

Université du Québec  
INRS-Eau, Terre et Environnement

Influence du pH sur le transport transmembranaire du  
manganèse et du cadmium chez l'algue verte  
unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*

Par  
Laura François

Thèse présentée pour l'obtention  
Du grade Philosophiæ Doctor (Ph. D.) en Sciences de l'eau

Membres du Jury :

Examinatrice externe.....Prof. Danielle Fortin, Université d'Ottawa

Examinatrice externe.....Prof. Catherine Jumarie, UQAM

Examineur interne.....Prof. Jean-Christian Auclair, INRS-ETE

Codirecteur de recherche.....Prof. Peter G.C. Campbell, INRS-ETE

Directeur de recherche.....Prof. Claude Fortin, INRS-ETE

© Droits réservés de Laura François, 2008



## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Claude Fortin, pour son encadrement, sa compétence, ses idées et ses conseils, ainsi que pour sa gentillesse et sa compréhension. Je tiens également à remercier mon co-directeur, Peter Campbell, pour ses précieuses recommandations et ses commentaires constructifs.

Je remercie également le professeur Jean-Christian Auclair, pour son expertise sur les algues et qui, avec Sophie Duchesne, m'ont guidée à travers mes calculs statistiques. De plus, l'aide technique et les conseils (ainsi que la compagnie !) d'Amiel Boullemant, Lise Rancourt, Séverine Le Faucheur et Jonathan Bernier ont été très précieux.

Ensuite je remercie du fond du cœur mon conjoint, Christophe, et mes amis, Marie-Josée, Édouard et Séverine, pour leur affection et leur soutien. Je tiens aussi à remercier mon fils, Tiago, pour sa patience et sa gentille coopération ces derniers mois !

Enfin, cette étude a été possible grâce au support financier de l'initiative pour les nouveaux chercheurs du Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) et le programme des Chaires de recherche du Canada.



## RÉSUMÉ

L'influence du pH sur la prise en charge et l'adsorption du manganèse et du cadmium par l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* a été étudiée sur des temps d'exposition courts, afin de mieux comprendre la nature des interactions entre les protons et les transporteurs membranaires du métal. Les flux d'internalisation ( $J_{\text{int}}$ ) du manganèse et du cadmium ont été mesurés sur une large gamme de concentrations allant de  $1 \cdot 10^{-10}$  à  $4 \cdot 10^{-4}$  M et ce à différents pH (Mn : 5, 6,5 et 8 ; Cd : 5 et 6,5).

Nos mesures ne montraient pas de saturation des sites d'adsorption métalliques dans les gammes de pH et de concentrations étudiées. Le pH n'a pas eu d'effet notable sur l'adsorption du manganèse mais l'adsorption du cadmium diminuait quand le pH diminuait. Ceci nous laisse croire que le Cd et le Mn se lient à des sites d'adsorption distincts.

Des prises en charge caractéristiques d'un processus de saturation Michaëlis-Menten ont été observées pour les deux métaux mais le flux maximal de transport ( $J_{\text{max}}$ ) diminuait quand le pH diminuait. Ce résultat, jamais démontré chez les algues auparavant, suggère fortement une inhibition de nature non compétitive (simple ou partielle) de la prise en charge du métal par le proton. Un modèle d'inhibition de type Michaëlis-Menten considérant la compétition du proton et du calcium a été testé. Les constantes de stabilité des complexes métal-transporteur (ou « métal-ligand biotique » ;  $K_{\text{Mn}}$  et  $K_{\text{Cd}}$ ), ainsi que celles des complexes formés par la liaison compétitive du calcium avec les transporteurs métalliques ( $K_{\text{Ca}}^{\text{Mn}}$  et  $K_{\text{Ca}}^{\text{Cd}}$ ) et du proton ( $K_{\text{H}}$ ) ont été calculées :  $K_{\text{Ca}}^{\text{Mn}} = 10^{3,7} \text{ M}^{-1} [10^{3,51} - 10^{3,81}]$  (intervalle d'erreur-type) et  $K_{\text{Mn}} = 10^{4,20} \text{ M}^{-1} [10^{4,11} - 10^{4,27}]$  ;  $K_{\text{Ca}}^{\text{Cd}} = 10^{4,75} \text{ M}^{-1} [10^{3,85} - 10^{4,63}]$ , et  $K_{\text{Cd}} = 10^{4,19} \text{ M}^{-1} [10^{4,18} - 10^{4,21}]$ . Pour aucun des deux métaux, la constante  $K_{\text{H}}$  n'a toutefois pu être estimée, indiquant que l'inhibition compétitive des protons n'était pas significative (inférieure à l'incertitude) dans le calcul des paramètres de notre modèle.

Comme suggéré dans la littérature, il a aussi été mis en évidence que le tampon MES n'influçait pas la prise en charge du cadmium. De plus, la prise en charge des métaux ne dépendait que du pH d'exposition et n'était pas influencée par le pH du milieu

d'acclimatation avant l'exposition, suggérant que les variations des flux métalliques avec le pH sont dues à des changements des caractéristiques fonctionnelles des protéines de surface plutôt qu'à la synthèse de sites de transport additionnels. La nature de l'inhibition du proton a été identifiée comme étant partiellement non compétitive puisqu'elle affecte la cinétique de transport transmembranaire des métaux.

Ces résultats sont en contradiction avec le modèle du Ligand Biotique (BLM) qui présume que tous les paramètres biologiques (vitesse d'internalisation, nombre de transporteurs) demeurent constants lorsque l'on change les conditions d'exposition. Nous concluons donc que le BLM, dans sa forme actuelle, ne décrit pas correctement la véritable influence du pH sur la prise en charge du manganèse et du cadmium par les algues et que l'effet physiologique du pH (changements des caractéristiques fonctionnelles des protéines de transport dus à l'inhibition partiellement non compétitive des protons) doit y être intégré.

# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
RÉSUMÉ .....	v
TABLE DES MATIÈRES .....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES .....	xiii
GLOSSAIRE.....	xxiii
DÉFINITIONS.....	xxv
1. INTRODUCTION .....	1
1.1. Spéciation du métal.....	2
1.2. Prise en charge et membrane cellulaire.....	3
1.3. Modèle du Ligand Biotique .....	5
1.4. Le pH .....	13
1.4.1. Exemples en accord avec le BLM.....	15
1.4.2. Exceptions au BLM .....	17
1.4.2.1. Assimilation des hydroxo- ou carbonato-complexes.....	19
1.4.2.2. Modèles alternatifs au BLM .....	21
1.4.2.3. Autres types d'inhibitions (différentes de simplement compétitive) .....	22
1.4.2.3.1. Composante compétitive de la modélisation .....	23
1.4.2.3.2. Composante tenant compte de la modification de la physiologie du ligand biotique .....	25
1.4.2.3.3. Exemples déviant des prédictions du BLM .....	27
1.5. Problématique et hypothèses.....	31
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	35
2.1. Les algues.....	35
2.1.1. Choix de l'organisme test .....	35
2.1.2. Milieux de culture .....	35
2.1.3. Croissance algale .....	39
2.1.4. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	46
2.2. Matériel et réactifs .....	46

2.3.	Protocoles expérimentaux .....	47
2.3.1.	Récolte et exposition .....	47
2.3.2.	Récupération du métal après filtration .....	48
2.3.3.	Distinction entre métal intracellulaire et métal adsorbé.....	49
2.3.4.	Dosage des radioéléments .....	50
2.3.5.	Expériences d'exposition .....	52
2.4.	Modèle de spéciation.....	53
2.5.	Statistiques .....	53
3.	MODÉLISATION DES FLUX INTRACELLULAIRES.....	55
3.1.	Modèle partiellement non compétitif.....	55
3.2.	Détermination des paramètres du modèle .....	58
4.	PRISE EN CHARGE DES MÉTAUX.....	61
4.1.	Introduction .....	61
4.1.1.	Les métaux dans l'environnement.....	61
4.1.1.1.	Le manganèse .....	61
4.1.1.2.	Le cadmium.....	62
4.1.2.	Spéciation .....	63
4.1.2.1.	Le manganèse .....	63
4.1.2.2.	Le cadmium.....	65
4.1.3.	Toxicité et bioaccumulation .....	67
4.1.3.1.	Le manganèse .....	67
4.1.3.2.	Le cadmium.....	69
4.2.	Expériences .....	72
4.2.1.	Cinétique .....	72
4.2.2.	Prise en charge métallique.....	72
4.2.3.	Le pH.....	74
4.2.3.1.	Le manganèse .....	74
4.2.3.2.	Le cadmium.....	76
4.2.4.	Autres expériences .....	76
4.2.4.1.	Concentration de manganèse.....	76
4.2.4.2.	Effet du chrome sur la prise en charge du manganèse .....	77



4.2.4.3.	Effet du tampon MES sur la prise en charge du cadmium.....	77
4.2.4.4.	Effet du calcium.....	77
4.2.4.4.1.	Le manganèse.....	77
4.2.4.4.2.	Le cadmium.....	78
4.3.	Résultats.....	78
4.3.1.	Cinétique.....	78
4.3.2.	Adsorption.....	80
4.3.2.1.	Le manganèse.....	80
4.3.2.2.	Le cadmium.....	83
4.3.3.	Prise en charge métallique.....	85
4.3.3.1.	Le manganèse.....	85
4.3.3.2.	Le cadmium.....	89
4.3.4.	Influence du pH du milieu de culture sur la prise en charge.....	91
4.3.4.1.	Le manganèse.....	91
4.3.4.2.	Le cadmium.....	93
4.3.5.	Autres expériences.....	95
4.3.5.1.	Concentration de manganèse.....	95
4.3.5.2.	Effet du chrome sur la prise en charge du manganèse.....	97
4.3.5.3.	Effet du tampon MES sur la prise en charge du cadmium.....	98
4.3.5.4.	Effet du calcium.....	100
4.3.5.4.1.	Le manganèse.....	100
4.3.5.4.2.	Le cadmium.....	100
4.4.	Discussion.....	103
4.4.1.	Prise en charge métallique.....	103
4.4.1.1.	Le manganèse.....	103
4.4.1.2.	Le cadmium.....	105
4.4.1.3.	Variabilité biologique.....	106
4.4.2.	Adsorption.....	106
4.4.3.	Concentration de manganèse.....	108
4.4.4.	Effet du calcium.....	109
4.4.5.	Modélisation.....	111

4.4.5.1.	Le manganèse .....	114
4.4.5.2.	Le cadmium.....	118
4.4.6.	Influence du pH du milieu de culture sur la prise en charge.....	120
4.4.6.1.	Acclimatation .....	120
4.4.6.2.	Simulations Monte Carlo .....	121
4.4.7.	Effet du tampon MES sur la prise en charge du cadmium.....	130
4.4.8.	Mécanisme d'inhibition de la prise en charge du métal par les protons .....	133
4.4.8.1.	Observations générales.....	133
4.4.8.2.	Mécanismes pouvant influencer sur le flux d'internalisation maximal, Jmax .....	133
4.4.8.3.	Comparaison de nos résultats avec la littérature .....	134
4.4.8.3.1.	Le manganèse.....	135
4.4.8.3.2.	Le cadmium.....	135
5.	CONCLUSION .....	139
5.1.	Effet du pH sur la prise en charge du manganèse et du cadmium .....	139
5.2.	Perspectives de recherche.....	141
5.3.	Implications pour le développement d'un BLM algal .....	142
6.	BIBLIOGRAPHIE .....	145
	ANNEXE .....	161

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1 : Récapitulatif des cas d'effets de pH intrigants. ....	18
Tableau 2-1 : Concentrations molaires des cations et anions des milieux de culture, de rinçage et d'exposition. ....	37
Tableau 4-1 : Résumé des résultats pour des expériences de toxicité du cadmium sur des algues unicellulaires (ordonnés suivant leur citation dans le texte). Dans la colonne « Type de mesure », $\mu$ correspond au taux de croissance. ....	71
Tableau 4-2 : Expériences indépendantes effectuées avec le Mn dans des conditions différentes de pH et de tampons. HEPES et MES sont les tampons présents dans le milieu ; (F1) correspond à des algues qui ont toujours été cultivées à pH 5,0 ; (Ca) et (Cr) correspondent à des expériences où la concentration de calcium ou de chrome varie. ....	73
Tableau 4-3 : Expériences indépendantes avec le cadmium effectuées dans des conditions différentes de pH et de tampon. (MES) est indiqué lorsque ce tampon est présent dans le milieu ; (ST) signifie « sans tampon » ; (F1) correspond à des algues qui ont toujours été cultivées à pH 5 ; (Ca) correspond à des expériences où la concentration de calcium varie. ....	74
Tableau 4-4 : Récapitulatif des résultats (et leur erreur-type) de régression linéaire de l'adsorption du manganèse en fonction de l'ion métallique libre. ....	81
Tableau 4-5 : Récapitulatif des résultats (et leur erreur-type) de régression linéaire de l'adsorption du cadmium en fonction de l'ion métallique libre. ....	83
Tableau 4-6a : Paramètres de l'équation de Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) estimés par régression non linéaire ( $\pm$ erreur-type). ....	87
Tableau 4-6b : Intervalles de confiance à 95 % des paramètres de l'équation de Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) estimés par régression non linéaire. ....	87
Tableau 4-7a : Paramètres de l'équation de Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) estimés par régression non linéaire pour l'expérience aux trois pH sur une même culture ( $\pm$ erreur-type). ....	88
Tableau 4-7b : Intervalles de confiance à 95 % des paramètres de l'équation de Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) estimés par régression non linéaire pour l'expérience aux trois pH sur une même culture. ....	89

Tableau 4-8a : Paramètres de l'équation de Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) estimés par régression non linéaire ( $\pm$ erreur-type).....	90
Tableau 4-8b : Intervalles de confiance à 95 % des paramètres de l'équation de Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) estimés par régression non linéaire.....	90
Tableau 4-9 : Paramètres estimés (et leur erreur-type) par régression linéaire des taux de prise en charge du manganèse à pH 7 HEPES présentés dans les figures 4-18 et 4-19. ....	96
Tableau 4-10a : Paramètres estimés (et leur erreur-type) par régression non linéaire du modèle Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) et du modèle partiellement non compétitif (Éq. 25 et 26a). Les intervalles d'erreur-type pour les constantes d'équilibre, log K, sont présentés entre crochets. ....	116
Tableau 4-10b : Intervalles de confiance à 95 % des paramètres estimés par régression non linéaire du modèle Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) et du modèle partiellement non compétitif (Éq. 26a). ....	116
Tableau 4-11a : Paramètres estimés (et leur erreur-type) par régression non linéaire du modèle Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) et du modèle partiellement non compétitif (Éq. 25 et 26a) pour l'expérience aux trois pH sur une même culture. Les intervalles d'erreur-type pour les constantes d'équilibre, log K, sont présentés entre crochets.....	117
Tableau 4-11b : Intervalles de confiance à 95 % des paramètres estimés par régression non linéaire du modèle Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) et du modèle partiellement non compétitif (Éq. 26a) pour l'expérience aux trois pH sur une même culture.....	118
Tableau 4-12a : Paramètres estimés par régression non linéaire du modèle Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) et du modèle partiellement non compétitif (Éq. 25 et 26b). Les intervalles d'erreur-type pour les constantes d'équilibre, log K, sont présentés entre crochets.....	119
Tableau 4-12b : Intervalles de confiance à 95 % des paramètres estimés par régression non linéaire du modèle Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) et du modèle partiellement non compétitif (Éq. 26b). ....	120

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1-1 : Distribution de la fréquence cumulative des valeurs NOEC (la plus haute concentration testée n'ayant pas d'effet significatif par rapport au témoin) des tests de toxicité du Cd sur différentes espèces aquatiques. HC<sub>5</sub> est le cinquième percentile (n = 44) de cette distribution (se rapporter à [EU \(2003\)](#) pour les détails des calculs). Les producteurs primaires (NOEC ; µg·L<sup>-1</sup>) sont : a) *Asterionella formosa* (0,85) ; b) *Selenastrum capricornutum* (2,4) ; c) *Lemna paucicostata* (5 ; 10 ; 10) ; d) *Coelastrum proboscideum* (6,3) ; e) *Chlamydomonas reinhardtii* (7,5) ; f) *Scenedesmus quadricauda* (31) (adaptée de [EU, 2003](#)). .....2
- Figure 1-2 : Schéma conceptuel du modèle de l'ion libre (FIAM) et du ligand biotique (BLM). Il comprend (1) la diffusion du métal libre (M<sup>z+</sup>) et d'un complexe hydrophile (ML) en solution ; (2) la dissociation / complexation avec un ligand en solution ; (3) l'adsorption spécifique (M-X<sub>cell</sub>) ou non spécifique (M-A<sub>cell</sub>) du métal à la surface de l'organisme ; (4) le transport du métal à l'intérieur de l'organisme, caractérisé par une constante d'internalisation (k<sub>int</sub>), et une réaction subséquente avec un ligand intracellulaire (ML<sub>bio</sub>) ; et (5) l'expression des effets biologiques. Le rectangle identifie les réactions prises en compte par le FIAM et le BLM (adaptée de [Hassler et al., 2004a](#)).....4
- Figure 1-3 : Modèle conceptuel des interactions métal-ligand biotique. M<sup>z+</sup>, ion métallique libre ; ML, complexe métallique en solution ; K<sub>1</sub>, constante d'équilibre de formation de ML ; M-X-membrane, complexe de surface avec le ligand biotique; k<sub>f</sub>, k<sub>f</sub>', constantes de formation du complexe de surface ; k<sub>d</sub>, k<sub>d</sub>', constantes de dissociation du complexe de surface ; k<sub>int</sub>, constante d'internalisation ou de transport du métal à travers la membrane biologique. Les charges des complexes ne sont pas indiquées pour simplifier (adaptée de [Campbell, 1995](#)). .....6
- Figure 1-4 : Prise en charge de M<sup>2+</sup> modélisée par un processus de saturation typique Michaëlis-Menten (Éq. 8), sans inhibiteur compétitif (ligne noire) et avec inhibiteur compétitif (ligne violette) dans le milieu.....9
- Figure 1-5 : Modèle schématique du BLM (adaptée de [Di Toro et al., 2001](#)).....11
- Figure 1-6 : Deux cas limites de contrôle de la liaison du métal aux transporteurs membranaires. (A) Contrôle thermodynamique (le pré-équilibre fixe la concentration de {M-X≡}) comme supposé par les modèles de l'ion libre et du ligand biotique. (B) Contrôle cinétique (l'état stationnaire fixe la concentration de {M-X≡}). L'épaisseur des flèches pour les réactions de formation et dissociation du complexe {M-X≡} et pour l'étape d'internalisation indiquent l'importance relative de ces taux. Les réactions entre les espèces en solution sont généralement très rapides comparées au transport (l'épaisseur des flèches n'est pas à l'échelle) (adaptée de [Hudson, 1998](#)). .....12

Figure 1-7 : Effet du pH sur : (a) les flux de prise en charge  $J_{\text{int}}$  et le Pb lié aux sites de transport  $\{\text{Pb-R}_{\text{cell}}\}$  ; (b) la perméabilité membranaire,  $P = J_{\text{int}}/[\text{Pb}^{2+}]$  ; (c) la constante d'internalisation  $k_{\text{int}} = J_{\text{int}}/\{\text{Pb-R}_{\text{cell}}\}$  ; (d) la mobilité électrophorétique (EPM) de *C. kesslerii*. Les ajustements de P et  $k_{\text{int}}$  (lignes en tirets dans b et c) sont calculés avec  $\log(K\text{H-R}_{\text{cell}}) = 3,9$ ,  $\log(K\text{Pb-R}_{\text{cell}}) = 5,54$ ,  $J_{\text{max}} = 1.10^{-14} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  et  $\{\text{R}_{\text{cell,tot}}\} = 1,5.10^{-11} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Dans (d), l'EPM est mesurée pour un temps de contact de 35 min. Différentes lettres indiquent des différences statistiques significatives entre les moyennes ( $p < 0,05$ , test Student-Neuman-Keuls),  $n = 3$  pour (a), (b) et (c) et  $n = 6$  pour (d) (tirée de Slaveykova et Wilkinson, 2003)..... 20

Figure 1-8 : Activité de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\log \{\text{Cu}^{2+}\}$ , observée versus calculée pour des concentrations correspondant à (CE)50  $\text{Cu}^{2+}$  (symboles vides) et (CE)10  $\text{Cu}^{2+}$  (symboles pleins). «  $\text{Cu}^{2+}$  observée » fait référence aux valeurs de (CE)50  $\text{Cu}^{2+}$  et (CE)10  $\text{Cu}^{2+}$  (concentrations de métal entraînant respectivement, après 72 h d'exposition, une inhibition de la croissance de 50 et de 10 %) exprimées en fonction de l'activité de l'ion libre et calculées pour chaque milieu-test en se basant sur l'inhibition de la croissance à chaque  $\{\text{Cu}^{2+}\}$  mesurée. «  $\text{Cu}^{2+}$  calculée » fait référence aux  $\{\text{Cu}^{2+}\}$  calculées à l'aide du programme Biotic Ligand Model Version a008 (se référer à De Schamphelaere et al., 2003) et en utilisant la composition chimique des milieux d'exposition. La ligne pleine correspond à la droite de régression linéaire des données et les lignes en pointillés à son intervalle de confiance à 95 % (adaptée de De Schamphelaere et al., 2003)..... 21

Figure 1-9 : Prise en charge modélisée de  $\text{M}^{2+}$  avec inhibition compétitive des protons ( $K_{\text{H}^+}[\text{H}^+]$  augmente lorsque le pH diminue ; Éq. 17 ; les trois courbes tendent vers le même plateau  $J_{\text{max}}$  mais l'affinité apparente du ligand biotique pour le métal diminue)..... 25

Figure 1-10 : Prise en charge modélisée de  $\text{M}^{2+}$  avec inhibition (partiellement) non compétitive des protons (les trois courbes tendent vers des plateaux différents ;  $J_{\text{max}}$  varie)..... 26

Figure 1-11 : Représentation logarithmique des flux d'internalisation de Cd en fonction du pH pour *C. reinhardtii* à de basses (a:  $5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ) et haute (b:  $7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) concentrations de cadmium. Les prédictions de  $J_{\text{int}}$  sont basées sur le modèle compétitif du BLM et avec une valeur de  $K(\text{H-R}_{\text{cell}}) = 10^{5,2} \text{ M}^{-1}$  (ligne pleine). Les prédictions de  $J_{\text{int}}$  sont aussi faites en tenant compte de la réaction d'un second proton et avec une constante de stabilité de  $K(\text{H}_2\text{-R}_{\text{cell}}) = 10^{11,3} \text{ M}^{-1}$  (ligne en tirets) (tirée de Kola et Wilkinson, 2005)..... 28

Figure 1-12 : Effets de l'activité de  $Sr^{2+}$  sur la cinétique de prise en charge, dans le corps entier de la carpe, lors d'une exposition à différents pH pendant 3 h. Les points représentent la prise en charge moyenne avec des écarts-type ( $n=5-7$ ,  $Sr_{tot} = 0,2-10000 \mu M$  ; température =  $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ C$ ). Les courbes sont des prédictions modélisées à différents pH : (5,0) = pointillés ; (6,0) = petits tirets ; (7,0) = tirets moyens ; (8,0) = ligne pleine ; (8,5) = tirets longs (tirée de Chowdury et Blust, 2001). .....30

Figure 1-13 : Prise en charge de l'uranium intracellulaire en fonction de la concentration d'ion uranyle libre par *Chlamydomonas reinhardtii* suite à une exposition de 30 min. (a) : à pH 5 ; les prédictions de  $J_{int}$  sont basées sur des régressions non linéaires d'un modèle d'inhibition non compétitive et avec des valeurs de  $K_{U-Rcell} = 10^{7,7}$  (ligne en long tirets),  $K_{U-Rcell} = 10^{7,1}$  (ligne en tirets courts), et  $K_{U-Rcell} = 10^{6,5}$  (ligne en pointillés). (b) : à pH 7 ; les régressions non linéaires ont été obtenues avec le même modèle qu'à pH 5 et avec une valeur de  $J_{max} = 26 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot min^{-1}$  (tirée de Fortin et al., 2007). .....31

Figure 2-1 : Croissance de *Chlamydomonas applanata* à pH 5 (tampon MES), pH 6,8 (tampon MES), pH 6,8 (tampon HEPES) et pH 8 (tampon HEPES). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). .....40

Figure 2-2 : Croissance de *Euglena gracilis* à pH 5 (tampon MES) et pH 8 (tampon HEPES). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). .....40

Figure 2-3 : Croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 5 (tampon MES), pH 7 (tampon HEPES) et pH 8 (tampon HEPES). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). .....41

Figure 2-4 : Croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 6,8 (tampon MES), pH 6,8 (tampon HEPES) dans MHSM-1. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). .....42

Figure 2-5 : Croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 7 (tampon HEPES) pour des milieux MHSM-C carencé (C) et MHSM-1 non carencé. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). .....43

Figure 2-6 : Croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 8 avec tampon (8 HEPES) et sans tampon (8 ST). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). ....44

Figure 2-7 : Croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 6,5 avec tampon (6,5 MES), et sans tampon (6,5 ST). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). .....44

- Figure 2-8 : Croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 5 : avec tampon (5 MES) à partir d'algues cultivées à pH 7 ; avec tampon mais pour des algues cultivées à pH 5 à partir du premier repiquage depuis la gélose (5 MES F1) ; et sans tampon (5 ST). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). ..... 45
- Figure 2-9 : Schéma du protocole expérimental utilisé. pH A correspond au pH d'acclimatation, pH B à celui d'exposition. M est le métal en solution. Le rectangle orange correspond à la période d'acclimatation..... 48
- Figure 3-1 : Prise en charge modélisée de  $M^{2+}$  et de  $MOH^+$  selon un scénario fictif où :  $J'_{max} = 50 \times J_{max}$  ;  $K_M = 10 \times K_{MOH}$  ; et M est un métal qui forme des hydroxo-complexes proche de la neutralité ( $\beta_{OH} = 7,0$ ). ..... 57
- Figure 4-1 : Courbe de spéciation du manganèse ( $1 \cdot 10^{-9}$  M de métal total) dans le milieu MHSM-E à l'équilibre avec l'atmosphère.  $[Mn^{2+}]$  est représentée par la ligne pleine,  $[MnHCO_3^+]$  par la ligne en pointillés et  $[MnOH^+]$  par une ligne en tirets. .... 64
- Figure 4-2 : Courbe de solubilité de la rhodochrosite ( $MnCO_3(s)$ ) dans le milieu MHSM-E à l'équilibre avec l'atmosphère. .... 64
- Figure 4-3 : Courbe de spéciation du cadmium ( $1 \cdot 10^{-9}$  M de cadmium total) dans le milieu MHSM-E en équilibre avec l'atmosphère.  $[Cd^{2+}]$  est représentée par la ligne pleine,  $[CdCO_3(aq)]$  par la ligne en pointillés et  $[Cd(CO_3)_2^{2-}]$  par une ligne en tirets. .... 66
- Figure 4-4 : Courbe de solubilité de l'otavite ( $CdCO_3(s)$ ) dans le milieu MHSM-E à l'équilibre avec l'atmosphère..... 67
- Figure 4-5 : Modèle schématique de la prise en charge du manganèse dans les cellules de *Chlamydomonas* sp. par formation de complexes avec les sites de transport membranaire X (ligand biotique). MnX représente les complexes « Mn-site de transport »,  $L_c$  est un ligand intracellulaire, les complexes de Mn dans le milieu extérieur sont représentés par  $\sum_i [MnL_{ci}]$  (adaptée de Sunda et Huntsman, 1985). .... 69
- Figure 4-6 : Cinétique de prise en charge du manganèse par *Chlamydomonas reinhardtii*, pour trois essais indépendants avec une concentration totale en Mn de 50 nM, à pH 7. La droite de régression (ligne noire d'équation  $Y = 6,5 \cdot 10^{-2} \cdot X - 8,6 \cdot 10^{-2}$ ) a été calculée à partir de toutes les mesures. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). ..... 79



- Figure 4-7 : Cinétique d'adsorption du manganèse par *Chlamydomonas reinhardtii* pour une concentration totale en Mn de 50 nM, à pH 7 (n = 1). La ligne en pointillée représente le résultat d'une régression non linéaire des mesures. ....80
- Figure 4-8 : Adsorption du manganèse en fonction de la concentration de métal libre (après 45 min d'exposition), à pH 8 ( $\Delta$ ), pH 6,5 ( $\square$ ), pH 5 ( $\circ$ ), pour des algues acclimatées à pH 6,5 et exposées à pH 8 ( $\blacktriangle$ ) et pour des algues acclimatées à pH 8 et exposées à pH 6,5 ( $\blacksquare$ ). Les droites de régressions linéaires sont présentées à pH 8 (ligne pleine), pH 6,5 (ligne en tirets) et pH 5 (ligne en pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (voir la section 4.2 pour des explications sur le nombre d'essais). ....81
- Figure 4-9 : Adsorption du manganèse en fonction de la concentration de métal libre (après 45 min d'exposition), pour des algues acclimatées et exposées à pH 6,5 ( $\square$ ) et pour des algues acclimatées à pH 8 et exposées à pH 6,5 ( $\blacksquare$ ). Les régressions linéaires sont respectivement la ligne pleine et la ligne en tirets. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (voir la section 4.2 pour des explications sur le nombre d'essais). ....82
- Figure 4-10 : Adsorption du manganèse en fonction de la concentration de métal libre (après 45 min d'exposition), pour des algues acclimatées et exposées à pH 8 ( $\Delta$ ) et pour des algues acclimatées à pH 6,5 et exposées à pH 8 ( $\blacktriangle$ ). Les régressions linéaires sont respectivement la ligne pleine et la ligne en tirets. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (voir la section 4.2 pour des explications sur le nombre d'essais). ....82
- Figure 4-11a : Adsorption du cadmium en fonction de la concentration de métal libre, après 45 min d'exposition, pour des algues acclimatées et exposées à pH 6,5 ( $\square$ ) et pour des algues acclimatées à pH 5 et exposées à pH 6,5 ( $\blacksquare$ ). Les régressions linéaires sont respectivement la ligne pleine et la ligne en tirets. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole et que n = 3. ....84
- Figure 4-11b : Adsorption du cadmium en fonction de la concentration de métal libre, après 45 min d'exposition, pour des algues acclimatées et exposées à pH 5 ( $\circ$ ), pour des algues acclimatées à pH 6,5 et exposées à pH 5 ( $\bullet$ ). Les régressions linéaires sont respectivement la ligne pleine et la ligne en tirets. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole et que n = 3. ....84
- Figure 4-12 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre, à pH 8 ( $\Delta$ ), pH 6,5 ( $\square$ ), pH 5 ( $\circ$ ). Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 8 (Michaelis-Menten), pour pH 8 (ligne pleine), pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). ....86

- Figure 4-13 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre pour des algues issues d'une même et unique culture, à pH 8 ( $\Delta$ ), 6,5 ( $\square$ ), 5 ( $\circ$ ). Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 8 (Michaëlis-Menten), pour chaque pH : 8, **ligne pleine** ; 6,5, **tirets** ; et 5, **pointillés**. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). ..... 88
- Figure 4-14 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre à pH 6,5 ( $\square$ ) et pH 5 ( $\circ$ ). Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 8 (Michaëlis-Menten), pour pH 6,5 (**tirets**) et pH 5 (**pointillés**). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). ..... 90
- Figure 4-15 : Représentation en log 10 des flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre pour des cellules exposées à : (a) pH 8 ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ) ; (b) pH 6,5 ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). ..... 92
- Figure 4-16: Représentation en log 10 des flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre pour des cellules exposées à pH 5 mais ayant toujours été cultivées à pH 5 ( $\bullet$ ) et des cellules cultivées à pH 7 et transférées dans le milieu d'acclimatation à pH 5 seulement 5 jours avant l'expérience ( $\circ$ ). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). ..... 93
- Figure 4-17 : Représentation en log 10 des flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre pour des cellules exposées à : (a) pH 6,5 ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ) et (b) pH 5 ( $\bullet$ ,  $\circ$ ). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). ..... 94
- Figure 4-18: Représentation en log 10 des flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre pour des cellules exposées à pH 5 mais ayant toujours été cultivées à pH 5 ( $\bullet$ ) et des cellules cultivées à pH 7 et transférées dans le milieu d'acclimatation à pH 5 seulement 5 jours avant l'expérience ( $\circ$ ). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). ..... 95
- Figure 4-19 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre pour trois cultures indépendantes à pH 7 (tampon HEPES). Les équations des droites de régression linéaire sont données dans le tableau 4-9. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). ..... 96

- Figure 4-20 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre à pH 7 (tampon HEPES). Ce sont les mêmes mesures que celles de la figure 4-17 mais considérées comme un ensemble. La ligne pleine correspond à la droite de régression et les deux lignes en tirets à l'intervalle de confiance à 95 %. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). .....97
- Figure 4-21 : Prise en charge du manganèse par *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction de la concentration nominale de chrome (III), à pH 6,5. La régression linéaire (sur les données non transformées) est représentée par une ligne pointillée. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). .....98
- Figure 4-22 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre, à pH 6,5 avec (□) et sans tampon MES (■). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). .....99
- Figure 4-23 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre, à pH 5 avec (○) et sans tampon MES (●). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). .....99
- Figure 4-24 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration libre de calcium, à pH 8 (a) et leur représentation en échelle log 10 (b). [Mn<sup>2+</sup>] est fixe à 0,5 µM. Les flux prédits (ligne pleine) ont été calculés à l'aide de l'équation 25 (section 4.4.5). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). .....101
- Figure 4-25 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration libre de calcium, à pH 6,5 (a) et leur représentation en échelle log 10 (b). La concentration de cadmium est fixe à 1 µM. Les flux prédits (ligne en pointillés) ont été calculés à l'aide de l'équation 25 (section 4.4.5). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). .....102
- Figure 4-26 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre, à pH 8 (a), pH 6,5 (b), et pH 5 (c). Les différents symboles correspondent à des expériences différentes. Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 8 (Michaëlis-Menten), pour pH 8 (ligne pleine), pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). .....104
- Figure 4-27 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre, à pH 6,5 (a) et pH 5 (b). Les différents symboles correspondent à des expériences différentes. Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 8 (Michaëlis-Menten), pour pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). .....105

- Figure 4-28 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration libre de calcium, pour *C. reinhardtii* exposées à 0,5  $\mu\text{M}$  de  $[\text{Cd}^{2+}]$  à pH 7 et sa représentation en log 10 dans l'encadré (tirée de Kola et Wilkinson, 2005). ..... 110
- Figure 4-29 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre ( $[\text{Mn}^{2+}] < 1,25 \mu\text{M}$ ), à pH 8 ( $\Delta$ ), pH 6,5 ( $\square$ ), pH 5 ( $\circ$ ). Les droites sont des régressions linéaires pour pH 8 (ligne pleine), pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). ..... 113
- Figure 4-30 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre ( $[\text{Cd}^{2+}] < 5 \mu\text{M}$ ), à pH 6,5 ( $\square$ ) et à pH 5 ( $\circ$ ). Les droites sont des régressions linéaires pour pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). ..... 113
- Figure 4-31 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre, à pH 8 ( $\Delta$ ), pH 6,5 ( $\square$ ), pH 5 ( $\circ$ ). Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 26a et des  $J_{\text{int}}$  mesurés, pour pH 8 (ligne pleine), pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). ..... 115
- Figure 4-32 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre pour une même culture d'algues, à pH 8 ( $\Delta$ ), pH 6,5 ( $\square$ ), pH 5 ( $\circ$ ). Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 26a et des  $J_{\text{int}}$  mesurés, pour pH 8 (ligne pleine), pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). ..... 117
- Figure 4-33 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre, à pH 6,5 ( $\square$ ) et pH 5 ( $\circ$ ). Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 26b, et des  $J_{\text{int}}$  mesurés et des paramètres du tableau 4-12, pour pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). ..... 119
- Figure 4-34 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) pour des cellules exposées à pH 8 ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets), en vert pour de des simulations issues des mesures de prises en charge pour des algues acclimatées et exposées à pH 8 et en bleu à pH 6,5. .... 124

Figure 4-35 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) pour des cellules exposées à pH 6,5 (■, □). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets), en vert pour de des simulations issues des mesures de prises en charge pour des algues acclimatées et exposées à pH 8 et en bleu à pH 6,5. ....125

Figure 4-36 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) pour des cellules exposées à pH 6,5 (■, □). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets), en bleu pour de des simulations issues des mesures de prises en charge pour des algues acclimatées et exposées à pH 6,5 et en bordeaux à pH 5.....126

Figure 4-37 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) pour des cellules exposées à pH 5 (●, ○). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets), en bleu pour de des simulations issues des mesures de prises en charge pour des algues acclimatées et exposées à pH 6,5 et en bordeaux à pH 5.....127

Figure 4-38: Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) pour des cellules exposées à pH 5 mais ayant toujours été cultivées à pH 5 (●) et des cellules cultivées à pH 7 et transférées dans un milieu à pH 5 seulement 5 jours avant l'expérience (○). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets).....128

Figure 4-39: Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) pour des cellules exposées à pH 5 mais ayant toujours été cultivées à pH 5 (●) et des cellules cultivées à pH 7 et transférées dans un milieu à pH 5 seulement 5 jours avant l'expérience (○). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets).....129

Figure 4-40 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) à pH 6,5 avec (□) et sans tampon MES (■). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets)..... 131

Figure 4-41 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) à pH 5 avec (○) et sans tampon MES (●). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets)..... 132

Figure 4-42 : (a) Prise en charge du cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction du métal libre en solution pour pH 5 (○) et 6,5 (□) et leur modélisation (Éq. 26) : ligne en tirets à pH 6,5 et ligne en pointillés à pH 5 (nos résultats) ; (b) Représentation logarithmique des interceptes pour le graphe Cdint vs. temps en fonction de  $[Cd^{2+}]$ , sans (○) ou avec (●) de l'acide citrique, avec acide diglycolique (■) ou avec NTA(▲), pour *C. reinhardtii* à pH 7 ; la ligne en pointillée représente l'isotherme de Langmuir pour  $\log K_{ads} = 10^{6,2} \pm 0,1 M^{-1}$  et  $J_{max} = (3,2 \pm 0,1) \times 10^{-11} mol \cdot cm^{-2}$  (tirée de Kola et Wilkinson, 2005).  
..... 137

## GLOSSAIRE

BLM : *Biotic Ligand Model*. Modèle du Ligand Biotique.

CE<sub>50</sub> : Concentration d'une substance toxique provoquant une réponse à mi-chemin entre le témoin et l'effet maximal sur une population (ex. : nombre de cellules) après une période fixe d'incubation dans des conditions définies.

CI<sub>50</sub> : Concentration d'une substance toxique provoquant 50 % d'inhibition d'un processus biologique (ex. : la division cellulaire) après une période fixe d'incubation dans des conditions définies.

CEAEQ : Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec.

CPM : comptes par minute.

CR : constante de radioactivité.

DPM : désintégrations par minute.

DPS : désintégrations par seconde.

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique.

FIAM : *Free Ion Activity Model*. Modèle de l'ion libre.

FRAQUIL : milieu de culture censé représenter les eaux douces.

GEOCHEM : Logiciel de modélisation des équilibres chimiques.

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine-éthanesulfonique.

HSM : *High Salt Medium*. Milieu en haute teneur en sels.

$k_d$  : constantes de cinétique de dissociation du complexe de surface  $\equiv X-M$  ;  $k_d = 1/k_f$ .

$k_f$  : constantes de cinétique d'association du complexe de surface  $\equiv X-M$  ;  $k_f = 1/k_d$ .

$K_M$  : constante de formation du complexe de surface  $\equiv X-M$ .

$K_M^{MM}$ ,  $K_m$  : constante de demi-saturation de la modélisation Michaëlis-Menten.

$k_{int}$  : constante d'internalisation ou de transport du métal à travers la membrane biologique.

MES : acide 2-(N-morpholino)-éthanesulfonique.

MHSM : *Modified High Salt Medium*. Milieu en haute teneur en sels modifié.

MHSM-1 : *Modified High Salt Medium*, milieu de culture.

MHSM-R1 : *Modified High Salt Medium*, milieu de rinçage sans EDTA.

MHSM-R2 : *Modified High Salt Medium*, milieu de rinçage avec EDTA.

MHSM-E : *Modified High Salt Medium*, milieu d'exposition.

MINEQL : Logiciel de modélisation des équilibres chimiques.

$M^{z+}$  : ion métallique libre incluant sa sphère d'hydratation.

NTA : acide nitrilotriacétique.

NOEC : *No Observed Effect Concentration*. La plus haute concentration testée n'ayant pas d'effet significatif par rapport au témoin.

RI : rapport isotopique.

SAAM : *Synthetic Amino Acid Medium*. Milieu de culture synthétique contenant des acides aminés.

USEPA : *United States Environmental Protection Agency*. Agence environnementale des États-Unis.



## DÉFINITIONS

*Acclimatation* : Dans le cadre de cette étude, l'acclimatation des algues correspond à leur culture pendant cinq jours dans le milieu MHSM-C (voir section 2.1.2) ; ce milieu a une concentration en manganèse inférieure à celle du milieu de la culture mère (MHSM-1) et son pH varie selon les expériences.

*Biodisponibilité* : Fraction d'une substance disponible pour l'absorption par un organisme en considérant une voie spécifique d'exposition (définition issue du Winnipeg Ecotox Workshop organisé par G. R. B. Webster, University of Manitoba, Winnipeg, Canada, 16-19 juin 1996).

*Densité cellulaire* : Nombre de cellules algales par millilitre ( $\text{cellules}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

*Prise en charge* : Assimilation d'un métal impliquant un transport transmembranaire (Campbell et Couillard, 2004).

*Spéciation* : Distribution d'un élément parmi les espèces chimiques définies d'un système (Templeton et al., 2000).

*Inhibition compétitive* : La liaison de l'inhibiteur et du métal est mutuellement exclusive et si l'inhibiteur est lié au site de transport, le métal ne peut pas se lier (Segel, 1975).

*Inhibition simplement non compétitive* : L'inhibiteur n'empêche pas la liaison du métal au site de transport mais rend ce dernier inactif, c'est-à-dire incapable d'internaliser le métal (Segel, 1975).

*Inhibition partiellement non compétitive* : L'inhibiteur n'empêche ni la liaison ni l'internalisation du métal au site de transport mais modifie la cinétique de transport transmembranaire (Segel, 1975).

**MOTS CLÉS** – pH, Manganèse, Cadmium, Modèle du Ligand Biotique, Phytoplancton, Prise en charge, Adsorption, Inhibition compétitive, Inhibition partiellement non compétitive, Calcium.

# 1. INTRODUCTION

Depuis le début du siècle dernier, les métaux comptent parmi les contaminants d'intérêt environnemental. En effet, la possibilité que les métaux exercent des effets toxiques sur les organismes aquatiques devient préoccupante, leurs concentrations dans les eaux naturelles ayant augmenté principalement à cause de l'accroissement des rejets domestiques et industriels.

Certains organismes sont très sensibles à la présence de métaux dans l'eau. La figure 1-1 présente la distribution de la fréquence cumulative des valeurs de NOEC (la plus haute concentration testée n'ayant pas d'effet significatif par rapport au témoin) obtenues lors de tests de toxicité du cadmium chez divers organismes aquatiques (EU, 2003). On constate que plusieurs valeurs pour les producteurs primaires étudiés se retrouvent près du sommet de la courbe<sup>1</sup>. Toutefois, en négligeant les valeurs pour le macrophyte (cf. valeurs « c » dans la figure 1-1), la distribution des espèces phytoplanctoniques devient plus étalée sur cette courbe. Ceci suggère donc que les algues peuvent faire partie des organismes sensibles au cadmium dans le milieu, quoique certains invertébrés semblent encore plus sensibles.

Les algues unicellulaires, principales et premières productrices des écosystèmes aquatiques, ont souvent été utilisées pour évaluer l'impact potentiel de contaminants sur leur milieu car ce sont des organismes simples qui ont tendance à accumuler les métaux et ce à fortes concentrations. Mais il faut garder à l'esprit que certains métaux sont essentiels au développement des cellules ; ils participent, par exemple, à la stabilisation des structures cellulaires et ils sont impliqués dans les réactions d'oxydoréduction et l'activation d'enzymes (Rosakis et Köster, 2005).

---

<sup>1</sup> Notons que les données de NOEC de EU (2003) sont exprimées sur la base des concentrations de métal total dissous qui sont habituellement supérieures aux concentrations de métal libre en raison de la présence d'un ligand fort (EDTA, NTA ou citrate) dans les milieux de cultures d'algues afin de tamponner les concentrations disponibles en oligo-éléments. Or, on peut ajouter qu'un autre étudiant de notre laboratoire (Boily, 2004) a déterminé la toxicité du cadmium chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Dans ces travaux, le NOEC était de  $3,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ . Cette valeur se trouve environ au centre de la distribution (fig. 1-1) et est plus de deux fois inférieure à celle utilisée dans cette courbe pour *Chlamydomonas reinhardtii* ( $7,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

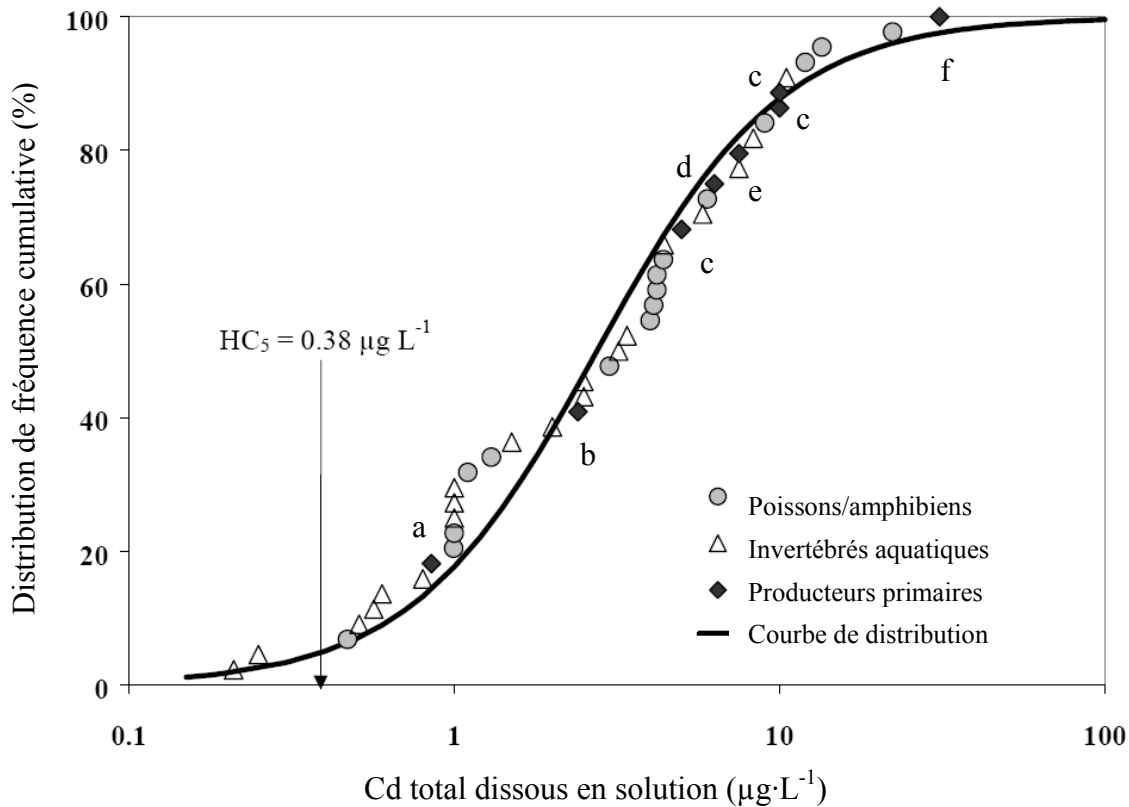


Figure 1-1 : Distribution de la fréquence cumulative des valeurs NOEC (la plus haute concentration testée n'ayant pas d'effet significatif par rapport au témoin) des tests de toxicité du Cd sur différentes espèces aquatiques. HC<sub>5</sub> est le cinquième percentile (n = 44) de cette distribution (se rapporter à [EU \(2003\)](#) pour les détails des calculs). Les producteurs primaires (NOEC ; µg·L<sup>-1</sup>) sont : a) *Asterionella formosa* (0,85) ; b) *Selenastrum capricornutum* (2,4) ; c) *Lemna paucicostata* (5 ; 10 ; 10) ; d) *Coelastrum proboscideum* (6,3) ; e) *Chlamydomonas reinhardtii* (7,5) ; f) *Scenedesmus quadricauda* (31) (adaptée de [EU, 2003](#)).

### 1.1. Spéciation du métal

Dans l'environnement, on retrouve les métaux sous de nombreuses formes chimiques différentes et la connaissance de l'effet de cette spéciation sur le transport membranaire des métaux à l'interface eau/organisme est primordiale.

L'analyse de la spéciation d'un métal consiste en la détermination analytique de l'identité et/ou des quantités d'une ou de plusieurs de ses espèces chimiques ([Templeton et al., 2000](#)). Pour les métaux traces, c'est généralement sous forme cationique plus ou

moins complexé par des ligands (organiques ou inorganiques) ou bien liés à la matière particulaire qu'on les retrouve en milieu aquatique (Buffle et al., 1997 ; Smith et al., 2002 ; Batley et al., 2004). Il faut noter que pour beaucoup de métaux biologiquement actifs comme le manganèse ou le fer, le cycle redox affecte également leur spéciation ; ceci du fait des grandes différences de réactivité et de propriétés chimiques qui existent entre les différents états redox d'un même métal (Sunda et Hunstman, 1998a).

Outre les ligands en solution et les particules minérales, les métaux en solution peuvent réagir avec les organismes aquatiques, à l'interface eau/membrane cellulaire, ce qui peut mener à leur prise en charge.

## 1.2. Prise en charge et membrane cellulaire

L'entrée d'un métal à l'intérieur d'une cellule est précédée de plusieurs étapes, qui sont généralement les suivantes<sup>2</sup> : le métal atteint la surface cellulaire par diffusion à travers la couche diffuse ; le métal se lie à un site de transport membranaire ; le métal est transporté à travers la membrane. Il peut alors se produire des effets (bénéfiques ou délétères) provoqués par la présence du métal dans la cellule. La figure 1-2 présente, de façon conceptuelle, les modèles de l'ion libre (Free-Ion Activity Model, FIAM ; Morel, 1983 ; Campbell, 1995) et du ligand biotique (Biotic Ligand Model, BLM ; Di Toro et al., 2001), qui seront présentés dans la section suivante, et qui décrivent les cinq étapes de la prise en charge d'un métal par un organisme aquatique.

---

<sup>2</sup> Il faut noter qu'un métal peut emprunter d'autres voies pour entrer dans la cellule : s'il forme des complexes lipophiles avec des ligands du milieu, il peut simplement diffuser à travers la membrane (Boullemant et al., 2004) ; s'il forme des complexes hydrophiles avec des ligands assimilables (généralement des métabolites de faible poids moléculaire) et entre « accidentellement » dans la cellule simplement en accompagnant le ligand (Errécalde et al., 1998 ; Fortin et Campbell, 2001 ; Campbell et Couillard, 2004).

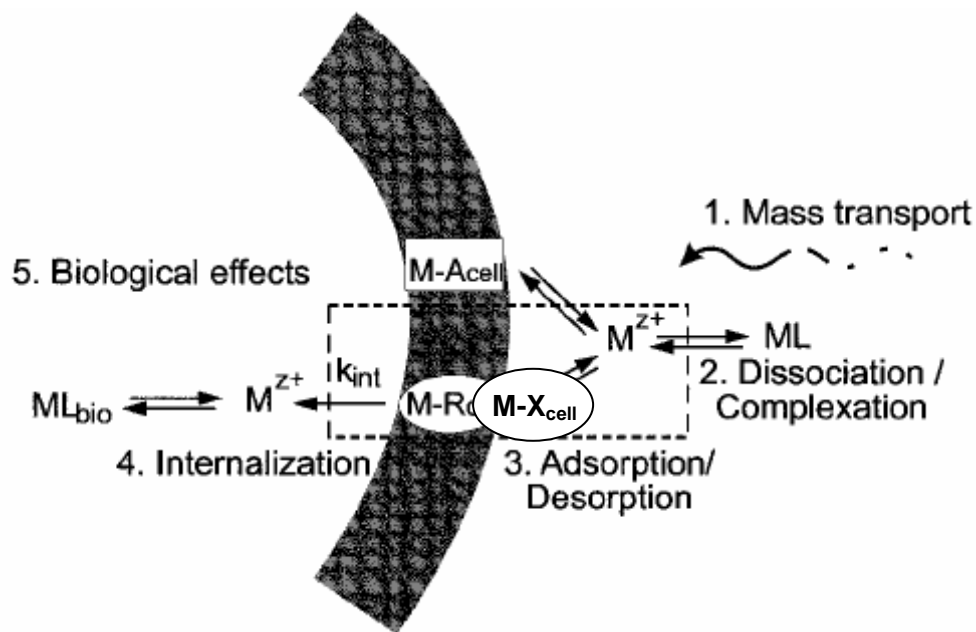


Figure 1-2 : Schéma conceptuel du modèle de l'ion libre (FIAM) et du ligand biotique (BLM). Il comprend (1) la diffusion du métal libre ( $M^{z+}$ ) et d'un complexe hydrophile ( $ML$ ) en solution ; (2) la dissociation / complexation avec un ligand en solution ; (3) l'adsorption spécifique ( $M-X_{cell}$ ) ou non spécifique ( $M-A_{cell}$ ) du métal à la surface de l'organisme ; (4) le transport du métal à l'intérieur de l'organisme, caractérisé par une constante d'internalisation ( $k_{int}$ ), et une réaction subséquente avec un ligand intracellulaire ( $ML_{bio}$ ) ; et (5) l'expression des effets biologiques. Le rectangle identifie les réactions prises en compte par le FIAM et le BLM (adaptée de [Hassler \*et al.\*, 2004a](#)).

Les particularités essentielles de la membrane plasmique, qui peuvent influencer sur la prise en charge des métaux, sont son caractère hydrophobe, la présence de protéines, pouvant traverser la bicouche lipidique, ainsi que des protéines de transport et des canaux ioniques qui facilitent le mouvement des ions à travers la membrane ([Simkiss et Taylor, 1995](#)). Ses nombreux groupements fonctionnels sont dominés par les groupements donateurs contenant de l'oxygène :  $-COH$ ,  $-COOH$ ,  $-P(O)(OH)_2$  ([Crist \*et al.\*, 1994](#) ; [Mehta \*et al.\*, 2002](#)). À pH neutre, ces groupements sont largement ionisés et peuvent lier les métaux. Ces sites de liaison peuvent être classés en deux catégories. Pour les sites physiologiquement inertes, la liaison du métal n'entraîne pas de perturbation du fonctionnement cellulaire, alors que pour les sites physiologiquement actifs, la liaison du métal perturbe le métabolisme cellulaire (par exemple : directement, en se liant à un site

correspondant à une enzyme, ou indirectement si le métal est transporté à travers la membrane par une voie qui ne lui était pas destinée). Le métal lié au transporteur « X-cellule » peut alors être transporté vers l'intérieur de la cellule, où il peut interagir avec une gamme de sites intracellulaires et provoquer des effets (Campbell *et al.*, 2002).

Ceci étant dit, l'interaction du métal avec les sites de transport membranaire reste complexe et influencée par de nombreux paramètres. Afin de mieux comprendre, et même de pouvoir prédire, comment les métaux interagissent avec les organismes aquatiques, des modèles ont été développés au fil du temps.

### 1.3. Modèle du Ligand Biotique

La biodisponibilité du métal pour une algue unicellulaire est généralement déterminée en se basant sur sa bioaccumulation et sur les effets du métal sur la croissance, la mobilité ou la photosynthèse. D'après la majorité des études sur la prise en charge des métaux en milieu aquatique, l'activité de l'ion libre reflète la réactivité chimique du métal. Cette réactivité détermine l'importance des réactions du métal avec les sites de complexation de la surface cellulaire (Campbell, 1995). Donc, la concentration de l'ion métallique libre,  $[M^{z+}(H_2O)_n]$  (déterminée expérimentalement ou calculée à partir de la concentration totale de métal dissous et en tenant compte de la concentration ainsi que de la nature des ligands en solution) est essentielle dans l'estimation de la réponse biologique d'un organisme.

Initialement, des expériences sur des algues marines ont menées à la formulation du FIAM (Morel, 1983 ; Campbell, 1995). Cependant, dans le milieu marin, les concentrations de calcium, magnésium et protons entre autres, sont plutôt constantes par rapport à celles retrouvées dans les eaux naturelles. Des expériences effectuées sur des organismes d'eau douce ont démontré qu'il fallait tenir compte non seulement de la concentration de l'ion métallique libre, mais également du pH et de la dureté de l'eau. Le BLM (Di Toro *et al.*, 2001), qui met l'accent sur le ligand biotique (site d'interaction spécifique menant à l'internalisation du métal) plutôt que sur l'espèce se liant à celui-ci, permet d'intégrer le pH et la dureté dans les prédictions de biodisponibilité.

Ces modèles ont pour but de prédire la biodisponibilité du métal en fonction de sa spéciation en solution et leur validité est basée sur de nombreuses prémisses (Campbell, 1995 ; van Leeuwen, 1999 ; Di Toro *et al.*, 2001 ; Campbell *et al.*, 2002) présentées ci-après.

1. La surface cellulaire est le site primaire pour l'interaction d'un métal  $M$  avec le ligand biotique d'un organisme vivant ( $\equiv X$  ; Fig. 1-3).

## Interactions métal-organisme

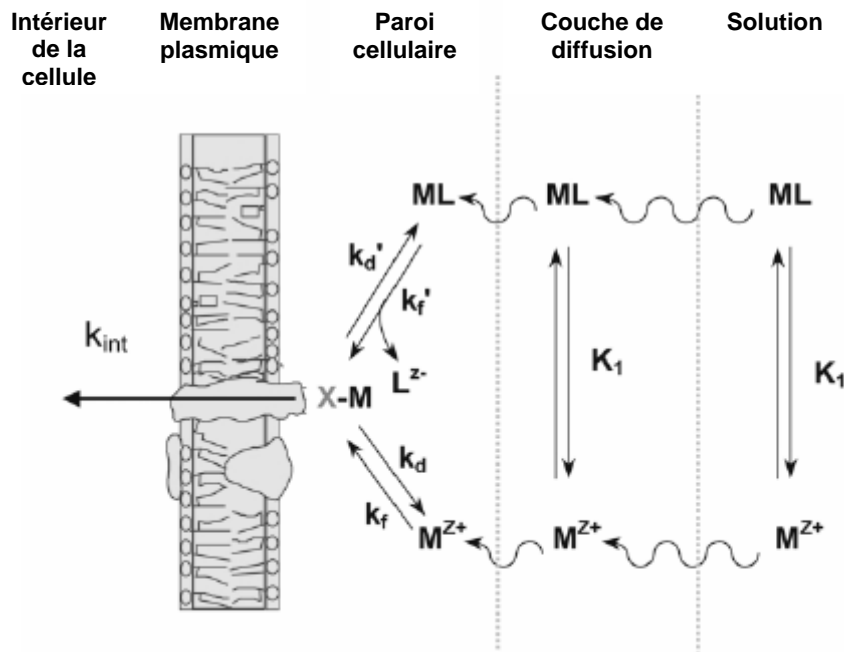


Figure 1-3 : Modèle conceptuel des interactions métal-ligand biotique.  $M^{Z+}$ , ion métallique libre ;  $ML$ , complexe métallique en solution ;  $K_1$ , constante d'équilibre de formation de  $ML$  ;  $M-X$ -membrane, complexe de surface avec le ligand biotique;  $k_f$ ,  $k_f'$ , constantes de formation du complexe de surface ;  $k_d$ ,  $k_d'$ , constantes de dissociation du complexe de surface ;  $k_{int}$ , constante d'internalisation ou de transport du métal à travers la membrane biologique. Les charges des complexes ne sont pas indiquées pour simplifier (adaptée de Campbell, 1995).



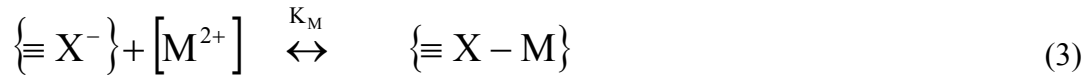
2. L'interaction du métal avec le ligand biotique peut être représentée par la formation d'un complexe de surface  $\{\equiv X-M\}$  (Fig. 1-3) et la réponse biologique est proportionnelle à la concentration du complexe de surface  $\{\equiv X-M\}$ .

Lorsque l'on considère simplement l'ion métallique libre hydraté, on peut écrire les réactions suivantes. Pour simplifier, les charges sur les complexes sont omises et les molécules d'eau de la sphère de coordination du métal ne sont pas indiquées. Les accolades correspondent à des concentrations de surface et les crochets à des concentrations en solution (nous présumerons également que la concentration est égale à l'activité ; c'est-à-dire à dilution infinie).



$$K_1 = \frac{[ML]}{[L] \cdot [M^{2+}]} \quad (2)$$

La réaction de l'ion libre avec le ligand biotique  $\{\equiv X^-\}$  est représentée par :



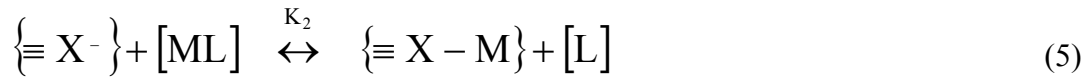
$$\{\equiv X-M\} = K_M \cdot [M^{2+}] \cdot \{\equiv X^-\} \quad (4)$$

où  $K_1$  et  $K_M$  sont des constantes d'équilibre et L un ligand en solution.

Notons que dans certains cas, cette prémisse n'est pas valide et donc les modèles ne sont pas applicables : lors de la formation de complexes lipophiles (Boullemant *et al.*, 2004) pouvant diffuser passivement à travers la membrane, ainsi que dans les cas de formation des complexes ternaires à la surface cellulaire avec le ligand biotique,  $\{\equiv X-M-L\}$ , entraînant une réponse biologique (Wilkinson *et al.*, 1990) ou de complexes ternaires  $\{\equiv Y-L-M\}$ , où  $\{\equiv Y\}$  est un site de transport anionique, qui permettent l'entrée du métal dans la cellule (Errécalde *et al.*, 1998 ; Fortin et Campbell, 2001).

3. Les variations de  $\{ \equiv X-M \}$  suivent celles de l'ion métallique libre  $[M^{+}]$  dans la gamme de concentrations d'intérêt environnemental, c'est-à-dire lorsque  $\{ \equiv X-M \} \ll \{ \equiv X \}$ , comme le souligne l'équation 4.

On peut ajouter qu'une mauvaise interprétation du FIAM, considérant à tort l'ion libre comme la seule espèce biodisponible ou toxique (voir les équations plus bas), a aboutit à une reformulation du modèle qui a été prise en compte dans le BLM. En effet, il faut préciser que l'étape 2 de la figure 1-2 (dissociation) n'est pas obligatoire ; la formation de  $\{ \equiv X-M \}$  ( $M-X_{\text{cell}}$  dans la figure 1-2) peut se produire par échange de ligands :



$$\{ \equiv X - M \} = K_2 \cdot \frac{\{ \equiv X^{-} \} \cdot [ML]}{[L]} \quad (6)$$

où  $K_2$  est une constante d'équilibre.

Si on combine les équations 2 et 6, on obtient :

$$\{ \equiv X - M \} = K_1 \cdot K_2 \cdot \{ \equiv X^{-} \} \cdot [M^{2+}] \quad (7)$$

Les équations 4 et 7 sont identiques car  $K_1 \cdot K_2 = K_M$  et montrent donc toutes deux une dépendance vis-à-vis de la concentration de l'ion libre. Ceci souligne qu'aucune espèce ne peut être considérée comme plus disponible qu'une autre (Campbell, 1995). Notons que lorsqu'il y a formation de complexes neutre lipophiles de type  $[ML_n^0]$  ou formation de complexes hydrophiles de type  $[ML^-]$  où  $L^-$  est un ligand assimilable (généralement un métabolite de faible poids moléculaire), la biodisponibilité du métal peut ne pas suivre la concentration de l'ion libre (Campbell et Couillard, 2004). En effet, les complexes neutres traverseraient directement la membrane biologique, ce qui expliquerait l'augmentation de la disponibilité du métal observée après complexation. Dans le cas des complexes hydrophiles, le transport « accidentel » du métal aurait lieu : le transporteur du ligand  $L^-$  serait peu sélectif et permettrait au métal d'entrer dans la cellule simplement en accompagnant le ligand (Campbell et Couillard, 2004).

Il faut souligner que cette troisième prémisses est seulement valide dans une gamme de concentrations d'intérêt environnemental. Lorsque les organismes sont soumis (en laboratoire ou lors de contamination aiguës) à des concentrations plus élevées, il peut y avoir saturation du système de transport. C'est pourquoi, notamment pour les algues unicellulaires, les flux d'internalisation  $J_{int}$  d'un métal bivalent ( $M^{2+}$ ) sont souvent modélisés par un processus de saturation typique Michaëlis-Menten (Éq. 8) :

$$J_{int} = \frac{J_M^{MM} \cdot [M^{2+}]}{K_M^{MM} + [M^{2+}]} \quad (8)$$

où  $J_M^{MM}$  est le flux maximal d'internalisation du métal et  $K_M^{MM}$  est la constante de demi-saturation (Fig. 1-4).

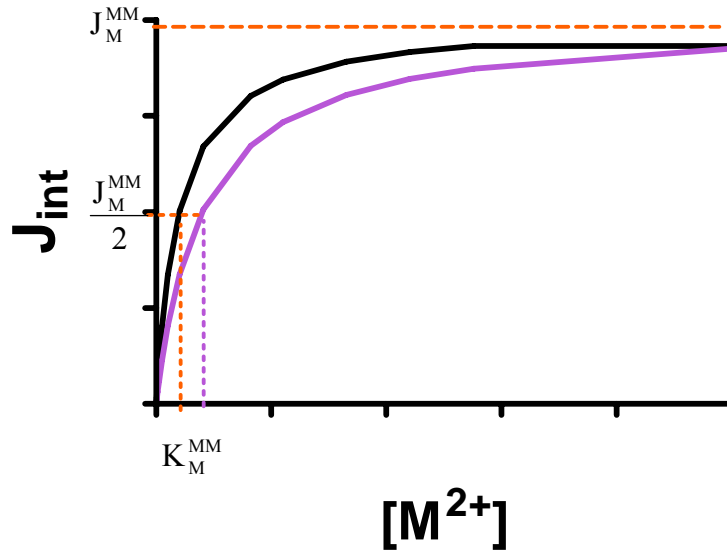


Figure 1-4 : Prise en charge de  $M^{2+}$  modélisée par un processus de saturation typique Michaëlis-Menten (Éq. 8), sans inhibiteur compétitif (ligne noire) et avec inhibiteur compétitif (ligne violette) dans le milieu.

Dans la gamme de concentrations métalliques environnementales, la prise en charge est à peu près linéaire, mais lorsque les concentrations augmentent, le système de transport arrive à saturation et on observe un plateau qui correspond au flux maximal d'internalisation  $J_M^{MM}$ . Ce paramètre permet de calculer la constante de demi-saturation

$K_M^{MM}$ , qui correspond à la concentration métallique induisant un flux de prise en charge égal à la moitié du flux maximal :  $J_{int} = 0.5 \cdot J_M^{MM}$ .

On peut constater que l'inhibition compétitive de la prise en charge du métal par un proton ou un cation, est mise en évidence par une augmentation de  $K_M^{MM}$  quand la concentration de l'inhibiteur augmente (*courbe violette* sur la figure 1-4) ; en effet, il faudra davantage de métal pour arriver à la demi-saturation du système de transport mais la capacité de ce dernier restant constante,  $J_M^{MM}$  n'est donc pas affecté (quand le métal est en excès, il occupe la totalité des sites de transport).

4. *D'autres cations peuvent entrer en compétition avec le métal  $M^{E+}$  dans la réaction de complexation de surface ( $H^+$  ;  $Ca^{2+}$  ;  $Mg^{2+}$  ; etc....).*

La quantité de métal liée au ligand biotique est déterminée d'une part par la complexation (présence de ligands) et d'autre part par la compétition pour le ligand biotique entre les différents cations et le métal en solution. L'impact de cette compétition sur l'équilibre chimique dépend de la concentration et de la force de liaison du métal et du compétiteur pour le ligand biotique (Fig. 1-5).

5. *La nature de la surface biologique ou de ses transporteurs ioniques reste inchangée pendant l'exposition au métal.*

Ceci implique que lors d'expositions chroniques à long terme, pendant lesquelles l'organisme peut s'adapter ou développer une tolérance, les modèles s'appliquent moins bien.

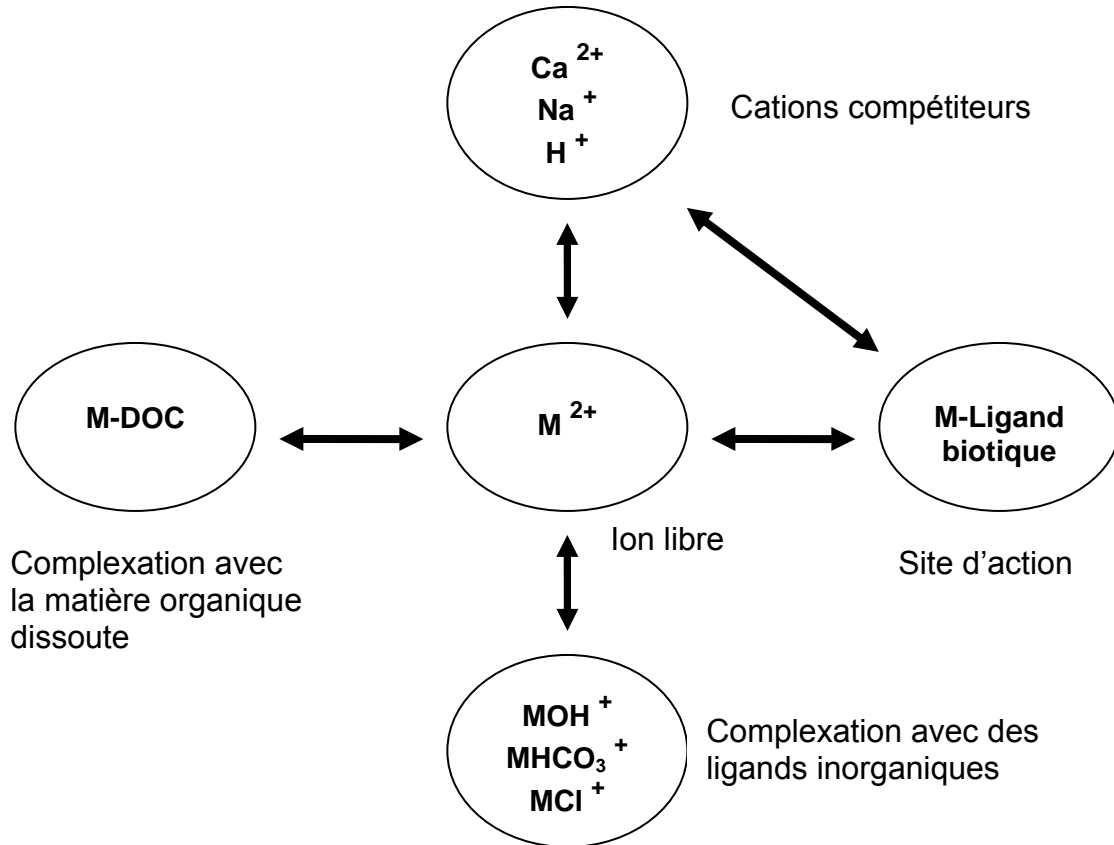


Figure 1-5 : Modèle schématique du BLM (adaptée de Di Toro et al., 2001).

6. *La réaction de complexation à la surface biologique se déroule rapidement (plus vite que la réponse biologique) et un pseudo-équilibre s'établit entre les espèces en solution et celles à la surface biologique ( $k_d \gg k_{int}$  ; Fig. 1-3).*

Notons que les modèles FIAM et BLM sont applicables lorsque le système est sous contrôle thermodynamique. Mais il arrive parfois que ce soit la cinétique qui contrôle le système. Hudson (1998) propose deux scénarios possibles pour les réactions de prise en charge des métaux (Fig. 1-6) :

- le premier (Fig. 1-6A), qui correspond au FIAM, est contrôlé par un équilibre thermodynamique : un pseudo-équilibre s'établit entre les espèces métalliques du milieu et le métal lié aux sites de transport ; les taux de formation et de dissociation du complexe de surface sont nettement supérieurs au taux d'internalisation du métal : ce taux d'internalisation dépend de la concentration de  $\{M-X\}$ , laquelle dépend de la

concentration externe d'ion métallique libre ; ce phénomène est attendu pour des métaux qui ont une cinétique rapide d'échange de ligands, comme le cadmium et le cuivre (Sunda et Huntsman, 1998a).

- le second (Fig. 1-6B) est sous contrôle cinétique et le taux d'internalisation du métal est nettement supérieur au taux de dissociation du complexe de surface,  $\{M-X\}$ . En principe cette situation s'appliquerait aux métaux dont les complexes se dissocient lentement (Sunda et Huntsman, 1998a).

Il faut préciser que le cas (A) est beaucoup plus fréquent que le cas (B). En effet, à notre connaissance, le cas (B) n'a été démontré que pour le fer et une diatomée marine (Hudson et Morel, 1993).

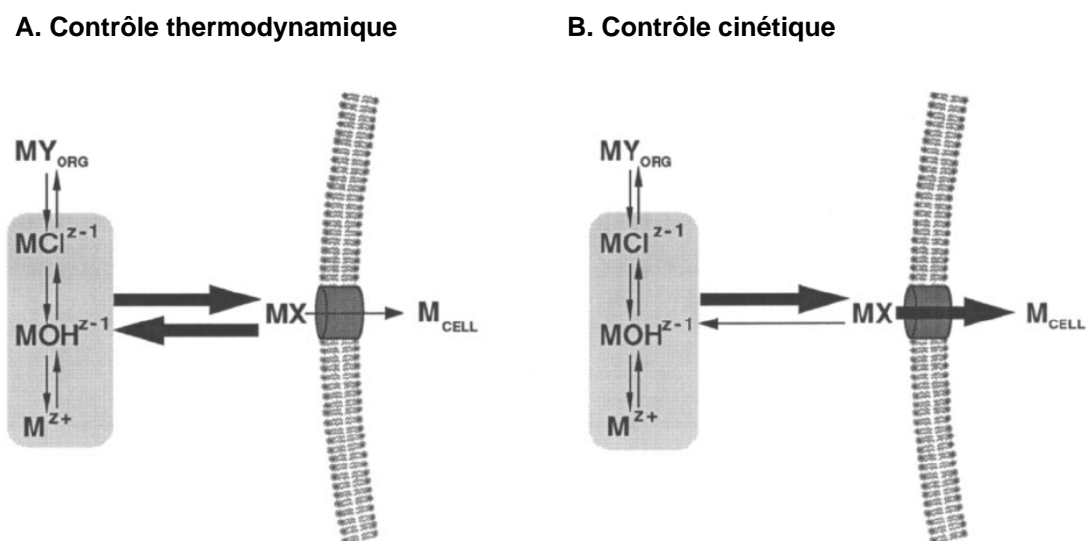


Figure 1-6 : Deux cas limites de contrôle de la liaison du métal aux transporteurs membranaires. (A) Contrôle thermodynamique (le pré-équilibre fixe la concentration de  $\{M-X\}$ ) comme supposé par les modèles de l'ion libre et du ligand biotique. (B) Contrôle cinétique (l'état stationnaire fixe la concentration de  $\{M-X\}$ ). L'épaisseur des flèches pour les réactions de formation et dissociation du complexe  $\{M-X\}$  et pour l'étape d'internalisation indiquent l'importance relative de ces taux. Les réactions entre les espèces en solution sont généralement très rapides comparées au transport (l'épaisseur des flèches n'est pas à l'échelle) (adaptée de Hudson, 1998).

Si l'on revient sur le fait que l'accumulation de métaux par les cellules algales dépend de nombreux facteurs, il a été clairement démontré que la physicochimie des eaux, et particulièrement le pH, affecte fortement la prise en charge métallique.

#### 1.4. Le pH

Le pH est un facteur environnemental qui a un impact majeur sur la géochimie des métaux traces (Nelson et Campbell, 1991) et qui par conséquent influence leur prise en charge par les organismes aquatiques (Campbell et Stokes, 1985). Cependant, les variations de pH ont aussi des conséquences directes sur les organismes aquatiques unicellulaires, entre autres sur : la biomasse et la composition de la communauté algale (Goldman et al., 1982a et 1982b) ; la photosynthèse ; la disponibilité du phosphore pour les algues ; la toxicité de l'ammoniaque pour les cellules (influence le rapport  $\text{NH}_3$  :  $\text{NH}_4^+$ ). Le pH gouverne aussi la disponibilité du carbone inorganique pour l'algue (influence la répartition  $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ ), ainsi que les taux métaboliques de certaines algues (Mayo, 1997). Le pH est donc un paramètre environnemental crucial pour le bien-être du biote aquatique.

Si l'on s'intéresse plus particulièrement à l'effet du pH sur la prise en charge des métaux traces, on peut souligner qu'il l'influence de différentes manières :

- Le pH peut influencer les concentrations dissoutes des métaux traces et la distribution de leurs espèces (dissoutes) dans les eaux douces (Nelson et Campbell, 1991). L'adsorption des métaux traces aux particules des sols et aux particules sédimentaires comme les oxyhydroxydes de fer et de manganèse (Tessier, 1992 ; Chuan et al., 1996) est très sensible aux variations de pH et une baisse de ce dernier entraîne une libération des métaux dans le milieu. Tessier (1992) a montré que les concentrations de métaux dans la colonne d'eau étaient liées à celles retrouvées dans les sédiments superficiels des lacs. En effet, pour des lacs de  $\text{pH} < 5$ , on retrouvait la majorité des métaux traces (Cd, Ni et Zn) dans la colonne d'eau ; pour les lacs de pH plus élevé ( $\text{pH} > 7$  pour Cd, Ni et Zn ;  $\text{pH} > 8$  pour Pb), les métaux étaient principalement associés aux oxyhydroxydes de fer. On peut ajouter que dans les sols acides (comme ceux des forêts en comparaison avec les sols agricoles), les métaux sont également plus mobilisés (et donc plus biodisponibles)

(Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Par conséquent, à l'échelle du bassin versant, cette mobilisation influencera également les concentrations métalliques dans le milieu aquatique du bassin (conséquence du lessivage).

- Le pH influence directement la spéciation des métaux traces en solution, qui elle, détermine leur biodisponibilité (Stumm et Morgan, 1996). En effet, certains cations métalliques ont tendance à former des hydroxo- et carbonato-complexes quand le pH augmente (le cuivre, le cadmium ou le plomb entre autres). Le pH peut aussi modifier la spéciation des ligands organiques (ex. : acides humiques et fulviques) en solution et donc influencer leur capacité à complexer les métaux en solution (Campbell *et al.*, 1997).
- Comme prédit par le FIAM et le BLM, les protons peuvent inhiber la prise en charge des métaux de manière compétitive. Lorsque le pH diminue, la concentration de protons augmente et une plus grande proportion des sites de prise en charge est occupée par ces derniers, ce qui entraîne une diminution de la liaison du métal et donc une baisse de sa prise en charge. Nombreuses sont les expériences ayant mis en évidence un tel phénomène (voir la section 1.4.1).

Il faut souligner que les deux effets peuvent se compenser : l'effet d'une augmentation de la concentration de métal biodisponible, qui devrait entraîner une augmentation de la prise en charge métallique, peut être atténué par la compétition par les protons qui contribuent à diminuer la prise en charge.

C'est pourquoi, quand le pH n'est pas constant, la simple connaissance de  $[M^{z+}]$  n'est pas suffisante pour prédire la réponse biologique due à l'exposition au métal (Campbell, 1995 ; Campbell *et al.*, 2002). Comme mentionné plus tôt, le BLM (Di Toro *et al.*, 2001), a été établi de manière à répondre à cette insuffisance. Il considère la compétition  $H^+/M^{z+}$ , introduisant, de façon explicite, les réactions des protons avec le ligand biotique. Les protons sont supposés entrer en compétition avec  $M^{z+}$  pour les sites de liaisons  $\{≡X^-\}$ , de telle sorte que lorsque  $[H^+]$  augmente, le nombre de sites  $\{≡X^-\}$  disponibles diminue, réduisant ainsi la prise en charge du métal et sa toxicité (Campbell et Stokes, 1985 ; Campbell *et al.*, 2002 ; Wilkinson et Buffle, 2004).



### 1.4.1. Exemples en accord avec le BLM

D'après le BLM, la réponse biologique varie en fonction du degré de saturation du ligand biotique et la relation entre  $\{\equiv X-M\}$  et  $[M^{z+}]$  suit une relation de saturation de type Michaelis-Menten. Comme mentionné plus haut, les ions  $H^+$  entrent en compétition avec les métaux pour les sites de transport à la surface de la cellule algale, et diminuent ainsi leur disponibilité.

Campbell et Stokes (1985) ont identifié deux types de comportement des métaux vis-à-vis de l'acidité (chez *Chlorella kessleri* et *Scenedesmus obliquus*). Pour les métaux avec un comportement de type I (cas du Cd et du Zn), l'effet principal de la baisse du pH sera l'atténuation de la toxicité du métal ; ceci est dû à une compétition entre le métal et les protons pour les sites de liaison et/ou de son effet sur le potentiel membranaire. Pour les métaux avec un comportement de type II (cas du Pb), la baisse de pH affecte fortement la spéciation du métal en solution et si le métal est fortement lié à la membrane (i.e., compétition de  $H^+$  sans effet), alors l'effet principal de l'acidification sera une augmentation de la disponibilité du métal. Campbell et Stokes (1985) soulignent que la compétition  $H^+$ /métal existe pour les sites de liaison à la surface des algues à des valeurs de pH d'intérêt environnemental.

De plus, Crist et al. (1981) ont montré que des protons sont déplacés par l'adsorption des cations métalliques. Un titrage réversible de l'acidité montre qu'il existe des protons labiles dont la perte n'aboutit pas à des changements structurels substantiels, soutenant la théorie d'une compétition directe entre les protons et l'ion métallique pour les sites de transport ( $\equiv X$ ).

On peut ajouter que, chez les algues, la tolérance à l'acidité est souvent accompagnée d'une tolérance aux concentrations élevées de métaux (Campbell et Stokes, 1985). Quand le pH diminue, pour certains métaux, la proportion d'ion libre augmente ; par exemple, pour le cuivre dans un milieu inorganique simple, lorsque le pH passe de 7 à 5, la proportion de  $Cu^{2+}$  libre passe de 37 à 99 %, ce qui devrait rendre le milieu plus toxique pour une concentration de cuivre total dissous donnée. Cependant, la baisse du pH entraîne une baisse de la toxicité chez les algues adaptées à un milieu acide (Twiss,

1990 ; Aguilera et Amils, 2005). Ici l'effet protecteur des ions  $H^+$  l'emporte sur l'effet de spéciation.

Les modèles FIAM et BLM ont été appliqués avec succès dans de nombreuses études (Campbell, 1995 ; Slaveykova et Wilkinson, 2005) dont voici quelques exemples.

D'après Doyle et al. (1980), l'adsorption de Mn sur la paroi cellulaire de *Bacillus subtilis* diminue avec le pH. Les auteurs proposent l'explication suivante (en accord avec le FIAM) à ce phénomène : quand la concentration de protons augmente, l'affinité de la membrane cellulaire pour les métaux diminue, alors que le nombre de sites de liaison reste constant ; ils concluent que les métaux et les protons sont en compétition pour les mêmes sites.

Selon Nalewajko et al. (1997), pour *Scenedesmus acutus* f. *alternans*, la baisse de pH entraîne une chute de la prise en charge de  $Cu^{2+}$ , mettant en évidence la compétition des protons pour les sites de prise en charge métalliques, comme suggéré par le BLM.

Mehta et al. (2000) ont observé une baisse du nickel intracellulaire chez *Chlorella vulgaris* lorsque le pH chutait de 6,5 à 3,5. Ils proposent également l'hypothèse de la compétition entre protons et cations pour les sites de transport. Notons qu'ils suggèrent également la dénaturation des molécules de transport par l'acidité pour expliquer ce phénomène (la section 1.4.2.3 expliquera cette théorie). Les auteurs ont aussi observé une baisse de prise en charge à des pH supérieurs à 7, qui s'expliquerait par la précipitation du Ni sous forme de  $Ni(OH)_2(s)$  (non biodisponible) en raison des fortes concentrations de Ni utilisées .

Dans une autre étude, Mehta et al. (2002), toujours pour *Chlorella vulgaris*, ont examiné la prise en charge du Cu à divers pH entre 3,5 et 7,5. Le maximum de prise en charge est obtenu pour un pH de 6,0 avec une constante de demi-saturation  $K_m$  indépendante du pH (aucune inhibition compétitive mise en évidence). Cependant, une baisse du pH entraîne une chute de la prise en charge de  $Cu^{2+}$ . De plus, il y a baisse de l'absorption à des pH basiques qui s'expliqueraient à nouveau par la précipitation du métal sous forme d'hydroxydes de cuivre non pris en charge. Toutefois, l'interprétation adéquate de ces résultats nécessite une excellente connaissance de la spéciation des métaux dans les milieux d'exposition, ce qui n'est pas le cas dans ces études (Mehta et

*al.*, 2000 et 2002) puisque les résultats sont présentés en fonction de la concentration totale nominale et la composition du milieu est inconnue.

Les variations de pH influencent donc grandement la prise en charge métallique et bien que le BLM considère la compétition proton-métal, ceci ne suffit pas toujours à expliquer les effets des variations du pH.

#### **1.4.2. Exceptions au BLM**

Jusqu'à présent, dans le développement du BLM, il est présumé, et ce de façon peu critique, que l'influence des protons est limitée à un mécanisme d'inhibition compétitive. Or, dans plusieurs cas, les modèles n'ont pas suffi à expliquer les résultats obtenus (Tableau 1-1).

## 1. Introduction

Tableau 1-1 : Récapitulatif des cas d'effets de pH intrigants.

<b>Auteurs</b>	<b>Métal</b>	<b>Espèces</b>	<b>Gamme de pH</b>	<b>Explications avancées</b>
<u>Slaveykova et Wilkinson (2003)</u>	Pb <sup>2+</sup>	<i>Chlorella kesslerii</i>	4,0-8,0	Des hydroxo- ou carbonato-complexes se lieraient aux sites de transport et seraient pris en charge entre pH 7 et 8
<u>Sary et al. (1983)</u>	Mn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	<i>Chlorella kessleri</i> et <i>Scenedesmus obliquus</i>	4,0-9,0	À pH élevé, prise en charge d'hydroxo-complexes MnOH <sup>+</sup> mais pas Mn(OH) <sub>2</sub>
<u>Heijerick et al. (2002)</u>	Zn <sup>2+</sup>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	5,5-8,0	Physiologie du ligand biotique affecté par l'augmentation de pH
<u>Wilde et al. (2006)</u>	Zn <sup>2+</sup>	<i>Chlorella</i> sp.	5,5-8,0	Création de nouveaux sites de prise en charge
<u>Parent et Campbell (1994)</u>	Al <sup>3+</sup>	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	4,3-6,0	Compétition Al <sup>3+</sup> /H <sup>+</sup> mais dépendance résiduelle au pH non expliquée
<u>Parent et al. (1987)</u>	Mn <sup>2+</sup>	<i>Mougeotia</i> sp.	5,5-7,0	La liaison des protons entraîne des changements de conformation des sites de transport et diminution du potentiel transmembranaire

#### 1.4.2.1. Assimilation des hydroxo- ou carbonato-complexes

Si on revient sur l'influence du pH sur la spéciation, il a été mentionné que lorsque le pH augmente, il peut y avoir formation d'hydroxo- et/ou carbonato-complexes pour certains métaux en solution.

- Slaveykova et Wilkinson (2003) ont étudié l'effet du pH sur la bioaccumulation du plomb par *Chlorella kesslerii*. Selon cette étude, les taux de prise en charge de Pb et les liaisons de Pb aux sites de transport membranaire augmentent avec le pH de 4,0 à 5,0 puis sont relativement stables dans l'intervalle de pH 5,0-6,5 et augmentent à nouveau entre pH 7,0 et 8,0 (Fig. 1-7). Selon les auteurs, les protons affectent la prise en charge du Pb en modifiant sa spéciation chimique en solution, en entrant en compétition directe pour les sites de complexation de surface, et en modifiant la charge globale de surface de l'algue. Mais une augmentation inexplicée de la prise en charge de Pb est observée au dessus de pH 6,5. Cette augmentation a mené les auteurs à suggérer que des complexes de Pb, hydroxo- ou carbonato-complexes, pourraient aussi se lier à des sites de transport membranaire et être transportés vers l'intérieur de l'algue de façon similaire à l'ion libre. Les auteurs suggèrent que ces complexes soient pris en compte par les modèles (BLM ou FIAM).
- Stary et al. (1983) ont aussi évoqué la prise en charge d'hydroxo-complexes (en plus de l'ion libre) chez les algues *Chlorella kesslerii* et *Scenedesmus obliquus*, en présence de  $Mn^{2+}$  et de  $Cd^{2+}$  entre autres. Notons qu'ici les chercheurs n'ont pas distingué le métal adsorbé du métal absorbé ; ils ont mesuré le métal total (adsorbé + absorbé).

Soulignons que les expériences qui tentent de distinguer l'effet du proton (complexation de surface par le ligand biotique) de l'effet de l'ion hydroxyde (complexation du métal) sont rares (Brown et Markich, 2000) pour les cations formant des hydroxo-complexes à des pH pertinents du point de vue environnemental (Wilkinson et Buffle, 2004). Nous proposons d'ailleurs une modélisation qui tienne compte de la prise en charge de ces complexes dans le Chapitre 3.

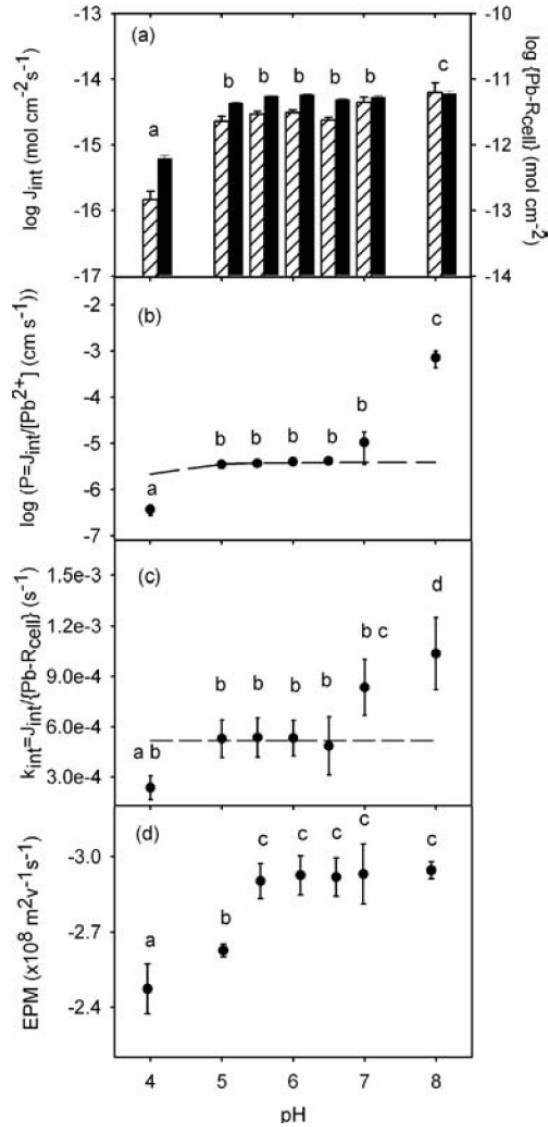


Figure 1-7 : Effet du pH sur : (a) les flux de prise en charge  $J_{int}$  et le Pb lié aux sites de transport  $\{Pb-R_{cell}\}$  ; (b) la perméabilité membranaire,  $P = J_{int}/[Pb^{2+}]$  ; (c) la constante d'internalisation  $k_{int} = J_{int}/\{Pb-R_{cell}\}$  ; (d) la mobilité électrophorétique (EPM) de *C. kesslerii*. Les ajustements de  $P$  et  $k_{int}$  (lignes en tirets dans b et c) sont calculés avec  $\log (KH-R_{cell}) = 3,9$ ,  $\log (KPb-R_{cell}) = 5,54$ ,  $J_{max} = 1.10^{-14} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  et  $\{R_{cell,tot}\} = 1,5.10^{-11} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Dans (d), l'EPM est mesurée pour un temps de contact de 35 min. Différentes lettres indiquent des différences statistiques significatives entre les moyennes ( $p < 0,05$ , test Student-Neuman-Keuls),  $n = 3$  pour (a), (b) et (c) et  $n = 6$  pour (d) (tirée de Slaveykova et Wilkinson, 2003).

### 1.4.2.2. Modèles alternatifs au BLM

Comme mentionné précédemment, dans les études où le pH varie, la simple connaissance de  $[M^{z+}]$  n'est pas suffisante pour prédire la réponse biologique (Campbell, 1995 ; Di Toro *et al.*, 2001) ou pour expliquer les observations du point de vue déterministe (Chowdury et Blust, 2001 ; Slaveykova et Wilkinson, 2003). Comme le BLM ne permet pas de tenir compte des effets directs du pH autres que ceux liés à la simple compétition  $H^+/M^{z+}$  (section 1.3), des modèles empiriques (basés sur des régressions appliquées aux résultats) ont souvent été utilisés pour ajuster le BLM sur une gamme de pH (Heijerick *et al.*, 2003). Par exemple, De Schamphelaere *et al.* (2003) ont modélisé la toxicité du cuivre chez l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* (Fig. 1-8).

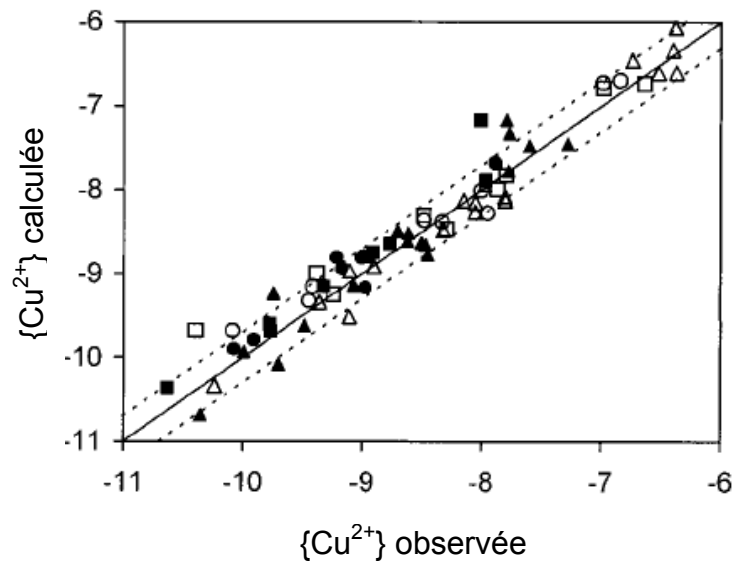


Figure 1-8 : Activité de  $Cu^{2+}$ ,  $\log \{Cu^{2+}\}$ , observée versus calculée pour des concentrations correspondant à (CE)50  $Cu^{2+}$  (symboles vides) et (CE)10  $Cu^{2+}$  (symboles pleins). «  $Cu^{2+}$  observée » fait référence aux valeurs de (CE)50  $Cu^{2+}$  et (CE)10  $Cu^{2+}$  (concentrations de métal entraînant respectivement, après 72 h d'exposition, une inhibition de la croissance de 50 et de 10 %) exprimées en fonction de l'activité de l'ion libre et calculées pour chaque milieu-test en se basant sur l'inhibition de la croissance à chaque  $\{Cu^{2+}\}$  mesurée. «  $Cu^{2+}$  calculée » fait référence aux  $\{Cu^{2+}\}$  calculées à l'aide du programme Biotic Ligand Model Version a008 (se référer à De Schamphelaere *et al.*, 2003) et en utilisant la composition chimique des milieux d'exposition. La ligne pleine correspond à la droite de régression linéaire des données et les lignes en pointillés à son intervalle de confiance à 95 % (adaptée de De Schamphelaere *et al.*, 2003).

Les équations du modèle sont celles obtenues par régression non linéaire des données :  $\log(\text{CE}_{50 \text{ Cu}^{2+}}) = 1,43 \cdot \text{pH} + 2,05$  ( $r^2 = 0,95$ ) et  $\log(\text{CE}_{10 \text{ Cu}^{2+}}) = 1,14 \cdot \text{pH} - 0,81$  ( $r^2 = 0,91$ ), où  $(\text{CE})_{50 \text{ Cu}^{2+}}$  et  $(\text{CE})_{10 \text{ Cu}^{2+}}$  sont les concentrations de  $\text{Cu}^{2+}$  libre entraînant respectivement, après 72 h d'exposition, une inhibition de la croissance de 50 et de 10 %.

Heijerick et al. (2002) ainsi que Wilde et al. (2006) ont observé que la toxicité du zinc ( $\text{CE}_{50 \text{ Zn}^{2+}}$ , concentration de  $\text{Zn}^{2+}$  libre entraînant une baisse de 50 % de la croissance algale) n'augmentait pas de façon linéaire avec  $[\text{H}^+]$  pour les algues vertes *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlorella* sp. Une augmentation rapide de la toxicité a été remarquée à  $\text{pH} > 6$ , augmentation qu'une simple compétition protonique ne pourrait expliquer. En revanche, comme on pouvait s'y attendre, la modélisation empirique s'appliquait bien aux résultats obtenus dans les deux études. Les auteurs ont proposé différentes explications, dont l'altération de la physiologie (variation des constantes d'équilibre des réactions de surface) du ligand biotique (Heijerick et al., 2002) ou la création de nouveaux sites de prise en charge (Wilde et al., 2006). Ces possibilités seront traitées dans la prochaine section.

### **1.4.2.3. Autres types d'inhibitions (différentes de simplement compétitive)**

Les variations de pH influençant les surfaces biologiques de différentes manières ; les effets physiologiques des variations de pH sur la membrane cellulaire ont été ignorés jusqu'à récemment dans les études de prises en charge des métaux par les organismes aquatiques. Or, il est possible que les protons ne soient pas uniquement des inhibiteurs compétitifs des métaux pour les sites de transports mais également des inhibiteurs partiellement compétitif, simplement ou partiellement non compétitifs. En effet, les variations de pH pourraient entraîner des changements des caractéristiques fonctionnelles des sites de transport, par exemple en modifiant directement la conformations de la protéine ou en modifiant son environnement et ainsi que leur capacité à transporter les métaux (Harrison et al., 1986 ; Schenck et al., 1988). Boullement et al., 2004 ont constaté que la perméabilité membranaire de l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*

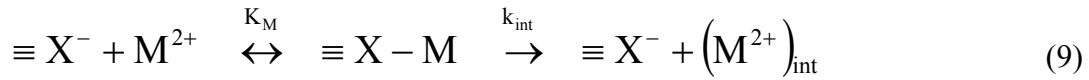


diminuait avec le pH, suggérant que la structure de la membrane où se trouvent les protéines de transport, était affectée.

Si l'on s'intéresse maintenant à la modélisation proprement dite de la prise en charge, rappelons que pour une algue unicellulaire, les flux d'internalisation  $J_{\text{int}}$  d'un métal bivalent ( $M^{2+}$ ) peuvent être modélisés par un processus de saturation Michaëlis-Menten (Éq. 8) lorsque les courbes d'accumulation métallique suivent l'isotherme de Langmuir. Cependant, dans sa forme simple, l'équation de Michaëlis-Menten n'intègre pas les réactions de compétition ; donc quand le pH varie, une modélisation Michaëlis-Menten à chacun des pH peut donner une idée (aspect qualitatif) des courbes d'accumulation en présence d'inhibiteur mais le calcul des paramètres de prise en charge (aspect quantitatif) restera approximatif.

#### 1.4.2.3.1. Composante compétitive de la modélisation

Si l'on considère les interactions du métal avec les sites de transport du point de vue de l'équilibre thermodynamique, la réaction de l'ion libre métallique divalent,  $M^{2+}$ , avec le ligand biotique,  $\{ \equiv X^- \}$ , peut être représentée comme suit :



$$\{ \equiv X - M \} = K_M \cdot [M^{2+}] \cdot \{ \equiv X^- \} \quad (10)$$

$$J_{\text{int}} = k_{\text{int}} \cdot K_M \cdot [M^{2+}] \cdot \{ \equiv X^- \} \quad (11)$$

où  $J_{\text{int}}$  est le taux d'internalisation du métal,  $K_M$  est la constante d'équilibre pour la réaction du métal  $M$  avec le ligand biotique  $\{ \equiv X^- \}$ ,  $k_{\text{int}}$  est la constante de cinétique d'internalisation du métal et  $(M^{2+})_{\text{int}}$  représente le métal intracellulaire (Éq. 9).

Si l'on considère à présent toutes les réactions de surfaces possibles, un site de transport peut lier un proton  $H^+$  (Éq. 12), un autre cation  $C^{n+}$  (Éq. 13), ou le métal libre  $M^{2+}$  (Éq. 14) :



La concentration totale de sites est donnée par l'équation de conservation de masse suivante :

$$\{\equiv X\}_T = \{\equiv X^-\} + \{\equiv X - H\} + \{\equiv X - C\} + \{\equiv X - M\} \quad (15)$$

Afin d'exprimer cette concentration en fonction de la concentration de sites libres, il faut combiner les équations 12 à 15 :

$$\{\equiv X\}_T = \{\equiv X^-\} \cdot \left( 1 + K_H \cdot [H^+] + K_C \cdot [C^{n+}] + K_M \cdot [M^{2+}] \right) \quad (16)$$

La combinaison des équations 11 et 16 donne l'équation finale :

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}} \cdot K_M \cdot [M^{2+}]}{\left( 1 + K_H \cdot [H^+] + K_C \cdot [C^{n+}] + K_M \cdot [M^{2+}] \right)} \quad (17)$$

où  $J_{\text{max}} = k_{\text{int}} \cdot \{\equiv X\}_T$ .

Contrairement à l'équation 8, l'équation 17 représente un modèle de prise en charge de type BLM qui tient compte de la compétition potentielle des protons et d'un autre cation. Donc dans le cas d'une inhibition compétitive de la part des protons, selon l'équation 17, quand le pH diminue,  $[H^+]$  et le produit  $K_H \cdot [H^+]$  augmentent. Tous les

autres paramètres étant constants, ceci entraîne une diminution de  $J_{\text{int}}$ . On peut noter que si le milieu ne contient pas d'inhibiteur, l'équation 17 se simplifie au dénominateur et devient l'équation 8 de Michaëlis-Menten.

#### 1.4.2.3.2. Composante tenant compte de la modification de la physiologie du ligand biotique

Les protons pourraient aussi inhiber la prise en charge métallique de façon différente, en influençant soit la constante d'affinité du métal,  $K_M$  (cas 1), soit le flux maximal d'internalisation,  $J_{\text{max}}$  (cas 2).

- Cas 1 : un accroissement de pH causant une augmentation de l'affinité du ligand biotique pour le métal ( $K_M$ ) se manifestera par une pente plus raide de  $J_{\text{int}}$  en fonction de  $[M^{2+}]$  qui atteindra cependant la même limite maximale  $J_{\text{max}}$  (Fig. 1-9) (**inhibition partiellement compétitive**).

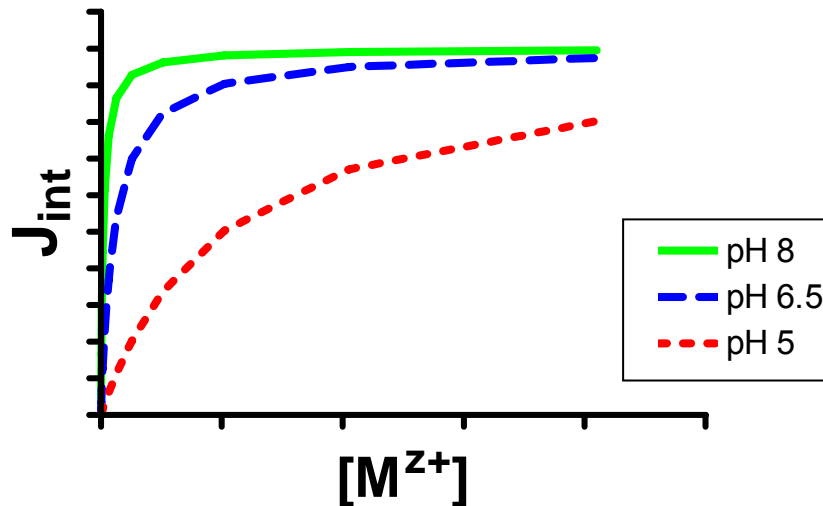


Figure 1-9 : Prise en charge modélisée de  $M^{2+}$  avec inhibition compétitive des protons ( $K_H \cdot [H^+]$  augmente lorsque le pH diminue ; Éq. 17 ; les trois courbes tendent vers le même plateau  $J_{\text{max}}$  mais l'affinité apparente du ligand biotique pour le métal diminue).

- Cas 2 : un accroissement  $J_{\max}$  (Fig. 1-10) avec le pH pourrait s'expliquer par :
  - d'une part par un accroissement de  $k_{\text{int}}$  ; des changements des caractéristiques fonctionnelles des protéines de transport du métal entraînent une augmentation du taux d'internalisation intrinsèque du métal. Typiquement observée pour un inhibiteur **partiellement non compétitive**, ce type d'effet a été évoqué par Chowdury et Blust (2001), Heijerick *et al.* (2002), Kola et Wilkinson (2005), Wilde *et al.* (2006) et Fortin *et al.* (2007).
  - d'autre part, cette augmentation de  $J_{\max}$  avec le pH (Fig. 1-10) pourrait s'expliquer par une augmentation de  $\{\equiv X\}_T$  (changement du nombre de sites pouvant internaliser le métal) ; on parlera plus spécifiquement dans ce cas-ci d'inhibition **simplement non compétitive**.

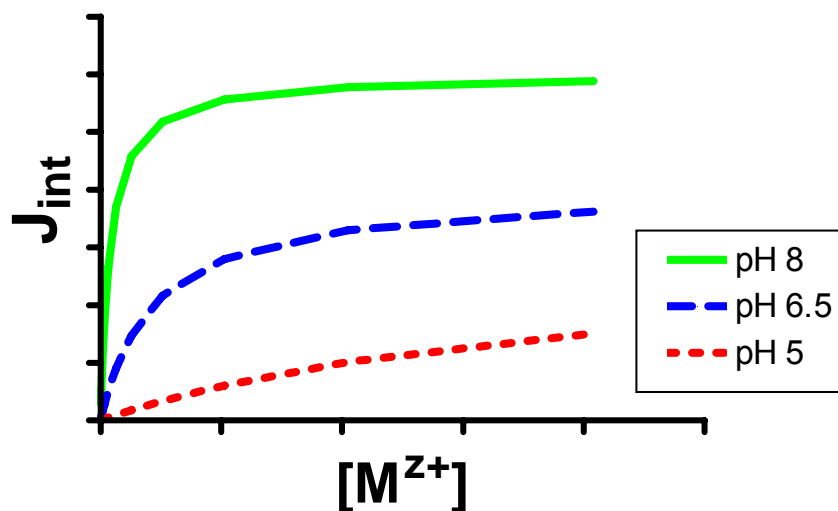


Figure 1-10 : Prise en charge modélisée de  $M^{2+}$  avec inhibition (partiellement) non compétitive des protons (les trois courbes tendent vers des plateaux différents ;  $J_{\max}$  varie).

### 1.4.2.3.3. Exemples déviant des prédictions du BLM

Voici les exemples relevés dans la littérature où les observations diffèrent des prédictions du BLM et pour lesquelles l'inhibition non compétitive simple ou partielle de la part des protons est, ou pourrait être, avancée (Tableau 1-1).

- Comme mentionné plus tôt, Mehta et al. (2000 et 2002) ont observé respectivement une baisse du nickel et du cuivre intracellulaire chez *Chlorella vulgaris* lorsque le pH chutait de 6,5 à 3,5. Ils proposent l'hypothèse de la compétition entre protons et cations pour les sites de transport puisque les constantes de demi-saturation,  $K_m$ , varient avec le pH, mais ils suggèrent aussi la dénaturation des molécules de transport par l'acidité pour expliquer ce phénomène d'effet irréversible du pH, car les flux de prise en charge  $J_{max}$  changent aussi avec le pH. Dans de tels cas, l'inhibition persisterait si les algues étaient de nouveau exposées au pH initial. Nous étudierons un tel cas de figure plus loin (Chapitre 4).
- Selon Parent et Campbell (1994), comme le prédit le FIAM, sur la gamme de pH 4,3-6,0, la biodisponibilité de l'aluminium varie en fonction de la concentration de l'ion libre  $[Al^{3+}]$  chez *Chlorella pyrenoidosa*. De plus, à une concentration  $[Al^{3+}]$  fixe, la prise en charge et la toxicité d'Al augmentent avec le pH. Les auteurs ont cependant constaté une faille dans le modèle : malgré la prise en compte de la compétition  $Al^{3+}/H^+$ , l'inhibition de la croissance montrait une dépendance résiduelle au pH non expliquée (augmentation de la protection des protons vis-à-vis du métal quand le pH diminue). Une inhibition de type non compétitive pourrait expliquer ce phénomène.
- Selon Parent et al. (1987), la prise en charge du manganèse (exposition à  $1,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pendant 4 h, après une croissance à pH 6) à pH 5,5 par l'algue *Mougeotia* sp., est légèrement inférieure à celle à pH 7. Ceci est probablement dû à un flux de métal, vers l'intérieur de la cellule, plus faible à bas pH. Pour expliquer que le flux de manganèse diminue avec le pH, les auteurs proposent plusieurs explications, la compétition directe des protons mais aussi le fait que la liaison de protons puisse entraîner des changements de conformation des sites et que le potentiel transmembranaire diminue.

- De plus, Kola et Wilkinson (2005) (Fig. 1-11) ont constaté qu'une baisse de pH de 7,0 à 5,2 entraîne une baisse importante du flux d'internalisation ( $J_{int}$ ) du cadmium chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Puisque la spéciation du métal ne change pas sur cette gamme de pH, les auteurs ont pensé que cette diminution était due à la compétition directe des protons pour les sites de transport membranaire ( $H^+ + \equiv X^- \leftrightarrow \equiv X-H$ ). Cependant le FIAM et le BLM prédisaient mal la prise en charge. Par contre, en tenant compte de la réaction d'un second proton ( $2H^+ + \equiv X^- \leftrightarrow \equiv X-H_2$ ), le modèle expliquait les résultats (Fig. 1-11).

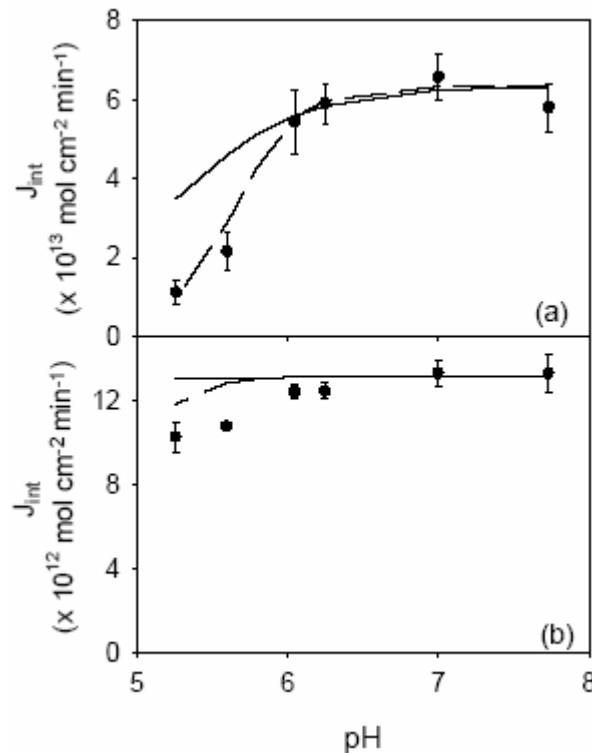


Figure 1-11 : Représentation logarithmique des flux d'internalisation de Cd en fonction du pH pour *C. reinhardtii* à de basses (a:  $5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ) et haute (b:  $7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) concentrations de cadmium. Les prédictions de  $J_{int}$  sont basées sur le modèle compétitif du BLM et avec une valeur de  $K(H-R_{cell}) = 10^{5.2} \text{ M}^{-1}$  (ligne pleine). Les prédictions de  $J_{int}$  sont aussi faites en tenant compte de la réaction d'un second proton et avec une constante de stabilité de  $K(H_2-R_{cell}) = 10^{11.3} \text{ M}^{-1}$  (ligne en tirets) (tirée de Kola et Wilkinson, 2005).

Les auteurs proposent que des changements allostériques des protéines de transport entraînent des variations de la constante de liaison apparente (Fig. 1-11). Il faut ajouter que d'après les données, concernant la liaison des protons au site de prise en charge, on aurait un  $pK_{a1} = 5,2$  et un  $pK_{a2} = 6,1$  ; or il est peu probable que le second proton possède une affinité plus élevée que le premier. En effet, en général lors des réactions de protonation, le  $pK_a$  diminue lorsque le nombre de protons liés augmente (nous reviendrons sur ces explications dans la discussion du chapitre 4). Une modélisation tenant compte de l'effet des protons sur la nature des transporteurs, comme le modèle d'inhibition (partiellement) non compétitive proposé précédemment, serait peut-être plus adéquate pour expliquer les résultats.

- Chowdury et Blust (2001) se sont intéressés à la nature des liaisons de la surface branchiale avec le strontium et les protons, en faisant varier le pH entre 5,0 et 8,5 dans leur étude de la prise en charge du  $^{85}\text{Sr}$  par la carpe commune. L'analyse des données (Fig. 1-12) met en évidence le fait que l'ion  $\text{H}^+$  inhibe la prise en charge de  $\text{Sr}^{2+}$  en changeant  $J_{\text{Sr}}^{\text{MM}}$  (flux maximal de prise en charge de  $\text{Sr}^{2+}$  en  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), mais pas  $K_{\text{Sr}}^{\text{MM}}$  (constante de demi-saturation en  $\mu\text{M}$ ). Pour décrire l'effet de l'ion  $\text{H}^+$ , un modèle d'inhibition partiellement non compétitive de type Michaëlis-Menten a été proposé et les données obtenues pour le  $\text{Sr}^{2+}$  s'ajustaient à ce dernier. Ce modèle implique que l'ion  $\text{H}^+$  interagisse avec la surface dans une région différente de celle des sites de liaison du métal (donc la liaison de  $\text{Sr}^{2+}$  n'est pas directement perturbée), mais le transport du métal diminue car l'ion  $\text{H}^+$  provoque des changements dans les caractéristiques fonctionnelles du transporteur.

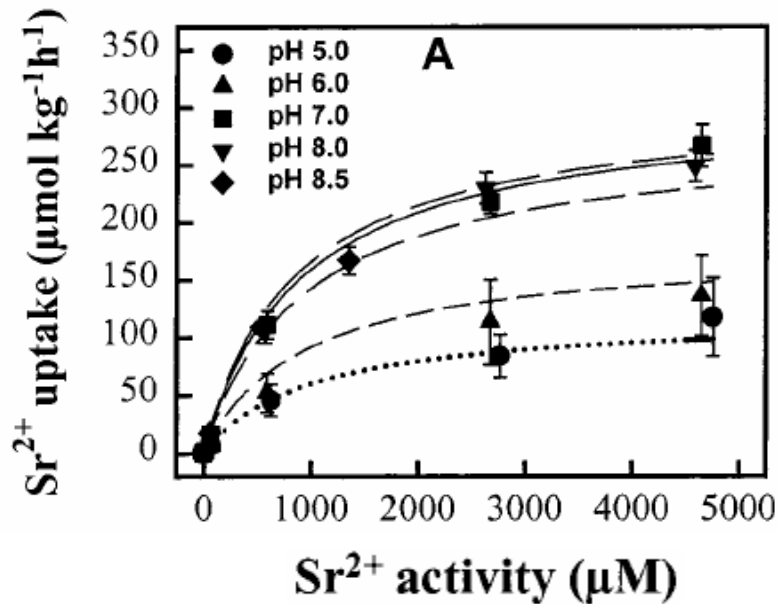


Figure 1-12 : Effets de l'activité de Sr<sup>2+</sup> sur la cinétique de prise en charge, dans le corps entier de la carpe, lors d'une exposition à différents pH pendant 3 h. Les points représentent la prise en charge moyenne avec des écarts-type (n=5-7, Sr<sub>tot</sub> = 0,2-10000 µM ; température = 25 ± 0,5 °C). Les courbes sont des prédictions modélisées à différents pH : (5,0) = pointillés ; (6,0) = petits tirets ; (7,0) = tirets moyens ; (8,0) = ligne pleine ; (8,5) = tirets longs (tirée de [Chowdury et Blust, 2001](#)).

- Dans des travaux récents sur l'uranium, [Fortin et al. \(2007\)](#) ont confirmé que la prise en charge de l'ion uranyle chez *C. reinhardtii* est inhibée par les protons. Leurs résultats ont montré que l'inhibition compétitive de H<sup>+</sup> a probablement lieu mais ont surtout mis en évidence une inhibition non compétitive importante puisqu'ils ont observé un  $J_{\text{UO}_2}^{\text{MM}}_{\text{pH } 5}$  inférieur à  $J_{\text{UO}_2}^{\text{MM}}_{\text{pH } 7}$  (Fig. 1-13 : bien que le plateau de saturation à pH 7 ne soit pas accessible, étant trop élevé, ce plateau est certainement supérieur à celui à pH 5).



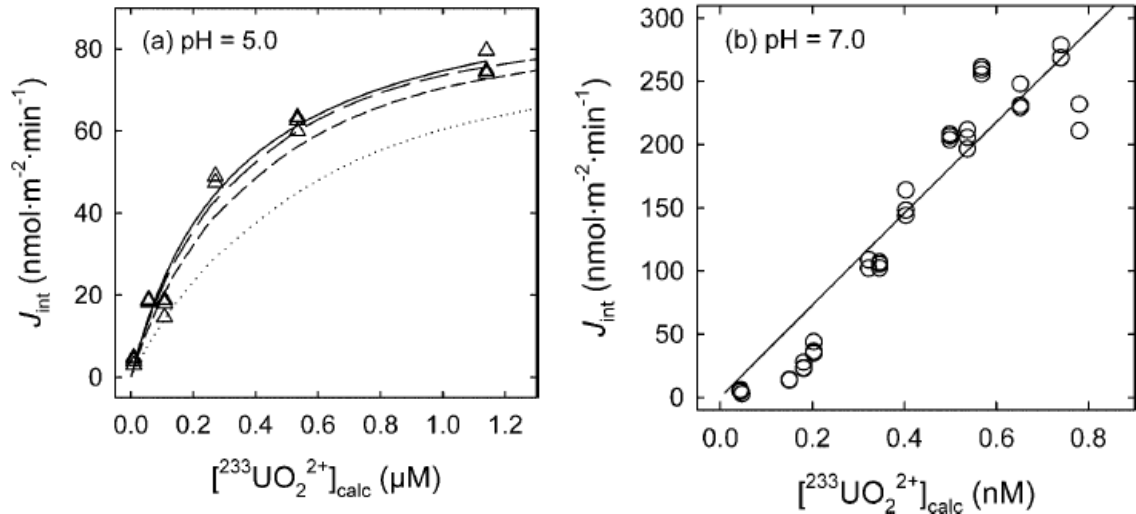


Figure 1-13 : Prise en charge de l'uranium intracellulaire en fonction de la concentration d'ion uranyle libre par *Chlamydomonas reinhardtii* suite à une exposition de 30 min. (a) : à pH 5 ; les prédictions de  $J_{\text{int}}$  sont basées sur des régressions non linéaires d'un modèle d'inhibition non compétitive et avec des valeurs de  $K_{\text{U-Rcell}} = 10^{7.7}$  (ligne en long tirets),  $K_{\text{U-Rcell}} = 10^{7.1}$  (ligne en tirets courts), et  $K_{\text{U-Rcell}} = 10^{6.5}$  (ligne en pointillés). (b) : à pH 7 ; les régressions non linéaires ont été obtenues avec le même modèle qu'à pH 5 et avec une valeur de  $J_{\text{max}} = 26 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  (tirée de Fortin *et al.*, 2007).

Dans tous les cas présentés précédemment, les déviations des résultats par rapport à la théorie du BLM ont été expliquées en suggérant des changements physiologiques induits par le pH, ou plus précisément : des changements des caractéristiques fonctionnelles des protéines de transport du métal entraînant des changements des flux d'internalisation ; ou une augmentation du nombre de sites de transport métalliques disponibles avec le pH.

## 1.5. Problématique et hypothèses

Selon les résultats tirés de la littérature qui ont été présentés dans la section 1.4, il existe un besoin de mieux comprendre pourquoi la prise en charge d'un métal varie avec le pH, et d'intégrer cette influence du pH à un modèle de type BLM. L'objectif de ce travail est donc le suivant :

**Clarifier le rôle du pH comme facteur influant sur la biodisponibilité des métaux chez les algues, et ceci en laboratoire. Les protons agissent-ils comme de simples compétiteurs des métaux pour des sites spécifiques de liaisons (sans influence sur la physiologie) ou influencent-ils différemment le flux de transport transmembranaire (ex. : la constante de cinétique d'internalisation du métal et/ou le nombre de sites capable de le transporter à l'intérieur de la cellule) ?**

Nous proposons de répondre à cette question en observant l'altération des flux transmembranaires de métaux en fonction du pH. Des expériences de prise en charge, de courte durée, ont été effectuées en mettant l'accent sur le contrôle de la spéciation du métal dans le milieu d'exposition. Nous avons utilisé des métaux cationiques bivalents avec une spéciation simple et très peu affectée par les variations de pH, ce qui facilite l'interprétation des données (ex. : absence de covariance significative des hydroxo- et carbonato-complexes du métal par rapport au pH). Le manganèse, un élément essentiel, et le cadmium, un élément considéré comme non essentiel, étaient de bons candidats : ils ont tous deux une pertinence environnementale et leur aquo-ion,  $M(H_2O)_6^{2+}$ , est la forme dominante (98-99 %) en milieu inorganique simple entre les pH 5 et 8 pour Mn et entre pH 5 et 6,5 pour Cd (voir la section 4.1 pour plus de détails). De plus, ces deux métaux ont des radio-isotopes disponibles,  $^{54}Mn$  et  $^{109}Cd$ , ce qui facilite les mesures de prise en charge. Ces expériences, où la cinétique des réactions impliquées (complexation à la surface biologique et transport à travers la membrane biologique) était suivie de près, ont permis de quantifier les flux transmembranaires. Les mesures de paramètres physiologiques de type Michaëlis-Menten, comme les flux d'internalisation maximaux de transport,  $J_{max}$ , ont servi à discriminer un effet inhibiteur des ions  $H^+$  (effet sur le nombre de sites de transport disponibles) d'un effet physiologique (effet sur l'affinité et la capacité à internaliser le métal des sites de transport).  $J_{max}$  représente le flux maximal de transport du métal, lorsque le ligand biotique est saturé. Une diminution de  $J_{max}$  a été interprétée comme une diminution de la vitesse maximale de transport transmembranaire du métal suite à une modification des caractéristiques fonctionnelles du transporteur (inhibition de nature partiellement non compétitive) ou comme une diminution du nombre

de sites de liaison « actifs » capables d'internaliser le métal (inhibition de nature simplement non compétitive).

La modélisation déterministe de  $J_{\max}$  a aidé à discriminer les types d'inhibition de  $H^+$  : effet compétitif (la liaison des protons réduit le nombre de sites de transport disponibles) et effet physiologique partiellement ou simplement non compétitif (sur l'affinité des sites de transport, sur la cinétique ou sur le nombre). En d'autres termes, il pourrait y avoir modulation du flux transmembranaire (variation de  $k_{\text{int}}$  ; Fig. 1-1) par l'algue en fonction du pH.

Si l'on revient sur le BLM, il faut préciser qu'il est utilisé par les autorités environnementales en Amérique du nord ainsi qu'en Europe pour l'estimation de risque des contaminations métalliques en milieu aquatique car, dans de nombreux cas, il est applicable. C'est pourquoi, l'hypothèse que nous allons tester correspond à une des conditions présumées par le BLM : l'inhibition du transport d'un métal par les ions  $H^+$  est de nature exclusivement compétitive ( $J_{\max}$  est constant quand le pH varie).



## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Les algues

#### 2.1.1. Choix de l'organisme test

Les organismes utilisés lors des expériences de prise en charge sont des algues vertes unicellulaires d'eau douce. Elles ont été choisies pour différentes raisons : elles sont faciles à cultiver ; en effet, leur taux de croissance est rapide dans des milieux de culture inorganiques simples ; l'utilisation d'une grande population permet d'obtenir un rapport [surface algale/volume de milieu à tester] élevé ; de plus, une littérature importante est disponible puisqu'elles ont été très étudiées (le développement même du FIAM était initialement basé sur des observations de l'accumulation de métaux chez le phytoplancton).

Les algues suivantes ont été présélectionnées car leur croissance est peu affectée par les variations de pH d'intérêt environnemental ; elles sont toutes trois issues de cultures de l'Université de Toronto, Collection de Cultures d'algues et cyanobactéries (Département d'Écologie et Biologie Évolutionniste, Université de Toronto, Toronto, ON, Canada) : *Chlamydomonas reinhardtii* (UTCC 11) et *Chlamydomonas applanata* (UTCC 120) de la famille des Chlorophycées (Macfie et al., 1994 ; Visviki et Santikul, 2000) et *Euglena gracilis* (UTCC 95) de la famille des Euglenophycées (Danilov et Ekelund, 2001). *C. reinhardtii* a une forme ellipsoïdale, possède deux flagelles et a un diamètre se situant entre 4 et 5  $\mu\text{m}$  ; *C. applanata* a une forme ovoïde, possède deux flagelles et a un diamètre se situant entre 5 et 6  $\mu\text{m}$  ; *E. gracilis* a une forme ellipsoïdale aplatie, possède une flagelle et a un diamètre moyen de 4  $\mu\text{m}$ .

#### 2.1.2. Milieux de culture

Le milieu de culture utilisé pour les algues est une modification du milieu HSM de Macfie et al. (1994), nommé MHSM-1. En effet, Fortin et Campbell (2000) ont montré que des concentrations de phosphate et d'ammonium plus faibles n'affectaient ni le taux de croissance, ni le rendement des algues obtenus avec le milieu HSM original, et

permettait d'obtenir une force ionique faible ( $6 \text{ méq}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ce qui évite les agrégats algaux observés à force ionique élevée.

Le tableau 2-1 décrit la composition détaillée des différents milieux utilisés au cours des expériences que nous avons réalisées, ainsi que du milieu HSM, duquel fut inspirée la composition de nos milieux :

- Comme mentionné précédemment, MHSM-1 est le milieu de croissance de la culture mère (de laquelle on prélève les échantillons algaux pour les expériences).
- MHSM-C est un milieu de culture « carencé » en manganèse dans lequel les algues étudiées sont cultivées avant les expériences d'exposition. Il sert de milieu d'acclimatation à différents pH. MHSM-1 étant très riche en manganèse, la concentration totale de ce dernier a été diminuée de  $2\cdot 10^{-6} \text{ M}$  (MHSM-1) à  $1\cdot 10^{-9} \text{ M}$  (MHSM-C) afin de se rapprocher des concentrations environnementales. Pour être constant dans nos travaux, toutes les expériences furent menées dans ce milieu ; ainsi, pour les mesures de prises en charge du cadmium, les algues étaient aussi acclimatées dans MHSM-C. Afin de vérifier si cette modification de milieu influence les algues, un suivi de la croissance algale a été effectué dans MHSM-1 et MHSM-C sur 4 jours (voir la section 2.1.3).
- Le milieu MHSM-R1 sert à rincer et récupérer les algues avant de les inoculer dans les milieux d'exposition.
- Le milieu MHSM-E, milieu d'exposition, est aussi un milieu simplifié, contenant du métal radioactif et du métal « froid » issu d'un étalon pour spectrométrie de masse, en quantités déterminées. Le métal radioactif nous permet de quantifier aisément le métal intracellulaire pris en charge par les algues par comptage gamma. Notons que la carence en oligo-éléments dans le milieu MHSM-E, par rapport au milieu MHSM-C, n'affecte vraisemblablement pas les cellules car elles ne s'y retrouvent que pour une très brève période de temps ( $< 1 \text{ h}$ ).

## 2. Matériel et Méthodes

Tableau 2-1 : Concentrations molaires des cations et anions des milieux de culture, de rinçage et d'exposition.

<b>Ions</b>	<b>HSM<sup>(1)</sup></b>	<b>MHSM-1 (culture)</b>	<b>MHSM-C (acclimatation)</b>	<b>MHSM-R1 (rinçage avant exposition)</b>	<b>MHSM-E (exposition)</b>	<b>MHSM-R2 (rinçage après exposition)</b>
<b>NH<sub>4</sub></b>	$9,35 \cdot 10^{-3}$	$9,37 \cdot 10^{-4}$	$9,37 \cdot 10^{-4}$	$9,37 \cdot 10^{-4}$	$9,37 \cdot 10^{-4}$	$9,37 \cdot 10^{-4}$
<b>Cl</b>	$9,49 \cdot 10^{-3}$	$5,98 \cdot 10^{-6}$	$3,88 \cdot 10^{-6}$	–	–	–
<b>K</b>	$2,20 \cdot 10^{-2}$	$4,22 \cdot 10^{-3}$	$4,22 \cdot 10^{-3}$	$4,22 \cdot 10^{-3}$	$4,22 \cdot 10^{-3}$	$4,22 \cdot 10^{-3}$
<b>PO<sub>4</sub></b>	$1,37 \cdot 10^{-2}$	$1,37 \cdot 10^{-4}$	$1,37 \cdot 10^{-4}$	–	–	–
<b>CO<sub>3</sub></b>	1 atm <sup>(2)</sup>	1 atm <sup>(2)</sup>	1 atm <sup>(2)</sup>	1 atm <sup>(2)</sup>	1 atm <sup>(2)</sup>	1 atm <sup>(2)</sup>
<b>NO<sub>3</sub></b>	–	$5,07 \cdot 10^{-3}$	$5,07 \cdot 10^{-3}$	$5,07 \cdot 10^{-3}$	$5,07 \cdot 10^{-3}$	$5,07 \cdot 10^{-3}$
<b>SO<sub>4</sub></b>	$8,12 \cdot 10^{-5}$	$8,12 \cdot 10^{-5}$	$8,12 \cdot 10^{-5}$	$8,12 \cdot 10^{-5}$	$8,12 \cdot 10^{-5}$	$8,12 \cdot 10^{-5}$
<b>Mg</b>	$8,12 \cdot 10^{-5}$	$8,12 \cdot 10^{-5}$	$8,12 \cdot 10^{-5}$	$8,12 \cdot 10^{-5}$	$8,12 \cdot 10^{-5}$	$8,12 \cdot 10^{-5}$
<b>Ca</b>	$6,80 \cdot 10^{-5}$	$6,80 \cdot 10^{-5}$	$6,80 \cdot 10^{-5}$	$6,80 \cdot 10^{-5}$	$6,80 \cdot 10^{-5}$	$6,80 \cdot 10^{-5}$
<b>Na</b>	$1,02 \cdot 10^{-4}$	$1,02 \cdot 10^{-4}$	$1,02 \cdot 10^{-4}$	$1,02 \cdot 10^{-4}$	$1,02 \cdot 10^{-4}$	$3,02 \cdot 10^{-4}$
<b>BO<sub>3</sub></b>	$3,01 \cdot 10^{-6}$	$3,01 \cdot 10^{-6}$	$3,01 \cdot 10^{-6}$	–	–	–
<b>Mn</b>	$2,10 \cdot 10^{-6}$	$2,10 \cdot 10^{-6}$	$1,00 \cdot 10^{-9}$	–	variable	–
<b>Cd</b>	–	–	–	–	variable	–
<b>EDTA</b>	$8,06 \cdot 10^{-7}$	$8,06 \cdot 10^{-7}$	$8,06 \cdot 10^{-7}$	–	–	$1,00 \cdot 10^{-4}$
<b>Fe</b>	$5,92 \cdot 10^{-7}$	$5,92 \cdot 10^{-7}$	$5,92 \cdot 10^{-7}$	–	–	–
<b>MoO<sub>4</sub></b>	$3,00 \cdot 10^{-8}$	$3,00 \cdot 10^{-8}$	$3,00 \cdot 10^{-8}$	–	–	–
<b>Zn</b>	$2,43 \cdot 10^{-8}$	$2,43 \cdot 10^{-8}$	$2,43 \cdot 10^{-8}$	–	–	–
<b>Co</b>	$1,09 \cdot 10^{-8}$	$1,09 \cdot 10^{-8}$	$1,09 \cdot 10^{-8}$	–	–	–
<b>Cu</b>	$7,04 \cdot 10^{-11}$	$7,04 \cdot 10^{-11}$	$7,04 \cdot 10^{-11}$	–	–	–
<b>Tampon<sup>3</sup></b>		$10^{-2}$	$10^{-2}$	0	$10^{-2}$	0

<sup>1</sup> Macfie *et al.* (1994).

<sup>2</sup> La concentration du carbonate est ajustée par équilibre gazeux avec l'atmosphère.

<sup>3</sup> HEPES était utilisé pour des pH entre 6,5 et 8, MES était utilisé pour des pH entre 5 et 6,5.

- Le milieu MHSM-R2 est identique à MHSM-R1, sauf qu'il contient une concentration de  $10^{-4}$  M de tétra-acétate d'éthylènediamine, EDTA ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , Sigma Aldrich). Ce milieu sert au rinçage des algues après l'exposition au métal. L'EDTA complexe le métal en solution, favorisant la désorption du métal faiblement lié à la surface des cellules (métal adsorbé) et permet ainsi de le différencier du métal absorbé (Bates et al., 1982 ; Harrison et al., 1986 ; Schenck et al., 1988 ; Hassler et al., 2004b).

Les algues sont cultivées de façon axénique dans des fioles Erlenmeyer en verre de 250 mL contenant 100 mL de milieu de culture MHSM-1, dans des conditions de lumière ( $130 \mu\text{mol-photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et de température ( $20,0 \pm 0,2$  °C) maintenues constantes grâce à une chambre de croissance (Conviroc CMP3023, Winnipeg, MB, Canada). Les cultures sont aussi soumises à une agitation constante (100 rpm) afin de prévenir l'agglomération et la sédimentation des cellules. L'entretien de la culture mère se fait de façon hebdomadaire. Quelques millilitres de la culture d'algues sont transférés dans un milieu MHSM-1 frais et stérile (pH = 7). Un maximum de dix inoculations successives est effectué pour une même culture avant d'en redémarrer une nouvelle à partir de la souche sur gélose, ceci afin de tester la prise en charge sur des cultures n'ayant aucun lien générationnel et aussi de diminuer le risque de contamination bactérienne. Comme mesure supplémentaire, les cultures étaient testées périodiquement par placage sur agar nutritif (Difco-Bacto) pour détecter toute contamination bactérienne.

Pour les milieux avec des pH entre 6,5 et 8, le tampon HEPES (acide 2-[N-morpholino]éthanesulfonique ;  $10^{-2}$  M ; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) était utilisé ; pour les solutions avec un pH entre 5 et 6,5, le tampon MES (acide N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonique] ;  $10^{-2}$  M ; Sigma Aldrich) était utilisé. La concentration de tampon, quelque soit le milieu ou le pH, était toujours de  $10^{-2}$  M. Notons que des études montrent que ces tampons sont inoffensifs pour les organismes vivants, qu'ils n'altèrent pas la division cellulaire (Wehr et al., 1986 ; Lage et al., 1996) et qu'ils ont une très faible capacité complexante pour les métaux que nous avons sélectionnés et ce aux concentrations utilisées (Wehr et al., 1986 ; Soares et al., 1999 ; Ceretti et al., 2006). Seules les études de Vasconcelos et al. (1996 et 2000) ont montré



des effets du tampon HEPES sur la prise en charge de certains métaux par les algues (Cu, Pb et Cd). Afin de vérifier si la nature du tampon influence la croissance des algues, un suivi de cultures au même pH (6,8) mais avec des tampons différents a été effectué (voir section suivante).

### 2.1.3. Croissance algale

Revenons à présent à la croissance des algues, qui est caractérisée par trois phases distinctes : une phase de latence courte est suivie d'une phase exponentielle, puis la croissance des cellules atteint un niveau stationnaire. Lors des expériences, les algues sont toujours récoltées vers la fin de la phase exponentielle pour éviter un biais dû à des différences d'état biologique des cellules (Bates *et al.*, 1983). Le comptage des cellules est effectué avec un compteur électronique de particules (dilution 1:10 avec une solution isotonique ISOTON II ; modèle Multisizer™ 3 Counter® ; Beckman, Miami, FL, USA), équipé d'une électrode avec un orifice de 70 µm qui permet une analyse sur une plage de taille entre 2,20 et 10,00 µm.

Les trois espèces d'algues que nous avons choisies ont été testées afin d'identifier celle dont la croissance est le moins influencée par les variations de pH et par la nature du tampon : les algues (40 000 cellules·mL<sup>-1</sup>) étaient inoculées, à partir d'une même culture mère, dans les milieux à tester. La croissance, déterminée par comptage du nombre de cellules, était mesurée sur une période de 96 h.

Les figures 2-1 à 2-3 présentent respectivement les études préliminaires de la croissance des algues *Chlamydomonas applanata*, *Euglena gracilis* et *Chlamydomonas reinhardtii*, pour différentes conditions de pH dans le milieu MHSM-1 :

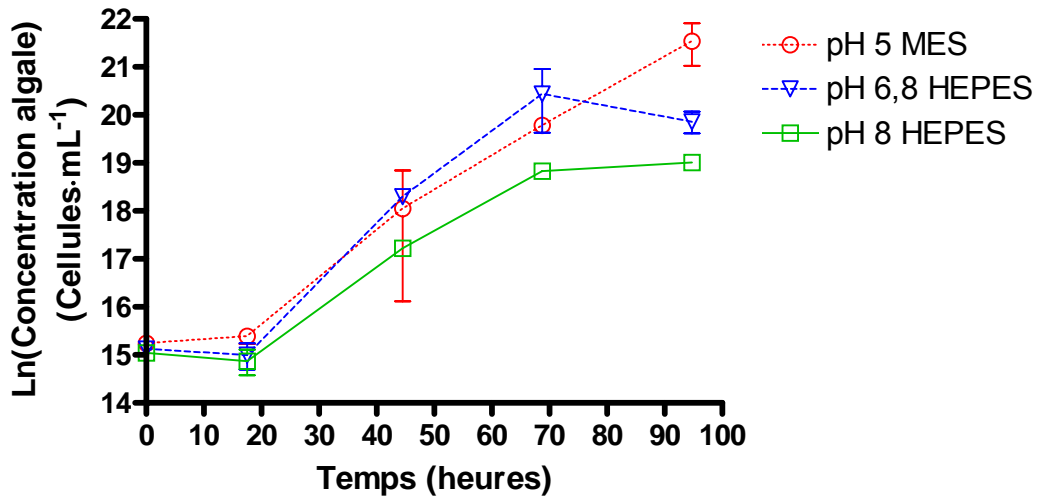


Figure 2-1 : Croissance de *Chlamydomonas applanata* à pH 5 (tampon MES), pH 6,8 (tampon MES), pH 6,8 (tampon HEPES) et pH 8 (tampon HEPES). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3).

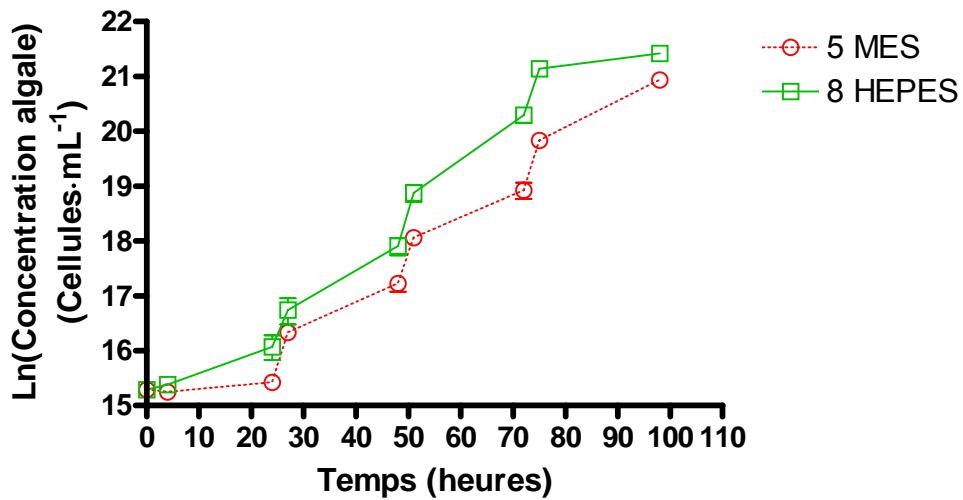


Figure 2-2 : Croissance de *Euglena gracilis* à pH 5 (tampon MES) et pH 8 (tampon HEPES). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3).

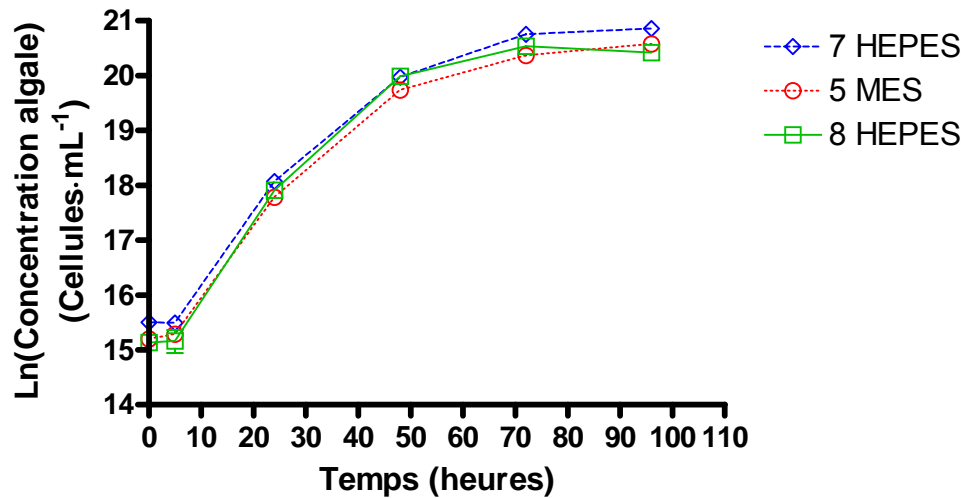


Figure 2-3 : Croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 5 (tampon MES), pH 7 (tampon HEPES) et pH 8 (tampon HEPES). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).

La croissance de *C. reinhardtii* est peu influencée par le pH ou le tampon, sa phase exponentielle est nette et les écarts-types sont plus faibles que les deux autres algues. Pour *C. applanata* par contre, la croissance est variable selon le pH du milieu de croissance : la phase exponentielle se situe entre les heures 20 et 70 pour les pH 6,8 et 8 mais à pH 5 l'état stationnaire de croissance n'est toujours pas atteint après 96 h ; de plus les écarts-types sont grands (l'expérience a été réalisée deux fois, et on obtient toujours des essais peu semblables). Notons aussi que le pH des milieux a varié d'environ 0,2 unité entre 0 et 96 h (et ce malgré la présence de tampon), tandis que pour *C. reinhardtii* et *E. gracilis* la variation ne dépasse pas 0,02 unité. Les mesures pour *E. gracilis* ont de faibles écarts-types mais, comme pour *C. applanata*, la phase stationnaire n'est pas atteinte à pH 5 après 96 h. Il faut noter que, pour ces deux algues, lors du transfert de l'algue de la gélose au milieu MHSM-1, on observe une phase de latence de la croissance nettement supérieure (environ 18 h pour *C. applanata*, plus de 20 h pour *E. gracilis*) à celle de *C. reinhardtii* (environ 6 h avant le début de la croissance). On peut ajouter que les algues survivent mal à la conservation sur gélose et s'agglomèrent en solution par la suite (mis en évidence lors de l'analyse des échantillons par le compteur d'algues).

Nous avons donc décidé d'utiliser *C. reinhardtii* pour la suite des expériences car sa croissance est peu influencée par les variations de pH ou le tampon. De plus, elle a été très étudiée et une littérature vaste est disponible, ce qui aide à la compréhension de son comportement.

Nous avons ensuite comparé la croissance de l'algue pour un même pH mais avec les deux tampons utilisés dans les milieux d'exposition afin de vérifier un effet potentiel de ces derniers. La figure 2-4 présente la croissance de *C. reinhardtii* à pH 6,8 avec les tampons MES et HEPES ; 6,8 étant la limite de tampon supérieure pour MES et inférieure pour HEPES. Bien que la courbe de croissance en présence de tampon MES soit légèrement en dessous de celle en présence de tampon HEPES en raison d'une courte phase de latence, l'effet est minime sur le rendement de la culture (la concentration cellulaire après 96 h) et nul sur la croissance (la pente pendant la phase exponentielle de croissance) et la surface algale (données non présentées ici).

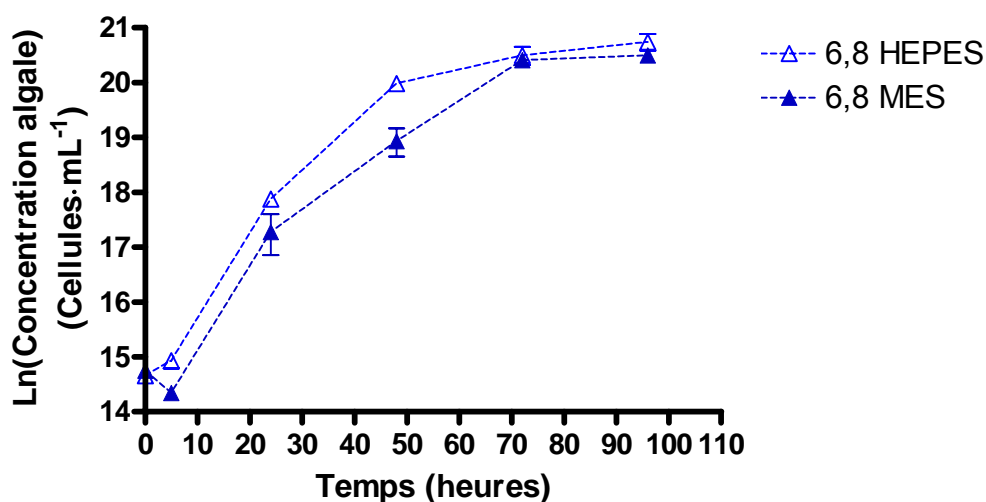


Figure 2-4 : Croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 6,8 (tampon MES), pH 6,8 (tampon HEPES) dans MHSM-1. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3).

Comme mentionné plus tôt, nous utilisons un milieu MHSM-C carencé en manganèse, et nous avons vérifié que la croissance de *C. reinhardtii* n'était pas affectée par cette modification, comme le montre la figure 2-5 :

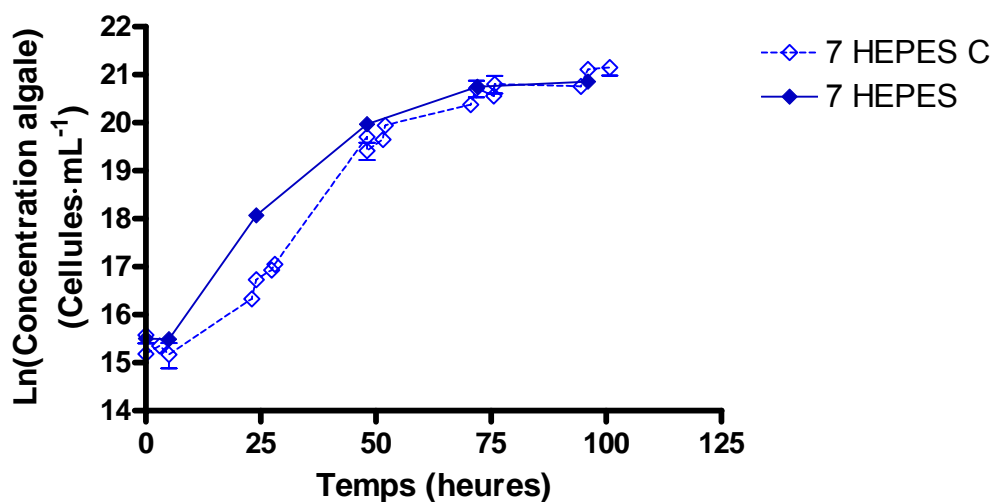


Figure 2-5 : Croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 7 (tampon HEPES) pour des milieux MHSM-C carencé (C) et MHSM-1 non carencé. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3).

La croissance de l'algue a aussi été observée à pH 8 en présence et en absence de tampon HEPES ainsi qu'à pH 5 et 6,5 avec ou sans tampon MES (Fig. 2-6 à 2-8). Notons que le milieu utilisé ici est le MHSM-C. Pour les milieux sans tampon, le pH était maintenu à l'aide d'un pHstat ( $\alpha$ ph2000w, Eutech Inst., Singapour ; électrode pH époxy BWC et valves 625E, Cole-Palmer Inst., Vernon Hills, IL, USA) à l'aide de solutions de  $\text{HNO}_3$   $10^{-4}$  M et  $\text{NaOH}$   $10^{-4}$  M. Ce dispositif autorisait une variation de pH de  $\pm 0,05$ .

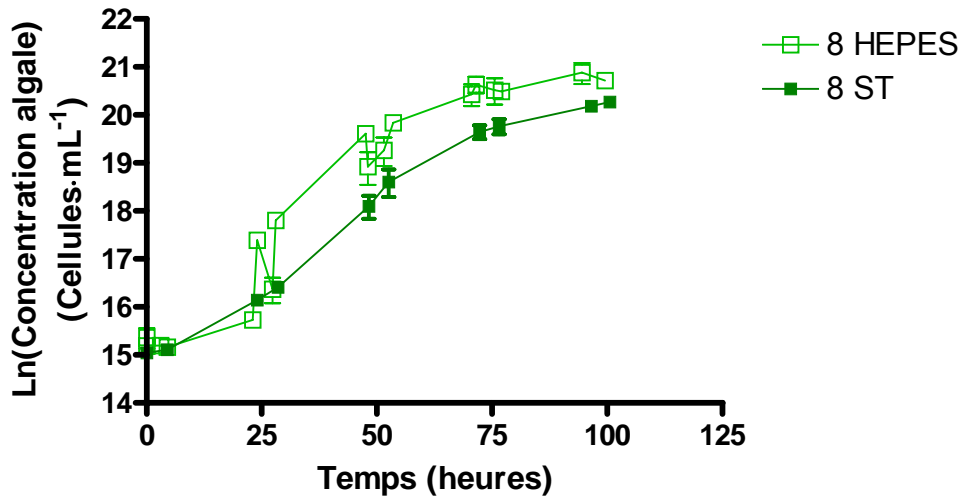


Figure 2-6 : Croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 8 avec tampon (8 HEPES) et sans tampon (8 ST). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3).

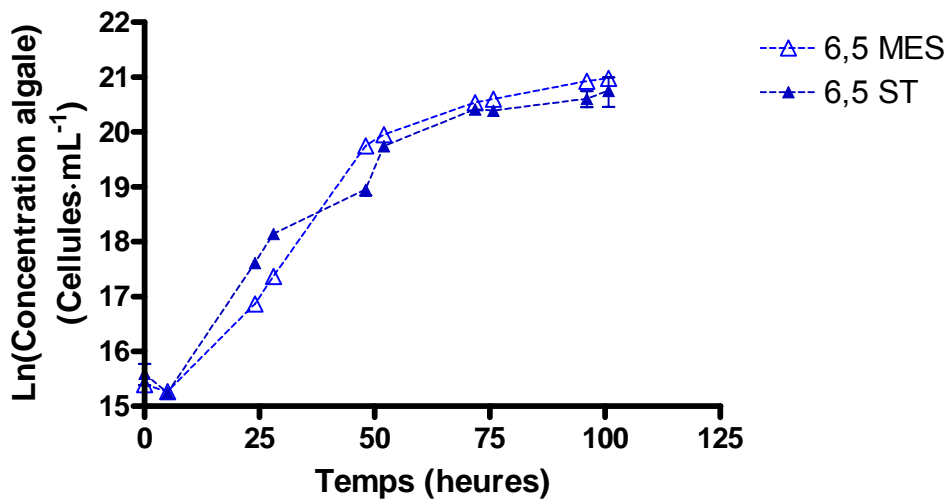


Figure 2-7 : Croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 6,5 avec tampon (6,5 MES), et sans tampon (6,5 ST). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3).

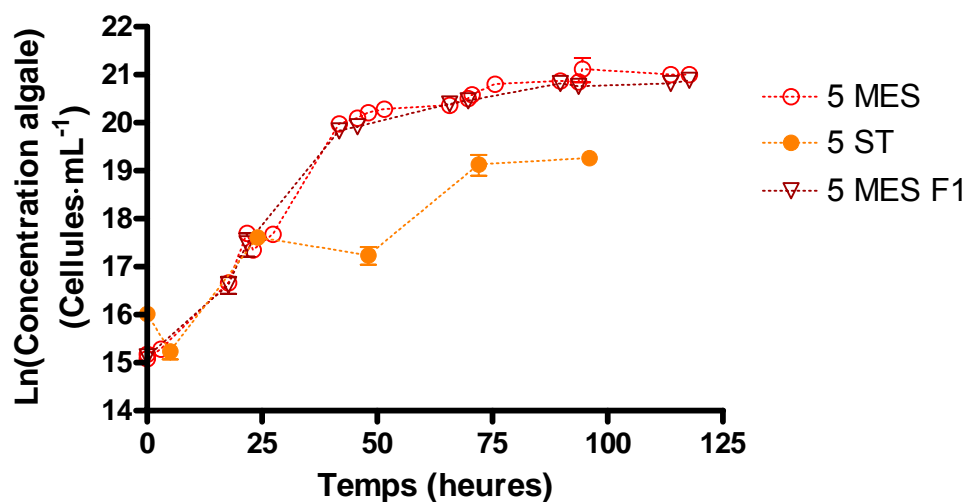


Figure 2-8 : Croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* à pH 5 : avec tampon (5 MES) à partir d'algues cultivées à pH 7 ; avec tampon mais pour des algues cultivées à pH 5 à partir du premier repiquage depuis la gélose (5 MES F1) ; et sans tampon (5 ST). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3).

La croissance de *C. reinhardtii* n'est que très peu influencée par les variations de pH entre 5 et 8 en présence des tampons. On peut noter qu'en l'absence de ces derniers (en particulier à pH 5), la concentration algale est plus faible. Cette diminution de la croissance était probablement due à une acidification importante du milieu de culture par cette algue (Fortin, 2000). Toutefois, la surface spécifique de l'algue ( $\mu\text{m}^2 \cdot \text{cellule}^{-1}$ ) n'était pas affectée et aucun débris cellulaire n'était détecté, ce qui permet de penser que les cellules étaient toujours viables. De plus, il n'y a pas de différence de croissance entre des algues provenant d'une culture mère à pH 5 (toujours cultivée à pH 5 avec le tampon MES) et celles provenant de la culture mère à pH 7 (avec le tampon HEPES) ; cette comparaison a été effectuée afin de déterminer l'influence à long terme d'un pH acide sur la croissance de l'algue.

Nous pouvons donc cultiver nos échantillons aux conditions de pH et de tampon désirées en sachant que celles-ci n'influencent peu ou pas la croissance de l'algue.

#### 2.1.4. *Chlamydomonas reinhardtii*

Comme mentionné précédemment, *Chlamydomonas reinhardtii* est une algue unicellulaire verte d'eau douce d'environ 5 µm de diamètre et qui se déplace à l'aide de deux flagelles. Sa paroi cellulaire est composée de sept couches diverses principalement composées de glycoprotéines hydroxyprolines, un chloroplaste large (en forme de tasse) où se trouve le pyrénoloïde (centre de fixation du dioxyde de carbone) et un « œil » (sensible à la lumière) (Harris, 1989). Du fait de sa capacité à croître en milieu simple en laboratoire, elle est utilisée comme organisme modèle en biologie cellulaire, elle a été très étudiée et son génome a été entièrement analysé (Rosakis et Köster, 2005).

Si l'on s'intéresse aux particularités de l'algue qui vont influencer la prise en charge métallique, on peut mentionner que les groupements fonctionnels retrouvés sur la paroi cellulaire sont principalement R-COOH, R-NH<sub>2</sub> et R-OH (Kiefer *et al.*, 1997).

Pour ce qui de la membrane cellulaire, Rosakis et Köster (2005) ont étudié à l'aide de modifications génétiques, les protéines de transport des métaux bivalents et ont identifié un transporteur du manganèse, nommé DMT1, ayant une terminaison contenant du carbone à l'extérieur de la cellule et un groupement azoté à l'intérieur et qui peut également transporter le fer, le cadmium et le cuivre mais pas le zinc.

### 2.2. Matériel et réactifs

Tous les contenants en polycarbonate et en verre étaient trempés 24 h dans un bain de HNO<sub>3</sub>, 10 % w/v (grade ACS, EMD Chemical Inc., Darmstadt, Allemagne), rincés sept fois à l'eau ultra pure (18 MΩ·cm) et séchés sous une hotte à flux laminaire. Tout matériel destiné à la culture des algues était aussi autoclavé à 121 °C pendant 15 min. Les sels utilisés pour les cultures et les expériences étaient tous de grade analytique ou supérieur.



### 2.3. Protocoles expérimentaux

#### 2.3.1. Récolte et exposition

La méthodologie employée ici a souvent été utilisée (Knauer *et al.*, 1999 ; Kola et Wilkinson, 2005), et en particulier par les chercheurs dans nos laboratoires (Bates *et al.*, 1982 et 1983 ; Harrison *et al.*, 1986 ; Schenck *et al.*, 1988 ; Fortin et Campbell, 2000 ; Boullemant *et al.*, 2004).

La figure 2-9 présente la première partie du protocole expérimental détaillé ci-après. Un volume d'algues (environ 4 mL) était transféré de la culture mère (MHSM-1, pH 7 avec tampon HEPES) dans 100 mL de milieu MHSM-C fraîchement préparé (ajusté au pH désiré). Après 72 h de croissance, on transférait de cette culture, un volume déterminé (calculé à l'aide d'une mesure effectuée avec un compteur de particules) pour obtenir une densité algale initiale de 40 000 cellules·mL<sup>-1</sup>, dans 100 mL de milieu MHSM-C frais. Après 48 h, ce qui correspondait à la fin de la phase exponentielle de croissance des algues (densité algale d'environ 800 000 cellules·mL<sup>-1</sup>), celles-ci étaient récoltées par filtration (membrane de polycarbonate 2,0 µm Isopore™ ; Millipore, Mississauga, ON, Canada). Notons que les filtres utilisés ne nécessitant qu'une très faible pression (vide < 10 cm d'Hg) pour récupérer les algues, ces dernières n'étaient donc pas abîmées. Suite à cela, elles étaient rincées cinq fois avec 10 mL de milieu MHSM-R1 (Tableau 2-1). Ce rinçage permettait d'éliminer les ligands du milieu de culture (EDTA, chlorures, exsudats) qui auraient pu perturber la spéciation du métal étudié dans les milieux d'exposition.

Ensuite, les algues étaient resuspendues dans 10 mL de MHSM-R1. À l'aide du compteur de particules, les tailles et surfaces moyennes, ainsi que les densités algales, étaient immédiatement déterminées. Les cellules étaient ensuite distribuées dans les flacons d'exposition Erlenmeyer de 250 mL en polycarbonate contenant 100 mL de milieu MHSM-E (Tableau 2-1) ainsi que le métal d'intérêt. La densité algale finale était de 15 000 cellules·mL<sup>-1</sup>; cette faible valeur a été choisie afin de minimiser la perte de métal lorsque l'algue adsorbe et prend en charge le métal, ce qui aurait fait varier significativement la concentration d'exposition. Le milieu MHSM-E était préparé 24 h avant l'expérience afin d'assurer l'équilibre des métaux en solution, et était préalablement

filtré (sur membrane d'une porosité de 0,2  $\mu\text{m}$  pour éliminer toute phase particulaire qui aurait pu se former).

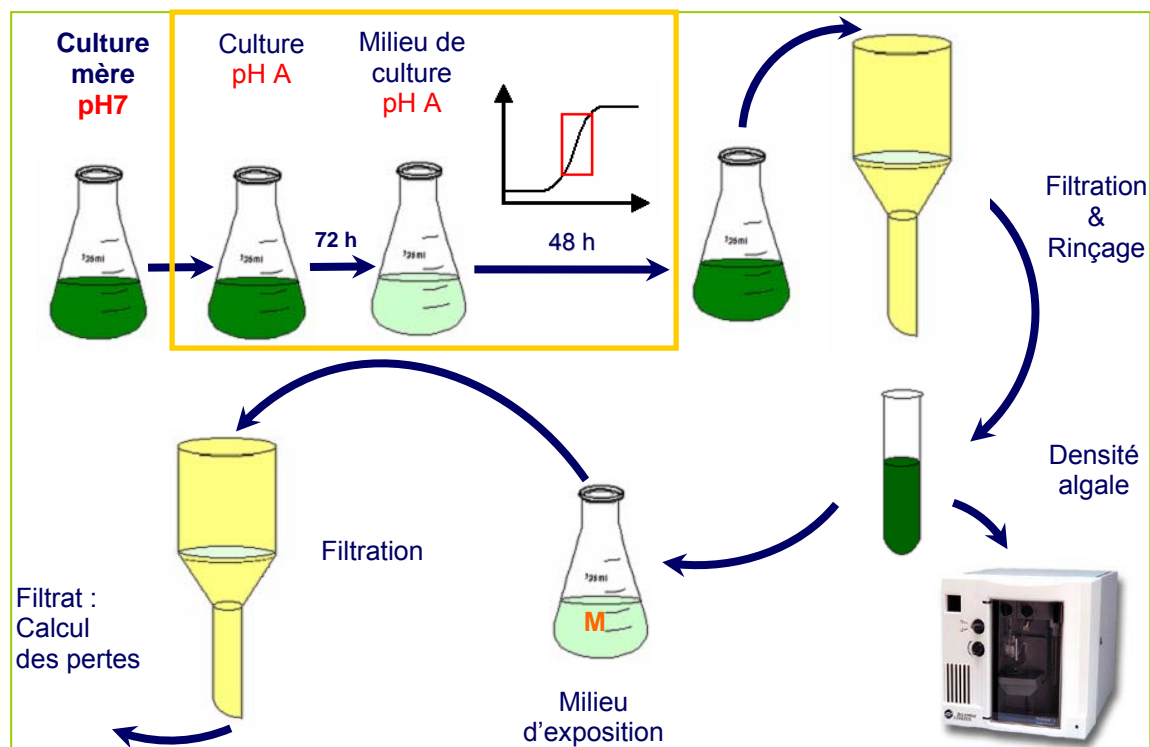


Figure 2-9 : Schéma du protocole expérimental utilisé. pH A correspond au pH d'acclimatation, pH B à celui d'exposition. M est le métal en solution. Le rectangle orange correspond à la période d'acclimatation.

Notons qu'il y avait trois essais (triplicata) pour chaque condition d'exposition (pH et concentration) et que chaque expérience a été répétée au moins deux fois dans le temps sur des cultures distinctes afin de vérifier la répétabilité des résultats.

### 2.3.2. Récupération du métal après filtration

Des temps d'exposition courts ( $< 60$  min) ont été utilisés afin de : i) minimiser l'impact des exsudats cellulaires, qui pourraient affecter la spéciation du métal en solution ; ii) minimiser la croissance (division cellulaire) ou les changements du volume cellulaire, qui pourraient influencer les paramètres d'exposition ; iii) éviter l'apparition

d'un effet toxique du métal, nos concentrations étant parfois très élevées. Après des tests préliminaires, nous avons utilisé un temps de 45 min qui répondait à ces critères et était suffisamment long pour obtenir des concentrations intracellulaires métalliques exploitables (concentrations de radio-isotope supérieures à la limite de détection du compteur gamma).

Donc après un temps d'exposition de 45 min, 2 mL de chaque essai étaient prélevés pour être passés au compteur de particules afin de déterminer les concentrations et surface spécifique algales. Le reste des algues était récupéré sur deux filtres superposés d'une porosité de 2  $\mu\text{m}$ . Le second filtre permettait d'évaluer subséquemment le bruit de fond causé par l'adsorption du métal sur le filtre : la radioactivité retenue par le filtre du dessous était donc soustraite à celle du filtre du dessus pour corriger l'adsorption du métal à la membrane filtrante.

### 2.3.3. Distinction entre métal intracellulaire et métal adsorbé

Après avoir été récupérées sur les filtres, les algues étaient ensuite rincées cinq fois avec 10 mL de milieu MHSM-R2 (Tableau 2-1) contenant  $10^{-4}$  M d'EDTA. Cette étape de rinçage est communément utilisée pour déloger les métaux adsorbés à la surface algale, permettant ainsi la distinction entre métal absorbé (retenu dans la cellule sur le filtre) du métal adsorbé (collecté dans le filtrat). Plusieurs chercheurs (Bates *et al.*, 1982 ; Harrison *et al.*, 1986 ; Schenck *et al.*, 1988 ; Mehta *et al.*, 2002 ; Hassler *et al.*, 2004b entre autres) ont montré que la désorption du métal à la surface des cellules s'effectuait facilement avec de l'EDTA ( $10^{-3}$  à  $10^{-5}$  M) pour des métaux bivalents comme le Mn, le Cu, le Cd et le Zn ; notons que  $\log K_{\text{MnEDTA}} = 15,60$  et  $\log K_{\text{CdEDTA}} = 18,26$  (Martell *et al.*, 2004), ce qui traduit une forte affinité favorisant la formation des complexes Mn-EDTA et Cd-EDTA. De plus, l'EDTA est un bon ligand pour faire cette distinction d'adsorption/absorption du manganèse et du cadmium car il est non assimilable, c'est-à-dire qu'il ne peut pas pénétrer dans la cellule et réagit donc uniquement avec le métal lié à la surface. Le métal intracellulaire considéré ici correspond donc à la partie non extractible à l'EDTA (Bates *et al.*, 1982 ; Mehta *et al.*, 2002).

### 2.3.4. Dosage des radioéléments

Des solutions radioactives acidifiées de manganèse et de cadmium ( $2 \text{ mCi}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$  pour  $^{54}\text{Mn}$  et  $28 \text{ mCi}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$  pour  $^{109}\text{Cd}$ , dans  $0,1 \text{ M HCl}$ ) provenant de PerkinElmer (Woodbridge, ON, Canada) ont facilité les mesures de la prise en charge des métaux. Ces solutions étaient diluées avec des solutions non radioactives de métal ( $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2-5 %  $\text{HNO}_3$ , étalon ICP, SCP Science, Québec, QC, Canada) pour ajuster les concentrations de métal dans les milieux d'exposition, et afin d'assurer une radioactivité suffisante pour être détectée, tout en minimisant la consommation inutile de radio-isotope.

Un prélèvement de 2 mL du filtrat après la récolte des cellules exposées permettait de déterminer s'il y avait une perte significative ( $> 10 \%$ ) du métal pendant l'exposition (par adsorption et absorption), alors qu'un prélèvement de 2 mL du filtrat après rinçage des algues permettait de déterminer la quantité de métal adsorbée à la surface des cellules. Chaque aliquote de 2 mL récupérée pendant l'expérience était placée dans un flacon en verre de 4 mL. Tous les filtres étaient placés dans 2 mL d'eau ultra-pure (afin d'obtenir la même atténuation du signal que dans le cas des échantillons aqueux) dans le même type de flacon. Le tout était analysé au compteur à rayonnement gamma (Wallac 1480 Wizard™ 3", Turku, Finlande).

Afin de vérifier l'efficacité du compteur pour nos métaux, nous avons effectué plusieurs dilutions de la source originale. Dans le cas du manganèse, l'efficacité du compteur gamma était de  $20,8 \pm 0,7 \%$  (écart-type,  $n = 9$ ) et celle du cadmium de  $36,7 \pm 0,4 \%$  (écart-type,  $n = 9$ ). Un temps de comptage de 2000 s et/ou un nombre limite de comptes de 100 000 par échantillon, permettaient d'obtenir une erreur suffisamment faible ( $< 0,32 \%$ ) sur l'activité. La fenêtre de mesure des désintégrations du  $^{54}\text{Mn}$  à doser était restreinte entre 600 et 820 keV (pic principal à 700 keV) ; pour le  $^{109}\text{Cd}$ , la fenêtre se situait entre 16 et 36 keV (pic principal à 22 keV). La limite de détection correspond à dix fois le bruit de fond, déterminé par un échantillon témoin mesuré (2 mL d'eau ultra-pure) dont la valeur variait entre 0 et 5 cpm.

La concentration du métal était ensuite calculée : les comptes par minute (CPM) étaient transformés en désintégrations par minute (DPM) en divisant les CPM par l'efficacité (%) du compteur :

$$\text{DPM} = \frac{\text{CPM}}{\text{efficacité}}$$

Ces derniers étaient alors transformés en désintégrations par seconde (DPS) en divisant par 60 :

$$\text{DPS} = \frac{\text{DPM}}{60}$$

Le nombre de noyaux de radio-isotope ( $N_x$ ) était donné par la division du nombre de DPS par la constante de radioactivité du métal (CR, obtenue en divisant  $(\ln 2)$  par le temps de demi-vie du métal en secondes) :

$$N_x = \frac{\text{DPS}}{\text{CR}}$$

En divisant  $N_x$  par le nombre d'Avogadro ( $6,023 \cdot 10^{23}$ ), on obtenait le nombre de moles de radio-isotope ( $n_x$ ) :

$$n_x = \frac{N_x}{6,023 \cdot 10^{23}}$$

Ce dernier était divisé par le rapport isotopique du jour (RI), calculé en divisant le nombre de moles de métal radioactif par le nombre de moles de métal total, et l'on obtenait le nombre de moles de métal total de l'échantillon ( $n_M$ ) de 2 mL (soit 0,002 L) :

$$n_M = \frac{n_x \cdot 0,002}{\text{RI}}$$

Notons que le rapport isotopique du jour tenait compte des spécifications de la solution mère de radio-isotope (activité spécifique, volume, date de certification), de la dilution avec le métal non radioactif, ainsi que de la décroissance de la radioactivité du métal. L'équation suivante permettait de tenir compte de cette désintégration naturelle du radio-isotope :

$$N = N_0 \cdot e^{\frac{-\ln 2 \cdot t}{\text{DV}}}$$

où  $N$  est l'activité spécifique le jour de l'expérience ;  $t$ , le nombre de jours écoulés entre la date de certification et la date de l'expérience ;  $N_0$ , l'activité spécifique à la date de certification ;  $\text{DV}$ , le temps de demi-vie du radio-isotope en nombre de jours.

Le résultat était ensuite normalisé pour la surface algale exposée ( $m^2$ ), calculée à partir du nombre total de cellules algales filtrées et de leur surface spécifique moyenne. Les résultats sont donc exprimés en moles de métal par  $m^2$ . Cette normalisation permet des comparaisons entre différentes espèces d'algues. Pour une expérience de prise en charge typique, les cellules de *C. reinhardtii* avaient une surface moyenne d'environ  $70 \mu m^2$  et un volume approximatif de  $55 \mu m^3$ .

### 2.3.5. Expériences d'exposition

Les fractions intracellulaires de métal ont été mesurées pour des concentrations de métal libre croissantes ( $1 \cdot 10^{-10} - 6 \cdot 10^{-4}$  M). Cette gamme était relativement large car il fallait s'approcher de la saturation du transport transmembranaire afin de faciliter le calcul de la capacité des transporteurs. Bien que ces concentrations ne soient pas rencontrées dans l'environnement, la saturation des transporteurs était essentielle pour que le modèle présenté dans le Chapitre 3 converge et fournisse de bonnes estimations des différents paramètres.

Entre quatre et six expériences indépendantes (composées de trois répétitions chacune ;  $n = 3$ ) ont été effectuées à chaque pH testé et ce pour les deux métaux. Ces répétitions étaient nécessaires pour couvrir toute la gamme de concentration et pour tester la reproductibilité des résultats entre différentes cultures d'algues. Le pH dans le milieu d'acclimatation (MHSM-C) était le même que le pH du milieu d'exposition (MHSM-E), qui était contrôlé quelques minutes avant l'expérience et réajusté si nécessaire (dans une gamme de  $\pm 0,02$ ) à l'aide de NaOH (0,5 M, Caledon, Georgetown, ON, Canada) ou de HNO<sub>3</sub> (0,5 M, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada).

Notons qu'au début de l'étude, l'adsorption n'était mesurée que pour une des trois répétitions en raison d'un manque de matériel adéquat ; plus tard, elle l'était pour les trois essais.

## 2.4. Modèle de spéciation

Afin de connaître et contrôler la spéciation des milieux, nous avons utilisé un modèle d'équilibre chimique (MINEQL+, version 4.5) et une base de données thermodynamique mise à jour à partir d'une révision récente (Schecher, 2001 ; Martell *et al.*, 2004). Les métaux, dans les milieux d'exposition sous les conditions utilisées, ne forment pas de complexes stables avec les ligands ou anions présents et l'ion libre est l'espèce majoritaire à au moins 98 % (plus de détails dans le Chapitre 4).

## 2.5. Statistiques

**À moins que ce ne soit indiqué autrement, les résultats sont donnés sous forme d'une moyenne de trois répétitions  $\pm$  un écart-type.** Toutes les régressions et l'optimisation des paramètres du modèle et de leurs erreurs-types ont été déterminées avec le programme informatique Graph Pad Prism 4 (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Afin de comparer les flux d'internalisation pour des conditions d'acclimatation et d'exposition différentes, nous avons effectué des simulations Monte Carlo à l'aide du logiciel Matlab 7.3 (The MathWorks, Inc., Meudon, France).





### 3. MODÉLISATION DES FLUX INTRACELLULAIRES

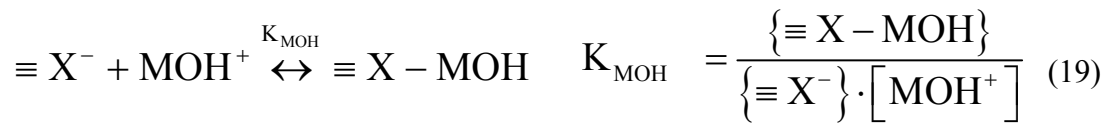
#### 3.1. Modèle partiellement non compétitif

Comme mentionné dans l'introduction, pour une algue unicellulaire, les flux d'internalisation  $J_{\text{int}}$  d'un métal bivalent ( $M^{2+}$ ) peuvent être modélisés par un processus de type Michaëlis-Menten (Éq. 8, Chapitre 1) qui n'intègre pas les réactions de compétition. Par contre, l'équation 17 (présentée à nouveau ci-après) est une modélisation de prise en charge qui tient compte de la compétition potentielle des protons et d'un autre cation.

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}} \cdot K_M \cdot [M^{2+}]}{(1 + K_H \cdot [H^+] + K_C \cdot [C^{n+}] + K_M \cdot [M^{2+}])} \quad (17)$$

Rappelons que pour simplifier la présentation, les charges des complexes et les molécules de la sphère de coordination du métal ne sont pas indiquées ; les accolades { } correspondent à des concentrations d'espèces présentes à la surface cellulaire tandis que les crochets [ ] correspondent à des concentrations en solution.

Dans l'introduction, diverses études présentées font mention de la possible prise en charge d'hydroxo- et de carbonato-complexes métalliques. Si l'on considère cette possibilité, en suivant le même raisonnement, nous pouvons développer le même type d'équation :



Si  $k'_{\text{int}}$  est la constante d'internalisation de l'hydroxo-complexe, on a :

$$J_{\text{int}} = k_{\text{int}} \cdot \{\equiv \text{X} - \text{M}\} + k'_{\text{int}} \cdot \{\equiv \text{X} - \text{MOH}\} \quad (21)$$

La concentration totale de sites est donnée par l'équation de masse 22, qui donne l'équation 23 après avoir été combinée avec les équations 12, 13, 14, 18 et 19 :

$$\begin{aligned} \{\equiv \text{X}\}_{\text{T}} = & \{\equiv \text{X}^{-}\} + \{\equiv \text{X} - \text{H}\} + \{\equiv \text{X} - \text{C}\} \\ & + \{\equiv \text{X} - \text{M}\} + \{\equiv \text{X} - \text{MOH}\} \end{aligned} \quad (22)$$

$$\{\equiv \text{X}\}_{\text{T}} = \{\equiv \text{X}^{-}\} \cdot \left( \frac{1 + K_{\text{H}} \cdot [\text{H}^{+}] + K_{\text{C}} \cdot [\text{C}^{\text{n}+}] + K_{\text{M}} \cdot [\text{M}^{2+}]}{+ K_{\text{MOH}} \cdot \beta_{\text{OH}} \cdot [\text{M}^{2+}] \cdot [\text{OH}^{-}]} \right) \quad (23)$$

Nous présumons donc ici que l'hydroxo-complexe utilise le même transporteur que l'aquo-ion. La combinaison des équations 21 et 23 donne l'équation finale :

$$J_{\text{int}} = \frac{[\text{M}^{2+}]}{\alpha} \cdot \left( J_{\text{max}} \cdot K_{\text{M}} + J'_{\text{max}} \cdot K_{\text{MOH}} \cdot \beta_{\text{OH}} \cdot [\text{OH}^{-}] \right) \quad (24)$$

$$\text{où } \alpha = 1 + K_{\text{H}} \cdot [\text{H}^{+}] + K_{\text{C}} \cdot [\text{C}^{\text{n}+}] + K_{\text{M}} \cdot [\text{M}^{2+}] + K_{\text{MOH}} \cdot \beta_{\text{OH}} \cdot [\text{M}^{2+}] \cdot [\text{OH}^{-}]$$

$$J_{\text{max}} = k_{\text{int}} \cdot \{\equiv \text{X} - \text{M}\}_{\text{max}} \text{ et } J'_{\text{max}} = k'_{\text{int}} \cdot \{\equiv \text{X} - \text{MOH}\}_{\text{max}}.$$

Étant donné que l'hydroxo-complexe ne porte qu'une seule charge positive, comparé à l'ion libre qui est bivalent, on s'attend à ce que  $K_{\text{MOH}} < K_{\text{M}}$ , c'est-à-dire que  $\{\equiv \text{X} - \text{MOH}\} < \{\equiv \text{X} - \text{M}\}$ , dans le cas où  $[\text{M}^{2+}] = [\text{MOH}^{+}]$ . Donc pour que le complexe  $\text{MOH}^{+}$  contribue significativement à la prise en charge maximale du métal M, il faut que  $k'_{\text{int}} > k_{\text{int}}$ , soit  $J'_{\text{max}} > J_{\text{max}}$ . Maintenant, si l'on étudie l'équation 24, on constate que lorsque le pH devient acide et que  $[\text{OH}^{-}] \ll \beta_{\text{OH}}$ , la composante  $K_{\text{MOH}} \cdot \beta_{\text{OH}} \cdot [\text{OH}^{-}]$  devient négligeable par rapport à  $K_{\text{M}} \cdot [\text{M}^{2+}]$ , et le modèle peut être simplifié à l'équation 17. Par contre, lorsque le pH devient basique ( $[\text{OH}^{-}] \geq \beta_{\text{OH}}$ ), la contribution de l'hydroxo-

complexe à la prise en charge du métal pourrait prendre de l'importance, ce qui se manifesterait en une augmentation du plateau de saturation : la figure 3-1 présente les courbes de simulations auxquelles on s'attend en appliquant ce modèle (Éq. 24). Pour ces simulations nous avons utilisé le scénario fictif suivant :  $J'_{\max} = 50 \times J_{\max}$  ;  $K_M = 10 \times K_{MOH}$  ; M est un métal qui forme des hydroxo-complexes à un pH proche de la neutralité ( $\beta_{OH} = 7,0$ ), comme le cuivre et le plomb ( $\beta_{CuOH^+} = 6,5$  et  $\beta_{PbOH^+} = 6,4$ ). On constate que lorsque  $[OH^-]$  s'approche de  $\beta_{OH}$ , le flux maximal apparent en fonction de la somme des espèces internalisées ( $[M^{2+}] + [MOH^+]$ ) augmente de façon notable. Toutefois, dans le cas d'un métal, comme le manganèse ou le cadmium qui forme moins de 1 % d'hydroxo-complexes à pH 8 ( $K_{MnOH^+} = 3,4$  et  $K_{CdOH^+} = 3,9$ ), pH le plus élevé étudié dans cette thèse, la contribution de ces complexes ne serait pas significative, à moins que  $J'_{\max} > 500 \times J_{\max}$ . Nous considérons ce scénario comme très improbable puisque, d'une part, la prise en charge des hydroxo-complexes n'a pas été démontrée à ce jour, et d'autre part, les hypothèses nécessaires pour que cette prise en charge de  $MnOH^+$  et de  $CdOH^+$  soit significative nous semblent déraisonnables. Nous présumerons donc que seul l'aquo-ion est internalisé.

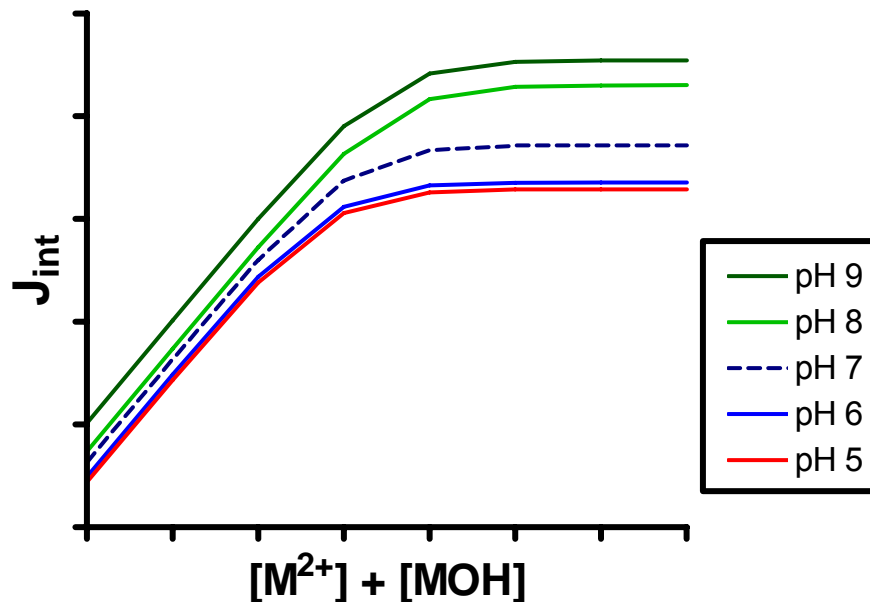


Figure 3-1 : Prise en charge modélisée de  $M^{2+}$  et de  $MOH^+$  selon un scénario fictif où :  $J'_{\max} = 50 \times J_{\max}$  ;  $K_M = 10 \times K_{MOH}$  ; et M est un métal qui forme des hydroxo-complexes proche de la neutralité ( $\beta_{OH} = 7,0$ ).

### 3.2. Détermination des paramètres du modèle

La première étape de la détermination des paramètres du modèle consiste à examiner la prise en charge du métal en fonction des cations majeurs qui pourraient entrer en compétition avec le métal. En effet, les protons ne sont pas les seuls compétiteurs potentiels pour les sites de transport métalliques, et le BLM prédit que les ions comme  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  peuvent inhiber la prise en charge des métaux de façon compétitive (Di Toro et al., 2001 ; Fig. 1-4).

Nous avons considéré que Ca était le seul cation inhibiteur significatif ( $\text{C}^{n+}$ , Éq. 17) car de nombreuses études mettent en évidence une inhibition de la prise en charge métallique par le calcium (Hauck et al., 2002 ; Issa et al., 1995 ; Slaveykova et Wilkinson, 2002 ; Mosulén et al., 2003 ; Kola et Wilkinson, 2005 ; Worms et Wilkinson, 2007). Le magnésium n'a pas été testé car il est probable qu'il ne soit pas un inhibiteur majeur de nos métaux (Kola et Wilkinson, 2005 ; Kehres et al., 2000). Idéalement, tous les cations devraient être testés s'ils sont des compétiteurs potentiels. Négliger de considérer un inhibiteur significatif résulterait en une sous-estimation de  $K_M$ . Si la concentration de cet inhibiteur reste constante, son effet ne sera pas détecté.

L'optimisation des paramètres ajustables  $K_{\text{Ca}}$ ,  $K_M$ ,  $K_H$  et  $J_{\text{max}}$ , a été réalisée en trois étapes :

- Étape 1 : en utilisant d'abord le taux de prise en charge des métaux lorsque  $[\text{Ca}^{2+}]$  varie et, par régression non linéaire (Éq. 25), nous pouvons extraire une valeur de  $K_{\text{Ca}}$ .

$$J_{\text{int}} = \frac{A}{1 + K_{\text{Ca}} \cdot [\text{Ca}^{2+}]} \quad (25)$$

où A est l'autre paramètre ajustable regroupant les termes constants du numérateur de l'équation 17.

Notons qu'ici, nous considérons que  $K_M \cdot [\text{M}^{2+}] \ll 1$  (ce qui est raisonnable puisque, dans ces expériences de prise en charge,  $[\text{M}^{2+}]$  est relativement faible, 0,5  $\mu\text{M}$ , par rapport aux concentrations de saturation) et que  $K_H \cdot [\text{H}^+] \ll 1$  (cette considération sera discutée

plus bas). Ainsi le nombre de paramètres ajustables est limité à deux ce qui simplifie le modèle et permettra une convergence afin de déterminer la constante  $K_{Ca}$ .

- Étape 2 : les valeurs de  $K_{Ca}$  obtenues pour chacun des métaux et les paramètres de la modélisation Michaëlis-Menten ( $J_{max} = J_m^{MM}$  dans l'équation 8) au pH le plus élevé, (c'est-à-dire lorsque la compétition  $H^+/M^{2+}$  est la plus faible), à pH 8 pour le manganèse et à pH 6,5 pour le cadmium, sont utilisés pour calculer  $K_M$  (correspondant à  $K_{Mn}$  ou  $K_{Cd}$ ) ; on considère donc que  $K_H \cdot [H^+] \ll 1$  et l'équation 17 est simplifiée :

$$J_{int} = \frac{J_{max} \cdot K_M \cdot [M^{2+}]}{(1 + K_{Ca} \cdot [Ca^{2+}] + K_M \cdot [M^{2+}])} \quad (26)$$

- Étape 3 : en introduisant les valeurs de  $K_{Ca}$  et  $K_M$  dans l'équation 27, et en utilisant les valeurs de  $J_{int}$  mesurées au pH le plus faible (pH 5, condition pour laquelle la compétition  $H^+/M^{2+}$  est la plus importante), on peut alors résoudre la valeur  $K_H$ .

$$J_{int} = \frac{J_{max} \cdot K_M \cdot [M^{2+}]}{(1 + K_H \cdot [H^+] + K_{Ca} \cdot [Ca^{2+}] + K_M \cdot [M^{2+}])} \quad (27)$$

Ayant déterminé les valeurs de tous les paramètres ajustables, nous pourrions modéliser les taux de prise en charge des métaux.



## 4. PRISE EN CHARGE DES MÉTAUX

### 4.1. Introduction

Comme mentionné précédemment, nous avons choisi de travailler avec le manganèse et le cadmium. Le manganèse possède une spéciation aqueuse simple, ce qui en fait un bon candidat afin de nous affranchir de cofacteurs pouvant modifier les flux des métaux en fonction du pH (i.e. changement de spéciation). De plus, des systèmes de transport spécifiques à ce métal essentiel sont connus (Sunda et Huntsman, 1985 et 1998a). Le choix du cadmium comme second métal a été déterminé par le fait que c'est un contaminant d'intérêt environnemental, que sa spéciation est simple également, et qu'il y a des résultats dans la littérature qui suggèrent l'existence d'interactions compétitives avec le Mn (Sunda et Huntsman, 1998a et 1998b ; Topperwien *et al.*, 2007).

#### 4.1.1. Les métaux dans l'environnement

##### 4.1.1.1. Le manganèse

Le manganèse est un des éléments chimiques naturels les plus abondants de la croûte terrestre (Elias, 1981) et on le retrouve principalement dans les roches ignées, sédimentaires ou métamorphiques. Sa concentration moyenne dans la croûte terrestre est d'environ 1000 ppm (Noro, 1985). Un survol de la littérature indique que les concentrations naturelles dissoutes de manganèse sont généralement inférieures à 1 µM (Campbell et Stokes, 1985 ; Shanley, 1986 ; De Vitre et Davison, 1993).

Pour ce qui est du manganèse anthropique, ses principales sources sont les émissions des industries de l'acier et de ses alliages, de la fabrication de piles, ainsi que son utilisation comme agent oxydant dans l'industrie chimique ; les gaz d'échappements de voitures ainsi que les rejets des centrales nucléaires ( $^{54}\text{Mn}$ ) sont aussi mis en cause (Santé Canada, 1987 ; Adam et Garnier-Laplace, 2003).

La principale préoccupation environnementale concernant le manganèse est qu'il a une forte capacité à se solubiliser et qu'étant présent dans les eaux usées, il migre vers les eaux naturelles (Markich *et al.*, 2000). Notons qu'étant donné sa faible toxicité, l'écotoxicologie du manganèse a été très peu étudiée et les normes environnementales ont

été établies pour des raisons esthétiques ; les effets néfastes mentionnés sont les taches sur le linge et le goût désagréable que provoque une eau contenant plus de  $8,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de manganèse (Santé Canda, 1987).

#### 4.1.1.2. Le cadmium

Le cadmium est un métal que l'on retrouve naturellement dans les sols, les sédiments et les milieux aquatiques. Ses concentrations sont habituellement inférieures à  $1 \text{ nM}$  dans les eaux douces (Hoffman, 1995). Ses principales sources naturelles sont l'activité volcanique, l'érosion et les feux de forêts (Nriagu et Pacyna, 1989).

Les sources anthropiques de cadmium dans les eaux de surface sont principalement des mines de métaux non ferreux (zinc) ; le métal se retrouve dans les eaux de drainage et de ruissellement des zones minières mais aussi dans les émanations des raffineries (Cain et al., 2000). Les principales utilisations industrielles de ce métal sont les suivantes : stabilisateur du P.V.C. (polychlorure de vinyle), pigment dans les verres et les plastiques, protecteur de corrosion des aciers, composé de divers alliages, et matériau pour des électrodes dans les piles nickel-cadmium (Wilson, 1988).

En plus des apports de cadmium dissous, le cadmium particulaire contamine les sédiments lacustres et océaniques ; il peut se retrouver à nouveau dans la colonne d'eau par sa dissolution dans les eaux interstitielles des sédiments puis son déplacement vers l'interface sédiments-eau par diffusion (Van Den Berg et al., 1999), par resuspension des sédiments (ten Hulscher et al., 1992) ou par bioturbation (Wilson et Chang, 2000). Une fois dans la colonne d'eau, le Cd devient biodisponible pour l'ensemble du biotope aquatique. On peut aussi ajouter que l'acidification des milieux, qu'ils soient terrestres, sédimentaires ou aquatiques, augmente la mobilité du cadmium (Nelson et Campbell, 1991).

L'intérêt écotoxicologique du cadmium vient aussi du fait que, bien que les rejets de ce métal aient diminué au cours des dernières décennies (notamment grâce à l'amélioration des procédés industriels), son utilisation reste très importante et donc les risques de contamination environnementale le sont aussi (Adhiya et al., 2002).



## 4.1.2. Spéciation

### 4.1.2.1. Le manganèse

Dans la colonne d'eau, le métal est majoritairement présent dans la phase dissoute (c'est-à-dire peu associé à la phase particulaire) et il est principalement sous forme Mn(II) à bas pH (LaZerte et Burling, 1990). D'après Chiswell et Mokhtar (1987), Mn(II) ne forme pas de complexes labiles en eaux douces car les concentrations de ligands sont insuffisantes ; notons tout de même que, les complexes les plus probables sont  $\text{MnSO}_4$ , ( $\log K_{\text{MnSO}_4} = 2,25$ ) et  $\text{MnHCO}_3^+$  ( $\log K_{\text{MnHCO}_3^+} = 11,63$ ). Il n'y a pas non plus de preuve de chélation organique significative pour ce métal. Ses formes stables oxydées ou métastables, les oxydes de Mn(III) et (IV), sont très peu solubles et donc pas directement biodisponibles pour la prise en charge algale. Le Mn(II), par contre, est fortement soluble et rapidement pris en charge par le phytoplancton. L'oxydation de ce métal (Mn(II) en oxydes de Mn(III) ou Mn(IV)) peut être abiotique et autocatalytique (Morgan, 1967 ; Diem et Stumm, 1984), ou biotique. Dans le premier cas, la vitesse d'oxydation est fortement influencée par le pH, étant plus rapide à pH basique que neutre (Sunda et Huntsman, 1987 ; von Lagen et al., 1997). Notons que les algues unicellulaires photosynthétiques peuvent générer, lors de fleurs d'eau (*blooms*), des microenvironnements de pH élevé ( $> 9$ ), ce qui favorisera l'oxydation abiotique (Richardson et al., 1988 ; Knauer et al., 1999). Quant à l'oxydation biotique, Sunda et Huntsman (1987 et 1988) ont mis en évidence l'oxydation bactérienne du manganèse en milieu marin ; de plus, les algues vertes, comme *Scenedesmus subspicatus* (Knauer et al., 1999), peuvent également oxyder le manganèse au niveau de la surface algale.

La prochaine figure illustre bien la simplicité de la spéciation de ce métal. La distribution des espèces chimiques dominantes a été déterminée à l'aide du logiciel MINEQL+, version 4.5. Dans les milieux utilisés dans nos expériences, c'est sous la forme d'aquo-ion  $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  que l'on retrouve principalement le manganèse (98-99 %), et ce pour une gamme de pH allant de 5,0 à 8,0 (Fig. 4-1). Toutefois, à pH basique et lorsque la concentration de manganèse est élevée, il peut y avoir précipitation de la rhodochrosite ( $\text{MnCO}_3(\text{s})$ ,  $\log K_{\text{ps}} = 10,3$ ) (Fig. 4-2).

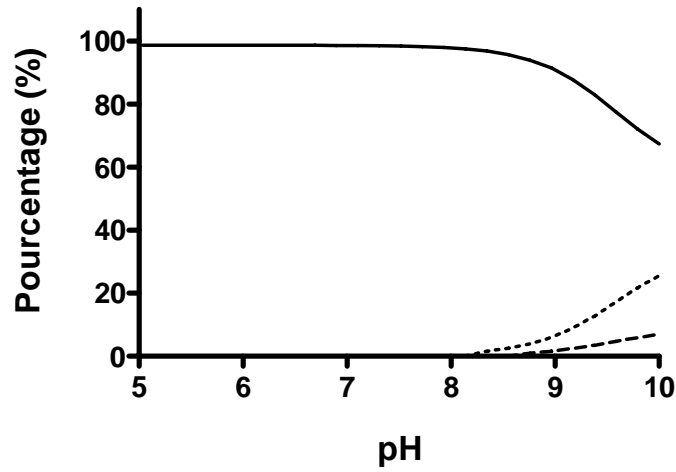


Figure 4-1 : Courbe de spéciation du manganèse ( $1 \cdot 10^{-9}$  M de métal total) dans le milieu MHSM-E à l'équilibre avec l'atmosphère.  $[Mn^{2+}]$  est représentée par la ligne pleine,  $[MnHCO_3^+]$  par la ligne en pointillés et  $[MnOH^+]$  par une ligne en tirets.

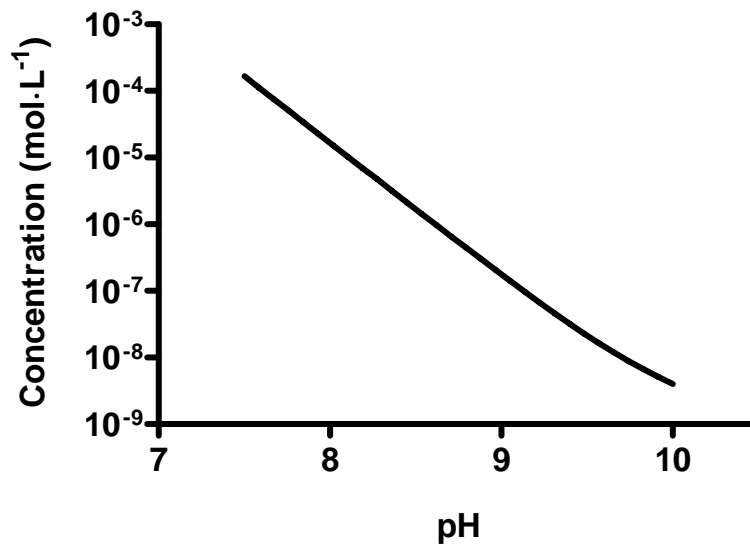


Figure 4-2 : Courbe de solubilité de la rhodochrosite ( $MnCO_3(s)$ ) dans le milieu MHSM-E à l'équilibre avec l'atmosphère.

Pour les expériences à pH 8, nous nous trouvions proche de la limite de solubilité. Il a donc fallu prendre des précautions pour minimiser les risques de précipitation de la rhodochrosite. En effet, si le pH du milieu d'exposition contenant le manganèse devait être ajusté avec un ajout de NaOH, il y avait précipitation puisque, lorsqu'une goutte de NaOH était ajoutée au milieu, le pH dans la zone de réception de cette goutte était suffisamment élevé pour entraîner la formation de la rhodochrosite. C'est pourquoi le pH de MHSM-E était ajusté à pH 8 avant l'ajout du métal et les milieux étaient équilibrés pendant 24 h ainsi que filtrés avant chaque exposition des algues (le filtre était analysé pour vérifier la présence de  $^{54}\text{Mn}$ ) et les concentrations de métal étaient déterminées à chaque étape des expériences, ce qui permettait de détecter toute trace de précipité (il est arrivé quelques rares fois, d'en mesurer, lorsqu'il a été nécessaire de réajuster le pH du milieu MHSM-E après avoir ajouter le métal ; ce qui a été pris en compte).

#### 4.1.2.2. Le cadmium

Le cadmium est un métal de classe intermédiaire-ambivalent (classification de Nieboer et Richardson, 1980) ; c'est-à-dire qu'il a des affinités pour les groupements fonctionnels comportant de l'oxygène mais aussi pour les groupements fonctionnels ayant des atomes d'azote ou du soufre.

En milieu marin, la majorité du métal est complexé par les chlorures, donnant principalement les complexes solubles  $\text{CdCl}^+$  et  $\text{CdCl}_2$  (Byrne et al., 1988 ; Millero et Hawke, 1992), ce qui implique une prise en charge nettement inférieure par les organismes marins, en comparaison avec les organismes d'eaux douces (Dobson, 1992).

En eaux douces, la spéciation du cadmium varie selon les conditions physico-chimiques du milieu, en particulier selon le pH, la concentration de  $\text{Cl}^-$ , celle de matière organique dissoute et de la concentration de particules en suspension (Lum, 1987 ; Stumm et Morgan, 1996 ; Xue et Sigg, 1998). Cependant, d'après Nelson et Campbell (1991), entre pH 4 et 7, dans les eaux du Bouclier canadien, la spéciation du cadmium varie très peu et  $\text{Cd}^{2+}$  est l'espèce largement majoritaire. De plus, Campbell et Stokes (1985) ont constaté que lors de l'acidification des cours d'eau, la proportion d'ion libre

métallique augmente faiblement et l'effet principal de la baisse du pH est l'atténuation de la toxicité du cadmium (chez *Chlorella kessleri* et *Scenedesmus obliquus*).

Dans la gamme de pH que nous avons étudiée, la spéciation du cadmium varie très peu (Fig. 4-3) mais à partir de pH 7 en montant, il y a un risque de sursaturation en  $\text{CdCO}_3(\text{s})$ , otavite, lorsque de fortes concentrations en Cd sont utilisées (Fig. 4-4) ; nous nous sommes donc limités à une gamme de pH allant de 5,0 à 6,5 pour s'affranchir de biais possibles causés par la précipitation du cadmium.

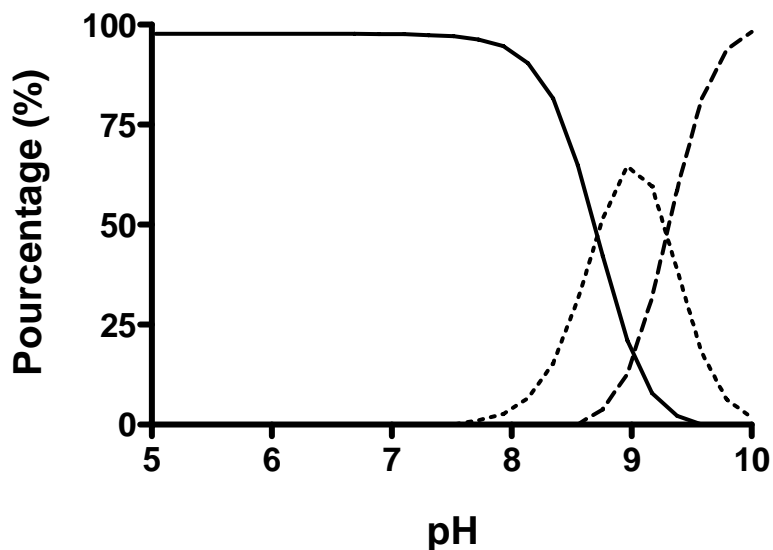


Figure 4-3 : Courbe de spéciation du cadmium ( $1 \cdot 10^{-9}$  M de cadmium total) dans le milieu MHSM-E en équilibre avec l'atmosphère.  $[\text{Cd}^{2+}]$  est représentée par la ligne pleine,  $[\text{CdCO}_3(\text{aq})]$  par la ligne en pointillés et  $[\text{Cd}(\text{CO}_3)_2^{2-}]$  par une ligne en tirets.

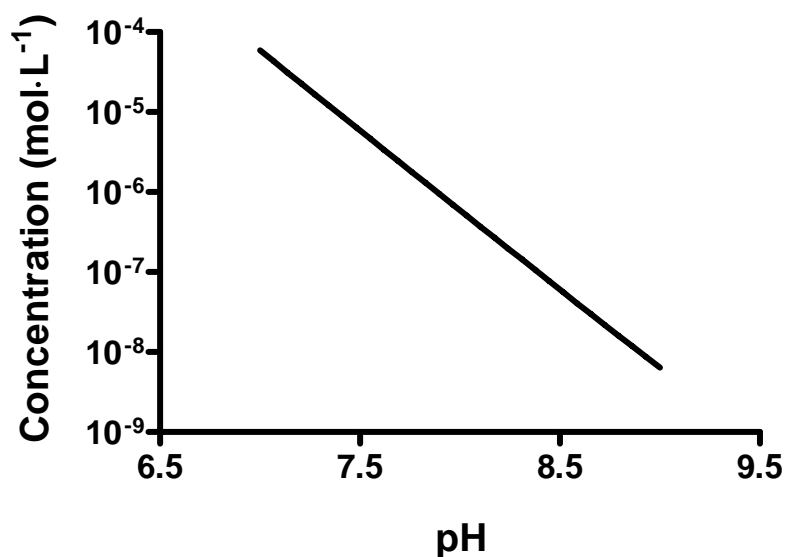


Figure 4-4 : Courbe de solubilité de l'otavite ( $\text{CdCO}_3(\text{s})$ ) dans le milieu MHSM-E à l'équilibre avec l'atmosphère.

### 4.1.3. Toxicité et bioaccumulation

#### 4.1.3.1. Le manganèse

Le manganèse est un nutriment essentiel et de nombreuses enzymes utilisent ses propriétés redox. Comme tout métal essentiel, en trop fortes concentrations, il devient toxique (Stumm et Morgan, 1996). En ce qui concerne le phytoplancton, le manganèse participe aux réactions de certaines enzymes impliquées dans le processus de respiration, dans celui de la photosynthèse et de l'assimilation de l'azote, dans les processus hormonaux, et dans la synthèse des acides aminés, entre autres (Noro, 1985 ; Raven *et al.*, 1999).

Knauer *et al.* (1999) ont déterminé les taux de croissance de l'algue verte *Scenedesmus subspicatus* pour une large gamme de concentrations de Mn afin d'évaluer ses concentrations essentielles et toxiques. Selon leurs résultats, quand  $[\text{Mn}^{2+}] < 1 \cdot 10^{-9}$  M, la croissance est limitée et quand  $[\text{Mn}^{2+}] > 1 \cdot 10^{-5}$  M, elle est inhibée. Notons que leurs

résultats indiquent que la prise en charge du manganèse est reliée à la concentration de l'ion libre.

Pour ce qui est du mécanisme d'adsorption de ce métal, Knauer et al. (1999) ont montré que plus de 90 % du manganèse cellulaire chez *Scenedesmus subspicatus* était présent sous la forme d'oxydes de Mn(III) et Mn(IV) (et moins de 5 %, sous forme de  $Mn^{2+}$  lié à des polymères chargés négativement) et que de petits oxydes de manganèse se trouvaient sur la surface de l'algue. Par ailleurs, rappelons que la surface algale de *C. reinhardtii* possède une variété de groupes fonctionnels, dont R-COOH, R-OH, R-CN<sup>-</sup> et R-NH<sub>2</sub> (Kiefer et al., 1997), auxquels le manganèse aura tendance à se lier. C'est un métal intermédiaire-ambivalent avec un fort caractère de classe A (Nieboer et Richardson, 1980) et il a de l'affinité pour les groupements fonctionnels contenant de l'oxygène ou de l'azote.

Sunda et Huntsman, (1985) ont étudié les mécanismes qui régissent l'accumulation du manganèse chez une algue unicellulaire *Chlamydomonas* sp. dans de l'eau de mer tamponnée. Les auteurs suggèrent que le Mn cellulaire est régulé par un mécanisme de rétroaction négative (le flux intracellulaire maximal  $J_{max}$ , augmente chez les algues qui sont acclimatées à des concentrations faibles en  $Mn^{2+}$ ), ce qui est en accord avec la littérature antérieure. Les cellules maintiennent une concentration de manganèse cellulaire constante (pour un taux de croissance constant) en faisant varier la capacité de transport,  $J_{max}$  (Fig. 4-5). Il faut noter que la capacité de régulation des cellules est limitée ; si  $[Mn^{2+}]$  est trop basse,  $[Mn \text{ cellulaire}]$  diminue. La concentration cellulaire apparente régulée est, chez *Chlamydomonas* sp., de  $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et ceci représente au moins cinq fois la concentration requise pour une croissance maximale ; cette réserve permettrait à la cellule d'avoir une marge de sécurité en cas de carence.

La régulation par rétroaction est courante pour la prise en charge de nutriments par les cellules. Ce phénomène existe souvent entre les concentrations cellulaires de métal et le taux de croissance, puisqu'ils s'influencent mutuellement : d'une part, le quota cellulaire de manganèse permettra de maintenir une bonne croissance cellulaire ; d'autre part, la croissance fera diminuer le quota cellulaire de métal, ce qui déclenche le mécanisme de régulation par rétroaction.

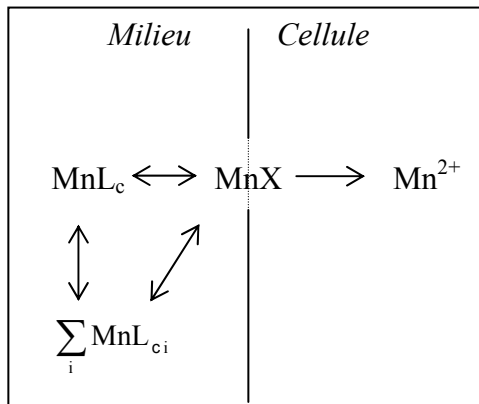


Figure 4-5 : Modèle schématisé de la prise en charge du manganèse dans les cellules de *Chlamydomonas* sp. par formation de complexes avec les sites de transport membranaire X (ligand biotique). MnX représente les complexes « Mn-site de transport »,  $L_c$  est un ligand intracellulaire, les complexes de Mn dans le milieu extérieur sont représentés par  $\sum_i [MnL_{c_i}]$  (adaptée de [Sunda et Huntsman, 1985](#)).

Les travaux cités précédemment ont permis de comprendre le comportement du manganèse chez les algues marines. Cependant, contrairement au milieu marin, le pH en eaux douces est très variable et la prise en charge du manganèse peut être fortement influencée.

#### 4.1.3.2. Le cadmium

Le cadmium est généralement considéré comme étant un élément non essentiel. On peut toutefois noter que [Lee et al. \(1995\)](#) ont montré qu'il peut remplacer partiellement le zinc comme nutriment chez la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* et permet d'augmenter sa croissance en cas de limitation en zinc. Le cadmium, en remplaçant le zinc, permettrait de restaurer l'activité de l'enzyme anhydrase carbonique qui joue un rôle majeur dans la croissance.

En dehors de ce cas isolé, le cadmium est un élément classé comme très toxique et relativement accessible qui se trouve sur la liste des substances prioritaires de l'USEPA,

Agence environnementale des États-Unis (Adhiya et al., 2002) et sur la liste de substances d'intérêt prioritaire d'Environnement Canada (1999).

Le mécanisme de toxicité du cadmium chez les algues n'est pas très bien documenté mais on sait qu'il est facilement pris en charge par les algues vertes et qu'il affecte entre autres, la photosynthèse, la synthèse de chlorophylle, la croissance ainsi que la prise en charge de l'eau et des nutriments (Faller et al., 2005). Faller et al. (2005) ont constaté que le cadmium modifiait la photosynthèse et entraînait une baisse de la reproduction cellulaire : le cadmium se lie aux sites de transport du calcium sur le photosystème II, ce qui inhibe la photoactivation et la production d'oxygène<sup>3</sup> en est modifiée.

Les concentrations de cadmium auxquelles une toxicité sera observée sur les algues, ont été largement étudiées (les résultats des références citées ci-après sont regroupées dans le tableau 4-1). Les résultats obtenus peuvent être très variables selon l'organisme étudié et la composition du milieu utilisé (Errécalde et al., 1998 ; Maloney, 2007). D'ailleurs, les données de toxicité ne sont pas toujours facilement comparables (par exemple les CE<sub>30</sub> ou CI<sub>50</sub>, Macfie et al., 1994; Lawrence et al., 1989). Les méthodes de culture, continue (Lawrence et al., 1989 ; Lin et al., 1996) ou en lots (Errécalde et al., 1998 ; Boily, 2004) sont aussi importantes ; dans le cas des cultures en lots, la concentration de métal dans le milieu peut diminuer de façon importante (Paquet, 2007). De plus, la spéciation du métal n'est pas toujours considérée : si la toxicité est estimée en fonction du cadmium total (plutôt qu'en fonction de la concentration d'ion libre, Chen et al., 1997), ce qui est souvent le cas (Chen et Lin, 1997 ; Franklin et al., 2002), il peut y avoir sous-estimation de l'impact du métal.

En raison de son importance écotoxicologique en tant que métal considéré comme non essentiel, le cadmium est un métal d'un grand intérêt.

---

<sup>3</sup> La production d'oxygène pendant le processus de photosynthèse correspond à la réaction de photolyse de l'eau qui génère de l'oxygène moléculaire.



#### 4. Prise en charge des métaux

Tableau 4-1 : Résumé des résultats pour des expériences de toxicité du cadmium sur des algues unicellulaires (ordonnés suivant leur citation dans le texte). Dans la colonne « Type de mesure »,  $\mu$  correspond au taux de croissance.

Référence	Espèce algale	Type de mesure	Résultat (nM)	Spéciation du Cd	Milieu d'exposition
<u>Macfie et al. (1994)</u>	<i>C. reinhardtii</i>	Biomasse (120h-CE <sub>50</sub> )	4500 à pH 5 100 à pH 6,8	Cd <sup>2+</sup> (calculé après ajout nominal)	HSM modifié
<u>Maloney (2007)</u>	<i>P. subcapitata</i>	$\mu$ (96h-CI <sub>50</sub> )	58 à 185	Cd <sup>2+</sup>	CEAEQ Avec variations de [Mg <sup>2+</sup> ], [Ca <sup>2+</sup> ], [Cu <sup>2+</sup> ], [Fe <sup>3+</sup> ], [Zn <sup>2+</sup> ]
<u>Lawrence et al. (1989)</u>	<i>C. reinhardtii</i>	Culture continue Biomasse à l'état stationnaire après 7 j	67	Cd total	Milieu de culture
<u>Errécalde et al. (1998)</u>	<i>P. subcapitata</i>	Biomasse (72h-CI <sub>50</sub> )	36 280	Cd <sup>2+</sup>	FRAQUIL avec citrate FRAQUIL avec NTA
<u>Lin et al. (1996)</u>	<i>P. subcapitata</i>	Culture continue $\mu$ (24h-CI <sub>50</sub> )	285	Cd total	SAAM avec EDTA
<u>Boily (2004)</u>	<i>C. reinhardtii</i>	$\mu$ (72h-CI <sub>50</sub> )	450	Cd <sup>2+</sup>	MHSM-1
<u>Paquet (2007)</u>	<i>P. subcapitata</i>	$\mu$ (96h-CE <sub>50</sub> )	(a)* 83 (b)* 20	Cd <sup>2+</sup>	CEAEQ
<u>Chen et Lin (1997)</u>	<i>P. subcapitata</i>	$\mu$ (24h-CI <sub>50</sub> ) (avec 1 $\mu$ M d'EDTA)	3030	Cd total	Milieu USEPA modifié
<u>Chen et al. (1997)</u>	<i>P. subcapitata</i>	Culture continue $\mu$ (24h-CI <sub>50</sub> ) (avec 1 $\mu$ M d'EDTA)	116 36	Cd total Cd <sup>2+</sup>	Milieu USEPA modifié
<u>Franklin et al. (2002)</u>	<i>Chlorella</i> sp.	$\mu$ (48h-CI <sub>50</sub> ) $\mu$ (72h-CI <sub>50</sub> )	850 850	Cd total	Eau douce synthétique USEPA modifiée

\* : densité cellulaire initiale de : (a) 10 000 Cellules·mL<sup>-1</sup>, (b) 2500 Cellules·mL<sup>-1</sup>.

## **4.2. Expériences**

### **4.2.1. Cinétique**

Une des expériences préliminaires de nos travaux a été l'étude de la cinétique d'internalisation du manganèse à pH 7 afin de vérifier que le protocole expérimental permettait de déterminer la prise en charge métallique de façon optimale (cf. section 2.3). Les algues étaient exposées à un milieu MHSM-E contenant 50 nmoles par litre de manganèse (> 99 % sous la forme  $Mn^{2+}$  libre) et la prise en charge était mesurée par trois fois à six temps différents : 0, 10, 20, 30, 45 et 60 min. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Au cours de ces expériences, l'adsorption sur les algues a aussi été mesurée (une valeur pour chaque jeu de trois mesures).

### **4.2.2. Prise en charge métallique**

Les tableaux 4-2 (pour le Mn) et 4-3 (pour le Cd) présentent le nombre d'expériences indépendantes effectuées dans des conditions différentes de pH et tampons, qui seront détaillées dans les sections suivantes.

Quelles que soient les conditions d'exposition, la procédure était toujours identique : les algues étaient inoculées dans MHSM-C, puis, après 72 h, une quantité précise d'algues étaient à nouveau transférée dans du milieu frais pour atteindre une concentration initiale de 40 000 cellules·mL<sup>-1</sup>. Après 48 h de croissance, les algues étaient récoltées par filtration et rincées. Les algues étaient ensuite exposées pendant 45 min dans le milieu MHSM-E contenant le métal (détails dans la section 2.3). La gamme de pH testée allait de 5,0 à 8,0. Le tampon HEPES était utilisé pour les milieux à pH 7,0-8,0 et le tampon MES pour les milieux à pH 5,0-6,5.

#### 4. Prise en charge des métaux

Tableau 4-2 : Expériences indépendantes effectuées avec le Mn dans des conditions différentes de pH et de tampons. HEPES et MES sont les tampons présents dans le milieu ; (F1) correspond à des algues qui ont toujours été cultivées à pH 5,0 ; (Ca) et (Cr) correspondent à des expériences où la concentration de calcium ou de chrome varie.

Approche	Type d'approche	pH d'acclimatation (MHSM-C)	pH d'exposition (MHSM-E)	Nombre d'expériences
A	Même pH d'acclimatation et d'exposition	8 (HEPES)	8 (HEPES)	4
		6,5 (MES)	6,5 (MES)	5
		5 (MES)	5 (MES)	4
B	Prise en charge à différents pH pour une même culture	7 (HEPES)	8 (HEPES), 6,5 (MES), 5 (MES)	1
C	Influence du pH d'acclimatation	5 (MES, F1)	5 (MES, F1)	3
		8 (HEPES)	6,5 (MES)	2
		6,5 (MES)	8 (HEPES)	2
D	Très faibles concentrations métalliques	7 (HEPES)	7 (HEPES)	3
E	Variation de la concentration d'un élément autre que le métal d'intérêt	6,5 (MES)	6,5 (MES, Cr)	1
		8 (HEPES)	8 (HEPES, Ca)	3

#### 4. Prise en charge des métaux

Tableau 4-3 : Expériences indépendantes avec le cadmium effectuées dans des conditions différentes de pH et de tampon. (MES) est indiqué lorsque ce tampon est présent dans le milieu ; (ST) signifie « sans tampon » ; (F1) correspond à des algues qui ont toujours été cultivées à pH 5 ; (Ca) correspond à des expériences où la concentration de calcium varie.

Approche	Type d'approche	pH d'acclimatation (MHSM-C)	pH d'exposition (MHSM-E)	Nombre d'expériences
A	Même pH d'acclimatation et d'exposition	6,5 (MES)	6,5 (MES)	4
		5 (MES)	5 (MES)	6
C	Influence du pH d'acclimatation	5 (MES, F1)	5 (MES, F1)	2
		6,5 (MES)	5 (MES)	2
		5 (MES)	6,5 (MES)	1
E	Variation de la concentration d'un élément autre que le métal d'intérêt	6,5 (MES)	6,5 (MES, Ca)	2
F	Influence du tampon	6,5 (ST)	6,5 (ST)	4
		5 (ST)	5 (ST)	3

### 4.2.3. Le pH

#### 4.2.3.1. Le manganèse

Lors des expériences de prise en charge du manganèse pour des algues acclimatées et exposées aux pH 5,0 (MES), 6,5 (MES) et 8,0 (HEPES), la fraction intracellulaire de manganèse a été mesurée pour des concentrations de métal libre en solution allant de  $1 \cdot 10^{-11}$  à  $6 \cdot 10^{-4}$  M (Approche A, Tableau 4-2).

Du fait des limitations de matériel et de temps, il est difficile de comparer simultanément l'effet du pH sur la prise en charge du manganèse en se servant d'algues issues de la même culture. Cependant nous avons pu effectuer une expérience aux trois

pH sur une même culture (Approche B, Tableau 4-2). Les algues ont été cultivées à pH 7 (HEPES) puis réparties dans des milieux d'exposition à pH 8 (HEPES), pH 6,5 (MES) et pH 5 (MES). Nous avons obtenu trois mesures pour chaque concentration testée ( $\geq 3$ ) à chaque pH.

L'influence de l'acclimatation (ou de l'absence d'acclimatation) des cellules au pH du milieu d'exposition sur les flux de prise en charge de métaux a déjà été évoquée dans la littérature pour expliquer certaines divergences de résultats. Par exemple, De Schamphelaere et Janssen (2006) ont comparé leur étude de la toxicité du cuivre pour *P. subcapitata* et *C. vulgaris* avec les travaux antérieurs de Macfie et al. (1994) sur la prise en charge métallique (Cd, Co, Cu et Ni) chez *C. reinhardtii* ; ils ont suggéré que la différence dans l'ampleur de l'effet du pH (plus faible chez *C. reinhardtii*) pourrait être partiellement expliquée par le fait que les cellules étaient acclimatées au pH expérimental pendant 4 jours avant l'exposition au métal tandis que De Schamphelaere et Janssen (2006) n'ont pas acclimaté leurs algues. C'est pourquoi, l'influence du pH d'acclimatation (MHSM-C, rappelons que les algues proviennent d'une culture mère dans MHSM-1 à pH 7) sur la saturation des transporteurs transmembranaires du métal (sur  $J_{\max}$ ) a aussi été testé (deux expériences indépendantes pour chaque condition) (Approche C, Tableau 4-2) : des cellules ont été acclimatées à pH 8 (HEPES) et exposées à pH 6,5 (MES), tandis que d'autres algues ont été acclimatées à pH 6,5 (MES) et exposées à pH 8 (HEPES). Notons que pour toutes ces expériences, l'adsorption du Mn sur les algues a été mesurée pour les trois essais.

Nous avons aussi vérifié l'influence d'une acclimatation plus longue (Approche C, Tableau 4-2) : la prise en charge du Mn par des algues cultivées à pH 5 depuis la gélose (F1 pour première génération) a été étudiée pour la comparer à celle mesurée pour des algues cultivées à pH 7 et transférées dans le milieu MHSM-C d'acclimatation à pH 5 seulement 5 jours avant l'expérience (cf. section 2.3.1). Nous pouvons ajouter que nous avons choisi un pH de 5 dans l'éventualité d'une comparaison avec le cadmium et en gardant à l'esprit les nombreux cas d'acidification d'origine anthropique.

#### 4.2.3.2. Le cadmium

Lors des expériences de prise en charge du cadmium par des algues acclimatées et exposées aux pH 5,0 (MES) et 6,5 (MES), le cadmium intracellulaire a été mesuré pour des concentrations de métal libre en solution allant de  $1 \cdot 10^{-10}$  à  $5 \cdot 10^{-4}$  M (Approche A, Tableau 4-3).

Outre les expériences à pH 5,0 et 6,5 où les algues étaient acclimatées et exposées au même pH, nous avons effectué des expériences, en présence de tampon MES, pendant lesquelles les cellules ont été acclimatées à pH 6,5 et exposées à pH 5 (deux expériences indépendantes), tandis que d'autres algues ont été acclimatées à pH 5 et exposées à pH 6,5 (une expérience) (Approche C, Tableau 4-3). Notons que pour toutes ces expériences, l'adsorption du Cd sur les algues a été mesurée pour les trois essais.

De plus, nous avons une nouvelle fois vérifié si le fait que les algues soient acclimatées plus longtemps à un pH avait une influence (Approche C, Tableau 4-3) : la prise en charge du Cd par des algues cultivées ayant toujours été cultivées à pH 5 a été étudiée pour la comparer à celle mesurée pour des algues cultivées à pH 7 et transférées dans le milieu d'acclimatation à pH 5 seulement 5 jours avant l'expérience (cf. section 2.3.1).

#### 4.2.4. Autres expériences

##### 4.2.4.1. Concentration de manganèse

L'existence de deux systèmes de transport pour le manganèse a déjà été proposée (Noro, 1985 ; Ross, 1993 ; Gadd et Laurence, 1996). Il pourrait exister un système de transport de haute affinité saturé à de faibles concentrations de métal et un autre système de moins grande affinité saturable à de plus hautes concentrations. Nous avons donc étudié la prise en charge du métal pour des concentrations dissoutes entre  $1 \cdot 10^{-11}$  à  $1 \cdot 10^{-8}$  M, et ce à pH 7 (HEPES) (Approche D, Tableau 4-2).

#### 4.2.4.2. Effet du chrome sur la prise en charge du manganèse

Une contrainte liée à l'utilisation de l'isotope radioactif choisi ici, est que le produit de dégradation du  $^{54}\text{Mn}$  (demi-vie de 312,3 jours) est le  $^{54}\text{Cr(III)}$  (stable). Les concentrations de chrome dans nos milieux d'exposition se situaient entre  $2,5 \cdot 10^{-12}$  et  $6,6 \cdot 10^{-11}$  M, selon l'âge de l'échantillon radioactif. Afin de nous assurer que la présence de chrome n'introduit pas de biais dans nos mesures, son effet sur la prise en charge du manganèse (Approche E, Tableau 4-2) a été testé à pH 6,5 pour une concentration de Mn de  $3,5 \cdot 10^{-10}$  M et huit concentrations nominales de chrome entre  $1,5 \cdot 10^{-12}$  et  $1,0 \cdot 10^{-9}$  M obtenues par l'ajout d'un volume approprié d'une solution étalon de chrome ( $\text{Cr(NO}_3)_3$ , étalon ICP,  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 4 %  $\text{HNO}_3$ , SCP Science).

#### 4.2.4.3. Effet du tampon MES sur la prise en charge du cadmium

Comme mentionné plus tôt, le tampon MES était utilisé dans tous les milieux avec tampon pour l'étude de la prise en charge du cadmium. Pour des fins de comparaison, la prise en charge sans tampon a été étudiée (Approche F, Tableau 4-3). Les algues cultivées à pH 7 (HEPES) depuis la gélose étaient acclimatées dans un milieu sans tampon au pH désiré 5 jours avant l'expérience ; le pH était maintenu constant à l'aide d'un pHstat (section 2.1.3) qui permettait l'ajout de  $\text{HNO}_3$  (0,01 M) ou de  $\text{NaOH}$  (0,05 M) selon le besoin. La prise en charge du cadmium, dans un milieu d'exposition également sans tampon, par ces algues a ensuite été comparée, pour un même pH, avec celles d'algues acclimatées et exposées dans des milieux avec tampon MES.

#### 4.2.4.4. Effet du calcium

##### 4.2.4.4.1. Le manganèse

Tel que discuté précédemment dans le Chapitre 3, le calcium est reconnu comme un inhibiteur de la prise en charge des métaux divalents chez les algues (Hauck *et al.*, 2002 ; Slaveykova et Wilkinson, 2002 ; Mosulén *et al.*, 2003 ; Kola et Wilkinson, 2005). Nous

avons donc testé cet effet potentiel (Approche E, Tableau 4-2) en augmentant la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  à pH 8 (trois expériences indépendantes). A ce pH, la compétition  $\text{Mn}^{2+}/\text{H}^+$  est faible et peut être considérée comme négligeable, ce qui facilite le calcul de la constante d'affinité ( $K_{\text{Ca}}$ ) pour le transporteur du manganèse (Chap. 3). La concentration totale de métal était constante à  $0,5 \mu\text{M}$ , une concentration bien en-dessous du niveau de saturation des transporteurs du Mn. La concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  a été variée de 0 à  $1 \cdot 10^{-3}$  M par ajouts à partir de solutions stock préparées avec un sel de nitrate de calcium (Sigma Aldrich). La force ionique des milieux d'exposition était maintenue à  $6 \text{ meq} \cdot \text{L}^{-1}$  en ajustant la concentration de  $\text{KNO}_3$  (Caledon, Georgetown, ON, Canada). Bien que la variation de la concentration en potassium qui résulte de cette substitution puisse à son tour influencer sur la prise en charge du Mn, nous avons considéré comme négligeable cette compétition potentielle. Notons par ailleurs que [Heijerick \*et al.\* \(2002\)](#) ont montré qu'une large gamme de concentrations de potassium (0,08-1,12 mM) n'avait pas d'effet sur la toxicité du zinc sur l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*.

#### 4.2.4.4.2. Le cadmium

Nous avons également testé l'effet inhibiteur du calcium sur la prise en charge du cadmium (Approche E, Tableau 4-3) et ceci en augmentant la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  à pH 6,5 (deux expériences indépendantes). La concentration totale de métal, nettement en-dessous du niveau de saturation, donc dans la portion linéaire de la courbe d'accumulation, était constante à  $1 \mu\text{M}$ . La concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  a été variée de 0 à  $1 \cdot 10^{-3}$  M par ajouts de petits volumes de solutions stock préparées à partir de sel de nitrate de calcium. Comme pour le manganèse, la force ionique des milieux d'exposition était maintenue à  $6 \text{ meq} \cdot \text{L}^{-1}$  en ajustant la concentration de  $\text{KNO}_3$ .

### 4.3. Résultats

#### 4.3.1. Cinétique

La figure 4-6 présente les résultats de la cinétique de prise en charge du manganèse par *Chlamydomonas reinhardtii*, et la figure 4-7, celle de l'adsorption correspondante. Si



l'on s'intéresse d'abord à l'internalisation du manganèse (Fig. 4-6), on constate une augmentation plutôt linéaire après un délai d'environ 10 min. On obtient une droite de régression linéaire d'équation :  $Y = 6,5 \cdot 10^{-2} \cdot X - 8,6 \cdot 10^{-2}$  qui passe tout de même à proximité de l'origine. Ceci indique que la discrimination entre le métal absorbé et celui adsorbé, à l'aide du rinçage à l'EDTA, est efficace. En effet, d'après de nombreuses études dont celles de Bates *et al.* (1982) et Schenck *et al.* (1988), l'adsorption augmente très rapidement (dans la première minute) pour atteindre un plateau ; une mauvaise discrimination entre absorption et adsorption aurait donc donné une ordonnée positive et éloignée de l'origine. D'ailleurs, nos mesures d'adsorption (Fig. 4-7), confirment ce type de comportement.

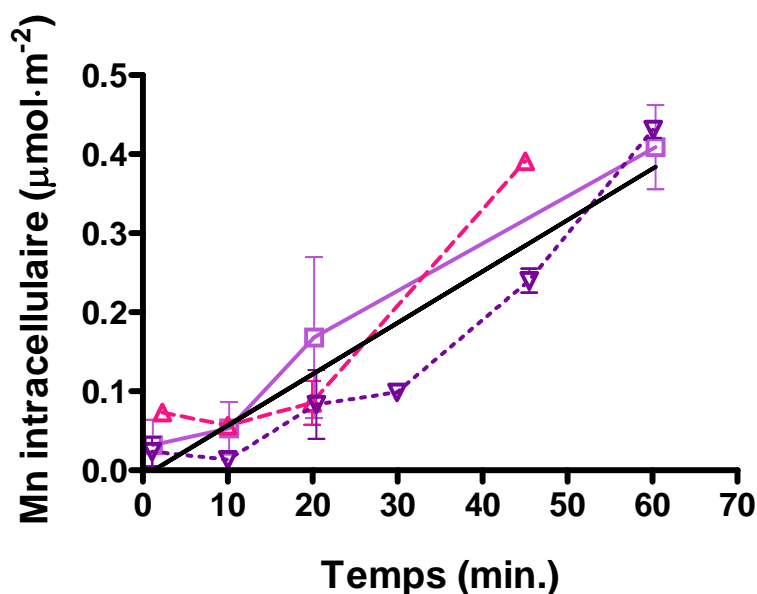


Figure 4-6 : Cinétique de prise en charge du manganèse par *Chlamydomonas reinhardtii*, pour trois essais indépendants avec une concentration totale en Mn de 50 nM, à pH 7. La droite de régression (ligne noire d'équation  $Y = 6,5 \cdot 10^{-2} \cdot X - 8,6 \cdot 10^{-2}$ ) a été calculée à partir de toutes les mesures. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3).

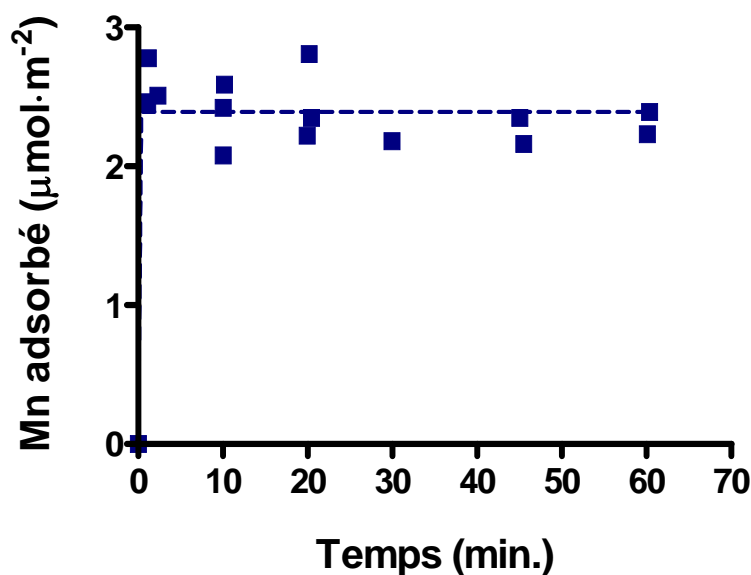


Figure 4-7 : Cinétique d'adsorption du manganèse par *Chlamydomonas reinhardtii* pour une concentration totale en Mn de 50 nM, à pH 7 (n = 1). La ligne en pointillée représente le résultat d'une régression non linéaire des mesures.

### 4.3.2. Adsorption

#### 4.3.2.1. Le manganèse

L'adsorption du manganèse à la surface cellulaire est linéaire sur toute notre gamme de concentrations d'ion métallique libre, et ce aux trois pH (Fig. 4-8). Le tableau 4-4 présente les équations des droites de régression et les coefficients de détermination aux différents pH.

Aucun effet significatif du pH sur l'adsorption du manganèse n'a été observé (fig.4-8) ; les pentes n'étaient pas significativement différentes ( $P = 0,06$ ). Le fait que les algues étaient acclimatées à un pH différent de celui auquel elles étaient exposées n'a eu que peu d'effet sur l'adsorption du métal quand les cellules étaient acclimatées à pH 8 et exposées à pH 6,5 ( $P = 0,11$  en comparaison aux algues acclimatées et exposées à pH 6,5) (Fig. 4-9). Par contre, les pentes étaient significativement différentes pour les algues acclimatées et exposées à pH 8 et pour celles acclimatées à pH 6,5 et exposées à pH 8 ( $P = 0,04$ ), mais cette différence était relativement faible (Fig.4-10).

#### 4. Prise en charge des métaux

Tableau 4-4 : Récapitulatif des résultats (et leur erreur-type) de régression linéaire de l'adsorption du manganèse en fonction de l'ion métallique libre.

pH de culture mère	pH de culture	pH d'exposition	pente	$r^2$
7,0	7,0	8,0	$7,1 \pm 0,4$	0,94
7,0	7,0	6,5	$7,7 \pm 0,5$	0,92
7,0	7,0	5,0	$7,9 \pm 0,2$	0,99
7,0	8,0	6,5	$9,7 \pm 0,5$	0,98
7,0	6,5	8,0	$10,3 \pm 0,3$	0,99

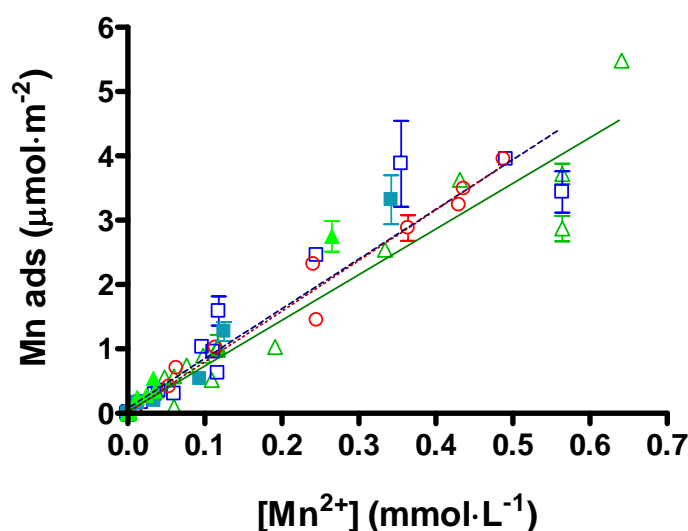


Figure 4-8 : Adsorption du manganèse en fonction de la concentration de métal libre (après 45 min d'exposition), à pH 8 ( $\Delta$ ), pH 6,5 ( $\square$ ), pH 5 ( $\circ$ ), pour des algues acclimatées à pH 6,5 et exposées à pH 8 ( $\blacktriangle$ ) et pour des algues acclimatées à pH 8 et exposées à pH 6,5 ( $\blacksquare$ ). Les droites de régressions linéaires sont présentées à pH 8 (ligne pleine), pH 6,5 (ligne en tirets) et pH 5 (ligne en pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (voir la section 4.2 pour des explications sur le nombre d'essais).

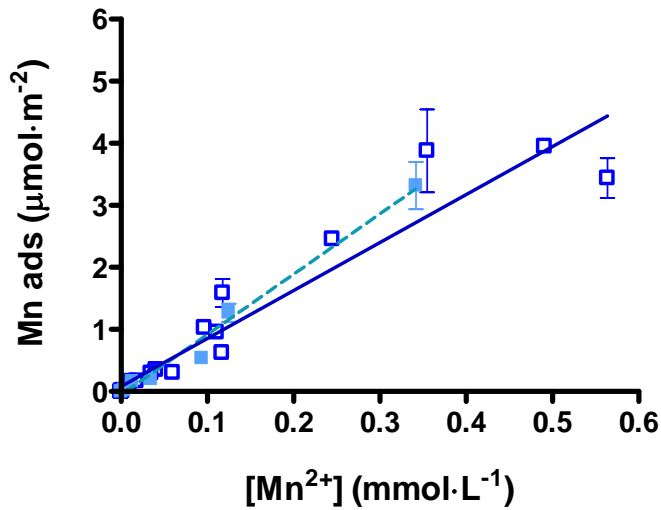


Figure 4-9 : Adsorption du manganèse en fonction de la concentration de métal libre (après 45 min d'exposition), pour des algues acclimatées et exposées à pH 6,5 (□) et pour des algues acclimatées à pH 8 et exposées à pH 6,5 (■). Les régressions linéaires sont respectivement la **ligne pleine** et la **ligne en tirets**. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (voir la section 4.2 pour des explications sur le nombre d'essais).

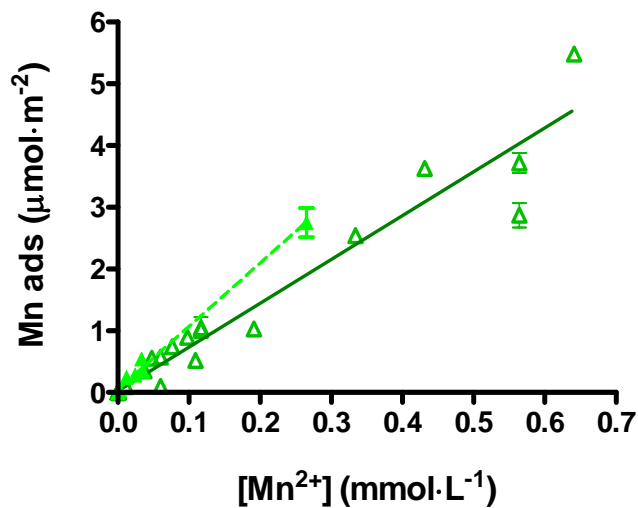


Figure 4-10 : Adsorption du manganèse en fonction de la concentration de métal libre (après 45 min d'exposition), pour des algues acclimatées et exposées à pH 8 (Δ) et pour des algues acclimatées à pH 6,5 et exposées à pH 8 (▲). Les régressions linéaires sont respectivement la **ligne pleine** et la **ligne en tirets**. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (voir la section 4.2 pour des explications sur le nombre d'essais).

### 4.3.2.2. Le cadmium

L'adsorption du cadmium en fonction de  $[Cd^{2+}]$  était linéaire aux deux pH (Fig. 4-11a et 4-11b), et les résultats des régressions linéaires sont présentés dans le tableau 4-5. Contrairement au cas du manganèse, l'adsorption de Cd augmente significativement avec le pH : à pH 6,5 la pente était de  $28,9 \pm 1,8$  alors qu'à pH 5, elle était de  $11,7 \pm 0,4$  ( $P < 0,001$ ).

Le pH auquel les algues étaient acclimatées n'a pas influencé l'adsorption (Fig. 4-11a) : la pente de la courbe d'adsorption pour les algues acclimatées à pH 5 et exposées à pH 6,5 n'est pas significativement différente de celle des algues acclimatées et exposées à pH 6,5 ( $P = 0,43$ ) ; les pentes des courbes d'adsorption pour des algues acclimatées à pH 6,5 et exposées à pH 5 et pour des algues acclimatées et exposées à pH 5, ne sont pas non plus significativement différentes ( $P = 0,74$ ) (Fig. 4-11b).

Tableau 4-5 : Récapitulatif des résultats (et leur erreur-type) de régression linéaire de l'adsorption du cadmium en fonction de l'ion métallique libre.

<b>pH de culture mère</b>	<b>pH de culture</b>	<b>pH d'exposition</b>	<b>pente</b>	<b><math>r^2</math></b>
7,0	7,0	6,5	$28,9 \pm 1,8$	0,87
7,0	7,0	5,0	$11,7 \pm 0,4$	0,97
7,0	5,0	6,5	$23,8 \pm 0,5$	0,99
7,0	6,5	5,0	$12,0 \pm 0,2$	0,99

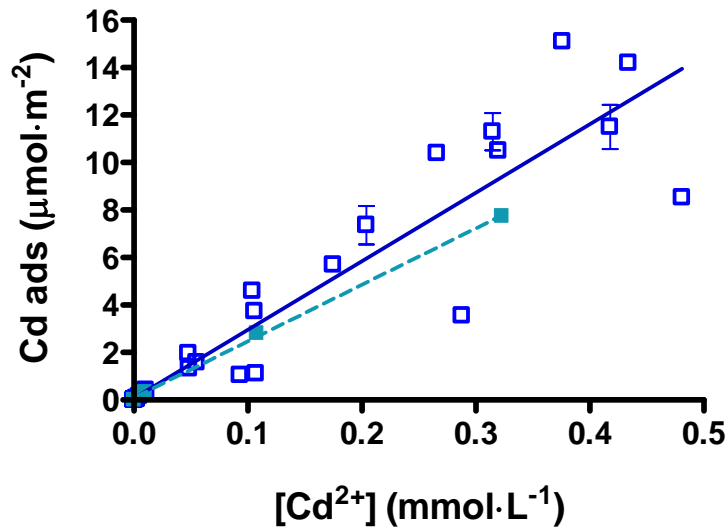


Figure 4-11a : Adsorption du cadmium en fonction de la concentration de métal libre, après 45 min d'exposition, pour des algues acclimatées et exposées à pH 6,5 ( $\square$ ) et pour des algues acclimatées à pH 5 et exposées à pH 6,5 ( $\blacksquare$ ). Les régressions linéaires sont respectivement la **ligne pleine** et la **ligne en tirets**. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole et que  $n = 3$ .

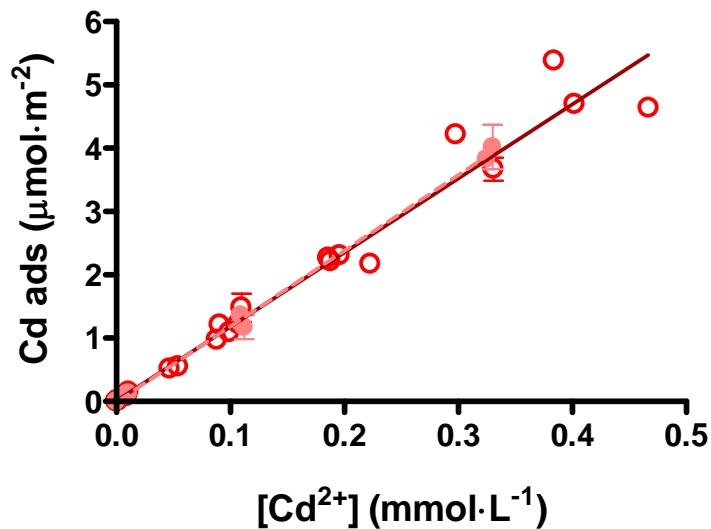


Figure 4-11b : Adsorption du cadmium en fonction de la concentration de métal libre, après 45 min d'exposition, pour des algues acclimatées et exposées à pH 5 ( $\circ$ ), pour des algues acclimatées à pH 6,5 et exposées à pH 5 ( $\bullet$ ). Les régressions linéaires sont respectivement la **ligne pleine** et la **ligne en tirets**. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole et que  $n = 3$ .

### 4.3.3. Prise en charge métallique

#### 4.3.3.1. Le manganèse

La figure 4-12 présente les flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration d'ion libre en solution à pH 8, 6,5 et 5. On observe un plateau de saturation qui commence quand  $[Mn^{2+}]$  atteint  $\sim 0,1$  mM. Le comportement observé est caractéristique d'un processus de saturation Michaëlis-Menten. Les tableaux 4-6a et 4-6b présentent respectivement les paramètres estimés par régression non linéaire du modèle Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) et leurs intervalles de confiance à 95 %. Notons que, comme mentionné dans le tableau 4-2, les résultats sont issus de quatre expériences à pH 8 et quatre autres à pH 5 ainsi que de cinq expériences à pH 6,5. Cette approche avait pour but de couvrir toute la gamme de concentration de manganèse et de vérifier la répétabilité des mesures.

On peut remarquer dans le tableau 4-6a que le flux maximal d'internalisation,  $J_{Mn}^{MM}$  augmente avec le pH, tendance qui ne correspond pas à la prédiction du BLM (cf. section 1.3). Remarquons tout de même que le tableau 4-6b indique que les  $J_{Mn}^{MM}$  à pH 6,5 et 8 ne sont pas significativement différents, puisque les intervalles de confiance à 95 % se chevauchent (le  $J_{Mn}^{MM}$  obtenu à pH 5 est significativement différent de ceux obtenus à pH 6,5 et 8). De plus, les valeurs apparentes de  $K_m^{MM}$  sont supposées augmenter quand le pH diminue, or nous obtenons des résultats incohérents et les intervalles de confiance à 95 % se chevauchent aux trois pH indiquant qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois  $K_m^{MM}$ . Il faut noter que nos résultats montrent une variabilité biologique importante (en particulier aux pH 8 et 5, qui ne sont pas les pH de prédilection de notre algue) sur laquelle nous reviendrons dans la section Discussion. On peut tout de même souligner que contrairement aux  $K_m^{MM}$ , les valeurs des erreurs-type des  $J_{Mn}^{MM}$  sont plutôt faibles. Étant donné que notre modélisation se base sur ces dernières, nous avons pu suivre le raisonnement présenté dans le chapitre 3 pour déterminer les autres paramètres de notre modèle avec confiance.

L'expérience effectuée simultanément aux trois pH mais sur des algues issues d'une même culture (Approche B, Tableau 4-2) confirme les tendances (Fig. 4-13), bien que les plateaux et les constantes soient nettement inférieurs (Tableaux 4-7a et 4-7b) à ceux obtenus sur l'ensemble des données (Tableau 4-6a et 4-6b). La modélisation Michaëlis-Menten donne un  $J_{Mn}^{MM}$  à peu près identique à pH 6,5 qu'à pH 8 (les intervalles de confiance à 95 % se chevauchent confirmant que les valeurs ne sont pas significativement différentes). Par contre, la faible quantité de points génère plus d'incertitude, par exemple à pH 8 la prise en charge semble anormalement élevée lorsque  $[Mn^{2+}] = 3,5 \mu M$ , ce qui donne une pente de la partie linéaire plus abrupte ( $K_{Mn}^{MM}$  plus faible) et un plateau plus marqué qu'à pH 6,5.

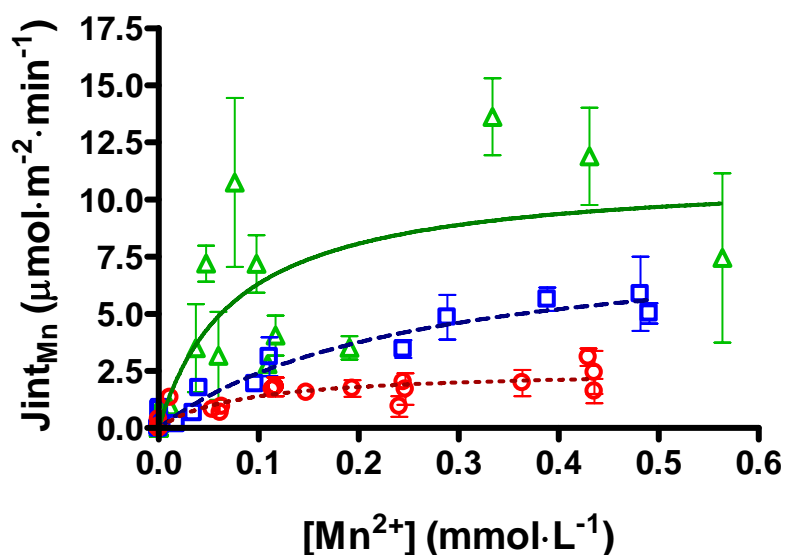


Figure 4-12 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre, à pH 8 ( $\Delta$ ), pH 6,5 ( $\square$ ), pH 5 ( $\circ$ ). Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 8 (Michaëlis-Menten), pour pH 8 (ligne pleine), pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).



#### 4. Prise en charge des métaux

Tableau 4-6a : Paramètres de l'équation de Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) estimés par régression non linéaire ( $\pm$  erreur-type).

<b>Mn</b>	$J_{Mn}^{MM}$ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$	$K_{Mn}^{MM}$ <b>mM</b>
<b>pH 8,0</b>	11,2 $\pm$ 1,2	0,077 $\pm$ 0,031
<b>pH 6,5</b>	8,5 $\pm$ 1,0	0,253 $\pm$ 0,066
<b>pH 5,0</b>	2,6 $\pm$ 0,3	0,085 $\pm$ 0,025

Tableau 4-6b : Intervalles de confiance à 95 % des paramètres de l'équation de Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) estimés par régression non linéaire.

<b>Mn</b>	<b>Intervalle de confiance à 95 % de <math>J_{Mn}^{MM}</math> (<math>\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}</math>)</b>	<b>Intervalle de confiance à 95 % de <math>K_{Mn}^{MM}</math> (mM)</b>
<b>pH 8,0</b>	8,08 – 14,24	0,014 – 0,139
<b>pH 6,5</b>	6,48 – 10,49	0,120 – 0,385
<b>pH 5,0</b>	2,09 – 3,03	0,035 – 0,135

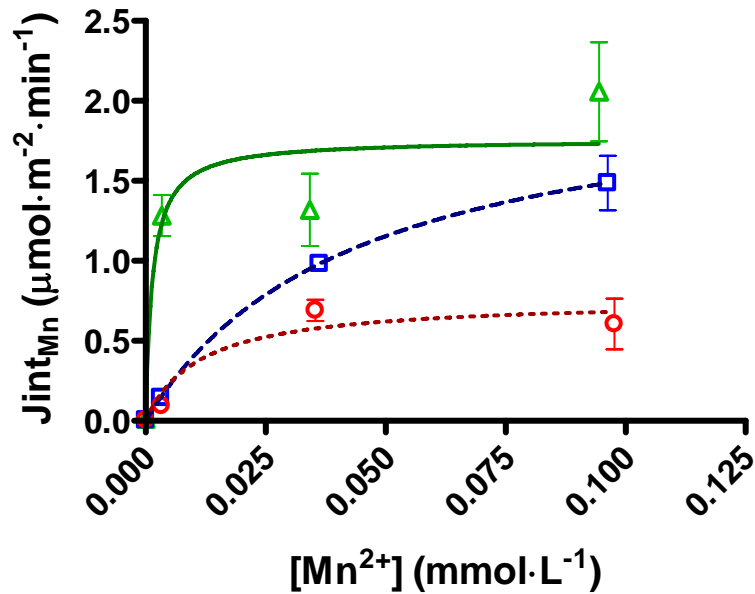


Figure 4-13 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre pour des algues issues d'une même et unique culture, à pH 8 ( $\Delta$ ), 6,5 ( $\square$ ), 5 ( $\circ$ ). Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 8 (Michaëlis-Menten), pour chaque pH : 8, **ligne pleine** ; 6,5, **tirets** ; et 5, **pointillés**. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).

Tableau 4-7a : Paramètres de l'équation de Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) estimés par régression non linéaire pour l'expérience aux trois pH sur une même culture ( $\pm$  erreur-type).

Mn	$J_{Mn}^{MM}$	$K_{Mn}^{MM}$
	$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$	mM
pH 8,0	$1,8 \pm 0,2$	$0,001 \pm 0,001$
pH 6,5	$2,1 \pm 0,3$	$0,044 \pm 0,016$
pH 5,0	$0,8 \pm 0,1$	$0,011 \pm 0,008$

Tableau 4-7b : Intervalles de confiance à 95 % des paramètres de l'équation de Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) estimés par régression non linéaire pour l'expérience aux trois pH sur une même culture.

<b>Mn</b>	<b>Intervalle de confiance à 95 % de <math>J_{Mn}^{MM}</math> (<math>\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}</math>)</b>	<b>Intervalle de confiance à 95 % de <math>K_{Mn}^{MM}</math> (mM)</b>
<b>pH 8,0</b>	1,3 – 2,2	0 – 0,004
<b>pH 6,5</b>	1,4 – 2,9	0,007 – 0,080
<b>pH 5,0</b>	0,5 – 1,1	0 – 0,030

#### 4.3.3.2. Le cadmium

Comme pour le manganèse, les flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration d'ion libre (Fig. 4-14) ont un comportement caractéristique d'un processus de saturation Michaëlis-Menten. Les tableaux 4-8a et 4-8b présentent respectivement les paramètres estimés par régression non linéaire du modèle Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) et leur intervalle de confiance à 95 % :  $J_{Cd}^{MM}$  (obtenu avec une erreur-type relativement faible) et  $K_{Cd}^{MM}$  augmentent avec le pH. L'observation du tableau 4-8b permet de souligner que les valeurs de  $J_{Cd}^{MM}$  sont significativement différentes. Toutefois l'augmentation (inattendue) de  $K_{Cd}^{MM}$  n'est pas significative. On peut à nouveau constater qu'il existe une variabilité biologique notable (en particulier à pH 5).

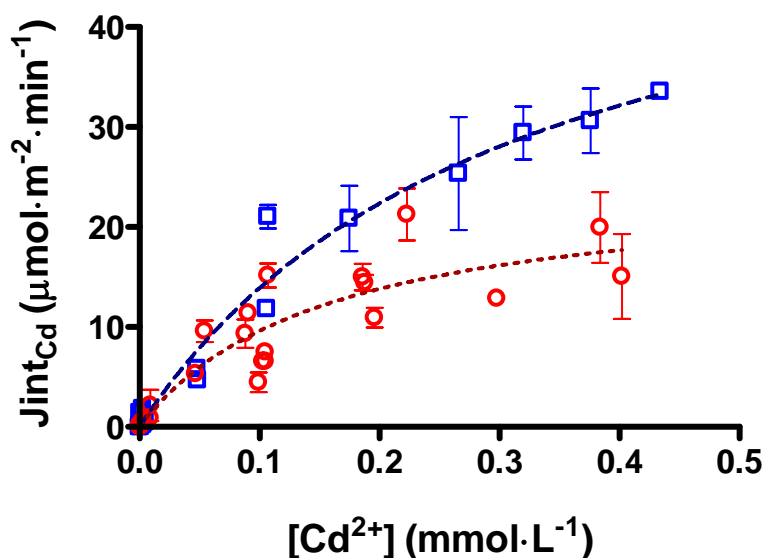


Figure 4-14 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre à pH 6,5 ( $\square$ ) et pH 5 ( $\circ$ ). Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 8 (Michaelis-Menten), pour pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).

Tableau 4-8a : Paramètres de l'équation de Michaelis-Menten (Éq. 8, section 1.3) estimés par régression non linéaire ( $\pm$  erreur-type).

Cd	$J_{Cd}^{MM}$	$K_{Cd}^{MM}$
	$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$	mM
pH 6,5	$57,2 \pm 4,9$	$0,312 \pm 0,051$
pH 5,0	$24,6 \pm 2,7$	$0,156 \pm 0,037$

Tableau 4-8b : Intervalles de confiance à 95 % des paramètres de l'équation de Michaelis-Menten (Éq. 8, section 1.3) estimés par régression non linéaire.

Cd	Intervalle de confiance à 95 %	Intervalle de confiance à 95 %
	de $J_{Cd}^{MM}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ )	de $K_{Cd}^{MM}$ (mM)
pH 6,5	47,3 – 67,1	0,211 – 0,413
pH 5,0	19,2 – 30,0	0,082 – 0,230

#### **4.3.4. Influence du pH du milieu de culture sur la prise en charge**

##### **4.3.4.1. Le manganèse**

Les flux d'internalisation du manganèse n'étaient pas sensibles au pH auquel les algues étaient acclimatées avant les expériences (Fig. 4-15). En effet les valeurs de prise en charge déterminées en fonction de la concentration d'ion métallique libre pour des algues acclimatées à pH 6,5 et exposées à pH 8 (triangles pleins ; Fig. 4-15a) et pour des algues acclimatées à pH 8 et exposées à pH 6,5 (carrés pleins ; Fig. 4-15b) sont voisines, respectivement, de celles des algues acclimatées et exposées à pH 8 (triangles vides ; Fig. 4-15a) et celles acclimatées et exposées à pH 6,5 (carrés vides ; Fig. 4-14b). Rappelons que toutes les algues étudiées ici provenaient d'une culture mère cultivée à pH 7 avec tampon HEPES ; elles étaient transférées au pH d'acclimatation de l'expérience 5 jours avant l'exposition.

Si l'on compare maintenant la prise en charge du Mn par des algues provenant d'une culture mère cultivée à pH 5 (avec tampon MES) et celle d'algues cultivées à pH 7 (avec HEPES) et transférées dans le milieu d'acclimatation à pH 5 seulement 5 jours avant l'expérience (Fig. 4-16), à nouveau il ne semble pas y avoir de différence majeure. Des simulations Monte Carlo, présentées dans la section 4.4.6 permettront de confirmer toutes ces observations.

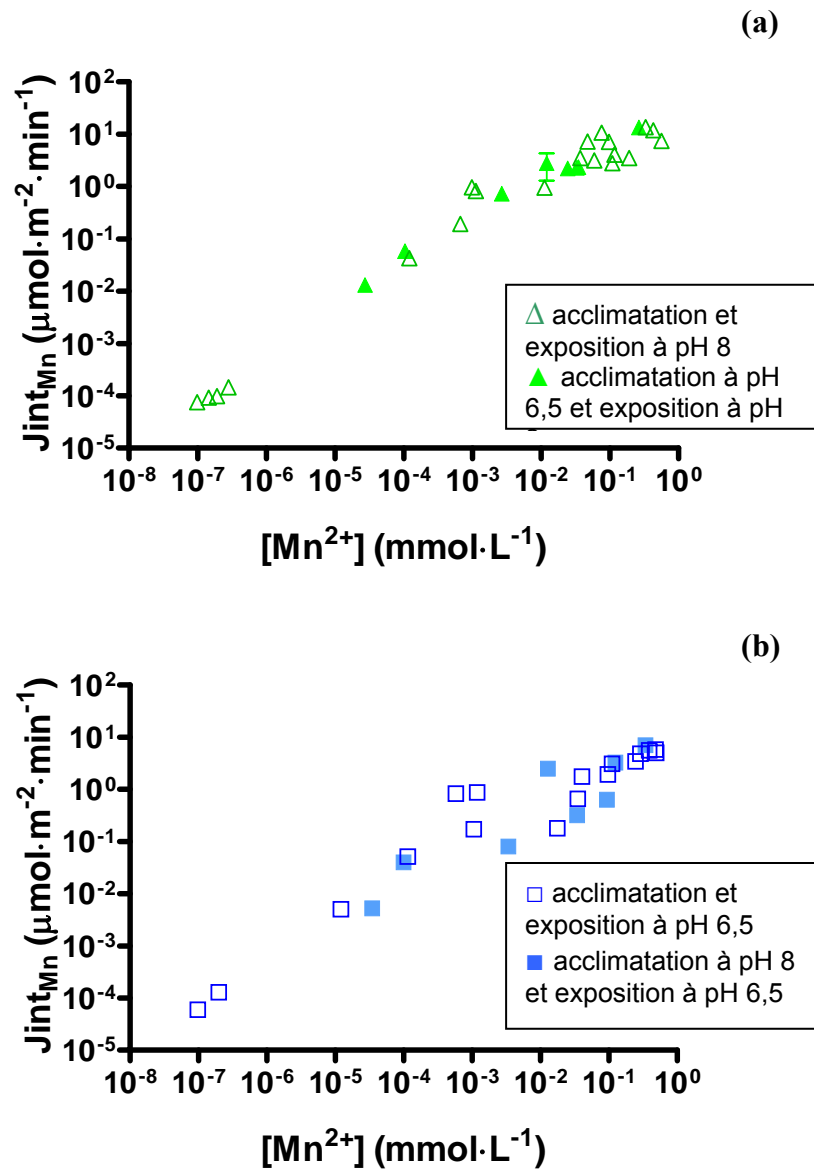


Figure 4-15 : Représentation en log 10 des flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre pour des cellules exposées à : (a) pH 8 ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ) ; (b) pH 6,5 ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).

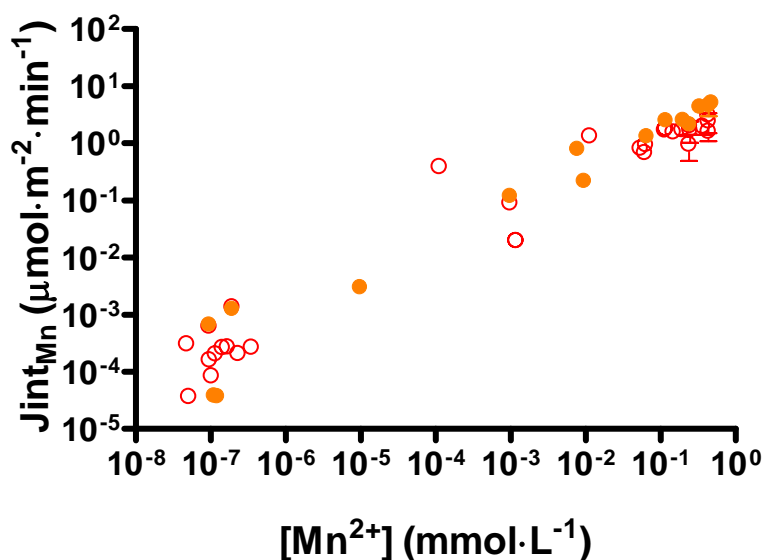


Figure 4-16: Représentation en log 10 des flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre pour des cellules exposées à pH 5 mais ayant toujours été cultivées à pH 5 (●) et des cellules cultivées à pH 7 et transférées dans le milieu d'acclimatation à pH 5 seulement 5 jours avant l'expérience (○). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3).

#### 4.3.4.2. Le cadmium

Comme pour le manganèse, le pH auquel les algues étaient acclimatées pendant 5 jours après repiquage depuis une culture mère à pH 7 (HEPES) n'a pas influencé la prise en charge du métal : les algues exposées à pH 6,5 présentaient des flux de prise en charge similaires si elles étaient acclimatées à pH 5 ou pH 6,5 (Fig. 4-17a) ; il en était de même pour les algues exposées à pH 5, qu'elles aient été acclimatées à pH 5 ou pH 6,5 (Fig. 4-17b).

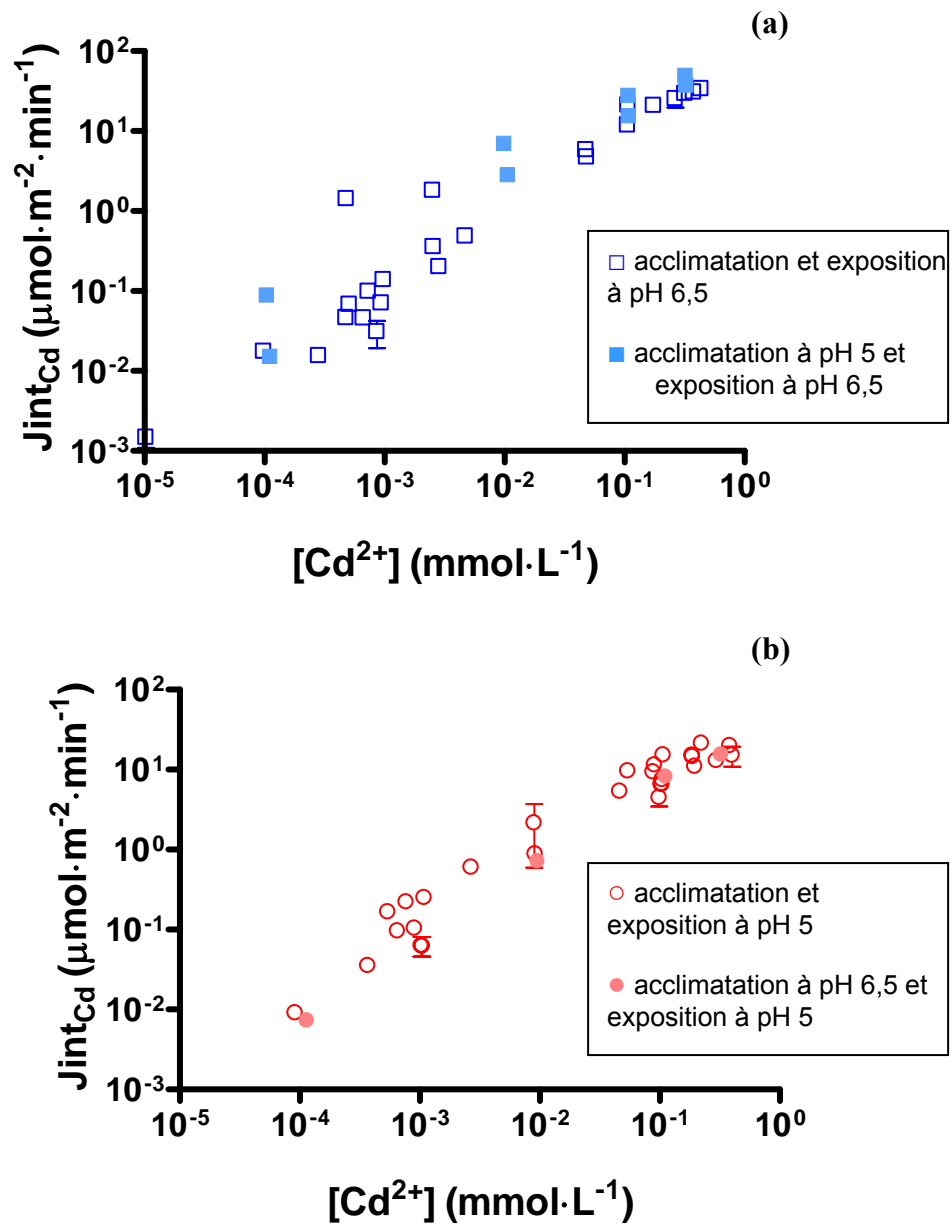


Figure 4-17 : Représentation en log 10 des flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre pour des cellules exposées à : (a) pH 6,5 (■, □) et (b) pH 5 (●, ○). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3).



Si l'on compare maintenant la prise en charge à pH 5 par des algues ayant toujours été cultivées à pH 5 avec celles cultivées à pH 7 jusqu'à 5 jours avant l'expérience (Fig. 4-18), il ne semble pas non plus y avoir de différence. Des simulations Monte Carlo, présentées dans la section 4.4.6 permettront de confirmer toutes ces observations.

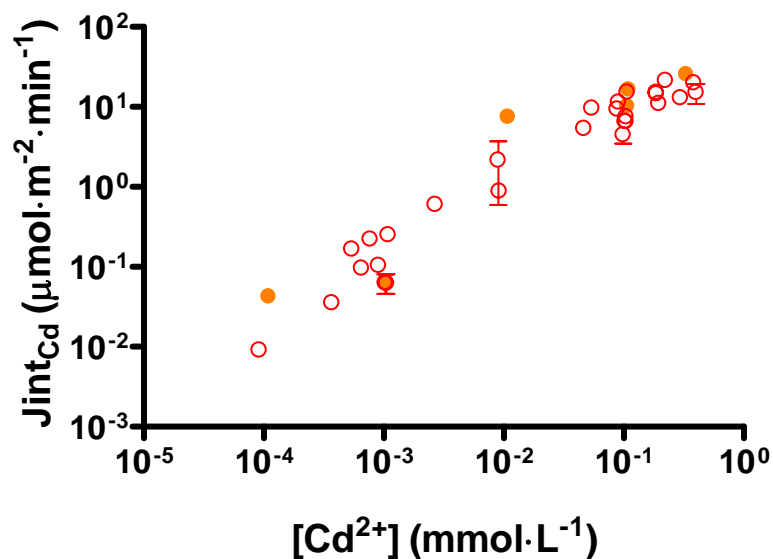


Figure 4-18: Représentation en log 10 des flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre pour des cellules exposées à pH 5 mais ayant toujours été cultivées à pH 5 (●) et des cellules cultivées à pH 7 et transférées dans le milieu d'acclimatation à pH 5 seulement 5 jours avant l'expérience (○). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3).

### 4.3.5. Autres expériences

#### 4.3.5.1. Concentration de manganèse

Les résultats obtenus pour les trois expériences indépendantes à pH 7 (tampon HEPES) à de très faibles concentrations de manganèse libre sont présentés dans la figure 4-19. De plus, les résultats des régressions linéaires de ces mesures sont présentées dans le tableau 4-9.

Les pentes n'étaient pas significativement différentes ( $P = 0,20$ ) et les droites passaient par l'origine. Si l'on considère les résultats des trois expériences comme faisant partie du même jeu de mesures (Fig. 4-20), la pente (ainsi que son erreur-type) de la régression linéaire était de  $(0,604 \pm 0,083)$  et la droite passait par l'origine.

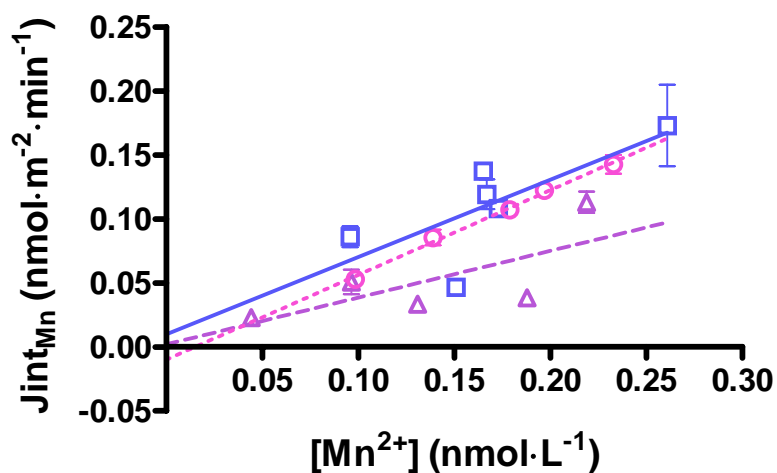


Figure 4-19 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre pour trois cultures indépendantes à pH 7 (tampon HEPES). Les équations des droites de régression linéaire sont données dans le tableau 4-9. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).

Tableau 4-9 : Paramètres estimés (et leur erreur-type) par régression linéaire des taux de prise en charge du manganèse à pH 7 HEPES présentés dans les figures 4-18 et 4-19.

Symboles	Pentes	$r^2$
□	$0,6 \pm 0,2$	0,43
△ (Fig. 4-19)	$0,4 \pm 0,1$	0,48
○	$0,7 \pm 0,1$	0,95
◇ (Fig. 4-20)	$0,6 \pm 0,1$	0,53

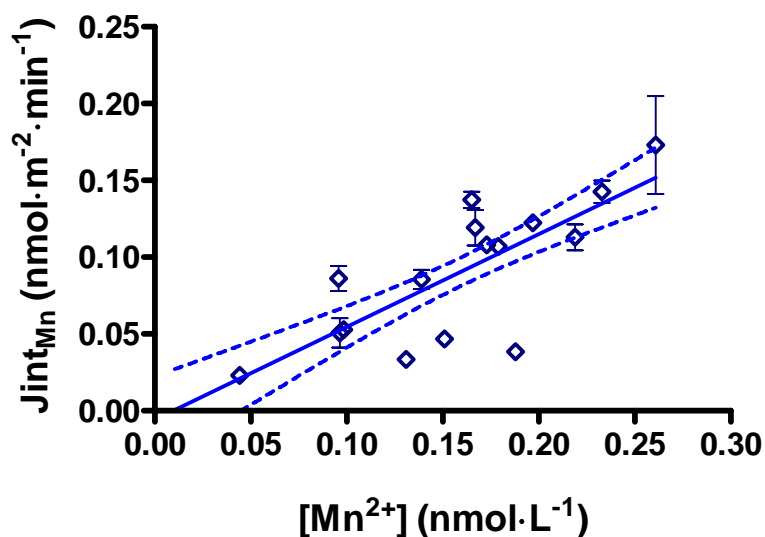


Figure 4-20 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre à pH 7 (tampon HEPES). Ce sont les mêmes mesures que celles de la figure 4-17 mais considérées comme un ensemble. La ligne pleine correspond à la droite de régression et les deux lignes en tirets à l'intervalle de confiance à 95 %. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).

On observe à nouveau une variabilité biologique notable mais les pentes n'étaient pas significativement différentes (bien que le jeu de mesure  $\Delta$  de la figure 4-19 contenait des valeurs plus faibles que dans les deux autres). Cependant, aucun plateau n'est clairement observable aux très basses concentrations de manganèse libre, et donc aucun système de transport du métal, saturable à faibles concentration, n'a été mis en évidence.

#### 4.3.5.2. Effet du chrome sur la prise en charge du manganèse

L'addition de chrome (III) à pH 6,5 n'a révélé aucune influence majeure sur la prise en charge du manganèse (Fig. 4-21). La pente de la régression linéaire (valeur  $\pm$  erreur-type), de  $(2,7 \pm 1,2) \cdot 10^{-3}$  n'est pas significativement différente de zéro ( $P = 0,066$ ). On a un taux de prise en charge moyen  $J_{\text{int}} = 0,14 \pm 0,01 \text{ nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$  lorsque la concentration de chrome varie de 1,5 pM à 10 nM (forme métallique dominante,  $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$ , à 99 %), et celle de  $[\text{Mn}^{2+}]$  est constante à  $0,33 \pm 0,04 \text{ nM}$ .

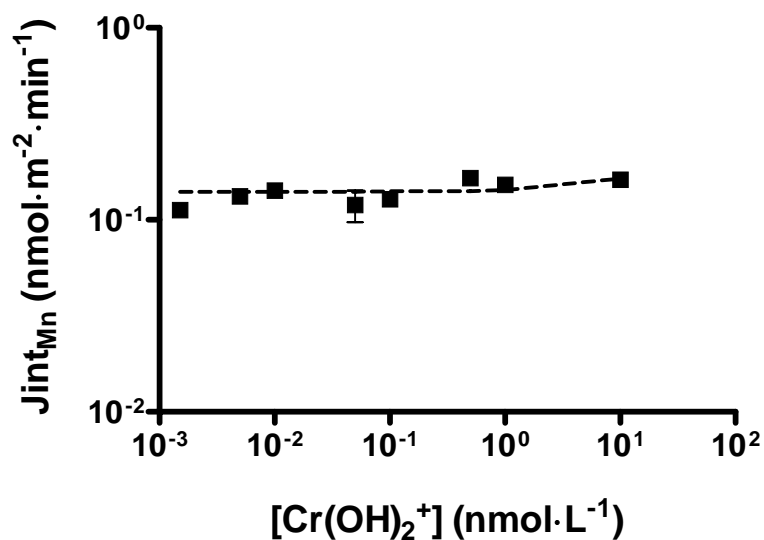


Figure 4-21 : Prise en charge du manganèse par *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction de la concentration nominale de chrome (III), à pH 6,5. La régression linéaire (sur les données non transformées) est représentée par une ligne pointillée. Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).

#### 4.3.5.3. Effet du tampon MES sur la prise en charge du cadmium

Que ce soit à pH 6,5 (Fig. 4-22) ou pH 5 (Fig. 4-23), il semble que la présence de tampon MES dans le milieu n'influence pas la prise en charge du cadmium puisque les points ne se distinguent pas des mesures effectuées dans un milieu sans tampon. À nouveau, nous explorerons ces différences (ou l'absence de différence) à l'aide de simulations Monte Carlo, présentées dans la section 4.4.7.

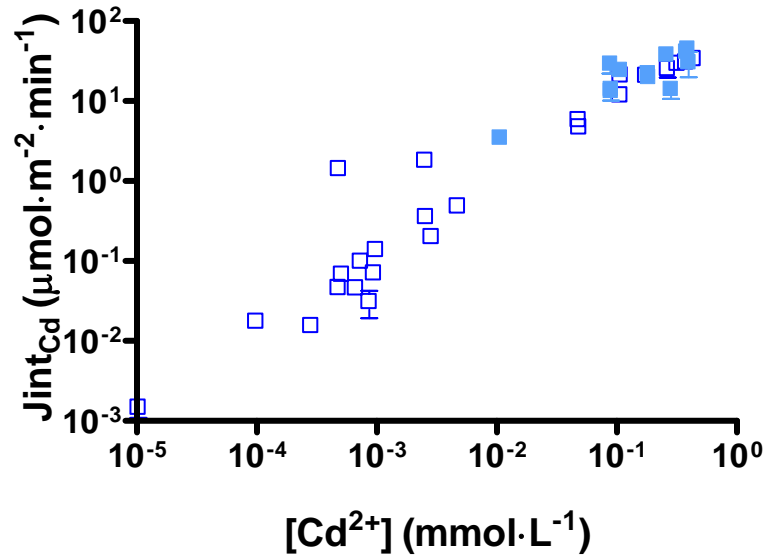


Figure 4-22 : Flux d'intérialisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre, à pH 6,5 avec (□) et sans tampon MES (■). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3).

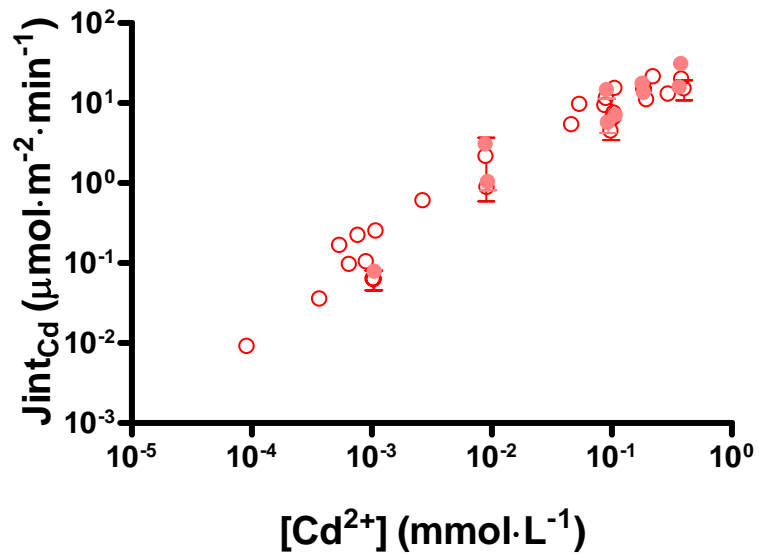


Figure 4-23 : Flux d'intérialisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre, à pH 5 avec (○) et sans tampon MES (●). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3).

#### 4.3.5.4. Effet du calcium

##### 4.3.5.4.1. Le manganèse

Les flux d'internalisation du manganèse en fonction de  $[\text{Ca}^{2+}]$  à pH 8 et pour une  $[\text{Mn}^{2+}]$  fixe de 0,5  $\mu\text{M}$ , ont été significativement inhibés par le calcium (Fig. 4-24). Ces flux ont diminué d'un facteur 2 (de 0,080 à 0,037  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ) en présence d'un excès de calcium 10 000 fois supérieur ( $10^{-3}$  M) à la plus faible concentration en calcium testée ( $10^{-7}$  M). La diminution de la prise en charge du manganèse a commencé pour des additions nominales de calcium supérieures à  $1\cdot 10^{-5}$  M.

##### 4.3.5.4.2. Le cadmium

Pour le cadmium, les flux d'internalisation ont aussi été affectés par les variations de la concentration du calcium à pH 6,5 (Fig. 4-25) mais de façon beaucoup plus marquée. La prise en charge du cadmium, pour une concentration métallique de 1  $\mu\text{M}$ , diminue d'un facteur 40 (de 0,43 à 0,01  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ) en présence d'un excès de calcium 10 000 fois supérieur ( $10^{-3}$  M) à la concentration la plus faible en calcium ( $10^{-7}$  M). La diminution était observée pour des additions nominales de calcium supérieures à  $1\cdot 10^{-6}$  M.

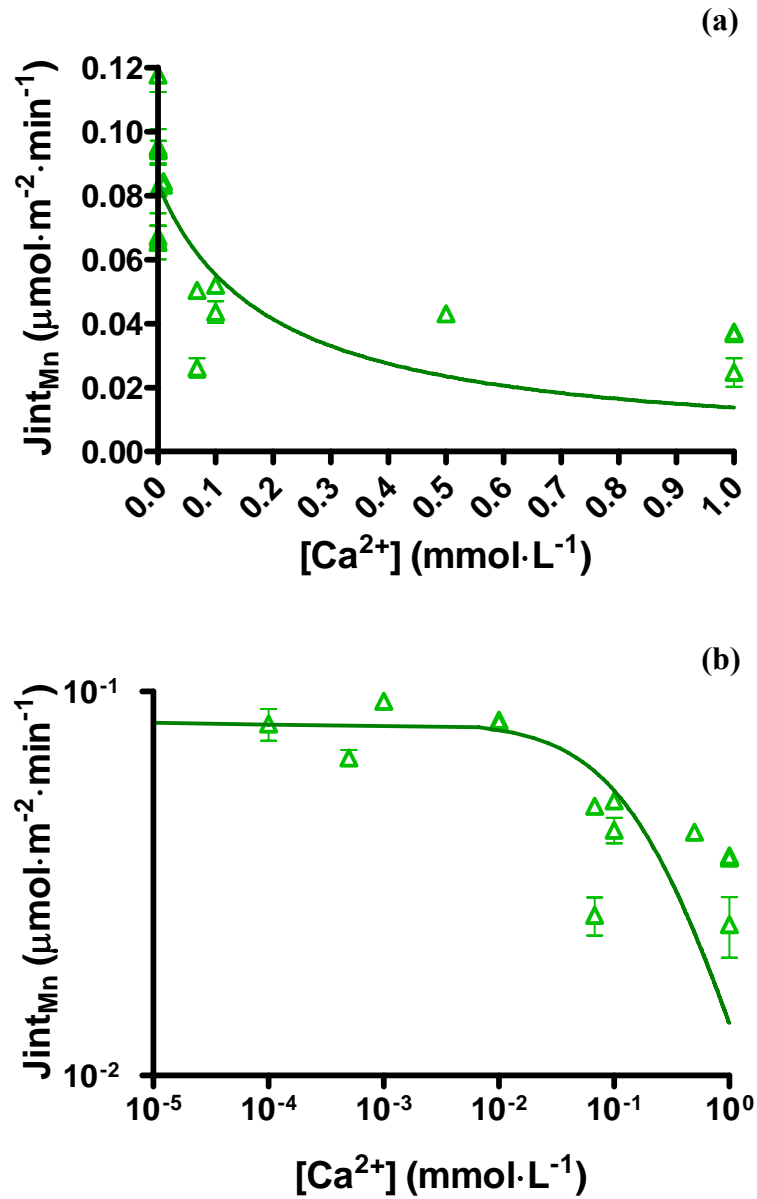


Figure 4-24 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration libre de calcium, à pH 8 (a) et leur représentation en échelle log 10 (b).  $[Mn^{2+}]$  est fixe à  $0,5 \mu M$ . Les flux prédits (ligne pleine) ont été calculés à l'aide de l'équation 25 (section 4.4.5). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).

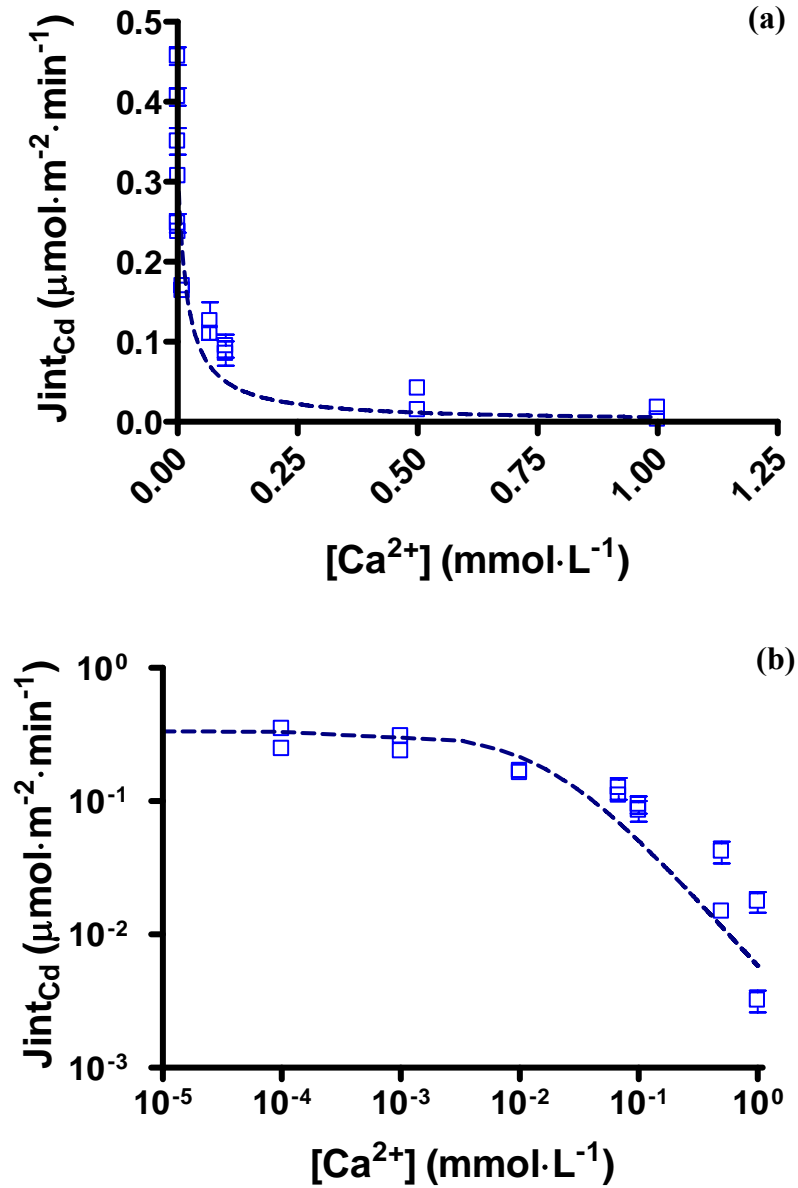


Figure 4-25 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration libre de calcium, à pH 6,5 (a) et leur représentation en échelle log 10 (b). La concentration de cadmium est fixe à 1  $\mu\text{M}$ . Les flux prédits (ligne en pointillés) ont été calculés à l'aide de l'équation 25 (section 4.4.5). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).



## 4.4. Discussion

### 4.4.1. Prise en charge métallique

#### 4.4.1.1. Le manganèse

Chez *C. reinhardtii*, on observe un profil de prise en charge du manganèse de type Michaëlis-Menten (Fig. 4-12). La modélisation (Tableaux 4-6a et b) donne des paramètres  $J_{Mn}^{MM}$  et  $K_{Mn}^{MM}$  allant à l'encontre de la prédiction du BLM dans de telles conditions expérimentales. L'augmentation du taux maximal d'internalisation  $J_{max}$  (obtenu avec une faible erreur-type) avec le pH suggère fortement que l'inhibition de la prise en charge du Mn par les protons n'est pas uniquement de nature compétitive mais aussi de nature non compétitive. Si l'on observe la prise en charge aux trois pH sur une même culture (Fig. 4-13, Tableaux 4-7a et b), on retrouve les mêmes tendances. Il faut souligner que cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois avec un nombre limité de concentrations du fait de la lourdeur d'une telle manipulation et que la variabilité biologique ne s'est malheureusement pas avérée être moins grande. Pour réduire l'incertitude sur les calculs des paramètres de prise en charge, il semble qu'un plus grand nombre de répétitions avec des cellules provenant de cultures distinctes soit préférable à la réalisation d'une expérience avec plusieurs traitements simultanée à l'aide de cellules provenant de la même culture.

Malgré le nombre important de répétitions, la variabilité biologique de nos mesures est mise en évidence. La figure 4-26 présente chaque expérience individuellement et sa modélisation Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3), contrairement à la figure 4-12 qui présente toutes les mesures regroupées par pH. On constate que, surtout à pH 8 (Fig. 4-26a) et un peu moins à pH 5 (Fig. 4-26c), la variabilité biologique est évidente. À pH 6,5 (Fig. 4-26b), pH de prédilection de l'algue, on observe moins de dispersion des données.

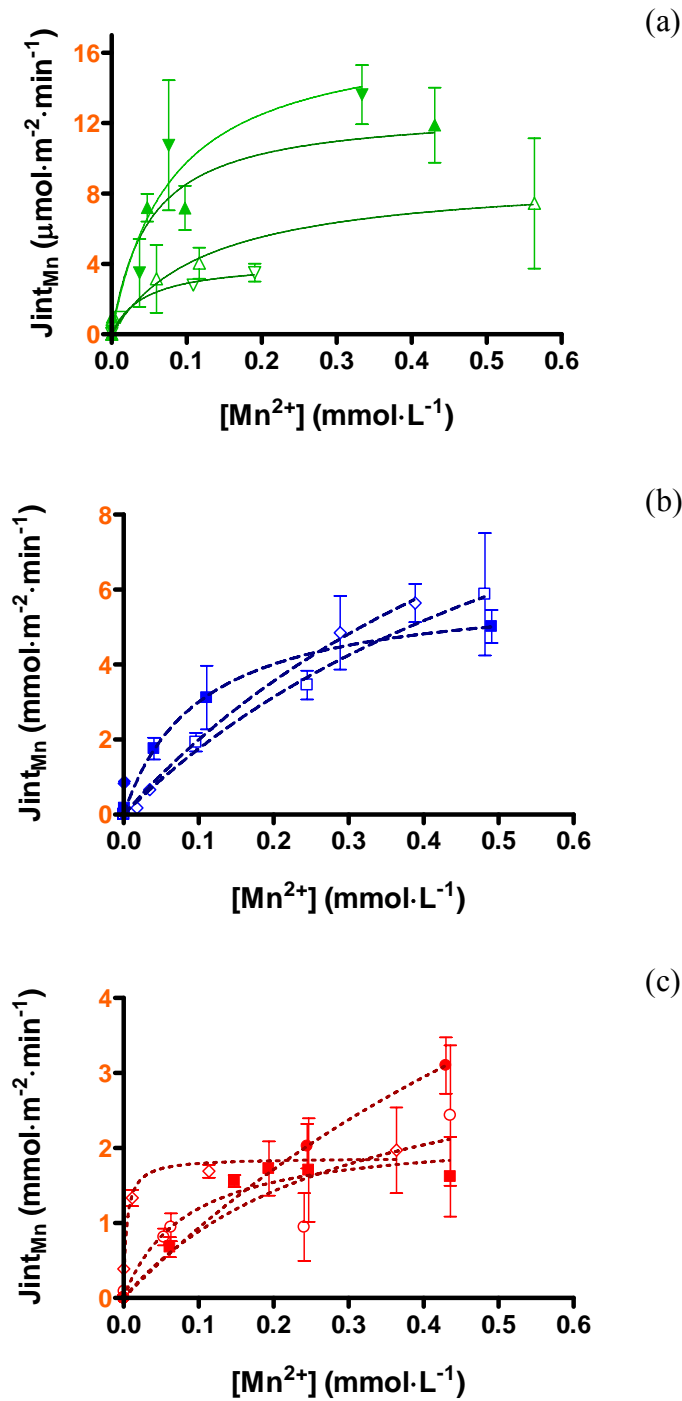


Figure 4-26 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre, à pH 8 (a), pH 6,5 (b), et pH 5 (c). Les différents symboles correspondent à des expériences différentes. Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 8 (Michaëlis-Menten), pour pH 8 (ligne pleine), pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3).

## 4.4.1.2. Le cadmium

Comme pour le manganèse, on observe aussi pour le cadmium un profil de prise en charge de type Michaëlis-Menten (Fig. 4-14) et la modélisation donne des paramètres  $J_{Cd}^{MM}$  et  $K_{Cd}^{MM}$  (Tableaux 4-8a et b) qui augmentent avec le pH. Rappelons que le fait que  $J_{max}$  augmente avec le pH suggère une inhibition (partiellement) non compétitive.

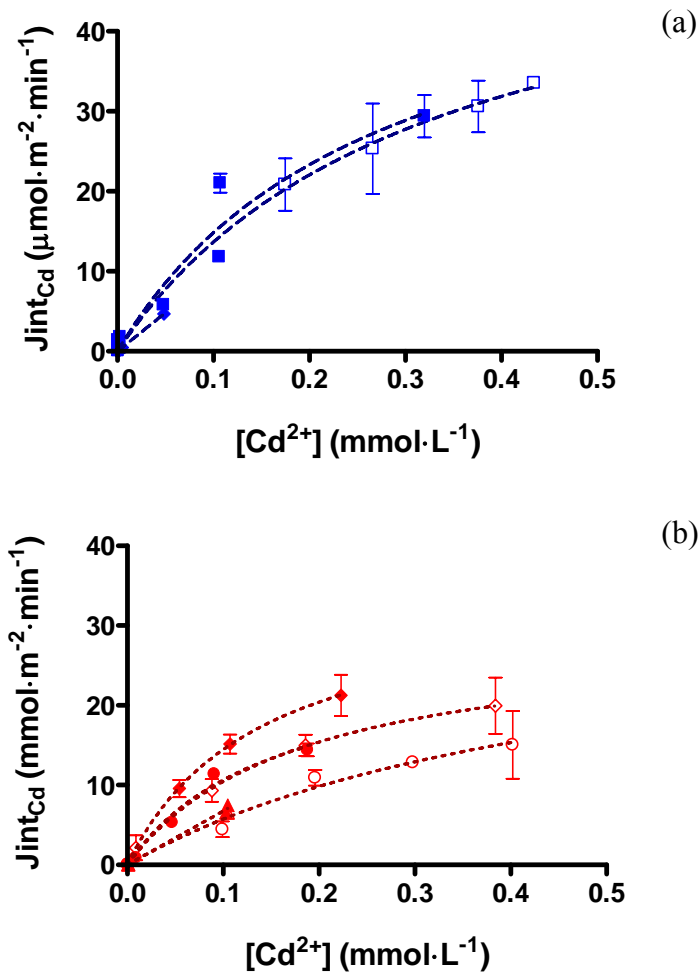


Figure 4-27 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre, à pH 6,5 (a) et pH 5 (b). Les différents symboles correspondent à des expériences différentes. Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 8 (Michaëlis-Menten), pour pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).

Notons que, comme ce fut le cas pour le manganèse, l'observation de la prise en charge du Cd lors des expériences considérées individuellement à chaque pH permet de constater à nouveau que l'effet de la variabilité biologique est plus marqué à pH 5 qu'à pH 6,5 (Fig. 4-27).

#### 4.4.1.3. Variabilité biologique

Étant donné que l'on retrouve, pour les deux métaux, une variabilité biologique importante et ce surtout lorsque le pH s'éloigne de la neutralité, on peut se demander quel stress est à l'origine de ce phénomène puisque Boullemant *et al.* (2004) ont effectué les mêmes types d'expériences avec le cadmium à pH 5,5 et 7 et n'ont pas obtenu une telle variabilité. Il y a toutefois deux distinctions à faire. D'abord le mécanisme de transport est de toute évidence différent dans le cas de Boullemant *et al.* (2004) qui ont étudié des complexes neutres et lipophiles qui pénètrent à l'intérieur des cellules par simple diffusion alors que dans notre cas il s'agit de transport facilité. Ensuite, nous avons utilisé le milieu MHSM-C, carencé en manganèse, où les algues étaient acclimatées 5 jours avant l'exposition. On peut se demander si cette période de carence peut expliquer la variabilité biologique de la prise en charge des métaux lorsque le pH s'éloigne de la neutralité. L'observation de la figure 2-5 présentant la croissance de *C. reinhardtii* à pH 7 dans les milieux MHSM-C carencé et MHSM-1 non carencé, ne permet pas de penser que le changement de concentration en manganèse ait un impact particulier sur la croissance de l'algue. On peut constater que dans les premières heures la densité algale dans MHSM-C est inférieure à celle dans MHSM-1, mais aux environs de 48 h la différence est faible. Cependant, peut-être que cette différence, même minime, a été sous-estimée et reflète un impact plus important de la carence en Mn pour *C. reinhardtii*.

#### 4.4.2. Adsorption

Aucun effet particulier de pH sur l'adsorption du manganèse n'a été observé (Figures 4-8 à 4-10), ce qui confirme les observations de Schenck *et al.* (1988) ainsi que les références citées dans cette étude.

Contrairement au manganèse, l'adsorption du cadmium est influencée par les variations de pH de la même façon que sa prise en charge (Fig. 4-11) ; quand le pH diminue, l'adsorption diminue également.

Par contre, le pH auquel les algues étaient acclimatées n'a pas vraiment influencé l'adsorption des métaux. On peut se pencher plus particulièrement sur les algues de la culture mère à pH neutre, acclimatées à pH 8 (Mn) ou pH 5 (Cd) puis exposées à nouveau à pH neutre (■, Fig. 4-9 pour Mn et Fig. 4-11a pour Cd), et comparer leur adsorption avec des algues ayant toujours été cultivées et exposées à pH neutre (□, Fig. 4-9 pour Mn et Fig. 4-11a pour Cd). Le fait que les pentes des régressions linéaires n'étaient pas significativement différentes indique qu'aucun changement irréversible majeur dans la nature et la composition des sites d'adsorption de nos métaux n'a eu lieu pour cette gamme de pH (6,5-8 pour Mn et 5-6,5 pour Cd).

De plus, nous n'avons observé aucune saturation sur une large gamme de concentrations et ce pour les deux métaux. La saturation aurait fourni une estimation précise du nombre de sites d'adsorption ne menant pas à l'internalisation. Nous n'avons donc pas pu déterminer une constante d'équilibre d'adsorption pour la liaison de Mn et Cd à la surface algale de *C. reinhardtii*. Rappelons tout de même que l'adsorption a été déterminée initialement avec  $n = 1$  puisque le matériel nécessaire n'a pas été disponible dès le début des expériences. Nous aurions pu augmenter davantage la concentration de métal, mais seulement à pH faible où la solubilité est plus grande (cf. Fig. 4-2 pour Mn et 4-4 pour Cd).

Différents travaux ont été effectués pour déterminer la nature des sites membranaires de liaisons des métaux (Crist *et al.*, 1981, 1994 et 1999 ; González-Dávila *et al.*, 1995). On compte parmi ces sites, des groupements carboxyliques, aminés, ainsi que des groupements phénoliques. González-Dávila *et al.* (1995) ont étudié l'adsorption du cuivre à la surface de l'algue marine *Dunaliella tertiolecta* et ont déterminé par titrage les pKa (et leur erreur-type) de la surface algale afin d'identifier le type de groupements auxquels se lie le cuivre : le  $pK_{a1} = 4,92 \pm 0,16$  correspondrait aux acides carboxyliques, le  $pK_{a2} = 6,28 \pm 0,09$  à des groupements aminés et le  $pK_{a3} = 10,06 \pm 0,10$  à des groupements phénoliques. Si on fait le parallèle avec les résultats que nous avons obtenus pour l'adsorption, on pourrait croire que le manganèse se lie à des groupements

carboxyliques qui seraient peu sensibles aux protons dans la gamme de pH 5,0-8,0 et pour lesquels le Mn a une certaine affinité (Kiefer et al., 1997). Le cadmium se lierait à deux types de sites : un sensible aux variations de pH de notre gamme, comme les amines (le cadmium étant un métal plus mou que le manganèse, il aura plus d'affinité pour les groupements azotés) et l'autre non sensible pour des pH  $\geq 5$  comme les acides carboxyliques où se lierait le manganèse. Ceci resterait à vérifier expérimentalement, en s'inspirant peut-être de la technique voltamétrique utilisée par González-Dávila et al. (1995).

#### 4.4.3. Concentration de manganèse

L'existence de deux systèmes de transport transmembranaire pour le manganèse a été proposée par Noro (1985) chez l'algue verte marine *Dunaliella tertiolecta* Butcher ; en effet, un système de transport de haute affinité pouvait être saturé à de faibles concentrations ( $< 6 \cdot 10^{-8}$  M). De plus, Ross (1993) ainsi que Gadd et Laurence (1996), ont mis en évidence deux systèmes de transport de ce métal, respectivement, dans les champignons *Penicillium notatum* ( $K_m^1 = 4,4$  nM et  $K_m^2 = 22$   $\mu$ M) et *Saccharomyces cerevisiae* ( $K_m^1 = 0,3$  nM et  $K_m^2 = 62$   $\mu$ M).

Contrairement à ces études, nos résultats ne mettent pas en évidence l'existence de deux systèmes de transport du métal. En effet, aucun plateau n'a été observé aux très basses concentrations de manganèse libre (Fig. 4-19 et 4-20), ce qui ne suggère pas l'existence d'un système de très haute affinité. Sunda et Huntsman (1985, 1986 et 1996), chez *Chlamydomonas* sp., et chez *Thalassiosira pseudonana*, ont également montré que le manganèse était pris en charge par un seul système de transport mais de haute affinité.

D'après nos résultats, *C. reinhardtii* ne possède qu'un système de transport du manganèse qui ne sature qu'à de hautes concentrations métalliques.

#### 4.4.4. Effet du calcium

Nous avons considéré que le calcium était le seul cation inhibiteur significatif. En effet, plusieurs études mettent en évidence une inhibition de la prise en charge métallique par le calcium : celle du manganèse chez le lichen *Hypogymnia physodes* (Hauck et al., 2002) ; celle du manganèse et du cadmium, entre autres, chez *Kirchneriella lunaris* (Issa et al., 1995) ; celle du plomb chez *Chlorella vulgaris* (Slaveykova et Wilkinson, 2002) ; celle du cuivre et du cadmium chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Mosulén et al., 2003 ; Kola et Wilkinson, 2005). Plus récemment, Worms et Wilkinson (2007) ont étudié l'effet du calcium sur la prise en charge du nickel chez *C. reinhardtii*. Ils ont mis en évidence une inhibition non compétitive de la prise en charge du nickel. Ils ont aussi observé une augmentation de la prise en charge du métal en présence de faibles concentrations de calcium ; les auteurs pensent qu'une diminution du taux de dépuración du nickel pourrait expliquer l'augmentation nette de sa prise en charge.

Si nous comparons maintenant nos résultats avec ceux mentionnés ci-dessus, pour ce qui est de l'effet du calcium, comme chez le lichen *Hypogymnia physodes* (Hauck et al., 2002) et chez *Kirchneriella lunaris* (Issa et al., 1995), une inhibition de la prise en charge du manganèse (Fig. 4-24) a été mise en évidence.

Rappelons que nos expériences ont été réalisées à pH 8, pH auquel la compétition  $Mn^{2+}/H^+$  est faible, ce qui permet de négliger la composante pH dans le modèle proposé (Éq. 25) et calculer  $K_{Ca}$  (voir la section suivante).

Pour le cadmium, l'effet du calcium observé (Fig. 4-25) est également celui attendu : les résultats mettent en évidence une inhibition de la prise en charge du métal. Kola et Wilkinson (2005) ont réalisé une expérience semblable et ont obtenu des résultats similaires (Fig. 4-28).

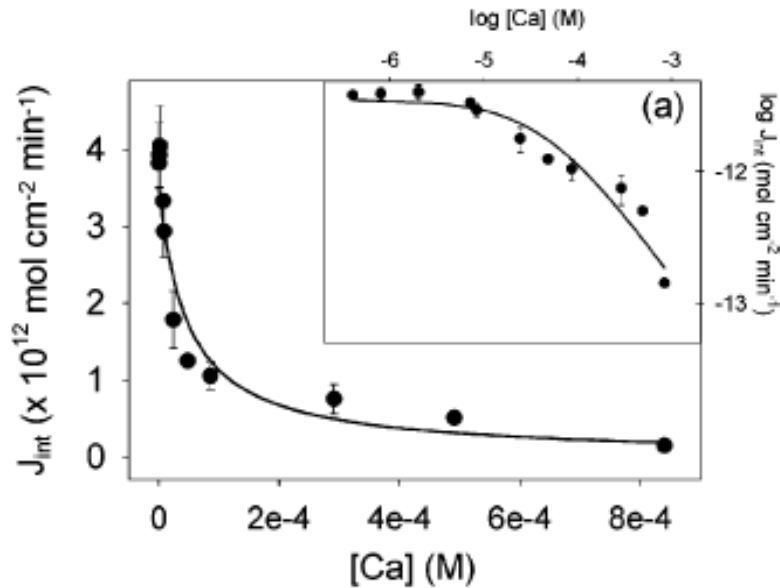


Figure 4-28 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration libre de calcium, pour *C. reinhardtii* exposées à 0,5  $\mu\text{M}$  de  $[\text{Cd}^{2+}]$  à pH 7 et sa représentation en log 10 dans l'encadré (tirée de Kola et Wilkinson, 2005).

Nous aurions pu aussi nous attarder à l'inhibition du transport de nos métaux par le magnésium. La littérature est toutefois contradictoire à ce sujet. Kehres et al. (2000) ont démontré que le magnésium (ainsi que le calcium d'ailleurs) n'inhibait pas la prise en charge du manganèse chez *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*. En revanche, Hauck et al. (2002) ont découvert que le magnésium réduisait la prise en charge du manganèse chez les lichens épiphytes, mais de façon moins importante que le calcium. Gadd et Laurence (1996) ont également mis en évidence l'inhibition de la prise en charge du manganèse par le magnésium chez le champignon *Saccharomyces cerevisiae*. De plus, Worms et Wilkinson (2007) ont aussi étudié l'effet du magnésium sur la prise en charge du nickel chez *C. reinhardtii* et mis en évidence une inhibition compétitive de la prise en charge du métal ; il faut noter qu'il a été montré que le nickel emprunte les transporteurs du magnésium pour entrer dans la cellule (Chamngopol et Groisman, 2002). Le magnésium n'a pas été testé dans notre étude étant donné que Kola et Wilkinson (2005) n'ont montré aucune inhibition significative de la prise en charge du cadmium par le



magnésium chez *C. reinhardtii*. Idéalement, l'inhibition par tous les cations devrait être vérifiée.

#### 4.4.5. Modélisation

Tel que présenté dans les chapitres 1 et 3, nous avons utilisé un modèle d'inhibition partiellement non compétitive pour expliquer l'effet de cations sur la prise en charge de Mn et Cd chez *C. reinhardtii*. Afin de déterminer les paramètres du modèle, nous avons suivi le raisonnement de modélisation exposé dans le Chapitre 3.

Par régression non linéaire à l'aide de l'équation 25 et des données de  $J_{\text{int}}$  obtenues lors de l'expérience d'inhibition de prise en charge des métaux par le calcium (Fig. 4-24 pour Mn et Fig. 4-25 pour Cd), nous avons obtenu  $K_{\text{Ca}}^{\text{Mn}} = 10^{3,7} \text{ M}^{-1}$  avec un intervalle d'erreur-type de  $[10^{3,51} - 10^{3,81}]$  pour le transport du manganèse et  $K_{\text{Ca}}^{\text{Cd}} = 10^{4,75} \text{ M}^{-1}$  avec un intervalle d'erreur-type de  $[10^{4,63} - 10^{4,85}]$  pour le transport du cadmium.

$$J_{\text{int}} = \frac{A}{1 + K_{\text{Ca}} \cdot [\text{Ca}^{2+}]} \quad (25)$$

Nous avons ensuite introduit dans l'équation 26a,  $K_{\text{Ca}}^{\text{Mn}}$  et  $J_{\text{max}}$ , en utilisant  $J_{\text{Mn}}^{\text{MM}}$  obtenu par modélisation Michaëlis-Menten à pH 8 (pH auquel la compétition  $\text{H}^+/\text{Mn}^{2+}$  est considérée négligeable). Après régression non linéaire des données de  $J_{\text{int}}$  mesurées à pH 8, nous avons obtenu une valeur de  $K_{\text{Mn}} = 10^{4,20} \text{ M}^{-1}$  avec un intervalle d'erreur-type de  $[10^{4,11} - 10^{4,27}]$ . De la même manière que pour le manganèse, les paramètres du modèle pour le cadmium ont été déterminés en introduisant  $K_{\text{Ca}}^{\text{Cd}}$  et  $J_{\text{max}} = J_{\text{Cd}}^{\text{MM}}$  (obtenu par modélisation Michaëlis-Menten à pH 6,5) dans l'équation 26b. Nous avons obtenu une valeur de  $K_{\text{Cd}} = 10^{4,19} \text{ M}^{-1}$  avec un intervalle d'erreur-type de  $[10^{4,18} - 10^{4,21}]$ .

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}} \cdot K_{\text{Mn}} \cdot [\text{Mn}^{2+}]}{(1 + K_{\text{Ca}} \cdot [\text{Ca}^{2+}] + K_{\text{Mn}} \cdot [\text{Mn}^{2+}])} \quad (26a)$$

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}} \cdot K_{\text{Cd}} \cdot [\text{Cd}^{2+}]}{(1 + K_{\text{Ca}} \cdot [\text{Ca}^{2+}] + K_{\text{Cd}} \cdot [\text{Cd}^{2+}])} \quad (26b)$$

En introduisant par la suite  $K_{\text{Ca}}^{\text{Mn}}$  et  $K_{\text{Mn}}$  dans l'équation 17a, avec  $J_{\text{max}} = J_{\text{Mn}}^{\text{MM}}$  obtenu par modélisation à l'aide de l'équation Michaëlis-Menten à pH 5, la régression non linéaire des  $J_{\text{int}}$  mesurés à pH 5 (pH auquel la compétition  $\text{H}^+/\text{Mn}^{2+}$  est la plus importante) aurait dû donner une valeur pour  $K_{\text{H}}$ .

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}} \cdot K_{\text{Mn}} \cdot [\text{Mn}^{2+}]}{(1 + K_{\text{H}} \cdot [\text{H}^+] + K_{\text{Ca}} \cdot [\text{Ca}^{2+}] + K_{\text{Mn}} \cdot [\text{Mn}^{2+}])} \quad (17a)$$

En faisant de même pour le cadmium, en introduisant  $K_{\text{Ca}}^{\text{Cd}}$ ,  $K_{\text{Cd}}$  et en optimisant la régression sur les données de  $J_{\text{int}}$  obtenues à pH 5 dans l'équation 17b, nous aurions dû également pouvoir déterminer la valeur de  $K_{\text{H}}$ .

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}} \cdot K_{\text{Cd}} \cdot [\text{Cd}^{2+}]}{(1 + K_{\text{H}} \cdot [\text{H}^+] + K_{\text{Ca}} \cdot [\text{Ca}^{2+}] + K_{\text{Cd}} \cdot [\text{Cd}^{2+}])} \quad (17b)$$

Toutefois, les estimations de  $K_{\text{H}}$  n'étaient pas significatives (erreur-type  $> K_{\text{H}}$ ). Ceci pourrait s'expliquer par la variabilité des données observée pour les deux métaux sous le niveau de saturation aux pH testés (Fig. 4-29 et 4-30). En effet, malgré le fait que toutes les mesures aient été effectuées en triple et que plusieurs expériences (utilisant différentes cultures d'algues) aient été réalisées, la variabilité biologique était trop grande. Sur les figures 4-29 et 4-30, sont présentées des régressions linéaires (et non pas une modélisation de type Michaëlis-Menten) puisqu'à ces concentrations, nous sommes dans la partie linéaire de la courbe de saturation. On constate que pour les deux métaux, les données se recoupent alors que l'on devrait pouvoir distinguer des tendances nettes selon le pH (données à pH 8 au-dessus de celles à pH 6,5, elles-mêmes au-dessus de celles à pH 5), et ce n'est pas le cas. Cette distinction selon le pH n'était claire que lorsque les transporteurs étaient saturés.

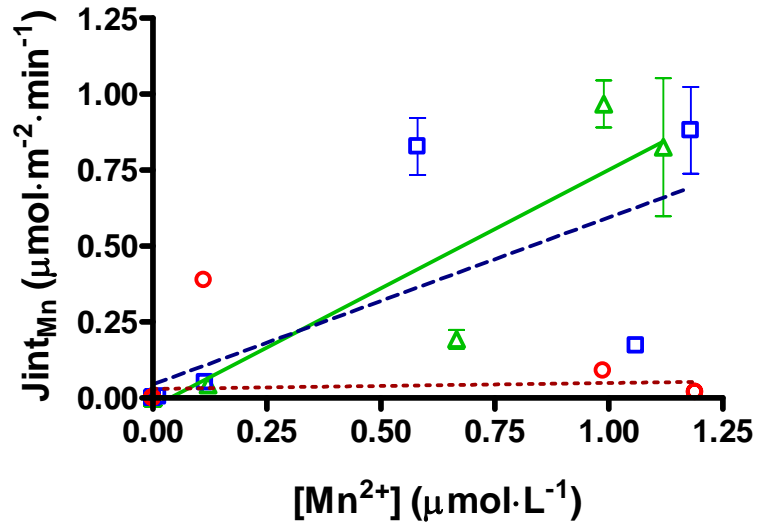


Figure 4-29 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre ( $[\text{Mn}^{2+}] < 1,25 \mu\text{M}$ ), à pH 8 ( $\Delta$ ), pH 6,5 ( $\square$ ), pH 5 ( $\circ$ ). Les droites sont des régressions linéaires pour pH 8 (ligne pleine), pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).

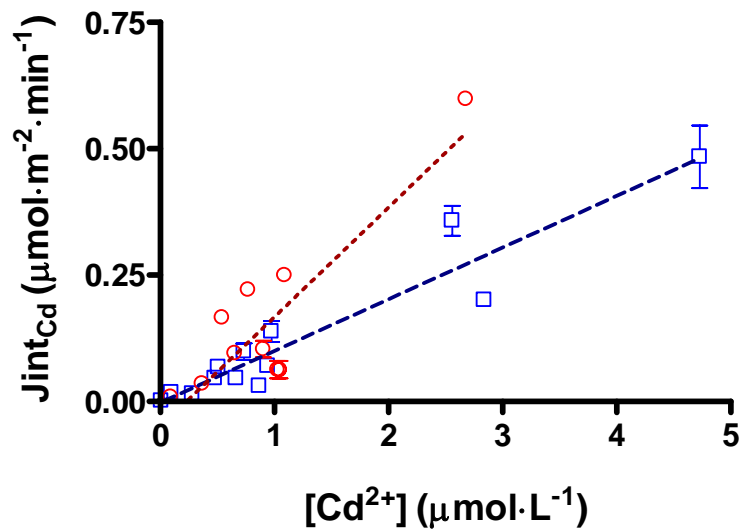


Figure 4-30 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre ( $[\text{Cd}^{2+}] < 5 \mu\text{M}$ ), à pH 6,5 ( $\square$ ) et à pH 5 ( $\circ$ ). Les droites sont des régressions linéaires pour pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).

Il n'est donc pas surprenant que l'optimisation du paramètre  $K_H$  à l'aide de ces données n'ait pas permis de calculer une valeur précise pour la liaison de protons ( $K_H$ ). Notons également qu'en raison d'une grande variabilité des données observées lors des expériences à faibles concentrations métalliques, le chevauchement (et l'étendue des points) explique l'incohérence obtenue pour les  $K_{Mn}^{MM}$ , supposées augmenter quand le pH diminue et les erreurs-type élevées lors de la modélisation Michaëlis-Menten.

Bien qu'une compétition entre protons et métal doit certainement avoir lieu, elle reste un paramètre peu sensible dans notre modèle, indiquant que  $K_H \cdot [H^+] \ll 1$  (voir équation 17), et ce même au plus bas pH testé (5,0), si bien que  $K_H \ll 10^5$ .

On peut finalement ajouter que, dans leur étude de la prise en charge du strontium par la carpe commune, Chowdhury et Blust (2001) n'ont pas non plus constaté d'inhibition compétitive de la part des protons ( $K_H = 0,54 \pm 0,07$ , valeur 185 fois inférieure à  $K_{Sr}$ ) et ont proposé d'expliquer ce phénomène comme suit : le Sr se lierait aux groupements carbonyles ou carboxyles des protéines de transport ; leurs pKa se trouvent entre 3 et 5, la compétition du proton sur ces sites est alors attendue pour un pH inférieur à 5. Dans notre gamme de pH, le fait que nous ne constatons pas de compétition du proton pour les sites de transport métallique est donc aussi explicable par ce raisonnement.

#### 4.4.5.1. Le manganèse

Puisque  $K_H$  n'est pas un paramètre significatif, notre modèle final pour le manganèse est l'équation 26a ; les paramètres estimés y ont donc été introduits et les valeurs de  $J_{max}$  à pH 6,5 et 5,0 ont été calculées (Fig. 4-31, Tableaux 4-10a et 4-10b). Rappelons que les premiers calculs ont été effectués avec la valeur de  $J_{max}$  à pH 8 obtenue par modélisation Michaëlis-Menten ; il est donc inutile de recalculer ce paramètre. Il faut souligner que les  $J_{max}$  sont tous significativement différents les uns des autres (tableau 4-10b) puisque les intervalles de confiance à 95 % ne se chevauchent pas.

La figure 4-32 présente la modélisation des résultats obtenus aux trois pH pour une même culture. Nous avons introduit  $K_{Ca}^{Mn}$  et  $K_{Mn}$  dans l'équation 26a et déterminé des

nouveaux  $J_{\max}$  (Tableau 4-11) en utilisant comme données, **les  $J_{\text{int}}$  mesurés** lors de cette expérience. Comme pour les résultats de modélisation Michaëlis-Menten, les valeurs de  $J_{\max}$  obtenues sont nettement plus faibles que dans la figure 4-31, mais la tendance est la même. Donc malgré la variabilité difficile à maîtriser, l'influence du pH ( $J_{\max}$  augmente avec le pH) sur le transport du manganèse est cohérente. Notons que le point isolé à pH 8 ( $J_{\text{int}} = 1,28 \pm 0,22 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  pour  $[\text{Mn}^{2+}] = 3,4\cdot 10^{-3} \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a été pris en compte : la modélisation impose une tendance à la courbe, ce qui explique l'éloignement du point par rapport à cette dernière et donc une erreur-type plus élevée de  $J_{\max}$  à pH 8. Ceci explique aussi pourquoi l'intervalle de confiance à 95 % (tableau 4-11b) est large et chevauche celui obtenu à pH 6,5.

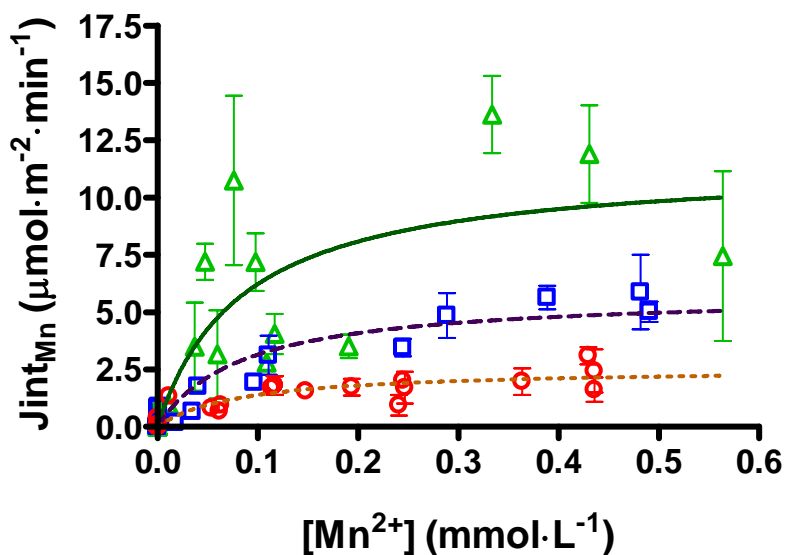


Figure 4-31 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre, à pH 8 ( $\Delta$ ), pH 6,5 ( $\square$ ), pH 5 ( $\circ$ ). Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 26a et des  $J_{\text{int}}$  mesurés, pour pH 8 (ligne pleine), pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).

#### 4. Prise en charge des métaux

Tableau 4-10a : Paramètres estimés (et leur erreur-type) par régression non linéaire du modèle Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) et du modèle partiellement non compétitif (Éq. 25 et 26a). Les intervalles d'erreur-type pour les constantes d'équilibre, log K, sont présentés entre crochets.

Mn	Paramètres Michaëlis-Menten		Paramètres du modèle d'inhibition partiellement non compétitive		
	$J_{Mn}^{MM}$ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$	$K_{Mn}^{MM}$ mM	$\log K_{Ca}^{Mn}$	$\log K_{Mn}$	$J_{max}$ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$
pH 8,0	11,2 ± 1,2	0,08 ± 0,03	3,70	4,20	11,2 ± 1,2
pH 6,5	8,5 ± 1,0	0,25 ± 0,07	[3,56 – 3,81]	[4,11 – 4,27]	5,8 ± 0,2
pH 5,0	2,6 ± 0,3	0,09 ± 0,03			2,6 ± 1,0

Tableau 4-10b : Intervalles de confiance à 95 % des paramètres estimés par régression non linéaire du modèle Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) et du modèle partiellement non compétitif (Éq. 26a).

Mn	Intervalle de confiance à 95 % des paramètres Michaëlis-Menten		Intervalle de confiance à 95 % de $J_{max}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ )
	$J_{Mn}^{MM}$ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$	$K_{Mn}^{MM}$ mM	
pH 8,0	8,08 – 14,24	0,014 – 0,139	8,08 – 14,24
pH 6,5	6,48 – 10,49	0,120 – 0,385	5,37 – 6,27
pH 5,0	2,09 – 3,03	0,035 – 0,135	2,37 – 2,75

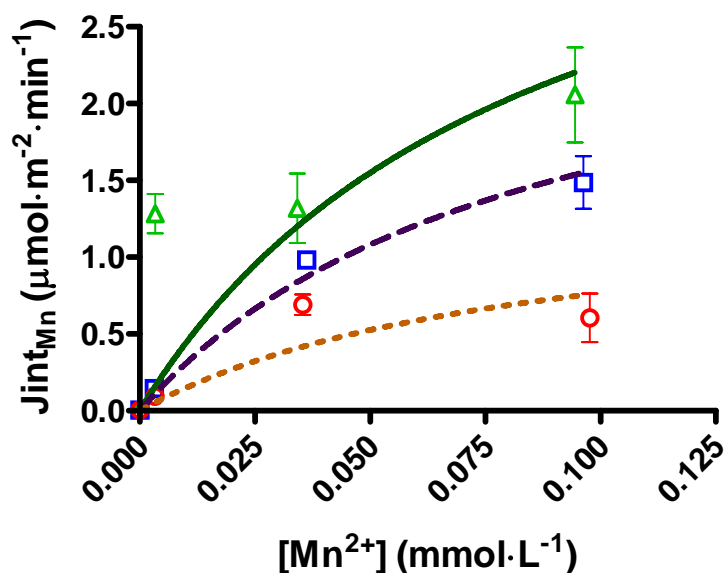


Figure 4-32 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre pour une même culture d'algues, à pH 8 ( $\Delta$ ), pH 6,5 ( $\square$ ), pH 5 ( $\circ$ ). Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 26a et des  $J_{\text{int}}$  mesurés, pour pH 8 (ligne pleine), pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).

Tableau 4-11a : Paramètres estimés (et leur erreur-type) par régression non linéaire du modèle Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) et du modèle partiellement non compétitif (Éq. 25 et 26a) pour l'expérience aux trois pH sur une même culture. Les intervalles d'erreur-type pour les constantes d'équilibre, log K, sont présentés entre crochets.

Mn	Paramètres Michaëlis-Menten		Paramètre du modèle partiellement non compétitif
	$J_{\text{Mn}}^{\text{MM}}$ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$	$K_{\text{Mn}}^{\text{MM}}$ mM	$J_{\text{max}}$ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$
pH 8,0	$1,9 \pm 0,2$	$0,001 \pm 0,001$	$4,2 \pm 0,6$
pH 6,5	$1,6 \pm 0,1$	$0,044 \pm 0,016$	$2,9 \pm 0,1$
pH 5,0	$0,8 \pm 0,1$	$0,011 \pm 0,008$	$1,4 \pm 0,2$

Tableau 4-11b : Intervalles de confiance à 95 % des paramètres estimés par régression non linéaire du modèle Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) et du modèle partiellement non compétitif (Éq. 26a) pour l'expérience aux trois pH sur une même culture.

Mn	Intervalle de confiance à 95 % des paramètres Michaëlis-Menten		Intervalle de confiance à 95 % de $J_{\max}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ )
	$J_{\text{Mn}}^{\text{MM}}$ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$	$K_{\text{Mn}}^{\text{MM}}$ mM	
pH 8,0	1,3 - 2,2	0 - 0,004	2,78 - 5,60
pH 6,5	1,4 - 2,9	0,007 - 0,080	2,61 - 3,23
pH 5,0	0,5 - 1,1	0 - 0,030	0,99 - 1,85

#### 4.4.5.2. Le cadmium

Comme pour le manganèse, il nous a été impossible de déterminer  $K_{\text{H}}$ . Notre modèle final est donc pour le Cd l'équation 26b, à partir de laquelle les valeurs de  $J_{\max}$  à pH 5 ont été recalculées (Fig. 4-33, Tableau 4-12a et 4-12b) à l'aide des valeurs de  $K_{\text{Ca}}^{\text{Cd}}$  et  $K_{\text{Cd}}$ .

Le tableau 4-12b permet de comparer les intervalles de confiance à 95 % des  $J_{\max}$  obtenus à pH 5 et 6,5 par notre modèle et de constater qu'ils sont significativement différents.



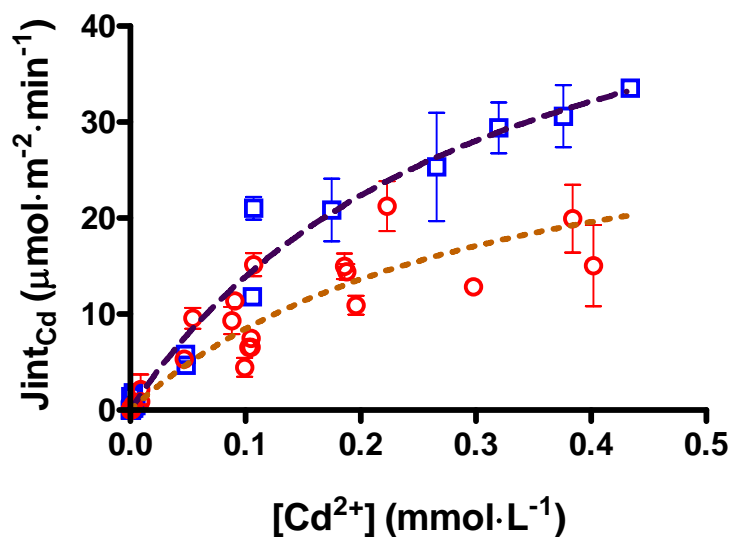


Figure 4-33 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre, à pH 6,5 (□) et pH 5 (○). Les flux prédits ont été déterminés à partir de l'équation 26b, et des  $J_{int}$  mesurés et des paramètres du tableau 4-12, pour pH 6,5 (tirets) et pH 5 (pointillés). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ).

Tableau 4-12a : Paramètres estimés par régression non linéaire du modèle Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) et du modèle partiellement non compétitif (Éq. 25 et 26b). Les intervalles d'erreur-type pour les constantes d'équilibre,  $\log K$ , sont présentés entre crochets.

Cd	Paramètres Michaëlis-Menten		Paramètres du modèle d'inhibition partiellement non compétitive		
	$J_{Cd}^{MM}$ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$	$K_{Cd}^{MM}$ mM	$\log K_{Ca}^{Cd}$	$\log K_{Cd}$	$J_{max}$ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$
pH 6,5	$57,2 \pm 4,9$	$0,31 \pm 0,05$	4,75	4,19	$57,2 \pm 4,9$
pH 5,0	$24,6 \pm 2,7$	$0,16 \pm 0,04$	[4,63 – 4,85]	[4,18 – 4,21]	$34,9 \pm 1,2$

Tableau 4-12b : Intervalles de confiance à 95 % des paramètres estimés par régression non linéaire du modèle Michaëlis-Menten (Éq. 8, section 1.3) et du modèle partiellement non compétitif (Éq. 26b).

Cd	Intervalle de confiance à 95 % des paramètres Michaëlis-Menten		Intervalle de confiance à 95 % de $J_{\max}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ )
	$J_{\text{Cd}}^{\text{MM}}$ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$	$K_{\text{Cd}}^{\text{MM}}$ mM	
pH 6,5	47,3 – 67,1	0,211 – 0,413	47,3 – 67,1
pH 5,0	19,2 – 30,0	0,082 – 0,230	32,5 – 37,2

#### 4.4.6. Influence du pH du milieu de culture sur la prise en charge

##### 4.4.6.1. Acclimatation

Rappelons que De Schamphelaere et Janssen (2006) ont comparé leur étude de la toxicité du cuivre pour *P. subcapitata* et *C. vulgaris* avec les travaux de Macfie et al. (1994) chez *C. reinhardtii* et ont partiellement expliqué la différence dans l'ampleur de l'effet du pH par le fait que les cellules de *C. reinhardtii* étaient acclimatées au pH expérimental pendant 4 jours avant l'exposition au métal alors que celles de *P. subcapitata* et *C. vulgaris* ne l'étaient pas. Nos résultats semblent indiquer au contraire que l'acclimatation au pH d'exposition ne modifie pas la prise en charge, du moins pas à court terme.

De plus, les figures 4-15b (pour le manganèse) et 4-17a (pour le cadmium) présentent les taux de prise en charge des algues cultivées et exposées à pH neutre (pH 7,0 puis pH 6,5) et ceux des algues cultivées à pH neutre (7,0), puis acclimatées à pH 8,0 (pour le manganèse, Fig. 4-15b) ou 5,0 (pour le cadmium, Fig. 4-17a) pendant 5 jours et enfin, exposées de nouveau à pH neutre (6,5). À première vue, aucune différence notable entre les expériences n'est observable, ce qui suggère que les variations de pH n'affectent pas les sites de transport des métaux de façon irréversible. Des calculs statistiques permettant de comparer nos données de façon plus précise s'imposent donc.

On peut d'abord penser à comparer les paramètres de modélisation Michaëlis-Menten. Cependant, la grande incertitude des  $K_M^{MM}$  obtenus (Tableau 4-4), et le nombre de mesures limité et plus ou moins bien réparti sur la gamme de concentrations pour les expériences où le pH d'acclimatation variait, ne permettent pas de faire de comparaisons robustes. C'est pourquoi nous avons décidé d'effectuer des simulations Monte Carlo.

#### 4.4.6.2. Simulations Monte Carlo

Afin de pouvoir comparer l'influence du pH du milieu d'acclimatation sur la prise en charge des métaux (Fig. 4-15 et 4-16 pour Mn et Fig. 4-17 et 4-18 pour Cd), nous avons effectué des simulations Monte Carlo. Elles permettent d'obtenir un taux de prise en charge moyen et son intervalle de confiance à 95 % tout en considérant l'incertitude déterminée pour chaque paramètre de notre modèle. Ainsi, les mesures d'expériences où les conditions varient peuvent être comparées : si elles sont dans l'intervalle de confiance, on peut considérer que le changement de condition n'a pas d'effet.

Nos simulations sont basées sur les résultats expérimentaux des algues acclimatées et exposées au même pH (Fig. 4-12 pour Mn et Fig. 4-14 pour Cd) ainsi que sur les paramètres déterminés par la modélisation ( $K_{Ca}$ ,  $K_M$  et  $J_{max}$  ; voir la section précédente). Un total de 10 000 simulations a été effectué pour chaque paramètre en intégrant leur incertitude (intervalle de confiance à 95 %) au calcul et en imposant une erreur aléatoire gaussienne (distribution normale). Avec les  $K_{Ca}^{MC}$ ,  $K_M^{MC}$  et  $J_{maxM}^{MC}$  simulés (10 000 de chaque), nous avons calculé 10 000  $J_{int}$  ; les premiers et derniers 5 % ont été exclus, donnant ainsi les extrémités de l'intervalle à 95 % de nos simulations et la moyenne des  $J_{int}$  restants a été calculée. Nous avons effectué ces calculs à tous les pH pour les deux métaux.

Grâce aux simulations Monte Carlo, il nous a été possible de mettre en perspective les prises en charge déterminées en fonction de la concentration libre d'ion métallique pour des algues exposées au même pH mais acclimatées à des pH différents ; il faut noter que toutes ces algues proviennent d'une culture mère à pH 7 : la figure 4-34 présente la prise en charge du manganèse pour une exposition à pH 8, certaines algues ayant été

acclimatées à pH 8 ( $\Delta$ ) et d'autres à pH 6,5 ( $\blacktriangle$ ) ; la figure 4-35 présente la prise en charge du manganèse pour une exposition à pH 6,5, certaines algues ayant été acclimatées à pH 6,5 ( $\square$ ) et d'autres à pH 8 ( $\blacksquare$ ). La figure 4-36 présente la prise en charge du cadmium pour une exposition à pH 6,5, certaines algues ayant été acclimatées à pH 6,5 ( $\square$ ) et d'autres à pH 8 ( $\blacksquare$ ) ; la figure 4-37 présente la prise en charge du cadmium pour une exposition à pH 5, certaines algues ayant été acclimatées à pH 5 ( $\circ$ ) et d'autres à pH 6,5 ( $\bullet$ ). Dans chacune de ces figures, la prise en charge simulée moyenne (ligne pleine) et son intervalle de confiance à 95 % (lignes en tirets) aux différents pH sont présentés.

L'observation générale des figures 4-34 à 4-37 permet de confirmer qu'il n'y a pas d'effet du pH d'acclimatation sur la prise en charge des métaux puisque la grande majorité des points se situent dans l'intervalle de confiance des simulations effectuées à partir des prises en charge des algues acclimatées et exposées au même pH. S'il y avait eu un effet du pH d'acclimatation, par exemple pour les algues acclimatées à pH 8 et exposées à pH 6,5 (Fig. 4-34), les points ( $\blacktriangle$ ) se seraient trouvés dans l'intervalle Monte Carlo bleu (simulé à partir des prises en charge d'algues acclimatées et exposées à pH 6,5 ;  $\square$ ) et pas dans l'intervalle Monte Carlo vert (simulé à partir des prises en charge d'algues acclimatées et exposées à pH 8 ;  $\Delta$ ). On peut constater que certains points (points pleins) sont à l'extérieur de l'intervalle de confiance, mais des points de référence (symboles vides) s'y trouvent également. Ceci s'explique par la variabilité des mesures et le poids des points situés au niveau du plateau par rapport aux points situés dans la partie quasi-linéaire puisque  $K_{Mn}$  et  $K_{Cd}$  sont calculées à l'aide des  $J_M^{MM}$  (étape 2 décrite dans le chapitre 3). Il faut ajouter que la pondération lors des simulations n'était pas possible du fait de la répartition inégale des points sur la gamme de concentration. On peut tout de même conclure que les données sont cohérentes quand le pH varie. Il semble donc qu'une acclimatation de 5 jours à un pH donné n'ait pas d'influence sur les flux de prise en charge du manganèse et du cadmium chez *C. reinhardtii*.

Comparons maintenant des algues exposées à pH 5 mais qui proviennent de cultures mère différentes : les figures 4-38 pour Mn et 4-39 pour Cd, présentent la prise en charge métallique pour des algues provenant d'une culture mère à pH 7 (HEPES) ( $\circ$ ) et pour des algues provenant d'une culture mère à pH 5 (MES) ( $\bullet$ ), toutes deux cultivées à pH 5 pendant les 5 jours avant l'exposition. Dans ces figures, la prise en charge simulée

moyenne (ligne pleine) et son intervalle de confiance à 95 % (lignes en tirets) sont également présentés. Dans ce cas, on ne peut pas conclure qu'il n'y ait pas d'effet du pH d'acclimatation sur la prise en charge des métaux puisque la majorité des points (vides ou pleins) ne se situent pas dans l'intervalle de confiance de nos simulations, qui est relativement étroit. On peut tout de même souligner que de nombreux points pleins sont très proches des points vides ou que les écarts-types se croisent (pour deux des trois derniers points ● du plateau de la figure 4-38). Une fois encore la variabilité des résultats et le poids des points à haute concentration sont à l'origine des ces déviations. Notons toutefois que l'échelle en ordonnée diminue avec le pH, ce qui accentue visuellement l'écart comparativement à une échelle constante.

Bien qu'il soit préférable de corroborer ces résultats avec une autre espèce algale qui serait moins susceptible de générer une aussi grande variabilité, on peut penser que des algues soumises à une pollution acide brutale auront le même comportement vis-à-vis du manganèse que des algues acclimatées.

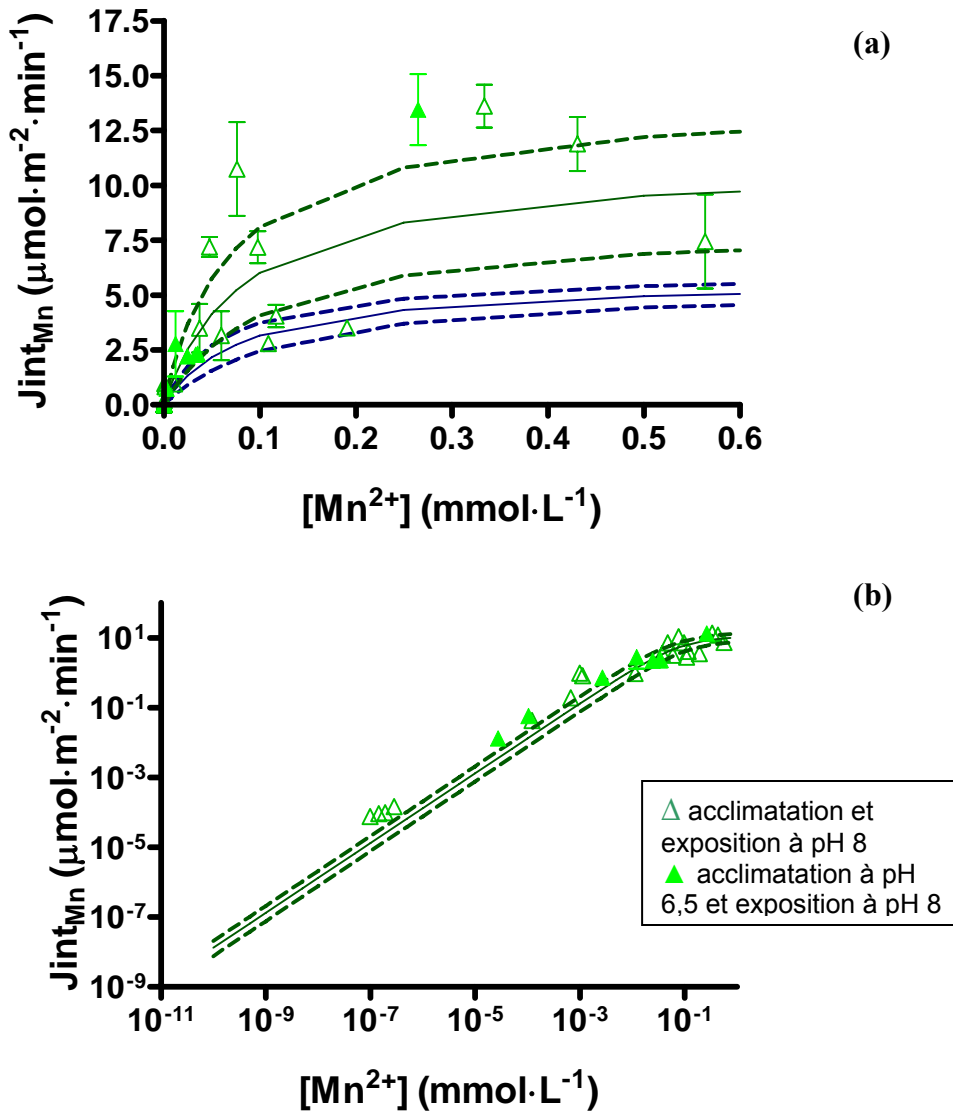


Figure 4-34 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) pour des cellules exposées à pH 8 ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets), en vert pour de des simulations issues des mesures de prises en charge pour des algues acclimatées et exposées à pH 8 et en bleu à pH 6,5.

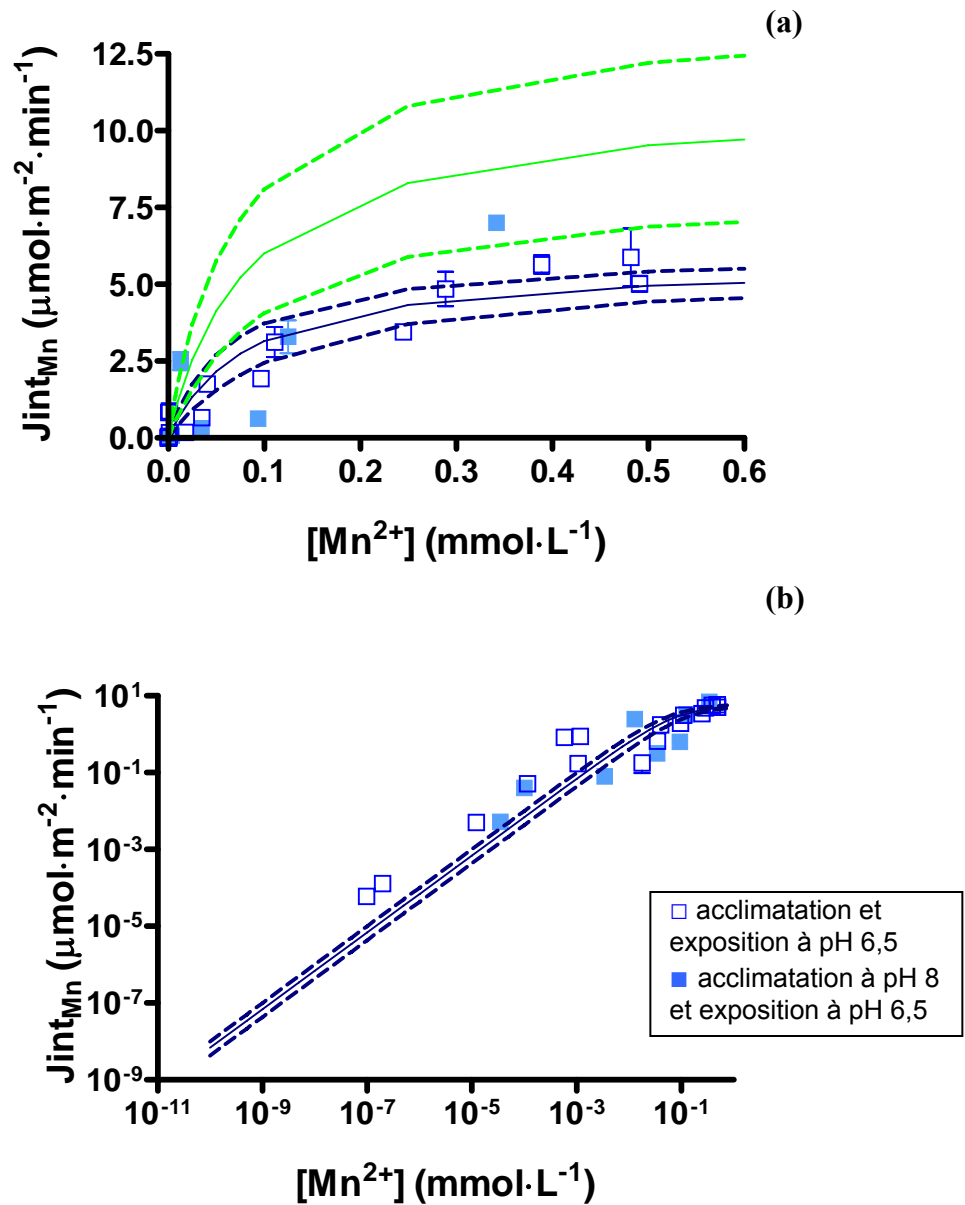


Figure 4-35 : Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) pour des cellules exposées à pH 6,5 (■, □). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets), en vert pour de des simulations issues des mesures de prises en charge pour des algues acclimatées et exposées à pH 8 et en bleu à pH 6,5.

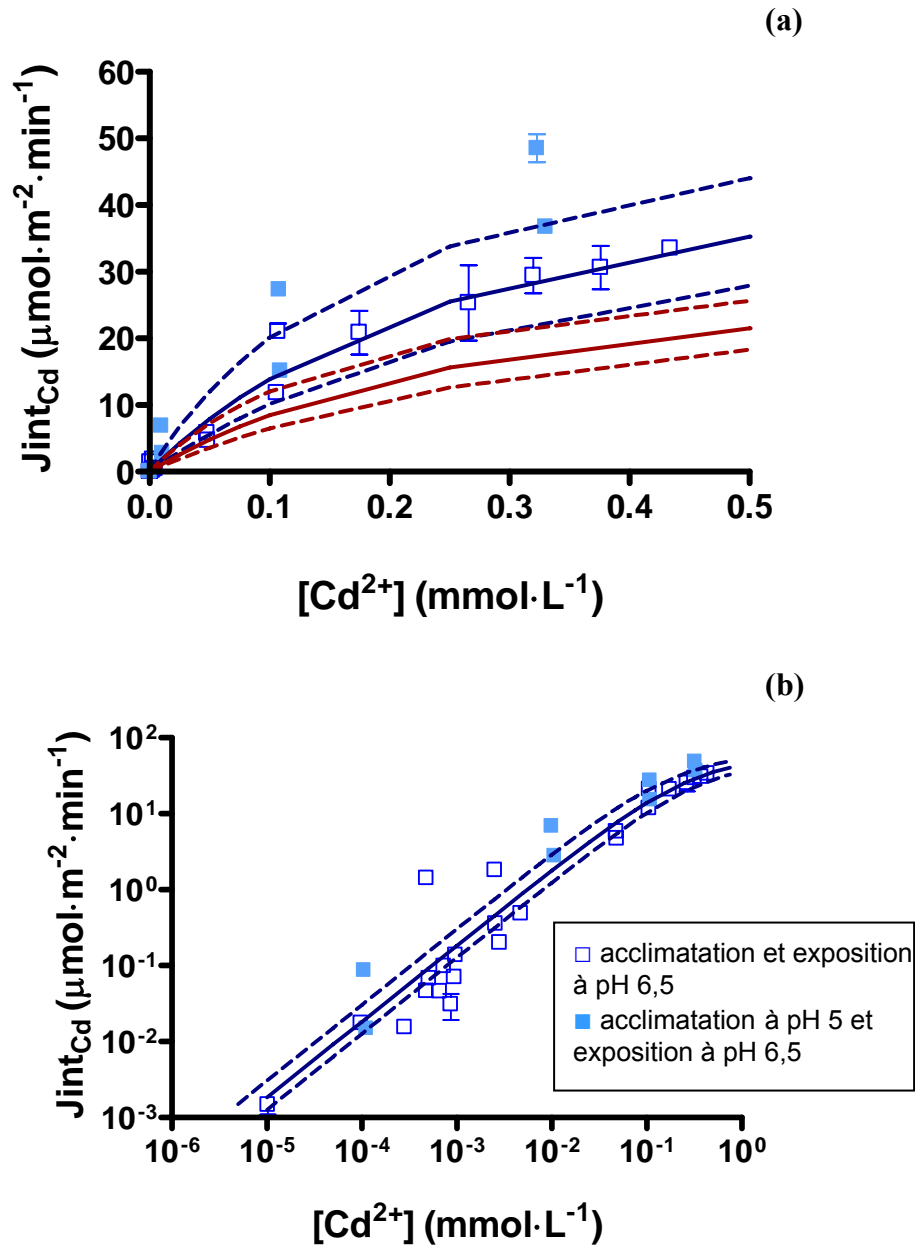


Figure 4-36 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) pour des cellules exposées à pH 6,5 (■, □). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets), en **bleu** pour de des simulations issues des mesures de prises en charge pour des algues acclimatées et exposées à pH 6,5 et en **bordeaux** à pH 5.



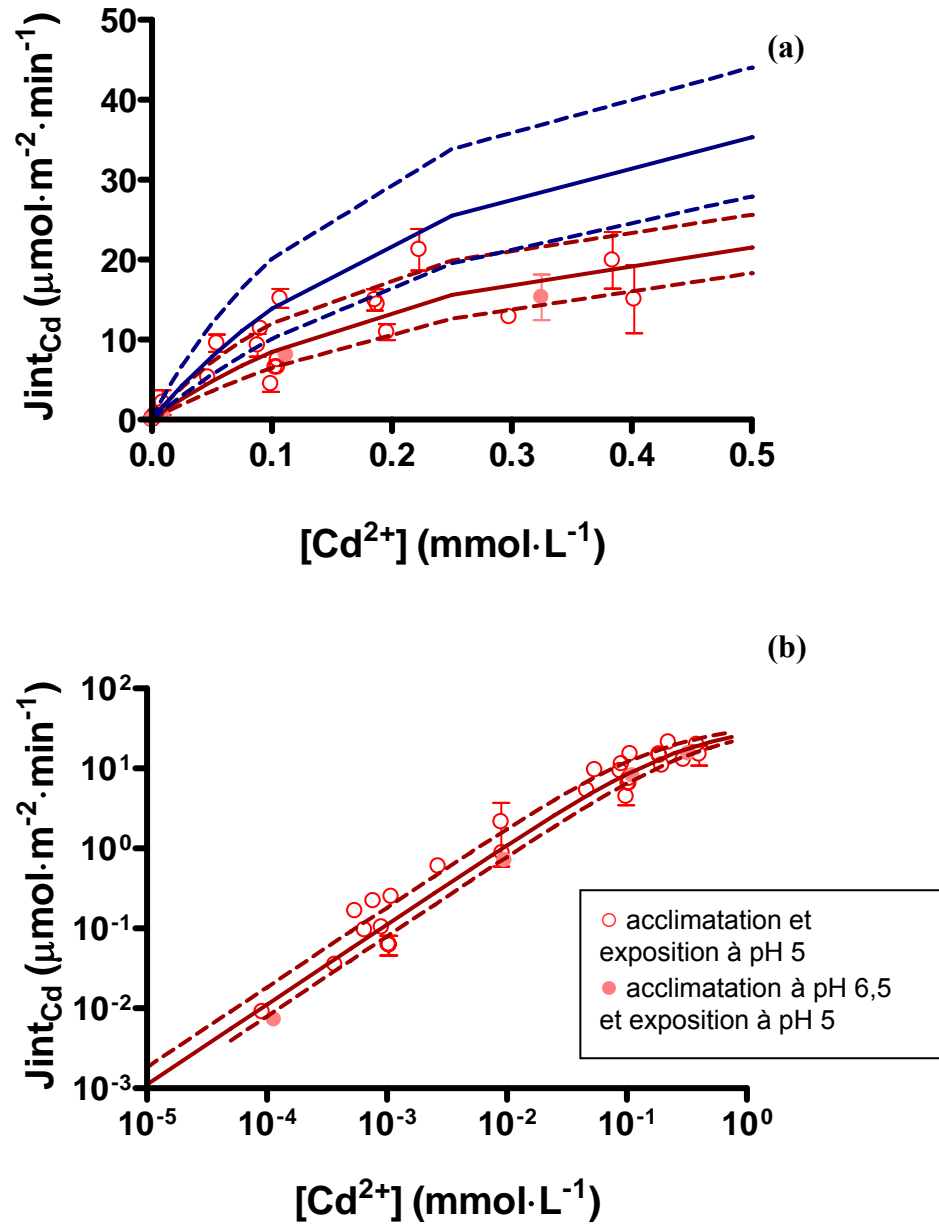


Figure 4-37 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) pour des cellules exposées à pH 5 (●, ○). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets), en **bleu** pour de des simulations issues des mesures de prises en charge pour des algues acclimatées et exposées à pH 6,5 et en **bordeaux** à pH 5.

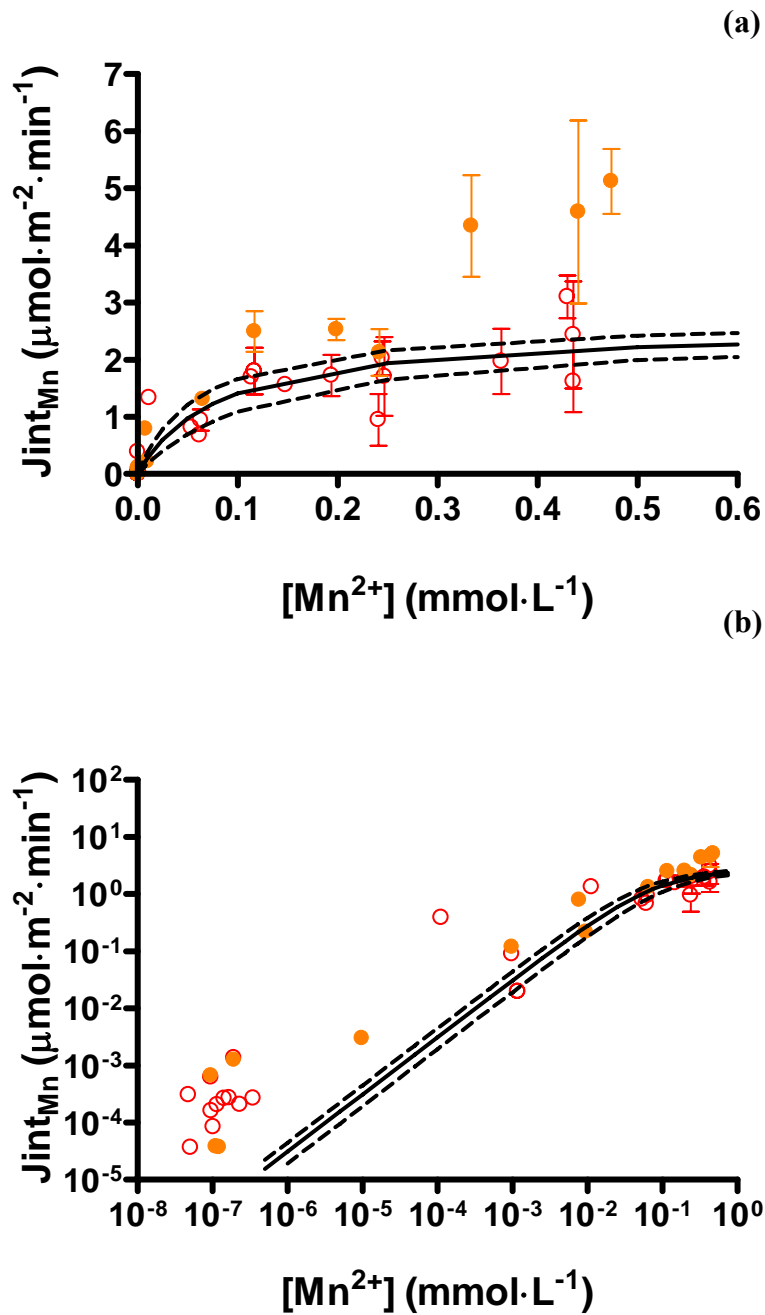


Figure 4-38: Flux d'internalisation du manganèse en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) pour des cellules exposées à pH 5 mais ayant toujours été cultivées à pH 5 (●) et des cellules cultivées à pH 7 et transférées dans un milieu à pH 5 seulement 5 jours avant l'expérience (○). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets).

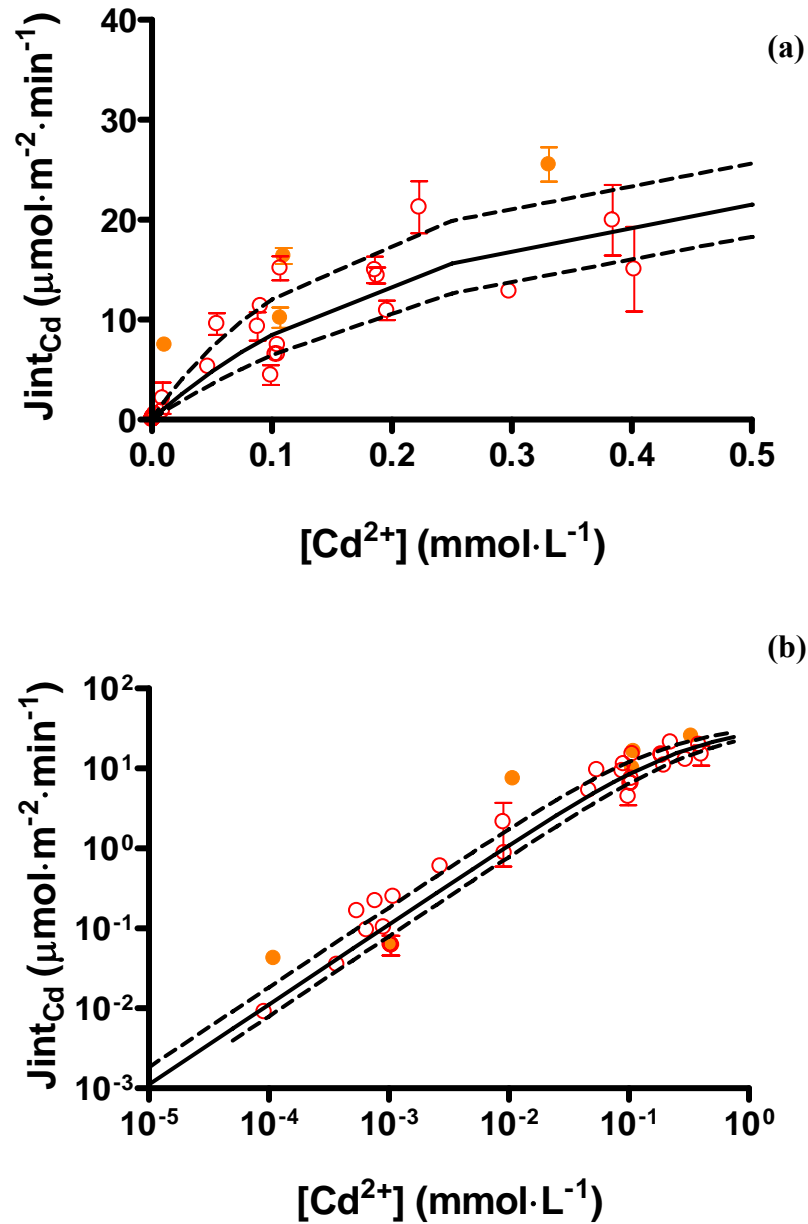


Figure 4-39: Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) pour des cellules exposées à pH 5 mais ayant toujours été cultivées à pH 5 (●) et des cellules cultivées à pH 7 et transférées dans un milieu à pH 5 seulement 5 jours avant l'expérience (○). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets).

#### 4.4.7. Effet du tampon MES sur la prise en charge du cadmium

Encore une fois, les simulations Monte Carlo ont permis de comparer les prises en charge de cadmium déterminées en fonction de la concentration libre d'ion métallique pour des algues acclimatées et exposées à pH 6,5 (Fig. 4-40) et à pH 5 (Fig. 4-41) avec ou sans tampons MES.

Les points se trouvant principalement dans l'intervalle de confiance simulé, on peut avancer qu'il n'y a pas d'effet de tampon sur la prise en charge du cadmium à ces deux pH. Nos résultats sont en accord avec les constatations de Wehr *et al.* (1986) et Soares *et al.* (1999) (voir la section 2.1.2) qui ont conclu que le tampon MES pouvait être utilisé pour les expériences de prises en charge des métaux par les algues.

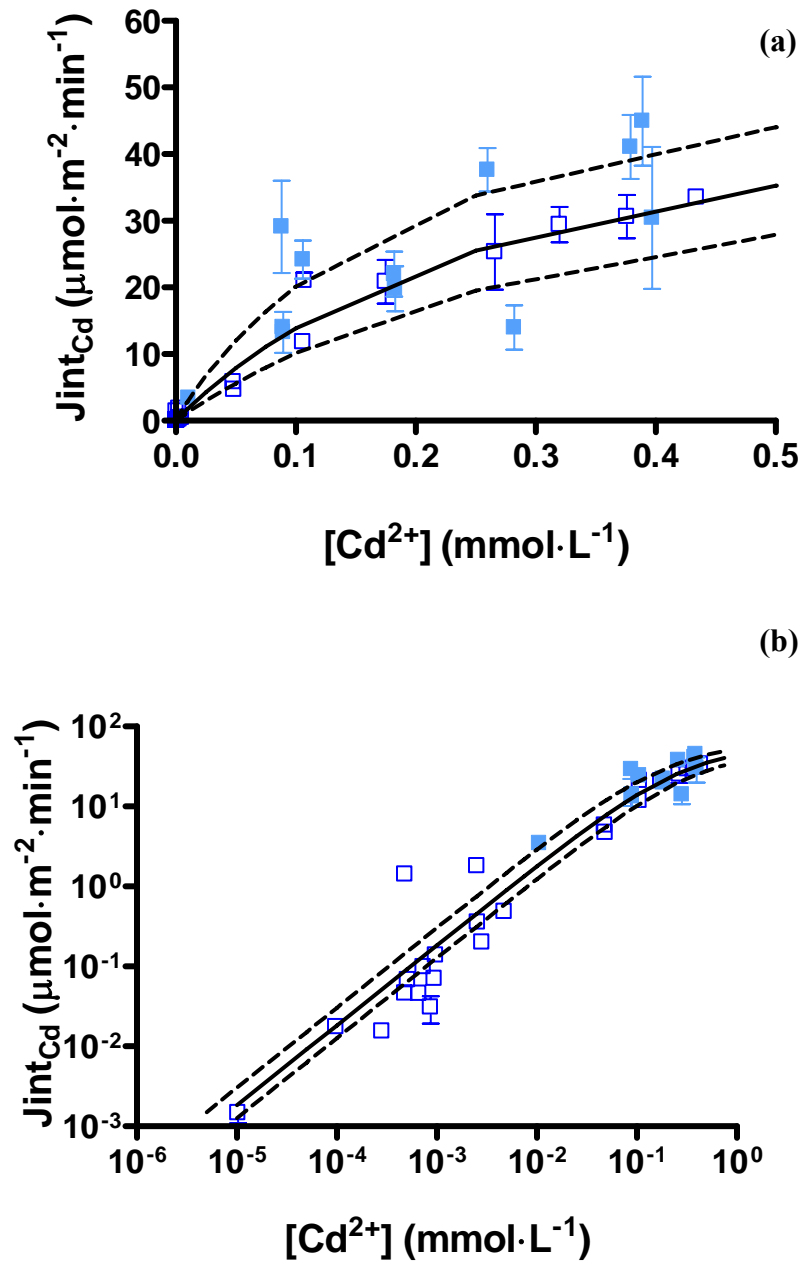


Figure 4-40 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) à pH 6,5 avec (□) et sans tampon MES (■). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole ( $n = 3$ ). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets).

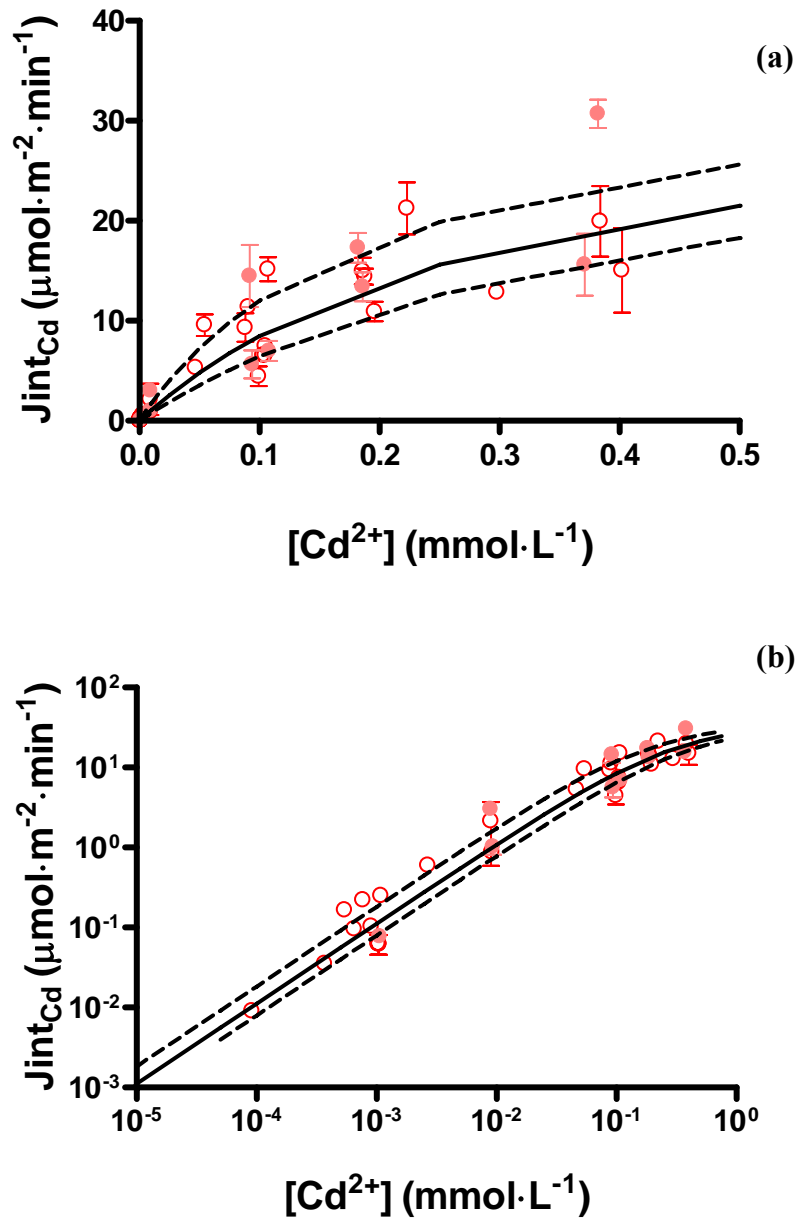


Figure 4-41 : Flux d'internalisation du cadmium en fonction de la concentration de métal libre (a) et sa représentation en log 10 (b) à pH 5 avec (○) et sans tampon MES (●). Les barres d'écart-type sont représentées quand elles sont plus larges que le symbole (n = 3). La prise en charge simulée moyenne (Monte Carlo) est représentée par la ligne pleine et son intervalle de confiance à 95 % par les lignes en tirets).

#### 4.4.8. Mécanisme d'inhibition de la prise en charge du métal par les protons

##### 4.4.8.1. Observations générales

Comme on s'y attendait, la principale observation de nos travaux était que, quand le pH diminue, la prise en charge des métaux diminue également, démontrant l'inhibition de l'internalisation du métal par les protons. Notons que, résultat inattendu, la constante  $K_H$  n'est pas un paramètre sensible dans notre modélisation. De plus, les flux  $J_{\max}$  ont des valeurs qui augmentent significativement avec le pH, ce qui indique clairement un phénomène d'inhibition (partiellement) non compétitive.

##### 4.4.8.2. Mécanismes pouvant influencer sur le flux d'internalisation maximal, $J_{\max}$

En guise de rappel, mentionnons que  $J_{\max} = k_{\text{int}} \cdot \{\equiv X\}_T$ . Un changement de  $J_{\max}$  peut donc être interprété de deux manières : comme une variation du nombre total de sites capables de lier et d'internaliser le métal,  $\{\equiv X\}_T$  (inhibition simplement non compétitive) ; ou comme une variation de  $k_{\text{int}}$ , c'est-à-dire comme un changement de la constante de cinétique d'internalisation du métal (inhibition partiellement non compétitive).

Dans le premier cas, l'inhibition non compétitive pourrait résulter d'un effet irréversible de la liaison de l'inhibiteur à la membrane, n'empêchant pas le métal de se lier mais rendant le transporteur incapable de l'internaliser (diminution du nombre de  $\{\equiv X\}_T$  « actifs »). Lorsque le pH diminue, une proportion grandissante de sites de transport pourrait être désactivée. **Toutefois, les expériences où les algues étaient acclimatées à un pH différent de celui du pH d'exposition n'ont montré aucune influence du pH d'acclimatation sur la prise en charge des deux métaux ; le pH du milieu d'exposition était le paramètre clé.**

D'un autre point de vue, il pourrait être suggéré que les cellules produisent davantage de transporteurs à haut pH (augmentation de  $\{\equiv X\}_T$ ). Ceci est improbable puisque les algues acclimatées à bas pH et exposées à haut pH donnent des résultats

similaires à ceux des algues acclimatées et exposées à haut pH. La synthèse de nouveaux transporteurs n'étant pas un processus instantané, elle est plutôt improbable pour un temps d'exposition aussi court (45 min.).

Dans le deuxième cas,  $k_{int}$  pourrait être modulé par le pH. Un mécanisme plausible pour expliquer la modulation de la vitesse d'internalisation,  $k_{int}$ , serait que les protons se lient à des sites membranaires différents de ceux impliqués dans la complexation de surface du métal menant à son internalisation. La conséquence de cette liaison de protons serait un changement des caractéristiques fonctionnelles des sites de liaison du métal, ce qui résulterait en une diminution du flux de prise en charge métallique  $J_{int}$ . Ce mécanisme d'inhibition partiellement non compétitive a été évoqué à quelques reprises dans l'introduction (Harrison et al., 1986 ; Chowdhury et Blust, 2001 ; Kola et Wilkinson, 2005 ; Fortin et al., 2007) et **nos résultats renforcent cette hypothèse en démontrant clairement (à notre connaissance pour la première fois avec des algues unicellulaires) une inhibition de nature partiellement non compétitive.**

L'hypothèse selon laquelle les protons sont de simples compétiteurs pour la prise en charge du manganèse et de celle du cadmium chez *C. reinhardtii* doit être rejetée et l'inhibition partiellement non compétitive doit donc être considérée.

#### 4.4.8.3. Comparaison de nos résultats avec la littérature

Revenons à présent aux études, présentées dans l'introduction, dont les résultats déviaient du BLM.

De façon générale, les résultats des études ayant suggéré une prise en charge de l'espèce MOH pourraient être expliqués par notre théorie, c'est-à-dire une modification de la cinétique d'internalisation  $k_{int}$  par les protons plutôt que par l'absorption du complexe MOH.

Plus spécifiquement, Mehta et al. (2000) ont étudié la prise en charge du nickel chez *Chlorella vulgaris* lorsque le pH chutait de 6,5 à 3,5 ; ils ont obtenu des  $K_m$  et des flux de prise en charge  $J_{max}$  qui changeaient avec le pH. Ils ont proposé l'hypothèse de la compétition mais aussi la « dénaturation » des molécules de transport par l'acidité pour



expliquer ce phénomène ce qui correspond en quelque sorte à nos conclusions pour le Mn et le Cd chez *C. reinhardtii*. Toutefois, d'après nos résultats, cette « dénaturation » (ou changement fonctionnel du site de transport l'empêchant d'internaliser le métal) ne serait pas irréversible puisque le pH d'acclimatation n'affecte pas la prise en charge de nos métaux ; ce qui resterait à démontrer pour le nickel. Parent et Campbell (1994) ont observé qu'à concentration en  $Al^{3+}$  fixe, la prise en charge et la toxicité de l'aluminium augmentent avec le pH (entre 4,3-6,0) chez *Chlorella pyrenoidosa*, comme le prédit le FIAM. Les auteurs ont cependant constaté que malgré la prise en compte de la compétition  $Al^{3+}/H^+$ , l'inhibition de la croissance montrait une dépendance résiduelle au pH non expliquée. L'effet compensatoire entre l'augmentation de la concentration métallique et la compétition des protons pour les sites de prise en charge n'était pas suffisant pour expliquer l'augmentation de la protection des protons vis-à-vis du métal quand le pH diminue. Une inhibition de type partiellement non compétitive pourrait expliquer ce phénomène : des changements des caractéristiques fonctionnelles des protéines de transport de la membrane entraînant une internalisation de métal moins importante. Les mêmes explications sont applicables aux résultats obtenus par Parent et al. (1987) (prise en charge du manganèse chez l'algue *Mougeotia* sp. à pH 5,5 et à pH 7).

##### 4.4.8.3.1. Le manganèse

Très peu d'études proposent des constantes de stabilité conditionnelles pour la liaison de Mn à des sites de transport algaux. De plus, les espèces testées sont des algues marines, ce qui rend les comparaisons avec nos résultats difficiles. Cependant, les valeurs rapportées par Slaveykova et Wilkinson (2005) vont de  $10^{7,0}$  à  $10^{3,1}$  (certaines espèces présentaient un profil correspondant à deux systèmes de transport). Notre estimation de  $K_{Mn}$  ( $10^{4,20}$ ) se situe dans cet intervalle de valeur et plutôt dans la moitié inférieure.

##### 4.4.8.3.2. Le cadmium

Les valeurs de  $K_{Cd}$  données pour *C. pyrenoidosa* ( $10^{5,5} M^{-1}$  à pH 7) et pour *C. vulgaris* ( $10^{4,4} M^{-1}$  à pH 6,8) sont proches de nos résultats ( $K_{Cd} = 10^{4,19}$ ) – voir

Slaveykova et Wilkinson (2005) et les références citées dans cette revue de la littérature. Dans le cas de *C. reinhardtii*, Kola et Wilkinson (2005) rapportent un  $J_{\max}$  à pH 7 ( $1,3 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 50 fois inférieur au notre ( $J_{\max} = 5,7 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ ) car ils ont observé une saturation du système de transport à des concentrations plus faibles (autours de  $[\text{Cd}^{2+}] = 10^{-6} \text{ M}$ , Fig. 4-42b, tandis que notre plateau de saturation commence vers  $10^{-4} \text{ M}$ , Fig. 4-42a). Ceci mène à une constante conditionnelle  ${}^{\circ}K_{\text{Cd}} = 1/K_{\text{Cd}}^{\text{MM}} = 10^6 \text{ M}^{-1}$  (calculée à partir de la modélisation Michaëlis-Menten, qui suppose qu'aucune inhibition significative de la prise en charge par d'autres cations n'a lieu) qui est par conséquent nettement supérieure à notre constante ( $K_{\text{Cd}} = 10^{4,19}$ ). D'un autre côté, leur constante d'affinité du Ca pour les sites de transport du Cd est proche ( $K_{\text{Ca}} = 10^{4,5}$ ) de la notre ( $K_{\text{Ca}} = 10^{4,75}$ ).

Les grandes différences entre les paramètres de prise en charge reflètent une différence d'affinité des sites de transport pour le métal. La composition des milieux de culture et en particulier des milieux d'exposition (ne contenant pas de calcium) utilisés par Kola et Wilkinson (2005) ( $10^{-2} \text{ M}$  d'acide morpholino propane sulfonique, force ionique de  $10^{-2} \text{ M}$  ajusté à l'aide  $\text{NaNO}_3$ ) pourrait expliquer cette différence. Étant donné l'influence importante du calcium, on pourrait émettre l'hypothèse, qui serait à étudier, que la déficience en calcium mène à un changement de l'affinité du site où se lie le cadmium. Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que nos résultats de modélisation de la prise en charge du cadmium donnent  $K_{\text{Ca}} > K_{\text{Cd}}$ . Ceci laisse croire que le calcium jouerait un rôle très important dans l'inhibition du transport de Cd.

Notons également qu'entre les deux études, des souches différentes de *C. reinhardtii* ont été utilisées.

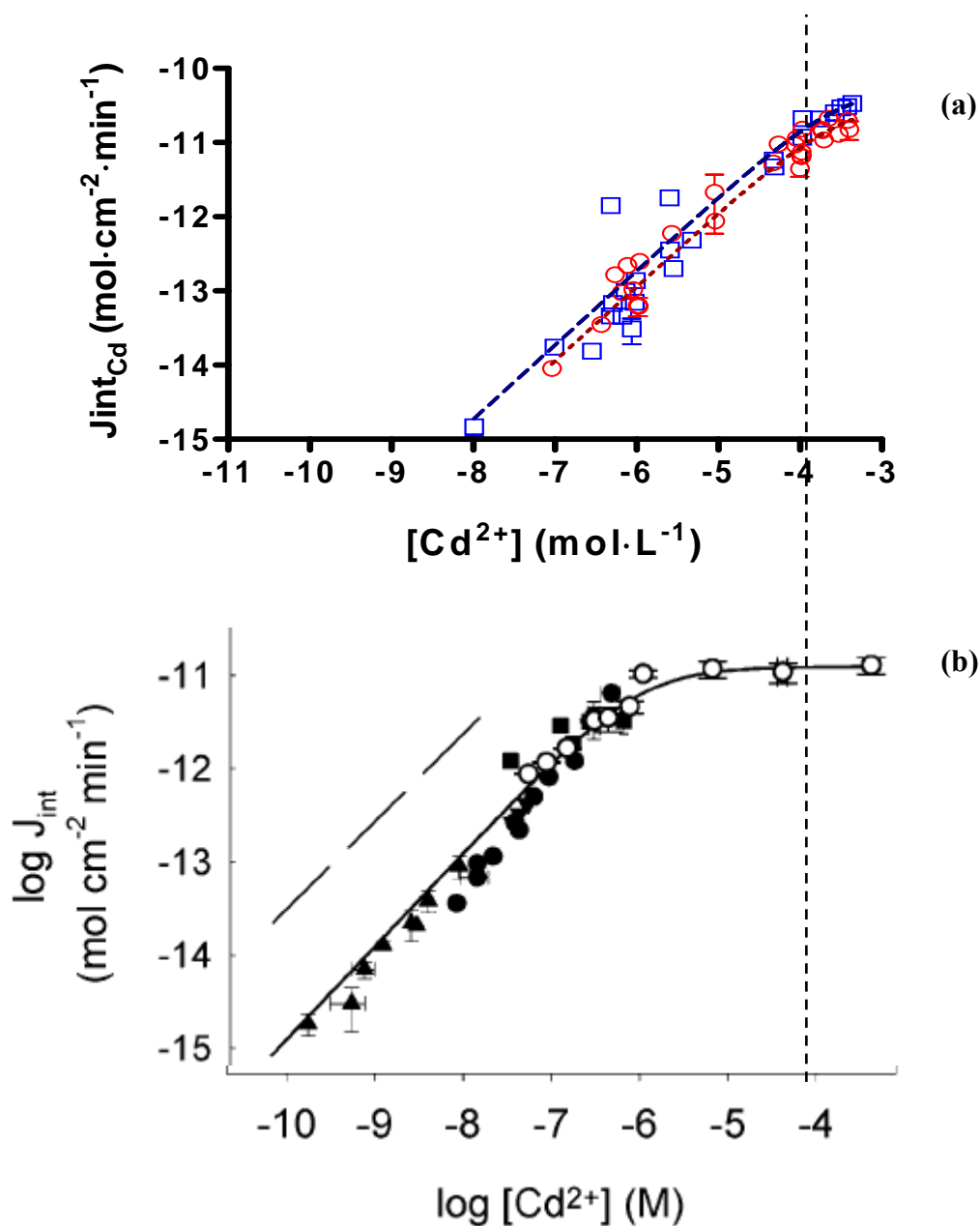


Figure 4-42 : (a) Prise en charge du cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction du métal libre en solution pour pH 5 (○) et 6,5 (□) et leur modélisation (Éq. 26) : ligne en tirets à pH 6,5 et ligne en pointillés à pH 5 (nos résultats) ; (b) Représentation logarithmique des interceptes pour le graphe  $Cd_{int}$  vs. temps en fonction de  $[Cd^{2+}]$ , sans (○) ou avec (●) de l'acide citrique, avec acide diglycolique (■) ou avec NTA(▲), pour *C. reinhardtii* à pH 7 ; la ligne en pointillée représente l'isotherme de Langmuir pour  $\log K_{ads} = 10^{6,2} \pm 0,1 \text{ M}^{-1}$  et  $J_{max} = (3,2 \pm 0,1) \times 10^{-11} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$  (tirée de [Kola et Wilkinson, 2005](#)).

Revenons à présent sur le fait que Kola et Wilkinson (2005) ont estimé une valeur pour la constante de liaison des protons aux sites de transport du cadmium ( $K_H = 10^{5,2}$ ). Cette valeur n'a pas expliqué de façon satisfaisante les données et ils ont considéré la liaison d'un second proton au même transporteur ( $2 H^+ + \equiv X^- \leftrightarrow \equiv X-H_2$  ;  $K_{H_2} = 10^{11,3}$ ). Un tel raisonnement implique d'abord que le modèle de prise en charge soit nettement plus complexe (nombre plus élevé de paramètres ajustables diminuant ainsi les probabilités de convergence), imposant aussi davantage d'approximations dans les calculs des paramètres. De plus, il est hautement improbable que le site de transport du métal ait plus d'affinité pour le second proton ( $pK_{a_2} = 6,1$ ) que pour le premier ( $pK_{a_1} = 5,2$ ) puisque, pour que le  $pK_{a_2}$  d'un site de transport puisse être supérieur au  $pK_{a_1}$ , il faudrait que la liaison du premier proton entraîne un changement de conformation du transporteur qui libèrerait un site ayant une plus grande affinité pour le second proton.

## 5. CONCLUSION

### 5.1. Effet du pH sur la prise en charge du manganèse et du cadmium

L'influence du pH sur la prise en charge du manganèse et du cadmium par *C. reinhardtii* a été étudiée pour des temps d'exposition courts afin de mieux comprendre les effets des protons sur les flux transmembranaires métalliques. Pour les deux métaux, nous avons observé une internalisation biologique de premier ordre. L'inhibition compétitive des protons prévue par le BLM, pour les sites de transport membranaire est difficilement observable de par l'incertitude sur les  $K_M^{MM}$  (modélisation Michaëlis-Menten). Cependant, les flux de transport maximaux ( $J_{max}$ ) diminuent (d'un facteur 4 pour le manganèse entre pH 8 et pH 5, et diminuent significativement d'un facteur 1,6 pour le cadmium, entre pH 6,5 et 5) quand le pH diminue, ce qui suggère fortement une inhibition simplement ou partiellement non compétitive de la part des protons.

Les changements de conditions des expériences de prise en charge ont permis de mettre en évidence que le chrome n'a pas d'effet sur l'internalisation du manganèse pour des concentrations entre  $1,5 \cdot 10^{-12}$  et  $1 \cdot 10^{-8}$  M, et que la présence de tampon MES n'a pas d'influence sur la prise en charge du cadmium à pH 5 et 6,5 et pour des concentrations métalliques entre  $10^{-6}$  et  $10^{-3}$  M.

Un modèle d'inhibition de type Michaëlis-Menten a été testé. L'inhibition de la prise en charge par le calcium ainsi que l'impact de la variation du pH sur  $J_{int}$  ont permis de calculer les constantes de stabilité pour les liaisons compétitives de  $Ca^{2+}$  avec les sites de transport (ou ligand biotique) du cadmium et du manganèse ainsi que les constantes de stabilité pour les transporteurs de ces deux métaux :  $K_{Ca}^{Mn} = 10^{3,70} M^{-1}$  avec un intervalle d'erreur-type de  $[10^{3,51} - 10^{3,81}]$ , et  $K_{Mn} = 10^{4,20} M^{-1} [10^{4,11} - 10^{4,27}]$  ;  $K_{Ca}^{Cd} = 10^{4,75} M^{-1} [10^{3,85} - 10^{4,63}]$ , et  $K_{Cd} = 10^{4,19} M^{-1} [10^{4,18} - 10^{4,21}]$ . Le calcium inhibe fortement la prise en charge des deux métaux : les flux de manganèse, pour une  $[Mn^{2+}]$  fixe de 0,5  $\mu M$ , diminuent d'un facteur 2 (de 0,080 à 0,037  $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot min^{-1}$ ) en passant de  $10^{-7}$  M à  $10^{-3}$  M  $Ca^{2+}$  ; la prise en charge du cadmium, pour une concentration métallique de 1  $\mu M$ , diminue quant à elle encore plus fortement, d'un facteur 40 (de 0,43 à 0,01

$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ) en présence d'un excès de calcium 10 000 fois supérieur ( $10^{-3}$  M) à la concentration de base en calcium ( $10^{-7}$  M). En revanche, la constante  $K_H$  n'a pu, pour aucun des deux métaux, être estimée précisément ( $K_H \ll 10^5$ ), indiquant que l'inhibition compétitive des protons (celle considérée par le BLM) n'est pas significative dans le processus de calcul des paramètres de notre modèle. Il est probable que le rôle d'inhibiteurs compétitif des protons ne soit pas détectable en raison de la grande variabilité observée dans les mesures de prise en charge des métaux. Rappelons que l'origine de cette variabilité reste obscure mais la carence en manganèse du milieu de culture pourrait en être à l'origine. Toutefois, ceci n'a pas empêché d'obtenir des  $J_{\max}$  avec une faible incertitude et ainsi procéder à la modélisation avec confiance.

Les variations de  $J_{\max}$  peuvent être interprétées comme une variation du nombre total de sites capables d'internaliser le métal (inhibition simplement non compétitive), ou comme un changement de la constante de cinétique d'internalisation du métal (inhibition partiellement non compétitive). Or, les expériences où les algues étaient acclimatées à un pH différent de celui du pH d'exposition n'ont montré aucune influence sur la prise en charge des deux métaux) et il est improbable que les cellules produisent davantage de transporteurs à haut pH (puisque les algues acclimatées à bas pH et exposées à haut pH donnent des résultats similaires avec ceux des algues acclimatées et exposées à haut pH et que le temps d'exposition de 45 min. est relativement court). Ceci nous a amené à proposer que la liaison des protons aux protéines de transport de la membrane entraînerait des changements des caractéristiques fonctionnelles de ces molécules, ce qui expliquerait pourquoi  $k_{\text{int}}$ , et donc les taux d'internalisation, sont sensibles au pH.

Nous pouvons donc conclure que notre hypothèse de départ, selon laquelle les protons sont de simples compétiteurs pour la prise en charge du manganèse chez *C. reinhardtii*, doit être rejetée. De plus, l'inhibition partiellement non compétitive peut expliquer la prise en charge du métal là où le BLM ne le peut pas.

## 5.2. Perspectives de recherche

Ceci nous mène à nous questionner sur les perspectives de recherche inspirées par ces travaux. La nature de l'inhibition du calcium pourrait être étudiée par une approche similaire à celle utilisée ici pour le pH (notons que Worms et Wilkinson (2007) ont suggéré que le calcium inhibe la prise en charge du Ni chez *C. reinhardtii* de manière non compétitive). L'influence d'autres cations comme le magnésium devrait être également étudiée pour les deux métaux afin d'être certain de ne pas omettre de compétiteur potentiel pour les sites de transport membranaire.

Dans ce sens, l'influence d'un métal sur la prise en charge d'un autre métal peut aussi être étudiée en testant un modèle comme ceux proposés dans nos travaux (compétitif et/ou simplement ou partiellement non compétitif), en commençant par l'effet du cadmium sur la prise en charge du manganèse et inversement (Sunda et Huntsman, 1996).

Les effets des tampons MES et HEPES sur la prise en charge d'autres métaux devraient également être étudiés pour s'assurer qu'ils n'ont pas d'impact sur les mesures comme nous l'avons constaté pour le Cd.

Il pourrait aussi être intéressant de se pencher sur l'impact des variations de pH sur la suite du parcours cellulaire du manganèse et du cadmium, sur leurs effets toxiques et leur détoxification par exemple.

L'étude des hydroxo- et carbonato-complexes, en considérant l'inhibition partiellement non compétitive des sites de prise en charge ainsi que la possibilité d'un co-transport du métal et de  $\text{OH}^-$  ou  $\text{CO}_3^{2-}$  plutôt que de celle du complexe entier, pourrait être considérée.

Nos travaux ainsi que ceux proposés ci-dessus sont des expériences en laboratoire. Des études parallèles sur le terrain seraient une suite logique mais complexe puisque nos modèles sont développés pour des milieux simplifiés où la spéciation est très contrôlée. Des avancées sur les connaissances des éléments présents en eaux naturelles (comme la matière organique par exemple) seront nécessaires avant de pouvoir véritablement expliquer le comportement des métaux par rapport aux producteurs primaires.

### 5.3. Implications pour le développement d'un BLM algal

Nos résultats démontrent que le BLM, dans son état d'avancement actuel, ne décrit pas de manière satisfaisante la véritable influence du pH sur la prise en charge du manganèse et du cadmium par les algues et qu'une composante d'inhibition partiellement non compétitive devrait être intégrée.

Le BLM est basé sur de nombreuses hypothèses (Campbell, 1995 ; van Leeuwen, 1999 ; Di Toro et al., 2001 ; Campbell et al., 2002) mais deux en particulier ont été testées dans ces travaux : (i) les cations comme  $H^+$  ou  $Ca^{2+}$  peuvent entrer en compétition avec le métal  $M^{z+}$  dans les réactions de complexation de surface ; et (ii) la nature de la surface biologique ou de ces transporteurs ioniques reste inchangée durant l'exposition au métal. Nous avons étudié la prise en charge du métal sur une large gamme de concentrations (allant jusqu'à des valeurs très au dessus de celles rencontrées normalement dans l'environnement) afin de déterminer les flux transmembranaires de saturation. Ces derniers ont permis le développement d'un modèle plus précis pour l'interprétation déterministe des processus impliqués dans la prise en charge du manganèse, du cadmium et possiblement d'autres métaux.

Nos résultats suggèrent que quand le pH varie, les changements de ces prises en charge ne peuvent être expliqués par la théorie du BLM, qui ne considère que l'impact **chimique** du pH. Si cet effet **physiologique** partiellement non compétitif du pH était applicable à toutes les interactions métal-algues, ceci justifierait une réévaluation des limitations du BLM concernant l'influence des protons. Cependant, dans une gamme de concentrations environnementales ( $< 10^{-9}$  M Cd ;  $< 10^{-6}$  M Mn), les prises en charge se font dans la partie linéaire de la courbe d'accumulation ; on ne peut pas observer de plateau de saturation et comparer les taux maximaux,  $J_{max}$ . La modélisation des taux de prise en charge par un modèle type BLM (comme Michaëlis-Menten) peut donner des résultats cohérents sans prendre en compte l'inhibition partiellement non compétitive des protons pour les sites de transport membranaire. Cependant, la compréhension de la prise en charge des métaux basée sur le BLM sera plus empirique que déterministe (et les constantes calculées plus conditionnelles) quand le pH varie. Les applications du BLM



devraient peut-être être limitées à des milieux où le pH ne varie pas, mais évidemment, ceci ne reflète pas les situations environnementales.

On peut alors se demander si l'idée d'un modèle universel applicable à toutes les espèces aquatiques est réalisable ; ou bien un modèle universel à un type d'organisme particulier (phytoplancton, zooplancton, poissons). Les résultats différents obtenus pour la prise en charge du cadmium par *C. reinhardtii* (par Kola et Wilkinson (2005) d'une part et par nous-mêmes d'autre part) ne semblent pas aller dans ce sens. C'est pourquoi un modèle comme le BLM, ajusté au cours du temps à différents types de conditions du milieu, peut donner une idée plus ou moins précise du comportement d'un organisme vis-à-vis d'un métal ce qui reste primordiale pour une protection adéquate des écosystèmes aquatique.



## 6. BIBLIOGRAPHIE

- Adam C., Garnier-Laplace J. Bioaccumulation of silver-110m, cobalt-60, cesium-137, and manganese-54 by the freshwater algae *Scenedesmus obliquus* and *Cyclotella meneghiana* and by suspended matter collected during summer bloom event. *Limnol. Oceanogr.* 48, 2303-2313. **2003.**
- Adhiya J., Cai X., Sayre R.T., Traina S.J. Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Coll. Surf.* 210, 1-11. **2002.**
- Aguilera A., Amils R. Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain). *Aquat. Toxicol.* 75, 316-329. **2005.**
- Bates S.S., Tessier A., Campbell P.G.C., Buffle J. Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. *J. Phycol.* 18, 521-529. **1982.**
- Bates S.S., Létourneau M., Tessier A., Campbell P.G.C. Variation in zinc adsorption and transport during growth of *Chlamydomonas variabilis* (Chlorophyceae) in batch culture with daily addition of zinc. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40, 895-904. **1983.**
- Batley G.E., Apte S.C., Stauber J.L. Speciation and bioavailability of trace metals in water: Progress since 1982. *Aust. J. Chem.* 57, 903-919. **2004.**
- Boily F. Mécanismes de prise en charge et toxicité du cadmium en présence de thiosulfate chez une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-ETE, QC, Canada.* **2004.**

- Boullemant A., Vigneault B., Fortin C., Campbell P.G.C. Uptake of neutral metal complexes by a green alga: influence of pH and humic substances. *Aust. J. Chem.* 57, 931-936. **2004**.
- Brown P.L., Markich S.J. Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction: extension of the conceptual model. *Aquat. Toxicol.* 51, 177-194. **2000**.
- Buffle J., Wilkinson K.J., Tercier M.L., Parthasarathy N. *In situ* monitoring and speciation of trace metals in natural waters. *Ann. Chim.* 87, 67-82. **1997**.
- Byrne R.H., Kemp L.R., Cantrell K.J. The influence of temperature and pH on trace metal speciation in seawater. *Mar. Chem.* 25, 163-181. **1988**.
- Cain D.J., Carter J.L., Fend S.V., Luoma S.N., Alpers C.N., Taylor H.E. Metal exposure in a benthic macroinvertebrate, *Hydropsyche californica*, related to mine drainage in the Sacramento River. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 380-390. **2000**.
- Campbell P.G.C., Stokes P.M. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 2034-2049. **1985**.
- Campbell P.G.C. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free ion activity model. *Dans : Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, Tessier A., Turner D.R. (Eds). J. Wiley & Sons, New York, NY, USA. 45-102. **1995**.
- Campbell P.G.C., Twiss M.R., Wilkinson K.J. 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. **1997**.

- 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. Phys. C* 133, 189-206. **2002**.
- Campbell P.G.C., Couillard Y. Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques. Dans : *Écotoxicologie moléculaire – Principes fondamentaux et perspectives de développement*, Pelletier E., Campbell P.G.C., Denizeau F. (Eds). Presses de l'Université du Québec, Québec, QC, Canada, 9-61. **2004**.
- Ceretti H.M., Vullo D.L., Zalts A., Ramirez S.A. Cadmium complexation in culture media. *Electroanal.* 18, 493-498. **2006**.
- Chamngopol S., Groisman E.A. Mg<sup>2+</sup> homeostasis and avoidance of metal toxicity. *Mol. Microbiol.* 44, 561-571. **2002**.
- Chen C.Y., Lin K.C. Optimization and performance evaluation of the continuous algal toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1337-1344. **1997**.
- Chen C.Y., Lin K.C., Yang D.T. Comparison of the relative toxicity relationships based on batch and continuous algal toxicity tests. *Chemosphere* 35, 1959-1965. **1997**.
- Chiswell B., Mokhtar M. The speciation of manganese in fresh waters. I. Use of EPR studies. *Talanta* 34, 307-311. **1987**.
- Chowdhury M.J., Blust R. A mechanistic model for the uptake of waterborne strontium in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Sci. Technol.* 35, 669-675. **2001**.
- Chuan C., Shu G.Y., Liu J.C. Solubility of heavy metals in a contaminated soil: effects of redox potential and pH. *Water, Air, Soil Pollut.* 90, 543-556. **1996**.

- Crist R.H., Oberholser K., Shank N., Nguyen M. Nature of bonding between metallic ions and alga cell walls. *Environ. Sci. Technol.* 11, 1212-1217. **1981**.
- Crist R.H., Martin J.R., Carr D., Watson J.R., Clarke H.J., Crist D.R. Interaction of metals and protons with algae. 4. Ion exchange vs adsorption models and a reassessment of Scatchard plots; ion-exchange rates and equilibria compared with calcium alginate. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1859-1866. **1994**.
- Crist R.H., Martin J.R., Crist D.R. Interaction of metal ions with acid sites of biosorbents peat moss and *Vaucheria* and model substances alginic and humic acids. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2252-2256. **1999**.
- Danilov R.A., Ekelund N.G.A. Effects of pH on the growth rate, motility and photosynthesis in *Euglena gracilis*. *Folia Microbiol.* 46, 549-554. **2001**.
- De Schamphelaere K.A.C., Vasconcelos F.M., Heijerick D.G., Tack F.M.G., Delbeke K., Allen H.E., Janssen C.R. Development and field validation of a predictive copper toxicity model for the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2454-2465. **2003**.
- De Schamphelaere K.A.C., Janssen C.R. Bioavailability models for predicting copper toxicity to fresh green microalgae as a function of water chemistry. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4514-4522. **2006**.
- De Vitre R.R., Davison W. Manganese particles in freshwaters. *Dans : Environmental particles, Vol. 2. Buffle J., van Leeuwen H.P. (Eds). Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.* 317-352. **1993**.
- Diem D., Stumm W. Is dissolved  $Mn^{2+}$  being oxidized by  $O_2$  in absence of Mn-bacteria or surface catalysts. *Geochim. Cosmochim. Acta* 48, 1571-1573. **1984**.

- 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.* 20, 2383-2396. **2001**.
- Dobson S. Environmental Health Criteria 135: Cadmium - Environmental aspects. *World Health Organisation, Geneva*. **1992**.
- Doyle R.J., Matthews T.H., Streips U.N. Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall. *J. Bacter.* 143, 471-480. **1980**.
- Elias P.S. Environmental Health Criteria 017: Manganese. *World Health Organisation, Geneva*. **1981**.
- Environnement Canada. *La Loi canadienne sur la protection de l'environnement*. [LCPE (1999), article 76]. **1999**.
- Errécalde O., Seidl M., Campbell P.G.C. Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: an exception to the free-ion model. *Water Res.* 32, 419-429. **1998**.
- European Union (EU). European Union Risk Assessment Report. RISK ASSESSMENT : Cadmium oxide/Cadmium metal, CAS-No.: 1306-19-0, CAS-No.: 7440-43-9. Final Draft RAR, Sections 0 to 3. July **2003**.
- Faller P., Kienzler K., Krieger-Liszkay A. Mechanism of Cd<sup>2+</sup> toxicity: Cd<sup>2+</sup> inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca<sup>2+</sup> site. *Biochim. Biophys. Acta* 1706, 158-164. **2005**.
- Fortin C. Mécanismes de prise en charge et toxicité de l'argent chez une algue verte en relation avec la spéciation chimique. Thèse de doctorat, T-271. *Université du Québec, INRS-Eau, QC, Canada*. **2000**.

- 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.* 19, 2769-2778. **2000**.
- Fortin C., Campbell P. G. C. Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: Role of anion transporters in metal uptake. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2214-2218. **2001**.
- Fortin C., Denison F.H., Garnier-Laplace J. Metal – phytoplankton interactions: modeling the effect of competing ions ( $H^+$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ ) on uranium uptake. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 242-248. **2007**.
- Franklin N.M., Stauber J.L., Richard P.L., Petocz P. Toxicity of metal mixture to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*): the effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2412-2422. **2002**.
- Gadd G.M., Laurence O.S. Demonstration of high-affinity  $Mn^{2+}$  uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: specificity and kinetics. *Microbiol.* 142, 1159-1167. **1996**.
- Goldman J.C., Azov Y., Riley C.B., Dennett M.R. The effect of pH in intensive microalgal cultures. I. Biomass regulation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 57, 1-13. **1982a**.
- Goldman J.C., Riley C.B., Dennett M.R. The effect of pH in intensive microalgal cultures. II. Species competition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 57, 15-24. **1982b**.
- González-Dávila M., Santana-Casino J.M., Pérez-Peña J., Millero F.J. Binding of Cu(II) to the surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. *Environ. Sci. Technol.* 29, 289-301. **1995**.



Harris E.H. The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. *Academic Press, INC., Harcourt Brace Jovanovich, Publishers*, San Diego, CA, USA. **1989**.

Harrison G.I., Campbell P.G.C., Tessier A. Effects of pH changes on zinc uptake by *Chlamydomonas variabilis* grown in batch culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43, 687-693. **1986**.

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.* 23, 283–291. **2004a**.

Hassler C.S., Slaveykova V.I., Wilkinson K.J. Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol. Oceanogr. Methods* 2, 237-247. **2004b**.

Hauck M., Mulack C., Paul A. Manganese uptake in the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides*. *Environ. Exp. Bot.* 48, 107-117. **2002**.

Heijerick D.G., De Schamphelaere K.A.C., Janssen C.R. Biotic ligand model development predicting Zn toxicity to the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: possibilities and limitations. *Comp. Biochem. Phys. C.* 133, 207-218. **2002**.

Heijerick D.G., Janssen C.R., De Coen W.M. The combined effects of hardness, pH, and dissolved organic carbon on the chronic toxicity of Zn to *D. magna*: Development of a surface response model. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 210-217. **2003**.

Hoffman D.J. Cadmium. *Dans : Handbook of ecotoxicology. CRC Press Inc. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.* 405-423. **1995**.

- 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.* 219, 95–115. **1998**.
- Hudson R.J.M., Morel F.M.M. Trace-metal transport by marine microorganisms - Implications of metal coordination kinetics. *Deep-Sea Res. Pt I.* 40, 129-150. **1993**.
- Issa A.A., Abdel-Basset R., Adam M.S. Abolition of heavy metal toxicity on *Kirchneriella lunaris* (chlorophyta) by calcium. *Ann. Bot.* 75, 189-192. **1995**.
- Kabata-Pendias A., Pendias H. *Trace Elements in Soil and Plants, Third Edition, CRC Press (Eds) , Boca Raton, FL, USA. 2001*.
- Kehres D.G., Zaharik M.L., Finlay B.B., Maguire M.E. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol. Microbiol.* 36, 1085-1100. **2000**.
- Kiefer E., Sigg L., Schosseler P. Chemical and spectroscopic characterization of algae surfaces. *Environ. Sci. Technol.* 31, 759-764. **1997**.
- Knauer K, Jabusch T, Sigg L. Manganese uptake and Mn(II) oxidation by the alga *Scenedesmus subspicatus*. *Aquat. Sci.* 61, 44–58. **1999**.
- Kola M., Wilkinson K.J. Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3040-3047. **2005**.
- Lage O.M., Vasconcelos M.T.S.D., Soares H.M.V.M., Osswald J.M., Sansonetty F., Parente A.M., Salema R. Suitability of the pH buffers 3-[N-N-bis(hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid and 2-N-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid for *in vitro* copper toxicity studies. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 199-205. **1996**.

- Lawrence S.G., Holoka M.H., Hamilton R.D. Effects of cadmium on a microbial food-chain, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Tetrahymena vorax*. *Sci. Total Environ.* 87, 381-395. **1989**.
- LaZerte B.D., Burling K. Manganese speciation in dilute waters of the Precambrian shield, Canada. *Water Res.* 24, 1097-1101. **1990**.
- Lee J.G., Roberts S.B., Morel F.M.M. Cadmium: A nutrient for marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnol. Oceanogr.* 40, 1056-1063. **1995**.
- Lin K.C., Lin C.I., Chen C.Y. The effect of limiting nutrient on metal toxicity to *Selenastrum capricornutum*. *Toxicol. Environ. Chem.* 56, 47-61. **1996**.
- Lum K.R. Cadmium in fresh waters: the Great Lakes and the St. Lawrence River. *Adv. Environ. Sci. Technol.* 19, 35-50. **1987**.
- Macfie S.M., Tarmohamed Y., Welbourn P.M. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 454-458. **1994**.
- Maloney F. Influence de paramètres physico-chimiques (dureté, pH et présence d'un agent chélateur, l'EDTA) sur la réponse toxique au cadmium de l'algue verte d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-ETE, QC, Canada.* **2007**.
- Markich S.J., Brown P.L., Jeffree R.A., Lim R.P. Valve movement responses of *Velesunio angasi* (Bivalvia : Hyriidae) to manganese and uranium: An exception to the free ion activity model. *Aquat. Toxicol.* 51, 155-175. **2000**.

- Martell A.E., Smith R.M., Motekaitis R.J. Critical stability constants of metal complexes database. *U.S. Department of Commerce, Gaithersburg, MD, USA*. **2004**.
- Mayo A.W. Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialga *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria. *Water Environ. Res.* 69, 64-72. **1997**.
- Mehta S.K., Tripathi B.N., Gaur J.P. Influence of pH, temperature, culture age and cations on adsorption and uptake of Ni by *Chlorella vulgaris*. *Eur. J. Protistol.* 36, 443-450. **2000**.
- Mehta S.K., Singh A., Gaur J. P. Kinetics of adsorption and uptake of  $\text{Cu}^{2+}$  by *Chlorella vulgaris*: Influence of pH, temperature, culture age, and cations. *J. Environ. Sci. Heal. A.* 37, 399-414. **2002**.
- Millero F.J., Hawke D.J. Ionic interactions of divalent metals in natural waters. *Mar. Chem.* 40, 19-48. **1992**.
- Morel F.M.M. Principles of aquatic chemistry. *Wiley International, Toronto, ON, Canada*. 237-309. **1983**.
- Morgan J.J. Chemical equilibria and kinetics properties of manganese in natural waters. *Dans : Principles and applications of water chemistry, Faust S.D., Hunter J.V. (Eds). Wiley, Chichester, UK*. 561-623. **1967**.
- Mosulén S., Domínguez M.J., Vígara J., Vílchez C., Guiraum A., Vega J.M. Metal toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Effect on sulfate and nitrate assimilation. *Biomol. Eng.* 20, 199-203. **2003**.
- Nalewajko C., Colman B., Olaveson M. Effects of pH on growth, photosynthesis, respiration, and copper tolerance of three *Scenedesmus* strains. *Environ. Exp. Bot.* 37, 153-160. **1997**.

- Nelson W.O., Campbell P.G.C. The effects of acidification on the geochemistry of Al, Cd, Pb and Hg in freshwater environments: a literature review. *Environ. Pollut.* 71, 91-130. **1991**.
- Nieboer E., Richardson D.H.S. The replacement of the nondescriptive term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. B.* 1, 3-26. **1980**.
- Noro T. Mechanism of manganese uptake by a green alga, *Dunaliella tertiolecta* Butcher. *Mem. Fac. Fish, Kagoshima Univ.* 34, 183-224. **1985**.
- Nriagu J.O., Pacyna J.M. Quantitative assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* 338, 47-49. **1989**.
- Paquet N. Évolution temporelle de la prise en charge et de la toxicité de l'argent (en présence et en absence d'acide humique) et du cadmium chez l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-EET, QC, Canada.* **2007**.
- Parent L., Campbell P.G.C., Stokes P.M. Manganese bioavailability towards freshwater algae in acidified environments. *Dans : Acid rain: Scientific and technical advances.* Pery R., Harrison R.M., Bell J.N.B., Lester J.N. (Eds). London UK. 415-419. **1987**.
- Parent L., Campbell P.G.C. Aluminium bioavailability to the green alga *Chlorella pyrenoidosa* in acidified synthetic soft water. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 587-598. **1994**.
- Raven J.A., Evans M.C.W., Korb R.E. The role of trace metal in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub>-evolving organisms. *Photosynth. Res.* 60, 111-149. **1999**.

- Richardson L.L., Aguilar C., Neilson K.H. Manganese oxidation in pH and O<sub>2</sub> microenvironments produced by phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 33, 352-363. **1988**.
- Rosakis A., Köster W. Divalent metal transport in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* is mediated by a protein similar to prokaryotic Nramp homologues. *BioMet.* 18, 107–120. **2005**.
- Ross I.S. Membrane transport processes and response to exposure to heavy metals. *Dans : Stress tolerance of fungi, pp. 97-125. Jennings D.H. (Eds). Marcel Dekker, New-York, USA. 1993*.
- Santé Canada. Manganese. May 1979 (updated November **1987**).
- Schecher W.D. MINEQL+: Version 4.5, Environmental Research Software. *Hallowell, ME, USA. 2001*.
- Schenck R.C., Tessier A., Campbell P.G.C. The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. *Limnol. Oceanogr.* 33, 538-550. **1988**.
- Segel I.H. Enzyme Kinetics – Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. *J. Wiley & Sons Inc., New York, NY, USA. 100-201. 1975*.
- Shanley J.B. Manganese biogeochemistry in a small forested lake watershed. *Water Resour. Res.* 22, 1647-1656. **1986**.
- Simkiss K., Taylor M.G. Transport of metals across membranes. *Dans : Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. Tessier A., Turner D.R. (Eds). J. Wiley & Sons, New York, NY, USA. 1-44. 1995*.
- Slaveykova V.I., Wilkinson K.J. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environ. Sci. Technol.* 36, 969-975. **2002**.

- Slaveykova V.I., Wilkinson K.J. Effect of pH on Pb biouptake by the freshwater alga *Chlorella kesslerii*. *Environ. Chem. Lett.* 1, 185–189. **2003**.
- Slaveykova V.I., Wilkinson K.J. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: critical review of the Biotic Ligand Model. *Environ. Chem.* 2, 9-24. **2005**.
- Smith D.S., Bell R.A., Kramer J.R. Metal speciation in natural waters with emphasis on reduced sulfur groups as strong metal binding sites. *Comp. Biochem. Phys. C.* 133, 65-74. **2002**.
- Soares H.M.V.M., Conde P.C.F.L., Almeida A.A.N., Vasconcelos M.T.S.D. Evaluation of n-substituted aminosulfonic acid pH buffers with a morpholinic ring for cadmium and lead speciation studies by electroanalytical techniques. *Anal. Chim. Acta* 394, 325-335. **1999**.
- Stary J., Kratzer K., Prasilova J. Systematic study of cumulation of elements on alga. *Toxicol. Environ. Chem.* 7, 47-61. **1983**.
- Stumm W., Morgan J.J. Aquatic chemistry – Chemical equilibria and rates in natural waters. *Third edition. Wiley-Interscience, New York, NY, USA.* 614-640. **1996**.
- Sunda W.G., Huntsman S.A. Regulation of cellular manganese and manganese transport rates in the unicellular alga *Chlamydomonas*. *Limnol. Oceanogr.* 30, 71-80. **1985**.
- Sunda W.G., Huntsman S.A. Relationships among growth rate, cellular manganese concentrations and manganese transport kinetics in estuarine and oceanic species of the diatom *Thalassiosira*. *J. Phycol.* 22, 259-270. **1986**.
- Sunda W.G., Huntsman S.A. Microbial oxidation of manganese in a North Carolina estuary. *Limnol. Oceanogr.* 32, 552-564. **1987**.

Sunda W.G., Huntsman S.A. Effect of sunlight on redox cycles of manganese in the southwestern Sargasso Sea. *Deep-Sea Res.* 35, 1297-1317. **1988**.

Sunda W.G., Huntsman S.A. Antagonisms between cadmium and zinc toxicity and manganese limitation in a coastal diatom. *Limnol. Oceanogr.* 41, 373-387. **1996**.

Sunda W.G., Huntsman S.A. Process regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *Sci. Total Environ.* 219, 165-181. **1998a**.

Sunda W.G., Huntsman S.A. Control of Cd concentrations in a coastal diatom by interactions among free ionic Cd, Zn, and Mn in seawater. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2961-2968. **1998b**.

Templeton D.M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L.-G., Muntau H., van Leeuwen H.P., Lobinski R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure Appl. Chem.* 72, 1453-1470. **2000**.

ten Hulscher T.E.M., Mol G.A.J., Luers F. Release of metals from polluted sediments in shallow lakes; quantifying resuspension. *Dans : Sediment/water interactions; Proceedings of fifth international symposium, Hart B.T., Sly P.G. (Eds). Hydrobiol.* 235-236, 97-105. **1992**.

Tessier A. Sorption of trace elements on natural particles in oxic environments. *Dans : Environmental particles, Vol. 1. Buffle J., van Leeuwen H.P. (Eds). Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.* **1992**.



- Topperwien S., Behra R., Sigg, L. Competition among zinc, manganese, and cadmium uptake in the freshwater alga *Scenedesmus vacuolatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 483-490. **2007**.
- Twiss M. R. Copper tolerance of *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyceae) isolated from acidic, copper-contaminated soils. *J. Phycol.* 26, 655-659. **1990**.
- Van Den Berg G.A., Loch J.P.G., Van Der Heijdt L.M., Zwolsman J.J.G. Mobilisation of heavy metals in contaminated sediments in the river Meuse, the Netherlands. *Water, Air, Soil Pollut.* 116, 567-586. **1999**.
- van Leeuwen H.P. Metal speciation dynamics and bioavailability: inert and labile complexes. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3743–3748. **1999**.
- von Langen P.J., Johnson K.S., Coale K.H., Elrod V.A. Oxidation kinetics of manganese(II) in seawater at nanomolar concentrations. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 4945-4954. **1997**.
- Vasconcelos M.T.S.D., Azenha M.A.G.O., Lage O.M. Electrochemical evidence of surfactant activity of the Hepes pH buffer which may have implications on trace metal availability to cultures *in vitro*. *Anal. Biochem.* 241, 248-253. **1996**.
- Vasconcelos M.T.S.D., Almeida C.M.R., Lage O.M., Sansonetty F. Influence of zwitterionic pH buffers on the bioavailability and toxicity of copper to the alga *Amphidinium carterae*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2542-2550. **2000**.
- Visviki I., Santikul D. The pH tolerance of *Chlamydomonas applanata* (Volvocales, Chlorophyta). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 147-151. **2000**.
- Wehr J.D., Brown L.M., Vanderelst I.E. Hydrogen ion buffering of culture media for algae from moderately acidic, oligotrophic waters. *J. Phycol.* 22, 88-94. **1986**.

- Wilde K.L., Stauber J.L., Markich S.J., Franklin N.M., Brown P.L. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 174-185. **2006**.
- 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.* 47, 1446-1452. **1990**.
- Wilkinson K.J., Buffle J. Critical evaluation of physicochemical parameters and process for modelling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic) systems. *Dans : Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces. van Leeuwen P., Köster W (Eds). J. Wiley & Sons, New York, NY, USA.* 445-533. **2004**.
- Wilson D.N. Cadmium – market trends and influences. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> international cadmium conference, London, Cadmium Association.* 9-16. **1988**.
- Wilson D.J., Chang E. Bioturbation and oxidation of sulphide in sediments. *J. Tenn. Acad. Sci.* 75, 76-85. **2000**.
- Worms I.A.M., Wilkinson K.J. Ni uptake by green alga. 2. Validation of equilibrium models for competition effects. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4264-4270. **2007**.
- Xue H.B., Sigg L. Cd speciation and complexation by natural organic ligands in freshwater. *Anal. Chim. Acta* 363, 249-259. **1998**.

## ANNEXE

Publication issue de cette thèse parue dans un numéro spécial à la mémoire de Richard Playle et édité par Chris M. Wood et Joseph W. Gorsuch : « *A Tribute to Rick Playle: The Interface of Toxicology, Physiology, and Modeling in Improving Water Quality Regulations for Metals* »

Titre : « pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: Implications for an algal BLM »

Auteurs : Laura François, Claude Fortin et Peter G. C. Campbell

Périodique : *Aquatic Toxicology* 84 (2007) 123–132



# pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: Implications for an algal BLM

Laura François, Claude Fortin\*, Peter G.C. Campbell

INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, 490 de la Couronne, Québec, Que., Canada G1K 9A9

Received 15 November 2006; received in revised form 19 February 2007; accepted 27 February 2007

## Abstract

The influence of pH on short-term uptake of manganese and cadmium by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* was studied to better understand the nature of proton interactions with metal membrane transporters. Manganese and cadmium internalization fluxes ( $J_{\text{int}}$ ) were measured over a wide range of free metal ion concentrations from  $1 \times 10^{-10}$  to  $4 \times 10^{-4}$  M at several pH values (Mn: 5.0, 6.5 and 8.0; Cd: 5.0 and 6.5). For both metals, first-order biological internalization kinetics were observed but the maximum transport flux ( $J_{\text{max}}$ ) decreased when pH decreased, in contradiction with the Biotic Ligand Model (BLM). This result suggested a non-competitive inhibition of metal uptake by the  $\text{H}^+$ -ion. A Michaelis–Menten type inhibition model considering proton and calcium competition was tested. The metal biotic ligand stability constants and the stability constants for competitive binding of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{H}^+$  with the metal transporters were calculated: for manganese,  $K_{\text{Mn}} = 10^{4.20}$  and  $K_{\text{Ca}} = 10^{3.71}$ ; for cadmium,  $K_{\text{Cd}} = 10^{4.19}$  and  $K_{\text{Ca}} = 10^{4.76}$ ; for both metal transport systems,  $K_{\text{H}}$  was not a significant parameter. Furthermore, metal uptake was not significantly influenced by the pH of the antecedent growth medium, suggesting that increases in metal fluxes as the pH is raised are caused by conformational changes of the surface transport proteins rather than by the synthesis of additional transport sites. Our results demonstrate that the BLM in its present state does not properly describe the true influence of pH on manganese and cadmium uptake by algae and that a non-competitive inhibition component must be integrated.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Manganese; Cadmium; pH; Biotic Ligand Model; Phytoplankton; Competition; Calcium

## 1. Introduction

According to the vast majority of studies on metal uptake by aquatic biota, the free ion activity,  $\{\text{M}^{z+}\}$ , reflects the metal's chemical activity, which in turn determines the importance of the metal's reactions with the biologically active surface binding sites (Free Ion Activity Model, FIAM; Campbell, 1995). However, when the pH is not constant, the simple knowledge of  $\{\text{M}^{z+}\}$  is insufficient to predict the biological response to metal exposure (Campbell, 1995; Campbell et al., 2002). The Biotic Ligand Model, or BLM (Di Toro et al., 2001), was designed to correct for this shortcoming of the FIAM. The BLM considers  $\text{H}^+/\text{M}^{z+}$  competition, explicitly introducing the reactions of protons with the biotic ligand. Protons are expected to compete with the metal for binding sites  $\equiv\text{X}^-$ , such that when  $\{\text{H}^+\}$  increases,

the number of available  $\equiv\text{X}^-$  sites decreases, thus reducing metal uptake and toxicity (Campbell and Stokes, 1985; Campbell et al., 2002; Wilkinson and Buffle, 2004). In the development of the BLM to date it has been assumed, rather uncritically, that the influence of protons is limited to this “competitive inhibition” mechanism.

In addition to  $\text{H}^+/\text{M}^{z+}$  competition at the biological surface, there are other ways in which pH variations can influence metal uptake. For example, protons could inhibit metal uptake in a “non-competitive” manner, by causing changes in the conformation of the proteins involved in trans-membrane metal transport and modifying the metal internalization rate (Harrison et al., 1986). According to Parent and Campbell (1994), and as predicted by the FIAM, aluminium bioavailability to the unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* at a given pH was a function of the free aluminium ion concentration  $[\text{Al}^{3+}]$  (for pH values between 4.3 and 6.0). Furthermore, for a fixed value of  $[\text{Al}^{3+}]$ , Al uptake and toxicity increased with pH. Nevertheless, the authors noted that the FIAM did not explain the data correctly: despite

\* Corresponding author. Tel.: +1 418 654 3770; fax: +1 418 654 2600.  
E-mail address: [claudie.fortin@ete.inrs.ca](mailto:claudie.fortin@ete.inrs.ca) (C. Fortin).

considering  $\text{Al}^{3+}/\text{H}^+$  competition for binding at the algal surface, growth inhibition showed an unexplained residual dependency on pH (enhanced protection as the pH was lowered). Likewise, Kola and Wilkinson (2005) observed an important decrease in the cadmium internalization flux ( $J_{\text{int}}$ ) in *Chlamydomonas reinhardtii* when pH was decreased from 7.0 to 5.2. Because metal speciation remained unchanged over this pH range, the authors suggested that this decrease was due to direct proton competition for membrane transport sites. Nonetheless, the BLM did not predict the uptake very well and they suggested that allosteric changes of the transport proteins induced variations in the apparent binding constant. Both Heijerick et al. (2002) and Wilde et al. (2006) observed a Zn EC50 (expressed as free  $\text{Zn}^{2+}$ ) that did not increase linearly with  $\{\text{H}^+\}$  in two green algae (*Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella* sp.). A sharp increase in toxicity was noted at  $\text{pH} > 6$ , which could not be explained by simple proton competition. In a recent study, Fortin et al. (2007) confirmed that uranyl ion uptake in *C. reinhardtii* was inhibited by protons. Their results showed that competitive inhibition of the uptake was important ( $K_{\text{UO}_2, \text{pH}5}^{\text{MM}} \gg K_{\text{UO}_2, \text{pH}7}^{\text{MM}}$ ; Michaelis–Menten half-saturation constant in  $\mu\text{M}$ , which corresponds to the free  $\text{UO}_2^{2+}$  ion concentration when uranyl flux is equal to half of the maximum uptake flux  $J_{\text{UO}_2}^{\text{MM}}$  in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{min}^{-1}$ ), but non-competitive inhibition was also evident ( $J_{\text{UO}_2, \text{pH}5}^{\text{MM}} < J_{\text{UO}_2, \text{pH}7}^{\text{MM}}$ ).

In all the above cases, deviations from the BLM have been tentatively explained by invoking physiological changes induced by pH, such as conformational changes in metal transport proteins leading to changes in internalization rates, or increases in the number of metal transporters with pH. Chowdhury and Blust (2001) studied  $^{85}\text{Sr}$  uptake in the common carp and focused on the nature of the surface binding of strontium and protons, as the pH was varied between 5.0 and 8.5. They observed that  $\text{H}^+$  inhibited  $\text{Sr}^{2+}$  uptake, modifying  $J_{\text{Sr}}^{\text{MM}}$  (maximum  $\text{Sr}^{2+}$  uptake flux in  $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), but not the half-saturation constant  $K_{\text{Sr}}^{\text{MM}}$ . To describe the overall proton effect, a model of partial non-competitive inhibition was suggested and the data obtained followed the Michaelis–Menten model. This model implies that the  $\text{H}^+$ -ion interacts with the cell surface in a different region from where the metal binding sites are located (so that  $\text{Sr}^{2+}$  binding is not directly disturbed); however metal transport decreases because  $\text{H}^+$  binding leads to changes in the functional characteristics of the transporter.

Because there is no theoretical or experimental basis allowing one to neglect the direct biological effects of pH changes, empirical models (based on regression analyses) have often been used successfully to adjust the BLM over a range of pH values (Heijerick et al., 2003; De Schampelaere et al., 2003). However, these models lack a mechanistic underpinning and there is thus a need to better understand why metal uptake changes when pH varies, and to integrate the influence of pH into a BLM-type model. This reasoning led us to ask the following question: are protons simply competitors for metal-specific binding sites (with no influence on the physiology) or do they also influence trans-membrane metal

transport flux capacity (e.g., the intrinsic rate of metal internalization and/or the number of transport sites)? We tried to clarify the influence of protons on manganese and cadmium bioavailability in a green alga by observing the influence of pH on metal internalization fluxes. Short-term measures of maximum internalization fluxes over a pH range were performed and a mechanistic metal internalization flux model was developed to help discriminate between the two different inhibitory effects of  $\text{H}^+$ : the competitive effect (binding of protons reducing the number of available transport sites) versus a physiological non-competitive effect (on transport site affinity, kinetics or number).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Test organism and cultures

The unicellular green alga *C. reinhardtii* was chosen for the present study for its ability to grow over a wide pH range (5–8, data not shown). Pure cultures were obtained from the University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria (strain UTCC 11, Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Toronto, Toronto, Ont., Canada). Asynchronous batch cultures were grown axenically in 100 mL of modified high salt medium MHSM-1 (Macfie et al., 1994; Fortin and Campbell, 2000), see Table 1. Cultures were maintained in 250 mL Erlenmeyer glass flasks under constant rotary agitation (100 rpm), illumination ( $130 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Cool White Fluorescent tubes) and temperature ( $20.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ). The ionic strength of the medium was  $6 \text{ meq L}^{-1}$ . For regular maintenance, approximately 2 mL of culture were transferred weekly to a fresh, sterile medium at pH 7 with  $10^{-2} \text{ M}$  of HEPES buffer (2-[*N*-morpholino]ethanesulfonic acid), purchased from Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA); this operation was repeated up to 10 weeks, at which point a new culture was started from the original culture that had been kept on agar. This was a supplementary precaution to ensure maintenance of axenic conditions. To identify the exponential growth phase, cell numbers in batch cultures were determined using an electronic particle counter (1:10 dilution with ISOTON II isotonic solution, 70  $\mu\text{m}$  aperture, model Multisizer<sup>TM</sup> 3 Counter<sup>®</sup>, Beckman, Miami, FL, USA). Cultures were periodically checked for bacterial contamination by plating on nutrient agar (Difco-Bacto).

Buffers known to be non-complexing for the selected metals (Wehr et al., 1986) were chosen: for media with pH between 7 and 8, HEPES was used, and for solutions with pH between 5.0 and 6.5, MES (*N*-[2-hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid];  $10^{-2} \text{ M}$ ; Sigma–Aldrich) was used.

All polycarbonate containers and glassware were soaked for 24 h in 10% (w/v)  $\text{HNO}_3$  (ACS grade, EMD Chemical Inc., Darmstadt, Germany), rinsed seven times with ultra pure water (18  $\text{M}\Omega \text{ cm}$ ) and dried in a laminar flow hood. Material destined for algal cultures was also autoclaved at  $121^\circ\text{C}$  for 15 min. Salts used for cultures and experiments were of analytical grade or better.

Table 1

Molar concentrations of modified high salt media used for algal growth and uptake experiments (carbonates are assumed to be at equilibrium with the atmosphere)

Ions	MHSM-1 (growth)	MHSM-C (growth before experiment)	MHSM-R1 (rinsing before exposure)	MHSM-E (exposure)	MHSM-R2 (rinsing after exposure)
NH <sub>4</sub>	$9.37 \times 10^{-4}$	$9.37 \times 10^{-4}$	$9.37 \times 10^{-4}$	$9.37 \times 10^{-4}$	$9.37 \times 10^{-4}$
Cl	$5.98 \times 10^{-6}$	$3.88 \times 10^{-6}$	–	–	–
K	$4.22 \times 10^{-3}$	$4.22 \times 10^{-3}$	$4.22 \times 10^{-3}$	$4.22 \times 10^{-3}$	$4.22 \times 10^{-3}$
PO <sub>4</sub>	$1.37 \times 10^{-4}$	$1.37 \times 10^{-4}$	–	–	–
NO <sub>3</sub>	$5.07 \times 10^{-3}$	$5.07 \times 10^{-3}$	$5.07 \times 10^{-3}$	$5.07 \times 10^{-3}$	$5.07 \times 10^{-3}$
SO <sub>4</sub>	$8.12 \times 10^{-5}$	$8.12 \times 10^{-5}$	$8.12 \times 10^{-5}$	$8.12 \times 10^{-5}$	$8.12 \times 10^{-5}$
Mg	$8.12 \times 10^{-5}$	$8.12 \times 10^{-5}$	$8.12 \times 10^{-5}$	$8.12 \times 10^{-5}$	$8.12 \times 10^{-5}$
Ca	$6.80 \times 10^{-5}$	$6.80 \times 10^{-5}$	$6.80 \times 10^{-5}$	$6.80 \times 10^{-5}$	$6.80 \times 10^{-5}$
Na	$1.02 \times 10^{-4}$	$1.02 \times 10^{-4}$	$1.02 \times 10^{-4}$	$1.02 \times 10^{-4}$	$1.02 \times 10^{-4}$
BO <sub>3</sub>	$3.01 \times 10^{-6}$	$3.01 \times 10^{-6}$	–	–	–
Mn	$2.10 \times 10^{-6}$	$1.00 \times 10^{-9}$	–	Variable	–
Cd	–	–	–	Variable	–
EDTA	$8.06 \times 10^{-7}$	$8.06 \times 10^{-7}$	–	–	$1.00 \times 10^{-4}$
Fe	$5.92 \times 10^{-7}$	$5.92 \times 10^{-7}$	–	–	–
MoO <sub>4</sub>	$3.00 \times 10^{-8}$	$3.00 \times 10^{-8}$	–	–	–
Zn	$2.43 \times 10^{-8}$	$2.43 \times 10^{-8}$	–	–	–
Co	$1.09 \times 10^{-8}$	$1.09 \times 10^{-8}$	–	–	–
Cu	$7.04 \times 10^{-11}$	$7.04 \times 10^{-11}$	–	–	–
Buffer <sup>a</sup>	$10^{-2}$	$10^{-2}$	0	$10^{-2}$	0

<sup>a</sup> HEPES was used to buffer pH between 7.0 and 8.0 while MES was used to buffer pH between 5.0 and 6.5.

## 2.2. Selection of metals

The main selection criterion for the metals to be tested was their speciation in aqueous solution. The use of a metal with very simple speciation, minimally affected by pH variations, facilitates data interpretation (e.g., absence of significant covariance of hydroxo- and carbonato-metal complexes with pH). Manganese, an essential metal, and cadmium, generally considered as a non-essential toxic metal, were good candidates: they are both environmentally relevant and the aquo-ion,  $M(H_2O)_6^{2+}$ , is the dominant metal form (98–99%) in simple media between pH 5 and 8 for manganese and between pH 5 and 7 for cadmium. At pH 8, formation of cadmium carbonate complexes can be significant and over our wide metal concentration range an over saturation in  $CdCO_3(s)$  might have occurred; for this reason we limited the upper pH range to 7 for cadmium. Both metals are available as convenient radioisotopes,  $^{54}Mn$  and  $^{109}Cd$  (2 mCi  $\mu mol^{-1}$ , for manganese, and 28 mCi  $\mu mol^{-1}$ , for cadmium; 0.1 M HCl solutions purchased from Perkin-Elmer, Woodbridge, Ont., Canada), which facilitated measurements of metal uptake. Metal stock solutions were diluted with non-radioactive metal (1000  $\mu g mL^{-1}$ , 2–5% HNO<sub>3</sub>, ICP Standard, SCP Science, Que., Canada) to adjust metal concentrations in the exposure media, when needed, so as to ensure sufficient radioactivity while minimizing needless consumption of the radioisotope.

## 2.3. Metal uptake experiments

### 2.3.1. Influence of pH

Widely used uptake methods were employed (Knauer et al., 1997; Fortin and Campbell, 2000; Kola and Wilkinson, 2005). An aliquot of the main algal culture was transferred into a 100 mL of fresh medium MHSM-C (Table 1) in order to have

an initial algal density of 40,000 cells  $mL^{-1}$ . Because MHSM-1 (Table 1) is very rich in manganese, its total concentration was lowered from  $2 \times 10^{-6}$  M (MHSM-1) to  $1 \times 10^{-9}$  M (MHSM-C) to provide more environmentally realistic background Mn concentrations in the test culture cells. To be consistent in our protocol, all experiments were carried out in the same manner (even when measuring Cd uptake, algae were grown in MHSM-C); preliminary algal growth experiments showed no significant difference when algae were grown in MHSM-1 or MHSM-C. After 48 h, which corresponded to the end of the exponential phase of growth (algal density  $\sim 800,000$  cells  $mL^{-1}$ ), sufficient algae were harvested on a filter membrane (2.0  $\mu m$ , polycarbonate membrane, Isopore<sup>TM</sup>; Millipore, Mississauga, Ont., Canada) using a vacuum pressure  $\leq 10$  cm Hg, and rinsed five times with 10 mL of a simplified medium (MHSM-R1 medium, Table 1). The rinsing step was designed to minimize carry-over of metals (micronutrients) as well as algal exudates and ligands from the growth medium. Next, algae were re-suspended in 5 mL of the simplified medium MHSM-R1 and size distribution, average surface area, and cell abundance were immediately determined using the particle counter. Cells were then distributed (final cell density of 15,000 cells  $mL^{-1}$ ) in 250 mL Erlenmeyer polycarbonate flasks containing 100 mL of the exposure medium MHSM-E. This exposure medium was prepared 24 h prior to the experiment to ensure metal equilibrium in solution, and filtered just before inoculation through a 0.2  $\mu m$  polycarbonate membrane to remove any particulates. Each exposure condition (pH and concentration) was tested in triplicate and repeated at least twice on different batch cultures. We chose an exposure time of 45 min as a compromise between our desire, on one hand, to minimize the impact of cell exudates, which could affect metal speciation in solution, and also to minimize changes in cell abundance or volume that could modify exposure parameters, and, on the other hand, to maximize gamma emissions



from our harvested cells. At the end of each exposure, 2 mL of each replicate were used to determine cell density and specific surface area whereas the rest of the aliquot was filtered through two superimposed 2.0  $\mu\text{m}$  porosity filter membranes. Experiments were conducted with low cell densities, to minimize metal depletion through uptake and adsorption by the algal cells. A 2-mL aliquot of the filtrate was used to determine if a significant loss of dissolved metal had occurred; if the loss was greater than 10%, the data were excluded. The harvested cells were then rinsed five times with 10 mL of MHSM-R2 medium (Table 1) containing  $10^{-4}$  M of ethylenediamine tetra-acetate, ( $\text{Na}_4\text{EDTA}$ ; Sigma–Aldrich). This rinsing step is commonly used to remove metals adsorbed to the algal surface, allowing a distinction between absorbed metal (retained in the algal cells on the top filter) and adsorbed metal (collected in the filtrate)—see Bates et al. (1982), Mehta et al. (2002), Hassler et al. (2004). Note that the absorbed metal increased linearly as a function of time (<60 min), and the regression line extended to the origin (data not shown), indicating that the discrimination between intracellular metal and adsorbed metal using EDTA was effective. The metal radioactivity retained by the bottom filter was subtracted from the radioactivity of the top filter to correct for passive metal adsorption to the membrane.

Each 2 mL-aliquot collected during the experiment was placed in a 4 mL glass vial. The filters were carefully folded and inserted into identical vials and 2 mL of ultra-pure water were added to provide similar counting matrices. Every sample was analysed by a gamma counter (Wallac 1480 Wizard<sup>TM</sup> 3, Turku, Finland). Counting windows of 600–820 keV (main peak at 700 keV) for  $^{54}\text{Mn}$  and 16–36 keV (main peak at 22 keV) for  $^{109}\text{Cd}$  were used; the counting time was set to 2000 s and/or to a maximum collection of 100,000 counts, ensuring a sufficiently low uncertainty (<0.3%). Counts per minute were converted into metal molar concentrations using detector efficiency, radioactive decay and exposure solution radioisotope specific activity. Results were normalized for the total algal surface area present on the filter. In a typical uptake experiment, the *C. reinhardtii* cells had a total surface area of approximately  $70 \mu\text{m}^2$  and a total volume of approximately  $55 \mu\text{m}^3$ .

The operationally defined intracellular metal fraction was measured at increasing free metal ion concentrations (range:  $1 \times 10^{-10}$  to  $4 \times 10^{-4}$  M); a relatively broad range was used in order to approach saturation of trans-membrane transport. Although such concentrations are higher than those encountered in the environment, conditions approaching saturation of the transporters are essential for the model to converge and to provide good estimates of uptake parameters. Between four and six independent experiments were performed at each pH tested and for both metals. These repetitions were necessary to cover the full range of concentrations and to test for reproducibility among different cell batch cultures. The pH of the growth medium (MHSM-C) was the same as the pH of the exposure medium (MHSM-E) which was checked minutes prior to the experiment and readjusted when required (to within a range of  $\pm 0.02$ ) using NaOH (0.5 M, Sigma Ultra, Sigma–Aldrich) or  $\text{HNO}_3$  (0.5 M, trace metal grade, Fisher Scientific, Ottawa, Ont., Canada). At the beginning of the study, adsorption in each

experiment was measured on only one of the three replicates; in later experiments, it was measured on all three replicates. Such triplicate measurements of adsorption were obtained for at least one experiment for each set of conditions.

The influence of the pH of the antecedent growth medium (MHSM-C) on the saturation of trans-membrane metal transporters was also tested twice for each set of conditions. For manganese, cells were grown at pH 8 and exposed at pH 6.5, and others were grown at pH 6.5 and exposed at pH 8. Similarly for cadmium, cells were grown at pH 5 and exposed at 6.5 and others were grown at 6.5 and exposed at 5. For all these experiments, adsorption was also measured, for all three replicates.

### 2.3.2. Influence of Ca

Calcium is known to be a good inhibitor of divalent metal uptake in algae (Hauck et al., 2002; Slaveykova and Wilkinson, 2002; Mosulén et al., 2003; Kola and Wilkinson, 2005). We tested for this effect by increasing  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations at pH 8 for manganese (three independent experiments) and pH 6.5 for cadmium (two independent experiments). The total nominal metal concentration was kept constant at  $0.5 \mu\text{M}$ , a concentration well below the transport saturation level. The  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was varied from 0 to  $1 \times 10^{-3}$  M by the addition of the appropriate volumes of stock solutions prepared from calcium nitrate salt (Sigma–Aldrich). The ionic strength of the exposure solutions was maintained at a constant  $6 \text{ meq L}^{-1}$  by adjusting the concentration of  $\text{KNO}_3$  (Caledon, Georgetown, Ont., Canada) in the medium. We thus assumed that potassium ions in the low mM concentration range would have a negligible impact on Cd and Mn uptake. Indeed, Heijerick et al. (2002) showed that  $\text{K}^+$  ions (concentration range: 0.08–1.12 mM) had no effect on zinc toxicity to green algae.

### 2.3.3. Influence of Cr

Because the decay product of  $^{54}\text{Mn}$  is  $^{54}\text{Cr}$ , and chromium is a potentially toxic metal, we tested the influence of chromium (III) on manganese–membrane interactions. Chromium concentrations encountered in our experiment were estimated to be between  $2.5 \times 10^{-12}$  and  $6.6 \times 10^{-11}$  M. The effect of chromium on manganese uptake was tested at pH 6.5, with a fixed free manganese concentration of  $(3.4 \pm 0.4) \times 10^{-10}$  M and eight nominal concentrations of chromium between  $1.5 \times 10^{-12}$  and  $1 \times 10^{-8}$  M ( $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ , 10,000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 4%  $\text{HNO}_3$ , ICP Standard, SCP Science).

## 2.4. Speciation modelling

Metal speciation in all media was calculated with the chemical equilibrium software MINEQL+ (v. 4.5) with an updated thermodynamic database prepared from a recent review of available thermodynamic data (Schecher, 2001; Martell et al., 2004).

## 2.5. Statistical analysis

Unless indicated otherwise, results are given as mean values of three replicates  $\pm 1\text{S.E.}$  All regressions and the optimization of model parameters and their standard errors to the observed

Table 2

Estimated model parameters (standard error intervals of the equilibrium constants, log  $K$ , are presented between square brackets)

Mn	$J_{Mn}^{MM}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{min}^{-1}$ )	$K_{Mn}^{MM}$ ( $\mu\text{M}$ )	log $K_{Ca}$	log $K_{Mn}$	$J_{max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{min}^{-1}$ )
pH 8.0	11.2 $\pm$ 1.2	77 $\pm$ 31			11.2 $\pm$ 1.2
pH 6.5	8.5 $\pm$ 1.0	253 $\pm$ 66	3.70 [3.56–3.81]	4.20 [4.11–4.27]	5.8 $\pm$ 0.2
pH 5.0	2.6 $\pm$ 0.3	85 $\pm$ 25			2.6 $\pm$ 1.0
Cd	$J_{Cd}^{MM}$	$K_{Cd}^{MM}$	log $K_{Ca}$	log $K_{Cd}$	$J_{max}$
pH 6.5	57.2 $\pm$ 4.9	312 $\pm$ 51			57.2 $\pm$ 4.9
pH 5.0	24.6 $\pm$ 2.7	156 $\pm$ 37	4.75 [4.63–4.85]	4.19 [4.18–4.21]	34.9 $\pm$ 1.2

uptake fluxes were determined using the Graph Pad Prism 4 computer programme (Graph Pad software, San Diego, CA, USA). In order to compare internalization fluxes between different sets of growth and exposure conditions, Monte Carlo simulations were performed, (see Section 4.2).

### 3. Results

#### 3.1. Metal internalization fluxes

##### 3.1.1. Influence of pH

Metal internalization fluxes as a function of the free metal ion concentration (Fig. 1) showed, at all pHs, a saturation plateau

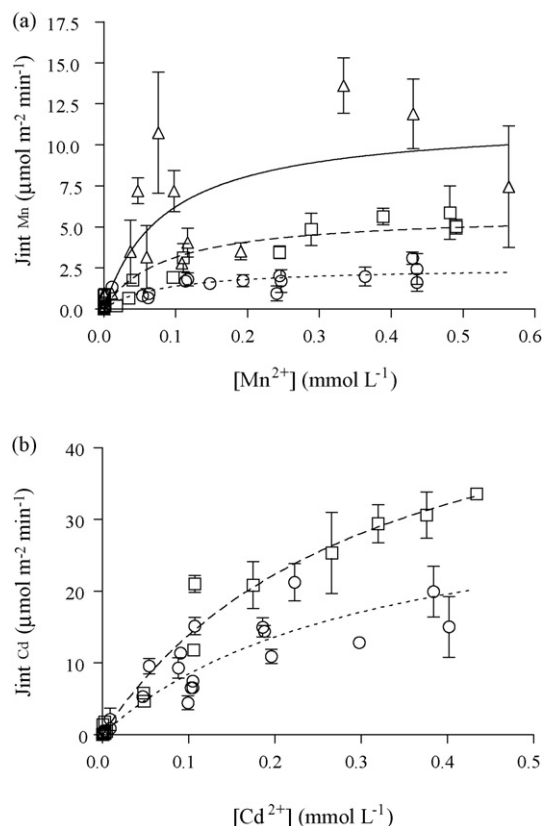


Fig. 1. Manganese (a) and cadmium (b) internalization fluxes as a function of the free metal ion concentration, at pH 8 ( $\Delta$ ), pH 6.5 ( $\square$ ), pH 5 ( $\circ$ ). Predicted fluxes were made using Eq. (12), for pH 8 (solid line), pH 6.5 (dashed line) and pH 5 (dotted line). Standard errors are given when larger than the symbol size ( $n=3$ ).

starting when the free ion concentration reached  $\sim 0.1$  mM. The observed behaviour is typical of a Michaelis–Menten saturation process (estimated parameters are presented in Table 2). However, the maximum Mn internalization fluxes,  $J_{Mn}^{MM}$ , increased with pH, a trend inconsistent with the BLM. Moreover, half-saturation constants  $K_m^{MM}$  are expected to increase when pH decreases but we obtained incoherent results. Indeed,  $K_{Mn}^{MM}$  increased from pH 8.0 to 6.5 but then decreased at pH 5.0 back to the value obtained at pH 8. In a manner similar to the results obtained for Mn,  $J_{Cd}^{MM}$  and  $K_{Cd}^{MM}$  also decreased between pH 6.5 and 5.0.

Metal internalization fluxes were not sensitive to the pH at which the cells had been grown (Fig. 2). Metal uptake was determined as a function of free metal-ion concentration for algae cultivated at a low pH and exposed at a high pH (Mn: pH 6.5  $\rightarrow$  pH 8.0, Fig. 2a; Cd: pH 5.0  $\rightarrow$  pH 6.5, Fig. 2c) and for algae cultivated at a high pH and exposed at a low pH (Mn: pH 8.0  $\rightarrow$  pH 6.5, Fig. 2b; Cd: pH 6.5  $\rightarrow$  pH 5.0, Fig. 2d).

##### 3.1.2. Influence of Ca and Cr

Metal internalization fluxes as a function of  $[Ca^{2+}]$  showed a significant inhibitive effect from calcium (Fig. 4). In the presence of a 10,000-fold excess of calcium ( $10^{-3}$  M), Mn internalization fluxes decreased 2-fold (from 0.080 to 0.037  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{min}^{-1}$ ) whereas cadmium uptake decreased more than 40-fold (from 0.43 to 0.01  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{min}^{-1}$ ). The decrease started from nominal concentrations of calcium greater than  $1 \times 10^{-5}$  M for Mn and greater than  $1 \times 10^{-6}$  M for Cd.

Addition of an excess of chromium (III) relative to manganese at pH 6.5, revealed no significant influence on Mn uptake:  $J_{int} = (1.4 \pm 0.1) \times 10^{-4} \mu\text{mol m}^{-2} \text{min}^{-1}$  when the chromium concentration was varied from  $1.5 \times 10^{-12}$  to  $1 \times 10^{-8}$  M (dominant metal form,  $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$ ,  $\sim 99\%$ ), and  $[\text{Mn}^{2+}]$  was held constant ( $3.4 \times 10^{-10}$  M).

#### 3.2. Metal adsorption

In contrast to the internalization results, metal adsorption to the cell surface was linear over the entire range of free ion concentrations and over the entire pH range tested, with determination coefficients comprised between 0.87 and 0.99 (Fig. 3). No significant pH effect was observed for Mn (slopes were not significantly different,  $P=0.26$ ) but cadmium adsorption increased with pH: at pH 6.5 the slope was  $28.9 \pm 1.8$ , whereas at pH 5.0 it was  $11.7 \pm 0.4$  (slopes significantly different,  $P<0.001$ ).



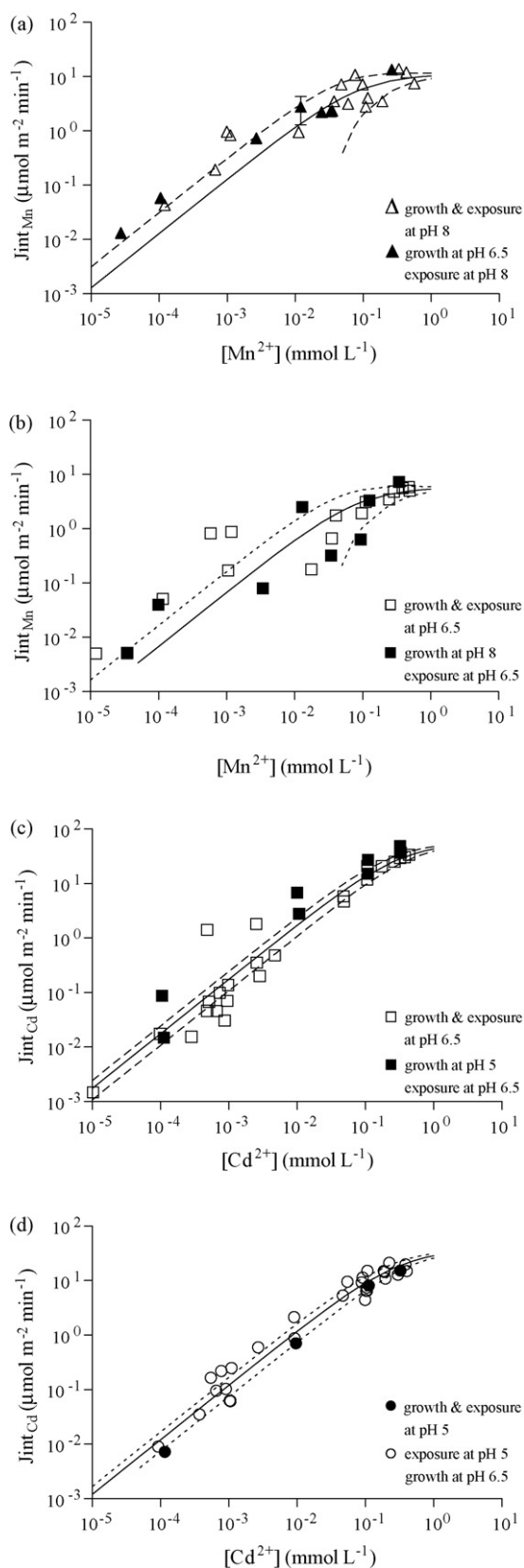


Fig. 2. Manganese and cadmium internalization fluxes as a function of the free metal concentration for cells exposed to: (a) Mn at pH 8 ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ); (b) Mn at pH 6.5 ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ); (c) Cd at pH 6.5 ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ); and (d) Cd at pH 5 ( $\bullet$ ,  $\circ$ ). Monte Carlo simulations (solid lines) and the 95% confidence intervals (dashed and dotted lines) are also plotted. Standard errors are given when larger than the symbol size ( $n = 3$ ).

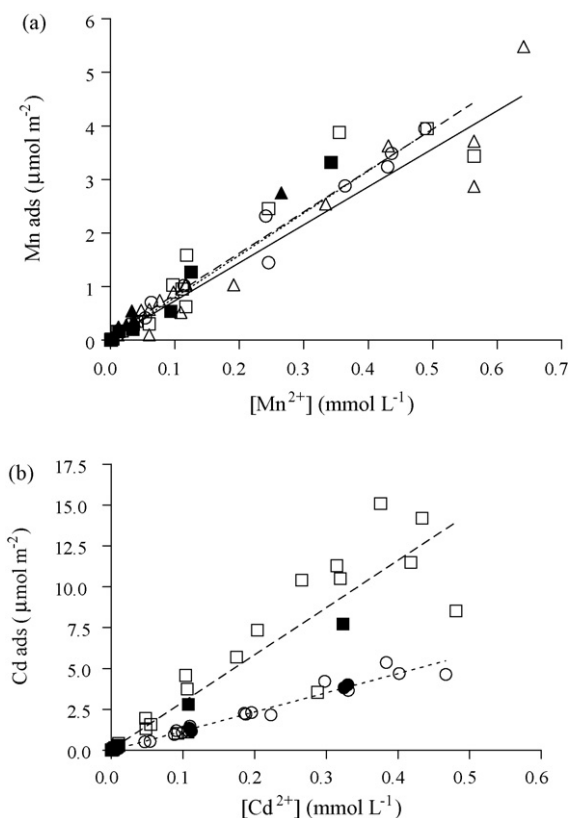


Fig. 3. Manganese (a) and cadmium (b) adsorption as a function of the free metal concentration, at pH 8 ( $\triangle$ ), pH 6.5 ( $\square$ ), pH 5 ( $\circ$ ); (a) for algae cultivated at pH 6.5 and exposed at pH 8 ( $\blacktriangle$ ), for algae cultivated at pH 8 and exposed at pH 6.5 ( $\blacksquare$ ); (b) for algae cultivated at pH 5 and exposed at pH 6.5 ( $\square$ ), for algae cultivated at pH 6.5 and exposed at pH 5 ( $\bullet$ ). Linear regressions (Mn:  $0.96 < r^2 < 0.99$ ; Cd:  $0.87 < r^2 < 0.97$ ) are plotted: pH 8 (solid line), pH 6.5 (dashed line) and pH 5 (dotted line). Standard errors are given when larger than the symbol size ( $n = 3$ ).

Culturing the algae at a different pH from the pH of exposure had little influence on Mn adsorption when the cells were grown at pH 8 and exposed at pH 6.5 ( $P = 0.11$ ) but the slopes were statistically different from controls when the cells were grown at pH 6.5 and exposed at pH 8 ( $P = 0.04$ ). For Cd, adsorption curves for algae cultivated and exposed at different pHs were not significantly different ( $P > 0.4$ ).

#### 4. Discussion

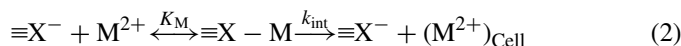
##### 4.1. Modelling metal internalization fluxes

For *C. reinhardtii*, both manganese and cadmium internalization fluxes could be modelled by a typical Michaelis–Menten saturation process (Eq. (1)); estimated model parameters are presented in Table 2.

$$J_{\text{int}} = \frac{J_m^{\text{MM}}[M^{2+}]}{K_m^{\text{MM}} + [M^{2+}]} \quad (1)$$

In this simple form, the Michaelis–Menten equation does not integrate competition reactions. If we look at metal interactions with transport sites from a thermodynamic equilibrium point of

view, the reaction of the free divalent metal ion,  $M^{2+}$ , with the biotic ligand,  $\equiv X^-$ , can be represented as follows:

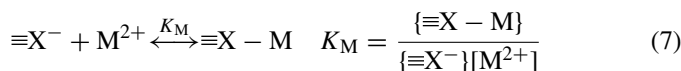
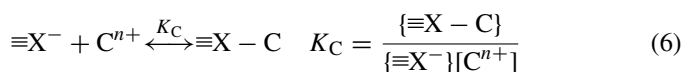
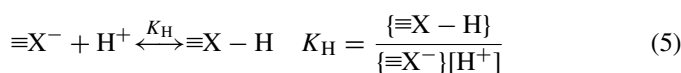


$$\{\equiv X - M\} = K_M [M^{2+}] \{\equiv X^-\} \quad (3)$$

$$J_{int} = k_{int} K_M [M^{2+}] \{\equiv X^-\} \quad (4)$$

where  $K_M$  is the equilibrium constant for the reaction of metal  $M$  with the biotic ligand  $\equiv X^-$ ,  $k_{int}$  is the rate of metal internalization, and  $J_{int}$  is the metal internalization flux. To simplify, charges on complexes and water molecules in the metal coordination sphere are not shown; braces  $\{\}$  correspond to surface concentrations and square brackets  $[\ ]$  to solution concentrations.

If we consider all possible surface complexation reactions, a transport site can bind a proton  $H^+$  (Eq. (5)), another competing cation  $C^{n+}$  (Eq. (6)), or the free metal  $M^{2+}$  (Eq. (7)):



The total concentration of sites is given by the following mass balance equation:

$$\{\equiv X\}_T = \{\equiv X^-\} + \{\equiv X - H\} + \{\equiv X - C\} + \{\equiv X - M\} \quad (8)$$

To express this concentration as a function of the concentration of free sites, we combined Eqs. (5), (6), (7) and (8):

$$\{\equiv X\}_T = \{\equiv X^-\} (1 + K_H [H^+] + K_C [C^{n+}] + K_M [M^{2+}]) \quad (9)$$

Eqs. (4) and (9) combined give:

$$J_{int} = \frac{J_{max} K_M [M^{2+}]}{(1 + K_H [H^+] + K_C [C^{n+}] + K_M [M^{2+}])} \quad (10)$$

where  $J_{max} = k_{int} \{\equiv X\}_T$ . According to the BLM, protons will inhibit metal uptake competitively: as the pH decreases,  $[H^+]$  and the product  $K_H [H^+]$  increase, leading to a decrease in  $J_{int}$ . The maximum internalization rate  $J_{max}$  is assumed to be constant. However, protons could also inhibit metal uptake non-competitively, by affecting either  $K_M$  or  $J_{max}$ . A rise in pH causing an increase in the biotic ligand affinity for a metal ( $K_M$ ) will result in a steeper slope of  $J_{int}$  as a function of  $[M^{2+}]$  but will ultimately reach the same upper limit ( $J_{max}$ ). A rise in pH causing an increase in  $J_{max}$  could be explained either by an increase in  $k_{int}$  (conformational changes of metal transport proteins leading to an increase in the intrinsic metal internalization rate, as typically observed for a partial non-competitive inhibitor) or by an increase in  $\{\equiv X\}_T$  (changes in the number of transporter sites).

Since Eq. (10) contains many adjustable parameters, we estimated several parameters under simple conditions where only one parameter was varied. Our initial step was to examine metal

uptake as a function of  $[Ca^{2+}]$  at constant pH and metal concentrations using non-linear regression and Eq. (11), in order to determine the calcium binding constant  $K_{Ca}$ :

$$J_{int} = \frac{A}{1 + K_{Ca} [Ca^{2+}]} \quad (11)$$

where  $A$  is an adjustable parameter regrouping all constant terms of Eq. (10). Note here that we assumed that both  $K_M [M^{2+}]$  and  $K_H [H^+]$  are  $\ll 1$ . The first assumption is reasonable given the relatively low  $[M^{2+}]$  ( $0.5 \mu M$ ) that we used with respect to saturation concentrations, and the second will be discussed below. This analysis yielded values for  $K_{Ca}$ :  $10^{3.70} M^{-1}$  with a standard error interval of  $[10^{3.56} - 10^{3.81}]$  for manganese binding sites; and  $10^{4.75} M^{-1}$  with a standard error interval of  $[10^{4.63} - 10^{4.85}]$  for cadmium binding sites (Fig. 4, Table 2).

We assumed that Ca was the only significant competing cation ( $C^{n+}$ , Eq. (10)). Magnesium was not tested based on the work of Kola and Wilkinson (2005) that showed no significant inhibition of cadmium uptake by *C. reinhardtii*. Also, Kehres et al. (2000) showed that magnesium did not inhibit Mn uptake in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. However, Hauck

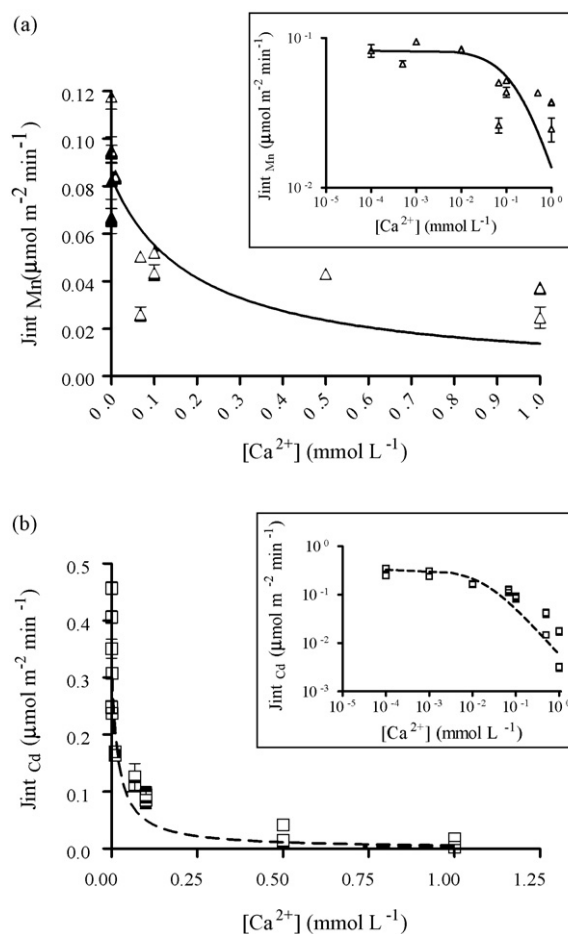


Fig. 4. Manganese (a) and cadmium (b) internalization fluxes as a function of the free calcium concentration, at pH 8 ( $\Delta$ ) for manganese (a) and at pH 6.5 ( $\square$ ) for cadmium (b). Predicted fluxes were calculated using Eq. (11), for manganese (solid line) and cadmium (dashed line). Standard errors are given when larger than the symbol size ( $n = 3$ ). Insets show the same data on a log 10 scale.

et al. (2002) reported that  $\text{MgCl}_2$  reduced manganese uptake in epiphytic lichens, but to a smaller extent than  $\text{CaCl}_2$ . Ideally, all cations should be tested to incorporate all potential inhibitors. Omitting a significant inhibitor would result in an underestimation of  $K_M$ , provided that the inhibitor concentration is constant throughout.

These  $K_{Ca}$  values were used to estimate the model parameters for manganese and cadmium, using a competitive inhibition Michaelis–Menten model. Maximum internalization flux values (with  $J_{\max} = J_m^{\text{MM}}$  in Eq. (1)) were obtained at pH 8.0 for manganese ( $11 \pm 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{min}^{-1}$ ) and at pH 6.5 for cadmium ( $57 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{min}^{-1}$ ). At these pH values, we considered that  $K_H [\text{H}^+] \ll 1$  and Eq. (10) was simplified to estimate  $K_{Mn}$  and  $K_{Cd}$ :

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\max} K_M [\text{M}^{2+}]}{(1 + K_{Ca} [\text{Ca}^{2+}] + K_M [\text{M}^{2+}])} \quad (12)$$

Through non-linear regression analysis, we obtained  $K_{Mn} = 10^{4.20}$  with a standard error interval of  $[10^{4.11} \text{ to } 10^{4.27}]$  and  $K_{Cd} = 10^{4.19}$  with a standard error interval of  $[10^{4.18} \text{--} 10^{4.21}]$ . Introducing  $K_{Ca}$  and  $K_M$  in Eq. (10) along with the  $J_{\text{int}}$  data obtained at pH 5 should have enabled us to estimate a value for  $K_H$ . However, the overlap in the data at concentrations below saturation levels at all tested pH values prevented us from narrowing down a precise value for the binding of protons ( $K_H$ ). Given that all measurements were done in triplicate, several experiments (using different batch cultures) were used to model metal uptake, thus incorporating the inherent biological variability in our graphs. The resultant scatter no doubt contributes to the inconsistent trend in  $K_m^{\text{MM}}$  as a function of pH (i.e.  $K_m^{\text{MM}}$  are expected to increase when pH decreases). Although proton competition most probably occurs, it remains an insensitive parameter in our Cd and Mn uptake model, indicating that  $K_H [\text{H}^+] \ll 1$  even at the lowest pH tested (5.0) such that  $K_H \ll 10^5$ .

These estimated parameters were introduced into our final model (Eq. (12)) and  $J_{\max}$  values at pH 6.5 and 5.0 for manganese, and at pH 5.0 for cadmium were calculated (Fig. 1, Table 2). From the observed changes in  $J_{\max}$  with pH (Fig. 1), the influence of protons is obviously of a non-competitive nature.

#### 4.2. Influence of growth medium pH

The influence of acclimation (or absence of acclimation) of the cells to the experimental medium pH on metal uptake rates has been evoked before to explain discrepancies. For example, De Schamphelaere and Janssen (2006) compared their study of copper toxicity to *P. subcapitata* and *Chlorella vulgaris* with the work of Macfie et al. (1994) on metal (Cd, Co, Cu and Ni) uptake in *C. reinhardtii*; they suggested that the difference in the magnitude of the pH effect (lower in *C. reinhardtii*) could be partially explained by the fact that the cells were acclimated to the experimental pH for 4 days before being exposed to the metal whereas De Schamphelaere and Janssen (2006) did not acclimate their algae.

Means and standard errors of each variable ( $J_{\max}$ ,  $K_{Ca}$  and  $K_{Mn}$  or  $K_{Cd}$ ; see modelling in Section 4.1) were used to calculate

the theoretical internalization flux and its 95% confidence interval using Monte Carlo simulations. The simulations were based on the experimental results for algae grown and exposed at the same pH. A total of 10,000 simulations were performed, assuming a normally distributed (Gaussian) random error and error propagation laws were used. The simulations results allowed us to determine if a variation in the pH of the growth medium had a significant effect on metal uptake and helped compare experimental results obtained for algae grown at a pH different from the one used for the metal exposure (Fig. 2). Uptake of Cd or Mn was not affected by the pH of the growth medium; all results obtained with cells grown at a different pH than the exposure medium pH were consistent with those obtained with cells grown and exposed at the same pH. Note that, in Fig. 2, the line for the lower limit of the confidence interval is interrupted because of the log 10 scale representation.

#### 4.3. Mechanism of proton inhibition of Mn and Cd uptake

As expected, the main observation in our experiments was that, when pH decreased, metal uptake also decreased, demonstrating the inhibition of metal uptake by protons. However, Michaelis–Menten modelling (Table 2) gave  $J_m^{\text{MM}}$  values that increased with pH, which is a clear indicator of a non-competitive inhibition phenomenon. Considering the non-competitive inhibition suggested by the behaviour of  $J_{\max}$ , a plausible explanation for the uptake mechanism is that protons bind to the algal membrane at sites that differ from those involved in surface metal complexation. The consequence of this binding is a change in conformation of the metal binding sites, which results in lower uptake rates of the metal. This mechanism has previously been suggested (Harrison et al., 1986; Chowdhury and Blust, 2001; Kola and Wilkinson, 2005; Fortin et al., 2007) and our present data set clearly supports it.

A change of  $J_{\max}$  can be interpreted as a change of  $k_{\text{int}}$  (a change in the intrinsic rate of transmembrane uptake of the metal) or as a change in the total number of sites capable of binding and internalizing the metal,  $\{\equiv X\}_T$ . Non-competitive inhibition could result from an irreversible binding of an inhibitor, disabling the transporter (a decrease in “active”  $\{\equiv X\}_T$ ). As the pH is lowered, a growing proportion of transport sites could be deactivated. However, our experiments where algae were cultivated at a pH different from the pH of exposure showed no sign of irreversible binding. Indeed, Mn and Cd uptake were not affected by the pH of the growth medium; the exposure medium pH was the key parameter. From a different perspective, it could be argued that cells produce more transporters at higher pH values (an increase in  $\{\equiv X\}_T$ ). This is however very unlikely considering that cells grown at a low pH but exposed at a high pH gave results consistent with those obtained with algae grown and exposed at a high pH. The synthesis of new transporters is not an instantaneous process and is improbable in such a short time scale (exposure time = 45 min). Therefore, the observed change in  $J_{\max}$  most probably reflects a reversible conformational change in the uptake sites, inducing a change in  $k_{\text{int}}$ . The hypothesis that protons are simply competi-

tors for manganese and cadmium uptake in *C. reinhardtii* must be rejected.

#### 4.4. Biotic ligand affinity

Very few studies have proposed conditional stability constants for Mn binding to transport sites in algae. Moreover, the species tested were marine algae, which makes comparisons with our results hazardous. Nevertheless, the values reported for  $K_{Mn}$  by Slaveykova and Wilkinson (2005) ranged from  $10^7$  to  $10^{3.1}$  (some species exhibited a biphasic transport profile). Our estimated value for  $K_{Mn}$  ( $10^{4.20}$ ) lies within this range albeit closer to the lower limit.

Values for  $K_{Cd}$  found for *C. pyrenoidosa* ( $10^{5.5} M^{-1}$  at pH 7.0) and for *C. vulgaris* ( $10^{4.4} M^{-1}$  at pH 6.8) are close to our results ( $K_{Cd} = 10^{4.19}$ )—see Slaveykova and Wilkinson (2005) and references therein. In the case of *C. reinhardtii*, Kola and Wilkinson (2005) reported a much lower  $J_{max}$  at pH 7.0 ( $1.3 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ ) than we have observed ( $J_{max} = 5.72 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ ) and they observed a saturation at much lower concentrations (around  $[Cd^{2+}] = 10^{-6} M$ , whereas our saturation plateau started at  $\sim 10^{-4} M$ ), resulting in a conditional constant  ${}^c K_{Cd} = 1/K_m^{MM} = 10^6 M^{-1}$  (calculated from Michaelis–Menten modelling which assumes no significant inhibition from other cations) almost two orders of magnitude higher than ours ( $K_{Cd} = 10^{4.19}$ ). On the other hand, the binding affinity of Ca for the Cd transport sites was close ( $K_{Ca} = 10^{4.5}$ ) to ours ( $K_{Ca} = 10^{4.75}$ ). They also estimated a value for proton binding to Cd transport sites ( $K_H = 10^{5.2}$ ), but this value did not successfully explain the data and they considered a second proton binding site on the same transporter ( $2 H^+ + \equiv X^- \leftrightarrow \equiv X-H_2$ ;  $K_{H_2} = 10^{11.3}$ ). The large differences in uptake parameters might reflect the composition of the growth and exposure media used by Kola and Wilkinson (2005) ( $10^{-2} M$  of morpholino propane sulfonic acid, ionic strength of  $10^{-2} M$  adjusted with  $NaNO_3$ , and most notably the absence of Ca), or come from differences in the origin of the algal strains used.

#### 4.5. Adsorption

No significant pH effect on manganese adsorption was observed, thus confirming previous observations (Schenck et al., 1988 and references therein). Also, no significant saturation was observed over our very wide concentration range. Saturation can provide an accurate estimate of the number of non-specific (not leading to internalization) adsorption sites. We thus could not determine an adsorption equilibrium constant for Mn binding to the algal surface.

Unlike manganese, cadmium adsorption was influenced by pH variations in the same manner as cadmium uptake; when the pH decreased, cadmium adsorption decreased as well. The pH at which the algae had been cultured did not influence the results either, indicating that no major changes in the surface Cd adsorption sites occur within this pH range (5.0–6.5). Again, no significant saturation was observed and no accurate adsorption equilibrium constant for Cd binding to the algal surface could be computed.

#### 4.6. Implications for an algal BLM

The BLM is based on numerous hypotheses (Campbell, 1995; Van Leeuwen, 1999; Di Toro et al., 2001; Campbell et al., 2002) but two, in particular, were tested in this work: (i) cations like  $H^+$  or  $Ca^{2+}$  can compete with the metal  $M^{z+}$  in surface complexation reactions; and (ii) the nature of the biological surface or its ionic transporters remain unchanged during the exposure to the metal. Even though we observed metal uptake over a very wide concentration range (reaching concentrations well above normal environmental values), the knowledge of saturation trans-membrane fluxes allowed the development of a more accurate model for the mechanistic interpretation of processes involved in manganese and cadmium uptake. Our results suggest that when pH varies, the changes in metal uptake cannot be explained by the BLM theory. Should this non-competitive effect of pH be applicable to all metal–algae interactions, this would warrant a re-evaluation of the BLM limitations concerning the influence of protons. Otherwise, the understanding of metal uptake based on the model will be more empirical than mechanistic (and calculated constants more conditional) when pH varies; or BLM applications will be limited to media with no changing pH conditions, which does not reflect relevant environmental situations.

#### 5. Conclusion

The influence of pH on short-term uptake of manganese and cadmium by *C. reinhardtii* was studied to better understand the effect of protons on metal trans-membrane fluxes. For both metals, first-order biological internalization was observed. However, maximum transport fluxes ( $J_{max}$ ) decreased more than 4-fold for manganese between pH 8.0 and 5.0, and decreased 1.6-fold for cadmium between pH 6.5 and 5.0, suggesting a non-competitive inhibition by  $H^+$ -ions. A Michaelis–Menten type inhibition model was tested: the metal stability constants for transport sites and the stability constants for competitive binding of  $Ca^{2+}$  and  $H^+$  were calculated. Surprisingly, for both metals,  $K_H$  was not a significant parameter, indicating that competitive inhibition of protons (the type of inhibition considered in the BLM) is negligible. We also observed that growing the algae at a pH different from the exposure pH did not influence subsequent metal uptake, leading us to conclude that protons induce conformational changes in the membrane bound transport protein that result in pH-sensitive internalization rates ( $k_{int}$ ). Our results demonstrate that the BLM in its present state does not properly describe the true influence of pH on manganese and cadmium uptake by algae and that a non-competitive inhibition component must be integrated.

#### Acknowledgments

Financial support to C. Fortin provided through the new scientist initiative of the Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) and the discovery grant program of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) is acknowledged.

P.G.C. Campbell is supported by the Canada Research Chair program.

## References

- Bates, S.S., Tessier, A., Campbell, P.G.C., Buffle, J., 1982. Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. *J. Phycol.* 18, 521–529.
- Campbell, P.G.C., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free ion activity model. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. IUPAC, John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp. 45–102.
- Campbell, P.G.C., Stokes, P.M., 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 2034–2049.
- Campbell, P.G.C., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneault, B., 2002. Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 133, 189–206.
- Chowdhury, M.J., Blust, R., 2001. A mechanistic model for the uptake of waterborne strontium in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Sci. Technol.* 35, 669–675.
- De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., 2006. Bioavailability models for predicting copper toxicity to fresh green microalgae as a function of water chemistry. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4514–4522.
- De Schamphelaere, K.A.C., Vasconcelos, F.M., Heijerick, D.G., Tack, F.M.G., Delbeke, K., Allen, H.E., Janssen, C.R., 2003. Development and field validation of a predictive copper toxicity model for the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2454–2465.
- Di Toro, D., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., Santore, R.C., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2383–2396.
- Fortin, C., 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., Denison, F.H., Garnier-Laplace, J., 2007. Metal–phytoplankton interactions: modeling the effect of competing ions ( $H^+$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ ) on uranium uptake. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 242–248.
- Harrison, G.I., Campbell, P.G.C., Tessier, A., 1986. Effects of pH changes on zinc uptake by *Chlamydomonas variabilis* grown in batch culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43, 687–693.
- Hassler, C.S., Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2004. Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol. Oceanogr. Methods* 2, 237–247.
- Hauck, M., Mulack, C., Paul, A., 2002. Manganese uptake in the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides*. *Environ. Exp. Bot.* 48, 107–117.
- Heijerick, D.G., De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., 2002. Biotic ligand model development predicting Zn toxicity to the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: possibilities and limitations. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 133, 207–218.
- Heijerick, D.G., Janssen, C.R., De Coen, W.M., 2003. The combined effects of hardness, pH, and dissolved organic carbon on the chronic toxicity of Zn to *D. magna*: development of a surface response model. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 210–217.
- Khres, D.G., Zaharik, M.L., Finlay, B.B., Maguire, M.E., 2000. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol. Microbiol.* 36, 1085–1100.
- Knauer, K., Behra, R., Sigg, L., 1997. Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 33, 596–601.
- Kola, H., Wilkinson, K.J., 2005. Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3040–3047.
- Macfie, S.M., Tarmohamed, Y., Welbourn, P.M., 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 454–458.
- Martell, A.E., Smith, R.M., Motekaitis, R.J., 2004. *Critical Stability Constants of Metal Complexes Database*, Version 8.0. U.S. Department of Commerce, Gaithersburg, MD, USA.
- Mehta, S.K., Singh, A., Gaur, J.P., 2002. Kinetics of adsorption and uptake of  $Cu^{2+}$  by *Chlorella vulgaris*: influence of pH, temperature, culture age, and cations. *J. Environ. Sci. Health Part A-Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 37, 399–414.
- Mosulén, S., Domínguez, M.J., Vígara, J., Vílchez, C., Guiraum, A., Vega, J.M., 2003. Metal toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Effect on sulfate and nitrate assimilation. *Biomol. Eng.* 20, 199–203.
- Parent, L., Campbell, P.G.C., 1994. Aluminium bioavailability to the green alga *Chlorella pyrenoidosa* in acidified synthetic soft water. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 587–598.
- Schecher, W.D., 2001. MINEQL+: Version 4.5. Environmental Research Software. Hallowell, ME, USA.
- Schenck, R.C., Tessier, A., Campbell, P.G.C., 1988. The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. *Limnol. Oceanogr.* 33, 538–550.
- Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2002. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environ. Sci. Technol.* 36, 969–975.
- Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2005. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: critical review of the Biotic Ligand Model. *Environ. Chem.* 2, 9–24.
- Van Leeuwen, H.P., 1999. Metal speciation dynamics and bioavailability: inert and labile complexes. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3743–3748.
- Wehr, J.D., Brown, L.M., Vanderlost, I.E., 1986. Hydrogen ion buffering of culture media for algae from moderately acidic, oligotrophic waters. *J. Phycol.* 22, 88–94.
- Wilde, K.L., Stauber, J.L., Markich, S.J., Franklin, N.M., Brown, P.L., 2006. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 174–185.
- Wilkinson, K.J., Buffle, J., 2004. Critical evaluation of physicochemical parameters and process for modelling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic) systems. In: van Leeuwen, P., Köster, W. (Eds.), *Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces*. John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp. 445–533.