

**Université du Québec**  
Institut national de la recherche scientifique  
Centre - Eau, Terre et Environnement

**ÉTUDE DES MÉCANISMES DE PRISE EN CHARGE DES MÉTAUX  
TRACES TRIVALENTS CHEZ LES ALGUES UNICELLULAIRES**

par  
**Anne CRÉMAZY**

Thèse présentée pour obtenir le grade de  
Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
**en Sciences de l'eau**

**Jury d'évaluation**

Examineur externe	Prof. Ronny Blust Université d'Anvers
Examineur externe	Prof. Christel Hassler Université de Genève
Examineur interne et président du jury	Prof. Patrice Couture INRS-ETE
Directeur de recherche	Prof. Claude Fortin INRS-ETE
Codirecteur de recherche	Prof. Peter G.C. Campbell INRS-ETE



## RÉSUMÉ

Le modèle du ligand biotique (MLB) est un modèle conceptuel utilisé pour la prédiction de l'accumulation et de la toxicité des métaux traces chez les organismes aquatiques. Il décrit l'interaction du métal M avec un transporteur à la membrane biologique comme une réaction de complexation de surface à l'équilibre. En respectant un certain nombre de prémisses, le MLB prédit que l'internalisation du métal sera proportionnelle à sa concentration libre en solution  $[M^{z+}]$  (à composition ionique et pH constants). L'applicabilité du MLB aux métaux bivalents (p. ex. le Cd, le Cu et le Zn) a été relativement bien étudiée et a été généralement confirmée. En revanche, des difficultés analytiques ont freiné l'étude de l'applicabilité du MLB aux métaux trivalents, tels que l'Al. Notamment, l'absence de radio-isotope d'Al adapté au radio-traçage constitue un obstacle majeur pour l'étude de sa biodisponibilité chez les organismes aquatiques. Pour contourner cette limitation, nous avons substitué l'Al par le Sc, un analogue chimique de l'Al possédant un radio-isotope approprié pour le radio-traçage (Sc-46). L'objectif général de ces travaux était d'étudier les mécanismes de prise en charge de ce métal trivalent chez le phytoplancton. Plus précisément, nous avons évalué la capacité du MLB à prédire la prise en charge du Sc chez le phytoplancton.

Les hypothèses de cette étude étaient que (i) par analogie aux métaux bivalents, le MLB s'applique aux métaux trivalents et donc au Sc; et que (ii) le Sc et l'Al sont suffisamment semblables chimiquement pour que les mécanismes de prise en charge observés chez le Sc puissent être présumés chez l'Al.

Dans un premier temps, pour tester l'hypothèse (i), des flux d'internalisation du Sc ( $J_{int}$ ) ont été déterminés chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* avec des expositions à court terme ( $\leq 1$  h). Ces expositions ont été réalisées à différents pH (pH = [4,50 – 7,90]), concentrations en fluorures ( $[F^-] = [0 - 40 \mu M]$ ) et concentrations en Sc total ( $[Sc_T]$ ). Dans ces différents milieux d'exposition, les concentrations en  $Sc^{3+}$  ( $[Sc^{3+}]$ ) ont été calculées avec des logiciels de calculs thermodynamiques. Ces valeurs de  $[Sc^{3+}]$  ont ensuite été mises en relation avec les valeurs de  $J_{int}$  obtenues, avec l'équation du MLB décrivant les flux d'internalisation. Afin d'évaluer la généralité des résultats obtenus, des expositions au Sc à  $[F^-] = 0$  et  $10 \mu M$  (et à pH = 5,00) ont aussi été réalisées avec l'algue verte unicellulaire *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Dans un deuxième temps, pour tester l'hypothèse (ii), des flux d'internalisation du Sc ont été déterminés chez *C. reinhardtii* à des concentrations variables en Al dissous. Ces expériences avaient pour but d'évaluer la compétition de l'Al pour la liaison au transporteur membranaire emprunté par le Sc. Enfin, la distribution subcellulaire de ces deux métaux a été comparée chez *C. reinhardtii* après une exposition de 72 h ( $[Sc_T]$  ou  $[Al_T] = 4,5 \mu M$ , pH = 7 et  $[F^-] = 380 \mu M$ ).

A chaque condition de pH et de  $[F^-]$  testée, les flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii* suivaient une cinétique de type Michaelis-Menten en fonction de la concentration en Sc (totale ou libre). Ces profils indiquaient que le Sc en solution était en équilibre thermodynamique avec les sites de transport à la surface biologique, une prémisses importante du MLB. Pour une même  $[Sc_T]$ , les calculs de spéciation dans les milieux d'exposition prédisaient une diminution de  $[Sc^{3+}]$  de  $10^7$  fois entre pH 4,50 et 7,90 et de 2000 fois entre 0 et  $40 \mu M$  de  $F^-$ . Cependant, ces baisses très importantes de  $[Sc^{3+}]$  ne se reflétaient pas dans des baisses conséquentes des valeurs de  $J_{int}$  mesurées chez *C. reinhardtii*. Ces observations ont été confirmées avec *P. subcapitata* à  $[F^-]$  variable. La compétition des protons pour le transporteur du Sc (effet considéré par le MLB) ne permettait pas d'expliquer la tendance des valeurs de  $J_{int}$  mesurées dans l'ensemble de la gamme de pH testée. Plusieurs hypothèses pour expliquer ces déviations aux prédictions du

MLB ont été étudiées. L'augmentation du pH d'exposition de 4,50 à 7,90 a été associée à une hausse du potentiel négatif de la paroi cellulaire de *C. reinhardtii*. Cet effet, qui a pour conséquence d'augmenter la concentration en  $\text{Sc}^{3+}$  à la surface cellulaire, était cependant de trop faible amplitude pour expliquer les fortes valeurs de  $J_{\text{int}}$  observées à faibles  $[\text{Sc}^{3+}]$ . Des calculs du flux diffusif maximal de  $\text{Sc}^{3+}$  nous ont indiqué que la diffusion de cette espèce vers la membrane biologique était trop faible pour soutenir les valeurs de  $J_{\text{int}}$  observées à  $\text{pH} > 5,00$  et à  $[\text{F}^-] > 1 \mu\text{M}$ . Cependant, nos données expérimentales suggéraient que l'équilibre entre le métal et les sites de transport était maintenu. Ainsi, la seule hypothèse permettant d'expliquer nos résultats était celle de la participation d'hydroxo- et de fluoro-complexes du Sc au flux transmembranaire de ce métal, via la formation de complexes ternaires aux transporteurs de  $\text{Sc}^{3+}$ . La participation de  $\text{ScOH}^{2+}$ ,  $\text{Sc}(\text{OH})_2^+$  et  $\text{ScF}^{2+}$  permettait notamment de lever la limitation de diffusion sur la prise en charge du Sc chez *C. reinhardtii*.

Les expériences réalisées avec l'Al ont démontré que ce métal n'était pas (principalement) internalisé par le transporteur du Sc chez *C. reinhardtii*. Nous avons supposé que la différence de taille entre les ions  $\text{Sc}^{3+}$  et  $\text{Al}^{3+}$  (sous leurs formes déshydratées et hydratées) pouvait expliquer ce résultat. Cette observation n'exclut pas que les mêmes mécanismes de prise en charge soient impliqués pour le Sc et l'Al chez *C. reinhardtii*. En effet, des études ont déjà évoqué la prise en charge d'hydroxo- et de fluoro-complexes d'Al pour expliquer des résultats déviant des prédictions du MLB. En accord avec l'analogie présumée entre le Sc et l'Al, la distribution subcellulaire de ces deux métaux était très similaire chez *C. reinhardtii*, avec une préférence marquée pour les organelles puis les granules, et une très faible association avec les protéines cytosoliques. Ces similarités ont démontré le potentiel intéressant du Sc à substituer l'Al dans des études visant à comprendre les mécanismes de toxicité de l'Al.

Le principal résultat de cette étude est que le MLB, dans sa formulation actuelle, ne permet pas de décrire les flux d'internalisation du Sc chez deux espèces de phytoplancton. En effet, comme il a déjà été proposé pour l'Al, des hydroxo- et fluoro-complexes du Sc semblent participer à la prise en charge, via la formation de complexes ternaires de surface. Il apparaît donc de plus en plus incertain que notre conception actuelle des interactions entre les métaux et les membranes biologiques soit adéquate pour les métaux trivalents. Il en découle que l'évaluation du risque environnemental posé par un métal trivalent risque d'être erronée si elle se base sur les prédictions du MLB, c'est-à-dire sur la concentration de l'ion métallique libre en solution.

**Mots clés :** Métal trivalent, algues unicellulaires, modèle du ligand biotique, flux d'internalisation, *Chlamydomonas reinhardtii*, scandium, aluminium, distribution subcellulaire

## ABSTRACT

The biotic ligand model (BLM) is a conceptual tool for predicting the accumulation and toxicity of metals in aquatic organisms. It describes the interaction between a metal and a membrane transport site as a surface complexation equilibrium. Provided that all the model's assumptions are respected, the BLM predicts that metal internalization will be proportional to the free metal ion concentration in solution ( $[M^{z+}]$ ) (at constant ionic composition and pH). A relatively large body of experimental work on the bioavailability of divalent metals (e.g. Cd, Cu and Zn) has shown good agreement with BLM predictions. However, numerous analytical difficulties have hindered the conduct of such studies with trivalent metals, such as aluminum. In particular, the absence of an appropriate Al radio-isotope for tracer experiments is a major hurdle for the study of its bioavailability toward aquatic organisms. To overcome this limitation, we substituted Sc for Al, Sc being a chemical analogue with a convenient radio-isotope (Sc-46) for tracer experiments. Our general objective was to study the uptake mechanisms of trivalent metals with phytoplankton. More precisely, we evaluated the ability of the BLM to predict Sc uptake in phytoplankton.

Our hypotheses were that (i) by analogy with divalent metals, the BLM can be applied to trivalent metals and thus to Sc; and that (ii) Sc and Al share enough chemical similarities such that the uptake mechanisms observed with Sc could be similar to those involved in the uptake of Al.

To test hypothesis (i), Sc internalization fluxes ( $J_{\text{int}}$ ) in the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* were determined with short-term exposures ( $\leq 1$  h). These exposures were performed at different pH values (pH = [4.50 – 7.90]), fluoride concentrations ( $[F^-] = [0 - 40 \mu\text{M}]$ ) and total Sc concentrations ( $[Sc_T]$ ). In these media,  $Sc^{3+}$  concentrations ( $[Sc^{3+}]$ ) were calculated with speciation software. These  $[Sc^{3+}]$  values were then related to the obtained  $J_{\text{int}}$  values using the BLM equation describing internalization fluxes. In order to assess the generality of the results, Sc exposures at 0 and 10  $\mu\text{M}$   $F^-$  (and pH 5.00) were performed with an additional unicellular alga, *Pseudokirchneriella subcapitata*.

To test hypothesis (ii), Sc internalization fluxes in *C. reinhardtii* were determined over a range of dissolved Al concentrations. The purpose of these experiments was to evaluate whether Al significantly binds to the membrane transporter involved in Sc uptake. Furthermore, the subcellular distribution of these two metals was compared in *C. reinhardtii* after a 72 h exposure ( $[Sc_T]$  or  $[Al_T] = 4.5 \mu\text{M}$ , pH = 7 and  $[F^-] = 380 \mu\text{M}$ ).

For each pH and  $[F^-]$  tested, Sc internalization fluxes in *C. reinhardtii* followed Michaelis-Menten kinetics with total or free Sc concentrations. These profiles indicated that Sc in solution was in chemical equilibrium with Sc at the transport sites on the biological surface, which respects one important BLM assumption. For a given  $[Sc_T]$ , speciation calculations for the exposure media predicted a decrease of  $[Sc^{3+}]$  by a factor  $10^7$  from pH 4.50 to 7.90 and by a factor 2000 from 0 to 40  $\mu\text{M}$   $F^-$ . However, these important  $[Sc^{3+}]$  reductions were not reflected by comparable decreases in the  $J_{\text{int}}$  values measured in *C. reinhardtii*. These observations were confirmed with *P. subcapitata* over a range of  $[F^-]$ . Proton competition for binding to Sc transport sites (effect considered in the BLM framework) could not explain the observed trend in  $J_{\text{int}}$  values over the entire tested pH range. Multiple hypotheses were examined to explain these deviations from BLM predictions. The increase in exposure pH from 4.50 to 7.90 was associated with an increase of the negative cell wall potential of *C. reinhardtii*. However, this effect, which has the consequence of raising  $[Sc^{3+}]$  in the cell wall, was too weak to explain the high  $J_{\text{int}}$  values observed at low  $[Sc^{3+}]$ . Moreover, calculations of  $Sc^{3+}$  maximum diffusive flux indicated that the

diffusion of this species to the biological membrane was too low to sustain the  $J_{\text{int}}$  values measured at  $\text{pH} > 5.00$  and at  $[\text{F}^-] > 1 \mu\text{M}$ . However, our experimental data suggested that a chemical equilibrium was reached between the metal and its transport sites. Thus, the only hypothesis that could explain our results was the contribution of hydroxo- and fluoro-complexes to Sc uptake, via the formation of ternary complexes with  $\text{Sc}^{3+}$  membrane transport sites. With the contribution of  $\text{ScOH}^{2+}$ ,  $\text{Sc}(\text{OH})_2^+$  and  $\text{ScF}^{2+}$ , Sc uptake by *C. reinhardtii* was no longer diffusion limited.

Uptake competition experiments showed that Al was not (mainly) taken up by *C. reinhardtii* via Sc transporters. We hypothesized that the difference in size between  $\text{Sc}^{3+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  hydrated and dehydrated ions could explain this result. This observation does not rule out the possibility of common transport mechanisms for Sc and Al in *C. reinhardtii*. Indeed, accumulation of Al hydroxo- and fluoro-complexes has already been suggested to explain results deviating from BLM predictions. In agreement with the proposed analogy between Sc and Al, their subcellular distribution in *C. reinhardtii* was very similar, with the strongest preference for the organelles, then the granules fraction, and with a very low association with cytosolic ligands. These similarities showed the interesting potential of Sc as a surrogate for Al in toxicity mechanism studies.

The main conclusion of this study is that the BLM, in its present form, does not provide an adequate modeling framework for Sc internalization fluxes in two phytoplanktonic species. Indeed, as already reported for Al, some Sc hydroxo- and fluoro-complexes seem to participate in the transmembrane flux, via the formation of surface ternary complexes. Thus, it appears more and more doubtful that our present conception of metal interactions with biological membranes is adequate for trivalent metals. It follows that the assessment of the environmental risk posed by these metals is likely to be incorrect if based on BLM predictions, *i.e.* on the free metal ion concentration.

**Keywords:** Trivalent metal, unicellular algae, biotic ligand model, internalization flux, *Chlamydomonas reinhardtii*, scandium, aluminum, subcellular distribution

## AVANT-PROPOS

Cette thèse se divise en deux parties. La première partie est une synthèse de l'ensemble des travaux du doctorat. Elle présente dans un premier temps le contexte, la problématique, l'objectif global et l'approche générale de l'étude. Les objectifs précis de l'étude et les hypothèses de recherche sont ensuite développés. Enfin, les principaux résultats sont présentés et discutés. La deuxième partie de la thèse est composée des trois articles scientifiques cités ci-dessous. Le premier article a été publié dans la revue *Environmental Science and Technology*, le deuxième dans la revue *BioMetals* et le troisième vient d'être accepté dans la revue *Environmental Science and Technology*. À la fin de la thèse, une annexe présente des résultats complémentaires.

Les articles scientifiques composant la deuxième partie de la thèse sont les suivants :

1. Crémazy A, Campbell PGC, Fortin C (2013) The biotic ligand model can successfully predict the uptake of a trivalent ion by a unicellular alga below pH 6.50 but not above: Possible role of hydroxo-species. *Environ. Sci. Technol.* **47**:2408-2415
2. Crémazy A, Levy J, Campbell PGC, Fortin C (2013) Uptake and subcellular partitioning of trivalent metals in a green alga: comparison between Al and Sc. *BioMetals* **20**:989-1001
3. Crémazy A, Campbell PGC, Fortin C (2014) In the presence of fluoride, free Sc<sup>3+</sup> is not a good predictor of Sc bioaccumulation by two unicellular algae: possible role of fluoro-species. *Environ. Sci. Technol.*

La contribution des différents auteurs s'établit comme suit :

**Anne Crémazy** : Conception de l'étude, réalisation des expériences, traitement et interprétation des données, rédaction initiale et finale des manuscrits.

**Claude Fortin** : Élaboration initiale du sujet, financement de la recherche, appui à la conception de l'étude, interprétation des données, révision et soumission des manuscrits.

**Peter G.C. Campbell** : Appui à la conception de l'étude, interprétation des données, révision des manuscrits.

**Jacqueline Levy** (chercheure postdoctorale, 2011-2013) : Participation à la réalisation des expériences de distribution subcellulaire, au traitement et à l'interprétation de ces données et contribution à la rédaction du manuscrit publié dans la revue *BioMetals*.





## REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu mes directeurs Claude Fortin et Peter Campbell, d'abord pour m'avoir transmis le goût de la recherche et l'intérêt pour l'écotoxicologie lors de mon premier passage à l'INRS-ETE en 2008. Leurs conseils avisés, leur rigueur scientifique, mais aussi leur disponibilité et leur bienveillance, ont fait de ce doctorat une expérience des plus positives. Je me sens sincèrement privilégiée d'avoir réalisé ce projet à leurs côtés.

Mes remerciements vont aussi à l'ensemble de la fine équipe de techniciens de l'INRS-ETE, pour l'apprentissage de qualité qu'ils m'ont offert et pour leur aide au laboratoire au cours de ce doctorat. Je pense en particulier à Lise Rancourt, Stéfane Prémont, René Rodrigue, Julie Perrault, Sébastien Duval et Anissa Bensadoune.

Une partie de ce projet a aussi bénéficié de la participation de Jacqui Levy, que je remercie sincèrement pour sa très sympathique collaboration et pour les « bons moments de pipetage » passés ensemble!

J'ai aussi eu la chance d'être entourée par la formidable équipe d'étudiants et de postdoctorants du groupe d'écotoxicologie de l'INRS-ETE. Je pense notamment à Dominic Ponton, Michel Lavoie, Isabelle Lavoie, Séverine Le Faucheur, Jonathan Bernier, Kristin Mueller, Paula Sánchez Marín, Zhongzhi Chen, Sébastien Leguay, Simon Leclair, Camille Guilleux et Karista Hudelson. La très bonne ambiance et l'entraide au sein de ce groupe ont été de précieux atouts durant les longues journées de laboratoire.

Pendant ma vie d'étudiante au Québec, j'ai aussi pu compter sur des amis très proches qui m'ont fait me sentir en famille. J'en profite aussi pour remercier le Québec de m'avoir accueillie (à deux reprises) dans ses « quelques arpents de neige ».

Je ne sais que dire à mes parents, si ce n'est merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir soutenue et encouragée dans mes études, malgré l'éloignement que cela a engendré. Enfin, ma pensée la plus profonde va à mon compagnon de vie, Johan, qui a grandement facilité cette expérience par son soutien et son amour inconditionnels.



# TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	XIII
LISTE DES TABLEAUX .....	XVII
LISTE DES ABBREVIATIONS .....	XIX
PARTIE I : SYNTHÈSE .....	1
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Le modèle du ligand biotique .....	2
1.1.1 Cadre théorique du modèle du ligand biotique .....	2
1.1.2 Applicabilité du MLB : le cas particulier des métaux trivalents .....	7
1.2 Problématique et objectif général .....	11
1.3 Approche générale.....	12
1.3.1 Choix du modèle biologique : le phytoplancton .....	12
1.3.2 Choix du métal trivalent : le scandium .....	13
1.3.3 Choix des variables : le pH et les fluorures .....	17
1.3.4 Choix de la méthodologie : mesure des flux d'internalisation .....	18
2 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES .....	21
2.1 Évaluation de l'applicabilité du MLB au Sc chez le phytoplancton .....	21
2.2 Évaluation de l'analogie entre le Sc et l'Al avec le phytoplancton .....	21
3 MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE.....	23
3.1 Conditions de culture des algues.....	23
3.2 Conditions d'exposition des algues.....	23
3.2.1 Milieux d'exposition à court terme ( $\leq 1$ h) .....	24
3.2.2 Milieux d'exposition à long terme (72 h) .....	26
3.3 Calculs de la spéciation du Sc dans les milieux d'exposition .....	26
3.4 Détermination des flux d'internalisation du Sc chez les algues .....	27
3.4.1 Cinétiques de prise en charge du Sc à court terme ( $\leq 1$ h) .....	27
3.4.2 Traitement des profils de prise en charge du Sc à court terme .....	28
3.5 Mesures de mobilité électrophorétique de <i>C. reinhardtii</i> à différents pH .....	29
3.6 Détermination de la distribution subcellulaire du Sc et de l'Al .....	30
3.7 Traitement statistique des données .....	31
4 RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	33
4.1 Description des profils temporels de Sc bioaccumulé à court terme .....	33
4.2 Tests de l'applicabilité du MLB au Sc à différents pH et $[F^-]$ .....	35

4.2.1	Spéciation du Sc dans les milieux d'exposition à pH et [F <sup>-</sup> ] variables .....	35
4.2.2	Effet du pH sur les flux d'internalisation du Sc chez <i>C. reinhardtii</i> .....	37
4.2.3	Effet des fluorures sur les flux d'internalisation du Sc chez <i>C. reinhardtii</i> et <i>P. subcapitata</i> .....	41
4.2.4	Étude de la déviation aux prédictions du MLB.....	45
4.2.5	Modélisation des flux d'internalisation du Sc chez <i>C. reinhardtii</i> dans l'ensemble de la gamme de pH et de [F <sup>-</sup> ].....	51
4.3	Tests de l'analogie entre l'Al et le Sc .....	53
4.3.1	Compétition entre l'Al et le Sc pour l'internalisation chez <i>C. reinhardtii</i> .....	53
4.3.2	Niveaux d'accumulation de l'Al et du Sc chez <i>C. reinhardtii</i> exposée 72 h .....	56
4.3.3	Destins intra-cellulaires de l'Al et du Sc chez <i>C. reinhardtii</i> exposée 72 h .....	57
4.3.4	Possibles mécanismes de toxicité et de détoxication de l'Al et du Sc chez <i>C. reinhardtii</i> .....	59
5	CONCLUSION .....	63
5.1	Résumé des principaux résultats de l'étude .....	63
5.2	Conclusion générale et perspectives de recherche .....	63
6	RÉFÉRENCES.....	65
PARTIE II : ARTICLES SCIENTIFIQUES .....		75
7	ARTICLE #1 .....	75
8	ARTICLE #2.....	119
9	ARTICLE #3.....	157
10	ANNEXE A .....	199
11	ANNEXE B .....	201

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Schéma conceptuel représentant les interactions métal-organisme (inspiré de Campbell (1995)).  $M^{Z+}$  : ion métallique libre; L : ligand; ML : complexe métallique; R : ligand biotique (site de transport dans le schéma); M-R : complexe métallique de surface. .... 3
- Figure 2 : Représentation graphique de la concentration du complexe de surface M-R en fonction de la concentration en ion métallique libre en solution..... 5
- Figure 3 : Résultats de recherches bibliographiques pour différents métaux sur la base de données SCOPUS..... 8
- Figure 4 : Solubilité maximale d' $Al^{3+}$  et d'ions similaires en milieu aqueux à différents pH, d'après les données de Baes et Mesmer (1976). Figure modifiée de Ganrot (1986). .... 16
- Figure 5 : Protocole de séparation des fractions subcellulaires par centrifugation différentielle. Traduit de Lavoie et al. (2011). .... 31
- Figure 6 : Valeurs de Sc accumulé chez *C. reinhardtii* en fonction du temps (à pH = 5,00 et  $[Sc_T] \sim 5$  nM) mesurées après rinçage des cellules avec une solution d'EDTA (cercles noirs) et après rinçage multiple sans EDTA (cercles blancs). .... 34
- Figure 7 : Distribution des espèces majoritaires du Sc dans les milieux d'exposition à différents pH ( $[F^-] = 0$  M) telle que calculée par Mineql+ (version 4.6). .... 36
- Figure 8 : Flux d'internalisation du Sc ( $J_{int}$ ) chez *C. reinhardtii* de pH 4,50 à 7,90 en fonction a) de la concentration en Sc totale mesurée ( $[Sc_T]$ ) et b) de la concentration en  $Sc^{3+}$  calculée ( $[Sc^{3+}]$ ) dans les milieux d'exposition. Valeurs déterminées par régressions linéaires des mesures de  $Sc_{acc}$  en fonction du temps dans des expositions à court terme. Les droites en tirets correspondent aux estimations des flux de diffusion maximaux de a)  $Sc_T$  et b)  $Sc^{3+}$  de la solution vers la surface biologique (equation 23). .... 38
- Figure 9 : Valeurs des flux d'internalisation du Sc calculées avec l'équation 21 (équation du MLB avec compétition de  $H^+$ ), en fonction des valeurs déterminées expérimentalement entre pH 4,50 et 7,90 chez *C. reinhardtii* (n = 187). Les droites 1:1 (ligne pleine), 1:2 et 2:1 (lignes en tirets) sont tracées pour comparaison. .... 40
- Figure 10 : Flux d'internalisation du Sc ( $J_{int}$ ) chez *C. reinhardtii* à pH 5,00 et de 0 à 40  $\mu M$  de  $F^-$ , en fonction **a)** de la concentration en Sc totale mesurée ( $[Sc_T]$ ) et **b)** de la concentration en  $Sc^{3+}$  calculée ( $[Sc^{3+}]$ ) dans les milieux d'exposition. Valeurs

	déterminées par régressions linéaires des mesures de $Sc_{acc}$ en fonction du temps dans des expositions à court terme. Les droites en tirets correspondent aux estimations des flux de diffusion maximaux de <b>a) <math>Sc_T</math></b> et <b>b) <math>Sc^{3+}</math></b> de la solution vers la surface biologique (équation 23).....	41
Figure 11 :	Valeurs des flux d'internalisation du Sc calculées avec l'équation 20 (équation du MLB sans compétition de $H^+$ ), en fonction de celles déterminées expérimentalement entre 0 et 40 $\mu M$ de $F^-$ et à pH 5,00 chez <i>C. reinhardtii</i> (n = 134). Les droites 1:1 (ligne pleine), 1:2 et 2:1 (lignes en tirets) sont tracées pour comparaison. ....	43
Figure 12 :	Flux d'internalisation du Sc ( $J_{int}$ ) chez <i>P. subcapitata</i> à pH 5,00 et $[F^-] = 0$ et 10 $\mu M$ , en fonction <b>a) de la concentration en Sc totale mesurée (<math>[Sc_T]</math>)</b> et <b>b) de la concentration en <math>Sc^{3+}</math> calculée (<math>[Sc^{3+}]</math>)</b> dans les milieux d'exposition. Valeurs déterminées par régressions linéaires des mesures de $Sc_{acc}$ en fonction du temps dans des expositions à court terme. Les droites en tirets correspondent aux estimations des flux de diffusion maximaux de <b>a) <math>Sc_T</math></b> et <b>b) <math>Sc^{3+}</math></b> de la solution vers la surface biologique (équation 23).....	44
Figure 13 :	Mobilité électrophorétique de cellules de <i>C. reinhardtii</i> exposées de pH 4,50 à 7,90. Moyennes $\pm$ écarts types (n = 3). Axe des ordonnées avec valeurs en ordre inverse. ....	46
Figure 14 :	Scandium adsorbé à la surface de <i>C. reinhardtii</i> ( $Sc_{ads}$ ) exposée de pH 4,50 et 7,90 et rincée à l'EDTA, en fonction a) de la concentration en Sc totale mesurée ( $[Sc_T]$ ) et b) de la concentration en $Sc^{3+}$ calculée ( $[Sc^{3+}]$ ) dans les milieux d'exposition. Valeurs déterminées par régressions linéaires des mesures de $Sc_{acc}$ en fonction du temps dans des expositions à court terme. ....	50
Figure 15 :	Scandium adsorbé à la surface de <i>C. reinhardtii</i> ( $Sc_{ads}$ ) exposée entre 0 et 40 $\mu M$ de $F^-$ et rincée 10 fois sans EDTA, en fonction <b>a) de la concentration en Sc totale mesurée (<math>[Sc_T]</math>)</b> et <b>b) de la concentration en <math>Sc^{3+}</math> calculée (<math>[Sc^{3+}]</math>)</b> dans les milieux d'exposition. Valeurs déterminées par régressions linéaires des mesures de $Sc_{acc}$ en fonction du temps dans des expositions à court terme. ....	50
Figure 16 :	Flux d'internalisation du Sc calculés avec l'équation 24 en fonction des flux d'internalisation déterminés expérimentalement chez <i>C. reinhardtii</i> de pH 4,50 à 7,90 et de $[F^-] = 0$ à 50 $\mu M$ . Les droites 1:1 (ligne pleine), 1:2 et 2:1 (lignes en tirets) sont tracées pour comparaison.....	53

- Figure 17 : Effet de la concentration en Al sur les flux d'internalisation du Sc normalisés (par la concentration en  $Sc^{3+}$ ) chez *C. reinhardtii* à pH 5,00 et  $[Sc_T] = 5,7 \pm 1,1$  nM. Moyennes  $\pm$  écarts types (n = 3). Les moyennes ne partageant pas de lettres communes sont significativement différentes (Tukey,  $p < 0,05$ ). ..... 54
- Figure 18 : Distribution du Sc et de l'Al (en %) dans les fractions subcellulaires de *C. reinhardtii* après une exposition de 72 heures à chacun des deux métaux (4,5  $\mu$ M) à pH 7, **a**) avec et **b**) sans la fraction des débris cellulaires. Moyennes  $\pm$  écarts types (n = 5). Dans chaque fraction, la présence des symboles \* indique une différence significative dans la distribution du Sc et de l'Al (test t,  $p < 0,05$ ). ..... 58





## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques d'Al <sup>3+</sup> et de Sc <sup>3+</sup> .....	16
Tableau 2 : Spéciation du Sc dans des eaux douces et de mer avec 0 ou 3 mg·L <sup>-1</sup> de COD (compositions sans COD données par Turner et al. (1981)). Calculs réalisés avec WHAM VII. ....	18
Tableau 3 : Variables expérimentales des expositions à court terme (n : nombre de tests réalisés). ....	24
Tableau 4 : Distribution des espèces majoritaires du Sc dans les milieux d'exposition à [F <sup>-</sup> ] variable et à pH 5,00. Cette spéciation a été calculée par Visual Minteq pour [Sc <sub>T</sub> ] = 1 nM (Sc:F < 1:20) et était représentative de 90 % des milieux d'exposition. ....	36
Tableau 5 : Résultats des régressions des flux d'internalisation du Sc chez <i>C. reinhardtii</i> avec l'équation 20 (équation du MLB sans compétiteur), à chaque pH expérimental. Les valeurs ne partageant aucune lettre commune sont significativement différentes (test t avec correction FDR, $\alpha = 0,05$ ). ....	38
Tableau 6 : Résultats des régressions des valeurs de J <sub>int</sub> chez <i>C. reinhardtii</i> avec l'équation 20 (équation du MLB sans compétiteur), à chaque [F <sup>-</sup> ] testée. Les valeurs ne partageant aucune lettre commune sont significativement différentes (test t avec correction FDR, $\alpha = 0,05$ ). ....	42



## LISTE DES ABBREVIATIONS

$\alpha$  : valeur seuil du test statistique

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine di-phosphate

AF : acide fulvique

AH : acide humique

ATP : adénosine tri-phosphate

$\beta$  : constante de formation du complexe

$C_i$  : cation i

COD : carbone organique dissous

$\delta$  : épaisseur de la couche de diffusion

D ( $D_{Sc^{3+}}$ ,  $D_{Sc-OH}$ ,  $D_{Sc-F}$ ) : coefficient de diffusion à 25°C

DTPA : acide diéthylènetriaminepentaacétique

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

FDR : false discovery rate

HDP : protéine instable à la chaleur

HEPES : acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique

HSP : protéine stable à la chaleur

ICP-AES : spectromètre par torche à plasma d'émission atomique

$J_{diff}(Sc^{3+})_{max}$  : flux maximal de  $Sc^{3+}$

$J_{int}$  : flux d'internalisation du métal

$J_{int}^*$  :  $J_{int}$  normalisé par la concentration en métal libre

$J_{int, calc}$  :  $J_{int}$  calculé (en opposition à  $J_{int, obs}$ )

$J_{int, obs}$  :  $J_{int}$  observé expérimentalement (en opposition à  $J_{int, calc}$ )

$J_{max}$  : flux maximal d'internalisation du métal

K ( $K_{ML}$ ,  $K_{M-R}$ ,  $K_{ML-R}$ ,  $K_{Sc-Rint}$ , etc.) : constante d'équilibre réactionnelle

$k_{int}$  : constante de vitesse d'internalisation du métal

$K_s$  : constante de solubilité du métal

$k_w$  : constante de vitesse d'échange de  $H_2O$

L : ligand

M : métal

MIL : modèle de l'ion libre

$M^{z+}$  : ion métallique libre

$M_{int}$  : métal internalisé  
MES : acide 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonique  
MHSM-1 : milieu de culture algale  
MLB : modèle du ligand biotique  
MOPS : acide 3-(*N*-morpholino)propanesulfonique  
 $n$  : nombre d'expériences réalisées  
NIST : National Institute of Standard and Technology  
 $p$  : probabilité de rejeter à tort l'hypothèse nulle d'un test statistique  
PC : polycarbonate  
 $r$  : rayon ionique  
 $R$  : site sensible à la surface cellulaire  
 $R^2$  : coefficient de détermination  
Rads : site d'adsorption à la surface cellulaire  
 $r_c$  : rayon de l'algue  
Rint : site d'internalisation à la surface cellulaire  
 $Sc_{acc}$  :  $Sc$  accumulé chez les algues  
 $Sc_{ads}$  :  $Sc$  adsorbé à la surface cellulaire  
 $Sc_{int}$  :  $Sc$  internalisé chez les algues  
 $s_{y,x}$  : erreur type de l'estimation  
WHAM : Windermere humic aqueous model  
 $z$  : charge du métal

# **PARTIE I : SYNTHÈSE**

## **1 INTRODUCTION**

Les métaux sont naturellement présents dans la croûte terrestre et ne peuvent être ni créés ni détruits par les activités anthropiques. Cependant, leur exploitation accrue depuis le début de l'ère industrielle perturbe leurs cycles géochimiques naturels et peut les redistribuer à des niveaux pouvant s'avérer toxiques dans un écosystème (Luoma et Rainbow, 2008; Mahler et al., 2006; Nriagu et Pacyna, 1988). Le rejet de métaux dans l'environnement aquatique constitue notamment une problématique environnementale majeure.

Certains métaux sont essentiels à la vie, comme le cuivre, le zinc, le fer ou le manganèse. Afin de subvenir à leurs besoins métaboliques, les organismes ont développé au cours de l'évolution des mécanismes de prise en charge efficaces de ces métaux essentiels. Cependant, certaines voies d'entrée biologiques ne sont pas suffisamment spécifiques et des métaux non essentiels (p. ex. l'aluminium, le cadmium ou l'argent) peuvent interagir avec celles-ci et mener à l'apparition de dommages biologiques.

Au cours des dernières décennies, chimistes, physiologistes et toxicologistes ont travaillé de concert pour comprendre les mécanismes gouvernant la bioaccumulation et la toxicité des métaux traces chez les organismes aquatiques. Ces travaux ont abouti au développement de concepts clés utilisés à la base de modèles décrivant les interactions métal-organismes. Certains de ces modèles (p. ex. le modèle du ligand biotique) ont été adoptés par certaines agences régulatrices définissant les normes de qualité de l'eau pour la protection de la vie aquatique (p. ex. l'agence américaine de protection de l'environnement (U.S. EPA)). Les études scientifiques en cours, s'intéressant à combler les lacunes qui persistent dans notre compréhension des interactions métal-organisme, visent ultimement à améliorer ces modèles et donc à améliorer l'évaluation du risque environnemental posé par les métaux. Les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent dans cette démarche, avec pour objet les métaux trivalents.

Ce chapitre d'introduction présente dans un premier temps le modèle du ligand biotique (MLB). Dans un second temps, l'applicabilité du MLB au cas particulier des métaux trivalents sera

abordée. Ceci nous amènera à formuler la problématique et l'objectif général de cette thèse. Enfin, l'approche adoptée pour répondre à cet objectif sera détaillée.

## **1.1 Le modèle du ligand biotique**

Les métaux dans leur environnement peuvent être présents sous diverses formes chimiques (ion métallique libre, complexes organiques ou complexes inorganiques). Leur distribution sous ces différentes formes, c'est-à-dire leur spéciation, est notamment fonction de la nature et de la concentration en ligands organiques et inorganiques, du pH et de la température du milieu (Batley et al., 2004). Jusqu'au milieu des années 70, les études sur la biodisponibilité des métaux chez les organismes aquatiques mettaient l'accent sur l'importance des paramètres biologiques tels que le stade de vie, le poids et la nutrition de l'organisme cible. C'est grâce au développement des techniques analytiques et des logiciels de calculs thermodynamiques permettant de déterminer la spéciation métallique, que des études ont alors pu mettre en évidence les liens entre la spéciation des métaux et leur biodisponibilité (Allen et al., 1980; Anderson et al., 1978; Sunda et Guillard, 1976). Ces différents travaux ont mené à l'élaboration du modèle de l'ion libre (MIL), qui stipule que la réponse biologique sollicitée par un métal M dissous est proportionnelle à l'activité de l'ion métallique libre  $M^{z+}$  (aquo-ion ou  $M(H_2O)_x^{z+}$ ) en solution. Le MIL a ensuite connu des améliorations (intégration de l'effet protecteur des autres cations en solution) qui ont conduit au développement du MLB (Campbell, 1995; Di Toro et al., 2001). Le MLB s'est progressivement imposé comme un outil d'évaluation du risque environnemental des métaux traces chez les organismes aquatiques. L'U.S. EPA l'a provisoirement approuvé, l'Union Européenne a adhéré à ses principes et Environnement Canada l'incorpore actuellement dans le développement de nouvelles recommandations sur la qualité de l'eau pour les métaux (Campbell et al., 2006).

### **1.1.1 Cadre théorique du modèle du ligand biotique**

Le MLB définit la biodisponibilité d'un métal (hydrophile) chez un organisme aquatique comme étant sa capacité à interagir avec la membrane plasmique et à déclencher ainsi une réponse biologique. Ainsi, dans ce modèle, la membrane biologique constitue le site primaire d'interaction du métal avec l'organisme.

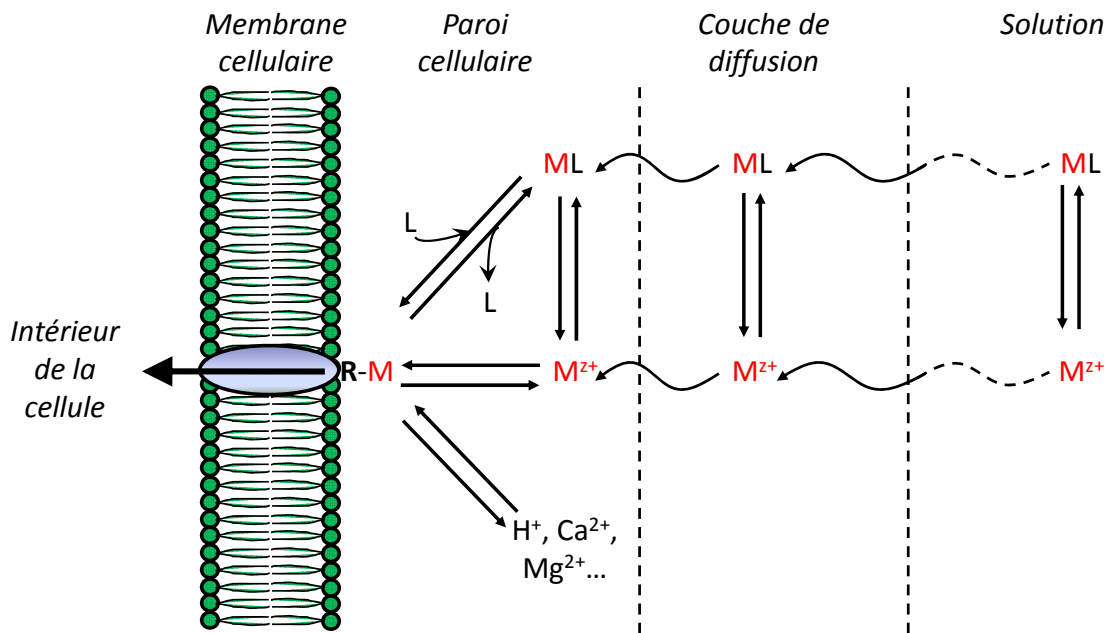


Figure 1 : Schéma conceptuel représentant les interactions métal-organisme (inspiré de Campbell (1995)).  $M^{z+}$  : ion métallique libre; L : ligand; ML : complexe métallique; R : ligand biotique (site de transport dans le schéma); M-R : complexe métallique de surface.

Différentes étapes décomposent l'interaction d'un métal avec la membrane biologique d'un organisme (figure 1). Le métal doit en premier lieu diffuser de la solution externe jusqu'à la membrane plasmique, en traversant souvent une paroi cellulaire (couche protectrice présente notamment chez les algues et composée de glycoprotéines ou de polysaccharides). Pour générer un effet biologique, le métal doit ensuite se lier à un récepteur physiologiquement actif de la membrane biologique (ligand biotique, noté R). Il existe une grande variété de sites de liaison pour le métal à la surface cellulaire, mais ceux-ci peuvent être distingués en sites physiologiquement inertes, pour lesquels la complexation avec le métal n'a pas d'effet, et en sites physiologiquement actifs, où la complexation entraîne une perturbation du métabolisme cellulaire (dans le cas d'un métal non essentiel). Cet effet biologique peut être généré directement par cette liaison (*i.e.* par adsorption sur la surface cellulaire) ou indirectement si le site correspond à un transporteur vers le milieu intra-cellulaire (*i.e.* par internalisation).

Le MLB repose sur l'hypothèse fondamentale que l'interaction entre le métal M et le ligand biotique R peut être représentée par une réaction de complexation classique à l'équilibre thermodynamique (Di Toro et al., 2001). Ainsi, dans le cas où l'ion libre  $M^{z+}$  est présent en solution avec le ligand L (dont les charges sont omises par souci de simplicité), les équilibres suivants sont observés :



Ces équilibres 1 et 2 sont décrits par les équations 3 et 4, avec  $K_{ML}$  et  $K_{M-R}$  les constantes respectives de ces équilibres. Les symboles  $\{ \}$  et  $[ ]$  indiquent respectivement des concentrations à la surface biologique et en solution.

$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M^{z+}] \cdot [L]} \quad \text{éq. (3)}$$

$$\{M-R\} = K_{M-R} \cdot \{R\} \cdot [M^{z+}] \quad \text{éq. (4)}$$

En considérant que **la réponse biologique est proportionnelle à  $\{M-R\}$**  et en supposant que  $\{R\}$  est constante, l'équation 4 indique que **la réponse biologique est proportionnelle à la concentration en ion libre  $[M^{z+}]$** .

Notons que le complexe ML peut aussi interagir avec R selon un mécanisme d'échange de ligands (équilibre 5). Dans ce cas,  $\{M-R\}$  s'exprime selon l'équation 6, avec  $K_{ML-R}$  la constante de l'équilibre 5. La substitution de l'équation 3 dans l'équation 6 donne ensuite l'équation 7, qui est identique à l'équation 4 ( $K_{ML-R} \cdot K_{ML} = K_{M-R}$ ). Ainsi, la liaison de toute espèce du métal avec R (par échange de ligands) conduit à la même relation entre  $\{M-R\}$  et  $[M^{z+}]$  que celle décrite par l'équation 4.



$$\{M-R\} = \frac{K_{ML-R} \cdot \{R\} \cdot [ML]}{[L]} \quad \text{éq. (6)}$$



$$\{M-R\} = K_{ML-R} \cdot K_{ML} \cdot \{R\} \cdot [M^{Z+}] \quad \text{éq. (7)}$$

La concentration maximale du complexe de surface  $\{M-R\}_{\max}$  peut s'exprimer comme la somme des concentrations en sites libres  $\{R\}$  et occupés  $\{M-R\}$  (équation 8). En combinant cette expression avec celle de l'équation 4,  $\{M-R\}$  s'exprime alors selon l'équation 9, formellement identique à l'isotherme d'adsorption de Langmuir et dont la représentation graphique est donnée par la figure 2. Ainsi,  $\{M-R\}$  augmente linéairement avec  $[M^{Z+}]$  lorsque  $K_{M-R} \cdot [M^{Z+}] \ll 1$  (i.e. à faibles  $[M^{Z+}]$ ) puis atteint un plateau correspondant à la capacité maximale de complexation des sites R :  $\{M-R\}_{\max}$ .

$$\{M-R\}_{\max} = \{R\} + \{M-R\} \quad \text{éq. (8)}$$

$$\{M-R\} = \frac{\{M-R\}_{\max} \cdot K_{M-R} \cdot [M^{Z+}]}{1 + K_{M-R} \cdot [M^{Z+}]} \quad \text{éq. (9)}$$

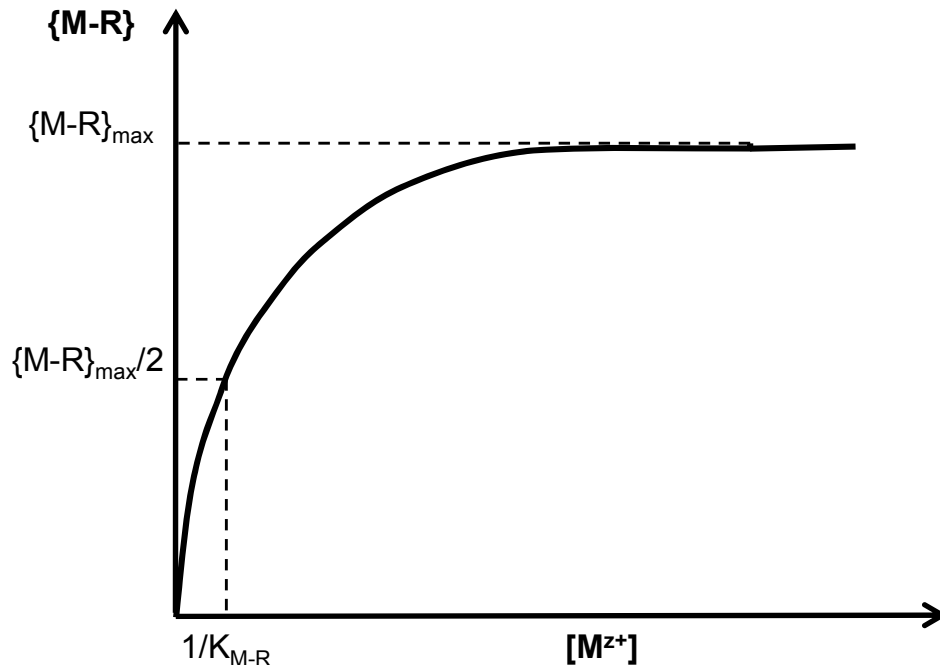


Figure 2 : Représentation graphique de la concentration du complexe de surface M-R en fonction de la concentration en ion métallique libre en solution.

Il est admis qu'un site physiologique n'est que rarement spécifique à une seule espèce chimique. Ainsi, il se peut que d'autres cations présents en solution ( $C_i$  :  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , etc.) entrent en compétition avec le métal pour la liaison au même site sensible de surface (Campbell et al., 2002; Wilkinson et Buffle, 2004; Worms et Wilkinson, 2007). Dans ce cas, la seule connaissance de  $[M^{z+}]$  ne suffit plus à prédire la biodisponibilité du métal. L'effet protecteur des cations compétiteurs est pris en compte par le MLB avec l'équation 10, où  $K_{C_i-R}$  correspond à la constante d'équilibre entre le cation  $C_i$  et le site de surface R.

$$\{M-R\} = \frac{\{M-R\}_{\max} \cdot K_{M-R} \cdot [M^{z+}]}{1 + K_{M-R} \cdot [M^{z+}] + \sum_i K_{C_i-R} \cdot [C_i]} \quad \text{éq. (10)}$$

Dans le cas très fréquent où le site de surface sensible R correspond à un transporteur membranaire (noté R<sub>int</sub>) (Worms et al., 2006), une étape de prise en charge/internalisation irréversible est ajoutée à l'équilibre 4 :



où  $M_{int}$  correspond au métal à l'intérieur de la cellule.

En supposant que la cinétique d'internalisation est de premier ou de pseudo-premier ordre, le flux d'internalisation du métal à travers la membrane biologique ( $J_{int}$ ) s'exprime alors selon l'équation 12 :

$$J_{int} = k_{int} \cdot \{M-R_{int}\} \quad \text{éq. (12)}$$

avec  $k_{int}$  la constante de vitesse d'internalisation.

Si la diffusion du métal de la solution à la membrane biologique est très rapide devant l'étape d'internalisation (*i.e.* l'internalisation n'est pas sous contrôle diffusif) et que la complexation entre le métal et le transporteur R<sub>int</sub> est aussi très rapide devant l'étape d'internalisation (*i.e.* l'internalisation n'est pas sous contrôle cinétique), alors l'équilibre thermodynamique entre le métal et le site de transport R<sub>int</sub> n'est pas affecté par l'internalisation. La prise en charge suit dans ce cas une cinétique de type Michaelis-Menten en fonction de  $[M^{z+}]$ . En prenant en compte

la compétition des autres cations en solution pour la liaison avec le site de transport, le flux d'internalisation, s'exprime selon l'équation 13, analogue à l'équation 10.

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}} \cdot K_{\text{M-Rint}} \cdot [M^{Z+}]}{1 + K_{\text{M-Rint}} \cdot [M^{Z+}] + \sum_i K_{\text{C}_i\text{-Rint}} \cdot [C_i]} \quad \text{éq. (13)}$$

Ainsi, comme pour {M-R},  $J_{\text{int}}$  suit une isotherme de Langmuir en fonction de  $[M^{Z+}]$ , en augmentant linéairement lorsque  $K_{\text{M-Rint}} \cdot [M^{Z+}] \ll 1$  (*i.e.* à faibles  $[M^{Z+}]$ ) et en saturant à  $J_{\text{max}}$ , lorsque tous les sites de transport sont occupés. Cette cinétique d'internalisation de type Michaelis-Menten a été observée expérimentalement pour plusieurs métaux chez diverses espèces de phytoplancton (Anderson et Morel, 1982; Sunda et Huntsman, 1985; 1986).

Nous avons pu voir que le MLB repose sur un certain nombre de prémisses qui doivent être respectées afin que le modèle s'applique (p. ex. la membrane biologique demeure inchangée pendant l'exposition et le métal en solution est à l'équilibre avec les sites de liaison sur la membrane). Un certain nombre d'études se sont intéressées à évaluer la validité des prédictions du MLB sur la bioaccumulation et la toxicité des métaux traces en milieu aquatique. Dans la section suivante, nous présentons celles qui ont eu pour objet les métaux trivalents.

### 1.1.2 Applicabilité du MLB : le cas particulier des métaux trivalents

Peu de données existent sur l'applicabilité du MLB aux métaux traces trivalents tels que l'Al, par rapport aux métaux bivalents (p. ex. le Cd, le Cu, le Ni, le Pb ou le Zn) et ce malgré une toxicité bien documentée dans le cas de l'Al chez les organismes aquatiques (Dobbs et al., 1989; Gensemer et Playle, 1999; Sparling et Lowe, 1996; Wauer et al., 2004) (figure 3). En dehors de leurs importances environnementales respectives, ces différences entre les métaux sont largement dues à des considérations analytiques. Le Cu est le métal dont l'applicabilité au MLB a été la plus testée et ceci est en grande partie dû à l'existence d'une électrode sélective ionique permettant de mesurer les concentrations environnementales de  $\text{Cu}^{2+}$ . L'étude des métaux trivalents fait intervenir un certain nombre de difficultés analytiques. Ces derniers possèdent une spéciation complexe dans les eaux naturelles, avec une forte tendance à s'hydrolyser, à former des espèces polymères et à précipiter (Driscoll et Schecher, 1990). De plus, ils possèdent une forte affinité pour les surfaces biologiques, ce qui rend difficile, voire dans certains cas

impossible, la distinction entre le métal internalisé (intra-cellulaire) et adsorbé à la surface cellulaire (extra-cellulaire) par les méthodes de rinçage classiques (Rengel et Reid, 1997; Taylor et al., 2000b). Ces difficultés techniques ont donc grandement limité le nombre d'études valables sur les métaux trivalents.

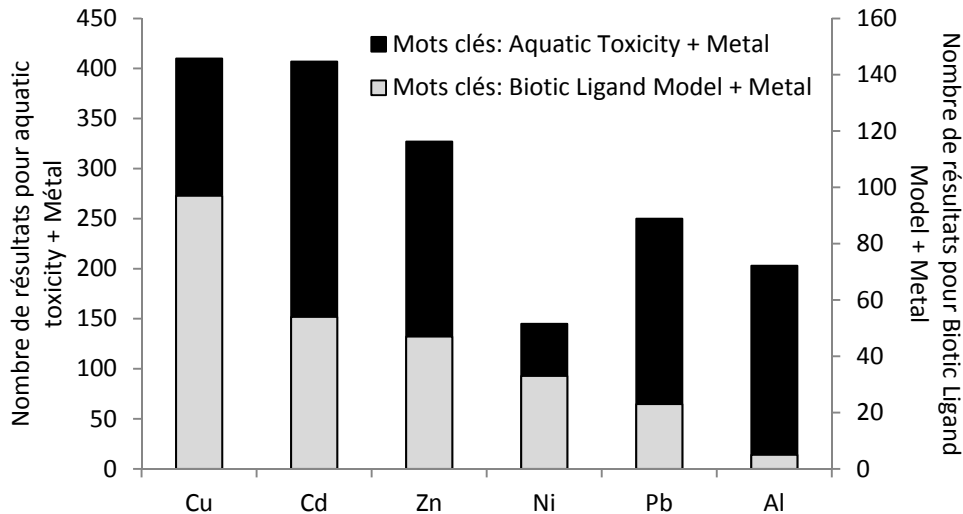


Figure 3 : Résultats de recherches bibliographiques pour différents métaux sur la base de données SCOPUS.

L'aluminium est généralement considéré comme le métal trivalent le plus préoccupant pour la santé des écosystèmes aquatiques (Campbell et Stokes, 1985). Ainsi, la quasi-totalité des tests d'adéquation du MLB avec des métaux trivalents porte sur ce métal. La spéciation de l'Al étant très sensible aux fluctuations de pH (formation d'hydroxo-complexes) et de la concentration en fluorures  $[F^-]$  (formation de fluoro-complexes), beaucoup de ces études portent sur l'effet du pH et de  $[F^-]$  sur la bioaccumulation et/ou la toxicité de l'Al. Les études présentées ci-dessous sont séparées entre les cas où le MLB s'appliquait et les cas où le MLB ne s'appliquait pas.

#### 1.1.2.1 Cas où le MLB semblait s'appliquer

Kinraide et Parker (1989) ont étudié l'effet de l'Al sur la croissance des racines de blé *Triticum aestivum* (en culture hydroponique), dans des expériences à pH = [4,3 – 5,0] et à concentrations en Al total dissous  $[Al_T] = [0 - 3,2 \mu M]$ . Il s'est avéré que, contrairement à la concentration de

l'ensemble des hydroxo-complexes,  $[Al^{3+}]$  était un bon indicateur de l'inhibition de la croissance des racines de *T. aestivum*.

Cameron et al. (1986) ont étudié l'effet de l'Al ( $[Al_T] = [0 - 100 \mu M]$ ) sur la croissance des racines de l'orge *Hordeum vulgare* (en culture hydroponique) à pH 4,5 et en présence de 0 à 10  $\mu M$  de fluorures et de 0 à 3300  $\mu M$  de sulfates. La toxicité de l'Al était corrélée avec  $[Al^{3+}]$  et non avec  $[Al_T]$ .

Gunn et al. (1986) ont étudié l'effet du citrate et de l'acide fulvique sur la toxicité de l'Al à pH 5,5 chez une bactérie marine bioluminescente avec un test Microtox. Ils ont montré qu'en accord avec le MLB, la complexation de l'Al (0 – 1,25 mM) par le citrate (0 – 0,9 mM) (déterminée par la méthode spectrophotométrique du violet-catéchol) avait pour effet de baisser sa toxicité. Dans la même étude, les auteurs ont aussi observé une diminution de la toxicité de l'Al (0 – 200  $\mu g \cdot L^{-1}$ ) attribuable à la complexation par l'acide fulvique (9 et 36  $mg \cdot L^{-1}$ ).

#### 1.1.2.2 Cas où le MLB ne s'appliquait pas

- Inhibition non compétitive des protons

Le MLB ne prend pas en compte les possibles changements au niveau de la membrane biologique pouvant survenir lors de l'exposition. Or, certaines variations physico-chimiques du milieu (p. ex. une variation du pH) peuvent affecter les sites de surface sensibles (p. ex. leurs conformations et donc leurs affinités pour le métal, ou bien leurs nombres à la surface biologique), invalidant ainsi les prédictions du MLB (Deleebeeck et al., 2009; François et al., 2007).

Parent et Campbell (1994) ont étudié l'effet de l'acidification sur la biodisponibilité de l'Al chez l'algue verte unicellulaire *Chlorella pyrenoidosa*. Ils ont observé une baisse de la toxicité de  $Al^{3+}$  (estimée en inhibition de croissance) et des concentrations d'Al intra- et extra-cellulaire en diminuant le pH de 6 à 4,3. Ces baisses ne pouvaient s'expliquer uniquement par une compétition des protons pour les sites de surface de l'Al. Les auteurs ont suggéré que les protons induisaient des changements physiologiques au niveau de la membrane biologique, qui se répercutaient sur la bioaccumulation et donc la toxicité de l'Al. Plus précisément, les auteurs

ont supposé que les protons pouvaient affecter la perméabilité membranaire ainsi que l'affinité des sites de liaison de l'Al sur la membrane plasmique.

- Formation d'un complexe ternaire aux sites de surface sensibles

Le MLB ne prend pas en compte la formation de complexes métalliques ternaires aux sites de surface sensibles. En effet, ce modèle stipule que l'interaction d'un complexe ML avec le site R se produit selon un mécanisme d'échange de ligand pour former M-R (cf. équation 5). Selon ce mécanisme, {M-R} est proportionnelle à  $[M^{z+}]$  (cf. équation 7). Cependant, si l'on considère la formation d'un complexe ternaire L-M-R, sa concentration est alors proportionnelle à [ML] :



$$\{L-M-R\} = K_{L-M-R} \cdot \{R\} \cdot [ML] \quad \text{éq. (15)}$$

avec  $K_{L-M-R}$  correspondant à la constante de formation du complexe de surface ternaire L-M-R.

Dans le cas où le site de surface sensible est un transporteur (R<sub>int</sub>) qui internalise ML (équation 16), le flux d'internalisation du complexe ( $J_{\text{int, ML}}$ ) est fonction de [ML] (équation 17) :



$$J_{\text{int, ML}} = \frac{J_{\text{max}} \cdot K_{L-M-R_{\text{int}}} \cdot [ML]}{1 + K_{L-M-R_{\text{int}}} \cdot [ML]} \quad \text{éq. (17)}$$

Wilkinson et al. (1990) ont montré que le MLB ne permettait pas de prédire adéquatement la toxicité de l'aluminium pour le saumon atlantique (*Salmo salar*, juvéniles) exposé à l'Al (0 – 11  $\mu\text{M}$ ) en présence de différentes concentrations en fluorures (0 – 18  $\mu\text{M}$ ) à un pH entre 4,5 et 4,9. L'augmentation de la concentration en fluorures atténuait la toxicité et l'internalisation de l'Al, mais à des niveaux nettement moindres que ceux prédits par la complexation d' $\text{Al}^{3+}$  avec  $\text{F}^-$ . À noter que l'internalisation de l'Al (en l'absence et en présence de fluorures) était probablement surestimée dans ces expériences, car le rinçage à l'EDTA ne permettait pas d'extraire la totalité de l'Al extra-cellulaire (Wilkinson et Campbell, 1993). Des analyses de régressions multiples ont montré que la meilleure prédiction de la mortalité était obtenue avec les espèces  $\text{Al}^{3+}$  et  $\text{AlF}^{2+}$ . Les auteurs ont suggéré la formation d'un complexe ternaire de surface F-Al-branchie, dont la

concentration était proportionnelle à la concentration en  $\text{AlF}_2^+$  en solution. En intégrant à la fois  $\{\text{Al-branchie}\}$  et  $\{\text{F-Al-branchie}\}$  dans le MLB et en supposant que l'Al exerçait sa toxicité de manière extra-cellulaire, celui-ci prédisait adéquatement la toxicité. Les auteurs de cette étude ont ensuite vérifié expérimentalement l'existence du complexe ternaire F-Al-branchie (Wilkinson et al., 1993).

Dans la même étude que celle décrite dans la section 1.1.2.1, Gunn et al. (1986) ont aussi montré que, contrairement au citrate et à l'acide fulvique, l'augmentation de la concentration en fluorures (de 0 à  $1,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) n'abaissait pas la toxicité de l'Al ( $0 - 500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) à des niveaux attendus par les calculs de spéciation.

Dans une étude de phytoremédiation avec cinq plantes aquatiques (*T. latifolia*, *M. exalbescens*, *P. epihydrus*, *S. angustifolium* et *S. multipedunculatum*), Gallon et al. (2004) ont constaté que des fluoro-complexes d'Al contribuaient à la prise en charge de ce métal. Les expositions de ces plantes ont été réalisées entre pH 4,5 et 7,5 et à des concentrations élevées en Al ( $[\text{Al}_T] = 0 - 400 \text{ }\mu\text{M}$ ) et en fluorures ( $[\text{F}^-] = 0 - 900 \text{ }\mu\text{M}$ ) représentatives d'effluents industriels.

Enfin, Stevens et al. (1997) ont montré que les concentrations en Al et en  $\text{F}^-$  dans des cultures hydroponiques de tomates et d'avoine étaient corrélées avec les concentrations dissoutes en  $\text{AlF}_2^+$  et en  $\text{AlF}_2^+$ , dans des expériences réalisées entre pH 4,2 et 6,7 avec  $[\text{Al}_T] = [0 - 1700 \text{ }\mu\text{M}]$  et  $[\text{F}^-] = [0 - 1500 \text{ }\mu\text{M}]$ .

## 1.2 Problématique et objectif général

Les travaux visant à étudier les liens entre la spéciation de l'Al et sa biodisponibilité chez les organismes ont mené à des résultats contradictoires, mais souvent en inadéquation avec les prédictions du MLB. L'interprétation de ces résultats est limitée par le manque de connaissances sur les mécanismes d'interaction de l'Al avec les membranes biologiques, et notamment sur l'identité des formes chimiques accumulées. Ce manque de données est en grande partie dû aux limitations techniques inhérentes aux métaux trivalents. Notamment, il est extrêmement difficile de réaliser des expériences permettant d'explorer de manière quantitative et conceptuelle les liens entre la spéciation de l'Al et sa biodisponibilité (p. ex. par la modélisation de flux d'internalisation).

Bien que l'Al soit à ce jour quasiment l'unique métal trivalent étudié dans le cadre du MLB, il faut mentionner qu'un nombre croissant d'études écotoxicologiques sont actuellement réalisées sur les terres rares, un groupe d'éléments trivalents comprenant la série des lanthanides mais aussi généralement l'yttrium et le scandium. Du fait de l'essor actuel de leur exploitation, il apparaît désormais nécessaire de se poser la question inédite des mécanismes gouvernant leur biodisponibilité et de leur applicabilité au MLB.

**L'objectif général de ce doctorat est d'explorer les mécanismes de prise en charge des métaux traces trivalents non essentiels chez les organismes aquatiques.**

L'approche générale que nous avons adoptée pour répondre à cet objectif est détaillée dans la section suivante, avec notamment le choix du métal trivalent étudié.

### **1.3 Approche générale**

#### **1.3.1 Choix du modèle biologique : le phytoplancton**

L'étude a été réalisée avec des algues unicellulaires (phytoplancton) car celles-ci regroupent un certain nombre de caractéristiques qui en font des modèles biologiques intéressants pour des études écotoxicologiques. Elles sont faciles à cultiver en laboratoire, ne nécessitent pas de grands volumes de milieux de culture et d'exposition et ont une croissance rapide. Elles sont sensibles à une grande variété de contaminants, notamment à de faibles concentrations en métaux traces, et sont relativement tolérantes à des variations de conditions physico-chimiques de leur milieu (pH, température, force ionique, etc.). Elles sont ubiquistes dans les eaux naturelles et se trouvent à la base de la chaîne trophique, ce qui leur confère une grande importance écologique. De plus, ce sont des organismes simples pour l'élaboration de modèles de prise en charge des métaux. En effet, contrairement aux animaux aquatiques combinant souvent deux voies d'entrée dans leurs organismes (la voie directe opérant via la phase dissoute et la voie trophique opérant via l'ingestion de proies contaminées), la phase dissoute est habituellement l'unique vecteur de prise en charge des métaux chez les algues. Enfin, les algues unicellulaires ont été largement étudiées et les chercheurs disposent donc d'un grand nombre de données génétiques, biologiques et écologiques à leur sujet.



L'algue qui a été le modèle biologique de notre étude est *Chlamydomonas reinhardtii*. Il s'agit d'une algue verte unicellulaire dulcicole, faisant partie de la classe des Chlorophyceae et de l'ordre des Volvocales. Elle est de forme ellipsoïdale, son diamètre varie autour de 5 µm et elle possède deux flagelles lui permettant de se déplacer dans l'eau. Sa paroi cellulaire est principalement composée de glycoprotéines (Macfie et Welbourn, 2000). Malgré le fait qu'elle ne soit pas d'une grande importance écologique, *C. reinhardtii* est largement utilisée pour des études écotoxicologiques en laboratoire car il s'agit d'un des organismes photosynthétiques unicellulaires les plus connus au niveau biochimique et génétique (Harris, 1989; Pröschold et al., 2005). De plus, elle est facilement cultivable dans un milieu de culture relativement simple (sans vitamines ni cofacteurs). Une autre caractéristique intéressante dans le cadre de notre étude est sa tolérance à une large gamme de pH. Bien que la gamme de pH de croissance recommandée pour *C. reinhardtii* soit habituellement entre 6,5 et 8 (Harris, 1989), Lustigman et al. (1995) ont montré que cette algue était capable de croître entre pH 4 et 12, quoique sa croissance était sévèrement diminuée aux extrémités de cette gamme. Enfin, *C. reinhardtii* a été largement utilisée dans notre laboratoire comme organisme modèle (Fortin et Campbell, 2000).

Par souci de généralisation des résultats obtenus avec *C. reinhardtii*, quelques expériences ont été réalisées sur un second modèle biologique : *Pseudokirchneriella subcapitata* (anciennement nommée *Selenastrum capricornutum*). Il s'agit d'une algue verte unicellulaire dulcicole, faisant partie de la classe des Chlorophyceae et de l'ordre des Sphaeropleales. C'est une algue non motile, en forme de croissant, possédant une longueur variant entre 8 et 14 µm et une largeur variant entre 2 et 3 µm. Elle détient une paroi cellulaire rigide en cellulose (Wehr et al., 2002). Cette espèce de phytoplancton se retrouve assez abondamment dans les lacs et les étangs. Comme *C. reinhardtii*, *P. subcapitata* est très largement utilisée dans des études écotoxicologiques, notamment dans le cadre de bioessais (Canter-Lund et Lund, 1995).

### **1.3.2 Choix du métal trivalent : le scandium**

Le critère de pertinence environnementale est habituellement déterminant lors du choix d'un métal d'étude. Dans le cadre d'une étude écotoxicologique sur les métaux trivalents, l'Al s'imposerait alors comme un choix évident. Cependant, le manque de techniques analytiques suffisamment sensibles pour détecter des niveaux d'Al intra-cellulaires faibles est l'une des

principales causes de notre compréhension limitée de la biodisponibilité de ce métal. Notamment, l'absence d'un isotope radioactif d'Al adapté pour le radio-traçage dans des expériences de prise en charge constitue un frein analytique important. Le seul isotope d'Al avec une demi-vie suffisamment élevée, Al-26, est rare, coûteux et a une faible énergie d'émission, ce qui rend son utilisation très limitée (Taylor et al., 2000b). Ainsi, il nous a semblé judicieux d'étudier un analogue chimique de l'Al, d'une importance environnementale moindre, mais possédant un radio-isotope adapté aux études écotoxicologiques (*i.e.* avec une demi-vie suffisamment longue et une bonne accessibilité commerciale).

L'idée de substituer l'Al par un métal analogue n'est pas nouvelle dans des études toxicologiques. Clarkson et Sanderson (1969) ont utilisé le Sc comme analogue de l'Al après avoir constaté que les effets de  $\text{Sc}^{3+}$  et d' $\text{Al}^{3+}$  sur les apex de racines d'oignons *Allium cepa* étaient similaires : ces deux ions bloquaient la division cellulaire après un court délai d'exposition, sans générer d'importantes anomalies chromosomiques durant la mitose. Les auteurs ont fait l'hypothèse que ces métaux devaient probablement agir sur la division cellulaire selon un mécanisme commun. Ils utilisèrent alors l'isotope radioactif Sc-46 comme traceur pour suivre la prise en charge et la distribution du Sc dans les racines, puis faire des suggestions sur les mécanismes de perturbation du cycle mitotique par l'Al. Plus récemment, Walton et al. (2010) ont étudié l'aptitude du Ga à substituer l'Al dans des expériences de traçage chez l'escargot d'eau douce *Lymnea stagnalis*. Ils exposèrent les individus pendant 40 jours à des solutions de Ga ou d'Al (0,0135 mM), sous les mêmes conditions expérimentales. Des différences significatives entre les deux métaux aux niveaux de la vitesse d'accumulation dans les tissus mous et des fractions associées aux protéines thermostables ont amené les auteurs à conclure que le Ga avait un potentiel limité comme analogue de l'Al pour *L. stagnalis*.

Parmi les possibles candidats considérés dans cette étude (le Sc, l'In, le Ga, l'Y et le Cr(III)), le Sc est celui qui présentait le meilleur compromis entre la similarité avec l'Al et la disponibilité d'un radio-isotope adapté aux études écotoxicologiques (Sc-46, demi-vie de 83,8 jours, émissions gamma/beta de hautes énergies) (Ganrot, 1986; Verstraeten et al., 1997).

Le Sc est un élément du groupe des terres rares, comprenant la série des lanthanides et l'yttrium. Il est ubiquiste et présent en quantités relativement faibles dans tous les compartiments terrestres. Dans les eaux douces, les concentrations en Sc sont typiquement de l'ordre de 0,2 nM (Bowen, 1979). Dans les sédiments, les concentrations en Sc sont de l'ordre du  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Horovitz, 1999). Avec une concentration moyenne de  $16 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  dans la croûte continentale (Wedepohl, 1995), il se place au 31<sup>ème</sup> rang d'abondance en pourcentage de poids de la croûte

terrestre, ce qui correspond à la moitié de l'abondance du cuivre, au double de celle du plomb et à dix fois celle de l'étain (Lide, 1991). C'est un élément toutefois très uniformément dispersé car il présente peu de préférences pour des phases minérales spécifiques. Il existe ainsi peu de minerais exploitables et l'utilisation industrielle du Sc est donc relativement faible, avec une production globale actuelle estimée entre 2 et 10 tonnes par an. Cependant, la demande dans le marché des terres rares est en constante augmentation : jusqu'à 2007, celle-ci a augmenté en moyenne de plus de 3 % par an (Tanida et al., 2009). Une des principales applications du Sc est l'amélioration des propriétés thermiques des alliages d'Al (Toropova et al., 1998). Ces alliages Al-Sc sont actuellement utilisés dans certains équipements sportifs (p. ex. les bâtons de baseball et les armatures de vélo) et intéressent de plus en plus l'industrie aéronautique. Le Sc est aussi utilisé dans la fabrication de lampes de hautes intensités produisant une lumière similaire à celle du soleil. Enfin, son isotope Sc-46 est utilisé dans la médecine nucléaire et dans les traitements anti-tumoraux.

Du côté des propriétés chimiques, le Sc est le premier métal de la série de transition et est probablement l'élément de la 4<sup>ème</sup> période le moins étudié (Cotton, 1999). C'est un acide « dur » au sens de Pearson, c'est-à-dire un métal de classe A, peu polarisable, tout comme l'Al. Le Sc forme ainsi les complexes les plus forts avec des ligands durs, c'est-à-dire avec des ions ou des groupes fonctionnels possédant une charge électronique très localisée (p. ex. les groupements hydroxydes, fluorures, sulfates, phosphates et acétates) (Wood et Samson, 2006). Les similarités entre Sc<sup>3+</sup> et Al<sup>3+</sup> sont leur degré d'oxydation +3, leur configuration électronique d'un gaz rare, leur absence d'activité redox dans les systèmes biologiques et leurs affinités très proches pour les hydroxydes et les fluorures (deux ligands importants dans les eaux naturelles) (tableau 1). Les solubilités de leurs hydroxo-complexes ternaires sont aussi très similaires, avec un minimum de solubilité entre pH 6 et 10 pour Sc(OH)<sub>3</sub> et entre pH 6 et 8 pour Al(OH)<sub>3</sub> (figure 4). Le rayon ionique de Sc<sup>3+</sup> est cependant plus élevé que celui d'Al<sup>3+</sup> et sa densité de charge est donc plus faible. Ceci lui confère un pouvoir polarisant moins élevé, mais aussi une cinétique d'échange de ligand fortement supérieure. En effet, la constante de vitesse d'échange d'une molécule d'eau  $k_{-w}$  est de  $4,8 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$  pour l'aquo-ion Sc<sup>3+</sup> et de seulement  $1,3 \text{ s}^{-1}$  pour Al<sup>3+</sup> (Kobayashi et al., 1998). L'ion Sc<sup>3+</sup> a donc une vitesse d'échange de ligand environ  $10^7$  fois supérieure à celle d'Al<sup>3+</sup> et est donc beaucoup plus labile (Ganrot, 1986). Enfin, les récentes avancées sur la chimie du Sc indiquent que l'aquo-ion Sc<sup>3+</sup> n'est pas entouré par six molécules d'eau comme Al<sup>3+</sup> (en coordinence octaédrique) mais plutôt par sept ou huit molécules d'eau (en coordinence prismatique trigonale à trois sommets) (Cotton, 1999; Lindqvist-Reis et al., 2006; Persson, 2010).

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques d'Al<sup>3+</sup> et de Sc<sup>3+</sup>.

Paramètre	Al	Sc
Rayon ionique <sup>a</sup> (indice de coordination), r	0,535 Å (6)	0,745 Å (6); 0,870 Å (8)
Densité de charge, z/r (z=3)	5,56 Å <sup>-1</sup>	4,03 Å <sup>-1</sup> (6); 3,45 Å <sup>-1</sup> (8)
Pouvoir polarisant, z <sup>2</sup> /r (z=3)	16,67 Å <sup>-1</sup>	12,08 Å <sup>-1</sup> (6); 10,34 Å <sup>-1</sup> (8)
Configuration électronique de M <sup>3+</sup>	Gaz rare	Gaz rare
Vitesse d'échange de H <sub>2</sub> O <sup>b</sup> , k <sub>w</sub>	1,3 s <sup>-1</sup>	4,8 x 10 <sup>7</sup> s <sup>-1</sup>
Log β M(OH) <sub>x</sub> <sup>(3-x)+</sup> (x=1,...,4) <sup>c</sup>	9,003; 17,906; 25,209; 33,312	9,703; 18,306; 25,909; 30,012
Log β M(F) <sub>x</sub> <sup>(3-x)+</sup> (x=1,...,4) <sup>c</sup>	7,000; 12,600; 16,700; 19,400	7,080; 12,900; 17,400; 20,220
Log K <sub>s</sub> M(OH) <sub>3</sub> <sup>d</sup>	-9,350 (gibbsite microcristalline)	-9,291

<sup>a</sup> Les rayons ioniques sont issus de Shannon (1976)

<sup>b</sup> La vitesse d'échange de H<sub>2</sub>O de l'Al provient de Martin (1992) et celle du Sc provient de Kobayashi et al. (1998)

<sup>c</sup> β, constante de formation du métal M à force ionique nulle et à 25°C, sélection critique réalisée par Martell et Smith (2004)

<sup>d</sup> K<sub>s</sub>, constante de solubilité du métal M à force ionique nulle et à 25°C, sélection critique réalisée par Nordstrom et al. (1990) pour l'Al et par Martell et Smith (2004) pour le Sc

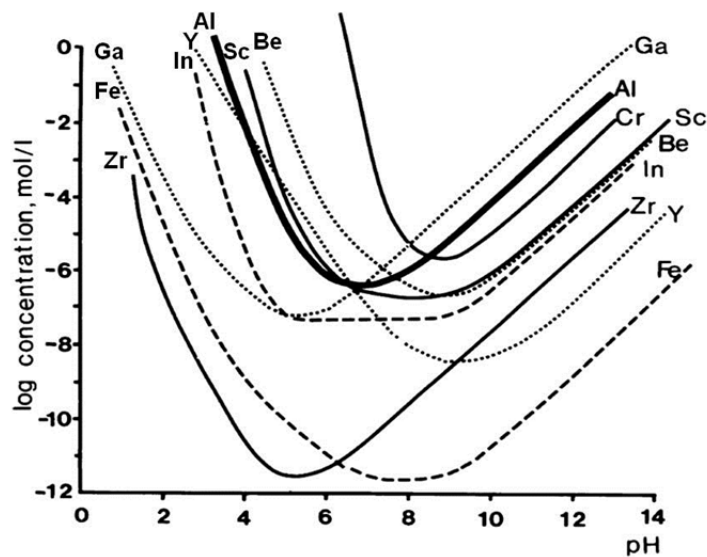


Figure 4 : Solubilité maximale d'Al<sup>3+</sup> et d'ions similaires en milieu aqueux à différents pH, d'après les données de Baes et Mesmer (1976). Figure modifiée de Ganrot (1986).

### 1.3.3 Choix des variables : le pH et les fluorures

De manière générale, les études visant à tester l'applicabilité du MLB pour un métal, chez un organisme donné, déterminent la biodisponibilité de ce métal en faisant varier sa spéciation en solution, ou plus précisément sa concentration en ion libre.

La spéciation du Sc dissous dans les eaux naturelles est très similaire à celle de l'Al, en raison de leurs constantes de formation proches. Elle est aussi d'une manière générale représentative de la spéciation d'un grand nombre de métaux trivalents dans l'environnement aquatique (Serrano et al., 2000; Wood et Samson, 2006). La spéciation du Sc dissous dans les eaux naturelles est dominée par les complexes avec la matière organique dissoute (MOD), les hydroxo-complexes ( $\text{Sc}(\text{OH})^{2+}$ ,  $\text{Sc}(\text{OH})_2^+$ ,  $\text{Sc}(\text{OH})_3$  et  $\text{Sc}(\text{OH})_4^-$ ), les fluoro-complexes ( $\text{ScF}^{2+}$ ,  $\text{ScF}_2^+$  et  $\text{ScF}_3$ ) et les sulfato-complexes ( $\text{ScSO}_4^+$  et  $\text{Sc}(\text{SO}_4)_2^-$ ) (Tanizaki et al., 1992; Turner et al., 1981). La distribution relative de ces différentes formes dépend notamment de la concentration des différents ligands et du pH.

Le tableau 2 présente la spéciation des espèces dissoutes du Sc dans des eaux douces de pH 4,5, 6,0 et 9,0 et dans une eau salée de pH 8,2, modélisée avec le logiciel WHAM (Windermere Humic Aqueous Model VII) (Tipping et al., 2011), à partir des compositions sans MOD de Turner et al. (1981). Les concentrations en  $\text{F}^-$  étaient de 5  $\mu\text{M}$  dans les eaux douces et de 30  $\mu\text{M}$  dans l'eau de mer. Les modélisations avec ou sans MOD étaient basées sur des concentrations en carbone organique dissous (COD) de 0 et 3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , cette dernière concentration étant représentative d'un lac mésotrophe (Thurman, 1985). Nous avons fait les approximations que le ratio MOD:COD était de 2:1, que 60% de la MOD était composée d'acide humique (AH) et d'acide fulvique (AF), puis que le ratio AH:AF était de 1:3 (Perdue et Ritchie, 2003). Cette modélisation montre la très faible proportion en  $\text{Sc}^{3+}$  dans les eaux naturelles ainsi que la dominance des complexes Sc-F et Sc-OH lorsque la MOD est absente, et celle des complexes Sc-AH et Sc-AF en présence de MOD. Précisons que la proportion des hydroxo- et des fluoro-complexes de Sc par rapport à l'ion libre reste identique en présence et en absence de MOD, et demeure donc toujours très élevée. Par exemple, dans les eaux douces de pH 4,5 à 9,0 de composition donnée par Turner et al. (1981), les complexes Sc-F et Sc-OH sont de  $10^{2,3}$  à  $10^{10,2}$  fois plus abondants que  $\text{Sc}^{3+}$ . Ces espèces sont donc tout à fait pertinentes pour l'étude de la biodisponibilité de métaux trivalents tels que le Sc et l'Al. Si en règle générale, le MLB semble s'appliquer à l'Al en présence de matière organique, quelques expériences en présence de fluorures ou à pH variable ont montré des cas déviants des prédictions du modèle. Nous avons

donc décidé de tester l'applicabilité du MLB au Sc dans des conditions variables de pH et de concentration en fluorures.

Tableau 2 : Spéciation du Sc dans des eaux douces et de mer avec 0 ou 3 mg·L<sup>-1</sup> de COD (compositions sans COD données par Turner et al. (1981)). Calculs réalisés avec WHAM VII.

Eau	pH	COD (mg/L)	% Sc <sup>3+</sup>	% Sc-OH	% Sc-F	% Sc-Cl	% Sc-SO <sub>4</sub>	% Sc-CO <sub>3</sub>	% Sc-AH	% Sc-AF	Sc <sup>3+</sup> /Sc <sub>total</sub>
Mer	8,2	0	<1	100	<1	<1	<1	<1	0	0	10 <sup>-6,96</sup>
Douce	4,5	0	<1	1	98	<1	<1	<1	0	0	10 <sup>-2,28</sup>
Douce	6,0	0	<1	37	62	<1	<1	<1	0	0	10 <sup>-2,51</sup>
Douce	9,0	0	<1	100	<1	<1	<1	<1	0	0	10 <sup>-10,20</sup>
Mer	8,2	3	<1	5	<1	<1	<1	<1	24	72	10 <sup>-8,28</sup>
Douce	4,5	3	<1	<1	<1	<1	<1	<1	38	62	10 <sup>-6,29</sup>
Douce	6,0	3	<1	<1	<1	<1	<1	<1	33	67	10 <sup>-8,62</sup>
Douce	9,0	3	<1	7	<1	<1	<1	<1	26	67	10 <sup>-11,34</sup>

### 1.3.4 Choix de la méthodologie : mesure des flux d'internalisation

L'applicabilité du MLB a été testée pour un grand nombre de métaux et d'organismes aquatiques de tout niveau trophique, par des études mettant le plus souvent en relation la toxicité, l'accumulation totale (intra- et extra-cellulaire) ou le flux d'internalisation chez les organismes en fonction de la concentration en ion métallique libre en solution.

Il est difficile de tester quantitativement le modèle avec des données de toxicité, car la relation entre la réponse biologique et la concentration du métal en solution est souvent de type sigmoïdale (Hassler et Wilkinson, 2003). Les données de bioaccumulation totale (métal intra- et extra-cellulaire) peuvent quant à elles souvent être reliées à [M<sup>Z+</sup>] avec l'isotherme de Langmuir (Hollis et al., 2000; Playle, 1998). Cependant, ces données décrivent l'interaction du métal avec l'ensemble des ligands biologiques pour lesquels il a une affinité significative, incluant donc les sites physiologiquement inertes. Le nombre de sites inertes étant généralement au moins d'un ordre de magnitude plus élevé que celui des sites actifs (Slaveykova et Wilkinson, 2002; Wilkinson et Campbell, 1993), les données de bioaccumulation totale ne sont généralement pas

directement liées à la réponse biologique. L'internalisation est en revanche directement associée à la liaison du métal avec un site actif de la membrane biologique (correspondant à un transporteur, Rint) et cette association est généralement considérée comme un pré-requis important à l'apparition d'effets biologiques. La modélisation des flux d'internalisation du métal chez le phytoplancton avec l'équation du MLB (cf. équation 13) représente donc une méthode simple et rigoureuse pour tester quantitativement le MLB (Slaveykova et Wilkinson, 2005). Alors que de telles modélisations n'ont jamais pu être réalisées avec l'Al et le phytoplancton, elles étaient envisageables pour le Sc grâce à l'utilisation du radio-isotope Sc-46. Nous avons donc déterminé les flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii* et *P. subcapitata* sous différentes conditions de pH et de [F], puis vérifié si ces flux étaient bien modélisés par l'équation du MLB. Il est cependant important de préciser que dans le cas des métaux trivalents, la toxicité peut aussi être initiée au niveau de la surface biologique (paroi cellulaire et membrane plasmique), c'est-à-dire sans internalisation préalable. En effet, ce mode de toxicité extra-cellulaire est considéré comme important pour l'Al chez les poissons, où des perturbations des fonctions respiratoires et d'ionorégulation ont été observées suite à l'adsorption de ce métal sur les branchies (Gensemer et Playle, 1999). Dans ce cas particulier, l'adsorption devient un paramètre important en lien avec la toxicité. Les mécanismes de toxicité de l'Al restent cependant en grande partie spéculatifs chez les plantes supérieures et encore davantage chez les algues moins étudiées. Des modes de toxicité intra-cellulaires ont été rapportés pour l'Al, comme par exemple la perturbation de la physiologie du phosphore chez la cyanobactérie *Anabaena cylindrica* (Pettersson et Bergman, 1989). Cependant, la question de la localisation (intra- ou extra-cellulaire) des principaux sites sensibles de ce métal est à ce jour toujours débattue, principalement en raison des difficultés à distinguer l'Al internalisé de l'Al adsorbé aux surfaces biologiques (Rengel, 1996; Taylor et al., 2000b). Dans notre étude sur le Sc, nous avons été en mesure de réaliser cette distinction, avec une caractérisation partielle de l'adsorption de ce métal chez les algues. Bien que ces travaux soient centrés sur les mécanismes d'internalisation, il est important de garder à l'esprit que l'adsorption aux surfaces biologiques pourrait s'avérer jouer un rôle non négligeable dans la toxicité des métaux trivalents chez le phytoplancton.





## 2 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

### 2.1 Évaluation de l'applicabilité du MLB au Sc chez le phytoplancton

Il s'agit de l'objectif principal de cette thèse. Pour répondre à cet objectif, nous avons tout d'abord étudié l'effet du pH sur les flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii*, dans la gamme de pH des eaux douces naturelles. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet des fluorures sur les flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii*, dans une gamme de concentrations environnementale en fluorures.

Notre hypothèse de départ était que, par analogie aux métaux bivalents, le MLB s'applique aux métaux trivalents et donc au Sc. Ainsi, nous nous attendions à ce que le pH et la concentration en fluorures affectent les flux d'internalisation du Sc en affectant la spéciation chimique du métal, plus précisément  $[\text{Sc}^{3+}]$ . De plus, nous nous attendions à ce que des variations du pH affectent aussi l'internalisation du Sc en faisant varier l'ampleur de la compétition des protons pour la liaison avec le transporteur membranaire emprunté par le Sc. Ces effets sont pris en compte par le MLB dans l'équation 13 des flux d'internalisation. Nous avons donc vérifié notre hypothèse en modélisant les flux d'internalisation du Sc avec cette équation aux différentes conditions expérimentales.

### 2.2 Évaluation de l'analogie entre le Sc et l'Al avec le phytoplancton

L'une des hypothèses majeures de notre étude était que les résultats obtenus avec le Sc pourraient nous instruire sur les mécanismes de prise en charge de l'Al. Cependant, bien que le Sc et l'Al présentent certaines propriétés physico-chimiques très proches, ils se distinguent dans d'autres propriétés. Ainsi, il apparaissait nécessaire de réaliser quelques expériences permettant d'évaluer l'analogie présumée entre le Sc et l'Al.

Nous avons dans un premier temps réalisé des expériences de compétition de l'Al sur la prise en charge du Sc chez *C. reinhardtii*. Ces expériences avaient pour but d'évaluer si le Sc et l'Al partageaient un transporteur commun à la surface de l'algue. Nous nous attendions à ce que le transporteur du Sc lie aussi l'Al.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé la répartition subcellulaire de l'Al et du Sc accumulés chez *C. reinhardtii* après des expositions à long terme. Un destin intra-cellulaire commun sous-entend généralement des mécanismes de toxicité et de détoxification communs. Or, ces derniers restent très peu connus pour l'Al. Ces expériences avaient donc pour but principal d'évaluer le potentiel du Sc à substituer l'Al dans des études s'intéressant aux mécanismes d'action intra-cellulaire de l'Al.

## 3 MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE

### 3.1 Conditions de culture des algues

Les algues *C. reinhardtii* et *P. subcapitata* ont été cultivées dans un milieu de culture MHSM-1 dont la composition est détaillée dans Fortin et al. (2004). Ce milieu avait un pH de 7, une force ionique de  $8,4 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$  et contenait l'ensemble des éléments nécessaires à la croissance des algues, comme les métaux essentiels (p. ex. Cu, le Zn et le Fe), le phosphore (sous forme de phosphates) ou l'azote (sous forme d'ammonium). Les algues étaient cultivées dans un incubateur (Conviron, CMP4030) permettant de les maintenir sous agitation (50 rpm), température ( $20,1 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) et illumination ( $100 \pm 10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) constantes. Afin de conserver les algues dans des conditions physiologiques satisfaisantes, une aliquote de culture était transférée dans une nouvelle solution MHSM-1 tous les quatre jours. En effet, dans MHSM-1, la densité cellulaire de *C. reinhardtii* et de *P. subcapitata* augmente exponentiellement durant les deux à trois premiers jours de culture, puis atteint un plateau indiquant la perte des conditions optimales de croissance.

Un certain nombre de précautions ont été prises afin d'éviter toute contamination bactérienne dans nos cultures algales. Par exemple, les milieux MHSM-1 ainsi que l'ensemble de la verrerie étaient stérilisés avant utilisation (à  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 15 min dans un autoclave Sanyo) et les cultures d'algues étaient manipulées sous une hotte à flux laminaire.

### 3.2 Conditions d'exposition des algues

Deux types de milieux d'exposition algale synthétiques ont été utilisés dans notre étude : des milieux d'exposition à court terme ( $\leq 1 \text{ h}$ ) et des milieux d'exposition à long terme ( $\sim 72 \text{ h}$ ).

Le Sc présent dans ces solutions était un mélange de Sc radioactif (Sc-46) et non radioactif (Sc-45) à des concentrations d'environ  $0,2 \text{ à } 4 \text{ TBq}\cdot\text{mol}^{-1}$  qui permettaient une détection du Sc satisfaisante dans les milieux d'exposition et chez les algues.

### 3.2.1 Milieux d'exposition à court terme ( $\leq 1$ h)

Les milieux d'exposition à court terme ont été utilisés dans les expériences visant à déterminer l'effet du pH, des fluorures et de l'Al sur le flux d'internalisation du Sc chez les algues. Les conditions expérimentales de chaque expérience sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Variables expérimentales des expositions à court terme (n : nombre de tests réalisés).

Algue	Effet du pH sur l'internalisation du Sc			Effet des fluorures sur l'internalisation du Sc			Compétition de l'Al sur l'internalisation du Sc		
	pH	[Sc <sub>T</sub> ] (nM)	n	[F <sup>-</sup> ] (μM)	[Sc <sub>T</sub> ] (nM)	n	[Al <sub>T</sub> ] (nM)	[Sc <sub>T</sub> ] (nM)	n
<i>C. reinhardtii</i>	<u>pH variable</u>			<u>pH 5,00</u>			<u>pH 5,00</u>		
	4,50	2 – 2000	27	0	0,7 – 300	22	0	6	3
	5,00	1 – 5000	19	1	2 – 500	8	400	6	3
	6,00	2 – 400	21	2	1 – 500	8	700	6	3
	6,50	2 – 200	20	5	0,5 – 700	21	2000	6	3
	7,00	0,5 – 80	21	10	0,2 – 4000	45	3000	6	3
	7,50	20 – 60	6	40	0,3 – 10000	15			
	7,90	0,5 – 20	20						
				<u>pH 6,50</u>					
				0	1 – 200	23			
			50	1 – 900	15				
<i>P. subcapitata</i>			<u>pH 5,00</u>						
			0	0,3 – 800	27				
			10	3 – 400	13				

Les expériences à pH et [F<sup>-</sup>] variables ont été réalisées dans des gammes de pH (4,50 – 7,90) et de [F<sup>-</sup>] (0 – 40 μM) représentatives des eaux douces naturelles (CCME, 2002; Dobbs, 1974). Les expériences à pH variable ont été effectuées à 0 μM de F<sup>-</sup> avec *C. reinhardtii* uniquement. Celles à [F<sup>-</sup>] variable ont principalement été effectuées à pH = 5,00 avec *C. reinhardtii*. Pour vérifier la généralité de l'effet des fluorures observé chez *C. reinhardtii*, des expériences ont été réalisées avec *P. subcapitata* à pH = 5,00 et [F<sup>-</sup>] = 0 et 10 μM. De plus, des expériences ont été réalisées avec *C. reinhardtii* à pH 6,50 et [F<sup>-</sup>] = 0 et 50 μM, afin de tester l'effet des fluorures à un pH différent.

Les expériences visant à évaluer la compétition de l'Al sur l'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii* ont été réalisées à pH 5,00, à différentes [Al<sub>T</sub>] et à une seule [Sc<sub>T</sub>] de 5,7 ± 1,1 nM. Le

but était de se placer dans la partie relativement linéaire de la courbe de saturation des flux d'internalisation et d'observer l'effet d'une augmentation croissante en  $\text{Al}^{3+}$  sur les valeurs de  $J_{\text{int}}$ . Dans les milieux d'exposition, les concentrations en  $\text{Al}^{3+}$  calculées étaient de 0 à 970 fois supérieures à celles de  $\text{Sc}^{3+}$ , et de 0 à 150 fois supérieures à la concentration en Sc nécessaire pour saturer les transporteurs de ce métal chez *C. reinhardtii* (déterminée dans les expériences précédentes). Ainsi,  $\text{Al}^{3+}$  était ajouté jusqu'à un excès suffisant par rapport à  $\text{Sc}^{3+}$  pour pouvoir observer un effet compétiteur même faible de l'Al sur l'internalisation du Sc. Ces expériences ont aussi été répétées à pH 7,00 pour  $[\text{Sc}_T] = 1,4 \pm 0,6$  nM et cinq  $[\text{Al}_T]$  (0,  $35 \pm 2$ ,  $170 \pm 10$ ,  $280 \pm 20$  et  $430 \pm 20$  nM) correspondant à des concentrations en  $\text{Al}^{3+}$  de 0 à 170 fois supérieures à celles en  $\text{Sc}^{3+}$ .

En raison de la courte durée d'exposition des algues dans ces expériences, les milieux pouvaient être exempts de nutriments. Ils contenaient uniquement du Sc, du Na, du  $\text{NO}_3$ , du Ca, un tampon pH et selon les tests aussi de l'Al et du F. Ces compositions chimiques simples permettaient (i) de limiter les incertitudes sur la modélisation de la spéciation du Sc et (ii) de limiter la compétition de cations en solution pour la prise en charge du Sc. Tous ces milieux d'exposition avaient une force ionique de  $8,8 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$  et possédaient  $1 \mu\text{M}$  de Ca afin de satisfaire les besoins physiologiques des algues. Les milieux étaient tamponnés avec 1 mM de MES (acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique) à pH < 6,00, avec 1 mM de MOPS (acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique) à pH entre 6,00 et 7,50 et avec 1 mM d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique) à pH > 7,50. Étant donné la grande dépendance de la spéciation du Sc à des fluctuations de pH, le pH des solutions d'exposition était ajusté avec une précision < 0,03 unités pH.

Chaque milieu d'exposition a été préparé au moins 24 heures avant le début de l'expérience, afin d'être confiants que l'équilibre thermodynamique des solutions était atteint. Cette précaution était également nécessaire pour permettre la stabilisation des concentrations en Sc dissous. En effet, une déplétion non négligeable de  $[\text{Sc}_T]$ , par adsorption du Sc sur les parois des fioles en polypropylène, se produisait dans les premières heures qui suivaient la préparation des milieux. Il est à noter que cette adsorption était considérée en mesurant  $[\text{Sc}_T]$  au début des expériences de prise en charge, plutôt qu'en se remettant aux concentrations nominales.

### 3.2.2 Milieux d'exposition à long terme (72 h)

Les milieux d'exposition à long terme ont été utilisés dans les expériences visant à comparer la distribution subcellulaire de l'Al et du Sc chez *C. reinhardtii*. En raison de la longue durée d'exposition, les milieux devaient contenir des nutriments pour maintenir les algues dans un bon état physiologique. Ainsi, ces expériences ont été réalisées dans le milieu de culture MHSM-1 (à pH 7,00 et à force ionique de 8,4 mEq·L<sup>-1</sup>). Les milieux contenaient soit de l'Al, soit du Sc à concentration totale de 4,5 µM. Cette concentration relativement élevée était nécessaire pour être en mesure de quantifier l'Al dans les différentes fractions subcellulaires. Afin d'empêcher la précipitation de Sc(OH)<sub>3</sub> et Al(OH)<sub>3</sub>, mais aussi de tamponner les concentrations dissoutes en Al et en Sc durant l'exposition, des fluorures ont été ajoutés à une concentration de 380 µM. Cette forte concentration en F<sup>-</sup> était représentative d'effluents d'aluminerie (Goulet et al., 2005).

Chaque milieu d'exposition a été préparé au moins 24 heures avant le début de l'expérience. Chaque exposition a été réalisée cinq fois (n = 5), le même jour et à partir de la même culture mère de *C. reinhardtii*. Afin de vérifier la reproductibilité des résultats obtenus, l'expérience a été entièrement répétée un autre jour à partir d'une autre culture d'algue.

### 3.3 Calculs de la spéciation du Sc dans les milieux d'exposition

Les mesures du pH (électrode de pH) ont été réalisées directement dans les solutions, avant le début de l'exposition (*i.e.* avant l'ajout des algues). Les mesures de la concentration en Sc totale (compteur gamma), de la concentration en F<sup>-</sup> (quand F<sup>-</sup> était présent) (électrode sélective de fluorures et milieu TISAB) et de la concentration en Al totale (quand Al était présent) (spectromètre par torche à plasma d'émission atomique, ICP-AES) ont été réalisées dans des aliquotes de solutions prélevées avant l'ajout des algues. Ces données, ainsi que les concentrations nominales des autres espèces en solution (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et tampon pH), ont ensuite été incorporées dans des logiciels de calculs thermodynamiques (soit Mineql+, soit Visual Minteq) pour modéliser la spéciation chimique du Sc dans les différentes solutions d'exposition. À noter que l'utilisation de deux logiciels différents n'a pas eu d'impact sur les calculs de spéciation, étant donné que ceux-ci utilisaient les mêmes constantes thermodynamiques pour leurs calculs.

Les constantes de formation du Sc utilisées dans ces logiciels proviennent de la base de données thermodynamiques 46 version 8.0 du NIST (National Institute of Standard and Technology) (Martell et Smith, 2004) (cf. tableau 1). Elles ont fait l'objet d'une revue critique par Wood et Samson (2006). Les constantes de formation des fluoro-complexes sont considérées comme étant raisonnablement bien estimées (précision comprise entre 0,3 et 0,5 unités log). La précision est aussi bonne pour la constante du premier hydroxo-complexe  $\text{ScOH}^{2+}$  ( $< 0,3$ ), mais le niveau de confiance baisse pour  $\text{Sc}(\text{OH})_2^+$ ,  $\text{Sc}(\text{OH})_3$  et  $\text{Sc}(\text{OH})_4^-$  car un nombre moins important de valeurs a été rapporté dans la littérature. Cependant, selon Wood et Samson (2006), plusieurs éléments indiquent qu'il n'y a pas de raison de suspecter la validité des constantes de formation de ces hydroxo-complexes. Ainsi, nous avons estimé que la modélisation de la spéciation du Sc dans nos milieux d'exposition simples à court terme était suffisamment raisonnable. En revanche, les milieux d'exposition à long terme, contenant soit du Sc soit de l'Al, possédaient quelques ligands (p. ex. des sulfates et des phosphates) dont certaines constantes de formation avec  $\text{Sc}^{3+}$  et  $\text{Al}^{3+}$  sont mal définies, voire inconnues. Notre confiance dans la modélisation de la spéciation du Sc et de l'Al dans ces milieux d'exposition était donc moins bonne. Cependant, ceci n'était pas problématique étant donné que ces milieux étaient utilisés pour comparer la distribution intra-cellulaire de l'Al et du Sc. Or, la distribution subcellulaire des métaux est normalement indépendante de la spéciation métallique dans le milieu d'exposition.

### **3.4 Détermination des flux d'internalisation du Sc chez les algues**

#### **3.4.1 Cinétiques de prise en charge du Sc à court terme ( $\leq 1$ h)**

Ces expériences consistaient à exposer les algues pendant une durée  $\leq 1$  h et à déterminer la quantité en Sc bioaccumulé en fonction du temps, avec deux à quatre temps d'exposition.

Toutes les expositions ont été réalisées avec des cultures d'algues en phase de croissance mi-exponentielle ( $\sim 48$  h après le début d'une nouvelle culture). Elles étaient ainsi toujours dans un état physiologique similaire. Ces algues étaient récoltées par filtration sur une membrane de  $2 \mu\text{m}$  en polycarbonate (PC) puis rincées avec une solution de rinçage (correspondant à la solution d'exposition sans métal). Les algues ainsi rincées de leur milieu de culture étaient ensuite re-suspendues dans les milieux d'exposition, à une densité cellulaire de 20 000

cellules·mL<sup>-1</sup> (pour *C. reinhardtii*) ou de 40 000 cellules·mL<sup>-1</sup> (pour *P. subcapitata*). Ces densités relativement faibles permettaient de minimiser la déplétion du Sc dissous au cours de l'exposition à une proportion < 10 %. À différents temps d'exposition (deux, trois ou quatre temps généralement compris entre 5 et 60 min), des aliquotes d'algues étaient récoltées par filtration sur une membrane de 2 µm en PC. À partir de cette étape, deux protocoles différents ont été utilisés pour les expériences réalisées à pH/[Al<sub>T</sub>] variable et à [F<sup>-</sup>] variable :

- (i) Pour les expositions à pH/[Al<sub>T</sub>] variable (réalisées en premier), les algues étaient rincées trois fois avec 5 mL de solution de rinçage, exposées pendant 10 min à 10 mL d'une solution de rinçage contenant 1 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), puis rincées trois fois avec 10 mL de solution de rinçage.
- (ii) Pour les expositions à [F<sup>-</sup>] variable (réalisées par la suite), les algues étaient rincées 10 fois avec 10 mL de solution de rinçage (*i.e.* sans EDTA).

Ces deux protocoles de rinçage (i) et (ii) permettaient d'éliminer les résidus de solution d'exposition dans le filtre et dans les interstices des cellules algales, c'est-à-dire d'éliminer le Sc non bioaccumulé. Les algues ainsi rincées étaient ensuite re-suspendues dans 10 mL de solution de rinçage, en y agitant le filtre sur lequel les algues étaient retenues. La surface totale des algues re-suspendues était mesurée avec un compteur à particule et leur teneur en Sc était mesurée avec un compteur gamma. Ces expériences permettaient donc de déterminer la concentration en Sc accumulé dans les algues ( $Sc_{acc}$ , en nmol·m<sup>-2</sup>) en fonction du temps.

Comme présenté plus loin dans la section 4.1, les deux protocoles de rinçage (i) et (ii) conduisaient à des déterminations équivalentes du flux d'internalisation, mais à des mesures différentes du Sc lié à la surface des algues.

### 3.4.2 Traitement des profils de prise en charge du Sc à court terme

Les valeurs de  $Sc_{acc}$  mesurées dans les expositions à court terme correspondaient à un mélange de Sc internalisé ( $Sc_{int}$ ) et de Sc adsorbé à la surface cellulaire ( $Sc_{ads}$ ) (équation 18). Cette dernière mesure correspondait plus précisément à du Sc non désorbé de la surface cellulaire après le rinçage des algues par les protocoles (i) et (ii).

$$Sc_{acc} = Sc_{int} + Sc_{ads} \quad \text{éq. (18)}$$



La distinction entre  $Sc_{int}$  et  $Sc_{ads}$  a été réalisée sur la base des différentes cinétiques d'accumulation qui sont classiquement attribuées aux processus d'internalisation et d'adsorption métallique. Il est en effet bien admis que l'adsorption est un processus très rapide contrairement à l'internalisation (Bates et al., 1982; Knauer et al., 1997). Ainsi, en règle générale, la quantité de métal adsorbé sur l'algue augmente très rapidement pour atteindre un plateau dans les premières minutes de l'exposition, indiquant que le métal à la surface des algues est à l'équilibre avec le métal en solution. En revanche, la quantité de métal internalisé augmente beaucoup moins rapidement et de façon linéaire avec le temps pour des expériences à court terme (*i.e.* sans efflux de métal). En conséquence, dans la fenêtre temporelle de nos expositions à court terme ([5 – 60 min]),  $S_{acc}$  était linéaire en fonction du temps, avec une pente correspondant au flux d'internalisation  $J_{int}$  et une ordonnée à l'origine (extrapolée) correspondant à  $Sc_{ads}$  :

$$Sc_{acc} = J_{int} \cdot \text{temps} + Sc_{ads} \quad \text{éq. (19)}$$

Ainsi, les valeurs de  $J_{int}$  et de  $Sc_{ads}$  ont été obtenues par régression linéaire des différentes cinétiques d'accumulation à court terme réalisées. Dans les expériences où plus de deux temps d'exposition ont été utilisés, les erreurs types des paramètres de régression  $J_{int}$  et de  $Sc_{ads}$  étaient obtenues.

### 3.5 Mesures de mobilité électrophorétique de *C. reinhardtii* à différents pH

L'effet du pH sur le potentiel électrique de la surface cellulaire de *C. reinhardtii* a été estimé par des mesures de mobilité électrophorétique. Ces expériences ont été réalisées avec les différentes solutions d'exposition utilisées pour les cinétiques de prise en charge à court terme à pH variable (*i.e.* à pH 4,50, 5,00, 6,00, 6,50, 7,00, 7,50 et 7,90).

*Chlamydomonas reinhardtii* étant une algue motile, il n'était pas possible de déterminer sa mobilité électrophorétique sans l'immobiliser préalablement. Cette espèce d'algue est reconnue pour « se séparer » de ses flagelles en réponse à divers changements brusques des conditions de son environnement (choc de pH, ajout de détergents, températures extrêmes, cisaillement mécanique, etc.) selon un processus actif nommé autonomie flagellaire ou encore « self-cutting » (Salisbury et al., 1987). Les cellules régénèrent rapidement leurs flagelles après un retour à des conditions plus favorables (en quelques heures). Parmi les différentes techniques

par cisaillement mécanique testées, un traitement des cellules algales avec un disperseur (Ultra Turrax®) pendant 10 minutes à 30 000 tours·min<sup>-1</sup> permettait une déflagellation quasi-totale sans briser les cellules (vérifications réalisées au microscope). Les cellules restaient immobiles la première heure suivant ce traitement, puis régénéraient leurs flagelles dans les deux heures suivantes.

Les mesures de mobilité électrophorétique ont été effectuées sur les cellules déflagellées avec un Zetaphoromètre. Le potentiel Zeta ( $\zeta$ ) a été calculé avec l'équation de Smoluchowski (Hunter, 1981) et était considéré comme une approximation du potentiel électrique de la paroi cellulaire (potentiel Donnan,  $\Psi_{\text{DON}}$ ) (Hassler et al., 2004b; Yee et al., 2004).

### **3.6 Détermination de la distribution subcellulaire du Sc et de l'Al**

Des cellules de *C. reinhardtii* en phase mi-exponentielle étaient récoltées puis re-suspendues dans les milieux d'exposition à une densité initiale de 20 000 cellules·mL<sup>-1</sup>. Les concentrations en métal (Al ou Sc), le pH et la densité cellulaire étaient mesurés toutes les 24 h, du début à la fin de l'exposition. Après les 72 h d'exposition, les algues étaient récupérées par centrifugation, exposées à 10 mL d'une solution de 1 mM d'EDTA pendant 10 min, puis récoltées à nouveau par centrifugation. La concentration en métal était mesurée dans une aliquote de ces algues. Le reste des algues était brisé par sonication et les différentes fractions subcellulaires étaient ensuite séparées par centrifugation différentielle avec des traitements chimiques et thermiques pour certaines fractions, selon la méthode décrite par Lavoie et al. (2009), avec un erratum publié en 2011 (figure 5). Les différentes fractions isolées correspondaient aux débris cellulaires (noyau, membranes et paroi cellulaire), aux organelles (mitochondries, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, chloroplaste, etc.), aux granules (phases minérales résistantes au NaOH), aux protéines stables à la chaleur ou « HSP » (glutathion, phytochélatines et autres peptides non identifiés) et aux protéines instables à la chaleur ou « HDP » (enzymes). Les concentrations en Al et en Sc étaient mesurées dans chacune de ces fractions. Pour les cellules exposées à l'Al, les fractions subcellulaires étaient digérées à l'acide avant les mesures par ICP-AES. Pour les cellules exposées au Sc, les fractions subcellulaires étaient directement analysées au compteur gamma.

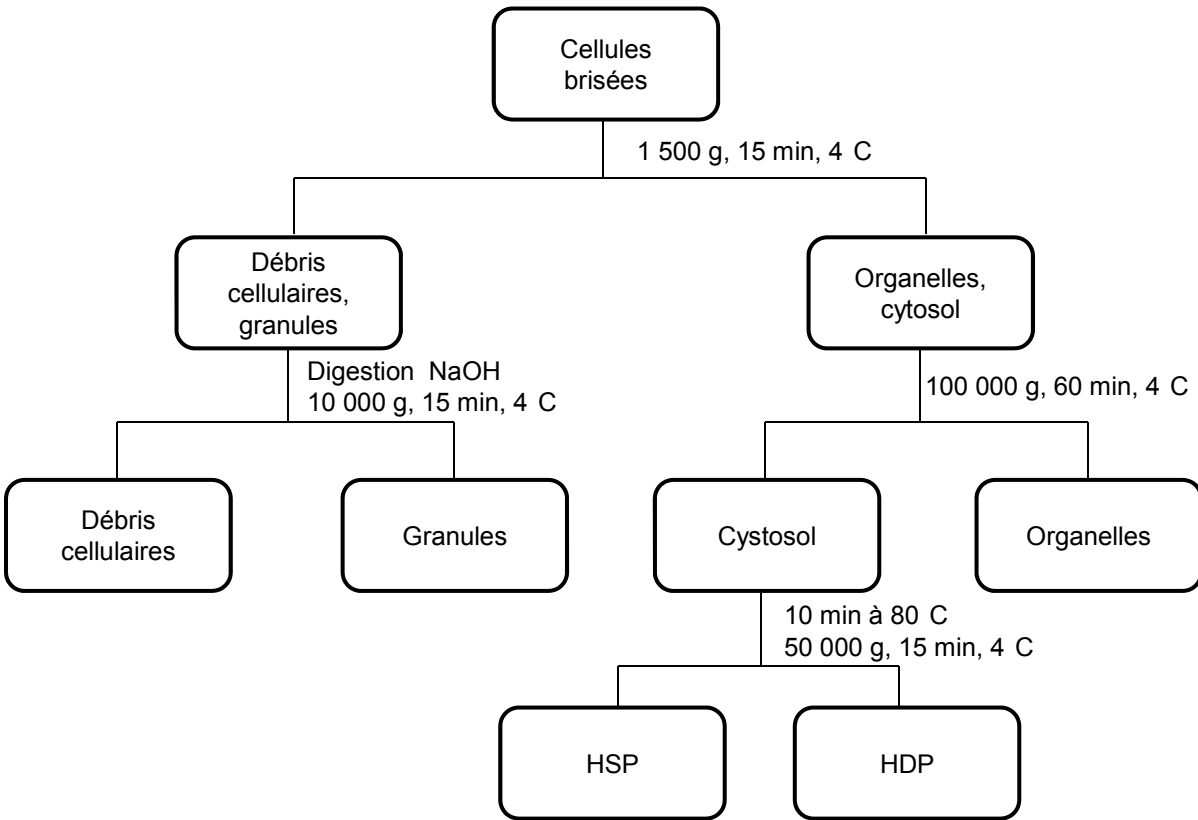


Figure 5 : Protocole de séparation des fractions subcellulaires par centrifugation différentielle.  
Traduit de Lavoie et al. (2011).

### 3.7 Traitement statistique des données

Les comparaisons entre deux paramètres de régression (p. ex.  $K_{Sc-Rint}$ ) ont été réalisées avec des tests t de Student avec un niveau de probabilité ( $\alpha$ ) de 0,05. Dans le cas où plus de deux paramètres étaient comparés (comparaison multiple), une correction « False Discovery Rate » (FDR) était appliquée sur la valeur de  $\alpha$  du test t de Student (Benjamini et Hochberg, 1995).

Les comparaisons entre deux moyennes avec répétition de mesures ont été réalisées avec des tests t de Student avec  $\alpha = 0,05$ . Dans le cas où plus de deux moyennes étaient comparées (comparaison multiple), un test de Tukey était utilisé avec  $\alpha = 0,05$ . La comparaison de pourcentages (p. ex. % de l'Al et du Sc dans une même fraction subcellulaire) a été réalisée après transformation arcsin de ces données.

La qualité de l'ajustement des différents modèles de prédiction des flux d'internalisation du Sc était comparée sur la base des coefficients de détermination ( $R^2$ ) et des erreurs types de l'estimation de y sur x ( $s_{y,x}$ ) (Zar, 1999).

## 4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 4.1 Description des profils temporels de Sc bioaccumulé à court terme

Des expériences de prise en charge du Sc réalisées à plus de deux temps d'exposition ont montré que les valeurs de  $Sc_{acc}$  mesurées chez *C. reinhardtii* et *P. subcapitata* étaient linéaires en fonction du temps, quelles que soit les conditions physico-chimiques testées (pH ou  $[F^-]$  variables) (voir p. ex. la figure SI.4 de l'article 1). Cette linéarité indiquait que l'adsorption du Sc sur la surface cellulaire des deux algues atteignait rapidement sa valeur maximale (avant le premier temps d'exposition, soit  $< 5$  min). En d'autres termes, l'équilibre entre le Sc en solution et les sites d'adsorption à la surface des algues était rapidement atteint dans nos conditions expérimentales. La linéarité des droites de  $Sc_{acc}$  en fonction du temps indiquait aussi que le métal n'était pas excrété par les algues de manière importante pendant la durée des expositions ( $\leq 1$  h). Ainsi, les régressions linéaires de  $Sc_{acc}$  avec l'équation 19 nous ont bien permis d'obtenir les valeurs de  $J_{int}$  (pente) et de  $Sc_{ads}$  (ordonnée à l'origine).

La figure 6 montre que les deux protocoles de rinçage des algues (i) et (ii), réalisés avant la mesure de  $Sc_{acc}$ , conduisaient à des droites d'accumulation de même pente (*i.e.* de même  $J_{int}$ ). Ceci n'est pas surprenant étant donné que le métal internalisé dans les algues n'est pas en contact avec les solutions de rinçage. En revanche, le rinçage à l'EDTA (réalisé pour les expériences à pH variable) conduisait à des valeurs de  $Sc_{ads}$  plus faibles que celles mesurées après le rinçage multiple sans EDTA (réalisé pour les expériences à  $[F^-]$  variable).

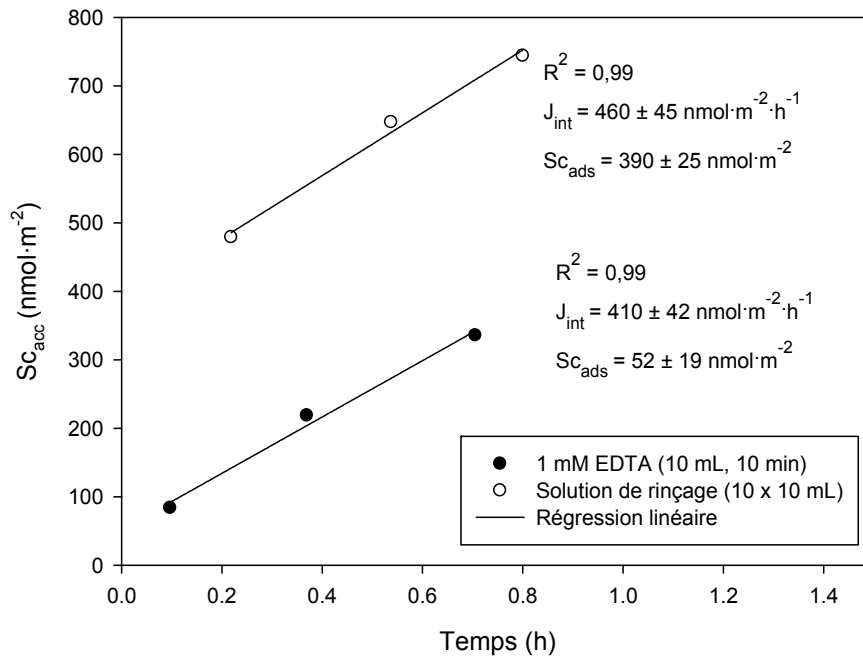


Figure 6 : Valeurs de Sc accumulé chez *C. reinhardtii* en fonction du temps (à pH = 5,00 et  $[Sc_T] \sim 5$  nM) mesurées après rinçage des cellules avec une solution d'EDTA (cercles noirs) et après rinçage multiple sans EDTA (cercles blancs).

Dans cette étude, l'EDTA a été initialement utilisé afin de désorber le Sc des surfaces biologiques (*i.e.*  $Sc_{ads} = 0$  chez les algues rincées) (Hassler et al., 2004a). Une extraction complète aurait permis de déterminer les valeurs de  $J_{int}$  avec seulement un temps d'exposition. Cependant, aucune de nos tentatives n'a permis de désorber complètement le Sc lié à la surface cellulaire de *C. reinhardtii* (voir les figures SI.1 et SI.2 et le tableau SI.1 de l'article 1). Une augmentation de la concentration en EDTA jusqu'à 10 mM, l'utilisation de l'acide diéthylène triaminepentaacétique (DTPA,  $\log K_{ScDTPA} = 27,12 > \log K_{ScEDTA} = 25,66$ ) et même la substitution isotopique (substitution de Sc-46 avec un excès de Sc-45) n'ont pas permis de diminuer notablement les valeurs de  $Sc_{ads}$  mesurées. À l'exception du cas particulier du fer (Hassler et Schoemann, 2009), aucun ligand efficace n'a à ce jour été identifié pour désorber des métaux traces trivalents tels que l'Al des surfaces biologiques (Reid et al., 1996; Rengel et Reid, 1997; Taylor et al., 2000b). Nous avons conclu que les valeurs de  $Sc_{ads}$  mesurées dans ces expériences à pH variable correspondaient à du Sc quasi-irréversiblement lié à la surface de *C. reinhardtii*. Il n'était pas possible d'obtenir la quantité totale de Sc adsorbé pendant l'exposition en mesurant la quantité de Sc extrait dans la solution d'EDTA. En effet, le filtre en PC servant à

récolter les algues exposées absorbait une grande quantité de Sc de la solution d'exposition pendant sa filtration. Tout comme une partie du Sc adsorbé aux algues, une partie de ce Sc lié au filtre était aussi extrait par le rinçage à l'EDTA. Or, cette deuxième valeur était non seulement plus importante que la première, mais elle était aussi peu reproductible, empêchant une correction précise de la première valeur.

Il a par la suite été décidé de rincer les algues avec une solution sans EDTA (expériences à  $[F^-]$  variable), pour que l'ordonnée à l'origine des droites d'accumulation du Sc en fonction du temps nous offre une indication de la quantité de Sc adsorbée à la surface cellulaire pendant l'exposition. Cependant, malgré l'absence de ligand, le rinçage multiple a aussi conduit à la désorption d'une portion du Sc associé aux algues (voir la figure SI.2 de l'article 3). Ainsi, la valeur de  $Sc_{ads}$  déterminée avec cette deuxième méthode de rinçage sous-estimait l'adsorption du Sc à la surface biologique pendant l'exposition. Nous avons évalué que cette sous-estimation pouvait s'élever jusqu'à un facteur deux environ (voir la section I de l'information additionnelle de l'article 3). L'option de supprimer totalement l'étape de rinçage pour obtenir la vraie valeur de l'adsorption n'était pas envisageable étant donné que beaucoup de Sc non accumulé (Sc de milieu d'exposition résiduel sur le filtre) n'aurait pas été rincé.

## **4.2 Tests de l'applicabilité du MLB au Sc à différents pH et $[F^-]$**

### **4.2.1 Spéciation du Sc dans les milieux d'exposition à pH et $[F^-]$ variables**

Aucune précipitation du Sc n'était prédite dans les différents milieux d'exposition. Étant donné que certains milieux circumneutres présentaient des  $[Sc_T]$  relativement proches de la limite de solubilité ( $\sim 200$  nM entre pH 7 et 9), des tests ont été réalisés afin de mettre en évidence l'absence de  $Sc(OH)_{3(s)}$  dans ces milieux (voir la section 1 de l'information additionnelle de l'article 1).

La figure 7 illustre l'effet du pH sur la spéciation du Sc dans les milieux d'exposition sans fluorures. La proportion de  $Sc^{3+}$  diminuait de 47 % à  $10^{-5,2}$  % ( $\sim 10^7$  fois) de pH 4,50 à 7,90, en raison de la formation d'hydroxo-complexes. Ces complexes dominaient donc la spéciation du Sc dans ces milieux d'exposition.

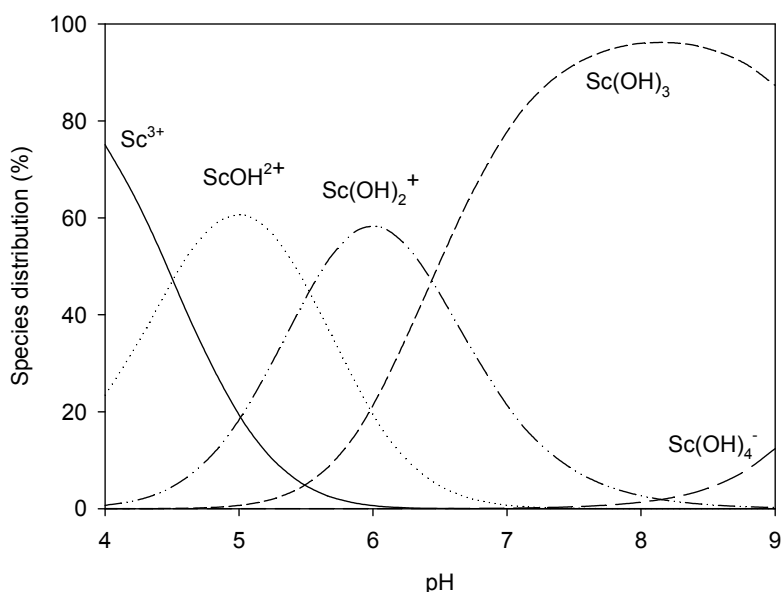


Figure 7 : Distribution des espèces majoritaires du Sc dans les milieux d'exposition à différents pH ( $[F^-] = 0 \text{ M}$ ) telle que calculée par Mineql+ (version 4.6).

Le tableau 4 présente la distribution des différentes espèces majoritaires de Sc calculée dans les milieux d'exposition de 0 à 40  $\mu\text{M}$  de  $F^-$ , à pH 5,00 et pour  $[\text{Sc}_T] = 1 \text{ nM}$ . Dans cette gamme de  $[F^-]$ , la proportion de  $\text{Sc}^{3+}$  diminuait de 20 % à 0,01 % (2000 fois). Ces calculs de spéciation étaient valides dans environ 90 % des milieux, pour lesquels F était en large excès par rapport au Sc ( $\text{Sc:F} < 1:20$ ). Dans les autres milieux où  $\text{Sc:F} > 1:20$ , une complexation significative de  $F^-$  par  $\text{Sc}^{3+}$  menait à une baisse de  $[F^-]$  et donc de la proportion en fluoro-complexes de Sc. Ainsi, une spéciation spécifique a été calculée dans chacun de ces milieux (résultats non montrés).

Tableau 4 : Distribution des espèces majoritaires du Sc dans les milieux d'exposition à  $[F^-]$  variable et à pH 5,00. Cette spéciation a été calculée par Visual Minteq pour  $[\text{Sc}_T] = 1 \text{ nM}$  ( $\text{Sc:F} < 1:20$ ) et était représentative de 90 % des milieux d'exposition.

	$[F^-] = 0 \mu\text{M}$	$[F^-] = 1 \mu\text{M}$	$[F^-] = 2 \mu\text{M}$	$[F^-] = 5 \mu\text{M}$	$[F^-] = 10 \mu\text{M}$	$[F^-] = 40 \mu\text{M}$
% $\text{Sc}^{3+}$	20	7	3	0,9	0,3	0,01
% $\text{ScOH}^{2+}$	61	21	10	3	0,8	0,03
% $\text{Sc(OH)}_2^+$	18	6	3	0,8	0,3	0,01
% $\text{ScF}^{2+}$	0	45	44	29	17	3
% $\text{ScF}_2^+$	0	21	37	59	66	46
% $\text{ScF}_3(\text{aq})$	0	0	2	8	16	50



#### 4.2.2 Effet du pH sur les flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii*

Aucune différence n'a été observée sur la croissance de cellules de *C. reinhardtii* dans MHSM-1 après une exposition de 60 min à pH 4,00 et 7,00 (voir la figure SI.3 de l'article 1). Nous en avons conclu que les algues cultivées à pH 7 n'ont pas subi de choc physiologique important au cours de leur re-suspension dans les milieux d'exposition à pH aussi bas que 4,50.

Sans considérer la spéciation métallique, les flux d'internalisation du Sc mesurés chez *C. reinhardtii* étaient d'un ordre de grandeur cohérent avec les flux rapportés pour d'autres métaux (Ag, Cd, Zn, Mn) chez cette même algue (voir le tableau SI.2 de l'article 1).

Aux pH entre 4,50 et 7,00, les flux d'internalisation décrivaient une cinétique de type Michaelis-Menten comme prédit par le MLB : les valeurs de  $J_{int}$  augmentaient avec la concentration en  $Sc_T$  ou en  $Sc^{3+}$  jusqu'à atteindre un plateau indiquant la saturation des sites de transport membranaire (figures 8a et 8b). Aux pH 7,50 et 7,90, les faibles limites de solubilité du Sc n'ont pas permis d'atteindre des concentrations suffisamment élevées pour saturer le système de transport. Lorsqu'exprimés en fonction de  $[Sc_T]$ , les flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii* étaient peu affectés par le pH (figure 8a). En revanche, pour une même  $[Sc^{3+}]$ , une forte augmentation de  $J_{int}$  était observable avec le pH (figure 8b). Afin de quantifier cet effet, les flux d'internalisation ont été modélisés à chaque pH en fonction de  $[Sc^{3+}]$  avec l'équation du MLB sans compétiteur :

$$J_{int} = \frac{J_{max} \cdot K_{Sc-Rint} \cdot [Sc^{3+}]}{1 + K_{Sc-Rint} \cdot [Sc^{3+}]} \quad \text{éq. (20)}$$

Des valeurs de  $J_{max}$  (flux d'internalisation maximal du Sc) et de  $K_{Sc-Rint}$  (constante d'affinité apparente du Sc pour le transporteur Rint) étaient ainsi obtenues pour chaque pH entre 4,50 et 7,00 (tableau 5). À pH 7,50 et 7,90 où les flux n'atteignaient pas leurs valeurs maximales  $J_{max}$ , des régressions linéaires ont permis d'estimer le produit  $J_{max} \cdot K_{Sc-Rint}$ , en supposant que les faibles valeurs de  $[Sc^{3+}]$  à ces pH menaient à  $K_{Sc-Rint} \cdot [Sc^{3+}] \ll 1$  dans l'équation 20. Les valeurs de  $J_{max}$  obtenues de pH 4,50 à 7,00 ne présentaient pas de tendance avec le pH ( $J_{max \text{ moyen}} = 2200 \pm 290 \text{ nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ). En supposant que  $J_{max}$  demeurerait constant jusqu'à pH 7,90, les valeurs apparentes de  $K_{Sc-Rint}$  ont alors pu être calculées à pH 7,50 et 7,90 avec  $J_{max \text{ moyen}}$ .

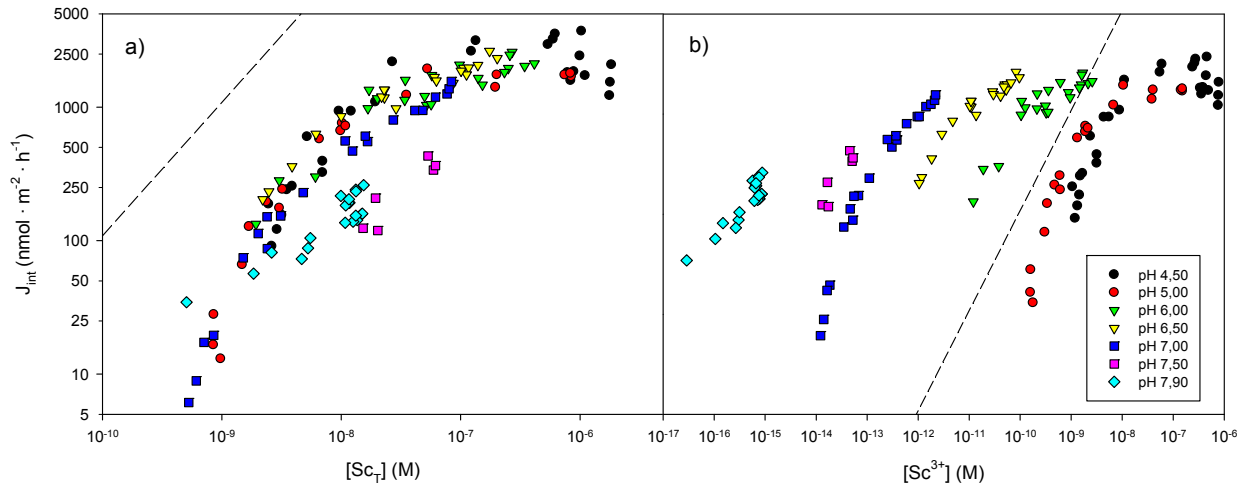


Figure 8 : Flux d'internalisation du Sc ( $J_{int}$ ) chez *C. reinhardtii* de pH 4,50 à 7,90 en fonction **a)** de la concentration en Sc totale mesurée ( $[Sc_T]$ ) et **b)** de la concentration en  $Sc^{3+}$  calculée ( $[Sc^{3+}]$ ) dans les milieux d'exposition. Valeurs déterminées par régressions linéaires des mesures de  $Sc_{acc}$  en fonction du temps dans des expositions à court terme. Les droites en tirets correspondent aux estimations des flux de diffusion maximaux de **a)**  $Sc_T$  et **b)**  $Sc^{3+}$  de la solution vers la surface biologique (equation 23).

Tableau 5 : Résultats des régressions des flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii* avec l'équation 20 (équation du MLB sans compétiteur), à chaque pH expérimental. Les valeurs ne partageant aucune lettre commune sont significativement différentes (test t avec correction FDR,  $\alpha = 0,05$ ).

pH	$R^2$	n	$J_{max} \pm$ erreur type ( $nmol \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ )	$\log K_{Sc-Rint}$ apparente et intervalle de confiance à 95 %
4,50	0,80	27	$2490 \pm 200$ <sup>a</sup>	8,08 [7,62 – 8,30] <sup>a</sup>
5,00	0,96	19	$1810 \pm 80$ <sup>b</sup>	8,53 [8,33 – 8,66] <sup>a</sup>
6,00	0,80	21	$2230 \pm 160$ <sup>ab</sup>	9,78 [9,40 – 10,00] <sup>b</sup>
6,50	0,81	20	$2470 \pm 150$ <sup>a</sup>	10,89 [10,64 – 11,05] <sup>c</sup>
7,00	0,99	21	$2010 \pm 120$ <sup>ab</sup>	12,03 [11,89 – 12,13] <sup>d</sup>
7,50	0,84	6	* $2200 \pm 290$ <sup>ab</sup>	**12,46 [11,93 – 12,70] <sup>e</sup>
7,90	0,67	20	* $2200 \pm 290$ <sup>ab</sup>	**13,95 [13,70 – 14,11] <sup>f</sup>

\* Moyenne des valeurs de  $J_{max}$  entre pH 4,50 et 7,90 ( $J_{max}$  moyen)

\*\* Valeurs déterminées avec  $K_{Sc-Rint} \cdot [Sc^{3+}] \ll 1$  dans l'équation 20

De manière générale, les flux d'internalisation étaient bien modélisés par l'équation 20 à chaque pH. Le fait de ne pas observer de tendance sur la valeur de  $J_{\max}$  de pH 4,50 à 7,00 indiquait que la capacité du transporteur du Sc n'était pas affectée par cette variation (*i.e.* le nombre de transporteurs et leur conformation restaient inchangés). Une certaine variabilité était cependant observée sur les valeurs de  $J_{\max}$  obtenues. Celle-ci a été attribuée à la variabilité biologique, issue de la nécessité d'utiliser différentes cultures d'algues dans chaque expérience à pH différent. L'augmentation des valeurs de  $J_{\text{int}}$  de pH 4,50 à 7,90, pour une même  $[\text{Sc}^{3+}]$  (cf. figure 8b), se traduisait par une augmentation des constantes apparentes de  $K_{\text{Sc-Rint}}$  de  $10^{8,08}$  à  $10^{13,95}$   $\text{M}^{-1}$ . En supposant que cet effet du pH était dû à la compétition des protons pour les sites de transport du Sc, une régression des flux d'internalisation a été réalisée dans l'ensemble de la gamme de pH expérimentale avec l'équation 21 (où  $K_{\text{H-Rint}}$  est la constante d'affinité du proton avec le transporteur du Sc). Cette équation était dérivée des principes du MLB, qui prend en compte la compétition des cations en solution pour les transporteurs membranaires des métaux.

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\max} \cdot K_{\text{Sc-Rint}} \cdot [\text{Sc}^{3+}]}{1 + K_{\text{Sc-Rint}} \cdot [\text{Sc}^{3+}] + K_{\text{H-Rint}} \cdot [\text{H}^+]} \quad \text{éq. (21)}$$

Pour cette régression, nous avons utilisé les différentes valeurs de  $J_{\max}$  obtenues à chaque pH, afin de prendre en compte la variabilité biologique entre les expériences. Nous avons fixé la valeur de  $K_{\text{Sc-Rint}}$  à  $10^{13,95}$   $\text{M}^{-1}$ , soit à la valeur estimée à pH 7,90 où la compétition du proton était nécessairement la plus faible. Dans ce modèle, cette valeur de  $K_{\text{Sc-Rint}}$  était considérée comme une estimation minimale de la constante d'affinité intrinsèque du Sc avec Rint. En effet, nos données expérimentales ne permettaient pas d'affirmer que la compétition du proton n'était plus significative à pH 7,90.

La meilleure estimation de  $K_{\text{H-Rint}}$  obtenue par régression des valeurs expérimentales avec l'équation 21 était  $10^{10,10}$   $\text{M}^{-1}$ , avec une valeur de  $p > 0,05$  indiquant sa non significativité. La figure 9 présente les valeurs de flux d'internalisation prédites par ce modèle ( $J_{\text{int, calc}}$ ) en fonction de celles mesurées expérimentalement ( $J_{\text{int, obs}}$ ) ( $R^2 = 0,64$  et  $s_{y,x} = 486$   $\text{nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Les valeurs de  $J_{\text{int, calc}}$  étaient distribuées autour de la droite de prédiction 1:1, avec une surestimation des flux à pH  $< 6,00$  et une sous-estimation à pH  $> 6,00$ . Les valeurs de  $J_{\text{int, calc}}$  à pH 7,90 étaient jusqu'à 1200 fois inférieures aux valeurs de  $J_{\text{int, obs}}$ . Ainsi, le MLB ne permettait pas d'interpréter l'effet du pH observé sur la prise en charge du Sc chez *C. reinhardtii*. En d'autres termes, cet effet du pH ne pouvait être attribué à la compétition du proton, du moins pas entièrement.

Notons aussi que les valeurs minimales de  $K_{Sc-Rint}$  et de  $K_{H-Rint}$  estimées sur la base de ce modèle étaient très élevées par rapport aux constantes généralement rapportées dans la littérature. En effet les constantes d'affinité de métaux pour les transporteurs membranaires chez le phytoplancton sont généralement comprises entre  $10^4$  et  $10^9$   $M^{-1}$  (Slaveykova et Wilkinson, 2005) et la seule constante rapportée pour un métal trivalent est de  $10^8$   $M^{-1}$  (affinité de l'Al pour le transporteur du Ni chez *C. reinhardtii*) (Worms et Wilkinson, 2007). De plus, selon Slaveykova et Wilkinson (2005) qui ont compilé ces constantes, l'effet compétiteur du proton n'était généralement pas observé au-delà de pH 6,0. Or dans la présente étude, l'effet du pH sur les flux d'internalisation s'étendait au moins jusqu'à pH 7,90.

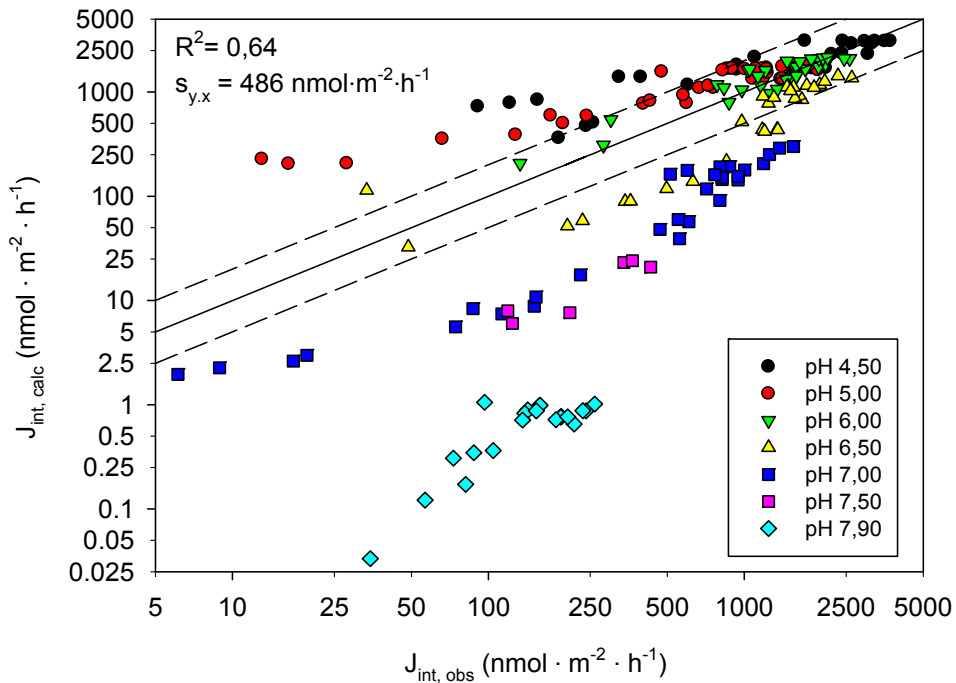


Figure 9 : Valeurs des flux d'internalisation du Sc calculées avec l'équation 21 (équation du MLB avec compétition de  $H^+$ ), en fonction des valeurs déterminées expérimentalement entre pH 4,50 et 7,90 chez *C. reinhardtii* ( $n = 187$ ). Les droites 1:1 (ligne pleine), 1:2 et 2:1 (lignes en tirets) sont tracées pour comparaison.

### 4.2.3 Effet des fluorures sur les flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii* et *P. subcapitata*

#### 4.2.3.1 Chez *C. reinhardtii*

Les flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii* à pH 5,00 et aux différentes  $[F^-]$  testées sont présentés en fonction de  $[Sc_T]$  et de  $[Sc^{3+}]$  dans les figures 10a et 10b respectivement.

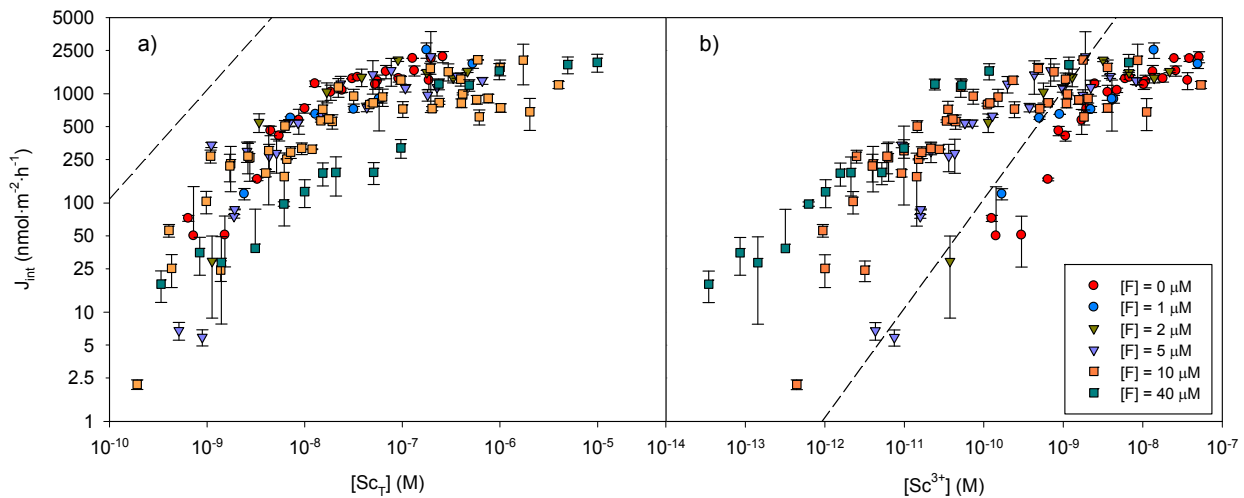


Figure 10 : Flux d'internalisation du Sc ( $J_{int}$ ) chez *C. reinhardtii* à pH 5,00 et de 0 à 40  $\mu\text{M}$  de  $F^-$ , en fonction **a)** de la concentration en Sc totale mesurée ( $[Sc_T]$ ) et **b)** de la concentration en  $Sc^{3+}$  calculée ( $[Sc^{3+}]$ ) dans les milieux d'exposition. Valeurs déterminées par régressions linéaires des mesures de  $Sc_{acc}$  en fonction du temps dans des expositions à court terme. Les droites en tirets correspondent aux estimations des flux de diffusion maximaux de **a)**  $Sc_T$  et **b)**  $Sc^{3+}$  de la solution vers la surface biologique (équation 23).

À chaque  $[F^-]$ , les valeurs de  $J_{int}$  augmentaient avec  $[Sc_T]$  et  $[Sc^{3+}]$  jusqu'à l'atteinte du plateau de saturation. De manière similaire aux expériences à pH variable, l'effet inhibiteur des fluorures était très faible sur les valeurs de  $J_{int}$  pour une même  $[Sc_T]$  (figure 10a). Ainsi, ces flux augmentaient avec  $[F^-]$  pour une même  $[Sc^{3+}]$  (figure 10b). Cette tendance se reflétait dans l'augmentation des valeurs de  $K_{Sc-Rint}$  (apparentes au pH et à  $[F^-]$ ) obtenues par régression des valeurs de  $J_{int}$  à chaque  $[F^-]$  avec l'équation 20 (équation du MLB sans compétiteur) (tableau 6). Notons que la valeur de  $K_{Sc-Rint}$  calculée à 0  $\mu\text{M}$  de  $F^-$  ( $10^{8,46}$  [ $10^{8,17} - 10^{8,64}$ ]  $\text{M}^{-1}$ ) n'était pas

significativement différente de celle précédemment estimée sous les mêmes conditions expérimentales mais avec rinçage des algues à l'EDTA ( $10^{8,53}$  [ $10^{8,33} - 10^{8,66}$ ]  $M^{-1}$ , cf. tableau 5) (test t,  $p > 0,05$ ). Comme observé pour le pH,  $F^-$  n'avait pas d'effet sur  $J_{max}$  et donc sur la capacité du système de transport du Sc chez *C. reinhardtii*, dans la gamme de  $[F^-]$  testée. La variabilité observée sur les valeurs de  $J_{max}$  a une nouvelle fois été attribuée à la variabilité biologique entre les différentes cultures algales utilisées pour ces expériences.

Tableau 6 : Résultats des régressions des valeurs de  $J_{int}$  chez *C. reinhardtii* avec l'équation 20 (équation du MLB sans compétiteur), à chaque  $[F^-]$  testée. Les valeurs ne partageant aucune lettre commune sont significativement différentes (test t avec correction FDR,  $\alpha = 0,05$ ).

$[F^-]$ ( $\mu M$ )	$R^2$	n	$J_{max} \pm$ erreur type ( $nmol \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ )	log $K_{Sc-Rint}$ apparente et intervalle de confiance à 95%
0	0,90	22	$1980 \pm 130^a$	8,46 [8,17 – 8,64] <sup>a</sup>
1	0,77	8	$2440 \pm 500^{ab}$	8,36 [n.a. – 8,75] <sup>a</sup>
2	0,88	8	$1710 \pm 140^a$	9,56 [n.a. – 9,90] <sup>ab</sup>
5	0,80	21	$1520 \pm 130^{ab}$	9,90 [9,20 – 10,15] <sup>bc</sup>
10	0,67	45	$1220 \pm 80^b$	10,37 [9,88 – 10,59] <sup>cd</sup>
40	0,92	15	$1970 \pm 120^a$	10,63 [10,12 – 10,86] <sup>d</sup>

n.a. : non applicable (limite inférieure <0)

Selon le MLB, l'effet des fluorures sur la prise en charge des métaux se limite à un effet de spéciation (*i.e.* à la complexation de  $Sc^{3+}$  par  $F^-$ ), contrairement à l'effet du pH où la compétition du proton doit généralement aussi être prise en compte. Ainsi, l'augmentation de  $[F^-]$  de 0 à 40  $\mu M$ , en diminuant d'environ 2000 fois  $[Sc^{3+}]$  pour une même  $[Sc_T]$ , aurait dû considérablement diminuer l'internalisation du Sc. En revanche, pour une même  $[Sc^{3+}]$ , l'augmentation de  $[F^-]$  de 0 à 40  $\mu M$  n'aurait pas dû faire varier les valeurs de  $J_{int}$  et les valeurs apparentes de  $K_{Sc-Rint}$ . En conséquence, les prédictions du MLB ( $J_{int, calc}$ ) réalisées avec l'équation 20, où  $K_{Sc-Rint}$  était fixée à  $10^{8,46} M^{-1}$  (*i.e.* valeur à  $[F^-] = 0 M$ ), étaient inférieures aux valeurs de  $J_{int, obs}$  en présence de fluorures (figure 11) :  $J_{int, obs} = [1 - 2] \cdot J_{int, calc}$  à  $[F^-] = 1 \mu M$ ,  $J_{int, obs} = [1 - 10] \cdot J_{int, calc}$  à  $[F^-] = 2 \mu M$ ,  $J_{int, obs} = [1 - 80] \cdot J_{int, calc}$  à  $[F^-] = 5 \mu M$ ,  $J_{int, obs} = [1 - 180] \cdot J_{int, calc}$  à  $[F^-] = 10 \mu M$  et  $J_{int, obs} = [1 - 900] \cdot J_{int, calc}$  à  $[F^-] = 40 \mu M$ . Cette régression avait un  $R^2$  faible de 0,24 et une importante erreur type de l'estimation  $s_{y,x}$  de  $835 nmol \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ .

Ces mêmes tendances ont été observées à un pH plus élevé (pH 6,50 pour  $[F^-] = 0$  et  $50 \mu\text{M}$ ) (voir les figures SI.3 et SI.5a et le tableau SI.3 de l'article 3).

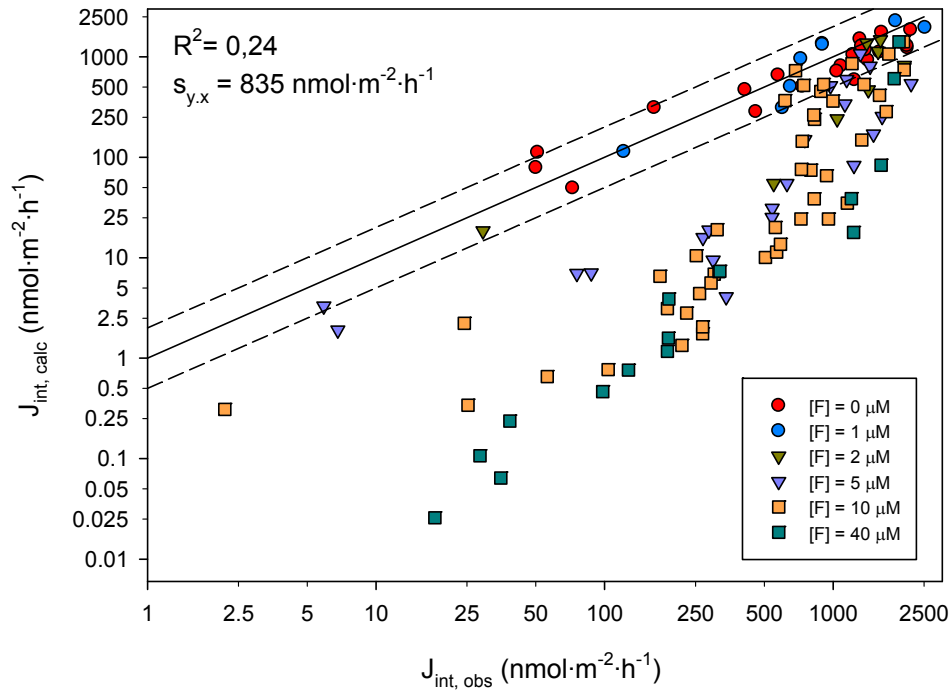


Figure 11 : Valeurs des flux d'internalisation du Sc calculées avec l'équation 20 (équation du MLB sans compétition de  $\text{H}^+$ ), en fonction de celles déterminées expérimentalement entre 0 et  $40 \mu\text{M}$  de  $\text{F}^-$  et à pH 5,00 chez *C. reinhardtii* ( $n = 134$ ). Les droites 1:1 (ligne pleine), 1:2 et 2:1 (lignes en tirets) sont tracées pour comparaison.

#### 4.2.3.2 Chez *P. subcapitata*

Les valeurs de  $J_{\text{int}}$  chez *P. subcapitata* à pH = 5,00 présentait le même ordre de grandeur que celles observées chez *C. reinhardtii*, avec des valeurs légèrement plus faibles pour les mêmes conditions expérimentales. À  $0 \mu\text{M}$  de  $\text{F}^-$ , l'inflexion de la courbe  $J_{\text{int}} = f([\text{Sc}^-] \text{ ou } [\text{Sc}^{3+}])$  observée à  $J_{\text{int}} \sim 80 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  indiquait la présence de deux types de transporteurs du Sc à la surface de *P. subcapitata* dans la gamme de concentration en Sc testée (figures 12a et 12b) : un premier transporteur de faible capacité/haute affinité et un deuxième transporteur de haute capacité/faible affinité. La modélisation des valeurs de  $J_{\text{int}}$  avec l'équation 20 a permis d'obtenir

une valeur de  $J_{\max(1)}$  de  $76 \pm 9 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  et de  $K_{\text{Sc-Rint}(1)}$  apparente de  $10^{9,47} [10^{8,55} - 10^{9,75}] \text{ M}^{-1}$  ( $R^2 = 0,85$ ,  $n = 11$ ) pour ce premier transporteur. En raison de l'absence de saturation pour le deuxième transporteur observé à  $0 \mu\text{M}$  de  $\text{F}^-$  et pour les flux mesurés à  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{F}^-$ , ces flux n'ont pas pu être modélisés avec l'équation 20. L'effet des fluorures sur les valeurs de  $J_{\text{int}}$  était cependant visuellement appréciable : comme chez *C. reinhardtii*, l'augmentation de  $[\text{F}^-]$  n'a entraîné qu'une faible inhibition des valeurs de  $J_{\text{int}}$ , non proportionnelle à la baisse de  $[\text{Sc}^{3+}]$  d'un facteur 67 prédite par les calculs thermodynamiques. Ainsi, il est probable que l'incapacité du MLB à modéliser les flux d'internalisation du Sc à  $[\text{F}^-]$  variable soit généralisable chez d'autres espèces de phytoplancton.

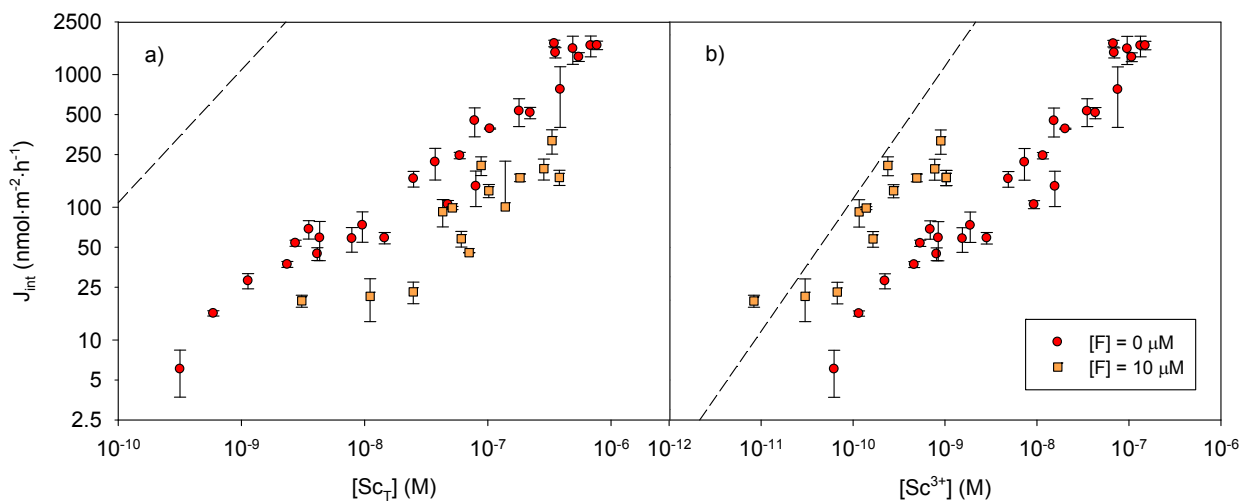


Figure 12 : Flux d'internalisation du Sc ( $J_{\text{int}}$ ) chez *P. subcapitata* à pH 5,00 et  $[\text{F}^-] = 0$  et  $10 \mu\text{M}$ , en fonction **a)** de la concentration en Sc totale mesurée ( $[\text{Sc}_T]$ ) et **b)** de la concentration en  $\text{Sc}^{3+}$  calculée ( $[\text{Sc}^{3+}]$ ) dans les milieux d'exposition. Valeurs déterminées par régressions linéaires des mesures de  $\text{Sc}_{\text{acc}}$  en fonction du temps dans des expositions à court terme. Les droites en tirets correspondent aux estimations des flux de diffusion maximaux de **a)**  $\text{Sc}_T$  et **b)**  $\text{Sc}^{3+}$  de la solution vers la surface biologique (équation 23).

En conclusion sur ces expositions à court terme, l'augmentation de  $[\text{F}^-]$  ou de  $[\text{OH}^-]$  (*i.e.* du pH) dans les milieux d'exposition résultait en une diminution de  $[\text{Sc}^{3+}]$  jusqu'à des niveaux extrêmement faibles, sans que cela ne se répercute par une baisse proportionnelle des flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii* et chez *P. subcapitata*. Dans la section suivante, nous présentons les différentes hypothèses qui ont été envisagées pour expliquer ces résultats déviant des prédictions du MLB.



#### 4.2.4 Étude de la déviation aux prédictions du MLB

##### 4.2.4.1 Hypothèse 1 : changement du potentiel membranaire de *C. reinhardtii* avec le pH

Certaines propriétés physico-chimiques des milieux d'exposition peuvent affecter la membrane biologique et donc de façon indirecte l'internalisation des métaux (Hassler et al., 2004b; Kinraide, 2006; Lavoie et al., 2012). De tels effets ne sont pas pris en compte par le MLB. Nous n'avons pas observé de différences sur les valeurs de flux maximal en variant  $[F^-]$  ou le pH. Ainsi, si un changement s'opérait à la surface biologique, celui-ci ne concernait pas la conformation ou le nombre des sites de transport du Sc. Les fluorures, aux concentrations testées dans cette étude, n'ont pas d'effet rapporté sur les membranes biologiques. Ainsi, il est improbable que l'effet de  $[F^-]$  sur l'internalisation du Sc puisse être expliqué par un changement des propriétés membranaires des algues. En revanche, il est désormais bien établi que les cations en solution (p. ex.  $H^+$ ) peuvent, en se liant aux sites déprotonés de la surface biologique, affecter le potentiel membranaire négatif de celle-ci. Or, ce potentiel, en exerçant une attraction électrostatique sur les cations en solution, enrichit leurs concentrations dans la paroi cellulaire par rapport à la solution externe (avec un enrichissement variant selon la charge du cation). Ainsi, une variation du potentiel membranaire entraîne une variation de la concentration en cations dans la paroi cellulaire. Plusieurs études ont rapporté un effet du pH sur le potentiel membranaire des algues unicellulaires (Hassler et al., 2004b; Slaveykova et Wilkinson, 2003). Il est possible de le prendre en compte dans l'équation du MLB, en remplaçant les concentrations des différents cations en solution par celles estimées dans la paroi cellulaire. Dans notre étude à pH variable, le flux d'internalisation du Sc serait alors exprimé par l'équation 22 :

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}} \cdot K_{\text{Sc-Rint}} \cdot [\text{Sc}^{3+}]_{\text{paroi cellulaire}}}{1 + K_{\text{Sc-Rint}} \cdot [\text{Sc}^{3+}]_{\text{paroi cellulaire}} + K_{\text{H-Rint}} \cdot [\text{H}^+]_{\text{paroi cellulaire}}} \quad \text{éq. (22)}$$

Les concentrations  $[\text{Sc}^{3+}]_{\text{paroi cellulaire}}$  et  $[\text{H}^+]_{\text{paroi cellulaire}}$  ont été estimées chez *C. reinhardtii* dans la gamme de pH [4,50 – 7,90] à partir de mesures de mobilité électrophorétique. Deux augmentations significatives de la mobilité électrophorétique (et donc du potentiel membranaire négatif) de *C. reinhardtii* ont été observées de pH 4,50 à 5,00 et de pH 7,00 à 7,50 (figure 13). Nous avons attribué ces augmentations à la déprotonation de groupements carboxyliques puis amines présents dans la paroi cellulaire de l'algue, quoique selon le pKa des amines, leur déprotonation devrait plutôt se situer entre pH 8 et 10 (Adhiya et al., 2002; Kiefer et al., 1997).

Nos estimations du facteur d'enrichissement de  $Sc^{3+}$  dans la paroi cellulaire par rapport à la solution externe variaient de 5 à 12 entre pH 4,50 et 7,90 (voir l'annexe A). Cet effet du pH était d'une amplitude trop faible pour expliquer l'effet du pH sur les flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii*. En effet, il ne permettait pas d'améliorer significativement la prédiction de  $J_{int}$  : la modélisation des valeurs de  $J_{int}$  de pH 4,50 à 7,90 avec l'équation 22 menait à un  $R^2$  de 0,71 et à une valeur de  $s_{y,x}$  de  $466 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ .

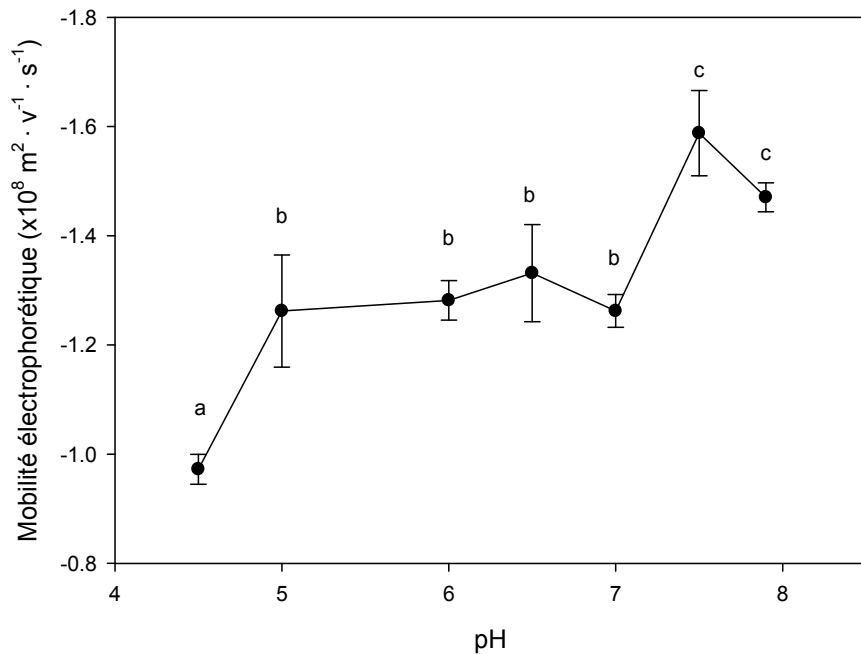


Figure 13 : Mobilité électrophorétique de cellules de *C. reinhardtii* exposées de pH 4,50 à 7,90. Moyennes  $\pm$  écarts types ( $n = 3$ ). Axe des ordonnées avec valeurs en ordre inverse.

#### 4.2.4.2 Hypothèse 2 : internalisation sous contrôle dynamique

Le MLB stipule que l'internalisation du métal à travers la membrane biologique est l'étape limitante du processus de prise en charge et qu'il y a donc équilibre thermodynamique entre les espèces métalliques en solution et celles liées aux sites de transport à la surface biologique. Pour respecter cette prémisse, le flux d'internalisation du métal doit être inférieur à la cinétique de complexation du métal avec le transporteur membranaire (*i.e.* l'internalisation n'est pas sous contrôle cinétique) et au flux de diffusion de l'ion libre de la solution à la membrane biologique (*i.e.* l'internalisation n'est pas sous contrôle diffusif). À nos connaissances, un seul cas

d'internalisation sous contrôle cinétique a été rapporté avec le phytoplancton, à savoir avec le fer chez la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* par Hudson et Morel (1990). Nous avons supposé ici que cette hypothèse était peu probable car la cinétique de complexation du Sc est relativement rapide (cf. tableau 1). Le cas d'une internalisation sous contrôle diffusif a en revanche été considéré. Dans ce cas, la rapide prise en charge de l'ion libre par rapport à sa diffusion de la solution externe engendre une déplétion de cette espèce à la surface biologique. Lorsque des complexes métalliques suffisamment labiles sont présents en solution, cette déplétion provoque leur dissociation pour tenter de ramener l'ion libre à sa concentration d'équilibre. Ainsi, ces complexes participent indirectement au processus de prise en charge, qui ne dépend donc plus de la concentration en ion libre seule. Pour estimer si l'internalisation du Sc était sous un tel contrôle dynamique dans nos expériences, nous avons comparé, sous chaque condition expérimentale, le flux d'internalisation mesuré avec le flux de diffusion maximal de  $Sc^{3+}$  calculé par l'équation suivante :

$$J_{diff}(Sc^{3+})_{max} = D_{Sc^{3+}} \cdot \left( \frac{1}{r_c} + \frac{1}{\delta} \right) \cdot [Sc^{3+}] \quad \text{éq. (23)}$$

où  $r_c$  est le rayon de l'algue,  $\delta$  est l'épaisseur de la couche de diffusion et  $D_{Sc^{3+}}$  est le coefficient de diffusion de  $Sc^{3+}$  à 25°C. Nous avons fait l'hypothèse que *P. subcapitata* était une algue sphérique ( $r_c = 4,4 \mu m$ ), de même que *C. reinhardtii* ( $r_c = 2,5 \mu m$ ). La valeur de  $\delta$  chez *C. reinhardtii* a été calculée avec l'équation de Levich (1962) et les approximations de Whitfield et Turner (1979) pour une algue motile. La même valeur de  $\delta$  a été attribuée pour *P. subcapitata*, bien que cette algue soit non motile. L'absence de motilité de *P. subcapitata* implique que sa couche de diffusion est probablement plus épaisse que celle de *C. reinhardtii* (i.e.  $\delta > 8 \mu m$ ). Cependant, comme l'indique l'équation 23, lorsque la valeur de  $\delta$  devient importante devant celle de  $r_c$ , l'effet de  $\delta$  sur le flux de diffusion devient négligeable. Une différence de seulement 30 % était observée sur  $J_{diff}(Sc^{3+})_{max}$  en augmentant  $\delta$  de 8 à 30  $\mu m$  chez *P. subcapitata*.

Chez *P. subcapitata*, les valeurs de  $J_{int}$  mesurées étaient quasiment toutes inférieures aux valeurs de  $J_{diff}(Sc^{3+})_{max}$  calculées dans chaque condition testée ( $J_{int} < 10 \cdot J_{diff}(Sc^{3+})_{max}$ ) (cf. figure 12b). En revanche chez *C. reinhardtii*, les valeurs de  $J_{int}$  obtenues à pH > 5,00 et à  $[F] > 1 \mu M$  étaient supérieures aux valeurs de  $J_{diff}(Sc^{3+})_{max}$  calculées (cf. figures 8b et 10b). Ainsi, pour ces expositions, nos calculs prédisaient une internalisation sous contrôle dynamique et non pas thermodynamique. Cependant, nos observations expérimentales étaient en contradiction

avec cette prédiction. En effet, les flux d'internalisation mesurés à chaque pH et  $[F^-]$  présentaient une cinétique d'accumulation de type Michaelis-Menten, dont le formalisme mathématique nécessite un système à l'équilibre. En revanche, un flux d'internalisation sous contrôle dynamique, qui dépend de la vitesse de dissociation et/ou de la diffusion des espèces labiles, ne devrait pas présenter de saturation. De plus, une diffusion limitante de  $Sc^{3+}$  n'était pas prédite à pH 4,50 ( $J_{int} < 8 \cdot J_{diff}(Sc^{3+})_{max}$ ) et à pH 5,00 ( $J_{int} < 5 \cdot J_{diff}(Sc^{3+})_{max}$ ). Ainsi, quelle que soit l'augmentation de  $[F^-]$  ou du pH, la prise en charge du Sc ne devrait pas être sous diffusion limitante pour des mêmes  $[Sc^{3+}]$ . Enfin, même en ignorant ces faits et en calculant les flux d'internalisation du Sc avec le logiciel de calculs de flux d'internalisation dynamiques FLUXY (Zhang et al., 2008), la labilité des hydroxo-complexes et des fluoro-complexes était très insuffisante, dans l'échelle temporelle du système étudié, pour soutenir les importants flux d'internalisation du Sc mesurés chez *C. reinhardtii* à faibles  $[Sc^{3+}]$  (voir les tableaux SI.3 et SI.4 de l'article 1).

Ceci nous a amené à la conclusion que les flux d'internalisation du Sc que nous avons mesurés chez *C. reinhardtii* à pH > 5,00 et à  $[F^-] > 1 \mu M$  (*i.e.* où  $J_{diff}(Sc^{3+})_{max} < J_{int}$ ) n'étaient physiquement pas réalistes si l'on se base sur la concentration en  $Sc^{3+}$  en solution. La seule hypothèse permettant d'expliquer le maintien des conditions d'équilibre entre la solution et les sites de transport dans ces conditions était l'association de complexes du Sc avec les transporteurs membranaires (formation d'un complexe ternaire : ligand-métal-transporteur), suivi de l'internalisation du métal. Cette dernière hypothèse est décrite dans la section suivante.

#### 4.2.4.3 Hypothèse 3 : formation d'un complexe ternaire avec le site de transport du Sc

Comme détaillé dans l'introduction, quelques études antérieures ont suggéré l'internalisation de fluoro-complexes d'Al chez les organismes aquatiques ou chez les plantes supérieures (Gallon et al., 2004; Nagata et al., 1993; Stevens et al., 1997; Wilkinson et al., 1990; Xie et al., 2001). À noter qu'en raison de la très forte affinité de l'Al pour les surfaces biologiques, il est très probable qu'une partie non négligeable de l'Al bioaccumulé était en réalité associé aux surfaces biologiques dans ces études, malgré la réalisation de rinçages plus ou moins puissants. Contrairement à l'internalisation de fluoro-complexes, l'hypothèse de l'internalisation d'hydroxo-complexes d'Al a pu être beaucoup moins clairement établie, en raison notamment des multiples effets du pH sur la prise en charge métallique difficilement différenciables (*i.e.* changement de

spéciation du métal, inhibition compétitive et inhibition non compétitive). Avec une méthodologie analogue à celle que nous avons employée dans cette étude (*i.e.* mesure de flux d'internalisation), Slaveykova et Wilkinson (2003) ont suggéré l'internalisation d'hydroxo-complexes (et de carbonato-complexes) de Pb chez l'algue verte *Chlorella kesslerii*. Ainsi, il existe un certain nombre de précédents pour l'hypothèse de l'internalisation d'hydroxo- et de fluoro-complexes de métaux. Un mécanisme proposé est celui de la formation d'un complexe ternaire à la surface biologique, suivi de l'internalisation du métal (cf. équation 16).

Dans notre étude, seule l'hypothèse de la participation de complexes du Sc au flux d'internalisation permettait d'expliquer les fortes valeurs de  $J_{int}$  observées chez *C. reinhardtii* aux faibles  $[Sc^{3+}]$  (*i.e.* à  $pH > 5,00$  et à  $[F^-] > 1 \mu M$ , où  $J_{diff}(Sc^{3+})_{max} < J_{int}$ ). Plus précisément, nous avons estimé que la contribution à la prise en charge du Sc de  $ScOH^{2+}$ ,  $Sc(OH)_2^+$  et  $ScF^{2+}$  permettait de lever la limitation diffusive à  $pH > 5,00$  et à  $[F^-] > 1 \mu M$ . Cette estimation a été réalisée en calculant le flux de diffusion maximal de chaque complexe de Sc en solution avec l'équation 23, en faisant comme approximation  $D_{Sc^{3+}} \sim D_{Sc-OH} \sim D_{Sc-F}$  ( $OH^-$  et  $F^-$  étant des ligands de petites tailles) (Buffle et al., 2007).

L'hypothèse de la formation d'un complexe ternaire à la surface cellulaire était aussi supportée par nos résultats d'adsorption ( $Sc_{ads}$ ). En effet, la quantité de Sc non désorbé de la surface biologique de *C. reinhardtii* par le rinçage à l'EDTA (expériences à  $pH$  variable, figure 14) ou par le rinçage multiple sans EDTA (expériences à  $[F^-]$  variable, figure 15) présentait les mêmes tendances avec  $[Sc_T]$  et  $[Sc^{3+}]$  que le flux d'internalisation : alors que les profils d'adsorption pour une même  $[Sc_T]$  étaient relativement bien superposés, les valeurs de  $Sc_{ads}$  augmentaient avec le  $pH$  et  $[F^-]$  pour une même concentration en  $[Sc^{3+}]$ . Même en prenant en compte la compétition du proton pour l'adsorption du Sc, un effet du  $pH$  persistait sur  $Sc_{ads}$  (voir l'annexe B). Les mêmes tendances étaient observées sur les valeurs de  $Sc_{ads}$  mesurées chez *P. subcapitata* à  $pH 5,00$  et  $[F^-] = 0$  et  $10 \mu M$  (voir la figure 1 de l'article 3) et chez *C. reinhardtii* de  $[F^-] = 0$  à  $50 \mu M$  à  $pH 6,50$  (voir la figure SI.3 de l'article 3). Ces observations suggèrent que des complexes de Sc intacts se lient à la surface biologique. Précisons que la surface biologique est composée d'une multitude de sites de liaison pour le métal et que tous ces sites ne peuvent être considérés comme sensibles (et bien évidemment encore moins comme des sites d'internalisation). Cependant, il n'y a pas de raison pour que l'interaction du métal aux sites sensibles de la surface biologique se produise de manière différente que celle aux sites non spécifiques.

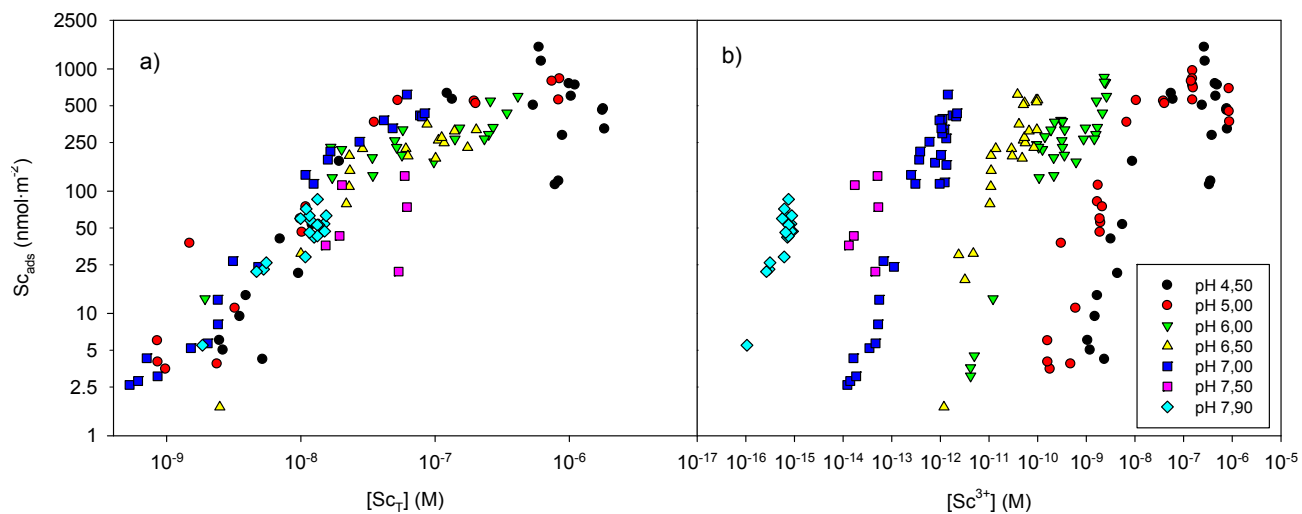


Figure 14 : Scandium adsorbé à la surface de *C. reinhardtii* ( $Sc_{ads}$ ) exposée de pH 4,50 et 7,90 et rincée à l'EDTA, en fonction **a)** de la concentration en Sc totale mesurée ( $[Sc_T]$ ) et **b)** de la concentration en  $Sc^{3+}$  calculée ( $[Sc^{3+}]$ ) dans les milieux d'exposition. Valeurs déterminées par régressions linéaires des mesures de  $Sc_{acc}$  en fonction du temps dans des expositions à court terme.

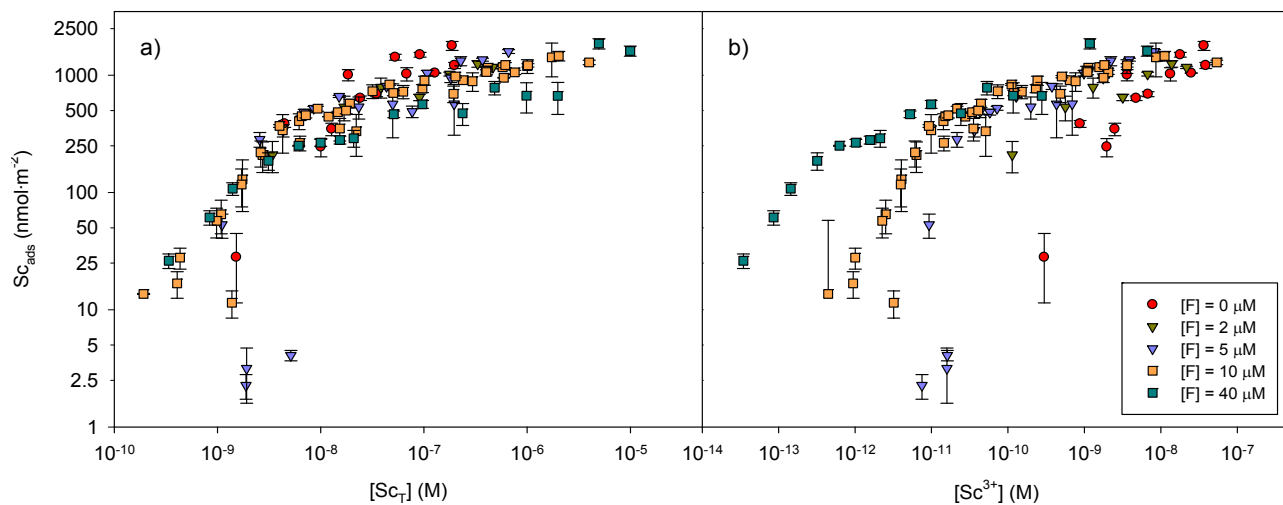


Figure 15 : Scandium adsorbé à la surface de *C. reinhardtii* ( $Sc_{ads}$ ) exposée entre 0 et 40 μM de  $F^-$  et rincée 10 fois sans EDTA, en fonction **a)** de la concentration en Sc totale mesurée ( $[Sc_T]$ ) et **b)** de la concentration en  $Sc^{3+}$  calculée ( $[Sc^{3+}]$ ) dans les milieux d'exposition. Valeurs déterminées par régressions linéaires des mesures de  $Sc_{acc}$  en fonction du temps dans des expositions à court terme.

Nous n'avons observé qu'une seule valeur de  $J_{\max}$  chez *C. reinhardtii* dans nos expériences à pH et à  $[F^-]$  variables, ce qui signifie qu'il n'y avait qu'un seul type de transporteur impliqué dans la prise en charge du Sc chez cette algue dans les conditions expérimentales testées. Ainsi, si des complexes participaient à l'internalisation par la formation de complexes ternaires de surface, cette internalisation devait se faire via le même transporteur ( $R_{\text{int}}$ ) et à la même vitesse ( $k_{\text{int}}$ ) que l'ion libre  $\text{Sc}^{3+}$ . Alors que ces contraintes peuvent paraître peu réalistes, un certain appui à ce mécanisme de transport est apporté par les récents travaux sur le transport du magnésium à travers les membranes biologiques (Dudev et Lim, 2013; Li et al., 2001; Moomaw et Maguire, 2010). Le magnésium interagit initialement avec le transporteur sous sa forme hydratée  $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  via la formation d'un complexe de sphère externe (Mg-H<sub>2</sub>O-transporteur). Durant le processus de translocation transmembranaire, les molécules de H<sub>2</sub>O entourant le cation central sont ensuite progressivement retirées. Cette déshydratation est réalisée grâce à des interactions transitoires entre le cation central et des groupements donneurs d'électrons présents à l'intérieur du transporteur, permettant de compenser le coût énergétique de la déshydratation. Ainsi, le Mg entre finalement dans la cellule sous sa forme libre ou partiellement déshydraté. Il est intéressant de faire remarquer que selon Dudev et Lim (2013), l'interaction initiale de  $\text{Mg}^{2+}$  avec le transporteur sous la forme d'un complexe de sphère externe est due à la forte polarisation des liaisons de Mg-H<sub>2</sub>O, elle-même due à la forte densité de charge de l'ion central  $\text{Mg}^{2+}$ . Les charges +3 des ions  $\text{Al}^{3+}$  et  $\text{Sc}^{3+}$ , combinées à leurs rayons ioniques relativement faibles, leur confèrent aussi un pouvoir polarisant relativement élevé. Ainsi, il ne serait pas exclu que leur liaison initiale avec leurs transporteurs respectifs se produise selon un mode de sphère externe. Par ailleurs, l'Al est reconnu pour inhiber la prise en charge du Mg chez les plantes supérieures et la raison évoquée est la très grande analogie entre les aquo-ions  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  et  $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  (taille et géométrie) (Bose et al., 2011; Rengel, 1990; Rengel et Robinson, 1989).

#### **4.2.5 Modélisation des flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii* dans l'ensemble de la gamme de pH et de $[F^-]$**

Avec l'hypothèse de la participation d'hydroxo- et de fluoro-complexes à la prise en charge du Sc chez *C. reinhardtii*, des modifications de l'équation du MLB étaient nécessaires pour modéliser les valeurs de  $J_{\text{int}}$  observées dans l'ensemble de la gamme de pH et de  $[F^-]$ .

Différentes formulations du flux d'internalisation permettaient une bonne convergence vers nos données expérimentales, démontrant que des convergences fortuites avaient lieu (voir p. ex. les figures 5 et SI.6 de l'article 1). En effet, l'augmentation du nombre de paramètres ajustables dans l'équation du MLB, par l'ajout de la contribution d'hydroxo- et de fluoro-complexes, augmentait sa « flexibilité » et donc sa probabilité de converger vers les observations expérimentales. En faisant l'hypothèse que les complexes de Sc les plus susceptibles d'être liés au transporteur de  $Sc^{3+}$  étaient les moins substitués (*i.e.* les plus proches de  $Sc^{3+}$ ) et en respectant la condition  $J_{diff}(Sc)_{max} > J_{int}$ , l'internalisation de  $Sc^{3+}$ ,  $ScOH^{2+}$ ,  $Sc(OH)_2^+$  et  $ScF^{2+}$  devait au minimum être prise en compte dans la modélisation de  $J_{int}$  chez *C. reinhardtii*. Ainsi, l'équation modifiée du MLB devait au moins contenir ces quatre espèces, et probablement aussi l'inhibition compétitive de  $H^+$ , ce qui menait à une équation à cinq paramètres ajustables! Un modèle simple permettant de modéliser ces flux a cependant retenu notre attention. Ce modèle, décrit par l'équation 24, a été construit sur l'observation que pour une même  $[Sc_T]$ , les valeurs de  $J_{int}$  étaient peu affectées par le pH et par  $[F^-]$  chez *C. reinhardtii*.

$$J_{int} = \frac{J_{max} \cdot K_{Sc-Rint} \cdot [Sc_T]}{1 + K_{Sc-Rint} \cdot [Sc_T]} \quad \text{éq. (24)}$$

Le modèle convergeait vers  $K_{Sc-Rint} = 10^{7,49} [10^{7,44} - 10^{7,53}] M^{-1}$  et prédisait relativement bien les flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii* dans l'ensemble des conditions expérimentales testées ( $R^2 = 0,81$  et  $s_{y,x} = 370 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) (figure 16). Cependant, ce modèle présumait que toutes les espèces de Sc (ion libre, hydroxo- et fluoro-complexes) étaient internalisées par un même transporteur pour lequel elles présentaient toutes la même affinité. Ces prémisses semblent très peu réalistes si l'on considère l'état actuel des connaissances sur la prise en charge des métaux. Par exemple, il apparaît très peu probable que des espèces aussi différentes sur le plan physico-chimique que  $Sc^{3+}$  et  $ScF_3$  puissent présenter exactement la même affinité pour un même site de transport. Ainsi, la bonne convergence de ce modèle était probablement fortuite. Cependant, ce modèle à la fois extrêmement simple et capable de prédire les flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii* dans une large gamme de pH et de  $[F^-]$  mérite considération.



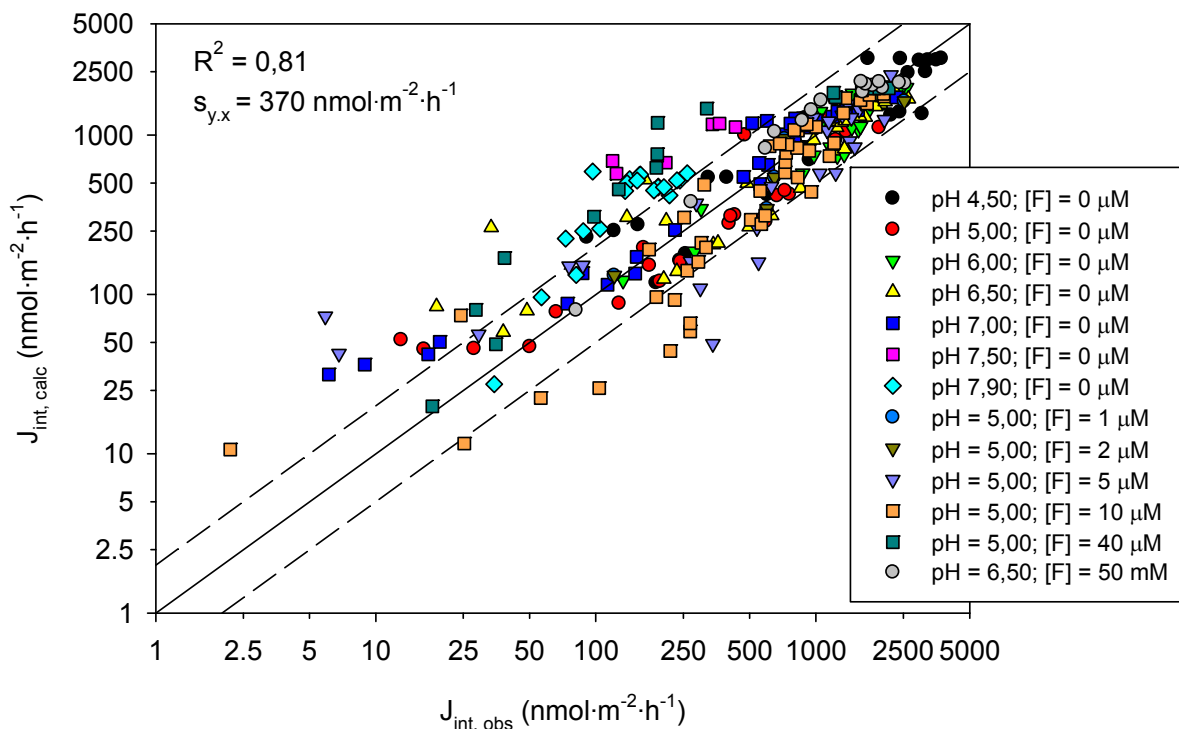


Figure 16 : Flux d'internalisation du Sc calculés avec l'équation 24 en fonction des flux d'internalisation déterminés expérimentalement chez *C. reinhardtii* de pH 4,50 à 7,90 et de [F] = 0 à 50  $\mu\text{M}$ . Les droites 1:1 (ligne pleine), 1:2 et 2:1 (lignes en tirets) sont tracées pour comparaison.

### 4.3 Tests de l'analogie entre l'Al et le Sc

#### 4.3.1 Compétition entre l'Al et le Sc pour l'internalisation chez *C. reinhardtii*

En raison de pertes variables en Sc dissous par adsorption sur les parois des fioles, les valeurs de  $[\text{Sc}_T]$  variaient entre 3,7 et 7,3 nM (moyenne de  $[\text{Sc}_T] = 5,7 \pm 1,1 \text{ nM}$ ,  $n = 15$ ) dans les solutions d'exposition préparées pour cette expérience. Le Sc était à ~ 20 % sous sa forme libre dans ces milieux de pH 5,00 (cf. figure 7). Ces valeurs correspondaient à une variation de  $[\text{Sc}^{3+}]$  entre 0,74 et 1,5 nM (moyenne de  $[\text{Sc}^{3+}] = 1,1 \pm 0,22 \text{ nM}$ ,  $n = 15$ ). Pour s'affranchir au maximum de cette variabilité expérimentale dans notre interprétation des résultats, l'effet de l'Al a été observé sur les valeurs de  $J_{\text{int}}$  normalisées par la valeur de  $[\text{Sc}^{3+}]$  calculée dans chaque milieu

d'exposition ( $J_{int}^* = J_{int}/[Sc^{3+}]$ ). Cette normalisation était justifiée car, dans l'étroite gamme de valeurs de  $[Sc^{3+}]$  observées, les valeurs de  $J_{int}$  correspondantes se situaient dans une partie quasi-linéaire de la courbe  $J_{int} = f([Sc^{3+}])$  (cf. figure 8b). Contrairement aux concentrations en Sc, les concentrations en Al étaient relativement élevées et très proches de leurs valeurs nominales (écart < 10%) dans les milieux d'exposition. Dans ces solutions, l'Al était à ~ 50 % sous sa forme libre (voir le tableau 2 de l'article 2).

Nous n'avons pas observé de tendance significative entre les valeurs de  $J_{int}^*$  et  $[Al_T]$ , la seule différence significative étant observée entre les valeurs de  $J_{int}^*$  à  $[Al_T] = 670$  et  $2820$  nM (figure 17).

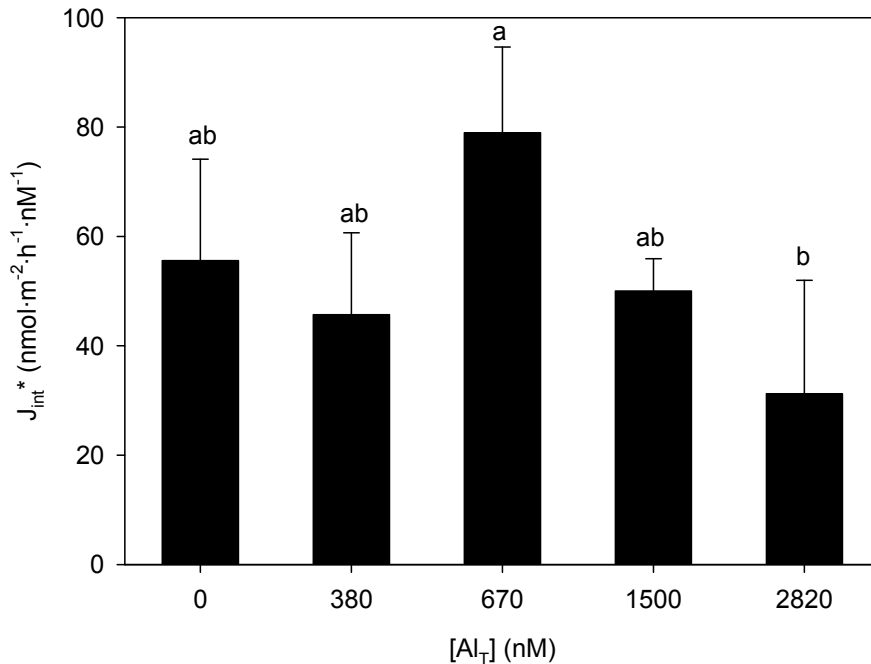


Figure 17 : Effet de la concentration en Al sur les flux d'internalisation du Sc normalisés (par la concentration en  $Sc^{3+}$ ) chez *C. reinhardtii* à pH 5,00 et  $[Sc_T] = 5,7 \pm 1,1$  nM. Moyennes  $\pm$  écarts types ( $n = 3$ ). Les moyennes ne partageant pas de lettres communes sont significativement différentes (Tukey,  $p < 0,05$ ).

Pour exprimer ces résultats dans le langage du MLB, nous avons décrit la compétition de l'Al sur les flux d'internalisation du Sc avec l'équation 25, où  $K_{Al-Rint}$  est la constante d'affinité de l'Al pour le transporteur membranaire du Sc. La compétition de  $H^+$  dans cette équation a été

indirectement prise en compte, en y intégrant la constante apparente  $K_{Sc-Rint}$  déterminée à pH 5,00.

$$J_{int} = \frac{J_{max} \cdot K_{Sc-Rint} \cdot [Sc^{3+}]}{1 + K_{Sc-Rint} \cdot [Sc^{3+}] + K_{Al-Rint} \cdot [Al^{3+}]} \quad \text{éq. (25)}$$

Selon l'équation 25, l'absence d'inhibition de l'Al sur les flux d'internalisation du Sc signifie que le terme  $1 + K_{Sc-Rint} \cdot [Sc^{3+}]$  était très supérieur au terme  $K_{Al-Rint} \cdot [Al^{3+}]$ . Les expositions à court terme présentées plus haut ont montré que la constante apparente  $K_{Sc-Rint}$  était  $\approx 10^{8,5} M^{-1}$  à pH 5,00 et  $[F^-] = 0 M$  (cf. tableaux 5 et 6). Ainsi, avec  $[Sc^{3+}] = 1,1 nM$ , le terme  $1 + K_{Sc-Rint} \cdot [Sc^{3+}]$  était  $\approx 1,4$ . En posant ensuite  $[Al^{3+}] = 1400 nM$  (concentration testée la plus élevée), on obtenait une valeur de  $K_{Al-Rint} \ll 10^{5,9} M^{-1}$ . Worms et Wilkinson (2007) ont estimé une constante d'affinité de l'Al de  $10^8 M^{-1}$  pour le transporteur du nickel à pH 5,00 chez *C. reinhardtii*. Ainsi, même si nous ne pouvons pas exclure totalement la possibilité que l'Al emprunte aussi le transporteur membranaire du Sc chez *C. reinhardtii*, cette voie d'entrée ne contribuerait très probablement qu'à une proportion insignifiante du transport de l'Al dans cette algue. Cette expérience a été reproduite à pH 7,00 pour des concentrations en  $Al^{3+}$  jusqu'à 170 fois plus élevées que celles en  $Sc^{3+}$  et aucune inhibition de l'internalisation du Sc n'a non plus été observée (voir la figure SI.1 de l'article 2). Précisons qu'il n'a pas été possible de mesurer l'internalisation de l'Al dans ces différentes expositions à court terme en raison des limites de détection trop élevées avec l'ICP-AES.

Il est reconnu que les transporteurs membranaires sont rarement spécifiques à un seul métal. Par exemple, il a été démontré que l'Al inhibait la prise en charge de plusieurs métaux, comme celle du Co chez la levure (MacDiarmid et Gardner, 1998) ou celle du Mg chez les plantes supérieures (Li et al., 2001). Notons que ces expériences d'inhibition ne permettent pas à elles seules de conclure que le métal compétiteur emprunte le transporteur étudié. En effet, elles permettent uniquement de démontrer que le métal se lie au transporteur et bloque ainsi son accès aux autres cations en solution. La spécificité des transporteurs membranaires pour les cations dépend des propriétés physico-chimiques de ces derniers. Dans le but de modéliser et donc de prédire l'accumulation et la toxicité des métaux chez les organismes, quelques études se sont intéressées à d'identifier ces propriétés clés (p. ex. la charge, la taille et la configuration électronique du cation) (Wolterbeek et Verburg, 2001), mais ces liens demeurent à ce jour empiriques. Il peut apparaître surprenant que  $Al^{3+}$  inhibe la prise en charge de cations tels que

Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ou Ni<sup>2+</sup>, mais pas celle de Sc<sup>3+</sup> avec qui il partage à première vue plus de caractéristiques physico-chimiques communes. Malgré le statut d'analogues chimiques souvent attribué à Sc<sup>3+</sup> et à Al<sup>3+</sup>, ces deux cations présentent des différences qui pourraient expliquer leurs voies d'entrées séparées chez *C. reinhardtii* (cf. tableau 1). Par exemple, les ions Al<sup>3+</sup> et Sc<sup>3+</sup> possèdent des tailles assez différentes, surtout en considérant un numéro de coordination de 8 pour le Sc<sup>3+</sup>, comme les dernières études sur cet élément le suggèrent ( $r_{Al^{3+}} = 0,535 \text{ \AA}$  et  $r_{Sc^{3+}} = 0,870 \text{ \AA}$ ). De plus, du fait de leurs différents numéros de coordination, leurs cations hydratés possèdent des structures distinctes : Al(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>3+</sup> a une conformation octaédrique tandis que Sc(H<sub>2</sub>O)<sub>8</sub><sup>3+</sup> a une conformation prismatique trigonale à trois sommets. Or, comme mentionné plus haut (section 4.2.4), il a été suggéré que l'Al se liait au transporteur du Mg chez les plantes supérieures à cause de la grande analogie entre Al(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>3+</sup> (4,89 Å) et Mg(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>2+</sup> (4,28 Å). Ces différences entre Al(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>3+</sup> et Sc(H<sub>2</sub>O)<sub>8</sub><sup>3+</sup> se retrouvent dans les hydroxo-complexes de ces deux métaux, présents dans nos solutions d'exposition à pH 5,00. Ainsi, même si l'on postule l'internalisation de ces espèces chez *C. reinhardtii*, il est probable que leur différence de tailles les a amenés à se lier à des sites de transport différents à la surface de l'algue. En conclusion, l'absence de compétition entre l'Al et le Sc pour l'internalisation chez *C. reinhardtii* met en évidence leur analogie limitée pour la complexation avec des transporteurs métalliques. En revanche, ces expériences n'excluent pas que ces deux métaux trivalents soient internalisés selon des mécanismes communs, comme le supporte les études ayant rapporté la prise en charge de complexes d'Al chez les organismes aquatiques et les plantes supérieures (Gallon et al., 2004; Stevens et al., 1997; Wilkinson et al., 1990; Xie et al., 2001).

#### 4.3.2 Niveaux d'accumulation de l'Al et du Sc chez *C. reinhardtii* exposée 72 h

La croissance de *C. reinhardtii* était la même pour les cellules exposées pendant 72 h à 4,5 µM d'Al ou de Sc (dans MHSM-1, à pH = 7 et à 380 µM de F<sup>-</sup>) (voir la figure SI.2 de l'article 2). De plus, cette croissance n'était pas différente de celle des algues exposées en l'absence de métal dans ces mêmes conditions (voir la figure SI.3 de l'article 2). Nous avons donc conclu que l'exposition à 4,5 µM d'Al ou de Sc (tous les deux largement sous formes de fluoro-complexes) n'entraînait pas d'effet biologique notable chez *C. reinhardtii*.

Les résultats de cette expérience nous ont montré que *C. reinhardtii* accumulait (métal extra-cellulaire + intra-cellulaire) environ 3,7 fois plus d'Al que de Sc (voir tableau 3 de l'article 2).

Environ 50 % du Sc accumulé était adsorbé à la surface biologique et cette proportion était de 10 à 40 % pour l'Al, selon l'efficacité du rinçage à l'EDTA (discutée dans la section suivante). Ainsi, nous avons estimé que l'Al était entre 3,4 et 5,1 fois plus internalisé que le Sc chez *C. reinhardtii* dans nos conditions expérimentales. Cette différence d'internalisation pouvait être due à un flux d'internalisation plus élevé et/ou à un efflux plus faible de l'Al par rapport au Sc. Nous avons montré que l'Al et le Sc empruntaient des transporteurs principaux différents chez *C. reinhardtii*. Selon les connaissances actuelles sur l'internalisation des métaux, l'amplitude du flux d'internalisation de l'Al et du Sc dépendrait alors d'un grand nombre de facteurs : leur spéciation en solution, leur affinité avec leur transporteur respectif, l'abondance de leurs transporteurs à la surface biologique, leur constante de vitesse d'internalisation et l'amplitude de la compétition générée par les autres cations en solution. Certains de ces facteurs ne dépendent pas directement des propriétés physico-chimiques des métaux. Il n'est donc probablement pas pertinent de considérer l'accumulation totale comme critère d'évaluation de l'analogie entre l'Al et le Sc.

#### **4.3.3 Destins intra-cellulaires de l'Al et du Sc chez *C. reinhardtii* exposée 72 h**

La répartition subcellulaire de l'Al et du Sc chez *C. reinhardtii* est présentée avec ou sans la fraction débris cellulaires dans les figures 18a et 18b respectivement. En ne considérant pas la fraction débris, la distribution relative de l'Al et du Sc dans le milieu intra-cellulaire était quasi-identique. Les pourcentages de ces deux métaux dans les différentes fractions décroissaient dans l'ordre organelles > granules > HSP et HDP. Ces proportions étaient identiques dans chaque fraction, sauf dans la fraction HSP qui contenait significativement plus d'Al que de Sc (test t,  $p < 0,05$ ). En considérant la fraction débris dans laquelle l'Al se partitionnait beaucoup plus que le Sc, le pourcentage de Sc dans la fraction organelle devenait supérieur à celui de l'Al.

La distinction de la distribution intra-cellulaire avec ou sans la fraction débris a été réalisée car il était incertain que le métal présent dans cette fraction soit du métal internalisé (associé au noyau) ou du métal n'ayant pas été désorbé par le rinçage à l'EDTA (associé aux membranes plasmiques et à la paroi cellulaire). En comparant la quantité de métal rincé à l'EDTA et celle associée à la fraction débris, nous avons pu affirmer que l'efficacité de désorption du Sc et de l'Al par l'EDTA était respectivement  $\geq 95\%$  et  $\geq 30\%$ . Il est justifié de suspecter que la désorption de l'Al par l'EDTA était moins efficace que celle du Sc. En effet, si les complexes inorganiques

d'Al et du Sc présentent généralement des constantes de formation similaires, ce n'est pas le cas des complexes avec l'EDTA : dans la base de donnée du NIST (46 version 8.0), la constante de stabilité du complexe  $\text{ScEDTA}^-$  est  $\sim 10^{6,7}$  fois plus élevée que celle du complexe  $\text{AlEDTA}^-$  (à force ionique nulle,  $\log K_{\text{ScEDTA}} = 25,66$  à  $20^\circ\text{C}$  et  $\log K_{\text{AlEDTA}} = 18,96$  à  $25^\circ\text{C}$ ). A noter que dans l'article 2, nous avons par erreur rapporté la valeur de  $\log K_{\text{ScEDTA}}$  à 0,1 M de force ionique (23,1) en la présentant comme la valeur à force ionique nulle. Comme mentionné dans la section 4.1, une discrimination efficace de l'Al intra- et extra-cellulaire par l'EDTA n'a jamais été rapportée dans la littérature. Il est donc très probable qu'une proportion non négligeable de l'Al retrouvé dans la fraction débris cellulaire corresponde à de l'Al extra-cellulaire, non désorbé par le rinçage à l'EDTA. Quelle que soit la nature du métal dans cette fraction, la distribution de l'Al et du Sc dans les autres fractions était maintenue dans l'ordre organelles > granules > HSP et HDP. Ainsi, nous pouvons conclure que ces deux métaux présentaient des distributions intra-cellulaires relativement semblables.

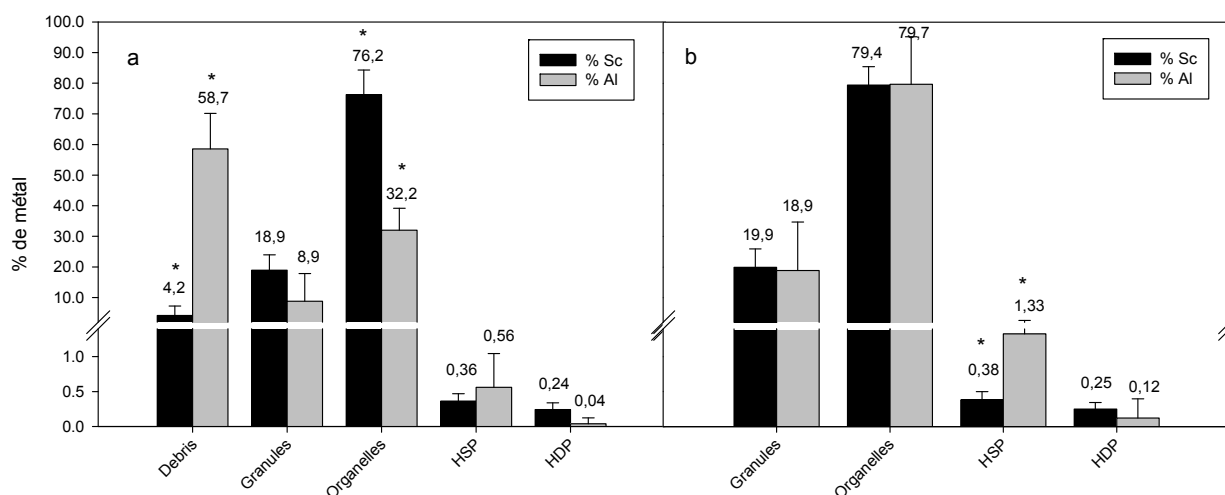


Figure 18 : Distribution du Sc et de l'Al (en %) dans les fractions subcellulaires de *C. reinhardtii* après une exposition de 72 heures à chacun des deux métaux ( $4,5 \mu\text{M}$ ) à pH 7, **a**) avec et **b**) sans la fraction des débris cellulaires. Moyennes  $\pm$  écarts types ( $n = 5$ ). Dans chaque fraction, la présence des symboles \* indique une différence significative dans la distribution du Sc et de l'Al (test t,  $p < 0,05$ ).

La distribution subcellulaire des métaux (et des cations en général) dépend de leurs affinités relatives avec les différents ligands présents dans le milieu intra-cellulaire et de l'abondance

relative de ces derniers. L'aluminium et le Sc sont tous deux des métaux de classe A. Dans le milieu intra-cellulaire, les plus forts complexes sont donc formés avec les atomes d'oxygène négativement chargés, comme ceux des groupements phosphates et carboxylates (Martin, 1992). Le positionnement de ces groupements dans les biomolécules est un facteur important à considérer. Par exemple, les groupements phosphates présents dans les molécules d'ADN ne présentent pas une affinité suffisamment élevée avec l'Al pour que cette interaction puisse être en compétition de manière significative avec l'hydrolyse de l'Al au pH physiologique (Martin, 1992). En revanche, les groupements phosphates terminaux de l'adénosine di- et tri-phosphates (ADP et ATP) peuvent former des complexes très stables avec l'Al (Kiss, 1995). En effet,  $Al^{3+}$  se lie à l'ATP environ  $10^7$  fois plus fortement que son contre-ion principal  $Mg^{2+}$  (Martin, 1986). Ainsi, nous avons suggéré que l'Al et le Sc présents en grande proportion dans la fraction organelles pouvaient être liés de façon importante à ces nucléotides (Pettersson et Bergman, 1989; Viola et al., 1980). Dans la fraction granules, deuxième par ordre d'importance dans notre étude (en ne considérant pas la fraction débris), nous avons supposé que les métaux étaient séquestrés dans des granules de polyphosphate (Komine et al., 2000; Pettersson et al., 1985; Roth et al., 1987). Les très faibles proportions en Al et en Sc retrouvées dans les fractions protéiques du cytosol (HSP et HDP) ont été quant à elles expliquées par la faible affinité de ces métaux de classe A pour les groupements amines et sulfhydryls composant les protéines. Dans la fraction débris, nous avons proposé qu'un pourcentage important des métaux pouvait être lié extracellulairement aux groupements phosphates de la membrane plasmique et aux groupements carboxylates de la paroi cellulaire (Horst et al., 2010; Kinraide, 1994; Rengel et Reid, 1997). Une partie des métaux de cette fraction pouvait aussi être associée à des nucléotides présents dans le noyau de la cellule (Martin, 1992).

#### **4.3.4 Possibles mécanismes de toxicité et de détoxification de l'Al et du Sc chez *C. reinhardtii***

La distribution subcellulaire des métaux est classiquement déterminée afin d'étudier leurs modes de toxicité et de détoxification chez les organismes. Les fractions HDP et organelles sont généralement considérées comme des fractions sensibles aux métaux, tandis que les fractions HSP et granules sont le plus souvent associées à des processus de détoxification (Giguère et al., 2006; Lavoie et al., 2009). Ces fractions sont cependant opérationnellement définies et il est important de garder à l'esprit qu'elles peuvent toutes contenir des cibles sensibles et non

sensibles aux métaux. Précisons aussi que nous n'avons ici qu'une image à un instant de la distribution subcellulaire de l'Al et du Sc. Les phénomènes dynamiques pouvant influencer la répartition des métaux dans la cellule (par ex. la cinétique de renouvellement des composés intra-cellulaires ou «turnover») sont donc occultés. En conservant ces limitations à l'esprit, nous présentons dans les deux paragraphes ci-dessous, les possibles mécanismes de détoxification de l'Al et du Sc chez *C. reinhardtii*, puis les possibles mécanismes de toxicité.

La séquestration importante de l'Al et du Sc dans la fraction granules, considérée comme une fraction non sensible, pourrait constituer le principal mode de détoxification de ces métaux chez *C. reinhardtii*. En effet, ce mode de détoxification métallique a plusieurs fois été évoqué chez différents organismes (Jensen et al., 1982; Nishikawa et al., 2003). Un autre mode de détoxification métallique, régulièrement observé chez le phytoplancton, est la séquestration du métal par les phytochélatines (Gekeler et al., 1988), des peptides retrouvés dans la fraction HSP. En raison de la très faible proportion de l'Al et du Sc dans la fraction HSP, ce mode de détoxification devrait être secondaire chez *C. reinhardtii*, à l'inverse par exemple du Cd, un métal plus « mou » présentant une affinité relativement grande pour ces peptides (Lavoie et al., 2009).

Le partitionnement important de l'Al et du Sc dans la fraction organelles, considérée comme sensible, pourrait conduire à des effets toxiques, notamment par la perturbation des cycles de l'ATP et de l'ADP, deux molécules impliquées dans un grand nombre de processus métaboliques. Les interactions de ces métaux avec l'ATP peuvent notamment affecter l'activité d'enzymes ayant cette biomolécule pour substrat, comme celles énumérées par Ganrot (1986) dans le cas de l'Al. Par exemple, Viola et al. (1980) ont montré que le Sc et l'Al, parmi d'autres métaux trivalents, avaient pour effet d'inhiber fortement l'activité enzymatique de l'hexokinase impliquée dans la phosphorylation des hexoses. Les auteurs ont proposé que cette inhibition fût due à l'inactivation de l'ATP, substrat de l'hexokinase, par liaison avec ces métaux. Enfin, plusieurs études ont montré une diminution de l'activité de la Na-K-ATPase, et donc une perturbation de l'osmorégulation, dans les branchies de poissons exposés à l'Al à pH acide (Camargo et al., 2009; Nilsen et al., 2010; Staurnes et al., 1984).

Selon l'hypothèse où l'Al de la fraction débris était en grande partie présent dans le noyau de la cellule, nous pouvons supposer que ce métal pourrait présenter un risque de diminution de l'activité mitotique, un mécanisme de toxicité plusieurs fois proposé pour l'Al (Matsumoto, 1991; Silva et al., 2000) et aussi rapporté pour le Sc (Clarkson et Sanderson, 1969).



Lorsque la toxicité des métaux trivalents est abordée, il est important de considérer le métal lié à la membrane plasmique et à la paroi cellulaire (*i.e.* le métal extra-cellulaire). En effet, l'interaction des métaux trivalents pour ces compartiments biologiques est particulièrement forte (Reid et al., 1995; Rengel, 1996; Taylor et al., 2000a). L'apparition de dommages directs aux surfaces biologiques a été observée chez des plantes et des algues exposées à des concentrations en Al dissous de l'ordre de plusieurs dizaines de micromoles·L<sup>-1</sup> (Horst et al., 2010). Des modifications de la fluidité et de la perméabilité membranaire, pouvant avoir un impact sur le transport ionique à travers la membranaire, ont notamment été rapportées (Horst et al., 2010; Parent et al., 1996; Saçan et al., 2007; Zhao et al., 1987; Zheng et Yang, 2005).

Enfin, la faible proportion en Al et en Sc dans la fraction HDP dite sensible, implique que les enzymes composant cette fraction ne devraient pas constituer des cibles directes importantes de la toxicité de ces métaux.



## 5 CONCLUSION

### 5.1 Résumé des principaux résultats de l'étude

Nos expériences de prise en charge à court terme du Sc chez *C. reinhardtii* et *P. subcapitata* ont clairement mis en évidence que la concentration en ion libre  $[Sc^{3+}]$  n'était pas un bon prédicteur de l'internalisation du Sc. Seule l'hypothèse de la participation d'hydroxo- et de fluoro-complexes au flux transmembranaire permettait d'expliquer les valeurs de  $J_{int}$  observées dans nos expériences à pH et à  $[F^-]$  variables. Des résultats de toxicité et de bioaccumulation dans la littérature suggèrent aussi que les hydroxo- et fluoro-complexes d'Al puissent être « biodisponibles ». Ainsi, il existe désormais un nombre conséquent d'observations indiquant que le MLB, dans sa formulation actuelle, n'est pas apte à prédire adéquatement la prise en charge de métaux trivalents chez les organismes aquatiques.

Nos expériences de compétition de l'Al pour la prise en charge du Sc chez *C. reinhardtii* ont mis en évidence que ces deux métaux n'étaient pas majoritairement transportés dans cette algue via le même transporteur membranaire. Si ces résultats démontrent que le Sc et l'Al ne sont pas suffisamment analogues chimiquement pour emprunter un même transporteur, ils n'excluent pas la possibilité que ces deux métaux soient internalisés via des mécanismes similaires (p. ex. via la formation de complexes ternaires à la surface biologique).

Enfin, nos expériences de fractionnement subcellulaire ont montré une forte similarité entre le destin intra-cellulaire de l'Al et du Sc chez *C. reinhardtii*. Ces résultats suggèrent que ces deux métaux possèdent des affinités proches pour les ligands du milieu intra-cellulaire. Il est donc tout à fait plausible que l'Al et le Sc présentent des mécanismes de toxicité et de détoxification analogues chez *C. reinhardtii*, et probablement aussi chez d'autres organismes.

### 5.2 Conclusion générale et perspectives de recherche

Grâce à l'utilisation d'un radio-isotope de Sc, nous avons pu observer pour la première fois des cinétiques de saturation de flux d'internalisation (nécessaires pour déterminer  $K_{M-Rint}$  et  $J_{max}$ ) d'un métal trivalent non essentiel chez le phytoplancton. L'étude de ces flux d'internalisation sous différentes variables physico-chimiques (pH et  $[F^-]$ ), a permis de tester de manière quantitative

les prémisses du MLB pour un métal trivalent. L'analogie souvent évoquée entre l'Al et le Sc nous suggère que les mécanismes de prise en charge observés dans cette étude avec le Sc, pourraient être aussi impliqués dans la prise en charge de l'Al. Cette hypothèse se base sur le fait que nos observations avec le Sc confirment des observations de bioaccumulation et de toxicité de fluoro-complexes d'Al chez divers organismes, malgré l'incertitude sur la nature extra- ou intra-cellulaire de la bioaccumulation et de la toxicité dans ces travaux. Par sa démarche mécaniste, cette étude offre ainsi un appui fort et inédit à l'hypothèse que le MLB, qui ne considère que l'internalisation de l'ion libre, soit inapte à décrire les processus de prise en charge des métaux trivalents dont les proportions en hydroxo- et fluoro-complexes sont importantes dans les eaux naturelles. Il apparaît donc nécessaire de poursuivre l'étude de ces processus, afin de proposer un modèle alternatif au MLB permettant d'évaluer adéquatement le risque environnemental posé par ces métaux. Ces prochains travaux devraient notamment s'intéresser à identifier les différents hydroxo- et fluoro-complexes participant à la prise en charge du métal. Aussi, notre étude soulève des questions quant aux paramètres gouvernant la spécificité des transporteurs membranaires. En effet, il demeure assez surprenant que le transporteur membranaire du Sc soit incapable de discriminer entre l'ion libre et certains hydroxo- et fluoro-complexes du métal.

Cette étude présente aussi les premières caractérisations du destin intra-cellulaire du Sc chez un organisme et de l'Al chez le phytoplancton. En raison de l'analogie importante observée dans la répartition subcellulaire de ces deux métaux, il est probable que ces derniers présentent des mécanismes de toxicité et de détoxification similaires. Ces observations ouvrent donc la voie à l'utilisation du Sc comme substitut de l'Al dans des études visant à comprendre les effets biologiques de l'Al chez les organismes.

## 6 RÉFÉRENCES

- Adhiya, J., Cai, X., Sayre, R.T. et Traina, S.J. (2002) Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Colloid Surface A* 210, 1-11.
- Allen, H.E., Hall, R.H. et Brisbin, T.D. (1980) Metal speciation. Effects on aquatic toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 14, 441-443.
- Anderson, M.A. et Morel, F.M.M. (1982) The influence of aqueous iron chemistry on the uptake of iron by the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii* *Limnol. Oceanogr.* 27, 789-813.
- Anderson, M.A., Morel, F.M.M. et Guillard, R.R.L. (1978) Growth limitation of a coastal diatom by low zinc ion activity. *Nature* 276, 70-71.
- Baes, C.F. et Mesmer, R.E. (1976) *The Hydrolysis of Cations*. Wiley-Interscience, New York.
- Bates, S.S., Tessier, A., Campbell, P.G. et Buffle, J. (1982) Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas varuiabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. *J. Phycol.* 18, 521-529.
- Batley, G.E., Apte, S.C. et Stauber, J.L. (2004) Speciation and bioavailability of trace metals in water: Progress since 1982. *Aust. J. Chem.* 57, 903-919.
- Benjamini, Y. et Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B* 57, 289-300.
- Bose, J., Babourina, O. et Rengel, Z. (2011) Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. *J. Exp. Bot.* 62, 2251-2264.
- Bowen, H.J.M. (1979) *Environmental chemistry of the elements*. Academic Press, London; New York.
- Buffle, J., Zhang, Z. et Startchev, K. (2007) Metal flux and dynamic speciation at (bio)interfaces. Part I: Critical evaluation and compilation of physicochemical parameters for complexes with simple ligands and fulvic/humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7609-7620.
- Camargo, M.M.P., Fernandes, M.N. et Martinez, C.B.R. (2009) How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 94, 40-46.
- Cameron, R.S., Ritchie, G.S.P. et Robson, A.D. (1986) Relative toxicities of inorganic aluminum complexes to Barley. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50 1231-1236.
- Campbell, P.G., Twiss, M.R. et Wilkinson, K.J. (1997) Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 2543-2554.

- Campbell, P.G.C. (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Tessier, A. et Turner, D.R., Eds. John Wiley & Sons: New York, NY, USA, pp 45-102.
- Campbell, P.G.C., Chapman, P.M. et Hale, B.A. (2006) Risk assessment of metals in the environment. In *Chemicals in the Environment Assessing and Managing Risk*, R M Harrison, R.M. et R E Hester, R.E., Eds. The Royal Society of Chemistry: Vol. 22, pp 102-126.
- Campbell, P.G.C., Errecalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V.P. et Vigneault, B. (2002) Metal bioavailability to phytoplankton-applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol., C: Comp. Toxicol. Pharmacol.* 133, 189-206.
- Campbell, P.G.C. et Stokes, P.M. (1985) Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 2034-2049.
- Canter-Lund, H. et Lund, J.W.G. (1995) Freshwater algae: their microscopic world explored. Biopress Limited, Bristol.
- CCME (2002) (Canadian Council of Ministers of the Environment) Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Inorganic fluorides. In *Canadian environmental quality guidelines*, Winnipeg.
- Clarkson, D.T. et Sanderson, J. (1969) The uptake of a polyvalent cation and its distribution in the root apices of *Allium cepa*: Tracer and autoradiographic studies. *Planta* 89, 136-154.
- Cotton, S.A. (1999) Recent advances in the chemistry of scandium. *Polyhedron* 18, 1691-1715.
- Crémazy, A., Levy, J.L., Campbell, P.G.C. et Fortin, C. (2013) Uptake and subcellular partitioning of trivalent metals in a green alga: comparison between Al and Sc. *BioMetals* 26, 989-1001.
- Deleebeeck, N.M.E., De Schampelaere, K.A.C. et Janssen, C.R. (2009) Effects of  $Mg^{2+}$  and  $H^+$  on the toxicity of  $Ni^{2+}$  to the unicellular green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Model development and validation with surface waters. *Sci. Total Environ.* 407, 1901-1914.
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R. et Santore, R.C. (2001) Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2383-2396.
- Dobbs, A.J., French, P., Gunn, A.M., Hunt, D.T.E. et Winnard, D.A. (1989) Aluminium speciation and toxicity in upland waters. In *Environmental Chemistry and Toxicology of Aluminium*, Lewis, T.E., Ed. Chelsea Michigan, pp 209-228.
- Dobbs, G.G. (1974) Fluoride and the environment. *Fluoride* 7, 123-135.

- Driscoll, C.T. et Schecher, W.D. (1990) The chemistry of aluminum in the environment. *Environ. Geochem. Health* 12, 28-49.
- Dudev, T. et Lim, C. (2013) Importance of metal hydration on the selectivity of  $Mg^{2+}$  versus  $Ca^{2+}$  in magnesium ion channels. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 17200-17208.
- Fortin, C. et Campbell, P.G.C. (2000) Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2769-2778.
- Fortin, C., Dutel, L. et Garnier-Laplace, J. (2004) Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 974-981.
- François, L., Fortin, C. et Campbell, P.G.C. (2007) pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: Implications for an algal BLM. *Aquat. Toxicol.* 84, 123-132.
- Gallon, C., Munger, C., Premont, S. et Campbell, P.G.C. (2004) Hydroponic study of aluminum accumulation by aquatic plants: Effects of fluoride and pH. *Water Air Soil Pollut.* 153, 135-155.
- Ganrot, P.O. (1986) Metabolism and possible health effects of aluminium. *Environ. Health Perspect.* 65, 363-441.
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.L. et Zenk, M.H. (1988) Algae sequester Heavy-metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* 150, 197-202.
- Gensemer, R.W. et Playle, R.C. (1999) The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 29, 315-450.
- Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L. et Couture, P. (2006) Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol.* 77, 178-189.
- Goulet, R.R., Lalonde, J.D., Munger, C., Dupuis, S., Dumont-Frenette, G., Prémont, S. et Campbell, P.G.C. (2005) Phytoremediation of effluents from aluminum smelters: A study of Al retention in mesocosms containing aquatic plants. *Water Res.* 39, 2291-2300.
- Gunn, A.M., Hunt, D.T.E. et Winnard, D.A. (1986) Aluminum speciation and its effect on toxicity, Water Research Centre, Medmenham, UK.
- Harris, E.H. (1989) Culture and storage methods. In *The Chlamydomonas Sourcebook- A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*, Academic Press: San Diego.
- Hassler, C.S. et Schoemann, V. (2009) Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions: an update on the case of iron. *Limnol. Oceanogr.* 7, 479-489.

- Hassler, C.S., Slaveykova, V.I. et Wilkinson, K.J. (2004a) Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol. Oceanogr.* 2, 237-247.
- Hassler, C.S., Slaveykova, V.I. et Wilkinson, K.J. (2004b) Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 283-291.
- Hassler, C.S. et Wilkinson, K.J. (2003) Failure of the biotic ligand and free-ion activity models to explain zinc bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 620-626.
- Hollis, L., McGeer, J.C., McDonald, D.G. et Wood, C.M. (2000) Protective effects of calcium against chronic waterborne cadmium exposure to juvenile rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2725-2734.
- Horovitz, C.T. (1999) *Biochemistry of scandium and yttrium - Part 1: physical and chemical fundamentals*. Springer, New York.
- Horst, W.J., Wang, Y. et Eticha, D. (2010) The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: A review. *Ann. Bot.* 106, 185-197.
- Hudson, R.J.M. et Morel, F.M.M. (1990) Iron transport in marine-phytoplankton - Kinetics of cellular and medium coordination reactions. *Limnol. Oceanogr.* 35, 1002-1020.
- Hunter, R.J. (1981) *Zeta potential in colloid science - principles and applications*. Academic Press, London, U.K.
- Jensen, T.E., Baxter, M., Rachlin, J.W. et Jani, V. (1982) Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (cyanophyceae) into cellular components, especially polyphosphate bodies: An X-ray energy dispersive study. *Environ. Pollut. Ser. A* 27, 119-127.
- Kiefer, E., Sigg, L. et Schosseler, P. (1997) Chemical and spectroscopic characterization of algae surfaces. *Environ. Sci. Technol.* 31, 759-764.
- Kinraide, T.B. (1994) Use of Gouy-Chapman-Stern model for membrane-surface electrical potential to interpret some features of mineral rhizotoxicity. *Plant Physiol.* 106, 1583-1592.
- Kinraide, T.B. (2006) Plasma membrane surface potential ( $\psi_{pm}$ ) as a determinant of ion bioavailability: A critical analysis of new and published toxicological studies and a simplified method for the computation of plant  $\psi_{pm}$ . *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 3188-3198.
- Kinraide, T.B. et Parker, D.R. (1989) Assessing the phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum. *Plant Cell Environ.* 12, 479-487.



- Kiss, T. (1995) Interaction of aluminum with biomolecules — any relevance to Alzheimer's disease? Arch. Gerontol. Geriatr. 21, 99-112.
- Knauer, K., Behra, R. et Sigg, L. (1997) Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyta). J. Phycol. 33, 596-601.
- Kobayashi, S., Nagayama, S. et Busujima, T. (1998) Lewis acid catalysts stable in water. Correlation between catalytic activity in water and hydrolysis constants and exchange rate constants for substitution of inner-sphere water ligands. J. Am. Chem. Soc. 120, 8287-8288.
- Komine, Y., Eggink, L.L., Park, H. et Hooper, J.K. (2000) Vacuolar granules in *Chlamydomonas reinhardtii*: Polyphosphate and a 70-kDa polypeptide as major components. Planta 210, 897-905.
- Lavoie, M., Le Faucheur, S., Boulemant, A., Fortin, C. et Campbell, P.G.C. (2012) The influence of pH on algal cell membrane permeability and its implications for the uptake of lipophilic metal complexes. J. Phycol. 48, 293-302.
- Lavoie, M., Le Faucheur, S., Fortin, C. et Campbell, P.G.C. (2009) Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. Aquat. Toxicol. 92, 65-75.
- Lavoie, M., Le Faucheur, S., Fortin, C. et Campbell, P.G.C. (2011) Erratum to "Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules" [Aquat. Toxicol. 92 (2009) 65-75]. Aquat. Toxicol. 101, 298.
- Levich, V.G. (1962) Physicochemical hydrodynamics. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Li, L., Tutone, A.F., Drummond, R.S.M., Gardner, R.C. et Luan, S. (2001) A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis*. Plant Cell 13, 2761-2775.
- Lide, D.R., ed (1991) CRC Handbook of Chemistry and Physics, 71st edn. CRC Press, Boston.
- Lindqvist-Reis, P., Persson, I. et Sandstrom, M. (2006) The hydration of the scandium(III) ion in aqueous solution and crystalline hydrates studied by XAFS spectroscopy, large-angle X-ray scattering and crystallography. Dalton Trans., 3868-3878.
- Luoma, S.N. et Rainbow, P.S. (2008) Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Lustigman, B., Lee, L.H. et Weiss-Magasic, C. (1995) Effects of cobalt and pH on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 55, 65-72.

- MacDiarmid, C.W. et Gardner, R.C. (1998) Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *J. Biol. Chem.* 273, 1727-1732.
- Macfie, S.M. et Welbourn, P.M. (2000) The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 413-419.
- Mahler, B.J., Van Metre, P.C. et Callender, E. (2006) Trends in metals in urban and reference lake sediments across the United States, 1970 to 2001. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1698-1709.
- Martell, A.E. et Smith, R.M. (2004) NIST critically selected stability constants of metal complexes v. 8.0., National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA.
- Martin, R.B. (1986) The chemistry of aluminum as related to biology and medicine. *Clin. Chem.* 32, 1797-1806.
- Martin, R.B. (1992) Aluminium speciation in biology. In *Aluminium in Biology and Medicine*, Chadwick, D.J. et Whelan, J., Eds. John Wiley & Sons, Ltd.: New York, NY, pp 5-25.
- Matsumoto, H. (1991) Biochemical mechanism of the toxicity of aluminium and the sequestration of aluminium in plant cells. *Dev. Plant Soil Sci.* 45, 825-838.
- Moomaw, A.S. et Maguire, M.E. (2010) Cation selectivity by the CorA Mg<sup>2+</sup> channel requires a fully hydrated cation. *Biochem.* 49, 5998-6008.
- Nagata, T., Hayatsu, M. et Kosuge, N. (1993) Aluminium kinetics in the tea plant using <sup>27</sup>Al and <sup>19</sup>F NMR. *Phytochem.* 32, 771-775.
- Nilsen, T.O., Ebbesson, L.O.E., Kverneland, O.G., Kroglund, F., Finstad, B. et Stefansson, S.O. (2010) Effects of acidic water and aluminum exposure on gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit isoforms, enzyme activity, physiology and return rates in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquat. Toxicol.* 97, 250-259.
- Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I. et Tominaga, N. (2003) Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microb. Ecol.* 44, 253-259.
- Nordstrom, D.K., Plummer, L.N., Langmuir, D., Busenberg, E., May, H.M., Jones, B.F. et Parkhurst, D.L. (1990) Revised chemical equilibrium data for major water - mineral reactions and their limitations. In *Chemical Modeling of Aqueous Systems II*, Melchior, D.C. et Bassett, R.L., Eds. Amer Chemical Soc: Washington, Vol. 416, pp 398-413.
- Nriagu, J.O. et Pacyna, J.M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134-139.

- Parent, L. et Campbell, P.G.C. (1994) Aluminium bioavailability to the green-alga *Chlorella-pyrenoidosa* in acidified synthetic soft-water. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 587-598.
- Parent, L., Twiss, M.R. et Campbell, P.G.C. (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. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1713-1720.
- Perdue, E.M. et Ritchie, J.D. (2003) Dissolved organic matter in freshwaters. In *Surface and ground water, weathering, and soils*, Drever, J.I., Ed. Elsevier: Amsterdam (Pays-Bas), pp 273-318.
- Persson, I. (2010) Hydrated metal ions in aqueous solution: How regular are their structures? *Pure Appl. Chem.* 82, 1901-1917.
- Pettersson, A. et Bergman, B. (1989) Effects of aluminium on ATP pools and utilization in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*: A model for the *in vivo* toxicity. *Physiol. Plant.* 76, 527-534.
- Pettersson, A., Kunst, L., Bergman, B. et Roomans, G.M. (1985) Accumulation of aluminum by *Anabaena cylindrica* into polyphosphate granules and cell walls: An X-ray energy-disperse microanalysis study. *J. Gen. Microbiol.* 131, 2545-2548.
- Playle, R.C. (1998) Modelling metal interactions at fish gills. *Sci. Total Environ.* 219, 147-163.
- Pröschold, T., Harris, E.H. et Coleman, A.W. (2005) Portrait of a Species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 170, 1601-1610.
- Reid, R., Tester, M. et Smith, F.A. (1995) Calcium/aluminium interactions in the cell wall and plasma membrane of *Chara*. *Planta* 195, 362-368.
- Reid, R.J., Rengel, Z. et Smith, F.A. (1996) Membrane fluxes and comparative toxicities of aluminium, scandium and gallium. *J. Exp. Bot.* 47, 1881-1888.
- Rengel, Z. (1990) Competitive Al<sup>3+</sup> inhibition of net Mg<sup>2+</sup> uptake by intact *Lolium multiflorum* roots: II. Plant age effects. *Plant Physiol.* 93, 1261-1267.
- Rengel, Z. (1996) Uptake of aluminium by plant cells. *New Phytol.* 134, 389-406.
- Rengel, Z. et Reid, R.J. (1997) Uptake of Al across the plasma membrane of plant cells. *Plant Soil* 192, 31-35.
- Rengel, Z. et Robinson, D.L. (1989) Competitive Al<sup>3+</sup> inhibition of net Mg<sup>2+</sup> uptake by intact *Lolium multiflorum* roots : I. Kinetics. *Plant Physiol.* 91, 1407-1413.
- Roth, L.E., Dunlap, J.R. et Stacey, G. (1987) Localizations of aluminum in soybean bacteroids and seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2548-2553.
- Saçan, M., Oztay, F. et Bolkent, S. (2007) Exposure of *Dunaliella tertiolecta* to lead and aluminum: toxicity and effects on ultrastructure. *Biol. Trace Elem. Res.* 120, 264-272.

- Salisbury, J.L., Sanders, M.A. et Harpst, L. (1987) Flagellar root contraction and nuclear movement during flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Cell Biol. 105, 1799-1805.
- Serrano, M.J.G., Sanz, L.F.A. et Nordstrom, D.K. (2000) REE speciation in low-temperature acidic waters and the competitive effects of aluminum. Chem. Geol. 165, 167-180.
- Shannon, R.D. (1976) Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. Acta Crystallogr. 32, 751 - 767.
- Silva, I.R., Smyth, T.J., Moxley, D.F., Carter, T.E., Allen, N.S. et Ruffy, T.W. (2000) Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. Plant Physiol. 123, 543-552.
- Slaveykova, V. et Wilkinson, K. (2003) Effect of pH on Pb biouptake by the freshwater alga *Chlorella kesslerii*. Environ. Chem. Lett. 1, 185-189.
- Slaveykova, V.I. et Wilkinson, K.J. (2002) Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. Environ. Sci. Technol. 36, 969-975.
- Slaveykova, V.I. et Wilkinson, K.J. (2005) Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model. Environ. Chem. 2, 9-24.
- Sparling, D.W. et Lowe, T.P. (1996) Environmental hazards of aluminum to plants, invertebrates, fish, and wildlife. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 145, 1-127.
- Staurnes, M., Sigholt, T. et Reite, O.B. (1984) Reduced carbonic anhydrase and Na-K-ATPase activity in gills of salmonids exposed to aluminium-containing acid water. Experientia 40, 226-227.
- Stevens, D.P., McLaughlin, M.J. et Alston, A.M. (1997) Phytotoxicity of aluminium-fluoride complexes and their uptake from solution culture by *Avena sativa* and *Lycopersicon esculentum*. Plant Soil 192, 81-93.
- Sunda, W.G. et Guillard, R.R.L. (1976) The relationship between cupric ion activity and toxicity of copper to phytoplankton. J. Mar. Res. 34, 511-529.
- Sunda, W.G. et Huntsman, S.A. (1985) Regulation of cellular manganese and manganese transport rates in the unicellular alga *Chlamydomonas*. Limnol. Oceanogr. 30, 71-80.
- Sunda, W.G. et Huntsman, S.A. (1986) Relationships among growth rate, cellular manganese concentrations and manganese transport kinetics in estuarine and oceanic species of the diatom *Thalassiodira*. J. Phycol. 22, 259-270.
- Tanida, E., Usuda, K., Kono, K., Kawano, A., Tsuji, H., Imanishi, M., Suzuki, S., Ohnishi, K. et Yamamoto, K. (2009) Urinary scandium as predictor of exposure: effects of scandium chloride hexahydrate on renal function in rats. Biol. Trace Elem. Res. 130, 273-282.

- Tanizaki, Y., Shimokawa, T. et Yamazaki, M. (1992) Physico-chemical speciation of trace elements in urban streams by size fractionation. *Water Res.* 26, 55-63.
- Taylor, G.J., McDonald-Stephens, J.L., Hunter, D.B., Bertsch, P.M., Elmore, D., Rengel, Z. et Reid, R.J. (2000a) Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiol.* 123, 987-996.
- Taylor, G.J., McDonald-Stephens, J.L., Hunter, D.B., Bertsch, P.M., Elmore, D., Rengel, Z. et Reid, R.J. (2000b) Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiol.* 123, 987-996.
- Thurman, M. (1985) Organic geochemistry of natural waters, Developments in biogeochemistry Vol. 2. Springer.
- Tipping, E., Lofts, S. et Sonke, J.E. (2011) Humic Ion-Binding Model VII: a revised parameterisation of cation-binding by humic substances. *Environ. Chem.* 8, 225-235.
- Toropova, L.S., Eskin, D.G., Kharakterova, M.L. et Dobatkina, T.V. (1998) Advanced aluminium alloys containing scandium: Structure and properties. Taylor & Francis, London.
- Turner, D.R., Whitfield, M. et Dickson, A.G. (1981) The equilibrium speciation of dissolved components in freshwater and sea water at 25°C and 1 atm pressure. *Geochim. Cosmochim. Acta* 45, 855-881.
- Verstraeten, S.V., Nogueira, L.V., Schreier, S. et Oteiza, P.I. (1997) Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: Role in lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 338, 121-127.
- Viola, R.E., Morrison, J.F. et Cleland, W.W. (1980) Interaction of metal(III)-adenosine 5'-triphosphate complexes with yeast hexokinase. *Biochem.* 19, 3131-3137.
- Walton, R.C., White, K.N., Livens, F. et McCrohan, C.R. (2010) The suitability of gallium as a substitute for aluminum in tracing experiments. *BioMetals* 23, 221-230.
- Wauer, G., Heckemann, H.J. et Koschel, R. (2004) Analysis of toxic aluminium species in natural waters. *Microchim. Acta* 146, 149-154.
- Wedepohl, K.H. (1995) The composition of the continental crust. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 1217-1232.
- Wehr, J.D., Sheath, R.G., Kociolek, R.P. et Thorp, J.H. (2002) *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Elsevier Science.
- Whitfield, M. et Turner, D.R. (1979) Critical assessment of the relationship between biological thermodynamic and electrochemical availability. In *Chemical Modeling in Aqueous Systems*, American Chemical Society: Vol. 93, pp 657-680.

- Wilkinson, K.J., Bertsch, P.M., Jagoe, C.H. et Campbell, P.G.C. (1993) Surface complexation of aluminum on isolated fish gill cells. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1132-1138.
- Wilkinson, K.J. et Buffle, J. (2004) Critical evaluation of physicochemical parameters and processes for modelling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic) systems. In *Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces*, Van Leeuwen, H.P. et Köster, W., Eds. John Wiley & Sons: Vol. 9.
- Wilkinson, K.J. et Campbell, P.G.C. (1993) Aluminum bioconcentration at the gill surface of juvenile Atlantic salmon in acidic media. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 2083-2095.
- Wilkinson, K.J., Campbell, P.G.C. et Couture, P. (1990) Effect of fluoride complexation on aluminum toxicity towards juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 1446-1452.
- Wolterbeek, H.T. et Verburg, T.G. (2001) Predicting metal toxicity revisited: general properties vs. specific effects. *Sci. Total Environ.* 279, 87-115.
- Wood, S.A. et Samson, I.M. (2006) The aqueous geochemistry of gallium, germanium, indium and scandium. *Ore Geol. Rev.* 28, 57-102.
- Worms, I., Simon, D.F., Hassler, C.S. et Wilkinson, K.J. (2006) Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie* 88, 1721-1731.
- Worms, I.A.M. et Wilkinson, K.J. (2007) Ni uptake by a green alga. 2. Validation of equilibrium models for competition effects. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4264-4270.
- Xie, Z.M., Ye, Z.H. et Wong, M.H. (2001) Distribution characteristics of fluoride and aluminum in soil profiles of an abandoned tea plantation and their uptake by six woody species. *Environ. Int.* 26, 341-346.
- Yee, N., Fowle, D.A. et Ferris, F.G. (2004) A Donnan potential model for metal sorption onto *Bacillus subtilis*. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 3657-3664.
- Zar, J.H. (1999) *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey.
- Zhang, Z., Buffle, J., Startchev, K. et Alemani, D. (2008) FLUXY: a simple code for computing steady-state metal fluxes at consuming (bio) interfaces, in natural waters. *Environ. Chem.* 5, 204-217.
- Zhao, X.-J., Sucoff, E. et Stadelmann, E.J. (1987)  $Al^{3+}$  and  $Ca^{2+}$  alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. *Plant Physiol.* 83, 159-162.
- Zheng, S.J. et Yang, J.L. (2005) Target sites of aluminum phytotoxicity. *Biol. Plant.* 49, 321-331.

## **PARTIE II : ARTICLES SCIENTIFIQUES**

### **7 ARTICLE #1**

The biotic ligand model can successfully predict the uptake of a trivalent ion by a unicellular alga below pH 6.50 but not above: possible role of hydroxo-species

Anne Crémazy†, Peter G.C. Campbell† and Claude Fortin†

† Institut national de la recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement (INRS-ETE), 490 de la Couronne, G1K 9A9, Québec, Canada.

Article publié dans la revue *Environmental Science and Technology*

## Résumé

Un nombre important de travaux sur les métaux bivalents ont montré que le modèle du ligand biotique (MLB) prédisait adéquatement leur biodisponibilité chez les organismes aquatiques. Cependant, les études sur la biodisponibilité des métaux trivalents non essentiels, comme l'aluminium (Al), demeurent à ce jour relativement rares. Dans cette étude, des flux d'internalisation à court terme du scandium (Sc) ont été mesurés chez *Chlamydomonas reinhardtii*, afin d'explorer l'applicabilité du MLB aux métaux trivalents. Le Sc a été sélectionné pour ses similarités chimiques avec l'Al et pour la disponibilité de son radio-isotope Sc-46 pouvant être utilisé comme traceur. Les constantes d'affinité apparentes de Sc<sup>3+</sup> avec les sites de transport membranaire ( $K_{\text{Sc-Rcell app}}$ ) étaient étonnamment élevées, avec des valeurs variant de  $10^{8,08} \text{ M}^{-1}$  à  $10^{13,95} \text{ M}^{-1}$  entre les pH 4,50 et 7,90. La compétition des ions H<sup>+</sup> pour la liaison aux sites de transport de Sc<sup>3+</sup> permettait d'expliquer cette tendance dans la gamme de pH 4,50 à 6,00, mais pas entre les pH 6,50 et 7,90. Dans cette dernière gamme, les flux prédits par le MLB étaient plus faibles que les flux observés et cette différence augmentait avec le pH, d'un facteur 4 à 1000 environ. Au-delà de pH 6,50, l'apport calculé en Sc<sup>3+</sup> à l'interface biologique, par diffusion de Sc<sup>3+</sup> et par dissociation des hydroxo-complexes (ScOH<sup>2+</sup>, Sc(OH)<sub>2</sub><sup>+</sup> et Sc(OH)<sub>3</sub>), était insuffisant pour soutenir les importants flux d'internalisation observés. Nous faisons l'hypothèse que ce désaccord avec le MLB pourrait être dû au transport membranaire d'hydroxo-complexes intacts du Sc. La prise en charge du Sc pouvait être raisonnablement bien modélisée avec une équation simple et semi-empirique considérant la participation égale de Sc<sup>3+</sup>, ScOH<sup>2+</sup>, Sc(OH)<sub>2</sub><sup>+</sup> et Sc(OH)<sub>3</sub>, ainsi que l'absence de compétition des ions H<sup>+</sup>. Ces travaux mettent en évidence l'importance d'étudier le rôle possible de ces hydroxo-complexes dans la prise en charge métallique.

**Mots clés** *Chlamydomonas reinhardtii*, modélisation de l'internalisation, scandium, métal, accumulation, flux diffusif, modèle du ligand biotique, hydroxo-complexes



## Abstract

In many reported cases, the Biotic Ligand Model (BLM) has been shown to predict the bioavailability of divalent metals towards aquatic biota successfully. However, studies on the bioavailability of non-essential trivalent metals, including aluminum (Al), are relatively scarce. In the present study, short-term scandium (Sc) internalization fluxes ( $J_{\text{int}}$ ) were measured in *Chlamydomonas reinhardtii* in order to explore the applicability of the BLM to trivalent metals. Scandium was selected for its chemical similarities with Al and for its convenient radio-isotope (Sc-46). Apparent affinity constants of  $\text{Sc}^{3+}$  with membrane transport sites ( $K_{\text{Sc-Rcell app}}$ ) were surprisingly high, ranging from  $10^{8.08} \text{ M}^{-1}$  to  $10^{13.95} \text{ M}^{-1}$  over the pH range from 4.50 to 7.90. The competition of  $\text{H}^+$  for binding with  $\text{Sc}^{3+}$  transport sites explained this trend within the pH range of 4.50 to 6.00, but not from pH 6.50 to 7.90. In this latter pH range, predicted fluxes were smaller than observed fluxes and this divergence increased with pH, from a factor of 4 to approximately 1000. Above pH 6.50, the calculated supply of  $\text{Sc}^{3+}$  to the bio-interface by physical diffusion of the free  $\text{Sc}^{3+}$  ion and by the dissociation of its hydroxo-complexes ( $\text{ScOH}^{2+}$ ,  $\text{Sc(OH)}_2^+$  and  $\text{Sc(OH)}_3$ ) was insufficient to support the high observed internalization fluxes. We speculate that this failure of the BLM could be due to the transport of undissociated Sc hydroxo-complexes. Scandium uptake could be modeled reasonably well using a simple semi-empirical equation considering equal contributions from  $\text{Sc}^{3+}$ ,  $\text{ScOH}^{2+}$ ,  $\text{Sc(OH)}_2^+$  and  $\text{Sc(OH)}_3$  and no  $\text{H}^+$  competition. Our work highlights the importance of studying the possible role of hydroxo-species in trace metal uptake.

**Keywords** *Chlamydomonas reinhardtii*, uptake modeling, scandium, metal accumulation, diffusive flux, free-ion activity model, biotic ligand model, hydroxo-species

## INTRODUCTION

It is now well established that the bioavailability of a trace metal in natural waters is strongly related to its chemical speciation. Numerous studies have demonstrated that the biological response elicited by a metal is generally a function of its free ion activity.<sup>1,2</sup> This observation led to the elaboration of mechanistic models such as the Biotic Ligand Model (BLM), describing the bio-uptake of a metal as the result of a thermodynamic equilibrium between the bulk solution and a transport site at the biological surface, followed by slow internalization of the free metal ion.<sup>3-5</sup> The development and on-going improvement of the BLM have contributed to enhance our mechanistic understanding of metal interactions with biological membranes and our ability to predict metal bioavailability to aquatic biota. Nonetheless, the level of development of the BLM currently remains uneven among metals, especially regarding trivalent trace metals.<sup>6</sup> Attempts to test the applicability of the BLM to trivalent metals have been hindered by several analytical difficulties: trivalent metals have a complex aqueous coordination chemistry and relatively low solubility limits, they tend to bind tightly to biological membranes, there is a lack of affordable and suitable radio-isotopes and a dearth of sensitive analytical techniques.<sup>7</sup> Therefore, for most trivalent metals, uptake mechanisms are still speculative and the links between their speciation and accumulation remain elusive.<sup>8</sup> The general goal of this study was to determine whether the BLM can predict the uptake of non-essential trivalent metals by phytoplankton.

Aluminum is without doubt the trivalent metal for which toxic effects are the best documented<sup>9,10</sup> due to acidification of natural waters which usually leads to an increase in total and free aluminum.<sup>11</sup> However, for the reasons mentioned above, the study of its uptake mechanisms is a technical challenge and several workers have suggested using other trivalent metals as surrogates for Al<sup>3+</sup>.<sup>12,13</sup> Scandium (Sc) was selected for this study for two reasons. First, Sc<sup>3+</sup> and Al<sup>3+</sup> share many chemical similarities in addition to their (+III) oxidation state: they have an inert gas electronic configuration, they have a lack of redox capacities in biological systems, the solubilities of their ternary hydroxo-complexes are very similar and they are both class A metals that show preferential and similar affinities for hydroxide, fluoride, sulfate and phosphate.<sup>14</sup> Second, unlike Al, Sc has a suitable radio-isotope (Sc-46, half-life of 83.8 days) that can be used as a radio-tracer to facilitate the measurement of trans-membrane uptake.

When studying metal uptake, considering the influence of other cations such as the proton is of great importance. Indeed, H<sup>+</sup> is known to possibly affect metal uptake by (i) direct competition

with metal transport sites,<sup>15, 16</sup> (ii) non-competitive inhibition by inducing changes at the biological membrane such as changes in the cell wall electrical charge or in the allosteric conformation of transport proteins<sup>17</sup> and (iii) changes in metal speciation in solution (especially important for trivalent metals since their speciation is very sensitive to pH changes). The applicability of the BLM to Sc was investigated by determining Sc internalization fluxes ( $J_{\text{int}}$ ,  $\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) in a unicellular green alga (*Chlamydomonas reinhardtii*) in uptake kinetics experiments conducted between pH 4.50 and 7.90. Our initial hypothesis was that the BLM could quantitatively predict Sc  $J_{\text{int}}$  over this pH range.

## THEORETICAL CONSIDERATIONS

The bioaccumulation process for a hydrophilic trace metal (M) starts with its diffusion toward the biological surface, followed by its fast and reversible binding to a cell receptor ( $\text{R}_{\text{cell}}$ ; corresponding to a transporter, also called biotic ligand).<sup>4</sup> The metal is then internalized into the cell. The BLM is based on several simplifying assumptions,<sup>16</sup> one of which is that metal mass transport to the biological surface and its subsequent complexation with the biotic ligand are much faster than the internalization step. This implies that thermodynamic equilibrium is attained at the biological interface. In this case, metal internalization fluxes ( $J_{\text{int}}$ ) should follow Michaelis-Menten kinetics (eq. 1).<sup>18, 19</sup>

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}}[M^{Z+}]}{K_M + [M^{Z+}]} \quad (1)$$

where  $J_{\text{max}}$  is the maximum value of the internalization flux,  $[M^{Z+}]$  is the free metal concentration in solution at the biological surface and  $K_M$  is the Michaelis-Menten constant corresponding to the free ion concentration at which the transport system is half-saturated. Under the equilibrium assumption, the reciprocal of  $K_M$  corresponds to the affinity constant between the metal M and the biotic ligand  $\text{R}_{\text{cell}}$ ,  $K_{M-\text{R}_{\text{cell}}}$ . The graphical representation of eq. 1 is a rectangular hyperbola with a quasi-linear part at low free ion concentrations and a saturation plateau at high concentrations. As membrane transporters are rarely specific to a single metal, competitive cations ( $C_j$ :  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ , etc.) can be incorporated into the BLM equation:

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}} K_{\text{M-Rcell}} [M^{z+}]}{1 + K_{\text{M-Rcell}} [M^{z+}] + \sum_i K_{\text{C}_i\text{-Rcell}} [C_i]} \quad (2)$$

where  $[C_i]$  is the concentration of the competitive cation  $C_i$  and  $K_{\text{C}_i\text{-Rcell}}$  is the affinity constant between  $C_i$  and  $\text{Rcell}$ . This latter equation represents a quantitative link between metal uptake and solution chemistry. The measurement and analysis of internalization fluxes constitute therefore a simple and rigorous way to quantitatively test the applicability of the BLM for a given metal. In the case where the equilibrium assumption is not respected, i.e. if the internalization step is not rate limiting, then dynamic aspects such as the diffusion rate from the bulk solution to the biological surface and the kinetics of the reactions of the metal complexes present in solution have to be considered.<sup>20</sup> In addition to the equilibrium requirement (assumption 1), other fundamental assumptions underpin the BLM: (2) the biological membrane is the primary site of metal interaction with the organism; (3) the biological response is directly proportional to the metal internalization flux; (4) the concentration of transport sites remains constant in the studied range of metal concentrations; (5) the nature of the biological membrane does not change during the exposure; and (6) only the free metal ion can be transferred through the membrane.

## MATERIALS AND METHODS

### Culture of *Chlamydomonas reinhardtii*

The unicellular green alga *C. reinhardtii* was chosen for the present study because of its broad pH tolerance.<sup>21</sup> Agar cultures of *C. reinhardtii* (CPCC 11 wild strain) were obtained from the Canadian Phycological Culture Centre, University of Waterloo. The algae were grown in an axenic modified high salt medium MHSM-1 with an ionic strength of  $8.4 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ , described by Fortin and co-workers.<sup>22</sup> These cultures were kept in an environmental growth chamber (Conviron, CMP3023) with constant illumination ( $100 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), temperature ( $20.0 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) and rotary agitation (around 50 rotations per min). Every 3 to 4 days, 2 mL of culture were transferred in a fresh MHSM-1 solution. All culture manipulations were performed under a sterile class 100 laminar flow hood. All glassware and culture media were sterilized at  $121^\circ\text{C}$  for 15 minutes in an autoclave (Sanyo) prior to use.

## Exposure solutions

Uptake experiments were performed between pH 4.50 and 7.90. At each pH, fluxes were measured at different Sc concentrations within the range:  $[2 \times 10^{-10} - 2 \times 10^{-6} \text{ M}]$ . Each concentration range was selected in order to characterize both the linear part and the plateau of the Michaelis-Menten saturation kinetics process, and thus to provide a good estimation of the uptake parameters ( $K_M$  and  $J_{max}$ ). However, at pH > 7.00, Sc concentrations were limited by the solubility of  $\text{Sc}(\text{OH})_3(\text{s})$  and were below uptake saturation levels.

All plasticware was soaked for 24 h in 10%  $\text{HNO}_3$  (v/v), rinsed five times with deionized water and two times in ultrapure water ( $\geq 18 \text{ Mohms}\cdot\text{cm}$ ) prior to use. The radio-isotope Sc-46 (PerkinElmer) was used as a radio-tracer in the experiments along with the stable isotope Sc-45 (SCP Science). Exposure media were prepared with ultrapure water and contained only Sc, Ca, Na,  $\text{NO}_3$  and a pH buffer when necessary. Exposure solutions had an ionic strength of  $8.4 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$  adjusted with a  $\text{NaNO}_3$  (ACS grade, EMD) solution. A low Ca concentration ( $1 \mu\text{M}$ ) was selected to minimize Ca competition yet meet the physiological requirements of *C. reinhardtii*.<sup>23</sup> The pH was adjusted with concentrated  $\text{HNO}_3$  (Trace metal grade, Fisher) or  $\text{NaOH}$  (ACS grade, Fisher) solutions. Media with pH between 6.00 and 7.50 were buffered with 1 mM MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) (Sigma Aldrich) and solutions with pH above 7.50 were buffered with 1 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Sigma Aldrich). All exposure media were prepared the day before their use since important adsorption losses of dissolved Sc onto flask walls were observed within the first hours after the medium preparation (loss  $\geq 40\%$ ). All data presented are based on measured Sc concentrations in solution at the beginning of the uptake experiments.

## Speciation modeling

Scandium speciation in the exposure media was calculated with MINEQL+ (version 4.6); the default MINEQL+ thermodynamic data base was updated with reference to the NIST (National Institute of Standards and Technology) stability constants database (version 4.5). A critical review of existing Sc stability constants was performed prior to this work. Scandium being a poorly studied metal, its thermodynamic database is relatively limited but formation constants

with OH<sup>-</sup> are sufficiently well constrained to provide satisfactory speciation modeling in our simple exposure media.<sup>24</sup>

No precipitation of Sc(OH)<sub>3</sub>(s) was expected in the exposure solutions over the selected range of pH and Sc concentrations (Sc solubility minimum at ~10<sup>-6.7</sup> M around pH 7.5<sup>14</sup>) and no evidence for precipitation was observed (see section 1 in the Supporting Information). Also, increasing buffer (MOPS or HEPES) concentrations from 1 mM up to 10 mM did not affect Sc internalization fluxes (data not shown), suggesting that these buffers do not bind Sc appreciably.

### Determination of Sc internalization fluxes

Scandium internalization fluxes were determined in the different exposure solutions by performing short-term (≤ 60 min) Sc uptake experiments in which the amount of accumulated Sc was determined, as a function of the exposure time. The short contact time was chosen to minimize potential metal efflux and to limit the possible influence of algal exudates on Sc speciation during the exposure.<sup>25</sup>

Metal accumulation ( $M_{acc}$ ) by an alga generally comprises two distinct fractions: the metal adsorbed at the cellular surface ( $M_{ads}$ ) and the metal internalized into the cell ( $M_{int}$ ) (eq. 3). Adsorption is a very fast process reaching equilibrium within the first seconds/minutes of the metal exposure, so that only the plateau is observable in the timescale of our accumulation kinetics experiments (i.e.  $M_{ads}$  remains constant). On the other hand, internalization is a slow and linear process. Thus, plots of the accumulated metal as a function of time ( $t$ ) normally yield a linear relation with a slope corresponding to the internalization flux ( $J_{int}$ ) and a positive intercept corresponding to the adsorbed metal fraction,  $M_{ads}$  (eq. 3).<sup>22</sup>

$$M_{acc} = M_{int} + M_{ads} = J_{int} \cdot t + M_{ads} \quad (3)$$

Metal internalization fluxes were thus determined from the slope of metal accumulation over time and therefore required at least two exposure times. In most studies,  $J_{int}$  is determined after extraction of surface-bound metal (i.e.  $M_{ads} = 0$ ), because it conveniently allows for the use of only one exposure time to derive  $J_{int}$ . Extraction of  $M_{ads}$  generally requires the use of strong complexing agents such as EDTA.<sup>26</sup> However, in the case of trivalent metals, complexing agents

strong enough to remove the adsorbed metal completely have not been identified.<sup>27, 28</sup> Our own attempts showed that the extraction of extra-cellular Sc was incomplete (see section 2 in the Supporting Information), suggesting that a small part of the extra-cellular Sc is quasi-irreversibly bound.<sup>22</sup> Thus,  $J_{\text{int}}$  values were determined from the slope of metal accumulation over time. Even though not necessary, an EDTA rinse step was still performed as it decreased the variability of the results (data not shown).

Algae were allowed to grow until they had reached the mid-exponential growth phase. They were then harvested on a 2- $\mu\text{m}$  polycarbonate filter membrane (Fisher), rinsed three times with 10 mL of rinsing solution (corresponding to the exposure solution without Sc) and resuspended in the exposure solution to obtain a cell density of 20,000 cells·mL<sup>-1</sup>. This low cell density was chosen to minimize Sc depletion in the exposure solution by uptake and cell surface binding ( $\leq 10\%$  after 60 minutes). Using two ( $t = 5$  and 20 min), three ( $t = 5, 20$  and 40 min) or four ( $t = 5, 20, 40$  and 60 min) contact times, an aliquot of exposed cells was recovered on a 2- $\mu\text{m}$  polycarbonate filter. After three rinses with 5 mL of rinsing solution, cells were exposed during 10 min to 10 mL of a rinsing solution supplemented with EDTA (1 mM), and then rinsed three times with 10 mL of the rinsing solution. Finally, cells were resuspended by agitating the filter with tweezers in 10 mL of a rinsing solution. An aliquot of this resuspension was analyzed with a gamma counter (Wizard<sup>2</sup> automatic gamma counter, PerkinElmer) to determine the amount of Sc accumulated by the algae. Another aliquot was analyzed with a particle counter (Counter Multisizer III, Beckman Coulter) to determine the total cell surface area in the resuspension. Internalization fluxes (in nmol·m<sup>-2</sup>·h<sup>-1</sup>) were determined from the slope of the plot of accumulated Sc, normalized for cell surface area, as a function of time.

## Electrophoretic mobility measurements

The effect of pH on the cell surface electrical potential of *C. reinhardtii*, as generated by electrical charges present in the phycosphere, was evaluated with electrophoretic mobility (EPM) measurements. These experiments were performed as described in section 3 of the Supporting Information. They provided an estimation of *C. reinhardtii* cell wall potential (Donnan potential,  $\psi_{\text{DON}}$  in J·C<sup>-1</sup>) from pH 4.50 to 7.90. The value of  $\psi_{\text{DON}}$  was used for the calculation of the free metal ion enrichment at the cell surface compared to the bulk solution, with the following equation.<sup>29</sup>

$$\frac{[\text{Sc}^{3+}]_{\text{cell wall}}}{[\text{Sc}^{3+}]_{\text{bulk}}} = \exp\left(-\frac{3\Psi_{\text{DON}}F}{RT}\right) \quad (4)$$

where F, R and T are the Faraday constant (in  $\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), the gas constant (in  $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) and the temperature (in  $^{\circ}\text{K}$ ), respectively.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Sc speciation in exposure solutions

Figure 1 illustrates the distribution of the different Sc species found in the exposure media from pH 4.00 to 9.00. At pH 4.50, approximately 47% of Sc is in the free  $\text{Sc}^{3+}$  form. This proportion drops to 19% at pH 5.00 and 0.62% at pH 6.00. At pH 7.90, it only represents an extremely low fraction of  $5.7 \times 10^{-6}\%$  of total Sc species. This speciation dominated by hydroxo-complexes is typical of trivalent metals.

### Sc internalization fluxes

No adverse biological effect was observed after exposure to low pHs (see section 4 in the Supporting Information). Scandium accumulation was linear with time over the short exposure times that we used (Figure SI.4 in the Supporting Information), indicating that there was no detectable cellular efflux and that an equilibrium was rapidly reached between Sc and surface binding sites.

The internalization fluxes determined at each pH are shown versus  $[\text{Sc}^{3+}]$  in Figure 2. Non-linear regressions were performed for each pH dataset up to 7.00 with eq. 1. The coefficients of determination ( $R^2$ ) were 0.80, 0.96, 0.80, 0.81 and 0.99 for the regressions at pH 4.50, 5.00, 6.00, 6.50 and 7.00 respectively. Internalization fluxes are thus reasonably well described by Michaelis-Menten kinetics under these experimental conditions. The obtained apparent stability constants  $K_{\text{Sc-Rcell}}(\text{app})$  and saturation fluxes  $J_{\text{max}}$  are given in Table 1. Linear regressions were



performed on Sc fluxes obtained at pH 7.50 and 7.90 because the low Sc solubility only allowed the characterization of the linear part of the uptake curve. Coefficients of determination of 0.84 and 0.68 were found respectively. Since  $[\text{Sc}^{3+}] \ll K_M$  in eq. 1 at pH 7.50 and 7.90, the obtained slopes correspond to the ratios  $J_{\max}/K_M$ , i.e. to the products of  $K_{\text{Sc-Rcell}}(\text{app})$  times  $J_{\max}$ . Saturation fluxes did not significantly vary from pH 4.50 to 7.00 ( $p > 0.05$ ) and the average value of  $J_{\max}$  was  $2200 \pm 290 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . This result indicates that the capacity and the number of Sc transporters did not vary significantly within this pH range and is consistent with the BLM framework (cf. assumptions 4 and 5). This  $J_{\max}$  value is within the reported literature range for *C. reinhardtii* (e.g.  $J_{\max} \text{ Fe(II)} \sim 120 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ <sup>30</sup>,  $J_{\max} \text{ Cd} \sim 7,200 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ <sup>31</sup> and  $J_{\max} \text{ Ni} \sim 24,000 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ <sup>32</sup>). Assuming that  $J_{\max}$  remains constant above pH 7.00, we calculated  $K_{\text{Sc-Rcell}}(\text{app})$  values for pH 7.50 and 7.90 from the slope of the linear regressions and the average  $J_{\max}$  obtained at  $\text{pH} \leq 7.00$ . These values are also given in Table 1. An increase of the pH led to an increase in  $K_{\text{Sc-Rcell}}(\text{app})$  values, demonstrating a probable competitive inhibition of  $\text{H}^+$ . Therefore, fluxes were modeled for variable pH by eq. 5, which takes into account the competition of  $\text{H}^+$  for Sc transport sites.

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\max} K_{\text{Sc-Rcell}} [\text{Sc}^{3+}]}{1 + K_{\text{Sc-Rcell}} [\text{Sc}^{3+}] + K_{\text{H-Rcell}} [\text{H}^+]} \quad (5)$$

The least-squares adjustment method was used to define the ratio  $K_{\text{Sc-Rcell}}/K_{\text{H-Rcell}}$  that best fit our experimental data ( $J_{\text{int, obs}}$ ) with the internalization fluxes calculated with eq. 5 ( $J_{\text{int, calc}}$ ). This ratio is  $4,040 \pm 450$  when considering only the data from pH 4.50 to 6.00 and  $8,020 \pm 970$  for the whole pH range.  $J_{\text{int, calc}}$  obtained using both parameters are plotted against  $J_{\text{int, obs}}$  in Figure 3. With  $K_{\text{Sc-Rcell}}/K_{\text{H-Rcell}} = 4,040 \pm 450$ , the model gives a good prediction of  $J_{\text{int}}$  between pH 4.50 to 6.00 (Figure 3a), with a  $R^2$  of 0.80 and a standard error of the regression (s, as defined by Zar<sup>33</sup>) of 379 for  $n = 101$  data points. However, it was less satisfactory in the whole pH range with  $K_{\text{Sc-Rcell}}/K_{\text{H-Rcell}} = 8,020 \pm 970$  (Figure 3b) ( $R^2 = 0.64$  and  $s = 486$  for  $n = 187$  data points). Indeed, internalization fluxes are underestimated by the model at  $\text{pH} \geq 6.50$  and this underestimation becomes more important when the pH increases:  $J_{\text{int, obs}}$  values are 2 to 5 fold higher than  $J_{\text{int, calc}}$  values at pH 6.50, 4 to 20 fold higher at pH 7.00, 20 to 30 fold higher at pH 7.50 and 100 to 1,200 fold higher at pH 7.90.

If we assume that the change in apparent Sc binding constants with pH is due to proton competition and that this competition persists up to pH 7.90, with reference to the last row in

Table 1, it follows that  $K_{\text{Sc-Rcell}} \geq 10^{13.95} \text{ M}^{-1}$ . Using the best fit ratio  $K_{\text{Sc-Rcell}}/K_{\text{H-Rcell}}$  determined above, the corresponding  $K_{\text{H-Rcell}}$  value would be  $\geq 10^{10.10} \text{ M}^{-1}$ . These minimum values are remarkably high as other trace metal affinity constants for phytoplankton ( $K_{\text{M-Rcell}}$ ) reported in the literature usually range from  $10^4$  to  $10^9 \text{ M}^{-1}$ .<sup>34</sup> To our knowledge, only one trivalent metal  $K_{\text{M-Rcell}}$  has been determined with *C. reinhardtii*: Worms and Wilkinson<sup>32</sup> reported an Al affinity constant of  $10^8$  for the Ni transporter, in competition experiments between these two metals. Thus, the exceptionally high minimum values of  $K_{\text{Sc-Rcell}}$  and  $K_{\text{H-Rcell}}$  estimated from the BLM equation are dubious. On another comparative basis, for a given total [M], Sc fluxes observed at pH 7.00 fall in the range of fluxes reported for other metals (Cd, Zn<sup>35</sup>, Mn and Ag<sup>36</sup>) obtained with *C. reinhardtii* under similar experimental conditions (Table SI.2 in the Supporting Information). However, when considering similar free  $[\text{M}^{2+}]$ , Sc fluxes are considerably higher ( $\times 10^3 - \times 10^6$ ). Thus, the proportion of  $\text{Sc}^{3+}$  at neutral pH seems very small for the high observed fluxes. In the following section, three hypotheses are examined to explain the model's lack of fit above pH 6.50: (i) the membrane electrical potential changes with the pH; (ii) the internalization is under dynamic control; and (iii) Sc hydroxo-complexes are internalized.

## Possible explanations for the model discrepancies

### Hypothesis of a membrane potential change with the pH

The EPM measurements at constant ionic strength confirmed that a pH increase from 4.50 to 7.90 increased the negative EPM values (Figure 4) and therefore the negative cell wall potential of *C. reinhardtii* cells. A first negative increase was observed from pH 4.50 to 5.00 and is attributed to the deprotonation of carboxylic groups present in the cell wall.<sup>37</sup> A second increase from pH 7.00 to 7.50 is attributed to the deprotonation of amino groups.<sup>38</sup> The increase in  $|\psi_{\text{DON}}|$  leads to an enhancement of the metal ion concentration at the cell surface, resulting in a  $[\text{Sc}^{3+}]_{\text{cell wall}}/[\text{Sc}^{3+}]_{\text{bulk}}$  ratio  $> 1$ . This enrichment factor calculated with eq. 4 increased from 5 to 8 from pH 4.50 to 5.00 and from 8 to 12 from pH 7.00 to 7.50. The BLM disregards  $\psi_{\text{DON}}$  variations (cf. assumption 5) and only takes into account specific competition with the  $\text{H}^+$ -ion at the biotic ligand site, and the latter is sometimes inadequate for the modeling of pH effects on metal uptake. This surface charge effect was incorporated into our model by replacing the  $\text{Sc}^{3+}$  concentration in the bulk solution by  $[\text{Sc}^{3+}]_{\text{cell wall}}$  in eq. 5. However, this new equation did not significantly improve the fit of Sc  $J_{\text{int, calc}}$  to  $J_{\text{int, obs}}$ . Thus, although a pH influence on  $\psi_{\text{DON}}$  is

clearly predicted, its extent is too limited in magnitude to explain the large differences between observed and calculated Sc internalization fluxes over the entire pH range.

### Hypothesis of an internalization under dynamic control

The BLM assumes that metal internalization is the limiting step of the uptake process (assumption 1), implying that the maximum possible diffusive flux of free metal to the biological interface is much higher than the metal internalization flux. The maximum diffusive flux of  $\text{Sc}^{3+}$  was therefore estimated with eq. 6 and compared to  $J_{\text{int, obs}}$  measured for each exposure treatment (cf. Figure 2).

$$J_{\text{diff}}(\text{Sc}^{3+})_{\text{max}} = D_{\text{Sc}^{3+}} \left( \frac{1}{r_c} + \frac{1}{\delta} \right) [\text{Sc}^{3+}] \quad (6)$$

where  $r_c$  is the algal cellular radius ( $2.5 \times 10^{-4}$  cm),  $\delta$  is the diffusion layer thickness ( $8 \times 10^{-4}$  cm according to Whitfield and Turner<sup>39</sup>),  $D_{\text{Sc}^{3+}}$  is the diffusion coefficient of  $\text{Sc}^{3+}$  at 25°C ( $5.74 \times 10^{-6}$   $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ <sup>40</sup>) and  $[\text{Sc}^{3+}]$  is the free  $\text{Sc}^{3+}$  concentration in the bulk solution.

The calculation suggests that  $J_{\text{diff}}(\text{Sc}^{3+})_{\text{max}}$  is smaller than  $J_{\text{int, obs}}$  from pH 6.00 to 7.90, i.e. for  $[\text{Sc}^{3+}] < 10^{-9}$  M. It implies that assumption 1 is not respected and mass transport of  $\text{Sc}^{3+}$  is insufficiently fast to satisfy the high biological uptake observed in this pH range. Thus, an additional pool of Sc (besides  $\text{Sc}^{3+}$ ) is necessary to explain the  $J_{\text{int, obs}}$  values. When the diffusion of a species becomes limiting, its depletion may occur at the bio-interface. Metal complexes will tend to restore the thermodynamic equilibrium by dissociating into free metal, providing an additional supply of free metal for the bio-uptake. This indirect contribution of metal complexes to the metal bio-uptake is controlled by their rates of diffusion (diffusive supply) and/or by their rates of formation/dissociation (chemical supply). Thus, the modeling of the overall metal flux requires the incorporation of these dynamic processes.<sup>20</sup> Recently, a new approach has been proposed to calculate the individual contribution to  $J_{\text{int}}$  from each metal species in multi-ligand systems.<sup>41, 42</sup> This approach is based on the reaction layer approximation (RLA), an electrochemical concept initially developed and described by Koutecký and Koryta.<sup>43</sup> A computer code named FLUXY was developed based on the RLA and other simplifying assumptions<sup>44</sup> which were respected in the present study (see section 7 of the Supporting Information). This

code calculates the total internalization flux as well as the flux of each metal species and its degree of lability in a multi-ligand-system. FLUXY (version 3.11) was used in the present study with input parameters described in Table SI.3 and the results obtained are given in Table SI.4 (Supporting Information). The  $J_{\text{int,calc}}$  values computed with FLUXY for pH values in the range from 6.00 to 7.90 are lower than the  $J_{\text{int,calc}}$  values calculated with the BLM equation, and are therefore even smaller than the  $J_{\text{int,obs}}$  values. This result reflects the low degrees of lability of Sc hydroxo-complexes (at the system temporal scale) as calculated by FLUXY; their contribution to the overall internalization flux is limited by their slow dissociation rate. This is reasonable, given that Sc, like Al and Fe(III), is classified as a “hard” cation dominated by stable oxo and hydroxo-complexes.

The combined supplies of  $\text{Sc}^{3+}$  (diffusion of  $\text{Sc}^{3+}$  as well as the dissociation of  $\text{Sc}(\text{OH})_n^{(3-n)+}$ ) to the biological interface are insufficient to sustain the high observed internalization fluxes. However, each data set from pH 4.50 to 7.00 was well modeled by the Michaelis-Menten equation (cf. Figure 2), implying that internalization was the rate limiting step and that thermodynamic equilibrium was fulfilled between the solution and the membrane at these pH values (cf. theoretical considerations). Yet, dynamic calculations show that this equilibrium cannot be maintained. A possible explanation for this contradiction is that undissociated hydroxo-complexes also contribute to the membrane transport. This additional contribution could maintain bulk and surface activities of all metal species at approximately the same levels.

### **Hypothesis of a contribution from membrane transport of Sc hydroxo-complexes**

A common assumption of both equilibrium and dynamic models is that only the free metal can pass through the biological membrane (assumption 6). The non-respect of this assumption by the internalization of undissociated Sc hydroxo-complexes could explain our results (high  $J_{\text{int,obs}}$  and  $K_{\text{Sc-Rcell app}}$  values). The internalization of metal complexes has been hypothesized several times to explain metal uptake deviating from BLM predictions.<sup>34, 45</sup> A proposed mechanism implies the formation of a ternary-complex at the biological surface, HO-Sc-Rcell, followed by the internalization of the intact complex. The transport of an undissociated hydroxo-complex might seem sterically unfavourable compared to the transport of the free metal ion. However, recent studies on the CorA divalent ion transporter family, generally associated with  $\text{Mg}^{2+}$  uptake in bacteria, have suggested that the fully hydrated cation  $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  is the form that initially bound

to the membrane transporter.<sup>46</sup> A subsequent progressive dehydration is then presumed to occur within the transporter channel so that the cation entering the intracellular environment is fully or partially dehydrated. There would thus appear to be some possible precedent for the uptake of an intact hydroxo-complex. Yet, this transport has never been demonstrated experimentally, since pH and hydroxo-metal species cannot be varied independently. Furthermore, the prediction of internalization fluxes based on this hypothesis is inherently complex because of the probable differences in transport properties among each metal species and the possible interplay of dynamic and thermodynamic factors.

Based on this final hypothesis, Sc fluxes were successfully modeled over nearly the entire pH range by eq. 7. This equation corresponds to eq. 5 where the total Sc concentration replaced  $[Sc^{3+}]$  and where  $K_{H-Rcell}$  was set to 0. Figure 5 shows the result of this modeling, with  $\log K_{Sc-Rcell} = 7.51 [7.47 - 7.54]$ ,  $R^2 = 0.81$  and  $s = 356$ . A very small pH effect was observable at  $pH \geq 7.50$  where  $J_{int, calc} \sim 3 \times J_{int, obs}$ . Diffusion limitation was alleviated with this new modeling (i.e.,  $J_{diff}(Sc)_{max} \gg J_{int, obs}$ , see Figure SI.5 in the Supporting Information), allowing the use of the Michaelis-Menten kinetics.

$$J_{int} = \frac{J_{max} K_{Sc-Rcell} [Sc]}{1 + K_{Sc-Rcell} [Sc]} \quad (7)$$

The assumptions underlying this new modeling are that the free ion and the undissociated hydroxo-complexes are taken up by the same transporter with the same affinity ( $K_{Sc-Rcell}$ ) and that  $H^+$  does not compete with Sc uptake. These assumptions do not seem realistic, given current general knowledge about trace metal uptake. Indeed, if hydroxo-complexes were to contribute to metal uptake, a large range of  $K_{Sc-Rcell}$  values would be expected due to the changes in size, charge and other properties of the ions. Furthermore, proton competition is generally expected for cationic metals at low pHs.<sup>19</sup> Thus, the good fit obtained with eq. 7 presumably is fortuitous. Similarly, a reasonable fit could also be obtained as a function of the first hydroxo-species ( $[ScOH^{2+}]$ ) along with proton competition using eq. 5 (see section 9 in the Supporting Information). This suggests that these relationships are empirical in nature and do not allow for a mechanistic interpretation. That being said, however, the simplicity and accuracy of eq. 7 in predicting Sc  $J_{int}$  for a wide pH range and variable metal speciation is an interesting finding. It highlights the importance of further research to obtain experimental demonstration for the uptake of Sc hydroxo-species.

## ENVIRONMENTAL IMPLICATIONS

Based on the results presented in this study, the BLM cannot be expected to predict Sc uptake as it greatly underestimates fluxes at pHs where the free metal proportion is very low. Dynamic modeling did not offer a better prediction although it was intuitively mechanistically more appropriate in the present case. The high observed uptake fluxes suggest that Sc hydroxo-complexes may also be transported through the biological membrane. An adaptation of the equilibrium and dynamic models to take this phenomenon into account might therefore be needed for environmental risk assessment. Modeling Sc fluxes with the total metal concentration in a simple Michaelis-Menten equation (eq. 7) surprisingly provided satisfactory predictions. However, this model's underlying hypotheses are not supported by current scientific knowledge. Experimental evidence for the membrane transport of metal hydroxo-species should be obtained as a next step. Due to the numerous chemical similarities shared between Al and Sc, Al uptake predictions by the BLM may also be inadequate.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Evaluation of potential Sc precipitation in exposure media; Surface-bound metal extraction experiments; Electrophoretic mobility measurements for the estimation of Donnan potential; Influence of exposure pH on *C. reinhardtii* growth; Linearity of Sc accumulation with time; Comparison of different metal internalization fluxes in *C. reinhardtii*; Dynamic flux computations with FLUXY; Internalization fluxes of Sc as a function of total [Sc]; Results of modeling internalization fluxes of Sc as a function of [ScOH<sup>2+</sup>]. This information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org/>.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge Jacques Buffle for helpful discussions. Financial support was provided by the *Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC)*

and Rio Tinto Alcan. C. Fortin and P.G.C. Campbell are supported by the Canada Research Chair program.

## REFERENCES

- (1) Allen, H. E.; Hall, R. H.; Brisbin, T. D., Metal speciation. Effects on aquatic toxicity. *Environ. Sci. Technol.* **1980**, *14* (4), 441-443.
- (2) Anderson, M. A.; Morel, F. M. M.; Guillard, R. R. L., Growth limitation of a coastal diatom by low zinc ion activity. *Nature* **1978**, *276* (5683), 70-71.
- (3) Morel, F. M. M., *Principles of Aquatic Chemistry*. John Wiley and Sons, Inc.: New York, 1983.
- (4) Campbell, P. G. C., Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Tessier, A.; Turner, D. R., Eds. John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 1995; pp 45-102.
- (5) Hudson, R. J. M., Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Observations and predictions of non-equilibrium effects. *Sci. Total Environ.* **1998**, *219* (2-3), 95-115.
- (6) Di Toro, D. M.; Allen, H. E.; Bergman, H. L.; Meyer, J. S.; Paquin, P. R.; Santore, R. C., Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20* (10), 2383-2396.
- (7) Taylor, G. J.; McDonald-Stephens, J. L.; Hunter, D. B.; Bertsch, P. M.; Elmore, D.; Rengel, Z.; Reid, R. J., Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiol.* **2000**, *123* (3), 987-996.
- (8) Rengel, Z., Uptake of aluminium by plant cells. *New Phytol.* **1996**, *134* (3), 389-406.
- (9) Wauer, G.; Heckemann, H. J.; Koschel, R., Analysis of toxic aluminium species in natural waters. *Microchim. Acta* **2004**, *146* (2), 149-154.
- (10) Sparling, D. W.; Lowe, T. P., Environmental hazards of aluminum to plants, invertebrates, fish, and wildlife. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1996**, *145*, 1-127.
- (11) Gensemer, R. W.; Playle, R. C., The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Crit. Rev. Environ. Sci. Tech.* **1999**, *29* (4), 315-450.
- (12) Walton, R. C.; White, K. N.; Livens, F.; McCrohan, C. R., The suitability of gallium as a substitute for aluminum in tracing experiments. *Biometals* **2010**, *23* (2), 221-230.

- (13) Yermiyahu, U.; Rytwo, G.; Brauer, D. K.; Kinraide, T. B., Binding and electrostatic attraction of lanthanum (La<sup>3+</sup>) and aluminum (Al<sup>3+</sup>) to wheat root plasma membranes. *J. Membr. Biol.* **1997**, 159 (3), 239-252.
- (14) Wood, S. A.; Samson, I. M., The aqueous geochemistry of gallium, germanium, indium and scandium. *Ore Geol. Rev.* **2006**, 28 (1), 57-102.
- (15) Campbell, P. G. C.; Errecalde, O.; Fortin, C.; Hiriart-Baer, V. P.; Vigneault, B., Metal bioavailability to phytoplankton-applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol., C: Comp. Toxicol. Pharmacol.* **2002**, 133 (1-2), 189-206.
- (16) Wilkinson, K. J.; Buffle, J., Critical evaluation of physicochemical parameters and processes for modelling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic) systems. In *Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces*, Van Leeuwen, H. P.; Köster, W., Eds. John Wiley & Sons: 2004; Vol. 9.
- (17) Hassler, C. S.; Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J., Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, 23 (2), 283-291.
- (18) Sunda, W. G.; Huntsman, S. A., Regulation of cellular manganese and manganese transport rates in the unicellular alga *Chlamydomonas*. *Limnol. Oceanogr.* **1985**, 30 (1), 71-80.
- (19) Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J., Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model. *Environ. Chem.* **2005**, 2 (1), 9-24.
- (20) Buffle, J.; Wilkinson, K. J.; van Leeuwen, H. P., Chemodynamics and bioavailability in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43 (19), 7170-7174.
- (21) Lustigman, B.; Lee, L. H.; Weiss-Magasic, C., Effects of cobalt and pH on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1995**, 55 (1), 65-72.
- (22) Fortin, C.; Dutel, L.; Garnier-Laplace, J., Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, 23 (4), 974-981.
- (23) Vaara, M., Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews* **1992**, 56 (3), 395-411.
- (24) Baes, J. C. F.; Mesmer, R. E., *The Hydrolysis of Cations*. Krieger Publishing Company: Malabar, Florida, 1986.
- (25) François, L.; Fortin, C.; Campbell, P. G. C., pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: Implications for an algal BLM. *Aquat. Toxicol.* **2007**, 84 (2), 123-132.



- (26) Hassler, C. S.; Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J., Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol. Oceanogr.* **2004**, *2*, 237-247.
- (27) Rengel, Z.; Reid, R. J., Uptake of Al across the plasma membrane of plant cells. *Plant Soil* **1997**, *192* (1), 31-35.
- (28) Taylor, G. J.; McDonald-Stephens, J. L.; Hunter, D. B.; Bertsch, P. M.; Elmore, D.; Rengel, Z.; Reid, R. J., Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiol.* **2000**, *123* (3), 987-996.
- (29) Kinraide, T. B., Plasma membrane surface potential ( $\psi_{PM}$ ) as a determinant of ion bioavailability: A critical analysis of new and published toxicological studies and a simplified method for the computation of plant  $\psi_{PM}$ . *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25* (12), 3188-3198.
- (30) Eckhardt, U.; Buckhout, T. J., Iron assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* involves ferric reduction and is similar to Strategy I higher plants. *J. Exp. Bot.* **1998**, *49* (324), 1219-1226.
- (31) Kola, H.; Wilkinson, K. J., Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39* (9), 3040-7.
- (32) Worms, I. A. M.; Wilkinson, K. J., Ni uptake by a green alga. 2. Validation of equilibrium models for competition effects. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41* (12), 4264-4270.
- (33) Zar, J. H., *Biostatistical Analysis*. 4th ed.; Prentice Hall: New Jersey, 1999.
- (34) Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J., Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36* (5), 969-75.
- (35) Lavoie, M.; Campbell, P. G. C.; Fortin, C., Extending the biotic ligand model to account for positive and negative feedback interactions between cadmium and zinc in a freshwater alga. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (21), 12129-12136.
- (36) Fortin, C.; Campbell, P. G. C., Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environ. Toxicol. Chem.* **2000**, *19* (11), 2769-2778.
- (37) Nederlof, M. M.; De Wit, J. C. M.; Van Riemsdijk, W. H.; Koopal, L. K., Determination of proton affinity distributions for humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27* (5), 846-856.
- (38) Plette, A. C. C.; van Riemsdijk, W. H.; Benedetti, M. F.; van der Wal, A., pH dependent charging behavior of isolated cell walls of a gram-positive soil bacterium. *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *173* (2), 354-363.
- (39) Whitfield, M.; Turner, D. R., Critical assessment of the relationship between biological thermodynamic and electrochemical availability. In *Chemical Modeling in Aqueous Systems*, American Chemical Society: 1979; Vol. 93, pp 657-680.

- (40) Li, Y.-H.; Gregory, S., Diffusion of ions in sea water and in deep-sea sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1974**, 38 (5), 703-714.
- (41) Buffle, J.; Startchev, K.; Galceran, J., Computing steady-state metal flux at microorganism and bioanalytical sensor interfaces in multiligand systems. A reaction layer approximation and its comparison with the rigorous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9 (22), 2844-2855.
- (42) Zhang, Z. S.; Buffle, J.; Town, R. M.; Puy, J.; van Leeuwen, H. P., Metal flux in ligand mixtures. 2. Flux enhancement due to kinetic interplay: comparison of the reaction layer approximation with a rigorous approach. *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113 (24), 6572-6580.
- (43) van Leeuwen, H. P.; Puy, J.; Galceran, J.; Cecilia, J., Evaluation of the Koutecky-Koryta approximation for voltammetric currents generated by metal complex systems with various labilities. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, 526 (1-2), 10-18.
- (44) Zhang, Z.; Buffle, J.; Startchev, K.; Alemani, D., FLUXY: a simple code for computing steady-state metal fluxes at consuming (bio) interfaces, in natural waters. *Environ. Chem.* **2008**, 5 (3), 204-217.
- (45) Slaveykova, V.; Wilkinson, K., Effect of pH on Pb biouptake by the freshwater alga *Chlorella kesslerii*. *Environ. Chem. Lett.* **2003**, 1 (3), 185-189.
- (46) Moomaw, A. S.; Maguire, M. E., Cation selectivity by the CorA Mg<sup>2+</sup> channel requires a fully hydrated cation. *Biochem.* **2010**, 49 (29), 5998-6008.

Table 1: Apparent stability constants for the binding of Sc to *C. reinhardtii* transport sites (mean  $\log K_{\text{Sc-Rcell}} (\text{app})$  [standard deviation range]) and maximum fluxes (average  $J_{\text{max}} \pm$  standard deviation)<sup>a</sup>

pH	$\log K_{\text{Sc-Rcell}} (\text{app})$	$J_{\text{max}} (\text{nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1})$
4.50	8.08 [7.96 – 8.25]	2490 ± 200
5.00	8.53 [8.46 – 8.61]	1810 ± 80
6.00	9.78 [9.67 – 9.92]	2230 ± 160
6.50	10.89 [10.81 – 10.99]	2470 ± 150
7.00	12.03 [11.97 – 12.09]	2010 ± 120
7.50	12.46 [12.40 – 12.52]	2200 ± 290
7.90	13.95 [13.89 – 14.01]	2200 ± 290

<sup>a</sup>At pH 7.50 and 7.90,  $K_{\text{Sc-Rcell}} (\text{app})$  values are calculated from the slope of observed internalization fluxes versus the  $\text{Sc}^{3+}$  concentration and the  $J_{\text{max}}$  value is the average of the values observed at  $\text{pH} \leq 7.00$ .

## Figure captions

Figure 1: Speciation of Sc in the exposure media from pH 4.00 to 9.00 calculated with MINEQL+ (version 4.6).

Figure 2: Internalization fluxes of Sc determined from the slope of accumulation data over 60 min exposures as a function of the free  $\text{Sc}^{3+}$  concentration at pH 4.50, 5.00, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50 and 7.90. Michaelis-Menten (MM) regressions (solid lines) were performed from pH 4.50 to 7.00 with eq. 1. Each point represents a single experiment. The dashed line represents the maximum diffusive flux of  $\text{Sc}^{3+}$  calculated with eq. 6.

Figure 3: Sc internalization fluxes calculated with eq. 5 versus internalization fluxes determined experimentally (a) at pH 4.50, 5.00 and 6.00 ( $n = 101$ ) and (b) at pH 4.50, 5.00, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50 and 7.90 ( $n = 187$ ). Each point represents a single experiment. The 1:1 (solid), 1:2 and 2:1 (dashed) lines are drawn for comparison.

Figure 4: Effect of pH on the electrophoretic mobility (EPM) of *C. reinhardtii* cells. Average  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ). Different letters indicate significant difference between means ( $p < 0.05$ , Tukey test).

Figure 5: Sc internalization fluxes calculated with total Sc concentration in eq. 1 versus internalization fluxes determined experimentally over the entire pH range ( $n = 187$ ). Each point represents a single experiment. The 1:1 (solid), 1:2 and 2:1 (dashed) lines are drawn for comparison.

**Figure 1:**

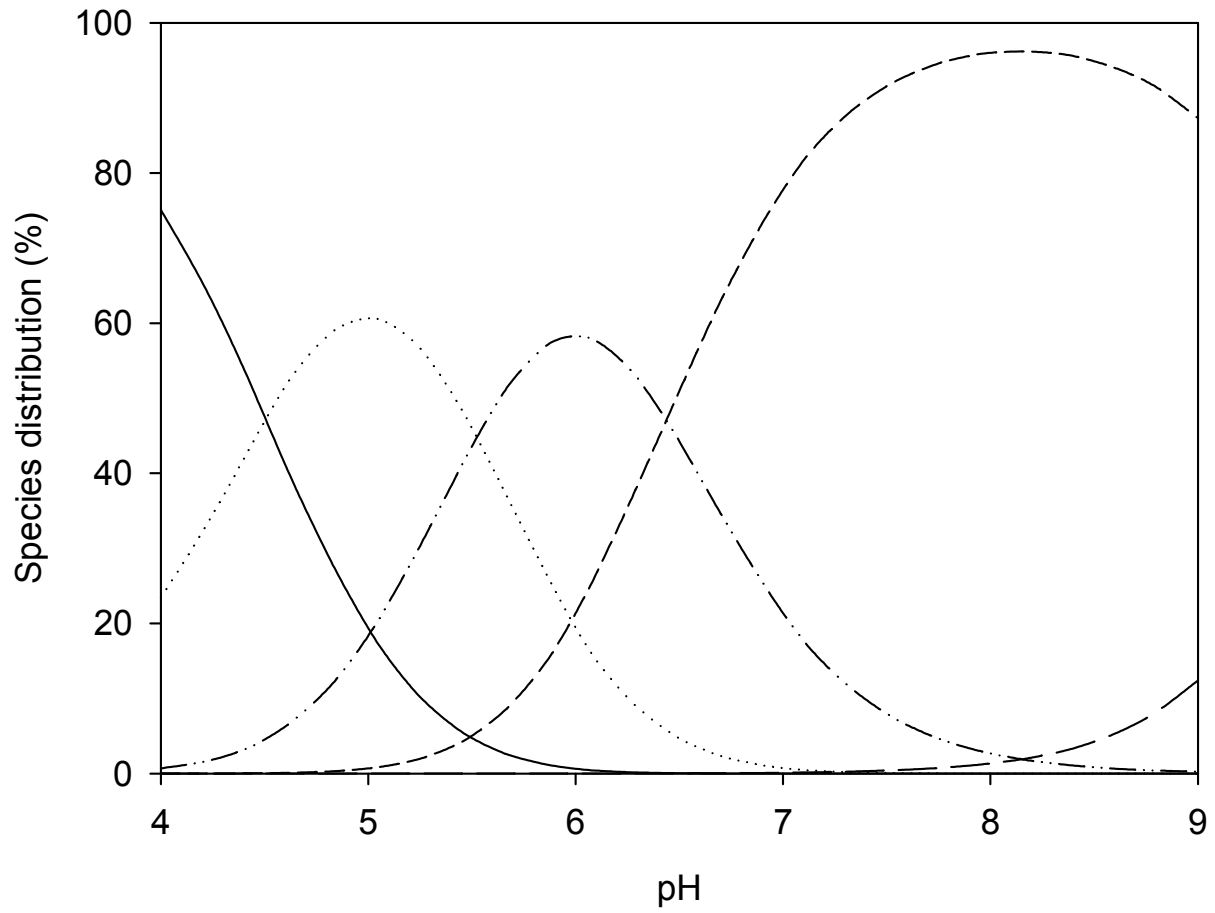
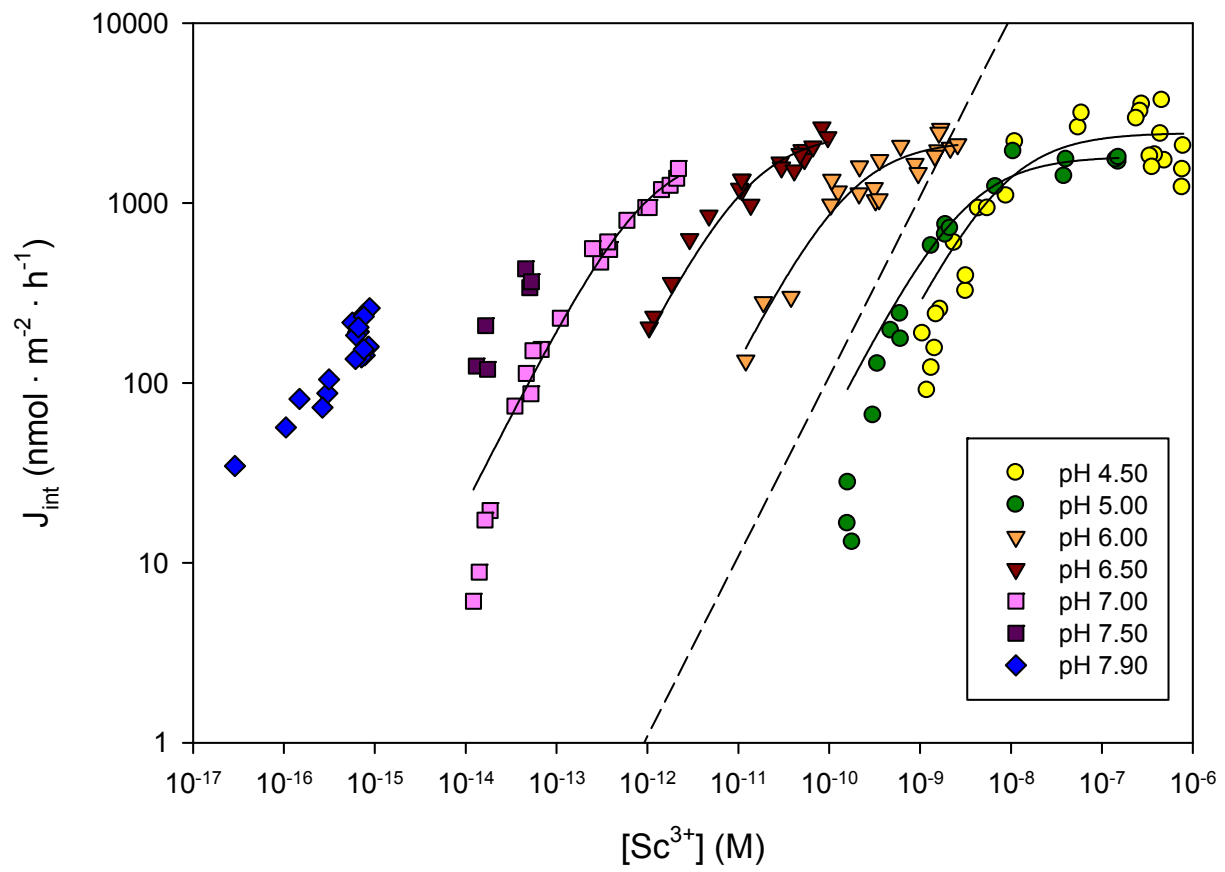


Figure 2:



**Figure 3:**

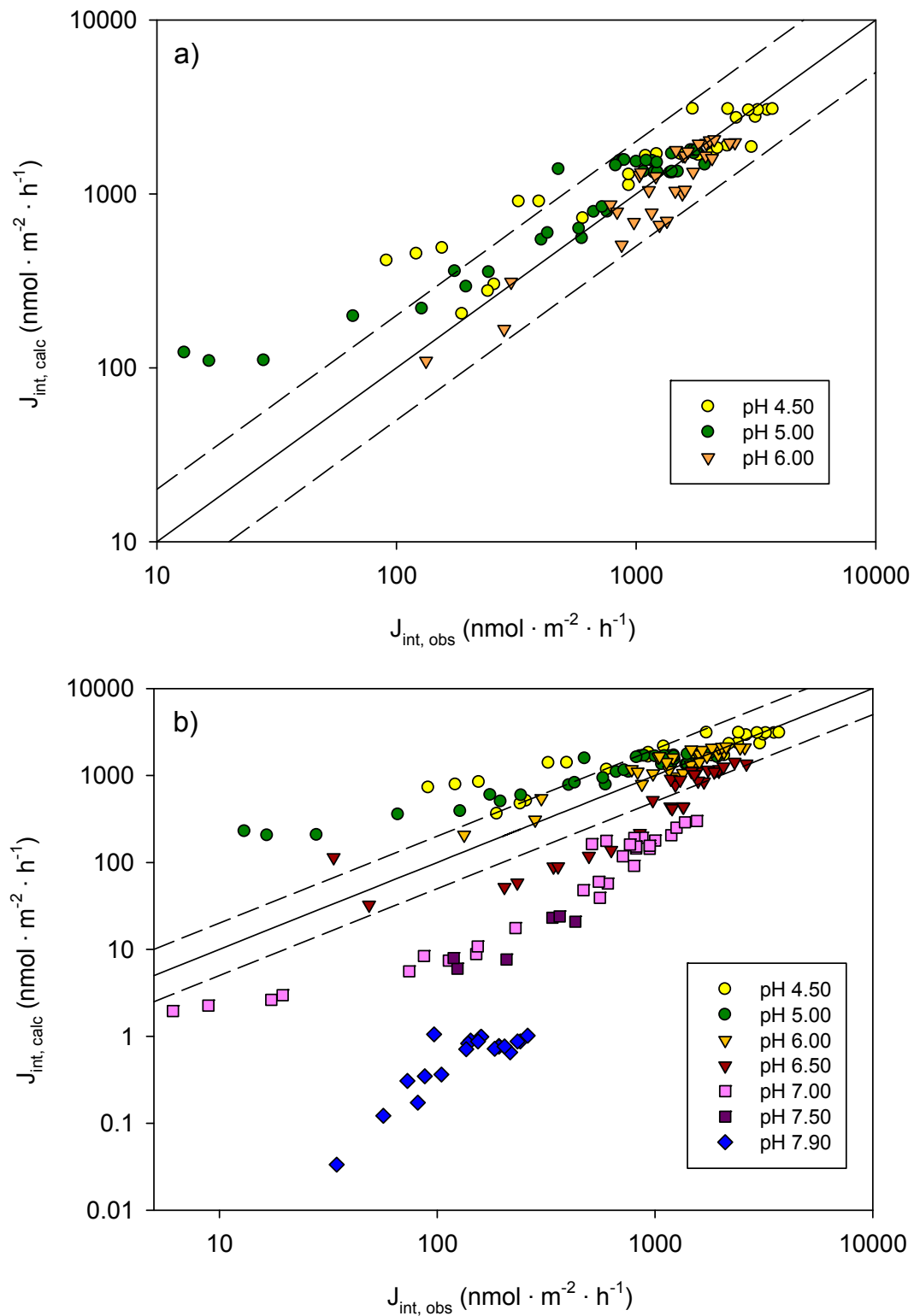


Figure 4:

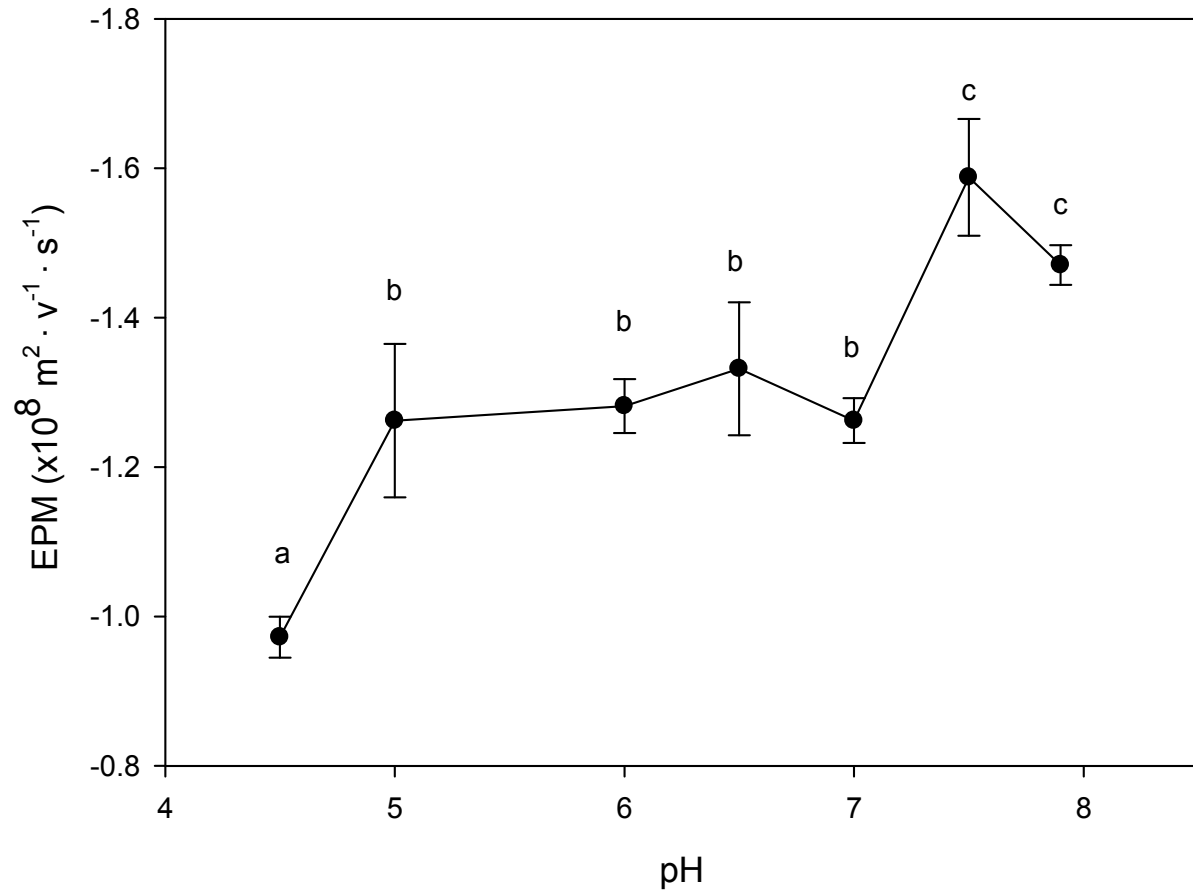
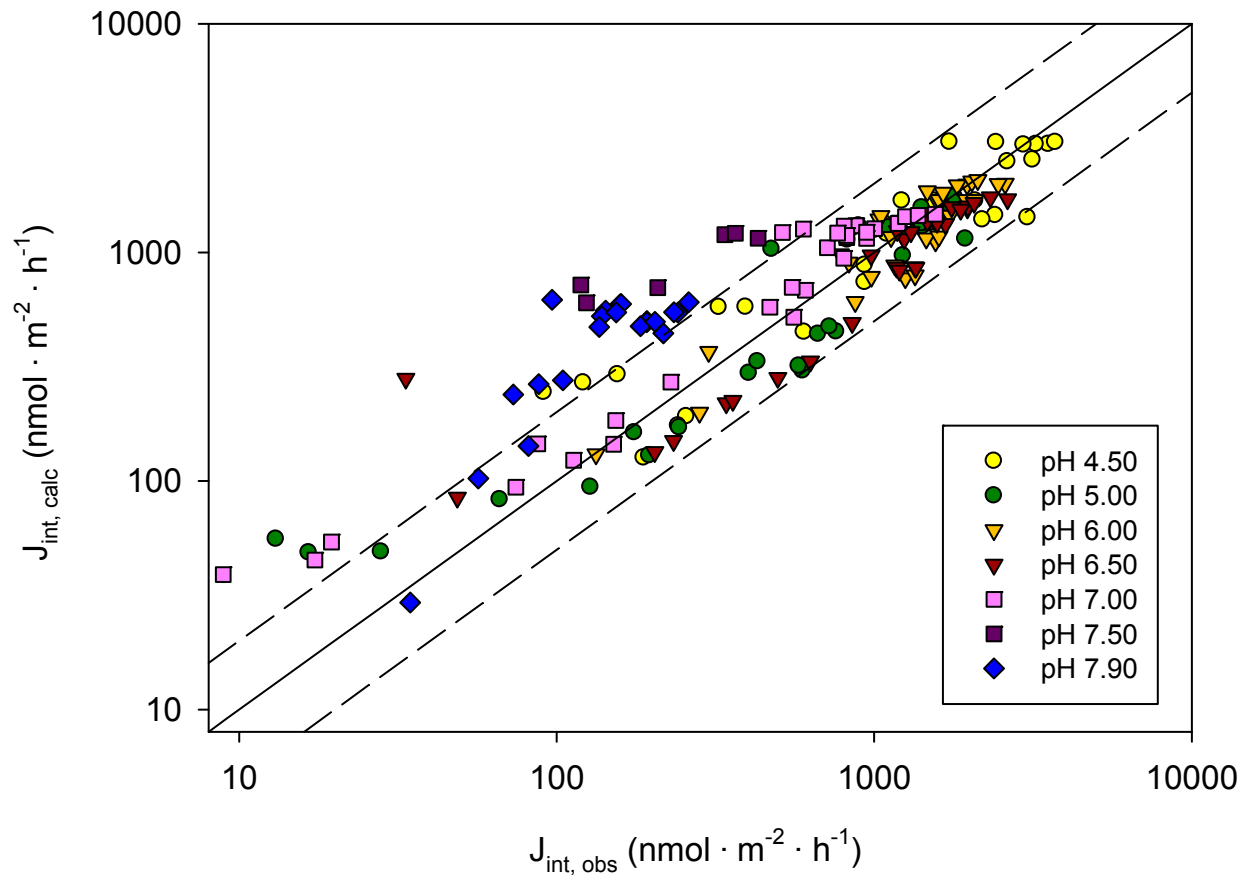




Figure 5:





## **Supporting information for**

The biotic ligand model can successfully predict the uptake of a trivalent ion by a unicellular alga below pH 6.50 but not above: possible role of hydroxo-species

Anne Crémazy, Peter G.C. Campbell and Claude Fortin

Six supplementary figures and four supplementary tables

## 1. Evaluation of potential Sc precipitation in the exposure media

In all the exposure solutions, Sc concentrations were at least 3.5 times below Sc reported solubility limits (Sc solubility minimum at  $\sim 10^{-6.7}$  M around pH 7.5).<sup>1</sup> However, we considered that this factor of 3.5 was not high enough to be truly confident about the absence of precipitation. To verify this, Sc internalization fluxes were measured (as described in the paper) at pH 7.50 at Sc concentrations of 18 and 57 nM. These concentrations were 3.5 and 11 times below Sc solubility minimum respectively. The latter concentration was considered low enough to be confident about the absence of precipitation. Under these experimental conditions, Sc internalization fluxes were situated in the linear part of the Michaelis-Menten relationship describing  $J_{\text{int}} = f([\text{Sc}^{3+}] \text{ or } [\text{Sc}])$  (cf. eq. 1). Therefore,  $J_{\text{int}}$  normalized for [Sc] could be compared for the two exposure concentrations.

Observed  $J_{\text{int}}/[\text{Sc}]$  were  $8.3 \pm 2.4$  and  $6.8 \pm 1.3 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{nM}^{-1}$  (n=3) for Sc concentrations of 18 and 57 nM respectively. These values were not significantly different ( $p > 0.05$ ), providing indirect evidence of the absence of precipitation for the highest Sc concentration we used. Indeed, if precipitation had occurred for this Sc concentration, it would have resulted in a lower  $J_{\text{int}}/[\text{Sc}]$  value.

## 2. Surface-bound metal extraction experiments

The efficiencies of different extraction methods to desorb surface-bound Sc in *C. reinhardtii* were evaluated after short-term uptake experiments (as described in the Materials and Methods section).

*C. reinhardtii* cells were exposed to approximately  $5 \times 10^{-8}$  M of Sc at pH 7.00. After four exposure times up to 90 min, algae aliquots were washed for 10 min with 10 mL of an extracting solution. This solution corresponded to the exposure solution without metal but amended with an extracting agent. The extracting agents tested in the present study were ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma Aldrich), diethylenetriamine-pentaacetic acid (DTPA, Sigma Aldrich) and Sc-45 (SCP Science). A few minutes of washing with micromolar concentrations of EDTA are generally sufficient to extract most surface-bound metals.<sup>2</sup> Total EDTA concentrations of 1, 5 and 10 mM were tested. We also tested extraction with 1 mM

DTPA, a stronger chelator than EDTA with respect to Sc ( $\log K_{\text{ScDTPA}} = 26.3$  and  $\log K_{\text{ScEDTA}} = 23.1$ ).<sup>3</sup> Finally, when a radio-isotope is used (Sc-46 in the present study), another method to discriminate between intracellular and extracellular metal is via isotopic substitution. A large excess of Sc-45 (0.01 mM at pH 5) was used here to exchange with surface-bound Sc-46 and render the extracellular metal signal undetectable by gamma counting. An experiment without extraction was also performed. After each extraction treatment, algae were rinsed three times with 10 mL of a rinsing solution (corresponding to the exposure solution without Sc). The amount of accumulated Sc (i.e., internalized + still adsorbed) per cell surface area ( $Sc_{\text{acc}}$ , in  $\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}$ ) was then measured with a gamma counter (Wizard<sup>2</sup> automatic gamma counter, PerkinElmer) and plotted with the exposure time ( $t$ , in hours). As mentioned in the Materials and Methods section (cf. eq. 3), the slope of the obtained line is the internalization flux ( $J_{\text{int}}$ , in  $\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) and the positive intercept is the concentration of surface-bound Sc ( $Sc_{\text{ads}}$ , in  $\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}$ ). This last parameter was used for the calculation of the extraction efficiency of each extraction method with the following equation:

$$\text{Extraction efficiency (\%)} = \frac{Sc_{\text{ads}}(\text{no extraction}) - Sc_{\text{ads}}(\text{after extraction})}{Sc_{\text{ads}}(\text{no extraction})} \times 100$$

with  $Sc_{\text{ads}}(\text{no extraction})$  the concentration of surface-bound Sc obtained without extraction and  $Sc_{\text{ads}}(\text{after extraction})$  the concentration of surface-bound Sc obtained after extraction. Each experiment was performed in triplicate ( $n=3$ ).

Figure SI.1 and Table SI.1 present the results normalized for dissolved Sc concentrations ( $[Sc]$ ). This normalization was necessary since it was not possible to obtain the exact same  $[Sc]$  among the experiments due to variable loss of dissolved Sc by adsorption on flask walls during solution preparation. Under the selected experimental conditions, Sc internalization fluxes ( $J_{\text{int}}$ ) are linear with  $[Sc]$  so that  $J_{\text{int}}/[Sc]$  can be compared among experiments. Figure SI.1 shows the different accumulation plots obtained with the different extraction treatments. The linear regression parameters  $J_{\text{int}}/[Sc]$  and  $Sc_{\text{ads}}/[Sc]$  obtained on these plots are presented in Table SI.1. As expected,  $J_{\text{int}}/[Sc]$ , representing the internalized Sc, is not affected by the extraction treatment or the resulting amount of surface-bound Sc. The calculated extraction efficiencies are given in Figure SI.2. No extraction method could extract 100% of surface-bound Sc and no extraction method was better than another. The use of DTPA did not provide a better Sc extraction than EDTA despite its higher affinity for Sc. Increasing EDTA concentrations from 1 to 10 mM did not

improve the extraction either. Finally, the isotopic substitution method was not better than a complexation method and accumulated Sc measured with this method displayed a greater variability than the other treatments (Figure SI.1).

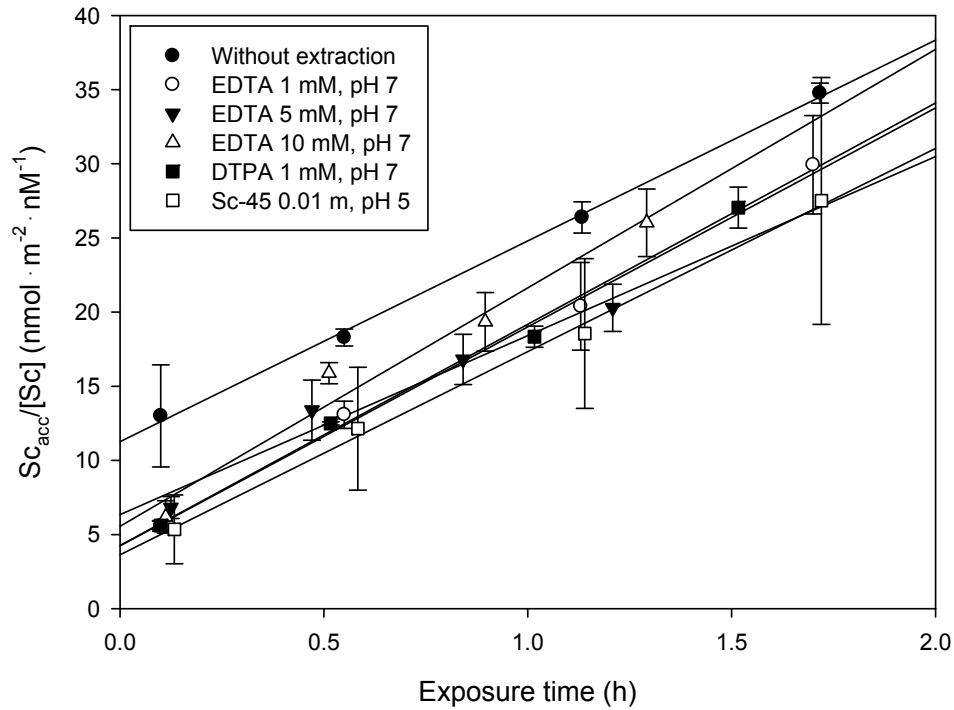


Figure SI.1: Temporal Sc accumulation in *C. reinhardtii* normalized for dissolved Sc concentration, after different extraction treatments of surface-bound Sc. Algal cells were exposed to approximately  $5 \times 10^{-8}$  M of Sc at pH 7.00, for less than 90 min. Solid lines are linear regressions. Average  $\pm$  standard deviation (n=3).

Table SI.1: Sc internalization fluxes and concentrations of surface-bound Sc in *C. reinhardtii*, normalized for dissolved Sc concentrations, after different extraction treatments. These parameters were obtained by linear regressions of the plots of  $Sc_{acc}/[Sc]$  versus time in Figure SI.2. Average  $\pm$  standard deviation (n=3).

Extracting agent	$J_{int}/[Sc](nmol \cdot m^{-2} \cdot h^{-1} \cdot nM^{-1})$	$Sc_{ads}/[Sc] (nmol \cdot m^{-2} \cdot nM^{-1})$
Without extraction	13.5 $\pm$ 2.2	11.3 $\pm$ 3.5
Sc-45 0.01 mM	13.8 $\pm$ 3.6	3.6 $\pm$ 1.8
DTPA 1 mM	14.8 $\pm$ 1.1	4.2 $\pm$ 0.4
EDTA 1 mM	14.6 $\pm$ 1.2	2.8 $\pm$ 0.3
EDTA 5 mM	12.1 $\pm$ 2.2	6.3 $\pm$ 1.7
EDTA 10 mM	16.1 $\pm$ 2.2	5.5 $\pm$ 0.9

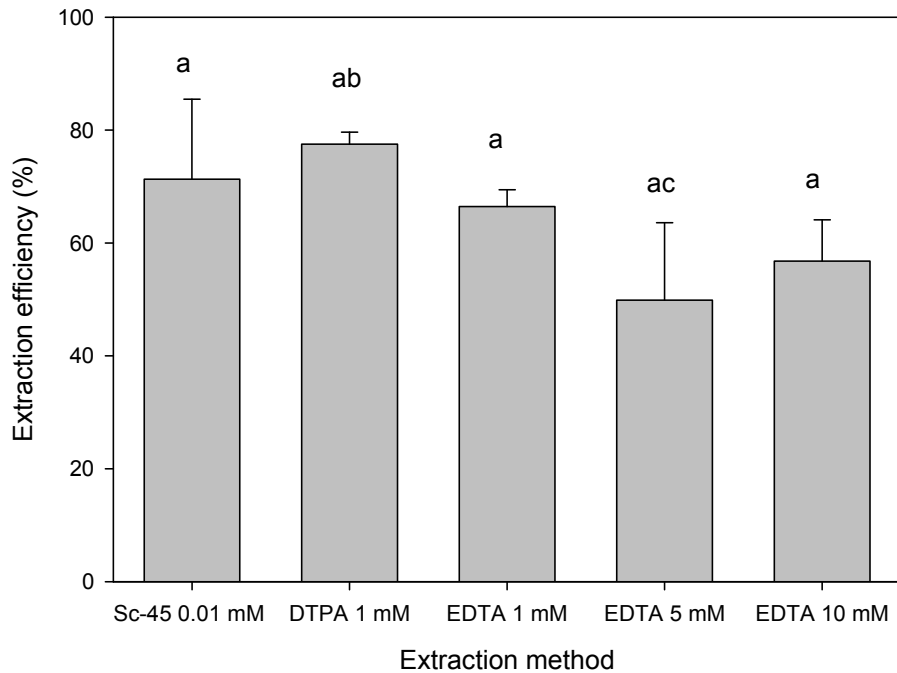


Figure SI.2: Efficiency of each extraction method to desorb surface-bound Sc on *C. reinhardtii*. Average  $\pm$  standard deviation (n=3). Different letters indicate significant differences among treatments ( $p < 0.05$ , Tukey test).

### **3. Electrophoretic mobility measurements for the estimation of Donnan potential**

Algal cell electrophoretic mobility measurements (EPMs) were measured with a ZetaPhorometer IV® (CAD Instrumentation) after a 20 min exposure in experimental solutions covering the pH range from 4.50 to 7.90 but without Sc. As *C. reinhardtii* is a flagellated motile alga, its movement interfered with the EPM measurements. Cells were thus deflagellated by subjecting them to a strong mechanical shear produced by a disperser (UltraTurrax®). They rapidly regenerated their flagella after a return to favorable conditions (within 2 hours). Experiments were performed in triplicate with the same algal culture. The Zeta potential ( $\zeta$ ), at the shear plane of the algal cell, was calculated from the EPMs with the Smoluchowski equation.<sup>4</sup> By assuming that the shear plane is only a few water layers from the cell surface and that the transition between the cell wall and the solution is very thin compared to the cell wall thickness,  $\zeta$  can be considered as a proxy for the cell wall potential (Donnan potential,  $\psi_{\text{DON}}$  in  $\text{J}\cdot\text{C}^{-1}$ ).<sup>5, 6</sup>

### **4. Influence of exposure pH on *C. reinhardtii* growth**

*C. reinhardtii* cells at their mid-exponential growth phase were exposed for 60 min to exposure media without metal at pH 4.00, 5.00 and 7.00. The algae were then harvested by filtration and rinsed with MHSM-1 (growth medium) before resuspension in MHSM-1. Their growth was then monitored during 3.5 days. Exposure to pH 7.00 was considered as a control. This experiment was performed with the same initial algal culture and in triplicate.

Figure SI.3 shows that the short exposure to acidic pH as low as pH 4.00 did not lead to any subsequent growth disturbance. Thus, it was assumed that there was no substantial biological effect associated with the exposure pH during the metal uptake experiments.



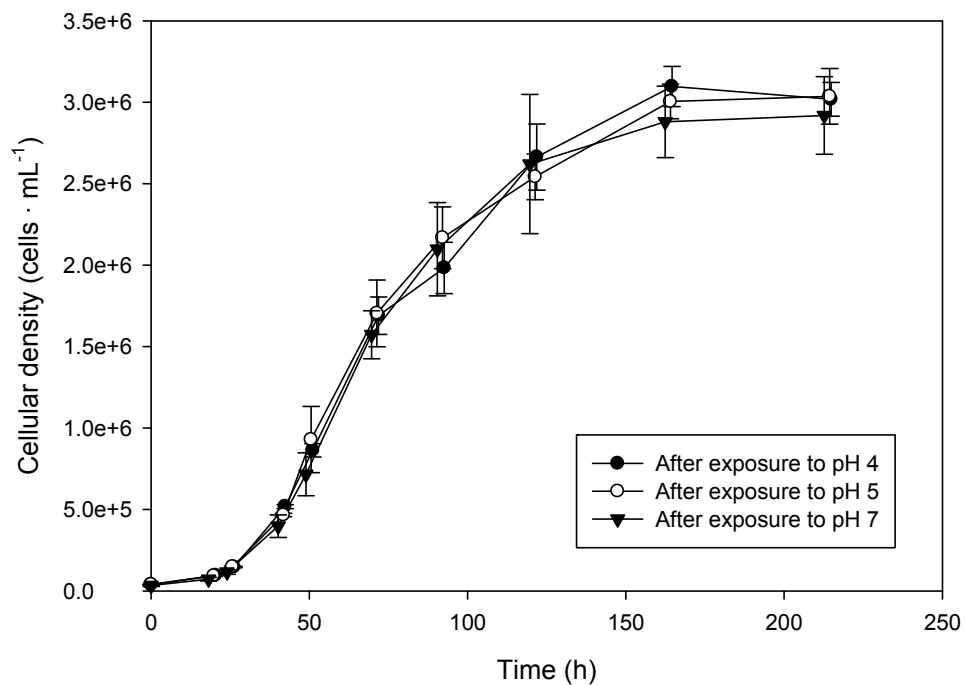


Figure SI.3: Growth of *C. reinhardtii* in MHSM-1 after being exposed to pH 4.00, 5.00 and 7.00 for 60 min. Average  $\pm$  standard deviation (n=3).

## 5. Linearity of Sc accumulation with time

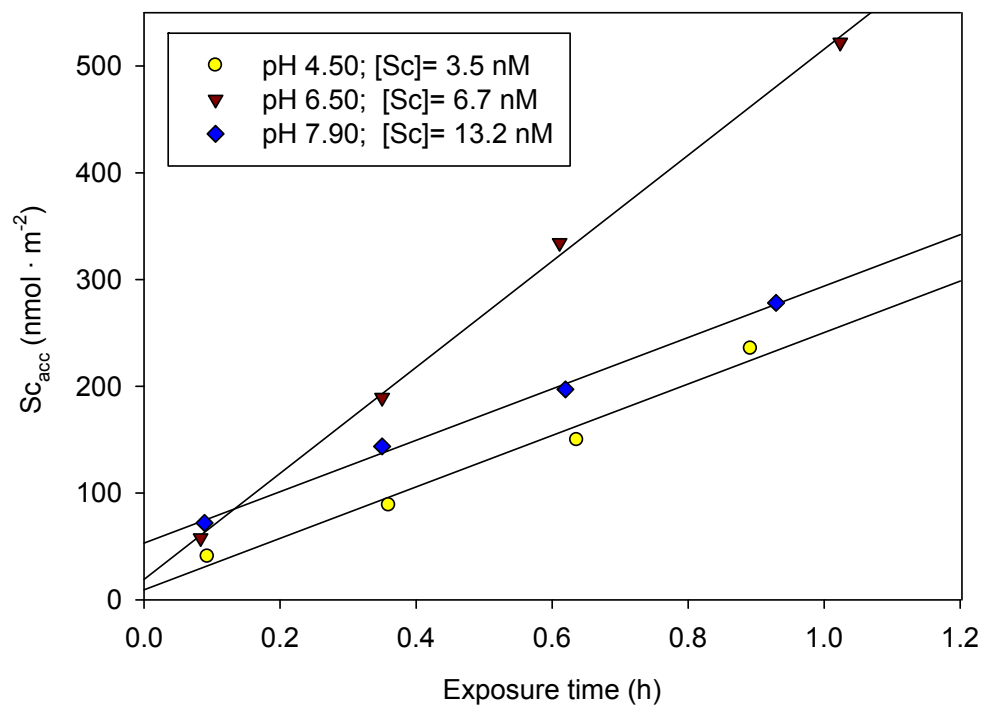


Figure SI.4: Sc accumulation as a function of time at pH 4.50, 6.50 and 7.90. Solid lines are linear regressions. Each point represents a single experiment.

## 6. Comparison of different metal internalization fluxes in *C. reinhardtii*

Table SI.2: Internalization fluxes ( $J_{\text{int}}$ ) of different metals in *C. reinhardtii* normalized for free ion ( $[M^{z+}]$ ) and total dissolved metal concentration ( $[M]$ ). For each metal, fluxes were measured in short-term (< 60 min) kinetic uptake experiments at pH 7.00 and an ionic strength of 0.01 M. Note that  $[M^{z+}] = [M]$  except for Sc where  $[\text{Sc}^{3+}] = 0.002\% [\text{Sc}]$  at pH 7.00.

Metal	$J_{\text{int}}/[M^{z+}]$ ( $\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{nM}^{-1}$ )	$J_{\text{int}}/[M]$ ( $\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{nM}^{-1}$ )	Reference
Sc	$5 \times 10^5 - 3 \times 10^6$	10 – 60	This article
Ag	180 – 420	180 – 420	7
Cd	2.4 – 3.6	2.4 – 3.6	8
Zn	0.6 – 1.8	0.6 – 1.8	8
Mn	~ 0.6	~ 0.6	7

## 7. Dynamic flux computations with FLUXY: simulation conditions and results

The theoretical and mathematical framework of this computational code is described by Zhang and co-workers.<sup>9, 10</sup> FLUXY includes two major limiting assumptions. The first assumption is that, for successive  $\text{ML}_n$  complexes, the dissociation of  $\text{ML}$  to  $\text{M}$  is the kinetically limiting step. We indeed calculated a dissociation rate constant for  $\text{ScOH}^{2+}$  lower than the ones for  $\text{Sc}(\text{OH})_2^+$ ,  $\text{Sc}(\text{OH})_3$  and  $\text{Sc}(\text{OH})_4^-$ . The second assumption is that the ligand is in excess compared with the metal. For  $\text{OH}^-$ , it means that the pH needs to be buffered to prevent pH variations at the bio-interface due to the dissociation of hydroxo-complexes. This constraint is respected as our exposure solutions were pH-buffered from pH 6.00 to 7.90. The dynamic parameters used in this code were obtained as described by Buffle and co-workers.<sup>11</sup> The input parameters are given in Table SI.3. The diffusion coefficients of the free hydrated metal and its hydroxo-complexes were assumed to be equal and correspond to the value reported by Li and Gregory.<sup>12</sup> The rate constant for water loss from the hydrated sphere of the Sc aquo-ion was the value reported by Kobayashi and co-workers.<sup>13</sup> The hydroxo-complex formation constants are those proposed by Baes and Mesmer<sup>14</sup> at zero ionic strength and 25°C. The Michaelis-Menten parameters ( $k_{\text{int}}$ ,  $\{R_{\text{cell}}\}$  and  $K_{\text{Sc-Rcell}}$ ) were chosen within the range of values most often reported<sup>15</sup> and so that  $k_{\text{int}}\{R_{\text{cell}}\}$  equaled the experimentally determined Sc  $J_{\text{max}}$ . The calculation was performed at pH 6.00, 6.50, 7.00, 7.50 and 7.90. At each pH, the input Sc concentrations corresponded to the

minimum of the concentration ranges of the experimental solutions described in the text. The degree of lability of each complex does not vary within these concentrations ranges at each pH. The calculation was performed under conditions of spherical diffusion ( $r_c = 2.5 \mu\text{m}$ ;  $\delta = 8 \mu\text{m}$ ). Steady-state fluxes were computed using the reaction layer approach (RLA) which can deal with the successive complexes. Results of dynamic flux computations are given in Table SI.4.

Table SI.3: Input parameters in FLUXY.

Ionic strength (M)	8.40e-3
T (K)	293
pH	[6.00-7.90]
Diffusion layer thickness ( $\mu\text{m}$ )	8.00
Internalization rate constant ( $k_{\text{int}}$ ) ( $\text{s}^{-1}$ )	6.11e-3
Complexation constant ( $K_{\text{Sc-Rcell}}$ ) ( $\text{M}^{-1}$ )	1.00e10
Sites concentration $\{\text{Rcell}\}$ ( $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ )	1.00e-7
Radius of microorganism ( $\mu\text{m}$ )	2.50
Diffusion coefficient $\text{Sc}(\text{OH})_k^{(3-n)+}$ ( $n=0,\dots,4$ ) ( $\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )	5.74e-6
Water exchange rate constant ( $k_w$ ) ( $\text{s}^{-1}$ ) for $\text{Sc}^{3+}$	4.80e7
Log $\beta$ $\text{ScOH}^{2+}$ (T=25°C, I = 0 M)	-4.297
Log $\beta$ $\text{Sc}(\text{OH})_2^+$ (T=25°C, I = 0 M)	-9.694
Log $\beta$ $\text{Sc}(\text{OH})_3$ (T=25°C, I = 0 M)	-16.091
Log $\beta$ $\text{Sc}(\text{OH})_4^-$ (T=25°C, I = 0 M)	-25.988

Table SI.4: Concentrations, degrees of lability and individual contributions of Sc species to the corresponding total metal fluxes calculated with FLUXY in exposure media at pH 6.00, 6.50, 7.00, 7.50 and 7.90, and comparison with experimentally measured total Sc fluxes.

pH	Metal species	Concentration (M)	Degree of lability	Calculated individual $J_{int}$ (nmol·m <sup>-2</sup> ·h <sup>-1</sup> )	Measured $J_{int}$ (nmol·m <sup>-2</sup> ·h <sup>-1</sup> )
6.00	Sc <sup>3+</sup>	1.23e-11	1	1.27e1	<b>1.33e2</b>
	ScOH <sup>2+</sup>	3.79e-10	3.89e-4	1.52e-1	
	Sc(OH) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	1.13e-9	3.84e-4	4.54e-1	
	Sc(OH) <sub>3</sub>	4.10e-10	3.81e-4	1.65e-1	
	Sc(OH) <sub>4</sub> <sup>-</sup>	5.74e-14	3.78e-4	2.30e-5	
	<b>Total</b>	<b>1.93e-9</b>		<b>1.35e1</b>	
6.50	Sc <sup>3+</sup>	8.45e-13	1	8.68e-1	<b>4.86e1</b>
	ScOH <sup>2+</sup>	8.23e-11	8.38e-5	7.06e-3	
	Sc(OH) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	7.76e-10	8.27e-5	6.66e-2	
	Sc(OH) <sub>3</sub>	8.91e-10	8.21e-5	7.67e-2	
	Sc(OH) <sub>4</sub> <sup>-</sup>	3.94e-13	8.15e-5	3.39e-5	
	<b>Total</b>	<b>1.75e-9</b>		<b>1.02</b>	
7.00	Sc <sup>3+</sup>	1.24e-14	1	1.25e-2	<b>6.12</b>
	ScOH <sup>2+</sup>	3.81e-12	1.02e-5	3.92e-5	
	Sc(OH) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	1.13e-10	1.01e-5	1.17e-3	
	Sc(OH) <sub>3</sub>	4.12e-10	1.00e-5	4.28e-3	
	Sc(OH) <sub>4</sub> <sup>-</sup>	5.77e-13	9.95e-6	5.98e-6	
	<b>Total</b>	<b>5.30e-10</b>		<b>1.81e-2</b>	
7.50	Sc <sup>3+</sup>	1.33e-14	1	1.31e-2	<b>1.24e2</b>
	ScOH <sup>2+</sup>	1.29e-11	8.27e-7	1.05e-5	
	Sc(OH) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	1.22e-9	8.16e-7	9.94e-4	
	Sc(OH) <sub>3</sub>	1.40e-8	8.10e-7	1.14e-2	
	Sc(OH) <sub>4</sub> <sup>-</sup>	6.18e-11	8.05e-7	5.04e-5	
	<b>Total</b>	<b>1.53e-8</b>		<b>2.58e-2</b>	
7.90	Sc <sup>3+</sup>	2.92e-17	1	2.80e-5	<b>3.46e1</b>
	ScOH <sup>2+</sup>	7.14e-14	9.42e-8	6.44e-9	
	Sc(OH) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	1.69e-11	9.29e-8	1.53e-6	
	Sc(OH) <sub>3</sub>	4.88e-10	9.22e-8	4.39e-5	
	Sc(OH) <sub>4</sub> <sup>-</sup>	5.42e-12	9.16e-8	4.90e-7	
	<b>Total</b>	<b>5.10e-10</b>		<b>7.49e-5</b>	

## 8. Internalization fluxes of Sc as a function of total Sc concentration

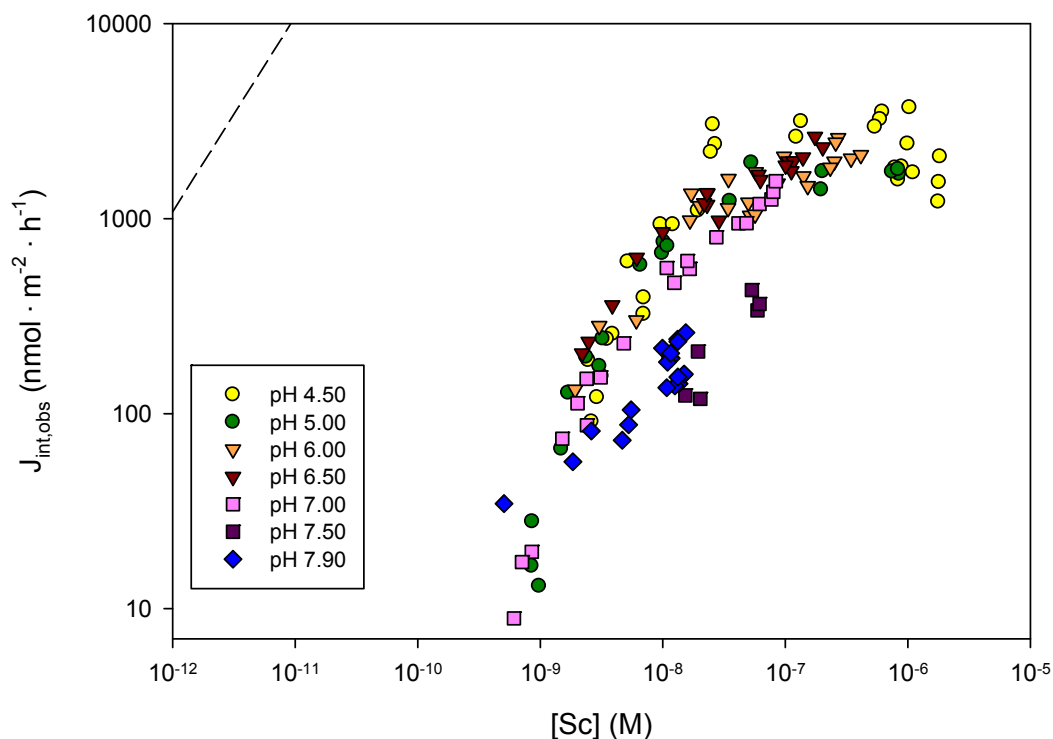


Figure SI.5: Internalization fluxes of Sc determined from the slope of accumulation data over 60 min exposures as a function of total Sc concentration at pH 4.50, 5.00, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50 and 7.90. Each point represents a single experiment. The dashed line represents the maximum diffusive flux of all Sc species calculated with eq. 6 where  $[Sc^{3+}]$  is replaced by  $[Sc]$  (with diffusion coefficients  $D_{Sc^{3+}} \sim D_{ScOH} \sim D_{Sc(OH)} \sim D_{Sc(OH)_3}$  as an acceptable approximation<sup>11</sup>).

## 9. Results of modeling internalization fluxes of Sc as a function of $[ScOH^{2+}]$

Modeling fluxes with  $[ScOH^{2+}]$  instead of  $[Sc^{3+}]$  in eq. 5 gives satisfactory predicted fluxes ( $K_{ScOH-R_{cell}}/K_{H-R_{cell}} = 500 \pm 50$ ,  $R^2 = 0.71$ ,  $s = 433$ ) as seen in Figure SI.6. Yet, this equation implies that only  $ScOH^{2+}$  is internalized, as well as the respect of the equilibrium assumption, which was not the case above pH 6.50 (i.e.  $J_{diff}(ScOH^{2+})_{max} < J_{int, obs}$ , results not shown). Thus, the good fit obtained here is considered as fortuitous.

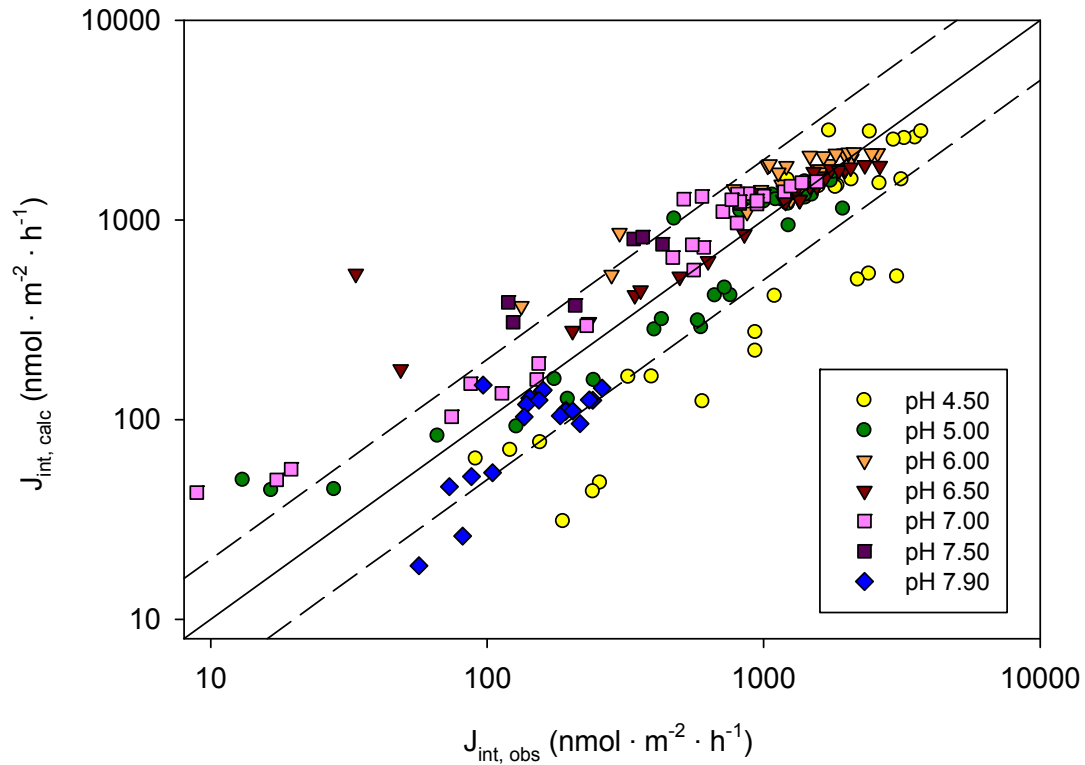


Figure SI.6: Sc internalization fluxes calculated with  $[\text{ScOH}^{2+}]$  in eq. 5 versus internalization fluxes determined experimentally over the entire pH range ( $n = 187$ ). Each point represents a single experiment. The 1:1 (solid), 1:2 and 2:1 (dashed) lines are drawn for comparison.

## 10. Literature Cited

1. Wood, S. A.; Samson, I. M., The aqueous geochemistry of gallium, germanium, indium and scandium. *Ore Geol. Rev.* **2006**, *28*, (1), 57-102.
2. Hassler, C. S.; Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J., Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol. Oceanogr.* **2004**, *2*, 237-247.
3. Martell, A. E.; Smith, R. M.; Motekaitis, R. J. *NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes Database*, 8.0; U.S. Department of Commerce: Gaithersburg, MD, USA, 2004.
4. Hunter, R. J., *Zeta potential in colloid science - principles and applications*. Academic Press: London, U.K., 1981.
5. Yee, N.; Fowle, D. A.; Ferris, F. G., A Donnan potential model for metal sorption onto *Bacillus subtilis*. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2004**, *68*, (18), 3657-3664.
6. Hassler, C. S.; Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J., Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23*, (2), 283-291.
7. Fortin, C.; Campbell, P. G. C., Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environ. Toxicol. Chem.* **2000**, *19*, (11), 2769-2778.
8. Lavoie, M.; Campbell, P. G. C.; Fortin, C., Extending the biotic ligand model to account for positive and negative feedback interactions between cadmium and zinc in a freshwater alga. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, (21), 12129-12136.
9. Zhang, Z.; Buffle, J.; Startchev, K.; Alemani, D., FLUXY: a simple code for computing steady-state metal fluxes at consuming (bio) interfaces, in natural waters. *Environ. Chem.* **2008**, *5*, (3), 204-217.
10. Zhang, Z. S.; Alemani, D.; Buffle, J.; Town, R. M.; Wilkinson, K. J., Metal flux through consuming interfaces in ligand mixtures: boundary conditions do not influence the lability and relative contributions of metal species. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, (39), 17606-17614.
11. Buffle, J.; Zhang, Z.; Startchev, K., Metal flux and dynamic speciation at (bio)interfaces. Part I: Critical evaluation and compilation of physicochemical parameters for complexes with simple ligands and fulvic/humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, (22), 7609-7620.
12. Li, Y.-H.; Gregory, S., Diffusion of ions in sea water and in deep-sea sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1974**, *38*, (5), 703-714.
13. Kobayashi, S.; Nagayama, S.; Busujima, T., Lewis acid catalysts stable in water. Correlation between catalytic activity in water and hydrolysis constants and exchange rate



constants for substitution of inner-sphere water ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, (32), 8287-8288.

14. Baes, J. C. F.; Mesmer, R. E., *The Hydrolysis of Cations*. Krieger Publishing Company: Malabar, Florida, 1986.

15. Wilkinson, K. J.; Buffle, J., Critical evaluation of physicochemical parameters and processes for modelling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic) systems. In *Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces*, Van Leeuwen, H. P.; Köster, W., Eds. John Wiley & Sons: 2004; Vol. 9.



## 8 ARTICLE #2

Uptake and subcellular partitioning of trivalent metals in a green alga: comparison between Al and Sc

Anne Crémazy†, Jacqueline L. Levy‡, Peter G.C. Campbell† and Claude Fortin†

† Institut national de la recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement (INRS-ETE), 490 rue de la Couronne, G1K 9A9, Québec, Canada.

‡ Sydney Water, 20 William Holmes Street, Potts Hill, NSW 2143, Australia

Article publié dans la revue *BioMetals*

## Résumé

Malgré plus de 40 années de recherche sur la toxicité de l'aluminium chez les organismes aquatiques, les mécanismes de transport à travers les membranes biologiques et le destin intracellulaire de l'Al demeurent très mal connus. Le scandium est un métal trivalent partageant un certain nombre de similarités chimiques avec l'Al et, contrairement à l'Al, possédant un radio-isotope (Sc-46) permettant des mesures simples de concentrations pertinentes d'un point de vue environnemental. Ainsi, nous avons étudié le potentiel du Sc à substituer l'Al dans des expériences de prise en charge et de distribution intracellulaire chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. Des expériences de prise en charge à court terme (< 60 min) ont indiqué que l'Al n'inhibait pas le flux d'internalisation du Sc chez *C. reinhardtii*, ce qui implique que ces deux métaux ne partagent pas un même mécanisme de transport chez cette algue. De plus, l'internalisation de l'Al était environ quatre fois supérieure à celle de l'Al après une exposition à long terme (72 h) de *C. reinhardtii* sous des conditions similaires (4,5  $\mu\text{M}$  d' $\text{Al}_T$  ou de  $\text{Sc}_T$ , 380  $\mu\text{M}$  de  $F_T$ , pH 7,0, 3,8 pM d' $\text{Al}_{\text{calc}}^{3+}$  et 1,0 pM de  $\text{Sc}_{\text{calc}}^{3+}$ ). En revanche, des similarités intéressantes ont été observées dans leurs distributions subcellulaires, ce qui suggère la possibilité de mécanismes communs de toxicité et de tolérance. Les deux métaux étaient distribués principalement dans la fraction des organelles et quasiment aucune association n'était détectée avec les protéines cytosoliques. La plus grande différence était observée dans la fraction des débris cellulaires (comprenant les membranes et le noyau de la cellule), où l'Al était beaucoup plus distribué que le Sc. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que cette fraction contienne du métal extra-cellulaire associé à la surface algale. En résumé, le Sc ne semble pas être un substitut adéquat de l'Al pour des études de mécanismes de prise en charge, mais il pourrait l'être pour des études de mécanismes de toxicité et de tolérance chez *C. reinhardtii*. Des travaux supplémentaires sont nécessaires afin de valider cette dernière suggestion.

**Mots clés** Prise en charge métallique, distribution subcellulaire, algue unicellulaire, aluminium, scandium, détoxification

## Abstract

Despite 40+ years of research on aluminum toxicity in aquatic organisms, Al transport mechanisms through biological membranes, and the intracellular fate of Al once assimilated, remain poorly understood. The trivalent metal scandium shares chemical similarities with Al and, unlike Al, it has a convenient radioactive tracer (Sc-46) allowing for relatively simple measurements at environmentally relevant concentrations. Thus, we investigated the potential of Sc to substitute for Al in uptake and intracellular fate studies with the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Short-term (< 60 min) competitive uptake experiments indicated that Al does not inhibit Sc influx, implying that these metals do not share a common transport mechanism. Also, internalized Al concentrations were ~4 times higher than Sc concentrations after long-term (72 h) exposures under similar conditions (4.5  $\mu\text{M}$   $\text{Al}_T$  or  $\text{Sc}_T$ , 380  $\mu\text{M}$   $\text{F}_T$ , pH 7.0, 3.8  $\text{pM}$   $\text{Al}^{3+}_{\text{calc}}$  and 1.0  $\text{pM}$   $\text{Sc}^{3+}_{\text{calc}}$ ). However, interesting similarities were observed in their relative subcellular distributions, suggesting possible common toxicity/tolerance mechanisms. Both metals mostly distributed to the organelles fraction and almost no association was found with the cytosolic proteins. The greatest difference was observed in the cellular debris fraction (membranes and nucleus) where Al was much more concentrated than Sc. However, it is not clear whether or not this fraction contained extracellular metal associated with the algal surface. To summarize, Sc does not seem to be an adequate substitute of Al for transport/uptake studies, but could be for investigations of toxicity/tolerance mechanisms in *C. reinhardtii*. Further work is needed to verify this latter suggestion.

**Keywords** Metal uptake, subcellular distribution, unicellular alga, aluminum, scandium, detoxification

## INTRODUCTION

Aluminum (Al) is known to be toxic to a variety of aquatic organisms and its biological effects have been extensively documented (Gensemer and Playle 1999). It is also well established that, in addition to physiological parameters, water chemistry (e.g., the pH, the ionic strength and the concentration of different organic and inorganic ligands) also greatly influences Al bioavailability and toxicity (Sparling and Lowe 1996). However, many processes leading to Al biological effects still remain unknown, hampering a general mechanistic understanding of Al toxicity. For example, Al transport mechanisms through biological membranes, as well as its intracellular targets once assimilated, are still speculative. Indeed, the chemical forms of Al responsible for the trans-membrane flux and the transporters involved have not yet been identified for most organisms (Taylor et al. 2000). Also, the partitioning tendencies of Al among different subcellular fractions (e.g., proteins, organelles and granules) are virtually unknown for aquatic organisms, even though the subcellular partitioning of a given metal is linked to its toxicity and tolerance mechanisms (Campbell and Hare 2009; Lavoie et al. 2009).

The lack of knowledge about Al uptake and toxicity mechanisms is mainly due to the analytical difficulties encountered with trivalent metals: Al has a complex aqueous coordination chemistry and relatively low solubility limits in natural waters (Hem and Roberson 1967). Aluminum also tends to bind tightly to biological membranes, making it difficult to operationally distinguish between mere adsorption to membrane surfaces and actual cellular internalization in uptake experiments (Rengel and Reid 1997). Finally, the only radio-isotope with a sufficiently long half-life to be used in tracing experiments, Al-26, is rare, expensive, and has a low specific activity (Walton et al. 2010). To overcome this latter limitation, the idea of using Al chemical analogues with suitable radio-isotopes has emerged. For example, Clarkson and Sanderson (1969) used a scandium isotope (Sc-46,  $t_{1/2} = 83.8$  days) as a substitute for Al to investigate the uptake and subsequent distribution of this metal in the roots of the onion *Allium cepa*. They demonstrated that these two metals had similar effects on cellular division and hypothesized that they probably shared a common toxicity mechanism. More recently, Walton et al. (2010) tested the suitability of gallium-67 as a marker for Al accumulation, toxicity, tissue and subcellular distributions in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. The two metals displayed too many differences in this latter work to support the use of Ga as a surrogate for Al. On the other hand, other comparative studies on the subcellular localization of Ga and Al have found strong similarities (Dobson et al. 1998).

In this study we tested the ability of Sc to substitute for Al in uptake and subcellular partitioning experiments with the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. The two metal ions  $\text{Sc}^{3+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  share many chemical similarities (Table 1): they display an inert gas electronic configuration; they are not redox active in biological systems; the solubilities of their ternary hydroxo-complexes are similar; and they are both class A metals that show preferential and very similar affinities for hydroxides, fluorides, sulfates and phosphates (Wood and Samson 2006). The ionic radius of  $\text{Sc}^{3+}$  is however larger than that of  $\text{Al}^{3+}$ . As a consequence, the charge density and polarizing power of Sc are lower, and its exchange kinetics are much faster. Indeed, the water exchange rate constant  $k_w$  of the Sc aquo-ion is  $4.8 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$  (Kobayashi et al. 1998) whereas that of the Al aquo-ion is only  $1.3 \text{ s}^{-1}$  (Martin 1992). It has been suggested that the Sc hydration coordination number is not 6, as is known to be the case for Al, but rather 7 or 8 (Lindqvist-Reis et al. 2006), and this could be another important difference. Whether these physico-chemical similarities or differences between Al and Sc may influence their biological accumulation and subcellular fate will be discussed in this study.

Several experiments were performed with the green unicellular alga *C. reinhardtii* to evaluate if Sc and Al are analogous. Competition for uptake into cells was assessed in short-term (< 60 min) bioaccumulation experiments to determine whether the two metals bind to a common transport protein at the biological interface. Additionally, the amount of metal accumulated and the distribution between the extracellular and intracellular compartments and within the intracellular environment of *C. reinhardtii* were compared after a 72-hour exposure to each metal at the same total concentration.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Culture of *Chlamydomonas reinhardtii***

Cultures of *C. reinhardtii* (CPCC 11 wild strain) were obtained from the Canadian Phycological Culture Centre, University of Waterloo, ON. The algae were grown in a sterile, axenic, modified high salt medium (MHSM-1, composition given in Table SI.1 of the Supporting Information) at pH 7.00 (Fortin et al. 2004). They were kept in an environmental growth chamber (Conviron, CMP3023) with constant illumination ( $100 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), temperature ( $20.0 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) and rotary

agitation (ca. 50 rotations per minute). Algae were transferred to fresh culture medium twice weekly to maintain healthy, growing cultures. They were acclimatized under these growth conditions at least two weeks prior to the exposure experiments. All culture glassware and media were sterilized at 121°C for 15 minutes in an autoclave (Sanyo) before use.

## Preparation of exposure media

All plasticware was soaked for 24 h in 10% HNO<sub>3</sub> (v/v), rinsed five times with deionized water and twice with ultrapure water ( $\geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ) prior to use. All exposure solutions were prepared the day before their use. Flasks used in long-term exposures were sterilized before use (121°C, 15 min).

Short-term (< 60 min) competition experiments were performed at pH  $5.00 \pm 0.02$  with  $5.7 \pm 1.1$  nM of Sc (Sc-46 from Polatom, radionuclide purity > 99%, initial specific activity of 394 TBq·mol<sup>-1</sup>, and Sc-45 from SCP Science, ICP grade). It is well recognized that a hydrophilic metal generally crosses biological membranes in its free ion form and that its uptake is function of its free ion concentration (Campbell 1995). In a previous study we showed that under the present experimental conditions, the Sc internalization flux in *C. reinhardtii* is linear with respect to the Sc<sup>3+</sup> concentration and Sc transport saturation starts at a concentration about five times higher than the concentration selected here (Crémazy et al. 2013). Measured Al (SCP Science, ICP grade) concentrations in the exposure media were 0,  $380 \pm 70$ ,  $670 \pm 20$ ,  $1500 \pm 30$  and  $2820 \pm 40$  nM. They corresponded to free Al<sup>3+</sup> concentrations approximately 0, 180, 290, 590 and 970 times higher than those of Sc<sup>3+</sup>. Also, these Al<sup>3+</sup> concentrations were from 0 to approximately 140 times higher than the Sc<sup>3+</sup> concentration where Sc internalization begins to saturate (Crémazy et al. 2013). Therefore, Al<sup>3+</sup> concentrations were in sufficient excess compared to Sc<sup>3+</sup> to inhibit transport of Sc, if significant competition occurs. This experiment was repeated at pH  $7.00 \pm 0.02$ , for a Sc concentration of  $1.4 \pm 0.6$  nM and five Al concentrations (0,  $35 \pm 2$ ,  $170 \pm 10$ ,  $280 \pm 20$  and  $430 \pm 20$  nM), corresponding to Al<sup>3+</sup> concentrations from 0 to about 170 times higher than Sc<sup>3+</sup> concentrations respectively. This pH change allowed us to test the effects of Al on Sc accumulation under a different metal speciation regime. A previous study showed that Sc hydroxo-complexes might be internalized by *C. reinhardtii*, in addition to Sc<sup>3+</sup> (Crémazy et al. 2013). At pH 7, these complexes represent more than 99% of Al and Sc species in the exposure media, compared to 50% and 80% respectively at pH 5.



Exposure solutions also contained  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (> 99.0%, Sigma Aldrich) at a concentration (1  $\mu\text{M}$ ) that was sufficient to meet the physiological requirements of *C. reinhardtii* yet low enough to minimize  $\text{Ca}^{2+}$  competition with metal uptake. The pH was adjusted with  $\text{HNO}_3$  (Trace metal grade, Fisher) or  $\text{NaOH}$  (ACS grade, Fisher, pre-filtered < 0.2  $\mu\text{m}$  with polyethersulfone membrane) stock solutions. The ionic strength was adjusted between 8.4 and 8.9  $\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$  with  $\text{NaNO}_3$  (ACS grade, EMD). The relative speciation of Al and Sc in the exposure media was calculated with the chemical equilibrium software MINEQL+ (version 4.6) (Table 2). No precipitation is expected under these conditions.

Long-term (72 h) accumulation experiments, for the comparison of Al and Sc accumulation and their distribution among different subcellular fractions, were performed at pH 7.00 in the sterile algal culture medium MHSM-1 containing either Al or Sc (4.5  $\mu\text{M}$ ). This rather high concentration was required to quantify Al concentration in the subcellular fractions. To buffer the Al and Sc in solution and to prevent  $\text{Al}(\text{OH})_3$  and  $\text{Sc}(\text{OH})_3$  from precipitating in the exposure media, fluoride was added to the solutions ( $\text{NaF}$ , ACS grade, Fisher;  $[\text{F}] = 380 \mu\text{M}$ ). Although higher than in natural environments, the selected F and Al concentrations are representative of effluents from aluminum production (Goulet et al. 2005). The pH was re-adjusted to  $7.00 \pm 0.02$  using a concentrated  $\text{NaOH}$  solution. The speciation of Al and Sc in the exposure solution was calculated with MINEQL+ (Table 2), without consideration of possible complexation with phosphate (0.14 mM); the formation constants with inorganic phosphate are much weaker than those with fluoride (0.38 mM) and are poorly characterized for Al and especially for Sc. The error associated with this omission should however be negligible. Indeed, given the high F concentration and the high Al-F and Sc-F formation constants, speciation in the media will be dominated by the fluoro-complexes. Calculated  $[\text{Al}^{3+}]$  and  $[\text{Sc}^{3+}]$  were 3.8 and 1.0  $\mu\text{M}$  respectively and no metal precipitation was predicted under these conditions.

All Al measurements were performed by inductively coupled plasma - atomic emission spectroscopy (ICP-AES, Varian Vista Axial) using a series of matrix-matched calibration standards. Measurement of a multi-element certified standard was used to verify analytical accuracy (PlasmaCal, SCP Science). In addition, one calibration standard was routinely measured every ten samples to check for any drift in the measurements. All Sc measurements were performed by gamma counting (Wizard<sup>2</sup> automatic gamma counter, PerkinElmer).

## Short-term competition experiments

The potential competitive effect of Al on Sc uptake was assessed by observing the influence of increasing Al concentrations on Sc internalization fluxes ( $J_{\text{int}}^{\text{Sc}}$ ) in *C. reinhardtii*. This was carried out using short-term (< 60 min) Sc uptake experiments. Scandium internalization fluxes were calculated by measuring the amount of accumulated Sc, normalized to the algal cell surface area, as a function of the exposure time. This latter relationship is linear for short exposure times where the potential for metal efflux is minimized, and the slope corresponds to the internalization flux (Fortin et al. 2004).

The experimental protocol for the measurement of Sc internalization fluxes in *C. reinhardtii* has been described in detail in a previous study (Crémazy et al. 2013). Briefly, algae in mid-exponential growth phase were collected by filtration and rinsed with metal-free media. Washed cells were then inoculated into each exposure medium at a cell density of 20,000 cells·mL<sup>-1</sup>. This density was low enough to prevent metal depletion by bioaccumulation during the exposure. Exposed cells were recovered by filtration after 5, 20 and 40 min. Total dissolved Al and Sc concentrations were analyzed in the exposure solutions at the beginning of the experiments, prior to algal inoculation. The amount of Sc in the algal cells was determined for each exposure time, and the Sc internalization flux was obtained from the slope of the linear regression between Sc accumulation and exposure time. The cell density was calculated with a particle counter (Counter Multisizer III, Beckman Coulter). All exposures were repeated in triplicate (n=3) with the same algal culture. The experiment was performed at pH 5.00 and then repeated at pH 7.00 as mentioned above.

We assessed the competition between Al and Sc for uptake into cells by comparing Sc internalization fluxes normalized to the free ion Sc<sup>3+</sup> concentrations ( $J_{\text{int}}^{\text{Sc}*}$ , in nmol·m<sup>-2</sup>·h<sup>-1</sup>·nM<sup>-1</sup>). This normalization was necessary since significant and variable losses of dissolved Sc occur by adsorption onto the walls of flasks containing the exposure solutions during their preparation. These variable losses make it unfeasible to obtain exactly the same Sc concentration in each solution and underscore the importance of determining exposure concentrations rather than relying on nominal values.

## Total metal accumulation experiments

*Chlamydomonas reinhardtii* cells in mid-exponential growth phase were collected by centrifugation (1300 g, 7 min, 4°C; Heraeus Multifuge 3 L-r) and rinsed three times with MHSM-R solution (trace metal-free MHSM-1 culture medium). Cells were then resuspended into each exposure medium (4.5 µM Al or Sc with 380 µM F in MHSM-1) to give an initial cell density of 20,000 cells·mL<sup>-1</sup>. The media were kept in the environmental growth chamber for the exposure duration, under the growth conditions described above. Small aliquots of each exposure medium and controls (experimental media without algae) were sampled at 0, 24, 48 and 72 h to measure the pH, the cell density and the total dissolved Sc or Al concentrations. After an exposure time of 72 h, algal cells were collected by centrifugation and resuspended for 10 min in 10 mL of a MHSM-E extracting solution, corresponding to the MHSM-R rinsing solution supplemented with 1 mM of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma Aldrich, > 99.0%). This step was performed to remove the metal adsorbed to the cell surface (i.e., the extracellular metal). EDTA is a strong chelating agent routinely used for this purpose (Hassler et al. 2004). Extracellular metal content was measured in the MHSM-E solution. The algal cells were then sequentially centrifuged and resuspended three times in 10 mL of fresh MHSM-R solution in order to remove any residual MHSM-E solution. A final algal suspension was collected in 2 mL of MHSM-R solution with a cell density of 10<sup>7</sup> to 10<sup>8</sup> cells·mL<sup>-1</sup>. Such high cell numbers were necessary to allow for the measurement of Al in the subcellular fractions. Aliquots of this suspension were sub-sampled for the measurements of cell density and total intracellular metal content. For intracellular Al measurements, algal cells were digested with concentrated HNO<sub>3</sub> (Fisher, trace metal grade) for 48 h then 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ACP Chemicals, ACS grade) for 24 h, prior to analysis by ICP-AES. The rest of the suspension (1.5 mL) was kept for subcellular distribution analysis. Five replicates were used for each exposure (n=5) and two method blank controls (no cells, no metal) were performed, using the same algal culture. The entire experiment was repeated a second time to confirm the results.

Aluminum and Sc concentrations in the whole intracellular and extracellular compartments were compared using Student t tests (with a nominal alpha of 0.05) and their relative distributions were compared after first using arcsin transformations to convert the data from percentages.

## Subcellular fractionation experiments

The subcellular distribution of Al and Sc in *C. reinhardtii* was determined in algal cells exposed to either Al or Sc for 72 h and then treated with EDTA as described above. This was achieved using a homogenization protocol and a differential centrifugation approach developed for algal cells in our laboratory (Lavoie et al. 2009; Lavoie et al. 2011). The algal cells were first disrupted by ultrasonication (Branson 250 sonication probe, Danbury, CT, USA; 4 min, pulse frequency =  $0.2 \text{ s}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ). Cell breakage efficiency was approximately 100% as verified by particle counting (data not shown). Broken cells were kept at  $4^\circ\text{C}$  on ice to prevent the denaturation of proteins. The intracellular components were then separated into five subcellular fractions: organelles (mitochondria, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum), granules (minerals, NaOH-resistant materials), debris (membranes, cell walls, nuclei), heat-stable proteins (HSP: glutathione, phytochelatins and other unidentified peptides) and heat-denaturable proteins (HDP: enzymes). The first centrifugation step (1,500 g, 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ) allowed the separation of the organelle/cytosol fraction (supernatant) and the debris/granules fraction (pellet). The organelle/cytosol fraction was then divided into an organelle fraction (pellet) and a cytosol fraction (supernatant) using centrifugation (100,000 g, 60 min,  $4^\circ\text{C}$ ). The cytosol fraction was separated into HSP (supernatant) and HDP (pellet) fractions after heating for 10 min at  $80^\circ\text{C}$ , cooling on ice for 60 min at  $4^\circ\text{C}$ , and then centrifuging (50,000 g for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ ). The separation of the debris (supernatant) and the granules (pellet) fractions was performed by adding 1 mL of ultrapure water to the combined fraction, heating (2 min at  $100^\circ\text{C}$ ), adding 0.5 mL of 1 M NaOH, heating again ( $70^\circ\text{C}$  for 60 min), and finally centrifuging (10,000 g, 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ).

For each exposure, metal content was analyzed in every subcellular fraction and normalized on a per cell basis (in  $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ ). For Al measurements in the pellet fractions (organelles, HDP and granules), samples were digested with concentrated  $\text{HNO}_3$  for 48 h, then 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h, whereas the supernatant fractions (debris, HSP) were acidified with  $\text{HNO}_3$  (final concentration 4% v/v) prior to analysis by ICP-AES. For Sc, metal contents in the fractions were measured directly using gamma counting (i.e., no digestion required). The calculation of the mass balance for each exposure was done by dividing the sum of all fractions by the total intracellular metal content measured independently, before the homogenization step (as described in the paragraph above). The proportion of metal in each fraction was determined by dividing the metal content in the individual fraction by the sum of the metal contents in all the fractions. Aluminum

and Sc subcellular distributions were assessed both with and without the debris fraction, because of the ambiguous nature of this fraction (see below). For each metal, the distribution among the different fractions was compared with a Tukey's HSD test, whereas comparisons between Al and Sc distribution in each fraction were performed using Student t tests. Nominal alpha was set to 0.05. Statistical analysis was done using the JMP software package.

## RESULTS

### Aluminum did not inhibit Sc uptake in *C. reinhardtii*

The only significant difference in Sc internalization fluxes (normalized for  $\text{Sc}^{3+}$  concentration;  $J_{\text{int}}^{\text{Sc}}$  \*) was observed between the  $2820 \pm 40$  nM and the  $670 \pm 20$  nM Al treatments (Tukey HSD,  $p < 0.05$ ) (Figure 1).

The Michaelis-Menten equation is known to satisfactorily model hydrophilic metal internalization fluxes through biological membranes (Wilkinson and Buffle 2004), including Sc internalization fluxes in *C. reinhardtii* (Crémazy et al. 2013). With  $\text{Al}^{3+}$  as a competitor, the equation for  $J_{\text{int}}^{\text{Sc}}$  can be adapted as follows (for a given pH and ionic composition):

$$J_{\text{int}}^{\text{Sc}} = \frac{J_{\text{max}}^{\text{Sc}} \cdot K_{\text{Sc-Rcell}} \cdot [\text{Sc}^{3+}]}{1 + K_{\text{Sc-Rcell}} \cdot [\text{Sc}^{3+}] + K_{\text{Al-Rcell}} \cdot [\text{Al}^{3+}]} \quad (\text{eq. 1})$$

where  $J_{\text{max}}^{\text{Sc}}$  is the maximal flux,  $K_{\text{Sc-Rcell}}$  is the formation constant of Sc with the membrane transporter (also called cell receptor, Rcell) and  $K_{\text{Al-Rcell}}$  is the formation constant of the competitor Al with Rcell.

The highest selected  $[\text{Al}^{3+}]$  was approximately 470 times higher than the  $[\text{Sc}^{3+}]$  where  $K_{\text{Sc-Rcell}} \cdot [\text{Sc}^{3+}] = 1$  at pH 5.00. Thus, if  $K_{\text{Al-Rcell}}$  and  $K_{\text{Sc-Rcell}}$  were similar, we should have  $K_{\text{Al-Rcell}} \cdot [\text{Al}^{3+}] \geq 1$  and then observe a significant decrease of  $J_{\text{int}}^{\text{Sc}}$ . Nonlinear regressions were performed on  $J_{\text{int}}^{\text{Sc}}$  experimental values with eq. 1, using the values of  $J_{\text{max}}^{\text{Sc}}$  and  $K_{\text{Sc-Rcell}}$  determined by Crémazy et al. (2013) at pH 5.00 with *C. reinhardtii*. The estimated value for  $K_{\text{Al-Rcell}}$  was not significantly

different from zero ( $p = 0.27$ ). Therefore, we can conclude that Al is not a competitor for Sc internalization.

Likewise, no statistically significant competitive effect of Al on Sc uptake was observed in a similar experiment at pH 7.00 using  $\text{Al}^{3+}$  concentrations 0 to 170 times higher than  $\text{Sc}^{3+}$  concentrations (Figure SI.1 in Supporting Information). Note that uptake of Al in *C. reinhardtii* could not be determined in these experiments as the accumulated Al concentrations were below the ICP-AES detection limits.

### **Aluminum and Sc subcellular distributions displayed many similarities**

The decreases in dissolved Al and Sc after 72 h of exposure were  $15 \pm 3\%$  and  $11 \pm 3\%$  respectively, which was considered to represent reasonably constant exposure conditions over time. The pH did not significantly vary over the course of the assay. Over the 72-h exposure, the Sc exposed cells grew at the same rate as the Al exposed cells (Figure SI.2 in Supporting Information). Preliminary experiments showed that Al did not affect *C. reinhardtii* growth over a 72-h exposure to Al concentrations ranging from 0 to  $5.1 \mu\text{M}$  under our experimental conditions (Figure SI.3 in Supporting Information). Therefore, we could conclude that *C. reinhardtii* growth was unaffected by the 72-h exposures to either metal at total metal concentrations of  $4.5 \mu\text{M}$  in the present experiment.

Total metal recoveries from all the subcellular fractions accounted for  $94.0 \pm 5.0\%$  of total cellular Sc and  $89.3 \pm 3.0\%$  of total cellular Al, which was considered to be acceptable.

The percentage of Al partitioning to subcellular components decreased in the order: organelles, debris > granules > HSP, HDP (Figure 2a). Similarly, the percentage of Sc partitioning to subcellular components decreased in the order: organelles > granules > HSP, HDP; the Sc debris content was lower than that in the organelles and not different from the individual contributions of the granule, HSP and HDP fractions.

The debris fraction (containing cell walls, membranes and nuclei) is an ambiguous one because there is no certainty that this fraction corresponds to internalized metal. Indeed, this fraction could correspond to EDTA-unextracted metal strongly bound to the biological surface (cell walls and membrane) of *C. reinhardtii*. With metal partitioning in the debris fraction of approximately

5% for Sc and 38% for Al, we can only affirm that the proportions of intracellular metal in the analyzed cells were  $\geq 95\%$  for Sc and  $\geq 62\%$  for Al. Therefore, comparisons of Al and Sc subcellular distributions were performed without the debris fraction (Figure 2b), i.e. on the fractions which are unequivocally intracellular. The relative partitioning of Al and Sc among these different fractions was equivalent. Similar results were obtained when the whole experiment was repeated (Figure SI.4 in Supporting Information).

### **The bioaccumulation of Al was greater than that of Sc after the 72-h exposure**

The total accumulation of Al and Sc in *C. reinhardtii* is given in Table 3, along with their partitioning between the extracellular and intracellular compartments. Ranges of possible extracellular and intracellular values are given within the lower and upper limits defined by the following two boundary conditions:

(i) The debris fraction corresponds to intracellular metal only (complete surface metal desorption):

Intracellular max = metal in EDTA-washed cells

Extracellular min = EDTA-extracted metal

(ii) The debris fraction corresponds to extracellular metal only (incomplete surface metal desorption):

Intracellular min = metal in EDTA-washed cells – debris fraction

Extracellular max = EDTA-extracted metal + debris fraction

These ranges are narrow for Sc but wide for Al because of the greater uncertainty with respect to the EDTA extraction efficiency of extracellular Al. Indeed, the extraction efficiency of surface-bound metal was  $\geq 94 \pm 6\%$  for Sc and  $\geq 30 \pm 11\%$  for Al, with the lower limits calculated with equation 2.

$$\text{Minimum extraction efficiency} = \frac{\text{EDTA - extracted metal}}{\text{EDTA - extracted metal} + \text{debris fraction}} \times 100 \quad (\text{eq.2})$$

The average total accumulation of Al was approximately 3.7 times higher than that of Sc. If we consider that the EDTA-wash was completely effective in removing surface-bound metal (i.e.

scenario (i): intracellular maximum and extracellular minimum), this observed difference can be mostly attributed to a higher intracellular Al content (5.1 times higher) since both metals bind to the same extent at the surface of *C. reinhardtii*. Scandium was evenly distributed between the intracellular and extracellular compartments whereas Al was mostly internalized. On the other hand, if we consider an incomplete EDTA-wash and assume that the debris fraction actually corresponds to extracellular metal (i.e. scenario (ii): intracellular minimum and extracellular maximum), the Sc distribution remains basically unchanged but the difference between intracellular and extracellular Al decreases. However, intracellular Al concentrations remain higher than in the extracellular fraction and Al intracellular content remains higher than Sc intracellular content (by a factor of 3.4). Finally, in scenario (ii), Al and Sc relative distributions between the extracellular and intracellular compartments become identical ( $p > 0.05$ ). We cannot determine which of these two scenarios is the most likely, but the reality is probably intermediate.

When this experiment was repeated, some differences in the absolute quantities of metals accumulated were observed compared with the first test, probably illustrating physiological differences between the algae cultures. However, all the observations made above with respect to the proportions of Al and Sc binding internally and externally were confirmed (Table SI.2, Supporting Information).

## DISCUSSION

No significant inhibition of Sc internalization in *C. reinhardtii* by Al was observed, demonstrating that, under our experimental conditions, Al and Sc do not share a common transporter at the membrane surface. Note that an inhibition of Sc influx by Al would not have necessarily meant that the two metals had a common transport route; Al could just have prevented Sc uptake by binding to its transporter without being internalized itself. However, the absence of inhibition in the present study does prove that the two metals do not share a common membrane transporter.

With the exception of a postulated Al specific membrane transporter from the Nramp family found very recently in rice (Xia et al. 2010), to our knowledge no specific trivalent transporter has



yet been identified in any organism. In comparison, uptake of the well-studied essential trivalent metal Fe(III) by *C. reinhardtii* involves a primary reduction step to Fe(II) at the cell surface, followed by a subsequent internalization of Fe(II) rather than Fe(III) (Eckhardt and Buckhout 1998). Nevertheless, membrane transporters are rarely specific to only one metal and Al has been shown to inhibit the transport of various metal ions, such as cobalt in yeast (MacDiarmid and Gardner 1998) or magnesium in higher plants (Li et al. 2001). Worms and Wilkinson (2007) observed that Al inhibited the uptake of divalent Ni by 77% in *C. reinhardtii* exposed for 40 min to equimolar free metal concentrations, whereas divalent Cd and Ga, a trivalent Al analogue, did not. These studies raise the question of which physicochemical metal ion properties determine the selectivity of membrane binding sites. In addition to cation charge, cation size is also an important parameter in metal ion substitution (Williams 2002). In the present case, the size differences that Sc<sup>3+</sup> and Al<sup>3+</sup> exhibit in their respective ionic and hydrated forms may have overwhelmed their other chemical similarities. Indeed, Al competition with Mg for Mg CorA membrane transporters in bacteria (Moomaw and Maguire 2010) and AtMGT homologues in plants (Li et al. 2001) has been presumed to be related to the very similar hydrated radii of their hexahydrated coordinated cations (4.89 Å for Al and 4.28 Å for Mg). These characteristics are relevant since CorA Mg transporters are postulated to interact initially with the fully hydrated metal ion (Moomaw and Maguire 2010). Thus, it could be speculated that the proposed higher than six water coordination number for Sc<sup>3+</sup>, along with its larger ionic radius compared to that of Al<sup>3+</sup>, might have been critical parameters accounting for the differences in preferential binding sites.

The subcellular distributions of Al and Sc showed similar contributions from the HSP, HDP, organelle and granule fractions (cf. Figure 2b). In biological systems, hard cations such as Al and Sc are expected to bind mostly to phosphate and carboxylate groups, but unless the steric arrangement of the carboxylate groups is favorable, as is the case with the citrate anion that strongly chelates Al<sup>3+</sup>, preferential binding to certain types of phosphate groups will be observed (e.g. the terminal phosphates of adenosine di- and tri-phosphate (Martin 1986; Kiss 1995)). In addition to ligand preferences, metal subcellular distributions might also be influenced by competition for cellular ligands afforded by other cations present in the subcellular fractions at higher concentrations.

The interpretation of metal distributions in algal subcellular fractions in terms of likely modes of toxic action or detoxification mechanisms is not always simple, as discussed previously in Lavoie

et al. (2009). In general, the HDP and organelle fractions could be considered to be metal-sensitive sites, whereas the HSP and granule fractions are likely to be involved in the biological detoxification of metals. This distinction is not always easy to make, as the fractions are operationally defined and may sometimes contain both metal-sensitive targets and less sensitive components. With this in mind, the implications of Al and Sc distributions in subcellular fractions are discussed below.

Aluminum and Sc partitioning in the granule fraction could be associated with sequestration into polyphosphate bodies, as has been observed in previous Al studies (Pettersson et al. 1985). Polyphosphates are linear polymers of orthophosphate present in many algal cells, including *C. reinhardtii* (Komine et al. 2000). From a toxicological point of view, metal binding with polyphosphate granules has been associated with metal tolerance in many organisms and is considered to be an important detoxification strategy for many trace metals, especially for hard cations such as Al and Sc that show the highest affinity for phosphate (Pettersson et al. 1985; Lavoie et al. 2009).

The very small proportions of Al and Sc in the cytosolic HSP and HDP proteins probably reflect the weak interactions of hard cations with amino and sulfhydryl groups. Thus, metal binding to phytochelatins in the HSP fraction, which is recognized as an important detoxification mechanism for many soft metals in plants and algae (Cobbett 2000), would not be expected to play an important role in detoxifying Al and Sc (Vitorello et al. 2005).

Aluminum and Sc were mostly found in the organelles fraction. This could be the result of strong metal chelates formed with adenosine di- and tri-phosphate (ADP, ATP). These nucleotides should be primarily present in the organelles fraction, although a significant proportion could be in the debris fraction, inside the nucleus and associated with membranes. Pettersson and Bergman (1989) observed that exposures in the range from 3.6 to 36  $\mu\text{M}$  Al increased intracellular ATP pools by 20 to 40% in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. They hypothesized that  $\text{Al}^{3+}$  may be competing with  $\text{Mg}^{2+}$  ions for binding to ATP, making it unavailable for metabolism. As a response, the organism would increase its ATP production. This hypothesis was based on the fact that  $\text{Al}^{3+}$  binds  $10^7$  times more strongly to ATP than does  $\text{Mg}^{2+}$  (Martin 1986). Accordingly, Viola et al. (1980) observed a strong inhibition of the yeast enzyme hexokinase when various trivalent metals, including Sc and Al, were present. They associated this inhibition to metal binding to ATP, which is a substrate for hexokinase.

Aluminum and Sc in the debris fraction could be associated with the nucleus. Aluminum was shown to have a significant affinity for nuclei in different studies with animals and plants (Matsumoto 1991; Silva et al. 2000), and Al binding to nuclear nucleotides and phosphorylated proteins has been suggested (Martin 1992). Aluminum binding to DNA has also been proposed (Matsumoto 1991) but its significance is still debated. Evidence for toxicity associated with accumulation in nuclei remains elusive for plants, but several studies have suggested a decreased mitotic activity (Matsumoto 1991; Silva et al. 2000), a toxic effect also reported for Sc (Clarkson and Sanderson 1969). In the present study, possible reasons why Al would be found bound to the nucleus in higher proportions ( $38 \pm 3\%$ ) than Sc ( $5 \pm 5\%$ ) are unclear. As mentioned earlier, the high observed Al partitioning into the debris fraction could also be the result of a poorly effective EDTA wash, which would result in a contribution to the debris fraction by extracellular Al associated with cell walls and the plasmalemma. Trivalent trace metals are known to have a very strong affinity for these biological components. Some researchers have proposed that membranes could be important targets of Al toxicity in algae and higher plants (Rengel and Reid 1997; Horst et al. 2010; Kinraide 1994). The high negative charge density in the cell wall and the abundance of phosphate groups present in the plasma membrane are thought to be responsible for the high Al interaction for these structures and have been associated with direct external damages (Zheng and Yang 2005; Verstraeten and Oteiza 1995). This high affinity makes it difficult to desorb trivalent metals from cellular surfaces and constitutes a major hurdle in studying their intracellular fate (Rengel 1996). To our knowledge, a complete chemical desorption of Al bound to biological membranes has not yet been reported in the literature. In previous experiments with *C. reinhardtii*, increasing the EDTA concentration up to 10 mM, using diethylenetriamine-pentaacetic acid (DTPA) rather than EDTA as a complexing agent, or finally using isotopic substitution rather than a complexation method, did not improve the extraction of surface-bound Sc (see Supporting Information of Crémazy et al. 2013). These experiments indicated that a small proportion of Sc was quasi-irreversibly bound to the cell surface, which is also probably the case for Al in this study. In the present long-term exposures, we can only assure that the EDTA wash extracted  $\geq 94 \pm 6\%$  and  $\geq 30 \pm 11\%$  of total adsorbed Sc and Al respectively. Extraction efficiency can vary greatly among metals and exposure media composition. A lower EDTA-extraction of Al compared to Sc is possible since its affinity constant with EDTA is 1000 times lower than that of Sc. The thermodynamic constants recommended by the National Institute for Standards and Technology are  $K_{\text{Sc-EDTA}} = 10^{23.100}$  and  $K_{\text{Al-EDTA}} = 10^{19.800}$  at 25°C and zero ionic strength. Due to the uncertainty associated with the debris fraction, it was

not included in our comparison of Al and Sc subcellular distributions. Scandium and Al distributions showed interesting similarities which could reflect analogous resistance and toxicity mechanisms. The challenge remains to achieve an unequivocal distinction between truly internalized and surface-bound Al, as the assessment of its biological fate and toxicity mechanisms is greatly hindered by this analytical limitation.

The total amount of Al inside the cells was between 3.4 and 5.1 times higher than the amount of Sc (Table 3), depending on the interpretation of the debris fraction (i.e., only intracellular or only extracellular metal). This could be due to a faster uptake rate for Al than for Sc, a faster efflux rate for Sc, or both. Walton et al. (2010) observed three times higher concentrations of Al in freshwater snails compared to Ga, when the snails were exposed to 13.5  $\mu\text{M}$  of either metal. They hypothesized that it was due to a faster uptake rate of Al, in part due to the smaller ionic radius of  $\text{Al}^{3+}$  (0.54 Å) compared to  $\text{Ga}^{3+}$  (0.62 Å), which would favor its uptake through membrane transporters. Given that the ionic radius of  $\text{Sc}^{3+}$  is 0.75 Å (assuming a co-ordination number of 6), a similar hypothesis could apply here. Numerous attempts have been made to identify metal physicochemical properties that would permit predictions of metal accumulation and/or toxicity in organisms. Some of the proposed properties are the metal ion charge and size, oxidation state and the electronic configuration (Wolterbeek and Verburg 2001). However, the link between these metal properties and accumulation/toxicity remains empirical.

Differences in uptake could also be caused by differences in the speciation of Al and Sc in the exposure media. Indeed, the biotic ligand model (BLM) stipulates that trace metal bioaccumulation is function of the free metal ion concentration (Campbell 1995). The estimation of metal speciation in the exposure medium (Table 2) indicates that the  $\text{Al}^{3+}$  concentration (3.8 pM) is about four times higher than the  $\text{Sc}^{3+}$  concentration (1.0 pM), because of the greater stability of  $\text{Sc-F}_n$  complexes as compared to  $\text{Al-F}_n$  complexes (Table 1). The lower Sc internalization could thus be partly explained by its lower free ion concentrations in the exposure solutions, assuming that Sc and Al have comparable uptake kinetics and that the BLM applies in this study.

The comparison of extracellular Al and Sc is unfortunately not possible since it depends on the uncertain EDTA-extraction efficiency of surface-bound Al. We can only affirm that Al adsorption on *C. reinhardtii* cells is equivalent to or higher than that of Sc under the tested conditions. Adsorption levels can be toxicologically relevant when the metal's primary toxicity targets are

extracellular, which has often been postulated for Al in plants (Xia et al. 2010). However, whether Al exerts its toxicity extracellularly or intracellularly remains a controversial topic (Vitorello et al. 2005).

## **CONCLUSION**

The objective of this study was to probe the uptake and internal fate of Al and Sc in the same target species, *C. reinhardtii*, and to evaluate whether Sc was a suitable surrogate of Al in algal ecotoxicological studies. This was done by assessing the inhibition of Sc uptake by Al, and by comparing Al and Sc accumulation and subcellular partitioning in *C. reinhardtii*. This is the first time that the partitioning of Sc to subcellular components in any organism has been assessed, and the first time that it has been assessed for Al in an algal species. Based on the results, Sc is not a suitable analogue of Al for the study of membrane transport mechanisms and intracellular accumulation. Indeed, the inability of Al to inhibit Sc uptake indicates that these metals do not enter into *C. reinhardtii* via a common pathway. Furthermore, more Al was accumulated than Sc (intracellular + extracellular), which could suggest greater influx rates. Higher concentrations of internalized Al were effectively demonstrated, whereas the comparison of the surface adsorption was hindered by uncertainty regarding the EDTA wash efficiency for Al. In contrast to these divergences between Al and Sc with respect to their uptake, exposure of *C. reinhardtii* resulted in similar subcellular fates for both metals. The similarities observed in the subcellular distributions of Al and Sc could be taken as evidence for common toxicity and resistance mechanisms. However, the possible use of Sc as an Al substitute in subcellular tracing studies needs further exploration.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Financial support was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Rio Tinto Alcan. C. Fortin and P.G.C. Campbell are supported by the Canada Research Chair program.

## REFERENCES

- Campbell PGC (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. In: Tessier A, Turner DR (eds) Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley & Sons, New York, NY, USA, pp 45-102
- Campbell PGC, Hare L (2009) Metal Detoxification in Freshwater Animals. Roles of Metallothioneins. In: Metallothioneins and Related Chelators: Metal Ions in Life Sciences, vol 5. The Royal Society of Chemistry, pp 239-277. doi:10.1039/9781847559531-00239
- Clarkson DT, Sanderson J (1969) The uptake of a polyvalent cation and its distribution in the root apices of *Allium cepa*: Tracer and autoradiographic studies. *Planta* 89:136-154
- Cobbett CS (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* 123:825-832. doi:10.1104/pp.123.3.825
- Crémazy A, Campbell PGC, Fortin C (2013) The biotic ligand model can successfully predict the uptake of a trivalent ion by a unicellular alga below pH 6.50 but not above: Possible role of hydroxo-species. *Environ Sci Technol* 47:2408-2415. doi:10.1021/es3038388
- Dobson CB, Day JP, King SJ, Itzhaki RF (1998) Location of aluminium and gallium in human neuroblastoma cells treated with metal-chelating agent complexes. *Toxicol Appl Pharmacol* 152:145-152. doi:http://dx.doi.org/10.1006/taap.1998.8489
- Eckhardt U, Buckhout TJ (1998) Iron assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* involves ferric reduction and is similar to Strategy I higher plants. *J Exp Bot* 49:1219-1226. doi:10.1093/jexbot/49.324.1219
- Fortin C, Dutel L, Garnier-Laplace J (2004) Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Environ Toxicol Chem* 23:974-981
- Gensemer RW, Playle RC (1999) The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Crit Rev Environ Sci Technol* 29:315-450
- Goulet RR, Lalonde JD, Munger C, Dupuis S, Dumont-Frenette G, Prémont S, Campbell PGC (2005) Phytoremediation of effluents from aluminum smelters: A study of Al retention in mesocosms containing aquatic plants. *Water Res* 39:2291-2300
- Hassler CS, Slaveykova VI, Wilkinson KJ (2004) Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol Oceanogr* 2:237-247
- Hem JD, Roberson CE (1967) Form and stability of aluminum hydroxide complexes in dilute solution. U.S. G.P.O., Washington

- Horst WJ, Wang Y, Eticha D (2010) The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: A review. *Ann Bot* 106:185-197. doi:10.1093/aob/mcq053
- Kinraide TB (1994) Use of Gouy-Chapman-Stern model for membrane-surface electrical potential to interpret some features of mineral rhizotoxicity. *Plant Physiol* 106:1583-1592
- Kiss T (1995) Interaction of aluminum with biomolecules - any relevance to Alzheimer's disease? *Arch Gerontol Geriatr* 21:99-112
- Kobayashi S, Nagayama S, Busujima T (1998) Lewis acid catalysts stable in water. Correlation between catalytic activity in water and hydrolysis constants and exchange rate constants for substitution of inner-sphere water ligands. *J Am Chem Soc* 120:8287-8288
- Komine Y, Eggink LL, Park H, Hooper JK (2000) Vacuolar granules in *Chlamydomonas reinhardtii*: Polyphosphate and a 70-kDa polypeptide as major components. *Planta* 210:897-905. doi:10.1007/s004250050695
- Lavoie M, Le Faucheur S, Fortin C, Campbell PGC (2009) Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquat Toxicol* 92:65-75
- Lavoie M, Le Faucheur S, Fortin C, Campbell PGC (2011) Erratum to "Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules" [*Aquat. Toxicol.* 92 (2009) 65-75]. *Aquat Toxicol* 101:298
- Li L, Tutone AF, Drummond RSM, Gardner RC, Luan S (2001) A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:2761-2775. doi:10.1105/tpc.010352
- Lindqvist-Reis P, Persson I, Sandstrom M (2006) The hydration of the scandium(III) ion in aqueous solution and crystalline hydrates studied by XAFS spectroscopy, large-angle X-ray scattering and crystallography. *Dalton Trans*:3868-3878
- MacDiarmid CW, Gardner RC (1998) Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *J Biol Chem* 273:1727-1732. doi:10.1074/jbc.273.3.1727
- Martell AE, Smith RM, Motekaitis RJ (1997) Critical Stability Constants of Metal Complexes Database [NIST Standard Reference Database 46] version 4.0. US Department of Commerce, Gaithersburg, MD
- Martin RB (1986) The chemistry of aluminum as related to biology and medicine. *Clin Chem* 32:1797-1806

- Martin RB (1992) Aluminium speciation in biology. In: Chadwick DJ, Whelan J (eds) Aluminium in Biology and Medicine. John Wiley & Sons, Ltd., New York, NY, pp 5-25. doi:10.1002/9780470514306.ch2
- Matsumoto H (1991) Biochemical mechanism of the toxicity of aluminium and the sequestration of aluminium in plant cells. *Dev Plant Soil Sci* 45:825-838
- Moomaw AS, Maguire ME (2010) Cation selectivity by the CorA Mg<sup>2+</sup> channel requires a fully hydrated cation. *Biochemistry* 49:5998-6008. doi:10.1021/bi1005656
- Nordstrom DK, Plummer LN, Langmuir D, Busenberg E, May HM, Jones BF, Parkhurst DL (1990) Revised chemical equilibrium data for major water - mineral reactions and their limitations. In: Melchior DC, Bassett RL (eds) Chemical Modeling of Aqueous Systems II, vol 416. Acs Symposium Series. Amer Chemical Soc, Washington, pp 398-413
- Pettersson A, Bergman B (1989) Effects of aluminium on ATP pools and utilization in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*: A model for the in vivo toxicity. *Physiol Plant* 76:527-534. doi:10.1111/j.1399-3054.1989.tb05473.x
- Pettersson A, Kunst L, Bergman B, Roomans GM (1985) Accumulation of aluminum by *Anabaena cylindrica* into polyphosphate granules and cell walls: An X-ray energy-disperse microanalysis study. *J Gen Microbiol* 131:2545-2548
- Rengel Z (1996) Uptake of aluminium by plant cells. *New Phytol* 134:389-406
- Rengel Z, Reid RJ (1997) Uptake of Al across the plasma membrane of plant cells. *Plant Soil* 192:31-35
- Shannon RD (1976) Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallogr* 32:751 - 767
- Silva IR, Smyth TJ, Moxley DF, Carter TE, Allen NS, Ruffy TW (2000) Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. *Plant Physiol* 123:543-552. doi:10.1104/pp.123.2.543
- Sparling DW, Lowe TP (1996) Environmental hazards of aluminum to plants, invertebrates, fish, and wildlife. *Rev Environ Contam Toxicol* 145:1-127
- Taylor GJ, McDonald-Stephens JL, Hunter DB, Bertsch PM, Elmore D, Rengel Z, Reid RJ (2000) Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiol* 123:987-996
- Verstraeten SV, Oteiza PI (1995) Sc<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, In<sup>3+</sup>, Y<sup>3+</sup>, and Be<sup>2+</sup> promote changes in membrane physical properties and facilitate Fe<sup>2+</sup>-initiated lipid peroxydation. *Arch Biochem Biophys* 322:284-290



- Viola RE, Morrison JF, Cleland WW (1980) Interaction of metal(III)-adenosine 5'-triphosphate complexes with yeast hexokinase. *Biochem* 19:3131-3137. doi:10.1021/bi00555a003
- Vitorello VA, Capaldi FR, Stefanuto VA (2005) Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Braz J Plant Physiol* 17:129-143
- Walton RC, White KN, Livens F, McCrohan CR (2010) The suitability of gallium as a substitute for aluminum in tracing experiments. *BioMetals* 23:221-230
- Wilkinson KJ, Buffle J (2004) Critical evaluation of the physicochemical parameters and processes for modelling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic) systems. In: van Leeuwen HP, Köster W (eds) *Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces*. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems, vol Vol 9. John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp 445-533
- Williams RJP (2002) Recent aspects of aluminum chemistry and biology: A survey. *Coord Chem Rev* 228:93-96
- Wolterbeek HT, Verburg TG (2001) Predicting metal toxicity revisited: general properties vs. specific effects. *Sci Total Environ* 279:87-115. doi:S0048-9697(01)00756-2 [pii]
- Wood SA, Samson IM (2006) The aqueous geochemistry of gallium, germanium, indium and scandium. *Ore Geol Rev* 28:57-102. doi:10.1016/j.oregeorev.2003.06.002
- Worms IAM, Wilkinson KJ (2007) Ni Uptake by a Green Alga. 2. Validation of Equilibrium Models for Competition Effects. *Environ Sci Technol* 41:4264-4270
- Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma JF (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc Natl Acad Sci* 107:18381-18385. doi:10.1073/pnas.1004949107
- Zheng SJ, Yang JL (2005) Target sites of aluminum phytotoxicity. *Biol Plant* 49:321-331. doi:10.1007/s10535-005-0001-1

Table 1: Physico-chemical properties of Al<sup>3+</sup> and Sc<sup>3+</sup>

Parameter	Al	Sc
Ionic radius <sup>a</sup> (coordination number), r	0.535 Å (6)	0.745 Å (6); 0.870 (8)
Ionic potential, z/r (z=3)	5.56 Å <sup>-1</sup>	4.03 Å <sup>-1</sup> (6); 3.45 Å <sup>-1</sup> (8)
Polarizing power, z <sup>2</sup> /r (z=3)	16.67 Å <sup>-1</sup>	12.08 Å <sup>-1</sup>
M <sup>3+</sup> electronic configuration	Inert-gas like configuration	Inert-gas like configuration
Water exchange rate <sup>b</sup> , k <sub>w</sub>	1.3 s <sup>-1</sup>	4.8 x 10 <sup>7</sup> s <sup>-1</sup>
Log β M(OH) <sub>n</sub> <sup>(3-n)+</sup> (n=1,...,4) <sup>c</sup>	-4.997, -10.094, -16.791, -22.688	-4.297, -9.694, -16.091, -25.988
Log β M(F) <sub>n</sub> <sup>(3-n)+</sup> (n=1,...,4) <sup>c</sup>	7.000, 12.600, 16.700, 19.400	7.080, 12.900, 17.400, 20.220
Log K <sub>s</sub> M(OH) <sub>3</sub> <sup>d</sup>	-9.350 (microcrystalline gibbsite)	-9.291

<sup>a</sup> Ionic radii are from Shannon (1976)

<sup>b</sup> Water exchange rate of Al is from Martin (1992) and that of Sc is from Kobayashi et al. (1998)

<sup>c</sup> β, formation constants of metal M for zero ionic strength and 25°C, critically selected by Martell et al. (1997)

<sup>d</sup> K<sub>s</sub>, Solubility constant of metal M for zero ionic strength and 25°C, critically selected by Nordstrom et al. (1990) for Al and by Martell et al. (1997) for Sc

Table 2: Distribution (in %) of dominant Al and Sc species in the short- and long-term exposure media as estimated with MINEQL+ (version 4.6). Metal phosphato-complexes were assumed to be negligible in the long-term exposure medium.

Exposure media	Metal, M	M <sup>3+</sup>	MOH <sup>2+</sup>	M(OH) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	M(OH) <sub>3</sub>	M(OH) <sub>4</sub> <sup>-</sup>	MF <sup>2+</sup>	MF <sub>2</sub> <sup>+</sup>	MF <sub>3</sub>	MF <sub>4</sub> <sup>-</sup>
Short-term (pH 5.00)	Al	50	31	19	0.34	0.048				
	Sc	20	61	18	0.66	9.3E-06				
Long-term (pH 7.00 MHSM-1 with 380 μM F)	Al	8.4E-05	5.0E-03	0.31	0.56	7.9	0.17	17	63	12
	Sc	2.3E-05	7.0E-03	0.19	0.69	3.5E-07	0.051	8.0	74	18

Table 3: Ranges of Sc and Al concentrations in the intracellular and extracellular fractions of *C. reinhardtii* exposed for 72 h to either Al or Sc (4.5  $\mu\text{M}$ ) at pH 7.00. Absolute ( $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ ) and relative (%) values given as means (standard deviation) (n=5).

	Sc	Al
Total accumulated	48 (27) $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ 100%	175 (59) $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ 100%
Intracellular ([min - max]) <sup>a</sup>	[29 (24) – 30 (24)] $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ [53 (19) – 55 (19)] %	[102 (39) – 153 (54)] $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ [58 (2) – 87 (2)] %
Extracellular ([min - max]) <sup>b</sup>	[18 (5) – 19 (5)] $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ [45 (19) – 47 (19)] %	[22 (10) – 74 (20)] $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ [13 (2) – 42 (2)] %

<sup>a</sup> Intracellular min: metal in EDTA-washed cells – debris fraction

Intracellular max: metal in EDTA-washed cells

<sup>b</sup> Extracellular min: EDTA-extracted metal

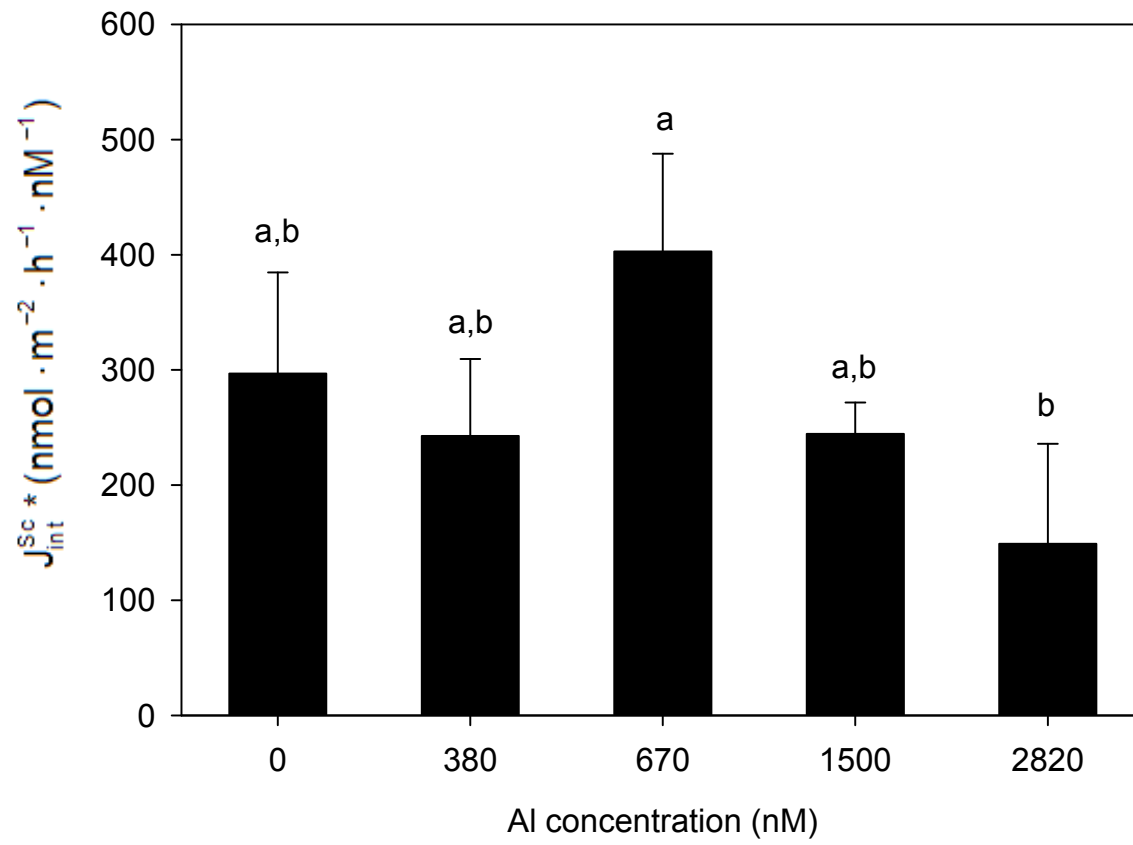
Extracellular max: EDTA-extracted metal + debris fraction

## Figure captions

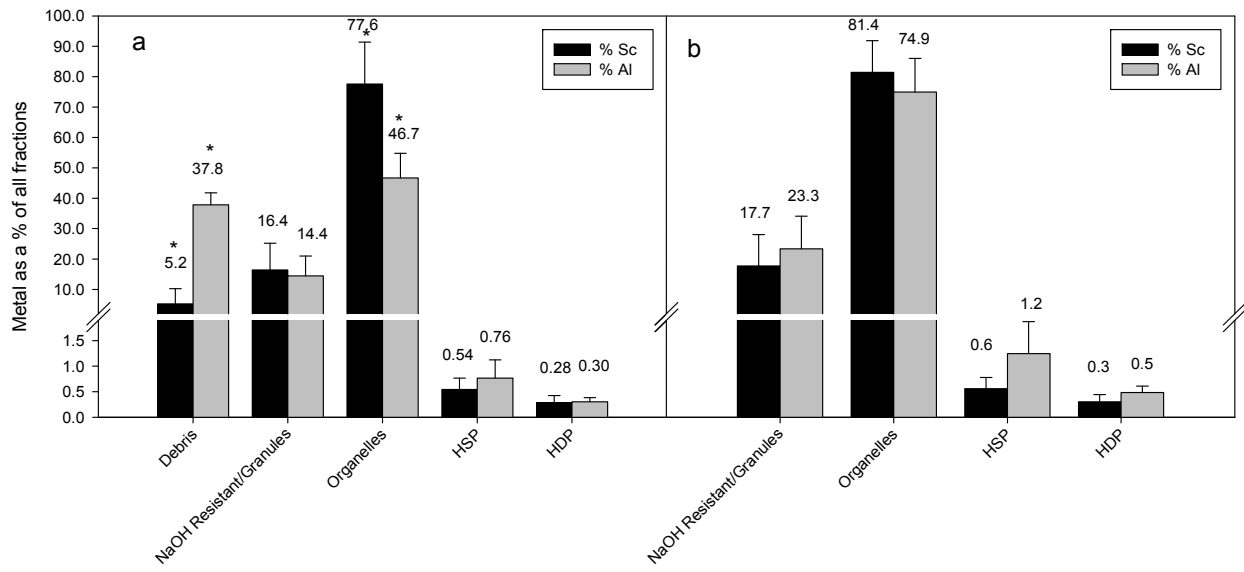
**Fig. 1:** Effect of the total Al concentration on normalized (for  $\text{Sc}^{3+}$  concentration) Sc internalization fluxes for *C. reinhardtii* at pH 5.00. Means  $\pm$  standard deviation (n=3). Means not sharing the same letter(s) are significantly different (Tukey HSD,  $p < 0.05$ ).

**Fig. 2:** Sc and Al distributions (in %) in subcellular fractions of *C. reinhardtii* following a 72-h exposure to either metal (4.5  $\mu\text{M}$ ) at pH 7.00, a) with and b) without the debris fraction. Average  $\pm$  standard deviation (n=5). \*= significant difference ( $p < 0.05$ ) between Al and Sc distribution

Figure 1:



**Figure 2:**







## Supporting information for

Uptake and subcellular partitioning of trivalent metals in a green alga: comparison between Al and Sc

Anne Crémazy†, Jacqueline L. Levy‡, Peter G.C. Campbell† and Claude Fortin†

† Institut national de la recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement (INRS-ETE), 490 rue de la Couronne, G1K 9A9, Québec, Canada.

‡ Sydney Water, 20 William Holmes Street, Potts Hill, NSW 2143, Australia

Four supplementary figures and two supplementary tables

Table SI.1: Concentrations of constituents in modified high salt medium (MHSM-1) for algal growth and long term accumulation experiments.

Ions	Total Concentration (M)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	9.37 x10 <sup>-4</sup>
Cl <sup>-</sup>	5.98 x10 <sup>-6</sup>
K <sup>+</sup>	4.22 x10 <sup>-3</sup>
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1.37 x10 <sup>-4</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5.07 x10 <sup>-3</sup>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	8.12 x10 <sup>-5</sup>
Mg <sup>2+</sup>	8.12 x10 <sup>-5</sup>
Ca <sup>2+</sup>	6.80 x10 <sup>-5</sup>
Na <sup>+</sup>	1.02 x10 <sup>-4</sup>
BO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	3.01 x10 <sup>-6</sup>
Mn <sup>2+</sup>	2.10 x10 <sup>-6</sup>
Fe <sup>3+</sup>	5.92 x10 <sup>-7</sup>
MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	3.00 x10 <sup>-8</sup>
Zn <sup>2+</sup>	2.43 x10 <sup>-8</sup>
Co <sup>2+</sup>	1.09 x10 <sup>-8</sup>
Cu <sup>2+</sup>	7.04 x10 <sup>-8</sup>
EDTA	8.06 x10 <sup>-7</sup>
MOPS	10 <sup>-2</sup>

**Table SI.2:** Ranges of Sc and Al concentrations in the intracellular and extracellular fractions of *C. reinhardtii* exposed for 72 h to either Al or Sc (4.5  $\mu\text{M}$ ) at pH 7.00. Absolute ( $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ ) and relative (%) values given as means (standard deviation) (n=5). Test #2.

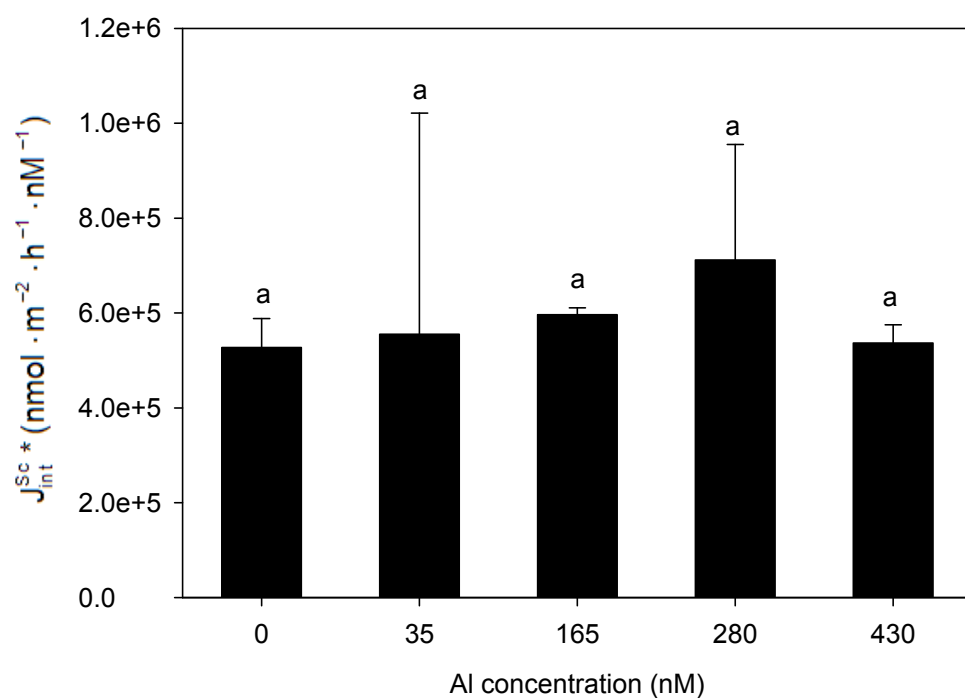
	Sc	Al
Total accumulated	117 (31) $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ 100%	302 (66) $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ 100%
Intracellular ([min - max])*	[62 (26) - 65 (27)] $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ [52 (11) - 54 (10)] %	[130 (78) - 261 (57)] $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ [42 (19) - 87 (2)] %
Extracellular ([min - max])**	[52 (8) - 54 (8)] $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ [46 (10) - 48 (11)] %	[41 (11) - 171 (55)] $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ [13 (2) - 58 (19)] %

\* Intracellular min: metal in EDTA-washed cells – debris fraction

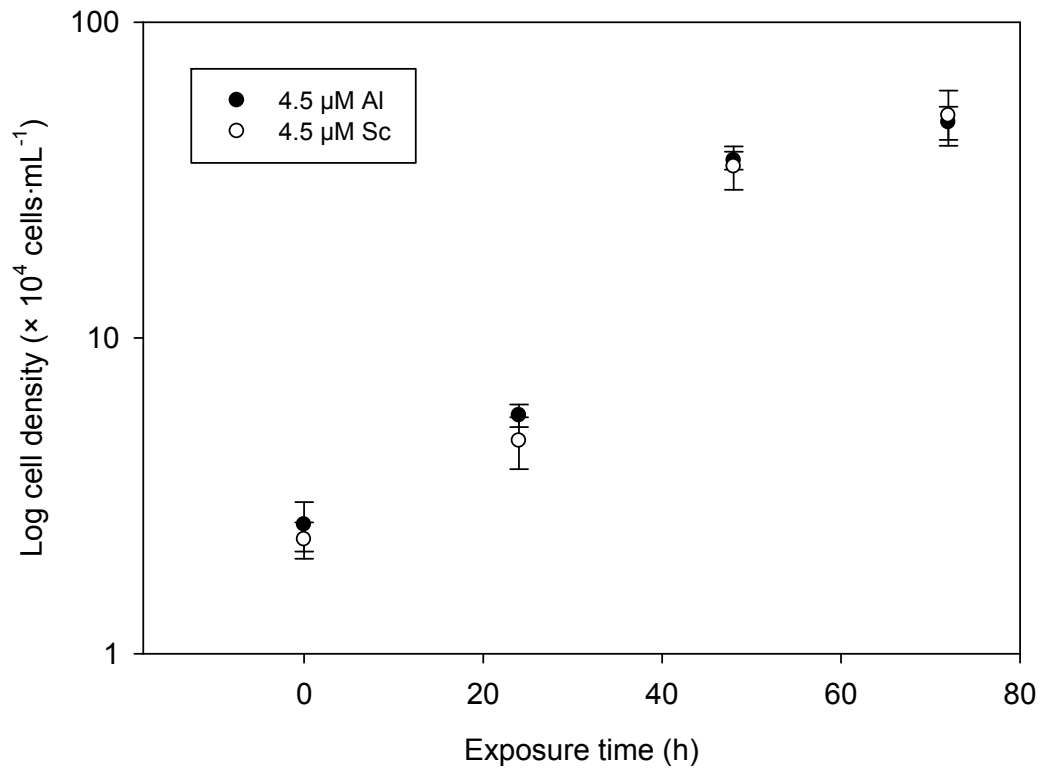
Intracellular max: metal in EDTA-washed cells

\*\* Extracellular min: EDTA-extracted metal

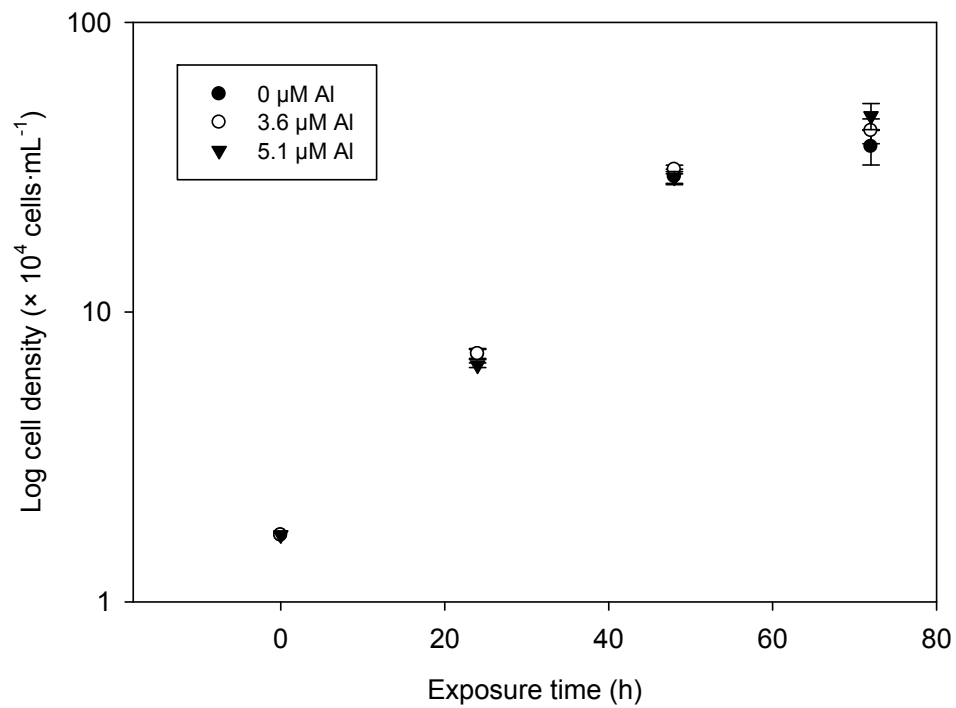
Extracellular max: EDTA-extracted metal + debris fraction



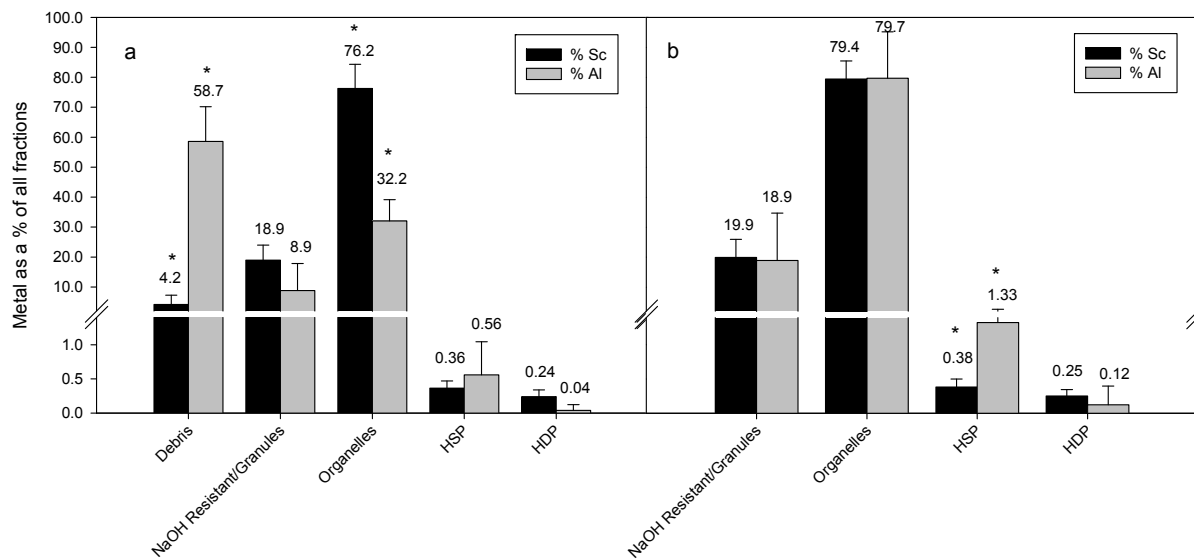
**Fig. SI.1:** Effect of the total Al concentration on normalized (for Sc<sup>3+</sup> concentration) Sc internalization fluxes in *C. reinhardtii* at pH 7.00. Mean ± standard deviation (n=3). Means not sharing the same letter(s) are significantly different (Tukey HSD,  $p < 0.05$ ).



**Fig.SI.2:** Growth of *C. reinhardtii* during a 72-hour exposure to 4.5  $\mu$ M Al or Sc in MHSM-1 at pH 7 in the presence of 380  $\mu$ M F. Mean  $\pm$  standard deviation (n=5).



**Fig. SI.3:** Growth of *C. reinhardtii* during a 72-hour exposure to 0, 3.6 or 5.1  $\mu\text{M}$  Al in MHSM-1 at pH 7 in the presence of 380  $\mu\text{M}$  F. Mean  $\pm$  standard deviation (n=3).



**Fig. SI.4:** ■ Sc and □ Al distributions (expressed as a percentage of metal in all fractions) in subcellular fractions of *C. reinhardtii* following a 72-h exposure to either metal (4.5  $\mu$ M, pH 7.00), a) with and b) without the debris fraction. Mean  $\pm$  standard deviation (n=5). Test #2. \*= significant difference ( $p < 0.05$ ) between Al and Sc distribution.





## 9 ARTICLE #3

In the presence of fluoride, free  $\text{Sc}^{3+}$  is not a good predictor of Sc bioaccumulation by two unicellular algae: possible role of fluoro-species

Anne Crémazy†, Peter G.C. Campbell† and Claude Fortin†

† Institut national de la recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement (INRS-ETE), 490 de la Couronne, G1K 9A9, Québec, Canada.

Article publié dans la revue *Environmental Science and Technology*

## Résumé

Nous avons étudié l'effet des fluorures sur l'accumulation du scandium chez deux algues unicellulaires, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata*. Ce métal trivalent a été sélectionné pour ses similarités chimiques avec l'aluminium et pour son radio-isotope Sc-46 pouvant être utilisé comme traceur dans des études de bioaccumulation à court terme. L'adsorption à la surface biologique ( $Sc_{ads}$ ) et les flux d'internalisation ( $J_{int}$ ) du Sc ont été estimés chez ces deux algues, en réalisant des expositions à court terme (< 1 h) à pH 5 et en présence de 0 à 40  $\mu\text{M}$  de  $\text{F}^-$ . Bien que la proportion en  $\text{Sc}^{3+}$  dissous diminuait de 20 à 0,01% dans cette gamme de  $[\text{F}^-]$ , les valeurs de  $Sc_{ads}$  et de  $J_{int}$  ne diminuaient que très faiblement chez les deux algues. Ces résultats suggèrent la participation de fluoro-complexes de Sc aux processus d'adsorption et d'internalisation. L'adsorption et la prise en charge de fluoro-complexes d'aluminium ont déjà été rapportées dans la littérature. Ces observations ne sont pas prises en compte par les modèles actuels de bioaccumulation des métaux traces (p. ex. le modèle du ligand biotique). Dans une étude précédente portant sur l'effet du pH sur la prise en charge du Sc chez *C. reinhardtii*, nous avons suggéré que des hydroxo-complexes de Sc étaient internalisés. Il y a donc de plus en plus d'indications que la concentration en ion libre ne soit pas un prédicteur approprié de l'accumulation du Sc (et potentiellement d'autres métaux trivalents) chez les organismes aquatiques.

**Mots clés** *Chlamydomonas reinhardtii*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, scandium, prise en charge, adsorption, modèle du ligand biotique, fluoro-complexes

## Abstract

We investigated the effect of fluoride complexation on scandium accumulation by two unicellular algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. This trivalent metal was selected for its chemical similarities with aluminum and for its convenient radio-isotope (Sc-46), which can be used as a tracer in short-term bioaccumulation studies. Scandium surface-bound concentrations ( $Sc_{ads}$ ) and uptake fluxes ( $J_{int}$ ) were estimated in the two algae over short-term (< 1 h) exposures at pH 5 and in the presence of 0 to 40  $\mu M F^-$ . Although the computed proportion of dissolved  $Sc^{3+}$  dropped from 20% to 0.01% over this  $[F^-]$  range,  $Sc_{ads}$  and  $J_{int}$  values for both algae decreased only slightly, suggesting a participation of Sc fluoro-complexes in both processes. Surface adsorption and uptake of fluoride complexes with aluminum have been reported in the literature. These observations are not taken into account by current models for trace metal bioaccumulation (e.g., the biotic ligand model). Results from a previous study, where the effects of pH on Sc uptake were investigated, suggested that Sc hydroxo-complexes were internalized by *C. reinhardtii*. There is thus growing evidence that the free ion concentration may not be adequate to predict the accumulation of Sc (and potentially of other trivalent metals) in aquatic organisms.

**Keywords** *Chlamydomonas reinhardtii*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, scandium, uptake, adsorption, biotic ligand model, fluoro-complexes

## INTRODUCTION

Since it was first developed, the biotic ligand model (BLM) has received increasing recognition by regulatory agencies as a powerful mechanistic tool to predict metal accumulation and toxicity in aquatic organisms.<sup>1</sup> For unicellular organisms such as algae, this model describes metal – organism interactions as a chemical equilibrium between the free metal ion and sensitive sites embedded in the biological membrane (e.g., transporters), referred to as biotic ligands. This concept can translate into a mathematical expression linking metal bioaccumulation (surface adsorption and internalization/uptake) to the free metal ion concentration. The BLM has proven to be effective in predicting the bioavailability of many divalent metals (e.g., Cd, Cu, Zn) for aquatic organisms.<sup>2</sup> By analogy, one might expect that trivalent metals should present the same relationship between their free ion activity and their bioavailability in natural waters.

Aluminum is the trivalent metal for which toxicity in aquatic systems has been the most documented.<sup>3</sup> It can be toxic to a variety of organisms and higher toxicity has often been reported in acidic waters where Al solubility and the proportion of  $\text{Al}^{3+}$  are higher.<sup>4</sup> Fluoride is known to complex Al to relatively high extent in acidic waters<sup>5</sup> and would thus be expected to substantially attenuate Al accumulation and toxicity. However, studies on the effect of fluoride on Al bioaccumulation and toxicity are scarce and not in complete agreement. For example, Cameron et al.<sup>6</sup> observed that Al toxicity to barley was proportional to  $[\text{Al}^{3+}]$  in the presence of fluoride. On the other hand, Wilkinson et al.<sup>7</sup> showed that gill accumulation of Al and its toxicity towards Atlantic salmon were correlated with  $[\text{Al}^{3+}]$  and  $[\text{AlF}^{2+}]$ . Thus, there is a need to further investigate the effect of fluoride on Al bioavailability.

A major reason for the lack of mechanistic studies concerning Al bioavailability is the absence of a suitable radio-isotope allowing for simple measurements at low concentrations.<sup>8</sup> To overcome this limitation, the trivalent metal scandium has been used in our laboratory as a surrogate for Al.<sup>9, 10</sup> Scandium and Al share a number of chemical similarities, such as their inert gas electronic configuration, their lack of redox activity, their belonging to the class A metal group and their very similar affinities for hydroxides, fluorides, sulfates and phosphates. However, unlike Al, Sc has a suitable radio-isotope (Sc-46, half-life of 83.8 d) for performing tracer studies in organisms under conditions that would not be feasible with Al (e.g., short-term bioassays at low concentrations). Thus, Sc was used in the present study to investigate the applicability of the BLM to trivalent cations in the presence of fluoride.

Scandium surface-bound concentrations ( $Sc_{ads}$ ) and internalization fluxes ( $J_{int}$ ) were obtained for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with short-term (< 1 h) bioaccumulation exposures at pH 5.00 and at  $[F^-] = 0, 1, 2, 5, 10$  and  $40 \mu\text{M}$ . The observed  $Sc_{ads}$  and  $J_{int}$  values were then related to the computed  $Sc^{3+}$  concentration in order to evaluate its predictive power. Our findings were validated with an additional alga, *Pseudokirchneriella subcapitata*, for  $[F^-] = 0$  and  $10 \mu\text{M}$ .

## MATERIAL AND METHODS

### Algal culture conditions

Cultures of *C. reinhardtii* and *P. subcapitata* were obtained from the Canadian Phycological Culture Centre (CPCC) of the University of Waterloo (ON, Canada). They were grown separately in a sterile modified high salt medium (MHSM-1) with an ionic strength of  $8.4 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$  and a pH of 7.0.<sup>11</sup> Algal cultures were maintained at  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  under constant illumination ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) and agitation ( $\sim 50 \text{ rpm}$ ) in an environmental growth chamber (Conviron, CMP3023). A small aliquot of each algal culture was transferred into a fresh culture medium every four days to keep the algae under optimal growth conditions. All culture media and glassware were autoclaved (Sanyo) at  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  for 15 min prior to use.

### Description and preparation of exposure media

The influence of fluoride on Sc adsorption and uptake was tested for *C. reinhardtii* ( $0, 1, 2, 5, 10$  and  $40 \mu\text{M } F^-$ ) and *P. subcapitata* ( $0, 10 \mu\text{M } F^-$ ); this second alga was used to verify the effect of fluoride initially observed with *C. reinhardtii*. For each tested  $[F^-]$ , algae were exposed to a wide range of total Sc concentrations ( $[Sc_T]$ ; see Table 1). The selected  $[F^-]$  were representative of uncontaminated freshwaters<sup>12, 13</sup> and were not expected to cause toxicity to either alga.<sup>14</sup> However, the chosen  $[Sc_T]$  ranges extended far beyond the typical Sc concentrations in freshwaters ( $\sim 0.2 \text{ nM}$  as reported in Bowen<sup>15</sup>). The upper limits for  $[Sc_T]$ , corresponding to a narrow range of computed  $[Sc^{3+}]$  ( $30 \pm 20 \text{ nM}$ ) for all  $[F^-]$ , were selected so as to be able to approach saturation of Sc uptake fluxes in *C. reinhardtii*; such data points are needed to model Sc internalization (as described later). Additional exposures of *C. reinhardtii* were performed at a

more neutral pH (6.50) and at  $[F^-] = 0$  and  $50 \mu\text{M}$  in order to verify the generality of our original findings obtained at pH 5.00. These experiments are described in the Supporting Information.

Prior to use, all plasticware was soaked for 24 h in 10%  $\text{HNO}_3$  (v/v), rinsed five times with deionized water and two times in ultrapure water ( $\geq 18 \text{ Mohms}\cdot\text{cm}$ ). All exposure media were prepared with ultrapure water the day before the exposure. Solutions were adjusted to  $\text{pH } 5.00 \pm 0.02$  with 1 M NaOH (ACS grade, prefiltered  $< 2 \mu\text{m}$  polyethersulfone membrane, Fisher) or 1.5 M  $\text{HNO}_3$  (trace metal grade, Fisher) and were buffered with 1 mM MES (2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid) ( $\geq 99.0\%$ , Fluka). The ionic strength was adjusted to  $8.8 \pm 0.1 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$  with  $\text{NaNO}_3$  (ACS grade, EMD). Solutions also contained  $1 \mu\text{M}$  Ca (amended as  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $>99.0\%$ , Sigma-Aldrich) to meet the physiological requirements of the algae. Fluoride was added as NaF (ACS grade, Fisher) and Sc was added as a mixture of the non radioactive isotope Sc-45 (as  $\text{Sc}(\text{NO}_3)_3$ , ICP grade, SCP Science) and the radioactive isotope Sc-46 (as  $\text{ScCl}_3$ , radionuclide purity  $>99\%$ , initial specific activity of  $394 \text{ TBq}\cdot\text{mol}^{-1}$ , Polatom) with radioactive concentrations ranging between  $\sim 0.1$  and  $\sim 2.5 \text{ mCi}\cdot\text{mg}^{-1}$ .

### **Measurement of $[\text{Sc}_T]$ and $[F^-]$ and speciation modeling in exposure media**

The specific activity of the Polatom radioactive source (containing both Sc-45 and Sc-46) was confirmed with measurements by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) and a gamma counter (Wizard<sup>2</sup> automatic gamma counter, PerkinElmer). Total Sc and fluoride concentrations were measured in the exposure media with a gamma counter and a fluoride electrode (Orion fluoride electrode, Thermo Fisher Scientific), respectively. Total Sc concentrations were determined in the exposure media just before the addition of algae. Total fluoride concentrations were measured in aliquots of the exposure media prior to the addition of Sc, in order to avoid  $F^-$  binding by  $\text{Sc}^{3+}$ . These solutions were diluted (50% v/v) in a low-level TISAB (Total Ionic Strength Adjustment Buffer) solution prepared as described by Thermo Scientific.<sup>16</sup> Measured total fluoride concentrations always matched the nominal fluoride concentrations. This was not the case for Sc, as significant losses of dissolved Sc by adsorption onto flask walls occurred within the first hours after medium preparation (24 h before exposure).

Scandium speciation was calculated in each exposure solution with the measured  $[\text{Sc}_T]$  and  $[F^-]$  as input data, using the speciation software Visual Minteq.<sup>17</sup> The formation constants for Sc

hydroxo- and fluoro-complexes are sufficiently well constrained to provide reliable speciation calculations in our simple exposure media.<sup>18</sup>

### Short-term (<1 h) bioaccumulation experiments

*C. reinhardtii* and *P. subcapitata* were exposed separately during their mid-exponential growth phase. Algal cells were harvested onto a 2 µm polycarbonate (PC) membrane filter and rinsed three times with 10 mL of a rinsing solution (exposure medium without Sc). Algae were then re-suspended in the exposure media at 20,000 cells·mL<sup>-1</sup> for *C. reinhardtii* and 40,000 cells·mL<sup>-1</sup> for *P. subcapitata*. These cellular densities were determined with a particle counter (Counter Multisizer III, Beckman Coulter). They were low enough to minimize Sc depletion in the exposure media (<10%) during the exposure period. Aliquots of the exposure medium were retrieved by filtration (2 µm PC filters) at three or four contact times between 10 and 60 min. Algae harvested on the filter were rinsed 10 times with 10 mL of rinsing solution, prior to their re-suspension in 10 mL of rinsing solution. These multiple rinses were performed in order to minimize the signal of occluded Sc (i.e., non bioaccumulated Sc) compared to the signal of bioaccumulated Sc in the final algal re-suspension. Finally, the bioaccumulated Sc was determined from the final re-suspension with a gamma counter and was normalized for cell surface area ( $Sc_{acc}$ , in nmol·m<sup>-2</sup>).

### Analysis of the bioaccumulation results

Discrimination between surface-bound Sc ( $Sc_{ads}$ ) and internalized Sc ( $Sc_{int}$ ) was achieved based on the classical interpretation of kinetic data. Metal accumulation kinetics generally display a biphasic behavior composed of a fast surface adsorption (reaching saturation within the first minutes of exposure) superimposed on a slow linear internalization.<sup>11, 19</sup> Consequently, within our exposure time frame,  $Sc_{acc}$  should be linear over time, with a slope corresponding to  $J_{int}$  (in nmol·m<sup>-2</sup>·h<sup>-1</sup>) and a y-intercept corresponding to  $Sc_{ads}$  (in nmol·m<sup>-2</sup>) (eq 1). Thus,  $J_{int}$  and  $Sc_{ads}$  were obtained by linear regressions of observed  $Sc_{acc}$  with time, for each bioaccumulation experiment.

$$Sc_{acc} = Sc_{int} + Sc_{ads} = J_{int} \cdot \text{time} + Sc_{ads} \quad (1)$$

The distinction between internalized and adsorbed metal is often performed by washing the cell surface with a strong ligand (e.g., ethylenediamine tetraacetic acid).<sup>20</sup> However, as reported in Cremazy et al.<sup>9</sup>, none of the extraction methods tested were able to remove surface-bound Sc completely, presumably due to the very high affinity of Sc for biological surfaces.<sup>21</sup> This limitation is also encountered with Al,<sup>22</sup> for which complete chemical desorption from biological surfaces has not yet been reported.

The  $Sc_{ads}$  and  $J_{int}$  values determined at each  $[F]$  were then related to  $[Sc^{3+}]$  by regression with Langmuir isotherms derived from BLM principles and taking into account the possibility of different  $Sc^{3+}$  receptor sites at the biological surface:

$$Sc_{ads} = \sum_{i=1}^M \frac{Sc_{ads,max(i)} \cdot K_{Sc-Rads(i)} \cdot [Sc^{3+}]}{1 + K_{Sc-Rads(i)} \cdot [Sc^{3+}]} \quad (2)$$

$$J_{int} = \sum_{i=1}^N \frac{J_{max(i)} \cdot K_{Sc-Rint(i)} \cdot [Sc^{3+}]}{1 + K_{Sc-Rint(i)} \cdot [Sc^{3+}]} \quad (3)$$

with  $Sc_{ads,max(i)}$  the maximal binding capacity;  $K_{Sc-Rads(i)}$  the affinity of  $Sc^{3+}$  with the surface adsorption site  $\bar{Rads}(i)$  ( $i=1, \dots, M$ );  $J_{max(i)}$  the maximum internalization flux; and  $K_{Sc-Rint(i)}$  the affinity of  $Sc^{3+}$  with the internalization receptor  $\bar{Rint}(i)$  ( $i=1, \dots, N$ ). Note that these regression parameters were conditional values, valid for our exposure conditions (pH, ionic strength) since the competition of the other cations in solution ( $H^+$ ,  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$ , at constant concentrations) for Sc adsorption and uptake sites was not included in eq 2 and 3.

The best-fit parameters for the same adsorption or internalization site were compared with one another with a t-test (alpha level of 0.05) with a false discovery rate (FDR) correction for multiple comparisons.<sup>23</sup>



## RESULTS AND DISCUSSION

### Sc speciation in the exposure media

Under our experimental conditions, solute concentrations were well below the solubility limits of  $\text{Sc}(\text{OH})_3(\text{s})$  or  $\text{CaF}_2(\text{s})$ . Scandium speciation is given for each  $[\text{F}^-]$  at  $[\text{Sc}_\text{T}] = 1 \text{ nM}$  in Table 2. At this low  $[\text{Sc}_\text{T}]$ , fluoride was in very large excess so that variations in  $[\text{Sc}_\text{T}]$  had no significant effect on the free  $\text{F}^-$  concentration (i.e.,  $[\text{F}^-] \sim [\text{F}_\text{T}]$ ). This was the case for 90% of our media, for which the Sc speciation given in Table 2 is valid. However, in the media where Sc:F ratio exceeded 1:20, significant fluoride complexation by  $\text{Sc}^{3+}$  was calculated (ranging from 5% to 40% of total fluoride). This complexation resulted in higher proportions of  $\text{Sc}^{3+}$  and lower proportions of Sc fluoro-complexes than those given in Table 2. Thus, specific speciation calculations were performed for these solutions (results not shown). As shown in Table 2, the proportion of  $\text{Sc}^{3+}$  dropped from 20% to 0.3% (67 $\times$ ) over 0 to 10  $\mu\text{M F}^-$  ( $[\text{F}^-]$  range used with *P. subcapitata*), and from 20% to 0.01% (2000 $\times$ ) over 0 to 40  $\mu\text{M F}^-$  ( $[\text{F}^-]$  range used with *C. reinhardtii*). Thus, the BLM would predict a considerable decrease in Sc bioaccumulation over these  $[\text{F}^-]$  ranges.

### Sc adsorption at the biological surfaces of *C. reinhardtii* and *P. subcapitata*

Scandium accumulation in *C. reinhardtii* and *P. subcapitata* was linear with time over our short exposure times (as previously shown in the Supporting Information of Crémazy et al.<sup>9</sup>). This linearity indicated that no efflux occurred during the exposure and that equilibrium between the solution and the cell surface was established before our first measurement time (10 min). Determination of  $\text{Sc}_{\text{ads}}$  and  $J_{\text{int}}$  with eq 1 was thus validated.

The ten washes of the exposed algae cells harvested on PC filters allowed for an accurate determination of  $\text{Sc}_{\text{int}}$  (with less than 3% of measured  $\text{Sc}_{\text{int}}$  attributed to occluded Sc). However, these multiple rinses resulted in a partial extraction of surface-bound Sc. With the present methodology, we estimated that the determined  $\text{Sc}_{\text{ads}}$  values could be underestimated by a factor of up to  $\sim 2$  (see Supporting Information). Thus, the observed  $\text{Sc}_{\text{ads}}$  values should be considered as minimal estimates of surface-bound Sc. As no clear influence of  $[\text{F}^-]$  on the under-

estimation of  $Sc_{ads}$  was observed, the effect of fluoride on surface-bound Sc could still be evaluated in the present study.

At all  $[F^-]$ , the concentration of surface-bound Sc in *C. reinhardtii* increased as a function of  $[Sc_T]$  or  $[Sc^{3+}]$  until reaching a maximum value ( $\sim 1440 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}$ ) (Figs. 1a and 1b) (adsorption data at  $[F^-] = 1 \text{ }\mu\text{M}$  were not determined). This maximum value could be considered as a first approximation of the density of Sc adsorption sites at the cellular surface. Note that these sites are known to be much more abundant than the internalization sites.<sup>19, 24</sup> Inflections in the Sc adsorption isotherm were observed at  $10 \text{ }\mu\text{M } F^-$  ( $\sim 610 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}$ ) and at  $40 \text{ }\mu\text{M } F^-$  ( $\sim 340 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Thus, the biological surface of *C. reinhardtii* seems to present multiple Sc adsorption sites. Scandium adsorption on the surface of *P. subcapitata* did not reach saturation at 0 or  $10 \text{ }\mu\text{M } F^-$  in the tested Sc concentration ranges (Figs. 1c and 1d).

For both algae, when  $Sc_{ads}$  values were plotted as a function of  $[Sc_T]$  (Figs. 1a and 1c), fluoride did not seem to influence Sc adsorption. When  $Sc_{ads}$  values at a given  $[Sc^{3+}]$  were considered (Figs. 1b and 1d), a significant increase in adsorption was observed with increasing  $[F^-]$ . Thus, fluoro-complexes appear to contribute to Sc adsorption for both algae. To quantify this observation in *C. reinhardtii*, modeling of  $Sc_{ads}$  with  $[Sc^{3+}]$  was performed with eq 2 (with  $M = 1$  site for  $[F^-] = 0, 2$  and  $5 \text{ }\mu\text{M}$  and  $M = 2$  sites for  $[F^-] = 10$  and  $40 \text{ }\mu\text{M}$ ). Results of each modeling exercise, in particular the best-fit parameters ( $Sc_{ads, max}$  and  $K_{Sc-Rads}$ ), are given in Table 3. Equation 2 fitted the experimental  $Sc_{ads}$  values relatively well at each individual  $[F^-]$ , except for  $[F^-] = 2 \text{ }\mu\text{M}$  and for the second adsorption site at  $[F^-] = 40 \text{ }\mu\text{M}$  (where the 95% confidence intervals of  $K_{Sc-Rads}$  were large, probably because of too few data points and experimental variability). The modeling showed a significant increase of the apparent  $K_{Sc-Rads}$  from  $10^{8.25}$  to  $10^{9.67} \text{ M}^{-1}$  over the range from 0 to  $5 \text{ }\mu\text{M } F^-$ . From 10 to  $40 \text{ }\mu\text{M } F^-$ , a significant increase of both  $K_{Sc-Rads(1)}$  and  $K_{Sc-Rads(2)}$  was observed. If the high-affinity/low-capacity adsorption sites ( $\text{Rads}(1)$ ) present higher affinities for certain Sc fluoro-species (e.g.,  $ScF_2^+$  or  $ScF_3$ ) than for the mono-fluoro  $ScF^{2+}$  complex, then speciation changes with  $[F^-]$  (cf. Table 2) could explain why these sites were not detected at  $[F^-] < 10 \text{ }\mu\text{M}$ . Lack of low  $Sc_{ads}$  data at  $[F^-] < 10 \text{ }\mu\text{M}$  and experimental variability may also have compromised the detection of any such sites. Modeling of  $Sc_{ads}$  with eq 2 could not be performed for *P. subcapitata* since saturation of adsorption sites was not observed with this alga.

In agreement with our adsorption data, other workers have reported the binding of Al fluoro-species to biological surfaces,<sup>25, 26</sup> with the suggestion that ternary F-Al-membrane complexes are formed. Unlike the case for transport sites, binding to adsorption sites at the biological surface usually does not lead to toxic effects as internalization is often considered a prerequisite for toxicity.<sup>27</sup> However, class A trivalent metals have particularly high affinities for biological surfaces, more specifically for the abundant phosphate and carboxylic groups located respectively in the membrane and the cell wall,<sup>22, 28, 29</sup> and their interactions with these groups have been associated with the occurrence of toxic effects.<sup>30</sup> For example, in algae and higher plants, Al ( $\sim 10^{-5}$  M) has been shown to alter the physical properties of cell walls (e.g., extensibility)<sup>31</sup> and plasma membranes (e.g., surface negativity, fluidity and permeability),<sup>32, 33</sup> occasionally leading to impairment of the ion transport properties.<sup>30, 34</sup>

### **Sc internalization fluxes in *C. reinhardtii* and *P. subcapitata***

A relatively important analytical variability was observed for the internalization fluxes in both algae. Despite this uncertainty, clear trends for  $J_{\text{int}}$  could still be observed with the Sc and fluoride concentrations. For *C. reinhardtii*, Sc internalization fluxes increased linearly with  $[\text{Sc}^{3+}]$  or  $[\text{Sc}_T]$  until reaching a plateau ( $\sim 1800 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) indicating a saturation of the membrane transport system (Figs. 2a and 2b). The observation of a unique plateau at all  $[\text{F}^-]$  indicated that only one type of transporter was involved in Sc uptake ( $N = 1$  in eq 3) and that fluoride did not affect the transporter capacity in *C. reinhardtii* (i.e., the number of transporters and their conformation were unaffected by  $[\text{F}^-]$ ). Although no trend with  $[\text{F}^-]$  was observed, the maximal internalization flux varied slightly between the experiments. This variability was attributed to the unavoidable use of successive algal cultures for each  $[\text{F}^-]$  tested. For *P. subcapitata*, Sc internalization fluxes profile at  $0 \mu\text{M F}^-$  indicated the presence of at least two membrane transporters ( $N > 1$  in eq 3); we observed a first increase of  $J_{\text{int}}$  up to a saturation plateau ( $\sim 80 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ), then a second more gradual increase without reaching saturation under our experimental conditions (Figs. 2c and 2d).

When we plotted  $J_{\text{int}}$  as a function of  $[\text{Sc}_T]$  (Figs. 2a and 2c), a decrease in Sc uptake could be observed for  $[\text{F}^-] = 10 \mu\text{M}$  in *P. subcapitata* and for  $[\text{F}^-] = 40 \mu\text{M}$  in *C. reinhardtii*. However, when  $J_{\text{int}}$  was plotted as a function of  $[\text{Sc}^{3+}]$  (Figs. 2b and 2d), it became clear that fluoride complexation of  $\text{Sc}^{3+}$  did not provide the expected protective effect in either alga. Indeed, at a

given  $[\text{Sc}^{3+}]$ ,  $J_{\text{int}}$  values increased with  $[\text{F}^-]$  instead of remaining constant, as would have been predicted by the BLM. This trend has been quantified for *C. reinhardtii* by modeling  $J_{\text{int}}$  with eq 3 (equation derived from BLM principles) at each  $[\text{F}^-]$  with  $N = 1$ ; best-fit parameters ( $J_{\text{max}}$  and  $K_{\text{Sc-Rint}}$ ) are given in Table 4. Equation 3 fitted the experimental fluxes relatively well at each individual  $[\text{F}^-]$ , except for  $[\text{F}^-] = 1$  and  $2 \mu\text{M}$  (where the 95% confidence intervals of  $K_{\text{Sc-Rint}}$  were large, probably because of too few data points and experimental variability). The increase of  $J_{\text{int}}$  from 0 to  $40 \mu\text{M F}^-$  observed in Fig. 2b was mirrored by the significant increase in apparent  $K_{\text{Sc-Rint}}$  values from  $10^{8.46}$  to  $10^{10.63} \text{ M}^{-1}$ . The apparent  $K_{\text{Sc-Rint}}$  values at  $[\text{F}^-] = 0, 2$  and  $5 \mu\text{M}$ , were not statistically different ( $p > 0.05$ ) from the apparent  $K_{\text{Sc-Rads}}$  values determined at the corresponding  $[\text{F}^-]$  (cf. Table 3). Thus, membrane sites with similar functional groups interacting with the same Sc species might be involved in both internalization and surface adsorption between 0 and  $5 \mu\text{M F}^-$ . Internalization fluxes for *P. subcapitata* could only be modeled for the first (low capacity) transporter observed at  $[\text{F}^-] = 0 \mu\text{M}$ , since it was the only one for which  $J_{\text{max}}$  could be determined. Data fitting with eq 3 yielded a  $J_{\text{max}(1)}$  value of  $76 \pm 8.8 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  and an apparent  $K_{\text{Sc-Rint}(1)}$  value of  $10^{9.47} [10^{8.55} - 10^{9.75}] \text{ M}^{-1}$  ( $R^2 = 0.85$ ,  $n = 11$ ).

For both algae, the increase in  $J_{\text{int}}$  with  $[\text{F}^-]$  at constant  $[\text{Sc}^{3+}]$  clearly indicates the contribution of Sc fluoro-complexes to the overall internalization. We initially hypothesized that this contribution could be explained by one of two mechanisms: (i) by the dissociation of labile complexes into  $\text{Sc}^{3+}$  and its subsequent internalization<sup>35</sup> or (ii) by the formation of ternary complexes at the transport site followed by the metal uptake.<sup>36</sup> The first situation occurs when metal uptake is limited by the diffusion of the free metal ion from the bulk solution to the biological membrane. In this case, the rapid metal uptake decreases the free ion concentration at the biological interface. In an attempt to restore the thermodynamic equilibrium, labile complexes dissociate into free metal ions and in this manner contribute to the overall internalization flux. To test this hypothesis, the maximum diffusive fluxes of  $\text{Sc}^{3+}$  from the bulk solution to the biological interfaces of *C. reinhardtii* and *P. subcapitata* ( $J_{\text{diff max}}(\text{Sc}^{3+})$ ) were calculated as previously described in Crémazy et al.<sup>9</sup> In the absence of fluoride,  $J_{\text{int}}$  values in *C. reinhardtii* and *P. subcapitata* were respectively 3 to 30-fold and 10 to 100-fold lower than their corresponding  $J_{\text{diff max}}(\text{Sc}^{3+})$ . Thus, in the presence of fluoride, at the same  $[\text{Sc}^{3+}]$ ,  $\text{Sc}^{3+}$  uptake should not be limited by the diffusion of  $\text{Sc}^{3+}$ . This conclusion was further validated by the observation of uptake saturation at each  $[\text{F}^-]$ . Thus, hypothesis (i) could be rejected with confidence and hypothesis (ii) was examined.

To date, the identity of the chemical species crossing biological membranes remains unclear for trivalent metals.<sup>21, 28</sup> In agreement with our experimental data, a significant number of studies have reported the internalization of Al fluoro-complexes.<sup>7, 8, 37-39</sup> A suggested mechanism for the transport of a metal complex across a biological membrane is the formation of a ternary surface complex (F-Sc-R<sub>int</sub> in our case), followed by the internalization of the intact complex.<sup>36</sup> Whereas the membrane transport of complexes might not appear favorable compared to the transport of free ions, recent investigations of Mg<sup>2+</sup> transport mechanisms provide some support for the idea. Indeed, unlike other identified ion channels, Mg<sup>2+</sup> transporters initially interact with the hexahydrated ion Mg(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>2+</sup> as opposed to the partially or the totally dehydrated ion.<sup>40, 41</sup> The association occurs in an outer-sphere mode, i.e. without expulsion of the first hydration shell water molecules. This indirect interaction is particularly strong (and selective) because Mg<sup>2+</sup> strongly polarizes its first-shell water bonds.<sup>42</sup> The first-shell H<sub>2</sub>O molecules are then partially or completely stripped off within the transporter pore, where the dehydration energy cost is compensated by interaction with electron donor groups located on the pore wall. By analogy with the behavior of Mg<sup>2+</sup>, the trivalent charge and relatively small ionic radii of Sc<sup>3+</sup> and Al<sup>3+</sup> might also result in strong polarization of the water molecules present in their respective hydration shells. A similar transport mechanism for Al<sup>3+</sup>, Sc<sup>3+</sup> and Mg<sup>2+</sup> may therefore be envisaged. Indeed, Al<sup>3+</sup> and Mg<sup>2+</sup> have been shown to compete for the same transporters in higher plants.<sup>43-45</sup> This competition has been suggested to be caused by the very similar hydrated radii and geometry of Al(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>3+</sup> and Mg(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>2+</sup>. We thus speculate that our experimental data could be explained by a transmembrane uptake initiated by binding between one membrane transporter and Sc species (the aquo-ion and some fluoro-complexes), followed by a subsequent partial or total loss of F<sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O. The Sc-F bond being stronger than the Sc-H<sub>2</sub>O bond, dehydration within the transporter would be preferred over loss of fluoride, resulting in the possible internalization of fluoride attached to Sc.

### **Modeling of Sc J<sub>int</sub> in *C. reinhardtii* over the entire range of [F<sup>-</sup>]**

Not enough experimental data were available to model J<sub>int</sub> in *P. subcapitata*, especially as the presence of multiple transporters renders the modeling very complex. Similar problems were encountered with Sc surface-binding in both algae. We thus only propose possible equations to model the internalization of Sc (Sc J<sub>int</sub>) by *C. reinhardtii* over the entire range of [F<sup>-</sup>].

Figure 3a illustrates the failure of eq 3, derived from BLM principles, to predict Sc  $J_{\text{int}}$  in *C. reinhardtii* over the studied  $[F^-]$  range. For this modeling,  $K_{\text{Sc-Rint}}$  was set to  $10^{8.46} \text{ M}^{-1}$ , the value determined at  $0 \mu\text{M } F^-$  and representing the apparent affinity of  $\text{Sc}^{3+}$  for  $\text{Rint}^-$  (cf. Table 4). Note that if Sc hydroxo-complexes do also contribute to the overall Sc uptake, as proposed in our previous study,<sup>9</sup> this apparent  $K_{\text{Sc-Rint}}$  value would also include their affinities for  $\text{Rint}^-$ . The calculation used the different  $J_{\text{max}}$  values determined for each  $[F^-]$  (cf. Table 4) in order to account for the biological variability within the experiments. This modeling provided a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.24 and a standard error of the regression ( $s_{y,x}$ , as defined by Zar<sup>46</sup>) of  $835 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  ( $n = 119$  data points). Except at saturation (i.e., when  $J_{\text{int}} \sim J_{\text{max}}$ ), eq 3 greatly underestimated Sc uptake fluxes in the presence of  $F^-$ . The difference between our experimental data ( $J_{\text{int, obs}}$ ) and the calculated fluxes ( $J_{\text{int, calc}}$ ) increased with increasing  $[F^-]$ :  $J_{\text{int, calc}}$  were 1 – 2 fold lower than  $J_{\text{int, obs}}$  at  $1 \mu\text{M } F^-$ , 1 – 10 fold lower at  $2 \mu\text{M } F^-$ , 1 – 80 fold lower at  $5 \mu\text{M } F^-$ , 1 – 180 fold lower at  $10 \mu\text{M } F^-$ ; and 1 – 900 fold lower at  $40 \mu\text{M } F^-$ .

$$J_{\text{int,calc}} = \frac{J_{\text{max}} \cdot (K_{\text{Sc-Rint}} \cdot [\text{Sc}^{3+}] + K_{\text{ScF-Rint}} \cdot [\text{ScF}^{2+}])}{1 + K_{\text{Sc-Rint}} \cdot [\text{Sc}^{3+}] + K_{\text{ScF-Rint}} \cdot [\text{ScF}^{2+}]} \quad (4)$$

Based on eq 3, a new equation was developed to incorporate the contribution of fluoro-complexes to the internalization of Sc. Note that diffusion limitation was alleviated with the contribution of  $\text{ScF}^{2+}$  alone (i.e.,  $J_{\text{diff max}}(\text{Sc}^{3+}) + J_{\text{diff max}}(\text{ScF}^{2+}) \geq J_{\text{int, obs}}$ , with  $J_{\text{diff max}}(\text{ScF}^{2+})$  calculated with  $\text{Sc}^{3+}$  diffusion coefficient). The equation was based on the experimental indication of a unique transporter (i.e., one  $J_{\text{max}}$ ) and the parameter  $K_{\text{Sc-Rint}}$  was maintained at  $10^{8.46} \text{ M}^{-1}$ . The addition of  $\text{ScF}^{2+}$  alone to the model considerably improved the prediction of Sc internalization fluxes (eq 4, Fig. 3b), with  $R^2 = 0.86$  and  $s_{y,x} = 349 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . The best fit for  $K_{\text{ScF-Rint}}$  was  $10^{8.18} [10^{8.06} - 10^{8.27}] \text{ M}^{-1}$  and this value was not statistically different from the  $K_{\text{Sc-Rint}}$  value ( $p = 0.0501$ ). Adding more fluoro-species to eq 3 did not significantly improve the prediction of  $J_{\text{int}}$ . The hypothesis underlying this modeling is that the membrane transporter is unable to distinguish between  $\text{Sc}^{3+}$  and  $\text{ScF}^{2+}$ . Equation 3 may not reflect the reality of Sc uptake, since its good agreement with our experimental data could be due to a fortuitous fit. However, it is the simplest equation providing the best prediction of the observed fluxes.

$$J_{\text{int,calc}} = \frac{J_{\text{max}} \cdot K_{\text{Sc-Rint}} \cdot [\text{Sc}_T]}{1 + K_{\text{Sc-Rint}} \cdot [\text{Sc}_T]} \quad (5)$$

Interestingly, a good fit was also obtained using eq 5, where the variable is  $[Sc_T]$  and the regression parameter is  $K_{Sc-Rint}$ ; the latter represents the affinity of any Sc species with  $^-Rint$ . This equation predicted Sc  $J_{int}$  surprisingly well within the pH range of 4.50 to 7.90 in our previous study.<sup>9</sup> Using the same  $K_{Sc-Rint}$  value determined in that earlier study ( $K_{Sc-Rint} = 10^{7.51}$  [ $10^{7.47} - 10^{7.54}$ ]  $M^{-1}$ ), Sc fluxes were overall well predicted ( $R^2 = 0.80$ ,  $s_{y,x} = 396 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) (Fig. 3c). Some  $J_{int}$  values at  $40 \mu\text{M } F^-$  were up to 5-times overestimated, presumably because this equation does not account for the small fluoride alleviating effect observed on Sc internalization at this  $[F^-]$  (cf. Fig. 2a). As a consequence, fitting with this equation was slightly less good than with eq 4. Note that this model is less mechanistic than the approach used above. Indeed, it implies the unlikely non-specificity of the membrane transporter for all Sc species ( $Sc^{3+}$ ,  $ScF_n^{3-n}$  and  $Sc(OH)_n^{3-n}$ ). Also, as in our previous study, this equation assumes that protons do not inhibit Sc uptake.<sup>9</sup> Nevertheless, the simplicity of eq 5 and its ability to predict Sc fluxes over a wide range of pH and  $[F^-]$  merit consideration.

The same fluoride effect was observed on both  $Sc_{ads}$  and  $J_{int}$  in *C. reinhardtii* at a higher pH (6.50 instead of 5.00) for  $[F^-] = 0$  and  $50 \mu\text{M}$  (see Supporting Information). Thus, the fluoride effect reported in this study seems to be present at other pH conditions where Sc speciation is considerably different.

## TOXICOLOGICAL IMPLICATIONS

Whether scandium-sensitive sites at the biological surface are mostly adsorption or internalization sites, our study suggests that the BLM in its current formulation may not be adequate to predict Sc toxicity toward unicellular algae. Indeed, with the finding that Sc fluoro-complexes (and also likely hydroxo-complexes) accumulate extra- and intra-cellularly, Sc toxicity may be greatly underestimated if predictions are based on the free metal ion concentration. Our observations are in agreement with some reported Al bioaccumulation and toxicity data. On the other hand, uptake of intact hydrophilic complexes through cation transporters has not been reported for divalent metals. Although we previously showed that Sc and Al do not compete for a common transporter in *C. reinhardtii*,<sup>10</sup> the mechanisms by which Al and Sc complexes contribute to bioaccumulation might be based on some shared physico-chemical properties (trivalent charge, strong polarizing power, etc.).

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting information

The Supporting Information is divided into two sections. The first section concerns the underestimation of  $Sc_{ads}$  with our short-term bioaccumulation experimental protocol. The second section presents the effect of fluoride on the bioaccumulation of Sc in *C. reinhardtii* at pH 6.50, in the same way as the pH 5.00 data are presented in the main manuscript.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Rio Tinto Alcan. C. Fortin and P.G.C. Campbell are supported by the Canada Research Chair program.

## REFERENCES

- (1) Niyogi, S.; Wood, C. M., Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, (23), 6177-6192.
- (2) Paquin, P. R.; Gorsuch, J. W.; Apte, S.; Batley, G. E.; Bowles, K. C.; Campbell, P. G. C.; Delos, C. G.; Di Toro, D. M.; Dwyer, R. L.; Galvez, F.; Gensemer, R. W.; Goss, G. G.; Hogstrand, C.; Janssen, C. R.; McGeer, J. C.; Naddy, R. B.; Playle, R. C.; Santore, R. C.; Schneider, U.; Stubblefield, W. A.; Wood, C. M.; Wu, K. B., The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *133*, (1-2), 3-35.
- (3) Gensemer, R. W.; Playle, R. C., The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **1999**, *29*, (4), 315-450.
- (4) Sparling, D. W.; Lowe, T. P., Environmental hazards of aluminum to plants, invertebrates, fish, and wildlife. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1996**, *145*, 1-127.
- (5) Driscoll, C. T.; Schecher, W. D., The chemistry of aluminum in the environment. *Environ. Geochem. Health* **1990**, *12*, (1-2), 28-49.



- (6) Cameron, R. S.; Ritchie, G. S. P.; Robson, A. D., Relative toxicities of inorganic aluminum complexes to Barley. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1986**, *50* (5), 1231-1236.
- (7) Wilkinson, K. J.; Campbell, P. G. C.; Couture, P., Effect of fluoride complexation on aluminum toxicity towards juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1990**, *47*, (7), 1446-1452.
- (8) Gallon, C.; Munger, C.; Premont, S.; Campbell, P. G. C., Hydroponic study of aluminum accumulation by aquatic plants: Effects of fluoride and pH. *Water Air Soil Pollut.* **2004**, *153*, (1-4), 135-155.
- (9) Crémazy, A.; Campbell, P. G. C.; Fortin, C., The biotic ligand model can successfully predict the uptake of a trivalent ion by a unicellular alga below pH 6.50 but not above: Possible role of hydroxo-species. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, (5), 2408-2415.
- (10) Crémazy, A.; Levy, J. L.; Campbell, P. G. C.; Fortin, C., Uptake and subcellular partitioning of trivalent metals in a green alga: comparison between Al and Sc. *BioMetals* **2013**, *26*, (6), 989-1001.
- (11) Fortin, C.; Dutel, L.; Garnier-Laplace, J., Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23*, (4), 974-981.
- (12) Dobbs, G. G., Fluoride and the environment. *Fluoride* **1974**, *7*, 123–135.
- (13) CCME, (Canadian Council of Ministers of the Environment) Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Inorganic fluorides. In *Canadian environmental quality guidelines*, Winnipeg, 2002.
- (14) Pitre, D.; Boulemant, A.; Fortin, C., Uptake and sorption of aluminium and fluoride by four green algal species. *Chem. Cent. J.* **2014**, *8*.
- (15) Bowen, H. J. M., *Environmental chemistry of the elements*. Academic Press: London; New York, 1979.
- (16) ThermoScientific *User guide Fluoride Ion Selective electrode.*; 2007.
- (17) Gustafsson, J. P. *Visual MINTEQ*, 3.0; KTH Royal Institute of Technology, department of Land and Water Resources Engineering: Stockholm, Sweden, 2012.
- (18) Wood, S. A.; Samson, I. M., The aqueous geochemistry of gallium, germanium, indium and scandium. *Ore Geol. Rev.* **2006**, *28*, (1), 57-102.
- (19) Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J., Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, (5), 969-75.
- (20) Hassler, C. S.; Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J., Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol. Oceanogr.* **2004**, *2*, 237-247.

- (21) Reid, R. J.; Rengel, Z.; Smith, F. A., Membrane fluxes and comparative toxicities of aluminium, scandium and gallium. *J. Exp. Bot.* **1996**, *47*, (305), 1881-1888.
- (22) Rengel, Z., Uptake of aluminium by plant cells. *New Phytol.* **1996**, *134*, (3), 389-406.
- (23) Benjamini, Y.; Hochberg, Y., Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B* **1995**, *57*, (1), 289-300.
- (24) Wilkinson, K. J.; Buffle, J., Critical evaluation of physicochemical parameters and processes for modelling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic) systems. In *Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces*, Van Leeuwen, H. P.; Köster, W., Eds. John Wiley & Sons: 2004; Vol. 9, pp 445-533.
- (25) Façanha, A. R.; Okorokova-Façanha, A. L., Inhibition of phosphate uptake in corn roots by aluminum-fluoride complexes. *Plant Physiol.* **2002**, *129*, (4), 1763-1772.
- (26) Wilkinson, K. J.; Bertsch, P. M.; Jagoe, C. H.; Campbell, P. G. C., Surface complexation of aluminum on isolated fish gill cells. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, (6), 1132-1138.
- (27) Campbell, P. G. C.; Errécalde, O.; Fortin, C.; Hiriart-Baer, V. P.; Vigneault, B., Metal bioavailability to phytoplankton-applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *133*, (1-2), 189-206.
- (28) Taylor, G. J.; McDonald-Stephens, J. L.; Hunter, D. B.; Bertsch, P. M.; Elmore, D.; Rengel, Z.; Reid, R. J., Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiol.* **2000**, *123*, (3), 987-996.
- (29) Reid, R.; Tester, M.; Smith, F. A., Calcium/aluminium interactions in the cell wall and plasma membrane of *Chara*. *Planta* **1995**, *195*, (3), 362-368.
- (30) Horst, W. J.; Wang, Y.; Eticha, D., The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: A review. *Ann. Bot.* **2010**, *106*, (1), 185-197.
- (31) Ma, J. F.; Shen, R.; Nagao, S.; Tanimoto, E., Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant and Cell Physiol.* **2004**, *45*, (5), 583-589.
- (32) Saçan, M.; Oztay, F.; Bolkent, S., Exposure of *Dunaliella tertiolecta* to lead and aluminum: toxicity and effects on ultrastructure. *Biol. Trace Elem. Res.* **2007**, *120*, (1-3), 264-272.
- (33) Zhao, X.-J.; Sucoff, E.; Stadelmann, E. J., Al<sup>3+</sup> and Ca<sup>2+</sup> alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. *Plant Physiol.* **1987**, *83*, (1), 159-162.
- (34) Zheng, S. J.; Yang, J. L., Target sites of aluminum phytotoxicity. *Biol. Plant.* **2005**, *49*, (3), 321-331.
- (35) Buffle, J.; Wilkinson, K. J.; van Leeuwen, H. P., Chemodynamics and bioavailability in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, (19), 7170-7174.

- (36) Campbell, P. G. C., Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Tessier, A.; Turner, D. R., Eds. John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 1995; pp 45-102.
- (37) Stevens, D. P.; McLaughlin, M. J.; Alston, A. M., Phytotoxicity of aluminium-fluoride complexes and their uptake from solution culture by *Avena sativa* and *Lycopersicon esculentum*. *Plant Soil* **1997**, *192*, (1), 81-93.
- (38) Nagata, T.; Hayatsu, M.; Kosuge, N., Aluminium kinetics in the tea plant using  $^{27}\text{Al}$  and  $^{19}\text{F}$  NMR. *Phytochem.* **1993**, *32*, (4), 771-775.
- (39) Xie, Z. M.; Ye, Z. H.; Wong, M. H., Distribution characteristics of fluoride and aluminum in soil profiles of an abandoned tea plantation and their uptake by six woody species. *Environ. Int.* **2001**, *26*, (5–6), 341-346.
- (40) Moomaw, A. S.; Maguire, M. E., Cation selectivity by the CorA  $\text{Mg}^{2+}$  channel requires a fully hydrated cation. *Biochem.* **2010**, *49*, (29), 5998-6008.
- (41) Kucharski, L. M.; Lubbe, W. J.; Maguire, M. E., Cation hexaammines are selective and potent inhibitors of the CorA magnesium transport system. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, (22), 16767-16773.
- (42) Dudev, T.; Lim, C., Importance of metal hydration on the selectivity of  $\text{Mg}^{2+}$  versus  $\text{Ca}^{2+}$  in magnesium ion channels. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, (45), 17200-17208.
- (43) Rengel, Z., Competitive  $\text{Al}^{3+}$  inhibition of net  $\text{Mg}^{2+}$  uptake by intact *Lolium multiflorum* roots: II. Plant age effects. *Plant Physiol.* **1990**, *93*, (3), 1261-1267.
- (44) Rengel, Z.; Robinson, D. L., Competitive  $\text{Al}^{3+}$  inhibition of net  $\text{Mg}^{2+}$  uptake by intact *Lolium multiflorum* roots : I. Kinetics. *Plant Physiol.* **1989**, *91*, (4), 1407-1413.
- (45) Bose, J.; Babourina, O.; Rengel, Z., Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, (7), 2251-2264.
- (46) Zar, J. H., *Biostatistical Analysis*. 4th ed.; Prentice Hall: New Jersey, 1999.

Table 1: Measured fluoride and total Sc concentrations in the exposure media for *C. reinhardtii* and *P. subcapitata* (n represents the number of [Sc<sub>T</sub>] tested).

Alga	[F <sup>-</sup> ] (μM)	[Sc <sub>T</sub> ] (nM)	n
<i>C. reinhardtii</i>	0	0.7 – 300	22
	1	2 – 500	8
	2	1 – 500	8
	5	0.5 – 700	21
	10	0.2 – 4,000	45
	40	0.3 – 10,000	15
<i>P. subcapitata</i>	0	0.3 – 800	27
	10	3 – 400	13

Table 2: Major Sc species distribution in exposure media (pH = 5.00 and ionic strength = 8.8 mEq·L<sup>-1</sup>), calculated with Visual Minteq at [Sc<sub>T</sub>] = 1 nM. This species distribution was representative of 90% of our exposure media, where the Sc:F ratio < 1:20.

	[F <sup>-</sup> ] = 0 μM	[F <sup>-</sup> ] = 1 μM	[F <sup>-</sup> ] = 2 μM	[F <sup>-</sup> ] = 5 μM	[F <sup>-</sup> ] = 10 μM	[F <sup>-</sup> ] = 40 μM
% Sc <sup>3+</sup>	20	7	3	0.9	0.3	0.01
% ScOH <sup>2+</sup>	61	21	10	3	0.8	0.03
% Sc(OH) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	18	6	3	0.8	0.3	0.01
% ScF <sup>2+</sup>	0	45	44	29	17	3
% ScF <sub>2</sub> <sup>+</sup>	0	21	37	59	66	46
% ScF <sub>3</sub> (aq)	0	<0.01	2	8	16	50

Table 3: Modeling results for  $Sc_{ads}$  on *C. reinhardtii* with eq 2 for each [F]. Values sharing no common letters are significantly different (t-test with FDR correction for multiple comparison,  $\alpha = 0.05$ ).

F ( $\mu\text{M}$ )	$R^2$	n	$Sc_{ads,max} \pm$ standard error ( $\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}$ )	Apparent log $K_{Sc-Rads}$ and 95% confidence interval
0	0.78	22	$1670 \pm 240^a$	8.25 [7.01-8.53] <sup>a</sup>
2	0.86	8	$1200 \pm 120^a$	9.07 [n.a.* - 9.39] <sup>ab</sup>
5	0.75	21	$1300 \pm 110^a$	9.67 [9.10 – 9.91] <sup>b</sup>
10	0.95	45	Rads(1) : $610 \pm 80^{a'}$	Rads(1) : 10.97 [10.49-11.20] <sup>a'</sup>
			Rads(2) : $780 \pm 80^{a''}$	Rads(2) : 9.10 [8.42 - 9.35] <sup>a''</sup>
40	0.90	15	Rads(1) : $340 \pm 13^{b'}$	Rads(1) : 12.54 [12.36 - 12.66] <sup>b'</sup>
			Rads(2) : $1510 \pm 200^{b''}$	Rads(2) : 9.47 [n.a. - 9.79] <sup>a''</sup>

\*n.a. : not applicable (lower limit <0)

Table 4: Modeling results for  $J_{\text{int}}$  in *C. reinhardtii* with eq 3 ( $N = 1$ ) for each  $[F]$ . Values sharing no common letters are significantly different (t-test with FDR correction,  $\alpha = 0.05$ ).

F ( $\mu\text{M}$ )	$R^2$	n	$J_{\text{max}} \pm \text{standard error}$ ( $\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ )	Apparent log $K_{\text{Sc-Rint}}$ and 95% confidence interval
0	0.90	22	$1980 \pm 130^a$	8.46 [8.17 - 8.64] <sup>a</sup>
1	0.77	8	$2440 \pm 500^{a,b}$	8.36 [n.a*. - 8.75] <sup>a</sup>
2	0.88	8	$1710 \pm 140^a$	9.56 [n.a. - 9.90] <sup>ab</sup>
5	0.80	21	$1520 \pm 130^{a,b}$	9.90 [9.20 - 10.15] <sup>bc</sup>
10	0.67	45	$1220 \pm 80^b$	10.37 [9.88 - 10.59] <sup>cd</sup>
40	0.92	15	$1970 \pm 120^a$	10.63 [10.12 - 10.86] <sup>d</sup>

\*n.a. : not applicable (lower limit <0)

## Figure captions:

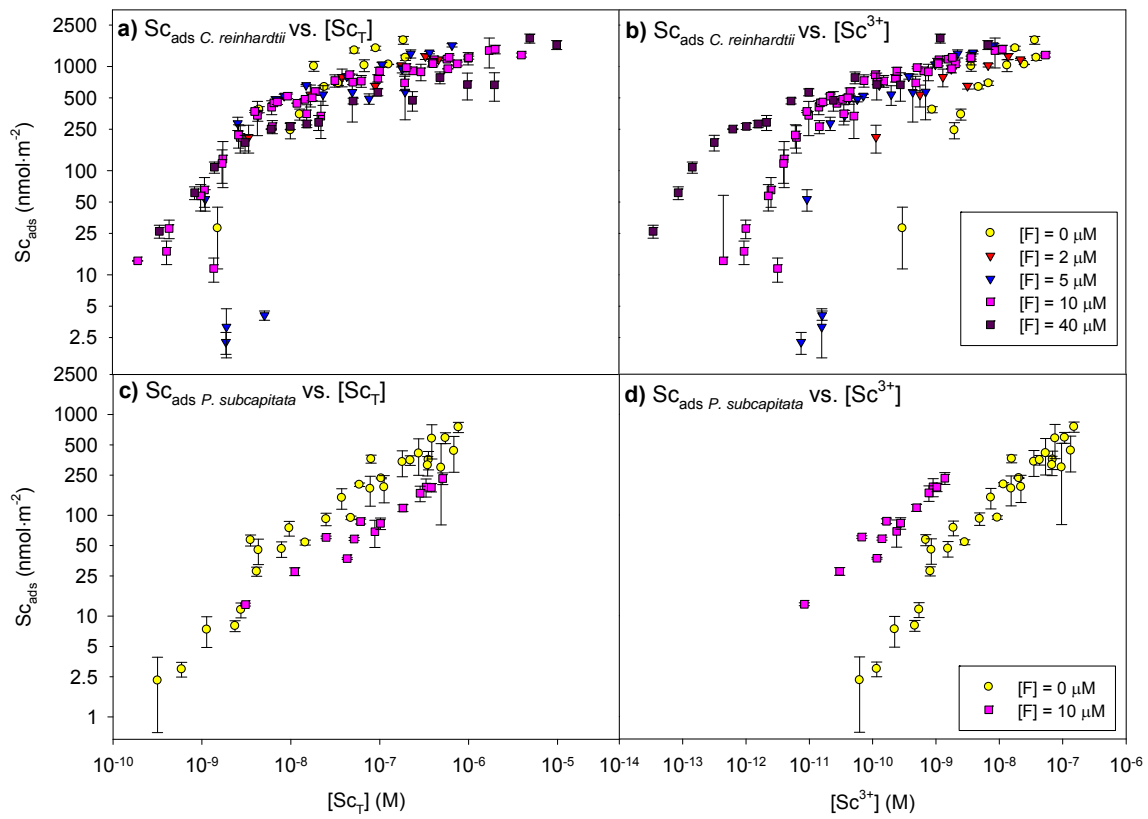
Figure 1: Adsorbed scandium ( $Sc_{ads}$ ) as determined from the y-intercept of bioaccumulation *versus* time plots at pH 5.00 and at different  $[F^-]$ . Values of  $Sc_{ads}$  observed in *C. reinhardtii* **a)** *versus*  $[Sc_T]$  (experimentally determined) and **b)** *versus*  $[Sc^{3+}]$  (calculated with Visual Minteq) and in *P. subcapitata* **c)** *versus*  $[Sc_T]$  and **d)** *versus*  $[Sc^{3+}]$ . Y-intercept values  $\pm$  standard errors.

Figure 2: Scandium internalization fluxes ( $J_{int}$ ) determined from the slope of bioaccumulation *versus* time plots at pH 5.00 and at different  $[F^-]$ . Values of  $J_{int}$  observed in *C. reinhardtii* **a)** *versus*  $[Sc_T]$  (experimentally determined) and **b)** *versus*  $[Sc^{3+}]$  (calculated with Visual Minteq) and in *P. subcapitata* **c)** *versus*  $[Sc_T]$  and **d)** *versus*  $[Sc^{3+}]$ . Slope values  $\pm$  standard errors.

Figure 3: Sc internalization fluxes in *C. reinhardtii* calculated with **a)** eq 3, **b)** eq 4 and **c)** eq 5 ( $J_{int, calc}$ ) *versus* Sc internalization fluxes experimentally observed at pH 5.00 and at different  $[F^-]$  ( $J_{int, obs}$ ). The 1:1 (solid), 1:2 and 2:1 (dashed) lines are drawn for comparison.



Figure 1:



**Figure 2:**

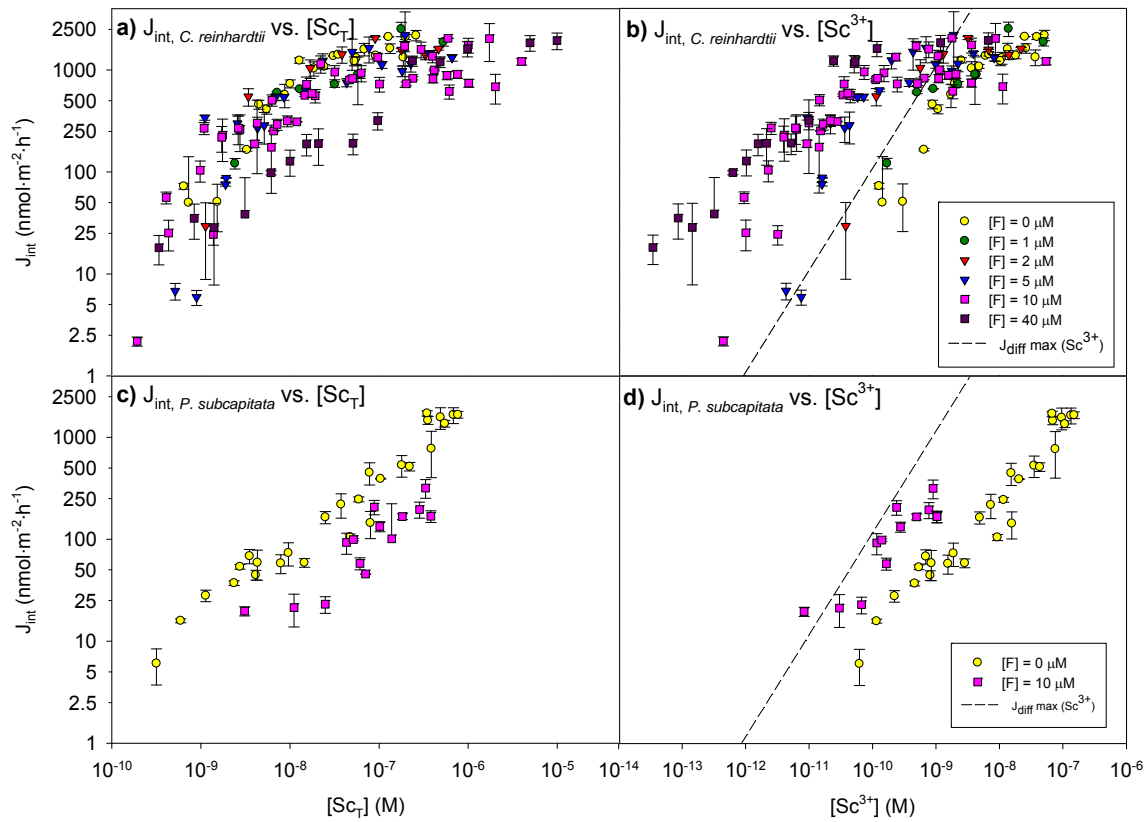
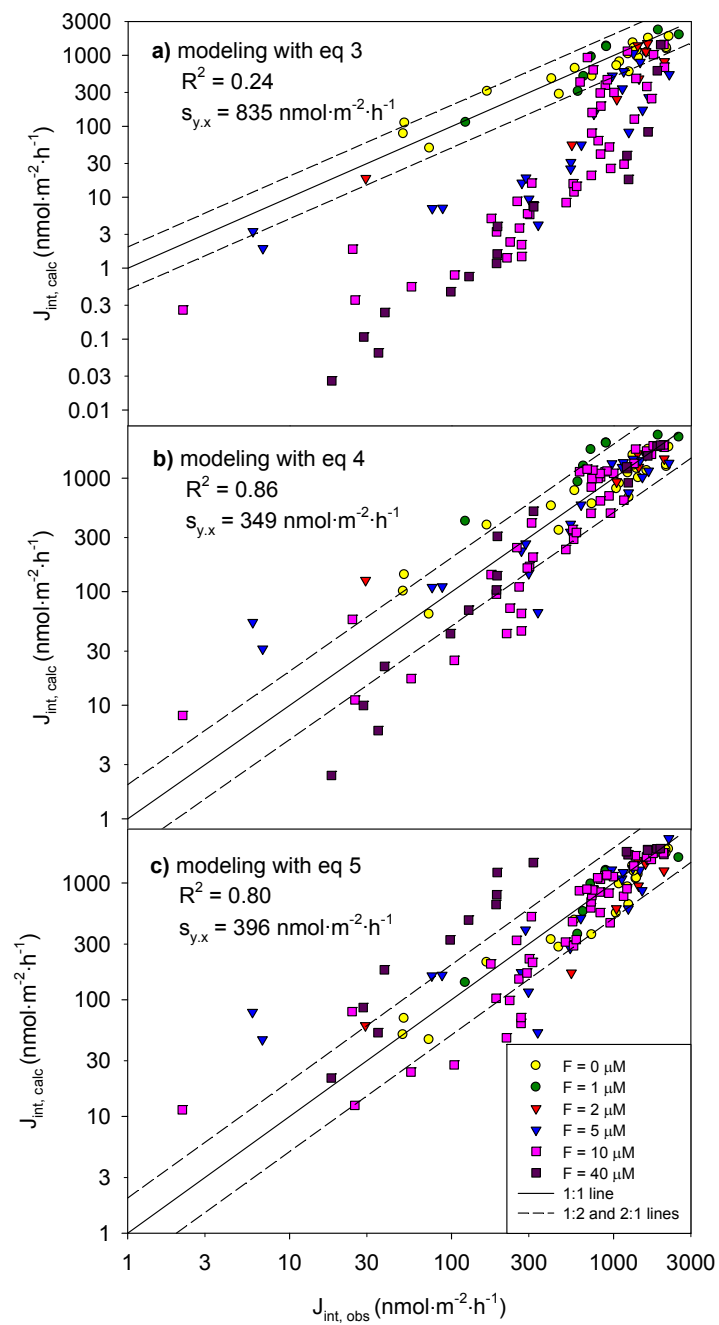


Figure 3:





## Supporting information for

In the presence of fluoride, free  $\text{Sc}^{3+}$  concentration is not a good predictor of Sc bioaccumulation by two unicellular algae: possible role of fluoro-species

Anne Crémazy, Peter G.C. Campbell and Claude Fortin

Six supplementary figures and four supplementary tables

## SECTION I: UNDER-ESTIMATION OF SURFACE-BOUND SCANDIUM

This section presents short-term bioaccumulation experiments with Sc and *C. reinhardtii* where we determined the amount and the nature (non accumulated or accumulated Sc) of Sc washed away by the multiple rinsing of the freshly-exposed algae cells. Under-estimations of  $Sc_{ads}$  were calculated for  $[F^-] = 0$  and  $40 \mu M$ .

### Materials and methods

#### Description of exposure media

The experiments were performed at pH 5.00 and at two different  $[F^-]$  of 0 and  $40 \mu M$ . At  $0 \mu M F^-$ , two total Sc concentrations were tested ( $[Sc_T] = 21$  and  $67$  nM), whereas only one total Sc concentration was tested at  $40 \mu M F^-$  ( $[Sc_T] = 17$  nM). A volume of 500 mL of each of these exposure media were prepared as described in the main manuscript.

#### Short-term (<1 h) bioaccumulation experiments

Two control experiments (i.e., experiments without algae) were first performed. Each control experiment was carried out with 100 mL of the exposure medium, with the procedure described in the main manuscript. Briefly, 100 mL of exposure media were filtered onto a  $2 \mu m$  polycarbonate (PC) filter. The filter was then washed with  $10 \times 10$  mL of rinsing solution (i.e., medium without Sc). The amount of Sc extracted by each two consecutive 10 mL rinses was measured in the filtered rinsing solution. The rinsed Sc corresponded to occluded Sc washed away by the rinsing step (noted  $Sc_{non\ acc-rinse}$  and corresponding to non accumulated Sc). The washed filters were then agitated with tweezers in a 10 mL rinsing solution (re-suspension step) and the amount of Sc re-suspended in this solution (noted  $Sc_{non\ acc-resuspension}$ ) was measured. In a second phase, *C. reinhardtii* was added in the remaining 300 mL exposure media at a density of  $20,000$  cells·mL<sup>-1</sup>. Aliquots of 100 mL were then filtered and washed at 15, 30 and 45 min, with the same procedure as that described above or in the manuscript. For each exposure time, the amount of Sc extracted by the multiple rinses ( $Sc_{rinse}$ ) corresponded to a combination of  $Sc_{non\ acc-}$

$Sc_{rinse}$  and algal surface-associated Sc (noted  $Sc_{ads-rinse}$ ). Thus,  $Sc_{ads-rinse}$  values could be estimated by subtracting the average  $Sc_{non\ acc-rinse}$  values (determined with the two control experiments) from  $Sc_{rinse}$  values. The amount of Sc subsequently re-suspended (noted  $Sc_{acc}$ ) was a combination of non bioaccumulated ( $Sc_{non\ acc-resuspension}$ ) and bioaccumulated Sc. This latter amount corresponded to the sum of non rinsed surface-bound Sc (noted  $Sc_{ads}$ ) and internalized Sc (noted  $Sc_{int}$ ).

## Results and discussion

The measured  $Sc_{acc}$  are given in Fig. SI.1 as a function of the exposure time. As anticipated, Sc accumulation was linear with time and eq 1 could thus be used to derive  $J_{int}$  (slope) and  $Sc_{ads}$  (y-intercept) values. The best-fit  $J_{int}$  and  $Sc_{ads}$  values and their standard errors are given near each regression line in Fig. SI.1.

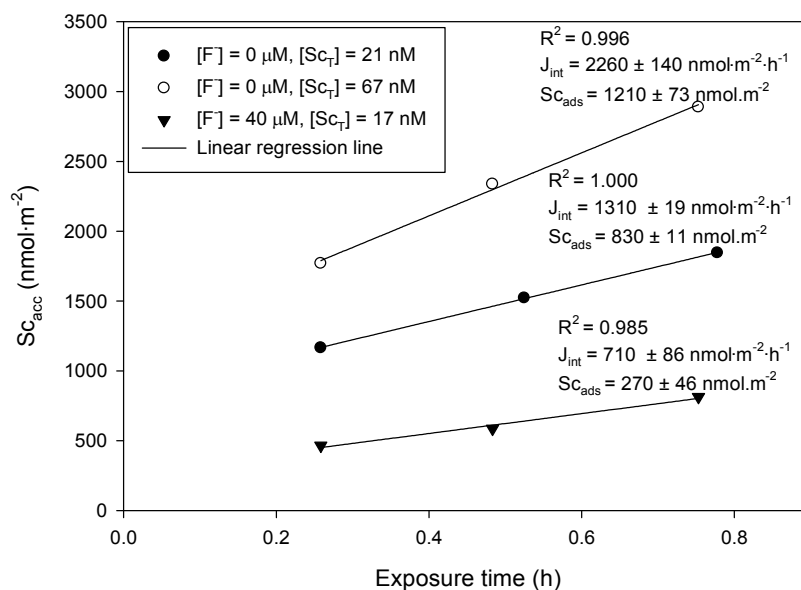


Figure SI.1: Sc accumulation as a function of time at pH 5.00 and different  $[F^-]$  and  $[Sc_T]$ . Solid lines are linear regressions. Each data point represents a single experiment.

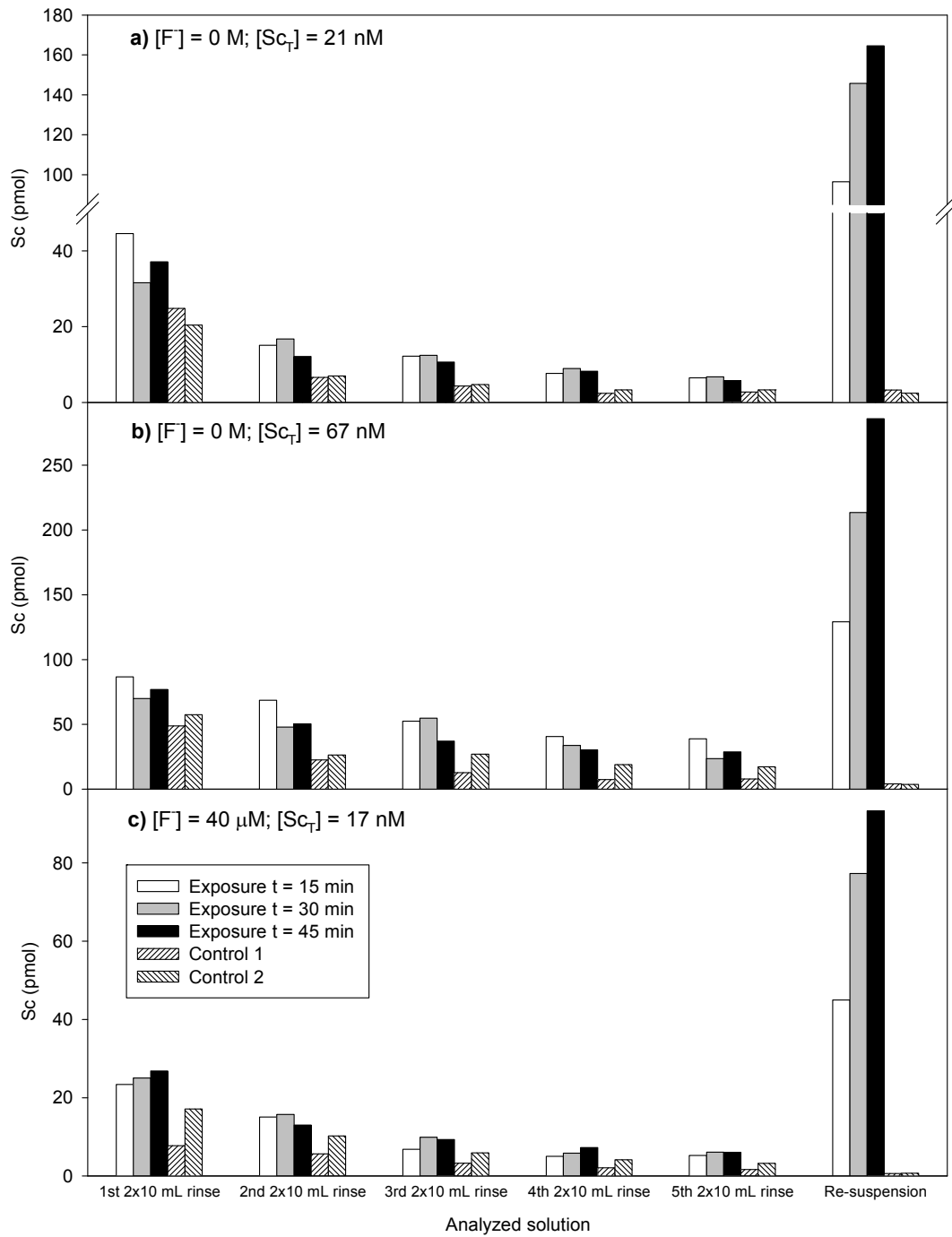


Figure SI.2: Amount of Sc (in pmol) determined in each 2 x 10 mL rinse and in the final re-suspension, in control experiments (no algae) and at different algal exposure times. Exposures were performed at pH 5.00 with *C. reinhardtii*.



Figure SI.2 presents the amount of Sc determined in each 2 x 10 mL rinse in control ( $Sc_{rinse} = Sc_{non\ acc-rinse}$ ) and uptake experiments ( $Sc_{rinse} = Sc_{non\ acc-rinse} + Sc_{ads-rinse}$ ) at different exposure times. It also presents the amount of Sc determined in the final re-suspension in control ( $Sc_{acc} = Sc_{non\ acc-resuspension}$ ), and uptake experiments ( $Sc_{acc} = Sc_{non\ acc-resuspension} + Sc_{int} + Sc_{ads}$ ) at different exposure times (15, 30 and 45 min). The control experiments showed that the successive rinses resulted in a significant extraction of occluded Sc ( $Sc_{non\ acc-rinse}$ ). This extraction decreased from the first to the fourth 2 x 10 mL rinse and was the same between the fourth and the fifth rinses. These multiple rinses minimized  $Sc_{non\ acc-resuspension}$  to less than 3% of  $Sc_{acc}$  in the algal re-suspension (i.e.,  $Sc_{non\ acc-resuspension} \ll Sc_{int} + Sc_{ads}$ ). If these rinses had not been performed, the  $Sc_{non\ acc-resuspension}$  values would have approached the  $Sc_{non\ acc-rinse}$  values determined in the first 2x10 mL rinse. Yet, for low exposure times, these values were relatively variable and important compared to  $Sc_{acc}$ :

- $Sc_{non\ acc-rinse}$  in the first rinse = 21 and 26%  $Sc_{acc}$  at t=15 min ( $[F^-] = 0\ M$  and  $[Sc_T] = 21\ nM$ )
- $Sc_{non\ acc-rinse}$  in the first rinse = 38 and 44%  $Sc_{acc}$  at t=15 min ( $[F^-] = 0\ M$  and  $[Sc_T] = 67\ nM$ )
- $Sc_{non\ acc-rinse}$  in the first rinse = 17 and 38%  $Sc_{acc}$  at t=15 min ( $[F^-] = 40\ \mu M$  and  $[Sc_T] = 17\ nM$ )

Thus, the multiple rinses were necessary to minimize the analytical variability of the determination of both  $Sc_{ads}$  and  $J_{int}$  as well as to avoid over-estimating  $Sc_{ads}$ .

The values of  $Sc_{rinse}$  were higher in the uptake experiments (where  $Sc_{rinse} = Sc_{non\ acc-rinse} + Sc_{ads-rinse}$ ) than in the control experiments (where  $Sc_{rinse} = Sc_{non\ acc-rinse}$ ), suggesting that the multiple rinses led to a significant extraction of Sc associated with the algal surface ( $Sc_{ads-rinse}$ ). For each rinse,  $Sc_{rinse}$  was variable with the exposure time but no trend was observed, confirming that surface-binding of Sc had reached equilibrium before 15 min of exposure. Thus, we calculated average  $Sc_{ads-rinse}$  values (n = 3 exposure times) and normalized them for cellular surface area (Table. SI.1). Then, for each exposure, the average  $Sc_{ads-rinse}$  values of all 2 x 10 mL rinse were summed to obtain the total amount of algal surface-associated Sc that was extracted by the cumulative rinses (designated total  $Sc_{ads-rinse}$  and given in Table. SI.1).

Table SI.1: Calculated  $Sc_{ads-rinse}$  values in each 2 x 10 mL rinse and in the sum of all the rinses. Average values  $\pm$  standard deviations (n = 3 exposure times).

	$Sc_{ads-rinse}$ (nmol·m <sup>-2</sup> ) [F <sup>-</sup> ] = 0 M; [Sc <sub>T</sub> ] = 21 nM	$Sc_{ads-rinse}$ (nmol·m <sup>-2</sup> ) [F <sup>-</sup> ] = 0 M; [Sc <sub>T</sub> ] = 67 nM	$Sc_{ads-rinse}$ (nmol·m <sup>-2</sup> ) [F <sup>-</sup> ] = 40 μM; [Sc <sub>T</sub> ] = 17 nM
1 <sup>st</sup> 2 x 10 mL rinse	90 ± 41	140 ± 52	77 ± 14
2 <sup>nd</sup> 2 x 10 mL rinse	47 ± 14	180 ± 70	40 ± 8
3 <sup>rd</sup> 2 x 10 mL rinse	44 ± 6	160 ± 57	25 ± 10
4 <sup>th</sup> 2 x 10 mL rinse	32 ± 3	130 ± 33	18 ± 7
5 <sup>th</sup> 2 x 10 mL rinse	20 ± 3	100 ± 47	20 ± 4
<b>Total <math>Sc_{ads-rinse}</math></b>	<b>230 ± 45</b>	<b>719 ± 220</b>	<b>180 ± 31</b>

We finally calculated an under-estimation of  $Sc_{ads}$  for our experimental protocol, for each experimental condition (equation SI.1).

$$\text{Under-estimation of } Sc_{ads} = \frac{Sc_{ads} + \text{total } Sc_{ads-rinse}}{Sc_{ads}} \quad (\text{eq SI.1})$$

The under-estimation of  $Sc_{ads}$  was  $1.3 \pm 0.1$  at [F<sup>-</sup>] = 0 M and [Sc<sub>T</sub>] = 21 nM;  $1.6 \pm 0.2$  at [F<sup>-</sup>] = 0 M and [Sc<sub>T</sub>] = 67 nM; and  $1.7 \pm 0.4$  at [F<sup>-</sup>] = 40 μM and [Sc<sub>T</sub>] = 17 nM. No clearly important fluoride effect was observed on the under-estimation of  $Sc_{ads}$  between 0 and 40 μM F<sup>-</sup>. Thus, the important increase of  $Sc_{ads}$  with [F<sup>-</sup>] observed at a constant [Sc<sup>3+</sup>] (cf. Fig. 1 in the manuscript) could probably be exclusively attributed to the adsorption of Sc fluoro-complexes and not to variable under-estimation of  $Sc_{ads}$  with [F<sup>-</sup>].

## SECTION II: EFFECT OF FLUORIDE ON *C. REINHARDTII* SCANDIUM BIOACCUMULATION AT PH 6.50

This section concerns the Sc exposures of *C. reinhardtii* performed at pH 6.50 and [F<sup>-</sup>] = 0 or 50 μM. Most of the materials and methods are the same as those described in the main manuscript and are thus not repeated here.

## Materials and methods

### Description and preparation of exposure media

The exposure media without fluoride contained 1 to 200 nM  $Sc_T$  ( $n = 23$ ). The exposure media with 50  $\mu M$   $F^-$  contained 1 to 900 nM  $Sc_T$  ( $n = 15$ ). They were prepared with the same materials and methods described in the main manuscript, except that their pH was adjusted to  $6.50 \pm 0.02$  and that they were buffered with 1 mM MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) instead of 1 mM MES.

### Short-term (<1 h) bioaccumulation experiments

Only *C. reinhardtii* was exposed in the pH 6.50 exposure media. The protocol described in the manuscript was used to determine  $J_{int}$  and  $Sc_{ads}$  for *C. reinhardtii*, except for 15 exposures carried out without  $F^-$ . In these latter experiments, only  $J_{int}$  values were obtained, with the protocol described in Crémazy et al. [1].

## Results

### Speciation in exposure media

Scandium speciation in the exposure media is given in Table SI.2. Fluoride complexation by  $Sc^{3+}$  was not significant in the range of  $[Sc_T]$  selected and did not affect the free fluoride concentration (i.e.,  $[F^-] \sim [F_T]$ ). Thus, Sc speciation in Table SI.2 is valid for all the exposure solutions. As indicated in the table, the proportion of  $Sc^{3+}$  decreased by a factor of  $\sim 9$  as the fluoride concentration increased from 0 to 50  $\mu M$ .

Table SI.2: Major Sc species distribution in exposure media (pH = 6.50 and ionic strength = 8.8 mEq·L<sup>-1</sup>), calculated with Visual Minteq at [Sc<sub>T</sub>] = 1 nM. This speciation was valid over the entire range of [Sc<sub>T</sub>] used.

	[F <sup>-</sup> ] = 0 μM	[F <sup>-</sup> ] = 50 μM
% Sc <sup>3+</sup>	0.050	0.0056
% ScOH <sup>2+</sup>	5.0	0,55
% Sc(OH) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	50	5.2
% Sc(OH) <sub>3</sub>	45	6.0
% ScF <sup>2+</sup>	0	1.8
% ScF <sub>2</sub> <sup>+</sup>	0	38
% ScF <sub>3</sub> (aq)	0	47
% ScF <sub>4</sub> <sup>-</sup> (aq)	0	1.5

### Scandium adsorption at the biological surfaces of *C. reinhardtii*

Only one adsorption site could be detected at [F<sup>-</sup>] = 0 μM. However at [F<sup>-</sup>] = 50 μM, adsorption first saturated (at ~1100 nmol·m<sup>-2</sup>) then increased gradually without reaching a second plateau over the range of [Sc<sub>T</sub>] tested. Fluoride did not notably alter the concentration of surface-bound Sc (Fig. SI.3a), which increased in the presence of fluoride at a given [Sc<sup>3+</sup>] (Fig. SI.3b), once again suggesting a surface adsorption of Sc fluoro-complexes.

Adsorption parameters (Sc<sub>ads, max</sub> and K<sub>Sc-Rads</sub>) at [F<sup>-</sup>] = 0 μM were obtained by fitting the experimental data to eq 2 with M = 1 site (Table SI.3). Adsorption parameters for the first adsorption site at [F<sup>-</sup>] = 50 μM were obtained likewise. The second adsorption site at [F<sup>-</sup>] = 50 μM could not be characterized since no saturation was observed. As was the case for [F<sup>-</sup>] = [0 – 5 μM] at pH 5.00, the apparent K<sub>Sc-Rads</sub> and K<sub>Sc-Rint</sub> values were not significantly different (p > 0.05) at [F<sup>-</sup>] = 0 or 50 μM, suggesting that same types of binding sites are involved in both the internalization and adsorption processes. The fact that another adsorption site was detected at [F<sup>-</sup>] = 50 μM suggests that this site displays a specific affinity for some fluoro-complexes.

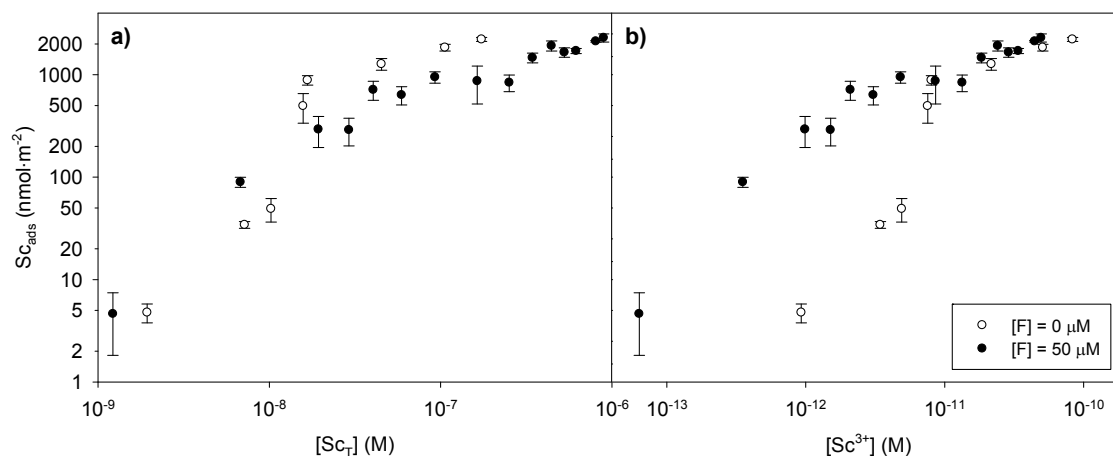


Figure SI.3: Scandium adsorption ( $Sc_{ads}$ ) determined in *C. reinhardtii* from the y-intercept of bioaccumulation versus time plots at pH 6.50 and at  $[F^-] = 0$  and  $50 \mu\text{M}$ . Values of  $Sc_{ads}$  **a)** versus  $[Sc_T]$  (experimentally determined) and **b)** versus  $[Sc^{3+}]$  (calculated with Visual Minteq). Y-intercept values  $\pm$  standard errors.

Table SI.3: Modeling results for  $Sc_{ads}$  on *C. reinhardtii* with eq 2 ( $M = 1$ ) for each  $[F^-]$ .

$F^- (\mu\text{M})$	$R^2$	$n$	$Sc_{ads,max} \pm$ standard error ( $\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}$ )	Apparent $\log K_{Sc-Rads}$ and 95% confidence interval
0	0.78	8	$3260 \pm 620$	10.42 [n.a. – 10.72]
50	0.95	15	Rads(1) : $1100 \pm 160$	Rads(1) : 11.68 [9.97-11.97]

\*n.a. : not applicable (lower limit <0)

### Sc internalization fluxes for *C. reinhardtii*

As observed at pH 5.00, only one transporter could be detected at pH 6.50 with  $[F^-] = 0$  or  $50 \mu\text{M}$ . Its maximum flux capacity was  $\sim 2300 \text{ nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  and this value was not significantly affected by the increase of pH from 5.00 to 6.50, as already observed in Crémazy et al. [1]. Fluoride did not reduce Sc uptake (Fig. SI.4a) and accordingly, fluoride increased  $J_{int}$  values for a given  $[Sc^{3+}]$  (Fig. SI.4b). To quantify this observation, modeling of  $J_{int}$  with  $[Sc^{3+}]$  was performed with eq 3 (with  $N = 1$ ). Results of each modeling exercise are given in Table SI.4. A significant increase in the conditional  $K_{Sc-Rint}$  value from  $10^{10.73}$  to  $10^{11.45} \text{ M}^{-1}$  was observed from 0 to  $50 \mu\text{M } F^-$  (Table SI.4). At  $[F^-] = 0 \text{ M}$ , the  $K_{Sc-Rint}$  value at pH 6.50 was much higher than the  $K_{Sc-Rint}$  value at pH 5.00 (cf. Table 4 in the main manuscript). In our preceding study [1], we observed

the same  $K_{Sc-Rint}$  values and thus the same pH effect at these two pH values (and under the same experimental conditions). In this earlier work, we interpreted the increase of the apparent  $K_{Sc-Rint}$  value with pH as evidence for a possible internalization of Sc hydroxo-complexes.

Contrary to the results at pH 5.00, the calculated  $J_{diff \max}(Sc^{3+})$  was lower than the observed  $J_{int}$  values (compare Fig. SI.4(b) and Fig. 2(b) in the manuscript). Thus, a diffusive limitation of  $Sc^{3+}$  uptake might be expected. However, the uptake saturation observed under both experimental conditions tells us that a chemical equilibrium was in fact reached between Sc in solution and Sc at the biological surface. The participation of intact hydroxo- and fluoro-species to the overall uptake is thus again suggested. With this hypothesis, the diffusion of assimilable complexes from the bulk solution to the biological surface should be added to the diffusion of  $Sc^{3+}$  when considering possible diffusion limitation. This additional contribution could lead to diffusion fluxes that are higher than the observed internalization fluxes and could thus explain why the present uptake data do not agree with a diffusion limitation scenario.

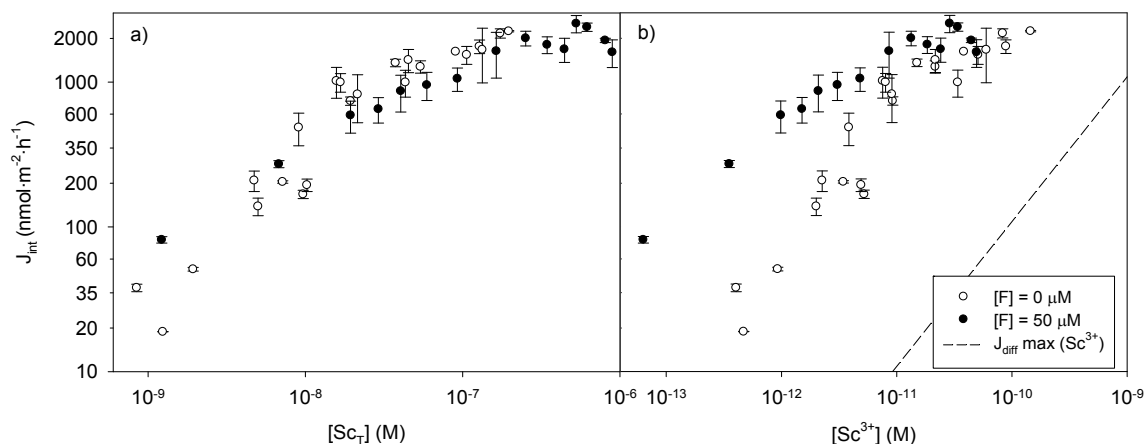


Figure SI.4: Scandium internalization fluxes determined for *C. reinhardtii* from the slope of bioaccumulation *versus* time plots at pH 6.50 and at different  $[F^-]$ . Values of  $J_{int}$  **a)** *versus*  $[Sc_T]$  (experimentally determined) and **b)** *versus*  $[Sc^{3+}]$  (calculated with Visual Minteq). Slope values  $\pm$  standard errors.

Table SI.4: Modeling results of  $J_{\text{int}}$  for *C. reinhardtii* with eq 3 (N=1). Values sharing no common letters are significantly different (t-test,  $\alpha = 0.05$ ).

F ( $\mu\text{M}$ )	$R^2$	n	$J_{\text{max}} \pm \text{standard error}$ ( $\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ )	Apparent log $K_{\text{Sc-Rint}}$ and 95% confidence interval
0	0.91	23	$2327 \pm 179^a$	10.73 [10.47 – 10.90] <sup>a</sup>
50	0.89	15	$2245 \pm 145^a$	11.45 [11.04 - 11.66] <sup>b</sup>

### Modeling of Sc $J_{\text{int}}$ in *C. reinhardtii* over the entire range of [F<sup>-</sup>]

The same equations used to model  $J_{\text{int}}$  values at pH 5.00 were used to model  $J_{\text{int}}$  values determined at pH 6.50. In the present modeling, the  $K_{\text{Sc-Rint}}$  value in eqs 3 and 4 was set at  $10^{10.73} \text{ M}^{-1}$  (value determined at 0 M  $\text{F}^-$  and pH 6.50) and represented the apparent affinity of  $\text{Sc}^{3+}$  (and also likely of some hydroxo-species) for the membrane transporter. Modeling with eq 3 derived from BLM principles under-estimated  $J_{\text{int}}$  at  $[\text{F}^-] = 50 \mu\text{M}$ , particularly at flux values below the maximum plateau (Fig. SI.5a). A far better modeling of these fluxes was obtained with eq 4 (Fig. SI.5b), with an apparent affinity of  $\text{ScF}^{2+}$  for the membrane transporter estimated at  $K_{\text{ScF-Rint}} = 10^{8.79} [10^{8.56} - 10^{8.94}] \text{ M}^{-1}$ . Again, adding more fluoro-complexes did not improve the fit, but this was expected here since only one  $[\text{F}^-]$  was tested. Modeling with eq 5, with  $K_{\text{Sc-Rint}} = 10^{7.51} \text{ M}^{-1}$  determined in our previous study, also provided a reasonable prediction of  $J_{\text{int}}$  (Fig. SI.5c).

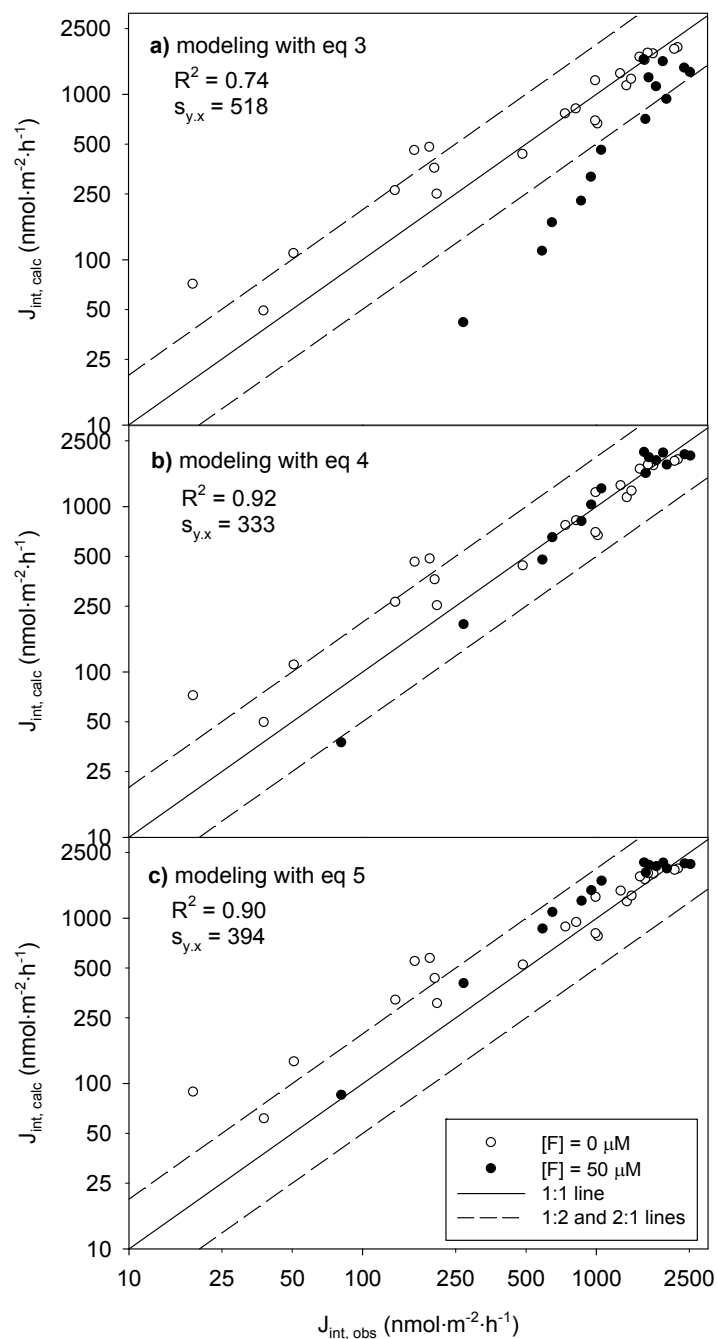


Figure SI.5: Sc internalization fluxes in *C. reinhardtii* calculated with **a)** eq 2, **b)** eq 4 and **c)** eq 5 ( $J_{\text{int, calc}}$ ) versus Sc internalization fluxes experimentally observed at pH 6.50 and at different [F] ( $J_{\text{int, obs}}$ ). The 1:1 (solid), 1:2 and 2:1 (dashed) lines are drawn for comparison.



## REFERENCE

1. Crémazy, A.; Campbell, P. G. C.; Fortin, C., The biotic ligand model can successfully predict the uptake of a trivalent ion by a unicellular alga below pH 6.50 but not above: Possible role of hydroxo-species. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 2408-2415.



## 10 ANNEXE A

### Calcul de l'enrichissement de $\text{Sc}^{3+}$ dans la paroi cellulaire de *C. reinhardtii* en fonction du pH

Les valeurs de mobilité électrophorétique de *C. reinhardtii* entre pH 4,50 et 7,90 ont permis d'obtenir le potentiel Zeta ( $\zeta$ ) des algues dans cette gamme de pH, avec l'équation de Smoluchowski (Hunter, 1981). Le potentiel  $\zeta$  correspond au potentiel dans le plan de cisaillement de la cellule algale, se situant à une faible distance de la surface biologique où les molécules d'eau suivent les mouvements de la cellule (Campbell et al., 1997). Le potentiel de surface ( $\Psi_0$ ) correspond au potentiel présent à l'interface eau-surface biologique (Yee et al., 2004). En supposant que le plan de cisaillement n'est qu'à quelques couches d'eau de la surface cellulaire, le potentiel  $\zeta$  peut être considéré comme une première approximation du potentiel  $\Psi_0$  (Hassler et al., 2004b). Enfin, le potentiel Donnan ( $\Psi_{\text{DON}}$ ), d'amplitude supérieure à  $\Psi_0$ , est le potentiel électrique présent dans la paroi cellulaire. Ces deux potentiels peuvent être considérés comme égaux en présumant que la transition entre la paroi cellulaire et la solution est très mince comparée à l'épaisseur de la paroi cellulaire (Yee et al., 2004). Ainsi, le potentiel  $\zeta$  calculé dans les expériences de mobilité électrophorétique était considéré comme une approximation du potentiel Donnan  $\Psi_{\text{DON}}$ . Il remplaçait donc  $\Psi_{\text{DON}}$  dans l'équation de Nernst (équation A1) pour obtenir une estimation des valeurs de  $[\text{Sc}^{3+}]_{\text{paroi cellulaire}}$  à partir des valeurs de  $[\text{Sc}^{3+}]$  en solution calculée dans chaque solution d'exposition, dans les algues exposées au Sc entre pH 4,50 et 7,90 (Hassler et al., 2004b).

$$[\text{Sc}^{3+}]_{\text{paroi cellulaire}} = [\text{Sc}^{3+}] \cdot \exp\left(-\frac{z\Psi_{\text{DON}}F}{RT}\right) \quad \text{éq. (A1)}$$

F, R et T sont la constante de Faraday (en  $\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), la constante des gaz parfaits (en  $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) et la température (en K) respectivement,  $\Psi_{\text{DON}}$  est le potentiel Donnan (ici remplacé par le potentiel  $\zeta$  en  $\text{J}\cdot\text{C}^{-1}$ ) et z est le nombre de charges de  $\text{Sc}^{3+}$ , c'est-à-dire 3.

Le terme exponentiel de l'équation A1 correspondait au facteur d'enrichissement (noté  $\pi$ ) de la concentration en  $\text{Sc}^{3+}$  dans la paroi cellulaire par rapport celle en solution (tableau A1).

L'augmentation de l'enrichissement de la concentration en  $\text{Sc}^{3+}$  dans la paroi cellulaire allait de 4,8 à pH 4,50 à environ 11,4 aux pH 7,50 et 7,90.

Tableau A1 : Facteur d'enrichissement de  $[\text{Sc}^{3+}]$  dans la paroi cellulaire par rapport à celle en solution en fonction du pH.

pH	$\pi$
4,50	4,74
5,00	7,63
6,00	7,67
6,50	8,44
7,00	7,28
7,50	12,57
7,90	10,25

## 11 ANNEXE B

### Modélisation des valeurs de $Sc_{ads}$ chez *C. reinhardtii* à pH variable

Dans les expériences à pH variable, les valeurs de  $Sc_{ads}$  observées correspondaient au Sc non désorbé de la surface de *C. reinhardtii* par le rinçage à l'EDTA. Nous avons supposé que ce Sc était irréversiblement lié à la surface biologique. Entre pH 4,50 et 7,00, ces valeurs de  $Sc_{ads}$  décrivaient des isothermes de Langmuir à chaque pH, en augmentant avec la concentration en Sc ( $[Sc^-]$  ou  $[Sc^{3+}]$ ) jusqu'à l'atteinte d'un plateau indiquant la saturation des sites d'adsorption. À pH 7,50 et 7,90, les limites de solubilité du Sc nous empêchaient d'employer des concentrations assez élevées pour atteindre cette saturation (cf. figure 14). Des valeurs de  $Sc_{ads,max}$  (adsorption maximale du Sc) et de  $K_{Sc-Rads}$  (constante d'affinité apparente du Sc pour le site de surface Rads) étaient obtenues pour chaque pH entre pH 4,50 et 7,00 avec l'équation suivante :

$$Sc_{ads} = \frac{Sc_{ads,max} \cdot K_{Sc-Rads} \cdot [Sc^{3+}]}{1 + K_{Sc-Rads} \cdot [Sc^{3+}]} \quad \text{éq. (B1)}$$

Ces valeurs sont compilées dans le tableau B1. Aucune tendance n'a été observée entre le pH et  $Sc_{ads,max}$  ( $Sc_{ads,max}$  moyen =  $588 \pm 165$  nmol·m<sup>-2</sup>), indiquant que la capacité des sites d'adsorption n'était pas affectée dans la gamme de pH = [4,50 – 7,00]. À noter que comme attendu, le plateau de saturation était moins élevé avec ce rinçage des cellules à l'EDTA qu'avec les rinçages multiples sans EDTA (expériences à  $[F^-]$  variable,  $Sc_{ads,max} = 1480 \pm 270$  nmol·m<sup>-2</sup>) (voir le tableau 3 de l'article 3). Comme du Sc était désorbé pour chacun de ces rinçages la vraie densité de sites d'adsorption du Sc chez *C. reinhardtii* était  $> 1480 \pm 270$  nmol·m<sup>-2</sup>. À pH 7,50 et 7,90 où les valeurs de  $Sc_{ads}$  n'atteignaient pas leurs valeurs maximales, des régressions linéaires ont permis d'estimer le produit  $Sc_{ads,max} \cdot K_{Sc-Rads}$ , en supposant que les faibles valeurs de  $[Sc^{3+}]$  à ces pH menaient à un produit  $K_{Sc-Rads} \cdot [Sc^{3+}] \ll 1$  dans l'équation B1. En supposant que  $Sc_{ads,max}$  demeurerait constant jusqu'à pH 7,90, les valeurs apparentes de  $K_{Sc-Rads}$  ont alors pu être calculées avec  $Sc_{ads,max}$  moyen à pH 7,50 et 7,90.

Tableau B1 : Résultats des régressions des valeurs de  $Sc_{ads}$  chez *C. reinhardtii* avec l'équation B1 (équation sans compétiteur), à chaque pH expérimental. Les valeurs ne partageant aucune lettre commune sont significativement différentes (test t avec correction FDR,  $\alpha = 0,05$ ).

pH	R <sup>2</sup>	n	$Sc_{ads,max} \pm$ erreur type ( $nmol \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ )	log $K_{Sc-Rads}$ apparente et intervalle de confiance à 95%
4,50	0,50	27	625 ± 101 <sup>ab</sup>	7,64 [n.a. – 8,13] <sup>a</sup>
5,00	0,93	19	763 ± 54 <sup>a</sup>	7,98 [7,57 – 8,19] <sup>a</sup>
6,00	0,71	21	481 ± 65 <sup>b</sup>	9,44 [8,53 – 9,71] <sup>b</sup>
6,50	0,83	20	362 ± 50 <sup>b</sup>	10,71 [9,92 – 10,98] <sup>c</sup>
7,00	0,92	21	706 ± 114 <sup>ab</sup>	11,99 [11,44 – 12,23] <sup>d</sup>
7,50	0,06	6	588 ± 165 (calculé) <sup>ab</sup>	12,00 [n.a. – 12,81] (calculé) <sup>abcde</sup>
7,90	0,71	20	588 ± 165 (calculé) <sup>ab</sup>	14,12 [13,18 – 14,40] (calculé) <sup>f</sup>

n.a. : non applicable (limite inférieure < 0)

Les constantes d'affinité apparentes du Sc avec les sites d'adsorption augmentaient de  $10^{7,64}$  à  $10^{14,12} M^{-1}$  de pH 4,50 à pH 7,90. En supposant que cet effet du pH était dû à la compétition des protons pour les sites Rads, une régression des valeurs de  $Sc_{ads}$  a été réalisée dans toute la gamme pH expérimentale avec l'équation B2 (où  $K_{H-Rads}$  est la constante d'affinité du proton avec le site d'adsorption du Sc).

$$Sc_{ads} = \frac{Sc_{ads,max} \cdot K_{Sc-Rads} \cdot [Sc^{3+}]}{1 + K_{Sc-Rads} \cdot [Sc^{3+}] + K_{H-Rads} \cdot [H^+]} \quad \text{éq. (B2)}$$

Pour cette régression, nous avons utilisé les différentes valeurs de  $Sc_{ads,max}$  obtenues à chaque pH, afin de prendre en compte la variabilité biologique entre les expériences. Nous avons fixé la valeur de  $K_{Sc-Rads}$  à  $10^{14,12} M^{-1}$ , soit à la valeur estimée à pH 7,90 où la compétition du proton était nécessairement la plus faible parmi les conditions testées. La meilleure estimation de  $K_{H-Rads}$  obtenue par régression des valeurs expérimentales avec l'équation B2 était  $10^{10,80} M^{-1}$ . La figure B1 présente les valeurs de  $Sc_{ads}$  prédits par ce modèle ( $Sc_{ads, calc}$ ) en fonction de celles mesurées ( $Sc_{ads, obs}$ ). Malgré la prise en compte de la compétition du proton dans ce modèle, un fort effet du pH était toujours observé sur l'adsorption quasi-irréversible du Sc : les valeurs de  $Sc_{ads, calc}$  étaient distribuées autour de la droite de prédiction 1:1, avec une surestimation à pH < 6,00 et une sous-estimation à pH > 6,00.

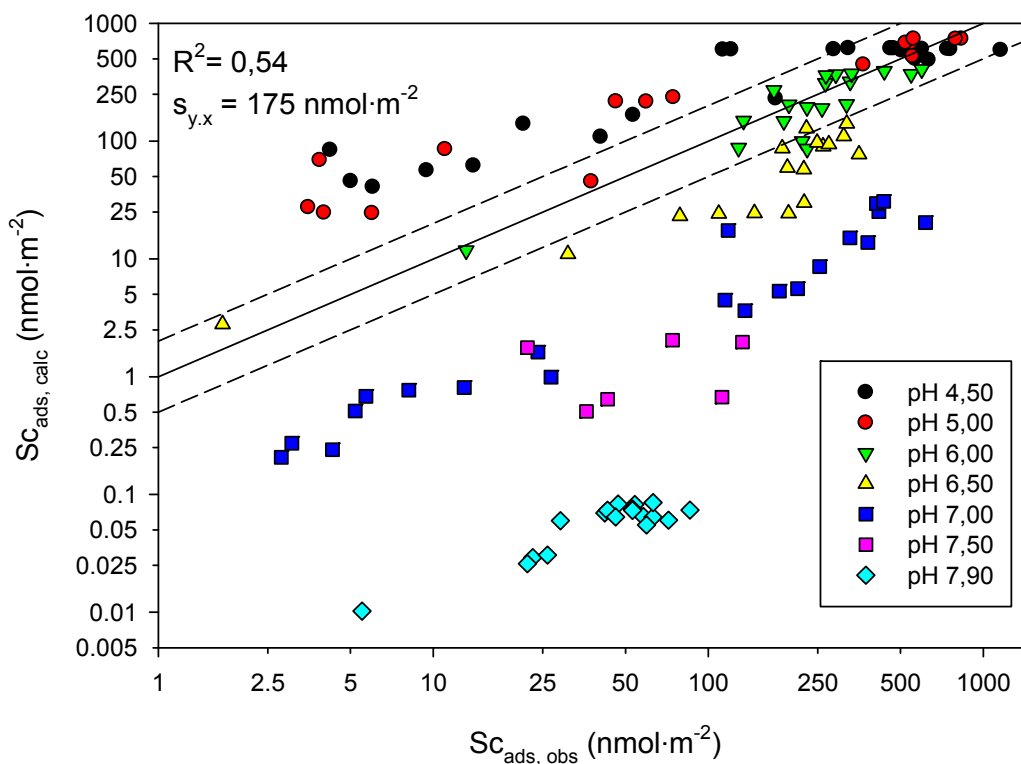


Figure B1 :Concentrations en Sc adsorbé à la surface biologique (après rinçage à l'EDTA) calculées avec l'équation B2 en fonction des concentrations déterminées expérimentalement entre pH 4,50 et 7,90 chez *C. reinhardtii*. Les droites 1:1 (ligne pleine), 1:2 and 2:1 (lignes en tirets) sont tracées pour comparaison.

L'effet du pH sur le potentiel membranaire de *C. reinhardtii* n'était pas suffisamment important pour améliorer significativement cette modélisation des valeurs de  $Sc_{ads}$ . L'adsorption d'hydroxo-complexes de Sc à la surface de *C. reinhardtii* a donc été présumée. Étant donné qu'un seul  $Sc_{ads, max}$  a été observé entre pH 4,50 et 7,00, un seul site de surface semblait être impliqué dans l'adsorption de ces espèces chimiques du Sc.