

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

**EFFETS DES MÉTAUX TRACES ESSENTIELS ET DU CALCIUM SUR
L'ACCUMULATION ET LA TOXICITÉ DU CADMIUM CHEZ
L'ALGUE VERTE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII : INCLUSION
DES INTERACTIONS PHYSIOLOGIQUES ALGALES DANS LE
MODÈLE DU LIGAND BIOTIQUE**

par

Michel LAVOIE

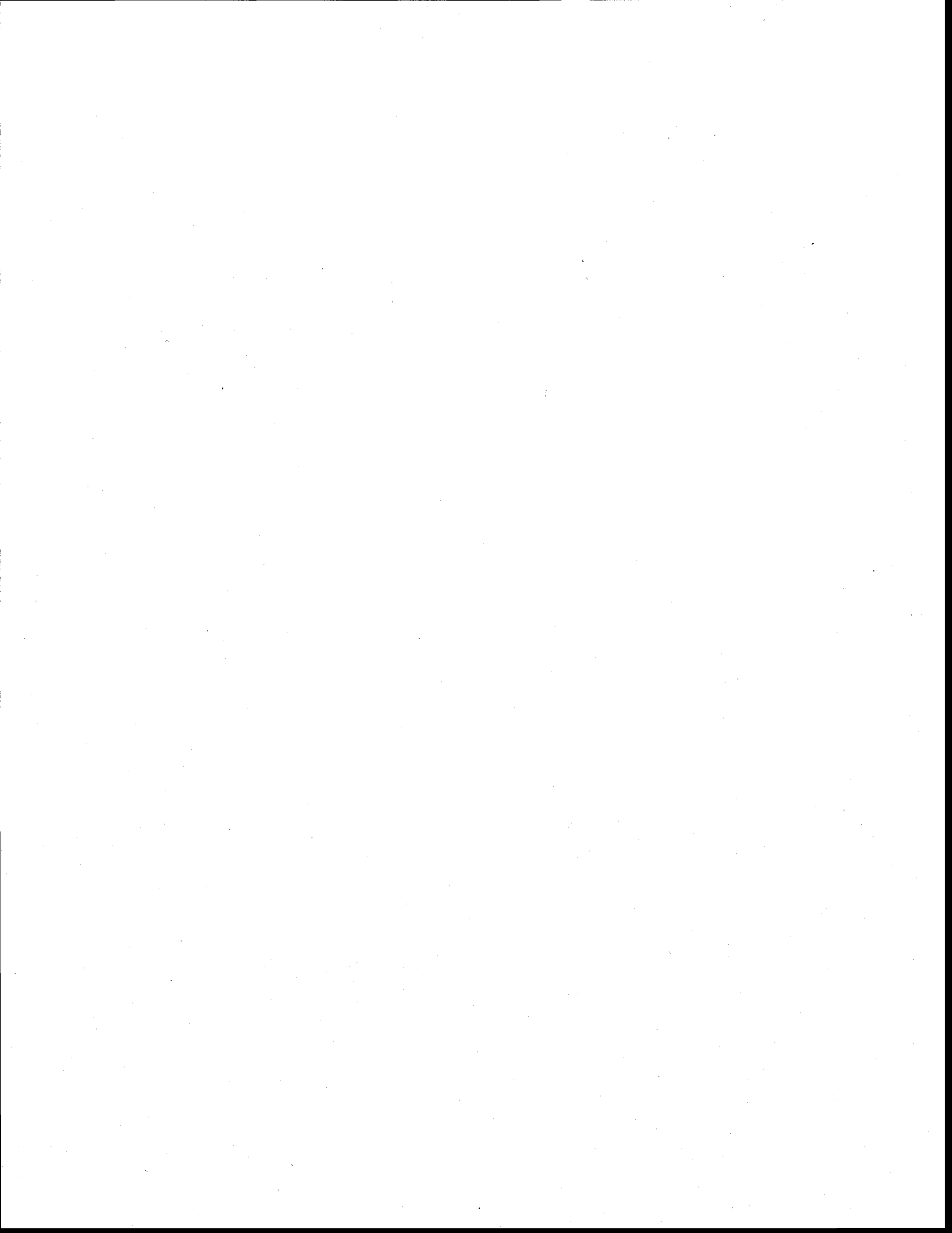
Thèse présentée pour obtenir le grade de

Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

en Sciences de l'eau

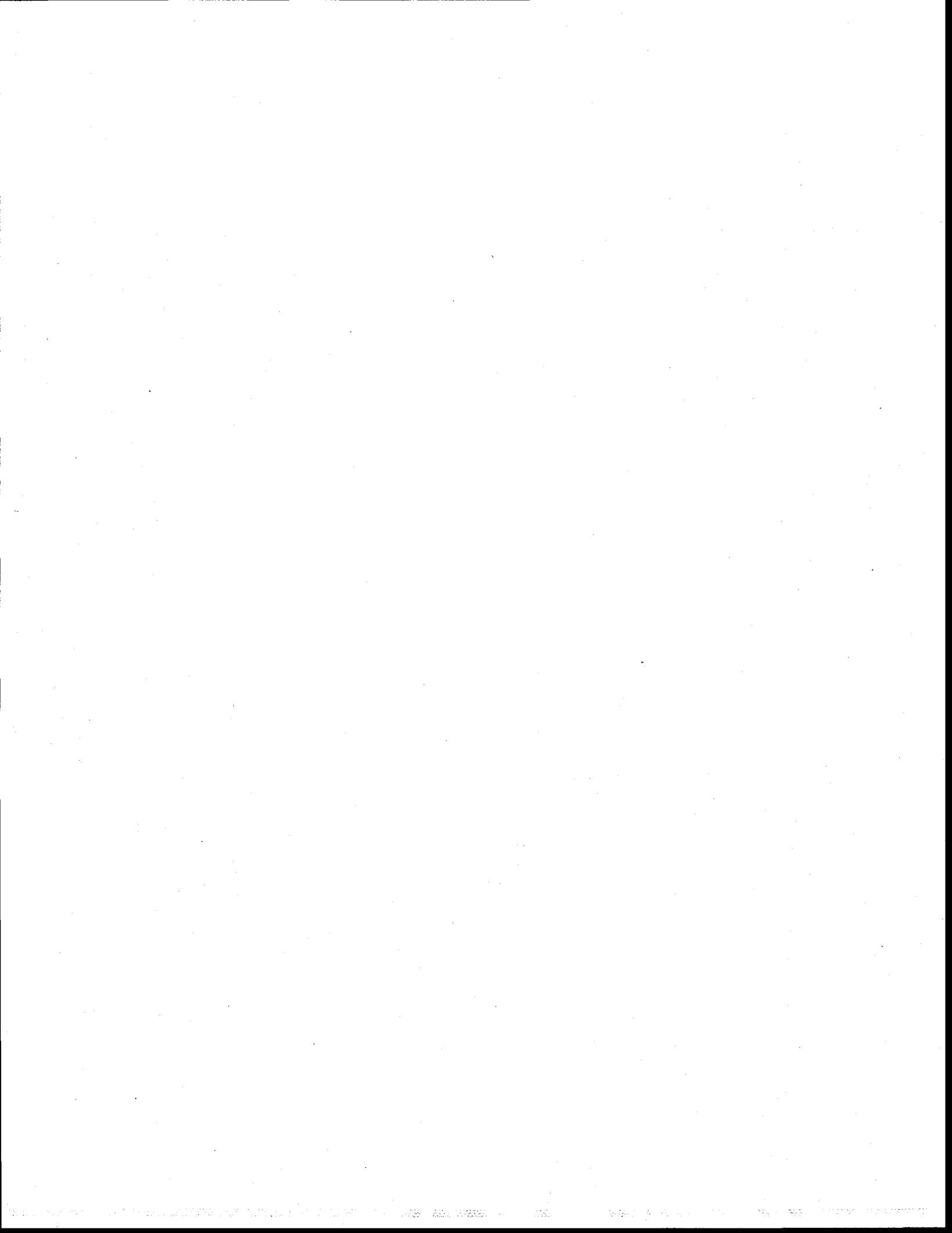
Jury d'évaluation

Examinatrice externe et présidente du jury	Prof. Laura SIGG EAWAG
Examineur externe	Prof. Alexandre POULAIN Université d'Ottawa
Examineur interne	Prof. Kevin J. WILKINSON Université de Montréal
Directeur de recherche	Prof. Claude FORTIN INRS-ETE
Codirecteur de recherche	Prof. Peter G.C. CAMPBELL INRS-ETE



La science a la chance et la modestie de savoir qu'elle est dans le provisoire, de déplacer les frontières de l'inconnu et d'avancer.

- Marc Augé



RÉSUMÉ

Plusieurs expériences en laboratoire ont conduit à l'élaboration d'un modèle (le modèle du ligand biotique ou MLB) permettant de prédire l'accumulation et la toxicité des métaux traces chez un grand nombre d'espèces aquatiques dont le phytoplancton. Ce modèle stipule que l'accumulation et la toxicité d'un métal sont reliées linéairement à la concentration de métal lié aux sites membranaires physiologiquement actifs. Ces sites représentent les ligands biotiques faisant souvent parti intégrante des systèmes de transport cationiques membranaires. Le MLB prédit que la concentration de métaux liés à ces ligands biotiques varie linéairement en fonction de la concentration de métal libre (M^{z+}) en solution à pH et dureté constants. Le MLB prend aussi compte de la compétition entre différents cations (Ca, Mg, protons) et les métaux pour la liaison au ligand biotique, et donc de leur effet protecteur pour l'accumulation et la toxicité des métaux. Le MLB ne tient pas compte des effets, encore peu connus, des métaux essentiels et non essentiels sur la physiologie des organismes et leurs répercussions sur l'accumulation et la toxicité des métaux. Ce projet doctoral visait à tester l'importance de ce dernier point. Les objectifs de recherche de cette thèse étaient donc : 1) de mesurer l'effet des métaux essentiels sur l'accumulation et la toxicité d'un métal non essentiel, le cadmium (Cd) chez l'algue d'eau douce *Chlamydomonas reinhardtii*; 2) de scruter les mécanismes par lesquels plusieurs de ces métaux essentiels en combinaison avec le Cd exercent leurs effets modulateurs sur l'accumulation et la toxicité du Cd; 3) d'inclure ces effets physiologiques des éléments essentiels et du Cd à l'intérieur du MLB afin de tester l'adéquation entre les prédictions de notre modèle et les mesures d'accumulation et de toxicité du Cd au laboratoire.

Pour ce faire, nous avons réalisé des cultures d'algues en lots au laboratoire dans des milieux où la spéciation des métaux est bien connue et contrôlée à l'aide d'un ligand non assimilable, l'acide nitrilotriacétique. Des cultures de *C. reinhardtii* ont d'abord été pré-acclimatées à différentes concentrations de métaux traces essentiels (fer ou Fe, cobalt ou Co, zinc ou Zn, manganèse ou Mn, cuivre ou Cu) et aussi à une $[Cd^{2+}]$ élevée ou faible. Les algues furent par la suite exposées à différentes $[Cd^{2+}]$ sur une période de 3 min, 30 min ou 60 h en présence de différentes concentrations de ces métaux traces essentiels et de calcium (Ca). L'accumulation du Cd était mesurée à l'aide d'un radio-traceur, le ^{109}Cd , et la toxicité du Cd était déterminée en dénombrant le rendement cellulaire après 60 h de croissance.

Tel que prédit par le MLB, une augmentation d'un facteur 200 de la $[Mn^{2+}]$ ou d'un facteur 100 de la $[Fe^{3+}]$ n'affectait pas l'accumulation et la toxicité du Cd mesurées après 60 h de croissance de l'algue. Cependant, une augmentation d'un facteur 10 de la $[Cu^{2+}]$ augmentait l'accumulation et la toxicité du Cd^{2+} par approximativement un facteur deux tandis qu'une augmentation d'un facteur 100 de la $[Zn^{2+}]$ ou de la $[Co^{2+}]$ inhibait l'accumulation et la toxicité du Cd^{2+} par plus de 2 fois. De plus, l'augmentation simultanée de l'ensemble des métaux traces essentiels étudiés diminuait d'un facteur 10 à 40 l'accumulation et la toxicité du Cd^{2+} . Ces effets des métaux traces essentiels n'étaient pas influencés par la composition du milieu d'acclimatation de l'algue avant l'exposition et devaient donc apparaître à l'intérieur de l'exposition de 60 h. Puisque la concentration intracellulaire de Cd inhibant de 50% la croissance de l'algue ne variait pas significativement pour l'ensemble des traitements et que la croissance des algues n'était pas affectée par les métaux traces (sauf pour le Cu, où son effet synergique sur l'accumulation et la toxicité du Cd était dû à une baisse du taux de croissance

de l'algue et donc à une diminution de la biodilution du Cd), cette modulation de la toxicité du Cd^{2+} par les métaux traces était directement reliée à des effets physiologiques des métaux traces sur les mécanismes d'assimilation du Cd^{2+} et non à l'efficacité de la détoxification intracellulaire du Cd.

Les mesures des taux d'accumulation du Cd à court terme (3 ou 30 min d'exposition) chez *C. reinhardtii* ont donc été entreprises afin d'étudier en détails les mécanismes de transport du Cd. Celles-ci ont premièrement montré que le Cd emprunte au moins trois systèmes de transport distincts pour pénétrer dans les cellules algales. Un système de transport de Cd de faible affinité nommé Cd-1 ($K_{\text{Cd-1}}^{\text{Cd}} = 10^{4.87 \pm 0.06}$) et deux autres systèmes de plus haute affinité, les systèmes de transport Cd-2 ($K_{\text{Cd-2}}^{\text{Cd}} = 10^{7.60 \pm 0.07}$) et Cd-3 ($K_{\text{Cd-3}}^{\text{Cd}} = 10^{8.80 \pm 0.09}$). Chez des algues acclimatées à une $[\text{Zn}^{2+}]$ 100 fois plus élevée (10^{-9} M au lieu de 10^{-11} M Zn^{2+}), on a pu démontrer une inhibition non compétitive du transport du Cd par le Zn^{2+} . En effet, une baisse significative d'environ 30 à 50% des taux d'internalisation maximaux de Cd, $V_{\text{max}}^{\text{Cd}}$, via les trois systèmes de transport du Cd, fut observée. Une acclimatation à 7×10^{-9} M Cd^{2+} pendant 60 h augmentait dramatiquement (d'environ un facteur six) le $V_{\text{max-2}}^{\text{Cd}}$ comparativement aux algues acclimatées à $< 10^{-12}$ M Cd^{2+} , une rétroaction positive du Cd. Une pré-acclimatation à des $[\text{Zn}^{2+}]$ et $[\text{Co}^{2+}]$ élevées (10^{-9} au lieu de 10^{-11} M) inhibait significativement le mécanisme de rétroaction positive du Cd sur le $V_{\text{max-2}}^{\text{Cd}}$ de respectivement 4,5 et 2,5 fois. Cela faisait en sorte que les effets protecteurs du Zn^{2+} et du Co^{2+} sur l'accumulation du Cd après 60 h d'exposition étaient en grande partie dus à la modulation du $V_{\text{max-2}}^{\text{Cd}}$. Notons aussi qu'une exposition à 10^{-3} M Ca^{2+} inhibait significativement le $V_{\text{max-2}}^{\text{Cd}}$ moyen d'environ 36% comparativement à une exposition à 2×10^{-5} M Ca^{2+} , et ce, pour des algues acclimatées à 2×10^{-5} M Ca^{2+} . Ce dernier résultat démontre un effet physiologique rapide et subtil du Ca^{2+} autre que la compétition classique prise en compte dans le MLB. Finalement, une acclimatation des algues à une augmentation combinée de l'ensemble des métaux traces étudiés induisait une diminution significative de l'affinité du Cd pour le système de transport Cd-2 d'environ un facteur 4, ce qui expliquait l'effet protecteur dramatique (pour des $[\text{Cd}^{2+}]$ loin de la saturation du système de transport Cd-2) de l'ensemble des métaux traces en combinaison sur l'accumulation et la toxicité du Cd.

Afin de mieux cerner la nature des trois systèmes de transport du Cd, nous avons aussi mesuré l'accumulation du Zn après des expositions à court terme à l'aide d'un radio-traceur, le ^{65}Zn . Les cinétiques d'accumulation du Zn montraient d'étonnantes similitudes avec celles du Cd, soit la présence d'un système de transport du Zn^{2+} de faible affinité ($K_{\text{Zn-1}}^{\text{Zn}} = 10^{5.13 \pm 0.08}$), un autre système de plus grande affinité ($K_{\text{Zn-2}}^{\text{Zn}} = 10^{7.43 \pm 0.05}$) ainsi qu'une zone où l'accumulation du Zn est fortement régulée par l'algue correspondant probablement à un troisième système de transport ($K_{\text{Zn-3}}^{\text{Zn}} > 10^9$). Les effets d'une pré-acclimatation à différentes $[\text{Zn}^{2+}]$ et $[\text{Cd}^{2+}]$ sur les $V_{\text{max-2}}^{\text{Zn}}$ étaient aussi d'amplitudes similaires à celles démontrés pour les $V_{\text{max-2}}^{\text{Cd}}$. De plus, les constantes d'affinité du Zn pour les systèmes de transport Cd-1 ($K_{\text{Cd-1}}^{\text{Zn}} = 10^{4.97 \pm 0.06}$) et Cd-2 ($K_{\text{Cd-2}}^{\text{Zn}} = 10^{6.95 \pm 0.11}$; exposition de 3 min) étaient similaires respectivement aux $K_{\text{Zn-1}}^{\text{Zn}}$ et $K_{\text{Zn-2}}^{\text{Zn}}$. Inversement, les constantes d'affinité du Cd pour les systèmes de transport de Zn-1 ($K_{\text{Zn-1}}^{\text{Cd}} = 10^{5.07 \pm 0.06}$), Zn-2 ($K_{\text{Zn-2}}^{\text{Cd}} = 10^{7.53 \pm 0.09}$; exposition de 3 min) et Zn-3 ($K_{\text{Zn-3}}^{\text{Cd}} = 10^{8.81 \pm 0.08}$) étaient aussi similaires respectivement aux $K_{\text{Cd-1}}^{\text{Cd}}$, $K_{\text{Cd-2}}^{\text{Cd}}$, $K_{\text{Cd-3}}^{\text{Cd}}$. Nos résultats suggèrent fortement que le Zn et le Cd partagent ces systèmes de transport. Les transporteurs

Cd-1/Zn-1 seraient probablement des systèmes de transport de cations majeurs, vu leur faible affinité pour le Cd et le Zn tandis que les Zn-2/Cd-2 et Zn-3/Cd-3 pourraient être des transporteurs de métaux divalents tels le Zn.

Notre modèle du ligand biotique incorporant les effets physiologiques du Ca et des métaux traces essentiels ainsi que la rétroaction positive du Cd sur l'accumulation du Cd permet de prédire adéquatement l'accumulation du Cd à l'état stationnaire chez *C. reinhardtii* cultivée en présence de différentes concentrations d'éléments essentiels. Le MLB développé dans cette étude représente un pas de plus vers l'élaboration d'un MLB capable de prédire d'une façon robuste l'accumulation et la toxicité des métaux dans un environnement chimique complexe en milieu naturel.



ABSTRACT

English title: Effects of Essential Trace Metals and Calcium on Cadmium Uptake and Toxicity in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Integrating Algal Physiological Interactions within the Biotic Ligand Model

Numerous experiments led to the development of the biotic ligand model (BLM), which predicts metal accumulation and toxicity in several aquatic organisms including phytoplankton. This model stipulates that metal uptake and toxicity is linearly related to the concentration of metals bound to physiologically active sites at the surface of the plasma membrane. These sites are the biotic ligands that usually lead to the internalisation of metals (i.e. metal transporters). The BLM predicts that the concentration of metal bound to membrane active sites linearly vary as a function of the free metal ion concentration (M^{z+}) at constant pH and hardness. The BLM also considers competition between some cations (Ca, Mg and protons) and metals for binding at the biotic ligand, and thus their protective effects on metal uptake and toxicity. However, the BLM currently does not take into account the effects of essential and non-essential metals on the physiology of organisms and their repercussions on metal uptake and toxicity since these are poorly documented. This research project aimed to assess the importance of these physiological aspects in the BLM. The research objectives were thus to: 1) measure the effect of essential metals on the uptake of a non-essential metal, cadmium (Cd), in the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii*; 2) examine the mechanisms whereby some essential metals and a non-essential metal (Cd) modulate Cd uptake and toxicity; and 3) integrate the physiological effects of essential metals and Cd within the BLM framework in order to test the agreement between model predictions and experimental Cd accumulation and toxicity measurements.

To do so, algae cultures were grown in laboratory batch cultures in well-defined culture media where metals speciation is buffered with nitrilotriacetic acid, a non-assimilable ligand. *Chlamydomonas reinhardtii* cultures were preconditioned to two different essential trace metal (Iron or Fe, cobalt or Co, zinc or Zn, manganese or Mn, copper or Cu) concentrations and to a high or low $[Cd^{2+}]$. The algae were then exposed to various $[Cd^{2+}]$ in short- (3 - 30 min) or long-term (60 h) experiments in the presence of different essential trace metal concentrations and calcium (Ca). The cadmium accumulation was measured by using a radioisotope, ^{109}Cd , and Cd toxicity was determined by enumerating cell yields after 60 h of growth.

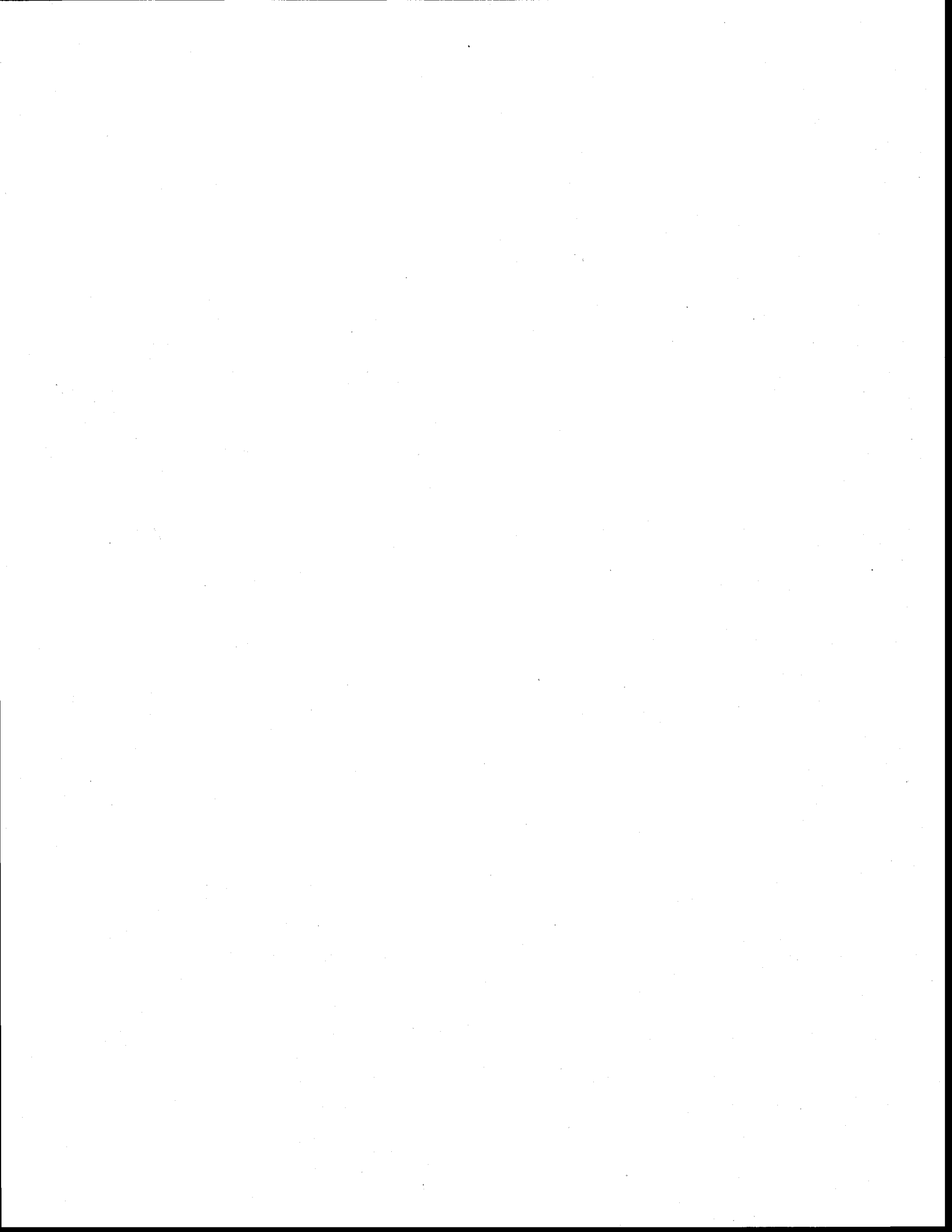
As predicted by the BLM, a 200-fold increase in $[Mn^{2+}]$ or a 100-fold increase in $[Fe^{3+}]$ did not affect Cd uptake and toxicity as measured after 60 h of growth. However, an increase by 10-fold of the $[Cu^{2+}]$ increased Cd accumulation and toxicity by approximately twofold whereas a 100-fold increase in $[Zn^{2+}]$ or $[Co^{2+}]$ inhibited Cd uptake and toxicity by more than twofold. Moreover, a simultaneous increase of all the five essential trace metals decreased Cd accumulation and toxicity by 10- to 40-fold. The surprising effects of essential trace elements were not influenced by the acclimation media composition (before the 60-h exposure experiments) and were thus thought to appear within the 60-h exposure. Cadmium intracellular concentrations inhibiting algae growth by 50% did not vary significantly in all treatments and algae growth were unaffected by trace metals alone (without Cd) except for

Cu, which decreased algal growth rate and thus decreased Cd biodilution which explains its synergistic effect on Cd uptake and toxicity. For all other trace elements, the modulation of Cd toxicity was directly linked to physiological effects of these metals on Cd assimilation mechanisms, but unrelated to intracellular Cd detoxification efficiency.

Measurements of short-term (3 or 30 min) Cd uptake rates were undertaken in order to study the underlying Cd transport mechanisms. These experiments showed that Cd is taken up by three transport systems. One system of low Cd affinity, the Cd-1 transport system ($K_{Cd-1}^{Cd} = 10^{4.87 \pm 0.06}$) and two other transport systems of higher affinity for Cd, the Cd-2 transport system ($K_{Cd-2}^{Cd} = 10^{7.60 \pm 0.07}$) and the Cd-3 transport system ($K_{Cd-3}^{Cd} = 10^{8.80 \pm 0.09}$). Using algae acclimated to 100-fold higher $[Zn^{2+}]$ (10^{-9} instead of 10^{-11} M Zn^{2+}), it was shown that Zn^{2+} inhibits non-competitively Cd accumulation through the three transport systems (a decrease by around 30 to 50% of the maximal Cd uptake rate, V_{max}^{Cd}). Acclimation of the cells to 7×10^{-9} M Cd^{2+} (instead of $< 10^{-12}$ M Cd^{2+}) for 60 h dramatically increased (by approximately sixfold) the V_{max}^{Cd} of the Cd-2 transport system (V_{max-2}^{Cd}), an inherent Cd positive feedback. High Zn^{2+} and Co^{2+} acclimation concentrations (10^{-9} instead of 10^{-11} M) was shown to significantly inhibit by 4.5- and 2.5-fold respectively the Cd positive feedback mechanism on the V_{max-2}^{Cd} so that the protective effects of Zn^{2+} and Co^{2+} on long-term (60 h) Cd accumulation and toxicity were largely due to this phenomenon. It was also shown that a 10^{-3} M Ca^{2+} exposure inhibited significantly the V_{max-2}^{Cd} by around 36% relatively to exposure in presence of 2×10^{-5} M Ca^{2+} for algae previously acclimated in both treatments to 2×10^{-5} M Ca^{2+} , demonstrating a rapid and subtle physiological effect of Ca^{2+} on Cd uptake. Finally, acclimation of algae cells to an increase in trace metal concentrations of all the five metals simultaneously induced a significant decrease in Cd affinity for the Cd-2 transport system by around fourfold. This effect explained why the Cd uptake and toxicity dramatically decreased (for $[Cd^{2+}]$ far from saturation of the Cd-2 transport system) when increasing all the five trace metal concentrations simultaneously.

In order to gain further insights into the three separate transport systems mediating Cd accumulation in *C. reinhardtii*, Zn short-term accumulation rates were determined using the ^{65}Zn radiotracer. Zinc accumulation kinetics showed striking similarities with those of Cd, that is a low affinity Zn transport system ($K_{Zn-1}^{Zn} = 10^{5.13 \pm 0.08}$), another Zn transport system of higher affinity ($K_{Zn-2}^{Zn} = 10^{7.43 \pm 0.05}$) along with another highly regulated Zn transport system ($K_{Zn-3}^{Zn} > 10^9$). The effects of preconditioning to different $[Zn^{2+}]$ and $[Cd^{2+}]$ on V_{max-2}^{Zn} were also similar to those already demonstrated on V_{max-2}^{Cd} . Moreover, Zn affinity constants for the Cd-1 ($K_{Cd-1}^{Zn} = 10^{4.97 \pm 0.06}$) and Cd-2 ($K_{Cd-2}^{Zn} = 10^{6.95 \pm 0.11}$; 3 min exposure) transport systems were similar to K_{Zn-1}^{Zn} and K_{Zn-2}^{Zn} respectively. Inversely, Cd affinity constants for the Zn-1 ($K_{Zn-1}^{Cd} = 10^{5.07 \pm 0.06}$), Zn-2 ($K_{Zn-2}^{Cd} = 10^{7.53 \pm 0.09}$; 3 min exposure) and Zn-3 ($K_{Zn-3}^{Cd} = 10^{8.81 \pm 0.08}$) transport systems were also similar to K_{Cd-1}^{Cd} , K_{Cd-2}^{Cd} and K_{Cd-3}^{Cd} respectively. All the latter data strongly suggest that Zn and Cd share these transporters. The Cd-1/Zn-1 transport system are probably a major cations transport system given its low Cd and Zn affinity whereas the two other transport systems (Zn-2/Cd-2 and Zn-3/Cd-3) could be divalent metal (such as Zn) transporters.

Our biotic ligand model incorporating the physiological effects of Ca^{2+} and essential trace metals as well as the Cd positive feedback on Cd transport system properties predicts reasonably well steady-state intracellular Cd in *C. reinhardtii* growing in presence of varying essential metal concentrations. The refined version of the proposed BLM in this thesis should be viewed as one more step toward the elaboration of a future version of the BLM able to accurately predict metal accumulation and toxicity in complex natural freshwater environment.



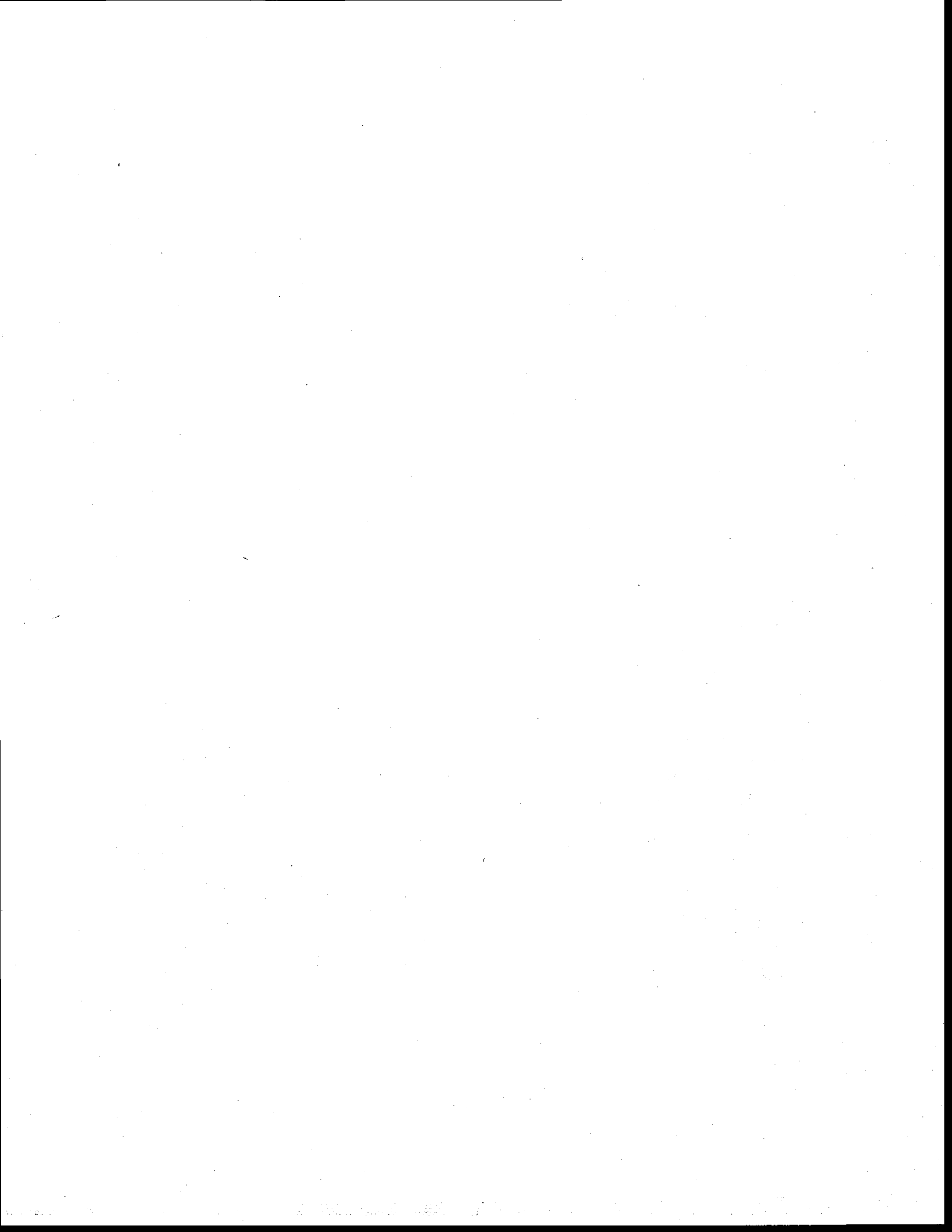
AVANT-PROPOS

Cette thèse comporte deux parties distinctes. La première partie est constituée d'une synthèse de l'ensemble des travaux de doctorat : la problématique, les objectifs et hypothèses de recherche ainsi que l'interprétation et la discussion des principaux résultats. Le cœur de la thèse, en deuxième partie, est composé de trois articles scientifiques cités ci-dessous. Un premier publié dans la revue *Environmental Toxicology and Chemistry*, un deuxième publié dans la revue *Environmental Science and Technology* et un troisième en préparation pour publication dans la revue *Environmental Science and Technology*. Finalement, des résultats complémentaires sont présentés en annexe.

La contribution des différents auteurs aux trois articles s'établit comme suit :

- Michel Lavoie: - Planification et conception du projet
- Réalisation des expériences
- Traitement des données
- Rédaction de la première ébauche des manuscrits
- Claude Fortin - Conception du projet
- et - Conseils scientifiques judicieux
- Peter G.C. Campbell - Révision constructive des manuscrits

- 1) Lavoie M., Fortin C. et Campbell P.G.C. 2012. Influence of essential elements on cadmium uptake and toxicity in a unicellular green alga: The protective effect of trace zinc and cobalt concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31:1445-1452. DOI: 10.1002/etc.1855
- 2) Lavoie M., Fortin C. et Campbell P.G.C. 2012. Extending the Biotic Ligand Model to account for positive and negative feedback interactions between cadmium and zinc in the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology*. 46:12129-12136. DOI: 10.1021/es302512r
- 3) Lavoie M., Fortin C. et Campbell P.G.C. 2012. Predicting cadmium accumulation and toxicity in a green alga in the presence of varying essential metal concentrations. À soumettre à *Environmental Science and Technology*.



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur, Claude Fortin, et mon co-directeur, Peter Campbell, pour les belles valeurs qu'ils véhiculent et transmettent à leurs étudiants, telles que le respect, l'enthousiasme et l'optimisme. Au fil des années, ils m'ont aussi inculqué l'importance de la rigueur scientifique en phycotoxicologie. Le « chimiste » qui sommeillait en moi en a profité pour saisir ce joyau. La façon de penser « sans » frontière disciplinaire en biogéochimie est aussi un des plus beaux cadeaux qui m'aient été offert lors de mon travail au sein de leur équipe de recherche. C'est là qu'on se rend compte jusqu'où cette vision de la science peut nous mener!

Mon travail dirigé réalisé au lac St-Charles avec Jean-Christian Auclair m'a permis d'ajouter une dimension limnologique ainsi que des compétences pratiques de « terrain » à mon doctorat. Je ne me doutais pas initialement que nos découvertes allaient nous mener jusqu'au congrès de l'ASLO et du World Lake student Meeting (WLSM) au Japon! Je me considère très chanceux d'avoir pu bénéficier de l'épatante expertise de Jean-Christian sur le cycle du phosphore. Nos discussions autant scientifiques que philosophiques m'ont fait grandement cheminer sur le plan intellectuel et personnel. Jean-Christian, tu as été une des pièces maîtresses pour la réussite de mes études doctorales.

Je remercie également les membres de mon jury d'évaluation, Prof. Laura Sigg, Prof. Alexandre Poulain et Prof. Kevin J Wilkinson. Vos commentaires constructifs d'experts ont contribué à la production d'une thèse au contenu plus rigoureux et mieux présenté.

Un grand merci à l'ensemble de mes collègues de travail et ami(e)s avec qui j'ai eu la chance de célébrer lors de nombreux congrès scientifiques ou après le travail. Je pense notamment à Maïkel Rosabal, Zhongzhi Chen, Isabelle Lavoie, Simon Leclair, Anne Crémazy, Paula Sánchez-Marín, Dominic Ponton, Isabelle Proulx, Stéphane Feyte, Dominique Lapointe, Séverine Le Faucheur, Benjamin Barst, Diego Campisi, Karista Hudelson, Karita Neghandi,

Raoul-Marie Couture, Kristin Mueller, Jonathan Bernier, Jacqui Levy, Cassandra Smith et Audrey Llevot.

Cette recherche n'aurait pu « prendre vie » sans le soutien technique de l'ensemble du personnel des laboratoires de l'INRS-ETE et l'appui financier de nombreux organismes : le Fond Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), les Chaires de recherche du Canada en biogéochimie des éléments traces ainsi qu'en écotoxicologie des métaux, le « Metals in the Human Environment Strategic Network » et le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG).

Je remercie aussi mes parents qui m'ont soutenu moralement et financièrement pendant toutes mes études. Ils m'ont fait part de bonnes valeurs, telles que la persévérance, la générosité et le goût d'apprendre. Celles-ci sont sans doute à l'origine de mon intérêt pour les sciences. C'est grâce à vous que j'ai réussi à atteindre mes objectifs académiques, mon diplôme de doctorat. Je ne vous remercierai jamais assez!

Que dire de la plus grande réussite de cette thèse, William. Sa présence juste à mes côtés, arborant son petit sourire serein, fut mon inspiration pour la rédaction de ma thèse. Après tout, la science n'est que la vision du monde à travers des yeux d'enfants. Je remercie aussi mon épouse Vicky pour son enthousiasme contagieux hors du commun. Elle a toujours été là pour m'aider dans les moments d'incertitudes grammaticales. Il y a un peu de vous deux dans les textes de cette thèse.

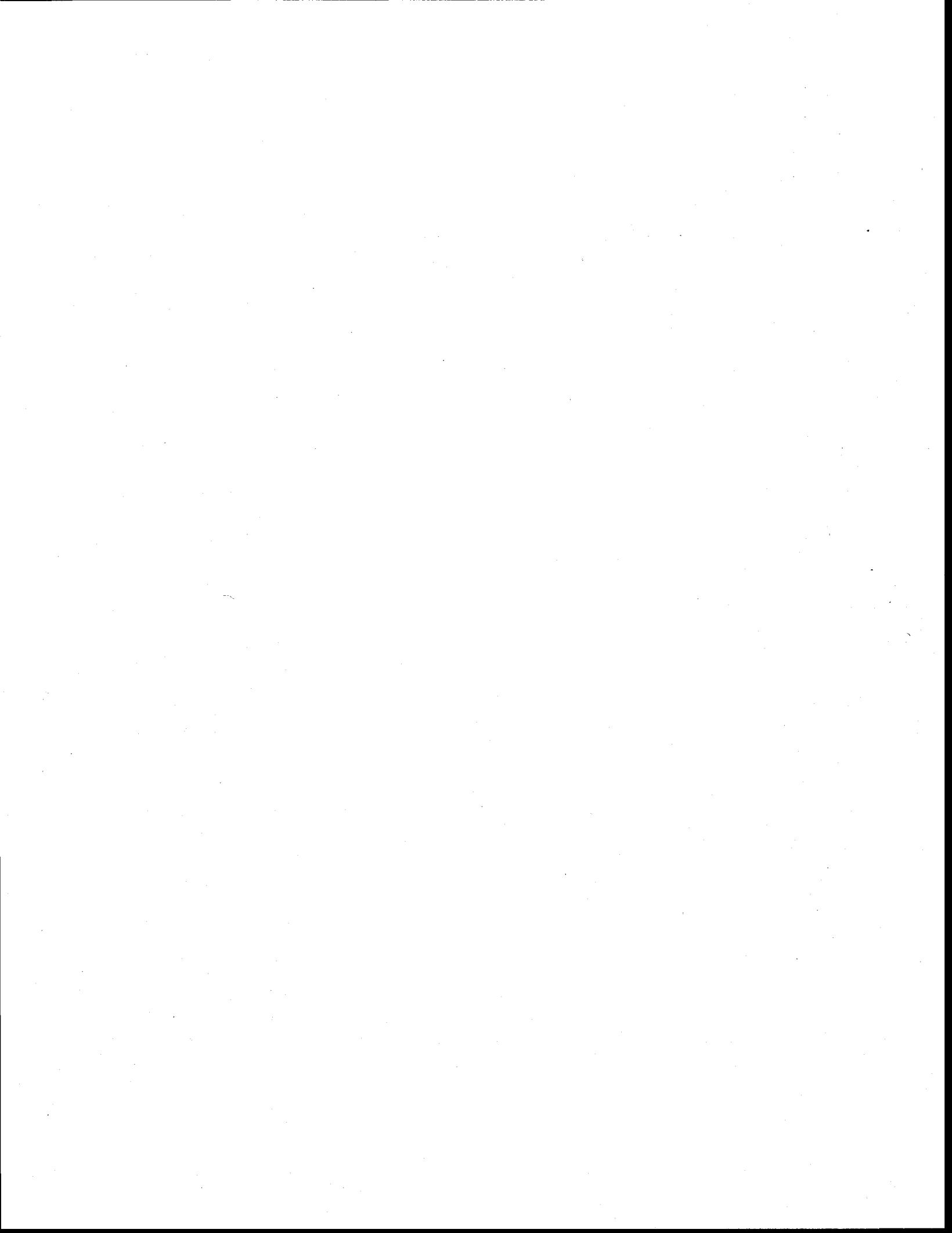
Finalement, à tous les membres de ma famille, je vous dédie ces écrits...

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures	XXI
Liste des tableaux.....	XXVII
PARTIE 1 : LA SYNTHÈSE.....	1
1. INTRODUCTION-Les métaux traces en milieu aquatique.....	1
1.1 Modèle de l'ion libre et le modèle du ligand biotique.....	2
1.1.1 Prémisses du modèle et théorie	4
1.1.2 Limites du modèle	7
1.2 Le cadmium un métal non essentiel.....	19
1.2.1 Spéciation du Cd et présence en eau douce.....	19
1.2.2 Prise en charge et toxicité du cadmium.....	20
1.2.3 Impact des métaux traces sur la prise en charge et la toxicité du cadmium.....	21
1.2.4 Effet du calcium et du magnésium sur la prise en charge et la toxicité du cadmium.....	24
1.2.5 Mécanismes de toxicité du cadmium	27
2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....	29
3. MÉTHODOLOGIE	31
3.1 Choix de l'espèce.....	31
3.2 Exposition des organismes.....	32
3.2.1 Culture des algues	32
3.2.2 Contrôle de la spéciation des métaux.....	33
3.3 Décomptes cellulaires et mesure de la toxicité du cadmium	34

3.4	Mesure de l'accumulation du cadmium et du zinc	35
3.5	Plan expérimental	37
3.5.1	Expériences d'exposition à long terme	37
3.5.2	Expériences d'exposition à court terme	39
3.6	Formalismes mathématiques et procédures de modélisation des données	40
3.7	Statistiques	43
4.	RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	45
4.1	Reproductibilité et sensibilité des mesures de toxicité du Cd en fonction du paramètre de toxicité choisi	45
4.2	Effets des métaux traces et du calcium sur l'accumulation et la toxicité du cadmium après 60 heures d'exposition	50
4.2.1	Acclimatation au milieu de base LM	50
4.2.2	Pré-acclimatation à différentes concentrations de métaux traces	53
4.3	Cinétique d'accumulation du Cd et du Zn à court terme	53
4.3.1	Effets des cations compétiteurs sur l'accumulation du Cd et du Zn	58
4.3.2	Effets d'une pré-acclimatation au Zn et au Cd	62
4.3.3	Capacité des cellules à minimiser la toxicité du Cd et à réguler l'accumulation du Zn	67
4.3.4	Effets d'une pré-acclimatation au Co, au Cd et aux autres métaux traces	68
4.3.5	Implications environnementales des effets d'une pré-acclimatation aux métaux traces	71
4.3.6	Effet non compétitif du Ca sur l'accumulation de Cd	72
4.4	Discussion au sujet de la nature des systèmes de transport de Cd et de Zn	74
4.5	Modélisation à l'état stationnaire du cadmium intracellulaire	75
4.6	Relation entre la toxicité du Cd ²⁺ et le Cd intracellulaire à l'état stationnaire	79
5.	CONCLUSION	83
6.	RÉFÉRENCES	85

Partie II : ARTICLES SCIENTIFIQUES	95
7. ARTICLE #1.....	95
8. ARTICLE #2.....	133
9. ARTICLE #3.....	175
10. ANNEXE A	221
11. ANNEXE B	231
11. ANNEXE C	239



Liste des figures

Figure 1 : Représentation conceptuelle des interactions métaux-organismes. M^{2+} = ion libre ; ML = métal complexé ; L^z = ligand (acide aminé, citrate, $S_2O_3^{2-}$, CO_3^{2-} , Cl^- , etc.) ; M-X = métal complexé à la surface. Figure modifiée de Campbell (1995).....6

Figure 2 : Exemple de relation entre le taux d'accumulation d'un métal et la concentration de Me^{2+} pour des expositions à court terme chez une algue hypothétique ayant été pré-acclimatée à une faible (courbe bleu) ou une forte (courbe verte) concentration de Me^{2+} . Les unités sont arbitraires et les courbes modélisées sont présentées sous une échelle linéaire sur les deux axes x et y. Au panneau A, les algues modulent le taux maximal de transport (V_{max}) en fonction du milieu d'acclimatation, mais ne modifient pas l'affinité du transporteur pour le métal (K_{Me}). Les V_{max} sont présentés par les lignes horizontales pointillées bleues et vertes chez respectivement les algues acclimatées aux faibles et aux fortes concentrations de métal. La $[Me^{2+}]$ où le système de transport est à demi saturé est représentée par des tirets noirs. Au panneau B, les algues modifient l'affinité (K_{Me}) du système de transport pour le métal sans modifier le V_{max} . La $[Me^{2+}]$ où le système est à demi saturé par le métal ($[Me^{2+}] = 1/K_{Me}$) est spécifiée par les tirets bleus et verts chez les algues acclimatées respectivement à une faible et une forte concentrations de Me^{2+} . Le V_{max} est représenté par la ligne pointillée noire..... 15

Figure 3 : Exemple de relation entre le taux d'accumulation d'un métal par deux systèmes de transport et la concentration de Me^{2+} pour des expositions à court terme chez une algue hypothétique. La courbe modélisée indique la présence de deux systèmes de transport de différentes affinités pour le Me^{2+} . Les tirets et les pointillés indiquent respectivement pour le transporteur de haute et de faible affinité, le point où ces transporteurs sont à demi saturés par le métal (où $[Me^{2+}] = 1/K_{Me}$). Les unités sont arbitraires et une échelle logarithmique est utilisée sur l'axe des x et des y afin de bien visualiser l'ensemble des deux systèmes de transport..... 17

Figure 4 : Rendement relatif mesuré en termes du nombre de cellules produites (ρ/ρ_0 , où ρ et ρ_0 sont les concentrations algales en nombre de cellules par mL après 60 h de croissance pour respectivement les cellules témoins en absence d'ajout de Cd et les cellules exposées à 7×10^{-9} M Cd^{2+}) en fonction de la composition du milieu d'exposition (expo) et d'acclimatation (accl). Les algues furent acclimatées au milieu LM (LM accl) ou aux milieux où la concentration d'un des six cations fut augmentée (+Me accl, où Me représente le Zn, Co, Fe, Mn, Cu ou Ca). Les algues furent ensuite exposées à 7×10^{-9} M Cd^{2+} dans le milieu LM (LM expo) ou dans des milieux où la concentration d'un des six oligo-éléments fut augmentée (+Me expo). Les astérisques montrent les rendements relatifs étant significativement inhibés par rapport aux témoins sans ajout de Cd ($\rho/\rho_0 < 1$). Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois mesures.46

Figure 5 : Rendement relatif mesuré en termes de volume cellulaire (v/v_0 , où v et v_0 sont les concentrations algales de volume cellulaire en $\mu\text{m}^3 \text{ mL}^{-1}$ après 60 h de croissance pour respectivement les cellules témoins en absence d'ajout de Cd et les cellules exposées à $7 \times 10^{-9} \text{ M Cd}^{2+}$) en fonction de la composition du milieu d'exposition (expo) et d'acclimatation (accl). Les algues furent acclimatées au milieu LM (LM accl) ou aux milieux où la concentration d'un des six cations fut augmentée (+Me accl, où Me représente le Zn, Co, Fe, Mn, Cu ou Ca). Les algues furent ensuite exposées à $7 \times 10^{-9} \text{ M Cd}^{2+}$ dans le milieu LM (LM expo) ou dans les milieux où la concentration d'un des six oligo-éléments fut augmentée (+Me expo). Les astérisques montrent les rendements relatifs étant significativement inhibés par rapport aux témoins sans ajout de Cd ($v/v_0 < 1$). Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois mesures. 47

Figure 6 : Cadmium intracellulaire ($\text{amol Cd } \mu\text{m}^{-3}$) mesuré après 60 h d'exposition à $7 \times 10^{-9} \text{ M Cd}^{2+}$ en fonction du milieu d'acclimatation (accl) et d'exposition (expo). Les algues furent acclimatées au milieu LM (LM accl) ou aux milieux où la concentration d'un des six cations fut augmentée (+Me accl, où Me représente le Zn, Co, Fe, Mn, Cu ou Ca). Les astérisques indiquent les différences significatives entre les concentrations de Cd intracellulaire mesurées pour les algues exposées au milieu témoin LM (LM expo) et au milieu où la concentration d'un des six oligo-éléments fut augmentée (+Me expo), pour un même milieu d'acclimatation. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois mesures. 48

Figure 7 : Cadmium intracellulaire ($\text{amol Cd cellule}^{-1}$) mesuré après 60 h d'exposition à $7 \times 10^{-9} \text{ M Cd}^{2+}$ en fonction du milieu d'acclimatation (accl) et d'exposition (expo). Les algues furent acclimatées au milieu LM (LM accl) ou aux milieux où la concentration d'un des six cations fut augmentée (+Me accl, où Me représente le Zn, Co, Fe, Mn, Cu ou Ca). Les astérisques indiquent les différences significatives entre les concentrations de Cd intracellulaire du milieu témoin LM (LM expo) et du milieu où la concentration d'un des six oligo-éléments fut augmentée (+Me expo), pour un même milieu d'acclimatation. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois mesures. 49

Figure 8 : Taux d'internalisation (V_{Cd}) du Cd ($\text{amol Cd } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$) à court terme (30 à 45 min d'exposition) en fonction de la concentration de Cd^{2+} (M). Les algues étaient pré-acclimatées au milieu LM avant l'expérience. La ligne pointillée représente le taux diffusif maximal calculé de l'ion libre Cd^{2+} . La courbe modélisée est une régression non linéaire utilisant l'éq. (11) et indique la présence de trois sites de transport différents (Cd-1, Cd-2, Cd-3). Les prédictions de V_{Cd} et la modélisation des paramètres cinétiques de chacun des systèmes de transport prenaient en considération la constante $K_{\text{Cd-1}}^{\text{Ca}} = 10^{4.02 \pm 0.14} \text{ M}^{-1}$ mais la constante $K_{\text{Cd-2}}^{\text{Cd}} = 10^{2.62 \pm 0.16} \text{ M}^{-1}$ n'affectait pas significativement les taux d'internalisation. La constante $K_{\text{Cd-3}}^{\text{Ca}}$ est inconnue. Les lignes verticales sous formes de tirets courts espacés par deux points (jaunes), de tirets courts (bleus) et de tirets longs (verts) montrent les

concentrations de Cd^{2+} où, respectivement, les systèmes de transport Cd-3, Cd-2 et Cd-1 sont à demi saturés ($[\text{Cd}^{2+}] = 1 / K_{\text{Cd}}$).....55

Figure 9 : Taux d'internalisation (V_{Zn}) du Zn ($\text{amol Zn } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$) à court terme (30 à 45 min d'exposition) en fonction de la concentration de Zn^{2+} (M). Les algues étaient pré-acclimatées au milieu LM avant l'expérience. La ligne pointillée représente le taux diffusif maximal calculé de l'ion libre Zn^{2+} . La courbe modélisée est une régression non linéaire utilisant l'éq. (11) et indique la présence de deux sites de transport différents (Zn-1 et Zn-2). Les paramètres cinétiques de la troisième région de la courbe pour les $[\text{Zn}^{2+}] < 10^{-8}$ M, obtenus avec l'éq. (11) n'étaient pas statistiquement significatifs et n'ont donc pu être modélisés. Les prédictions de V_{Zn} ainsi que les paramètres cinétiques des deux systèmes de transport prenaient en considération la constante $K_{\text{Zn-1}}^{\text{Ca}} = 10^{3.93 \pm 0.09} \text{ M}^{-1}$ mais pas la constante $K_{\text{Zn-2}}^{\text{Ca}} = 10^{2.60 \pm 0.05} \text{ M}^{-1}$ qui n'affectait pas significativement les taux d'internalisation. La constante $K_{\text{Zn-3}}^{\text{Ca}}$ est inconnue. Les lignes verticales sous formes de tirets courts (bleus) et de tirets longs (verts) démontrent les concentrations de Zn^{2+} où, respectivement, les systèmes de transport Zn-2 et Zn-1 sont à demi saturés ($[\text{Zn}^{2+}] = 1 / K_{\text{Zn}}$).....57

Figure 10 : Taux d'internalisation à court terme (30 min, sauf indication contraire) du Cd (V_{Cd}) via les systèmes de transport Cd-1 ($10^{-6} \text{ M Cd}^{2+}$) (A) ou Cd-2 ($2 \times 10^{-8} \text{ M Cd}^{2+}$) (B) en fonction de différentes concentrations de cations compétiteurs (expositions de 3 et 30 min Zn^{2+} présentées respectivement par les triangles verts et blancs; Ca^{2+} cercles bleus; Mg^{2+} triangles roses). Les courbes modélisées représentent les régressions utilisant l'éq. (11) et incluant la $K_{\text{Cd-1}}^{\text{Ca}}$ déterminée ici, et $K_{\text{Cd-2}}^{\text{Cd}} = 10^{7.6}$. Taux d'accumulation à court terme (30 min, sauf indication contraire) du Zn (V_{Zn}) via les systèmes de transport Zn-1 ($10^{-6} \text{ M Zn}^{2+}$) (C) ou Zn-2 ($2 \times 10^{-8} \text{ M Zn}^{2+}$) (D) en fonction de différentes concentrations de cations compétiteurs (les expositions de 3 et 30 min au Cd^{2+} présentées respectivement par les diamants blancs et rouges; expositions de 3 et 30 min au Ca^{2+} présentées respectivement par les triangles gris et les cercles bleus). Les courbes modélisées représentent les régressions utilisant l'éq. (11) et incluant la $K_{\text{Zn-1}}^{\text{Ca}}$ déterminée ici et $K_{\text{Zn-2}}^{\text{Zn}} = 10^{7.4}$. Le médaillon à la figure D montre les taux d'accumulation du Zn via le système Zn-3 en présence de différentes concentrations de Cd^{2+} et de $1,5 \times 10^{-11} \text{ M Zn}^{2+}$. La courbe modélisée fut aussi obtenue avec l'éq. (12).61

Figure 11 : Taux d'internalisation (V_{Cd}) du Cd (A) ou (V_{Zn}) du Zn (B) ($\text{amol Cd ou Zn } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$) à court terme (30 à 45 min d'exposition) en fonction de la concentration de Cd^{2+} (M). Les algues étaient pré-acclimatées à quatre milieux de culture différents : LM (cercles verts), +Cd (carrés rouges), +Zn (triangles bleus vers le haut), +Zn+Cd (triangles jaunes vers le bas) avant l'expérience d'exposition. Les lignes pointillées représentent les taux diffusifs maximaux calculés de l'ion libre Cd^{2+} (A) ou Zn^{2+} (B). Les courbes modélisées (optimisées par la méthode des moindres carrés avec éq. 11) sous forme de traits verts continus, de tiret-pointillés rouges, de longs tirets bleus et de courts tirets jaunes correspondent respectivement aux algues pré-acclimatées aux milieux LM, +Cd, +Zn et +Zn+Cd. Les régressions non

linéaires imposent un $K_{Cd-1}^{Ca} = 10^{4.02 \pm 0.14} M^{-1}$ et un $K_{Zn-1}^{Ca} = 10^{3.93 \pm 0.09}$; l'inclusion des K_{Cd-2}^{Ca} et K_{Zn-2}^{Ca} n'influençaient pas significativement l'accumulation respective de Cd et de Zn. Les coefficients de détermination (R^2) étaient plus grand que 0,95 sauf pour les taux d'internalisation de Zn chez les algues acclimatées au milieu +Cd où $R^2 = 0.80$. Les paramètres cinétiques (V_{max-i}^{Me} et K_{Me-i}^{Me}) des trois systèmes de transport de Cd (Cd-1, Cd-2 et Cd-3) ainsi que des deux systèmes de transport de Zn (Zn-1 et Zn-2) sont présentés au tableau 1 de l'article 2..... 64

Figure 12 : Taux d'internalisation du Cd (V_{Cd}) à court terme (30 min) en fonction de différentes $[Cd^{2+}]$ chez des algues pré-acclimatées à différents milieux de culture (LM, +Co, +Co+Cd, HM). L'exposition au Cd était réalisée en présence des mêmes concentrations de métaux traces que dans le milieu d'acclimatation. Les algues pré-acclimatées au milieu LM et exposées au milieu HM avec différentes $[Cd^{2+}]$ furent désignées : « HM exposé; LM acclimaté ». Les courbes sous formes de traits verts continus, de tiret-points rouges, de longs tirets bleus et de courts tirets-court tirets jaunes représentent les régressions obtenues avec l'éq. (11) ($R^2 > 0.90$) chez respectivement les traitements « LM », « +Co+Cd », « HM » et « HM exposé; LM acclimaté »..... 70

Figure 13 : Taux d'accumulation du Cd (V_{Cd}) à court terme (30 min) en fonction de différentes $[Cd^{2+}]$ et en présence d'une $[Ca^{2+}]$ faible (cercles pleins; $2 \times 10^{-5} M Ca^{2+}$) et élevée (cercles vides; $10^{-3} M Ca^{2+}$) sans ajouts de ligands et de métaux traces (LM-R). Les algues étaient acclimatées au milieu de culture LM. Les courbes continues et sous formes de longs tirets représentent les régressions optimisées par la méthode des moindres carrés avec l'éq. (11) à respectivement $2 \times 10^{-5} M$ et $10^{-3} M Ca^{2+}$. Les prédictions du taux d'internalisation du Cd ($R^2 > 0,96$) furent réalisées en incorporant les $K_{Cd-1}^{Ca} = 10^{4.02 \pm 0.14} M^{-1}$ et $K_{Cd-2}^{Ca} = 10^{2.62 \pm 0.16} M^{-1}$ 73

Figure 14 : Concentrations de Cd intracellulaire ($[Cd_{cell}]$) mesurées chez *C. reinhardtii* pour des expositions de 60 h à une gamme de $[Cd^{2+}]$ dans des milieux composés de différentes concentrations en métaux traces essentiels (LM, cercles pleins; +Zn, cercles vides; HM, triangles vides). Les lignes sous formes de pointillés, de tirets courts et de traits continus représentent les concentrations intracellulaires de Cd modélisées à l'état stationnaire pour respectivement les milieux LM, +Zn et HM. Les courbes modélisées incorporent les caractéristiques cinétiques des trois systèmes de transport de Cd (Cd-1, Cd-2 et Cd-3) existant chez *C. reinhardtii*, mais ignorent le mécanisme de rétroaction positive du Cd sur l'accumulation de Cd. 76

Figure 15 : Concentrations de cadmium intracellulaire ($[Cd_{cell}]$) modélisées et mesurées à l'état stationnaire en présence de $7 \times 10^{-9} M Cd^{2+}$ pour cinq milieux de culture différents (LM, +Zn, +Co et HM) caractérisés par des concentrations de métaux traces essentiels différentes. Les prédictions du modèle prennent en considération les caractéristiques cinétiques des trois systèmes de transport de Cd (Cd-1, Cd-2 et Cd-3) ainsi que le mécanisme de rétroaction

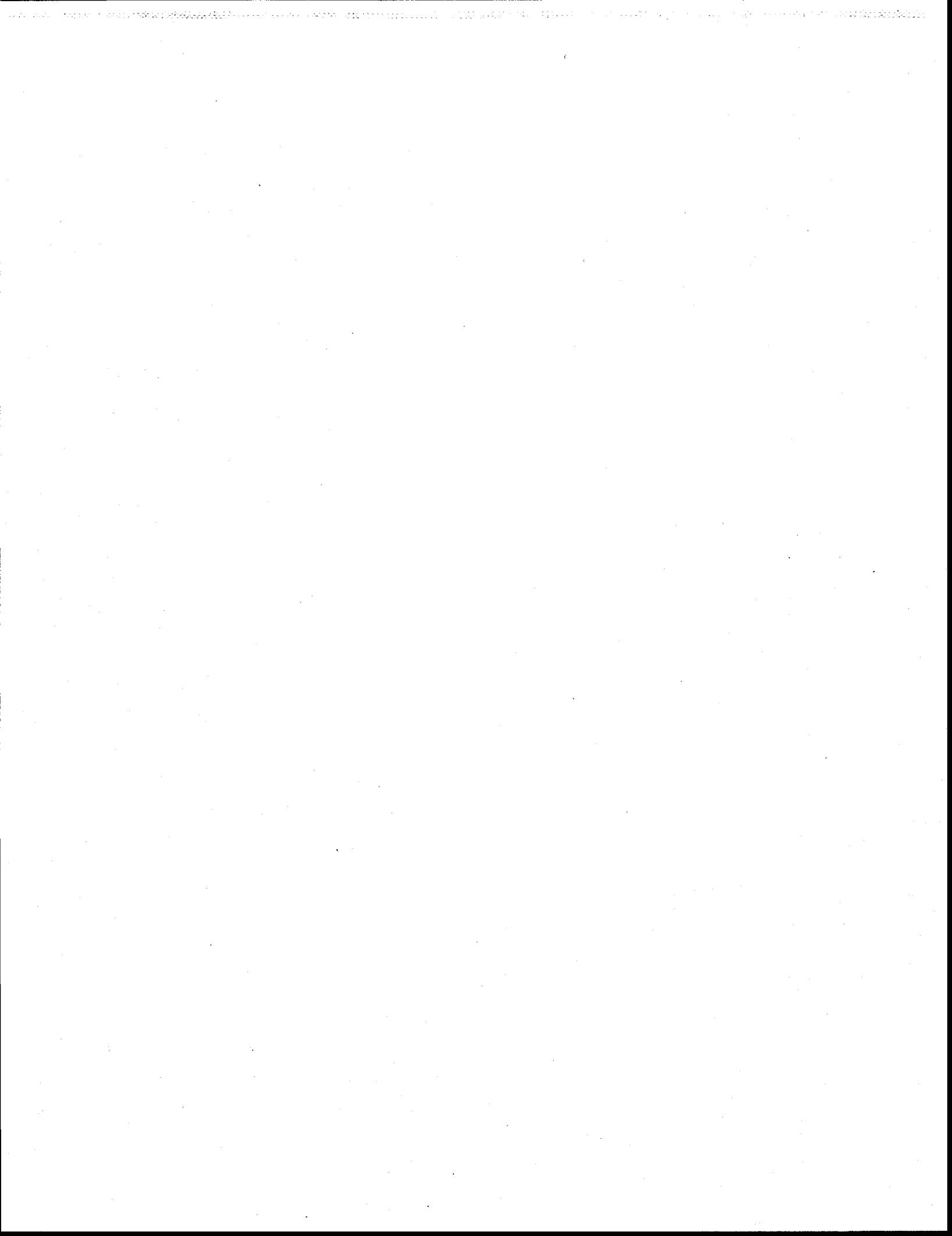
positive du Cd sur l'accumulation du Cd. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type des valeurs modélisées.....78

Figure 16 : Rendement relatif au témoin en terme de volume cellulaire total (v/v_0 , où v et v_0 sont les volumes cellulaires totaux respectivement des cultures témoins (sans ajout de Cd) et exposées au Cd après 60 h de croissance) en fonction des concentrations intracellulaires de Cd [Cd_{cell}] mesurées après 60 h de croissance chez *C. reinhardtii*. Les algues étaient exposées à trois milieux de culture différents caractérisés par différentes concentrations de métaux traces essentiels, les milieux LM (cercles pleins), +Zn (cercles vides) et HM (triangles vides). Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois mesures.....81



Liste des tableaux

Tableau 1 : Concentrations libres de métaux traces et de calcium utilisées pour les différents milieux de culture et d'exposition.....	38
---	-----------



PARTIE 1 : LA SYNTHÈSE

1. INTRODUCTION-Les métaux traces en milieu aquatique

Les métaux traces sont naturellement présents dans la croûte terrestre et dans les milieux aquatiques. Leurs abondances relatives particulières résultent originellement du Big Bang et d'événements astronomiques subséquents. Au tout début de la vie sur Terre, soit vers l'apparition des premières cellules procaryotes primitives, il y a plus de $3,5 \times 10^9$ années, les métaux traces les plus abondants et disponibles sous forme solubles (Mn, Fe, Co, Ni, Mo, W, B et, de façon plus restrictive : Cu, Zn) auraient été sélectionnés par les premières cellules vivantes comme oligo-éléments constitutifs essentiels du métabolisme (Williams 2002). D'autres métaux non essentiels possédant souvent un poids atomique plus élevé (ex. : le Cd, le Pb, le Hg, l'Ag, le Pd et le Po) n'ont pas été sélectionnés comme métaux de choix pour subvenir aux besoins métaboliques des cellules vivantes. L'évolution a fait en sorte de sélectionner peu à peu les organismes ayant développé des mécanismes homéostatiques efficaces permettant de réguler les concentrations intracellulaires des métaux essentiels à l'intérieur d'une gamme optimale et d'exclure ou de détoxiquer les métaux non essentiels. Les « véritables usines chimiques » (de là, on désigne les organismes aquatiques de notre époque!) créées par le « moteur » de l'évolution interagissent de façon complexe avec les métaux présents dans le milieu faisant en sorte que la prise en charge et la toxicité des métaux sont relativement complexes à modéliser. Toutefois, des modèles perfectionnés permettant de prédire la prise en charge et la toxicité des métaux en milieu aquatique ont été développés avec succès par les écotoxicologistes dans certaines conditions contrôlées au laboratoire. Ces modèles évoluent au fil des années afin d'étendre la portée de leurs prédictions à des conditions plus complexes et donc plus représentatives de l'environnement. Ce chapitre présente les principaux modèles de prédiction de l'accumulation des métaux par la voie dissoute ainsi que les mécanismes connus de prise en charge des métaux essentiels (Cu, Co, Mn, Fe, Zn) et d'un métal non essentiel (sauf dans certaines circonstances en milieu marin), le Cd, chez le phytoplancton.

1.1 Modèle de l'ion libre et le modèle du ligand biotique

L'avènement de logiciels informatiques au début des années 1970 a changé radicalement la façon de voir et de comprendre l'impact des métaux toxiques chez les organismes aquatiques. Au lieu de se concentrer sur l'impact des métaux chez les organismes cibles, l'attention s'est tournée vers les différentes espèces chimiques des métaux en solution. Les concentrations de ces espèces pouvaient désormais être rapidement calculées à l'aide d'algorithmes de calculs intégrés aux logiciels informatiques. De plus, les concentrations des espèces présentes en très faibles concentrations (et donc difficilement analysables) pouvaient maintenant être estimées (Templeton et al. 2000). L'étude des interactions entre les différentes espèces métalliques et les cellules phytoplanctoniques a commencé il y a plus de 30 ans avec les travaux pionniers de Sunda et Guillard (1976) mettant en relation l'activité de l'ion cuprique et sa toxicité chez une espèce d'algue marine. Le modèle de l'ion libre (MIL) fut ensuite développé sous la base de nombreuses expérimentations effectuées vers la deuxième moitié des années 1970 (Morel 1983). Ce modèle stipule que l'accumulation et la toxicité des métaux sont proportionnelles à l'activité de l'ion libre M^{z+} (aquo-ion ou $M(H_2O)_n^{z+}$) en solution. Une revue de littérature de Campbell (1995) portant sur l'ensemble des recherches effectués sur le MIL démontre que la réponse biologique de différents organismes aquatiques (algues, invertébrés, poissons) varie en fonction de l'ion libre (pour 52 des 59 cas étudiés) lors d'expositions réalisées en laboratoire à court terme à différents métaux (Zn, Cu, Cd, Mn, Pb, Fe, Ni), et ce, à pH et dureté constants, ainsi qu'en présence de complexes métalliques inorganiques hydrophiles.

Puisque les conditions chimiques des eaux douces sont beaucoup plus variables que celles de l'eau de mer et que ces conditions chimiques peuvent avoir un impact important sur cette relation simple entre le M^{z+} et les organismes aquatiques, le raffinement du MIL s'imposait en eau douce. Ainsi, l'intégration des effets protecteurs de certains cations (H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) au MIL a mené à la réalisation du modèle du ligand biotique (MLB) (Di Toro et al. 2001, Campbell et al. 2002, Paquin et al. 2002). Ce modèle porte davantage attention aux sites de la membrane cellulaire physiologiquement actifs que le MIL. Il est important de noter que le MLB n'est qu'un modèle dérivé du MIL et que la prise en charge et la toxicité reste toujours

directement proportionnelle à la concentration de l'ion libre pour une dureté et un pH constants.

Malgré l'ensemble des recherches effectuées sur le MLB au cours des années 2000, ce modèle se doit encore d'être raffiné afin de mieux prédire l'accumulation et la toxicité des métaux pour : 1) des expositions chroniques; 2) pour un pH et une dureté variables.

1) Grâce aux récents progrès en génomique (Armbrust et al. 2004, Merchant et al. 2007), on sait aujourd'hui qu'il existe plusieurs types de transporteurs de métaux faisant office de ligands biotiques à la surface des organismes. Les organismes vivants exposés aux métaux sur une longue période de temps ont le potentiel de s'acclimater ou même de s'adapter au cours des générations et donc de modifier l'importance relative des différents transporteurs membranaires. Par ces processus physiologiques, la capacité de transport des métaux par les ligands biotiques peut varier dans le temps à cause de la synthèse ou la dégradation de différents types de système de transport membranaires étant plus ou moins efficaces à prendre en charge les métaux (Sunda et Huntsman 1992, Hogstrand et Wood 1995, Sunda et Huntsman 1998c, Stoiber et al. 2012).

2) À ce jour, les bases fondamentales régissant les interactions entre les cations majeurs (Ca^{2+} et Mg^{2+}), le pH, les métaux et les membranes cellulaires demeurent peu comprises. De ce fait, des relations empiriques sont souvent développées afin de prédire adéquatement la toxicité aiguë ou chronique des métaux chez les organismes aquatiques à l'intérieur de plans d'eau à la dureté et au pH variable (Heijerick et al. 2002a, Heijerick et al. 2002b, De Schamphelaere et Janssen 2004, De Schamphelaere et al. 2005, De Schamphelaere et Janssen 2006, Deleebeeck et al. 2009a, Deleebeeck et al. 2009b). Ces modèles mathématiques sont développés à partir des données obtenues dans des conditions expérimentales précises. Ainsi, les équations de ces modèles ne se basent pas sur une compréhension complète des processus régissant l'accumulation et la toxicité des métaux. La portée universelle des prédictions de la toxicité des métaux réalisées par ces MLB empiriques demeure donc questionable.

Les succès (malgré certaines limites) du MLB ont conduit à la mise au point d'un logiciel informatique (Hydroqual; www.epa.gov/waterscience/criteria/copper/2007/index.htm) permettant de déterminer des critères de qualité de l'eau spécifiques à partir de la composition chimique des plans d'eau étudiés. Le MLB est même utilisé aujourd'hui pour dériver les critères de qualité de l'eau pour le cuivre aux États-Unis (US EPA) et pour l'analyse de risque écotoxicologique du cuivre, du zinc et du nickel au sein de l'Union européenne. Même si le MLB est un outil toujours en développement, l'utilisation de ce modèle permet de prédire beaucoup plus adéquatement la toxicité des métaux en milieu aquatique comparativement aux anciennes prédictions. Ces prédictions n'étaient basées que sur la concentration totale de métaux en solution ou la concentration de métaux récupérés suite à une acidification de l'échantillon. Ces travaux scientifiques ont permis d'apporter des outils informatiques puissants pour l'établissement des critères de qualité de l'eau beaucoup plus robustes et précis que ceux disponibles avant l'ère du MLB

1.1.1 Prémisses du modèle et théorie

Pour exercer une réponse toxique ou être accumulé chez les organismes aquatiques, les métaux doivent interagir avec la surface biologique et, normalement, être transportés à l'intérieur des cellules vivantes. L'interaction d'un métal avec un organisme aquatique peut généralement être décrite par les processus suivants qui sont présentés schématiquement à la figure 1 (Campbell 1995, Campbell et al. 2002, Slaveykova et Wilkinson 2005) :

- 1) Le métal diffuse relativement rapidement de la solution vers la surface biologique;
- 2) Le métal s'adsorbe relativement rapidement à des sites passifs dans la couche de protection de la cellule (comme la paroi cellulaire) ou à des sites de la surface extérieure de la membrane plasmique. La membrane plasmique peut contenir des sites physiologiquement inertes (la liaison du métal à ces sites ne perturbe pas les fonctions cellulaires et le métal ne s'accumule pas dans les cellules) ou encore des sites physiologiquement actifs (liaison du métal à une

enzyme membranaire, un transporteur protéique ou un canal ionique pouvant effectuer l'internalisation du métal et participer au métabolisme cellulaire);

3) Le métal est internalisé par la cellule par des systèmes de transport spécialisés de cations (transport passif facilité) à travers la membrane plasmique. Normalement, l'internalisation s'avère être l'étape limitante du processus de prise en charge des métaux, ce qui mène à un état d'équilibre entre l'ion métallique libre en solution et la surface biologique.

Le processus de liaison des métaux à la surface biologique est décrit à l'aide des huit équations chimiques ci-dessous. En présence d'un métal M^{z+} , d'un ligand L (les charges sont omises par souci de simplicité), un équilibre se produit dans le milieu étant caractérisé par une constante d'équilibre K_1 (équations 1 et 2) :



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

L'interaction entre M^{z+} et les sites cellulaires physiologiquement actifs \bar{X} -cellule peut être décrite par une réaction de complexation de surface où la constante conditionnelle d'équilibre est notée K_2 ; $\{ \}$ et $[]$ indiquent respectivement les concentrations à la surface biologique et dans le milieu (équations 3 et 4).



$$\{ M\text{-X-cellule} \} = K_2 \{ \bar{X}\text{-cellule} \} \cdot [M^{z+}] \quad \text{éq. (4)}$$

En faisant l'hypothèse que 1) la concentration des sites cellulaires physiologiquement actifs (\bar{X} -cellule) demeure constante (simplification raisonnable lorsque la concentration de métal dans le milieu est faible), 2) les sites \bar{X} -cellule sont loin d'être saturés de métaux (\bar{X} -cellule \gg M-X-cellule) et 3) le temps d'exposition est court, **la concentration du métal d'intérêt lié aux sites physiologiquement actifs, internalisé et/ou qui entraînera une réponse biologique varie linéairement en fonction de la concentration de M^{z+}** (équation 4).

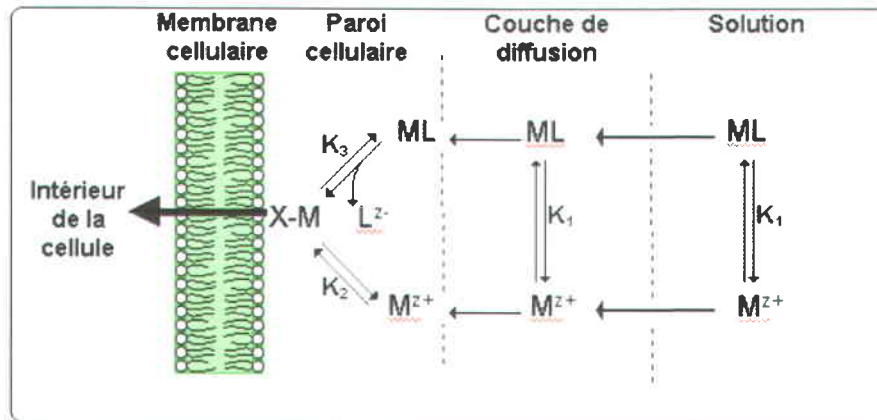


Figure 1 : Représentation conceptuelle des interactions métaux-organismes. M^{z+} = ion libre ; ML = métal complexé ; L^{z-} = ligand (acide aminé, citrate, $S_2O_3^{2-}$, CO_3^{2-} , Cl^- , etc.) ; M-X = métal complexé à la surface. Figure modifiée de Campbell (1995).

Une situation similaire à celle décrite ci-dessus prévaut lorsqu'un complexe métallique (ML) est l'espèce réagissant **par échange de ligands** (cas analogue à la prise en charge de complexes inorganiques labiles; voir section 1.1.2, point 3) à la surface cellulaire (équation 5).



$$\frac{[ML]}{[L]} = K_1 \cdot [M^{z+}] \quad \text{éq. (6)}$$

$$\{ \text{M-X-cellule} \} = K_3 \frac{\{ \text{X-cellule} \} \cdot [\text{ML}]}{[\text{L}]} \quad \text{éq. (7)}$$

$$\{ \text{M-X-cellule} \} = K_3 \cdot K_1 \cdot \{ \text{X-cellule} \} \cdot [\text{M}^{z+}] \quad \text{éq. (8)}$$

En réarrangeant l'équation 2, on obtient l'équation 6 que l'on peut substituer dans l'équation 7 afin d'obtenir l'équation 8. Cette dernière équation stipule que la concentration du complexe M-X-cellule varie en fonction de la concentration de l'ion métallique libre en solution lorsque le complexe ML réagit par **échange de ligands** à la surface cellulaire (Campbell et al. 2002). La liaison des métaux aux sites physiologiquement actifs demeurent dépendantes de l'espèce métallique libre de façon identique à la relation établie à l'équation 4, ou nous considérerions que l'ion libre (M^{z+}) et non le complexe ML. Ainsi, la prise en charge et la toxicité des métaux par les organismes aquatiques sont grandement influencées par la concentration de l'ion métallique libre en conditions d'équilibre. Comme tout modèle, le MLB a des limites. Quelques cas d'exceptions au modèle sont décrits dans la section suivante.

1.1.2 Limites du modèle

Quelques cas où le MLB ne pouvait prédire adéquatement la prise en charge et la toxicité des métaux chez les organismes aquatiques ont été retracés dans la littérature (Campbell 1995, Campbell et al. 2002, Slaveykova et Wilkinson 2005). Voici sept exemples de dérogations au MLB établissant les limites de ce modèle :

1) Pour que le MLB s'applique, les métaux se doivent d'être transportés par des systèmes de transport membranaires de cations de sorte que seul le métal libre se lie aux sites physiologiquement actifs (X-cellule). Or, il est désormais connu que certains complexes métalliques peuvent emprunter une voie alternative pour pénétrer dans la cellule.

Premièrement, les complexes métalliques neutres lipophiles peuvent pénétrer à travers la bicouche lipidique des membranes algales par diffusion passive. Citons par exemple les complexes inorganiques HgCl_2^0 et CH_3HgCl^0 (Mason et al. 1996) de même que certains complexes organométalliques formés avec le diéthylthiocarbamate (DDC), l'éthylxanthate (XANT) et la 8-hydroxyquinoline (oxine ou Ox) tels que $\text{Pb}(\text{DDC})_2^0$, $\text{Cu}(\text{Ox})_2^0$ et $\text{Cd}(\text{XANT})_2^0$ (Stauber et Florence 1987, Florence et al. 1992, Phinney et Bruland 1994, Boullemant et al. 2009). Deuxièmement, certains complexes hydrophiles chargés négativement (formés avec un métabolite de faible poids moléculaire, le citrate, ou un ligand inorganique, le thiosulfate) peuvent être accumulés par inadvertance via des transporteurs membranaires spécifiques à ces métabolites ou ces ligands inorganiques. Par exemple, les complexes organiques formés avec le citrate, $\text{Cd}(\text{citrate})^{-1}$, $\text{Zn}(\text{citrate})^{-1}$ (Errécalde et al. 1998, Errécalde et Campbell 2000) ainsi que les complexes inorganiques composés du thiosulfate tels AgS_2O_3^- (Hiriart-Baer et al. 2006) et CdS_2O_3^0 (avec une charge négative résiduelle) (Boily 2004), en sont de bons exemples.

2) Le MLB stipule que la réponse biologique d'un organisme à un métal dépend de la concentration des complexes de surface (M-X-cellule) formés entre le métal et les sites physiologiquement actifs. Ainsi, la formation de complexes de surface ternaire (L-M-X-cellule) pouvant pénétrer dans les cellules ou exercer un effet toxique en demeurant à la surface biologique entraîne une déviation au MLB. Dans ces cas, la réponse biologique devient proportionnelle à la concentration de complexe (ML) plutôt qu'à l'ion libre. Par exemple, l'espèce AlF^{2+} exercerait son effet toxique chez les saumons atlantiques juvéniles en formant un complexe ternaire à la surface des branchies (F-Al-branchie) (Wilkinson et al. 1990, Wilkinson et al. 1993). La toxicité du Cd chez l'algue verte *P. subcapitata* serait aussi augmentée en présence d'un acide aminé, l'alanine, en raison de la formation d'un complexe ternaire (Alanine-Cd-X-Cellule) (Campbell et al. 2002).

3) Le transport des métaux à l'intérieur des cellules est contrôlé thermodynamiquement d'après le MLB. Le MLB a en effet comme prémisses que l'internalisation des métaux via les

systèmes de transport membranaires constitue l'étape lente du processus de prise en charge des métaux. Le transport du métal de la solution vers la membrane et la réaction de complexation/dissociation de surface subséquente se font relativement rapidement comparativement à l'internalisation des métaux dans les cellules. Cela fait en sorte qu'un équilibre peut s'établir entre les espèces métalliques en solution et l'ion libre lié à la surface des cellules. Il s'en suit que si la diffusion des métaux vers la membrane ou si la dissociation des métaux du ligand biotique devient l'étape lente du processus, l'accumulation des métaux est contrôlée cinétiquement (et proportionnelle à la concentration de métal labile), ce qui est en désaccord avec le MLB.

Les systèmes de transport membranaire peuvent être limités cinétiquement lorsque : 3a) la vitesse d'internalisation est plus rapide que la vitesse de dissociation des métaux complexés aux sites physiologiquement actifs (Hudson et Morel, 1990, Morel et al., 1991); 3b) le transport physique ou la diffusion des métaux vers la membrane cellulaire à travers la couche limite non mélangée entourant l'organisme limite la liaison des métaux aux sites physiologiquement actifs (Whitfield et Turner, 1979, Campbell et al. 2002, Slaveykova et Wilkinson 2005).

3a À notre connaissance, une seule étude a démontré hors de tout doute que la prise en charge d'un métal était beaucoup plus rapide que la vitesse de dissociation du métal aux sites physiologiquement actifs. En réalisant des expériences de prise en charge transitoire ainsi que des expériences de type « pulse-chase » avec le fer chez l'algue marine *Thalassiosira weissflogii*, Hudson et Morel (1990) ont montré que le taux de formation du complexe de surface était similaire au taux d'internalisation du fer et beaucoup plus grand que le taux de dissociation de ce complexe de surface, démontrant sans équivoque un contrôle cinétique de la prise en charge. Il faut noter que ce phénomène est causé essentiellement par la lente cinétique de complexation et dissociation du fer. Ainsi, il serait possible que l'on retrouve le même phénomène chez

d'autres métaux ayant une cinétique lente comme le nickel (métal essentiel facultatif) et l'aluminium (métal non essentiel) par exemple.

3b Si le transport des espèces métalliques vers la surface des cellules devient l'étape limitante de la prise en charge, le flux d'internalisation maximale atteignable par les organismes ne pourra dépasser le flux diffusif maximal. Cela est causé par un trop grand flux de prise en charge par les cellules par rapport à la quantité de métal disponible dans son environnement immédiat. Une prise en charge limitée par la diffusion est plus susceptible d'être observée en présence de faibles concentrations de métaux, lorsque les transporteurs de très haute affinité ne sont pas saturés. La diffusion des espèces chimiques vers les organismes aquatiques peut dépendre de plusieurs facteurs, tels la taille et la charge de l'ion métallique, la taille et la forme de l'organisme et la position de l'organisme par rapport à d'autres (plancton, colonies, biofilms). Pour des cellules sphériques, le transport physique ou le taux de diffusion maximale des espèces métalliques en solution pour une concentration donnée peut être calculé par des équations mathématiques (Whitfield et Turner 1979, Fortin et Campbell 2000) à partir du rayon des cellules et du coefficient de diffusion du métal.

Une limite imposée par la diffusion a été suggérée ou démontrée pour plusieurs éléments traces chez plusieurs algues marines et d'eau douce. Chez le phytoplancton marin, un nombre considérable d'exemples de flux d'internalisation rapides des métaux près du flux diffusif maximal est disponible dans la littérature. En effet, les flux de prise en charge du Zn (Sunda et Huntsman 1992), du Fe (Hudson et Morel 1990, Sunda et Huntsman 1995b), du Cu (Sunda et Huntsman 1995a), du Mn (seulement pour une espèce) et même du Cd (via les transporteurs du Mn) (Sunda et Huntsman 1996) chez quelques algues marines peuvent représenter une fraction non négligeable du flux maximal calculé dicté par la diffusion des espèces labiles. Ces résultats suggèrent que les flux d'internalisation de ces métaux chez ces espèces

phytoplanctoniques marines pourraient être limités par la diffusion des espèces métalliques labiles.

Pour ce qui est des espèces phytoplanctoniques d'eau douce, deux exemples seulement où l'accumulation de métal essentiel serait contrôlée par la diffusion (l'un pour un élément essentiel et l'autre pour un élément non essentiel) furent répertoriés dans la littérature. Premièrement, l'algue verte, *Chlorella keslerii*, lorsque acclimatée à une concentration très faible de Zn^{2+} de 10^{-11} M, pourrait prendre en charge le zinc (concentrations variant de 10^{-12} et $10^{-10,7}$ M) à une vitesse presque 10 fois supérieure au flux maximal calculé prédit par la diffusion du Zn^{2+} au travers de la phycosphère, suggérant fortement que les complexes labiles ($ZnOH^+$, $ZnHCO_3^+$) peuvent contribuer à la prise en charge du Zn dans ces conditions (Hassler et Wilkinson 2003). Deuxièmement, la prise en charge de l'argent augmente en présence de chlorure chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Fortin et Campbell 2000) pour des concentrations d'argent relativement faibles, mais n'augmente pas chez deux autres espèces d'algues vertes, soit *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlorella pyrenoidosa* (Lee et al. 2004). Ces résultats seraient dus à la prise en charge particulièrement rapide de l'argent chez *C. reinhardtii*. Cette accumulation très rapide de l'argent ferait en sorte que le transport physique de Ag^+ de la solution vers la membrane cellulaire devienne l'étape limitante, et ce, chez une espèce en particulier.

Il faut garder en tête que cette apparente déviation au MLB (transport des métaux contrôlés par la cinétique) risque bien de n'avoir que **peu d'impact** dans la prédiction de la **toxicité** des métaux en nature. Les concentrations de métaux ambiantes pouvant mener à des effets toxiques sont habituellement relativement élevées (mis à part le cas de l'Ag, ce dernier étant un métal non essentiel et potentiellement très toxique) et ces conditions sont peu susceptibles de mener à une diffusion limitante. Ces dérogations potentielles au MLB semblent donc a priori plus intéressantes d'un point de vue écophysiologique (nutrition/carence) qu'écotoxicologique (effets toxiques).

4) Le MLB permet de prédire la prise en charge et la toxicité des métaux via la phase dissoute, mais ignore les métaux provenant de la diète. Ainsi, il est reconnu que la diète des consommateurs constitue, pour certains éléments, une voie d'assimilation très importante comparativement à l'accumulation par la phase dissoute (Luoma et Rainbow 2005, 2008, Rainbow et Luoma, 2011). Cette voie d'accumulation des métaux doit être considérée en parallèle à la voie aqueuse afin de prédire adéquatement l'accumulation et la toxicité des métaux chez les organismes consommateurs en milieu naturel, mais n'est évidemment d'aucune utilité pour des organismes autotrophes comme le phytoplancton.

5) Le MLB présume aussi que le ligand biotique (ou les sites physiologiquement actifs) ne subit pas de modification durant la période d'exposition aux métaux. Cependant, les organismes aquatiques possèdent des mécanismes homéostatiques précis permettant de réguler l'accumulation de certains métaux en fonction du temps. En effet, les transporteurs membranaires des métaux sont continuellement recyclés, dégradés et synthétisés à des rythmes qui peuvent être modifiés par les cellules (Slaveykova et Wilkinson 2005). Ces transporteurs auraient été très conservés au fil de l'évolution, ce qui pourrait expliquer que la biodisponibilité des métaux est souvent similaire chez un poisson, une daphnie et une algue (Paquin et al. 2002). Par exemple, il est bien connu que les poissons (Hogstrand et Wood 1995, Hollis et al. 1999) et les algues (Harrison et Morel 1986) peuvent réguler la prise en charge de métaux en modifiant les caractéristiques des sites de liaison (nombre et/ou affinité) sur les branchies ou les membranes cellulaires lors d'exposition à moyen ou long terme.

La régulation par « rétroaction négative » est un des mécanismes cellulaires bien connus dans la littérature qui permet l'acclimatation des cellules phytoplanctoniques à différentes concentrations de métaux essentiels afin de maximiser la croissance cellulaire. L'élément nutritionnel présent en concentration suffisante dans l'environnement et, par conséquent à l'intérieur des cellules algales, inhiberait (d'où le nom « rétroaction négative ») la synthèse de transporteurs membranaires et/ou stimulerait leur dégradation et/ou inhiberait l'activité du

transporteur par un complexe intracellulaire ou un métabolite interagissant avec les transporteurs membranaires. À mesure que la concentration de métaux essentiels diminue dans le milieu ainsi que dans les cellules, il s'en suit que la synthèse de nouveaux transporteurs est de moins en moins inhibée et est donc stimulée par les cellules (Sunda et Huntsman 1986, 1998c).

Plusieurs études chez les algues démontrent qu'une pré-exposition (généralement quelques heures suffisent) à des concentrations de métaux essentiels (Mn, Zn, Fe, Cu) permettant une croissance optimale ou induisant une carence peut mener à une modulation des flux de prise en charge de ces métaux à court terme pouvant dépasser un facteur 100 (Harrison et Morel 1986, Sunda et Huntsman 1992, 1995b, c, Hill et al. 1996, Sunda et Huntsman 1998c, Hassler et Wilkinson 2003). Ces études comparent généralement la prise en charge à court terme de nutriments chez des organismes ayant été cultivés à des concentrations faibles (diminuant la croissance) ou optimales de nutriments. Les vitesses maximales d'internalisation (V_{max}) sont typiquement plus élevées pour les organismes ayant été acclimatés à une plus faible concentration de métaux traces essentiels que celle utilisée en condition de culture optimales (voir exemple au panneau A de la figure 2). Pour la forte majorité des métaux traces testés, les constantes d'affinité pour les transporteurs des nutriments demeurent généralement constantes indépendamment des conditions de croissance préalables à l'expérience de prise en charge. Toutefois, dans le cas du Zn, la constante d'affinité augmente chez les algues acclimatées aux faibles concentrations de zinc comparativement à celles acclimatées à des concentrations plus élevées (Sunda et Huntsman 1992, Hassler et Wilkinson 2003) (voir exemple au panneau B de la figure 2). Ces résultats suggèrent que ce mécanisme de régulation par rétroaction négative des concentrations des métaux intracellulaires est relié de façon primordiale à la synthèse de transporteurs membranaires similaires à ceux présents chez les algues non acclimatés tandis que, pour le zinc, il y aurait aussi induction de différents types de transporteurs ou de changements de l'affinité d'un transporteur donné.

Les algues, comme plusieurs autres organismes vivants, ont évolué vers ce type de régulation homéostatique pour contrôler efficacement l'assimilation des macro- et micronutriments à l'intérieur d'un environnement où l'abondance de nutriments varie fortement dans le temps et dans l'espace. Ce type de régulation par rétroaction négative ferait en sorte de réguler la prise en charge à l'état stationnaire des métaux essentiels pour maintenir les quotas intracellulaires de ces métaux les plus près possibles des quotas optimaux pour la croissance. La capacité à synthétiser des transporteurs est cependant limitée, notamment à cause de l'espace disponible dans la membrane cellulaire (Hudson et Morel 1993). Cela fait en sorte qu'à partir d'une concentration métallique faible critique, la cellule ne pourrait plus être capable de prendre en charge le métal à un rythme suffisant pour permettre la croissance optimale de l'algue (voir exemple avec le Mn dans Sunda et Huntsman (1998a)). Il est aussi possible que la cellule puisse continuer à synthétiser des transporteurs dans le but de stimuler le taux de prise en charge du métal essentiel même à des concentrations de métaux très faibles où la prise en charge devient limitée par la diffusion des espèces labiles. Dans ce cas, l'accumulation de métaux analogues par les mêmes transporteurs membranaires pourra être stimulée. Si ces métaux analogues peuvent remplacer la fonction de métal essentiel, l'augmentation de la prise en charge pourra être bénéfique pour la croissance de l'algue. Sinon, la cellule aggravera son problème de manque de métaux essentiels, ce qui pourrait conduire à des effets de carence (voir exemple avec le Zn dans Sunda et Huntsman (1998a)). Inversement, lorsque la concentration de métaux essentiels devient supérieure à ses capacités de régulation, la cellule ne peut plus dégrader ou désactiver ces transporteurs membranaires et ne régule donc plus l'internalisation de métaux essentiels. Dans ces dernières conditions, la prise en charge de métaux essentiels devient proportionnelle à l'ion libre, conformément au modèle de l'ion libre, à condition que les systèmes de transport métalliques soient loin d'être saturés par le métal libre en solution. Ainsi, vu l'excès de métaux essentiels accumulé par les algues, des effets toxiques peuvent se manifester (Sunda et Huntsman 1992, 1998c). Cependant, la prise en charge des métaux non essentiels, étant accumulés par le phytoplancton présumément par un ou des transporteurs de métaux essentiels, sera influencée parfois de façon très importante par les concentrations ambiantes de métaux essentiels, qui moduleront l'activité des transporteurs des métaux essentiels par rétroaction négative (Sunda et Huntsman 1998a). Ce rôle interactif des micronutriments essentiels sur la toxicité des métaux par leur modulation du taux de prise

en charge maximale des cellules algales n'est pas pris en compte à l'intérieur de la version présente du MLB.

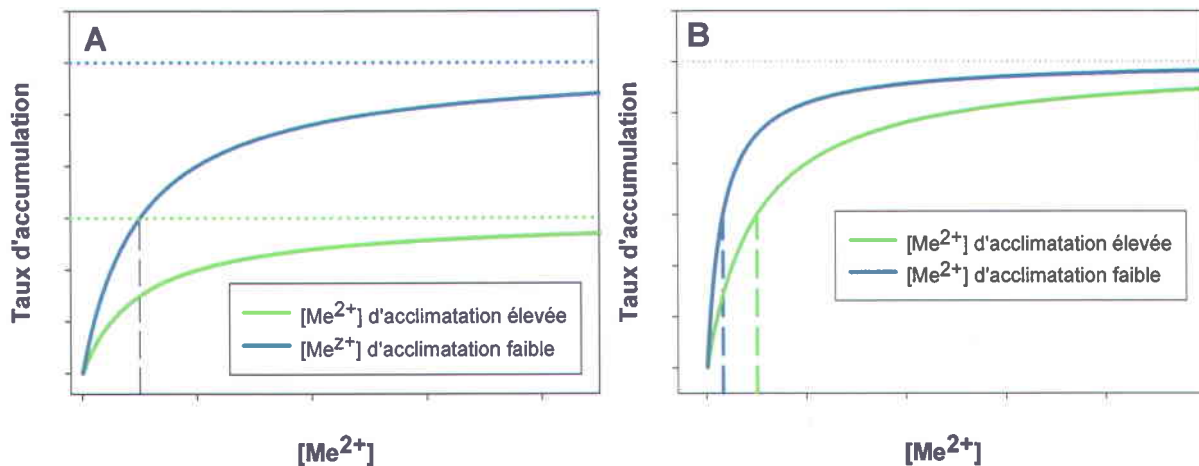


Figure 2 : Exemple de relation entre le taux d'accumulation d'un métal et la concentration de Me^{2+} pour des expositions à court terme chez une algue hypothétique ayant été pré-acclimatée à une faible (courbe bleu) ou une forte (courbe verte) concentration de Me^{2+} . Les unités sont arbitraires et les courbes modélisées sont présentées sous une échelle linéaire sur les deux axes x et y. Au panneau A, les algues modulent le taux maximal de transport (V_{max}) en fonction du milieu d'acclimation, mais ne modifient pas l'affinité du transporteur pour le métal (K_{Me}). Les V_{max} sont présentés par les lignes horizontales pointillées bleues et vertes chez respectivement les algues acclimatées aux faibles et aux fortes concentrations de métal. La $[Me^{2+}]$ où le système de transport est à demi saturé est représentée par des tirets noirs. Au panneau B, les algues modifient l'affinité (K_{Me}) du système de transport pour le métal sans modifier le V_{max} . La $[Me^{2+}]$ où le système est à demi saturé par le métal ($[Me^{2+}] = 1/K_{Me}$) est spécifiée par les tirets bleus et verts chez les algues acclimatées respectivement à une faible et une forte concentration de Me^{2+} . Le V_{max} est représenté par la ligne pointillée noire.

6) Le MLB prédit que l'accumulation des métaux est réalisé par un seul type de transporteur. Cependant, il est maintenant de plus en plus clair qu'une famille de différents ligands biotiques, associée à différents systèmes de transport pouvant transporter un même métal, existe à la surface des organismes. Outre les découvertes récentes des séquences génétiques des transporteurs ZIP de différentes affinités chez *C. reinhardtii*, des expériences de cinétique

d'accumulation suggèrent la présence de différents types de transporteurs dans le cas du zinc chez le phytoplancton marin (Sunda et Huntsman 1992) et d'eau douce (Hassler et Wilkinson 2003). De façon analogue à une synthèse de transporteurs induite sur une période de temps plus longue (voir point 5 ci-dessus), Sunda et Huntsman (1992) ont démontré que la prise en charge du zinc à court terme n'était pas directement proportionnelle à la concentration de zinc libre en solution. Dans ces conditions, on s'attend d'obtenir une courbe constituée de deux fonctions hyperboliques décalées qui se recourent (formant une courbe hyperbolique avec deux plateaux) au lieu d'une simple courbe hyperbolique relie donc l'accumulation des métaux en fonction de la concentration de l'ion libre en solution (Fig. 3). Cela fait en sorte que la liaison aux sites physiologiquement actifs des métaux sur les membranes algales devient pour une gamme de concentrations métalliques ne saturant pas les transporteurs : i) reliée de façon linéaire à l'ion libre (sites de transport avec une affinité élevée et une capacité faible pour les métaux), pour la partie linéaire inférieure de la courbe, ii) *indépendante* de la concentration de l'ion libre, à l'intérieur de la portion de la courbe où il y a saturation des sites de hautes affinités; iii) reliée de façon linéaire à l'ion libre (sites de transport avec une affinité faible et une capacité élevée pour les métaux), dans la seconde partie linéaire de la courbe. Les conséquences pratiques de cette contradiction apparente au MLB s'avèrent toutefois peu importantes pour l'application du MLB en nature dans un contexte toxicologique des *métaux essentiels* et non de nutrition (ou de carence) chez le phytoplancton. En effet, le MLB s'attardera aux concentrations de métaux essentiels pouvant être potentiellement toxiques envers les algues et donc, pour une gamme de concentration de métaux essentiels relativement élevée, située à l'intérieur de la seconde partie linéaire de la courbe hyperbolique à deux plateaux traitée ci-dessus. À ces fortes concentrations de métaux essentiels (plus grandes que celles pouvant soutenir la croissance maximale), la prise en charge et la toxicité de ces métaux devraient être fonction de la concentration de l'ion libre puisque l'entrée des métaux ne pourrait plus être régulée par les cellules. Campbell (1995) a d'ailleurs recensé plusieurs exemples (52 des 59 cas étudiés) où le MLB pouvait s'appliquer chez les éléments traces essentiels dont le Zn.

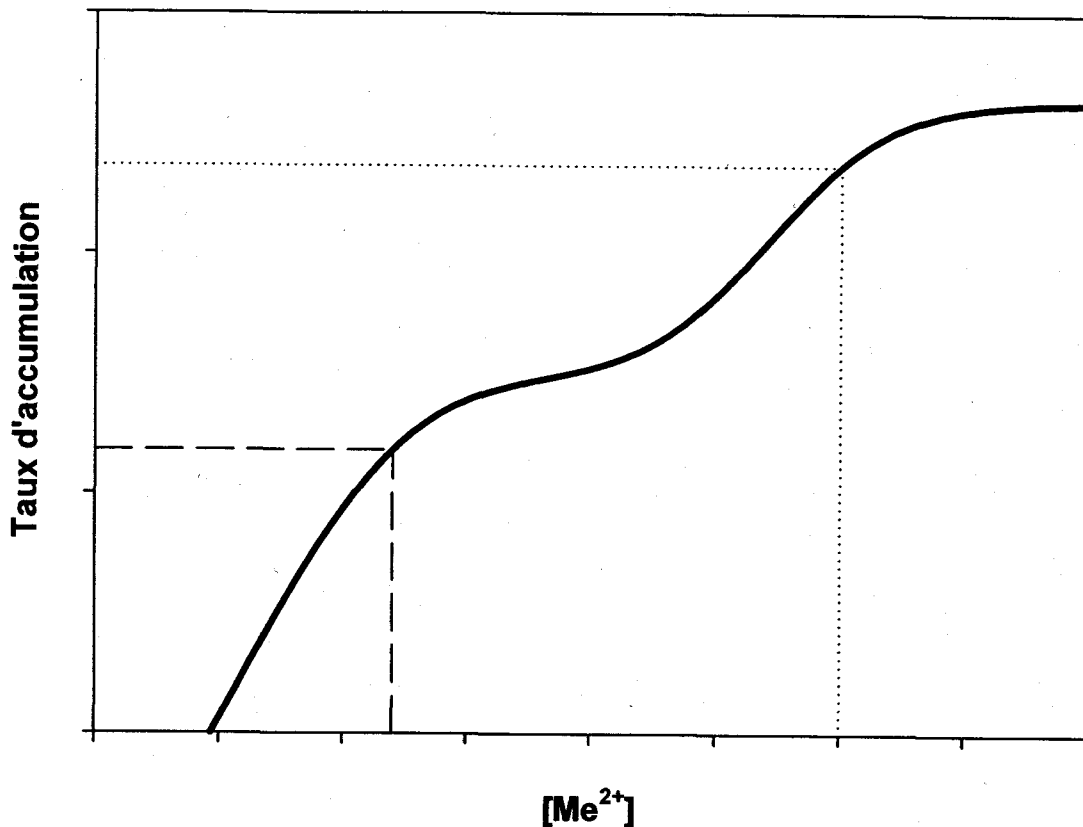


Figure 3 : Exemple de relation entre le taux d'accumulation d'un métal par deux systèmes de transport et la concentration de Me^{2+} pour des expositions à court terme chez une algue hypothétique. La courbe modélisée indique la présence de deux systèmes de transport de différentes affinités pour le Me^{2+} . Les tirets et les pointillés indiquent respectivement pour le transporteur de haute et de faible affinité, le point où ces transporteurs sont à demi saturés par le métal (où $[Me^{2+}] = 1/K_{Me}$). Les unités sont arbitraires et une échelle logarithmique est utilisée sur l'axe des x et des y afin de bien visualiser l'ensemble des deux systèmes de transport.

7) Les métaux traces seraient pris en charge par transport facilité d'après le MLB, c'est-à-dire que des transporteurs protéiques utilisent le gradient électrochimique transmembranaire comme force motrice et ne nécessitent pas directement d'énergie biochimique. Encore aujourd'hui, il n'existe que peu d'études ayant examiné la présence et la régulation de transporteurs membranaires des métaux traces chez les algues. Une étude récente a mis en évidence la présence de gènes (dont le gène *CrDMT1*) codant pour des transporteurs de la famille des NRAMPs (*Natural resistance-associated macrophage protein*) chez *C. reinhardtii*

(Rosakis et Köster 2004). L'expression du gène *CrDMT1* a aussi été démontrée à l'intérieur de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (dont le gène analogue à *CrDMT1* fut enlevé) par buvardage de western ou *western blot* (Rosakis et Köster 2005). La croissance de ces levures, génétiquement modifiées et cultivées dans un milieu contenant de faibles concentrations de métaux traces, pouvait être stimulée par un ajout de Mn, Cu, Fe ou Co (mais pas de Zn). Ces derniers résultats obtenus chez la levure *S. cerevisiae* suggère que le transporteur DMT1 de la famille des NRAMPs pourrait jouer un rôle dans l'accumulation de plusieurs métaux traces chez *C. reinhardtii*. L'activité des transporteurs NRAMPs n'est pas connue comme étant reliée à la production d'énergie biochimique cellulaire et le transport des métaux par ces transporteurs pourrait donc être réalisé par transport facilité tel que postulé par le MLB (Nevo et Nelson 2006).

Contrairement à ce que le BLM sous-entend, les algues transporteraient aussi plusieurs métaux essentiels (ex. : Fe, Cu et Zn) via des transporteurs de métaux activés par l'énergie biochimique. En effet, le transport du Fe(III) et du Cu(II) pourrait faire intervenir des enzymes membranaires qui nécessitent de l'énergie biochimique cellulaire (ex. : ATP ou NADP) (Anderson et Morel 1982, Xue et al. 1998, Weger et Espie 2000). De plus, l'analyse du génome de *C. reinhardtii* suggère la présence de deux types de transporteurs de Zn de la famille ZIP (*Zrt/IRT-like proteins*) avec différentes affinités (Rosakis et Köster 2004, Hanikenne et al. 2005). Ces transporteurs pourraient être activés à l'aide d'énergie chimique (ATP) chez *Chlorella kesslerii* (Hassler et Wilkinson 2003) de même que leurs analogues chez la levure *S. cerevisiae* (Zhao et Eide 1996). Cette régulation intense de l'accumulation des métaux par les cellules algales pourraient avoir un effet sur la vitesse à laquelle le métal franchi la membrane plasmique, c'est-à-dire sur la constante de vitesse d'internalisation du métal (k_{in}). Hassler et al. (2004) ont en effet suggéré que cette constante k_{in} pouvait être modifiée en fonction de la concentration de Zn^{2+} lors d'exposition à court terme. Cette régulation de la constante de vitesse d'internalisation pourrait influencer la relation linéaire entre l'accumulation de métal à la concentration de métal libre, ce qui serait contraire aux hypothèses du MLB. Comme mentionné au point 5 ci-dessus, il est bien possible que la capacité des algues à réguler le k_{in} des métaux essentiels soit plus marquée aux faibles

concentrations de métal essentiel qu'aux plus fortes concentrations ayant davantage un intérêt toxicologique dans le cadre du MLB.

8) Certaines variables physico-chimiques peuvent affecter la physiologie du phytoplancton et, de façon indirecte, le transport membranaire des métaux. Ce type de modulation de la prise en charge des métaux ne fait pas partie présentement du MLB. À ce jour, il est relativement peu compris et peu d'études se sont attardées à ce sujet. Quelques exemples seulement ont été répertoriés dans la littérature. Premièrement, une augmentation de la concentration de calcium inhiberait de façon non compétitive la prise en charge de nickel pour des expériences à court terme (40 min) chez *C. reinhardtii*, suggérant une modification de la conformation des transporteurs membranaires (modulation du k_{in}) par le calcium. Le calcium stimulerait aussi faiblement l'accumulation nette de nickel de façon significative pour des faibles concentrations de nickel d'exposition en diminuant notamment le taux d'excrétion du nickel des cellules (Worms et Wilkinson 2007). Deuxièmement, le pH inhiberait de façon non compétitive la prise en charge du cadmium chez *C. reinhardtii*, peut-être à cause de son effet sur la conformation des sites de transport membranaire (modulation du k_{in}) (François et al. 2007). Troisièmement, l'ajout d'une concentration élevée de cuivre au milieu expérimental peut stimuler la prise en charge de plusieurs métaux lors d'une exposition à court terme chez au moins deux espèces d'algues vertes (Slaveykova et Wilkinson 2002, Hassler et al. 2004, Chen et al. 2010).

1.2 Le cadmium un métal non essentiel

1.2.1 Spéciation du Cd et présence en eau douce

Le cadmium dissous est retrouvé dans les eaux naturelles sous sa forme ionique stable, Cd^{2+} , mais peut former des complexes avec une variété de ligands inorganiques (ions hydroxyles et carbonates à $pH > 8$) et organiques (MOD : matière organique dissoute autochtone et allochtone) formant différentes espèces chimiques. En eau douce, le Cd aurait relativement

peu d'affinité envers les ligands inorganiques et organiques comparativement à plusieurs autres métaux. Ainsi, on le retrouve souvent en grande proportion sous sa forme libre Cd^{2+} . En effet, le pourcentage moyen de Cd dissous total mesuré sous forme libre dans une série de lacs de la région de Rouyn-Noranda serait d'environ 54 (Mueller et al. 2012) à 71% (Fortin et al. 2010). Toutefois, comme pour plusieurs métaux, la tendance du Cd à apparaître sous forme de complexes serait fortement liée à sa concentration dissoute totale et à la productivité primaire des lacs (présence de ligands de nature biologiques) et donc au rapport [métal] : [ligands]. En effet, l'espèce Cd^{2+} pouvait représenter 80 % du Cd total dissous dans le lac Orta (Suisse) (Xue et Sigg 1998) de faible productivité biologique tandis qu'elle était seulement de 0,95 à 9,1 % dans le lac Greifen (Suisse), fortement eutrophe (Xue et Sigg 1998, Kalis et al. 2006, Sigg et al. 2006). Notons aussi que la plus forte proportion de Cd sous forme libre dans le lac Orta que dans le lac Greifen serait aussi en partie liée à la différence de pH entre les deux lacs; le lac Orta (pH = 7.3) étant plus acide que le lac Greifen (pH = 8.0).

Plusieurs études ont été réalisées afin de connaître le niveau de contamination en cadmium de nos écosystèmes d'eau douce. En milieu contaminé, comme par exemple près des régions minières, le Cd peut atteindre des concentrations largement supérieures à celles retrouvées naturellement dans nos lacs et rivières. Ainsi, la concentration en cadmium dissous dans les lacs les plus contaminés de la région de Rouyn-Noranda et de Sudbury varie entre 0,9 et 19,5 nM (Croteau et al. 1998, Kraemer et al. 2006) tandis qu'en milieu d'eau douce non contaminé, la concentration est typiquement inférieure à 0,1 nM (Xue et Sigg 1998).

1.2.2 Prise en charge et toxicité du cadmium

Le cadmium, étant généralement admis comme un métal non essentiel à la croissance du phytoplancton d'eau douce, devrait intuitivement être accumulé par les cellules algales via les transporteurs membranaires des métaux essentiels. Même si le Cd emprunte les transporteurs des métaux essentiels qui peuvent dépendre indirectement de l'énergie métabolique cellulaire, la prise en charge du cadmium (comme plusieurs autres éléments non essentiels) pour des

expositions à court terme (< 1 h) ne serait souvent que peu régulée par les cellules algales. Dans ce cas, les algues n'auraient pas assez de temps pour s'acclimater par le mécanisme de rétroaction négative énoncé à la section 1.1.2. L'activation très rapide de différents types de transporteurs de métaux essentiels (ex. : les transporteurs de haute et de faible affinités du zinc, voir section 1.1.2) pourrait peut-être affecter significativement la relation linéaire prédite par le MLB entre le Cd^{2+} et l'accumulation du Cd par les algues, mais cela demeure qu'une hypothèse et ne met pas en doute, à ce jour, le MLB pour des expositions à court terme au Cd. Jusqu'à maintenant, la prise en charge à court terme du cadmium semble donc fonction de l'ion libre et indépendant du statut métabolique chez les algues eucaryotes conformément aux prédictions du MLB (Campbell 1995, François et al. 2007).

L'accumulation et la toxicité du cadmium pour de moyennes ou de longues périodes d'exposition sont plus difficiles à modéliser (notamment à cause de la modification de la nature du ligand biotique dans le temps) que pour de courtes périodes d'exposition et ne peuvent donc être prédites avec confiance par le MLB (conformément à la limite numéro 5 du MLB au sujet de la toxicité chronique à la section 1.1.2). Par conséquent, pour bien prédire l'accumulation et la toxicité du cadmium, il importe de bien connaître, non seulement la concentration et la spéciation du cadmium en solution, mais aussi la physiologie cellulaire de l'algue lors de l'exposition : 1) la(les) voie(s) empruntée(s) par le cadmium lors de son entrée dans la cellule; 2) la régulation cellulaire du nombre et du(des) type(s) de transporteurs membranaires. Cette thèse contribue à améliorer nos connaissances touchant à ces deux derniers points.

1.2.3 Impact des métaux traces sur la prise en charge et la toxicité du cadmium

Les expériences de cinétique de prise en charge du cadmium à court terme (et quelques expériences à long terme) chez diverses espèces phytoplanctoniques suggèrent que ce métal peut être accumulé via les transporteurs de différents micronutriments, soit les transporteurs de manganèse (Hart et al. 1979, Sunda et Huntsman 1996, 1998a), de zinc de haute affinité

(Sunda et Huntsman 1998a, Töpperwien et al. 2007a, Töpperwien et al. 2007b) et de fer(II) (Lane et al. 2008, Lane et al. 2009). De plus, l'étude de Brembu et al. (2011) montre, par l'utilisation de puces à ADN, que la transcription des ARNs associés aux transporteurs de zinc de haute affinité (ZIP) est affectée par la présence de Cd chez la diatomée marine *Phaeodactylum tricornutum*. Chez la diatomée marine *Thalassiosira pseudonana*, il a été démontré que la voie de prise en charge du Cd^{2+} était très dépendante des concentrations de Mn^{2+} et surtout de Zn^{2+} auxquelles les algues avaient été acclimatées (Sunda et Huntsman 1996, 1998a). En fait, aux $[\text{Zn}^{2+}]$ relativement élevées permettant une croissance optimale sans induire d'effets toxiques, le taux de prise en charge du Cd^{2+} ($[\text{Cd}^{2+}]$ faible $\approx 10^{-12}$ M) sur une période d'exposition à long terme était très dépendant de la $[\text{Mn}^{2+}]$. Ce dernier résultat s'expliquait par le fait que le Cd^{2+} était accumulé presque exclusivement par les transporteurs de Mn. Dans ces conditions, le taux de prise en charge du cadmium diminuait de façon inversement proportionnel à la $[\text{Mn}^{2+}]$ à cause surtout de la diminution du flux maximal de prise en charge du Mn^{2+} par rétroaction négative et aussi de la saturation du système de prise en charge du Mn^{2+} et de la compétition qui en résulte entre le Mn^{2+} et le Cd^{2+} pour la liaison aux sites de prise en charge (Sunda et Huntsman 1996). Inversement, aux relativement faibles $[\text{Zn}^{2+}]$ (inhibant le taux de croissance de *T. pseudonana* ou étant à la limite inférieure de la gamme de $[\text{Zn}^{2+}]$ permettant une croissance optimale), le taux de prise en charge du Cd^{2+} n'était presque pas affecté par la $[\text{Mn}^{2+}]$. Ceci s'expliquait par le fait que le Cd pénétrait presque exclusivement par les transporteurs de zinc de haute affinité dont la synthèse est stimulée aux faibles $[\text{Zn}^{2+}]$ (Sunda et Huntsman 1998a). Il est intéressant de constater qu'un faible effet inhibiteur du Mn sur la prise en charge du Cd à court terme et à long terme chez l'algue d'eau douce *Scenedesmus vacuolatus* a aussi été observé avec des algues acclimatées à une relativement faible $[\text{Zn}^{2+}]$ (9×10^{-12} M Zn^{2+}) (Töpperwien et al. 2007a, Töpperwien et al. 2007b).

Ainsi, la régulation de la synthèse de transporteurs de métaux essentiels (ex. : du Zn et du Mn) par rétroaction négative en réponse à la variation des concentrations de ces cations essentiels affectera la biodisponibilité du cadmium et sa toxicité à long terme. La toxicité et la prise en charge du cadmium est notamment plus importante pour les cellules ayant synthétisé un plus

grand nombre de transporteurs membranaires de manganèse (en condition de forte $[Zn^{2+}]$) et de zinc qui peuvent transporter par inadvertance le Cd (Hart et al. 1979, Skowronski et al. 1988, Sunda et Huntsman 1996). Cette situation peut donc se traduire par un effet antagoniste des métaux essentiels sur l'accumulation à long terme et la toxicité du Cd. Cependant, le Cd pourra aussi à son tour influencer le mécanisme de régulation par rétroaction négative en inhibant la prise en charge de métaux essentiels (ex. : Zn et Mn). Aux fortes concentrations de Cd, le mécanisme de rétroaction négative permettant la régulation de la prise en charge de Mn pourrait être fortement voir complètement inhibé par le Cd (le Cd agissant à titre de « leurre » aux sites de régulation par rétroaction négative, faisant croire à la cellule qu'elle a assez accumulé de Mn, même si la croissance cellulaire est en vérité inhibée par une carence en Mn) chez *T. pseudonana* (Sunda et Huntsman 1996). Dans ce dernier cas, on pourrait s'attendre à ce que l'effet antagoniste (par rétroaction négative) des métaux essentiels sur l'accumulation ou la toxicité du Cd soit diminué aux plus fortes concentrations de Cd comparativement aux plus faibles.

En plus du Zn et du Mn, le Fe(III) jouerait un rôle antagoniste sur la prise en charge et la toxicité du cadmium pour des expositions à long terme (> 4 h) chez le phytoplancton (le Cd pouvant interférer sur les fonctions biochimiques du fer dans le métabolisme). Chez l'algue marine *T. weissflogii*, lorsque la concentration de fer dans le milieu est diminuée, la prise en charge et la toxicité du Cd aqueux seraient exacerbées (Foster et Morel 1982, Harrison et Morel 1983). En fait, en présence de Cd et d'une forte concentration de fer (étant suffisante pour permettre la croissance optimale des algues), les cellules accumuleraient des concentrations de fer plus élevées que celles n'ayant pas été exposées au cadmium (témoin). De plus, la diminution de la concentration de cadmium à des niveaux non toxique pour l'algue par un ajout d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) après 56 h de croissance (tout en maintenant les concentrations libres de l'ensemble des micronutriments constantes), induit une augmentation de la prise en charge de fer pour atteindre des quotas cellulaires énormément élevées et abolit ou renverse l'effet toxique du cadmium sur la croissance (la croissance des algues reprend de façon similaire au témoin). Ces résultats suggèrent donc que le cadmium interfère avec le métabolisme du fer, mais que le cadmium ne bloque pas totalement la

capacité des cellules à stimuler leur prise en charge de fer par le mécanisme de rétroaction négative (Harrison et Morel 1983). Chez l'algue d'eau douce *P. subcapitata*, un antagonisme du fer fut aussi démontré sur la toxicité du cadmium lors d'exposition de 96 h (Réty 2006, Maloney 2007). En revanche, le Fe(III) ne serait pas reconnu comme un bon inhibiteur de la prise en charge de Cd à court terme, du moins chez *C. reinhardtii*. Chez cette dernière espèce, le Fe(III) ne jouerait pas de rôle antagoniste sur l'accumulation de Cd pour une exposition de moins d'une heure (Caroline Hoang, communication personnelle, Université de Montréal). Il pourrait donc être possible que le rôle antagoniste du Fe(III) à long terme (> 4 h) sur la prise en charge et la toxicité du Cd chez le phytoplancton soit lié à la synthèse/dégradation de transporteurs de Fe(II) (pouvant transporter le Cd par inadvertance) comme il a été suggéré chez les plantes supérieures (Cohen et al. 1998, Thomine et al. 2000) ainsi que chez une espèce de diatomée marine (Lane et al. 2008, Lane et al. 2009)

1.2.4 Effet du calcium et du magnésium sur la prise en charge et la toxicité du cadmium

Le Mg ne serait pas un bon inhibiteur de la prise en charge du Cd chez *C. reinhardtii* puisqu'une concentration de Mg^{2+} de 10 μM n'inhibait pas la prise en charge à court terme (10 ou 30 min) du Cd ($[Cd^{2+}]$ d'exposition = 500 nM) chez cette espèce (Kola et Wilkinson 2005). De façon similaire, une variation de la concentration de Mg n'affectait pas la prise en charge de Cd après 60 min d'exposition chez *S. vacuolatus* (résultats non publiés, mais discutés succinctement dans Töpperwien et al. (2007b)). Puisque le Mg interfère peu avec la prise en charge du Cd pour de courtes expositions, il est probable qu'il n'ait que peu d'influence sur la toxicité du Cd à long terme pour la croissance des algues, mais cela ne reste qu'une hypothèse puisqu'aucune étude n'a été trouvée à ce sujet.

L'effet du Ca sur la prise en charge du Cd semble varier entre les espèces phytoplanctoniques. Ainsi, le Ca serait un bon inhibiteur de la prise en charge du Cd pour des expositions à court terme chez l'algue *C. reinhardtii* (Xue et al. 1988, Kola et Wilkinson 2005, François et al. 2007) tandis qu'il n'aurait curieusement pas d'effet chez l'algue *S. vacuolatus* (résultats non

publiés, mais discutés succinctement dans Töpperwien et al. (2007b)). Le(les) cause(s) à l'origine de cette importante différence interspécifique demeure(nt) encore aujourd'hui inconnue(s).

Chez *C. reinhardtii*, les quelques données disponibles dans la littérature suggère que le Ca^{2+} influence d'une façon strictement compétitive l'accumulation du Cd (Xue et al. 1988, Kola et Wilkinson 2005, François et al. 2007). Plus précisément, Kola et Wilkinson (2005) ont mesuré le flux de prise en charge du Cd^{2+} pendant 30 min d'exposition à une gamme de concentrations de Cd^{2+} pour des concentrations de Ca^{2+} de 10^{-4} ou de 10^{-3} M Ca^{2+} . Le taux maximal d'internalisation du Cd plafonnait à la même valeur (V_{max} constant). La constante de demi-saturation (concentration de Cd^{2+} pour laquelle le taux de prise en charge est la moitié du taux maximal) augmentait lorsque la concentration de Ca^{2+} augmentait dans le milieu. Étant donné que ces expériences ont été réalisées sur une très courte période de temps où la synthèse de nouveaux transporteurs est improbable et que le Ca est pris en charge via un transport facilité ne demandant pas d'énergie biochimique, ces résultats suggèrent fortement un processus de compétition entre le Ca et le Cd pour les sites de transport à la surface cellulaire. Signalons que le Ca se liait aux sites physiologiquement actifs du Cd (constante d'affinité ou l'inverse de la constante de demi-saturation; $K_{\text{Ca}} = 10^{4,5} \text{ M}^{-1}$) avec une plus faible affinité que le Cd pouvait se lier aux ligands biotiques ($K_{\text{Cd}} = 10^6 \text{ M}^{-1}$). Des constantes d'affinité similaires furent obtenues par Xue et al. (1988) chez la même espèce.

De façon similaire à l'impact du Ca sur la prise en charge du Cd à court terme, l'effet du Ca sur la toxicité du Cd à long terme varie en fonction des différentes espèces phytoplanctoniques étudiées. Quelques études (Issa et al. 1995, Mosulen et al. 2003, Källqvist 2009) suggèrent un rôle protecteur du Ca contre la toxicité du Cd chez différentes espèces d'algues sans toutefois mentionner la composition complète de leur milieu et la spéciation détaillée des constituants. L'ajout de Ca induira inéluctablement la dissociation des métaux traces essentiels du tampon métallique utilisé et il sera impossible d'étudier l'effet du Ca seul en ignorant la spéciation des autres éléments traces. De plus, l'ajout de Ca peut changer la force ionique des milieux de

culture si la concentration d'un autre cation majeur n'est pas diminuée en parallèle. Il en ressort donc que les résultats de ces études sont difficilement interprétables et ne seront plus considérées à partir de ce point.

Il y a tout de même quelques études récentes qui se sont attardées à l'effet du Ca sur la toxicité du Cd à l'intérieur de milieux de culture où la spéciation des éléments chimiques a été rigoureusement contrôlée. Les résultats fiables disponibles de Maloney (2007) et de Réty (2006) ont démontré que le Ca ne diminuait pas la toxicité du Cd (au niveau du rendement cellulaire) chez *P. subcapitata* exposé au Cd pendant 96 h. Fait intéressant, l'étude de Maloney (2007) a démontré que le Ca^{2+} pouvait avoir un effet indirect sur la toxicité du Cd^{2+} en déplaçant certains micronutriments comme le Zn^{2+} et le Fe(III) liés à l'EDTA et en augmentant donc la concentration de ces métaux traces libres dans le milieu. Le Zn et le Fe seraient à l'origine de la diminution de la toxicité du Cd tandis que le Ca seul (lorsque les concentrations des cations traces sont maintenues constantes) n'aurait pas d'effet significatif. Le Zn est perçu comme un inhibiteur de la prise en charge du cadmium chez *C. reinhardtii* pour des expositions à court terme (30 min) quoique pour une concentration de Zn excédant cependant celle du cadmium par un facteur 20 (Kola et Wilkinson 2005). Les concentrations de Zn^{2+} ne dépassant pas celle du cadmium d'un facteur 20 dans l'étude de Maloney (2007), il semble que le Zn ait un effet plus subtile qu'une simple inhibition de la prise en charge du Cd, et ce, si on fait l'hypothèse que le Zn inhibe la prise en charge du Cd chez *P. subcapitata* de la même façon que chez *C. reinhardtii*. Le Fe(III), quant à lui, ne serait pas un bon compétiteur pour la prise en charge du Cd chez *C. reinhardtii* d'après des expériences de prise en charge à court terme (Kola et Wilkinson 2005). Ainsi, le Fe(III) ainsi que le Zn pourraient bien agir d'une façon importante sur la synthèse de transporteurs membranaires, ce qui diminuerait la toxicité du Cd^{2+} et du Cd intracellulaire. Il a été mentionné dans ce document que les cellules algales pouvaient adapter leur mécanisme de transport du fer et du zinc après quelques heures d'exposition à différentes concentrations de Fe(III) et de zinc (mécanisme de rétroaction négative). Il est donc fortement possible que la toxicité et la prise en charge du Cd augmente en présence de faibles concentrations de Fe et de Zn à cause d'une régulation à la hausse de

l'activité des transporteurs membranaires du Fe(II) et du Zn, menant malencontreusement à un transport accentué du Cd²⁺.

1.2.5 Mécanismes de toxicité du cadmium

De nombreux effets toxiques aigus du cadmium ont été documentés dans la littérature chez les plantes et les cellules algales. Ce métal interférerait avec un bon nombre de fonctions cellulaires telles que la division cellulaire (réplication des gènes, altération des microtubules) (Voutsinas et al. 1997), les signaux intracellulaires, l'expression des gènes, la réparation des gènes et la photosynthèse. Il perturberait aussi l'intégrité des membranes cellulaires via la peroxydation des lipides (Deckert 2005, DalCorso et al. 2008). Le cadmium induirait ces effets toxiques en déplaçant les métaux traces essentiels (Zn, Cu, Fe, Ca) complexés aux protéines et aux enzymes intracellulaires, principalement à cause de sa grande affinité pour les groupements thiols et aussi de ses propriétés ioniques très similaires à celles de certains métaux (Zn et Ca) et altérerait donc la fonction de ces protéines. Via des réactions d'oxydoréduction, le Fe et le Cu libérés mèneraient à la production d'espèces d'oxygène réactives, qui sont très toxiques pour la cellule (Pinto et al. 2003, Rea et al. 2004). La sévérité de ces effets toxiques pourrait cependant être atténuée à l'aide de différents mécanismes de détoxification dont la synthèse de peptides détoxifiants (phytochélatines ou protéines de choc thermique) (Hu et al. 2001, Hall 2002, Torricelli et al. 2004, Gerloff-Elias et al. 2006, Lavoie et al. 2009), la séquestration du Cd dans des concrétions insolubles de polyphosphate (Komine et al. 1996, Komine et al. 2000, Ruiz et al. 2001) ou d'azote/soufre (Nassiri et al. 1997) ainsi que par l'expulsion du Cd de la cellule (Lee et al. 1996, Sunda et Huntsman 1996, Kola et Wilkinson 2005).

L'étude de la toxicité du Cd au niveau de cibles biochimiques intracellulaires (réplication de gènes, signaux intracellulaires, altération de la fonction de protéines) est souvent réalisée avec des concentrations de Cd plutôt élevées ([Cd] totale > 100 µM, spéciation non définie) et il est donc difficile de bien cerner les sites intracellulaires potentiels à l'origine de la toxicité du Cd

pour des $[Cd^{2+}]$ faibles et représentatives des lacs et rivières contaminés par les activités anthropiques. Les études réalisées à des $[Cd^{2+}]$ représentatives de celles retrouvées dans l'environnement et prenant en compte la spéciation du Cd sont beaucoup plus rares dans la littérature. Le potentiel de croissance cellulaire algal (ou de division cellulaire) serait traditionnellement reconnu comme étant le paramètre de toxicité le plus sensible à la présence du cadmium chez les microalgues (Rosko et Rachlin 1977, Le Faucheur et al. 2005, Tukaj et al. 2007). Des effets toxiques au niveau de la croissance peuvent être décelés à partir de faibles $[Cd^{2+}]$, soit près de 10 nM (Le Faucheur et al. 2005, Lavoie et al. 2009). Le cuivre (Stemann Nielsen et al. 1969, Steemann Nielsen et Kamp-Nielsen 1970, Stauber et Florence 1987) et le zinc (Stauber et Florence 1990) exerceraient aussi leur toxicité en ciblant de façon prioritaire les mécanismes de division cellulaire. Toutefois, l'efficacité photosynthétique mesurée à l'aide de fluorimètre de type « PAM » (« Pulse-amplitude-modulated fluorometry ») pourrait être un paramètre de toxicité (pour le Cd, le Cu et le Zn) de sensibilité comparable au taux de croissance des algues (Miao et al. 2005).

2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Les trois objectifs principaux de cette thèse accompagnés de leurs hypothèses respectives sont présentés ci-dessous.

Objectif 1 : Mesurer l'effet du Ca^{2+} et d'oligoéléments cationiques (Fe^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}) sur la prise en charge et la toxicité du Cd chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*;

Hypothèse 1 : Une augmentation des concentrations des oligoéléments inhibera l'accumulation et la toxicité du Cd contrairement aux prédictions actuelles du MLB.

Le Ca inhibera l'accumulation du Cd comme le prescrit le MLB.

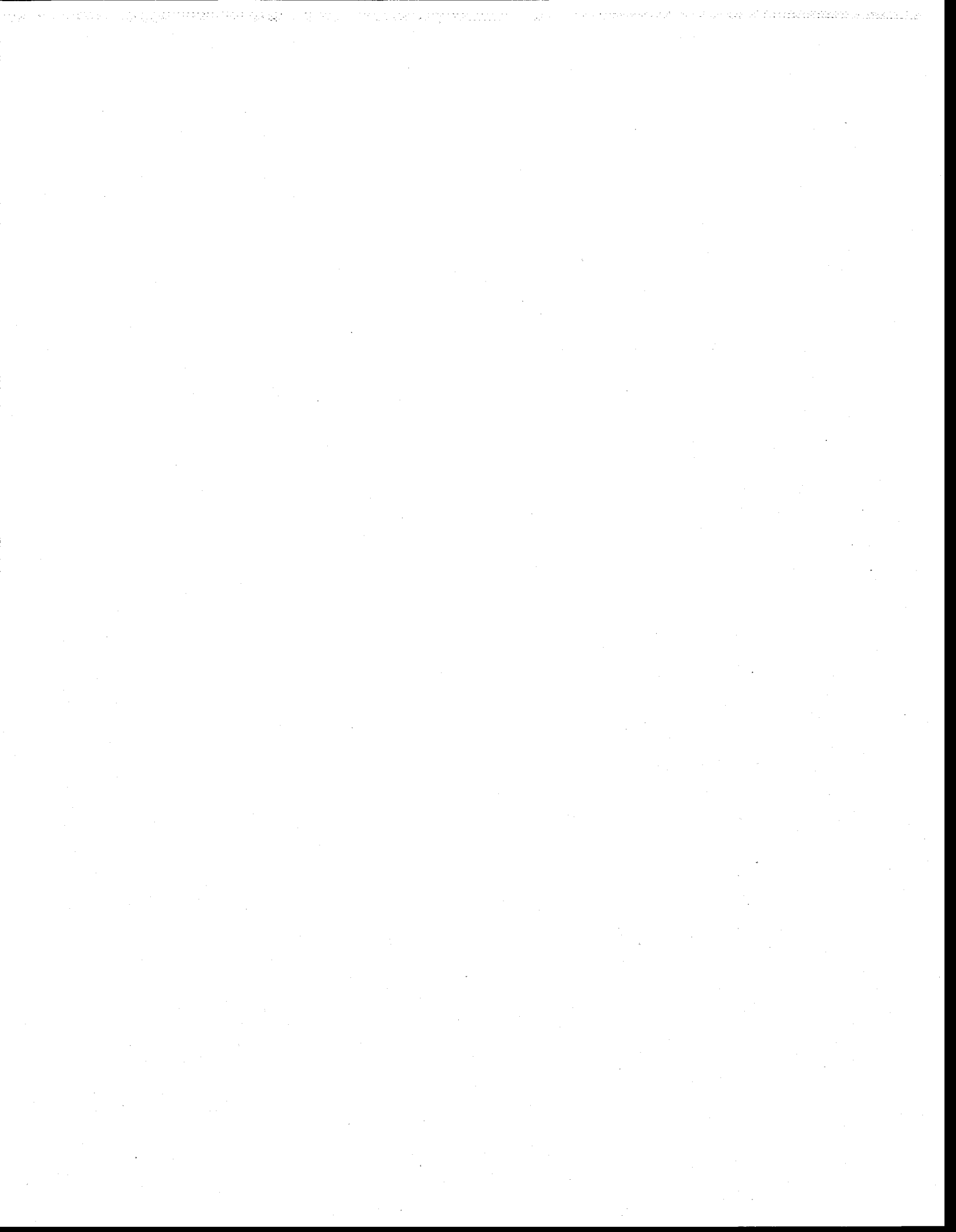
Objectif 2 : Déterminer les mécanismes par lesquels plusieurs de ces métaux essentiels et le Cd exercent leurs effets modulateurs sur l'accumulation et la toxicité du Cd;

Hypothèse 2 : Les métaux traces essentiels inhiberont de façon non compétitive l'accumulation du Cd, contrairement aux prédictions du MLB, mais ne seront pas des compétiteurs significatifs vu leur faible concentration. Le Ca inhibera l'accumulation du Cd de façon strictement compétitive.

La toxicité du Cd sera fonction de la quantité totale de Cd accumulé dans les cellules algales.

Objectif 3 : Développer un modèle du ligand biotique incorporant les effets physiologiques des éléments essentiels chez l'algue *C. reinhardtii* afin de prédire l'accumulation et la toxicité du Cd chez cette espèce au cours d'expositions à long terme (60 h).

Hypothèse 3 : L'incorporation dans le MLB du potentiel inhibiteur non compétitif des métaux traces sur l'accumulation du Cd permettra de prédire l'accumulation du Cd (qui sera proportionnel à la toxicité du Cd) à l'état stationnaire chez *C. reinhardtii*.



3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Choix de l'espèce

Pour ce projet doctoral, nous avons choisi d'utiliser l'algue verte d'eau douce *Chlamydomonas reinhardtii* P. A. Dang. comme organisme cible. Cette algue unicellulaire fait partie de l'embranchement des Chlorophyta (algues vertes) et de l'ordre des Volvocales. La souche sauvage munie d'une paroi cellulaire (CPCC11) fut obtenue du « Canadian Phycological Culture Center, CPCC » situé à l'Université de Waterloo (Ontario, Canada). Ce centre était auparavant situé à l'Université de Toronto (Ontario, Canada) sous le nom de « University of Toronto Culture Collection, UTCC ».

Cette espèce d'algue constitue un modèle idéal pour notre étude, car les interactions entre les métaux et les cellules de cette espèce ont été grandement étudiés dans un contexte écophysiotoxicologique (Knauer et al. 1997, Hanikenne 2003). C'est l'organisme photosynthétique unicellulaire le plus connu au niveau génétique et biochimique (Harris 1989, Pröschold et al. 2005). On connaît en effet plusieurs transporteurs de métaux essentiels chez cette espèce ainsi que la façon dont ils sont régulés (Merchant et al. 2006). L'espèce *C. reinhardtii* est donc un choix pertinent pour cette thèse dans le sens qu'il permet de coupler et comparer ces données physiologiques/biochimiques/génétiques aux données récoltées dans la présente étude réalisée en chimie environnementale visant à élucider quantitativement l'importance de ces différents transporteurs dans l'accumulation des métaux présents à des concentrations traces représentatives du milieu naturel.

Chlamydomonas reinhardtii est aussi facile à cultiver en laboratoire. Elle n'a besoin que d'un milieu de culture simple ne contenant pas de vitamines et de cofacteurs, ce qui permet de bien contrôler la spéciation initiale des métaux en solution. Cette dernière caractéristique est essentielle afin de bien interpréter les expériences de prise en charge et de toxicité du cadmium en présence de différentes concentrations de micronutriments et de calcium.

3.2 Exposition des organismes

3.2.1 Culture des algues

Les culture-mères de *Chlamydomonas reinhardtii* ont été maintenues dans des cultures en lots (milieu de culture LM; voir les détails du milieu au paragraphe suivant et à l'annexe A) dans des erlenmeyers de 250 mL en polycarbonate (pour les expériences) ou de verre (pour la culture-mère). Ces cultures étaient placées sur une plaque agitatrice (60 rpm) à l'intérieur d'une chambre environnementale (Conviron, CMP4030). La température à l'intérieur de la chambre était réglée à $20,0 \pm 0,1$ °C. La luminosité était maintenue à 100 ± 10 μE ou $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ afin d'obtenir des cultures d'algues asynchrone (qui se divisent à un taux constant durant toute la phase exponentielle de croissance). La distribution de taille ainsi que le métabolisme des algues demeuraient donc davantage uniformes sous une lumière continue qu'en présence de cycles jours/nuits, ce qui simplifiait l'analyse subséquente des résultats. Les algues étaient manipulées d'une façon axénique, c'est-à-dire que les milieux de cultures étaient autoclavés (20 min, 121 °C) et les métaux traces étaient ajoutés à partir de solutions stocks acidifiées étant stérilisés par filtration. L'ensemble des manipulations des cultures d'algues axéniques étaient réalisées sous une hotte à flux laminaire. L'absence de contamination bactérienne était testée visuellement par plaquage sur agar (Difco-Bacto Agar).

Le milieu LM fut spécialement développé pour étudier l'effet d'une augmentation des métaux traces et du calcium sur l'accumulation et la toxicité du Cd. Les détails relatifs au développement de ce milieu de culture sont disponibles à l'annexe A et la composition chimique complète du milieu LM est fournie au tableau 1 de l'article 1 (section 7). Le milieu LM possédait des concentrations libres de métaux traces et de calcium faibles étant représentatives des concentrations minimales de ces métaux essentiels retrouvées dans les lacs de Rouyn-Noranda et de Sudbury. De plus, la force ionique du milieu de culture était fixée à une valeur relativement élevée de 22 meq L^{-1} avec ajout de nitrate de sodium (NaNO_3 1 M). Les faibles concentrations de métaux traces dans le milieu de base LM permettaient d'étudier facilement l'effet d'une augmentation de leurs concentrations sur l'accumulation et la toxicité

du Cd. De plus, la faible concentration de calcium du milieu ainsi que la haute force ionique du milieu LM nous donnait la possibilité d'augmenter la concentration de Ca tout en conservant une force ionique constante de 22 meq L⁻¹ (en compensant la hausse de la concentration de Ca par une relativement faible diminution de la concentration de NaNO₃). Le protocole pour la fabrication du milieu était essentiellement le même que celui utilisé pour réaliser les milieux MHSM-1 (Fortin 2000), mise à part les différences de concentrations de métaux traces, de calcium et de NaNO₃ mentionnées ci-dessus.

Les rendements cellulaires après 60 h de croissance chez *C. reinhardtii* cultivée dans le milieu LM n'étaient pas significativement différents de ceux obtenus pour des cultures réalisées dans le milieu traditionnel MHSM-1. Les algues semblaient toutefois avoir une plus grande difficulté à se diviser au début de la phase exponentielle. Ce problème disparaissait vers la fin de la phase exponentielle, c'est-à-dire à environ 60 h de croissance (voir annexe A pour plus de détails à ce sujet).

3.2.2 Contrôle de la spéciation des métaux

Tout au long de cette étude, on s'est attardé minutieusement à bien contrôler la spéciation des métaux. L'acide nitrilotriacétique (NTA) fut choisi comme agent chélateur permettant de tamponner les concentrations de métaux libres dans les milieux d'exposition, surtout au cours des expériences d'exposition à long terme. Le logiciel informatique MINEQL+ version 4.6 (Schecher et McAvoy 1992) avec les constantes d'équilibres révisées (Martell et al. 2004) fut utilisé afin de modéliser les concentrations de métaux libres. Les concentrations totales de NTA furent augmentées lorsque nécessaire de façon concomitante aux concentrations totales de métaux afin d'éviter que l'ajout d'un métal mène à la dissociation des complexes d'autres métaux déjà présents et influence donc la spéciation des autres métaux indirectement.

Un grand excès de NTA ($\geq 10^{-4}$ M) fut utilisé pour la fabrication de l'ensemble des milieux de culture, sauf pour quelques expériences réalisées à court terme où aucun ligand ne fut ajouté. Cette approche créait un énorme réservoir de Cd et d'autres métaux traces en solution. Les bilans de masse des activités de ^{109}Cd dans les filtrats obtenus lors de la collecte des algues ont montré que la concentration totale de Cd diminuait de moins de 10% après exposition des algues à différentes concentrations de Cd^{2+} ($2,3 \times 10^{-11}$ M à 5×10^{-8} M Cd^{2+}) pendant 60 h en présence des concentrations de métaux essentiels les plus faibles (LM). D'après des simulations MINEQL, cette diminution de moins de 10% de la concentration totale de Cd n'induisait qu'une diminution de moins de 10% des concentrations libres de Cd^{2+} et n'affectait pas les concentrations des éléments essentiels. De plus, aucune perte significative de Cd par adsorption sur les parois des erlenmeyers ne fut observée. Les concentrations totales de Cd dans les milieux témoins LM étaient plus faibles que la limite de détection à l'ICP-AES (2×10^{-9} M Cd) et donc les concentrations de l'ion libre étaient plus faible que 10^{-12} M Cd^{2+} .

Des mesures de fer dissous (avant et après filtration des milieux de culture sur des filtres de $0,2 \mu\text{m}$ de porosité) suggéraient que la présence d'oxyhydroxides de fer dans les milieux de culture était négligeable (voir annexe B). De plus, la présence potentielle de colloïdes de fer adsorbant le Cd fut écartée par l'analyse du ^{109}Cd retenu sur des membranes de $0,025 \mu\text{m}$ de porosité après ultrafiltration des milieux de culture LM et +Fe (LM avec une $[\text{Fe}^{3+}]$ 100 fois plus élevée) (voir article 1).

3.3 Décomptes cellulaires et mesure de la toxicité du cadmium

La détermination de la concentration de cellules algales dans les milieux de culture était réalisée à l'aide d'un compteur de particules (Beckman Coulter, Multisizer III). Pour ce faire, un échantillon de milieu de culture était dilué dans une solution électrolytique (Isoton II) avant l'analyse par l'appareil. L'appareil fournit la concentration cellulaire en termes de nombre de cellules (nombre de cellules d'algues mL^{-1}), de surface cellulaire (μm^2 d'algues mL^{-1}) et de volume cellulaire (μm^3 d'algues mL^{-1}) en faisant l'hypothèse que les cellules sont sphériques.

Il est donc possible d'évaluer d'éventuels changements de taille des cellules en plus d'analyser leur nombre.

Pour la présente étude, les algues étaient toujours inoculées à une densité cellulaire initiale de 40 000 cellules mL⁻¹ et cultivées jusqu'à ce qu'elles atteignent la fin de la phase exponentielle (60 h de croissance) (pour des raisons expliquées à l'annexe A). La concentration ou rendement cellulaire après 60 h de croissance était utilisé comme paramètre de mesure de la toxicité du Cd (« endpoint »).

3.4 Mesure de l'accumulation du cadmium et du zinc

Les cellules étaient premièrement filtrées sur deux filtres de polycarbonate (porosité de 2 µm; diamètre de 47 mm) superposés l'un sur l'autre. Ensuite, les cellules étaient rincées pendant 10 min avec une solution d'EDTA 10⁻⁴ M afin de désorber les métaux présents à la surface des cellules. Cette étape était suivie de trois rinçages avec le milieu LM-R (LM sans métaux traces et NTA) pour bien enlever les résidus du milieu d'exposition et de métaux extracellulaires. La quantité de ¹⁰⁹Cd ou de ⁶⁵Zn sur le filtre du haut (accompagné des algues) ainsi que pour le filtre du bas (blanc de filtration sans algues, où les métaux s'adsorbent passivement dans le filtre) était mesurée à l'aide d'un compteur gamma (Wallac 1480, Perkin-Elmer). La quantité de métal internalisée par les algues pouvait donc être calculée en soustrayant le signal du blanc de filtration au signal des algues récoltées sur le filtre du haut. L'efficacité de comptage du ¹⁰⁹Cd et du ⁶⁵Zn (désintégrations détectées par minute ou comptes par minute ou CPM divisées par les désintégrations théoriques par minute ou DPM) était premièrement déterminée séparément en triplicata à partir de dilutions des sources radioactives des deux métaux. Pour ce faire, 2 mL de ces sources diluées dans une matrice HNO₃ 1% v/v furent placés dans les flacons à scintillation de 5 mL. L'efficacité de comptage était de 48,1 ± 0,6 % et de 21,2 ± 0,4 % pour respectivement le ¹⁰⁹Cd et le ⁶⁵Zn. Le temps de comptage était ajusté afin d'obtenir une erreur sur l'activité du radio-isotope relativement faible (< 5%). La fenêtre pour mesurer

les désintégrations du ^{109}Cd était restreinte entre 16 et 36 keV (pic principal à 22 keV) tandis que pour le ^{65}Zn , la fenêtre d'analyse comprenait 100 à 1500 keV (pic principal à 1115 keV).

Le signal gamma obtenu avec le compteur était converti avec la procédure décrite ci-dessous afin de déterminer la concentration totale de Cd ou de Zn dans les échantillons. Premièrement, les comptes par minute (CPM) étaient transformés en désintégrations par minute (DPM) en divisant les CPM par l'efficacité de comptage (CPM/DPM). Les DPM étaient ensuite converties en nCi en les divisant par 2220 DPM nCi⁻¹. Ensuite, les concentrations de radioisotopes (en nCi) étaient converties en concentration totale de l'élément (mol) en utilisant l'activité spécifique du cadmium ($\mu\text{Ci } \mu\text{mol Cd total}^{-1}$) ou du zinc ($\mu\text{Ci } \mu\text{mol Zn total}^{-1}$). Cette activité spécifique, fournie par la compagnie à la date de certification de la source, était corrigée pour la décroissance radioactive à l'aide de l'équation ci-dessous :

$$N = N_0 e^{\frac{\ln 2 t}{t_{1/2}}} \quad \text{éq. (9)}$$

où N est l'activité spécifique du métal à un temps t, N_0 est l'activité initiale fournie à la date de certification et $t_{1/2}$ est la demi-vie du radioisotope ($^{109}\text{Cd} = 462,3$ jours ; $^{65}\text{Zn} = 244$ jours). Le calcul de l'activité spécifique devait aussi tenir compte de toutes dilutions isotopiques (i.e. l'ajout de métal non radioactif).

3.5 Plan expérimental

3.5.1 Expériences d'exposition à long terme

Des cultures d'algues, ayant été acclimatées pendant plus de sept générations au milieu LM, furent premièrement exposées à une concentration de 7×10^{-9} M Cd^{2+} . Cette concentration de Cd en présence des concentrations de métaux traces essentielles prescrites par le milieu LM inhibait de 50% (EC_{50}) le rendement cellulaire après 60 h, exprimé en termes du nombre de cellules. D'autres expositions étaient par la suite réalisées en présence de différentes concentrations de métaux traces et de calcium afin d'évaluer leurs effets sur l'accumulation et la toxicité du Cd (Objectif 1). Plus précisément, les algues étaient exposées successivement au cadmium à l'intérieur du milieu LM de base ainsi qu'en présence d'une concentration élevée d'un autre cation d'intérêt. Pour ces expériences, les concentrations (M) passaient de 10^{-11} à 10^{-9} Zn^{2+} , 10^{-11} à 10^{-9} Co^{2+} , 10^{-19} à 10^{-17} Fe^{3+} , $10^{-8.3}$ à 10^{-6} Mn^{2+} , 10^{-14} à 10^{-13} Cu^{2+} ou $10^{-4.7}$ à 10^{-3} Ca^{2+} . L'accumulation et la toxicité du Cd étaient mesurées dans chacun de ces sept milieux (nommés LM, +Zn, +Co, +Fe, +Mn, +Cu et +Ca) pour des périodes d'exposition de 60 h à 7×10^{-9} M Cd^{2+} . Ces expériences d'exposition ont aussi été réalisées chez des algues pré-acclimatées pendant plus de trois générations aux milieux contenant une concentration élevée de métaux traces (i.e. +Zn, +Co, +Fe, +Mn, +Cu) afin de vérifier si la réponse de l'algue vis-à-vis du Cd changeait après acclimatation.

L'accumulation et la toxicité du Cd furent aussi étudiées pour des expositions de 60 h à une gamme de $[\text{Cd}^{2+}]$ (de $2,3 \times 10^{-11}$ M à 8×10^{-7} M Cd^{2+}) dans les milieux LM et +Zn ainsi que dans un autre milieu nommé HM, où les concentrations de tous les cinq métaux traces d'intérêt furent augmentées en combinaison. Ces expériences furent réalisées avec des algues acclimatées au milieu de base LM pendant plus de sept générations.

Milieux	[Zn ²⁺] (M)	[Co ²⁺] (M)	[Fe ³⁺] (M)	[Mn ²⁺] (M)	[Cu ²⁺] (M)	[Ca ²⁺] (M)
LM	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁹	10 ^{-8.3}	10 ⁻¹⁴	10 ^{-4.7}
+Zn	10 ⁻⁹	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁹	10 ^{-8.3}	10 ⁻¹⁴	10 ^{-4.7}
+Co	10 ⁻¹¹	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁹	10 ^{-8.3}	10 ⁻¹⁴	10 ^{-4.7}
+Fe	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁹	10 ^{-8.3}	10 ⁻¹⁴	10 ^{-4.7}
+Mn	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁹	10 ⁻⁶	10 ⁻¹⁴	10 ^{-4.7}
+Cu	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁹	10 ^{-8.3}	10 ⁻¹³	10 ^{-4.7}
+Ca	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁹	10 ^{-8.3}	10 ⁻¹⁴	10 ⁻³
HM	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁷	10 ^{-8.3}	10 ⁻¹³	10 ^{-4.7}

Tableau 1 : Concentrations libres de métaux traces et de calcium utilisées pour les différents milieux de culture et d'exposition.

Tout au long des expositions de 60 h, des mesures de densité cellulaires furent aussi réalisées pour les cellules croissant dans les milieux LM, +Zn et HM afin de pouvoir déterminer le taux de croissance spécifique (μ) de l'algue en absence de Cd. Ce taux de croissance fut seulement mesuré expérimentalement pour les expositions témoins sans Cd ($\mu_{\max} = 1.03 \pm \text{SD } 0.10 \text{ d}^{-1}$; $n = 6$) et non pour les expositions au Cd dans trois différents milieux de culture. En faisant l'hypothèse que le taux de croissance est constant tout au long de la phase de croissance exponentielle, il était possible de calculer les taux moyens de croissance des cultures d'algues avec ajout de Cd en multipliant le taux de croissance maximale mesuré chez les cultures témoins par l'inhibition du taux de croissance relatif au témoin ($\mu_{\text{Cd}} / \mu_{\text{témoin}}$), calculée avec l'éq. 10 :

$$\frac{\mu_{\text{Cd}}}{\mu_{\text{témoin}}} = \frac{\text{Ln}(\text{rendement}_{t1, \text{Cd}}) - \text{Ln}(\text{rendement}_{t0})}{\text{Ln}(\text{rendement}_{t1, \text{témoin}}) - \text{Ln}(\text{rendement}_{t0})} \quad \text{éq. (10)}$$

où rendement $t1, \text{Cd}$ et rendement $t1, \text{témoin}$ sont les rendements cellulaire en termes de biovolume total (volume total cellulaire mL^{-1}) mesurés après 60 h de croissance pour les cultures exposées respectivement au Cd et sans ajout de Cd (témoin); rendement $_{t0}$ est la concentration

initiale d'algue (en volume cellulaire total mL^{-1} , où $40\,000$ cellules $\text{mL}^{-1} \approx 2,75 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ mL^{-1}).

3.5.2 Expériences d'exposition à court terme

L'accumulation du ^{109}Cd ou du ^{65}Zn à court terme de 3 à 45 min a été étudiée en fonction d'une large gamme de $[\text{Cd}^{2+}]$ ou de $[\text{Zn}^{2+}]$ (10^{-11} à 8×10^{-5} M Cd^{2+} ; 2×10^{-11} à 2×10^{-5} M Zn^{2+}). Les algues étaient préalablement acclimatées à différents milieux de culture (LM, +Zn, +Co, HM, LM en présence de 7×10^{-9} ou $< 10^{-12}$ M Cd^{2+}) pendant une génération, sauf pour le milieu LM sans ajout de Cd, où les algues étaient cultivées depuis plus de sept générations dans ce milieu. Ces algues à la fin de la phase exponentielle étaient récoltées par filtration, rincées trois fois avec le milieu LM-R et inoculées à une densité cellulaire de $40\,000$ cellules mL^{-1} dans des milieux d'expositions simplifiés sans NTA (LM-R) pour les $[\text{Cd}^{2+}]$ ou $[\text{Zn}^{2+}]$ plus élevées que 10^{-8} M et, pour les $[\text{Cd}^{2+}]$ ou $[\text{Zn}^{2+}]$ plus faibles que 10^{-8} M, dans un milieu tamponné avec le NTA (LM). Une expérience a aussi été réalisée afin de tester l'effet sur l'accumulation de Cd d'une hausse de la $[\text{Ca}^{2+}]$ (10^{-3} M au lieu de la concentration de base de 2×10^{-5} M) dans le milieu d'exposition. Pour cette expérience, les algues étaient acclimatées au milieu LM avant l'exposition. Finalement, les taux d'accumulation de Cd ou de Zn étaient calculés en divisant les concentrations intracellulaires de métal mesurées par le temps d'exposition.

Les effets compétitifs du Ca, du Mg, du Zn et du Co sur l'accumulation du Cd (ainsi que la compétition du Ca et du Cd pour l'accumulation du Zn) ont aussi été testés. Les cellules d'algues à la fin de la phase exponentielle (acclimatées au milieu LM pour plus de dix cycles cellulaires) étaient récoltées par filtration, rincées trois fois avec 10 mL de LM-R et resuspendues dans le milieu LM-R ($+^{109}\text{Cd}$ ou ^{65}Zn) à une densité cellulaire d'environ $40\,000$ cellules mL^{-1} . Les algues étaient exposées pendant 3 ou 30 min à 2×10^{-8} ou 10^{-6} M Cd^{2+} ou Zn^{2+} en présence de 10^{-6} à 10^{-3} M Ca^{2+} , 8×10^{-5} à 10^{-3} M Mg^{2+} ou 10^{-8} à 10^{-5} M $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Co}^{2+}$. En outre, l'accumulation du Zn^{65} à une faible $[\text{Zn}^{2+}]$ ($1,5 \times 10^{-11}$ M) a aussi été mesurée

dans des milieux complets tamponnés avec le NTA (LM) pour une exposition de 40 min en présence de $[Cd^{2+}]$ variant de 10^{-11} à 5×10^{-9} M Cd^{2+} .

3.6 Formalismes mathématiques et procédures de modélisation des données

À l'équilibre, le taux d'accumulation des métaux (V_{Me-i}) par n sites de transport (i) est décrit par l'équation (11) du MLB ci-dessous (Sunda et Huntsman 1998c, François et al. 2007):

$$V_{Me-i} = \sum_{i=1}^n \frac{V_{\max-i}^{Me} [Me^{z+}] K_{Me-i}^{Me}}{1 + ([Me^{z+}] K_{Me-i}^{Me}) + ([C^{z+}] K_{Me-i}^C)} \quad (11)$$

où $[Me^{z+}]$ est la concentration de l'ion métallique libre étant accumulé par les cellules (en absence de limite de l'accumulation imposée par la diffusion), $V_{\max-i}^{Me}$ est le taux d'accumulation maximal du métal Me atteint à saturation des sites de transport i , $[C^{z+}]$ est la concentration du compétiteur C^{z+} , K_{Me-i}^{Me} et K_{Me-i}^C sont les constantes d'affinité respectivement de Me^{z+} et de C^{z+} pour le système de transport du Me. Le paramètre $V_{\max-i}^{Me}$ est égal à la quantité totale (en moles) de transporteurs par unité de biomasse (S_T) multiplié par la constante de vitesse (k_{in}) pour le transport du métal à travers la membrane.

Les techniques expérimentales que nous avons utilisées afin d'obtenir les paramètres cinétiques des différents systèmes de transport et de modéliser adéquatement l'accumulation de Cd s'énoncent comme suit. On a commencé par mesurer les taux d'accumulation du Me (ici le Cd ou le Zn) en fonction de la $[Me^{z+}]$ lors d'expositions à court terme en présence de faibles concentrations de compétiteurs tels que le Ca, le Mg et les métaux traces afin qu'ils aient un effet négligeable sur l'accumulation du Me. L'effet négligeable des principaux compétiteurs (excepté pour l'effet compétitif significatif d'une faible $[Ca^{2+}]$ sur l'accumulation du Cd et du Zn via les systèmes de transport Cd-1 et Zn-1, voir paragraphe suivant) fut ensuite validé par des expériences de liaisons compétitives (voir éq. 2) en fonction de la $[Me^{2+}]$. Donc, pour l'ensemble des systèmes de transport (sauf les systèmes Cd-1 et Zn-1), il était possible de déterminer des K_{Cd-i}^{Cd} et K_{Zn-i}^{Zn} précises avec ces expériences. Les

capacités des systèmes de transport ($V_{\max-i}^{\text{Me}}$) pouvaient aussi être calculées pour l'ensemble des systèmes de transport de Me.

Par la suite, en se basant sur les courbes d'accumulation du Me en fonction de $[\text{Me}^{z+}]$ réalisées précédemment, il fut possible d'identifier des $[\text{Me}^{z+}]$ suffisamment faibles pour ne pas saturer les différents systèmes de transport pour lesquels nous voulions étudier l'effet compétitif de différents cations. En choisissant une telle $[\text{Me}^{z+}]$ pour chacun des systèmes de transport, on s'affranchissait de tenir compte de la $K_{\text{Me}-i}^{\text{Me}}$ (qui était d'ailleurs inconnue précisément pour les systèmes Cd-1 et Zn-1) lors de l'étude des effets des cations compétiteurs (éq. (12)). Les expériences de compétition (où la $[\text{Me}^{z+}]$ est maintenue constante et où la $[\text{C}^{z+}]$ augmente) fournissaient des constantes d'affinité des compétiteurs C^{z+} (ex. : $K_{\text{Me}-i}^{\text{C}} = K_{\text{Cd}-i}^{\text{Ca}}$, $K_{\text{Cd}-i}^{\text{Mg}}$, $K_{\text{Cd}-i}^{\text{Zn}}$, $K_{\text{Cd}-i}^{\text{Co}}$ ou $K_{\text{Zn}-i}^{\text{Ca}}$, $K_{\text{Zn}-i}^{\text{Mg}}$, $K_{\text{Zn}-i}^{\text{Cd}}$) pour les sites de transport du Me^{z+} en utilisant l'équation 12 :

$$V_{\text{Me}-i} = \frac{A}{1 + (K_{\text{Me}-i}^{\text{C}} [\text{C}^{z+}]) + (K_{\text{Me}-i}^{\text{Me}} [\text{Me}^{2+}])} \quad (12)$$

où A est un paramètre ajustable regroupant tous les termes du numérateur de l'éq (11). Mentionnons qu'il nous a été impossible de choisir une $[\text{Me}^{z+}]$ suffisamment faible pour les systèmes Zn-2 et Cd-2, puisque d'autres systèmes de transport Zn-3 et Cd-3 de plus haute affinité opéraient à des concentrations proches des $K_{\text{Me}-i}^{\text{Me}}$ des systèmes Zn-2 et Cd-2. Dans ce cas, nous avons inclus le $K_{\text{Cd}-2}^{\text{Cd}}$ ou le $K_{\text{Zn}-2}^{\text{Zn}}$ dans l'éq. (12) (puisque une augmentation des $[\text{Ca}^{2+}]$ de 2×10^{-5} à 10^{-4} M Ca^{2+} n'affectait pas l'accumulation du Cd et du Zn par les systèmes Zn-2 et Cd-2, on pouvait affirmer que les $K_{\text{Cd}-1}^{\text{Cd}}$ et $K_{\text{Zn}-1}^{\text{Zn}}$ déterminées avec l'éq. (11) étaient exactes et non biaisées par la présence du Ca). Par conséquent, le terme $K_{\text{Me}} [\text{Me}^{z+}]$ était négligeable pour l'ensemble des expériences de compétition utilisant l'éq. (12) sauf pour les expériences impliquant les systèmes Zn-2 et Cd-2. Notons aussi que les effets compétitifs des protons sur l'accumulation du Cd furent considérés comme négligeable à pH 7 ($K_{\text{Cd}}^{\text{H}} \ll 10^5$; d'après les données de François et al. (2007)). En faisant l'hypothèse que le Cd et le Zn partage les mêmes systèmes de transport (hypothèse qui sera validée dans la section

Résultats), l'effet compétitif des protons à pH 7 sur l'accumulation du Zn devrait être aussi négligeable. En connaissant l'affinité du seul compétiteur significatif (Ca) pour certains sites de transport du Cd et du Zn (i.e. les sites Cd-1 et Zn-1), il était possible de calculer précisément K_{Me-1}^{Me} par régression non linéaire en utilisant l'éq. (11), mais en incluant cette fois les K_{Zn-1}^{Ca} ou K_{Cd-1}^{Ca} déterminées avec l'éq. (12).

Pour des expositions au Cd à long terme où la croissance algale devient significative, le taux de division cellulaire module transitoirement les concentrations intracellulaires de Cd ($[Cd_{cell}]$, c'est-à-dire le contenu en Cd par unité de biomasse) en fonction du temps d'exposition. Le taux de changement de la $[Cd_{cell}]$ est donné selon l'équation différentielle suivante :

$$\frac{d[Cd_{cell}]}{dt} = V_{Cd-i} - \mu [Cd_{cell}] \quad \text{éq. (13)}$$

où μ est le taux de croissance spécifique de l'algue. En présumant que V_{Cd-i} et μ demeurent constant lors de l'exposition, l'accumulation de Cd tendra éventuellement vers un état stationnaire, où $d[Cd_{cell}]/dt$ sera égal à 0. À l'état stationnaire, on obtient donc l'équation 14 :

$$[Cd_{cell}] = \frac{V_{Cd-i}}{\mu} \quad \text{éq. (14)}$$

Le taux d'accumulation de Cd à l'état stationnaire (V_{Cd-i}) est calculé avec l'éq. (11) pour les algues ayant atteint l'état stationnaire (i.e. pré-acclimatées à des concentrations spécifiques en métaux traces essentiels avant l'exposition). Le taux de croissance spécifique μ peut quant à lui être calculé à l'aide de l'éq. (10). Il était donc finalement possible de modéliser la quantité de Cd intracellulaire à l'état stationnaire et de comparer cette $[Cd_{cell}]$ modélisée à la $[Cd_{cell}]$ mesurée expérimentalement après 60 h de croissance (Objectif 3).

3.7 Statistiques

La significativité des différences entre les moyennes obtenues expérimentalement dans cette thèse fut testée par des analyses de variance à un ou deux facteurs suivies du test de comparaison multiple de Tukey. Les constantes d'affinité ($K_{\text{Me}-i}^{\text{Me}}$) et les capacités ($V_{\text{max}-i}^{\text{Me}}$) des systèmes de transport furent obtenues en optimisant par la méthode des moindres carrés l'adéquation entre les taux d'internalisation de métaux (en fonction de la concentration de l'ion libre) mesurés expérimentalement et prédits avec notre modèle. Les différences significatives par rapport à zéro des constantes provenant de ces régressions soient $K_{\text{Me}-i}^{\text{Me}}$ et $V_{\text{max}-i}^{\text{Me}}$, furent testées par des tests de t de Student pour échantillons indépendants. Les différences entre les moyennes des capacités des systèmes de transports ($V_{\text{max}-i}^{\text{Me}}$) chez des algues acclimatées à différentes concentrations de métaux traces furent évaluées en testant la significativité des différences entre les taux d'accumulation moyens près de la saturation des transporteurs (donc près de $V_{\text{max}-i}^{\text{Me}}$) avec des tests de t de Student pour échantillons indépendants. Toutefois, les différences entre les constantes d'affinité moyennes ne pouvaient être testées rigoureusement avec des tests statistiques à cause du faible nombre de mesures de taux d'accumulation au $[\text{Cd}^{2+}]$ ou $[\text{Zn}^{2+}]$ plus faibles que la constante de demi-saturation des systèmes de transport (étant l'inverse de la constante d'affinité du métal). Les différences entre les moyennes des constantes d'affinité des systèmes de transport furent donc évaluées d'une façon conservatrice par la comparaison des intervalles de confiance des constantes d'affinité modélisées.

Les données brutes (ou encore transformées par la transformation Box-Cox) respectaient les conditions des tests statistiques utilisées (ANOVA et test de t), soient l'égalité des variances et la normalité des données (test de t) ou des résidus (ANOVA). Toutefois, pour la comparaison de deux moyennes de variances inégales, le test de t pour variances inégales était utilisé. L'ensemble des tests statistiques et régressions furent réalisées avec les logiciels Systat 10 et Sigma-Plot 10 et les résultats étaient considérés significatifs si $p < 0,05$.

La macro REGTOX implantée dans le logiciel Excel (http://www.normalesup.org/~vindimian/en_index.html) fut utilisée afin de calculer les concentrations de Cd intracellulaire inhibant la croissance de 50% (EC₅₀) avec l'approche de Hill. Les intervalles de confiances des EC₅₀ moyens étaient estimées à l'aide de simulation non paramétrique de type « Bootstrap ».

4. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les principaux résultats, et leurs interprétations, obtenus dans le cadre de ce projet de recherche sont présentés dans cette section. Les résultats présentés dans ce chapitre, ainsi que des résultats additionnels, figurent dans des articles individuels (chapitres 7 à 9).

4.1 Reproductibilité et sensibilité des mesures de toxicité du Cd en fonction du paramètre de toxicité choisi

Pour des algues acclimatées au préalable au milieu LM, une exposition de 60 h à 7×10^{-9} M Cd^{2+} dans le milieu LM inhibait significativement ($p < 0.01$) de 57 à 80% la croissance (en termes de nombre de cellules produites; Fig. 4) de *C. reinhardtii*, et cela pour six expériences réalisés indépendamment (barres noires, Fig.4). Toutefois, lorsque la toxicité du Cd était exprimée en fonction du rendement au niveau du volume total cellulaire, les effets toxiques apparents devenaient quantitativement moins importants et étaient similaires entre les expériences (environ 10-20% d'inhibition; pas de variabilité inter-expérimentale significative) (Fig.5). Cet effet toxique faible induit par 7×10^{-9} M Cd^{2+} n'était cependant statistiquement significatif que pour deux de ces six expériences ($p < 0.05$, Fig. 5, barres noires avec astérisques). La plus faible toxicité apparente du Cd^{2+} sur le rendement au niveau du volume cellulaire relativement à celle mesurée en fonction du nombre de cellules (Fig. 4 et 5), était due à la capacité des cellules à croître (i.e., leur métabolisme demeurait au moins partiellement fonctionnel) même si les processus de division cellulaire étaient inhibés. Ce phénomène menait donc à une augmentation du volume cellulaire moyen par cellule en présence de $[\text{Cd}^{2+}]$ relativement élevées et compensait en partie pour la diminution du rendement en termes de nombre de cellules. Des expériences avec la diatomée marine, *Nitzschia closterium*, ont aussi montré que la division cellulaire était affectée en premier lieu par des concentrations toxiques de Zn et de Cu dans des conditions où la respiration et la photosynthèse n'étaient pas encore inhibées (Stauber et Florence 1987, 1990).

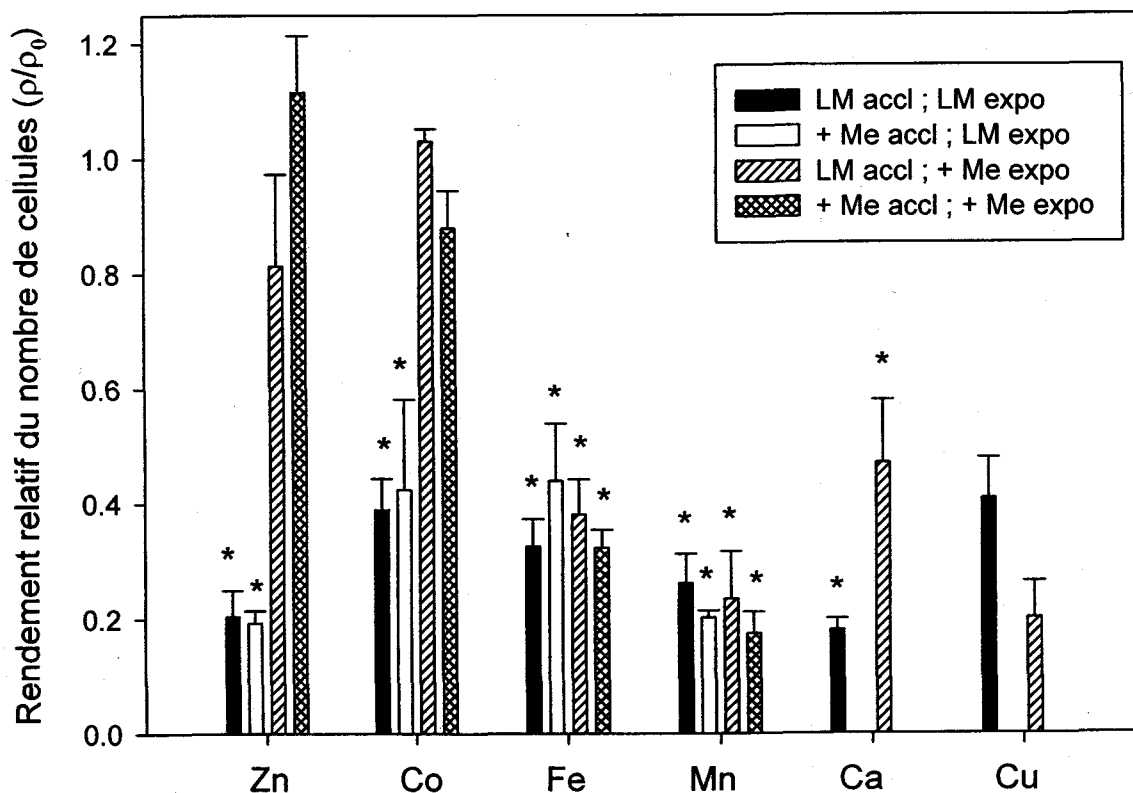


Figure 4 : Rendement relatif mesuré en termes du nombre de cellules produites (ρ/ρ_0 , où ρ et ρ_0 sont les concentrations algales en nombre de cellules par mL après 60 h de croissance pour respectivement les cellules témoins en absence d'ajout de Cd et les cellules exposées à 7×10^{-9} M Cd^{2+}) en fonction de la composition du milieu d'exposition (expo) et d'acclimatation (accl). Les algues furent acclimatées au milieu LM (LM accl) ou aux milieux où la concentration d'un des six cations fut augmentée (+Me accl, où Me représente le Zn, Co, Fe, Mn, Cu ou Ca). Les algues furent ensuite exposées à 7×10^{-9} M Cd^{2+} dans le milieu LM (LM expo) ou dans des milieux où la concentration d'un des six oligo-éléments fut augmentée (+Me expo). Les astérisques montrent les rendements relatifs étant significativement inhibés par rapport aux témoins sans ajout de Cd ($\rho/\rho_0 < 1$). Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois mesures.

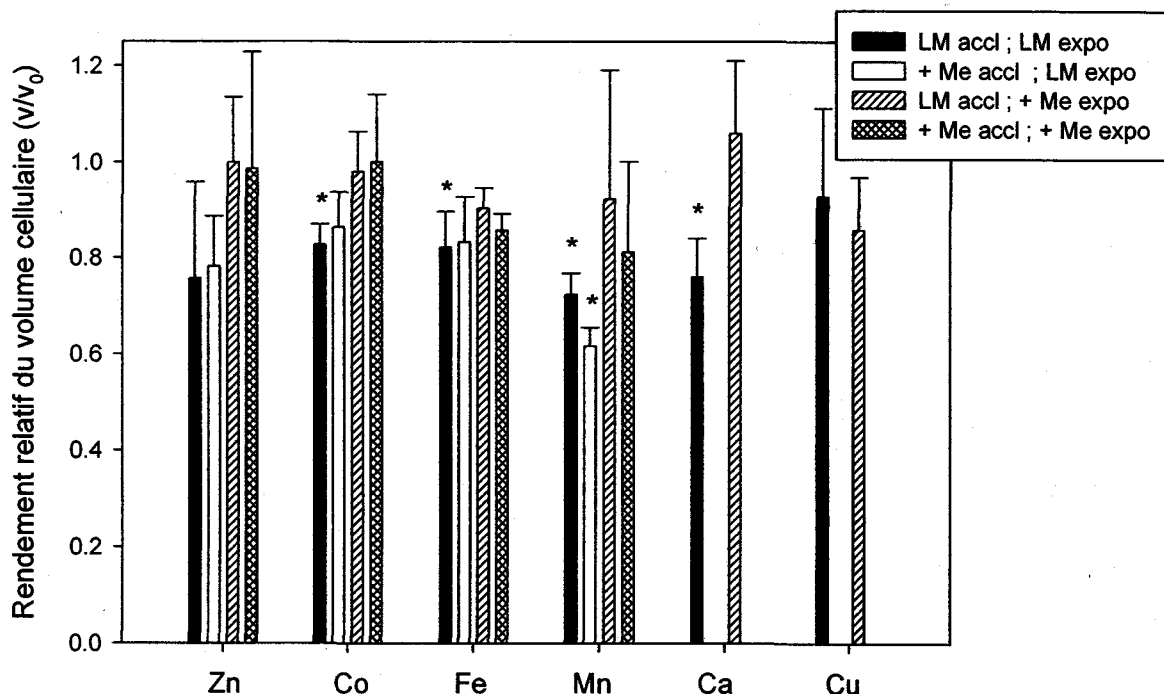


Figure 5 : Rendement relatif mesuré en termes de volume cellulaire (v/v_0 , où v et v_0 sont les concentrations algales de volume cellulaire en $\mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$ après 60 h de croissance pour respectivement les cellules témoins en absence d'ajout de Cd et les cellules exposées à $7 \times 10^{-9} \text{M Cd}^{2+}$) en fonction de la composition du milieu d'exposition (expo) et d'acclimatation (accl). Les algues furent acclimatées au milieu LM (LM accl) ou aux milieux où la concentration d'un des six cations fut augmentée (+Me accl, où Me représente le Zn, Co, Fe, Mn, Cu ou Ca). Les algues furent ensuite exposées à $7 \times 10^{-9} \text{M Cd}^{2+}$ dans le milieu LM (LM expo) ou dans les milieux où la concentration d'un des six oligo-éléments fut augmentée (+Me expo). Les astérisques montrent les rendements relatifs étant significativement inhibés par rapport aux témoins sans ajout de Cd ($v/v_0 < 1$). Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois mesures.

L'accumulation du Cd à l'intérieur des cellules de *C. reinhardtii* était aussi beaucoup plus reproductible entre les expériences lorsqu'elle était normalisée par rapport au volume total cellulaire au lieu du nombre de cellules. En effet, pour les cellules acclimatées à des concentrations de métaux traces essentiels faibles (présentent dans le milieu LM), l'accumulation moyenne de Cd par unité de volume cellulaire n'était pas significativement différente pour l'ensemble des six expériences réalisées indépendamment ($8,1 \pm 0,7 \text{ amol Cd } \mu\text{m}^{-3}$); Fig. 6, barres noires). Par contre, l'accumulation moyenne de Cd par cellule était

beaucoup plus variable (1000 à 2700 amol Cd cellule⁻¹) et différait entre les expériences (p=0.01; Fig. 7; barres noires)

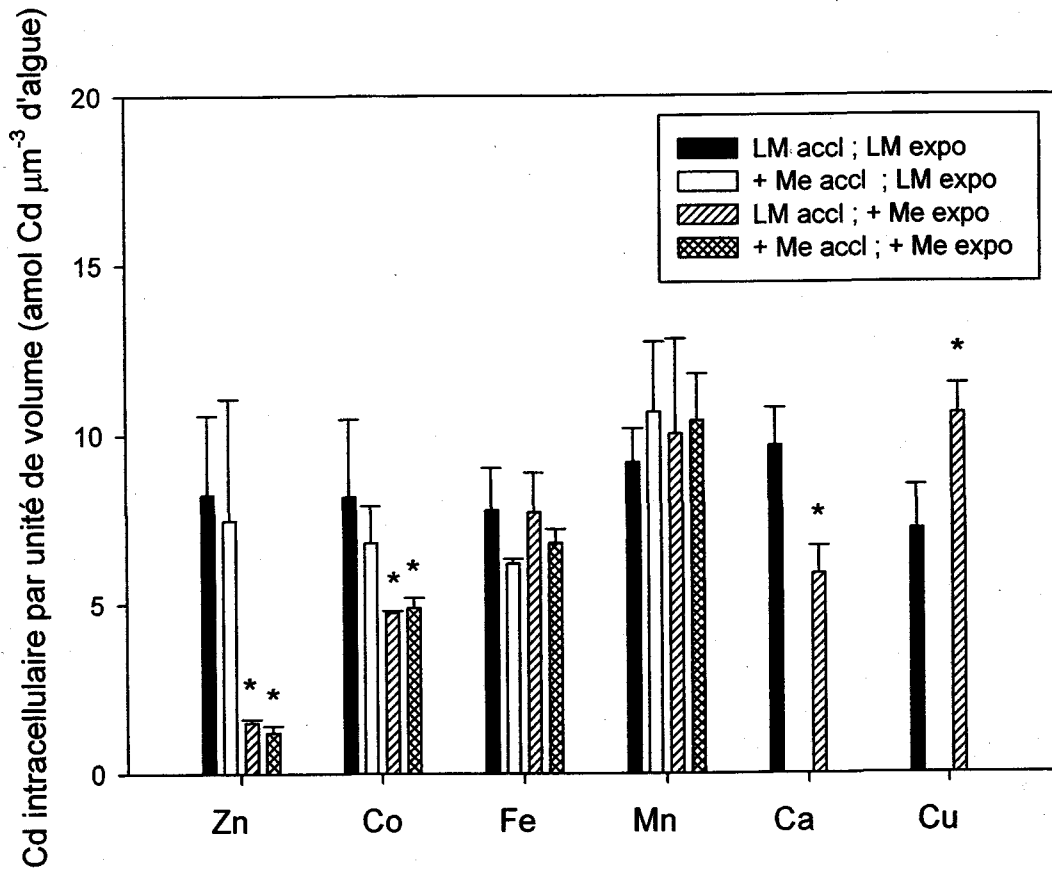


Figure 6 : Cadmium intracellulaire (amol Cd μm⁻³) mesuré après 60 h d'exposition à 7 x 10⁻⁹ M Cd²⁺ en fonction du milieu d'acclimatation (accl) et d'exposition (expo). Les algues furent acclimatées au milieu LM (LM accl) ou aux milieux où la concentration d'un des six cations fut augmentée (+Me accl, où Me représente le Zn, Co, Fe, Mn, Cu ou Ca). Les astérisques indiquent les différences significatives entre les concentrations de Cd intracellulaire mesurées pour les algues exposées au milieu témoin LM (LM expo) et au milieu où la concentration d'un des six oligo-éléments fut augmentée (+Me expo), pour un même milieu d'acclimatation. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois mesures.

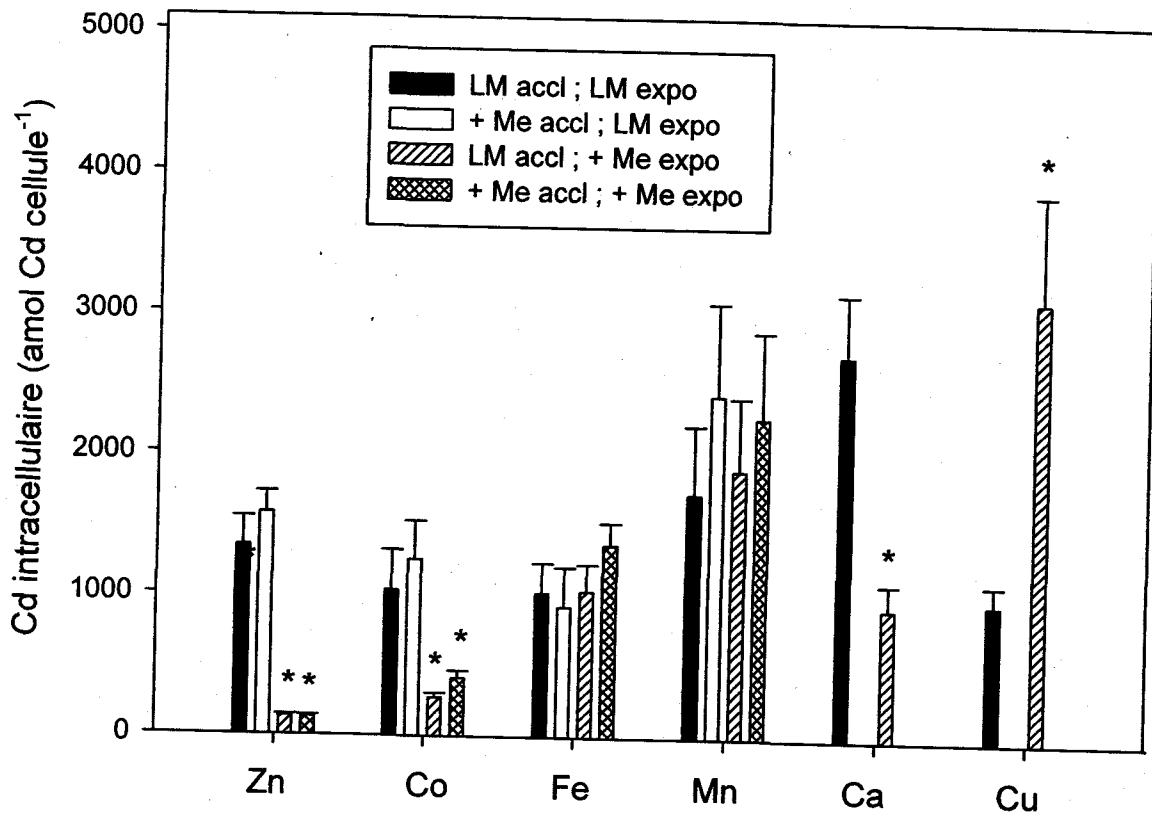


Figure 7 : Cadmium intracellulaire ($\text{amol Cd cellule}^{-1}$) mesuré après 60 h d'exposition à $7 \times 10^{-9} \text{ M Cd}^{2+}$ en fonction du milieu d'acclimatation (accl) et d'exposition (expo). Les algues furent acclimatées au milieu LM (LM accl) ou aux milieux où la concentration d'un des six cations fut augmentée (+Me accl, où Me représente le Zn, Co, Fe, Mn, Cu ou Ca). Les astérisques indiquent les différences significatives entre les concentrations de Cd intracellulaire du milieu témoin LM (LM expo) et du milieu où la concentration d'un des six oligo-éléments fut augmentée (+Me expo), pour un même milieu d'acclimatation. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois mesures.

Nos résultats suggèrent que le volume cellulaire total représente un paramètre d'évaluation de la toxicité plus reproductible que le nombre de cellules. Cependant, on montre clairement que la toxicité évaluée avec le volume cellulaire est moins sensible que lorsque l'on utilise le nombre de cellules. Comme explication à ces résultats, nous émettons l'hypothèse que de faibles variations de la sensibilité de la division cellulaire au Cd (variabilité inter-expérimentale) pourrait résulter en de grandes différences d'accumulation de Cd par cellule à cause de l'effet important du volume cellulaire dictant le taux d'accumulation des métaux traces (le volume cellulaire varie à la puissance trois du rayon cellulaire). En effet, intuitivement, un volume cellulaire plus grand (en faisant l'hypothèse d'une augmentation proportionnelle du volume de chaque compartiments intracellulaires tels les organites ou les transporteurs et autres structures reliés à la membrane cellulaire) demanderait une plus grande quantité de métaux essentiels afin de soutenir le métabolisme cellulaire et maintenir autant que possible les ratios intracellulaires métal : carbone constants. L'accumulation d'un métal non essentiel chez *C. reinhardtii* comme le Cd, qui devrait partager les mêmes systèmes de transport que d'autres métaux essentiels, pourrait bien être stimulée d'une façon concomitante.

4.2 Effets des métaux traces et du calcium sur l'accumulation et la toxicité du cadmium après 60 heures d'exposition

4.2.1 Acclimatation au milieu de base LM

Notons premièrement que chez les algues pré-acclimatées au milieu LM, une augmentation des concentrations de métaux traces essentiels (sauf le Cu) ou de calcium *en absence de Cd* n'avait pas d'influence significative sur la croissance de l'algue (résultats présentés à la Fig. S1 de l'article 1). Ces résultats indiquent que la croissance de l'algue n'était pas limitée par la présence de ces cations. Pour ce qui est du Cu, une augmentation de la $[Cu^{2+}]$ de 10^{-14} à 10^{-13} M en absence de Cd inhibait déjà la croissance algale en termes de nombre de cellules ou de biovolume cellulaire par respectivement $49 \pm 7\%$ et $30 \pm 3\%$. Cette forte toxicité du Cu est surprenante, considérant que des EC_{30} d'environ 400 nM Cu^{2+} (pH 6,8) ont été obtenues chez

C. reinhardtii par Macfie et al. (1994). Il faut cependant souligner qu'un milieu de culture relativement riche en métaux traces, le milieu HSM modifié, fut utilisé dans l'étude de Macfie et al. (1994). Ainsi, une explication possible, mais pour le moment hypothétique, pourrait être que le Cu exerce une toxicité particulièrement forte en présence de faibles concentrations de métaux essentiels compétiteurs tels les concentrations prescrites dans le milieu MSHM-LM.

Les effets du Zn^{2+} , du Co^{2+} , du Fe^{3+} , du Mn^{2+} , du Cu^{2+} ainsi que du Ca^{2+} sur la toxicité et l'accumulation du Cd ($[Cd^{2+}]$ fixe de 7×10^{-9} M) sont montrés aux figures 4, 5, 6 et 7 (Objectif 1). Il est montré qu'une augmentation d'un facteur 100 de la $[Fe^{3+}]$ ou d'un facteur 200 de la $[Mn^{2+}]$ n'affecte pas l'accumulation (Fig. 6 et 7) ni la toxicité (Fig. 4 et 5) du Cd. Ce résultat est conforme aux prédictions du MLB attestant que les métaux traces essentiels ont un effet négligeable sur l'accumulation et la toxicité des métaux non essentiels. Cependant, contrairement aux prédictions du MLB, une augmentation d'un facteur 100 des concentrations de Zn^{2+} ou de Co^{2+} inhibaient significativement l'accumulation (Fig. 6 et 7) et la toxicité (en termes du nombre de cellules; Fig.4) du Cd. Sunda et Huntsman (1998a, 2000) ont aussi montré chez quelques diatomées marines que le Zn^{2+} et le Co^{2+} peuvent inhiber l'accumulation du Cd. Dans le cas de leurs études, le Zn et le Co affectait la synthèse des systèmes de transport (V_{max}) en plus de compétitionner pour l'accumulation du Cd. Pour ce qui est de l'effet observé dans cette étude chez l'algue d'eau douce *C. reinhardtii*, les mécanismes précis à l'origine de cette inhibition de l'accumulation et de la toxicité du Cd par le Zn^{2+} et le Co^{2+} seront étudiés dans les sections suivantes (Objectif 2).

Pour une concentration de Cd^{2+} fixe de 7×10^{-9} M, l'inhibition moyenne de la croissance algale (normalisée par rapport au nombre de cellules; Fig. 4) de même que l'accumulation de Cd (Fig. 6) augmentait significativement d'environ un facteur deux pour une augmentation d'un facteur 10 de la $[Cu^{2+}]$. Cet effet apparemment synergique du Cu pourrait s'expliquer par son effet toxique. Le Cu inhibait le rendement en termes de nombre de cellules par un facteur 2.0 ± 0.7 (en tenant compte de la propagation d'erreur). À condition que le taux d'accumulation du Cd demeure constant en présence d'une plus forte concentration de Cu^{2+} , la

toxicité du Cu diminuera la biodilution du Cd internalisé. Cela augmentera donc l'accumulation et la toxicité du Cd en présence d'une $[Cu^{2+}]$ dix fois plus élevée. Notons cependant qu'il est difficile d'établir quantitativement avec certitude l'effet précis du Cu sur la biodilution du Cd *par cellule* et sa toxicité (*normalisée par nombre de cellules*) puisque la taille des cellules change au cours de l'exposition et qu'un état stationnaire au niveau des concentrations de Cd internalisées *par cellule* ne sera vraisemblablement pas atteint au cours de l'expérience. Nos résultats suggèrent quand même qualitativement que l'effet modulateur du Cu sur la biodilution du Cd internalisé et sa toxicité pourrait expliquer au moins partiellement l'effet synergique du Cu sur la toxicité du Cd. Une interaction synergique entre le Cu et le Cd internalisés pourrait aussi moduler la toxicité résultante du mélange Cu-Cd tel que montré par Franklin et al. (2002) chez l'algue tropicale *Chlorella* sp. Toutefois, notre plan expérimental ne permet pas de quantifier précisément cet effet synergique potentiel.

Une augmentation de la $[Ca^{2+}]$ d'un facteur 50 protégeait aussi contre la toxicité (en termes de nombre de cellules; Fig. 4) et l'accumulation du Cd (Fig. 6 et 7). Le niveau de protection de l'accumulation moyenne de Cd par cellule était d'environ un facteur 2.9 (Fig. 7). Cette diminution des quotas intracellulaires de Cd diminuerait la toxicité moyenne du Cd au niveau du nombre de cellules d'environ un facteur 2.8 d'après la courbe dose-réponse de la figure 3C de l'article 1. Cet effet protecteur de la toxicité moyenne du Cd d'un facteur 2.8 prédit avec la relation dose-réponse est relativement proche de l'effet protecteur du Ca sur la toxicité moyenne du Cd (d'un facteur d'environ 2.6) mesuré expérimentalement à la figure 4. Cette dernière observation suggère donc que la toxicité du Cd en présence de deux $[Ca^{2+}]$ différentes est reliée à la quantité de Cd internalisé par cellule. L'effet du Ca sur les mécanismes d'accumulation du Cd sera étudié plus en détail dans les prochaines sections (Objectif 2) afin de vérifier précisément la justesse de la prémisse actuelle du MLB, en l'occurrence, que le Ca inhibe l'accumulation du Cd d'une façon strictement compétitive.

4.2.2 Pré-acclimatation à différentes concentrations de métaux traces

Les figures 4 à 7 montrent clairement que les effets des métaux traces essentiels sur l'accumulation et la toxicité du Cd ne sont pas influencés par une pré-acclimatation de l'algue à une concentration élevée ou faible des cinq micronutriments étudiés séparément. Les résultats montrent donc qu'une possible acclimatation ou même adaptation de *C. reinhardtii* à long terme en réponse à la disponibilité des métaux traces essentiels n'affecte pas l'accumulation et la toxicité du Cd chez cette algue pour des expositions à long terme. Les effets à long terme d'une acclimatation aux métaux essentiels sur l'accumulation et la toxicité d'un métal non essentiel chez le phytoplancton sont très peu documentés dans la littérature. Hassler et al. (2005) ont montré que le taux d'accumulation du Zn à court terme (<30 min) chez l'algue verte d'eau douce *C. kesslerii* était fortement modulé par la $[Zn^{2+}]$ (de 10^{-11} ou 10^{-9} M Zn^{2+}) lors d'une exposition de quelques jours (jusqu'à la moitié de la phase exponentielle de croissance), mais l'effet de l'acclimatation au Zn^{2+} demeurait similaire même après une acclimatation de plus de 30 à 40 jours (16 à 19 cycles de croissance cellulaire), suggérant que l'acclimatation de cette algue au Zn^{2+} a lieu relativement rapidement (échelle de temps de jours ou d'heures au lieu de semaines). On peut donc déduire que l'accumulation de n'importe quel autre métal non essentiel par les transporteurs de Zn ne serait pas influencée par de tels changements des conditions antérieures de croissance.

4.3 Cinétique d'accumulation du Cd et du Zn à court terme

Chez les algues cultivées au préalable dans le milieu LM pendant plus de dix générations, les taux d'accumulation du Cd et du Zn mesurés lors d'expositions à court terme (30 à 45 min) en fonction respectivement de la $[Cd^{2+}]$ et de la $[Zn^{2+}]$ suggèrent la présence de trois différents types de sites membranaires ou systèmes de transport pour les deux métaux (Fig. 8 et 9). En effet, les taux d'accumulation du Cd peuvent être modélisés avec l'équation du MLB (éq. 11) ($R^2 = 0.98$) en incluant trois systèmes de transport indépendants (nommés Cd-1, Cd-2 et Cd-3) de différentes capacités et affinités ($K_{Cd-1}^{Cd} = 10^{4.87 \pm 0.06} M^{-1}$, $K_{Cd-2}^{Cd} = 10^{7.60 \pm 0.07} M^{-1}$, $K_{Cd-3}^{Cd} =$

$10^{8.80 \pm 0.09} \text{ M}^{-1}$) (Fig. 5). Notons que l'accumulation du Cd augmentait d'une façon linéaire de 15 à 120 minutes (Annexe C), ce qui justifie le calcul des taux d'accumulation du Cd (Fig. 8) à l'aide d'un seul temps d'exposition de 30 à 45 min.

Le modèle d'accumulation du Cd obtenu dans cette thèse diffère de celui publié par Kola et Wilkinson (2005) avec la même espèce d'algue. Ces derniers auteurs ont montré que l'accumulation du Cd est réalisée par un site de transport saturant autour de $10^{-4} \text{ M Cd}^{2+}$ avec un K_{Cd} de 10^6 M^{-1} . Des différences de pré-acclimatation des cellules avant les mesures de taux d'internalisation de Cd pourraient peut-être expliquer les divergences observées entre notre étude et celle de Kola et Wilkinson (2005). En effet, Kola et Wilkinson (2005) ont utilisé le milieu de culture TAP tandis que le milieu LM fut utilisé dans cette thèse. Le milieu TAP contient des concentrations libres de métaux traces essentiels deux à trois ordres de grandeur plus élevées que le milieu LM. Les concentrations de Ca^{2+} et de Mg^{2+} sont aussi environ 10 fois plus élevées dans le milieu TAP que dans le milieu LM.

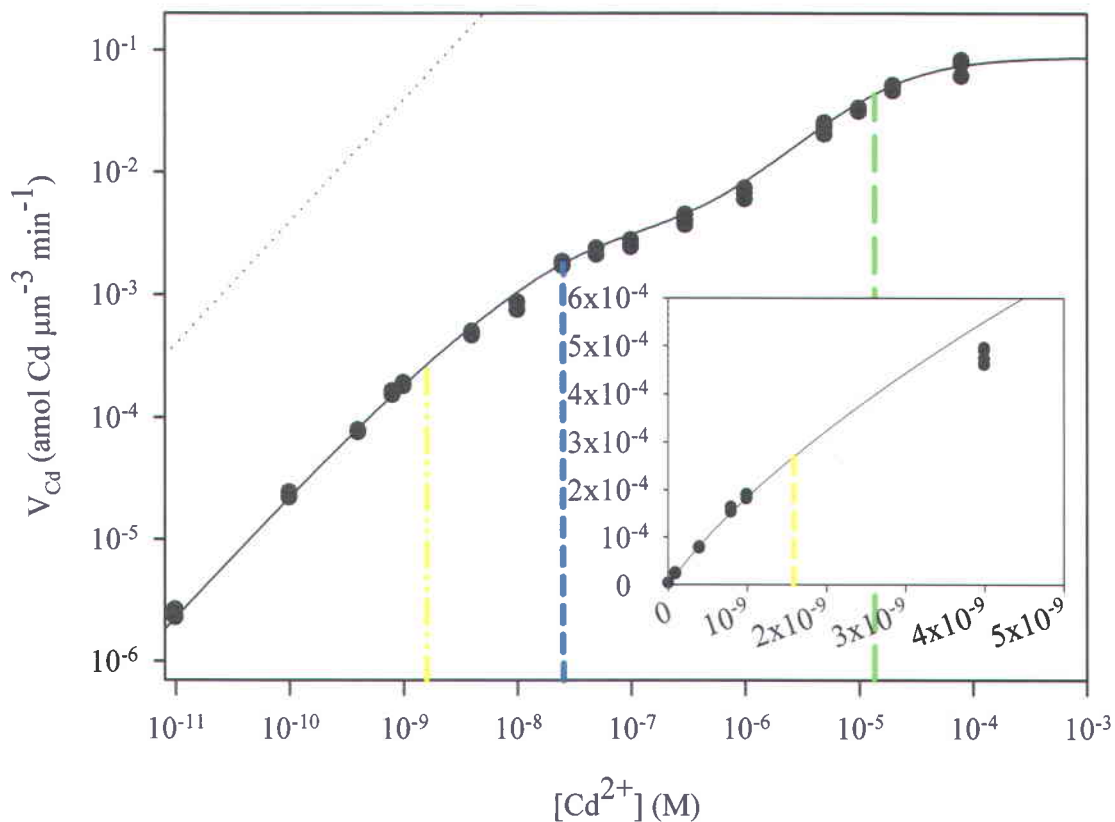


Figure 8 : Taux d'internalisation (V_{Cd}) du Cd ($\text{amol Cd } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$) à court terme (30 à 45 min d'exposition) en fonction de la concentration de Cd^{2+} (M). Les algues étaient pré-acclimatées au milieu LM avant l'expérience. La ligne pointillée représente le taux diffusif maximal calculé de l'ion libre Cd^{2+} . La courbe modélisée est une régression non linéaire utilisant l'éq. (11) et indique la présence de trois sites de transport différents (Cd-1, Cd-2, Cd-3). Les prédictions de V_{Cd} et la modélisation des paramètres cinétiques de chacun des systèmes de transport prenaient en considération la constante $K_{Cd-1}^{Ca} = 10^{4.02 \pm 0.14} \text{ M}^{-1}$ mais la constante $K_{Cd-2}^{Cd} = 10^{2.62 \pm 0.16} \text{ M}^{-1}$ n'affectait pas significativement les taux d'internalisation. La constante K_{Cd-3}^{Ca} est inconnue. Les lignes verticales sous formes de tirets courts espacés par deux points (jaunes), de tirets courts (bleus) et de tirets longs (verts) montrent les concentrations de Cd^{2+} où, respectivement, les systèmes de transport Cd-3, Cd-2 et Cd-1 sont à demi saturés ($[\text{Cd}^{2+}] = 1 / K_{Cd}$).

Les taux d'internalisation du Zn en fonction de la $[Zn^{2+}]$ (Fig. 9) peuvent être modélisés avec un modèle incluant deux sites de transport ($R^2 = 0.99$) avec des constantes d'affinité K_{Zn-1}^{Zn} et K_{Zn-2}^{Zn} respectivement égales à $10^{5.13 \pm 0.08} M^{-1}$ et $10^{7.43 \pm 0.05} M^{-1}$. Les taux d'internalisation du Zn à des $[Zn^{2+}]$ plus faibles qu'environ $10^{-9} M$ suggèrent la présence d'un troisième système de transport de Zn. L'accumulation du Zn par ce système semble très fortement régulée (sur une échelle de temps courte, i.e. < 45 min; voir les résultats plus bas pour plus de détails à ce sujet) par l'algue et l'application du modèle (éq. 11) ne donnait pas de résultats significatifs. On peut toutefois conclure dès maintenant que la similarité frappante entre les courbes des taux d'accumulation du Cd et du Zn en fonction de la concentration de l'ion libre suggère déjà un lien étroit entre l'accumulation de ces deux métaux. Les résultats présentés aux sections suivantes vont clarifier les interactions entre le Cd, le Zn et la surface algale.

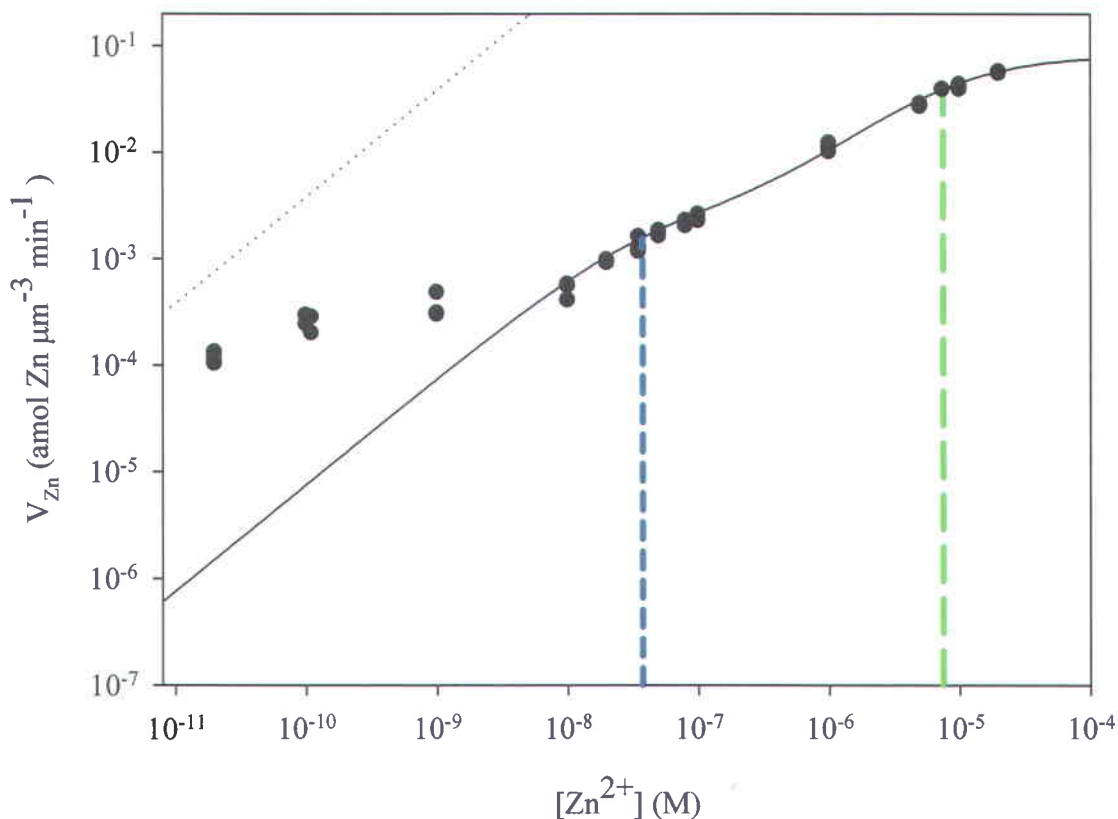


Figure 9 : Taux d'internalisation (V_{Zn}) du Zn ($\text{amol Zn } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$) à court terme (30 à 45 min d'exposition) en fonction de la concentration de Zn^{2+} (M). Les algues étaient pré-acclimatées au milieu LM avant l'expérience. La ligne pointillée représente le taux diffusif maximal calculé de l'ion libre Zn^{2+} . La courbe modélisée est une régression non linéaire utilisant l'éq. (11) et indique la présence de deux sites de transport différents (Zn-1 et Zn-2). Les paramètres cinétiques de la troisième région de la courbe pour les $[\text{Zn}^{2+}] < 10^{-8}$ M, obtenus avec l'éq. (11) n'étaient pas statistiquement significatifs et n'ont donc pu être modélisés. Les prédictions de V_{Zn} ainsi que les paramètres cinétiques des deux systèmes de transport prenaient en considération la constante $K_{Zn-1}^{\text{Ca}} = 10^{3.93 \pm 0.09} \text{ M}^{-1}$ mais pas la constante $K_{Zn-2}^{\text{Ca}} = 10^{2.60 \pm 0.05} \text{ M}^{-1}$ qui n'affectait pas significativement les taux d'internalisation. La constante K_{Zn-3}^{Ca} est inconnue. Les lignes verticales sous formes de tirets courts (bleus) et de tirets longs (verts) démontrent les concentrations de Zn^{2+} où, respectivement, les systèmes de transport Zn-2 et Zn-1 sont à demi saturés ($[\text{Zn}^{2+}] = 1 / K_{Zn}$).

4.3.1 Effets des cations compétiteurs sur l'accumulation du Cd et du Zn

Plusieurs éléments de preuve émanant des expériences de liaison compétitive de différents cations (Fig. 10) aux systèmes de transport du Zn ou du Cd suggèrent que les deux métaux sont en fait accumulés par les mêmes systèmes de transport. Les trois points ci-dessous décrivent ces éléments de preuve pour ce qui est des systèmes de transport de faible affinité (Zn-1 ou Cd-1) ou d'affinité intermédiaire (Zn-2 ou Cd-2).

1) les constantes de stabilité du Ca pour les systèmes de transport Zn-1 ($K_{Zn-1}^{Ca} = 10^{3.93 \pm 0.09} M^{-1}$) et Cd-1 ($K_{Cd-1}^{Ca} = 10^{4.02 \pm 0.14} M^{-1}$) ainsi que pour les systèmes Zn-2 ($K_{Zn-2}^{Ca} = 10^{2.60 \pm 0.05} M^{-1}$ et $10^{2.71 \pm 0.06} M^{-1}$ pour les expositions respectivement de 3 et 30 min) et Cd-2 ($K_{Cd-2}^{Ca} = 10^{2.62 \pm 0.16} M^{-1}$) n'étaient pas significativement différentes (sur la base d'une comparaison des intervalles de confiance);

2) la constante d'affinité du Zn pour le système de transport Cd-1 ($K_{Cd-1}^{Zn} = 10^{4.97 \pm 0.06} M^{-1}$) était très près de la constante d'affinité du Zn pour le système de transport Zn-1 ($K_{Zn-1}^{Zn} = 10^{5.13 \pm 0.08} M^{-1}$). Cependant, la constante moyenne K_{Cd-2}^{Zn} ($10^{6.95 \pm 0.11} M^{-1}$ obtenu pour l'exposition de 3 min) était plus faible que la constante moyenne K_{Zn-2}^{Zn} ($10^{7.43 \pm 0.05} M^{-1}$). Nous émettons l'hypothèse que les différences entre ces deux dernières constantes pourraient s'expliquer par une acclimatation très rapide de l'algue à une $[Zn^{2+}]$ élevée (la constante apparente K_{Cd-2}^{Zn} diminuait effectivement de plus d'un ordre de grandeur pour une exposition de 30 min relativement à 3 min; voir discussion dans l'article 2 à propos des interactions rapides entre le Cd et le Zn);

3) la constante de stabilité du Cd pour le système de transport Zn-1 ($K_{Cd-1}^{Zn} = 10^{5.07 \pm 0.06} M^{-1}$) était similaire à la constante d'affinité du Cd pour le système de transport Cd-1 ($K_{Cd-1}^{Cd} = 10^{4.91 \pm 0.02} M^{-1}$) et les constantes K_{Zn-2}^{Cd} ($10^{7.53 \pm 0.09} M^{-1}$ pour l'exposition de 3 min) et K_{Cd-2}^{Cd} ($10^{7.60 \pm 0.07} M^{-1}$) étaient aussi similaires.

La présente étude suggère aussi que les systèmes de transport Cd-3 et Zn-3 sont les mêmes systèmes puisque la constante d'affinité du Cd pour le système de transport Zn-3 ($K_{Zn-3}^{Cd} = 10^{8.81 \pm 0.08} M^{-1}$) était quasi-équivalente à la constante de stabilité du Cd pour le système Cd-3 ($K_{Cd-3}^{Cd} = 10^{8.80 \pm 0.09} M^{-1}$). Il faut noter que K_{Zn-3}^{Cd} et K_{Cd-3}^{Cd} sont toutes les deux des constantes conditionnelles à la présence de $2 \times 10^{-5} M Ca^{2+}$ (i.e. les affinités du Ca pour ces deux systèmes de transport étaient inconnues et n'étaient donc pas incorporées dans nos calculs). De plus, il est possible que K_{Zn-3}^{Cd} soit sous-estimée puisque nous n'avons pas pris en considération le terme $K_{Zn-3}^{Zn} [Zn^{2+}]$ (où K_{Zn-3}^{Zn} n'est pas connu précisément) dans le calcul de la constante d'affinité K_{Zn-3}^{Cd} . Toutefois, l'incorporation d'une K_{Zn-3}^{Zn} hypothétique de $10^{10.5} M^{-1}$ ne changerait que peu la K_{Zn-3}^{Cd} , qui atteignait $10^{8.90 \pm 0.08} M^{-1}$, ce qui suggère que la K_{Zn-3}^{Cd} est raisonnablement précise.

Puisque l'algue posséderait la capacité de réguler le fonctionnement des sites de transport Zn-3, on pourrait s'attendre à ce que, en présence d'une compétition entre le Zn et le Cd, les cellules algales régulent à la hausse leurs systèmes de transport Zn-3 à l'intérieur de l'exposition à court terme afin de maintenir le taux d'accumulation de Zn aussi constant que possible. Une telle régulation physiologique de l'accumulation du Zn n'apparaît pas (sur une courte échelle de temps) en présence d'une augmentation de l'effet compétitif du Cd sur l'accumulation du Zn par le système Zn-3, puisque l'adéquation entre les courbes modélisées (éq. 12) et les données expérimentales était significative (i.e. les constantes du modèle étaient significativement différentes de 0 et le R^2 des régressions étaient très élevées) et puisque les constantes K_{Zn-3}^{Cd} et K_{Cd-3}^{Cd} étaient quasi-identiques. Nous émettons donc l'hypothèse que le Cd inhibe les processus de régulation à la hausse des systèmes de transport Zn-3. Ainsi, cette régulation à la hausse des systèmes de transport Zn-3 pourrait être plus lente lors d'exposition au Cd^{2+} que pour les expositions au Zn^{2+} seul, ce qui expliquerait que les cellules demeureraient incapables de maintenir des taux d'accumulation de Zn constants lors d'exposition au Cd^{2+}/Zn^{2+} à l'instar des expositions au Zn^{2+} seulement.

Les constantes d'affinité de différents cations compétiteurs mesurées dans cette étude sont comparables à celles déterminées dans la littérature. Nos constantes d'affinité du Ca et du Zn pour les sites de transport Cd1 ($K_{Cd-1}^{Ca} = 10^{4.02 \pm 0.14} M^{-1}$; $K_{Cd-1}^{Zn} = 10^{4.97 \pm 0.06} M^{-1}$) (Fig. 10) sont relativement près de celles déterminées par Kola et Wilkinson (2005) ($K_{Cd}^{Ca} = 10^{4.5} M^{-1}$; $K_{Cd}^{Zn} = 10^{5.2} M^{-1}$) chez *Chlamydomonas reinhardtii* (souche sauvage 2137) pour une exposition à $4-5 \times 10^{-7} M Cd^{2+}$ pendant 30 min et à différentes $[Zn^{2+}]$ ou $[Ca^{2+}]$. Ces derniers auteurs ont aussi estimé une constante de stabilité du Mg (K_{Cd}^{Mg}) pour les sites de transport du Cd beaucoup plus faible que $10^5 M^{-1}$, ce qui est cohérent avec les faibles constantes d'affinité du Mg mesurées dans notre étude pour les systèmes de transport Cd-1 ($K_{Cd-1}^{Mg} = 10^{3.14 \pm 0.06} M^{-1}$) et Cd-2 ($K_{Cd-2}^{Mg} = 10^{2.56 \pm 0.08} M^{-1}$).

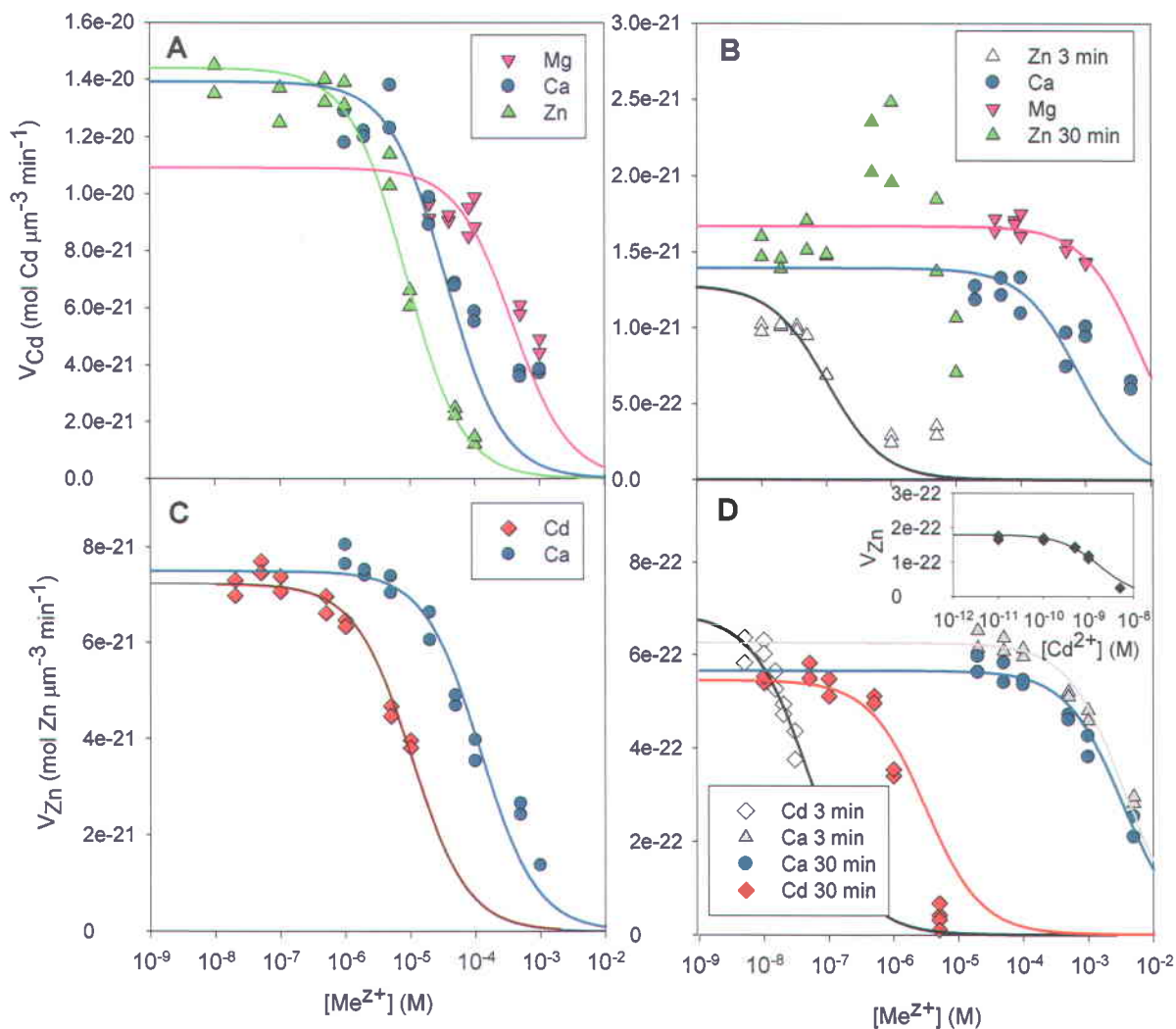


Figure 10 : Taux d'internalisation à court terme (30 min, sauf indication contraire) du Cd (V_{Cd}) via les systèmes de transport Cd-1 (10^{-6} M Cd^{2+}) (A) ou Cd-2 (2×10^{-8} M Cd^{2+}) (B) en fonction de différentes concentrations de cations compétiteurs (expositions de 3 et 30 min Zn^{2+} présentées respectivement par les triangles verts et blancs; Ca^{2+} cercles bleus; Mg^{2+} triangles roses). Les courbes modélisées représentent les régressions utilisant l'éq. (11) et incluant la K_{Cd-1}^{Ca} déterminée ici, et $K_{Cd-2}^{Cd} = 10^{7.6}$. Taux d'accumulation à court terme (30 min, sauf indication contraire) du Zn (V_{Zn}) via les systèmes de transport Zn-1 (10^{-6} M Zn^{2+}) (C) ou Zn-2 (2×10^{-8} M Zn^{2+}) (D) en fonction de différentes concentrations de cations compétiteurs (les expositions de 3 et 30 min au Cd^{2+} présentées respectivement par les diamants blancs et rouges; expositions de 3 et 30 min au Ca^{2+} présentées respectivement par les triangles gris et les cercles bleus). Les courbes modélisées représentent les régressions utilisant l'éq. (11) et incluant la K_{Zn-1}^{Ca} déterminée ici et $K_{Zn-2}^{Zn} = 10^{7.4}$. Le médaillon à la figure D montre les taux d'accumulation du Zn via le système Zn-3 en présence de différentes concentrations de Cd^{2+} et de $1,5 \times 10^{-11}$ M Zn^{2+} . La courbe modélisée fut aussi obtenue avec l'éq. (12).

4.3.2 Effets d'une pré-acclimatation au Zn et au Cd

Les résultats de la figure 11 montrent qu'une pré-acclimatation à différentes concentrations de Zn^{2+} et de Cd^{2+} affecte fortement la cinétique d'accumulation à court terme du Cd et du Zn chez *C. reinhardtii*. Cette modulation des taux d'accumulation était principalement réalisée par un changement des capacités ($V_{\max-i}^{Me}$) des systèmes de transport du Zn et du Cd. Pour des concentrations d'acclimatation données de Zn^{2+} et de Cd^{2+} , les $V_{\max-i}^{Me}$ des systèmes de transport Zn-1 et Cd-1 ou Zn-2 et Cd-2 n'étaient pas statistiquement différents (Fig. 11; $V_{\max-i}^{Me}$ moyens \pm erreur-type disponibles dans l'article 2), ce qui est aussi compatible avec la présence de deux systèmes de transport partagés par le Zn et le Cd.

Les taux maximaux d'accumulation de Cd ($V_{\max-i}^{Cd}$) et de Zn ($V_{\max-i}^{Zn}$) des systèmes de transport Cd-1, Zn-1, Cd-2, Zn-2 et Cd-3 diminuaient significativement de 30 à 44% chez les cellules algales acclimatées sans ajout de Cd à 10^{-9} M Zn^{2+} comparativement à 10^{-11} M Zn^{2+} (Fig. 11). Cette régulation à la baisse du $V_{\max-i}^{Me}$ serait due à une inactivation/dégradation des systèmes de transport membranaires (S_T) et/ou une diminution de la constante de vitesse d'accumulation des métaux (k_{in}). Les taux d'accumulation de Zn par le système de transport Zn-3 (i.e. pour les $[Zn^{2+}] < 10^{-9}$ M) pour les algues acclimatées à une faible $[Zn^{2+}]$ (1 à 5×10^{-4} mol Zn μm^{-3} min $^{-1}$) étaient aussi très élevés comparativement à ceux mesurés chez les algues acclimatées à une forte $[Zn^{2+}]$ (< limite de détection, i.e. $< 6 \times 10^{-6}$ mol Zn μm^{-3} min $^{-1}$) (Fig. 11B). Cette régulation importante de l'accumulation du Zn est conforme aux résultats obtenus par d'autres équipes de recherche. Les systèmes de transport de haute affinité du Zn chez l'algue d'eau douce *Chlorella keslerii* (Hassler et Wilkinson 2003, Hassler et al. 2005) ainsi que chez des diatomées marines et une coccolithophore (Sunda et Huntsman 1992) sont reconnus pour être fortement régulés à la baisse ou à la hausse (jusqu'à un facteur 100) en réponse aux changements de $[Zn^{2+}]$ d'acclimatation. Cette capacité d'acclimatation au Zn^{2+} ferait en sorte de moduler aussi par inadvertance l'accumulation de Cd. En effet, les taux d'accumulation du Cd chez la diatomée marine *T. pseudonana* (Sunda et Huntsman 1998a) et

la coccolithophore *Emiliana huxleyi* (Sunda et Huntsman 2000) peuvent aussi être inhibé de façon compétitive et non compétitive par une augmentation de la $[Zn^{2+}]$.

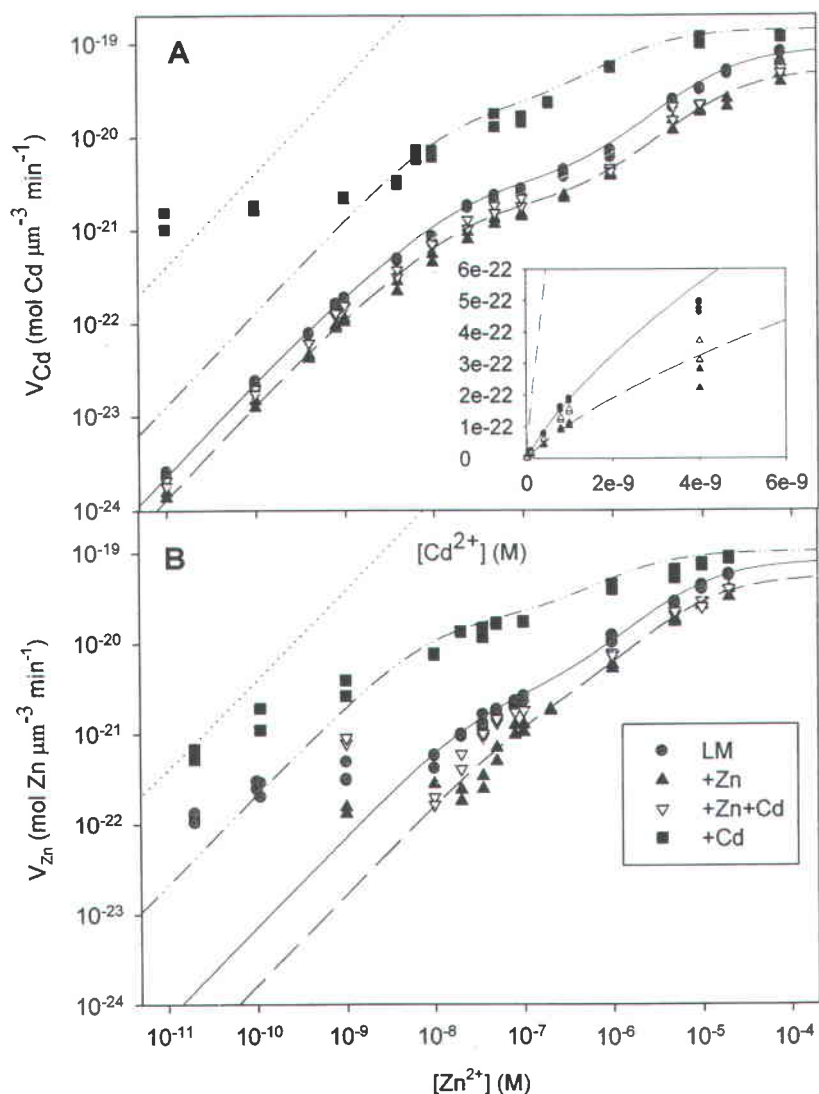


Figure 11 : Taux d'intérialisation (V_{Cd}) du Cd (A) ou (V_{Zn}) du Zn (B) ($\mu\text{mol Cd}$ ou $\text{Zn } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$) à court terme (30 à 45 min d'exposition) en fonction de la concentration de Cd^{2+} (M). Les algues étaient pré-acclimatées à quatre milieux de culture différents : LM (cercles verts), +Cd (carrés rouges), +Zn (triangles bleus vers le haut), +Zn+Cd (triangles jaunes vers le bas) avant l'expérience d'exposition. Les lignes pointillées représentent les taux diffusifs maximaux calculés de l'ion libre Cd^{2+} (A) ou Zn^{2+} (B). Les courbes modélisées (optimisées par la méthode des moindres carrés avec éq. 11) sous forme de traits verts continus, de tiret-pointillés rouges, de longs tirets bleus et de courts tirets jaunes correspondent respectivement aux algues pré-acclimatées aux milieux LM, +Cd, +Zn et +Zn+Cd. Les régressions non linéaires imposent un $K_{Cd-1}^{Ca} = 10^{4.02 \pm 0.14} \text{ M}^{-1}$ et un $K_{Zn-1}^{Ca} = 10^{3.93 \pm 0.09}$; l'inclusion des K_{Cd-2}^{Ca} et K_{Zn-2}^{Ca} n'influençaient pas significativement l'accumulation respective de Cd et de Zn. Les coefficients de détermination (R^2) étaient plus grand que 0,95 sauf pour les taux d'intérialisation de Zn chez les algues acclimatées au milieu +Cd où $R^2 = 0.80$. Les paramètres cinétiques (V_{max-i}^{Me} et K_{Me-i}^{Me}) des trois systèmes de transport de Cd (Cd-1, Cd-2 et Cd-3) ainsi que des deux systèmes de transport de Zn (Zn-1 et Zn-2) sont présentés au tableau 1 de l'article 2.

Une pré-acclimatation à une $[Zn^{2+}]$ élevée (10^{-9} M Zn^{2+}) en combinaison avec 7×10^{-9} M Cd^{2+} menait à une augmentation du V_{max-i}^{Me} moyen de 30 à 40% (par rapport aux algues acclimatées au milieu +Zn) pour l'accumulation du Zn et du Cd via les systèmes de transport Cd-1, Cd-2, Zn-2 et Cd-3. Toutefois, seulement l'augmentation du V_{max-2}^{Zn} était statistiquement significative. Cette rétroaction positive du Cd contrebalance approximativement la diminution du taux d'accumulation du Cd/Zn causée par une pré-acclimatation à une $[Zn^{2+}]$ élevée (10^{-9} M Zn^{2+}) sans ajout de Cd (Fig. 11). La rétroaction positive du Cd sur l'accumulation du Cd était beaucoup plus importante pour les algues acclimatées à 7×10^{-9} M Cd^{2+} , mais en combinaison avec une faible $[Zn^{2+}]$ (10^{-11} M Zn^{2+}). En effet, pour les algues acclimatées au préalable à 7×10^{-9} M Cd^{2+} et 10^{-11} M Zn^{2+} , les taux d'accumulation via les systèmes de transport Zn-2/Cd-2 et Zn-3/Cd-3 augmentaient dramatiquement par rapport aux taux mesurés chez les algues acclimatées au milieu LM. Plus précisément, les V_{max-2}^{Cd} et V_{max-2}^{Zn} moyens étaient régulés à la hausse respectivement d'un facteur 6,3 et 7,6 par rapport aux V_{max-2}^{Me} des algues pré-acclimatées au milieu LM. Les taux d'accumulation de Zn et de Cd par les systèmes de transport Zn-3/Cd-3 étaient aussi fortement régulés à la hausse, jusqu'au point où les taux d'accumulation du Zn et du Cd approchaient la limite prédite de la diffusion des ions libres (Fig. 11). À la lumière de ces résultats, il est clair que l'ajout de Zn inhibe le mécanisme de rétroaction positive du Cd sur l'accumulation du Cd.

Parmi les différentes constantes d'affinité du Cd et du Zn, seulement la K_{Cd-1}^{Cd} diminuait significativement en réponse à une pré-acclimatation à 7×10^{-9} M Cd^{2+} en combinaison avec la faible $[Zn^{2+}]$ et la K_{Zn-2}^{Zn} diminuait significativement à la forte $[Zn^{2+}]$ (10^{-9} M Zn^{2+}) d'acclimatation (Fig. 11). De telles modifications des constantes d'affinité sont habituellement attribuées à des changements de conformations ou de types de système de transport. Il semble donc que les algues acclimatées à 7×10^{-9} M Cd^{2+} ne régulent pas seulement à la hausse le V_{max-1}^{Cd} , mais aussi la K_{Cd-1}^{Cd} , qui augmente de $10^{4.87 \pm 0.06} M^{-1}$ à $10^{5.70 \pm 0.10} M^{-1}$. Notons que la K_{Zn-1}^{Zn} tend aussi à augmenter en réponse à l'acclimatation à 7×10^{-9} M Cd^{2+} . Cette augmentation de la K_{Zn-1}^{Zn} et de la K_{Cd-1}^{Cd} serait compatible avec la présence d'un seul système de transport Cd-1/Zn-1. Cependant, la variabilité dans les données et le faible nombre de mesures nous empêchaient d'évaluer précisément la significativité de cette différence.

L'induction d'une diminution de K_{Zn-2}^{Zn} (de $10^{7.43 \pm 0.05} M^{-1}$ à $10^{6.90 \pm 0.09} M^{-1}$), mais pas de K_{Cd-2}^{Cd} (de $10^{7.60 \pm 0.07} M^{-1}$ à $10^{7.59 \pm 0.08} M^{-1}$) chez des algues pré-acclimatées aux milieux +Zn au lieu du milieu LM (Fig. 11) est la seule indication d'une implication possible de deux systèmes de transport avec des affinités pour le Cd similaires, mais différentes pour le Zn. Alternativement, étant donné la différence de rayon ionique entre le Zn^{2+} et le Cd^{2+} , il est possible que le changement du système de transport soit suffisamment petit pour affecter la liaison d'un métal (Zn^{2+}), mais pas l'autre (Cd^{2+}).

4.3.3 Capacité des cellules à minimiser la toxicité du Cd et à réguler l'accumulation du Zn

À notre connaissance, aucune autre étude n'a démontré une telle rétroaction positive du Cd sur l'accumulation du Cd qui interagit avec la $[Zn^{2+}]$ d'exposition. Il semble que cette rétroaction positive du Cd soit intimement liée à la capacité de l'algue à réguler l'accumulation du Zn. En effet, d'après les expériences d'exposition au Zn à court terme (Fig. 11B) et l'absence d'effets toxiques au niveau du volume cellulaire (Fig. 5) en présence d'une relativement forte $[Cd^{2+}]$ (7×10^{-9} M Cd^{2+}) lors des expériences à long terme, le Cd n'inhiberait pas fortement la capacité des cellules de *C. reinhardtii* à maintenir le taux d'accumulation du Zn à un niveau suffisant pour la croissance.

Le raisonnement suivant démontre bien la capacité de *C. reinhardtii* à réguler l'accumulation du Zn au cours d'une exposition à long terme (60 h). La stimulation importante des taux d'accumulation du Zn à court terme (mesurés en absence de Cd; Fig. 11B) via le système de transport Zn-3/Cd-3 pour les algues acclimatées au milieu LM + 7×10^{-9} M Cd^{2+} , lorsque l'on tient compte de la compétition du Cd pour l'accumulation du Zn ($K_{Zn-3}^{Cd} = 10^{8.81 \pm 0.08} M^{-1}$; Fig. 7), mène à un taux d'accumulation moyen calculé du Zn, en présence de 2×10^{-11} M Zn^{2+} , de $1,08 \times 10^{-22}$ mol Zn $\mu m^{-3} min^{-1}$. Ce taux d'accumulation calculé du Zn est similaire à celui mesuré lors d'exposition à court terme chez les algues acclimatées au milieu LM en présence de 2×10^{-11} M Zn^{2+} ($\approx 10^{-22}$ mol Zn $\mu m^{-3} min^{-1}$; voir Fig. 11B). Ce taux d'accumulation mesuré du Zn permet l'atteinte d'un taux de croissance optimal chez cette espèce. En régulant l'accumulation du Zn, les algues s'évitent d'être carencées en Zn en présence d'une faible $[Zn^{2+}]$ et d'une relativement forte $[Cd^{2+}]$, qui inhibe compétitivement l'accumulation du Zn. Ce mécanisme de rétroaction positive en présence de Cd permet aux cellules de maintenir des quotas intracellulaires de Zn suffisant pour la croissance, mais augmente du même coup l'accumulation du Cd.

4.3.4 Effets d'une pré-acclimatation au Co, au Cd et aux autres métaux traces

Une pré-acclimatation au milieu +Co (10^{-9} M Co^{2+}) n'affectait pas de façon significative les taux d'accumulation du Cd via les systèmes de transport Cd-2 et Cd-3 par rapport aux algues pré-acclimatées au milieu LM (10^{-11} M Co^{2+}) (Fig. 12). Ces derniers résultats montrent que la seule hausse de la $[\text{Co}^{2+}]$, contrairement à celle du Zn^{2+} , n'induit pas de changements physiologiques mesurables sur la cinétique des systèmes de transport Cd-2 et Cd-3. Cependant, une pré-acclimatation à 10^{-9} M Co^{2+} et 7×10^{-9} M Cd^{2+} induisait une augmentation de 2,6 fois du $V_{\text{max-2}}^{\text{Cd}}$ moyen ($V_{\text{max-2}}^{\text{Cd}}$ atteignait $8.6 \pm 0.7 \times 10^{-21}$ mol Cd μm^{-3} min^{-1}) par rapport à celui obtenu chez les algues acclimatées au milieu LM ($V_{\text{max-2}}^{\text{Cd}} = 3,4 \pm 0,2 \times 10^{-21}$ mol Cd μm^{-3} min^{-1}) (Fig. 11A). Puisqu'il a été démontré précédemment que le $V_{\text{max-2}}^{\text{Cd}}$ moyen augmentait par 6,3 fois chez les algues pré-acclimatées au milieu LM (Fig. 11A), une acclimatation au Co inhibe donc le mécanisme de rétroaction positive du Cd sur l'accumulation du Cd. Cette inhibition de la rétroaction positive du Cd était cependant plus marquée lors d'une pré-acclimatation au Zn (Fig. 11A); le $V_{\text{max-2}}^{\text{Cd}}$ demeurait approximativement constant chez les algues acclimatées à 10^{-9} M Zn^{2+} et 7×10^{-9} M Cd^{2+} par rapport aux algues acclimatées à 10^{-11} M Zn^{2+} sans ajout de Cd, soit le milieu LM (Fig. 11A). On conclue donc que, comparativement au Co, le Zn est un meilleur inhibiteur du mécanisme de rétroaction positive du Cd sur l'accumulation du Cd chez *C. reinhardtii*. Nous émettons l'hypothèse que le Co posséderait une plus faible affinité que le Zn pour la liaison aux sites intracellulaires régulant la synthèse/l'activité des systèmes de transport membranaires, ce qui pourrait expliquer la différence observée entre l'effet du Zn et du Co sur la cinétique d'accumulation du Cd. Sunda et Huntsman (2000) ont aussi montré que l'accumulation du Cd est moins régulée à la hausse en présence de faibles $[\text{Co}^{2+}]$ que de faibles $[\text{Zn}^{2+}]$ chez la diatomée marine *Thalassiosira oceanica*, quoiqu'à des $[\text{Cd}^{2+}]$, $[\text{Co}^{2+}]$ et $[\text{Zn}^{2+}]$ beaucoup plus faibles, qui sont typiques du milieu marin (pour le Cd^{2+} et le Zn^{2+}).

Lorsque les concentrations de tous les métaux essentiels étaient augmentées en même temps dans le milieu d'acclimatation (et d'exposition) HM, la capacité du système de transport Cd-2

diminuait significativement d'environ 60% (atteignant $V_{\max-2}^{\text{Cd}} = 2.1 \pm 0.1 \times 10^{-21} \text{ mol Cd } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$) par rapport aux algues acclimatées au milieu LM (Fig. 12). Cette diminution était proche de la diminution moyenne de 40% du $V_{\max-2}^{\text{Cd}}$ rapportée précédemment lors d'une hausse de la $[\text{Zn}^{2+}]$ (sans ajout de Cd) dans le milieu d'acclimatation (Fig. 11A), suggérant que le Zn est le principal métal trace essentiel modulateur de la capacité du système de transport Cd-2. L'affinité du Cd pour ce dernier système de transport diminuait aussi de 3,8 fois ($p < 0,05$, sur la base de l'absence de chevauchement des intervalles de confiance des moyennes) chez les algues acclimatées et exposées au milieu HM ($K_{\text{Cd}-2}^{\text{Cd}} = 10^{7.08 \pm 0.13} \text{ M}^{-1}$) par rapport à celles acclimatées et exposées au milieu LM ($K_{\text{Cd}-2}^{\text{Cd}} = 10^{7.66 \pm 0.05} \text{ M}^{-1}$) (Fig. 12). Cette diminution de l'affinité du système de transport semblait se produire rapidement puisque la constante $K_{\text{Cd}-2}^{\text{Cd}}$ diminuait d'un facteur 2,7 (atteignant $10^{7.23 \pm 0.12} \text{ M}^{-1}$) chez les algues acclimatées au milieu LM, mais exposées directement au milieu HM en comparaison aux algues exposées et acclimatées au milieu LM (Fig. 12). Cette dernière diminution n'était pas statistiquement significative sur la base d'une comparaison des intervalles de confiance des constantes d'affinité moyennes, mais la tendance vers une diminution des taux d'accumulation de Cd lorsque la $[\text{Cd}^{2+}]$ diminue par rapport aux algues exposées et acclimatées au milieu LM est significative sur la base d'une ANOVA (interaction significative entre les deux variables indépendantes ou facteurs, étant la $[\text{Cd}^{2+}]$ et le milieu d'acclimatation). Cela est compatible avec une diminution rapide de l'affinité du Cd en réponse à une exposition à un milieu riche en métaux traces. En outre, l'absence de diminution significative du $V_{\max-2}^{\text{Cd}}$ chez les algues exposées au milieu HM (mais acclimatées au milieu LM) (Fig. 12) montre que la rétroaction négative des métaux traces sur la capacité du système de transport Cd-2 est relativement lente comme ce à quoi on s'attendrait dans le cas d'une induction de la synthèse/dégradation de transporteurs membranaires.

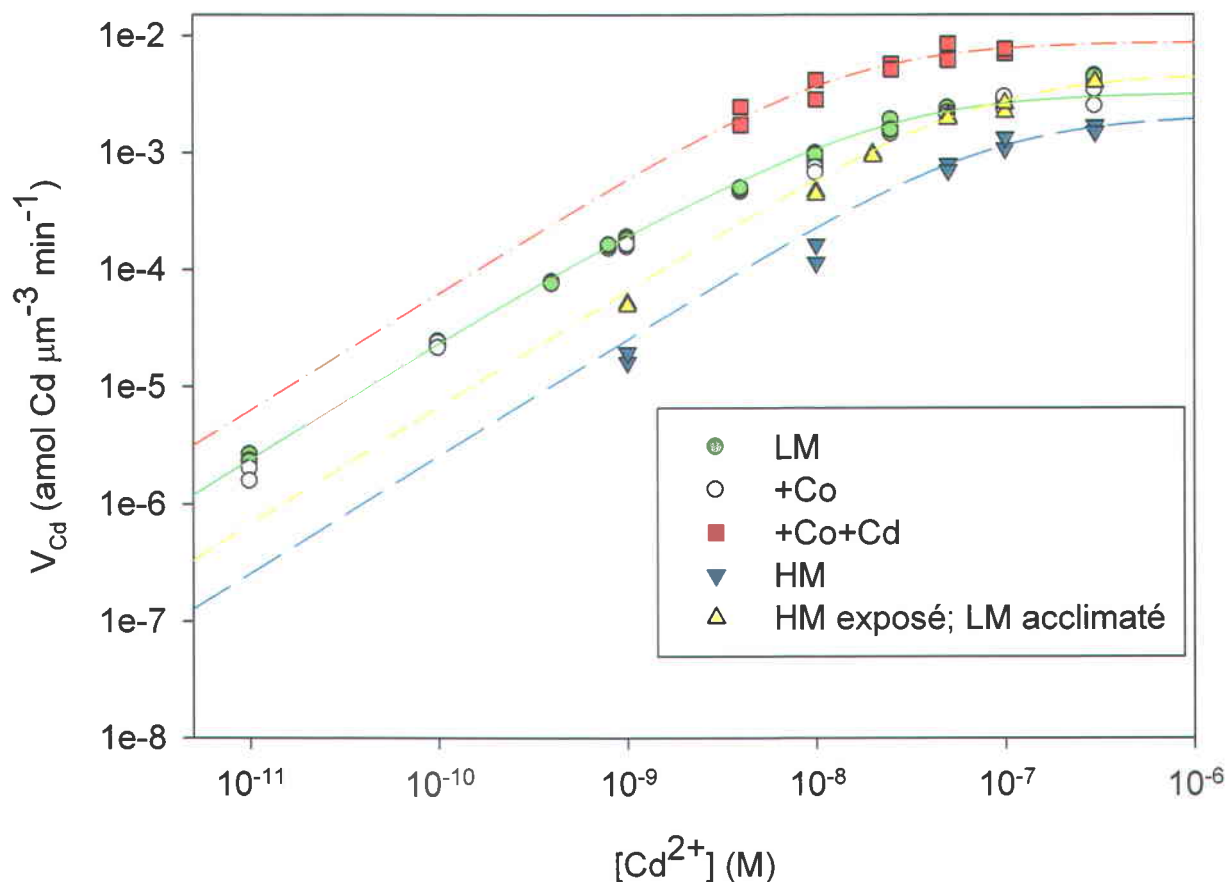


Figure 12 : Taux d'internalisation du Cd (V_{Cd}) à court terme (30 min) en fonction de différentes $[Cd^{2+}]$ chez des algues pré-acclimatées à différents milieux de culture (LM, +Co, +Co+Cd, HM). L'exposition au Cd était réalisée en présence des mêmes concentrations de métaux traces que dans le milieu d'acclimatation. Les algues pré-acclimatées au milieu LM et exposées au milieu HM avec différentes $[Cd^{2+}]$ furent désignées : « HM exposé; LM acclimaté ». Les courbes sous formes de traits verts continus, de tiret-points rouges, de longs tirets bleus et de courts tirets-courts tirets jaunes représentent les régressions obtenues avec l'éq. (11) ($R^2 > 0.90$) chez respectivement les traitements « LM », « +Co+Cd », « HM » et « HM exposé; LM acclimaté ».

Cette diminution de la K_{Cd-2}^{Cd} , en présence de fortes concentrations de métaux traces essentiels, n'étaient pas due à la compétition entre les métaux traces et le Cd pour les sites des systèmes de transport Cd-2 puisque les $[Co^{2+}]$ et les $[Zn^{2+}]$ étaient trop faibles pour compétitionner efficacement avec le Cd ($K_{Cd-2}^{Co} = 10^{6.38 \pm 0.20} M^{-1}$; $K_{Cd-2}^{Zn} = 10^{6.95 \pm 0.11} M^{-1}$) et l'augmentation de $[Fe^{3+}]$, de $[Cu^{2+}]$ ainsi que de $[Mn^{2+}]$ pris séparément n'affectait pas les taux

d'internalisation du Cd (voir fig. 2b de l'article 3). Noter aussi que les constantes de stabilité des complexes Métal-NTA de la base de données MINEQL devraient être très erronées afin d'expliquer entièrement la diminution observée des taux d'internalisation de Cd chez les algues acclimatées au milieu HM; d'après des simulations MINEQL, une diminution d'un facteur 100 des constantes d'équilibre des complexes Me-NTA pour le Fe, le Co, le Zn, le Cu et le Mn ne mèneraient qu'à une diminution des taux d'internalisation du Cd de 0,5 à 66% pour des $[Cd^{2+}]$ respectives de 10^{-7} et 10^{-9} M, ce qui est beaucoup moins que la diminution *mesurée* d'un facteur deux à 10 aux concentrations respectives de 10^{-7} et 10^{-9} M Cd^{2+} . Notre approche de modélisation des données porte donc à croire que l'affinité du système de transport Cd-2 (K_{Cd-2}^{Cd}) diminue en présence d'un milieu riche en métaux traces. Notons qu'il est aussi possible que la constante de vitesse d'internalisation du Cd (k_{in}) varie avec la $[Cd^{2+}]$ et le milieu d'acclimation, mais que nos mesures expérimentales soient trop peu nombreuses (à des $[Cd^{2+}] < 1/K_{Cd-2}^{Cd}$) et variables pour révéler une cinétique d'accumulation différente de celle prescrite par notre modèle (éq. 11).

4.3.5 Implications environnementales des effets d'une pré-acclimation aux métaux traces

Les effets notables d'une pré-acclimation à différentes concentrations de métaux traces sur l'accumulation du Cd ont une implication environnementale importante. Premièrement, d'autres métaux traces peuvent contrôler littéralement l'accumulation du Cd au même titre que l'ion libre Cd^{2+} . Deuxièmement, pour une même $[Cd^{2+}]$, le phytoplancton d'eau douce pourrait accumuler beaucoup plus de Cd dans les milieux eutrophes riches en ligands complexant les métaux (laissant une faible $[Zn^{2+}]$, $[Co^{2+}]$ et autres métaux traces libres; (Xue et al. 1995)) que dans les environnements oligotrophes (avec de plus fortes $[Zn^{2+}]$, $[Co^{2+}]$ et autres métaux traces libres (Mueller et al. 2012)). Troisièmement, l'introduction de Zn dans les rivières suivant un événement pluvieux (Meylan et al. 2004), pourrait aussi atténuer l'accumulation et la toxicité du Cd de façon transitoire chez les algues d'eau douce.

4.3.6 Effet non compétitif du Ca sur l'accumulation de Cd

À la figure 13, les taux d'internalisation du Cd en fonction de la $[Cd^{2+}]$ (couvrant les systèmes Cd-1 et Cd-2) et de deux $[Ca^{2+}]$ (2×10^{-5} et 10^{-3} M Ca^{2+}) sont présentés. Les taux d'accumulation du Cd en présence de 10^{-3} M Ca^{2+} peuvent être modélisés avec succès (éq. 11, $R^2 = 0.99$) en incorporant les constantes de stabilité du Ca pour les systèmes Cd-1 ($K_{Cd-1}^{Ca} = 10^{4.02 \pm 0.14}$ M⁻¹) et Cd-2 ($K_{Cd-2}^{Ca} = 10^{2.62 \pm 0.16}$ M⁻¹) ainsi que les K_{Cd-1}^{Cd} et K_{Cd-2}^{Cd} déterminées dans les sections précédentes. Le point intéressant et original est qu'une $[Ca^{2+}]$ élevée inhibe significativement de façon non compétitive les systèmes de transport Cd-2 à l'intérieur d'une très courte échelle de temps (i.e. < 30 min; rappelons que les algues étaient acclimatées à la faible $[Ca^{2+}]$ du milieu LM, soit 2×10^{-5} M Ca^{2+} , avant l'exposition au Cd). La capacité maximale moyenne du système de transport Cd-2 (V_{max-2}^{Cd}) diminuait significativement d'environ 36% pour l'exposition au Cd de 30 min en présence de 10^{-3} M Ca^{2+} ($V_{max-2}^{Cd} = 2,1 \pm 0,1 \times 10^{-21}$ mol Cd μm^{-3} min⁻¹) par rapport à 2×10^{-5} M Ca^{2+} ($V_{max-2}^{Cd} = 3,3 \pm 0,2 \times 10^{-21}$ mol Cd μm^{-3} min⁻¹) (Fig. 13). En outre, une diminution légère de V_{max-1}^{Cd} moyenne à $[Ca^{2+}]$ élevée fut aussi observée ($8,5 \pm 0,4 \times 10^{-20}$ à $7,8 \pm 1,1 \times 10^{-20}$ mol Cd μm^{-3} min⁻¹; Fig. 13). Cependant, l'absence de données près de la saturation du système de transport Cd-1 en présence de 10^{-3} M Ca^{2+} ne permettait pas de tester la significativité de cette différence. Notons que des calculs avec MINEQL suggèrent que le Cd dissous peut être sursaturé par rapport à l'otavite à des $[Cd^{2+}] > 9 \times 10^{-5}$ M, ce qui ne nous permettait pas d'atteindre des $[Cd^{2+}]$ qui saturent le système de transport Cd-1 en présence d'une forte $[Ca^{2+}]$.

Dans la littérature, l'étude de Worms et Wilkinson (2007) a montré une inhibition non compétitive du Ca sur l'accumulation d'un métal présent à l'état de trace, le nickel. Une inhibition non compétitive de l'accumulation du Cd peut être causée par : 1) une diminution de la constante de vitesse d'internalisation par des interactions allostériques et/ou 2) une diminution du nombre de systèmes de transport par une diminution du taux de remplacement des protéines membranaires composant le système de transport de métaux. Le premier mécanisme pourrait être rapide tandis que le second serait relativement lent. Nous faisons

donc l'hypothèse qu'une diminution aussi rapide du $V_{\max-2}^{\text{Cd}}$ en présence d'une plus forte $[\text{Ca}^{2+}]$ pourrait être reliée à une diminution du taux d'internalisation (k_{in}) du Cd à travers la membrane algale.

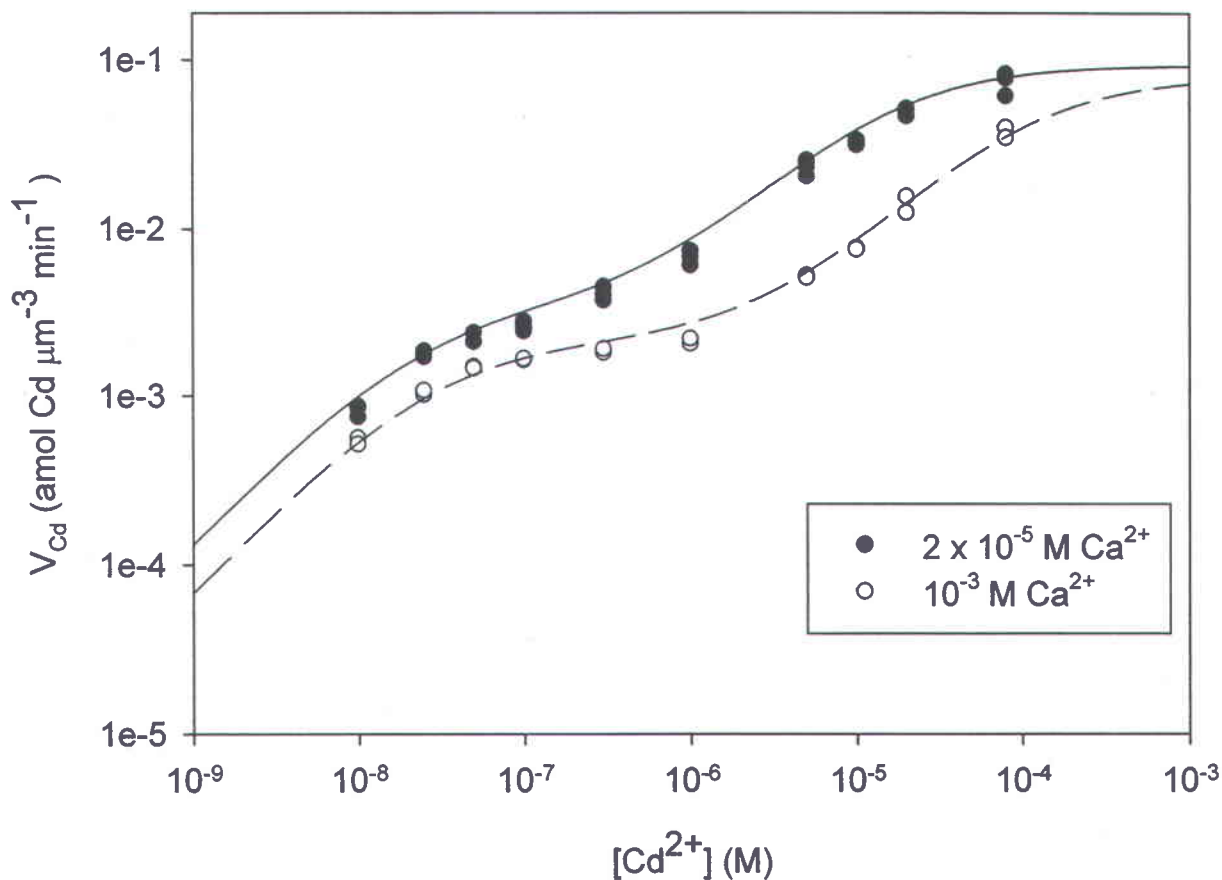


Figure 13 : Taux d'accumulation du Cd (V_{Cd}) à court terme (30 min) en fonction de différentes $[\text{Cd}^{2+}]$ et en présence d'une $[\text{Ca}^{2+}]$ faible (cercles pleins; 2×10^{-5} M Ca^{2+}) et élevée (cercles vides; 10^{-3} M Ca^{2+}) sans ajouts de ligands et de métaux traces (LM-R). Les algues étaient acclimatées au milieu de culture LM. Les courbes continues et sous formes de longs tirets représentent les régressions optimisées par la méthode des moindres carrés avec l'éq. (11) à respectivement 2×10^{-5} M et 10^{-3} M Ca^{2+} . Les prédictions du taux d'internalisation du Cd ($R^2 > 0,96$) furent réalisées en incorporant les $K_{\text{Cd}-1}^{\text{Ca}} = 10^{4,02 \pm 0,14} \text{ M}^{-1}$ et $K_{\text{Cd}-2}^{\text{Ca}} = 10^{2,62 \pm 0,16} \text{ M}^{-1}$.

4.4 Discussion au sujet de la nature des systèmes de transport de Cd et de Zn

En absence d'études complémentaires en biologie moléculaire pour nos conditions expérimentales, il est difficile d'établir hors de tout doute la nature précise des systèmes de transport du Zn et du Cd impliqués chez *C. reinhardtii* dans des conditions représentatives du milieu naturel. Il est toutefois possible de suggérer une implication plausible de certains systèmes de transport en comparant les résultats de notre étude aux connaissances disponibles sur la physiologie et la biologie moléculaire des systèmes de transport membranaire de l'algue *C. reinhardtii*. Le transport du Zn chez *C. reinhardtii* (Rosakis et Köster 2004, Hanikenne et al. 2005) ainsi que chez les algues marines (Sunda et Huntsman 1992) et chez les levures (Eide 1998) procéderait via des systèmes de transport du Zn (de la famille ZIP) d'affinité relativement élevée. Il est donc probable que les systèmes de transport Zn-2/Cd-2 et Zn-3/Cd-3 soient des transporteurs de Zn de haute affinité. Le système de transport Zn-1/Cd-1 possède quant à lui une constante de demi-saturation (inverse de la constante d'affinité du Zn et du Cd pour ce système) relativement élevée, soit d'environ 10^{-5} M. Ce système opère donc à des concentrations relativement élevées de métaux et pourrait donc être impliqué dans le transport de cations majeurs. Le candidat le plus probable serait le Ca. La constante de demi-saturation de ce système de transport Zn-1/Cd-1 pour le Ca est d'environ 10^{-4} M (; constante d'affinité K_{Cd-1}^{Ca} ou $K_{Zn-1}^{Ca} \approx 10^4 M^{-1}$), ce qui est près des concentrations de Ca^{2+} retrouvées en milieu naturel. En revanche, la concentration de Mg à laquelle le système de transport Zn1/Cd1 est à demi saturé est d'environ 7×10^{-4} M Mg^{2+} ($K_{Cd-1}^{Mg} = 10^{3.14 \pm 0.06} M^{-1}$), et ce, même si les $[Mg^{2+}]$ sont habituellement plus faibles que les $[Ca^{2+}]$ dans les eaux douces en milieu naturel (Fortin et al. 2010, Mueller et al. 2012). Il s'en suit donc que ce raisonnement est cohérent avec l'hypothèse d'un système de transport de Ca (système Zn-1/Cd-1) par lequel le Zn et le Cd sont accumulés d'une façon significative quand les concentrations de Cd^{2+} et de Zn^{2+} dépassent environ 10^{-7} M.

4.5 Modélisation à l'état stationnaire du cadmium intracellulaire

L'accumulation de Cd à l'état stationnaire fut premièrement modélisée avec l'éq. (14) chez des algues exposées à une gamme de $[Cd^{2+}]$ dans trois milieux de culture différents (LM, +Zn et HM) afin de pouvoir comparer les valeurs modélisées aux mesures expérimentales d'accumulation de Cd faites après 60 h d'exposition (Fig. 14). Cet exercice de modélisation prenait en compte l'ensemble des effets physiologiques des métaux traces révélés lors d'exposition à court terme, mais **ne prenait pas** en considération la possible rétroaction positive du Cd qui n'était d'ailleurs connue quantitativement que pour une acclimatation à une seule $[Cd^{2+}]$, soit 7×10^{-9} M Cd^{2+} . Plus précisément, les modèles incorporaient les caractéristiques cinétiques des trois systèmes de transport de Cd (K_{Cd-1}^{Cd} , K_{Cd-2}^{Cd} , K_{Cd-3}^{Cd} , V_{max-1}^{Cd} , V_{max-2}^{Cd} , V_{max-3}^{Cd}) obtenues chez des algues acclimatées aux milieux LM et +Zn, ainsi que les constantes d'affinité des cations compétiteurs. Pour les algues acclimatées au milieu HM, le V_{max-2}^{Cd} et la K_{Cd-2}^{Cd} déterminés précédemment furent utilisés et les paramètres cinétiques des systèmes de transport Cd-1 et Cd-3 furent considérés équivalents à ceux déterminés chez les algues acclimatées au milieu +Zn.

Notre modèle du ligand biotique reproduisait raisonnablement bien les concentrations de Cd intracellulaire mesurées à l'état stationnaire chez l'algue *C. reinhardtii* exposée à différentes $[Cd^{2+}]$ dans le milieu HM (Fig. 14). Au contraire, les concentrations intracellulaires de Cd modélisées à l'état stationnaire pour les cellules algales cultivées dans le milieu LM étaient systématiquement plus faibles que les mesures des concentrations de Cd intracellulaire, d'un facteur de six à 10 pour des $[Cd^{2+}]$ variant entre $2,3 \times 10^{-11}$ et 2×10^{-8} M (Fig. 14). Toutefois, l'écart entre les valeurs modélisées et mesurées rétrécissait à 5×10^{-8} M Cd^{2+} ($\approx 70\%$ d'inhibition du rendement cellulaire algal en termes de volume, Fig. 16). Pour les algues acclimatées au milieu +Zn, nous avons obtenu une tendance similaire entre les concentrations de Cd modélisées et mesurées à l'état stationnaire : le modèle sous-estimait par 2,5 à six fois l'accumulation de Cd entre $2,3 \times 10^{-11}$ et 10^{-7} M Cd^{2+} tandis que les valeurs modélisées et expérimentales devenaient comparables à $2,5 \times 10^{-7}$ M Cd^{2+} ($\approx 77\%$ inhibition du rendement

cellulaire en terme de volume cellulaire, Fig. 16) (Fig. 14). Pour les deux milieux LM et +Zn, la meilleure adéquation entre les valeurs mesurées et modélisées à des $[Cd^{2+}]$ très toxiques comparativement à celles aux plus faibles $[Cd^{2+}]$ pourrait être expliquée par la capacité des cellules à contrôler l'accumulation du Zn (et donc partiellement du Cd) à des $[Cd^{2+}]$ sous-létales ou faiblement/modérément toxiques tandis que pour des $[Cd^{2+}]$ très toxiques (>70% d'inhibition du volume total cellulaire), la capacité des cellules à moduler les taux d'accumulation de Zn/Cd pourrait être fortement compromise.

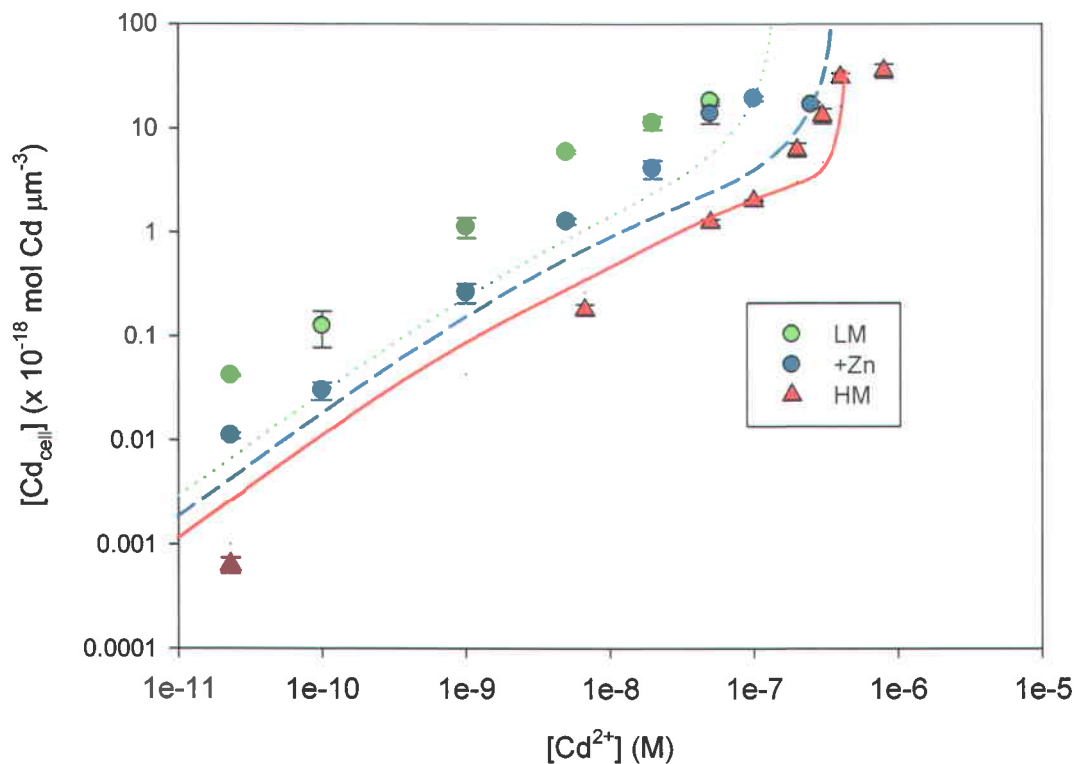


Figure 14 : Concentrations de Cd intracellulaire ($[Cd_{cell}]$) mesurées chez *C. reinhardtii* pour des expositions de 60 h à une gamme de $[Cd^{2+}]$ dans des milieux composés de différentes concentrations en métaux traces essentiels (LM, cercles pleins; +Zn, cercles vides; HM, triangles vides). Les lignes sous formes de pointillés, de tirets courts et de traits continus représentent les concentrations intracellulaires de Cd modélisées à l'état stationnaire pour respectivement les milieux LM, +Zn et HM. Les courbes modélisées incorporent les caractéristiques cinétiques des trois systèmes de transport de Cd (Cd-1, Cd-2 et Cd-3) existant chez *C. reinhardtii*, mais ignorent le mécanisme de rétroaction positive du Cd sur l'accumulation de Cd.

Un deuxième exercice de modélisation fut donc entrepris pour une seule $[Cd^{2+}]$ de 7×10^{-9} M pour laquelle l'étendue de la rétroaction positive par le Cd était quantitativement connue. En incorporant cette rétroaction positive du Cd sur la capacité du système de transport Cd-2, les concentrations de Cd intracellulaires modélisées et mesurées pour les algues cultivées dans les milieux LM et +Zn devenaient beaucoup plus comparables (Fig. 15) à celles obtenues lors de notre première exercice de modélisation (Fig. 14). Ces résultats suggèrent donc que l'écart entre les valeurs modélisées et mesurées à la figure 14, du moins pour des $[Cd^{2+}]$ près de 7×10^{-9} M, est dû presque entièrement à la réponse physiologique de l'algue au Cd. L'accumulation de Cd intracellulaire à l'état stationnaire est aussi modélisée pour le milieu +Co avec les constantes V_{max-2}^{Cd} (pour les algues acclimatées à 10^{-9} M Co^{2+} et 7×10^{-9} M Cd^{2+}) et K_{Cd-2}^{Co} mesurées précédemment. L'accumulation de Cd dans le milieu +Co était encore une fois bien prédite par notre modèle du ligand biotique (Fig. 15). L'effet d'une forte $[Ca^{2+}]$ (10^{-3} M) sur l'accumulation de Cd était aussi reproduit fidèlement par notre modèle incorporant l'effet inhibiteur non compétitif du Ca sur le système Cd-2 (i.e. effet sur le V_{max-2}^{Cd}) et la K_{Cd-2}^{Ca} (Fig. 15). L'effet stimulateur du cuivre sur l'accumulation du Cd pouvait également être prédit en prenant en considération la diminution du taux de croissance ($\approx 27\%$ d'inhibition). En présumant que le taux de transport du Cd demeure constant en présence d'une augmentation de la $[Cu^{2+}]$ d'un facteur 10, l'inhibition de la croissance causée par le cuivre diminuera la biodilution du Cd intracellulaire dans le milieu +Cu comparativement au milieu LM (Fig. 15).

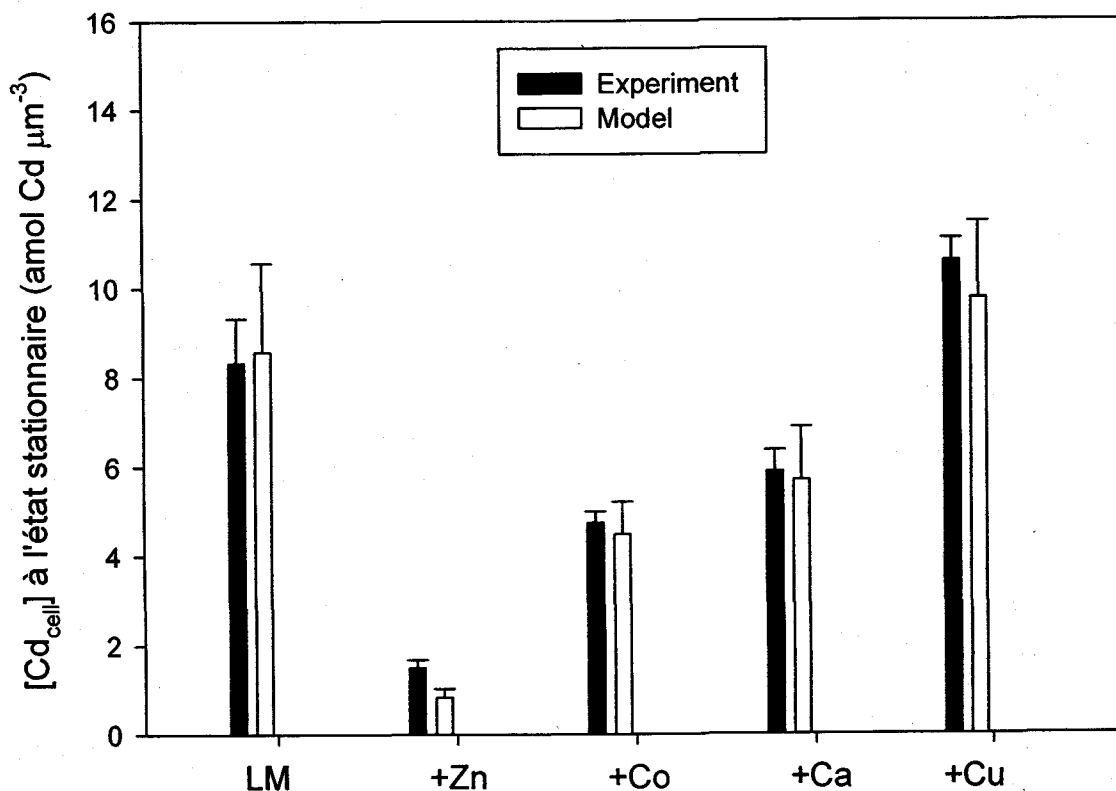


Figure 15 : Concentrations de cadmium intracellulaire ($[\text{Cd}_{\text{cell}}]$) modélisées et mesurées à l'état stationnaire en présence de $7 \times 10^{-9} \text{ M Cd}^{2+}$ pour cinq milieux de culture différents (LM, +Zn, +Co et HM) caractérisés par des concentrations de métaux traces essentiels différentes. Les prédictions du modèle prennent en considération les caractéristiques cinétiques des trois systèmes de transport de Cd (Cd-1, Cd-2 et Cd-3) ainsi que le mécanisme de rétroaction positive du Cd sur l'accumulation du Cd. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type des valeurs modélisées.

À notre connaissance, il s'agit de la première étude ayant développé un MLB capable de prédire l'accumulation du Cd en présence de différentes concentrations de cations essentiels chez une algue d'eau douce. Il faut toutefois souligner que les études pilotées par Sunda (Beaufort Laboratory, National Oceanic and Atmospheric Administration, Beaufort, Caroline du Nord, États-Unis) ont bien établi le lien étroit et capital entre la cinétique d'accumulation des métaux traces essentiels (Zn, Co, Mn, Cu, Fe) à court terme et leurs accumulations à l'état stationnaire chez plusieurs espèces de phytoplancton marin (Sunda et Huntsman 1998c, b,

2000). La capacité à modéliser avec confiance l'accumulation du Cd à l'état stationnaire, étant littéralement contrôlé par les effets du Zn et de Mn sur les paramètres cinétiques des transporteurs de Zn et de Mn chez la diatomée marine *T. pseudonana*, fut en effet très bien démontrée par Sunda et Huntsman (1996, 1998a). Précisons toutefois qu'à forte $[Cd^{2+}]$, où des effets toxiques sur la croissance de cette diatomée apparaissaient (i.e. à 5×10^{-9} M Cd^{2+}), la modélisation de l'accumulation du Cd à l'état stationnaire devenait plus complexe. Un système exportant le Cd à l'extérieur de la cellule était mis en branle, faisant en sorte de diminuer grandement (de près d'un ordre de grandeur) l'accumulation de Cd mesurée à l'état stationnaire par rapport au Cd intracellulaire modélisé (sans tenir compte de l'efflux de Cd) (Sunda et Huntsman 1996). Dans ce cas, la diatomée se devait d'expulser le Cd du milieu intracellulaire, car ce métal inhibait le mécanisme de rétroaction négative du Mn permettant de stimuler le taux d'accumulation de Mn et de maintenir des concentrations de Mn intracellulaire adéquate pour le métabolisme en présence de fortes concentrations de Cd intracellulaire. Au contraire, chez *C. reinhardtii*, l'accumulation du Zn demeure bien régulée même en présence de relativement fortes concentrations de Cd^{2+} (7×10^{-9} M Cd^{2+}), i.e. le Cd n'inhibe pas ou très peu le mécanisme de rétroaction négative permettant une stimulation des taux d'accumulation du Zn en présence de Cd (voir section 4.3.2 et 4.3.3). On déduit donc intuitivement qu'il y aurait peu d'avantages à évoluer un système indépendant d'efflux du Cd chez *C. reinhardtii* en présence de $[Cd^{2+}] < 7 \times 10^{-9}$ M. Nos résultats n'excluent cependant pas la possibilité qu'un tel système d'efflux existe chez *C. reinhardtii* et soit impliqué dans la détoxification du Cd à plus forte $[Cd^{2+}]$.

4.6 Relation entre la toxicité du Cd^{2+} et le Cd intracellulaire à l'état stationnaire

Les concentrations de Cd internalisées inhibant de 50% la croissance (normalisées par rapport au volume cellulaire) demeuraient étonnamment similaires chez les algues exposées au milieu LM ($EC_{50} = 16.6$ amol Cd μm^{-3} , $CI_{95\%} = 14,8 - 18,3$ amol Cd μm^{-3}), +Zn ($EC_{50} = 13,6$ amol Cd μm^{-3} , $CI_{95\%} = 10,2 - 16,1$ amol Cd μm^{-3}) et HM ($EC_{50} = 18,5$ amol Cd μm^{-3} , $CI_{95\%} = 13,3 - 23.6$ amol Cd μm^{-3}) (Fig. 16). Ces trois EC_{50} moyens variaient de seulement 26% et chacun

des EC₅₀ se retrouvaient bien à l'intérieur des intervalles de confiance des deux autres EC₅₀ moyens, démontrant l'absence de différences notables entre les trois EC₅₀. Les résultats montrent donc que l'efficacité de la détoxification du Cd intracellulaire, par exemple via l'induction de phytochélatines, ne change pas significativement en présence de différentes concentrations de Zn²⁺ ou des cinq autres métaux traces essentiels. L'induction de phytochélatines par les métaux traces essentiels étudiés dans cette thèse est typiquement beaucoup plus faible que celle due au Cd chez le phytoplancton (Ahner et Morel 1995, Devez et al. 2009). On ne s'attend donc pas à ce qu'un modeste ajout de métaux traces essentiels ait un effet important sur la synthèse nette de phytochélatines intracellulaires.

La modulation de la toxicité du Cd en présence de différentes concentrations de métaux traces essentiels est donc fortement reliée au niveau d'accumulation de cadmium intracellulaire à l'état stationnaire, indépendamment des variations de la disponibilité des métaux traces essentiels dans le milieu. Par conséquent, une fois que l'accumulation du Cd peut être précisément modélisée à l'aide du MLB mécanistique proposé dans cette thèse en fonction de la spéciation des métaux et de l'acclimatation de l'algue aux métaux, il est possible de prédire la toxicité du Cd²⁺ en présence de différentes concentrations d'éléments essentiels. Autrement dit, l'effet des métaux essentiels sur les mécanismes d'assimilation du Cd va contrôler la toxicité du Cd chez *C. reinhardtii*. Il s'en suit donc qu'il est fortement probable, qu'en présence de [Cd²⁺] croissantes, l'algue conserve la capacité de réguler l'accumulation des métaux essentiels indépendamment des concentrations de métaux traces essentiels libres disponibles dans le milieu (pour la gamme de métaux essentiels libres testée dans cette étude) comme ce qu'il fut démontré à la section 4.3.2 pour le Zn.

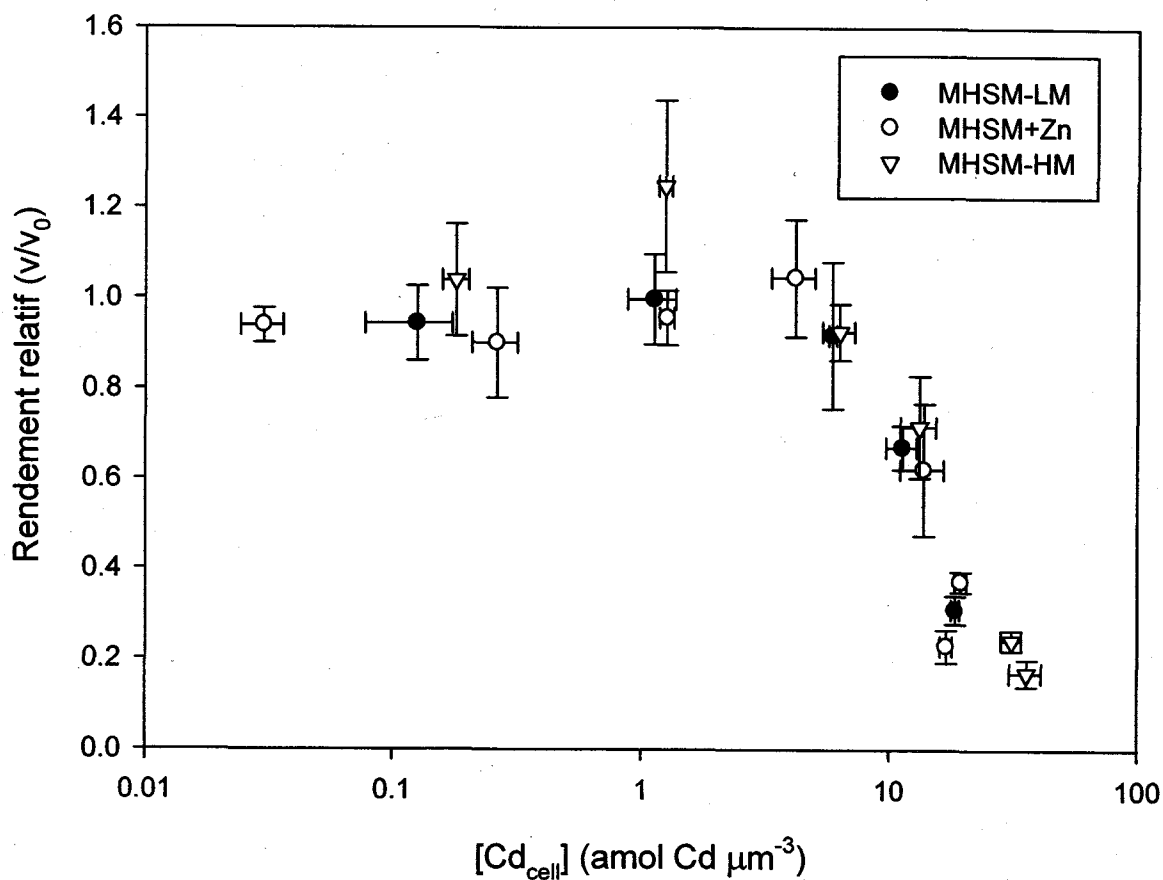
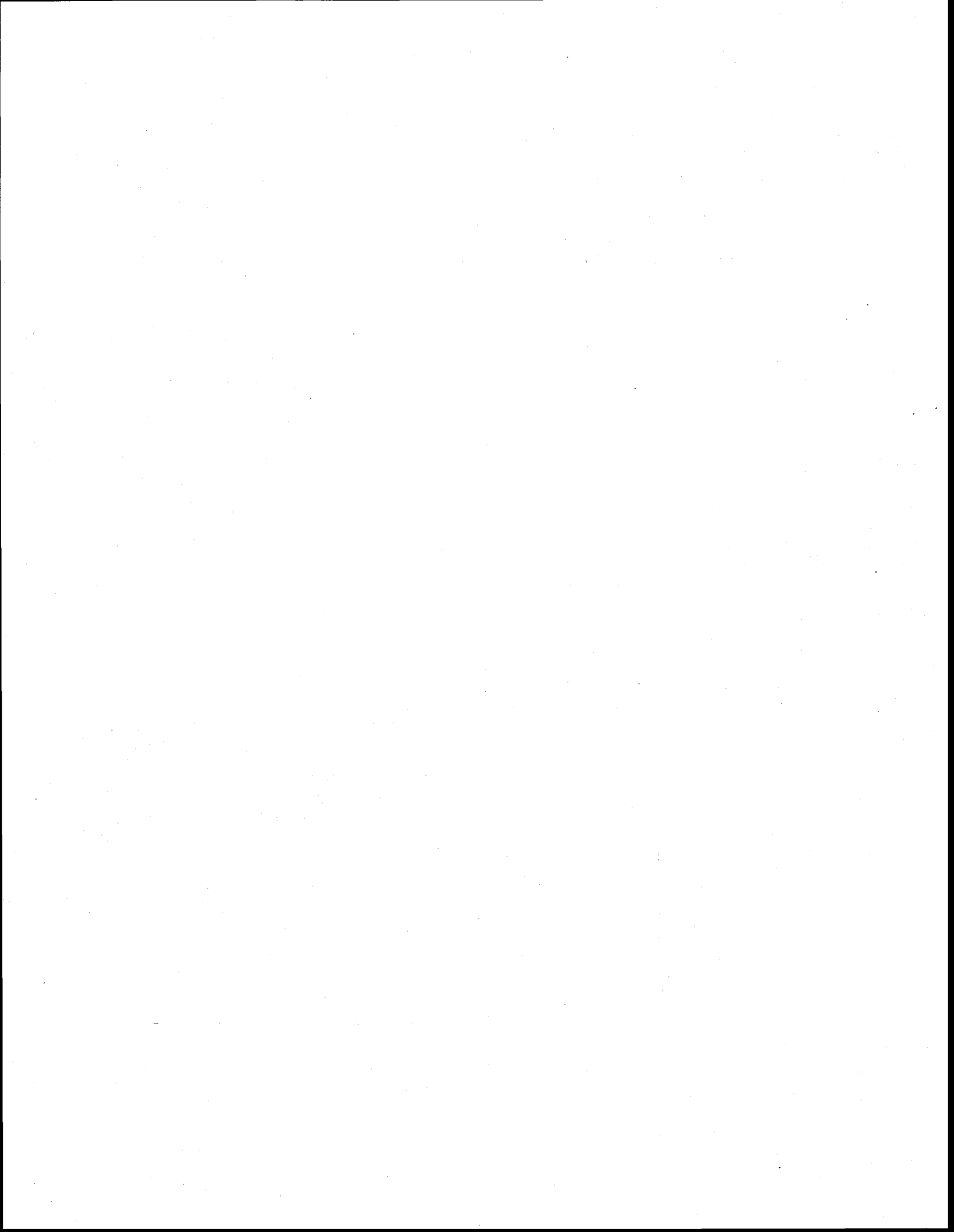


Figure 16 : Rendement relatif au témoin en terme de volume cellulaire total (v/v_0 , où v et v_0 sont les volumes cellulaires totaux respectivement des cultures témoins (sans ajout de Cd) et exposées au Cd après 60 h de croissance) en fonction des concentrations intracellulaires de Cd $[Cd_{cell}]$ mesurées après 60 h de croissance chez *C. reinhardtii*. Les algues étaient exposées à trois milieux de culture différents caractérisés par différentes concentrations de métaux traces essentiels, les milieux LM (cercles pleins), +Zn (cercles vides) et HM (triangles vides). Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois mesures.



5. CONCLUSION

Des modèles du ligand biotique perfectionnés permettant de prédire la prise en charge et la toxicité des métaux en milieu aquatique ont été développés avec succès par les écotoxicologistes dans certaines conditions contrôlées au laboratoire pour des expositions aux métaux sur une courte période de temps. Cependant, pour que ces modèles soient applicables à l'intérieur de diverses conditions chimiques, pour des expositions chroniques aux métaux et qu'ils aient une portée plus robuste et universelle, les effets physiologiques d'une acclimatation aux métaux traces et au calcium doivent être pris en compte.

Cette thèse a permis de documenter en détail les effets compétitifs de différents cations (Zn, Co, Ca) de même que les interactions non compétitives plus subtiles des métaux traces et du calcium avec trois systèmes de transport membranaires de Zn/Cd chez l'algue d'eau douce, *C. reinhardtii*. Il est par le fait même démontré que cette espèce d'algue, reconnue pour sa grande résistance au Cd, peut être très sensible à ce métal dans un environnement pauvre en métaux traces essentiels, représentatif de certains milieux naturels. Les effets physiologiques dominants modulant l'accumulation et la toxicité du Cd comprennent notamment le mécanisme de rétroaction positive du Cd sur l'accumulation du Cd^{2+} ainsi que l'inhibition de l'affinité du système de transport Cd-2 par un ajout d'une combinaison de métaux traces. Le Cd^{2+} avait le potentiel d'induire une régulation à la hausse de la capacité maximale des systèmes de transport de Zn/Cd, ce qui constituait la réponse de l'algue afin de réguler le taux d'internalisation du Zn^{2+} et d'éviter (ou de limiter) l'apparition d'effets toxiques du Cd. L'effet inhibiteur de l'ensemble des métaux traces en combinaison sur l'affinité du système de transport Cd-2 est cependant plus difficile à expliquer. Il est possible, mais cela ne reste qu'une hypothèse, qu'une combinaison de métaux traces induit une modulation du taux d'internalisation du Zn/Cd (k_{in}). Des recherches plus poussées devront être réalisées à ce sujet afin de trouver les causes précises de ce phénomène.

Nos découvertes ont permis de développer un MLB capable de prédire avec succès l'accumulation et la toxicité du Cd en fonction non seulement de la spéciation chimique du Cd²⁺, mais aussi de l'acclimatation des cellules aux cations essentiels et au Cd. Il s'agit de la première étude proposant un MLB capable de tenir compte des effets physiologiques des cations essentiels sur l'accumulation et la toxicité du Cd à long terme chez une algue d'eau douce. Le développement de ce MLB a permis d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes d'accumulation et de toxicité chez une algue d'eau douce typique. Notre modèle représente aussi un outil pratique pour raffiner le MLB pour qu'il puisse être davantage applicable dans les eaux douces, où les concentrations de métaux traces sont caractérisées par de grandes variations régionales et temporelles. Les travaux scientifiques en cours dans le domaine de l'écotoxicologie des métaux devraient donc être vus comme des efforts afin d'étendre l'applicabilité du MLB en nature. Notre étude représente un pas de plus dans cette direction. Mentionnons toutefois que l'élaboration d'un MLB applicable directement en nature nécessitera encore de nombreuses recherches en écotoxicologie. Il reste notamment à déterminer l'importance des réactions physiologiques algales aux cations essentiels/non essentiels chez différentes espèces d'algues en fonction d'une myriade de paramètres physico-chimiques (température, lumière, combinaisons de métaux non essentiels, etc.). Comme le niveau des connaissances dans plusieurs disciplines scientifiques (chimie, physiologie, toxicologie) progresse rapidement, nous croyons que l'objectif ambitieux d'un MLB capable de réaliser des prédictions fiables à l'intérieur d'une gamme de différents milieux naturels complexes pourrait bien être à notre portée.

6. RÉFÉRENCES

- Ahner, B. A. et F. M. M. Morel. 1995. Phytochelatin production in marine algae .2. Induction by various metals. *Limnology and Oceanography* **40**:658-665.
- Anderson, M. A. et F. M. M. Morel. 1982. Influence of aqueous iron chemistry on uptake of iron by the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnology and Oceanography* **27**:789-813.
- Armbrust, E. V., J. A. Berges, C. Bowler, B. R. Green, D. Martinez, N. H. Putnam, S. Zhou, A. E. Allen, K. E. Apt, M. Bechner, M. A. Brzezinski, B. K. Chaal, A. Chiovitti, A. K. Davis, M. S. Demarest, J. C. Detter, T. Glavina, D. Goodstein, M. Z. Hadi, U. Hellsten, M. Hildebrand, B. D. Jenkins, J. Jurka, V. V. Kapitonov, N. Kröger, W. W. Y. Lau, T. W. Lane, F. W. Larimer, J. C. Lippmeier, S. Lucas, M. Medina, A. Montsant, M. Obornik, M. S. Parker, B. Palenik, G. J. Pazour, P. M. Richardson, T. A. Ryneerson, M. A. Saito, D. C. Schwartz, K. Thamtrakoln, K. Valentin, A. Vardi, F. P. Wilkerson, et D. S. Rokhsar. 2004. The genome of the diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. *Science* **306**:79-86.
- Boily, F. 2004. Mécanismes de prise en charge et de toxicité du cadmium en présence de thiosulfate chez une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*. Mémoire de maîtrise, INRS-Eau, Terre et Environnement, Québec, 124 p., Québec.
- Boullemant, A., M. Lavoie, C. Fortin, et P. G. C. Campbell. 2009. Uptake of hydrophobic metal complexes by three freshwater algae: Unexpected influence of pH. *Environmental Science and Technology* **43**:3308-3314.
- Brembu, T., M. Jorstad, P. Winge, K. C. Valle, et A. M. Bones. 2011. Genome-wide profiling of responses to cadmium in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Environmental Science and Technology* **45**:7640-7647.
- Campbell, P. G. C. 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. Pages 45-102 in A. Tessier et D. R. Turner, editors. *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- Campbell, P. G. C., O. Errécalde, C. Fortin, V. P. Hiriart-Baer, et B. Vigneault. 2002. Metal bioavailability to phytoplankton - Applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* **133**:189-206.
- Chen, Z., L. Zhu, et K. J. Wilkinson. 2010. Validation of the biotic ligand model in metal mixtures: Bioaccumulation of lead and copper. *Environmental Science and Technology* **44**:3580-3586.
- Cohen, C. K., T. C. Fox, D. F. Garvin, et L. V. Kochian. 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiology* **116**:1063-1072.
- Croteau, M. N., L. Hare, et A. Tessier. 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environmental Science and Technology* **32**:1348-1353.
- DalCorso, G., S. Farinati, S. Maistri, et A. Furini. 2008. How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**:1268-1280.

- De Schamphelaere, K. A. C. et C. R. Janssen. 2004. Development and field validation of a biotic ligand model predicting chronic copper toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**:1365-1375.
- De Schamphelaere, K. A. C. et C. R. Janssen. 2006. Bioavailability models for predicting copper toxicity to freshwater green microalgae as a function of water chemistry. *Environmental Science and Technology* **40**:4514-4522.
- De Schamphelaere, K. A. C., J. L. Stauber, K. L. Wilde, S. J. Markich, P. L. Brown, N. M. Franklin, N. M. Creighton, et C. R. Janssen. 2005. Toward a biotic ligand model for freshwater green algae: Surface-bound and internal copper are better predictors of toxicity than free Cu^{2+} ion activity when pH is varied. *Environmental Science and Technology* **39**:2067-2072.
- Deckert, J. 2005. Cadmium toxicity in plants: Is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? *BioMetals* **18**:475-481.
- Deleebeek, N. M. E., F. De Laender, V. A. Chepurnov, W. Vyverman, C. R. Janssen, et K. A. C. De Schamphelaere. 2009a. A single bioavailability model can accurately predict Ni toxicity to green microalgae in soft and hard surface waters. *Water Research* **43**:1935-1947.
- Deleebeek, N. M. E., K. A. C. De Schamphelaere, et C. R. Janssen. 2009b. Effects of Mg^{2+} and H^+ on the toxicity of Ni^{2+} to the unicellular green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Model development and validation with surface waters. *Science of the Total Environment* **407**:1901-1914.
- Devez, A., E. Achterberg, et M. Gledhill. 2009. Metal ion-binding properties of phytochelatins and related ligands. Pages 441-481 in A. Sigel, H. Sigel, et R. K. O. Sigel, editors. *Metal-carbon bonds in enzymes and cofactors*. Royal Society of Chemistry.
- Di Toro, D. M., H. E. Allen, H. L. Bergman, J. S. Meyer, P. R. Paquin, et R. C. Santore. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**:2383-2396.
- Eide, D. J. 1998. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Nutrition* **18**:441-469.
- Errécalde, O. et P. G. C. Campbell. 2000. Cadmium and zinc bioavailability to *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae): Accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate. *Journal of Phycology* **36**:473-483.
- Errécalde, O., M. Seidl, et P. G. C. Campbell. 1998. 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 Research* **32**:419-429.
- Florence, T. M., H. K. J. Powell, J. L. Stauber, et R. M. Town. 1992. Toxicity of lipid-soluble copper(II) complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*: Amelioration by humic substances. *Water Research* **26**:1187-1193.
- Fortin, C. 2000. Mécanisme de prise en charge et toxicité de l'argent chez une algue verte en relation avec la spéciation chimique. Université du Québec INRS-Eau, Québec.
- Fortin, C. et P. G. C. Campbell. 2000. Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**:2769-2778.

- Fortin, C., Y. Couillard, B. Vigneault, et P. G. C. Campbell. 2010. Determination of free Cd, Cu and Zn concentrations in lake waters by in situ diffusion followed by column equilibration ion-exchange. *Aquatic Geochemistry* **16**:151-172.
- Foster, P. L. et F. M. M. Morel. 1982. Reversal of cadmium toxicity in a diatom: An interaction between cadmium activity and iron. *Limnology and Oceanography* **27**:745-752.
- François, L., C. Fortin, et P. G. C. Campbell. 2007. pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: Implications for an algal BLM. *Aquatic Toxicology* **84**:123-132.
- Franklin, N. M., J. L. Stauber, R. P. Lim, et P. Petocz. 2002. Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.): The effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**:2412-2422.
- Gerloff-Elias, A., D. Barua, A. Mölich, et E. Spijkerman. 2006. Temperature- and pH-dependent accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga *Chlamydomonas acidophila*. *FEMS Microbiology Ecology* **56**:345-354.
- Hall, J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**:1-11.
- Hanikenne, M. 2003. *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytologist* **159**:331-340.
- Hanikenne, M., U. Krämer, V. Demoulin, et D. Baurain. 2005. A comparative inventory of metal transporters in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the red alga *Cyanidioschizon merolae*. *Plant Physiology* **137**:428-446.
- Harris, E. H., editor. 1989. *The Chlamydomonas Sourcebook*. Academic Press, Toronto.
- Harrison, G. I. et F. M. M. Morel. 1983. Antagonism between cadmium and iron in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Journal of Phycology* **19**:495-507.
- Harrison, G. I. et F. M. M. Morel. 1986. Response of the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* to iron stress. *Limnology and Oceanography* **31**:989-997.
- Hart, B. A., P. E. Bertram, et B. D. Scaife. 1979. Cadmium transport by *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Research* **18**:327-335.
- Hassler, C. S., R. Behra, et K. J. Wilkinson. 2005. Impact of zinc acclimation on bioaccumulation and homeostasis in *Chlorella kesslerii*. *Aquatic Toxicology* **74**:139-149.
- Hassler, C. S., V. I. Slaveykova, et K. J. Wilkinson. 2004. Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**:283-291.
- Hassler, C. S. et K. J. Wilkinson. 2003. Failure of the biotic ligand and free-ion activity models to explain zinc bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**:620-626.
- Heijerick, D., K. De Schamphelaere, et C. R. Janssen. 2002a. Biotic ligand model development predicting Zn toxicity to the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: possibilities and limitations. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* **133**:207.
- Heijerick, D. G., K. A. C. De Schamphelaere, et C. R. Janssen. 2002b. Predicting acute zinc toxicity for *Daphnia magna* as a function of key water chemistry characteristics:

- Development and validation of a biotic ligand model. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**:1309-1315.
- Hill, K. L., R. Hassett, D. Kosman, et S. Merchant. 1996. Regulated copper uptake in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to copper availability. *Plant Physiology* **112**:697-704.
- Hiriart-Baer, V. P., C. Fortin, D. Y. Lee, et P. G. C. Campbell. 2006. Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: Influence of thiosulphate. *Aquatic Toxicology* **78**:136-148.
- Hogstrand, C. et C. M. Wood. 1995. Mechanisms for zinc acclimation in freshwater rainbow trout. *Marine Environmental Research* **39**:131-135.
- Hollis, L., J. C. McGeer, D. G. McDonald, et C. M. Wood. 1999. Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimation, and physiological effects during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* **46**:101-119.
- Hu, S., K. W. K. Lau, et M. Wu. 2001. Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science* **161**:987-996.
- Hudson, R. J. M. et F. M. M. Morel. 1990. Iron transport in marine phytoplankton - Kinetics of cellular and medium coordination reactions. *Limnology and Oceanography* **35**:1002-1020.
- Hudson, R. J. M. et F. M. M. Morel. 1993. Trace metal transport by marine microorganisms: implications of metal coordination kinetics. *Deep-Sea Research* **40**:129-150.
- Issa, A. A., R. Abdel-Basset, et M. S. Adam. 1995. Abolition of heavy metal toxicity on *Kirchneriella lunaris* (Chlorophyta) by calcium. *Annals of Botany* **75**:189-192.
- Kalis, E. J. J., L. Weng, F. Dousma, E. J. M. Temminghoff, et W. H. Van Riemsdijk. 2006. Measuring free metal ion concentrations in situ in natural waters using the Donnan Membrane Technique. *Environmental Science and Technology* **40**:955-961.
- Källqvist, T. 2009. Effect of water hardness on the toxicity of cadmium to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* in an artificial growth medium and nutrient-spiked natural lake waters. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* **72**:277-283.
- Knauer, K., R. Behra, et L. Sigg. 1997. Effects of free Cu^{2+} and Zn^{2+} ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environ Toxicol Chem* **16**:220-229.
- Kola, H. et K. J. Wilkinson. 2005. Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling. *Environmental Science and Technology* **39**:3040-3047.
- Komine, Y., L. L. Eggink, H. Park, et J. K. Hooper. 2000. Vacuolar granules in *Chlamydomonas reinhardtii*: Polyphosphate and a 70-kDa polypeptide as major components. *Planta* **210**:897-905.
- Komine, Y., H. Park, G. R. Wolfe, et J. K. Hooper. 1996. Secretory granules in the cytoplasm of a wall-less mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* contain processed light-harvesting complex apoproteins and HSP70. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **36**:301-306.
- Kraemer, L. D., P. G. C. Campbell, L. Hare, et J. C. Auclair. 2006. A field study examining the relative importance of food and water as sources of cadmium for juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **63**:549-557.

- Lane, E. S., K. Jang, J. T. Cullen, et M. T. Maldonado. 2008. The interaction between inorganic iron and cadmium uptake in the marine diatom *Thalassiosira oceanica*. *Limnology and Oceanography* **53**:1784-1789.
- Lane, E. S., D. M. Semeniuk, R. F. Strzepak, J. T. Cullen, et M. T. Maldonado. 2009. Effects of iron limitation on intracellular cadmium of cultured phytoplankton: Implications for surface dissolved cadmium to phosphate ratios. *Marine Chemistry* **115**:155-162.
- Lavoie, M., S. Le Faucheur, C. Fortin, et P. G. C. Campbell. 2009. Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquatic Toxicology* **92**:65-75.
- Le Faucheur, S., R. Behra, et L. Sigg. 2005. Phytochelatin induction, cadmium accumulation, and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**:1731-1737.
- Lee, D. Y., C. Fortin, et P. G. C. Campbell. 2004. Influence of chloride on silver uptake by two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**:1012-1018.
- Lee, J. G., B. A. Ahner, et F. M. M. Morel. 1996. Export of cadmium and phytochelatin by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environmental Science and Technology* **30**:1814-1821.
- Luoma, S. N. et P. S. Rainbow. 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science and Technology* **39**:1921-1931.
- Luoma, S. N. et P. S. Rainbow. 2008. Metal contamination in aquatic environments: Science and lateral management. Cambridge University Press.
- Macfie, S. M., Y. Tarmohamed, et P. M. Welbourn. 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **27**:454-458.
- Maloney, F. 2007. 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, INRS-Eau, Terre et Environnement, Québec, 118 p., Québec.
- Martell, A. E., R. M. Smith, et R. J. Motekaitis. 2004. NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes Database. U.S. Department of Commerce, Gaithersburg, MD, USA.
- Mason, R. P., J. R. Reinfelder, et F. M. M. Morel. 1996. Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. *Environmental Science and Technology* **30**:1835-1845.
- Merchant, S. S., M. D. Allen, J. Kropat, J. L. Moseley, J. C. Long, S. Tottey, et A. M. Terauchi. 2006. Between a rock and a hard place: Trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1763**:578-594.
- Merchant, S. S. et S. E. Prochnik et O. Vallon et E. H. Harris et S. J. Karpowicz et G. B. Witman et A. Terry et A. Salamov et L. K. Fritz-Laylin et L. Maréchal-Drouard et W. F. Marshall et L. H. Qu et D. R. Nelson et A. A. Sanderfoot et M. H. Spalding et V. V. Kapitonov et Q. Ren et P. Ferris et E. Lindquist et H. Shapiro et S. M. Lucas et J. Grimwood et J. Schmutz et I. V. Grigoriev et D. S. Rokhsar et A. R. Grossman et P. Cardol et H. Cerutti et G. Chanfreau et C. L. Chen et V. Cognat et M. T. Croft et R. Dent et S. Dutcher et E. Fernández et H. Fukuzawa et D. González-Ballester et D.

- González-Halphen et A. Hallmann et M. Hanikenne et M. Hippler et W. Inwood et K. Jabbari et M. Kalanon et R. Kuras et P. A. Lefebvre et S. D. Lemaire et A. V. Lobanov et M. Lohr et A. Manuell et I. Meier et L. Mets et M. Mittag et T. Mittelmeier et J. V. Moroney et J. Moseley et C. Napoli et A. M. Nedelcu et K. Niyogi et S. V. Novoselov et I. T. Paulsen et G. Pazour et S. Purton et J. P. Ral et D. M. Riaño-Pachón et W. Riekhof et L. Rymarquis et M. Schroda et D. Stern et J. Umen et R. Willows et N. Wilson et S. L. Zimmer et J. Allmer et J. Balk et K. Bisova et C. J. Chen et M. Elias et K. Gendler et C. Hauser et M. R. Lamb et H. Ledford et J. C. Long et J. Minagawa et M. D. Page et J. Pan et W. Pootakham et S. Roje et A. Rose et E. Stahlberg et A. M. Terauchi et P. Yang et S. Ball et C. Bowler et C. L. Dieckmann et V. N. Gladyshev et P. Green et R. Jorgensen et S. Mayfield et B. Mueller-Roeber et S. Rajamani et R. T. Sayre et P. Brokstein et I. Dubchak et D. Goodstein et L. Hornick et Y. W. Huang et J. Jhaveri et Y. Luo et D. Martínez et W. C. A. Ngau et B. Otilar et A. Poliakov et A. Porter et L. Szajkowski et G. Werner et K. Zhou. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**:245-251.
- Meylan, S., N. Odzak, R. Behra, et L. Sigg. 2004. Speciation of copper and zinc in natural freshwater: Comparison of voltammetric measurements, diffusive gradients in thin films (DGT) and chemical equilibrium models. *Analytica Chimica Acta* **510**:91-100.
- Miao, A. J., W. X. Wang, et P. Juneau. 2005. Comparison of Cd, Cu, and Zn toxic effects on four marine phytoplankton by pulse-amplitude-modulated fluorometry. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**:2603-2611.
- Morel, F. M. M. 1983. *Principles of Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- Morel, F. M. M., R. J. M. Hudson, et N. M. Price. 1991. Limitation of productivity by trace metals in the sea. *Limnology and Oceanography* **36**:1742-1755.
- Mosulen, S., M. J. Dominguez, J. Vigar, C. Vilchez, A. Guiraum, et J. M. Vega. 2003. Metal toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Effect of sulfate and nitrate assimilation. *Biomolecular Engineering* **20**:199-203.
- Mueller, K. K., S. Lofts, C. Fortin, et P. G. C. Campbell. 2012. Improving trace metal speciation predictions in natural aquatic systems: incorporation of dissolved organic matter (DOM) spectroscopic quality. *Environmental Chemistry* **9**:356-368.
- Nassiri, Y., J. Wéry, J. L. Mansot, et T. Ginsburger-Vogel. 1997. Cadmium bioaccumulation in *Tetraselmis suecica*: An electron energy loss spectroscopy (EELS) study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **33**:156-161.
- Nevo, Y. et N. Nelson. 2006. The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1763**:609-620.
- Paquin, P. R., J. W. Gorsuch, S. Apte, G. E. Batley, K. C. Bowles, P. G. C. Campbell, C. G. Delos, D. M. Di Toro, R. L. Dwyer, F. Galvez, R. W. Gensemer, G. G. Goss, C. Hogstrand, C. R. Janssen, J. C. McGeer, R. B. Naddy, R. C. Playle, R. C. Santore, U. Schneider, W. A. Stubblefield, C. M. Wood, et K. B. Wu. 2002. The biotic ligand model: A historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* **133**:3-35.
- Phinney, J. T. et K. W. Bruland. 1994. Uptake of lipophilic organic Cu, Cd, and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environmental Science and Technology* **28**:1781-1790.

- Pinto, E., T. C. S. Sigaud-Kutner, M. A. S. Leitao, O. K. Okamoto, D. Morse, et P. Colepicolo. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology* **39**:1008-1018.
- Pröschold, T., E. H. Harris, et A. W. Coleman. 2005. Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **170**:1601-1610.
- Rainbow, P. S. et S. N. Luoma. 2011. Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates - Modelling zinc in crustaceans. *Aquatic Toxicology* **105**:455-465.
- Rea, P. A., O. K. Vatamaniuk, et D. J. Rigden. 2004. Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase. *Plant Physiology* **136**:2463-2474.
- Réty, C. 2006. Mesure de la toxicité des métaux envers les algues unicellulaires: comparaison de deux méthodes, culture en lots et culture en continu (turbidostat). Rapport de stage de master 2, Stage de Master 2 réalisé à l'INRS-Eau, Terre et environnement, Québec, Quebec.
- Rosakis, A. et W. Köster. 2004. Transition metal transport in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* - Genomic sequence analysis. *Research in Microbiology* **155**:201-210.
- Rosakis, A. et W. Köster. 2005. Divalent metal transport in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* is mediated by a protein similar to prokaryotic Nramp homologues. *BioMetals* **18**:107-120.
- Rosko, J. J. et J. W. Rachlin. 1977. The effect of cadmium, copper, mercury, zinc and lead on cell division, growth, and chlorophyll a content of the chlorophyte *Chlorella vulgaris*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **104**:226-233.
- Ruiz, F. A., N. Marchesini, M. Seufferheld, Govindjee, et R. Docampo. 2001. The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. *Journal of Biological Chemistry* **276**:46196-46203.
- Schecher, W. D. et D. C. McAvoy. 1992. MINEQL+: A software environment for chemical equilibrium modeling. *Computers, Environment and Urban Systems* **16**:65-76.
- Sigg, L., F. Black, J. Buffle, J. Cao, R. Cleven, W. Davison, J. Galceran, P. Gunkel, E. Kalis, D. Kistler, M. Martin, S. NoÅ«l, Y. Nur, N. Odzak, J. Puy, W. Van Riemsdijk, E. Temminghoff, M. L. Tercier-Waeber, S. Toepperwien, R. M. Town, E. Unsworth, K. W. Warnken, L. Weng, H. Xue, et H. Zhang. 2006. Comparison of analytical techniques for dynamic trace metal speciation in natural freshwaters. *Environmental Science and Technology* **40**:1934-1941.
- Skowronski, T., B. Pawlik, et M. Jakubowski. 1988. Reduction of cadmium toxicity to green microalga *Stichococcus bacillaris* by manganese. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **41**:915-920.
- Slaveykova, V. I. et K. J. Wilkinson. 2002. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science and Technology* **36**:969-975.
- Slaveykova, V. I. et K. J. Wilkinson. 2005. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model. *Environmental Chemistry* **2**:9-24.
- Stauber, J. L. et T. M. Florence. 1987. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biology* **94**:511-519.
- Stauber, J. L. et T. M. Florence. 1990. Mechanism of toxicity of zinc to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Marine Biology* **105**:519-524.

- Steemann Nielsen, E. et L. Kamp-Nielsen. 1970. Influence of deleterious concentrations of copper on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiologia Plantarum* **23**:828-840.
- Steemann Nielsen, E., L. Kamp-Nielsen, et S. Wium-Andersen. 1969. The effect of deleterious concentrations of copper on the photosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiologia Plantarum* **22**:1121-1133.
- Stoiber, T. L., M. M. Shafer, et D. E. Armstrong. 2012. Relationships between surface-bound and internalized copper and cadmium and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **31**:324-335.
- Sunda, W. G. et R. R. L. Guillard. 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *Journal of Marine Research* **34**:511-529.
- Sunda, W. G. et S. A. Huntsman. 1986. Relationships among growth rate, cellular manganese concentrations and manganese transport kinetics in estuarine and oceanic species of the diatom *Thalassiosira*. *Journal of Phycology* **22**:259-270.
- Sunda, W. G. et S. A. Huntsman. 1992. Feedback interactions between zinc and phytoplankton in seawater. *Limnology and Oceanography* **37**:25-40.
- Sunda, W. G. et S. A. Huntsman. 1995a. Cobalt and zinc interreplacement in marine phytoplankton: Biological and geochemical implications. *Limnology and Oceanography* **40**:1404-1417.
- Sunda, W. G. et S. A. Huntsman. 1995b. Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton. *Marine Chemistry* **50**:189-206.
- Sunda, W. G. et S. A. Huntsman. 1995c. Regulation of copper concentration in the oceanic nutricline by phytoplankton uptake and regeneration cycles. *Limnology and Oceanography* **40**:132-137.
- Sunda, W. G. et S. A. Huntsman. 1996. Antagonisms between cadmium and zinc toxicity and manganese limitation in a coastal diatom. *Limnology and Oceanography* **41**:373-387.
- Sunda, W. G. et S. A. Huntsman. 1998a. Control of Cd concentrations in a coastal diatom by interactions among free ionic Cd, Zn, and Mn in seawater. *Environmental Science and Technology* **32**:2961-2968.
- Sunda, W. G. et S. A. Huntsman. 1998b. Interactions among Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Mn^{2+} in controlling cellular Mn, Zn, and growth rate in the coastal alga *Chlamydomonas*. *Limnology and Oceanography* **43**:1055-1064.
- Sunda, W. G. et S. A. Huntsman. 1998c. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *Science of the Total Environment* **219**:165-181.
- Sunda, W. G. et S. A. Huntsman. 2000. Effect of Zn, Mn, and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: Implications for oceanic Cd cycling. *Limnology and Oceanography* **45**:1501-1516.
- Templeton, D. M., F. Ariese, R. Cornelis, L. G. Danielsson, H. Muntau, H. P. Van Leeuwen, et R. Lobinski. 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry* **72**:1453-1470.
- Thomine, S., R. Wang, J. M. Ward, N. M. Crawford, et J. I. Schroeder. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:4991-4996.

- Töpperwien, S., R. Behra, et L. Sigg. 2007a. Competition among zinc, manganese, and cadmium uptake in the freshwater alga *Scenedesmus vacuolatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**:483-490.
- Töpperwien, S., H. Xue, R. Behra, et L. Sigg. 2007b. Cadmium accumulation in *Scenedesmus vacuolatus* under freshwater conditions. *Environmental Science and Technology* **41**:5383-5388.
- Torricelli, E., G. Gorbi, B. Pawlik-Skowronska, L. S. Di Toppi, et M. G. Corradi. 2004. Cadmium tolerance, cysteine and thiol peptide levels in wild type and chromium-tolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Aquatic Toxicology* **68**:315-323.
- Tukaj, Z., A. Bascik-Remisiewicz, T. Skowronski, et C. Tukaj. 2007. Cadmium effect on the growth, photosynthesis, ultrastructure and phytochelatin content of green microalga *Scenedesmus armatus*: A study at low and elevated CO₂ concentration. *Environmental and Experimental Botany* **60**:291-299.
- Voutsinas, G., F. E. Zarani, et A. Kappas. 1997. The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum Vulgare*. *Cell Biology International* **21**:411-418.
- Weger, H. G. et G. S. Espie. 2000. Ferric reduction by iron-limited *Chlamydomonas* cells interacts with both photosynthesis and respiration. *Planta* **210**:775-781.
- Whitfield, M. et D. R. Turner. 1979. Critical assessment of the relationship between biological thermodynamic and electrochemical availability. *Chemical Modeling in Aqueous Systems*:657-680.
- Wilkinson, K. J., P. M. Bertsch, C. H. Jagoe, et P. G. C. Campbell. 1993. Surface complexation of aluminum on isolated fish gill cells. *Environmental Science and Technology* **27**:1132-1138.
- Wilkinson, K. J., P. G. C. Campbell, et P. Couture. 1990. Effect of fluoride complexation on aluminium toxicity towards juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **47**:1446-1452.
- Williams, R. J. P. 2002. The fundamental nature of life as a chemical system: The part played by inorganic elements. *Journal of Inorganic Biochemistry* **88**:241-250.
- Worms, I. A. M. et K. J. Wilkinson. 2007. Ni uptake by a green alga. 2. Validation of equilibrium models for competition effects. *Environmental Science and Technology* **41**:4264-4270.
- Xue, H., D. Kistler, et L. Sigg. 1995. Competition of copper and zinc for strong ligands in a eutrophic lake. *Limnology and Oceanography* **40**:1142-1152.
- Xue, H. et L. Sigg. 1998. Cadmium speciation and complexation by natural organic ligands in fresh water. *Analytica Chimica Acta* **363**:249-259.
- Xue, H. B., W. Stumm, et L. Sigg. 1988. The binding of heavy metals to algal surfaces. *Water Research* **22**:917-926.
- Xue, X., C. M. Collins, et H. G. Weger. 1998. The energetics of extracellular Fe(III) reduction by iron-limited *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* **34**:939-944.
- Zhao, H. et D. Eide. 1996. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:2454-2458.



Partie II : ARTICLES SCIENTIFIQUES

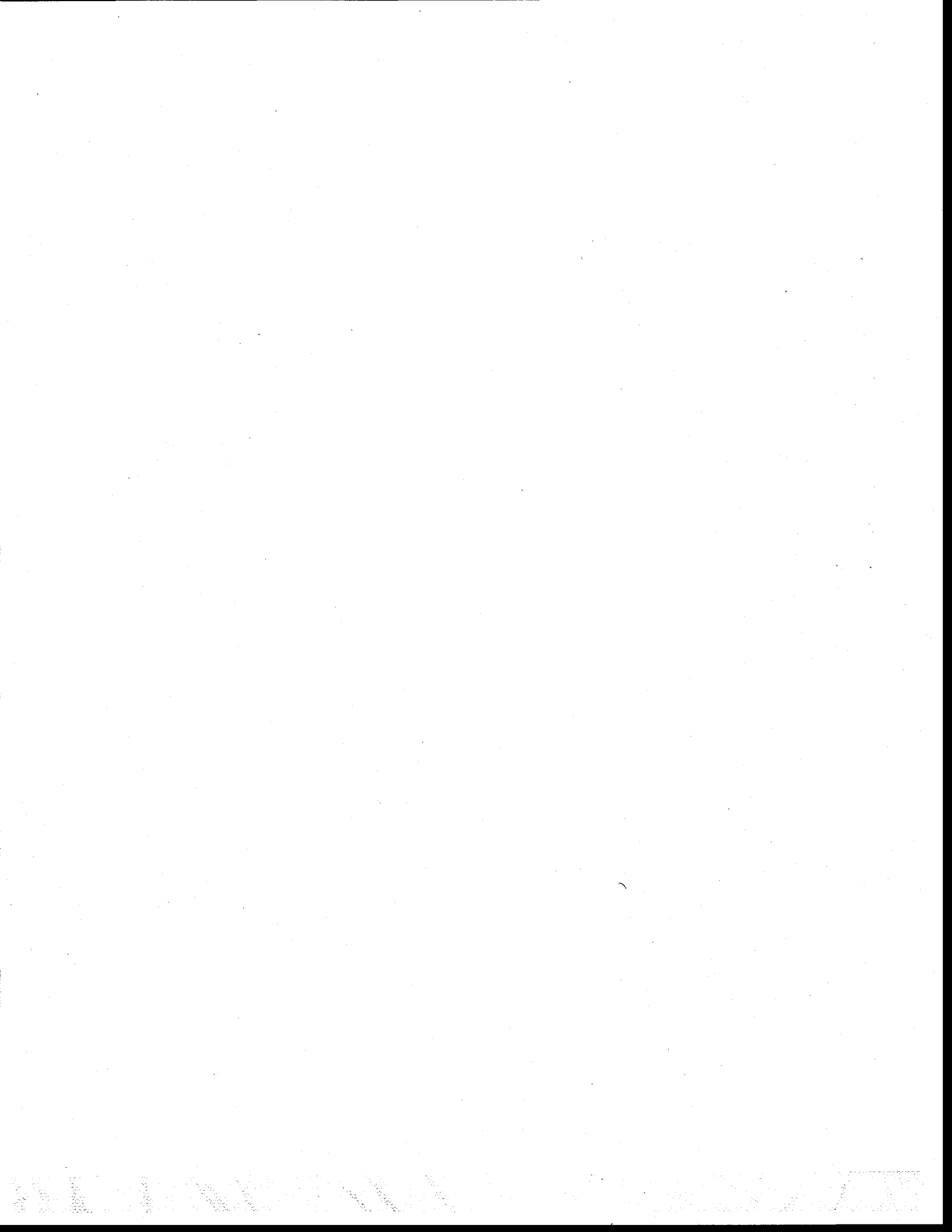
7. ARTICLE #1

Influence of essential elements on cadmium uptake and toxicity in a unicellular green alga: the protective effect of trace zinc and cobalt concentrations

Authors: Michel Lavoie†, Claude Fortin† and Peter G.C. Campbell†

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

Article publié dans *Environmental Toxicology and Chemistry*



Abstract – Within the biotic ligand model (BLM) construct, major cations are considered to be simple competitors for metal binding to uptake sites and may offer some protection against metal-induced toxicity, but the influence of essential trace elements and cell pre-conditioning to different micronutrient concentrations on metal uptake and toxicity is considered to be negligible. In order to test these underlying assumptions, we monitored Cd uptake and toxicity in a green alga (*Chlamydomonas reinhardtii*) after long-term exposures (60 h) to a range of environmentally realistic free Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , and Zn^{2+} concentrations buffered with nitrilotriacetic acid. A 200-fold increase in free $[\text{Mn}^{2+}]$ as well as a 100-fold increase in free $[\text{Fe}^{3+}]$ did not affect Cd uptake or toxicity, whereas a 50-fold increase in free $[\text{Ca}^{2+}]$ effectively offered some protection, as predicted by the BLM. However, it was also found that a 10-fold increase in free $[\text{Cu}^{2+}]$ significantly enhanced Cd toxicity by a factor of approximately 2, whereas a 100-fold increase in free $[\text{Zn}^{2+}]$ and $[\text{Co}^{2+}]$ from 10^{-11} to 10^{-9} M significantly decreased Cd uptake and toxicity by more than twofold. These effects did not change with prior algal acclimation to different essential micronutrient concentrations. Low essential trace metal concentrations may thus strongly affect the uptake and toxicity of cadmium in freshwater algae and should thus be taken into consideration in future developments of the BLM.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, Micronutrients, Toxicity, Metal, Biotic Ligand Model

INTRODUCTION

Since the end of the 1970s, numerous experiments have contributed to the identification of a strong relationship between the free metal ion concentration in aqueous environments and metal accumulation as well as toxicity, leading to the establishment of the free ion activity model [1]. The refinement of the simple mechanistic basis explaining metal uptake/toxicity in aquatic organisms offered by the free ion activity model led to the formulation of the Biotic Ligand Model (BLM) [2-4]. Although the BLM shares with the free ion activity model the same basic principles and premises (the biological response is proportional to the free ion activity for a given exposure medium ionic composition), it also incorporates the competitive effects of protons, calcium, and magnesium for metal binding to uptake sites.

The BLM is a useful tool to predict (acute and short-term) metal toxicity to aquatic organisms, although some limitations have been documented [2, 5]. More work is however necessary to extend the applicability of the BLM to the prediction of chronic metal toxicity. Indeed, several studies have shown that the BLM is less adapted to predict chronic, long-term (transgenerational) metal uptake due to poorly understood effects of Ca and Mg on the biotic ligands or the organisms' physiology (e.g., on *Daphnia magna*; 21-d reproduction rate; [6]). Moreover, studies on marine phytoplankton revealed that the concentrations of Mn, Zn, [7, 8], and Fe [9, 10] influence Cd uptake, largely via non-competitive inhibition (i.e., through the synthesis or shutdown of membrane-bound transporters). For instance, pre-exposure to varying free Mn^{2+} and Zn^{2+} concentrations was shown to modulate Cd uptake rate by more than 10-fold in marine diatoms and coccolithophores [11, 12]. This strong essential metal

regulation combined with competitive effects has also been shown to control the uptake of a non-essential metal (Cd) sharing the Zn and Mn transporter in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* [7].

In freshwater environments, the effects of trace metal nutrition on nonessential metal uptake in algae have been much less studied. The few available data suggest that metal (Cd) uptake can be competitively inhibited by other trace metals (Zn, Mn) depending on the algae species [13, 14]. There are also indications that short-term Zn transport flux into the green alga *Chlorella kesslerii* is strongly regulated, varying by nearly 100-fold when the cells are preconditioned to 10^{-11} M or 10^{-9} M free Zn^{2+} [15]. It is thus reasonable to suggest that regulation of essential metal transport rates by the cell could influence uptake of nonessential metals sharing the same uptake system.

Given the documented important influence of some essential metals on Cd uptake and toxicity in marine algae and the paucity of data about such interactions in freshwater algae, we decided to explore the effects of several essential elements (Ca, Zn, Co, Fe, Mn, Cu) on Cd uptake and toxicity in a green alga (*Chlamydomonas reinhardtii*) in long-term exposures (60 h). Cells were exposed to Cd over a range of environmentally realistic free Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} concentrations buffered with nitrilotriacetic acid (NTA). The influence of long-term cell pre-conditioning to different micronutrient concentrations on Cd uptake and toxicity was also investigated. The development of realistic toxicity models requires insight into the relationships between the composition of essential/non essential metal mixtures and the resulting metal toxicity. Such quantitative data are presented here.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and plastic/glassware

Salts used for cultures and experiments were of analytical grade or better. Radio-labelled Cd ($^{109}\text{CdCl}_2$; $0.4 \text{ mCi } \mu\text{mol}^{-1}$) from Isotope Products and concentrated analytical standards of Cd, Zn, Co, Cu, Mn, and Fe from SCP Science (1 mg ml^{-1}) were used to spike experimental media. Nitrilotriacetate sodium salt (>99%), 3-N-morpholino-propanesulfonic acid (MOPS) (>99%) were obtained from Sigma Scientific. All polycarbonate containers and glassware were soaked for 24 h in 15% (v/v) HNO_3 (ACS grade, Fisher Scientific), rinsed five times with demineralized water, two times with ultrapure water ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$; Nanopure grade) and then dried under a class 100 laminar flow hood, where all manipulations that required precautions against possible contamination by airborne particulates were performed.

Test organisms and culture conditions

The unicellular green alga *C. reinhardtii* P. A. Dang. (CPCC 11 or UTCC 11, walled wild type) was obtained from the Canadian Phycological Culture Center, formerly known as the University of Toronto Culture Collection. Asynchronous batch cultures were grown axenically (as determined visually by culture plating) in 100 ml of modified high salt medium – low metal MHSM-LM culture medium (Table 1). The growth and exposure media pH were buffered at 7.0 with noncomplexing MOPS buffer [16, 17] and the free metal concentrations were buffered with the non-assimilable ligand NTA [18, 19]. Targeted total metal

concentrations (Mn_T , Zn_T , Fe_T , Co_T , Cu_T) in MHSM-LM culture medium were measured by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES, Varian Vista AX CCD). Axenic stock algae cultures were maintained in 250 ml Erlenmeyer glass flasks under constant rotary agitation (100 rpm), illumination ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and temperature ($20.0 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$). A 2-ml sub-sample of algal culture was transferred to a sterile culture medium every week using a sterile serological pipette.

Cellular densities were determined with an electronic particle counter (Multisizer 3 Coulter Counter, 70 μm aperture; Beckman) after appropriate dilution in Isoton III-electrolyte. Cultures were periodically checked for bacterial contamination by plating on nutrient agar (Difco Bacto Agar, Fisher Scientific). Culture media (without trace metal) as well as material (Erlenmeyer flasks and filtration apparatus) destined for algal cultures were autoclaved at 121°C for 15 min. Culture or exposure media were then supplemented with a filter-sterilized trace metal mix (0.2 μm polycarbonate membrane, 47 mm; General Electric).

Optimizing the culture medium composition

The MHSM-LM culture medium, derived from the MHSM-1 culture medium [20], was specifically designed to study the effect of the free trace metal ions and calcium on Cd uptake and toxicity. The minimum calculated free ion concentrations of the studied cations in the MHSM-LM medium were $2 \times 10^{-5} \text{ M Ca}^{2+}$, $5 \times 10^{-9} \text{ M Mn}^{2+}$, $10^{-11} \text{ M Zn}^{2+}$, $10^{-11} \text{ M Co}^{2+}$, $10^{-19} \text{ M Fe}^{3+}$ (or $9 \times 10^{-11} \text{ M Fe}'$ where Fe' is mainly $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ and $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{aq})$), and $10^{-14} \text{ M Cu}^{2+}$ (Table 1). No Cd was detected in our growth media (ICP-AES detection limit for Cd_T of $2 \times 10^{-9} \text{ M}$) such that background free Cd^{2+} concentrations are expected to be below 10^{-12} M

Cd^{2+} . The ionic strength was adjusted to 22 meq L^{-1} with 1 M NaNO_3 and when Ca concentrations in the exposure media were changed, NaNO_3 concentrations were adjusted so as to maintain a constant ionic strength. For our experimental conditions, the Na_T concentration was decreased from 1.7×10^{-2} M to 1.3×10^{-2} M when free Ca^{2+} concentration was increased from 2×10^{-5} M to 10^{-3} M; such small variations in Na concentration were assumed to have negligible effects on the Ca or Cd uptake by the algae. Algae growth rates (calculated on the basis of cell number, surface, or volume) were not significantly different in the MHSM-1 or MHSM-LM media.

Nitrilotriacetic acid was chosen as the metal buffer to minimize the uncertainty in the Cd speciation calculations. When the total metal concentration approaches the total ligand concentration (i.e., near the complexation capacity of the chelating agent), the free metal ion concentration becomes poorly buffered in the sense that it is very sensitive to variations in the total metal and ligand concentrations (especially with strong metal ligands such as ethylenediaminetetraacetic acid). In this region, small increases in the total concentration of a given metal lead to a sharp increase in the free metal concentration, and free ion concentrations of other metals in solution also increase due to competition for the complexing ligand. Hence, the use of a moderately strong complexing agent (such as NTA) allows for better control of the free metal concentrations over a wide concentration range. Metal-NTA complexes are known to be unable to cross cell membranes [18, 19].

Preparation of experimental media

The concentrations of the free metal ions in the medium were computed with the MINEQL⁺ chemical speciation program (version 4.6; Schecher and McAvoy, 1992) with updated equilibrium constants [21], using total measured metal concentrations as input data. Cadmium was added to the experimental media by direct spiking of a ¹⁰⁹Cd radio-isotope solution (specific activity adjusted with stable Cd between 0.5 and 50 $\mu\text{Ci } \mu\text{mol}^{-1}$). The experimental media contained the same major nutrients as the culture media, with a pH buffered at 7.0 with MOPS (10 mM) and adjusted with small additions of 0.5 M NaOH, but the Cd^{2+} and/or Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} free metal concentrations were varied. Addition of Cd and other metals to the experimental media leads to dissociation of some of the pre-existing metal-NTA complexes. Therefore, in order to keep free essential metal concentrations constant, the free NTA^{3-} concentration was kept constant by adjusting the total NTA concentration. Throughout the present study, Cu-, Co-, Zn-, Fe-, and Cd-NTA complexes were present in more than 1000-fold excess over the free metal ions, affording strong buffering of the free trace metal ion concentrations.

In the first set of experiments, we increased each free essential metal concentration one at a time to investigate their effects on Cd uptake and toxicity ($[\text{NTA}]_{\text{T}}$ ranging from 1 to 6.5×10^{-4} M). Hence, we increased $[\text{Ca}^{2+}]$ to 10^{-3} M (MHSM-LM + Ca), $[\text{Zn}^{2+}]$ to 10^{-9} M (MHSM-LM + Zn), $[\text{Co}^{2+}]$ to 10^{-9} M (MHSM-LM + Co), $[\text{Mn}^{2+}]$ to 10^{-6} M (MHSM-LM + Mn), $[\text{Cu}^{2+}]$ to 10^{-13} M (MHSM-LM + Cu), and $[\text{Fe}^{3+}]$ to 10^{-17} M (or $[\text{Fe}'] = 9 \times 10^{-9}$ M) (MHSM-LM + Fe), while adjusting $[\text{Cd}^{2+}]$ to 2.3×10^{-11} M (4.2×10^{-8} M total Cd) (a non-inhibitory concentration) or 6.7×10^{-9} M (1.1×10^{-5} M total Cd) (a concentration leading to partial growth inhibition). Note that the influence of Ca was not tested at the non-inhibitory free Cd^{2+}

concentration and that control growth cultures with no added Cd ($< 10^{-12}$ M free Cd^{2+}) were also performed. For the second set of experiments, we decided to study more closely the effect of Zn and of combined-essential trace metals on Cd uptake and toxicity. To do so, the algae were acclimated to their respective medium for more than three growth cycles and experimental media were prepared with varying free Cd^{2+} concentrations from 10^{-10} M to 8×10^{-7} M (1.8×10^{-7} to 1.4×10^{-3} M total Cd; 10^{-4} to 1.5×10^{-3} M total NTA) in three different experimental media: 1) the MHSM-LM medium; 2) the MHSM-LM medium supplemented with Zn (10^{-9} M free Zn^{2+} ; MHSM-LM + Zn medium); and 3) the MHSM-LM medium supplemented with Fe, Cu, Mn, Zn, and Co (10^{-17} M free Fe^{3+} , 10^{-13} M free Cu^{2+} , 10^{-6} M free Mn^{2+} , 10^{-9} M free Zn^{2+} and 10^{-9} M free Co^{2+} ; the MHSM-HM medium).

All the above experimental media were left to equilibrate for 24 h before inoculation of the test alga ($40,000 \text{ cells ml}^{-1}$). All experiments were performed in triplicate in 250-ml polycarbonate Erlenmeyer flasks containing 100 ml of growth medium. Total concentrations of cations were measured with ICP-AES and were within 10% of the targeted concentrations.

Fe speciation

Speciation calculations with MINEQL⁺ suggest that no amorphous iron oxyhydroxide precipitates should form within the range of iron concentrations used in this study. Due to the known complexity of iron speciation, we further investigated the possible presence of colloidal iron and its possible effect on Cd speciation. The potential adsorption of Cd on Fe colloids that could be present in the exposure media was verified by analysing ^{109}Cd retained on a $0.025 \mu\text{m}$ pore size (47 mm diameter) nitrocellulose filter membrane (Millipore).

Triplicates of one litre of the MHSM-LM experimental medium (1.28×10^{-7} M total Fe; 10^{-19} M free Fe^{3+}) and the MHSM-LM + Fe medium (1.24×10^{-5} M total Fe; 10^{-17} M free Fe^{3+}), both containing 1.09×10^{-5} M total Cd (6.7×10^{-9} M free Cd^{2+}), were filtered through two superimposed $0.025 \mu\text{m}$ membranes. The filters were rapidly rinsed with 3×5 ml MHSM-LMR (culture medium without added trace metals solution; Table 1). In both cases, the Cd on the upper filter was not significantly different from the Cd associated with the filtration blank (lower filter). The average of the six filtered-retained total Cd measurements per experimental solution were $7.0 \pm 1.7 \times 10^{-10}$ mol Cd (MHSM-LM media) and $7.9 \pm 3.2 \times 10^{-10}$ mol Cd (MHSM-LM + Fe media) and were not significantly different. The proportion of any possible colloidal Cd with respect to total Cd in the experimental media would be $<0.007\%$. Thus, the adsorption of Cd on (possible) colloidal iron remains quantitatively unimportant and will not affect Cd speciation in well-buffered NTA media.

Long term Cd uptake and toxicity experiments

For the first set of experiments (media composition described earlier), *C. reinhardtii* cells acclimated for more than seven growth cycles (three to four weeks) to the MHSM-LM, MHSM-LM + Zn, MHSM-LM + Co, MHSM-LM + Mn, or MHSM-LM + Fe culture media were also used in order to test for the effect of long-term acclimation to varying essential trace metal concentrations on Cd uptake and toxicity. For the second set of experiments, the algae were previously acclimated to their respective growth medium for more than three growth cycles (MHSM-LM or MHSM-LM + Zn). Exponentially growing cells were harvested by centrifugation ($20,000 \text{ g}$, 5 min) and were rinsed four times with MHSM-LMR to remove any

algal exudates present in the original algae culture prior to inoculation into experimental media at an initial cell concentration of 40,000 cells ml⁻¹.

After a 60-h growth period (corresponding to the late exponential phase), algal cell numbers were measured in triplicate for each treatment using a particle counter. The culture yield relative to control was calculated by dividing the mean final cell numbers of the exposed algae by that of the control cultures. In parallel, 10-ml subsamples were gently filtered onto two superimposed 2 µm polycarbonate filters and the harvested cells were rinsed for 10 min with 10 ml 10⁻⁴ M total EDTA and then three times with 10 ml of MHSM-LMR. The EDTA rinse removes the ¹⁰⁹Cd bound to the surface of the algal cells, and the remaining Cd is thus operationally defined as intracellular [19, 22]. The activity of the lower filter was subtracted from that measured on the upper filter to correct for passive retention of ¹⁰⁹Cd by the polycarbonate filters. Filter radioactivity was measured with a gamma counter (Wallac 1480) in vials containing 2 ml of water to ensure constant sample geometry. The counting time was set at 1,000 s or to a maximum of 100,000 counts. Counts per minute (cpm) were converted into moles of Cd, taking into account the detector efficiency, radioactive decay, and the Cd specific activity. Mass balance calculations based on ¹⁰⁹Cd activities in the filtrates from the algal collection step showed that losses of total Cd from solution were less than 10% for varying free Cd²⁺ exposure concentration at the lowest micronutrient concentrations (MHSM-LM medium). Erlenmeyer flasks with very low free Cd²⁺ concentrations (≤10⁻¹⁰ M) without inoculated algae revealed no significant adsorptive loss after the 60-h period.

Statistics

Significant differences among the data were identified using one or two-way analyses of variance (ANOVA) followed by a Tukey pairwise comparison test. The statistical distribution of the data was always verified using raw or, if needed, transformed data using the Box-Cox transformation. Statistical analyses were performed using Systat software (Version 10.0) and results were considered to be significant if $p < 0.05$. Unless otherwise indicated, errors are given as \pm one standard deviation. Also, the Excel macro REGTOX (http://www.normalesup.org/~vindimian/en_index.html) was used to calculate EC_{xS} with the Hill approach. The 95% confidence intervals around the means were estimated by a bootstrap nonparametric simulation.

RESULTS AND DISCUSSION

Individual effects of essential cations on Cd uptake or toxicity

Cd uptake and toxicity in the low trace metal medium. For each experiment where the effect of micronutrients was tested, we first measured Cd uptake and toxicity in the MHSM-LM basic medium as a positive control. As expected, a concentration of 2.3×10^{-11} M free Cd^{2+} did not significantly affect the relative algal yield or cellular volume yield in any of the exposure media ($p > 0.05$; data not shown). In the presence of a constant free Cd^{2+} concentration of 6.7×10^{-9} M, algal yields after 60 h of growth, expressed as total cell concentration in cells ml^{-1} , decreased significantly ($p < 0.01$) with respect to control cultures.

This decrease in cell yields was observed in all experiments with 6.7×10^{-9} M free Cd^{2+} , regardless of the prior trace metal acclimation concentrations (six independent experiments, each with $n=3$). Some variability among experiments was however observed with yields varying between 20 and 43% of control cultures (Fig. 1A). When normalized to total cell volume rather than total cell numbers, the apparent toxic effects became quantitatively less important and were similar among the six independent experiments (around 10-20% inhibition, with no significant inter-experiment variability). The slight toxic effect of 6.7×10^{-9} M free Cd^{2+} on total cell volume with respect to control cells was still significant for the cells that had been previously acclimated to low trace metal concentrations only on two occasions ($p < 0.05$; Fig. 1B, solid black bars with asterisks). The lower apparent Cd toxicity on total cellular volume yield, when compared to that observed with cell numbers as the endpoint (Fig. 1), was due to the cells' ability to grow (i.e., their metabolism remained at least partially functional) even though cell division processes were inhibited. This combination resulted in an increase in the mean volume per cell in the presence of relatively high free Cd^{2+} concentrations and compensated in part for the decrease in cell yields. Cell division processes were also shown to be primarily affected by toxic Zn and Cu concentrations in experiments with the marine diatom, *Nitzschia closterium*, whereas respiration and photosynthesis were not yet inhibited [23, 24].

Similar trends were observed for Cd accumulation on a per cell or per volume basis. For cells acclimated to low trace metal concentrations and exposed to 6.7×10^{-9} M free Cd^{2+} plus low added trace metal concentrations, the mean Cd accumulation on a cell volume basis was not significantly different among all six independent experiments (8.1 ± 0.7 amol Cd μm^{-3} ; Fig. 2B, solid black bars). In contrast, mean Cd accumulation on a per cell basis for the

same experiments was much more variable (1000 to 2700 amol Cd cell⁻¹) and differed among treatments ($p=0.01$; Fig. 2A, solid black bars).

Hence, cellular volume as an endpoint for toxicity and accumulation seems more reproducible among experiments but provides a less sensitive response than cell numbers. Since the (six independent) experiments were carried out over a two-year period, it is possible that slight variations in the sensitivity of cell division to a given free Cd²⁺ concentration (inter-experiment variability) result in large differences in Cd accumulation per cell, due to the large effect of cell volume on Cd accumulation (spherical cell volume varies to the third power of the cell radius). Indeed, a larger cellular volume (assuming a proportional increase of the volume of all cellular components; e.g. cellular organelles or membrane-bound structures) would presumably require an increasingly higher amount of essential metal to sustain cellular metabolism and maintain (as much as possible) constant essential metal:carbon ratios. By doing so, the uptake of a nonessential metal like Cd (which is presumed to share a transporter with another essential metal) might be enhanced as well.

Effect of six cationic metals on Cd uptake and toxicity. The effect of free Zn²⁺, Co²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, or Ca²⁺ on Cd toxicity (Fig. 1) and accumulation (Fig. 2) in the presence of 6.7 x 10⁻⁹ M free Cd²⁺ was tested. Note that manipulations of free cations within the range used in the present study and in the *absence* of added cadmium did not significantly affect algal growth on a cell number or volume basis (except for Cu), indicating that algal growth was not significantly limited by any of these essential cations in the MHSM-LM growth medium (Supplemental Data, Fig. S1). Surprisingly, increasing [Cu²⁺] from 10⁻¹⁴ to 10⁻¹³ M (without added Cd) significantly inhibited cellular growth in terms of cell number or cell volume, by 49 ± 7% and 30 ± 3%, respectively (Supplemental Data, Fig. S1). We speculate

that low $[\text{Cu}^{2+}]$ might exert greater toxicity in a growth medium with very low trace metal concentrations than in metal-rich media due to a decrease in competing free essential metals.

A 200-fold increase of $[\text{Mn}^{2+}]$ as well as a 100-fold increase of $[\text{Fe}^{3+}]$ did not affect Cd uptake or toxicity normalized per cell number (Figs. 1A and 2). The absence of any effect of free Mn^{2+} and Fe^{3+} on Cd accumulation (Fig. 2), despite high $[\text{Mn}^{2+}]$ to $[\text{Cd}^{2+}]$ (~40,000) or $[\text{Fe}^{3+}]$ to $[\text{Cd}^{2+}]$ (~400) ratios respectively (Fig. 2C,D), indicates that free Mn^{2+} and Fe^{3+} species at environmentally-relevant concentrations are not significant competitors of Cd uptake in *C. reinhardtii*. The absence of any measurable effect of Mn at a high $[\text{Mn}^{2+}]:[\text{Cd}^{2+}]$ ratio suggests that Cd and Mn do not share the same transporter in this species or that Mn^{2+} affinity for the transporters involved in Cd uptake is very weak (i.e., $[\text{Mn}^{2+}] \ll \text{Mn}$ half-saturation constant for the transporters). In experiments with *Scenedesmus vacuolatus*, Töpperwien and co-workers [13] reported that Mn^{2+} only competed with Cd^{2+} for uptake at $[\text{Mn}^{2+}]:[\text{Cd}^{2+}]$ ratios > 10,000, although it had previously been suggested that Cd^{2+} and Mn^{2+} do compete (at $[\text{Mn}_T]:[\text{Cd}_T]$ ratios near 1) for binding with the same metal transporter in *Chlorella pyrenoidosa* [14].

As opposed to Fe and Mn, Ca did offer some protection against both Cd uptake and toxicity. A 50-fold increase in free Ca^{2+} concentration protects against Cd toxicity (on a cell number basis) and against Cd uptake per cell by a factor of 2.6 to 2.9 (Figs. 1A and 2A), suggesting that changes in Cd toxicity in presence of varying free Ca^{2+} concentration are largely due to changes in the amount of Cd internalized by the cells.

For a fixed free Cd^{2+} concentration of 6.7×10^{-9} M, overall inhibition of algal growth, expressed on a cell number basis, significantly increased approximately 2-fold in the presence

of a 10-fold higher $[\text{Cu}^{2+}]$ (Fig. 1A). This result might be explained by the toxicity of Cu alone, which decreased the cell number by approximately 50% and hence decreased growth biodilution of internalised Cd by a factor of approximately 2 for a 10-fold increase in $[\text{Cu}^{2+}]$ at constant $[\text{Cd}^{2+}]$ (Fig. 2A). The results suggest that Cd toxicity in the presence of varying $[\text{Cu}^{2+}]$ is linked to intracellular Cd quotas, as seen previously for Cd toxicity in the presence of varying $[\text{Ca}^{2+}]$. A synergistic Cu-Cd interaction might also modulate the resulting Cu-Cd toxicity as shown by Franklin et al. [25] in the freshwater tropical alga *Chlorella*. However, our experimental design does not allow this potential Cu-Cd synergistic effect to be quantified precisely.

Among the five trace metals of interest (Co, Cu, Fe, Mn, and Zn) in the present study, Zn and Co were the only ones to protect against Cd uptake and toxicity. The results clearly show that a 100-fold increase of $[\text{Zn}^{2+}]$ and $[\text{Co}^{2+}]$ significantly decreased Cd uptake and toxicity on a per cell basis (Figs. 1A and 2). Algal cell yields based on cell volumes were not significantly inhibited (in the case of the positive control experiment before the Co and Zn experiments) by 6.7×10^{-9} free Cd^{2+} in the MHSM-LM media (Fig. 1B). Cadmium accumulation per cell in the presence of 6.7×10^{-9} free Cd^{2+} decreased by approximately 8- and 2-fold (or by 4- and 1.6-fold on a per volume basis) in the media supplemented with Zn or Co, respectively (Fig. 2A,B). When the cells were exposed to 2.3×10^{-11} M free Cd^{2+} , we also measured a significant protective effect of Zn^{2+} and Co^{2+} on Cd accumulation by approximately 6- and 2-fold, respectively (Fig. 2C,D). The effect of Zn^{2+} or Co^{2+} may result from the synthesis or conformational changes of membrane-bound metal transporters, as well as from competition with Cd at the metal binding site. Töpperwien et al. [13] also reported that

Zn inhibits Cd uptake in the algae *S. vacuolatus*, albeit only at free $[Zn^{2+}]$ to $[Cd^{2+}]$ ratios greater than 14.

Overall, Cd toxicity in the various experimental media varies greatly as a function of the endpoint (cell number or cell volume), the cell numbers being consistently a more sensitive endpoint than cell volumes. Our results are in agreement with several previous studies [26-28] showing that biomass measurements (chlorophyll *a* or *b*, in vivo fluorescence or algal dry weight analyses) underestimate the toxicity of Cd compared to cell division monitoring.

Acclimation to essential trace metal and Cd uptake/toxicity. Interestingly, we found that the effect of each micronutrient on Cd uptake and toxicity remains consistently the same regardless of the earlier acclimation of the algae to the highest or the lowest $[Fe^{3+}]$, $[Mn^{2+}]$, $[Co^{2+}]$, or $[Zn^{2+}]$ used (Figs. 1 and 2). These results show that possible long-term acclimation/adaptation to an essential metal (when metals are separately tested) does not affect Cd uptake and toxicity in *C. reinhardtii*. The literature on the effect of long-term acclimation to a trace metal on a non-essential metal uptake or toxicity is scarce. Hassler et al. [29] have reported that Zn short-term (< 30 min) bioaccumulation and biological responses in the green alga *Chlorella kesslerii* were strongly modulated by exposure free Zn^{2+} concentration after a few days (growth to the mid-exponential growth phase), but remained similar over a 30 to 40 d (composed of 16-19 cell growth cycles) acclimation to 10^{-11} or 10^{-9} M free Zn^{2+} , suggesting that acclimation to Zn is occurring on a time scale of days (or less) instead of weeks. It follows that uptake of any other non-essential metals sharing the Zn transporters would also be unaffected by such changes in *prior* growth conditions.

A closer look into the effect of Zn on Cd uptake and toxicity

The Cd concentrations leading to 50% growth inhibition (EC50) on a cell number basis were almost fivefold lower in the low metal medium (10^{-11} M free Zn^{2+} ; EC50 = 6.2×10^{-9} M free Cd^{2+} , CI_{95%} = $4.9 - 7.3 \times 10^{-9}$) than in the medium supplemented with Zn (10^{-9} M free Zn^{2+} ; EC50 = 3.1×10^{-8} M free Cd^{2+} , CI_{95%} = $2.7 - 3.4 \times 10^{-8}$), confirming that Zn strongly protects against Cd toxicity as evaluated on the basis of cell numbers (Fig. 3A). When normalized to cell volumes, the apparent protective effect of Zn on Cd^{2+} toxicity decreases; the mean EC50 was only two times lower in the MHSM-LM (10^{-11} M free Zn^{2+} ; EC50 = 3.2×10^{-8} M free Cd^{2+} , CI_{95%} = $2.1 - 4.7 \times 10^{-8}$) than in the MHSM + Zn (10^{-9} M free Zn^{2+} ; EC50 = 6.6×10^{-8} M free Cd^{2+} , CI_{95%} = $4.6 - 9.9 \times 10^{-8}$) medium (Fig. 3B). The apparent change in the amplitude of the protective effect of Zn on Cd toxicity according to the selected endpoint could be due to the tendency of the cells grown in the MHSM-LM media to form larger cells (at the beginning of the experiment) than in the +Zn medium. Indeed, we noted that even when grown in the MHSM-LM medium without added Cd, the algal cells experience some apparent difficulty in dividing during the first 20 to 40 h of growth, such that the mean cellular volume (as measured with the particle counter and as seen with microscopic observations) increased markedly with respect to the cells grown in the MHSM+Zn (without added Cd) culture medium. This initial lag in cell division disappeared after approximately 40 h of growth and thus did not significantly affect the 60-h cell yields in the control cultures (Supplemental Data, Fig. S1). We speculate that the initial cell volume enlargement observed in the control MHSM-LM medium might be aggravated by the addition of Cd.

Measuring intracellular Cd uptake in cells exposed in experimental media supplemented or not with Zn also afforded insight into reasons for differences in Cd toxicity

as a function of the free Zn^{2+} exposure concentration. The internalized Cd cell quota leading to 50% growth inhibition (normalized to cell numbers or cell volumes) remained unchanged when the $[Zn^{2+}]$ was varied in the exposure medium (Fig. 3C,D). This result suggests that the protective effect of free Zn^{2+} is not due to a change in intracellular Cd detoxification (e.g., the induction of phytochelatins), but rather to a decrease in intracellular Cd accumulation. It is thus possible that increasing $[Zn^{2+}]$ leads to competition with Cd for binding at a shared metal transport site and/or affects the number or nature of the membrane-bound metal transporters. Hassler and Wilkinson [15] as well as Hassler et al. [29] reported that short-term Zn internalization fluxes increased by nearly 100-fold in *C. kesslerii* cells preincubated at 10^{-11} M rather than at 10^{-9} M free Zn^{2+} , probably because the cells regulate the synthesis of high affinity Zn transport sites in response to available Zn concentrations.

Effect of combined-trace metal concentrations on Cd toxicity

Our results show that *C. reinhardtii* cells (acclimated or not) grown in the MHSM-LM medium are much more sensitive to Cd^{2+} than suggested by previous reports. These earlier studies, however, were carried out in exposure media containing much higher trace metal concentrations than those used in the MHSM-LM medium. Indeed, the EC50 value for *C. reinhardtii* (expressed on a cell number basis) was approximately 2.7×10^{-7} M free Cd^{2+} [2.4 - 3.3×10^{-7} $CI_{95\%}$] when the cells were grown and acclimated in the MHSM-1 (pH 7.0) culture medium [20], whereas Macfie et al. [30] reported an EC50 value around 10^{-7} M free Cd^{2+} for *C. reinhardtii* (wild-type) exposed in the MHSM medium (pH 6.8). Both culture media contain rather high free trace metal concentrations (around 6×10^{-9} M Zn^{2+} , 2×10^{-9} M Co^{2+} ,

2.5×10^{-13} M Cu^{2+} , 10^{-6} M Mn^{2+} , and 9×10^{-19} Fe^{3+}), compared to the MHSM-LM medium, which may well explain the much higher apparent Cd toxicity obtained in the present study as compared to the earlier work.

To verify whether free trace metal concentrations really have that strong of an effect on Cd toxicity, we conducted another experiment with algae cells acclimated for more than three growth cycles to the MHSM-HM medium containing 10^{-17} M Fe^{3+} , 10^{-13} M Cu^{2+} , 10^{-6} M Mn^{2+} , 10^{-9} M Zn^{2+} , and 10^{-9} M Co^{2+} . The algal yields (on a cell number or cell volume basis) were not significantly different in both control media (MHSM-LM or MHSM-HM without added cadmium) demonstrating that algal growth was not limited by any of these trace metals (Supplemental Data, Fig. S1). Yet, in the MHSM-HM medium, the EC50 increased dramatically to 2.6×10^{-7} M free Cd^{2+} [$2.4 - 3.0 \times 10^{-7}$ $\text{CI}_{95\%}$] (on a cell number basis) or 3.0×10^{-7} M free Cd^{2+} [$2.8 - 3.2 \times 10^{-7}$ $\text{CI}_{95\%}$] (on a cell volume basis) (Fig. 4), which is approximately 40- and 9-fold higher, respectively, than the EC50 measured in the MHSM-LM medium as mentioned above (Fig. 3A). This result confirms the important effect of essential free trace metal concentrations on Cd toxicity and shows that the combined effect of trace metals on Cd toxicity cannot be predicted by the mere addition of the protective effects of each essential trace element. Indeed, the effects of Co, Zn, and Cu on Cd toxicity do not seem to be simply additive, since 1) Zn decreased Cd toxicity (EC50; cell numbers) by approximately fivefold (Fig. 3); 2) Co protects less than Zn against Cd toxicity (EC50; cell numbers) (Fig. 2A); 3) Cu exacerbates Cd toxicity—yet the addition of all trace metals combined (Fig. 4) protect against Cd toxicity by approximately a factor of 40. We believe that more studies are needed to fully understand the precise mechanisms at play here, which strongly influence Cd toxicity.

CONCLUSION

With these experiments, we have demonstrated an important and underestimated influence of essential trace metals on Cd uptake and toxicity in a freshwater phytoplankton species, *C. reinhardtii*, at very low free essential metal concentrations with respect to free Cd²⁺ concentrations (e.g., 10⁻⁹ M Zn²⁺ or Co²⁺). As observed with marine species, our results suggest that essential trace metals may control Cd uptake and toxicity in freshwater algal species. On the other hand, acclimation or adaptation to different essential trace metal concentrations (when separately tested) over successive growth cycles (on a time scale of weeks) did not affect Cd uptake and toxicity in *C. reinhardtii*. One of the many challenges in predicting metal uptake and toxicity will be to understand the mechanisms at play and to integrate them into the BLM in order to refine its mechanistic basis.

Supplemental data. Figure S1. Relative algal cell yields in the presence of different free essential element concentrations without added cadmium.

Acknowledgement—We acknowledge the technical assistance provided by Lise Rancourt, Sébastien Duval, and Anissa Bensadoune. Helpful discussions with William G. Sunda and Jacqueline Levy were also very much appreciated. The present study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council Discovery Grant as well as the Metals in the Human Environment Strategic Network programs. Michel Lavoie held a scholarship from the *Fonds Québécois de recherche sur la nature et les technologies*. Claude Fortin and Peter G.C. Campbell are supported by the Canada Research Chair programme.

REFERENCES

- [1] Campbell PGC. 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. In Tessier A, Turner DR, eds, *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA, pp 45-102.
- [2] Campbell PGC, Errécalde O, Fortin C, Hiriart-Baer VP, Vigneault B. 2002. Metal bioavailability to phytoplankton - Applicability of the biotic ligand model. *Comp Biochem Physiol C* 133:189-206.
- [3] Di Toro DM, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Paquin PR, Santore RC. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ Toxicol Chem* 20:2383-2396.
- [4] Paquin PR, Gorsuch JW, Apte S, Batley GE, Bowles KC, Campbell PGC, Delos CG, Di Toro DM, Dwyer RL, Galvez F, Gensemer RW, Goss GG, Hogstrand C, Janssen CR, McGeer JC, Naddy RB, Playle RC, Santore RC, Schneider U, Stubblefield WA, Wood CM, Wu KB. 2002. The biotic ligand model: A historical overview. *Comp Biochem Physiol C* 133:3-35.
- [5] Slaveykova VI, Wilkinson KJ. 2005. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model. *Environ Chem* 2:9-24.
- [6] De Schampelaere KAC, Janssen CR. 2004. Development and field validation of a biotic ligand model predicting chronic copper toxicity to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 23:1365-1375.

- [7] Sunda WG, Huntsman SA. 1998. 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.
- [8] Sunda WG, Huntsman SA. 1998. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *Sci Total Environ* 219:165-181.
- [9] Harrison GI, Morel FMM. 1983. Antagonism between cadmium and iron in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J Phycol* 19:495-507.
- [10] Foster PL, Morel FMM. 1982. Reversal of cadmium toxicity in a diatom: An interaction between cadmium activity and iron. *Limnol Oceanogr* 27:745-752.
- [11] Sunda WG, Huntsman SA. 1992. Feedback interactions between zinc and phytoplankton in seawater. *Limnol Oceanogr* 37:25-40.
- [12] Sunda WG, Huntsman SA. 1986. 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.
- [13] Töpperwien S, Behra R, Sigg L. 2007. Competition among zinc, manganese, and cadmium uptake in the freshwater alga *Scenedesmus vacuolatus*. *Environ Toxicol Chem* 26:483-490.
- [14] Hart BA, Bertram PE, Scaife BD. 1979. Cadmium transport by *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ Res* 18:327-335.
- [15] Hassler CS, Wilkinson KJ. 2003. Failure of the biotic ligand and free-ion activity models to explain zinc bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environ Toxicol Chem* 22:620-626.

- [16] Mash HE, Chin Y-P, Sigg L, Hari R, Xue H. 2003. Complexation of copper by zwitterionic aminosulfonic (Good) buffers. *Anal Chem* 75:671-677.
- [17] Wehr JD, Brown LM, Vanderelst IE. 1986. Hydrogen ion buffering of culture media for algae from moderately acidic, oligotrophic waters. *J Phycol* 22:88-94.
- [18] Simkiss K, Taylor MG. 2001. Trace element speciation at cell membranes: Aqueous, solid and lipid phase effects. *J Environ Monit* 3:15-21.
- [19] Vigneault B, Campbell PGC. 2005. Uptake of cadmium by freshwater green algae: Effects of pH and aquatic humic substances. *J Phycol* 41:55-61.
- [20] Lavoie M, Le Faucheur S, Fortin C, Campbell PGC. 2009. Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquat Toxicol* 92:65-75.
- [21] Martell AE, Smith RM, Motekaitis RJ. 2004. NIST critical stability constants of metal complexes, version 8. National Institute of Standards and Technology. Gaithersburg, MD. Gaithersburg, MD.
- [22] Bates SS, Tessier A, Campbell PGC, Buffle J. 1982. Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. *J Phycol* 18:521-529.
- [23] Stauber JL, Florence TM. 1987. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Mar Biol* 94:511-519.
- [24] Stauber JL, Florence TM. 1990. Mechanism of toxicity of zinc to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Mar Biol* 105:519-524.

- [25] Franklin NM, Stauber JL, Lim RP, Petocz P. 2002. Toxicity of metal mixtures 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.
- [26] Rosko JJ, Rachlin JW. 1977. The effect of cadmium, copper, mercury, zinc and lead on cell division, growth, and chlorophyll a content of the chlorophyte *Chlorella vulgaris*. *Bull Torrey Bot Club* 104:226-233.
- [27] Le Faucheur S, Behra R, Sigg L. 2005. Phytochelatin induction, cadmium accumulation, and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus*. *Environ Toxicol Chem* 24:1731-1737.
- [28] Tukaj Z, Bascik-Remisiewicz A, Skowronski T, Tukaj C. 2007. Cadmium effect on the growth, photosynthesis, ultrastructure and phytochelatin content of green microalga *Scenedesmus armatus*: A study at low and elevated CO₂ concentration. *Environ Exp Bot* 60:291-299.
- [29] Hassler CS, Behra R, Wilkinson KJ. 2005. Impact of zinc acclimation on bioaccumulation and homeostasis in *Chlorella kesslerii*. *Aquat Toxicol* 74:139-149.
- [30] Macfie SM, Tarmohamed Y, Welbourn PM. 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Arch Environ Contam Toxicol* 27:454-458.

Figure captions

Fig. 1: Relative algal yields expressed as total cell numbers (ρ/ρ_0 in panel A) or total cell volumes (v/v_0 in panel B) obtained after a 60-h exposure to 6.7×10^{-9} M Cd^{2+} in the presence of low (LM expo) or high (+Me expo) free Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} concentrations. Algae cells were acclimated (LM accl) to the MHSM-LM medium or to MHSM-LM supplemented with one of the six cations (+Me accl; where Me is Zn, Co, Fe, Mn, Cu, or Ca). Note that ρ and v are respectively the cell concentration ($\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$) and the total cell volume concentration ($\mu\text{m}^3 \text{ml}^{-1}$) of the Cd-exposed algae at $t=60$ h; ρ_0 and v_0 are respectively the cell concentration and the total cell volume concentration of control cultures (without added Cd) at $t=60$ h. Asterisks denote relative yields that are significantly inhibited relative to the control (<1). Error bars are the standard deviations of three replicate algal cultures.

Fig. 2: Intracellular cadmium concentrations in amol Cd cell^{-1} (A, C) or $\text{amol Cd } \mu\text{m}^{-3}$ (B, D) after a 60-h exposure to 6.7×10^{-9} M (A, B) or 2.3×10^{-11} M (C, D) free Cd^{2+} . Asterisks denote significantly different Cd uptake between the supplemented exposure medium (+Me expo; where Me is Zn, Co, Fe, Mn, Cu, or Ca) and the MHSM-LM medium (LM expo). Algae cells were acclimated (LM accl) to the MHSM-LM medium or to MHSM-LM supplemented with one of the six cations (+Me accl; where Me is Zn, Co, Fe, Mn, Cu, or Ca). Error bars are the standard deviations of three replicate algal cultures.

Fig. 3: Relative cell concentration (ρ/ρ_0 in panels A and C) or cellular volume yield (v/v_0 in panels B and D) obtained after a 60-h exposure to varying free Cd^{2+} concentrations in the MHSM-LM (10^{-11} M free Zn^{2+}) and the MHSM-LM + Zn (10^{-9} M free Zn^{2+}) exposure media. The relative yields are plotted as a function of Cd^{2+} concentrations (A, B) or internalized Cd (C, D). Error bars are the standard deviations of three replicate algal cultures.

Fig. 4: Relative cell yield (ρ/ρ_0 in panel A) or cellular volume yield (v/v_0 in panel B) obtained after a 60-h exposure to varying free Cd^{2+} concentrations in the MHSM-LM and the MHSM-HM (i.e. + Zn, Co, Cu, Mn and Fe) exposure medium. The relative yields are plotted as a function of free Cd^{2+} concentrations. Error bars are the standard deviations of three replicate algal cultures.

Figure 1 :

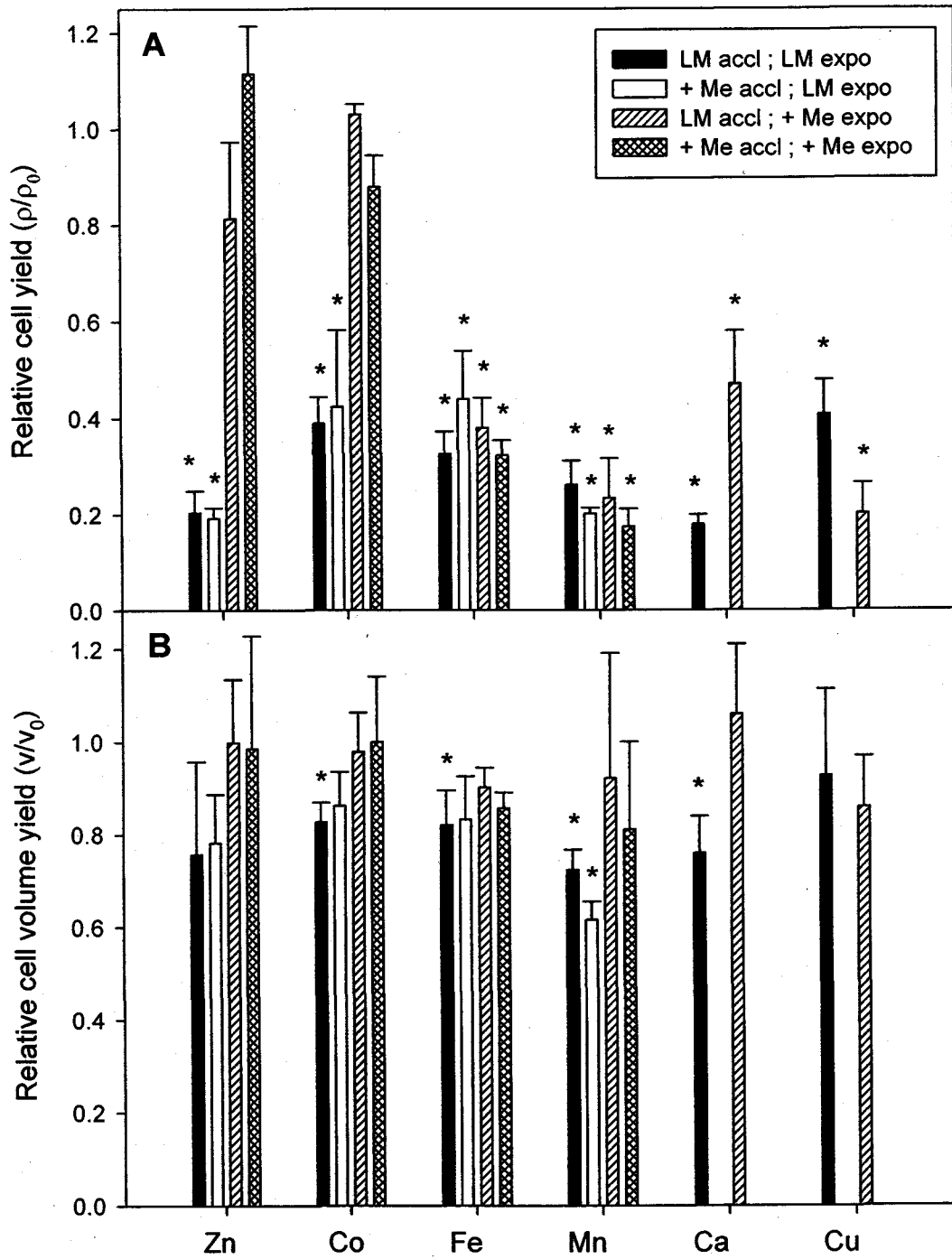


Figure 2 :

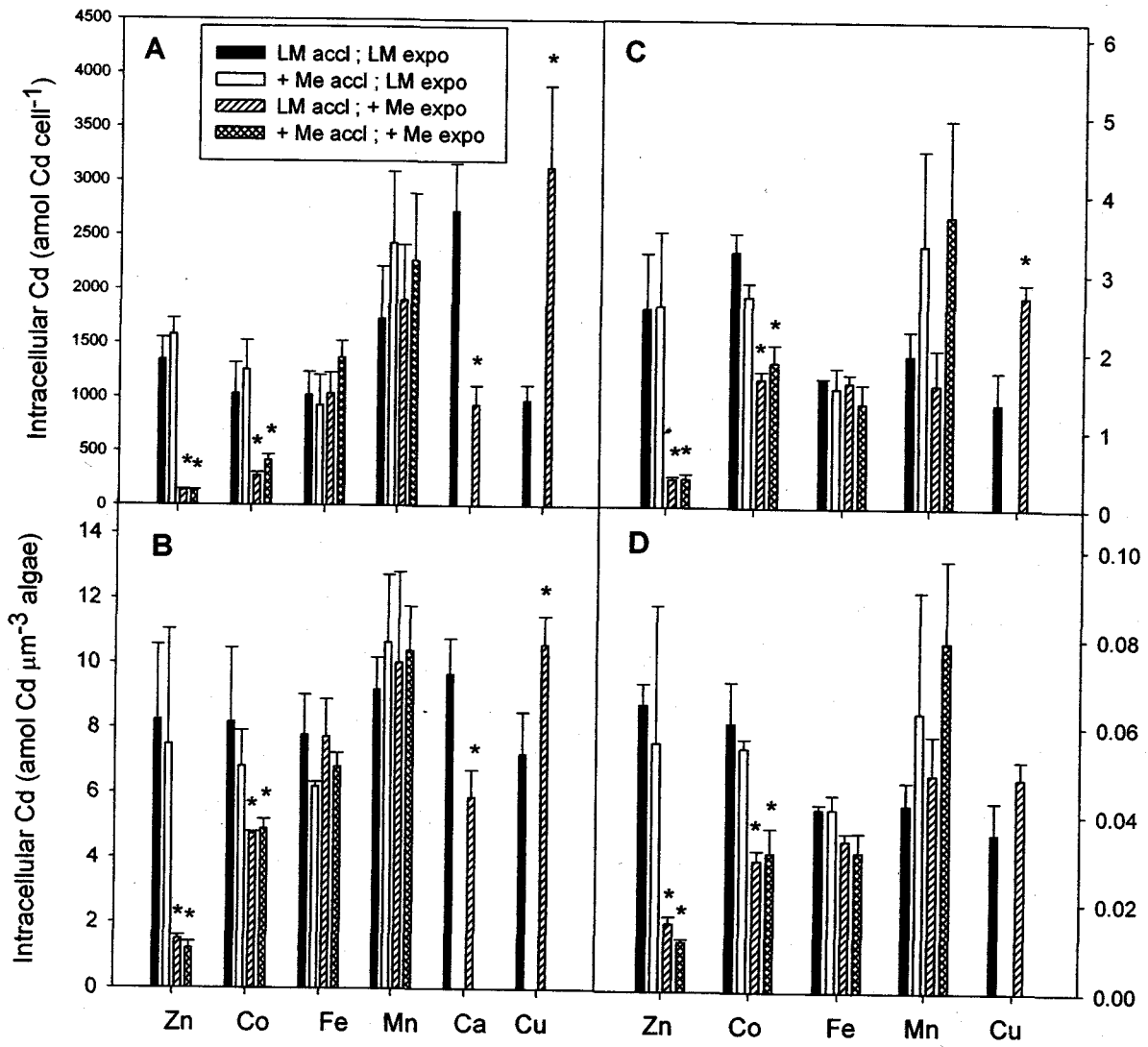


Figure 3 :

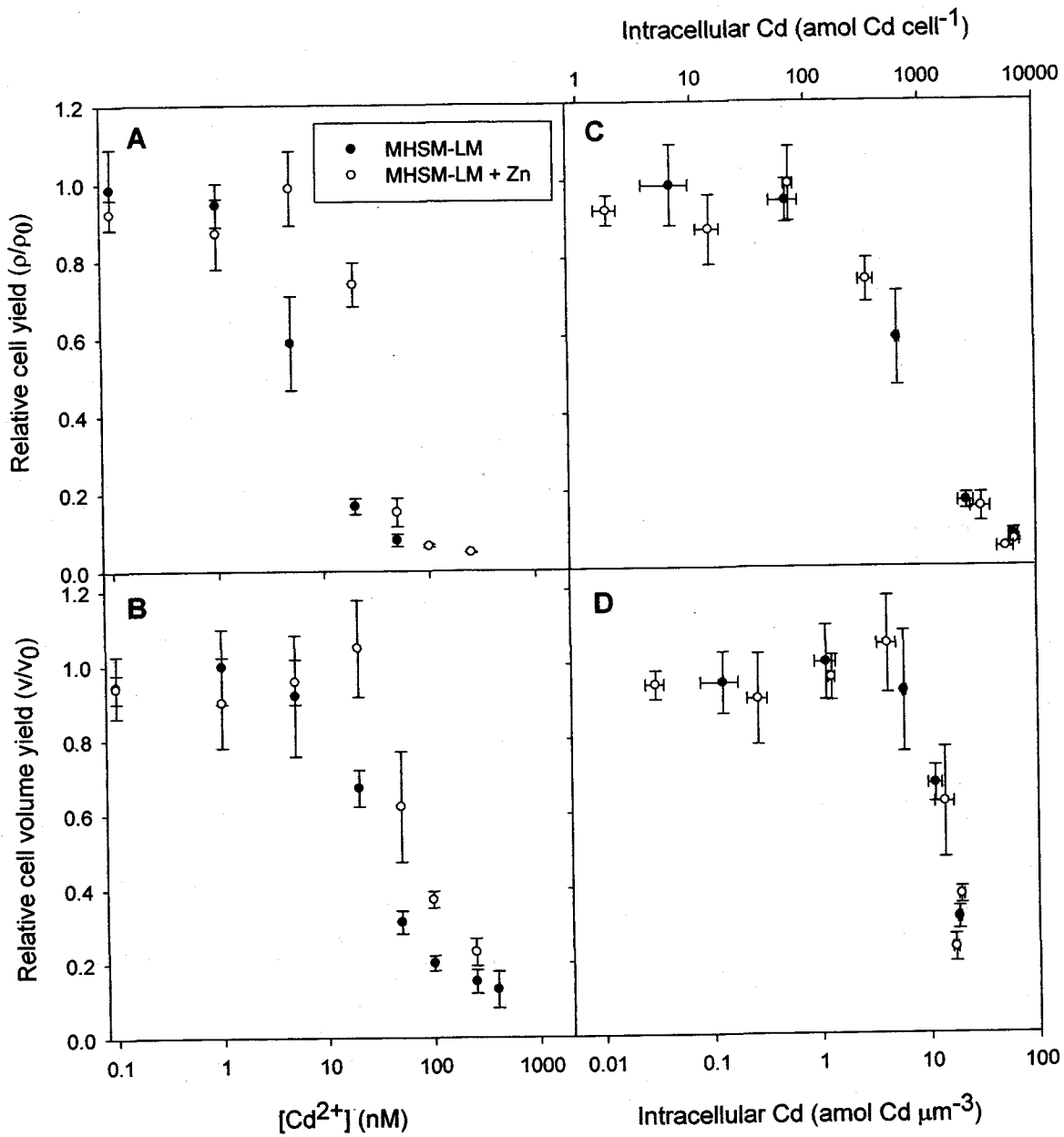
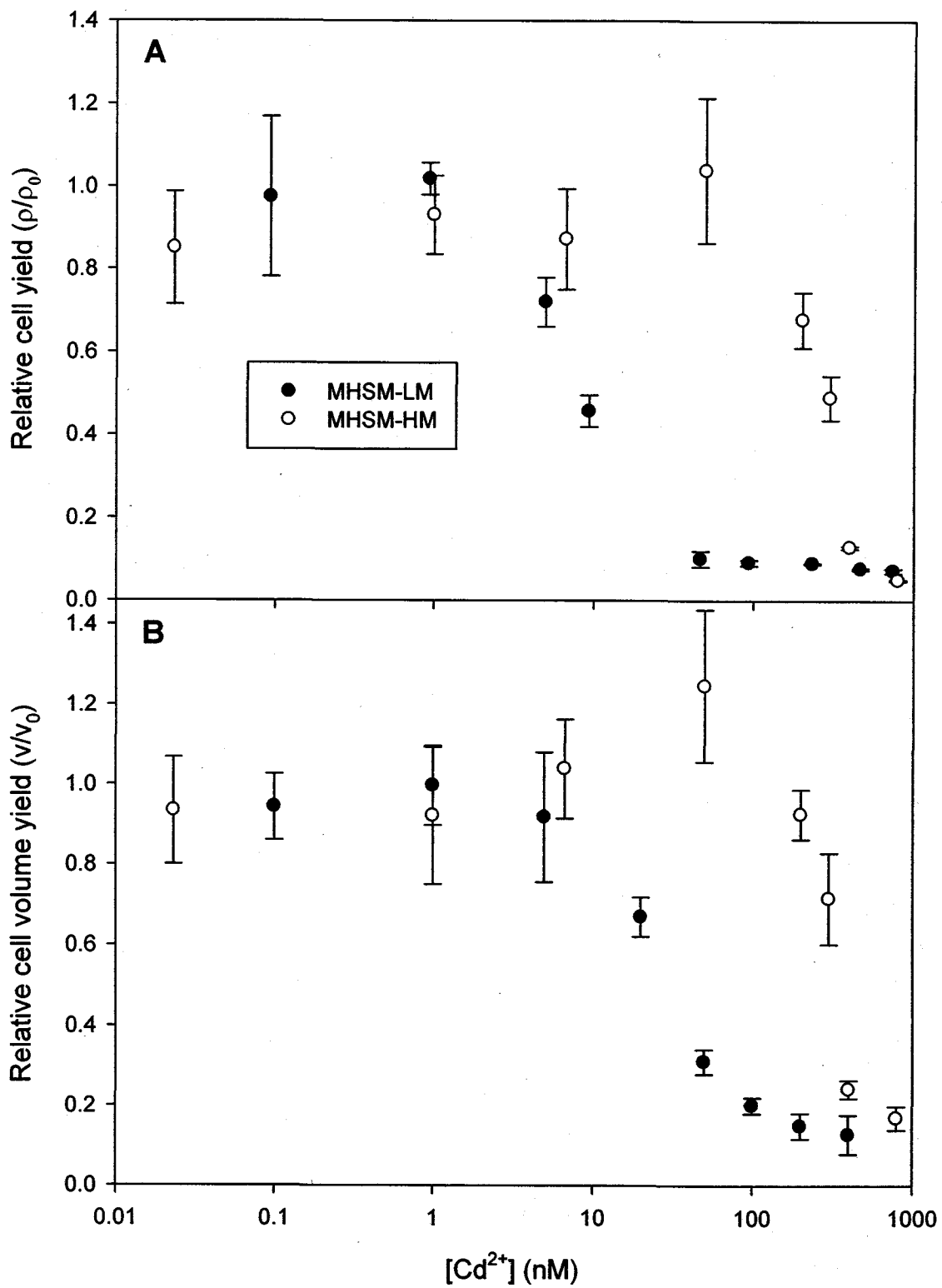
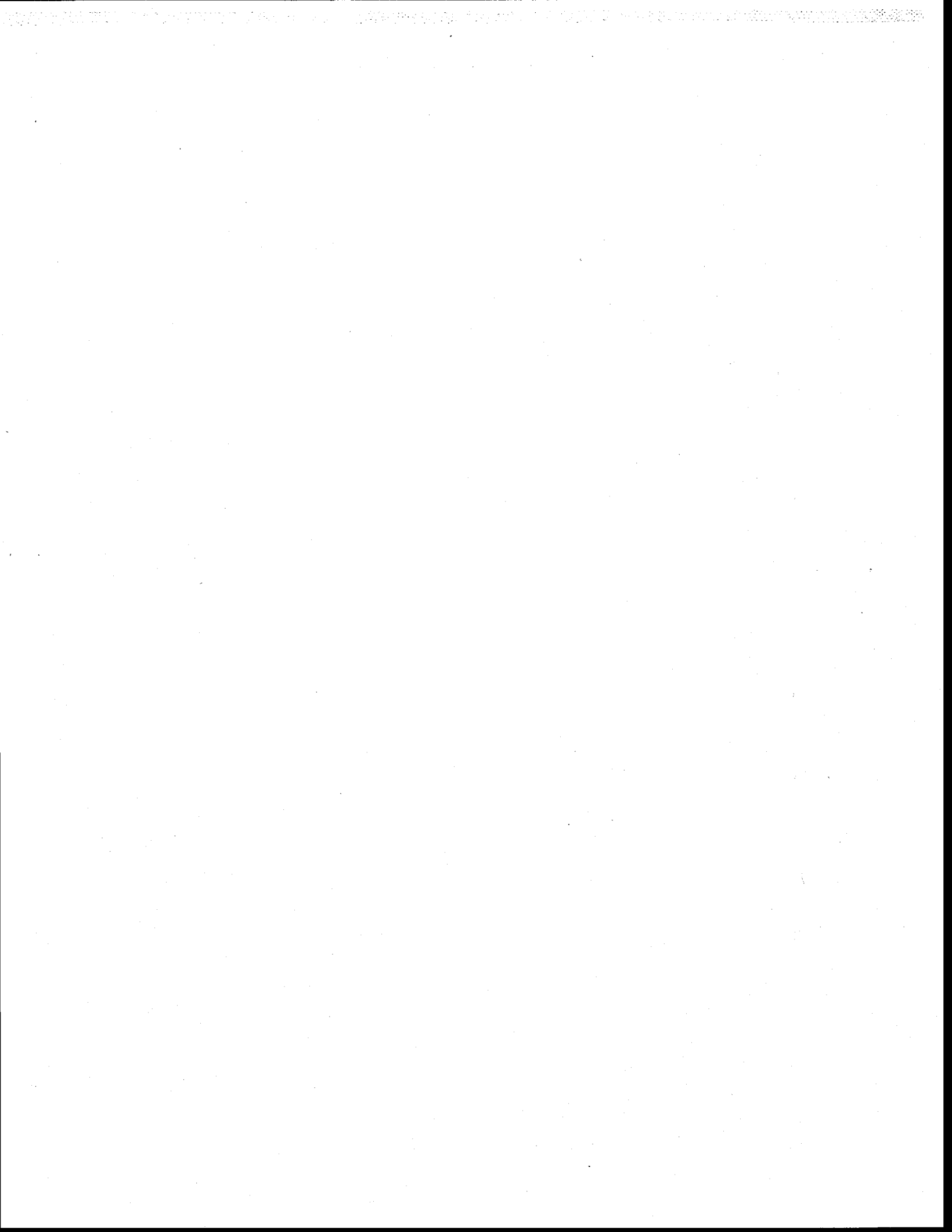


Figure 4 :





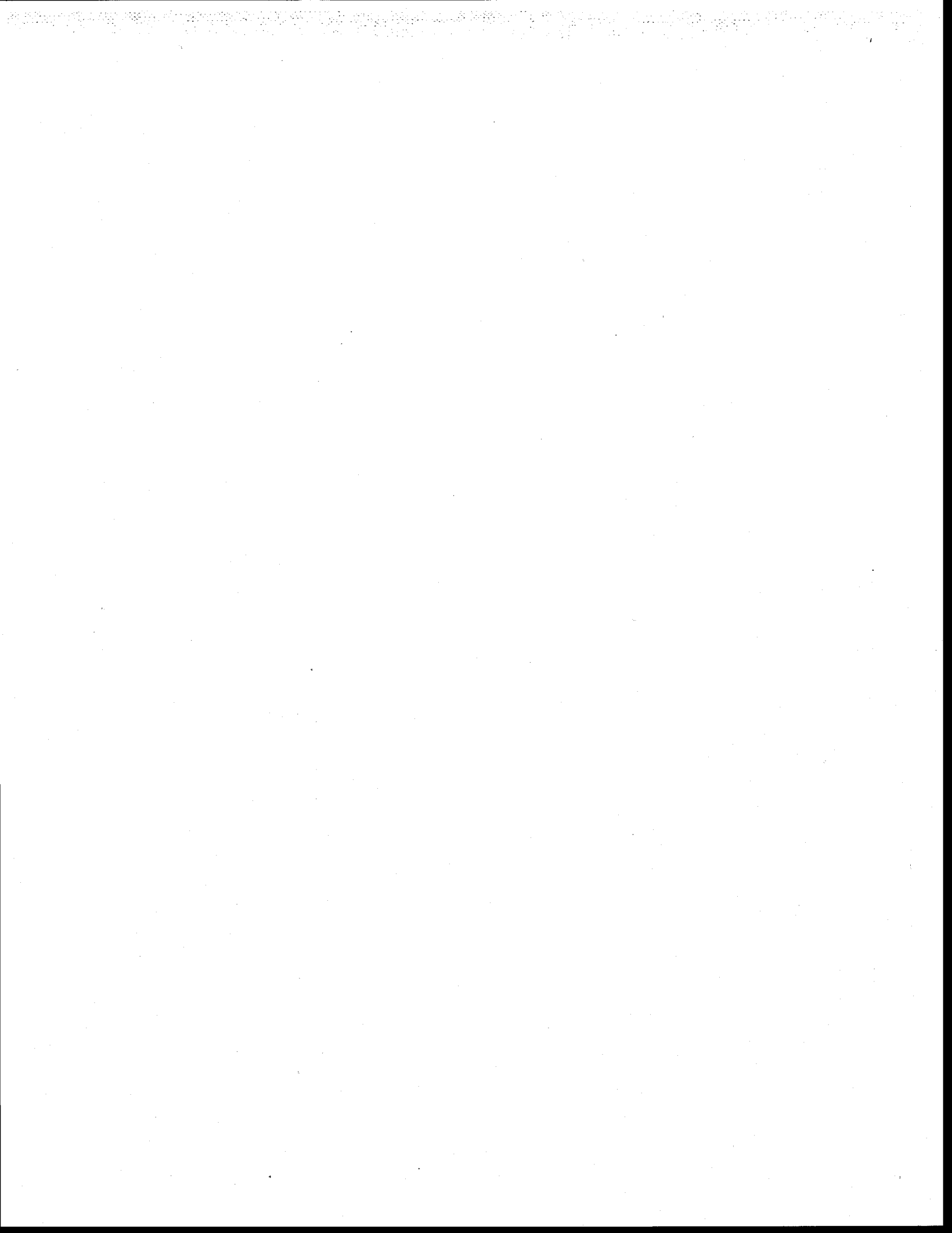
Supplemental data

Environmental Toxicology and Chemistry

Influence of essential elements on cadmium uptake and toxicity in a unicellular green alga: the protective effect of trace zinc and cobalt concentrations

Michel Lavoie†, Claude Fortin† and Peter G.C. Campbell†

**† Institut national de la recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement (INRS-ETE),
Québec, Canada.**



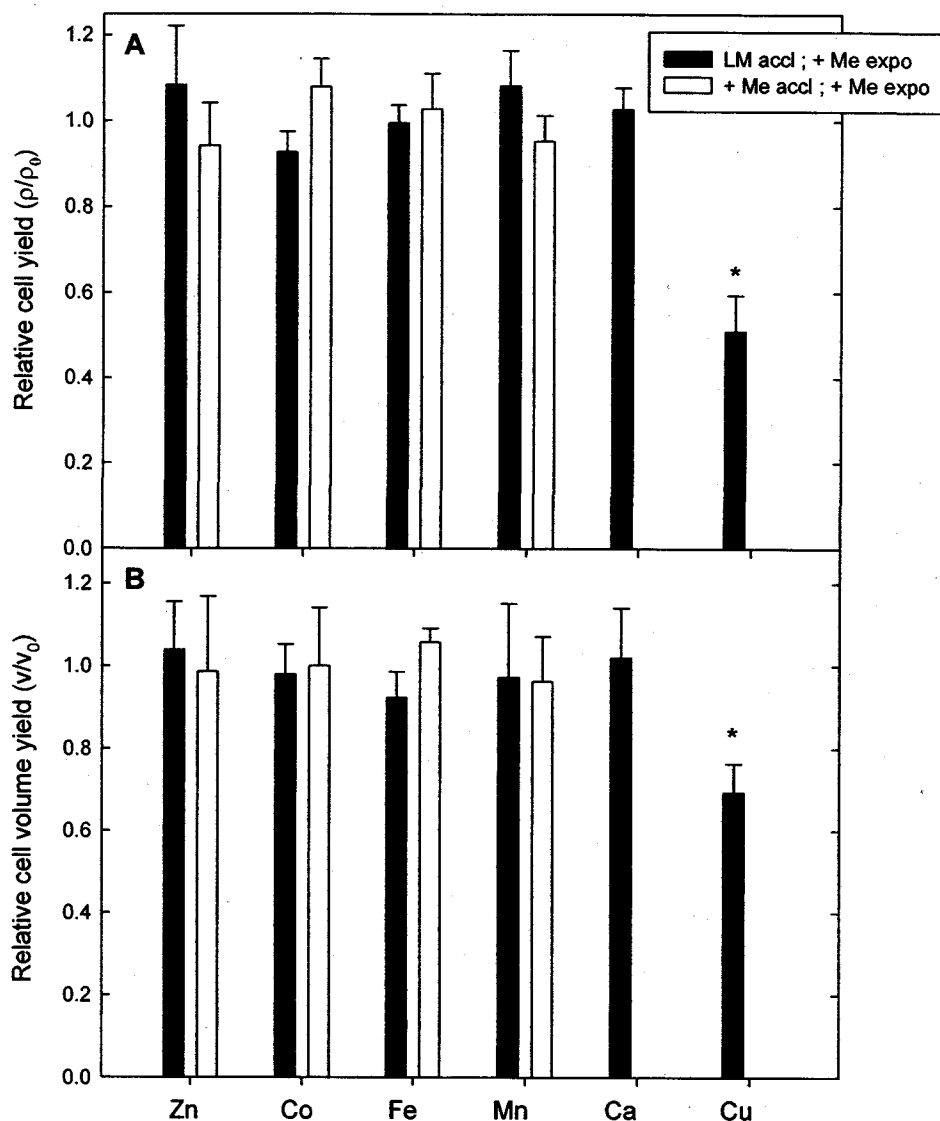
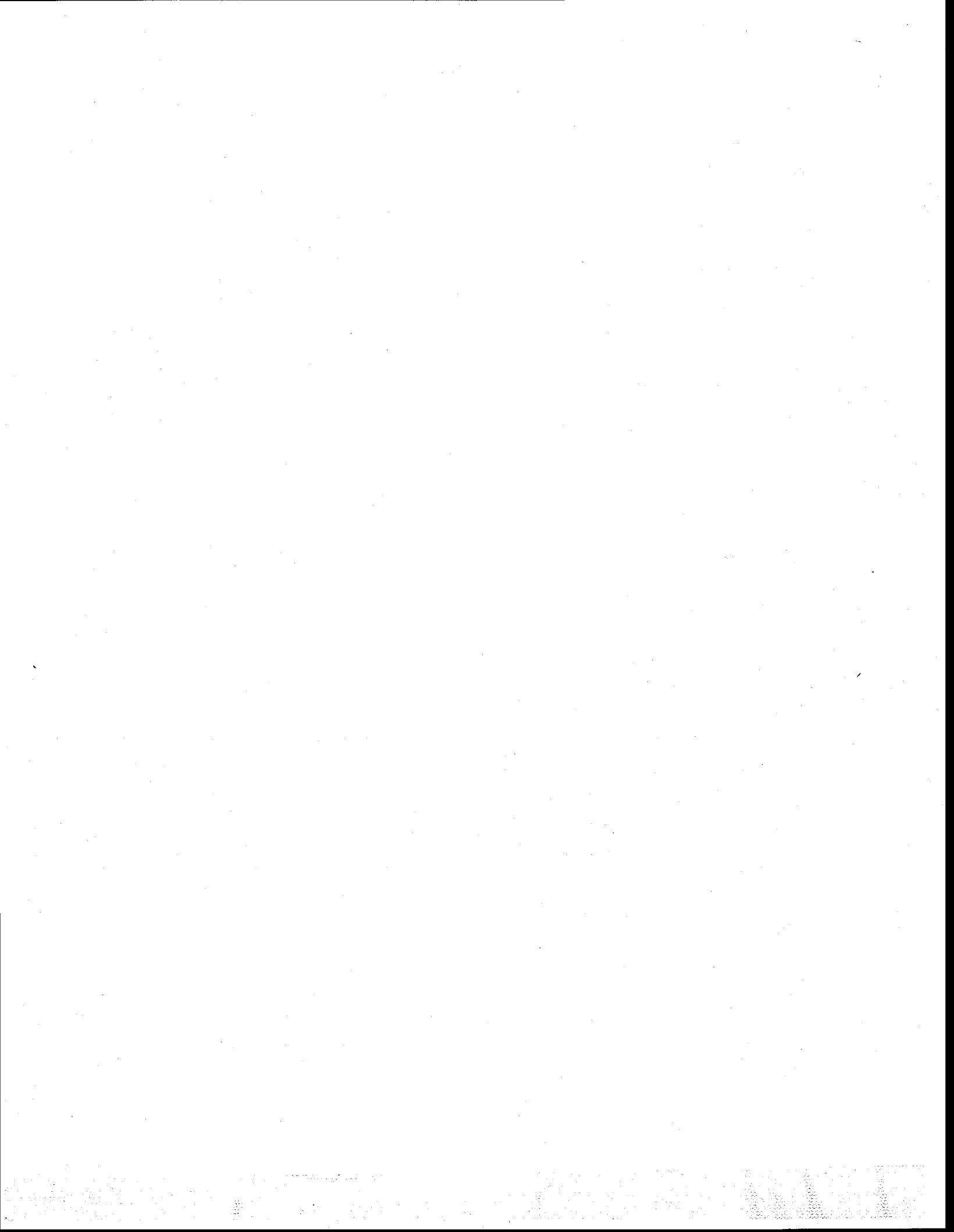


Figure S1 : Relative algal yields expressed as total cell numbers (ρ/ρ_0 in panel A) or total cell volumes (v/v_0 in panel B) obtained after a 60-h exposure to high (+Me expo) free Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} concentrations (without added Cd). Algae cells were acclimated (LM accl) to the MHSM-LM medium or to MHSM-LM supplemented with Zn, Co, Fe or Mn (+Me accl) without Cd. ρ and v are respectively the cell concentration ($cells \cdot mL^{-1}$) and the total cell volume concentration ($\mu m^3 mL^{-1}$) of the essential metal-exposed algae at $t=60$ h; ρ_0 and v_0 are respectively the cell concentration and the total cell volume concentration of control cultures (with low essential metal concentrations or MHSM-LM medium) at $t=60$ h. Asterisks denote relative yields that are significantly inhibited relative to the control (<1). Errors bars are the standard deviations of three replicate algal cultures.



8. ARTICLE #2

Extending the biotic ligand model to account for positive and negative feedback interactions between cadmium and zinc in a freshwater alga

Authors: Michel Lavoie, Peter G.C. Campbell, and Claude Fortin

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

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, metal accumulation, transport mechanisms, biotic ligand model, uptake inhibition

Article publié dans la revue *Environmental Science and Technology*



Abstract

Low concentrations of essential trace metals such as zinc (Zn) were recently shown to strongly modulate cadmium (Cd) uptake in the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Here we studied the mechanisms of Cd and Zn acquisition by this alga, using metal uptake kinetics experiments. Cadmium uptake rates fitted a three transport site model characterized by the affinity constants $K_{Cd-1}^{Cd} = 10^{5.0}$, $K_{Cd-2}^{Cd} = 10^{7.6}$, and $K_{Cd-3}^{Cd} = 10^{8.8}$. Similar uptake kinetics were obtained for Zn with $K_{Zn-1}^{Zn} = 10^{5.0}$, $K_{Zn-2}^{Zn} = 10^{7.4}$, and $K_{Zn-3}^{Zn} > 10^9$. Competitive binding experiments suggest that Zn and Cd share the same three transport systems. The capacities of the transport systems were modulated by as much as 10-fold following pre-acclimation to high or low Zn^{2+} and Cd^{2+} concentrations. We conclude that the strong protective effect of Zn on Cd accumulation is mainly due to the reduction of the maximal uptake rate of the high affinity Zn-2 (or Cd-2) transport system. A biotic ligand model was developed to incorporate the effects of both chemical speciation and physiological regulation of Cd transport systems. The model successfully predicts the experimentally-measured steady-state Cd content of *C. reinhardtii* in the presence of low or high $[Zn^{2+}]$.

Introduction

The biotic ligand model (BLM) is a useful tool to predict (acute) metal uptake and toxicity in aquatic organisms although some limitations have been documented [1, 2]. This model assumes that the biological response is proportional to the free ion activity, which varies as a function of the chemical composition of the environmental milieu (e.g. waterborne ligand concentrations, ionic strength and total metal concentrations). According to the BLM, the biological response can be antagonistically affected in the presence of competitors (protons, calcium and magnesium) for binding to uptake sites [1, 3, 4]. The BLM quantitatively incorporates the effects of cation competition with free metal ions in solution by assigning stability constants for their reaction with the membrane-bound uptake sites (biotic ligands). The model then relates the metal bound to the biotic ligand to metal uptake and toxicity.

Metal uptake systems are generally thought to be channels or carriers specifically meant for essential metals. One of the underlying hypotheses of the BLM is that the properties of these systems remain constant over time. However, throughout the evolution of cellular metabolism, living cells learned to regulate their internal concentrations of essential ions, notably by synthesizing/inactivating membrane-bound transporters [5, 6], modifying the nature of the uptake sites [7] or excreting cellular metal [8]. It thus follows that the affinity constants derived for the BLM may not be constant but rather may vary according to the cell's nutritional state.

Recent work has demonstrated that metal uptake systems are also sensitive to non-competitive interactions with various solutes present in the exposure medium. For example, calcium inhibits Ni uptake by *Chlamydomonas reinhardtii* non-competitively [9], and the H⁺-ion has a similar non-competitive effect on Cd uptake [10]. It was also shown that Cd uptake and toxicity in the same alga species can vary by more than 10-fold when the concentrations of other trace essential metals are varied, a result that is consistent with the cells' ability to regulate the uptake of essential (and inadvertently non-essential) metals [11]. These observations suggest that attempts to model metal uptake and toxicity should consider not only the metal's speciation in the external environment, but also the target organism's antecedent exposure regime and its current physiological state. The present study was designed to evaluate the importance of these latter factors.

The objectives of this study were first to evaluate the properties of Cd transport systems (quantity, affinity and capacity) in the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. This was done through short-term Cd uptake experiments over a wide range of free cadmium concentrations in well-defined inorganic culture media in laboratory batch cultures; uptake was determined as a function of previous acclimation of algae to different Zn²⁺ and Cd²⁺ concentrations. Secondly, we tested the hypothesis that Cd is accumulated through Zn transport systems, using Zn – Cd competitive binding experiments and short-term Zn uptake experiments. Our third objective was to develop a biotic ligand model incorporating Zn and Cd non-competitive interactions and to compare modeled and measured Cd content in long-term Cd exposure experiments.

Experimental Section

Experiments were conducted with the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* P. Dang. (CPCC 11, walled wild type), obtained as an axenic culture from the Canadian Phycological Culture Center (CPCC, Waterloo, ON, Canada). Asynchronous batch cultures were maintained in LM (low metal; Table SI.1, Supporting Information) culture medium using sterile techniques [11].

Throughout this study, initial cell concentrations were $40,000 \text{ cells mL}^{-1}$ and these were determined with an electronic particle counter (Multisizer™ 3 Coulter Counter®, 70 μm aperture). Cells were maintained at $20 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ under constant rotary agitation (100 rpm) and continuous illumination ($100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) in 250 mL polycarbonate bottles containing 100 mL of LM medium (with varying $[\text{Zn}^{2+}]$ and $[\text{Cd}^{2+}]$, see details below). The growth and exposure media pH were buffered at 7.0 with noncomplexing 3-N-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) buffer [12, 13] and the free metal concentrations were buffered with the non-assimilable ligand nitrilotriacetic acid (NTA) [14, 15]. The concentrations of the free metal ions in the medium were computed with the MINEQL⁺ chemical speciation program (version 4.6; [16]) with updated equilibrium constants [17]). Targeted total metal concentrations (Co, Cu, Fe, Mn, Zn) in culture media were validated ($\pm 10\%$) by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES). Throughout this study, when manipulating the concentration of one cation in NTA-buffered solutions, we adjusted (when

necessary) the total [NTA] so that the concentrations of free NTA^{3-} and the free essential metals were kept constant (as in our previous study [11]).

Short-term cadmium and zinc uptake experiments. Cells were acclimated for 60 h (corresponding to late exponential growth) in four different culture media (Table SI.1, Supporting Information): 1) the LM medium containing the lowest concentrations of essential trace elements, with no added cadmium ($< 10^{-12}$ M Cd^{2+}); 2) the LM medium supplemented with Cd (7×10^{-9} M Cd^{2+} , +Cd medium); 3) the LM medium supplemented with Zn (10^{-9} M Zn^{2+} , +Zn medium); 4) the LM medium supplemented with Zn and Cd (10^{-9} M Zn^{2+} , 7×10^{-9} M Cd^{2+} , +Zn+Cd medium). Acclimated cells were harvested gently on a 2- μm polycarbonate filter membrane, rinsed three times with their fresh culture medium (for exposure to $[\text{Me}^{z+}] < 10^{-8}$ M) or LM-R (simplified rinse medium without trace elements; Table SI.1, Supporting Information) medium (for exposure to $[\text{Me}^{z+}] > 10^{-8}$ M). The cells were then resuspended in radiolabeled uptake media and the total cell volume was precisely measured with the particle counter. The uptake media for $[\text{Cd}^{2+}]$ or $[\text{Zn}^{2+}] < 10^{-8}$ M contained ^{109}Cd (≈ 30 mCi μmol^{-1}) or ^{65}Zn (≈ 0.1 mCi μmol^{-1}) and $1 - 1.2 \times 10^{-4}$ M total NTA (depending on $[\text{Zn}_T]$ and $[\text{Cd}_T]$). The computed essential free ion concentrations of Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , and Cu^{2+} (as well as Zn^{2+} , in the case of the ^{109}Cd exposure) were the same as those in the LM medium. For $[\text{Cd}^{2+}]$ or $[\text{Zn}^{2+}]$ greater than 10^{-8} M, free metal ion concentrations were not buffered (cells were exposed in LM-R medium) to avoid overconsumption of radioisotopes. In this unbuffered medium, 97% of total Cd and Zn was calculated to be present as free ions; total essential metal concentrations in the LM-R medium were below ICP-AES detection limits, $[\text{Cu}] < 3 \times 10^{-9}$ M, $[\text{Zn}] < 6 \times 10^{-9}$ M, $[\text{Co}] < 4 \times 10^{-9}$ M, $[\text{Mn}] < 10^{-9}$ M, $[\text{Fe}] < 2.5 \times 10^{-8}$ M. Note that, as

expected, Cd uptake for a given $[Cd^{2+}]$ remained the same in the presence or absence of 10^{-4} M NTA (Table SI.2, Supporting Information), indicating that Cd-NTA complexes did not contribute to Cd uptake. After an exposure of up to 45 min, algal cells were filtered onto two superimposed 2- μ m polycarbonate filter membranes (47 mm diameter), rinsed for 10 min with 10^{-4} M EDTA and rinsed three times with LM-R medium. Cellular concentrations of Cd or Zn were determined from the activities of ^{109}Cd or ^{65}Zn measured by gamma spectroscopy. The activity of the lower filter was subtracted from that measured on the upper filter to correct for passive retention of radioisotopes by the filters. Cadmium and Zn internalization rates were calculated for each exposure metal concentration. Metal internalization rates were normalized with respect to cellular volume in order to take into account the differences in cellular volume induced by Cd over long-term exposure [11].

Competition experiments. The competitive effects of Ca, Mg and Zn on Cd uptake (as well as the effects of Ca, Mg and Cd on Zn uptake) were also evaluated. Exponentially growing cells (acclimated to the LM medium for more than ten cell cycles) were harvested by filtration, rinsed three times with LM-R medium and resuspended in radiolabeled uptake media.

Cadmium or Zn uptake was measured after short-term exposures (3 or 30 min) to 2×10^{-8} or 10^{-6} M Cd^{2+} or Zn^{2+} in the presence of 10^{-6} to 10^{-3} M Ca^{2+} , 8×10^{-5} to 10^{-3} M Mg^{2+} or 10^{-8} to 10^{-5} M Zn^{2+} or Cd^{2+} . Zinc uptake at low $[Zn^{2+}]$ (1.5×10^{-11} M) was also measured in NTA-buffered LM media after a 40-min pre-exposure to varying $[Cd^{2+}]$ (from 10^{-11} to 5×10^{-9} M).

Cadmium uptake kinetics. Cadmium uptake over time was followed over a 72-h exposure period (0.5, 1, 2, 6, 12, 24, 48 and 72 h) to 7×10^{-9} M Cd^{2+} in LM or +Zn culture media to examine the effect of Zn^{2+} on Cd uptake kinetics and to verify the agreement between modeled and experimentally measured steady-state Cd content (see the description of the model in the theoretical section below). Exponentially growing cells acclimated for more than ten cell cycles to the LM culture medium were used for this long-term experiment.

Data analyses. The characteristics of the metal transport systems (quantity, affinity and capacity) were estimated by nonlinear regression analyses of internalization rates against free ion concentrations. From a plot of measured versus calculated internalization rates, coefficients of determination (R^2) were computed; significant differences from 0 of the constants (V_{\max} and K_{Me}) were evaluated by t-test analyses. Differences between uptake rates measured at saturation of the transport systems as a function of earlier acclimation to Zn or Cd were examined with a t-test for independent samples (using uptake rates near the transport system capacities); differences between metal binding affinity constants were conservatively evaluated by comparing the 95% confidence intervals due to the insufficient data below the half-saturation constant. The data treatment was done with SigmaPlot 10 and SYSTAT 10 software. Results were considered to be significant when $p < 0.05$. Initial experiments to determine the Cd and Zn internalization rates for algae acclimated to the LM medium were performed with four replicates. The good reproducibility observed allowed us to decrease to two replicates and double the number of metal concentrations tested within a single experiment. The latter approach provides better data resolution that is more likely to cover the curvature near the saturation plateau than a set of values with high replication but determined

with a limited number of concentrations. Errors are given as \pm one standard error unless otherwise mentioned.

Theoretical considerations and modeling procedure. The metal uptake rate (V_{Me-i}) by transport site i is described by the well-known saturation equation [5]:

$$V_{Me-i} = \sum_{i=1}^n \frac{V_{\max-i}^{Me} [Me^{z+}] K_{Me-i}^{Me}}{1 + ([Me^{z+}] K_{Me-i}^{Me}) + ([C^{z+}] K_{Me-i}^C)} \quad (1)$$

where $[Me^{z+}]$ is the concentration of the free metal ion accumulated by the cells, $V_{\max-i}^{Me}$ is the maximal Me uptake rate achieved at metal saturation of the transport site i , $[C^{z+}]$ is the competitor C^{z+} concentration, K_{Me-i}^{Me} and K_{Me-i}^C are affinity constants of the Me transport system for Me^{z+} and C^{z+} , respectively. The parameter $V_{\max-i}^{Me}$ equals the total moles of transport systems i per unit biomass (S_T) multiplied by the rate constant (k_{in}) for the transport of metal across the membrane and subsequent cytoplasmic release:

$$V_{\max-i}^{Me} = k_{in} S_T \quad (2)$$

In this paper, we first measured Cd and Zn uptake rates as a function of $[Cd^{2+}]$ or $[Zn^{2+}]$ after previous acclimation in media of different compositions. These short-term exposures were performed in the presence of low concentrations of trace metals and other competing ions $[C^{z+}]$, i.e. $[Ca^{2+}]$ and $[Mg^{2+}]$, for which Cd and Zn uptake inhibition was assumed to be negligible; this assumption was later evaluated with competitive binding experiments (see eq 3 and section 3 of Supporting Information). Such results allowed us to identify the $[Cd^{2+}]$ or

[Zn²⁺] range associated with different transport systems (i.e., i = 1-3 in eq 1 as three distinct Cd and Zn transport systems were identified) in order to design competition experiments (e.g. to help choose a [Cd²⁺] or [Zn²⁺] sufficiently low as not to saturate the selected Cd or Zn transport system) between major cations and Cd or Zn. These competitive binding experiments yielded binding constants for competitors C^{z+} (Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺) at the Cd or Zn transport sites, according to the equation (see section 3 of Supporting Information for further details):

$$V_{Cd-i} = \frac{A}{1+(K_{Me-i}^C [C^{z+}])+(K_{Cd-i}^{Cd} [Cd^{2+}])} \quad (3)$$

where A is an adjustable parameter regrouping all terms of the numerator of eq 1.

For long-term experiments where algae growth becomes significant, cell division rate will affect the resulting intracellular metal quotas. The metal uptake rate at steady-state (V_{Me-ss}) equals the cellular metal concentration ($[Me_{cell}]$, i.e. metal content per unit of cellular volume) multiplied by the specific growth rate (μ):

$$V_{Me-ss} = [Me_{cell}] \mu \quad (4)$$

Intracellular metal content at steady-state can thus be predicted by dividing the metal uptake rate (computed with eq 1, for algae that have reached a steady-state with the exposure medium; i.e. algae that have been already grown and acclimated in a specific medium) by the experimentally-measured specific growth rate (μ).

With the short-term Cd uptake model developed with the first three equations, one can predict metal uptake rates as a function of prior cell acclimation (which could affect transport system capacity (V_{\max}) and/or metal affinity (K_{Me})) and the chemical composition of the external medium (i.e. $[Me^{z+}]$ and $[C^{z+}]$). We finally tested our uptake model for long-term metal exposure by predicting intracellular metal concentrations at steady-state with eq 4 and comparing the modeled results to experimental values.

Results and Discussion

Short-term Cd internalization rates. The Cd uptake rates as a function of a wide range of $[Cd^{2+}]$ fitted a three binding site model ($R^2 > 0.95$) in cells grown in Cd-free media (Fig. 1A; see triangles and dark circles). Cadmium thus appeared to be transported by at least three independent transport systems of varying capacities and affinities (Table 1). Affinities ranged from $K_{Cd-1}^{Cd} \approx 10^5$ for the high capacity, low affinity transport system to $K_{Cd-2}^{Cd} \approx 10^{7.5}$ for the second binding site and to $K_{Cd-3}^{Cd} \approx 10^{8.8}$ for the low capacity, high affinity system. Kola and Wilkinson [18], using the same algal species, showed that Cd uptake could be described by a single uptake site model ($[Cd^{2+}]$ varying from 10^{-10} to 10^{-4} M) with a $K_{Cd} = 10^6 M^{-1}$. Differences in cell preconditioning (TAP medium in Kola and Wilkinson [18] versus LM medium in our study) before the Cd uptake experiments might explain the differences between the two studies.

Short-term Zn internalization rates. As obtained for Cd, Zn internalization rates as a function of free metal ions (Fig. 1B) suggest the presence of three binding sites ($K_{Zn-1}^{Zn} \approx 10^5$, $K_{Zn-2}^{Zn} \approx 10^{7.4}$ and $K_{Zn-3}^{Zn} > 10^9$; Table 1). However, the binding parameters of the Zn-3 system could not be determined as we could not obtain sufficient data within the linear part of the accumulation curve (i.e., at $[Zn^{2+}] < 10^{-11}$ M). At low $[Zn^{2+}]$, the modeled Zn uptake rates using a two-binding site model underestimated by up to three orders of magnitude the measured Zn uptake fluxes, which remained nearly constant when $[Zn^{2+}] < 10^{-8}$ M (Fig. 1B). These nearly constant Zn uptake rates are consistent with tight regulation of algal Zn uptake, and suggest the presence of a third and highly regulated Zn transport system (operative at very low $[Zn^{2+}]$).

Competitive binding experiments. Besides the similar patterns in Cd and Zn uptake curves (Fig. 1), several lines of evidence revealed by competition experiments suggest that Zn and Cd are taken up by the same uptake system of low (Zn-1 = Cd-1) and intermediate affinity (Zn-2 = Cd-2):

- (i) The Ca stability constants for the Zn-1 ($K_{Zn-1}^{Ca} = 10^{3.93 \pm 0.09}$; Fig. 2C) and the Cd-1 ($K_{Cd-1}^{Ca} = 10^{4.02 \pm 0.14}$; Fig. 2A) transport systems as well as for the Zn-2 ($K_{Zn-2}^{Ca} = 10^{2.60 \pm 0.05}$ for the 3 min exposure or $10^{2.71 \pm 0.06}$ for the 30 min exposure; Fig. 2D) and Cd-2 ($K_{Cd-2}^{Ca} = 10^{2.62 \pm 0.16}$; Fig. 2B) transport systems were not significantly different.
- (ii) The Zn affinity constant for the Cd-1 transport system ($K_{Cd-1}^{Zn} = 10^{4.97 \pm 0.06}$; Fig. 2A) was close to the Zn affinity constant for the Zn-1 uptake system ($K_{Zn-1}^{Zn} = 10^{5.13 \pm 0.08}$; Fig. 1B),

and the constant K_{Cd-2}^{Zn} ($10^{6.95 \pm 0.11}$ for the 3 min exposure; Fig. 2B) was also close to K_{Zn-2}^{Zn} ($10^{7.43 \pm 0.05}$; Fig. 1B). We speculate that differences between both constants might be explained by very fast acclimation to high $[Zn^{2+}]$ (the apparent K_{Cd-2}^{Zn} effectively decreased when the exposure time was extended from 3 to 30 min; see discussion in the supporting information about fast Zn/Cd cellular feedback).

- (iii) The Cd stability constant for the Zn-1 transport system ($K_{Zn-1}^{Cd} = 10^{5.07 \pm 0.06}$; Fig. 2C) was similar to the Cd affinity constant for the Cd-1 transport system ($K_{Cd-1}^{Cd} = 10^{4.87 \pm 0.06}$; Fig. 1A) whereas the constants K_{Zn-2}^{Cd} ($10^{7.53 \pm 0.09}$ for a 3 min exposure; Fig. 2D) and K_{Cd-2}^{Cd} ($10^{7.60 \pm 0.07}$; Fig. 1A) were identical.

Our results also suggest that Cd-3 and Zn-3 may well be a single unique transport system since the Cd affinity constant for the Zn-3 transport system ($K_{Zn-3}^{Cd} = 10^{8.81 \pm 0.08}$; inset of Fig. 2C) was identical to the Cd stability constant for the Cd-3 uptake system ($K_{Cd-3}^{Cd} = 10^{8.80 \pm 0.09}$; Fig. 1A). One might argue that the constant K_{Zn-3}^{Cd} is slightly underestimated since we did not take into account the term ($K_{Zn-3}^{Zn} [Zn^{2+}]$) in eq 3 (where the value of K_{Zn-3}^{Zn} is unknown) when determining the competitive binding constant K_{Zn-3}^{Cd} , but incorporating a K_{Zn-3}^{Zn} up to $10^{10.5}$ did not change the computed K_{Zn-3}^{Cd} significantly. This suggests that our estimate of K_{Zn-3}^{Cd} is reasonable.

Zinc uptake by the Zn-3 transport sites in cells grown in LM medium seems very well regulated (see Zn uptake rates at $[Zn^{2+}] < 10^{-8}$ M; Fig. 1B). However, changes in physiological regulation of Zn uptake apparently do not occur on a short time scale in the presence of increasing Cd^{2+} (inset of Fig. 2C) since, as mentioned above, we observed a clear Zn uptake

inhibition by Cd. Considering that Zn and Cd seem to share the same high affinity transport system (identical values for K_{Zn-3}^{Cd} and K_{Cd-3}^{Cd} were obtained), it follows that the cells react differently to Cd (inhibition of Zn transport) than they do to Zn (regulation of Zn transport) on a short time scale.

The competitive biotic ligand affinity constants computed in the present study agree reasonably well with other constants available in the literature. Our Ca and Zn affinity constants for the Cd-1 uptake sites ($K_{Cd-1}^{Ca} = 10^{4.02 \pm 0.14}$; $K_{Cd-1}^{Zn} = 10^{4.97 \pm 0.06}$) are close to those measured by Kola and Wilkinson [18] ($K_{Cd}^{Ca} = 10^{4.5}$; $K_{Cd}^{Zn} = 10^{5.2}$) in *Chlamydomonas reinhardtii* (Wild-type strain; 2137) upon exposure to $4-5 \times 10^{-7}$ M Cd^{2+} for 10-30 min. These authors also estimated Mg stability constants (K_{Cd}^{Mg}) for the Cd transport sites to be much lower than 10^5 M⁻¹, which is in agreement with the low Mg affinity constants measured in the present study for the Cd-1 ($K_{Cd-1}^{Mg} = 10^{3.14 \pm 0.06}$) and the Cd-2 ($K_{Cd-2}^{Mg} = 10^{2.56 \pm 0.08}$) transport systems.

Nature of the Zn/Cd transport sites. The Zn-2/Cd-2 and Zn-3/Cd-3 transport systems are likely to be two high affinity Zn transporters. Indeed, Zn transport in *C. reinhardtii* [19, 20], as well as in marine algae [7] and yeast [21], is thought to proceed via two Zn uptake systems (from the ZIP family) of relatively high affinity. The Zn-1/Cd-1 transport system operating at relatively high metal concentrations (half-saturation constant $\approx 10^{-5}$ M, the inverse of the affinity constant) might also be involved in major cation transport, the most probable candidate being Ca. The Ca affinity constant for this transport system is in fact approximately

10^4 M^{-1} (Fig. 2A,C). The Ca affinity constants for the Zn-1/Cd-1 transport system are consistent with a single calcium transport system through which both Cd and Zn uptake becomes significant at $[\text{Cd}^{2+}]$ or $[\text{Zn}^{2+}] > 10^{-7} \text{ M}$. We would thus expect a strong protective effect of Ca on Cd (and Zn) toxicity when metal concentrations are high (e.g. in laboratory acute toxicity tests) but much less at low metal concentrations (e.g. concentrations likely to be encountered in all but the most grossly contaminated aquatic systems).

Pre-acclimation to Zn or Cd and metal uptake rates. Antecedent growth conditions may strongly affect Cd and Zn uptake kinetics in *C. reinhardtii*. Pre-acclimation to $< 10^{-12} \text{ M Cd}^{2+}$ and $10^{-11} \text{ M Zn}^{2+}$ (LM medium), to $10^{-9} \text{ M Zn}^{2+}$ (+Zn medium) or to $7 \times 10^{-9} \text{ M}$ (+Cd medium) modulated cadmium uptake rates mainly by inducing changes in capacities of the transport systems $V_{\text{max}-i}^{\text{Me}}$. For a given metal acclimation regime, the pairs $V_{\text{max}-1}^{\text{Zn}} - V_{\text{max}-1}^{\text{Cd}}$ or $V_{\text{max}-2}^{\text{Zn}} - V_{\text{max}-2}^{\text{Cd}}$ were similar (Table 1), which is also consistent with Zn and Cd being transported by two common transport systems.

The Cd and Zn maximal uptake rates ($V_{\text{max}}^{\text{Me}}$) through the Cd-1, Zn-1, Cd-2, Zn-2 and Cd-3 transport systems significantly decreased by 30 to 44% in cells acclimated to $10^{-9} \text{ M Zn}^{2+}$ compared to $10^{-11} \text{ M Zn}^{2+}$ (without added Cd) (Table 1). This decrease in $V_{\text{max}}^{\text{Me}}$ may be due to (i) a modulation of the membrane-bound transport systems (S_T), e.g., through an allosteric interaction leading to a decrease in the metal uptake rate constant (k_{in} ; see eq 2) and/or (ii) a decrease in the number of transport systems, e.g. through the turnover of membrane proteins and a reduced replacement rate. The short-term Zn uptake rates observed in Figure 1B at

$[Zn^{2+}] < 10^{-9}$ M (through the Zn-3 transport system) for algae acclimated to low $[Zn^{2+}]$ (1 to 5×10^{-22} mol Zn μm^{-3} min $^{-1}$) were also higher than those of cells acclimated to high $[Zn^{2+}]$ (< detection limit, i.e. $< 6 \times 10^{-24}$ mol Zn μm^{-3} min $^{-1}$). This tight regulation of uptake via high affinity Zn transport is in line with previous work. Zinc high affinity transport systems in the freshwater alga *Chlorella kesslerii* [22, 23] as well as in oceanic diatoms and a coccolithophore [7] are known to be strongly modulated (up to 100-fold) in response to acclimation to different $[Zn^{2+}]$. Acclimation to high $[Zn^{2+}]$ not only efficiently protects against further Zn uptake but, more importantly, protects against Cd uptake (Fig. 1A). The protective effect of high $[Zn^{2+}]$ acclimation on Cd accumulation described in the present study is in agreement with the large decrease observed in Cd uptake rates in the diatom *Thalassiosira pseudonana* [24] and the coccolithophore *Emiliana huxleyi* [25] with an increase in $[Zn^{2+}]$ at constant $[Cd^{2+}]$.

When algae were acclimated to high Cd^{2+} and low Zn^{2+} (+Cd medium), Zn and Cd uptake rates, via the Zn-2/Cd-2 or the Zn-3/Cd-3 transport systems, were dramatically increased (relative to uptake rates measured for algae acclimated in the LM medium) (Fig. 1; clear circles). The largest shift in the parameters of our Cd/Zn uptake models occurred for the Zn-2/Cd-2 transport system; the mean V_{max-2} increased 6.3 and 7.6-fold for the Cd-2 and the Zn-2 transport systems respectively (relative to the algae acclimated to the LM medium) (Table 1). The Zn or Cd uptake rates via the Zn-3/Cd-3 transport systems were strongly up-regulated too, up to the point where both Zn and Cd internalization rates approached the predicted diffusive limit of the free ions across the boundary layer (see dotted line in Fig. 1; calculations are given in the section 5 of the Supporting Information). Acclimation to both high Zn^{2+} and

Cd^{2+} (i.e. +Zn+Cd medium) led to a much more modest increase in V_{\max} (30 to 40% with respect to the algae acclimated to the +Zn medium) for Zn and Cd uptake through the Cd-1, Cd-2, Zn-2 and Cd-3 transport systems (only the increase in $V_{\max-2}^{\text{Zn}}$ was statistically significant).

To our knowledge, no other studies have demonstrated such a positive feedback of Cd and Zn acclimation on Cd uptake in algae. It appears that in the +Cd medium (7×10^{-9} M Cd^{2+}) *C. reinhardtii* is able to maintain a Zn uptake rate high enough to sustain its growth during long-term exposures at low (10^{-11} M) $[\text{Zn}^{2+}]$ despite the presence of Cd. In fact, the large enhancement in short-term Zn uptake rates through the Zn-3/Cd-3 transport system for algae acclimated to the +Cd medium compared to those acclimated to the LM medium (Fig. 1B), can be explained by Cd competition. In the presence of Cd, a higher transport capacity (V_{\max}) is required to maintain Zn uptake rates at levels needed to meet Zn requirements. Based on our $K_{\text{Zn-3}}^{\text{Cd}}$ (see inset of Fig. 2C) and the Zn uptake rate in absence of competition (Fig. 1B), we could estimate that the expected Zn uptake rate in the +Cd medium is 1.1×10^{-22} mol Zn μm^{-3} min^{-1} when $[\text{Zn}^{2+}] = 2 \times 10^{-11}$ M Zn^{2+} , whereas the measured uptake rate for the algae acclimated to the LM medium is 1.2 ± 0.1 (SD) $\times 10^{-22}$ Zn μm^{-3} min^{-1} (Fig. 1B). This positive feedback allows the cells to cope with the relative scarcity of Zn but in turn contributes to increase Cd uptake.

Among the various Cd and Zn affinity constants examined here, only $K_{\text{Cd-1}}^{\text{Cd}}$ significantly increased in response to Cd acclimation (in combination with low Zn^{2+}) and $K_{\text{Zn-2}}^{\text{Zn}}$

significantly decreased when $[Zn^{2+}]$ was increased in the acclimation medium ($p < 0.05$) (Table 1; Fig. 1). Such modifications of the metal binding constants are usually attributed to changes in transporter conformations or types. It appears that algae acclimated to Cd^{2+} not only increased V_{max-1}^{Cd} , but also altered K_{Cd-1}^{Cd} which increased from $10^{4.87 \pm 0.06}$ to $10^{5.70 \pm 0.10}$. Note that K_{Zn-1}^{Zn} tended to increase too (which again is in agreement with a single Cd-1/Zn-1 transporter) in response to Cd acclimation, but the variability in data and the limited number of measurements near or below the half-saturation constant do not allow a precise evaluation of the significance of this difference. The induced decrease in K_{Zn-2}^{Zn} (from $10^{7.43 \pm 0.05}$ to $10^{6.90 \pm 0.09}$), but not in K_{Cd-2}^{Cd} ($10^{7.60 \pm 0.07}$ and $10^{7.59 \pm 0.08}$) for the algae acclimated to the LM and +Zn medium respectively (Table 1; Fig. 1) is the only indication of the possible involvement of two distinct uptake systems with similar Cd affinities but different Zn affinities. Alternatively, given the different ionic dimensions of Zn^{2+} and Cd^{2+} , it is possible that the change in the transport system may be subtle enough to affect binding of one metal (Zn^{2+}) but not the other (Cd^{2+}).

Modeled steady-state Cd uptake. By using the V_{max-i}^{Cd} and K_{Cd-i}^{Cd} measured for the algae acclimated to the +Zn+Cd or the +Cd media in eq 1 and the specific growth rate ($\mu = 1.03 \pm 0.09 \text{ d}^{-1}$ in both treatments; not significantly different from the control growth rate) in eq 4, we computed the predicted Cd accumulation at steady-state at two different $[Zn^{2+}]$ and constant $[Cd^{2+}]$ taking into account error propagation. The Cd uptake model developed in this study successfully predicted the steady-state algal Cd content observed in *C. reinhardtii*. During the exposure to $7 \times 10^{-9} \text{ M } Cd^{2+}$ in the presence of low and high $[Zn^{2+}]$, the predicted intracellular

Cd were $8.7 \pm 1.9 \times 10^{-18}$ and $0.72 \pm 0.21 \times 10^{-18}$ mol Cd μm^{-3} respectively (Fig. 3). Figure 3 also shows that the difference between Cd accumulation in both Zn treatments started to be significant after an exposure of 2 h and continued to increase afterwards. The Cd quotas for algae growing in the LM medium only reached a steady-state after 40 h, reflecting the relatively slow Cd positive feedback on the V_{max} of the Cd-2 uptake system at low $[\text{Zn}^{2+}]$.

Environmental implications. The biotic ligand model assumes that the accumulation of toxic metals is related to the free metal ion concentration (and thus to water chemistry, which affects metal complexation in solution), as modulated by the competitive binding of protons and/or essential major cations to the metal transport sites. However, our data indicate that non-competitive interactions between essential and non-essential trace metals are also a major factor modulating Cd uptake in freshwater algae. We show that variations in $[\text{Zn}^{2+}]$ may affect algal uptake of Cd, as do variations in $[\text{Cd}^{2+}]$, due to physiological feedback regulation of two high affinity Zn transport systems. For a given $[\text{Cd}^{2+}]$, freshwater algae may accumulate more Cd in surface waters with low $[\text{Zn}^{2+}]$. Elevated Zn inputs in rivers following rain events [26] may also mitigate Cd uptake and toxicity to freshwater phytoplankton. Inversely, previous exposure to high $[\text{Cd}^{2+}]$ may further strongly increase Cd uptake and toxicity in algae due to the up-regulation of zinc uptake systems that are used by Cd to cross the plasma membrane.

Generally, metal polluted freshwater systems contain not only higher concentrations of Cd, but also of other essential metals, such as Zn [27-30], which further underscore the need to consider the protective effect of Zn on Cd bioavailability and toxicity in algae within the

BLM. Here we proposed the first freshwater algal biotic ligand model incorporating both basic thermodynamics and subtle (hard to predict) physiological responses to essential and non-essential metal concentrations. Such quantitative data will help to reconcile two conflicting schools of thought on the main processes leading to metal uptake/toxicity in freshwater aquatic organisms: the physiology/biology viewpoint that physiological acclimation often controls metal uptake, and the chemistry perspective that chemical conditions in the external medium prevail.

Acknowledgement

We acknowledge the technical assistance provided by Lise Rancourt and Sébastien Duval. Helpful discussions on preliminary data with William G. Sunda and François M. M. Morel were also very much appreciated. Jean-Christian Auclair provided valuable help for the statistical analyses. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) Discovery Grant as well as the Metals in the Human Environment Strategic Network (MITHE-SN) programs. M. Lavoie held a scholarship from the *Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies* (FRQNT). C. Fortin and P.G.C. Campbell are supported by the Canada Research Chair program.

Supporting Information available

Composition of culture media; Short-term Cd uptake experiments in presence or absence of NTA and MOPS; Fast Zn uptake regulation; Calculation of maximal diffusive fluxes of Zn^{2+} and Cd^{2+} . This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Literature cited

1. Campbell, P. G. C.; Errécalde, O.; Fortin, C.; Hiriart-Baer, V. P.; Vigneault, B. Metal bioavailability to phytoplankton - Applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol. C* **2002**, *133*, 189-206.
2. Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model. *Environ. Chem.* **2005**, *2*, 9-24.
3. Paquin, P. R.; Gorsuch, J. W.; Apte, S.; Batley, G. E.; Bowles, K. C.; Campbell, P. G. C.; Delos, C. G.; Di Toro, D. M.; Dwyer, R. L.; Galvez, F.; Gensemer, R. W.; Goss, G. G.; Hogstrand, C.; Janssen, C. R.; McGeer, J. C.; Naddy, R. B.; Playle, R. C.; Santore, R. C.; Schneider, U.; Stubblefield, W. A.; Wood, C. M.; Wu, K. B. The biotic ligand model: A historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. C* **2002**, *133*, 3-35.
4. Di Toro, D. M.; Allen, H. E.; Bergman, H. L.; Meyer, J. S.; Paquin, P. R.; Santore, R. C. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20*, 2383-2396.
5. Sunda, W. G.; Huntsman, S. A. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *Sci. Total Environ.* **1998**, *219*, 165-181.
6. Eide, D. J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *BBA - Mol. Cell Res.* **2006**, *1763*, 711-722.

7. Sunda, W. G.; Huntsman, S. A. Feedback interactions between zinc and phytoplankton in seawater. *Limnol. Oceanogr.* **1992**, *37*, 25-40.
8. Sunda, W. G.; Huntsman, S. A. Antagonisms between cadmium and zinc toxicity and manganese limitation in a coastal diatom. *Limnol. Oceanogr.* **1996**, *41*, 373-387.
9. Worms, I. A. M.; Wilkinson, K. J. Ni uptake by a green alga. 2. Validation of equilibrium models for competition effects. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 4264-4270.
10. François, L.; Fortin, C.; Campbell, P. G. C. pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: Implications for an algal BLM. *Aquat. Toxicol.* **2007**, *84*, 123-132.
11. Lavoie, M.; Fortin, C.; Campbell, P. G. C. Influence of essential elements on cadmium uptake and toxicity in a unicellular green alga: the protective effect of trace zinc and cobalt concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31*, 1445-1452.
12. Mash, H. E.; Chin, Y.-P.; Sigg, L.; Hari, R.; Xue, H. Complexation of copper by zwitterionic aminosulfonic (Good) buffers. *Anal Chem* **2003**, *75*, 671-677.
13. Wehr, J. D.; Brown, L. M.; Vanderelst, I. E. Hydrogen ion buffering of culture media for algae from moderately acidic, oligotrophic waters. *J. Phycol.* **1986**, *22*, 88-94.
14. Simkiss, K.; Taylor, M. G. Trace element speciation at cell membranes: Aqueous, solid and lipid phase effects. *J. Environ. Monit.* **2001**, *3*, 15-21.
15. Vigneault, B.; Campbell, P. G. C. Uptake of cadmium by freshwater green algae: Effects of pH and aquatic humic substances. *J. Phycol.* **2005**, *41*, 55-61.

16. Schecher, W. D.; McAvoy, D. C. MINEQL+: A software environment for chemical equilibrium modeling. *Comput. Environ. Urban Syst.* **1992**, *16*, 65-76.
17. Martell, A. E.; Smith, R. M.; Motekaitis, R. J. NIST critical stability constants of metal complexes, version 8. National Institute of Standards and Technology. Gaithersburg, MD. In Gaithersburg, MD, 2004.
18. Kola, H.; Wilkinson, K. J. Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 3040-3047.
19. Rosakis, A.; Köster, W. Transition metal transport in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* - Genomic sequence analysis. *Res. Microbiol.* **2004**, *155*, 201-210.
20. Hanikenne, M.; Krämer, U.; Demoulin, V.; Baurain, D. A comparative inventory of metal transporters in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the red alga *Cyanidioschizon merolae*. *Plant Physiol.* **2005**, *137*, 428-446.
21. Eide, D. J. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Nutr.* **1998**, *18*, 441-469.
22. Hassler, C. S.; Wilkinson, K. J. Failure of the biotic ligand and free-ion activity models to explain zinc bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, *22*, 620-626.
23. Hassler, C. S.; Behra, R.; Wilkinson, K. J. Impact of zinc acclimation on bioaccumulation and homeostasis in *Chlorella kesslerii*. *Aquat. Toxicol.* **2005**, *74*, 139-149.

24. 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.* **1998**, *32*, 2961-2968.
25. Sunda, W. G.; Huntsman, S. A. Effect of Zn, Mn, and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: Implications for oceanic Cd cycling. *Limnol. Oceanogr.* **2000**, *45*, 1501-1516.
26. Meylan, S.; Odzak, N.; Behra, R.; Sigg, L. Speciation of copper and zinc in natural freshwater: Comparison of voltammetric measurements, diffusive gradients in thin films (DGT) and chemical equilibrium models. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *510*, 91-100.
27. Xue, H.; Sigg, L. Cadmium speciation and complexation by natural organic ligands in fresh water. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *363*, 249-259.
28. Fortin, C.; Couillard, Y.; Vigneault, B.; Campbell, P. G. C. Determination of free Cd, Cu and Zn concentrations in lake waters by in situ diffusion followed by column equilibration ion-exchange. *Aquat. Geochem.* **2010**, *16*, 151-172.
29. Kalis, E. J. J.; Weng, L.; Dousma, F.; Temminghoff, E. J. M.; Van Riemsdijk, W. H. Measuring free metal ion concentrations in situ in natural waters using the Donnan Membrane Technique. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 955-961.
30. Lavoie, I.; Lavoie, M.; Fortin, C. A mine of information: Benthic algal communities as biomonitors of metal contamination from abandoned tailings. *Sci. Total Environ.* **2012**, *425*, 231-241.

Figure captions

Fig. 1: Short-term Cd (V_{Cd}) (A) and Zn (V_{Zn}) (B) uptake rates (30–45 minutes) as a function of $[Cd^{2+}]$ (A) or $[Zn^{2+}]$ (B). Algae were acclimated to four different culture media, i.e. LM (full circles), +Cd (open circles), +Zn (full triangles), or +Zn+Cd (open triangles) prior to exposure. The dotted lines represent the calculated maximal diffusive rate for Cd^{2+} (A) or Zn^{2+} (B) (see section 5 in the Supporting Information for details). The solid lines and the dashed-dotted lines represent least-square best fits of eq 1 for algae acclimated to the LM and the +Cd culture media respectively. The long dashed line and the short dashed line are best fits of eq 1 for algae acclimated to the +Zn and the +Zn+Cd culture media respectively. Predictions of V_{Zn} or V_{Cd} were made using values of $K_{Cd-1}^{Ca} = 10^{4.02 \pm 0.14}$ and $K_{Zn-1}^{Ca} = 10^{3.93 \pm 0.09}$ obtained from Fig. 2 (K_{Cd-2}^{Ca} and K_{Zn-2}^{Ca} were not included as they did not improve the data fit). The coefficients of determination, R^2 , of each regression were greater than 0.95; except for the algal Zn uptake rates after acclimation to the +Cd medium ($R^2 = 0.80$). The metal binding parameters are compiled in Table 1. Insert in panel A shows Cd uptake rates on a linear scale at low $[Cd^{2+}]$ ($< 6 \times 10^{-9}$ M).

Fig. 2: Short-term Cd uptake rates (V_{Cd} ; 30 min exposures except otherwise specified) through the Cd-1 (10^{-6} M Cd^{2+}) (A) or the Cd-2 (2×10^{-8} M Cd^{2+}) (B) transport sites as a function of varying $[Me^{2+}]:[Zn^{2+}]$ (full triangles: 30 min exposure; open squares: 3 min exposure), $[Ca^{2+}]$ (open circles) and $[Mg^{2+}]$ (full circles). Solid lines are best fit modeled curves using eq 3 and $K_{Cd-2}^{Cd} = 10^{7.6}$. These analyses yielded: $K_{Cd-1}^{Zn} = 10^{4.97 \pm 0.06}$, $K_{Cd-1}^{Ca} = 10^{4.02 \pm 0.14}$, $K_{Cd-1}^{Mg} = 10^{3.14}$

± 0.06 ; $K_{Cd-2}^{Zn} = 10^{6.95 \pm 0.11}$; $K_{Cd-2}^{Ca} = 10^{2.62 \pm 0.16}$; $K_{Cd-2}^{Mg} = 10^{2.56 \pm 0.08}$. Short-term (30 min exposure except otherwise specified) Zn uptake rates through the Zn-1 (10^{-6} M Zn^{2+}) (C) or the Zn-2 (2×10^{-8} M Zn^{2+}) (D) transport sites as a function of varying $[Me^{2+}]:[Cd^{2+}]$ (full diamonds and open squares) and $[Ca^{2+}]$ (open circles: 30 min exposure; triangles: 3 min exposure). Solid lines are best fit modeled curves using eq 3 and $K_{Zn-2}^{Zn} = 10^{7.4}$. These analyses yielded: $K_{Zn-1}^{Cd} = 10^{5.07 \pm 0.06}$; $K_{Zn-1}^{Ca} = 10^{3.93 \pm 0.09}$; $K_{Zn-2}^{Cd} = 10^{7.53 \pm 0.09}$; $K_{Zn-2}^{Ca} = 10^{2.60 \pm 0.05}$ (3 min exposure) or $10^{2.71 \pm 0.06}$ (30 min exposure). Insert in panel (C) denoted Zn uptake rates through the Zn-3 transport system in the presence of varying $[Cd^{2+}]$ and 1.5×10^{-11} M Zn^{2+} . The solid line is a best fit of the data with eq 3, yielding $K_{Zn-3}^{Cd} = 10^{8.81 \pm 0.08}$. The coefficients of determination, R^2 , of each regression were greater than 0.90, except for the Cd competitive effect on Zn uptake via the Zn-2 transport system ($R^2 = 0.79$) and the Zn competitive effect on Cd uptake via the Cd-2 transport system ($R^2 = 0.85$).

Fig. 3: Cadmium uptake kinetics over long-term exposures to the +Cd medium (10^{-11} M Zn^{2+} ; 7×10^{-9} M Cd^{2+}) (full circles) or the +Zn+Cd medium (10^{-9} M Zn^{2+} ; 7×10^{-9} M Cd^{2+}) (open circles). Algae were acclimated to the LM media for more than 10 generations prior to the experiment. The dashed line and the dotted line represent the predicted steady-state intracellular cadmium quotas (computed with eq 1 and 4) for algae grown in the +Cd ($8.7 \pm 1.9 \times 10^{-18}$ mol Cd μm^{-3}) and the +Zn+Cd ($0.72 \pm 0.21 \times 10^{-18}$ mol Cd μm^{-3}) medium respectively. Insert shows intracellular Cd quotas on a smaller scale (over the first 8 h of exposure).

Figure 1:

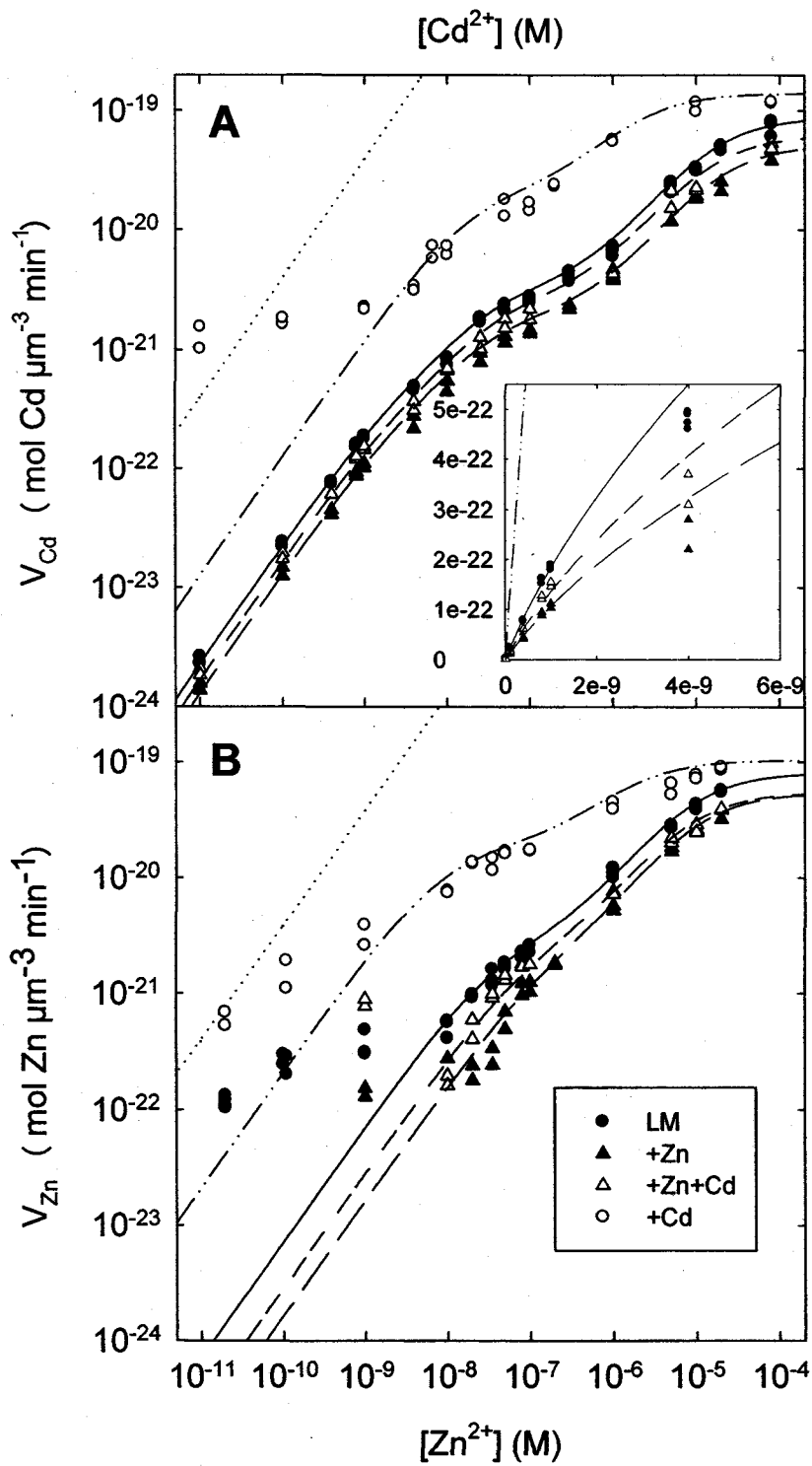


Figure 2 :

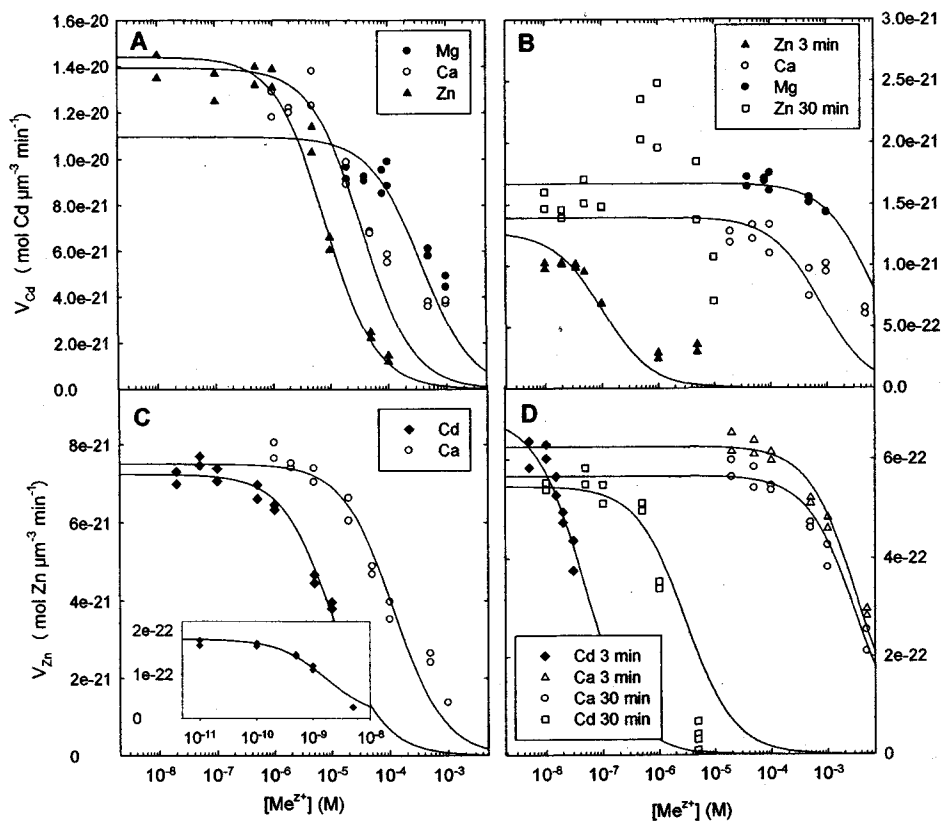


Figure 3 :

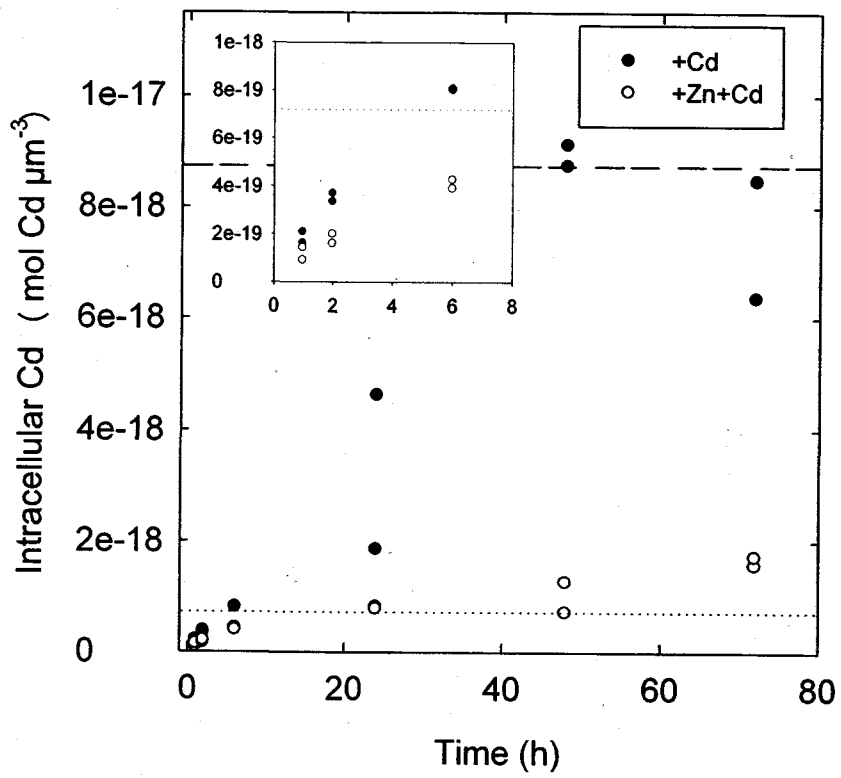


Table 1. Metal binding parameters (V_{\max} and log K) for the three Zn and Cd transport systems. Mean values \pm SE.

Acclimation media	Cd-1 transport system		Zn-1 transport system	
	$V_{\max-1}^{\text{Cd}}$	Log $K_{\text{Cd-1}}^{\text{Cd}}$	$V_{\max-1}^{\text{Zn}}$	Log $K_{\text{Zn-1}}^{\text{Zn}}$
	mol Cd $\mu\text{m}^{-3} \text{min}^{-1}$ $\times 10^{-21}$	M^{-1}	mol Zn $\mu\text{m}^{-3} \text{min}^{-1}$ $\times 10^{-21}$	M^{-1}
LM	90.1 \pm 3.7	4.87 \pm 0.06	79.0 \pm 6.0	5.13 \pm 0.08
" + Zn	50.0 \pm 4.3	4.82 \pm 0.13	53.1 \pm 6.1	5.07 \pm 0.09
" + Cd	120 \pm 13	5.70 \pm 0.10	85.3 \pm 7.0	5.87 \pm 0.38
" + Zn + Cd	59.4 \pm 4.1	4.94 \pm 0.04	53.1 \pm 5.4	5.16 \pm 0.10

	Cd-2 transport system		Zn-2 transport system	
	$V_{\max-2}^{\text{Cd}}$	Log $K_{\text{Cd-2}}^{\text{Cd}}$	$V_{\max-2}^{\text{Zn}}$	Log $K_{\text{Zn-2}}^{\text{Zn}}$
	mol Cd $\mu\text{m}^{-3} \text{min}^{-1}$ $\times 10^{-21}$	M^{-1}	mol Zn $\mu\text{m}^{-3} \text{min}^{-1}$ $\times 10^{-21}$	M^{-1}
LM	3.21 \pm 0.12	7.60 \pm 0.07	2.52 \pm 0.23	7.43 \pm 0.05
" + Zn	1.80 \pm 0.14	7.59 \pm 0.08	1.40 \pm 0.12	6.90 \pm 0.09
" + Cd	20.3 \pm 2.5	7.77 \pm 0.09	19.5 \pm 2.3	8.03 \pm 0.22
" + Zn + Cd	2.52 \pm 0.34	7.53 \pm 0.13	2.01 \pm 0.30	7.35 \pm 0.16

	Cd-3 transport system		Zn-3 transport system	
	$V_{\max-3}^{\text{Cd}}$	Log $K_{\text{Cd-3}}^{\text{Cd}}$	$V_{\max-3}^{\text{Zn}}$	Log $K_{\text{Zn-3}}^{\text{Zn}}$
	mol Cd $\mu\text{m}^{-3} \text{min}^{-1}$ $\times 10^{-21}$	M^{-1}	mol Zn $\mu\text{m}^{-3} \text{min}^{-1}$ $\times 10^{-21}$	M^{-1}
LM	0.163 \pm 0.010	8.80 \pm 0.09	na ^a	na ^a
" + Zn	0.104 \pm 0.012	8.76 \pm 0.08	nd ^b	nd ^b
" + Cd	na ^a	na ^a	na ^a	na ^a
" + Zn + Cd	0.131 \pm 0.004	8.78 \pm 0.06	nd ^b	nd ^b

^aNot available: Parameter could not be resolved. ^bNot determined.

SUPPORTING INFORMATION FOR

**Extending the biotic ligand model to account for positive and negative feedback
interactions between cadmium and zinc in a freshwater alga**

M. Lavoie, P.G.C. Campbell and C. Fortin

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

Two supplementary tables



1. Composition of culture media

Table SI.1: Total molar concentrations of constituents of low metal media used for algal growth and uptake experiments (LM) and rinse solution (LM-R) derived from the MHSM-1 medium [1]. The carbonate concentration is self-adjusted by equilibrium with the atmosphere.

Compounds	MHSM-1	LM	LM-R
NH ₄	9.37×10^{-4}	9.37×10^{-4}	9.37×10^{-4}
Cl	5.98×10^{-6}	5×10^{-4}	5×10^{-4}
K	4.22×10^{-3}	4.72×10^{-3}	4.72×10^{-3}
PO ₄	1.37×10^{-4}	1.37×10^{-4}	1.37×10^{-4}
CO ₃	Atm	Atm	Atm
NO ₃	5.07×10^{-3}	1.6×10^{-2}	1.6×10^{-2}
SO ₄	8.12×10^{-5}	8.12×10^{-5}	8.12×10^{-5}
Mg	8.12×10^{-5}	8.12×10^{-5}	8.12×10^{-5}
Ca	6.80×10^{-5}	3.28×10^{-5}	3.28×10^{-5}
Na	1.02×10^{-4}	1.67×10^{-2}	1.67×10^{-2}
BO ₃	3.01×10^{-6}	3.01×10^{-6}	
Mn	2.10×10^{-6}	3.28×10^{-8}	
EDTA	8.06×10^{-7}		
NTA		1×10^{-4}	
Fe	5.92×10^{-7}	1.28×10^{-7}	
MoO ₄	3.00×10^{-8}	3.00×10^{-8}	
Zn	2.33×10^{-7}	8.61×10^{-8}	
Co	1.09×10^{-8}	6.79×10^{-8}	
Cu	7.04×10^{-8}	3.69×10^{-8}	
MOPS	1×10^{-2}	1×10^{-2}	1×10^{-2}

2. Short-term Cd uptake experiments in the presence or absence of NTA or MOPS

We tested whether 10^{-4} M NTA or 10^{-2} M MOPS (pH buffer) affected short-term Cd uptake in *C. reinhardtii*. To do so, algae ($40\,000$ cells mL^{-1}) were exposed to the same free Cd ion concentration (10^{-9} M Cd^{2+}) for 45 minutes in four different media with or without NTA or MOPS (three replicates per media, i.e. $n=3$). All four media contained the major cations and anions concentrations found in the LM medium (Table SI.1) but no added essential trace elements (i.e. Fe, Cu, Co, Zn or Mn).

The first medium for our experiment was a well-buffered NTA medium (10^{-4} M total NTA; 1.84×10^{-6} M total Cd) with 10^{-2} M MOPS (i.e. the LM medium without essential trace elements); the second, a well-buffered NTA medium (10^{-4} M total NTA; 1.84×10^{-6} M total Cd) without MOPS; the third, a simplified LM-R medium (without NTA; $\text{Cd}^{2+} \approx 97\% \text{ Cd}_{\text{total}}$) with 10^{-2} M MOPS; and the fourth, a simplified LM-R medium (without NTA; $\text{Cd}^{2+} \approx 97\% \text{ Cd}_{\text{total}}$) without MOPS. Intracellular Cd contents were then measured by gamma spectrometry as described in the experimental section of the paper.

We found no significant differences ($p>0.05$) between intracellular cadmium quotas measured in all the different media (see Table SI.2) showing that neither 10^{-4} M total NTA nor 10^{-2} M MOPS affects Cd uptake in *C. reinhardtii* for a constant $[\text{Cd}^{2+}]$ of 10^{-9} M. Note that the trend between the treatments was the same when normalizing the Cd uptake data with respect to cell

number, surface or volume since, on a short time scale, cellular shape did not change significantly. These results indicate that, as anticipated, Cd-NTA complexes did not contribute to Cd uptake; similar results have been reported in several previous studies [2-4] . Moreover, it is shown that 10^{-2} M MOPS did not interfere with Cd uptake.

Table SI.2: Intracellular cadmium quotas (amol Cd cell^{-1}) measured after a 45 min exposure to 10^{-9} M Cd^{2+} in NTA-buffered media (10^{-4} M total NTA; 1.84×10^{-6} M total Cd) with or without 10^{-2} M MOPS or in LM-R media (without NTA; $\text{Cd}^{2+} \approx 97\% \text{ Cd}_{\text{total}}$) with or without 10^{-2} M MOPS. Error bars represent one standard deviation of three replicates.

	LM-R medium		NTA-buffered medium	
	Without MOPS	With MOPS	Without MOPS	With MOPS
Cd_{intra} (amol Cd cell^{-1})	0.29 ± 0.026	0.25 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.32 ± 0.03

3. Theoretical considerations and modeling procedure: testing the assumptions of the models

We tested the assumption (in eq 3) that the term ($K_{Cd-i}^{Cd} [Cd^{2+}]$) in eq 3 was non-significant. Such assumption was confirmed in the case of the Cd-1 transport system (i.e. the chosen $[Cd^{2+}] \ll 1/K_{Cd-1}^{Cd}$). However, in the case of the second Cd transport system (Cd-2), we had to choose a $[Cd^{2+}]$ near the half-saturation constant of this transport system since the operating range of another transport system (Cd-3) was relatively close to the Cd-2 system. We thus included K_{Cd-2}^{Cd} (computed in eq 1) in eq 3. Increasing K_{Cd-2}^{Cd} up to $10^9 M^{-1}$ (i.e. an improbably high affinity) in eq 3 yielded a K_{Cd-2}^C that would still not significantly affect the modeled Cd uptake and thus K_{Cd-2}^{Cd} obtained from eq 1. The latter analysis thus proved that K_{Cd}^C obtained with eq 3 and K_{Cd-2}^{Cd} obtained with eq 1 are accurate parameters.

We also tested the assumption (made in equation 1) that competing ion concentrations are too low to inhibit Cd uptake. Analyses with eq 3 confirmed our assumption that the $[Mg^{2+}]$, $[Ca^{2+}]$, and $[Zn^{2+}]$ used in experiments involving eq 1 were too low to significantly affect the resulting K_{Cd-i}^{Cd} and V_{max-1}^{Cd} , except in the case of Ca^{2+} and the first Cd transport system (Cd-1). In this case, we included K_{Cd-1}^{Ca} (determined with eq 3) in eq 1 to precisely determine K_{Cd-1}^{Cd} and V_{max-1}^{Cd} . The competitive effect of protons on Cd uptake was considered to be negligible at pH 7 since proton affinity constants for the Cd uptake sites were previously shown to be low at $[Cd^{2+}]$ encompassing the operating range of the Cd-1 and Cd-2 transport systems (e.g. For $[Cd^{2+}] < 4 \times 10^{-4} M$, $K_{Cd}^H \ll 10^5 M^{-1}$ [5]; at $5 \times 10^{-8} M Cd^{2+}$, $K_{Cd}^H = 10^{5.2} M^{-1}$ [6]). An analogous procedure was also used to model short-term Zn uptake rates and to test the underlying model assumptions.

4. Fast Zn uptake regulation and its interaction with Cd

From our competitive binding experiments, we have evidence that very fast (3-30 min) interaction between Cd/Zn and the Cd-2/Zn-2 transport system occurred at very high $[Cd^{2+}]$ or $[Zn^{2+}]$. Cadmium uptake rates after a 3 min exposure were inhibited by $[Zn^{2+}]$ greater than 5×10^{-8} M whereas, as measured after a 30 min exposure, Cd internalization rates tend to slightly increase (albeit not significantly; the variability among replicates at high $[Zn^{2+}]$ was relatively high, $\approx 16-28\%$) in response to $[Zn^{2+}]$ greater than 5×10^{-7} M and were only inhibited at high $[Zn^{2+}]$ ($\approx 10^{-5}$ M) (i.e., apparent $K_{Cd-2}^{Zn} \ll 10^6$) (Fig. 2B). The lower apparent Zn competitive effect for Cd uptake after a 30 min comparatively to a 3 min exposure would be consistent with the potential of an increase in $[Zn^{2+}]$ to induce a decrease in Zn affinity of the Zn-2 uptake system without notably altering Cd binding affinity for this system (see results determined at much lower $[Zn^{2+}]$ and lower $[Cd^{2+}]$ in the section "pre-acclimation to Zn or Cd and metal uptake rates"). The net result will be that Cd uptake would remain approximately stable (or decrease less easily) with increasing Zn^{2+} concentration since K_{Cd-2}^{Zn} would decrease concomitantly with an increase in $[Zn^{2+}]$. Another hypothesis would be that very high $[Zn^{2+}]$ might exert a fast toxic effect on algal cells which would affect the measurements and variability of Zn/Cd uptake rates, but this explanation remains speculative.

We also noted that Zn uptake in the presence of 2×10^{-8} M Zn^{2+} could be tightly regulated over a short period of time (3-30 min) in the presence of increasing Cd^{2+} concentrations (relatively high $[Cd^{2+}] > 1 \times 10^{-8}$ M); Cd strongly competes for Zn uptake for the 3 min

exposure experiment ($K_{Zn-2}^{Cd} = 10^{7.53 \pm 0.09}$) whereas after the 30 min exposure, Zn uptake rates remain constant until $[Cd^{2+}]$ reach approximately 5×10^{-7} M (i.e. apparent $K_{Zn-2}^{Cd} = 10^{6.08 \pm 0.14}$) (Fig. 2D). We hypothesize that the surprising ability of the algal cells to tightly regulate Zn uptake rates in the presence of high Cd^{2+} might be due to the induction by high $[Cd^{2+}]$ of an high affinity Zn transport site (with low affinity for Cd) such as the Zn-3 transport site. We already know from the data presented in this paper that Cd acclimation (albeit at lower $[Cd^{2+}]$ and for a longer period of time, i.e. 60 h) induces an up-regulation of Zn uptake rates through the Zn-1, Zn-2 and Zn-3 transport systems (Fig. 1B). The $[Zn^{2+}]$ (2×10^{-8} M) used here was near the saturating $[Zn^{2+}]$ of the Zn-3 transport system (especially for algae acclimated to high $[Zn^{2+}]$, see Fig. 1B) and since the Cd affinity is much less than the Zn affinity for the Zn-3 uptake system and that this system would be already saturated by Zn, Cd would be expected to compete with Zn for this system only at high $Cd^{2+}:Zn^{2+}$ ratios. Using eq 3 to fit the Zn uptake rates determined after the 30 min exposure to varying $[Cd^{2+}]$ and 2×10^{-8} M Zn^{2+} (data presented in Fig. 2D) and assuming a $K_{Zn-3}^{Zn} = 10^{10.5}$, the computed K_{Zn-3}^{Cd} 30 min exposure would be $10^{8.70 \pm 0.13}$, a value close to the $K_{Zn-3}^{Cd} = 10^{8.81 \pm 0.08}$ (determined at 1.5×10^{-11} M Zn^{2+} ; see insert in Fig. 2D) reported in the present study. This calculation strengthens our interpretation that high $[Cd^{2+}]$ rapidly affect Zn uptake rates through the Zn-2 and Zn-3 transport systems.

5. Calculations of the maximum diffusive uptake rates of Zn^{2+} or Cd^{2+}

The maximum diffusive flux of Cd^{2+} or Zn^{2+} (J , in $\text{pmol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) through the unstirred boundary layer was computed with the following equation [7]:

$$J = \frac{4 \pi D \left(\frac{r_c r_d}{r_d - r_c} \right) (C_b - C_s)}{A}$$

where r_c is the radius of the cell (2×10^{-4} cm), r_d is the radius of the cell plus the thickness of the unstirred boundary layer (estimated to be 8×10^{-4} cm [8]), thus, $r_d = 1 \times 10^{-3}$ cm), D is the diffusion coefficient of Cd^{2+} ($7.0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) or Zn^{2+} ($6.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) [9], A is the algal surface area (cm^2/cell), C_b and C_s are the free Cd^{2+} or Zn^{2+} concentrations in the bulk solution (in pmol cm^{-3} or nM) and at the surface (0 pmol cm^{-3} or 0 nM) respectively. The maximum diffusive fluxes were multiplied by 60 s min^{-1} , multiplied by the cellular surface area ($5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ cell}^{-1}$) and then divided by the cellular volume ($33.5 \text{ } \mu\text{m}^3 \text{ cell}^{-1}$). The resulting limiting uptake rates of Cd^{2+} or Zn^{2+} were thus expressed in $\text{mol } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$.

6. References

1. Lavoie, M.; Le Faucheur, S.; Fortin, C.; Campbell, P. G. C. Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquat. Toxicol.* **2009**, *92*, 65-75.
2. Jackson, G. A.; Morgan, J. J. Trace metal-chelator interactions and phytoplankton growth in seawater media: Theoretical analysis and comparison with reported observations. *Limnol. Oceanogr.* **1978**, *23*, 268-282.
3. Simkiss, K.; Taylor, M. G. Trace element speciation at cell membranes: Aqueous, solid and lipid phase effects. *J. Environ. Monitor.* **2001**, *3*, 15-21.
4. Vigneault, B.; Campbell, P. G. C. Uptake of cadmium by freshwater green algae: Effects of pH and aquatic humic substances. *J. Phycol.* **2005**, *41*, 55-61.
5. François, L.; Fortin, C.; Campbell, P. G. C. pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: Implications for an algal BLM. *Aquat. Toxicol.* **2007**, *84*, 123-132.
6. Kola, H.; Wilkinson, K. J. Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 3040-3047.
7. Crank, J. *The Mathematics of Diffusion*. Clarendon Press: Oxford, UK, 1956.
8. Whitfield, M.; Turner, A. Critical assessment of the relationship between biological thermodynamic and electrochemical availability. In *Chemical Modeling in Aqueous Systems*, EA, J., Ed. ACS Symposium Series 93: Washington DC, 1979; pp 657-680.
9. Kariuki, S.; Dewald, H. D. Evaluation of diffusion coefficients of metallic ions in aqueous solutions. *Electroanal.* **1996**, *8*, 307-313.

9. ARTICLE #3

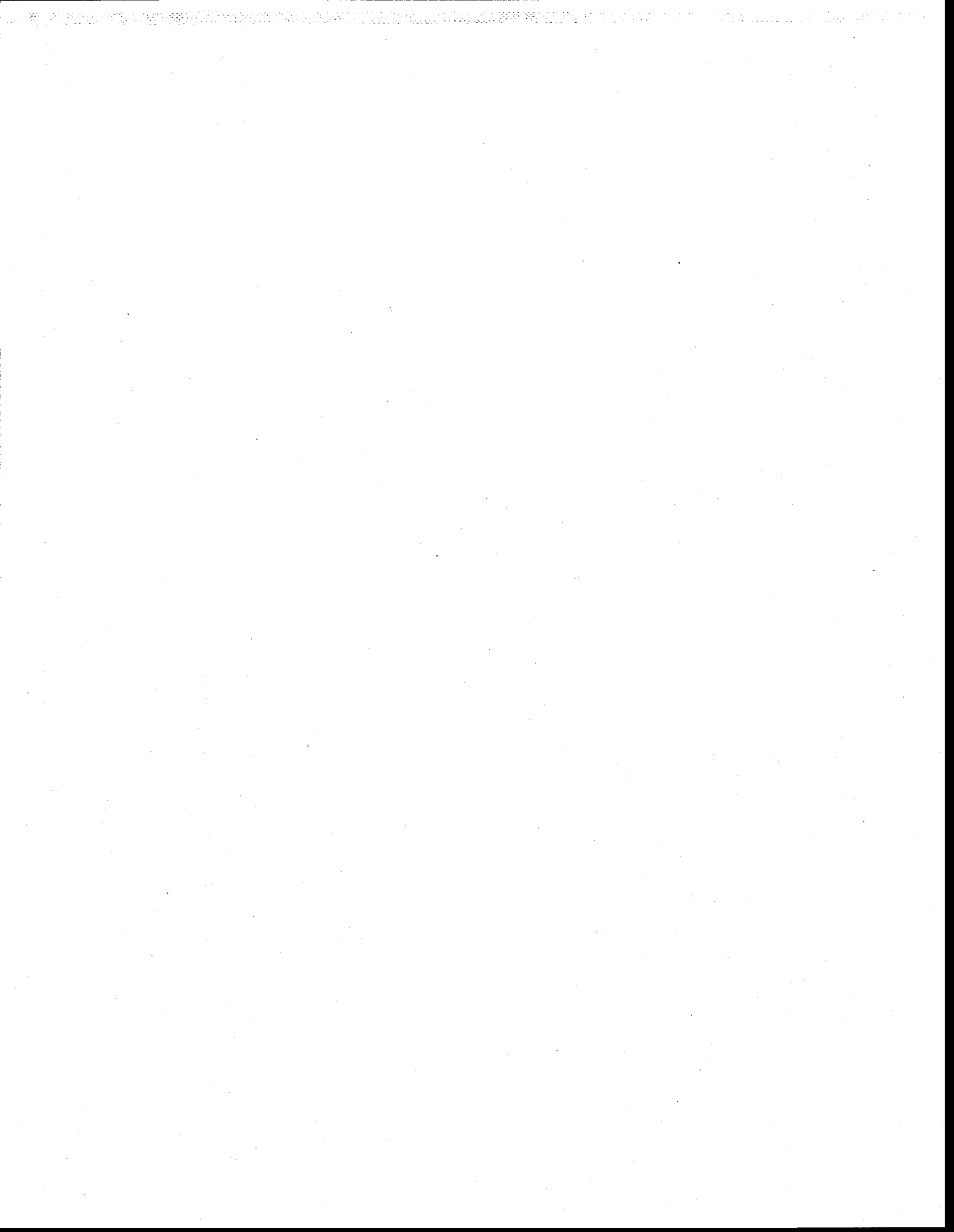
Predicting cadmium accumulation and toxicity in a green alga in the presence of varying essential element concentrations using a biotic ligand model

Authors: Michel Lavoie, Peter G.C. Campbell and Claude Fortin*

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

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, trace metals, cadmium, calcium, metal accumulation, metal toxicity, Biotic Ligand Model

Article en préparation pour soumission à la revue *Environmental Science and Technology*



Abstract

The current version of the Biotic Ligand Model (BLM) does not take into account the effect of essential trace elements on metal uptake/toxicity in aquatic organisms. Here, we refine the BLM by integrating the modulating effects of various essential elements on cadmium (Cd) uptake kinetics and Cd^{2+} toxicity in the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii*. It was recently shown that Cd and Zn are taken up through a common transporter (Zn-2 / Cd-2) in this species. The algae were acclimated to a low (LM) or high trace metal (HM) medium as well as to low or high Ca^{2+} and Co^{2+} concentrations, and the resulting effects on the capacity and affinity of the Zn-2 or Cd-2 transport system were evaluated. The Cd binding affinity to the Cd-2 transport system for the algae acclimated to the HM medium was significantly lower than for the algae acclimated to the LM medium. The results show that Ca^{2+} non-competitively inhibits the capacity of the Cd-2 transport system whereas Co^{2+} alone does not affect Cd^{2+} uptake kinetics. However, Co^{2+} in combination with Cd^{2+} non-competitively inhibits the Cd^{2+} positive feedback on Cd uptake. Our BLM incorporating the physiological effects of Ca^{2+} , Co^{2+} and other trace metals, as well as the Cd positive feedback on Cd uptake predicts steady-state Cd accumulation in the presence of varying concentrations of essential elements reasonably well. Cadmium toxicity can also be accurately predicted as a function of internalized Cd across varying trace metal concentration regimes since algal sensitivity to intracellular Cd was unaffected by the different essential element combinations.

Introduction

Our level of understanding of metal bioavailability and toxicity has evolved over recent years, leading to an integrated predictive framework: the Biotic Ligand Model (BLM) [1-3]. This model predicts the degree of metal binding to the site of action (i.e. the biotic ligand, which often represents membrane carriers for essential cations), and the rate of metal accumulation is in turn related to toxicological response. This response reflects both the chemistry of the ambient water (i.e. major cation competition, metal complexation) and the inherent sensitivity of organisms [3].

The BLM has proved its value in numerous laboratory experiments, accurately predicting (acute) metal uptake/toxicity as a function of the free ion concentrations for a wide range of cationic metals and organisms although some exceptions exist [1, 4]. One major limitation of the BLM is its inability to properly integrate the dynamic nature of the biotic ligand as a function of the organism's nutritional state and physiological acclimation to ambient essential metal supply. Studies on marine algae have shown that essential metal uptake rates are highly regulated in response to ambient free metal ion concentrations, in order to maintain nearly constant essential metal quotas over a wide range of external metal concentrations representative of those found in the exposure environment [5-7]. Recent reports on the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii* have shown that uptake of a mostly non-essential metal (cadmium) can be controlled not only by the free Cd^{2+} ion concentration, but also by the cells' trace element nutritional status [8, 9].

Alternatives have been proposed in the literature to account for the complex physiological cellular mechanisms modulating metal uptake. Empirical approaches may be viable in a given aquatic ecosystem but they offer less flexibility for application to aquatic ecosystems in general, with their widely different chemical compositions. Incorporating physiological aspects into equilibrium-based models such as the BLM will require fundamental knowledge of metal-organism interactions. Such an approach has been shown to successfully predict acute silver toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [10].

In the present study, we chose to build on the current simple BLM framework by integrating mechanistically the effect of water chemistry on the physiology of the biotic ligand in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. The first objective of this study was to evaluate the effects of Ca^{2+} and Co^{2+} , as well as that of an essential trace metal mixture, on the properties of Cd transport systems (quantity, affinity, capacity) by using short-term ^{109}Cd uptake experiments in well-defined inorganic culture media in laboratory batch cultures of the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. The effects of Co^{2+} and other trace metals were tested as a function of previous acclimation to different trace metal concentrations. The second objective was to develop a biotic ligand model predicting Cd uptake and toxicity in long-term exposures and incorporating algal physiological responses to Cd^{2+} , Ca^{2+} and essential trace metals.

Experimental Section

Chemicals and trace metal manipulation. Salts used to prepare culture and experimental solutions were of analytical grade or better. Radio-labeled Cd ($^{109}\text{CdCl}_2$; $26 \mu\text{Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$) from Perkin-Elmer (Woodbridge, ON, Canada) or concentrated analytical standards of Cd, Zn, Co, Cu, Mn and Fe from SCP Science (Baie d'Urfé, QC, Canada) (1 mg mL^{-1}) were used to spike experimental media. Nitrilotriacetate sodium salt (NTA) (>99%) and 3-N-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) (>99%) were obtained from Sigma Scientific (Oakville, ON, Canada). All solutions were prepared with ultrapure water ($18\text{-}18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, Milli-Q[®] Gradient A10, Bedford, MA, USA). All flasks (polypropylene, polycarbonate, Teflon) were washed and rinsed successively with 15% v/v nitric acid, deionized water, and ultrapure water before use. Manipulations that required precautions against possible contamination by airborne particulates were performed in a class 100 laminar flow hood under a positive pressure of filtered air.

Test organism and culture conditions. Asynchronous batch cultures of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* P. Dang. (CPCC 11, walled wild type), obtained as an axenic culture from the Canadian Phycological Culture Center (CPCC, Waterloo, ON, Canada), were maintained in LM (low metal; Table SI.1) culture medium using sterile techniques (autoclave, laminar flow hood). Stock cultures were maintained and transferred into fresh culture media two times per week using glass Erlenmeyer flasks. Axenicity was periodically tested visually with agar plating [8].

Cellular densities and volumes were determined with an electronic particle counter (Multisizer™ 3 Coulter Counter®, 70 µm aperture). Cells were inoculated at 40,000 cells mL⁻¹ in 250 mL polycarbonate bottles containing 100 mL of LM medium (with varying essential metal concentrations, see details below) and maintained at 20 ± 0.2 °C under constant rotary agitation (60 rpm) and continuous illumination (100 µmol quanta m⁻² s⁻¹). The growth and exposure media pH were buffered at 7.0 with noncomplexing MOPS buffer [11, 12] and the free metal concentrations were buffered with the non-assimilable ligand NTA [9, 13-15]. The concentrations of the free metal ions in the medium were computed with the MINEQL⁺ chemical speciation program (version 4.6; [16]) with updated equilibrium constants [17], using the concentrations of the major cations and anions, the pH and the total measured trace metal concentrations as input data.

Short-term cadmium uptake experiments. Uptake experiments were carried out in the LM or LM-R medium (see explanations in SI.1 section and Table SI.1) spiked with Cd. In all short-term experiments of the present study, Cd adsorption on the polycarbonate erlenmeyers as well as Cd accumulation or adsorption by algae did not decrease significantly the total dissolved Cd.

Effect of Ca exposure on Cd uptake. We first investigated the effect of Ca²⁺ on short-term Cd uptake kinetics. Algal cells were acclimated for more than 10 generations to the LM culture medium before the Cd exposure. After 60 hours of growth in the LM medium (i.e. late

exponential phase), algae were then harvested gently on 2 μm polycarbonate filters, rinsed three times with the LM-R (Table S1.1) medium and resuspended in LM-R media spiked with radiolabeled ^{109}Cd at a cell concentration of 40,000 cells mL^{-1} . According to speciation calculations, approximately 97% of total Cd added in the LM-R exposure media was present as the free Cd^{2+} ion. Cadmium accumulation was measured at Cd^{2+} concentrations ranging from 10^{-8} to 8×10^{-5} M at two different Ca^{2+} concentrations (2×10^{-5} and 10^{-3} M). As total Ca concentrations increased in the exposure medium, ionic strength was maintained at 22 mEq L^{-1} by addition of the appropriate volume of a 1 M NaNO_3 solution. After a 30-min exposure, algal cells were filtered onto two superimposed 2- μm polycarbonate membranes (47 mm diameter), rinsed for 10 minutes with 10^{-4} M EDTA (prepared in LM-R medium) and rinsed three times with LM-R medium. The EDTA rinsing step removes adsorbed Cd from the algal surface [14, 18]. Cellular concentrations of Cd were finally determined from the ^{109}Cd activity of the rinsed cells, as measured by gamma spectroscopy. Filter samples were placed in 2 mL of water to ensure constant sample geometry. The counting time was set 1,000 s or to a maximum of 100,000 counts. Molar amount of Cd was derived from counts per minute (cpm) taking into account the detector efficiency, radioactive decay, and the specific activity. The activity of the lower filter was subtracted from that measured on the upper filter to correct for passive retention of radiolabelled Cd by the filters. Intracellular cadmium concentrations were then normalized for biomass volume and divided by the exposure time, yielding Cd internalization rates ($\text{mol Cd } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$). Throughout this study, metal internalization rates were normalized with respect to cellular volumes in order to better predict steady-state Cd accumulation by taking into account the differences in cellular volume induced by Cd over long-term exposures [8].

Effects of acclimation to trace metals. We studied the effects of algal acclimation to different Co^{2+} and other trace metal concentrations on short-term Cd uptake kinetics. Algal cells were acclimated for 60 h (i.e. the late exponential phase) in four different culture media: 1) the LM medium containing the lowest concentrations of essential trace elements with no added cadmium ($< 10^{-12}$ M Cd^{2+}); 2) the LM medium supplemented with Co (10^{-9} M Co^{2+} : +Co medium); 3) the LM medium supplemented with Co and Cd (10^{-9} M Co^{2+} , 7×10^{-9} M Cd^{2+} : +Co+Cd medium); 4) the LM medium supplemented with Zn, Co, Fe, Mn, Cu (10^{-9} M Zn^{2+} , 10^{-9} M Co^{2+} , 10^{-17} M Fe^{3+} , 10^{-6} M Mn^{2+} , 10^{-13} M Cu^{2+} : High metal or HM medium). Algal cells were then harvested by filtration and exposed for 1 h to a range of $[\text{Cd}^{2+}]$ (from 10^9 to 3×10^{-7} M Cd^{2+}) in LM media containing the same computed free essential trace metal concentrations as in the acclimation medium (the total NTA concentrations were adjusted between 1 and 7×10^{-4} M to maintain the free essential trace metal concentrations constant as $[\text{Cd}^{2+}]$ were increased). We also carried out a fifth experiment with algae acclimated to the LM medium and directly exposed to Cd in the HM medium. Cadmium accumulations after the 1-h exposure periods were measured as described in the preceding paragraph.

Competition experiments. The effects of different $[\text{Co}^{2+}]$ over the range from 10^{-8} to 10^{-5} M on short-term (30 min) Cd uptake rates in the presence of 2×10^{-8} M Cd^{2+} prepared in the LM-R media were initially evaluated. We then tested whether an increase in three other trace metals (Fe, Mn or Cu taken separately) affected Cd uptake (we used LM media in order to control Fe and Cu speciation), using Fe^{3+} , Mn^{2+} and Cu^{2+} concentrations representative of the HM medium. To do so, we measured Cd uptake rates after a 1-h exposure to 2×10^{-8} M Cd^{2+}

in the control LM medium, or in the LM medium supplemented with Fe (10^{-17} M Fe^{3+} , +Fe), Mn (10^{-6} M Mn^{2+} , +Mn) or Cu (10^{-13} M Cu^{2+} , +Cu).

Long-term Cd accumulation. *Chlamydomonas reinhardtii* cells acclimated for more than seven growth cycles to the LM culture medium were harvested in the exponential phase by centrifugation (20,000 g, 5 min) and were rinsed four times with LM-R to remove any algal exudates present in the original algae culture. The algae were then inoculated into three different types of experimental media spiked with ^{109}Cd over the concentration range from 23 pM to 800 nM Cd^{2+} : 1) the LM medium; 2) the +Zn medium (LM with 10^{-9} M Zn^{2+}) and; 3) the HM medium. Algal cultures in the three different culture media, but with no added Cd, were also grown in parallel. After 60 hours of growth (corresponding to the late exponential phase), algal cell numbers and volumes (see Cd toxicity section below) as well as steady-state intracellular Cd accumulation were determined after filtration of the algal suspensions and removal of adsorbed Cd (protocol described above).

Measurements of ^{109}Cd activities in the filtrates from the algal collection step showed that losses of total Cd from solution were less than 10% for varying free Cd^{2+} exposure concentration in the LM medium [8]. Losses of Cd in the +Zn and HM media are also expected to be lower than 10% since net Cd accumulation was lowered than in the LM medium.

Cadmium toxicity. The toxicity of Cd was evaluated by measuring the culture yield relative to control after the 60-h exposure. This relative culture yield was calculated by dividing the mean final cell volumes of the exposed algae by that of the control algae. The relative culture yield was then plotted as a function of $[Cd^{2+}]$ or intracellular Cd concentrations. The data were fitted with the macro REGTOX (http://www.normalesup.org/~vindimian/en_index.html) to calculate EC_x with the Hill approach. The 95% confidence intervals around the EC_x means were estimated by a bootstrap non parametric simulation.

Steady-state Cd accumulation modeling. The kinetic parameters determined in the short-term Cd uptake experiments conducted in this paper and in our previous study [9] were incorporated into a simple model (see eq. 1, 2 and 3) to predict steady-state intracellular Cd in *C. reinhardtii* in the presence of different concentrations of Cd^{2+} and free essential cations.

Two main metal binding properties (i.e. transport system capacity, V_{max} , and Cd affinity, K_{Cd}) of the three cadmium transport systems (Cd-1, Cd-2 and Cd-3), which were recently characterized in *C. reinhardtii* [9], were first determined by a least-squares fit of short-term Cd uptake rates (V_{Cd}) as a function of $[Cd^{2+}]$ to eq. 1 [19, 20]:

$$V_{Cd-i} = \sum_{i=1}^n \frac{V_{max-i}^{Cd} [Cd^{2+}] K_{Cd-i}^{Cd}}{1 + ([Cd^{2+}] K_{Cd-i}^{Cd}) + ([Cz^+] K_{Cd-i}^C)} \quad (1)$$

where V_{Cd-i} occurred by transport sites i (in the case of Cd and *C. reinhardtii* : $n = 3$ transport systems, $i = Cd-1, Cd-2$ and $Cd-3$ [9]), $[Cd^{2+}]$ is the concentration of the free cadmium ion contributing to Cd accumulation by the cells, V_{max-i}^{Cd} is the maximum Cd uptake rate achieved at metal saturation of the transport sites i , $[C^{z+}]$ is the competitor C^{z+} concentration, K_{Cd-i}^{Cd} and K_{Cd-i}^C are the Cd^{2+} and C^{z+} affinity constants respectively for the Cd transport system i . Note that the parameter V_{max-i}^{Cd} equals the total moles of transport systems per unit biomass (S_T) times the rate constant (k_{in}) for the transport of metal across the membrane and subsequent cytoplasmic release. In eq. 1, we used the affinity constants of the major cations (Ca^{2+} and Mg^{2+}) for the Cd-1 and Cd-2 transport systems as derived in Lavoie et al. [9].

Cobalt competitive binding affinity for the Cd-2 transport site (K_{Cd-2}^{Co}) was determined in separate experiments where V_{Cd} was measured at constant $[Cd^{2+}]$, but over a range of $[Co^{2+}]$ concentrations. Cadmium internalization rates were fitted to eq. 2, where A is an adjustable parameter regrouping all terms of the numerator of eq. (1). The constant K_{Cd-2}^{Ca} does not appear in eq. 2 since Ca^{2+} competition with Cd^{2+} at the Cd-2 transport site was negligible.

$$V_{Cd-i} = \frac{A}{1 + (K_{Cd-i}^{Co} [Co^{2+}]) + (K_{Cd-i}^{Cd} [Cd^{2+}])} \quad (2)$$

In long-term growth experiments, where algal growth becomes significant, the rate of change of the concentration of cadmium internalized ($[Cd_{cell}]$, i.e. Cd content per unit of biomass) by the cells is expressed by the following differential equation:

$$\frac{d[Cd_{cell}]}{dt} = V_{Cd-i} - \mu [Cd_{cell}] \quad (3)$$

where μ is the specific algal growth rate. At steady-state (i.e. $d[Cd_{cell}]/dt = 0$), $[Cd_{cell}]$ will be function of the Cd uptake rate (V_{Cd-i}) divided by the specific growth rate (μ) [19]:

$$[Cd_{cell}] = \frac{V_{Cd-i}}{\mu} \quad (4)$$

The Cd uptake rate was computed with eq. 1 for algae that had reached a steady-state with the exposure medium, i.e. algae that had been acclimated before exposure and grown in the same specific medium. Assuming a constant growth rate over the exponential growth phase, the specific growth rate (μ) at various inhibiting $[Cd^{2+}]$ was computed by multiplying the measured maximum growth rate in control cultures without added Cd ($\mu_{max} = 1.03 \pm SD 0.10 d^{-1}$; $n = 6$) times the relative growth rate inhibition ($\mu_{Cd} / \mu_{control}$), which was computed with eq. 5:

$$\frac{\mu_{Cd}}{\mu_{control}} = \frac{\ln(\text{yield}_{t1, Cd}) - \ln(\text{yield}_{t0})}{\ln(\text{yield}_{t1, control}) - \ln(\text{yield}_{t0})} \quad (5)$$

where $\text{yield}_{t1, Cd}$ and $\text{yield}_{t1, control}$ are the cellular volume yields (total cell volume mL^{-1}) measured after 60 h growth in Cd-exposed and control (without added Cd) cultures

respectively; $yield_{i0}$ is the initial algal concentration in cell volume per mL^{-1} ($40,000 \text{ cells } mL^{-1} \approx 2.75 \times 10^8 \mu m^3 mL^{-1}$).

Finally, it is possible to compare the modeled steady-state intracellular Cd concentration (eq. 4) to the experimental measurements of Cd accumulation after 60 hours of growth described in the previous section. Calculations show that intracellular Cd concentrations after 60 hours of growth should approximate expected Cd accumulation at steady-state for a wide range of specific growth rates (see SI.2 section for details).

Statistical analyses. From a plot of measured versus calculated internalization rates, coefficients of determination (R^2) were determined and the significance from 0 of the constants (V_{max} and K_{Me}) was evaluated by t-test analyses. Differences between uptake rates measured at saturation of the transport systems as a function of earlier acclimation to trace metals were examined with a t-test for independent samples (using uptake rates near the transport system capacities). Differences between metal binding affinity constants were conservatively evaluated by comparing the 95% confidence intervals because of the low number of data below the half-saturation constant. An ANOVA analysis was also used to explore potential differences in cadmium binding affinity. The statistical data treatment was done with Sigma-Plot 10 software. Results were considered to be significant if $p < 0.05$. All the experiments were performed in duplicate ($n=2$) except the measurement of Cd uptake rates for algae acclimated to the LM medium ($n=2$ to 4). Errors are given as \pm one standard error unless otherwise mentioned.

Results and discussion

Calcium effect on cadmium internalization rates. As reported in Lavoie et al. [9], cadmium is taken up by *Chlamydomonas reinhardtii* via three different transport systems ($K_{Cd-1}^{Cd} = 10^5 M^{-1}$; $K_{Cd-2}^{Cd} = 10^{7.6} M^{-1}$; $K_{Cd-3}^{Cd} = 10^{8.8} M^{-1}$) (Figure 1a: Cd-1 and Cd-2; Figure 1b: Cd-2 and Cd-3), the Cd-2 and Cd-3 transport systems are probably high affinity Zn transporters whereas the Cd-1 binding site might be a major cation (such as Ca^{2+}) transport system. Cadmium uptake rates in the presence of high $[Ca^{2+}]$ ($10^{-3} M$) fit the model curve ($R^2 = 0.99$) incorporating the Ca stability constants for the Cd-1 ($K_{Cd-1}^{Ca} = 10^{4.02 \pm 0.14} M^{-1}$) and Cd-2 ($K_{Cd-2}^{Ca} = 10^{2.62 \pm 0.16} M^{-1}$) transport systems as determined in Lavoie et al. [9] (Figure 1a). High Ca^{2+} concentrations inhibit Cd uptake competitively and interact non-competitively with the Cd-2 transport sites within a very short time frame (i.e. within the 30-min exposure period, since the algae were acclimated to the low Ca^{2+} LM medium before the experiment). Indeed, the Cd-2 transport system capacity decreased significantly by $\approx 36\%$ in the presence of $10^{-3} M Ca^{2+}$ ($V_{max-2}^{Cd} = 2.1 \pm 0.1 \times 10^{-21} \text{ mol Cd } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$) compared to exposure to $2 \times 10^{-5} M Ca^{2+}$ ($V_{max-2}^{Cd} = 3.3 \pm 0.2 \times 10^{-21} \text{ mol Cd } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$) (Figure 1a; Table SI.2). A slight decrease in the mean V_{max-1}^{Cd} at high $[Ca^{2+}]$ was observed too ($8.5 \pm 0.4 \times 10^{-20}$ to $7.8 \pm 1.1 \times 10^{-20} \text{ mol Cd } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$; Figure 1a), but based on the few data points near saturation of the Cd-1 transport system in the presence of $10^{-3} M Ca^{2+}$ (Figure 1a; Table SI.2), we could not evaluate the significance of this result. Note that in our exposure media Cd may precipitate as otavite at $[Cd^{2+}] > 9 \times 10^{-5} M$, which precludes reaching Cd^{2+} concentrations that fully saturate the Cd-1 transport system.

Calcium was also shown to inhibit short-term Ni uptake non-competitively in the same algal species [21]. A non-competitive inhibition of Cd uptake may be due to (i) a decrease in the metal uptake rate constant (k_{in}) through an allosteric interaction and/or (ii) a decrease in the number of transport systems through the turnover of membrane proteins and a reduced replacement rates. The first mechanism (i) is expected to be rapid whereas the second mechanism (ii) is thought to be relatively slow. We thus speculate that the rapid decrease of the V_{max} of the Cd-2 transport system in the presence of high $[Ca^{2+}]$ could be due to a decrease in k_{in} . We however believe that further studies are needed to test the aforementioned hypothesis and unravel the precise mechanism behind the non-competitive effect of Ca on trace metal transport in *C. reinhardtii*.

Acclimation to essential trace metals. Acclimation to the +Co medium (10^{-9} M Co^{2+}) did not significantly affect Cd uptake rates via the Cd-2 and Cd-3 transport systems, relative to the algae pre-acclimated to 10^{-11} M Co^{2+} (i.e. LM medium) (Figure 1b), whereas acclimation to 10^{-9} M Zn^{2+} was shown to decrease the Cd-2 and Cd-3 transporter capacities by $\approx 40\%$ in our previous study [9]. These results show that Co alone, as opposed to Zn, does not induce measurable changes in Cd transport systems kinetics. However, a pre-acclimation to both 10^{-9} M Co^{2+} and 7×10^{-9} M Cd^{2+} induced a 2.5-fold increase in mean V_{max-2}^{Cd} , reaching $8.6 \pm 0.7 \times 10^{-21}$ mol Cd μm^{-3} min^{-1} , with respect to the algae acclimated to the LM medium ($V_{max-2}^{Cd} = 3.4 \pm 0.2 \times 10^{-21}$ mol Cd μm^{-3} min^{-1}) (Figure 1b; open squares; Table SI.3). In our previous study [9], we found that a pre-acclimation to 7×10^{-9} M Cd^{2+} alone resulted in a 6.3-fold

enhancement of $V_{\max-2}^{\text{Cd}}$ relative to a pre-acclimation to the LM medium, whereas in combination with 10^{-9} M Zn^{2+} , $V_{\max-2}^{\text{Cd}}$ remained approximately constant relative to the LM medium. In other words, prior exposure to Cd leads to an increase in the number (and/or internalization rate constant) of Zn transporters in response to the decrease in Zn uptake, which paradoxically contributes to an increased Cd uptake. This positive feedback on Cd accumulation nearly disappeared in the presence of 10^{-9} M Zn^{2+} .

Sunda and Huntsman [22] also found that Cd uptake is up-regulated less strongly in the presence of low Co^{2+} compared to low Zn^{2+} in the oceanic diatom *Thalassiosira oceanica*, albeit at much lower Cd^{2+} , Co^{2+} and Zn^{2+} concentrations. We hypothesize that a lower affinity of Co compared to Zn for binding to intracellular regulatory sites, which control the synthesis of the membrane-bound Zn/Cd transporter, might explain the different effects of Co and Zn on Cd uptake.

When all essential trace metals were simultaneously increased in the acclimation (and exposure) HM medium, the capacity of the Cd-2 transport system decreased by $\approx 60\%$ (reaching $V_{\max-2}^{\text{Cd}} = 2.1 \pm 0.1 \times 10^{-21}$ mol Cd μm^{-3} min $^{-1}$; Figure 1b, full triangles; Table SI.3), relative to the algae acclimated to the LM medium (Figure 1b). This significant decrease was close to the mean 40% decrease in $V_{\max-2}^{\text{Cd}}$ due to high $[\text{Zn}^{2+}]$ alone [9], suggesting that Zn is the main trace metal modulator of Cd-2 transporter capacity. Surprisingly, the Cd affinity for the Cd-2 transport system also decreased 3.8 fold ($p < 0.05$, on the basis of a comparison of confidence intervals) for the algae acclimated and exposed to the HM medium ($K_{\text{Cd-2}}^{\text{Cd}} = 10^{7.08}$

$\pm 0.13 \text{ M}^{-1}$; Fig. 1b, full triangles) relative to the LM medium ($K_{\text{Cd-2}}^{\text{Cd}} = 10^{7.66 \pm 0.05} \text{ M}^{-1}$) (Figure 1b; Table SI.3). This decrease in metal binding affinity seems rapid since we measured a 2.7-fold lower mean K_{Cd2} ($10^{7.23 \pm 0.12} \text{ M}^{-1}$) (Figure 1b, open triangles; Table SI.3) for algae acclimated to the LM medium but directly exposed to the HM medium (relative to the algae exposed to and acclimated in the LM medium). Note that this latter decrease is not significant on the basis of a comparison of confidence intervals. However, the increasing divergence between Cd uptake rates of algae acclimated to the LM or the HM medium as $[\text{Cd}^{2+}]$ is decreased in the exposure medium is significant on the basis of an ANOVA (i.e. significant statistical interaction between the effect of acclimation media and $[\text{Cd}^{2+}]$), which is consistent with a significant decrease in Cd binding affinity as a response to exposure in a metal-rich medium. Furthermore, the absence of any significant decrease in $V_{\text{max-2}}^{\text{Cd}}$ for algae exposed to HM (but acclimated to LM) (Figure 1b, open triangles; Table SI.3) shows that the negative feedback of trace metals (mainly due to Zn) on Cd-2 transport system is relatively slow, as would be expected for an induced change in the rates of the synthesis/degradation of membrane-bound transport systems.

The decrease in $K_{\text{Cd-2}}^{\text{Cd}}$ in presence of high trace metal concentrations was not due to competition between essential trace metals and Cd in the exposure media, since the Co^{2+} and Zn^{2+} concentrations (10^{-9} M) were too low to compete effectively with Cd for the Cd-2 transport sites ($K_{\text{Cd-2}}^{\text{Co}} \approx 10^{6.38 \pm 0.20}$ estimated in Fig. SI.2; $K_{\text{Cd-2}}^{\text{Zn}} = 10^{6.95 \pm 0.11}$ from [9]). Similarly, an increase in the Fe^{3+} , Mn^{2+} or Cu^{2+} concentration alone does not affect Cd internalization rates (Figure SI.1), and uncertainties with respect to the metal-NTA

equilibrium constants do not affect our conclusion (see SI.6 section). The significant change in K_{Cd-2}^{Cd} thus indicates that changes in the conformation or types of the Cd-2 transport system might occur as a function of prior trace metal acclimation.

Modeling steady-state Cd accumulation. We first modeled Cd uptake at steady-state with eq. 1 and 3 for algae exposed to varying $[Cd^{2+}]$ in three different culture media (LM, +Zn and HM) without taking into account Cd positive feedback on Cd accumulation (since we only had quantitative data on the effect of Cd acclimation at one $[Cd^{2+}]$, i.e. 7×10^{-9} M Cd^{2+}). Our model incorporated the Cd binding parameters (K_{Cd-i}^{Cd} , V_{max-i}^{Cd}) obtained for algae acclimated to the LM or +Zn media (from Lavoie et al. [9]). For the algae acclimated to the HM medium, we used the V_{max-2}^{Cd} and K_{Cd-2}^{Cd} determined in the present study and assumed that Cd binding parameters for the Cd-1 and Cd-3 transport systems were similar to those determined for the algae acclimated to the +Zn media.

Our strictly equilibrium-based biotic ligand model gave a reasonable prediction of the intracellular steady-state Cd concentration in *C. reinhardtii* exposed to different $[Cd^{2+}]$ in the HM medium, indicating that our metal binding constants apply over a wide range of $[Cd^{2+}]$ (Figure 3a, open triangles and solid line). In contrast, the modeled intracellular steady-state Cd concentration of algal cells growing in the LM medium (Figure 2a, dotted line) was consistently lower than the measured intracellular Cd (Figure 2a, full circles), by a factor of 10 to 6 for $[Cd^{2+}]$ ranging from 23 pM to 20 nM; the gap between the modeled and measured values narrowed at 50 nM Cd^{2+} ($\approx 70\%$ inhibition of the algal cell volume yield [8]) (Figure

2a). For the algae acclimated to the +Zn medium, we obtained a similar trend between the modeled (Figure 2a, short-dashed line) and the measured (Figure 2a, open circles) steady-state Cd concentrations: the model underestimated Cd accumulation by a factor of 2.5 to 6 over the Cd^{2+} concentration range from 23 pM to 100 nM, whereas the model and the experimental values reasonably agreed at the highly inhibitory $[\text{Cd}^{2+}]$ of 250 nM ($\approx 77\%$ inhibition of the algal cell volume yield [8]).

In both the LM and +Zn media, the convergence between the measured and the modeled intracellular Cd concentration at highly toxic Cd^{2+} concentrations ($>75\%$ inhibition of the cell volume yield) is caused by the levelling off of net Cd accumulation by the cells, suggesting that highly toxic Cd^{2+} concentrations inhibit net Cd uptake by the cells. At these very high $[\text{Cd}^{2+}]$, cell metabolism/viability and thus operation of Cd transport systems are expected to be strongly impaired by Cd. To explore the effect of the Cd positive feedback on long-term Cd accumulation, we performed a second modeling exercise for a single $[\text{Cd}^{2+}]$ of 7×10^{-9} M, for which we have quantitative data on the extent of the algal positive feedback response to Cd (Figure 2b). When the Cd positive feedback on the capacity of the Cd-2 transport system at steady-state at 7×10^{-9} M Cd^{2+} (data from [9]) was incorporated into the model, the modeled and measured intracellular Cd concentrations for algae growing in both the LM and the +Zn media were much closer than for our first modeling exercise (Figure 2b).

We also modeled steady-state intracellular Cd concentrations in the presence of high $[\text{Co}^{2+}]$ by incorporating the $V_{\text{max}-2}^{\text{Cd}}$ (for algae acclimated to high Co^{2+} and 7×10^{-9} M Cd^{2+}) and $K_{\text{Cd}-2}^{\text{Co}}$,

measured in the present study, into eq. 1 and 3 and, once again, Cd accumulation was reasonably well predicted with this approach (Figure 2b). The effect of high $[Ca^{2+}]$ (10^{-3} M) on steady-state Cd uptake was also closely reproduced by our model when the non-competitive inhibiting effect of Ca^{2+} on the Cd-2 transport system was introduced (i.e. $V_{\max-2}^{Cd}$ in the presence of low or high Ca^{2+} , as determined in this study) and K_{Cd-2}^{Ca} calculated in Lavoie et al. [9] (Figure 2b). The previously observed copper effect on Cd accumulation was also well predicted by eq. 4 by incorporating the decrease in growth rate that was computed with eq. 5 ($\approx 27\%$ total cell volume yield inhibition, [8]) for the +Cu medium (10^{-13} M Cu^{2+}) compared to the LM medium (10^{-14} M Cu^{2+}) (Figure 2b). Assuming a constant Cd uptake rate as $[Cu^{2+}]$ increased by 10-fold, the inhibition of growth rate by Cu is expected to decrease biodilution of intracellular Cd in the +Cu medium compared to the LM medium.

Cadmium accumulation and toxicity. Cadmium cellular quotas leading to 50% growth inhibition (normalized to cell volumes) remained unchanged for algae exposed in the LM ($EC_{50} = 16.6 \times 10^{-18}$ mol Cd μm^{-3} , $CI_{95\%} = 14.8 - 18.3 \times 10^{-18}$ mol Cd μm^{-3}), +Zn ($EC_{50} = 13.6 \times 10^{-18}$ mol Cd μm^{-3} , $CI_{95\%} = 10.2 - 16.1 \times 10^{-18}$ mol Cd μm^{-3}) and HM ($EC_{50} = 18.5 \times 10^{-18}$ mol Cd μm^{-3} , $CI_{95\%} = 13.3 - 23.6 \times 10^{-18}$ mol Cd μm^{-3}) media (data for algae acclimated to the LM and +Zn media from [8]) (Figure 3) (all data pooled, $n = 62$: $EC_{50} = 16.0 \times 10^{-18}$ mol Cd μm^{-3} , $CI_{95\%} = 12.6 - 18.4 \times 10^{-18}$ mol Cd μm^{-3}). The results thus show that intracellular Cd detoxification (e.g. potential induction of phytochelatins) does not change significantly in the presence of different concentrations of Zn^{2+} or other essential trace metals. Changes in Cd toxicity in the presence of different essential trace metal concentrations thus appear to be

strongly related to the steady-state concentration of intracellular cadmium, regardless of the cell's nutritional state.

Modeling Cd toxicity. We chose to model the EC_{20} as a function of $[Cd^{2+}]$ since the EC_{20} is a frequent endpoint in toxicity assays evaluating metal toxicity in species sensitivity distribution (SSD) [23]. We first computed the $EC_{20 [Cd]_{cell}}$ in each acclimation media (LM, +Zn and HM) with the data in figure 3 and modeled the $EC_{20 Cd^{2+}}$ using eq.1 and 4 under the approximation that $\mu = \mu_{max}$ at low inhibitory $[Cd^{2+}]$. Note that according to eq. 5, a 20% inhibition of the total cell volume yield after 60 hours of growth would decrease the specific growth rate by only around 8.7%. Such a low decrease of growth rate would in turn increase $[Cd]_{cell}$ by 8.7%. Our approximation of $\mu = \mu_{max}$ is thus expected to very weakly underestimate Cd^{2+} toxicity in the poorly sensitive region of the sigmoidal dose-response curve. Note also that we used in eq.1 the metal binding constants determined for algae acclimated to the different trace metal regimes as well as to 7×10^{-9} M Cd^{2+} (for the LM and +Zn acclimation media) in order to approximate the effect of the Cd positive feedback on Cd accumulation. The modeled $EC_{20 Cd^{2+}}$ was then compared to the experimental $EC_{20 Cd^{2+}}$, which was calculated by using dose-response curves published in Lavoie et al. [8].

For the *C. reinhardtii* cells that have been previously acclimated to the LM media, the modeled and the experimental $EC_{20 Cd^{2+}}$ agree within 20% and are not significantly different based on the $IC_{95\%}$ intervals (Table SI.4) indicating that our BLM can accurately predict the onset of Cd^{2+} toxicity in this case. However, our BLM underestimates 23- and 6.4-fold Cd^{2+}

toxicity for the algae acclimated to the +Zn and HM media respectively (Table SI.4). There are two sources of uncertainty to explain the weaker agreement between the modeled and experimental $EC_{20\ Cd^{2+}}$ for the algae acclimated to the +Zn or HM media than in the LM media. First, there is some uncertainty about the extent of the Cd positive feedback at increasing $[Cd^{2+}]$ ($> 7 \times 10^{-9}$ M) since the $EC_{20\ Cd^{2+}}$ was higher for the +Zn and HM treatments than the LM treatment. Second, the $[Cd^{2+}]$ required to induce a 20% reduction in growth in the +Zn and HM media is near the saturation of the Cd-2 transport system. In this situation, a large change in the concentration of Cd^{2+} results in a small change in $[Cd]_{cell}$ and leads to a high uncertainty on the $EC_{20\ Cd^{2+}}$.

Environmental significance. Our Cd uptake/toxicity model represents an improvement to the current version of the BLM, which currently ignores the physiological effects of calcium and essential or non-essential trace elements. The modeling approach proposed in this paper not only allows us to better understand the link between Cd uptake and toxicity in a typical freshwater alga, but can be useful to refine the BLM. We have also demonstrated that the concentrations of essential trace elements (e.g. Zn and Co) may have a strong influence on Cd uptake and toxicity in *C. reinhardtii*. Wide variations in the concentrations of these elements in natural [24, 25] and human-impacted [26, 27] freshwaters are often observed and are likely to modulate Cd uptake and toxicity significantly.

Ongoing scientific work in metal ecotoxicology should be viewed as efforts which proceed to extend the applicability of the BLM to natural aquatic environments of increasing complexity.

As our level of understanding of metal-organism interactions in highly complex conditions (more representative of natural conditions than typical laboratory synthetic solutions) improves, physiologically-based refinements to BLM-type models will become more feasible. Depending of the universal applicability of such a mechanistic BLM to different species and different environments, the ambitious goal of a robust metal toxicity model could be attainable in the future.

Acknowledgement

We acknowledge the technical assistance provided by Lise Rancourt and Sébastien Duval. Jean-Christian Auclair provides valuable help for the statistical analyses. Helpful discussions with William G. Sunda were also very much appreciated. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery Grant Program as well as the NSERC *Metals in the Human Environment Strategic Network* (MITHE-SN). M. Lavoie held a scholarship from the *Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies* (FRQNT). C. Fortin and P.G.C. Campbell are supported by the Canada Research Chair Programme.

Supporting Information available

Additional text and three figures describing the composition of culture media; Metal binding parameters (K_{Me} and V_{max}) calculated in this study; The effects of Fe, Mn, Cu on short-term Cd uptake rates; The effect of uncertainties on essential elements-NTA equilibrium constants on Cd speciation. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org/>.

Literature cited

1. Campbell, P. G. C.; Errécalde, O.; Fortin, C.; Hiriart-Baer, V. P.; Vigneault, B. Metal bioavailability to phytoplankton - Applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol. C* **2002**, *133*, 189-206.
2. Di Toro, D. M.; Allen, H. E.; Bergman, H. L.; Meyer, J. S.; Paquin, P. R.; Santore, R. C. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20*, 2383-2396.
3. Paquin, P. R.; Gorsuch, J. W.; Apte, S.; Batley, G. E.; Bowles, K. C.; Campbell, P. G. C.; Delos, C. G.; Di Toro, D. M.; Dwyer, R. L.; Galvez, F.; Gensemer, R. W.; Goss, G. G.; Hogstrand, C.; Janssen, C. R.; McGeer, J. C.; Naddy, R. B.; Playle, R. C.; Santore, R. C.; Schneider, U.; Stubblefield, W. A.; Wood, C. M.; Wu, K. B. The biotic ligand model: A historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. C* **2002**, *133*, 3-35.
4. Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the Biotic Ligand Model. *Environ. Chem.* **2005**, *2*, 9-24.
5. Sunda, W. G.; Huntsman, S. A. Feedback interactions between zinc and phytoplankton in seawater. *Limnol. Oceanogr.* **1992**, *37*, 25-40.
6. Harrison, G. I.; Morel, F. M. M. Antagonism between cadmium and iron in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J. Phycol.* **1983**, *19*, 495-507.
7. 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.* **1998**, *32*, 2961-2968.
8. Lavoie, M.; Fortin, C.; Campbell, P. G. C. Influence of essential elements on cadmium uptake and toxicity in a unicellular green alga: the protective effect of trace zinc and cobalt concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31*, 1445-1452.
9. Lavoie, M.; Fortin, C.; Campbell, P. G. C. Extending the biotic ligand model to account for antagonistic interaction between cadmium and zinc in a freshwater alga. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, In press.
10. Paquin, P. R.; Di Toro, D. M.; Santore, R. C.; Trivedi, D.; Wu, K. B. *A biotic ligand model of the acute toxicity of metals. III. Application to fish and Daphnia exposure to silver*; EPA Science Advisory Board, Office of Research and Development: Washington, D.C., 1999; pp 3-102.

11. Mash, H. E.; Chin, Y.-P.; Sigg, L.; Hari, R.; Xue, H. Complexation of copper by zwitterionic aminosulfonic (Good) buffers. *Anal Chem* **2003**, *75*, 671-677.
12. Wehr, J. D.; Brown, L. M.; Vanderelst, I. E. Hydrogen ion buffering of culture media for algae from moderately acidic, oligotrophic waters. *J. Phycol.* **1986**, *22*, 88-94.
13. Simkiss, K.; Taylor, M. G. Trace element speciation at cell membranes: Aqueous, solid and lipid phase effects. *J. Environ. Monit.* **2001**, *3*, 15-21.
14. Vigneault, B.; Campbell, P. G. C. Uptake of cadmium by freshwater green algae: Effects of pH and aquatic humic substances. *J. Phycol.* **2005**, *41*, 55-61.
15. Jackson, G. A.; Morgan, J. J. Trace metal-chelator interactions and phytoplankton growth in seawater media: theoretical analysis and comparison with reported observations. *Limnol. Oceanogr.* **1978**, *23*, 268-282.
16. Schecher, W. D.; McAvoy, D. C. MINEQL+: A software environment for chemical equilibrium modeling. *Comput. Environ. Urban Syst.* **1992**, *16*, 65-76.
17. Martell, A. E.; Smith, R. M.; Motekaitis, R. J. NIST critical stability constants of metal complexes, version 8. National Institute of Standards and Technology. Gaithersburg, MD. In Gaithersburg, MD, 2004.
18. 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.* **1982**, *18*, 521-529.
19. Sunda, W. G.; Huntsman, S. A. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *Sci. Total Environ.* **1998**, *219*, 165-181.
20. François, L.; Fortin, C.; Campbell, P. G. C. pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: Implications for an algal BLM. *Aquat. Toxicol.* **2007**, *84*, 123-132.
21. Worms, I. A. M.; Wilkinson, K. J. Ni uptake by a green alga. 2. Validation of equilibrium models for competition effects. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 4264-4270.
22. Sunda, W. G.; Huntsman, S. A. Effect of Zn, Mn, and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: Implications for oceanic Cd cycling. *Limnol. Oceanogr.* **2000**, *45*, 1501-1516.
23. (Environnement Canada) *Guidance document on statistical methods for environmental toxicity tests*; EPS 1/RM/46; Method Development and Applications Section, Environmental technology Center: Ottawa, Ontario, 2005; p 280.

24. Fortin, C.; Couillard, Y.; Vigneault, B.; Campbell, P. G. C. Determination of free Cd, Cu and Zn concentrations in lake waters by in situ diffusion followed by column equilibration ion-exchange. *Aquat. Geochem.* **2010**, *16*, 151-172.
25. Mueller, K. K.; Lofts, S.; Fortin, C.; Campbell, P. G. C. Improving trace metal speciation predictions in natural aquatic systems: incorporation of dissolved organic matter (DOM) spectroscopic quality. *Environ. Chem.* **2012**, *9*, 356-368.
26. Töpperwien, S.; Xue, H.; Behra, R.; Sigg, L. Cadmium accumulation in *Scenedesmus vacuolatus* under freshwater conditions. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 5383-5388.
27. Lavoie, I.; Lavoie, M.; Fortin, C. A mine of information: Benthic algal communities as biomonitors of metal contamination from abandoned tailings. *Sci. Total Environ.* **2012**, *425*, 231-241.

Figure captions

Fig. 1: Panel A: Short-term Cd uptake rates (30 min) as a function of $[Cd^{2+}]$ in the presence of 2×10^{-5} M Ca^{2+} (full circles) or 10^{-3} M Ca^{2+} (open circles). The algae were previously acclimated to the LM culture medium. The solid and the long dashed lines represent least-square best fits of Cd uptake rates with eq.1 at 2×10^{-5} M and 10^{-3} M Ca^{2+} respectively. Predictions of V_{Cd} ($R^2 > 0.96$) were made using values of $K_{Cd-1}^{Ca} = 10^{4.02 \pm 0.14}$ M⁻¹ and $K_{Cd-2}^{Ca} = 10^{2.62 \pm 0.16}$ M⁻¹ from [9]. Panel B: Short-term Cd uptake rates at different $[Cd^{2+}]$ for algae previously acclimated to different culture medium (LM, +Co, +Co+Cd, HM) and exposed to Cd in media with the same essential trace metal concentrations as in the acclimation medium. The algae acclimated to the LM medium and exposed to the HM medium with different $[Cd^{2+}]$ are designated: "HM exposed; LM acclimated". The solid, dashed-dot, long dashed and short-short dashed lines represent least-square best fits of Cd uptake rates with eq.1 ($R^2 > 0.90$) for the treatments "LM", "+Co+Cd" and "HM" and "HM exposed; LM acclimated" respectively. The insert in panel B shows Cd uptake rates on a linear scale at low $[Cd^{2+}]$ ($< 6 \times 10^{-9}$ M).

Fig. 2: Panel A: Intracellular Cd concentration $[Cd_{cell}]$ measured after a 60-h exposure to various Cd^{2+} concentrations in the LM (full circles; data from [8]), the +Zn (open circles; data from [8]) or the HM (open triangles) medium. The dotted line, the short-dashed line and the solid line represented the predicted steady-state $[Cd_{cell}]$ (modeled with eq. 4) in the LM, +Zn or HM medium respectively (A). Panel B: Measured (black bars; data from [8]) intracellular Cd concentrations $[Cd_{cell}]$ after a 60-h exposure to 7×10^{-9} M Cd^{2+} and modeled $[Cd_{cell}]$ at

steady-state (white bars) in five different exposure media: LM, +Zn, +Co, +Ca or +Cu. The modeled $[Cd_{cell}]$ at steady-state take into account the Cd positive feedback mechanism in panel B but not in panel A. Error bars are \pm one standard error for the measured and modeled intracellular Cd concentrations.

Fig. 3: Cadmium dose-response curves in three different culture media: the LM (full circles), the +Zn (open circles) and the HM (open triangles) culture media. The toxicity endpoint is the relative cell volume yield v/v_0 , where v and v_0 are the total cell volume concentration of Cd-exposed and control cultures respectively at $t=60$ h. Toxicity is plotted as a function of the intracellular cadmium concentration ($[Cd_{cell}]$) accumulated by *C. reinhardtii*. The data for the LM and +Zn media are from [8]. Error bars are \pm one standard deviation ($n=3$).

Figure 1:

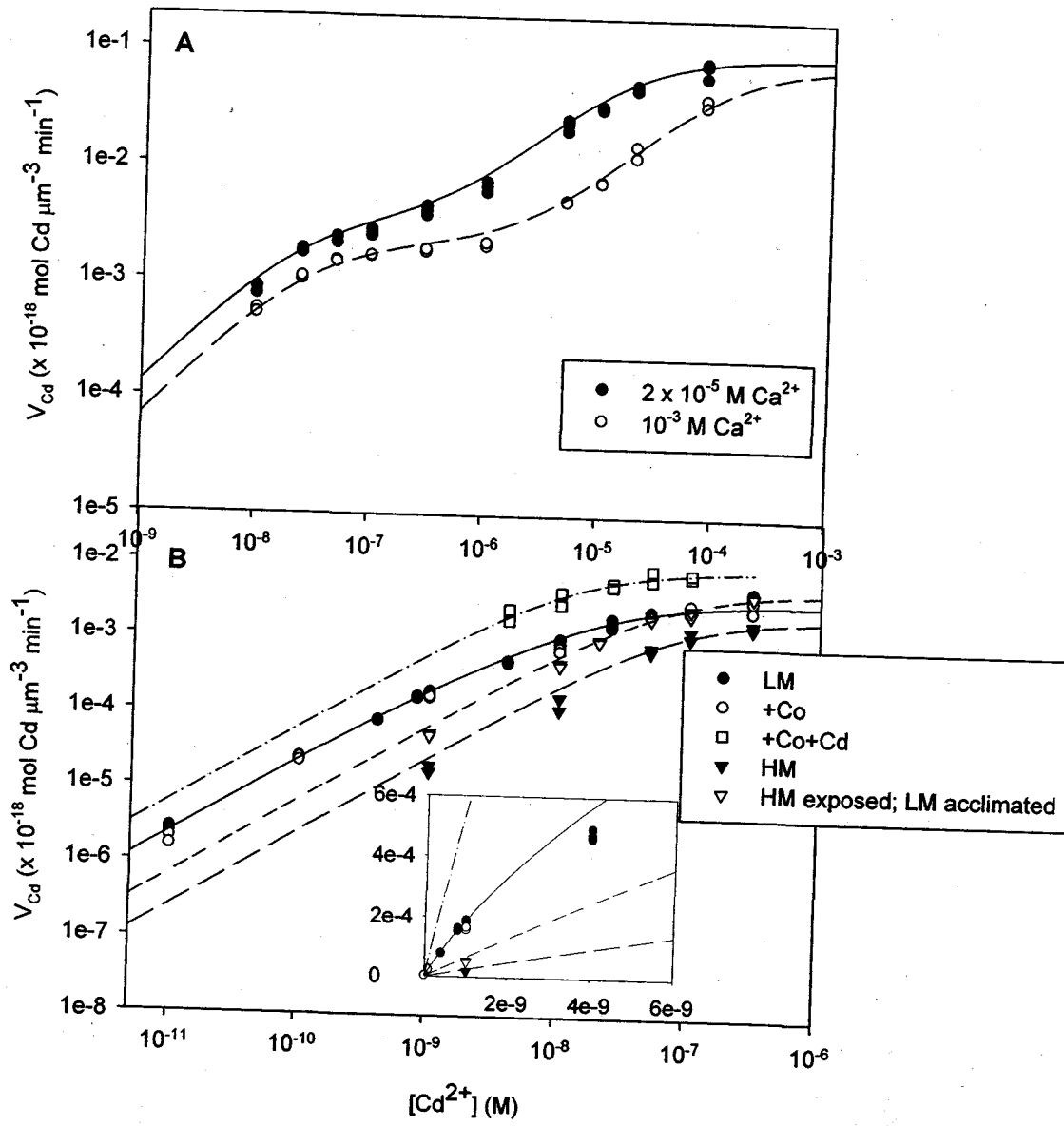


Figure 2:

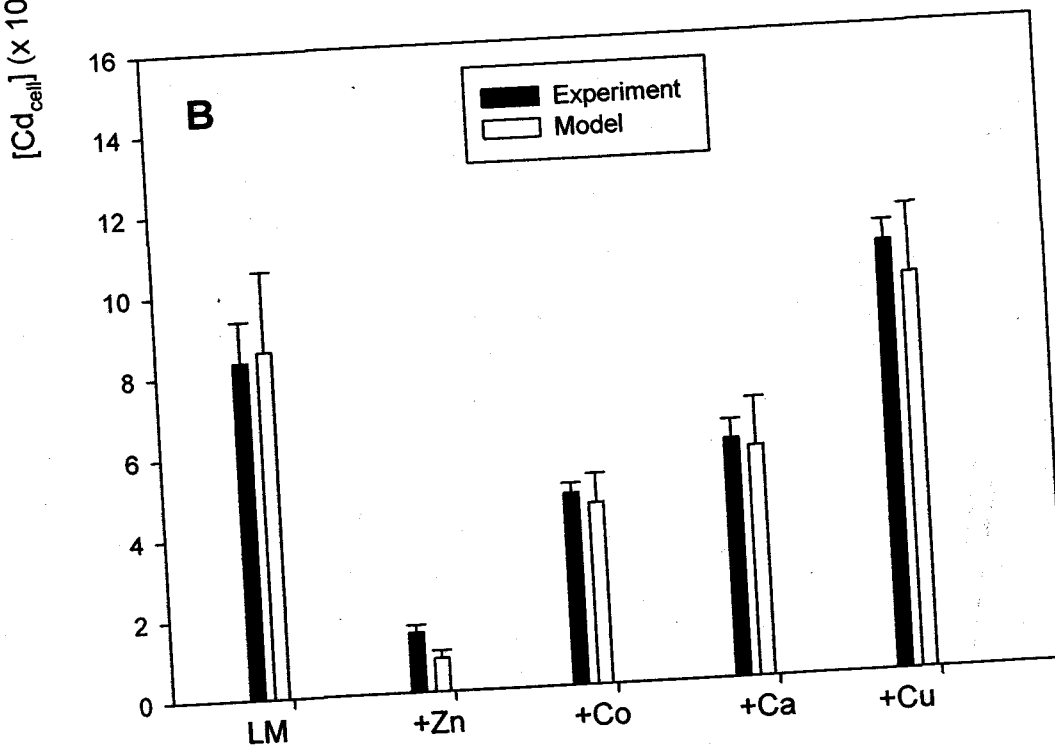
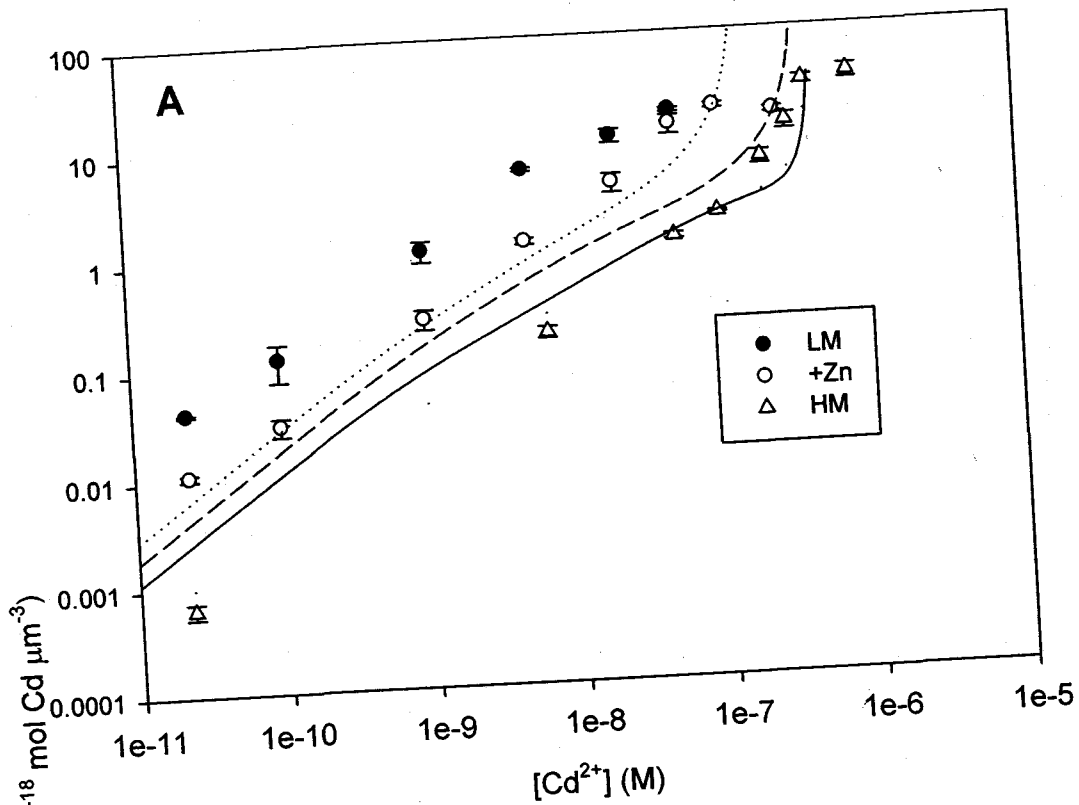
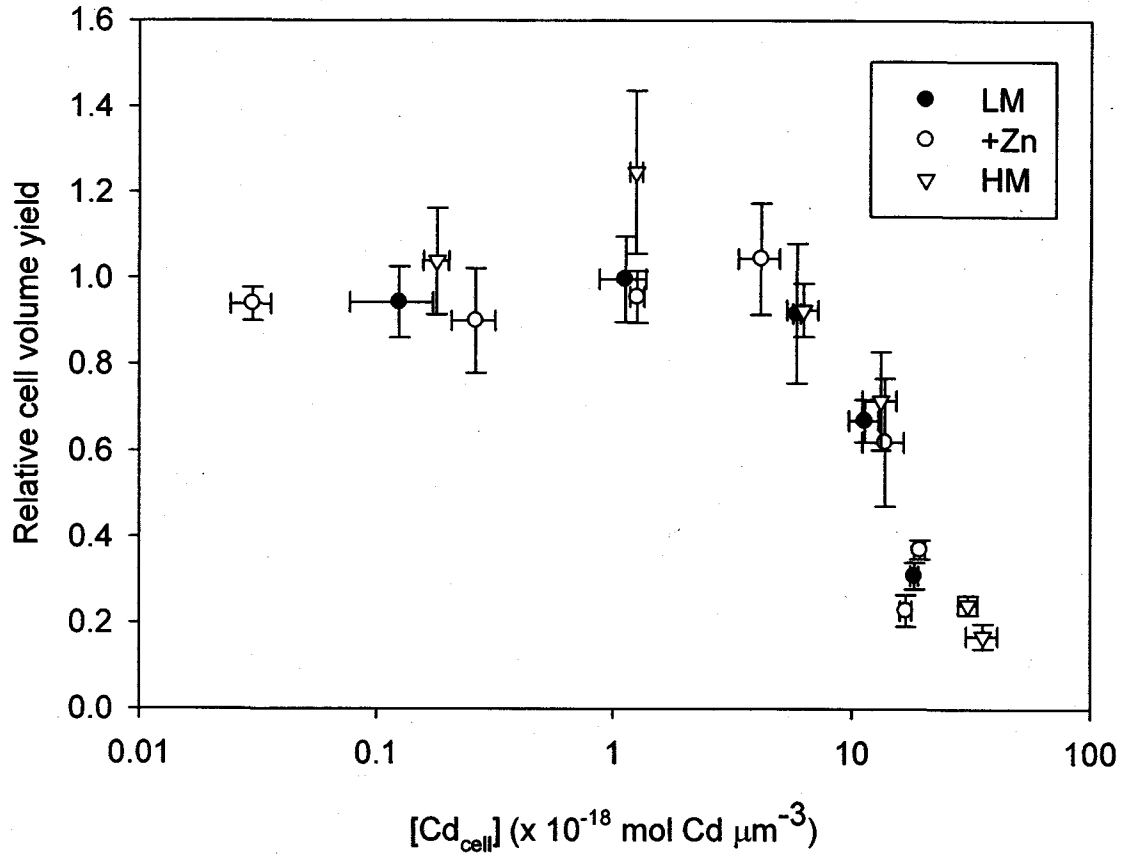
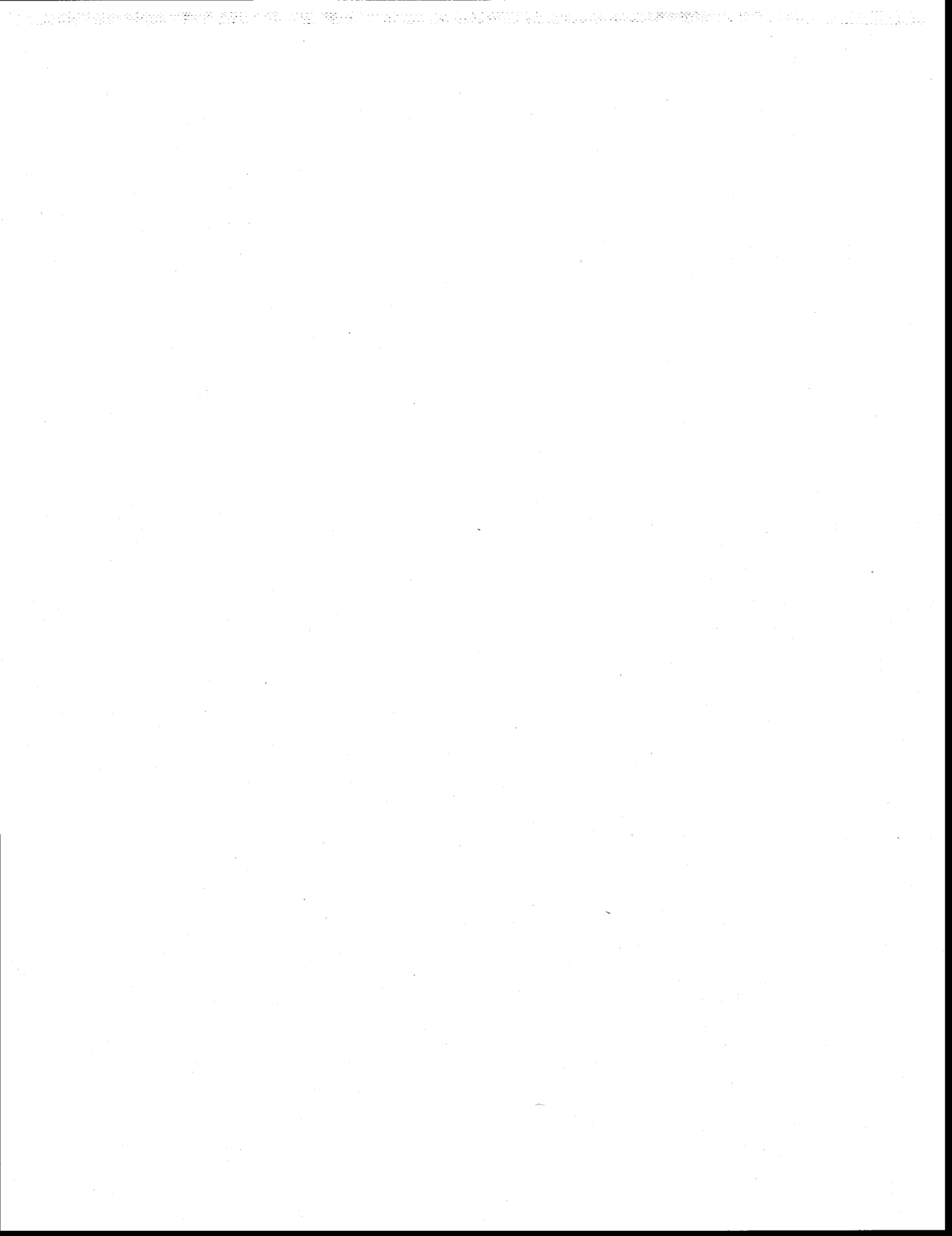


Figure 3:





SUPPORTING INFORMATION FOR

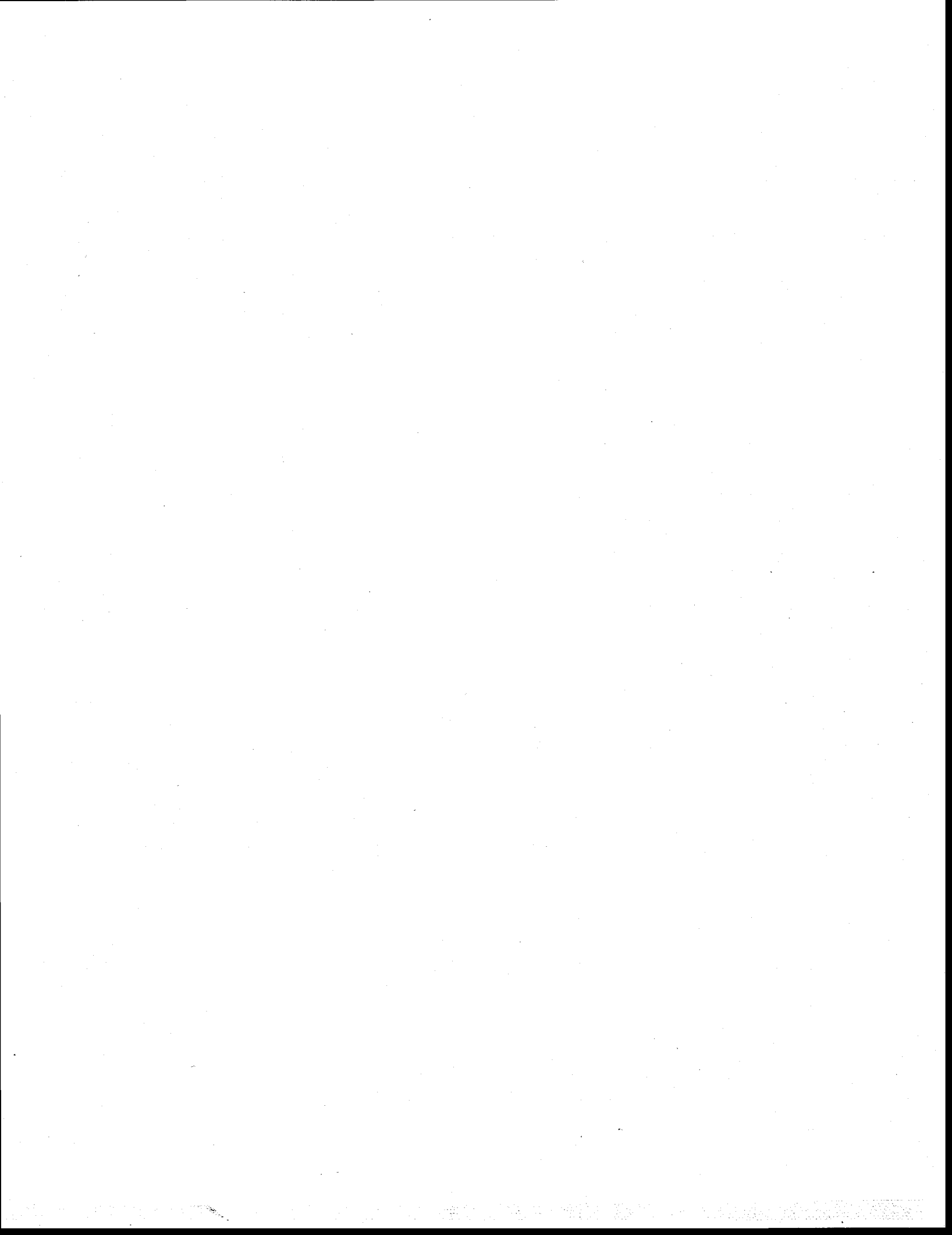
Predicting cadmium accumulation and toxicity in a green alga in the presence of
varying essential element concentrations using a biotic ligand model

M. Lavoie, P.G.C. Campbell and C. Fortin

Institut national de la recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement (INRS-ETE),

490 de la Couronne, Québec (Québec), Canada G1K 9A9

Four supplementary tables and two figures



1. Composition of culture and experimental media

Short-term cadmium uptake experiments were carried out in the LM or LM-R medium spiked with different Cd concentrations. We generally chose to use the NTA-buffered LM medium for experiments at relatively low $[Cd^{2+}]$ (i.e. $< 3 \times 10^{-7}$ M) encompassing the operating range of the Cd-2 and Cd-3 transport systems. However, for competitive binding experiments (i.e. competition between Co and Cd) as well as experiments at high $[Cd^{2+}]$ screening the high-capacity Cd-1 transport system (i.e. effect of Ca on Cd uptake), we used the unbuffered-LM medium to avoid overconsumption of ^{109}Cd radio-isotope. Note that the only exception was that we also used the LM-R medium at Cd concentrations relevant for the Cd-2 transport system (i.e. 3×10^{-7} M $< [Cd^{2+}] < 10^{-8}$ M) for the experiment evaluating the effect of Ca on short-term Cd uptake via the Cd-2 transport system.

Targeted total metal concentrations (Mn, Zn, Fe, Co, Cu) in LM media were validated ($\pm 10\%$) by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES). Total essential trace metal concentrations in the LM-R medium were below the ICP-AES detection limit ($[Cu] < 3 \times 10^{-9}$ M, $[Zn] < 6 \times 10^{-9}$ M, $[Co] < 4 \times 10^{-9}$ M, $[Mn] < 10^{-9}$ M, $[Fe] < 2.5 \times 10^{-8}$ M). Total Cd contamination in control (without added Cd) LM or LM-R media was below the detection limit at the ICP-AES ($< 2 \times 10^{-9}$ M Cd), such that free Cd^{2+} concentrations in the LM and LM-R media are expected to be below 10^{-12} M and 2×10^{-9} M Cd^{2+} respectively.

Table SI.1: Total molar concentrations of constituents of modified high salt media used for algal growth (LM) and rinse solution (LM-R) derived from the MHSM-1 medium [1, 2]. Carbonate concentration is self-adjusted by equilibrium with the atmosphere.

Compounds	MHSM-1	LM	LM-R
NH ₄	9.37×10^{-4}	9.37×10^{-4}	9.37×10^{-4}
Cl	5.98×10^{-6}	5×10^{-4}	5×10^{-4}
K	4.22×10^{-3}	4.72×10^{-3}	4.72×10^{-3}
PO ₄	1.37×10^{-4}	1.37×10^{-4}	1.37×10^{-4}
CO ₃	Atm	Atm	Atm
NO ₃	5.07×10^{-3}	1.6×10^{-2}	1.6×10^{-2}
SO ₄	8.12×10^{-5}	8.12×10^{-5}	8.12×10^{-5}
Mg	8.12×10^{-5}	8.12×10^{-5}	8.12×10^{-5}
Ca	6.80×10^{-5}	3.28×10^{-5}	3.28×10^{-5}
Na	1.02×10^{-4}	1.67×10^{-2}	1.67×10^{-2}
BO ₃	3.01×10^{-6}	3.01×10^{-6}	
Mn	2.10×10^{-6}	3.28×10^{-8}	
EDTA	8.06×10^{-7}		
NTA		1×10^{-4}	
Fe	5.92×10^{-7}	1.28×10^{-7}	
MoO ₄	3.00×10^{-8}	3.00×10^{-8}	
Zn	2.33×10^{-7}	8.61×10^{-8}	
Co	1.09×10^{-8}	6.79×10^{-8}	
Cu	7.04×10^{-8}	3.69×10^{-8}	
MOPS	1×10^{-2}	1×10^{-2}	1×10^{-2}

2. Testing the assumption of steady-state at 60 hours of growth

Integrating the differential equation expressing the rate of change in $[Cd_{cell}]$ over time (eq.3 of this paper) yields the eq. SI.1 below:

$$[Cd_{cell}] = \left(\frac{V_{Cd-i}}{\mu} \right) (1 - e^{-\mu t}) \quad (SI.1)$$

Since eq. 4 of this paper shows that $[Cd_{cell}]$ reaches a steady-state when $[Cd_{cell}] = \left(\frac{V_{Cd-i}}{\mu} \right)$, the equation SI.1 indicates that steady-state $[Cd_{cell}]$ is reached when $(1 - e^{-\mu t})$ tends toward 1 or when the time (t) asymptotically tends toward infinity. Hence, the time (t) needed to approximate steady-state $[Cd_{cell}]$, i.e. to reach a given fraction of steady-state $[Cd_{cell}]$ ($f_{steady-state}$) can be computed with the following eq. SI.2:

$$t = \frac{\text{Ln}(1 - f_{steady-state})}{-\mu} \quad (SI.2)$$

where $f_{steady-state}$ is the measured $[Cd_{cell}]$ after 60 hours of growth divided by the modeled steady-state $[Cd_{cell}]$ (calculated with eq.4). Therefore, for a specific growth rate near 1 day^{-1} for the algal cells exposed to the control LM, +Zn or HM medium (without added Cd), the measured $[Cd_{cell}]$ at 60 hours of growth should be only around 8% lower than the modeled expected steady-state $[Cd_{cell}]$. For a 50% inhibition of the total cell volume yield measured at 60 hours of growth (or a 27% inhibition of μ according to eq.5 of this paper), the measured $[Cd_{cell}]$ at 60 hours of growth should be only 16% of that predicted at steady-state with eq.4. For a high 73% inhibition of the total cell volume yield measured at 60 hours of growth (or a 50% inhibition of μ), the measured $[Cd_{cell}]$ at 60 hours of growth should be only 30% of that predicted at steady-state.

3. Metal binding parameters (K_{Cd} and V_{max}) calculated in this study

Table SI.2: Effect of Ca exposure on metal binding parameters (K_{Cd} and V_{max}) for the Cd-1 and Cd-2 pathways

Exposure Media	Cd-1 transport system		Cd-2 transport system	
	V_{max}	Log K	V_{max}	Log K
	$\text{mol Cd } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$ $\times 10^{-20}$	M^{-1}	$\text{mol Cd } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$ $\times 10^{-21}$	M^{-1}
LM	8.5 ± 0.4	4.87 ± 0.06	3.3 ± 0.2	7.60 ± 0.09
+Ca	7.8 ± 1.1	5.08 ± 0.12	2.1 ± 0.1	7.58 ± 0.06

Table SI.3: Effect of acclimation to trace metals on metal binding parameters (K_{Cd} and V_{max}) for the Cd-2 and Cd-3 pathways.

Acclimation Media	Cd-2 transport system		Cd-3 transport system	
	V_{max}	Log K	V_{max}	Log K
	$\text{mol Cd } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$ $\times 10^{-21}$	M^{-1}	$\text{mol Cd } \mu\text{m}^{-3} \text{ min}^{-1}$ $\times 10^{-21}$	M^{-1}
LM	3.2 ± 0.1	7.63 ± 0.08	0.15 ± 0.02	8.84 ± 0.07
+Co	3.1 ± 0.2	7.71 ± 0.15	0.14 ± 0.01	8.81 ± 0.08
+Co+Cd	8.6 ± 0.7	7.86 ± 0.12		
HM	2.1 ± 0.02	7.08 ± 0.13		
LM-HM _{exp} *	3.9 ± 0.05	7.23 ± 0.14		

*Algal cells have been acclimated to the LM medium but exposed to the HM medium

4. Effect of Fe, Mn and Cu on short-term Cd uptake rates

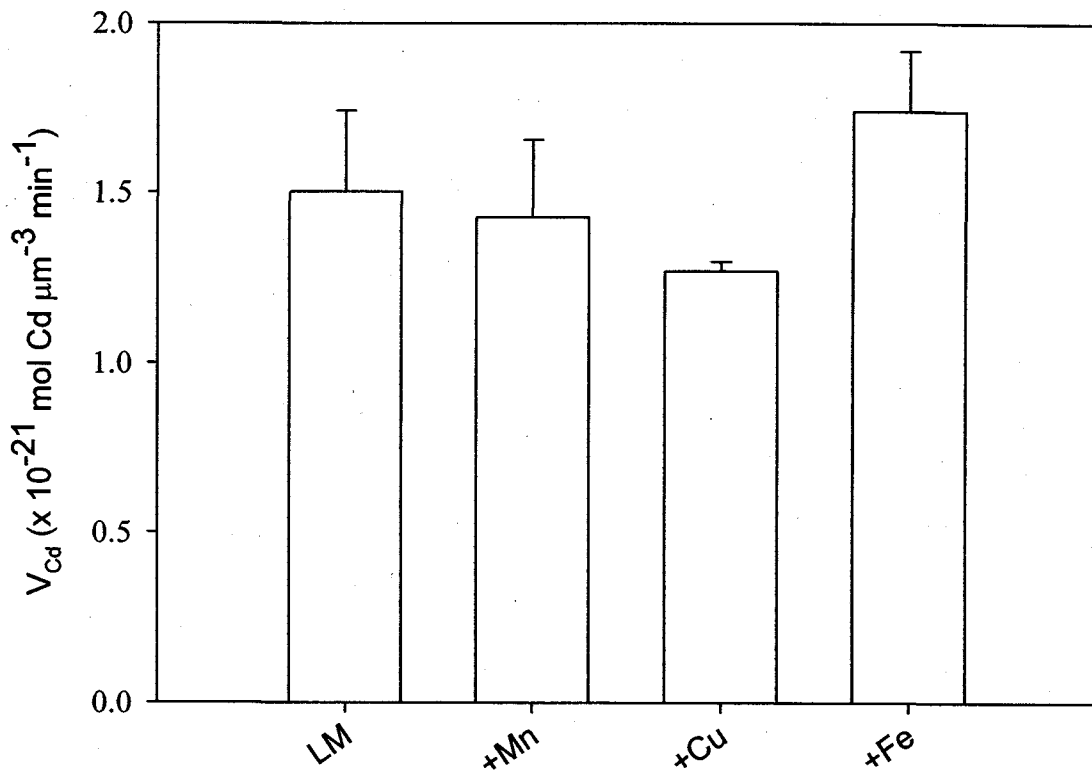


Fig. SI.1: Short-term Cd uptake rates ($2 \times 10^{-8} \text{ M Cd}^{2+}$) in the complete NTA-buffered LM medium, the LM supplemented with Fe ($10^{-17} \text{ M Fe}^{3+}$: +Fe), Mn ($10^{-6} \text{ M Mn}^{2+}$: +Mn) or Cu ($10^{-13} \text{ M Cu}^{2+}$: +Cu). Error bars represent \pm one standard deviation (n=2).

5. Cobalt competition for cadmium binding to the Cd-2 transport site

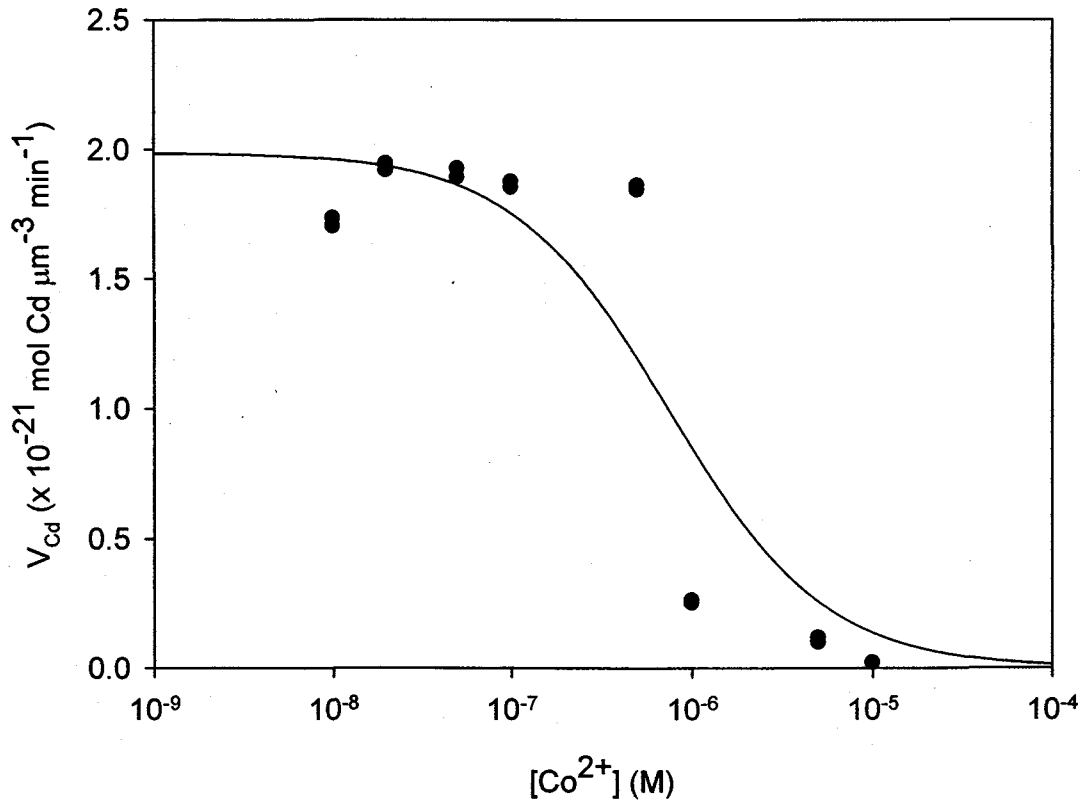


Fig. SL2: Short-term Cd uptake rates in the presence of 2×10^{-8} M Cd^{2+} as a function of Co^{2+} concentrations in the absence of other trace metals or NTA. The solid line is a best fit of the eq. 2 ($R^2 = 0.84$) taking into account $K_{\text{Cd-2}}^{\text{Cd}} = 10^{7.60 \pm 0.09}$. Calcium/magnesium competition with Cd was negligible and was thus not taken into account in the model fit. Note also that due to the very steep slope of the regression, no experimental data are available near the inflexion point of the regression. The competitive binding constant ($K_{\text{Cd-2}}^{\text{Co}} \approx 10^{6.38 \pm 0.20}$) derived with our model fit should thus be used with caution.

6. The effect of uncertainties on essential elements-NTA equilibrium constants on Cd speciation

We tested to what extent Cd speciation in NTA-buffered exposure media could be sensitive to large changes of several free micronutrient concentrations. We found that essential metal-NTA complexes stability constants in the MINEQL database would need to be highly erroneous to fully explain the observed decrease in Cd internalization rates for the algae acclimated to the trace metal-rich HM medium compared to those acclimated to the MHSM-LM medium (Figure 1b of the main paper). Indeed, based on MINEQL simulation, a 100-fold decrease (i.e. unrealistically high uncertainties) of Me-NTA equilibrium constants for Fe, Co, Zn, Cu and Mn would only lead to a 0.5% and 66% decrease in Cd uptake rates for $[Cd^{2+}]$ of 10^{-7} M and 10^{-9} M respectively, which is much less than the 2- and 10-fold measured decrease at 10^{-7} M and 10^{-9} M Cd^{2+} respectively (Figure 1b of the main paper; full triangles).

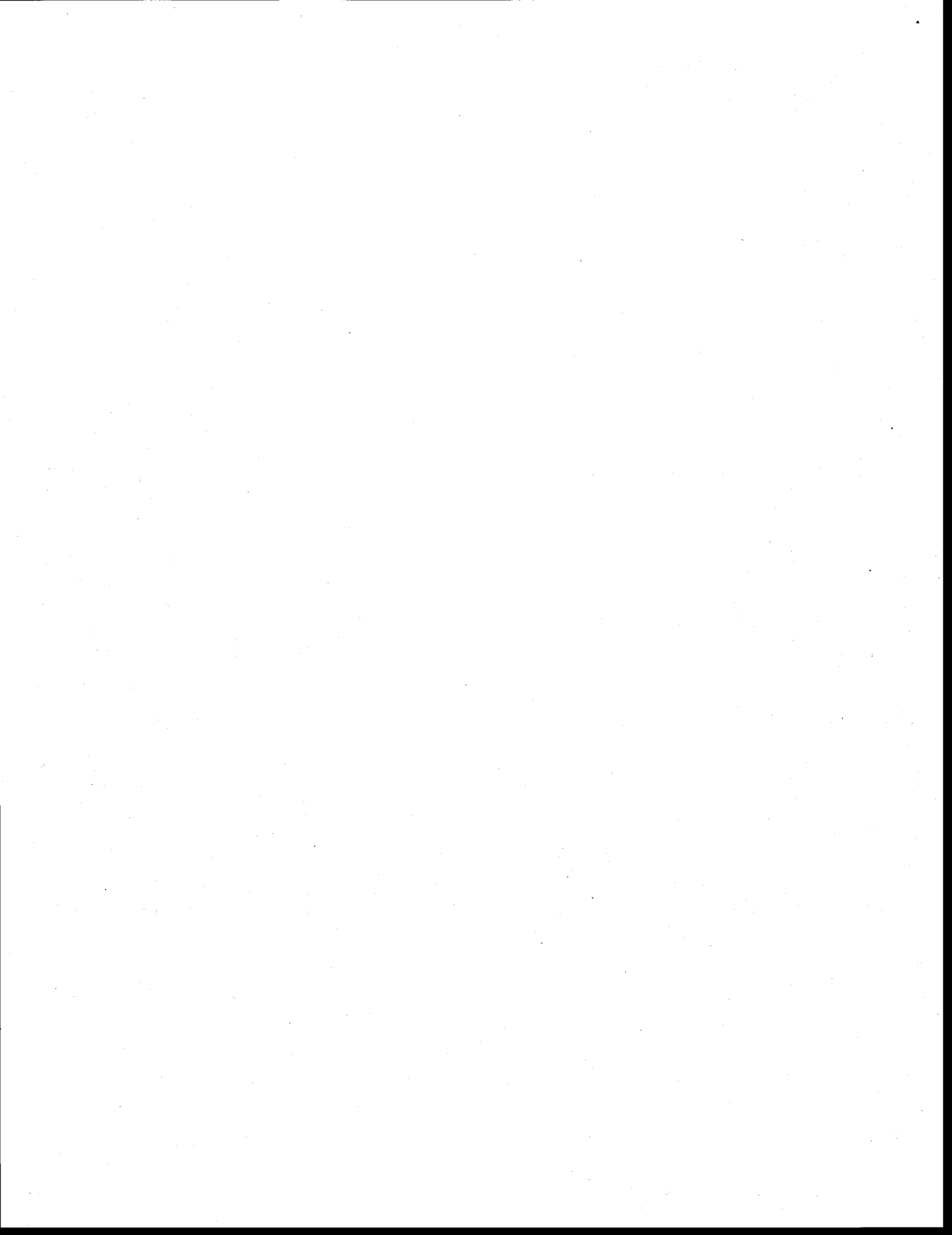
7. Modeling Cd²⁺ toxicity

Table SI.4 : Modeled and experimental EC₂₀ (M) (Mean ± IC_{95%}) for *Chlamydomonas reinhardtii* cultures acclimated to three different culture media (LM, +Zn, and HM).

Acclimation Media	Modeled EC ₂₀ Cd ₂₊ (M)		Experimental EC ₂₀ Cd ₂₊ (M)	
	Mean	IC _{95%}	Mean	IC _{95%}
LM	1.2×10^{-8}	$7.9 \times 10^{-9} - 1.6 \times 10^{-8}$	1.5×10^{-8}	$8.4 \times 10^{-9} - 2.4 \times 10^{-8}$
+Zn	7.6×10^{-7}	$1.5 \times 10^{-7} - 1.5 \times 10^{-6}$	3.3×10^{-8}	$1.6 \times 10^{-8} - 5.2 \times 10^{-8}$
HM	1.8×10^{-6}	$9.0 \times 10^{-7} - 2.9 \times 10^{-6}$	2.8×10^{-7}	$2.2 \times 10^{-7} - 3.2 \times 10^{-7}$

8. References

- [1] Lavoie M, Le Faucheur S, Fortin C, Campbell PGC. 2009. Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquat Toxicol* 92:65-75.
- [2] Lavoie M, Le Faucheur S, Fortin C, Campbell PGC. 2011. Erratum to "Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules" [*Aquat. Toxicol.* 92 (2009) 65-75] (DOI:10.1016/j.aquatox.2008.12.007). *Aquat Toxicol.*



10. ANNEXE A

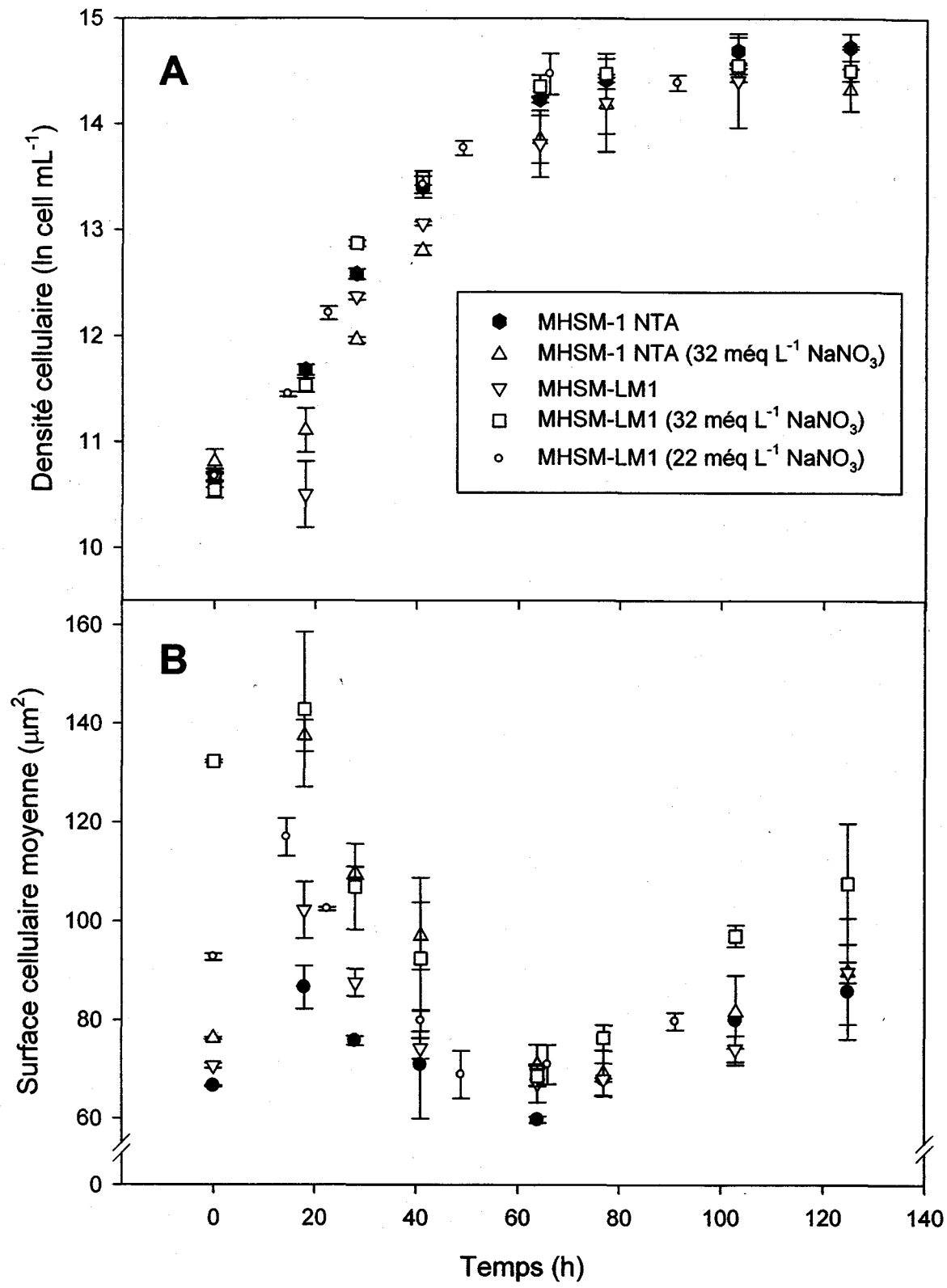
Optimisation des milieux de culture pour soutenir la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* à haute force ionique et à faibles concentrations de métaux traces

La capacité de *C. reinhardtii* à croître dans un milieu de culture caractérisé par de faibles concentrations de micronutriments et une force ionique relativement élevée fut testée. Pour ce faire, nous avons suivi la croissance de cette espèce à l'intérieur de milieux de différentes forces ioniques (de 9,0 à 32 meq L⁻¹) et concentrations de métaux traces. Plus précisément, la croissance des cultures de *C. reinhardtii* en termes de densité cellulaire et de surface totale cellulaire a été mesurée pendant environ 5 à 6 jours chez des algues acclimatées au milieu respectif (croissance pendant plus de quatre générations) (Figure A1) ou acclimatées au milieu MHSM-1 (croissance pendant plus de 15 générations) (Figure A2).

Huit milieux différents furent utilisés pour nos tests de croissance. Trois milieux de base (présentés au tableau A1) furent utilisés : les milieux MHSM-1 NTA, MHSM-1 EDTA et MHSM-LM1. Ces milieux de culture ont des forces ioniques similaires mentionnés au tableau A1. Le milieu MHSM-1 EDTA est en fait le milieu traditionnel MHSM-1 utilisé dans un bon nombre d'études du groupe de recherche de Claude Fortin et Peter Campbell. Le milieu MHSM-1 NTA est un milieu comportant des concentrations de métaux traces libres essentiels similaires au milieu MHSM-1 EDTA, mais où le ligand contrôlant la spéciation de ces métaux est le NTA au lieu de l'EDTA. Enfin, le milieu MHSM-LM1 est un milieu de culture comportant de faibles concentrations de métaux libres essentiels (comparativement aux deux autres milieux précédents) contrôlés avec le NTA. Les tests de croissance dans un milieu pauvre en métaux traces (MHSM-LM1) ont permis de vérifier si les cellules pouvaient bien croître et se diviser dans un tel milieu. La force ionique de l'ensemble de ces trois milieux de base fut aussi augmentée à 22 ou 32 meq L⁻¹ avec du NaNO₃ ou du KCl afin de définir la force ionique supérieure (et donc la [Ca²⁺] future pour nos expériences à ne pas dépasser) à partir de laquelle la croissance des algues commencent à être affectée.

Tableau A1 : Composition chimique des différents milieux de culture utilisés pour la croissance de *C. reinhardtii*. La concentration de carbonate s'ajuste par équilibre gazeux avec l'atmosphère. Le pH des milieux de culture était maintenu à 7,0 avec 10 mM de tampon MOPS (acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique). La force ionique des milieux MHSM-1 NTA, MHSM-1 EDTA et MHSM-LM1 était respectivement de 9,0, 10,3 et 10,3 méq L⁻¹. « N.A. » veut dire non applicable.

	MHSM-1 NTA		MHSM-1 EDTA		MHSM-LM1	
	[Totales]	[Libres]	[Totales]	[Libres]	[Totales]	[Libres]
	M	M	M	M	M	M
B(OH) ₃	3.01E-06		3.01E-06		3.01E-06	
Cl ⁻	9.84E-05		5.98E-06		1.00E-04	
Co ²⁺	3.88E-06	1.00E-09	1.09E-08	1.89E-09	8.77E-08	1.00E-11
Cu ²⁺	2.11E-08	1.00E-14	2.69E-10	2.40E-13	4.76E-08	1.00E-14
Fe ³⁺	8.94E-08	1.00E-19	5.92E-07	9.30E-19	2.03E-07	1.00E-19
K ⁺	4.22E-03		4.22E-03		4.32E-03	
Mg ²⁺	8.11E-05		8.12E-05		8.11E-05	
Mn ²⁺	4.24E-06	1.00E-06	2.10E-06	1.85E-06	4.09E-08	5.00E-09
MoO ₄ ²⁻	3.00E-08		3.00E-08		3.00E-08	
Na ⁺	5.67E-03		2.99E-03		5.67E-03	
NH ₄ ⁺	9.37E-04		9.37E-04		9.37E-04	
NO ₃ ⁻	4.99E-03		5.07E-03		5.01E-03	
PO ₄ ³⁻	1.37E-04		1.37E-04		1.37E-04	
SO ₄ ²⁻	8.11E-05		8.12E-05		8.11E-05	
Zn ²⁺	4.92E-05	1.00E-08	2.43E-07	5.64E-08	1.11E-07	1.00E-11
Ca ²⁺	2.57E-05		6.80E-05		3.36E-05	1.87E-05
NTA ³⁻	1.00E-04	2.64E-08	N. A.	N. A.	1.00E-04	2.64E-08
EDTA ⁴⁻	N. A.	N. A.	8.06E-07	1.01E-16	N.A.	N. A.



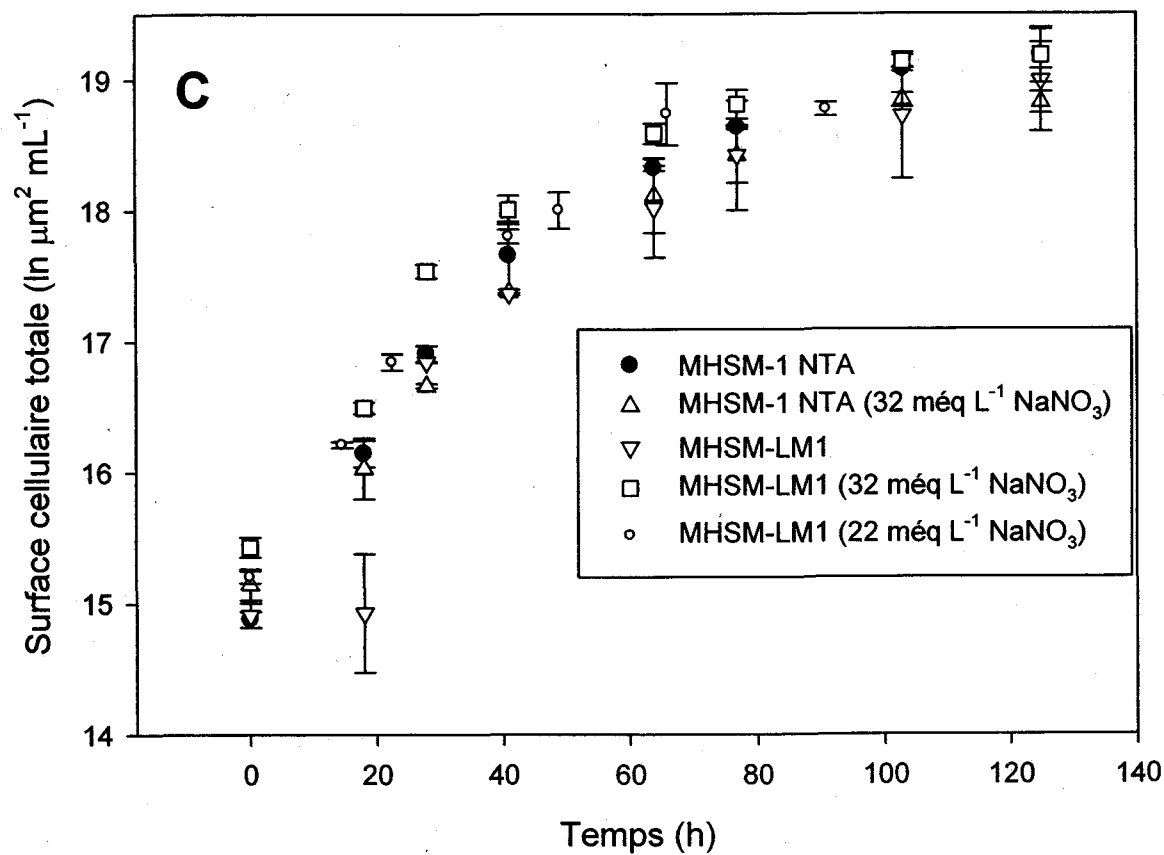
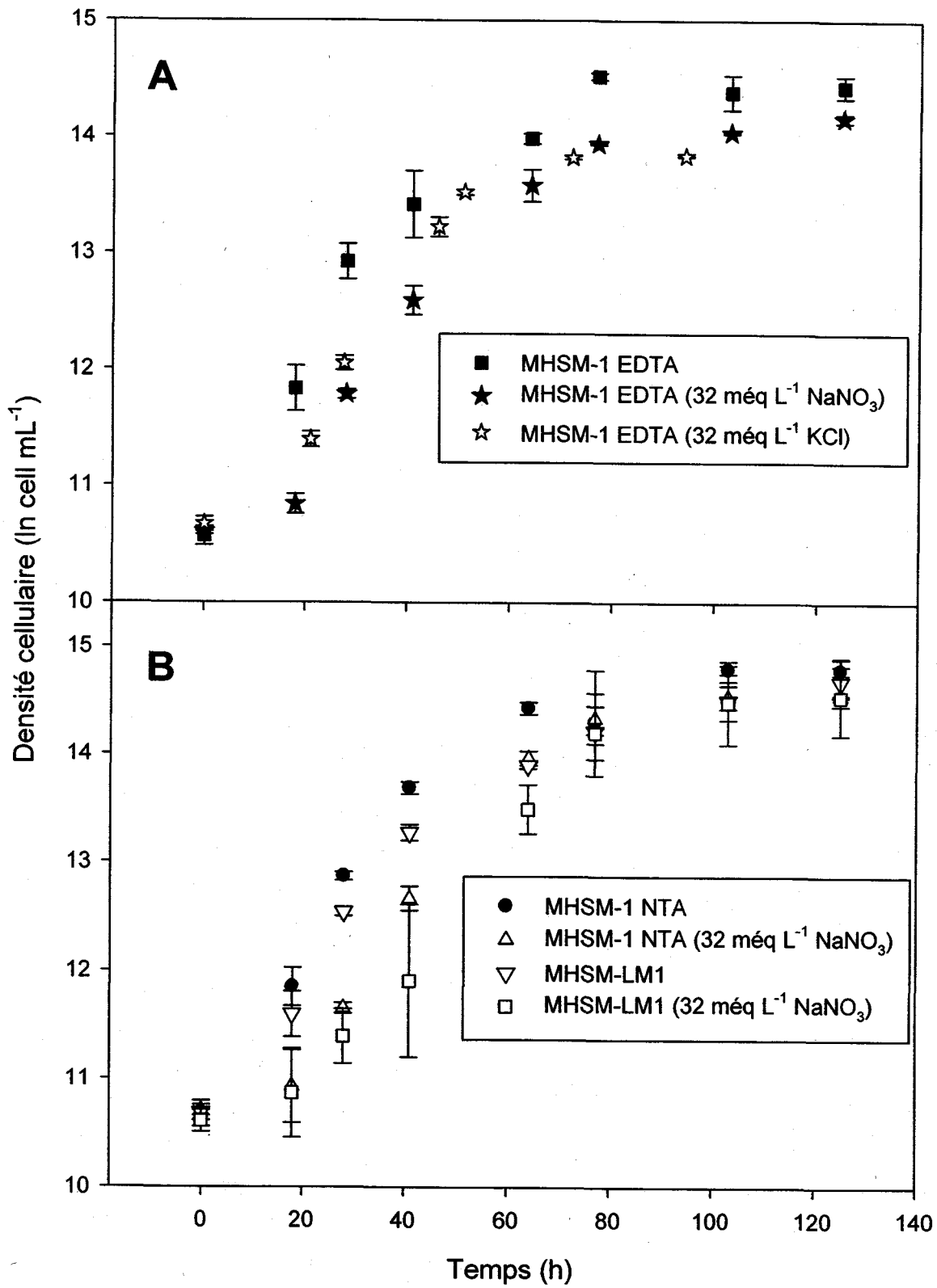
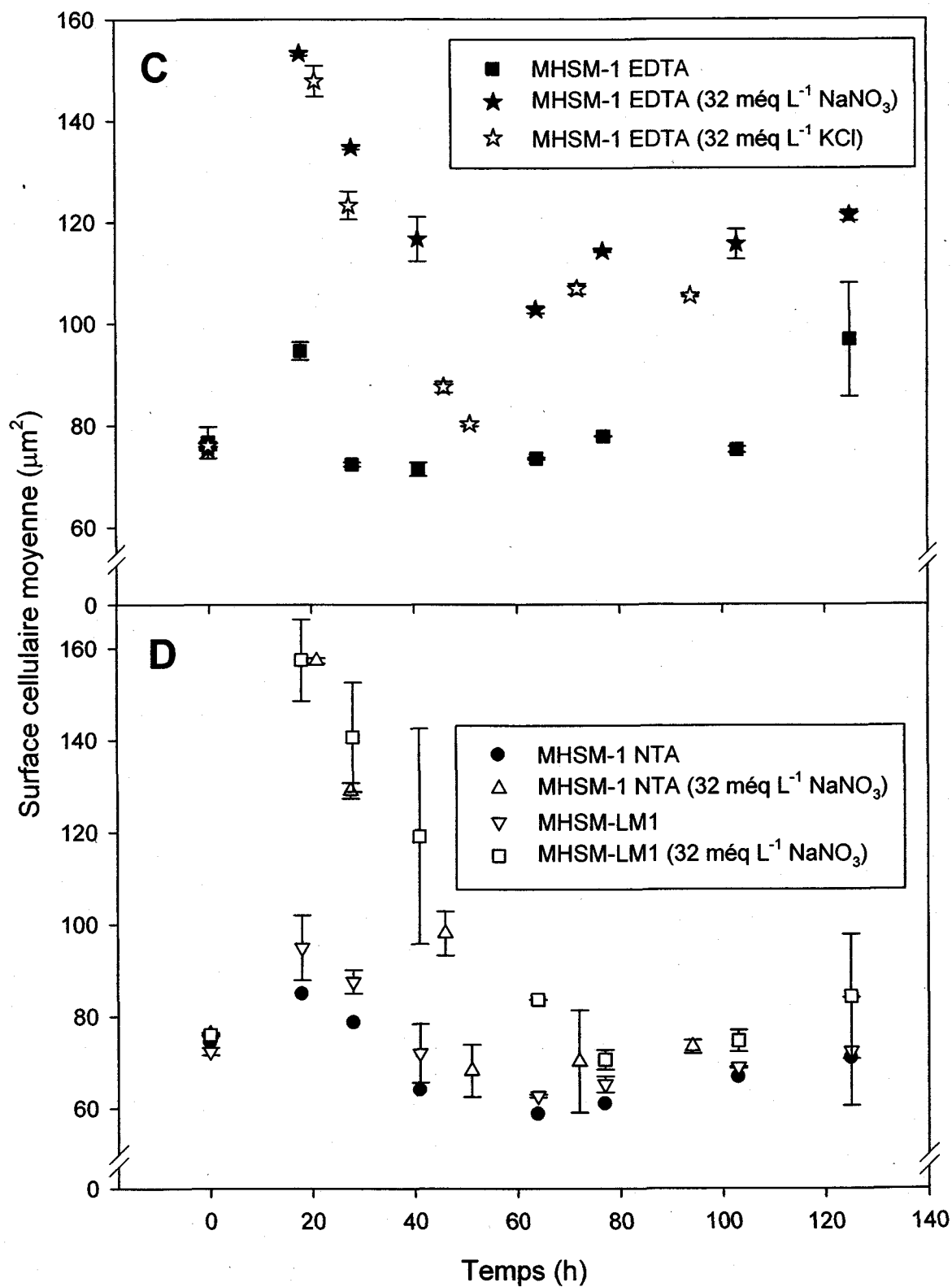


Figure A1 : Densité cellulaire (ln cellules mL^{-1}) (A), surface cellulaire moyenne (μm^2 cellule⁻¹) (B) et surface totale cellulaire (ln $\mu\text{m}^2 \text{mL}^{-1}$) (C) en fonction du temps (h) de croissance chez l'algue *C. reinhardtii* acclimatée aux milieux respectifs pendant plus de quatre générations. La densité initiale était d'environ 40 000 cellules mL^{-1} .





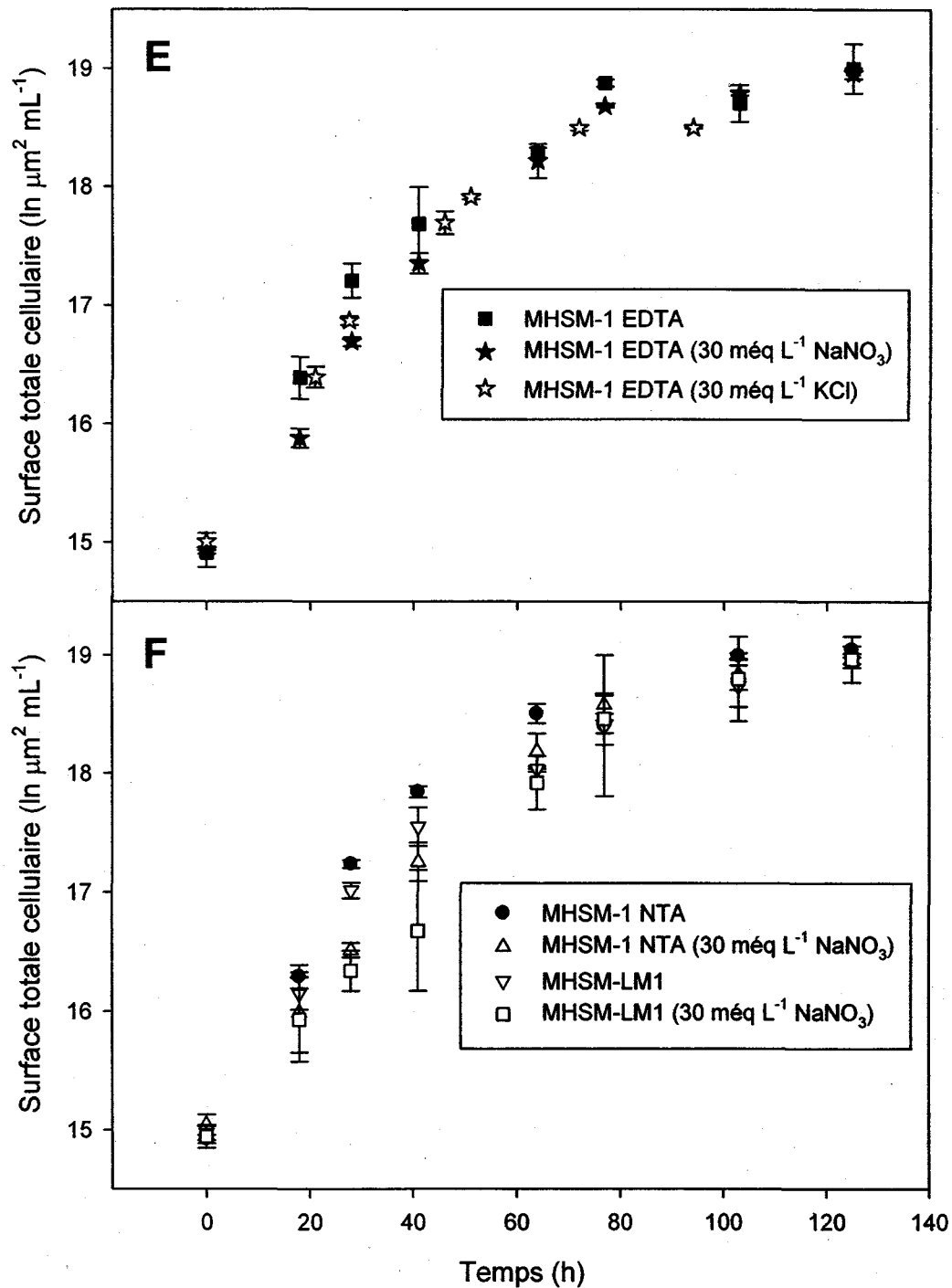


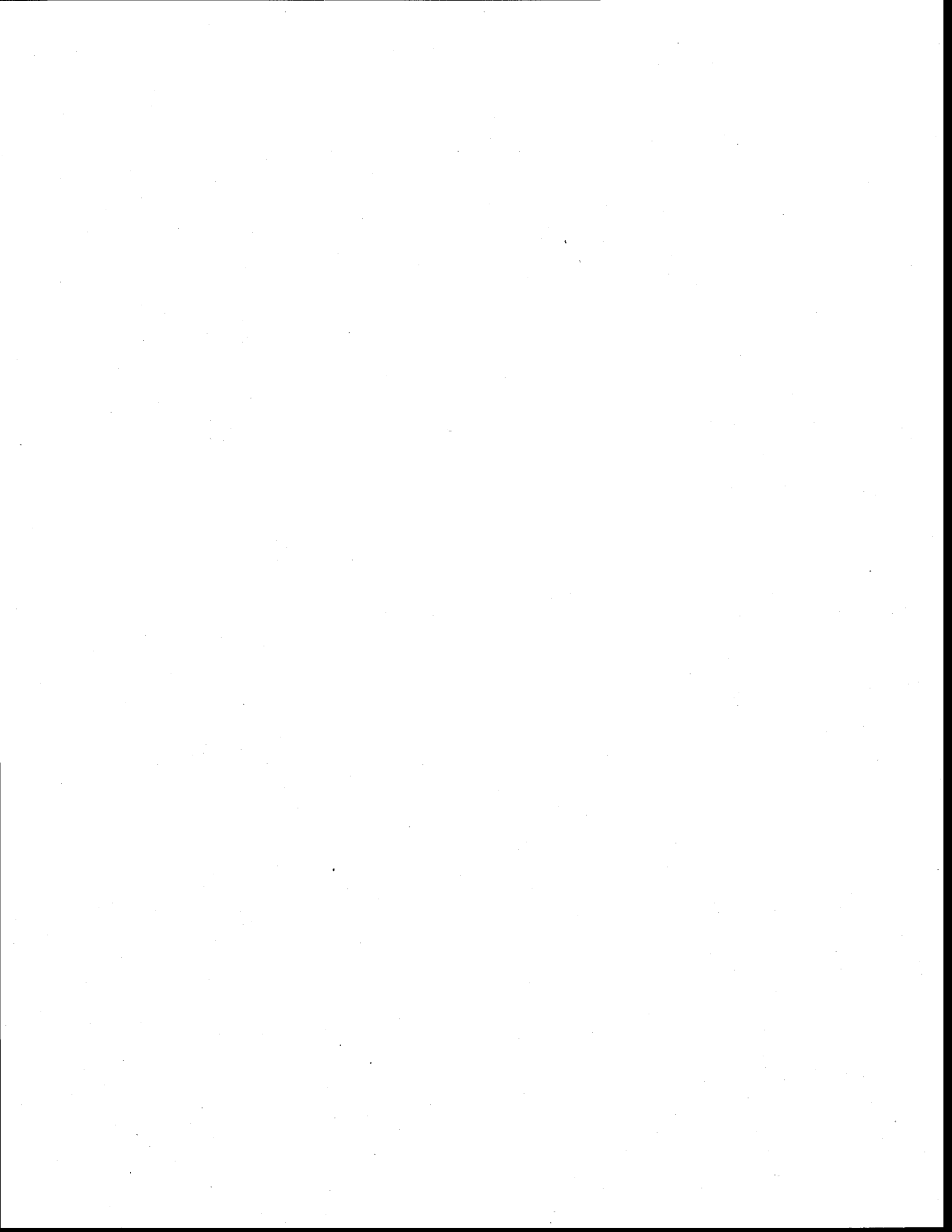
Figure A2 : Densité cellulaire (ln cellules mL^{-1}) (A, B), surface cellulaire moyenne (μm^2 cellule $^{-1}$) (C, D) et surface totale cellulaire (ln $\mu\text{m}^2 \text{mL}^{-1}$) (E, F) en fonction du temps (h) de croissance chez l'algue *C. reinhardtii* acclimatée dans un milieu de culture MHSM-1 EDTA pendant plus de 15 générations. La densité initiale était d'environ 40 000 cellules mL^{-1} .

La croissance cellulaire de *C. reinhardtii* (en termes de surface totale cellulaire mL^{-1}) ne semblait être que peu affectée lors du cycle de croissance à l'intérieur des différents milieux de culture testés. Les mesures cellulaires effectuées semblaient toutefois plus variables pour les algues qui n'avaient pas été acclimatées à leur milieu de culture respectif. Il est aussi important de souligner que l'augmentation de la force ionique du milieu et/ou la diminution de la concentration de micronutriments cationiques diminuait la capacité des cellules de se diviser (diminution de la densité cellulaire et augmentation de la surface cellulaire moyenne) au début de la phase exponentielle jusqu'à environ la moitié de la phase exponentielle. Les problèmes de division cellulaire ainsi que les petites agrégations d'algues (3-4 cellules agrégées au maximum; observations microscopiques non présentées) semblaient se résorber de la moitié à la fin de la phase exponentielle même si quelques cellules restantes à la fin de la phase exponentielle semblent contenir encore deux cellules filles à l'intérieur de leur membrane pour les expositions à la plus haute force ionique (32 méq L^{-1}). Ce problème de division cellulaire avait pour effet de créer deux populations d'algues de diamètre moyen différent même après 48 h de croissance. Ce désordre métabolique en réponse à une augmentation de la force ionique du milieu était semblable lorsque des sels de NaNO_3 ou de KCl étaient utilisés, suggérant que la présence de nitrate en grand excès dans le milieu de culture n'était pas la cause du problème de division cellulaire.

Il demeure que le milieu de culture à une force ionique de 22 méq L^{-1} avec peu de micronutriments était le meilleur compromis pour la réalisation de nos expériences de toxicité du Cd à long terme avec *C. reinhardtii*. En effet, les algues possédaient un diamètre moyen après 48 h qui n'était que légèrement plus élevé que celui des algues ayant poussé dans le milieu de culture (MHSM-1) et le problème des deux populations d'algues au diamètre différent était quasiment résolu. Ainsi, il est donc opportun d'envisager de récolter les cellules algales (ayant poussé dans le milieu MHSM-LM) après 60 h (3/4 de la phase exponentielle) de croissance par exemple afin de s'assurer de bien obtenir une population d'algues au diamètre plus uniforme. La récolte des cellules après 60 au lieu de 48 h permettraient de faciliter la reproductibilité des mesures prises lors de différentes expériences indépendantes. Il est aussi possible que l'ajout de Cd fasse en sorte d'exacerber ce problème de division cellulaire et il

devient donc primordial de bien s'assurer que l'ensemble des cellules ait une distribution de diamètre cellulaire homogène. De plus, une plus grande densité cellulaire d'algues sera disponible lors des expériences, ce qui augmentera la sensibilité des mesures de paramètres intracellulaires.

Le milieu MHSM-LM1 à 22 meq L⁻¹ (ajusté avec NaNO₃) fut donc choisi comme milieu de base pour entreprendre l'ensemble des expériences réalisées dans cette thèse. Par simplicité, ce milieu de culture fut baptisé le milieu « LM » tout au long de cette thèse.



11. ANNEXE B

Mesure des concentrations de fer dissoutes et totales dans les milieux de culture : Investigation de la formation de précipité de fer

Objectif :

Vérifier s'il y a précipitation significative du fer dans les milieux LM sur une période de quelques jours après ajout de fer sous forme de complexes avec le NTA ou encore de fer non complexé au NTA.

Méthode :

Plusieurs milieux de culture en duplicata furent réalisés avec différentes concentrations totales et libres de fer (voir tableau B1). Premièrement, le milieu de base LM fut réalisé (le pH fut ajusté à 7,0 avant d'ajouter une solution contenant le fer et les autres métaux essentiels complexés au NTA). Ce milieu LM était caractérisé par une concentration de fer nominale de 7,15 ppb ($1,28 \times 10^{-7}$ M) et d'une concentration nominale de NTA de 10^{-4} M, ce qui permettait de modéliser une $[\text{Fe}^{3+}]$ de 10^{-19} M. Un deuxième type de milieu fut préparé de la même façon que le milieu LM, mais une certaine quantité de fer (non complexé au NTA et provenant d'une solution étalon ICP acidifiée) fut ajoutée. Ce milieu, appelé LM1 + Fe, était composé d'une [Fe] nominale de 708 ppb ($1,27 \times 10^{-5}$ M) ($[\text{Fe}^{3+}] = 10^{-17}$ M en négligeant la possible présence de précipité) et la [NTA] nominale fut ajustée à $1,13 \times 10^{-4}$ M (avant l'ajout de fer) afin que les concentrations des autres oligoéléments demeurent stables. Un troisième milieu de culture (LM2 + FeNTA) avait une composition chimique théoriquement similaire au milieu LM1 + Fe sauf qu'ici, le fer fut ajouté au milieu à partir d'une solution contenant le fer et l'ensemble des

autres oligoéléments essentiels déjà complexés au NTA. Finalement, un quatrième milieu (LM3 + Fe) fut réalisé en ajoutant directement le fer provenant d'une solution étalon ICP acidifiée afin d'obtenir une [Fe] nominale de 7,09 ppm ($1,27 \times 10^{-4}$ M) et une $[Fe^{3+}]$ de 1×10^{-16} M (en négligeant la possible présence de précipité). Dans ce milieu, la [NTA] nominale fut aussi augmentée à $2,3 \times 10^{-4}$ M avant l'ajout de fer afin de stabiliser les concentrations des autres oligoéléments cationiques essentiels.

	[Fe] totale M	[Fe] libre M	[NTA] totale M	Méthode d'ajout du fer et NTA aux milieux
LM	$1,28 \times 10^{-7}$	1×10^{-19}	1×10^{-4}	Ajout solution (Fe et métaux complexés au NTA)
LM1+Fe	$1,27 \times 10^{-5}$	1×10^{-17}	$1,13 \times 10^{-4}$	Ajout de NTA et de fer séparément
LM2+FeNTA	$1,27 \times 10^{-5}$	1×10^{-17}	$1,13 \times 10^{-4}$	Ajout solution (Fe et métaux complexés au NTA)
LM3+Fe	$1,27 \times 10^{-4}$	1×10^{-16}	$2,3 \times 10^{-4}$	Ajout de NTA et de fer séparément

Tableau B1 : Concentrations de fer (totales et libres) et de NTA des quatre différents milieux utilisés. Les méthodes d'ajout du fer et du NTA sont aussi explicitées.

Les concentrations de fer dissous (filtré sur $0,2 \mu\text{m}$) et de fer total (non filtré) furent mesurées dans ces quatre types de milieu par ICP-AES après 24 h d'équilibre dans le noir et à température ambiante. D'autres mesures furent ensuite réalisées périodiquement au cours d'une période d'environ 2 semaines afin d'investiguer la cinétique de dissolution du fer.

Résultats et discussion

Pour l'ensemble des milieux, les concentrations totales de fer mesurées étaient similaires (<10% de différence) aux concentrations théoriques visées de fer total indiquant que les manipulations (pipetage, dilution des solutions) furent bien réalisées. En outre, l'erreur entre les [Fe] totales mesurées pour des duplicata (mesures indépendants) était relativement faible (< 4%) démontrant une relativement grande précision des analyses de fer par ICP-AES (Figures B1 et B2).

Les concentrations totales de fer (milieu non filtré) et dissoutes (milieu filtré) étaient similaires pour le milieu LM, et ce, pour l'ensemble de la période de mesure (soit de 24 à 384 h après la réalisation des milieux ; Fig. B1) suggérant l'absence de précipité de fer dans ce milieu (du moins de taille > 0,2 μm). De façon intéressante, pour le milieu enrichi en fer (LM1 + Fe), la concentration de fer après filtration était plus faible d'environ 7% comparativement à la concentration totale de fer mesurée avant filtration, mais seulement au début de la période de mesure ($t=24$ h), tandis que de 48 à 384 h, les [Fe] totales et dissoutes redevenaient similaires. Cependant, pour le milieu LM2 + FeNTA, caractérisé par une spéciation et une composition chimique *théorique* similaire au milieu LM1 + Fe, il n'y avait pas de différence entre les [Fe] totales et dissoutes pour l'ensemble de la période de mesure. Ces derniers résultats suggèrent que lors d'un ajout de fer non complexé au préalable par le NTA, il y aurait formation de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (solide) de façon transitoire avant l'atteinte de l'équilibre chimique et de la liaison prédominante du fer au NTA pour former les complexes FeOHNTA^{-1} . Inversement, lors de l'ajout de fer complexé au NTA au préalable, l'équilibre (liaison de Fe^{3+} et de FeOH^{2+} avec le NTA) serait atteinte plus rapidement et la formation de précipité $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (s) deviendrait négligeable (par rapport à la concentration totale de fer), du moins après 24 h d'attente. En fait, l'aquo-ion de fer ou $\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6$ est *déjà* entouré de molécules d'eau. Par conséquent, lors de l'ajout de fer non complexé au préalable au NTA (et aussi à pH 7), l'aquo-ion ferrique pourrait donc se complexer plus rapidement avec les ions hydroxydes (expulsion de protons du ligand H_2O de l'aquo-ion) qu'avec le NTA, étant situé plus loin de l'atome de fer ou de

FeOH. Cela aurait pour effet de favoriser la formation d'hydroxyde de fer peu soluble de façon transitoire. Il faut aussi souligner que lorsque le fer est complexé à un ligand autre que l'eau (ici le NTA), le taux de perte d'une molécule d'eau (k_w) est plus grand, ce qui augmente la cinétique des réactions entre le fer et le NTA et donc la vitesse à laquelle l'équilibre chimique sera atteinte dans le milieu.

Pour le milieu LM3 + Fe, on semble déceler un phénomène similaire (quoique plus prononcé) à celui observé avec le milieu LM1 + Fe (Fig. B2). En fait, la concentration de fer dissoute est inférieure d'environ 30% à la [Fe] totale après 24 h. La perte de fer lors de la filtration semble diminuée après 120 h (20-25 %). Après 384 h, les [Fe] totales et dissoutes redevenaient similaires. Ces derniers résultats suggèrent aussi que le fer non complexé au NTA peut précipiter de façon transitoire et que la quantité de précipité va tendre à diminuer avec le temps; lorsque la spéciation du fer est en route vers l'atteinte de l'équilibre chimique. En outre, la cinétique de dissolution du fer semble être considérablement plus lente pour le milieu LM3 + Fe (Fig. B2) que pour le milieu LM2 + FeNTA (Fig. 1). Cela pourrait peut-être s'expliquer par la plus grande quantité de précipité de fer dans le milieu LM3 + Fe.

Étant donné que les grandes quantités de fer (fer non complexé préalablement au NTA) ajoutées aux milieux LM1 + Fe et LM3 + Fe ont le potentiel d'augmenter drastiquement la [Fe'] ($[Fe'] = [Fe(OH)_n^{z+}] + [Fe^{3+}]$), du moins lors des premières heures après la réalisation du milieu (soit, avant que le NTA se complexé à une bonne partie du fer), il est possible que la $[Fe^{3+}]$ dépasse de beaucoup (initialement) celle dictée par la limite de solubilité à pH 7. Les $[Fe^{3+}]$ limites à partir desquelles il y a saturation par rapport à la phase solide de fer peuvent être déterminées à partir des produits de solubilité (K_s) disponibles dans certaines bases de données ainsi que dans MINEQL. Par exemple, la base de données du logiciel MINEQL ne tient compte que de la ferrihydrite ($Fe(OH)_3 (s)$) étant caractérisé par un produit de solubilité (K_s) de $10^{-38.8}$ (Smith et Martell 1976). Cependant, l'oxyhydroxyde de fer amorphe ($FeOOH (s)_{(amorphe)}$) a un produit de solubilité (K_s) légèrement plus élevé de $10^{-38.45}$ (Smith et Martell 1976). Les oxyhydroxydes de fer amorphe ($FeOOH (s)_{(amorphe)}$) pourraient ainsi contrôler la

solubilité du fer à l'instar des hydroxydes de fer ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) et il serait donc approprié de choisir le K_s de l'espèce $\text{FeOOH}_{(s)}$ (amorphe). Ce dernier type de précipité fut donc inclus dans MINEQL.

La $[\text{Fe}^{3+}]$ à pH 7 ($I=20$ mM dans les milieux de culture) à partir de laquelle il y a saturation du composé $\text{Fe}(\text{OH})_3_{(s)}$ n'est que de $5,61 \times 10^{-18}$ M d'après des simulations avec MINEQL tandis que la $[\text{Fe}^{3+}]$ limite, à partir de laquelle il y a précipitation de $\text{FeOOH}_{(s)}$ (amorphe), est de $1,26 \times 10^{-17}$ M. Théoriquement, il ne devrait donc pas y avoir de précipité de $\text{FeOOH}_{(s)}$ (amorphe) dans les milieux caractérisés par des $[\text{Fe}^{3+}]$ de 10^{-19} (LM) ou de 10^{-17} M (LM1 + Fe). Cependant, pour ce qui est du milieu LM3 + Fe ($[\text{Fe}^{3+}]$ modélisée en négligeant la précipitation = 10^{-16} M), un précipité de $\text{FeOOH}_{(s)}$ (amorphe), devrait se former en théorie. En effet, lorsque l'on tient compte de la précipitation de $\text{FeOOH}_{(s)}$ (amorphe), la $[\text{Fe}']$ modélisée à l'équilibre diminue d'environ un facteur 10 (elle passe de 84 nM à ≈ 12 nM). Cette perte de fer est cependant minime par rapport à la $[\text{Fe}]$ totale du milieu LM3 + Fe. Il en ressort donc qu'une aussi faible proportion de fer ayant précipité ne pourrait être détectée en mesurant les $[\text{Fe}]$ totales avant et après filtration dans notre milieu bien tamponné avec le NTA. Ainsi, il faut garder en tête que même si les concentrations dissoutes et totales de fer deviennent équivalentes vers la fin de la période d'échantillonnage (Fig. B1 et B2), cela ne veut pas nécessairement dire qu'il y a absence de précipité de fer dans les milieux de culture.

Il faut aussi considérer l'imprécision possible des constantes de stabilité du complexe prédominant (FeOHNTA^{-1}). Par exemple, des simulations avec MINEQL montrent qu'une sous-estimation d'un facteur 10 de la constante K_{FeOHNTA} (une augmentation d'un facteur 10) ferait en sorte de diminuer les $[\text{Fe}^{3+}]$ d'un facteur 10, ce qui aurait pour effet qu'aucun précipité ne se formerait. Inversement, une surestimation de cette constante K_{FeOHNTA} (une diminution de cette constante) augmenterait la quantité de précipité de fer formé.

Les résultats indiquent somme toute que la dissolution de précipités de fer est possible sur une relativement courte période de temps, mais que le temps nécessaire à la dissolution complète ou quasi-complète du fer peut varier en fonction de la quantité de fer (libre) ajoutée au milieu. Il semble donc qu'il est possible d'utiliser deux approches (ajout de fer complexé ou non au NTA) pour l'ajout de fer aux milieux de culture ou d'exposition, mais que la méthode traditionnelle (étant utilisée très souvent dans la littérature) consistant à ajouter le fer déjà complexé au NTA permet d'atteindre ou de tendre vers l'équilibre chimique plus rapidement. Les milieux de culture caractérisés par des plus fortes concentrations de fer seront donc réalisés dorénavant à partir de solutions stocks indépendantes contenant le NTA, le fer et l'ensemble des autres oligo-éléments essentiels.

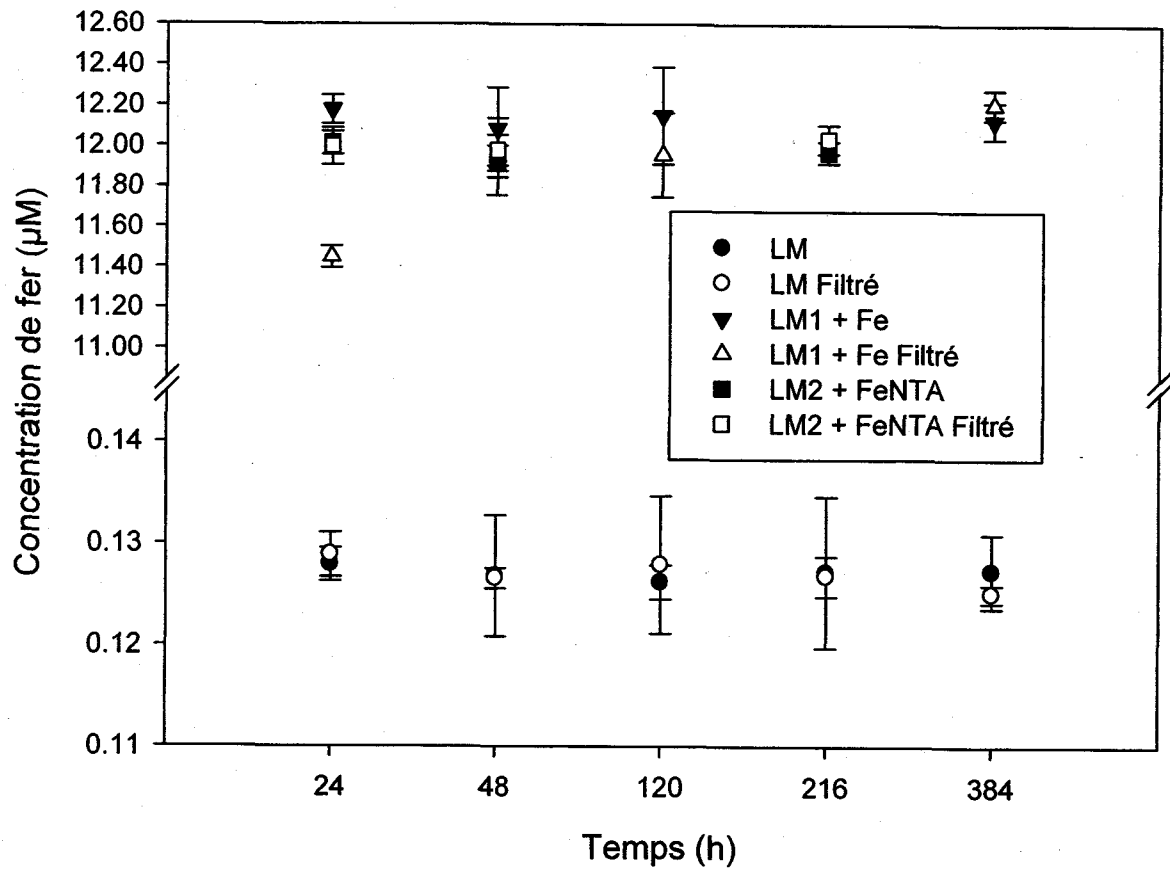


Figure B1 : Concentration de fer total (non filtré) et dissous (filtré sur 0,2 µm) (en µM) mesurée par ICP-AES dans les milieux LM, LM1 + Fe et LM2 + FeNTA en fonction du temps écoulé (en heures) après la préparation des milieux. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour deux échantillons indépendants.

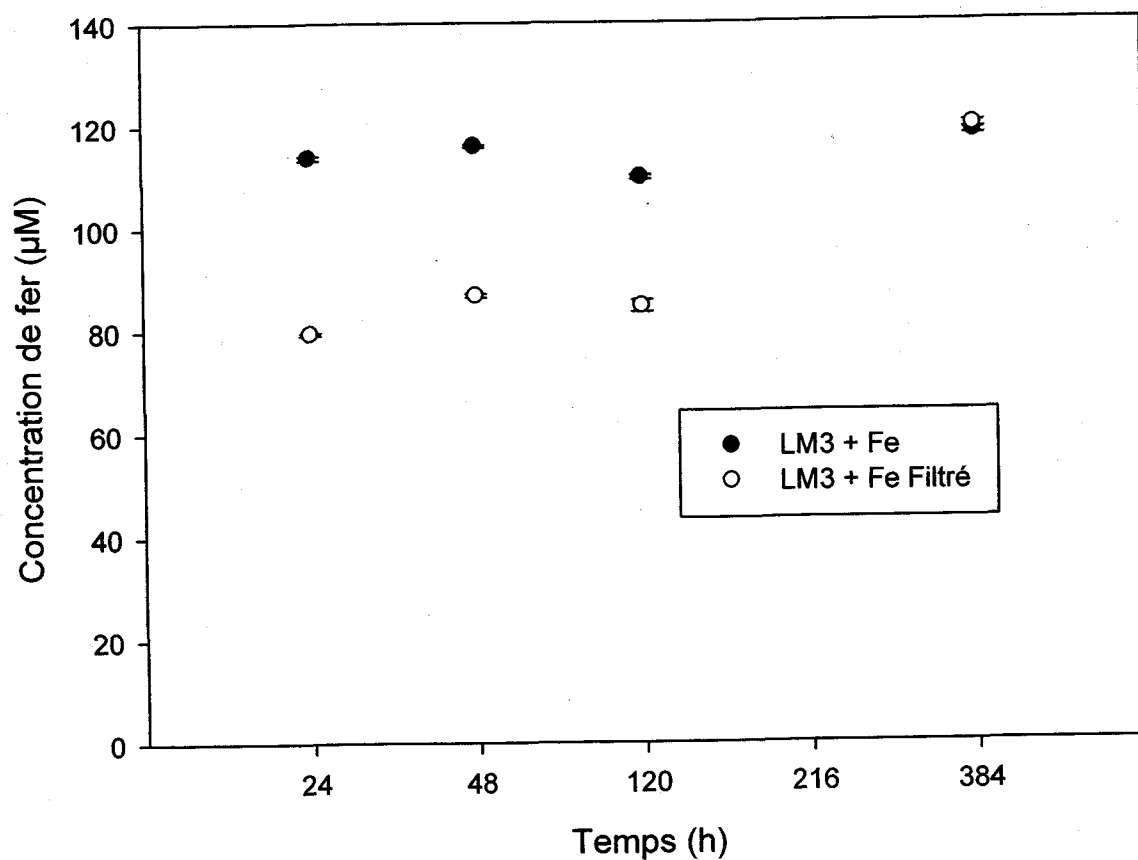


Figure B2 : Concentration de fer total (non filtré) et dissous (filtré sur 0,2 µm; noté « Filtré » sur le graphique) (en µM) mesurée par ICP-AES dans le milieu LM3 + Fe en fonction du temps écoulé (en heures) après la préparation du milieu. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour deux échantillons indépendants.

11. ANNEXE C

Cinétique d'accumulation du Cd chez *Chlamydomonas reinhardtii* lors d'exposition à court terme au Cd

Objectif :

Vérifier la linéarité de l'accumulation du Cd chez *C. reinhardtii* lors des premières minutes d'exposition au Cd.

Méthode :

Des cellules de *C. reinhardtii* acclimatées aux milieux LM et +Zn (pendant plus de trois générations) furent récoltées par filtration douce. Les algues acclimatées aux milieux LM et +Zn furent rapidement resuspendues dans des milieux d'expositions (n=3 pour une acclimatation au milieu LM ou +Zn) contenant 7 nM Cd²⁺ ([NTA] totale de 10⁻⁵ M, en absence de métaux traces compétiteurs et incluant l'ensemble des autres éléments aux concentrations prescrites dans les milieux LM ou +Zn). Le ¹⁰⁹Cd fut utilisé comme traceur radioactif. Les densités cellulaires initiales étaient d'environ 40 000 cellules mL⁻¹. Après 15, 30, 60 et 120 minutes, des échantillons de 10 mL de culture étaient pipetés et filtrés sur deux membranes en polycarbonate de 2 µm placées l'une sur l'autre. Les filtres étaient rincés avec une solution d'EDTA 10⁻⁴ M pendant 10 minutes pour ensuite être analysés au compteur gamma. Les concentrations intracellulaires de Cd furent finalement déterminées.

Résultats et discussion :

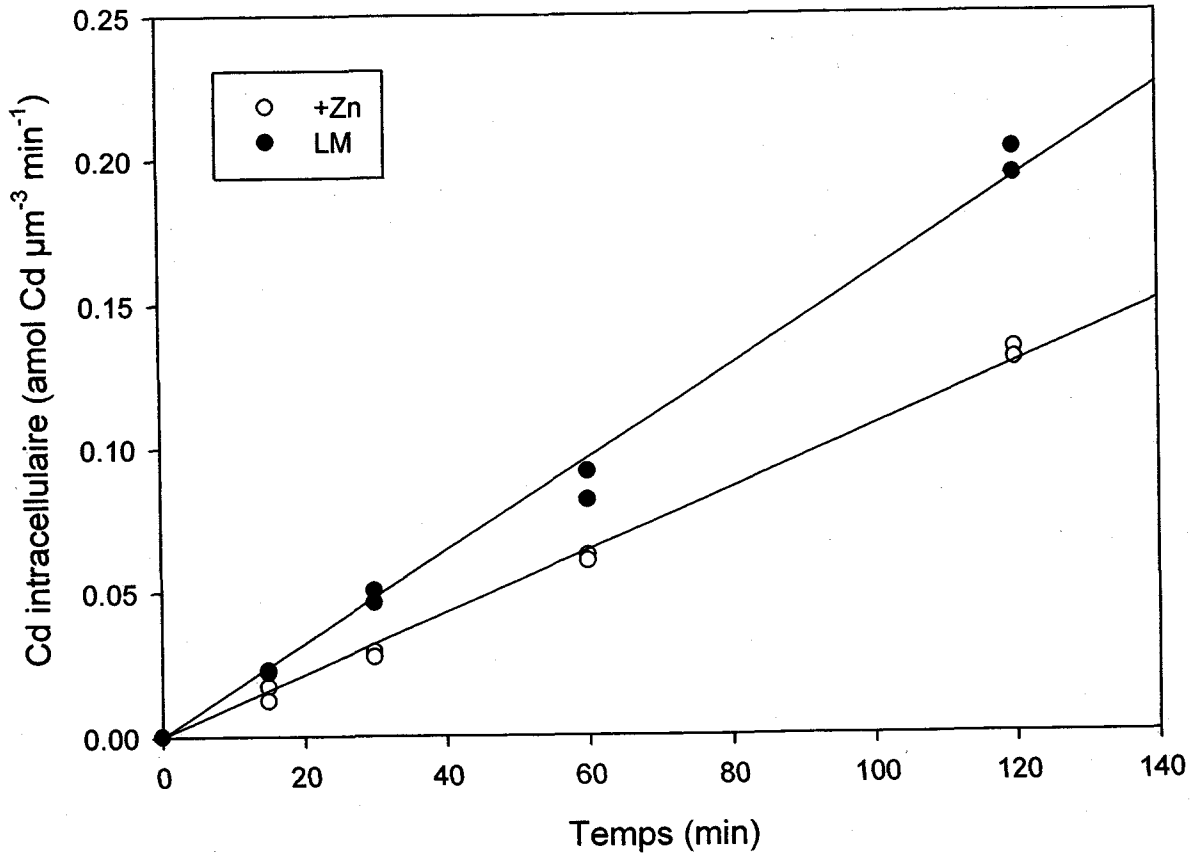


Figure C1 : Concentration intracellulaire de Cd en fonction du temps d'exposition à 7 nM Cd²⁺ chez des cellules de *C. reinhardtii* acclimatées au milieu LM ou +Zn pendant au moins trois générations avant l'exposition. Les traits continus représentent des régressions linéaires obtenues par la méthode des moindres carrés. Noter que les ordonnées à l'origine des deux régressions en ne considérant que les mesures d'accumulation après 15, 30, 60 et 120 minutes (en ne forçant pas la régression à passer par l'origine) n'étaient pas significativement différentes de 0 suggérant que la concentration de Cd cellulaire extrapolée au temps 0 est nulle. Les points (0,0) furent donc incorporés dans les régressions finales montrées à la figure C1. L'inclusion des points (0,0) n'affectait pas significativement les pentes des deux régressions suggérant encore une fois que les régressions passent bel et bien par l'origine.

La cinétique d'accumulation du Cd chez les cellules de *C. reinhardtii* acclimatées au milieu LM ou +Zn est linéaire de 0 à 120 minutes d'exposition (Figure C1). En effet, les coefficients de détermination (R^2) des régressions linéaires sont de 0,992 et de 0,995 pour les cellules acclimatées respectivement aux milieux LM et +Zn. La linéarité observée dans les concentrations intracellulaires de Cd en fonction du temps suggère que les algues ne régulent pas à la hausse ou à la baisse le taux d'accumulation du Cd au cours d'une exposition à court terme au Cd. Cette linéarité suggère aussi que les taux d'accumulation du Cd (et donc les constantes V_{max} et K_m) mesurés après un seul pas de temps (30 minutes) (voir article 2 et 3) sont fiables et non biaisés par des cinétiques d'accumulation du Cd non linéaires.

En outre, la pente de la régression pour les cellules acclimatées au milieu LM était 1,46 fois plus élevée que la pente de la régression pour les cellules acclimatées au milieu +Zn (Figure C1). Ce dernier résultat démontre que le taux d'accumulation du Cd est environ 46% plus élevé pour les cellules acclimatées au milieu LM que pour celles acclimatées au milieu +Zn. Cette inhibition du taux d'accumulation du Cd induite chez les cellules acclimatée à une plus forte concentration de Zn démontre une inhibition non compétitive du Zn sur l'accumulation du Cd, tel que discutée dans l'article #2 de cette thèse.

