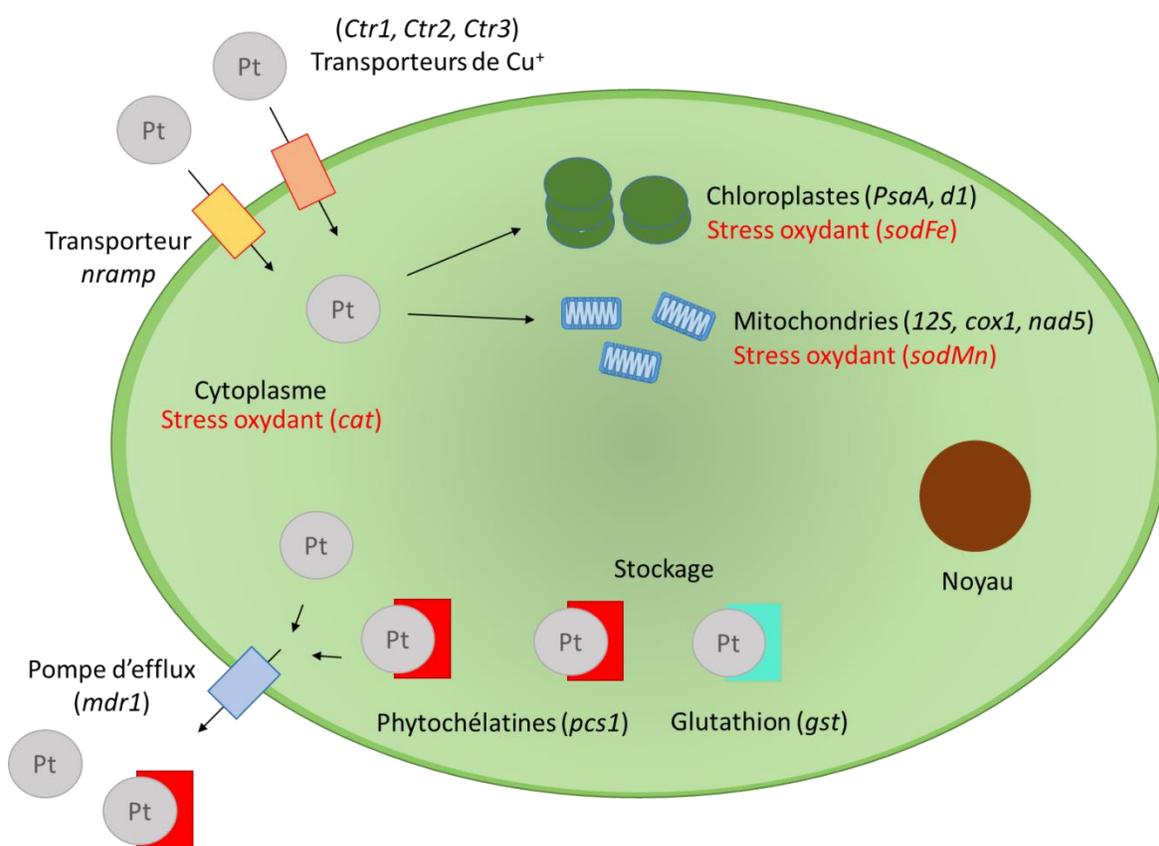


Figure 62: Schéma récapitulatif et simplifié des mécanismes intracellulaires mis en jeu par les algues suite à une exposition au platine, ARN étudiés correspondants en italique.

Les résultats de ces travaux ont des implications environnementales importantes puisqu'ils démontrent le rôle clé de la MON, et notamment des AH, dans la spéciation du platine, sa biodisponibilité ainsi que sa toxicité pour des organismes aquatiques. Par

ailleurs, la très forte toxicité du platine pour *Chlamydomonas reinhardtii* en présence de 20 mg C/L : CE50 \ll 10 μ gPt/L amène à se questionner sur le risque environnemental conséquent à une pollution par ce métal dans des conditions naturelles. Cela souligne l'importance de la prise en compte des interactions complexes entre métaux et substances humiques dans les études en écotoxicologie.

CHAPITRE 7: PERSPECTIVES

Les résultats obtenus soulèvent plusieurs questions. Tout d'abord, il faudra vérifier expérimentalement les pistes d'explication présentées pour expliquer les résultats obtenus pour les algues vertes en présence d'AH. Notamment, l'hypothèse selon laquelle la saturation des parois cellulaires se fait à des concentrations en AH différentes chez les deux algues vertes étudiées mérite un approfondissement. Des mesures d'activité électrophorétique et/ou d'adsorption des AH sur les algues permettrait de vérifier cette conjecture. Ajouté à cela, la réalisation d'analyses transcriptomiques chez *Chlorella fusca* pourrait permettre une comparaison des effets du platine avec les deux autres organismes étudiés : *Chlamydomonas reinhardtii* et *Nitzschia palea*. Cela nécessiterait au préalable de caractériser les gènes cibles envisagés en termes de composition moléculaire ou de réaliser le transcriptome de cette espèce par séquençage des ARN. Cette dernière technique permettrait également de cibler des gènes qui n'ont pas pu être étudiés chez les deux organismes cités, dont certains en lien avec la régulation de la division cellulaire. Aussi, la réalisation d'une étude de la toxicité du platine chez *Nitzschia palea* sur une durée de 7 à 14 jours au lieu de 21 ou 28 permettrait de mieux étudier la toxicité de ce métal, ainsi que les modifications de l'expression des gènes associées. Comme suggéré dans le chapitre 5, le raccourcissement des expositions ainsi que l'ajout de prélèvement de diatomées pour analyses transcriptomiques pendant l'exposition permettraient d'obtenir plus d'informations sur les mécanismes de défense éventuellement mis en place par les diatomées. Par ailleurs, l'addition d'analyses protéomiques permettrait de vérifier si la modification de l'expression des gènes déterminée par transcriptomique entraîne bien une modification de la quantité des protéines correspondantes. Cette approche permettrait de tester plus concrètement des hypothèses formulées grâce aux résultats de transcriptomique.

De plus, ces travaux se sont intéressés au rôle des AH, mais une partie non négligeable de la MON est aussi composée d'acides fulviques (AF). Ils sont, semble-t-il, plus petits et plus aliphatiques que les AH, sans pour autant qu'une distinction nette ne soit faite, puisque ce sont en réalité les conditions d'extraction qui différencient ces composés les uns des autres (Thurman, 1985). L'étude de l'influence de la présence de MON et d'AF

pourrait ensuite permettre de déterminer les rôles de ces deux catégories de molécules, ensemble et séparément. Cependant, la méthode d'ultrafiltration ne pourrait pas être utilisée avec les AF, car les molécules sont trop petites et ne seraient pas bien retenues sur la membrane. Une nouvelle méthode de détermination expérimentale de la spéciation du platine devrait donc être développée au préalable.

D'après plusieurs études, dont les travaux de Macoustra *et al.* (2019), il semblerait que l'origine et la composition de la MON soit un facteur d'importance quant à son rôle dans la biodisponibilité et la toxicité des métaux. En effet, la matière organique correspond à une catégorie très vaste. La réalisation d'expériences similaires à celles de ce projet avec des acides humiques d'une tout autre provenance pourrait permettre de généraliser ou non les résultats obtenus. De plus, en cas d'étude de MON obtenue sur le terrain, il faudrait déterminer la nature et notamment la fonctionnalisation chimique de ces composés afin de pouvoir faire des liens entre les propriétés déterminées et des éléments de composition chimique si besoin. À une autre échelle, l'influence de matière en suspension particulaire sur la spéciation du platine, sa biodisponibilité et sa toxicité pourrait compléter cette étude.

Par ailleurs, les AH utilisés au cours de ce projet provenaient de poudres de ces composés extraits par l'organisme : *International humic substances society*, dans des conditions, notamment de pH, très particulières. Dans un souci de représentativité des résultats et de cohérence environnementale, il pourrait être envisagé d'utiliser une solution reconcentrée contenant de la MON (sans extraction) pour réaliser d'autres types d'expériences.

Toutes ces pistes évoquées nécessiteraient de surmonter des problèmes méthodologiques liés à l'utilisation de ces substances complexes, mais permettrait une meilleure compréhension des interactions MON, métaux et organismes vivants dans le milieu naturel.

CHAPITRE 8: REFERENCES

- Achard M, Baudrimont M, Boudou A & Bourdineaud J (2004) Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquatic Toxicology* 67(4):347-357.
- Adair WS & Snell WJ (1990) The *Chlamydomonas reinhardtii* cell wall: structure, biochemistry and molecular biology. *Organization and assembly of plant and animal extracellular matrix*. p 15-84.
- Artelt S, Levsen K, König H & Rosner G (2000) Engine test bench experiments to determine platinum emissions from three-way catalytic converters. *Anthropogenic platinum-group element emissions*, Springer. p 33-44.
- Azaroual M, Romand B, Freyssinet P & Disnar J-R (2001) Solubility of platinum in aqueous solutions at 25 C and pHs 4 to 10 under oxidizing conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(24):4453-4466.
- Barbante C, Veysseyre A, Ferrari C, Van De Velde K, Morel C, Capodaglio G, Cescon P, Scarponi G & Boutron C (2001) Greenland snow evidence of large scale atmospheric contamination for platinum, palladium, and rhodium. *Environmental Science & Technology* 35(5):835-839.
- Bard SM (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48(4):357-389.
- Barefoot R (1997) Determination of platinum at trace levels in environmental and biological materials. *Environmental Science & Technology* 31(2):309-314.
- Barsanti L & Gualtieri P (2006) Algal culturing. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*, CRC Press.
- Bienvenu T, Meunier C, Bousquet S, Chiron S, Richard L, Gautheret-Dejean A, Rouselle J & Feldmann D (1999) Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. *Annales de Biologie Clinique*. p 77-84.
- Biesinger KE & Christensen GM (1972) Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. *Journal of the Fisheries Board of Canada* 29(12):1691-1700.
- Blaby-Haas CE & Merchant SS (2012) The ins and outs of algal metal transport. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823(9):1531-1552.
- Blaby IK, Blaby-Haas CE, Tourasse N, Hom EF, Lopez D, Aksoy M, Grossman A, Umen J, Dutcher S, Porter M, King S, Witman GB, Stanke M, Harris EH, Goodstein D, Grimwood J, Schmutz J, Vallon O, Merchant SS & Prochnik S (2014) The *Chlamydomonas* genome project: a decade on. *Trends in Plant Science* 19(10):672-680.
- 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.

- Bukhari S, Tahir M, Akhter N, Anjum F, Anwar H & Mustafa G (2018) Phylogeny and comparative modeling of phytochelatin synthase from *Chlorella* sp. as an efficient bioagent for detoxification of heavy metals. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 32(5):1191-1197.
- Cabaniss SE & Shuman MS (1987) Synchronous fluorescence spectra of natural waters: tracing sources of dissolved organic matter. *Marine Chemistry* 21(1):37-50.
- Calabrese EJ (2009) Getting the dose-response wrong: why hormesis became marginalized and the threshold model accepted. *Archives of Toxicology* 83(3):227-247.
- Callahan DL, Baker AJ, Kolev SD & Wedd AG (2006) Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11(1):2-12.
- Campbell PG (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. *Metal Speciation and bioavailability*. p 45-102.
- Campbell PG, Errécalde O, Fortin C, Hiriart-Baer VP & Vigneault B (2002) Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133(1-2):189-206.
- Campbell PG & Fortin C (2013) Biotic ligand model. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology* :237-246.
- Campbell PG & Hare L (2009) Metal detoxification in freshwater animals. Roles of metallothioneins. *Metal Ions in Life Sciences* 5:239-277.
- Campbell PG, Twiss MR & Wilkinson KJ (1997) Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54(11):2543-2554.
- Cattaneo A, Couillard Y, Wunsam S & Courcelles M (2004) Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada). *Journal of Paleolimnology* 32(2):163-175.
- Chen W, Smith D & Guéguen C (2013) Influence of water chemistry and dissolved organic matter (DOM) molecular size on copper and mercury binding determined by multiresponse fluorescence quenching. *Chemosphere* 92(4):351-359.
- Cleare M (1977) Immunological studies on platinum complexes and their possible relevance to autocatalysts. (SAE Technical Paper), p 16.
- Cobelo-Garcia A, Turner A, Millward GE & Couceiro F (2007) Behaviour of palladium(II), platinum(IV), and rhodium(III) in artificial and natural waters: influence of reactor surface and geochemistry on metal recovery. *Analytica Chimica Acta* 585(2):202-210.
- Coble PG (1996) Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51(4):325-346.

- Dauta A (1982) Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. Détermination des paramètres de croissance en fonction de la lumière et de la température. *Annales de Limnologie* (18): 217–262.
- de Aberasturi DJ, Pinedo R, de Larramendi IR, de Larramendi JR & Rojo T (2011) Recovery by hydrometallurgical extraction of the platinum-group metals from car catalytic converters. *Minerals Engineering* 24(6):505-513.
- Di Bonito M, Lofts S & Groenenberg JE (2018) Models of Geochemical Speciation: Structure and Applications. *Environmental Geochemistry: Site Characterization, Data Analysis and Case Histories*. p 237-305.
- Diehl DB & Gagnon ZE (2007) Interactions between essential nutrients with platinum group metals in submerged aquatic and emergent plants. *Water, Air, and Soil Pollution* 184(1-4):255-267.
- Dubiella-Jackowska A, Kudłak B, Polkowska Ż & Namieśnik J (2009) Environmental fate of traffic-derived platinum group metals. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 39(4):251-271.
- Ely JC, Neal CR, Kulpa CF, Schneegurt MA, Seidler JA & Jain JC (2001) Implications of platinum-group element accumulation along US roads from catalytic-converter attrition. *Environmental Science & Technology* 35(19):3816-3822.
- Ferreira M, Costa J & Reis-Henriques MA (2014) ABC transporters in fish species: a review. *Frontiers in Physiology* 5:266.
- Fortin C (2000) *Mécanismes de prise en charge et toxicité de l'argent chez une algue verte en relation avec la spéciation chimique*. Doctorat en sciences de l'eau (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique). 179 p
- Fortin C & Campbell PG (2000) Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: influence of chloride. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(11):2769-2778.
- Fortin C, Wang F & Pitre D (2011) Critical Review of Platinum Group Elements (Pd, Pt, Rh) in Aquatic Ecosystem. (INRS, Centre Eau Terre et Environnement), p 39.
- Glaeser H, Coblenz A, Kruczek R, Ruttke I, Ebert-Jung A & Wolf K (1991) Glutathione metabolism and heavy metal detoxification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Genetics* 19(3):207-213.
- Gonzalez P, Baudrimont M, Boudou A & Bourdineaud J-P (2006) Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Biomaterials* 19(3):225-235.
- Hagelüken BC (2012) Recycling the platinum group metals: A European perspective. *Platinum Metals Review* 56(1):29-35.
- Harris EH (2009) *The Chlamydomonas sourcebook: introduction to Chlamydomonas and its laboratory use*. Academic Press. 489 p

- Hecky R, Mopper K, Kilham P & Degens E (1973) The amino acid and sugar composition of diatom cell-walls. *Marine Biology* 19(4):323-331.
- Hermes-Lima M (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: Regulation and adaptation*, Vol 1. p 319-366.
- Huang CP, Fofana M, Chan J, Chang CJ & Howell SB (2014) Copper transporter 2 regulates intracellular copper and sensitivity to cisplatin. *Metallomics* 6(3):654-661.
- Jackson MT, Sampson J & Prichard HM (2007) Platinum and palladium variations through the urban environment: Evidence from 11 sample types from Sheffield, UK. *Science of The Total Environment* 385(1):117-131.
- Jakupec MA, Galanski M & Keppler BK (2003) Tumour-inhibiting platinum complexes--state of the art and future perspectives. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 146:1-54.
- Johnson Matthey P (2013) Interim review. in *Johnson Matthey Public Limited Company*, p 36.
- Kim H, Yim B, Kim J, Kim H & Lee Y-M (2017) Molecular characterization of ABC transporters in marine ciliate, *Euplotes crassus*: Identification and response to cadmium and benzo [a] pyrene. *Marine Pollution Bulletin* 124(2):725-735.
- Kim Tiam S, Feurtet-Mazel A, Delmas F, Mazzella N, Morin S, Daffe G & Gonzalez P (2012) Development of q-PCR approaches to assess water quality: effects of cadmium on gene expression of the diatom *Eolimna minima*. *Water Research* 46(4):934-942.
- Kim Tiam S, Lavoie I, Dooze C, Hamilton PB & Fortin C (2018) Morphological, physiological and molecular responses of *Nitzschia palea* under cadmium stress. *Ecotoxicology* 10.1007/s10646-018-1945-1.
- Knauer K, Behra R & Sigg L (1997) Effects of free Cu^{2+} and Zn^{2+} ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(2):220-229.
- König HP, Hertel RF, Koch W & Rosner G (1992) Determination of platinum emissions from a three-way catalyst-equipped gasoline engine. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics* 26(5):741-745.
- Kümmerer K & Helmers E (1997) Hospital effluents as a source for platinum in the environment. *Science of The Total Environment* 193(3):179-184.
- 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 I, Campeau S, Grenier M & Dillon PJ (2006) A diatom-based index for the biological assessment of eastern Canadian rivers: an application of correspondence analysis (CA). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63(8):1793-1811.

- Lavoie M, Campbell PG & Fortin C (2014) Predicting cadmium accumulation and toxicity in a green alga in the presence of varying essential element concentrations using a biotic ligand model. *Environmental Science & Technology* 48(2):1222-1229.
- Lavoie M, Raven JA, Jones OAH & Qian H (2016) Energy cost of intracellular metal and metalloid detoxification in wild-type eukaryotic phytoplankton. *Metallomics* 8(10):1097-1109.
- Lee JG, Ahner BA & Morel FM (1996) Export of cadmium and phytochelatin by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environmental Science & Technology* 30(6):1814-1821.
- 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.
- Lenz K, Hann S, Koellensperger G, Stefanka Z, Stingeder G, Weissenbacher N, Mahnik SN & Fuerhacker M (2005) Presence of cancerostatic platinum compounds in hospital wastewater and possible elimination by adsorption to activated sludge. *The Science of the Total Environment* 345(1-3):141-152.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25(4):402-408.
- Loos E & Meindl D (1982) Composition of the cell wall of *Chlorella fusca*. *Planta* 156(3):270-273.
- Macoustra G, Holland A, Stauber J & Jolley DF (2019) Effect of various natural dissolved organic carbon on copper lability and toxicity to the tropical freshwater microalga *Chlorella* sp. *Environmental Science & Technology*.
- McIntyre AM & Guéguen C (2013) Binding interactions of algal-derived dissolved organic matter with metal ions. *Chemosphere* 90(2):620-626.
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Marechal-Drouard L, Marshall WF, Qu LH, Nelson DR, Sanderfoot AA, Spalding MH, Kapitonov VV, Ren Q, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas SM, Grimwood J, Schmutz J, Cardol P, Cerutti H, Chanfreau G, Chen CL, Cognat V, Croft MT, Dent R, Dutcher S, Fernandez E, Fukuzawa H, Gonzalez-Ballester D, Gonzalez-Halphen D, Hallmann A, Hanikenne M, Hippler M, Inwood W, Jabbari K, Kalanon M, Kuras R, Lefebvre PA, Lemaire SD, Lobanov AV, Lohr M, Manuell A, Meier I, Mets L, Mittag M, Mittelmeier T, Moroney JV, Moseley J, Napoli C, Nedelcu AM, Niyogi K, Novoselov SV, Paulsen IT, Pazour G, Purton S, Ral JP, Riano-Pachon DM, Riekhof W, Rymarquis L, Schroda M, Stern D, Umen J, Willows R, Wilson N, Zimmer SL, Allmer J, Balk J, Bisova K, Chen CJ, Elias M, Gendler K, Hauser C, Lamb MR, Ledford H, Long JC, Minagawa J, Page MD, Pan J, Pootakham W, Roje S, Rose A, Stahlberg E, Terauchi AM, Yang P, Ball S, Bowler C, Dieckmann CL, Gladyshev VN, Green P, Jorgensen R, Mayfield S, Mueller-Roeber B, Rajamani S, Sayre RT, Brokstein P, Dubchak I, Goodstein D, Hornick L, Huang YW, Jhaveri J, Luo Y, Martinez D, Ngau WC, Otilar B, Poliakov A, Porter A, Szajkowski L, Werner G, Zhou K, Grigoriev IV, Rokhsar DS &

- Grossman AR (2007) The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318(5848):245-250.
- Moisset S, Kim Tiam S, Feurtet-Mazel A, Morin S, Delmas F, Mazzella N & Gonzalez P (2015) Contrasted genetic responses of three freshwater diatoms under realistic exposures of diuron. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Moldovan M, Rauch S, Gómez M, Antonia Palacios M & Morrison GM (2001) Bioaccumulation of palladium, platinum and rhodium from urban particulates and sediments by the freshwater isopod *Asellus aquaticus*. *Water Research* 35(17):4175-4183.
- Morin S, Cordonier A, Lavoie I, Arini A, Blanco S, Duong TT, Tornés E, Bonet B, Corcoll N & Faggiano L (2012) Consistency in diatom response to metal-contaminated environments. *Emerging and priority pollutants in rivers*, Springer. p 117-146.
- Morin S, Duong T, Dabrin A, Coynel A, Herlory O, Baudrimont M, Delmas F, Durrieu G, Schäfer J & Winterton P (2008) Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-West France. *Environmental Pollution* 151(3):532-542.
- Morrisson Ra (2008) Environmental relevance of the platinum-group elements. *Elements* 4(4):259-263.
- Morton O, Puchelt H, Hernández E & Lounejeva E (2001) Traffic-related platinum group elements (PGE) in soils from Mexico City. *Journal of Geochemical Exploration* 72(3):223-227.
- Mostofa KM, Liu C-q, Yoshioka T, Vione D, Zhang Y & Sakugawa H (2013) Fluorescent dissolved organic matter in natural waters. *Photobiogeochemistry of Organic Matter*, Springer. p 429-559.
- Odiyo JO, Bapela HM, Mugwedi R & Chimuka L (2005) Metals in environmental media: A study of trace and platinum group metals in Thohoyandou, South Africa. *Water SA* 31(4):581-588.
- Palacios MA, Gómez MM, Moldovan M, Morrison G, Rauch S, McLeod C, Ma R, Laserna J, Lucena P, Caroli S, Alimonti A, Petrucci F, Bocca B, Schramel P, Lustig S, Zischka M, Wass U, Stenbom B, Luna M, Saenz JC, Santamaría J & Torrens JM (2000) Platinum-group elements: quantification in collected exhaust fumes and studies of catalyst surfaces. *Science of The Total Environment* 257(1):1-15.
- Paolucci C, Ponti J, Fabbri M, Breda D, Sabbioni E & Burastero S (2007) Platinum group elements allergic immune response on dendritic cells. *Allergy and Immunology* 143:1-2.
- Parent L (1991) *Biodisponibilité de l'aluminium dans les eaux douces en relation avec les pluies acides*. Doctorat en sciences de l'eau (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique). 492 p
- Parent L, Twiss MR & Campbell PG (1996) Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga *Chlorella*: a test of the free-ion

- model of trace metal toxicity. *Environmental Science & Technology* 30(5):1713-1720.
- Prokhotskaya VY & Steinberg CE (2007) Differential sensitivity of a coccal green algal and a Cyanobacterial species to dissolved natural organic matter (NOM). *Environmental Science and Pollution Research* 14(1):11-18.
- Pyrzńska K (2000) Viewpoint Monitoring of platinum in the environment. *Journal of Environmental Monitoring* 2(6):99N-103N.
- Racine K (2016) *Étude de la répartition subcellulaire des éléments du groupe platine et des terres rares chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii*. Maîtrise en sciences de l'eau (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique). 91 p
- Rahal (2018) *Toxicité de lanthane chez l'algue verte Chlorella fusca en présence de matière organique naturelle*. Maîtrise en sciences de l'eau). 88 p
- Rauch S & Morrison GM (1999) Platinum uptake by the freshwater isopod *Asellus Aquaticus* in urban rivers. *Science of The Total Environment* 235(1):261-268.
- Rauch S, Paulsson M, Wilewska M, Blanck H & Morrison GM (2004) Short-term toxicity and binding of platinum to freshwater periphyton communities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47(3):290-296.
- Ravindra K, Bencs L & Van Grieken R (2004) Platinum group elements in the environment and their health risk. *Science of The Total Environment* 318(1-3):1-43.
- Reuter J & Perdue E (1977) Importance of heavy metal-organic matter interactions in natural waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 41(2):325-334.
- Rioux (2018) *Spéciation du platine en présence de matière organique naturelle et biodisponibilité pour l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii*. Maîtrise en sciences de l'eau (INRS). 187 p
- Roy G (2009) *Les éléments du groupe platine (Pd, Pt et Rh) dans les eaux de surface et leur toxicité chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii*. Maîtrise en sciences de l'eau (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique). 162 p
- Sánchez-Marín P, Slaveykova VI & Beiras R (2010) Cu and Pb accumulation by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* in the presence of humic acids. *Environmental Chemistry* 7(3):309-317.
- Schäfer J, Hannker D, Eckhardt JD & Stüben D (1998) Uptake of traffic-related heavy metals and platinum group elements (PGE) by plants. *Science of The Total Environment* 215(1):59-67.
- Sears ME (2013) Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification—a review. *The Scientific World Journal* 2013(Article ID 219840):13.
- Shams L, Turner A, Millward GE & Brown MT (2014) Extra- and intra-cellular accumulation of platinum group elements by the marine microalga, *Chlorella stigmatophora*. *Water Research* 50:432-440.

- Shi B, Huang Z, Xiang X, Huang M, Wang W-X & Ke C (2015) Transcriptome analysis of the key role of GAT2 gene in the hyper-accumulation of copper in the oyster *Crassostrea angulata*. *Scientific Reports* 5:17751.
- Shihira I & Krauss RW (1965) *Chlorella: physiology and taxonomy of forty-one isolates*. University of Maryland. 101 p
- Sies H (1986) Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English* 25(12):1058-1071.
- Sorenson CM, Barry MA & Eastman A (1990) Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 82(9):749-755.
- Soyol-Erdene TO, Huh Y, Hong S & Hur SD (2011) A 50-year record of platinum, iridium, and rhodium in Antarctic snow: volcanic and anthropogenic sources. *Environmental Science & Technology* 45(14):5929-5935.
- Sprowl JA, Ness RA & Sparreboom A (2013) Polymorphic transporters and platinum pharmacodynamics. *Drug metabolism and pharmacokinetics* :19–27.
- Stein JE (1973) Culture methods and growth measurements. *Cambridge University Press Handbook of Phycological methods*:448 pp.
- Steinberg CE (2014) NOM as natural xenobiotics. *Advances in the Physicochemical Characterization of Dissolved Organic Matter: Impact on Natural and Engineered Systems*, ACS Publications. p 115-144.
- Sunda WG & Huntsman SA (1998) Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems. *Science of the Total Environment* 219(2-3):165-181.
- Sunda WG & Lewis JAM (1978) Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*1. *Limnology and Oceanography* 23(5):870-876.
- Sures B, Thielen F, Baska F, Messerschmidt J & von Bohlen A (2005) The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* as a sensitive accumulation indicator for the platinum group metals Pt, Pd, and Rh. *Environmental Research* 98(1):83-88.
- Takeda H (1991) Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* 27(2):224-232.
- Tétrault G (2014) *Influence de la physico-chimie du milieu (pH, NH₄⁺, Ca²⁺) sur l'internalisation et la toxicité du platine et du palladium chez l'algue verte: *Chlamydomonas reinhardtii**. Maîtrise en sciences de l'eau (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique). 110 p
- Thurman E (1985) Aquatic humic substances. *Organic geochemistry of natural waters*, Springer. p 273-361.
- Toyo'oka T, Kashiwazaki T & Kato M (2003) On-line screening methods for antioxidants scavenging superoxide anion radical and hydrogen peroxide by liquid

- chromatography with indirect chemiluminescence detection. *Talanta* 60(2-3):467-475.
- Tubbing DM, Admiraal W, Cleven RF, Iqbal M, van de Meent D & Verweij W (1994) The contribution of complexed copper to the metabolic inhibition of algae and bacteria in synthetic media and river water. *Water Research* 28(1):37-44.
- Van Loon JC & Barefoot R (1991) *Determination of the precious metals: selected instrumental methods*. John Wiley & Son Ltd. 276 p
- Vannini C, Domingo G, Marsoni M, Fumagalli A, Terzaghi R, Labra M, De Mattia F, Onelli E & Bracale M (2011) Physiological and molecular effects associated with palladium treatment in *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquatic Toxicology* 102(1-2):104-113.
- Vedel F, Lalanne É, Sabar M, Chétrit P & De Paepe R (1999) The mitochondrial respiratory chain and ATP synthase complexes: composition, structure and mutational studies. *Plant Physiology and Biochemistry* 37(9):629-643.
- Vigneault B, Percot A, Lafleur M & Campbell PGC (2000) Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environmental Science & Technology* 34(18):3907-3913.
- Wedepohl KH (1995) The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59(7):1217-1232.

ANNEXE I : CALCULS DE FLUX D'INTERNALISATION

Pour tester l'hypothèse comme quoi l'étape de diffusion de platine dans la couche de milieu non mélangée proche de *Chlamydomonas reinhardtii* serait limitante, des calculs de flux d'internalisation ont été réalisés. Ainsi, les résultats obtenus pour le platine ont pu être comparés à ceux obtenus pour l'argent par Fortin & Campbell (2000) puisqu'il a été démontré que la vitesse de prise en charge de ce métal chez *Chlamydomonas reinhardtii* se rapprochait de sa vitesse de diffusion dans la couche limite de l'algue, ce qui rendait cette dernière étape limitante.

D'abord, un flux d'internalisation est calculé pour le platine à partir de la concentration intracellulaire maximale du plateau soit $2 \cdot 10^{-7}$ µg/cellule.

$[Pt]_{\max} = 2 \cdot 10^{-7}$ µg/cell = $2 \cdot 10^{-13}$ g/cellule. Or, $M(Pt) = 195$ g/mol, donc $[Pt]_{\max} = (2 \cdot 10^{-13}) / 195 = 1,025 \cdot 10^{-15}$ mol/cellule.

En approximant que *Chlamydomonas reinhardtii* est une sphère de rayon $r = 2 \cdot 10^{-4}$ cm : la surface de contact entre l'algue et son milieu est donc $S = 4 \cdot \pi \cdot r^2 = 4 \cdot \pi \cdot (2 \cdot 10^{-4})^2 = 5 \cdot 10^{-7}$ cm².

Finalement, $[Pt]_{\max} = (1,025 \cdot 10^{-15}) / (5 \cdot 10^{-7}) = 2 \cdot 10^{-9}$ mol/cm²

D'après Lavoie *et al.* (2014), le flux d'internalisation dépend de la concentration intracellulaire et du taux de division μ . Ainsi, $V(Pt)_{\max} = [Pt]_{\max} \cdot \mu$. Dans ces travaux, μ , le taux de division est approximé à 1 division/jour. Donc $\mu = 1 \text{ j}^{-1} = 4,16 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1} = 6,94 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1} = 1,16 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$

Finalement, $V(Pt)_{\max} = 2 \cdot 10^{-9} \cdot 1,16 \cdot 10^{-5} = 2,3 \cdot 10^{-14}$ mol/cm²/s = 0,023 pmol/cm²/s.

Et la valeur calculée pour l'argent dans Fortin 2000 est 0,08 pmol/cm²/s

Sauf que, les concentrations d'exposition sont différentes dans les deux cas. Pour, le platine, au début du plateau : $[Pt] = 60$ µg/L soit environ 310 nM alors $[Ag] = 8$ nM. On

considère que le flux augmente linéairement en fonction de la concentration d'exposition d'après la formule du flux présentée dans Fortin & Campbell (2000). Un calcul d'ajustement permet d'obtenir le flux de platine correspondant à la même concentration d'exposition que pour l'argent.

Finalement, $V(\text{Pt})_{\text{ajusté}} = 0,023 / (310/8) = 0,0006 \text{ pmol/ cm}^2/\text{s}$

Soit un facteur d'environ 130 entre $V(\text{Ag})$ et $V(\text{Pt})$. Les valeurs de flux sont trop éloignées l'une de l'autre et il semblerait donc que la diffusion ne soit pas limitante pour le platine.

Cette hypothèse devrait tout de même être testée expérimentalement avant d'éliminer définitivement cette conjecture.

ANNEXE II : VÉRIFICATIONS MÉTHODOLOGIQUES POUR LES TESTS DE TOXICITÉ SUR LES ALGUES VERTES

1) Influence de la présence d'algue sur la [Pt] d'exposition

En l'absence d'AH, l'ajout d'une condition d'exposition à 10 µg Pt/L sans algues a permis de déterminer la part de platine qui était adsorbé sur le contenant et internalisée par les algues sur la durée de l'exposition. Le suivi de la concentration de platine en solution pour l'exposition de *Chlorella fusca* sans AH a permis de voir que les deux étaient du même ordre de grandeur (Figure 63).

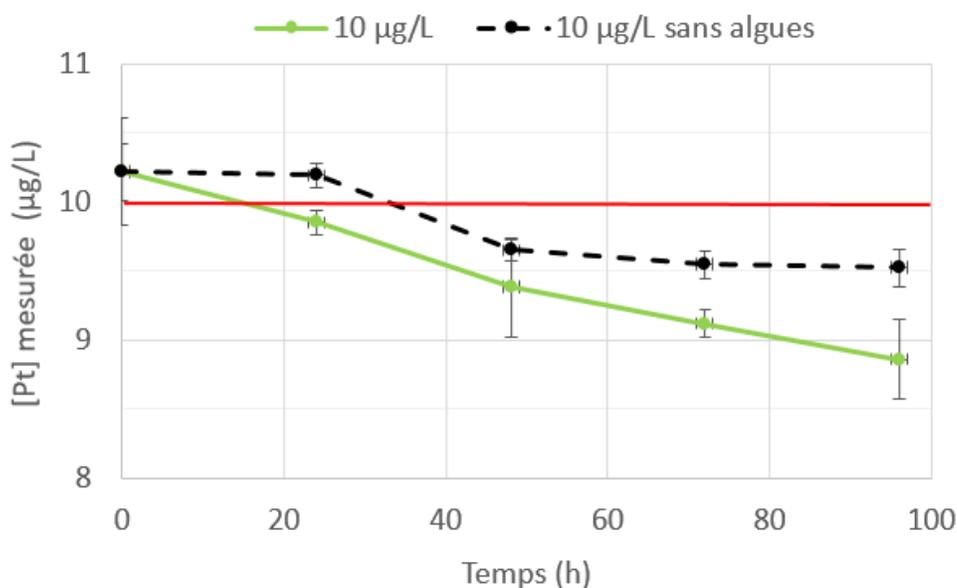


Figure 63: Suivi de la concentration en platine dans des erlenmeyers en polycarbonate lors de l'exposition de *Chlorella fusca* en l'absence d'AH dans le milieu MHSM-1; pH=6 (n=3)

2) Effet de la présence de 10 mg C/L d'AH pour *Chlorella fusca*

Pendant l'expérience d'exposition au platine en présence de 10 mg C/L d'AH, l'ajout de conditions « contrôles » a permis de démontrer que : 1) il n'y avait pas d'effet de la présence d'AH seul sur la croissance de *Chlorella fusca* (Figure 64) et 2) que pour la

même concentration en platine inorganique, il y avait une inhibition de croissance plus importante en présence de 10 mg C/L d'AH que sans ces substances, et ce, pour des algues dans un état physiologique identique (Figure 65).

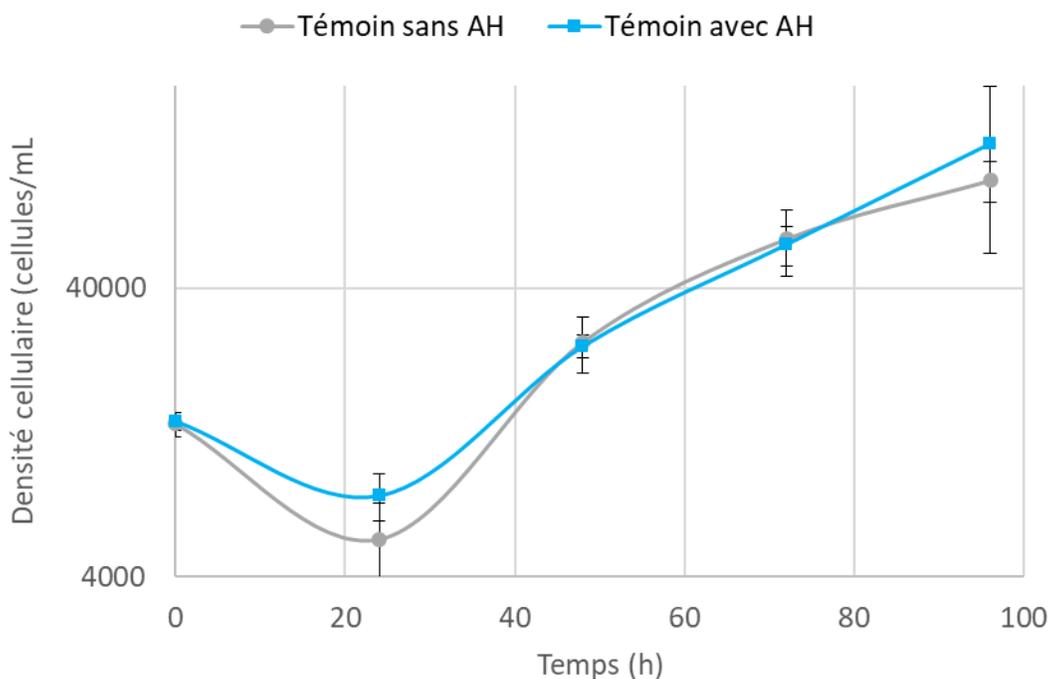


Figure 64: Courbes de croissance témoins de *Chlorella fusca* avec et sans AH dans le milieu MHSM-1, pH=6 (n=3)

Pour la Figure 65, les concentrations réelles mesurées par ICP-MS avec parfois une étape d'ultrafiltration partielle préalable sont respectivement de : 92 ± 8 et 99 ± 3 $\mu\text{g/L}$ de platine inorganique avec et sans AH.

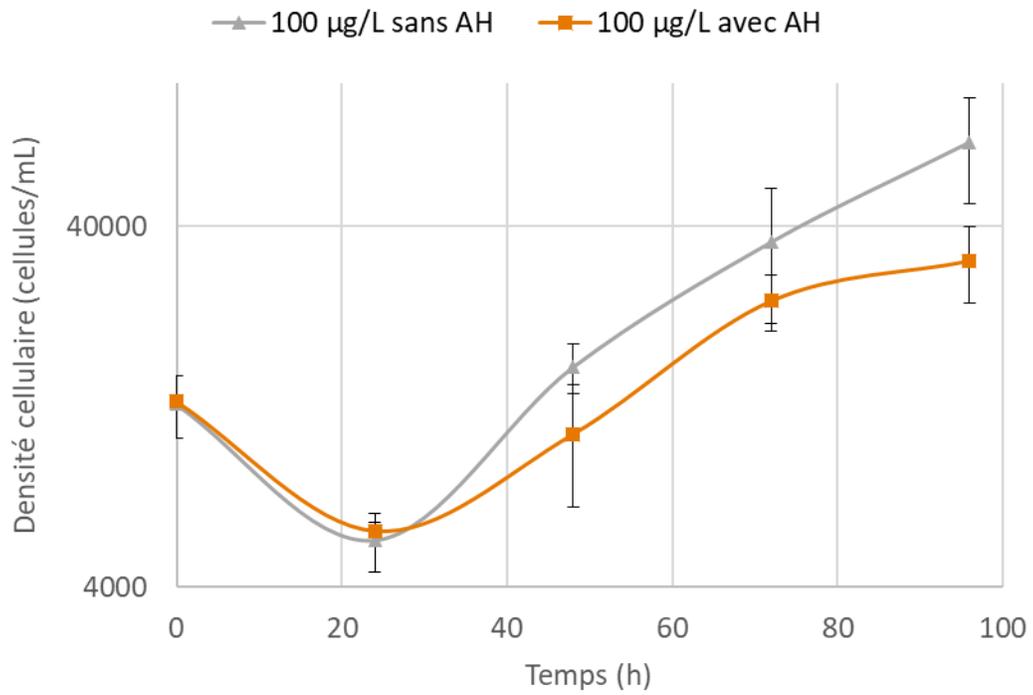


Figure 65: Courbes de croissance de *Chlorella fusca* exposées à 100 µg/L de platine. Comparaison avec et sans AH dans le milieu MHSM-1, pH=6 (n=3)

ANNEXE III : CONCENTRATIONS EN CUIVRE LIBRE

Le Tableau 18 présente les valeurs d'activité du cuivre libre, qui peuvent être assimilées à des valeurs approximées de la concentration en ion cuivre en raison de la faible force ionique du milieu MHSM-1. Ces valeurs ont été calculées avec le logiciel *WHAM7* pour chaque concentration en AH utilisées.

Tableau 18: Activité du cuivre libre dans différentes conditions de concentrations en AH sur la gamme d'exposition au platine dans le milieu MHSM-1 (pH=6)

[Pt] inorganique nominale	Réplication n°	Activité du Cu libre (sans AH)	Activité du Cu libre (10 mg C/L)	Activité du Cu libre 20 mg C/L	Facteur 0 à 10 mg C/L	Facteur 0 à 20 mg C/L
10	1	1,64E-15	6,61E-17	2,70E-17	24,8	60,8
10	2	1,64E-15	6,64E-17	2,41E-17	24,7	68,0
10	3	1,64E-15	6,43E-17	2,17E-17	25,5	75,8
30	1	1,64E-15	5,65E-17	2,47E-17	29,0	66,6
30	2	1,64E-15	6,29E-17	2,41E-17	26,1	68,2
30	3	1,64E-15	6,48E-17	1,89E-17	25,3	86,7
50	1	1,64E-15	5,85E-17	2,17E-17	28,1	75,5
50	2	1,64E-15	5,77E-17	2,26E-17	28,5	72,6
50	3	1,64E-15	6,51E-17	1,97E-17	25,2	83,4
100	1	1,64E-15	6,55E-17	2,59E-17	25,1	63,3
100	2	1,64E-15	6,37E-17	2,72E-17	25,8	60,4
100	3	1,64E-15	6,10E-17	2,27E-17	26,9	72,2
150	1	1,64E-15	6,83E-17	2,88E-17	24,1	57,0
150	2	1,64E-15	6,46E-17	2,90E-17	25,4	56,7
150	3	1,64E-15	6,34E-17	2,27E-17	25,9	72,4

moyenne	26,0	69,3
Ecart-type	1,5	8,9

ANNEXE IV : SPÉCIATION INORGANIQUE DU PLATINE DANS LE MILIEU MHSM-1

Le Tableau 19 représente les concentrations calculées par le logiciel MINEQL pour les principales espèces du platine dans le milieu MHSM-1 sans AH. Ces données montrent que l'espèce $\text{Pt}(\text{OH})_2$ est largement majoritaire en solution.

Tableau 19: Spéciation du platine dans le milieu MHSM-1 ; pH=6 ; logiciel MINEQL

$[\text{Pt}]_{\text{nominale}} (\mu\text{g/L})$	0	10	30	50	100	150
Pt TOT (mol/L)	$1 \cdot 10^{-18}$	$5,13 \cdot 10^{-8}$	$1,548 \cdot 10^{-7}$	$2,563 \cdot 10^{-7}$	$5,126 \cdot 10^{-7}$	$7,689 \cdot 10^{-7}$
Pt^{2+} (mol/L)	$1,23 \cdot 10^{-60}$	$6,311 \cdot 10^{-50}$	$1,904 \cdot 10^{-49}$	$3,153 \cdot 10^{-49}$	$6,306 \cdot 10^{-49}$	$9,46 \cdot 10^{-49}$
$\text{Pt}(\text{OH})$ (mol/L)	$1 \cdot 10^{-29}$	$5,13 \cdot 10^{-19}$	$1,548 \cdot 10^{-18}$	$2,563 \cdot 10^{-18}$	$5,126 \cdot 10^{-18}$	$7,689 \cdot 10^{-18}$
$\text{Pt}(\text{OH})_2$ (mol/L)	$1 \cdot 10^{-18}$	$5,13 \cdot 10^{-8}$	$1,548 \cdot 10^{-7}$	$2,563 \cdot 10^{-7}$	$5,126 \cdot 10^{-7}$	$7,689 \cdot 10^{-7}$
PtCl (mol/L)	$2,269 \cdot 10^{-59}$	$1,164 \cdot 10^{-48}$	$3,512 \cdot 10^{-48}$	$5,815 \cdot 10^{-48}$	$1,163 \cdot 10^{-47}$	$1,745 \cdot 10^{-47}$
PtCl_2 (mol/L)	$1,051 \cdot 10^{-57}$	$5,392 \cdot 10^{-47}$	$1,627 \cdot 10^{-46}$	$2,694 \cdot 10^{-46}$	$5,388 \cdot 10^{-46}$	$8,082 \cdot 10^{-46}$
PtCl_3 (mol/L)	$6,273 \cdot 10^{-60}$	$3,218 \cdot 10^{-49}$	$9,71 \cdot 10^{-49}$	$1,608 \cdot 10^{-49}$	$3,215 \cdot 10^{-48}$	$4,823 \cdot 10^{-48}$
PtCl_4 (mol/L)	$1,031 \cdot 10^{-63}$	$5,289 \cdot 10^{-53}$	$1,596 \cdot 10^{-52}$	$2,643 \cdot 10^{-52}$	$5,245 \cdot 10^{-52}$	$7,928 \cdot 10^{-52}$

Les constantes permettant cette modélisation sont tirées des travaux de (Azaroual *et al.*, 2001) et ont été corrigées par rapport à la force ionique.

ANNEXE V : COURBES DE CROISSANCE DE *NITZSCHIA PALEA*

Les Figure 66 et Figure 67 présentent les courbes de croissances pour les deux expériences d'exposition de *Nitzschia palea* dans le CHU-10 modifié réalisées au laboratoire EPOC. Les deux courbes sont représentées en échelle logarithmique.

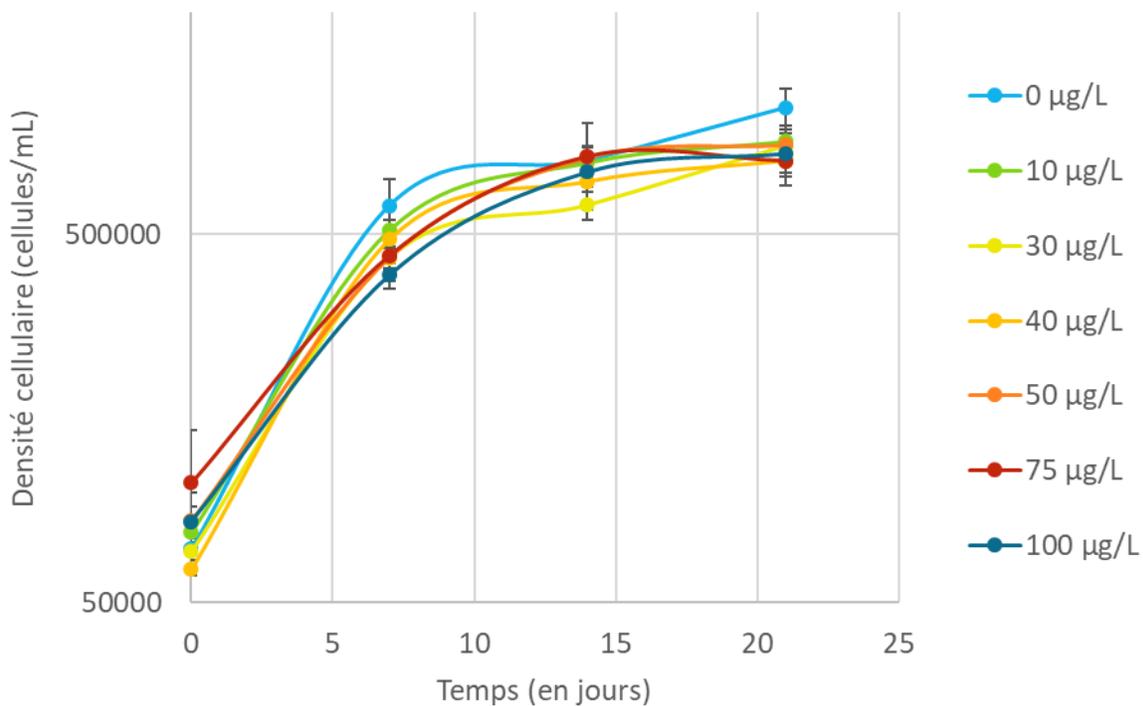


Figure 66: Courbes de croissance de la diatomée *Nitzschia palea* exposée à une gamme de concentration de platine dans le milieu CHU-10 modifié, pH=7 (n=3)

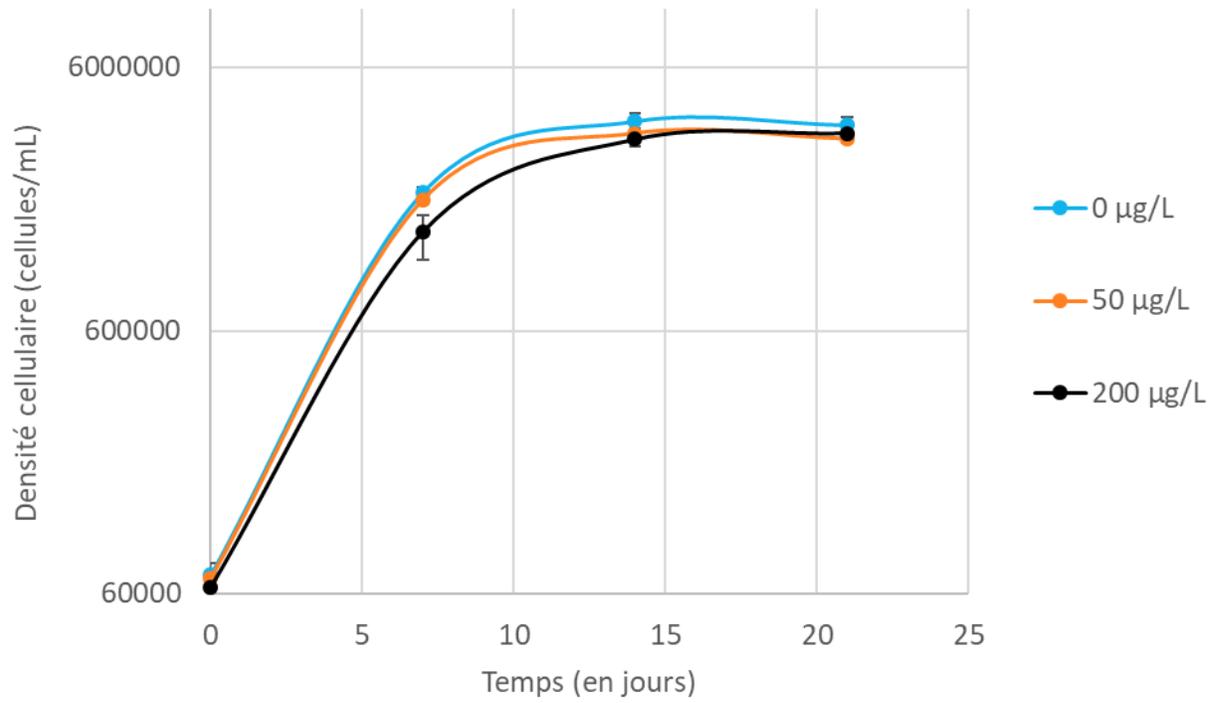


Figure 67: Courbes de croissance de la diatomée *Nitzschia palea* exposée à du platine dans le milieu CHU-10 modifié, pH=7 (n=3)

ANNEXE VI : DÉVELOPPEMENT MÉTHODOLOGIQUE POUR LES ESSAIS SUR LES DIATOMÉES

1) Détermination d'un milieu de culture adéquat

En Europe, le milieu Dauta (Dauta, 1982) est très souvent utilisé pour les cultures de diatomées. Cependant, il ne convenait pas de l'utiliser dans le cadre de cette étude. En effet, il est très riche en nutriments et c'est pourquoi il est si propice au développement des diatomées. Mais ces fortes concentrations induisent un risque de précipitation exacerbé, notamment pour le fer, et donc une incertitude quant à la spéciation du platine qui pourrait s'adsorber sur les oxydes de fer. Pour cette raison, le milieu de culture utilisé était le CHU-10 dont la recette est présentée en Annexe IV (Stein, 1973). Ce milieu a été recommandé par la curatrice de l'Université de Waterloo d'où provenait la culture axénique de *Nitzschia palea*. De plus, la présence de Na₂EDTA complexant les métaux dans ce milieu est un point positif pour la stabilité du fer.

Afin de réaliser des expériences d'exposition de *Nitzschia palea* au platine, il fallait s'assurer de pouvoir étudier la spéciation de ce métal dans le milieu. Le pH est un facteur important qui influe sur ce paramètre et, pour cette raison, il était important que le milieu de culture utilisé soit tamponné. Or ce n'est pas le cas du milieu CHU-10 choisi, qui a donc été modifié pour les besoins du projet. Certains des tampons testés, pourtant couramment utilisés dans les milieux de culture algaux, se sont avérés toxiques pour les diatomées concernées : le MES (acide 2-(N-morpholino)-4-éthanosulfonique) induisait une absence totale de croissance de *Nitzschia palea* à une concentration de 10⁻² mol/L (Figure 68). Cette toxicité surprenante serait intéressante à investiguer dans le cadre d'un projet à venir.

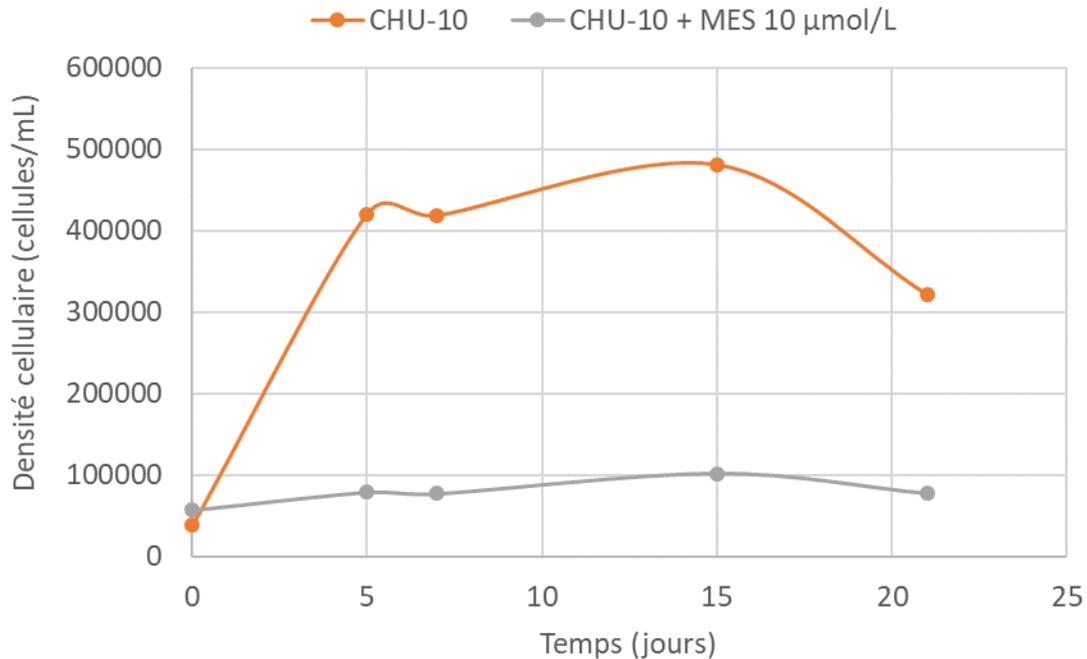


Figure 68: Courbes de croissance de *Nitzschia palea* dans le CHU-10 avec et sans tampon MES ; pH=6,4 (n=1)

Un problème de croissance similaire avait été remarqué avec un autre tampon, le MOPS (acide 3-morpholino-1-propanesulfonique) à la même concentration lors d'expériences préliminaires. Finalement, c'est le tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) qui a été utilisé, à une concentration $4 \cdot 10^{-3}$ mol/L. En effet, ce composé n'induisait pas d'effet sur la croissance de *Nitzschia palea*.

2) Variations de pH dans le CHU-10 modifié

L'ajout du tampon HEPES a permis de limiter les variations de pH liées à la croissance des diatomées dans le milieu CHU-10. Cependant il y avait tout de même une fluctuation maximale de l'ordre de 0,3 unités de pH pour l'exposition de 28 jours réalisée à l'INRS (Figure 69) ainsi que la première exposition de 21 jours au laboratoire EPOC (Tableau 20). Pour la deuxième expérience réalisée à EPOC, une variation plus importante, de l'ordre de 0,65 unités de pH au maximum, a été observée. Cela peut être expliqué par la croissance très importante des diatomées.

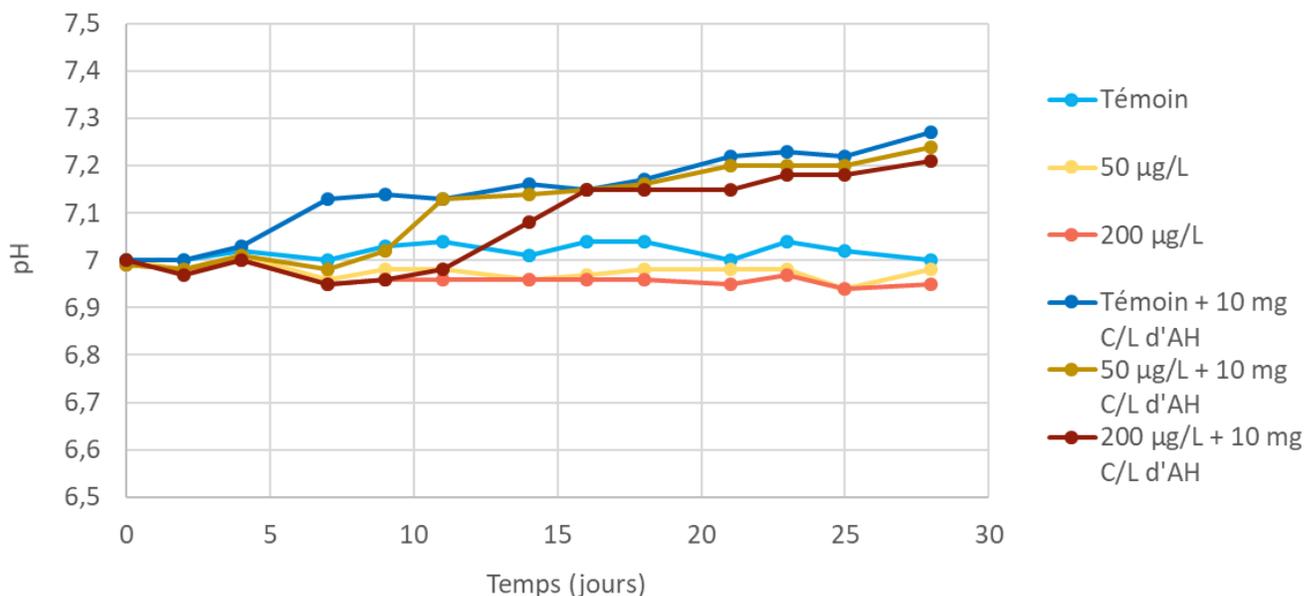


Figure 69: Suivi du pH au cours du temps pour l'expérience d'exposition de *Nitzschia palea* au platine Pendant 28 jours dans le milieu CHU-10 modifié (mesure réalisée dans un seul des erlenmeyers)

Tableau 20: Suivi du pH au cours du temps pour l'expérience d'exposition de *Nitzschia palea* au platine pendant 21 jours dans le milieu CHU-10 modifié (mesure réalisée dans un seul des erlenmeyers)

Réplication n°1	t=0	t=7 jours	t=14 jours	t= 21 jours
Témoin	7,09	7,19	7,33	7,34
10 µg/L	7,09	7,23	7,27	7,30
30 µg/L	7,08	7,24	7,25	7,30
40 µg/L	7,08	7,22	7,22	7,25
50 µg/L	7,09	7,22	7,22	7,28
75 µg/L	7,08	7,25	7,22	7,28
100 µg/L	7,06	7,15	7,2	7,28
Témoin	7,00	7,55	7,49	7,55
50 µg/L	6,94	7,50	7,51	7,58
200 µg/L	7,03	7,52	7,61	7,65

3) Détermination de la méthode de comptage

Afin d'étudier la toxicité du platine chez *Nitzschia palea*, un suivi de la cinétique de croissance de la population algale a été réalisé. Pour cela, il fallait d'abord choisir la meilleure méthode de comptage des cellules. Classiquement, pour ce genre d'étude sur des microalgues comme *Chlorella fusca*, le compteur de particules est utilisé. Mais le cas des diatomées est un peu plus complexe. En effet, ce sont des organismes périphytiques et ont par conséquent tendance à se coller sur les supports et à faire des amas entre elles. La première étape a été de trouver la méthode de comptage la plus adaptée dans ce cas. Plusieurs possibilités ont été explorées : la cellule de Nageotte, le cytomètre en flux et le compteur de particules. Le cytomètre en flux a rapidement été écarté car *Nitzschia palea* peut mesurer jusqu'à 43 μm de long et faire des amas ce qui risquait d'obstruer le « flow cell » et donc d'endommager l'appareil. Finalement, plusieurs expériences ont permis de comparer les comptages réalisés respectivement avec le compteur de particules et la cellule de Nageotte. Pour limiter ce phénomène d'amas avant comptage, des sous-échantillons de cultures algales sont passés 30 minutes dans un bain à ultrasons.

La dilution d'une culture a permis de montrer qu'une réponse linéaire était obtenue avec les deux méthodes qui sont donc toutes deux convenables pour compter les diatomées (Figure 70).

Une deuxième expérience a permis de mettre en lumière le fait que les deux méthodes donnaient des résultats significativement différents (test t) pour le même échantillon sachant que les incertitudes liées au prélèvement ainsi qu'à la méthode en elle-même ont été considérées dans la Figure 71.

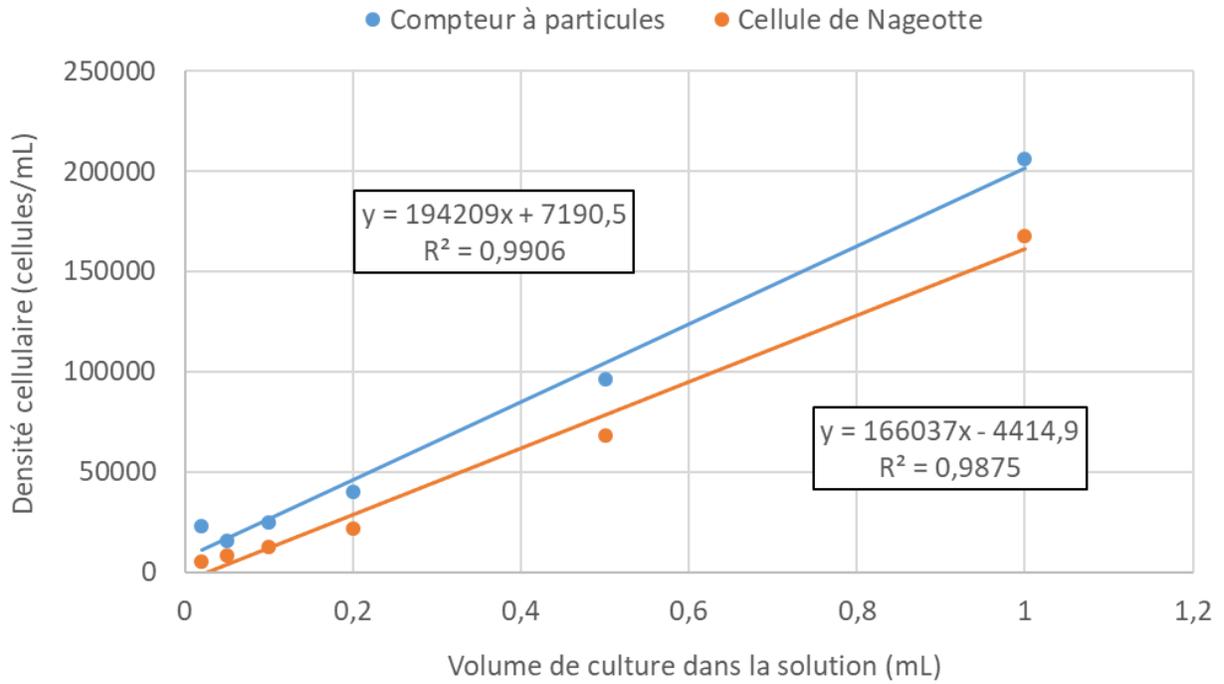


Figure 70: Nombre de cellules en fonction du volume de culture algale pour deux méthodes de comptage chez *Nitzschia palea* dans le milieu CHU-10 (n=1)

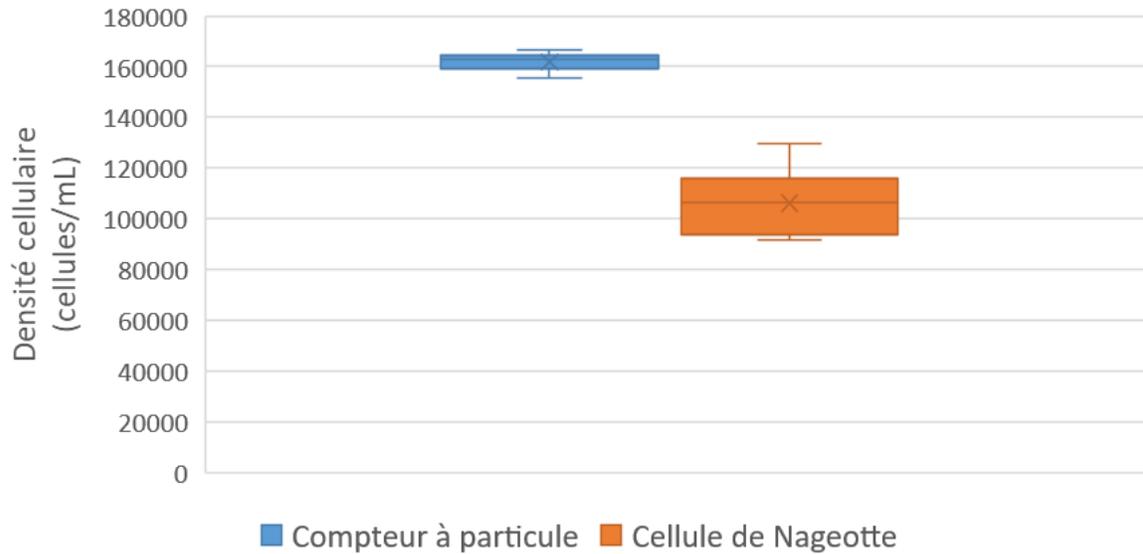


Figure 71: Comparaison du nombre de cellules et incertitudes obtenues par deux méthodes de comptage chez *Nitzschia palea* dans le milieu CHU-10 (n=10)

Cependant, lors d'autres expériences, il a été remarqué que parfois le compteur de particule donnait comme résultats un nombre de cellules plus important que la cellule de Nageotte, mais que c'était parfois le contraire. De plus, il y a une dispersion plus importante des résultats de comptage obtenus avec la cellule de Nageotte et donc une plus grande incertitude. Comme cette méthode étant moins précise, plus longue et plus contraignante, c'est finalement, le compteur de particules qui a été choisi afin de dénombrer les diatomées lors des expériences d'exposition.

En plus de toutes ces raisons, les observations au microscope ont montré qu'après le passage aux ultrasons les diatomées étaient bien séparées. Le comptage automatisé au compteur de particules devrait donc être réaliste d'autant plus que ce type de comptage écarte le biais humain induit par la cellule de Nageotte. Au vu de tous ces arguments, il semblerait que le dénombrement des cellules grâce au compteur de particule soit, de loin, la méthode la plus adaptée.