



HAL
open science

Écotoxicité et bioaccumulation du Cr(III) et du Cr(VI) : spéciation, biodisponibilité et effets biologiques

Imad Aharchaou

► To cite this version:

Imad Aharchaou. Écotoxicité et bioaccumulation du Cr(III) et du Cr(VI) : spéciation, biodisponibilité et effets biologiques. Ecotoxicologie. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0014 . tel-01549080

HAL Id: tel-01549080

<https://theses.hal.science/tel-01549080v1>

Submitted on 28 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Laboratoire Interdisciplinaire des
Environnements Continentaux (LIEC)
UMR 7360 Université de Lorraine, CNRS
METZ

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie
Ressources Procédés Produits
Environnement (RP2E) 410
NANCY

THESE

Pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lorraine
Spécialité : Écotoxicologie, Biodiversité, Écosystèmes

Soutenue publiquement par

AHARCHAOU IMAD

Le 21 février 2017

**Écotoxicité et bioaccumulation du Cr(III) et du Cr(VI) :
spéciation, biodisponibilité et effets biologiques**

Directeur de thèse : **Davide A.L. Vignati** (Chargé de recherche, CNRS, LIEC, Metz)

Co-directeur de thèse : **Eric Battaglia** (Maître de Conférences, Université de Lorraine, LIEC, Metz)

Rapporteur : **Catherine Mouneyrac** (Professeur, Université Catholique de l'Ouest, MMS, Angers)

Rapporteur : **Vera Slaveykova** (Professeur, Université de Genève, DEFSE, Genève, Suisse)

Membre invité : **Sébastien Cambier** (Chercheur, LIST, Esch sur Alzette, Luxembourg)

« Maman, est-ce que j'ai quelque chose à moi qui ne soit pas à vous ? »

Emile Zola.



Village de Zerarda (Mars 2016).

A la mémoire de ma mère !

Remerciements

Il y a environ vingt et un ans, j'ai fait mes premiers pas d'écolier à Zerarda, un petit village du Moyen Atlas au Maroc (photo précédente) avec plein d'ambition et de volonté d'apprentissage. Me voilà aujourd'hui en train de finaliser la rédaction de mon manuscrit de thèse de doctorat. Je considère ces années de thèse au sein du LIEC comme une étape très importante dans l'accomplissement d'un parcours qui mène vers l'aboutissement d'un rêve d'enfance : celui d'être chercheur. J'avoue qu'aujourd'hui je ressens une grande fierté. Je profite de ces lignes pour remercier **toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.**

Mes premières pensées vont en premier lieu à mes co-directeurs de thèse **Davide Anselmo Luigi Vignati** et **Eric Battaglia** pour l'entière confiance qu'ils m'ont accordé. Merci d'avoir cru en moi dès le tout début, et de m'avoir donné ma chance, bien que personne ne me connaissait dans ce laboratoire. Merci également de m'avoir fait partager vos expériences et pour la disponibilité dont vous avez toujours fait preuve, aussi bien pour m'aider à la paillasse que pour m'orienter dans ma rédaction. **Davide**, merci d'avoir été toujours juste et encourageant. Merci aussi d'avoir toujours fait tout votre possible pour m'aider sur tous les plans que ce soit professionnels ou personnels. **Eric**, merci pour votre éternelle bonne humeur et toutes vos remarques pertinentes lors de la correction du manuscrit. Cette thèse n'aurait pas été une si belle aventure sans vous deux. Je sors aujourd'hui grandi de cette expérience et c'est principalement grâce à vous. Quoi que je dise, je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Je remercie également l'ensemble des membres du jury pour avoir pris le temps de lire et de juger mon travail. Merci tout d'abord à Mme **Catherine Mouneyrac** et Mme **Vera Slaveykova** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et d'avoir consenti à venir évaluer cette thèse. Vos commentaires seront sûrement enrichissants et m'apporteront un nouveau regard sur mes résultats.

Un grand merci également à M **Sébastien Cambier** d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'évaluer mon travail de thèse. Merci également pour votre collaboration, vos remarques constructives lors de la rédaction de la publication numéro 1 de cette thèse et pour toutes les analyses au Nanosight. Merci également à M **Arno Gutleb** pour son accueil au LIST.

Je remercie le Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche, l'initiative structurante EC2CO et le LABEX RESSOURCES 21 pour leur soutien financier sans qui cette thèse n'aurait pas pu être réalisée. Merci également à la direction du LIEC, **Fabien Thomas** et **Pascale Bauda** d'avoir toujours été disponibles en cas de besoin.

Une partie de ces travaux ont été réalisée à l'université du Québec (Institut national de la recherche scientifique, Centre- Eau, Terre et Environnement). Je tiens à exprimer toute ma gratitude à M **Claude Fortin** qui a bien voulu m'y accueillir, pour sa disponibilité et sa rigueur scientifique. Je remercie également l'ensemble des membres de son laboratoire, pour l'apprentissage de nouvelles techniques qu'ils m'ont offert et pour leur aide au laboratoire tout au long de mon séjour. Mes pensées vont particulièrement à **Fengjie Liu**, **Maikel Rosabal**, **Kim Racine**, **Lise Rancourt** et **Stéfane Prémont**. Un grand merci également à **Sébastien Leguay**, **Camille Guilleux** et **Cédrick Beaubien** pour leur bonne humeur et toutes les discussions qu'on a partagé.

Je remercie également M **Jean-Sébastien Py**, M **Christophe Rosin** et M **Jean-François Munoz** de l'ANSES de Nancy d'avoir accepté de participer à l'étude de la spéciation du chrome par IC-ICP-MS. Un grand Merci aussi à M **Jean-Luc Loizeau** de l'université de Genève pour toutes les mesures SPC. Mes pensées vont également à M **Eric Meux**. Merci d'avoir été membre du comité de pilotage de ma thèse et aussi de m'avoir accueilli quelques jours dans votre laboratoire. Merci également à tous les membres de votre laboratoire pour leur gentillesse, leur accueil et leur aide en cas de besoin. Je remercie infiniment Mme **Laure Giamberini**, M **Jean-François Masfaraud** et M **François Rodius** pour leur gentillesse et leur bonne humeur, mais aussi d'avoir participé au comité de pilotage de cette thèse. Vos commentaires étaient très pertinents et m'ont permis d'avoir d'autres points de vue durant l'avancement de ma thèse. Merci à **l'UFR SCIFA** de m'avoir donné l'occasion de faire de l'enseignement dans le cadre du monitorat mais aussi pour m'avoir pris en tant qu'ATER.

Merci aux stagiaires qui m'ont aidé lors de cette thèse, **Bérengère, Mohammed, Nassim, Ruffine, Cécile, Raphael et Ghita.**

Je ne manquerai pas l'occasion de remercier tous les gestionnaires du LIEC, de l'UFR SCIFA ou de l'école doctorale RP2E, notamment, notre **Maryline** préférée (secrétaire du père Noël), **Catherine, Nathalie Kleinen** (partie trop tôt), **Tiffany, Christine** et **Valérie**. Un grand merci également à **Rosie, Marie-Andrée** et **Nathalie** (ton café me manquera sûrement).

Merci beaucoup à **Philippe Wagner** pour son aide lors des sorties terrains. Merci également à **Jean-François Poinsaint** pour son aide dans la mise en place des expériences avec les corbicules et pour sa gentillesse. Je ne remercierai jamais assez **Philippe Rousselle** pour sa disponibilité, sa sympathie et toutes les analyses SAA qu'il a faites pour moi et **Etienne Morhain** pour l'intendance et pour toutes les discussions qu'on a pu partager. **Danielle Pauly**, un grand merci pour ta gentillesse et pour ton aide dans les analyses au Konelab. Sans oublier notre **Bénédictte Sohm** (Alias : Béné) pour tout ce qu'elle a fait pour moi et ma famille, merci également pour ton aide au laboratoire (cytométrie de flux et Konelab).

Mes pensées vont également à tout le personnel du LIEC et à toutes ces personnes qui participent à la bonne entente du laboratoire et qui ont amplement participé à mon épanouissement au sein de ce laboratoire : **Vincent Felten, Carole Cossu-Leguille, Sylvie Cotelle, Marie Le Jean, Elisabeth Gross, Marc Parant, Michaël** et **Florence Danger, Simon** et **Sandrine Devin, Delphine Aran, Christophe Pagnout, Pascal Poupin, François Guérol, Céline Vellinger, Romain Couleau, Philippe Usseglio-Polatera** et **Jonathan Bouquerel**. La liste est longue, j'espère n'avoir oublié personne.

Doctorants et post-doc je ne vous ai pas oublié ... Je me rappelle de mes premiers jours au bureau, venant de loin, j'espérais rencontrer des gens sympa avec qui passer trois bonnes années et justement cela a été le cas. Les premières personnes que j'ai rencontrées étaient **Andréina, Emilie, Stéphane, Amira** et **Hela**. Merci d'avoir fait le nécessaire pour faciliter mon intégration au laboratoire et aussi pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble. Quelques mois après, voilà arrivée **Anne** (Alias Nanou) que je ne remercierai jamais assez pour sa gentillesse et pour tous les gâteaux qu'elle nous a ramenés au bureau. Je souhaite remercier également les autres doctorants, stagiaires et post-doctorants du laboratoire avec qui j'ai passé de très bons moments, notamment, **Clément** (alias Crecre), **Pierre, Maël,**

Jennifer, Marine, Dan, Kewin, Carole, Alice (alias vip...), **Fanny, Nico, David, Vanessa, Romain, Marc** (en fait Marc, non rien !!!1-0), **Morgane, Loïc, Emmanuel, Laetitia et Anna**. Un grand merci également à **Justine** (alias : bon ba allez zou) et **Muriel** pour leur sympathie et tous les bons moments qu'on a partagé au bureau des doctorants P8.

Enfin, je voudrai remercier toute la **famille Aharchaou**. Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir toujours soutenu. **PAPA** sans toi rien n'aurait été possible, sache que je t'aime fort et je serai toujours là quand tu auras besoin.

Merci également à ma belle-famille, toute la **famille ADILI** pour m'avoir accueilli et de m'avoir confié votre Khadija. Un grand merci également à **Achelfi Ali** et **Natasha** pour leur accueil, soutien et sympathie.

Khadija, ma chérie d'amour, je ne sais pas comment te remercier. Toi qui as quitté ta famille pour venir me rejoindre en France. Merci d'avoir été patiente et compréhensive pendant les périodes de mon absence (stages, congrès et surtout week-end de travail). Merci pour le meilleur cadeau que tu m'as offert : notre bien aimée Halima. Merci à **Halima** aussi qui me motive pour donner le meilleur de moi-même : Je veux que tu sois fière de ton papa. Je vous aime mes chéries.

Résumé

L'écotoxicité des éléments traces vis-à-vis du vivant est contrôlée par leur bioaccessibilité, leur biodisponibilité et leurs interactions avec le(s) site(s) d'action à l'intérieur des organismes. Pour certains éléments, l'existence dans le milieu naturel de plusieurs formes redox ayant des propriétés différentes doit aussi être prise en considération. Dans le cas spécifique du Cr, le consensus général considère le Cr(III) comme moins écotoxique que le Cr(VI). Toutefois, plusieurs études récentes soulignent que ce consensus devrait être réexaminé. Plus particulièrement, une connaissance insuffisante de la spéciation du Cr(III) pendant les tests en laboratoire pourrait avoir conduit à une sous-estimation de sa biodisponibilité et écotoxicité. Ce travail de thèse s'intéresse donc aux relations entre spéciation, biodisponibilité et bioaccumulation du Cr(III) et Cr(VI) dans différents modèles biologiques pour mieux appréhender leur potentiel écotoxique ainsi que leurs mécanismes d'interaction avec le vivant.

Des études ont été menées chez les algues *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlamydomonas reinhardtii*, le bivalve *Corbicula fluminea* et des cultures de cellules d'ovaire d'hamster chinois (CHO). Le comportement et la spéciation du chrome ont été caractérisés dans les différents milieux d'exposition utilisés. Les effets du Cr(III) et du Cr(VI) sur la croissance de *P. subcapitata* ont été comparés et interprétés sur la base d'une étude détaillée de la spéciation du Cr. Les flux d'internalisation et la répartition intracellulaire du Cr(III) et du Cr(VI) ont été établis chez l'algue verte *C. reinhardtii* pour des conditions le plus possible proches de la réalité environnementale. La bioaccumulation du Cr(III) et du Cr(VI) a été comparée dans les branchies et les glandes digestives de *C. fluminea* après exposition seule ou combinée aux deux formes du Cr. En outre, les effets de ces deux formes sur une batterie de 13 biomarqueurs ont été évalués dans les deux tissus. Enfin, dans le cadre d'amélioration de la compréhension des mécanismes d'internalisation du Cr(III) dans les cellules, la cytotoxicité du Cr(III) et du Cr(VI) a été étudiée et comparée chez différentes lignées de cellules CHO présentant ou non des glycoprotéines de surface, connues pour leur implication dans des mécanismes d'endocytose dans le cas d'autres métaux de transition.

La concentration du Cr(VI) reste relativement stable dans les différents milieux utilisés, tandis que celle du Cr(III) diminue fortement avec le temps. Les analyses détaillées de la spéciation dans le milieu de test algal montrent aussi une évolution rapide de la spéciation avec une disparition quasi-totale du Cr(III) ionique et une formation de particules de Cr sur des temps allant de quelques minutes à deux heures (à comparer avec la durée de 72 heures typique pour un test standardisé de croissance algale). En revanche, aucune interconversion entre les deux formes redox n'a été observée, qu'il s'agisse de conditions biotiques (en présence d'algues) ou abiotiques, ce qui permet de montrer que leur écotoxicité respective est effectivement liée à la forme redox considérée. Ainsi, il apparaît que le Cr(III) est plus toxique que le Cr(VI) vis-à-vis de *P. subcapitata* si l'on tient compte de la spéciation de ces deux formes. Par ailleurs, les flux d'internalisation du Cr(III) et du Cr(VI) chez *C. reinhardtii* varient en fonction de la concentration de ces deux formes redox et du pH du milieu d'exposition. Néanmoins, à pH 7 et à une concentration de 100 nM, représentative des milieux environnementaux, ces deux formes présentent des flux d'internalisation comparables chez cette algue. De plus, ces deux formes ont la même répartition à l'intérieur des cellules algales dans ces mêmes conditions d'exposition. Les différences d'écotoxicité entre les deux formes dépendent donc de l'interaction entre différents facteurs (concentration, pH et ses influences sur la spéciation du Cr ainsi que sur la charge de la surface des cellules). Les expériences réalisées avec les bivalves ont montré que le Cr(III) et le Cr(VI) s'accumulent dans les branchies et les glandes digestives de façon comparable. L'expression de certains biomarqueurs (p.ex., CSP3) est affectée par la forme redox et la concentration d'exposition sans qu'une tendance régulière puisse toutefois être établie. Les expositions seules et simultanées aux deux formes de Cr, réalisées en utilisant des solutions isotopiquement enrichies, montrent que l'accumulation de chaque forme redox peut varier selon l'absence ou la présence de l'autre. Chez les cellules CHO, le Cr(VI) s'est avéré plus toxique que le Cr(III), en accord avec le consensus existant. La présence des protéoglycanes à la surface des cellules CHO semblent affecter l'internalisation et la toxicité du Cr(III) vis-à-vis de ces cellules, contrairement au Cr(VI).

L'ensemble des résultats de ce travail suggère que la validité du paradigme 'le Cr(VI) est plus écotoxique que le Cr(III)' serait dépendante des conditions d'exposition et du modèle biologique utilisé. Ce paradigme, accepté tant par la communauté scientifique que par les gestionnaires environnementaux, nécessite donc un réexamen afin d'assurer une meilleure gestion des risques liés au Cr.

Sommaire

Résumé.....	i
Sommaire	iii
Liste des abréviations.....	vi
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xv
Introduction.....	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique.....	5
Partie 1.....	6
Les éléments traces métalliques	6
I. Généralités.....	6
II. Notions de biodisponibilité et spéciation.....	8
III. Transfert des ETM vers les organismes aquatiques.....	11
IV. Les modèles de bioaccumulation métallique	13
V. Les ETM à l'intérieur des cellules	16
VI. Ecotoxicité des ETM.....	17
VII. Mécanismes de détoxification des métaux.....	18
Partie 2.....	21
Le chrome.....	21
I. Le chrome dans l'environnement	21
II. Chimie du chrome dans les milieux aquatiques.....	22
III. Internalisation et écotoxicité du chrome	31

Chapitre II. Matériel et méthodes	51
I. Choix des modèles biologiques	52
II. Conditions de culture et du maintien au sein du laboratoire.....	61
III. Etudes menées chez les algues.....	64
IV. Etudes menées chez le bivalve <i>Corbicula fluminea</i>	84
V. Etudes menées chez des cultures cellulaires de CHO.....	90
Chapitre III. Résultats et discussion.	101
Partie 1	102
Ecotoxicité et spéciation du chrome.....	102
Partie 2	148
Mécanismes de l'écotoxicité du chrome chez <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	148
I. Effets du Cr sur le photosystème II.....	150
II. Effets du Cr(III) sur la viabilité, l'intégrité et la fonctionnalité des cellules algales.	160
III. Génotoxicité du Cr(III) et Cr(VI).....	166
Partie 3	173
Internalisation et répartition subcellulaire du Cr.....	173
Partie 4	241
Bioaccumulation du Cr et mesures de biomarqueurs chez <i>Corbicula fluminea</i>	241
I. Vue d'ensemble des expériences	243
II. Bioaccumulation et effets du Cr(III) et Cr(VI) chez <i>Corbicula fluminea</i>	243
III. Bioaccumulation et effets d'un mélange de Cr(III) et Cr(VI).....	249
Partie 5	260
Cytotoxicité du Cr(III) et du Cr(VI) chez les cellules CHO	260
I. Cinétique de croissance des cellules CHO.....	262

II. Comparaison de la cytotoxicité du Cr(III) et du Cr(VI) chez les différentes lignées cellulaires	263
III.Vérification des concentrations d'exposition dans le milieu de culture cellulaire....	267
Chapitre IV. Conclusions et perspectives	270
I. Contexte générale et nécessité du travail de thèse.....	271
II. Spéciation et effets biologiques du chrome	271
III. Internalisation et bioaccumulation du chrome	274
IV. Implications pour la gestion du risque	276
Annexes.....	278
Annexe 1 Compositions des différents milieux de tests	279
Annexe 2 Protocoles de dosage des biomarqueurs	281
Annexe 3 Protocoles de synthèse de nanoparticules de chrome.....	289

Liste des abréviations

- ACP** : Phosphatase acide
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ANSES** : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
- ATP** : Adénosine triphosphate
- BeT** : Bromure d'éthidium
- CSP3** : Caspase 3
- CAT** : Catalase
- CCAP** : Centre de culture et de collection des algues et protozoaires
- CE50** : Concentration efficace médiane
- Chl a** : Chlorophylle a
- CHO** : Cellule d'ovaire d'hamster chinois
- Chol** : Cholestérol
- CL50** : Concentration létale pour 50% des organismes
- CICAD** : Concise International Chemical Assessment Document
- DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- EDTA** : Acide éthylène diamine tétra-acétique
- ETM** : Élément trace métallique
- ETS** : Système de transport d'électrons
- FDA** : Diacétate de Fluorescéine
- FIAM** : Free ion activity model – modèle de l'ion libre
- Fm** : Fluorescence maximale
- F0** : Fluorescence minimale
- Fv** : Fluorescence variable
- GPx** : Glutathion peroxydase
- GSH** : Glutathion
- GST** : Glutathion-S-Transférase
- HDP** : Heat denaturable proteins
- HSP** : Heat Stable proteins
- ICP-MS** : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
- ISO** : International Standard Organisation

LB : Ligand biotique
LC : Lefevre-Czarda
LDH : Lactate déshydrogénase
LOOH : Hydroperoxydes lipidiques
MDA : Malondialdéhyde
MLB : Modèle du ligand biotique
MT : Métallothionéines
MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiozol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)
NOEC : No observable effect concentration
NTA : Nanoparticle Tracking Analysis
OCDE : Organisation de coopération et de développement économique
OMS : Organisation mondiale de la santé
PC : Phytochélatines
PNEC : Predicted no effect concentration
PROT: protéines
PSII: Photosystème II
ROS: Espèces réactives de l'oxygène
SAA : Spectrométrie d'absorption atomique
SPC : Single Particle Counting
TAC : Capacité totale antioxydante
TG : Triglycérides

Liste des figures

Figure 1 : Sources d'éléments traces métalliques dans les milieux aquatiques.....	8
Figure 2 : Schéma général montrant la spéciation chimique des ETM en solution.	10
Figure 3 : Modèle conceptuel des interactions entre les ETM et les organismes aquatiques. .	12
Figure 4 : Mécanismes membranaires permettant l'entrée des ETM (et de leur complexes) dans la cellule.....	13
Figure 5 : Classification des métaux.	17
Figure 6 : Diagramme de Pourbaix simplifié pour les espèces de Cr dans les solutions aqueuses.	24
Figure 7 : Spéciation du Cr(VI) dans les solutions aqueuses.	25
Figure 8 : Prédominance des espèces de Cr(III) (en %) en fonction du pH.....	27
Figure 9 : Solubilité des hydroxydes de Cr(III) dans des solutions aqueuses.....	27
Figure 10 : Ordre de grandeur des concentrations en ETM naturels dans la charge dissoute de différentes rivières à travers le monde.	30
Figure 11 : Interactions du Cr(VI) et du Cr(III) avec les composantes cellulaires et les possibles réactions d'interconversion entre les deux formes redox du Cr à l'intérieur des cellules.....	32
Figure 12 : Toxicité du Cr(VI) vis-à-vis des organismes aquatiques.....	35
Figure 13 : Toxicité du Cr(III) vis-à-vis des organismes aquatiques.....	38
Figure 14: Exemples de morphologies des cellules algales.....	52
Figure 15: Cellules de l'algue d'eau douce <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	54
Figure 16: Cellules de l'algue verte d'eau douce <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	55
Figure 17: Individus de <i>Corbicula fluminea</i> maintenus en laboratoire après prélèvement	56
Figure 18: Vue externe et interne d'une coquille de <i>Corbicula fluminea</i>	58

Figure 19: Localisation du site de prélèvement des individus de <i>Corbicula fluminea</i>	63
Figure 20: Protocole de l'acclimatation des corbicules.....	63
Figure 21: Photographie des microplaques utilisées pour l'étude d'écotoxicité du Cr(III) et Cr(VI) chez les algues.	66
Figure 22: Appareil Nanosight NS500 utilisé pour la détection des nanoparticules dans le milieu ISO 8692 (photo S. Cambier).	72
Figure 23: Schéma de la configuration optique utilisée dans le suivi individuel des nanoparticules (NTA). D'après Carr et Wright (2013).	72
Figure 24: Système SPC utilisé pour le suivi de la formation des particules dans le milieu ISO 8692.....	74
Figure 25: Protocole de séparation des fractions subcellulaires.....	78
Figure 26: Principales étapes du test des comètes.....	82
Figure 27: Analyse d'une comète par le logiciel Comet Assay IV couplé à une caméra digitale.....	84
Figure 28: Protocole d'exposition pour l'étude de la bioaccumulation du Cr chez <i>C. fluminea</i>	86
Figure 29: activité du PSII des cellules de <i>P. subcapitata</i> exposées au Cr(III)	150
Figure 30: activité du PSII des cellules de <i>P. subcapitata</i> exposées au Cr(VI).....	151
Figure 31: (A) évolution temporelle de la concentration totale filtrée (0,22 µm) du Cr dans le milieu ISO 8692 dopé avec du Cr(III) sur 24 h. (B) Effet du pH sur l'activité photosynthétique de l'algue <i>P. subcapitata</i>	154
Figure 32: : Effet du Cr(III) et du Cr(VI) sur la fluorescence maximale et minimale chez l'algue verte <i>P. subcapitata</i>	158
Figure 33: Densité cellulaire déterminée par cytométrie de flux après exposition pendant 24, 48 et 72 h à différentes concentrations de Cr(III).	161
Figure 34: (A) mise en évidence de l'effet algicide du Cr(III) sur <i>P. Subcapitata</i>	162
Figure 35: Détermination de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux..	164

Figure 36: Visualisation de l'activité estérase des cellules de <i>P. subcapitata</i> par cytométrie en flux en présence de Cr(III)..	165
Figure 37: Variation du nombre total de cellules intactes et de cellules dont l'intégrité et/ou la fonctionnalité sont/est perturbée(s) déterminé au cytomètre de flux	166
Figure 38: Photographies prises au microscope à fluorescence (x 40) après migration des noyaux dans un gel MPA à 2% (a) et dans un gel LMPA à 2% (b).	167
Figure 39: Bioaccumulation du Cr(III) et Cr(VI) dans les branchies et glandes digestives des corbicules exposés à 5, 50 ou 500 µg/L de Cr(III) ou de Cr(VI) pendant 24 h.	244
Figure 40: Cinétique de variation des concentrations totales et filtrées (0,45 µm) du Cr dans les milieux d'exposition dopés avec 5 µg/L (A), 50 µg/L (B) ou 500 µg/L (C) de Cr(III) (bleu) ou de Cr(VI) (orange).	246
Figure 41: Bioaccumulation du Cr(III) et Cr(VI) dans les branchies et glandes digestives des corbicules exposées à 50 µg/L de Cr(III) ou de Cr(VI) séparément ou à un mélange de solutions isotopiquement enrichies (100 µg/L de ⁵⁰ Cr(III) + 50 µg/L de ⁵³ Cr(VI)) pendant 96 h.	250
Figure 42: Variation temporelle des concentrations totales et filtrées (0,45 µm) du Cr entre 0 (barres noires) et 24 h (barres grises).	253
Figure 43: Variation de l'activité de la caspase-3 (CSP3) dans les branchies et glandes digestives après exposition pendant 96 h aux différentes conditions.	254
Figure 44: Détermination de la densité cellulaire optimale pour l'évaluation de la cytotoxicité du Cr chez les cellules CHO.	262
Figure 45: Effets du Cr(VI) sur la viabilité cellulaire.	264
Figure 46: Effets du Cr(III) sur la viabilité cellulaire.	265
Figure 47: Evolution des concentrations filtrées de Cr à t = 0 et 24, 48 et 72 h après ajout du Cr(III) ou du Cr(VI) dans le milieu de culture complet à deux concentrations différentes.	268

Liste des tableaux

Tableau 1: Etudes ayant évalué la toxicité du Cr(VI) chez les organismes aquatiques.	36
Tableau 2 : Etudes ayant évalué la toxicité du Cr(III) chez les organismes aquatiques.	39
Tableau 3: Principales caractéristiques du cycle de vie de <i>Corbicula fluminea</i>	57
Tableau 4: Résumé de travaux étudiant l'effet du Cr(VI) et du Cr(III) sur l'activité photosynthétique chez des microalgues.	153
Tableau 5: Valeurs du pH dans le milieu ISO 8692 dopé avec différentes concentrations de Cr(III) après 0 et 24 heures.....	155
Tableau 6: Comparaison des résultats des tests d'écotoxicité réalisés sur la croissance et l'activité du PSII de <i>P. subcapitata</i>	160
Tableau 7: Observations effectuées après migration des noyaux dans le gel MPA et LMPA à différentes concentrations (0 – 2%)	167
Tableau 8: Concentrations nominales et mesurées de Cr avant et après filtration (0,45 µm) dans les différents milieux d'exposition des corbicules à t = 0.....	245
Tableau 9: Résultats statistiques de l'analyse de variance (Anova à plan factoriel) pour les activités des différents biomarqueurs mesurés dans les branchies des corbicules exposées pendant 24 ou 96 h à 5, 50 et 500 µg/L de Cr(III) ou de Cr(VI).....	248
Tableau 10: Résultats statistiques de l'analyse de variance (Anova à plan factoriel) pour les activités des différents biomarqueurs mesurés dans les glandes digestives des corbicules exposées pendant 24 ou 96 h à 5, 50 et 500 µg/L de Cr(III) ou de Cr(VI).	248
Tableau 11: Niveaux de bioaccumulation du Cr rencontrés dans différents travaux réalisés chez les bivalves.....	251
Tableau 12: Moyennes ± écart-types des activités des biomarqueurs cellulaires mesurés sur les tissus (branchies et glandes digestives) de <i>C. fluminea</i>	256

Tableau 13: Résultats statistiques de l'analyse de variance (Anova à deux facteurs) pour les activités des différents biomarqueurs mesurés dans les branchies et les glandes digestives des corbicules exposées pendant 96 h à 50 µg/L de Cr(III) ou de Cr(VI) ou à un mélange des deux (100 µg/L de ⁵⁰ Cr(III) + 50 µg/L de ⁵³ Cr(VI)).	257
Tableau 14: Valeurs de CE ₅₀ et CE ₂₅ du Cr(VI) (en mg/L Cr) chez des lignées cellulaires CHO.	264

Introduction

Les éléments traces métalliques (ETM) présents dans l'environnement ont des origines variées, naturelles et anthropiques. Leur exploitation ne cesse d'augmenter depuis l'ère industrielle et perturbe leurs cycles biogéochimiques naturels. Cette perturbation peut augmenter leur concentration dans les différents compartiments environnementaux jusqu'à des niveaux potentiellement toxiques. Toutefois, l'impact des ETM sur les différents écosystèmes est fortement dépendant de leurs interactions avec le milieu environnant. En effet, l'écotoxicité des ETM vis-à-vis du vivant est contrôlée par leur bioaccessibilité (possibilité de rentrer en contact avec le vivant), leur biodisponibilité (capacité à être assimilé par le vivant) et leurs écotoxicocinétique et écotoxicodynamique (régissant leurs interactions avec le(s) site(s) d'action à l'intérieur des organismes).

Dans le cas du Cr, qui est largement utilisé dans des activités industrielles telles que la galvanostégie ou le tannage du cuir, la bioaccessibilité et la biodisponibilité sont essentiellement contrôlées par l'existence dans l'environnement des deux formes redox, le Cr(VI) et le Cr(III) ayant des propriétés physico-chimiques et écotoxicologique très contrastées. Ainsi, le Cr(VI) est très mobile dans l'environnement (forte bioaccessibilité) et facilement assimilable par les organismes (forte biodisponibilité) du fait des analogies structurales entre les ions chromates (la forme chimique dominante dans l'environnement) et les ions sulfates et phosphates nécessaires au fonctionnement des cellules (Cervantes et al., 2001; Viti et al., 2013). D'autre part le Cr(III) montre une tendance à s'associer avec les particules, colloïdes et matière en suspension, présentes dans l'environnement (faible mobilité) et à former des espèces chimiques (hydroxydes, carbonates, phosphates, complexes organiques) qui peuvent en réduire la biodisponibilité (Rai et al., 1989, 1987; Richard and Bourg, 1991). Par conséquent, le Cr(III) est considéré comme étant moins écotoxique que le Cr(VI).

Toutefois, alors que la toxicité du Cr(VI) n'est pas contestée, des études récentes remettent en question la non ou faible toxicité du Cr(III) (e.g., Lira-Silva et al., 2011; Thompson et al.,

2002). De plus, lors des études écotoxicologiques avec le Cr(III), la formation des certaines espèces chimiques insolubles peut conduire à une diminution de la concentration bioaccessible avec le risque de sous-estimer l'écotoxicité de cette forme de Cr (Vignati et al., 2010 ; Ponti et al , 2014). Finalement, il est aussi reconnu qu'il existe un grand manque de données concernant l'écotoxicité du Cr(III) (INERIS, 2005). Ainsi, des études qui permettraient de comprendre les mécanismes de toxicité du Cr(III) en relation à sa spéciation dans le milieu utilisé dans les tests en laboratoire sont donc indispensables pour bien appréhender la toxicité relative des deux formes de Cr. De plus, l'étude de la spéciation du Cr en conditions contrôlées en laboratoire constitue un point important pour mieux appliquer les résultats obtenus en laboratoire à des situations de terrain et pour réconcilier les différents points de vue sur l'écotoxicité de ces deux formes redox du Cr. Ces problématiques (spéciation du Cr, écotoxicité comparative du Cr(III) et du Cr(VI)) et leurs implications pour la gestion du risque environnemental du Cr constituent l'objet de ce travail de thèse.

En effet, les études comparant les effets biologiques du Cr(III) et le Cr(VI) restent relativement rares et un grand nombre de travaux ont été, et sont encore aujourd'hui, réalisés sur le Cr(VI) seulement. Les résultats de cette thèse auront permis *in fine* de montrer certaines limitations du consensus 'le Cr(VI) est plus toxique que le Cr(III)' ainsi que de comparer pour la première fois certains aspects des interactions du Cr(III) et du Cr(VI) avec le vivant.

Trois modèles biologiques ont été utilisés pour mener ces investigations : des microalgues unicellulaires d'eau douce (*Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlamydomonas reinhardtii*), un mollusque bivalve d'eau douce (*Corbicula fluminea* aussi connu sous les noms de palourde asiatique ou corbicule) et des cultures de cellules d'ovaire d'hamster chinois (CHO). Les objectifs spécifiques du travail peuvent ainsi se résumer :

Effectuer une étude comparative des effets du Cr(III) et du Cr(VI) chez différents modèles biologiques,

Caractériser le comportement et la spéciation du chrome dans les milieux d'exposition utilisés,

Etablir les flux d'internalisation et la répartition intracellulaire du Cr(III) et du Cr(VI) chez l'algue verte *C. reinhardtii*,

Comparer la bioaccumulation du Cr(III) et du Cr(VI) dans les branchies et les glandes digestives de *C. fluminea* et y étudier les effets vis-à-vis de plusieurs biomarqueurs, Contribuer à la compréhension du mécanisme de l'internalisation du Cr(III) à l'aide de différentes lignées de cellules CHO.

Cette thèse est organisée en quatre chapitres :

Le premier chapitre présente une revue bibliographique sur les ETM en général et sur le chrome en particulier. Les données discutées sur le chrome dans ce chapitre ont été limitées principalement aux organismes d'eau douce qui représentent le mieux la plupart de nos modèles biologiques.

Le second chapitre correspond à des descriptions détaillées des différents modèles biologiques, matériels et méthodes utilisés.

Le troisième présente les différents résultats obtenus ainsi que leur discussion. Une partie des résultats a été présentée sous forme de publications scientifiques et une autre partie a été rédigée et présentée de façon 'traditionnelle'.

Dans le quatrième et dernier chapitre, nous concluons sur l'ensemble des résultats qui ont permis de mieux appréhender l'écotoxicité du Cr(III) et du Cr(VI) ainsi que sur les perspectives de ce travail concernant les directions à suivre pour améliorer la compréhension de certains mécanismes.

Chapitre I.

Synthèse bibliographique

Partie 1

Les éléments traces métalliques

I. Généralités

La notion d'« éléments traces métalliques » (ETM) reste mal définie. Néanmoins, celle-ci se substitue peu à peu à celle de « métaux lourds » (Miquel, 2001). Généralement, le terme ETM désigne des métaux et métalloïdes¹ retrouvés dans l'environnement à l'état de « traces », et donc à des teneurs moyennes ne dépassant pas 100 parties par million en termes de fractions massiques (Duffus, 2002). L'appellation « métaux lourds » fait référence à la densité des éléments ; désignant ainsi les éléments métalliques, métaux ou métalloïdes, caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5 g/cm³ (Adriano, 2001). Cette appellation a été souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » (p. ex : zinc), tandis que d'autres éléments ne sont pas des métaux (p. ex : l'arsenic qui est un métalloïde). Pour ces différentes raisons, l'appellation « éléments traces métalliques » est préférable à celle de métaux lourds.

D'un point de vue biologique, on distingue deux types d'ETM en fonction de leurs effets (physiologiques et toxiques) chez les êtres vivants : les métaux essentiels et les métaux toxiques. **Les métaux essentiels** sont les éléments qui, à de faibles concentrations, sont essentiels à la croissance, voire à la reproduction des organismes vivants, aussi bien micro que macroscopiques. Certains éléments peuvent devenir toxiques lorsque leur concentration intracellulaire dépasse un certain seuil. Pour autant, lorsque la concentration de ces éléments est trop faible, un phénomène de carence (réversible par des apports) est observable pour les organismes. Autrement dit, les ETM essentiels montrent une fenêtre d'essentialité. C'est le cas, entre autres, du fer (Fe), du zinc (Zn), du cuivre (Cu). **Les métaux toxiques** ne sont pas

¹ Un métalloïde est un élément chimique semi-métallique, dont les propriétés physiques et chimiques sont intermédiaires entre celles d'un métal et d'un non-métal.

nécessaires à la croissance des organismes vivants et n'ont aucun effet bénéfique connu pour les cellules. Ils présentent un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. C'est le cas, par exemple, du mercure (Hg), du cadmium (Cd), du plomb (Pb).

Les ETM sont des éléments constitutifs de la croûte terrestre et ils se retrouvent dans tous les compartiments de l'environnement du fait d'échanges permanents entre les réservoirs géochimiques. Dans les milieux aquatiques, l'altération des roches de la croûte terrestre, le dépôt atmosphérique et les activités anthropiques sont les sources principales d'ETM (Figure 1). L'origine des ETM est liée à leur présence dans la roche-mère. Ils proviennent d'apports et d'enrichissements liés à l'altération, à l'érosion, aux phénomènes d'éruptions ou de retombées volcaniques. La teneur en éléments traces dépend de la nature de la roche-mère, de sa composition minéralogique et du type d'altération qu'elle subit (Campy and Macaire, 2003; Kabata-Pendias, 2010). Les activités anthropiques, quant à elles, ne font que perturber la répartition, la distribution et les cycles des ETM entre les différents compartiments de l'environnement. En effet, les cycles biogéochimiques des ETM ont été fortement perturbés au cours des dernières décennies par les activités industrielles, agricoles et minières telles que l'épandage de déchets, l'apport de fertilisants et de produits phytosanitaires, les retombées atmosphériques et les effluents miniers (Sen and Peucker-Ehrenbrink, 2012). Elles sont à l'origine d'une forte augmentation des émissions anthropiques d'ETM dans l'air, l'eau et les sols, influençant ainsi le risque d'accumulation des ETM dans les organismes vivants.

Quelle que soit leur origine (naturelle ou anthropique), les ETM ne se trouvent pas nécessairement sous la même forme physico-chimique dans les différents milieux. En effet, la concentration totale d'un élément n'est pas le seul facteur qui en détermine son potentiel de mobilité ou d'écotoxicité dans l'environnement. Afin de pouvoir relier le niveau de contamination des différents compartiments de l'environnement aquatique au risque que représente cette pollution vis-à-vis des organismes, il est indispensable de connaître la fraction biodisponible de chaque contaminant.

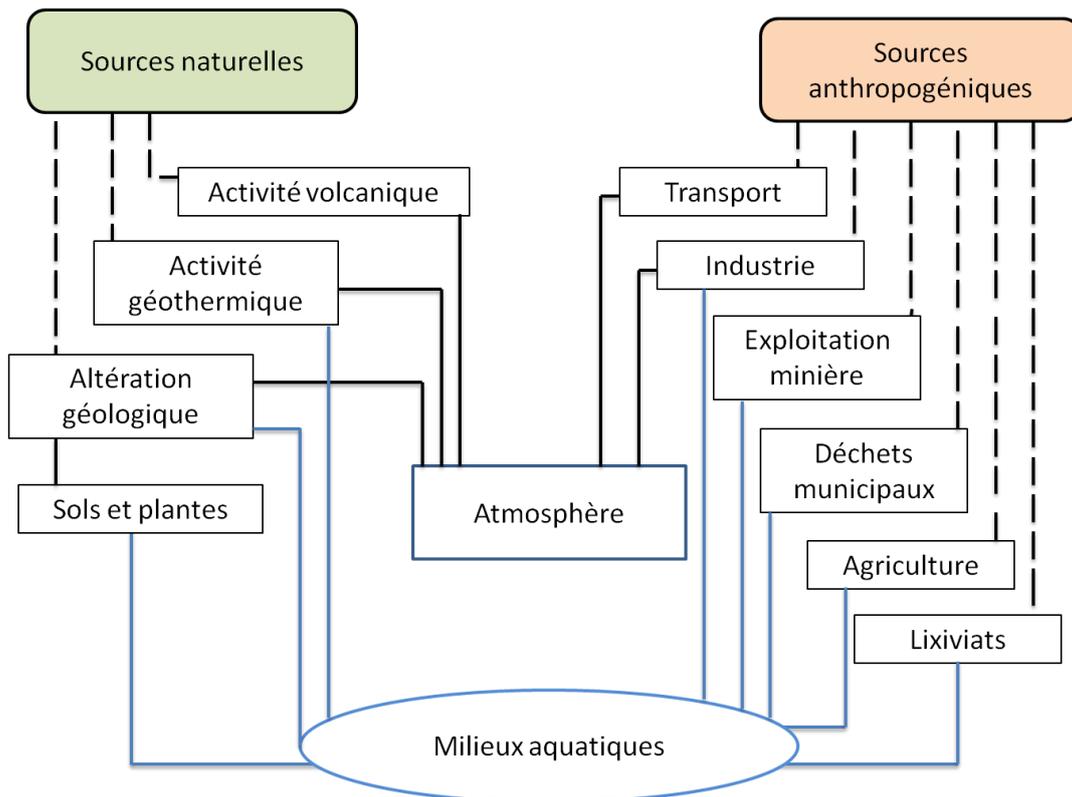


Figure 1 : Sources d'éléments traces métalliques dans les milieux aquatiques; modifiée d'après Foster and Charlesworth (1996).

II. Notions de biodisponibilité et spéciation

Dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental, les notions de biodisponibilité et de spéciation sont importantes pour comprendre et interpréter la toxicité des ETM (Fairbrother et al., 2007; Magalhães et al., 2015; Twiss et al., 2001). En effet, un ETM présent dans les milieux naturels constitue un risque pour les organismes vivants uniquement lorsqu'il leur est accessible. Ainsi, la mesure de la concentration totale peut bien indiquer la présence d'une contamination suite à des activités anthropiques, mais n'apporte que peu d'informations pour la prédiction du comportement biologique d'un ETM dans l'environnement. L'étude de la toxicité des ETM dans les milieux aquatiques passe par la connaissance de leur spéciation car leur degré de toxicité n'est pas le même selon la forme physico-chimique sous laquelle ils sont présents (Allen and Hansen, 1996; Florence et al., 1992).

La biodisponibilité se traduit généralement par l'aptitude d'une fraction d'un élément à être absorbée par un organisme vivant. Il existe plusieurs définitions de la biodisponibilité. Dans cette thèse nous nous basons sur la définition donnée par Adriano, (2001) qui définit la

biodisponibilité comme étant la capacité des produits chimiques biologiquement disponibles à être absorbés par un organisme et affecter son métabolisme.

La spéciation correspond à l'ensemble de toutes les formes physico-chimiques réunies d'un élément, formant la concentration totale de l'élément dans un milieu donné (Florence et al., 1992). Le terme spéciation peut aussi indiquer les procédures analytiques utilisées pour la quantification des différentes formes d'un élément.

On définit deux grands types de spéciation : physique et chimique. La spéciation physique d'un métal est sa répartition à travers les formes particulières (> 220 nm), colloïdales (10-220 nm) et dissoutes « vraies » (< 10 nm) (Campbell and Couillard, 2004). La spéciation chimique, quant à elle, concerne la distribution d'un élément selon différentes catégories d'espèces chimiques dans un système (voir ci-dessous) (Magalhães et al., 2015). Il existe trois types d'interactions contrôlant la spéciation des ETM en milieu aquatique : i) **la précipitation** qui définit le passage d'une espèce de l'état dissout à l'état solide. En milieu aquatique naturel, les ETM précipitent principalement sous forme d'hydroxydes, de carbonates, de phosphates ou de sulfures ; ii) **l'adsorption** qui est le phénomène par lequel des ETM se fixent sur la surface solide d'un substrat. Elle est généralement réversible par détachement des ETM adsorbés sur le substrat (désorption) ; iii) **la complexation** qui se réfère à l'association d'un ETM à des ions inorganiques ou des molécules organiques naturelles ou synthétiques. En particulier, par rapport à la complexation d'un ETM, on peut considérer les formes suivantes :

L'ion métallique libre (p.ex., Cr^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+})

Des complexes impliquant des anions inorganiques présents dans les milieux naturels (p.ex., HO^- , Cl^- , F^- , HCO_3^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} ...)

Des complexes impliquant des ligands organiques simples (p.ex., acides aminés, polycarboxyliques...) ou complexes (acides humiques, acides fulviques, protéines...)

Comme indiqué dans la figure 2 et expliqué par Campbell and Couillard (2004), l'ion métallique libre joue un rôle central dans la spéciation des ETM dissous. Il faut cependant noter que les cations métalliques ne sont jamais parfaitement « libres » en solution aqueuse ; ils sont toujours associés à des molécules d'eau (hydratation), $\text{M}^{Z+}(\text{H}_2\text{O})_n$ avec n entre 4 et 6.

Cependant, par convention on écrit souvent « M^{z+} » sans indiquer la présence de la sphère d'hydratation.

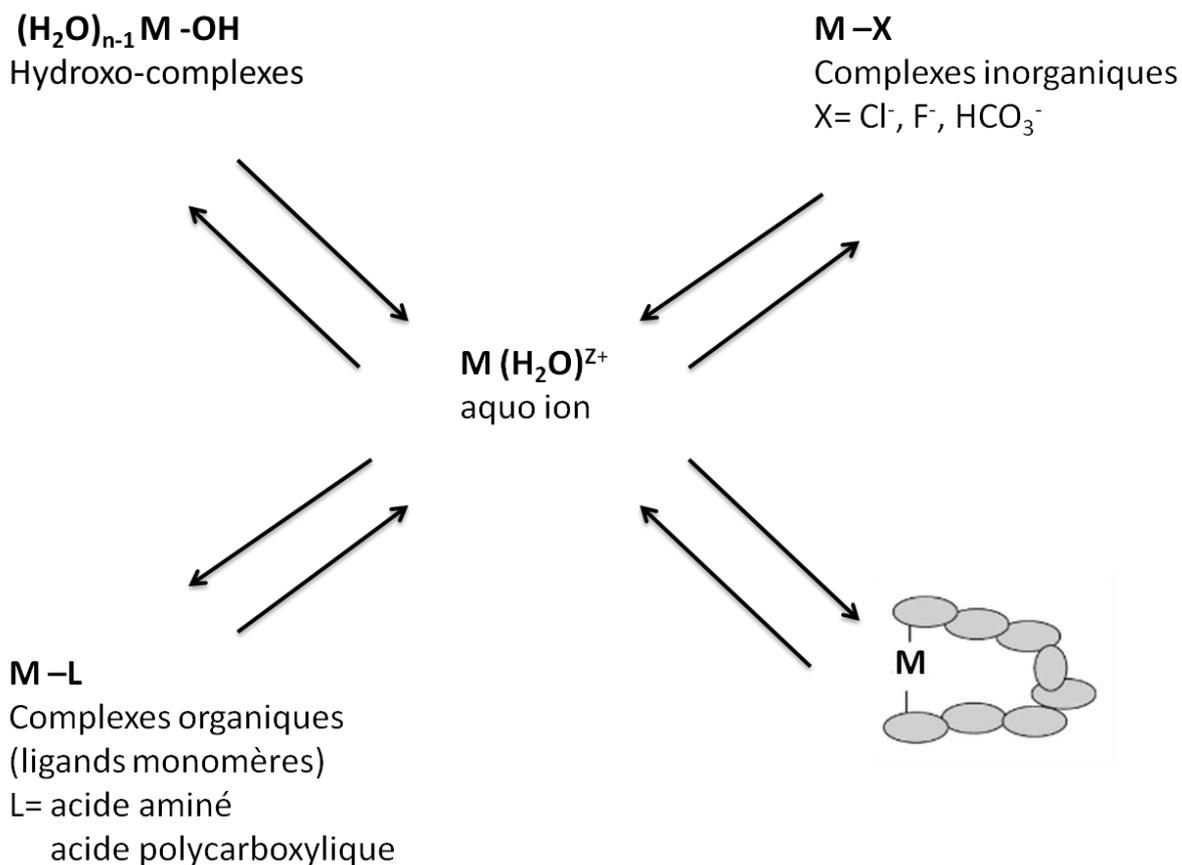


Figure 2 : Schéma général montrant la spéciation chimique des ETM en solution ; d'après Campbell et Couillard (2004).

Le comportement d'un métal dans un écosystème aquatique dépend donc des conditions physico-chimiques du milieu, où il peut exister sous différentes formes, réparties entre la phase dissoute et la phase particulaire. Le pH, la salinité, la dureté et la teneur en oxygène et carbone organique sont les paramètres physico-chimiques qui influencent grandement ce type d'échange dans l'eau. Par exemple, lors d'une diminution du pH dans l'eau, la concentration des métaux sous forme ionique augmente du fait de la compétition avec un nombre croissant d'ions hydronium vis-à-vis des sites d'adsorption. Ainsi la mobilité des métaux augmente généralement dans le milieu lorsque le pH diminue. La matière organique joue également un rôle très important vis-à-vis de la mobilité et de la biodisponibilité des métaux. Sa présence (dissoute ou particulaire) engendre beaucoup de réactions de complexation. Les concentrations en métal libre (considéré comme étant le plus assimilable par les organismes

aquatiques) diminuent alors, entraînant par la même occasion une diminution de la biodisponibilité métallique (Fairbrother et al., 2007).

Les effets toxiques des ETM ainsi que leur comportement au sein du milieu aquatique dépendent, en plus de leur spéciation, de l'organisme considéré (espèce, sexe, âge et stade de développement) et de la concentration dans un organe déterminé (Rand, 1995). Le métal ionique libre est une des formes les plus réactives, avec les espèces neutres et les complexes organiques puisque plus facilement assimilables par les organismes vivants (Bjerregaard, 2014; Magalhães et al., 2015; Weltens et al., 2000).

III. Transfert des ETM vers les organismes aquatiques

Même si la composition biochimique des membranes biologiques peut varier entre différentes espèces, ou même entre différents tissus, certaines propriétés se retrouvent dans toute membrane biologique : le caractère hydrophobe, la présence de phospholipides et de protéines ainsi que l'existence de divers transporteurs et/ou canaux ioniques, impliqués dans l'échange d'ions à travers la membrane (Campbell and Couillard, 2004). Ces caractéristiques permettent à la membrane de jouer son rôle biologique et sont primordiales dans le processus de bioaccumulation métallique qui s'effectue en trois étapes principales (Figure 3) :

Advection et diffusion des ETM et de ses complexes de la solution vers la surface biologique. Cette étape est fonction de la concentration de l'ETM en solution et de la chimie des équilibres qui s'établissent à l'interface entre l'organisme et son milieu.

Adsorption ou complexation des ETM à des sites membranaires de surface. Elle repose sur une forte électropositivité des métaux (M^{z+}) qui vont pouvoir se fixer sur de nombreux constituants tels que les groupements sulfhydriles, les ponts disulfures des protéines ou les têtes polaires des phospholipides. Ce processus est rapide et engendre la formation d'un complexe de surface noté M-X, selon l'équation suivante (Campbell et al., 2002) :

$M^{z+} + \text{X-cell} \leftrightarrow \text{M-X-cell}$ où M^{z+} : métal en solution et X-cell : ligand de la membrane cellulaire.

Transfert ou transport des ETM à travers la membrane biologique. Cela se fait par de nombreux mécanismes (Figure 4). En premier lieu, l'internalisation des métaux peut se faire

par simple diffusion passive à travers la membrane des complexes métalliques neutres lipophiles (Puckett et al., 2010). Elle peut également se faire par des phénomènes de diffusion facilitée, dans le sens du gradient de concentration par l'intermédiaire d'un transporteur ou par transport actif, contre le gradient de concentration, sollicitant de l'énergie (ATP). De plus, l'internalisation des métaux peut également se faire par mécanisme d'endocytose correspondant à l'internalisation des complexes métalliques par invagination de la membrane, créant une vacuole.

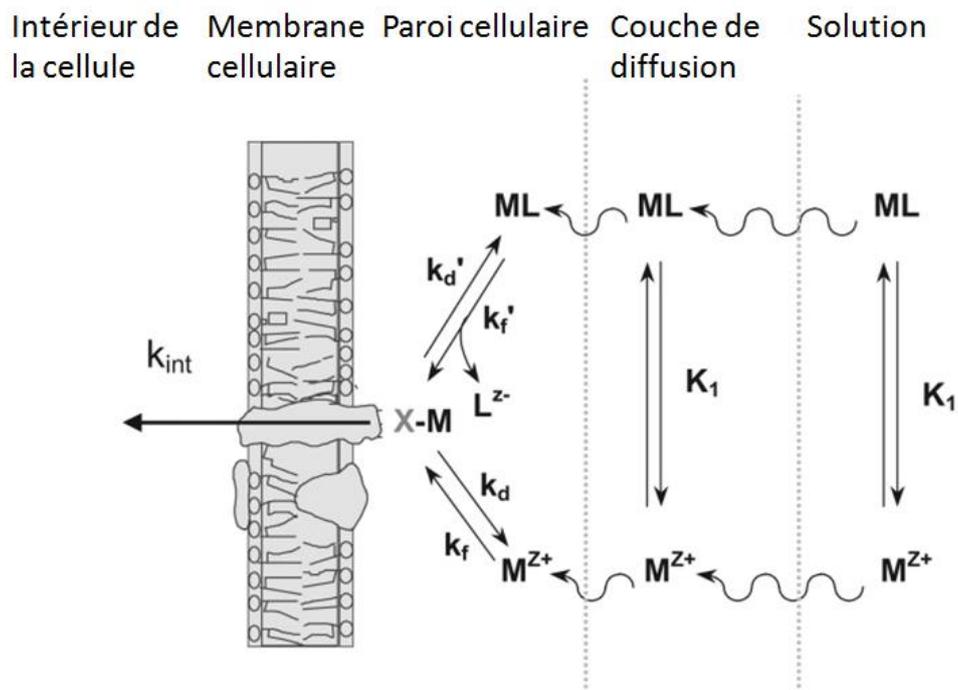


Figure 3 : Modèle conceptuel des interactions entre les ETM et les organismes aquatiques (source : Campbell et Couillard, 2004). M^{z+} : ion métallique libre; ML : complexe métallique en solution; M-X-Membrane: complexe métallique de surface; K_1 : constante d'équilibre constante d'équilibre pour la formation de l'espèce ML; K_f , K_f' : constantes d'équilibre de formation du complexe de surface; K_d , K_d' : constantes d'équilibre de dissociation du complexe de surface; K_{int} : constante de vitesse pour l'assimilation du métal. Les charges sur les complexes ne sont pas indiquées.

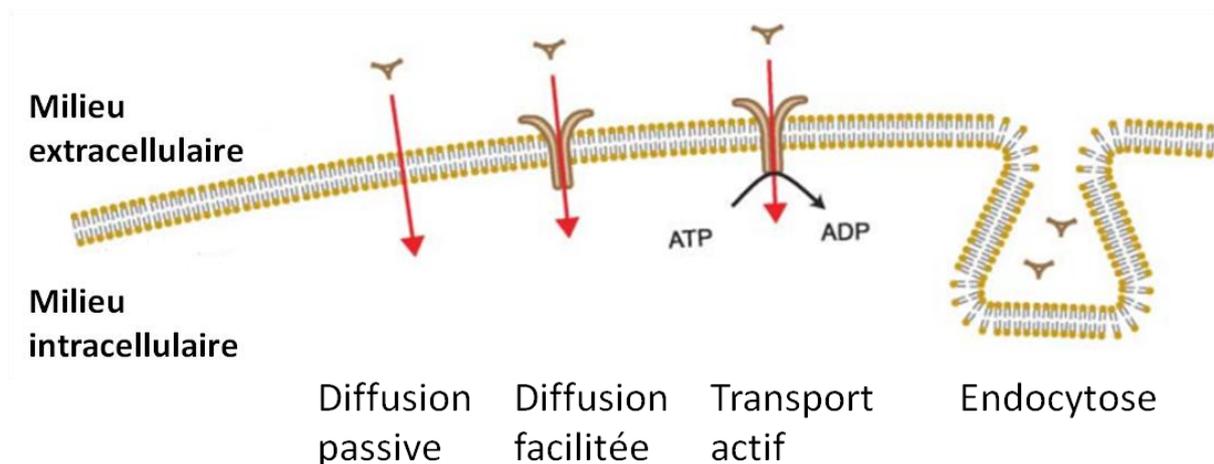


Figure 4 : Mécanismes membranaires permettant l'entrée des ETM (et de leur complexes) dans la cellule ; modifié d'après Puckett et al. (2010).

Ces mécanismes restent peu décrits chez les organismes aquatiques (Paquin et al., 2002; Worms et al., 2006). Pour les ETM présents en phase dissoute, c'est généralement la diffusion passive, facilitée et le transport actif qui dominent les mécanismes d'internalisation. Cependant, pour les métaux présents en phase particulaire, c'est l'endocytose qui prédomine. Elle joue un rôle important dans le transfert des ETM chez les organismes aquatiques (mollusques filtreurs, organismes fouisseurs, détritivores) susceptibles d'ingérer des matières en suspension contenant des ETM. Les ETM particulaires vont en effet être réellement assimilés uniquement après ingestion de la particule et solubilisation du métal (Campbell et al., 2004). Au cours des dernières décennies, les chercheurs ont exploré les liens entre la spéciation et la biodisponibilité et ont essayé d'établir des modèles de prédiction des effets biologiques utilisés aussi bien à la fois à des fins scientifiques que réglementaires.

IV. Les modèles de bioaccumulation métallique

IV.1 Le modèle de l'ion libre (Free Ion Activity Model – FIAM)

Le modèle FIAM (Figure 3) est l'une des premières bases valables de prédiction de la biodisponibilité des ETM. Il a été formulé par Morel (1983) et est basé sur l'existence, à la surface de l'organisme exposé, de sites spécifiques de fixation des métaux au travers desquels l'effet biologique s'exprime (Morel, 1983). L'effet biologique est proportionnel au nombre de sites membranaires occupés par le métal. Ce modèle stipule que la réponse biologique sollicitée par un métal M dissous est proportionnelle à l'activité de l'ion métallique libre M^{Z+}

(aquo-ion ou $M(H_2O)_n^{z+}$) en solution. Le FIAM a ensuite connu des améliorations (intégration de l'effet protecteur des autres cations en solution) qui ont conduit au développement du modèle du ligand biotique (MLB ; Campbell and Couillard, 2004; Campbell, 1995 ; Di Toro et al., 2001).

IV.2 Le modèle du ligand biotique

Le MLB s'est progressivement imposé comme un outil d'évaluation du risque environnemental des métaux traces chez les organismes aquatiques. L'U.S. EPA l'a provisoirement approuvé, l'Union Européenne a adhéré à ses principes et Environnement Canada l'incorpore actuellement dans le développement de nouvelles recommandations sur la qualité de l'eau pour les métaux (Crémazy, 2014). Dans ce modèle, la membrane biologique est le premier site d'interaction du métal avec l'organisme. Par conséquent, pour être internalisé dans une cellule et conduire à un effet biologique, un métal doit d'abord interagir avec une membrane biologique. Dans une solution contenant un métal, le métal peut exister sous la forme d'ion libre, ou sous forme de complexes dissous. L'interaction d'une espèce métallique avec une cellule suivra les étapes suivantes: (1) diffusion du métal de la solution à la surface biologique; (2) complexation de surface du métal à des sites de liaison passifs à l'intérieur de la couche protectrice (p.ex., mucus), ou à des sites sur la surface externe de la membrane plasmique; (3) absorption ou «internalisation» de la forme métallique à l'intérieur de la cellule (Campbell et al., 2002). Généralement, à pH constant et dureté constante, la réponse biologique doit varier en fonction de l'activité des ions métalliques libres dans la solution d'exposition (Campbell and Fortin, 2013).

L'objectif principal du MLB est de prédire, au niveau du site du ligand biotique, la biodisponibilité et la toxicité des métaux en fonction de leur spéciation dans la solution. Un certain nombre d'hypothèses simplificatrices doit être vérifié pour permettre l'applicabilité de ce modèle: (1) Le transport du métal en solution vers la membrane se produit rapidement, de sorte qu'un équilibre s'établit entre les espèces métalliques dans la solution et celles à la surface biologique; (2) la membrane biologique est le site principal des interactions des métaux avec les organismes vivants; (3) la réponse biologique est directement proportionnelle à l'internalisation du métal; (4) la concentration des sites de transport reste constante dans la fourchette des concentrations de métaux étudiées; (5) pendant l'exposition au métal d'intérêt,

la nature de la surface biologique reste constante; (6) seul l'ion métallique libre peut être transféré à travers la membrane (Campbell et al., 2002; Crémazy et al., 2013a).

Il est à noter que ce modèle, ainsi que le FIAM, s'applique lorsque la voie d'absorption impliquant l'intervention de transporteurs/canaux transmembranaires est prédominante. De plus ces modèles sont applicables pour les métaux cationiques (et leurs complexes) hydrophiles (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ...) chez les organismes n'assimilant pas la matière particulaire ou encore ceux pour lesquels la phase dissoute constitue le vecteur principal de prise en charge métallique.

La principale différence par rapport au FIAM est la prise en compte des phénomènes de compétition au niveau du ligand biotique ; ce qui permet d'appréhender l'effet protecteur des autres métaux cationiques présents dans le milieu ainsi que le rôle du pH (Di Toro et al., 2001). Enfin, la nature du ligand biotique (LB) auquel se fixe l'élément métallique va aussi déterminer les effets biologiques associés. Si le LB est un site physiologiquement actif, la fixation du métal va induire une réponse biologique directe alors que si le LB correspond plutôt à un site de transport, la fixation du métal entraînera son transport à travers la membrane, son entrée dans le cytosol et des réactions plus ou moins actives avec des ligands intracellulaires.

IV.2.1 Les ligands biotiques chez les organismes aquatiques (invertébrés et algues)

Chez les algues, comme chez plusieurs organismes aquatiques, on distingue deux types d'accumulation : l'adsorption et l'absorption (internalisation). Le premier phénomène implique la fixation de l'ETM sur les parois cellulaires (polysaccharides, peptidoglycanes, etc...) alors que le second fait intervenir des protéines facilitant le transport membranaire (Slaveykova and Wilkinson, 2002). Les membranes constituant les parois cellulaires sont donc considérées comme principaux ligands biotiques des microalgues. Chez les invertébrés aquatiques, les branchies sont généralement considérées comme étant le principal ligand biotique. Elles constituent une importante surface de contact avec le milieu extérieur et représentent le premier point de contact et d'échanges entre l'organisme et le milieu environnant (Marigómez et al., 2002).

V. Les ETM à l'intérieur des cellules

Une fois qu'un ETM traverse la membrane cellulaire, il fait face à un environnement intracellulaire qui est très différent de celui trouvé à l'extérieur de la cellule. Le pH intracellulaire est généralement neutre (environ 7), à l'exception des lysosomes où un pH acide est nécessaire pour l'activité des enzymes de l'appareil digestif (Han and Burgess, 2010). L'environnement intracellulaire peut avoir un potentiel redox moins oxydant que l'environnement extracellulaire réduisant ainsi, jusqu'à un certain seuil, le pouvoir oxydant des ETM (Auchinvole et al., 2012; Banerjee, 2012; Menon and Goswami, 2006). En outre, la nature de la plupart des ligands intracellulaires se liant aux métaux est différente de ceux trouvés à l'extérieur de la cellule. Dans l'environnement intracellulaire, un grand nombre de ligands a été identifié comme ayant des affinités importantes pour les ETM, y compris des protéines liant les métaux, des lysosomes et des concrétions minéralisées et organométalliques (Lavoie et al., 2009). Ces ligands, qui peuvent avoir de longues demi-vies biologiques, contribuent à la persistance de métaux essentiels et non essentiels dans l'environnement intracellulaire. De façon général, à l'intérieur de la cellule, les mécanismes de toxicité et de tolérance vis-à-vis des ETM sont liés à leur distribution intracellulaire (Crémazy et al., 2013b; Wallace et al., 2003). En effet, c'est leur liaison à des molécules dites « sensibles » ou dites « de détoxification » qui modulera leurs effets.

En ce qui concerne la liaison de l'ETM aux ligands intracellulaires, Nieboer and Richardson (1980) ont proposé une classification des ETM en trois groupes pour prédire le complexe métallique dans l'environnement intracellulaire sur la base des préférences de liaison aux différents ligands intracellulaires (Figure 5).

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La*	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac†	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt									

*	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
†	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr

Classe A
 Intermédiaire
 Classe B

* : Lanthanides † : Actinides

Figure 5 : Classification des métaux dans les classes A, B et intermédiaire selon Nieboer and Richardson (1980).

Les métaux de classe A se lient préférentiellement aux anions avec l'oxygène comme donneur d'électrons. Les métaux de classe B présentent une préférence pour les donneurs de soufre et d'azote présents à l'intérieur des cellules. Les métaux intermédiaires présentent des caractéristiques de liaison intermédiaires entre celles des métaux de classe A et B.

VI. Ecotoxicité des ETM

Plusieurs ETM sont reconnus pour avoir des effets tératogènes, mutagènes ou encore carcinogènes sur les organismes vivants (Bertin and Averbeck, 2006; Beyersmann and Hartwig, 2008; Roh et al., 2006). En pénétrant dans une cellule, les ETM peuvent provoquer une dépolarisation de la membrane et une acidification du cytoplasme (Cardozo et al., 2002). De plus, l'altération de la membrane peut conduire à une perturbation des transferts d'ions et donc de l'homéostasie intracellulaire (Pinto et al., 2003). Par ailleurs, les ETM perdent facilement des électrons et se retrouvent de ce fait sous forme de cations alors très réactifs. La toxicité des ions métalliques résulte de deux mécanismes principaux. D'une part, les ions métalliques peuvent avoir une affinité forte avec les sites de fixation de certaines protéines, impliquées par exemple dans la croissance cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN etc., et ainsi inactiver ces protéines. D'autre part, la majorité des métaux traces induisent des

dommages oxydatifs (Stohs and Bagchi, 1995; Valko et al., 2005). Ils catalysent des réactions d'oxydation (p.ex., réaction de Fenton) aboutissant à la formation de dérivés réactifs de l'oxygène, aussi appelés espèces réactives oxygénées (ROS), dont les principales sont le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet ($\text{O}_2\cdot^-$). La présence d'électrons en valence (libres) rend ces radicaux libres très réactifs. Les ROS provoquent d'importants effets délétères au niveau cellulaire (dommages à l'ADN, oxydation de protéines, peroxydation lipidique) (Ercal et al., 2001).

Une des principales atteintes dans le cas des organismes aquatiques photosynthétiques, notamment les microalgues, est la diminution de leur activité photosynthétique (Suresh Kumar et al., 2014). Les mitochondries et les chloroplastes des organismes photosynthétiques constituent des compartiments cellulaires très sensibles aux dommages oxydatifs en raison des flux d'électrons intenses dans leurs microenvironnements, qui présentent également de fortes capacités d'accumulation des ETM (Crémazy et al., 2013b; Lavoie et al., 2009; Pinto et al., 2003). L'inhibition de la photosynthèse peut être mise en évidence par la réduction de la fluorescence spécifique de la chlorophylle a, qui représente le pigment photosynthétique majeur des algues ou par mesure de l'activité du photosystème II (PSII).

VII. Mécanismes de détoxification des métaux

La détoxification comprend tous les processus, stratégies, ou mécanismes qui permettent de minimiser le potentiel d'un métal à interagir avec des macromolécules essentielles (Campbell and Couillard, 2004). Ces différentes stratégies de détoxification sont mises en place au niveau cellulaire et peuvent être résumées en trois types.

VII.1 Régulation des flux d'internalisation des ETM

La régulation de la concentration intracellulaire des ETM par limitation de leurs flux d'entrée chez les organismes aquatiques se fait par le biais de plusieurs stratégies (Rosabal-Rodriguez, 2015). En effet, plusieurs organismes modifient le mode, la vitesse et la voie d'absorption de l'ETM en modifiant la spéciation et la biodisponibilité d'ETM dans l'interface environnante. Par exemple, Vasconcelos and Leal, (2001) ont montré que des algues pouvaient produire des exsudats capables de complexer les ETM hors de la cellule. De façon similaire, l'algue verte *Cyanidium caldarium* limite l'internalisation des ETM en incorporant des éléments sous

forme de sulfures dans des microcristaux associés à sa membrane cellulaire externe (Wood and Wang, 1983).

Au niveau physique, la réduction de la taille cellulaire contribuerait également à limiter la surface exposée aux contaminants et donc à l'entrée des ETM dans la cellule (Cattaneo et al., 1998). Par ailleurs, de nombreux microorganismes, y compris les algues, produisent des substances polymériques extracellulaires qui confèrent une bonne adhésion entre les cellules d'une même communauté. Cette matrice organique peut jouer un rôle dans la protection contre les contaminants présents dans le milieu en limitant leur accessibilité aux cellules. Elle peut également piéger les ions métalliques en favorisant leur complexation (González et al., 2010; Ueshima et al., 2008).

VII.2 Favorisation de l'efflux des ETM

Pour diminuer la concentration intracellulaire en ETM, des mécanismes d'efflux et d'expulsion active sont induits et favorisent la tolérance aux polluants (Teitzel and Parsek, 2003). L'expulsion active des ETM (sous forme d'ions métalliques) par des pompes ATPasiques a été décrite chez des eucaryotes et des procaryotes (Hall, 2002; Nies, 2003; Silver and Phung, 2005).

VII.3 Séquestration intracellulaire des ETM

C'est une des importantes stratégies de détoxification des ETM chez les organismes aquatiques, qui peuvent, dans certains cas, accumuler des concentrations importantes d'ETM sans pour autant montrer des signes apparents de toxicité. Elle consiste en la liaison des ETM à une variété de ligands (p.ex., des protéines liant les métaux, des lysosomes, des concrétions minérales et organiques) qui diminuent les possibilités d'interaction avec d'autres constituants cellulaires.

La séquestration des ETM intracellulaires par des ligands, principalement les métallothionéines (MT) et les phytochélatines (PC), a été largement étudiée et mise en évidence chez différents organismes, des mammifères jusqu'aux organismes microscopiques. Ces ligands sont même utilisés comme biomarqueurs de pollutions métalliques (Amiard et al., 2006; Cobbett and Goldsbrough, 2002; Khati et al., 2012; Lavoie et al., 2009; Perales-Vela et al., 2006; Sigel et al., 2009) et ils sont impliqués dans la régulation cellulaire et la

détoxication de certains ETM (p.ex., Cd, Hg, Cu). Les métallothionéines sont des protéines cytosoliques de faible poids moléculaire et généralement stables à la chaleur. Comme les PC, les MT sont essentiellement caractérisées par la présence de groupements thiols et une haute teneur en cystéine (environ 30%) leur permettant de complexer efficacement les ETM (Sigel et al., 2009).

Etant donné l'affinité élevée des ETM pour les molécules contenant des groupements thiols et la présence de ces groupements dans des molécules autres que les MT, il n'est pas surprenant que le devenir intracellulaire des métaux soit également déterminé par d'autres ligands de liaison aux ETM. Ainsi, la séquestration d'éléments intracellulaires par d'autres ligands contenant des thiols, y compris le glutathion (GSH), a été identifiée dans plusieurs organismes aquatiques (Rosabal-Rodriguez, 2015).

En plus de l'implication des ligands dans la séquestration intracellulaire des ETM, cette dernière peut se faire également dans des structures compartimentées. Parmi ces structures on distingue notamment :

Les lysosomes : La séquestration des ETM dans ces organites représente une voie majeure de leur stockage et de leur détoxication (Marigómez et al., 2002). Le nombre de lysosomes ainsi que la stabilité et l'intégrité de leur membrane constituent des marqueurs de toxicité (Sokolova et al., 2005)

Les granules de stockage et de détoxication : Ces structures riches en ETM ont différentes appellations (p.ex., vésicules de stockage, concrétions et inclusions). Elles ont été mises en évidence chez différents organismes (souvent par microscopie électronique) et se sont avérés ayant une forte capacité de stockage d'ETM (Komine et al., 2000; Marigómez et al., 2002). Ce sont des précipités majoritairement composés de carbonates et de phosphates de calcium (Viarengo and Nott, 1993).

Partie 2

Le chrome

I. Le chrome dans l'environnement

Le nom « chrome » vient du grec « chroma », qui signifie « couleur », et se rapporte aux nombreux composés colorés qui contiennent du chrome. Il fut nommé par Vauquelin Nicolas Louis qui, en 1809, publia sa découverte du pigment jaune de chrome à partir de l'extraction du minéral crocoïse, le plomb rouge de Beresovsk de l'Oural (Pereira de Abreu et al., 2006).

Le chrome (Cr) est le 24^{ème} élément du tableau périodique de Mendeleïev, se situant entre le vanadium et le manganèse. Il a un poids atomique de 51,996, une densité de 7,14, un point de fusion de 1900°C, une dilatation thermique modérée et une structure cristalline cubique stable. En termes d'abondance, il est le septième élément sur Terre et le 21^{ème} dans la croûte terrestre avec une concentration avoisinant les 100 ppm (Barnhart, 1997). Le Cr a une configuration électronique $[Ar] 4s^1 3d^5$, particulière des éléments de transition, impliquant un nombre élevé de degrés d'oxydation allant de (-II) à (+VI) (Ščančar and Milačič, 2014). Les isotopes naturels du chrome sont ^{50}Cr , ^{52}Cr , ^{53}Cr , ^{54}Cr et plusieurs radioisotopes dont le ^{51}Cr est le plus stable avec une demi-vie de 27 jours.

Le chrome, en raison de sa dureté, de sa brillance, de son point de fusion élevé et de son caractère anticorrosif, est utilisé dans diverses activités industrielles telles que la galvanoplastie, la production d'acier et la fabrication automobile, le traitement du bois, le tannage des peaux, les plastiques et les applications militaires de défense (Viti et al., 2013). Par conséquent, des niveaux élevés de contamination en chrome peuvent se produire dans les milieux terrestres et aquatiques (eaux douces et marines). Même si le Cr peut exister sous différents états d'oxydation, dans l'environnement il se rencontre principalement sous deux états d'oxydation, le Cr(VI) et le Cr(III). Généralement, les rejets de Cr(VI) sont associés aux

activités industrielles de la production des aciers alors qu'une pollution en Cr(III) est reliée aux activités des tanneries (Bielicka et al., 2005; Ščančar and Milačič, 2014; Thompson et al., 2002). Les Cr(IV) et Cr(V), quant à eux, sont des formes intermédiaires instables des réactions entre agents oxydants et réducteurs du Cr(III) et Cr(VI). Le Cr(II) est facilement oxydable en Cr(III). En effet, les espèces du Cr(II) ne sont stables qu'en absence d'oxydants (p.ex., conditions anaérobiques) (Kotaš and Stasicka, 2000).

La quantité et les types de formes chimiques de chrome présentes dans les effluents dépendent du caractère des procédés industriels utilisant le chrome (Bielicka et al., 2005). L'atmosphère est devenue une voie importante pour le transfert à long terme du chrome vers différents écosystèmes. Les particules contenant du Cr dans l'atmosphère sont transportées sur différentes distances par le vent, avant qu'elles ne se déposent dans les milieux terrestres et aquatiques. Ces transferts du chrome à partir de l'atmosphère dépendent principalement des facteurs météorologiques, de la topographie et de la végétation (Bielicka et al., 2005). Cependant, le transport du Cr à l'intérieur des systèmes terrestres et aquatiques est grandement affecté par la spéciation chimique. Les processus de précipitation/dissolution et d'adsorption/désorption dans les différents compartiments individuels de l'environnement déterminent les processus de transport et de transformation entre les grands réservoirs que sont la géosphère, l'atmosphère et l'hydrosphère et donc le cycle biogéochimique de cet élément.

L'analyse de spéciation d'un élément donne des informations sur les concentrations individuelles des diverses formes chimiques de cet élément dans les échantillons environnementaux. L'intérêt de la spéciation du chrome provient de l'utilisation répandue de cet ETM en industrie. En raison de différents procédés industriels, de grandes quantités de composés du Cr sont déversées sous forme de déchets liquides, solides et gazeux dans l'environnement et peuvent avoir de significatifs effets biologiques et écologiques défavorables (Kotaš and Stasicka, 2000; Ščančar and Milačič, 2014).

II. Chimie du chrome dans les milieux aquatiques

Comme déjà mentionné ci-dessus, le chrome dans l'environnement existe principalement sous les deux états d'oxydation Cr(VI) et Cr(III). L'abondance relative de ces deux formes redox

dans les milieux concernés pourra varier en fonction de processus environnementaux contrôlant la spéciation du Cr. Compte-tenu des équilibres entre Cr(III) et Cr(VI) dans des solutions aérées, il faut souligner le rôle important joué par le pH et le potentiel redox. Cependant, la complexation et la formation d'espèces polynucléaires par le Cr(III) doit également être prise en compte. Le diagramme de Pourbaix, aussi appelé diagramme potentiel-pH (Eh-pH) est très utile pour la détermination de la spéciation environnementale à l'équilibre d'un ETM. Il indique sur un plan Eh-pH les domaines d'existence ou de prédominance des différentes formes (ions, complexes, précipités, etc..) d'un élément. Un tel diagramme pour le Cr dans des solutions aqueuses (eau pure) et en équilibre avec l'air est représenté sur la figure 6. Ce diagramme (Figure 6) est utile pour déterminer les différentes formes probables du Cr à un pH donné. Il est toutefois important de mentionner que ce diagramme se réfère à la spéciation du Cr dans l'environnement et ne prend pas en compte les contraintes cinétiques, et lorsque le Cr est introduit dans l'environnement naturel ou y existe, sa forme réelle peut différer de celle prédite par le diagramme (Kotaš and Stasicka, 2000). La présence de formes colloïdales ou particulaires n'est pas non plus prise en considération dans ce type de diagramme.

En général, le Cr(VI), formant des espèces chargées négativement, interagit peu avec la matière colloïdale et particulaire (portant aussi une charge nette négative) et est hautement mobile dans l'environnement. Au contraire, le Cr(III) est très réactif, et présente une spéciation dominée par des formes colloïdales ou particulaires ou encore par les espèces insolubles (Dominik et al., 2007; Vignati et al., 2010). Des interconversions entre les deux formes sont possibles. Ainsi, en présence de matière organique, le Cr(VI) est réduit en Cr(III) alors que, en présence d'hydroxydes de Mn, le Cr(III) peut être oxydé en Cr(VI) (Rai et al., 1989).

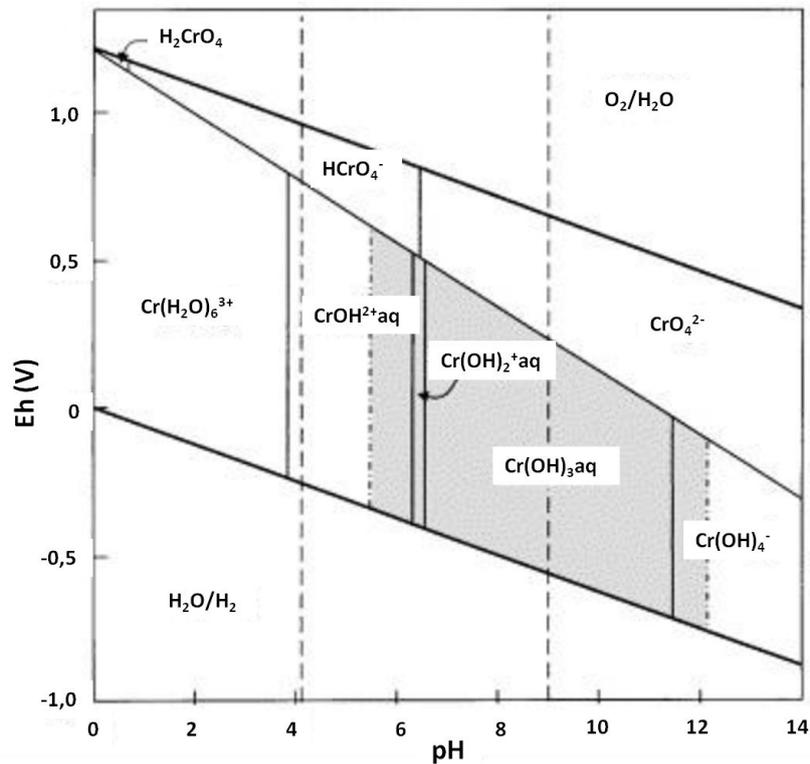


Figure 6 : Diagramme de Pourbaix simplifié pour les espèces de Cr dominant dans les solutions aqueuses aérées en l'absence de tout agent complexant, autre que H₂O et OH⁻ ; pour une raison de clarté, les molécules d'H₂O ne sont pas représentées. Figure modifiée d'après Kotaš and Stasicka (2000).

Le Cr(III) forme de nombreux complexes avec des composés organiques naturels différents, tels que des acides aminés, fulviques et humiques. Les complexes hydroxo de Cr(III) prédominent sa spéciation dans les eaux de surface (Rai et al., 1989). Dans les eaux naturelles, la complexation diminue généralement la précipitation du Cr(OH)₃aq dans les conditions de pH correspondantes (Figure 6). De plus, les complexes du Cr(III) (hydroxydes) sont fortement adsorbés par les solides ce qui réduit sa mobilité et sa biodisponibilité dans les systèmes aquatiques naturelles. En revanche, les espèces du Cr(VI) ne sont que faiblement adsorbées sur des surfaces inorganiques, ce qui la rend la forme la plus mobile du Cr dans l'environnement (Rai et al., 1989; Richard and Bourg, 1991).

II.1 Chimie du chrome hexavalent, Cr(VI)

Le Cr(VI) forme plusieurs espèces, dont les proportions relatives dépendent à la fois du pH et de la concentration totale de Cr(VI). La distribution selon le pH est illustrée dans la figure 7 (Alvarado et al., 2009). L'acide chromique ou chromate de dihydrogène, H₂CrO₄, appartient aux acides forts et il est persistant à un pH inférieur à 1. À pH entre 1 et 6, le chromate

hydrogène, HCrO_4^- , est la forme prédominante. Pour des concentrations élevées en Cr(VI), le dichromate, $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, est stable à des pH inférieurs à 6 (Figure 7) (Poulopoulou et al., 1997). Au-delà de pH 7, seuls les ions chromates, CrO_4^{2-} , existent en solution pour toutes concentrations (Figures 6 et 7).

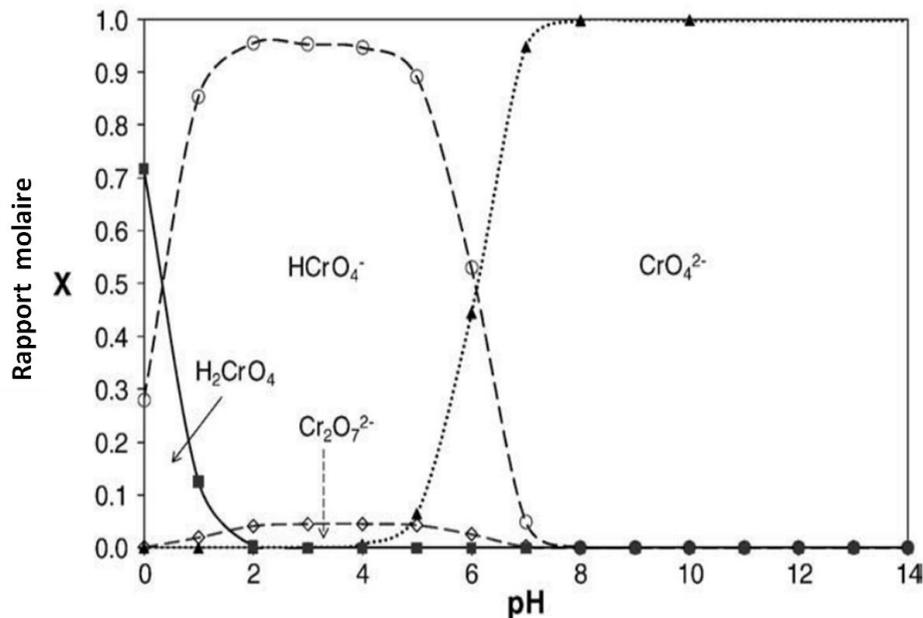
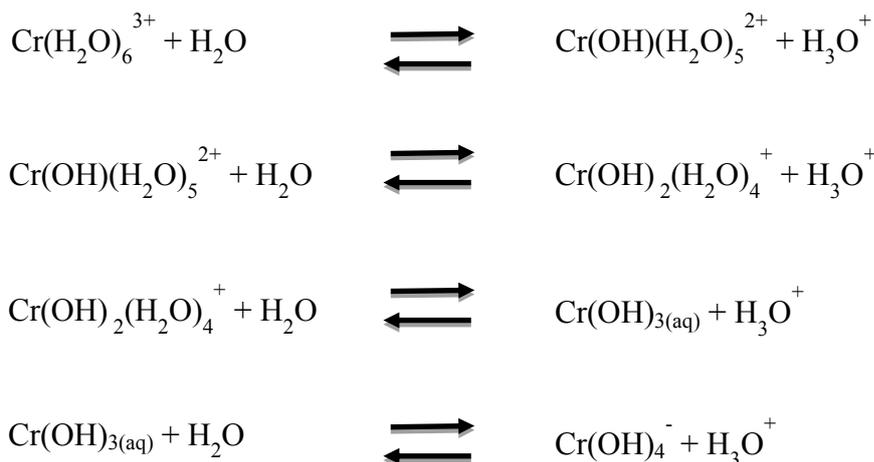


Figure 7 : Spéciation du Cr(VI) dans les solutions aqueuses (Alvarado et al., 2009). Le rapport molaire est la fraction de chaque espèce de Cr(VI) par rapport à la concentration totale donnée par la somme de toutes les espèces du Cr(VI).

II.2 Chimie du chrome trivalent, Cr(III)

La présence, la concentration et les formes de Cr(III) dans un compartiment donné de l'environnement dépendent de différents processus chimiques et physiques, tels que l'hydrolyse, la complexation, les réactions redox et l'adsorption. En absence de tout agent complexant, autre que H_2O ou OH^- , le Cr(III) existe sous forme de l'espèce $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ et sous forme de produits de son hydrolyse (Figure 6). En effet, le Cr(III) forme des complexes hydroxo en solution aqueuse (liaisons avec des groupements hydroxyles, OH^-). Les réactions d'hydrolyses ont été décrites par Rai et al. (1987) et sont résumées ci-dessous :



La stabilité des espèces hydrolysées du Cr(III) dépend de leur pKa et leur répartition en fonction du pH est présentée sur la figure 8. L'hydroxyde de Cr(III), $\text{Cr(H}_2\text{O)}_3(\text{OH})_3$, présente un comportement amphotère avec un minimum de solubilité entre 7 et 10 unités de pH. L'espèce $\text{Cr(H}_2\text{O)}_5(\text{OH})^{2+}$ est stable dans une gamme de pH allant de 3,5 à 6,5 alors que le cation $\text{Cr(H}_2\text{O)}_4(\text{OH})_2^+$ est peu abondant. L'espèce $\text{Cr(H}_2\text{O)}_6^{3+}$ prédomine lorsque le pH est inférieur à 3 unités pH, contrairement à l'oxyanion, $\text{Cr(H}_2\text{O)}_2(\text{OH})_4^-$ qui se forme au-delà de pH 12 (Figures 6 et 8) (Pereira de Abreu et al., 2006).

A un pH proche de 7, les espèces dissoutes du Cr(III) portent une charge positive et la spéciation de cette forme redox est dominée par la formation des hydroxydes insolubles Cr(OH)_3^0 (Rai et al., 1989). La présence du fer peut réduire davantage la solubilité du Cr(III) par suite de formation des hydroxydes mixtes Fe-Cr. La faible solubilité de Cr(OH)_3^0 et Fe- Cr(OH)_3 contrôle la concentration soluble du Cr(III) dans un milieu aqueux. Les solubilités des hydroxydes de Cr(III) en fonction du pH sont résumées dans la figure 9.

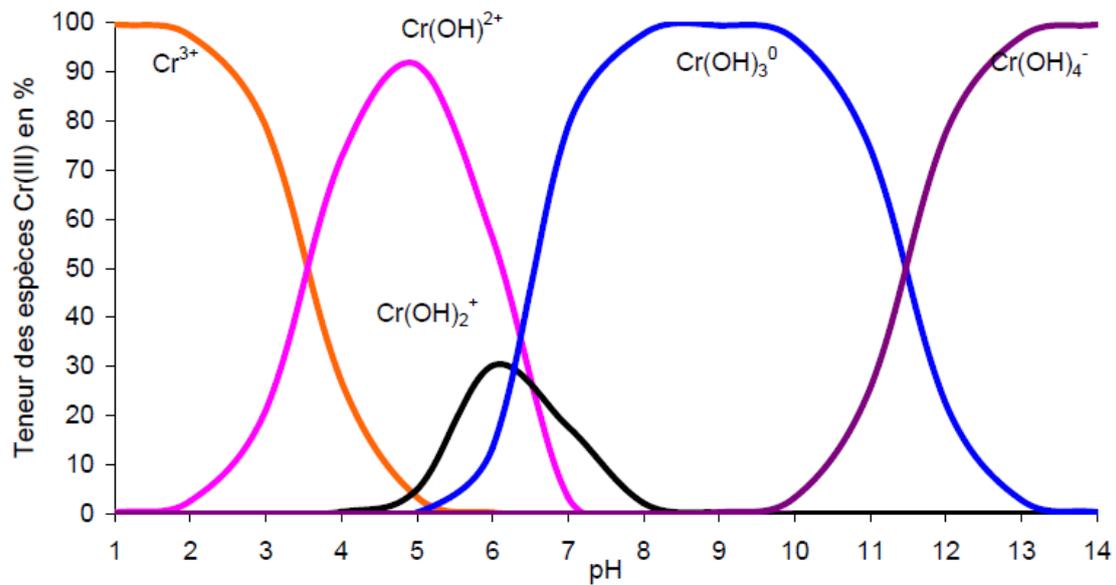


Figure 8 : Prédominance des espèces de Cr(III) (en %) en fonction du pH. Pour une raison de clarté, les molécules d' H_2O ne sont pas représentées. Source : Pereira de Abreu (2006).

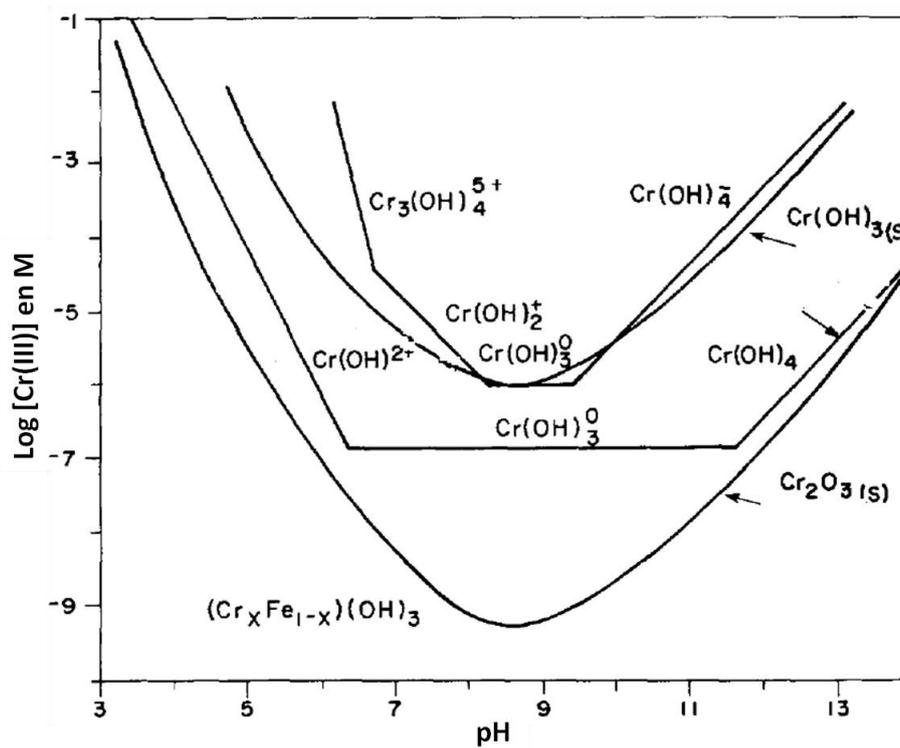


Figure 9 : Solubilité des hydroxydes de Cr(III) dans des solutions aqueuses en fonction du pH. Figure modifiée d'après Salem et al. (1989).

II.3 Le chrome dans les milieux aquatiques naturels

Dans les milieux aquatiques non contaminés, le chrome se retrouve habituellement à des concentrations totales inférieures à 20 nM ($\sim 1 \mu\text{g/L}$), la moyenne se situant entre 3 et 10 nM, bien que des concentrations naturelles allant jusqu'à $4 \mu\text{M}$ ($200 \mu\text{g/L}$) aient été observées (Richard and Bourg, 1991). Plus récemment, en se basant sur les concentrations dissoutes de différents ETM mesurées après filtration à 0,22 ou $0,45 \mu\text{m}$ dans des échantillons provenant de différentes rivières (p.ex., Amazone, Garonne, Mississippi, etc...) à travers le monde, le chrome a été classé dans les 10 ETM les plus abondants avec des concentrations moyennes entre 0 et $10 \mu\text{g/L}$ (Figure 10) (Gaillardet et al., 2003). Des concentrations particulièrement élevées (jusqu'à $730 \mu\text{g/L}$) peuvent se retrouver dans des régions minières (Gunkel-Grillon et al., 2014).

Dans les eaux marines, les concentrations en Cr sont plus faibles comparées à celles retrouvées dans les eaux douces. En effet, selon Zayed and Terry, (2003) dans les zones non polluées, les concentrations en Cr dans les eaux marines varient entre 0 et $0,5 \mu\text{g/L}$. Une concentration de Cr d'environ 4 nM ($0,2 \mu\text{g/L}$) est considérée comme concentration moyenne du Cr dans les océans (Mason, 2013).

Dans les milieux aquatiques, le chrome se rencontre principalement sous ses deux formes redox Cr(III) et Cr(VI). Le Cr(III) doit être la seule forme sous des conditions anoxiques ou suboxiques. Les espèces du Cr(III) sont stables à $\text{pH} \leq 6$, alors qu'à $\text{pH} \geq 7$, les ions CrO_4^{2-} devraient prédominer dans les solutions aqueuses oxygénées. Pour des valeurs de pH intermédiaires, le rapport Cr(III)/Cr(VI) dépend de la concentration en O_2 . Dans les eaux de surface oxygénées, le pH, la concentration en O_2 , la présence et la concentration de réducteurs et d'agents complexants sont importants pour l'apparition de quantités significatives de Cr(III). En même temps, le Cr(III) est facilement oxydé en Cr(VI) en présence d'oxydes de manganèse dans les conditions prévalant dans les eaux naturelles (Richard and Bourg, 1991). Différentes études ont étudié la spéciation en déterminant le rapport du Cr(III) et du Cr(VI) par rapport au Cr total dans différents milieux naturels (Krishna et al., 2005; Bourotte et al., 2009; Dominik et al., 2007; Fantoni et al., 2002; Ndung'u et al., 2010; Saputro et al., 2014). Ces résultats montrent que les concentrations relatives du Cr(VI) et du Cr(III) dans un milieu dépendent de différentes conditions telles que le pH, la teneur en oxygène (selon qu'il s'agit

d'eaux de surface ou souterraines), les conditions géologiques du site de prélèvement (roches volcaniques, chromites, ophiolites).

En effet, des rapports de 80% de Cr(III) (0,04 µg/L) et de 20% de Cr(VI) (0,01 µg/L) ont été reportés par Cranston and Murray, (1978) dans des eaux de rivières à des conditions anoxiques. Cette même étude a précisé des rapports de 94% de Cr(VI) (0,17 µg/L) et de 6% de Cr(III) (0,01 µg/L) dans des eaux de rivières en conditions oxiques. Dans une autre étude réalisée en Brésil (Bourotte et al., 2009), des rapports de 39% de Cr(VI) (44 µg/L) et de 61% de Cr(III) (70 µg/L) ont été trouvés dans des eaux d'un puits. Des teneurs plus importantes peuvent être rencontrées dans l'environnement selon la présence des sources de pollution en chrome. En effet, Krishna et al, (2005) ont étudié la spéciation des deux formes dans des échantillons de différentes eaux usées. Des rapports de 90% de Cr(VI) (4,3 mg/L) et 10% de Cr(III) (0,46 mg/L) ont été trouvés dans des effluents de tanneries, d'autres de 61% de Cr(VI) (72 µg/L) et de 39% de Cr(III) (44 µg/L) ont été mesurés dans des rejets d'industrie pharmaceutique ou enfin des rapports de 94% de Cr(VI) (184 µg/L) et de 6% de Cr(III) (12 µg/L) ont été détectés dans des eaux souterraines proches de mines de chromite.

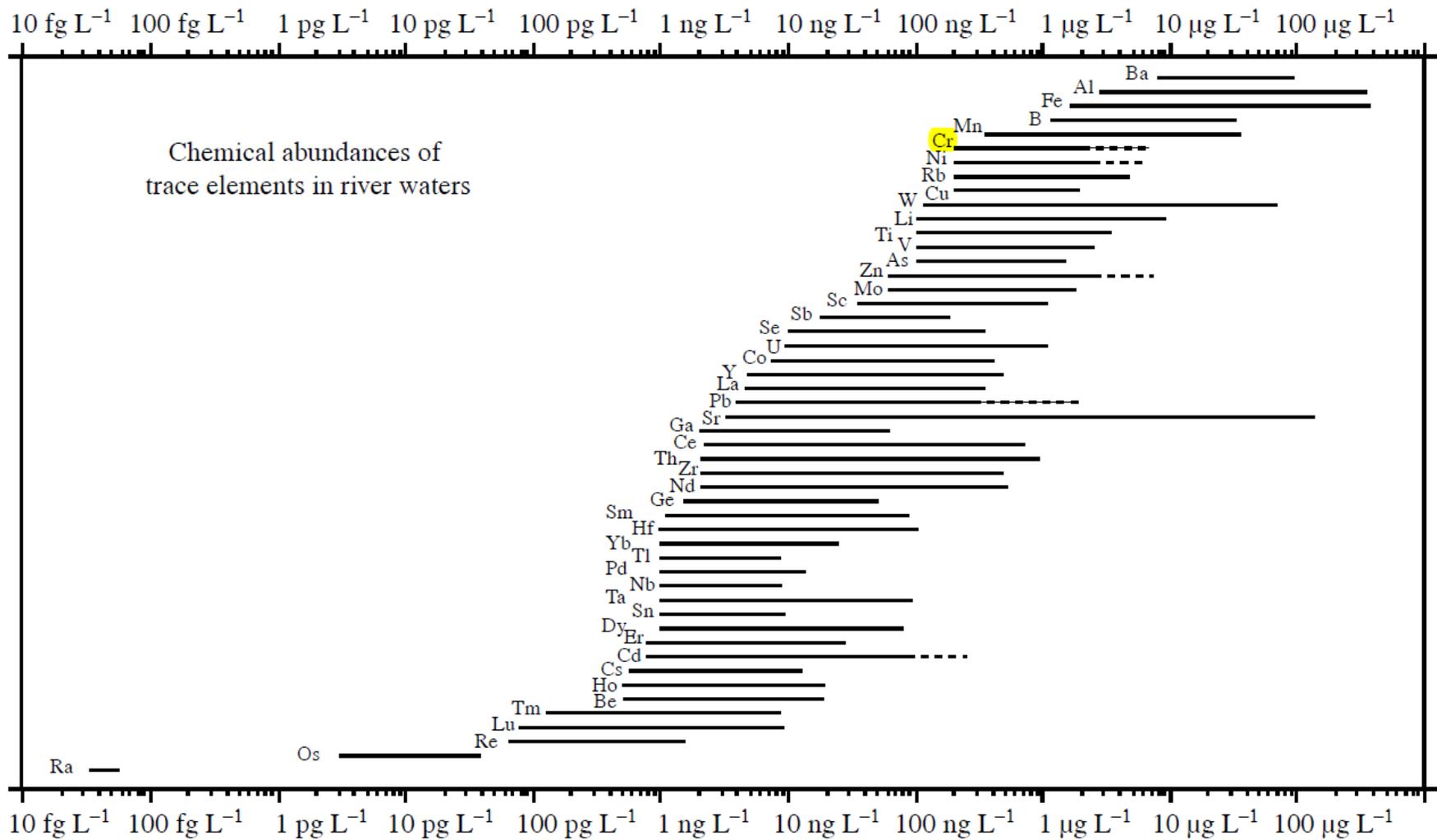


Figure 10 : Ordre de grandeur des concentrations en ETM dans la charge dissoute de différentes rivières à travers le monde (Gaillardet et al., 2003).

III. Internalisation et écotoxicité du chrome

Le chrome est un exemple illustratif de la façon dont la spéciation affecte le comportement et la toxicité d'un élément donné. Le Cr(III) a classiquement été considéré comme un micro-nutriment essentiel dans l'alimentation des animaux et des humains. Néanmoins, ce rôle d'élément essentiel pour le Cr (dans sa forme trivalente) a été récemment remis en question. En effet, des rats carencés en Cr(III) n'ont pas eu de conséquences négatives sur leur composition corporelle, leur métabolisme du glucose ou leur sensibilité à l'insuline par rapport aux rats non carencés (Di Bona et al., 2010). De plus, les complexes du Cr(III) peuvent être potentiellement génotoxiques (Levina et al., 2003; Levina and Lay, 2008) et leur utilisation dans les traitements micro-nutritifs ou antidiabétiques doit être reconsidérée (Di Bona et al., 2010; Levina and Lay, 2008).

Dans les solutions aqueuses, la forme trivalente Cr (III) est considérée comme relativement immobile, peu soluble et d'un intérêt écotoxicologique limité par rapport au Cr (VI) qui est mobile, soluble et hautement biodisponible. En effet, le chromate (Cr(VI)) traverse facilement la membrane cellulaire via les voies d'absorption des sulfates et des phosphates avec lesquels il a une grande similarité structurale (Cervantes et al., 2001; Viti et al., 2013); alors que les mécanismes d'internalisation du Cr(III) restent moins connus. Certaines études considèrent que le Cr(III) serait incapable de passer à travers les membranes cellulaires (Czakó-Vér et al., 1999; Francisco et al., 2002) ; ce qui expliquerait sa moindre toxicité par rapport au Cr(VI). D'autres travaux suggèrent toutefois que le Cr(III) serait aussi capable d'entrer dans les cellules procaryotes en utilisant la voie d'internalisation du Fe(III) ou dans les cellules eucaryotes par perturbation de la fluidité membranaire (Viti et al., 2013).

Une fois à l'intérieur des cellules, le Cr(VI) est rapidement réduit en Cr(III) due à diverses enzymes et à des activités non enzymatiques (Ramírez-Díaz et al., 2008) (Figure 11). Cette réduction intracellulaire du Cr(VI) par l'intermédiaire d'agents réducteurs cellulaires (p.ex., acide ascorbique et glutathion) entraîne la production de plusieurs intermédiaires réactifs, Cr(V) et/ou Cr(IV) (Kanmani et al., 2011; Ortega et al., 2005; Suzuki et al., 1992; Viti et al., 2013), qui peuvent provoquer directement des altérations de l'ADN et des effets toxiques (Shi and Dalal, 1990; Viti et al., 2013) (Figure 11).

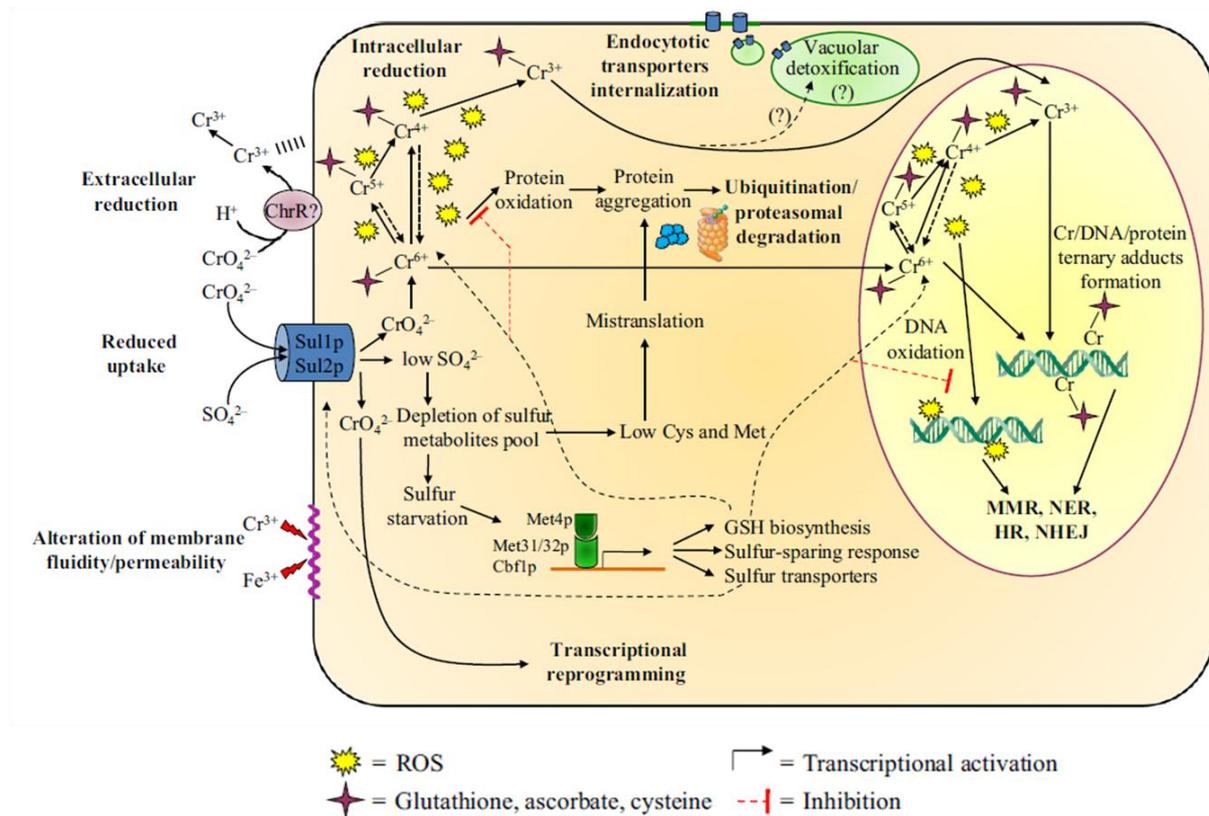


Figure 11 : Interactions du Cr(VI) et du Cr(III) avec les composantes cellulaires et les possibles réactions d'interconversion entre les deux formes redox du Cr à l'intérieur des cellules ; figure extraite de Viti et al. (2013).

La réduction de Cr(VI) en Cr(III) s'accompagne d'une oxydation de l'oxygène moléculaire en radical superoxyde, qui produit à son tour du peroxyde d'hydrogène. Le Cr(V) génère des radicaux hydroxyles par réaction avec le peroxyde d'hydrogène (Shi and Dalal, 1990). Par conséquent, des espèces réactives d'oxygène (ROS) sont générées lors de la réduction progressive de Cr(VI) en Cr(III). En effet, le Cr(V) et le Cr(IV), intermédiaires de la réduction intracellulaire du Cr(VI) en Cr(III), produisent un large spectre de dommages génomiques tels que des ruptures de brins d'ADN, des sites labiles en milieu alcalin, des adduits protéines-ADN et des réticulations ADN-ADN (Codd et al., 2001). Sumner et al, (2005) ont rapporté que les dommages oxydatifs aux protéines constituent un mécanisme central de la toxicité du Cr(VI). Le Cr(VI) peut également se lier à des matériaux cellulaires et, par conséquent, perturber leurs fonctions physiologiques normales (Kanmani et al., 2011; Sumner et al., 2005) (Figure 11). En outre, le Cr(III) affecte la réplication de l'ADN, provoque la mutagenèse et altère la structure et l'activité des enzymes en réagissant avec leurs groupements carboxyles et thiols (Bridgewater et al., 1994; Cervantes et al., 2001; Sobol and Schiestl, 2012; Tsou et al., 1996).

Plusieurs revues récentes ont résumé les mécanismes de tolérance au Cr(VI) (Poljsak et al., 2010; Ramírez-Díaz et al., 2008). Les principaux mécanismes décrits dans la littérature sont : des pompes d'efflux du Cr(VI) (Branco et al., 2008; Nies et al., 2006), la réduction extracellulaire du Cr(VI) en Cr(III) (Belchik et al., 2011; Chovanec et al., 2012; Gnanamani et al., 2010; Priester et al., 2006), la présence d'enzymes impliquées dans les processus de détoxification des ROS (Ackerley et al., 2004a, 2004b; Cheng et al., 2009), la réparation des lésions de l'ADN (Hu et al., 2005; Llagostera et al., 1986; Miranda et al., 2005) et l'interaction avec différentes formes de soufre (Christl et al., 2012; Viti et al., 2009) (Figure 11).

Les effets des métaux en général et du chrome en particulier sur l'activité photosynthétique ont été largement étudiés chez différents organismes, y compris les microalgues. En effet, plusieurs études ont montré que la photosynthèse est l'une des cibles importantes de la toxicité des métaux (Appenroth et al., 2003; Hörsik et al., 2007; Küpper et al., 2002). De plus, l'activité du photosystème II des microalgues a été souvent utilisée dans des essais de cytotoxicité (Bengtson Nash et al., 2005). Toutefois, nous avons remarqué que tous les travaux rencontrés dans la littérature étudiant l'effet du Cr sur l'activité photosynthétique avaient utilisé le Cr(VI) comme contaminant (Ali et al., 2006; Appenroth et al., 2001; Hörsik et al., 2007; Khalida et al., 2012; Susplugas et al., 2000) à l'exception d'une étude récente où l'effet des nanoparticules d'oxydes de chrome Cr₂O₃ sur le PSII de *C. reinhardtii* a été étudié (da Costa et al., 2016). Dans le cadre de notre travail, nous avons étudié simultanément les effets des deux formes de Cr (Cr(III) et Cr(VI)) sur le PSII de l'algue verte *P. subcapitata*.

Etant donné le nombre élevé de données disponibles sur l'écotoxicité du Cr(III) et du Cr(VI) vis-à-vis des organismes aquatiques, seules les études retenues pour l'élaboration des valeurs toxicologiques de référence par l'organisation mondiale de santé (OMS) dans ses rapports CICAD (Concise International Chemical Assessment Document) 76 (OMS, 2009) pour le Cr(III) et CICAD 78 (OMS, 2013) pour le Cr(VI) sont résumées et discutées ici (Tableaux 1 et 2). Ces valeurs écotoxicologiques sont utilisées par l'OMS pour déterminer les valeurs PNEC (Predicted No Effect Concentration : valeurs définissant le seuil utilisé en évaluation des risques environnementaux des substances chimiques) pour le Cr(III) et le Cr(VI) dans le but de la protection de 95% des espèces aquatiques. Des études supplémentaires réalisées

chez les algues et les bivalves, mais non retenues par l'OMS lors du calcul des PNEC, sont aussi examinées en vue de leur pertinence vis-à-vis de ce travail.

III.1 Ecotoxicité du Cr(VI) chez les organismes aquatiques

La toxicité aiguë du Cr(VI) dépend de plusieurs facteurs environnementaux, dont le pH, la dureté de l'eau, la salinité et la température. En général, la toxicité du Cr(VI) augmente avec la diminution du pH (de 8 à 6), l'augmentation de la température (de 15 à 25 °C) et la diminution de la dureté ou la salinité du milieu aqueux. Cependant, les études à long terme disponibles ne semblent pas démontrer une dépendance évidente de la toxicité sur les propriétés du milieu aqueux. Une comparaison entre les organismes d'eau douce et d'eau salée montre que les premiers semblent être plus sensibles (Figure 12). Toutefois, la sensibilité des organismes d'eau salée semble être comparable à celle des organismes d'eau douce lorsqu'ils sont exposés au Cr(VI) dans de l'eau de faible salinité (< 2‰). Plusieurs études de l'écotoxicité du Cr(VI) chez les organismes aquatiques sont résumées dans le tableau 1. Plusieurs valeurs de NOEC (la plus forte concentration testée à laquelle aucun effet sur les organismes vivants n'a été observé) entre 0,0005 et 0,68 mg/L ont été déterminées chez différents organismes micro et macroscopiques. La PNEC pour les organismes dulçaquicoles calculée sur la base de la limite de confiance à 95% de la concentration dangereuse pour la protection de 95% des espèces (5^{ième} percentile de la sensibilité des espèces), à savoir la HC5-95%, est égale à 4 µg/L. Dans l'eau salée, le chrome (VI) devrait être moins toxique, sauf peut-être quand la salinité est très faible (CICAD 78, OMS 2013).

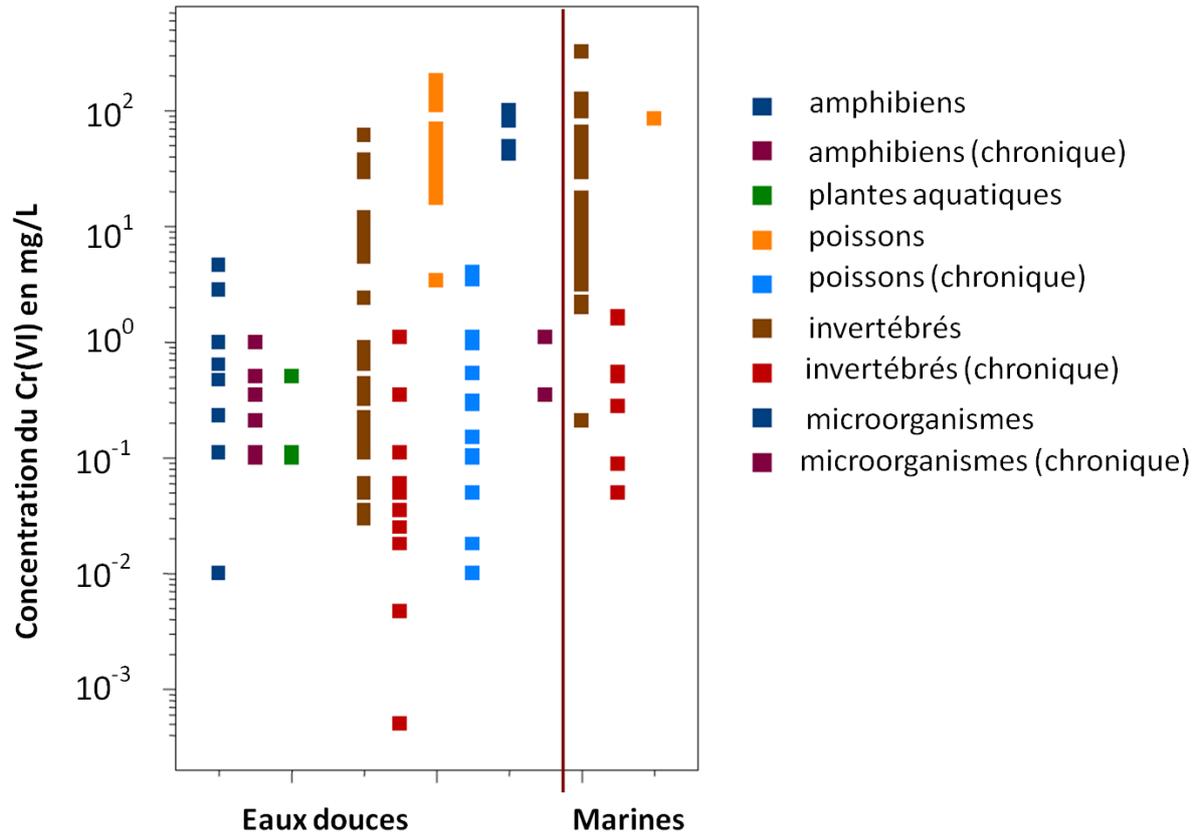


Figure 12 : Toxicité du Cr(VI) vis-à-vis des organismes aquatiques ; figure extraite du rapport CICAD 78 de l'OMS (2013).

Tableau 1: Etudes ayant évalué la toxicité du Cr(VI) chez les organismes aquatiques. La première partie du tableau résume les données ayant été utilisées par l'OMS (CICAD 78, OMS 2013) pour la détermination de la PNEC dans les eaux douces. La deuxième partie du tableau comporte d'autres études (non retenues dans l'élaboration de la PNEC) menées chez les algues et les bivalves; MG : moyenne géométrique.

Modèle	Espèces	Substance testée	Critère d'effet	[Cr] mg/L	Référence
Etudes retenues par l'OMS pour la détermination de la PNEC					
Algues	<i>Microcystis aeruginosa</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 96 h (croissance)	0,35	Slooff et Canton, 1983
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 96 h (biomasse)	0,1	Meisch et Schmitt-Beckmann, 1979
	<i>Chlorella sp.</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 96 h (biomasse)	0,1	Meisch et Schmitt-Beckmann, 1979
	<i>Scenedesmus pannonicus</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 96 h (biomasse)	0,11	Slooff et Canton, 1983
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	CE10 après 72 h (croissance)	0,11	Nyholm, 1991
Macrophytes	<i>Lemna gibba</i>	Na ₂ CrO ₄	NOEC après 8 j (croissance)	0,1	Staves et Knaus, 1985
	<i>Lemna minor</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 7 j (croissance)	0,11	Slooff et Canton, 1983
	<i>Spirodela polyrhiza</i>	Na ₂ CrO ₄	NOEC après 8 j (croissance)	0,1	Staves et Knaus, 1985
	<i>Spirodela punctata</i>	Na ₂ CrO ₄	NOEC après 8 j (croissance)	0,5	Staves et Knaus, 1985
Crustacés	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 7 j (reproduction)	0,0047	De Graeve et al., 1992
	<i>Daphnia carinata</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 14 j (reproduction)	0,05	Hickey, 1989
	<i>Daphnia magna</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 21 j (reproduction)	0,018	Kühn et al, 1989
	<i>Daphnia magna</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 14 j (reproduction)	0,025	Hickey, 1989
	<i>Daphnia magna</i>	Na ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 14 j (reproduction)	0,0005	Elnabarawy et al., 1986
Coelentérés	<i>Hydra littoralis</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 11 j (reproduction)	0,035	Dannenbergh, 1984
	<i>Hydra oligactis</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 21 j (croissance)	1,1	Slooff et Canton, 1983
Insectes	<i>Culex pipiens</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 25 j (Développement)	1,1	Slooff et Canton, 1983
Mollusques	<i>Lymnaea stagnalis</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 40 j (reproduction)	0,11	Slooff et Canton, 1983
Poissons	<i>Catostomus commersoni</i>	Na ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 60 j (croissance)	0,29	Sauter et al., 1976
	<i>Esox lucius</i>	Na ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 20 j (survie)	0,538	Sauter et al., 1976
	<i>Ictalurus punctatus</i>	Na ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 30 j (croissance)	0,15	Sauter et al., 1976

Suite du Tableau 1

Modèle	Espèces	Substance testée	Critère d'effet	[Cr] mg/L	Référence
Poissons	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Na ₂ Cr ₂ O ₇	MG de NOEC après 60 j et 8 m	0,07	Benoit, 1976; Hamilton et Buhl, 1990
	<i>Oryzias latipes</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 40 j (comportement)	3,5	Slooff et Canton, 1983
	<i>Pimephales promelas</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	MG de NOEC après 7, 60 et 412 j (croissance)	0,68	De Graeve et al., 1991; Pickering, 1980; Broderius et Smith, 1979
	<i>Poecilia reticulata</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 28 j (croissance)	3,5	Slooff et Canton, 1983
	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Na ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 8 j (croissance)	0,01	Benoit, 1976
	<i>Salvelinus namaycush</i>	Na ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 60 j (croissance)	0,105	Sauter et al., 1976
Amphibiens	<i>Xenopus laevis</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 100 j (mortalité)	0,35	Slooff et Canton, 1983
Etudes non retenues par l'OMS pour la détermination de la PNEC					
Algues	<i>Lyngbya sp.</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 18 j (croissance)	0,1	Cairns et al., 1978
	<i>Chlamydomonas sp.</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 10 j (croissance)	0,5	Cairns et al., 1978
	<i>Chlorella vulgaris</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	CE ₅₀ après 72 h (croissance)	0,47	Jouany et al., 1982
	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	CE ₁₀ après 72 h (croissance)	0,64	Kühn et Pattard, 1990
	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	CE ₅₀ après 72 h (croissance)	4,6	Kühn et Pattard, 1990
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	CE ₅₀ après 72 h (croissance)	0,99	Nyholm, 1991
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	CE ₁₀ après 72 h (croissance)	0,01	Christensen et al., 1983
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	CE ₅₀ après 72 h (croissance)	0,23	Christensen et al., 1983
	<i>Skeletonema costatum</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	NOEC après 120 h (croissance)	0,35	Cowgill et al., 1989
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	CE ₅₀ après 72 h	0,15	Vignati et al., 2010
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Na ₂ CrO ₄	CE ₅₀ après 72 h	0,17	Vignati et al., 2010
	<i>Chlorella kessleri</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	CE ₅₀ après 72 h	0,26	Vignati et al., 2010
Invertébrés (bivalves)	<i>Crassostrea gigas</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	CE ₅₀ après 48 h	4,5	Martin et al., 1981
	<i>Rangia cuneata</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	CL ₅₀ après 96 h	0,21 - 35	Olson et Harrel, 1973

III.2 Ecotoxicité du Cr(III) chez les organismes aquatiques

Les données toxicologiques relatives au Cr(III) sont principalement tirées d'études portant sur des dérivés hydrosolubles (chlorures, sulfates et nitrates de Cr(III)). Plusieurs études réalisées avec du Cr(III) chez les organismes aquatiques sont résumées dans le tableau 2 et la figure 13. Généralement le Cr(III) se montre moins écotoxique comparé au Cr(VI) chez les organismes aquatiques. Selon le rapport CICAD 76 de l'OMS (OMS, 2009), plusieurs études ont été utilisées pour la détermination et le calcul d'une valeur guide (PNEC) pour le Cr(III) dans les eaux douces. En effet, pour une protection de 99 % des espèces d'eau douce, l'OMS reporte une valeur-guide modérément fiable de 10 µg/L de Cr(III) avec un taux de confiance de 50%.

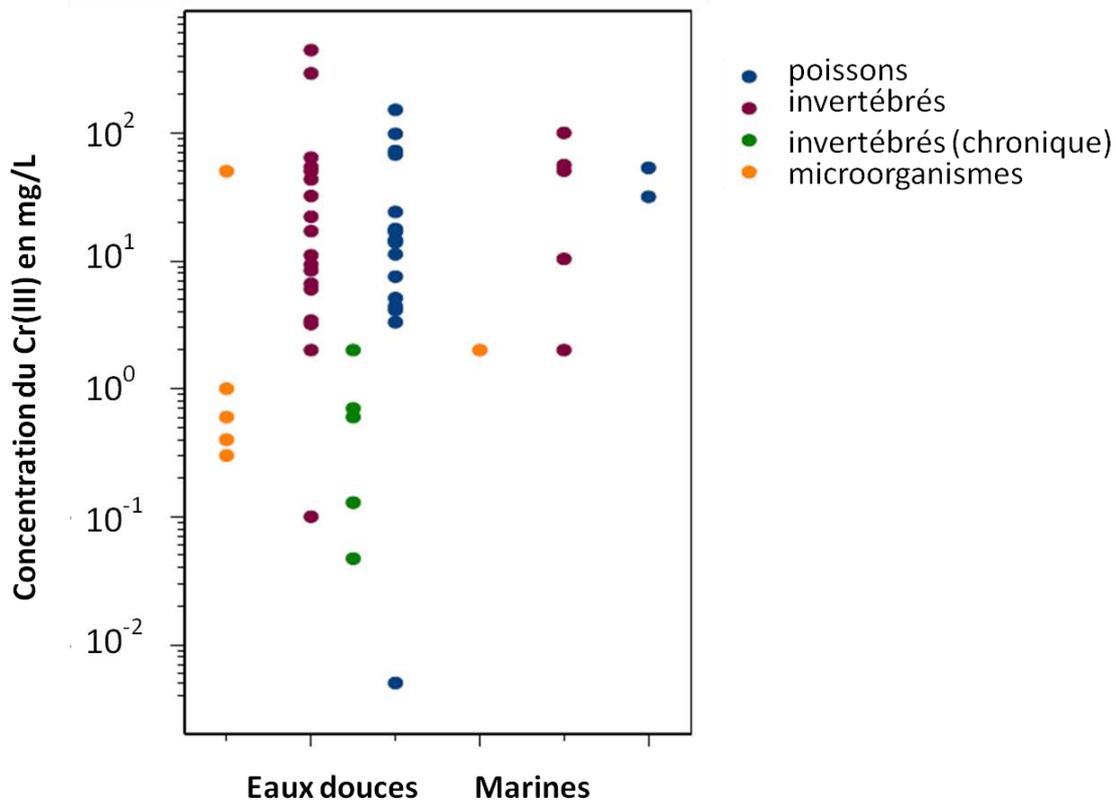


Figure 13 : Toxicité du Cr(III) vis-à-vis des organismes aquatiques ; figure extraite du rapport CICAD 76 de l'OMS (2009).

Tableau 2 : Etudes ayant évalué la toxicité du Cr(III) chez les organismes aquatiques. La première partie du tableau résume les données ayant été utilisées par l'OMS (CICAD 76, OMS 2009) pour la détermination de la PNEC dans les eaux douces. La deuxième partie du tableau comporte d'autres études (non retenues dans l'élaboration de la PNEC) menées chez les algues et les bivalves.

Modèle	Espèces	Substance testée	Critère d'effet	[Cr] mg/L	Référence
Etudes retenues par l'OMS pour la détermination de la PNEC					
Algues	<i>Selenastrum capricornutum</i>	CrCl ₃	CE ₅₀ après 96 h (croissance)	0,4	USEPA (1985)
Protozoaires	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	CrCl ₃	CL ₅₀ après 9 h (croissance)	50	Sauvant et al., 1995
Invertébrés	<i>Amnicola sp.</i>	-	CL ₅₀ après 96 h	8,4	Rehwoldt et al., 1973
	<i>Nais sp.</i>	-	CL ₅₀ après 96 h	9,3	Rehwoldt et al., 1973
	<i>Daphnia magna</i>	Cr(NO ₃) ₃	NOEC (cycle de vie)	0,047 et 0,129	USEPA (1985)
	<i>Daphnia pulex</i>	CrCl ₃	CL ₅₀ après 96 h	0,1 - 6	Stackhouse et Benson, (1989)
	<i>Asellus aquaticus</i>	CrCl ₃	CL ₅₀ après 96 h	442	Martin et Holdich, (1986)
	<i>Gammarus sp.</i>	-	CL ₅₀ après 96 h	3,2	Rehwoldt et al., 1973
	<i>Crangonyx pseudogracilis</i>	CrCl ₃	CL ₅₀ après 96 h	291	Martin et Holdich, (1986)
	<i>Austropotamobius pallipes</i>	CrCl ₃	CL ₅₀ après 96 h	3,4	Boutet et Chaisemartin, (1973)
	<i>Orconectes limosus</i>	CrCl ₃	CL ₅₀ après 96 h	6,6	Boutet et Chaisemartin, (1973)
	<i>Ephemerella subvaria</i>	CrCl ₃	CL ₅₀ après 96 h	2	Warnick et Bell, (1969)
	<i>Hydropsyche betteni</i>	CrCl ₃	CL ₅₀ après 96 h	64	Warnick et Bell, (1969)
	<i>Caddis fly (non identifiée)*</i>	-	CL ₅₀ après 96 h	50	Rehwoldt et al., 1973
	<i>Acroneturia lycorias</i>	CrCl ₃	CL ₅₀ après 7 j	32	Warnick et Bell, (1969)
	<i>Damsel fly (non identifiée)#</i>	-	CL ₅₀ après 96 h	43,1	Rehwoldt et al., 1973
<i>Chironomus sp.</i>	-	CL ₅₀ après 96 h	11	Rehwoldt et al., 1973	
Poissons	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Cr(NO ₃) ₃	NOEC après 72 h (survie)	0,05	Stevens et Chapman, (1984)
	<i>Carrasius auratus</i>	CrK(SO ₄) ₂	CL ₅₀ après 96 h	4,1	Pickering et Henderson, (1966)
	<i>Cyprinus carpio</i>	-	CL ₅₀ après 96 h	14,3	Rehwoldt et al., 1972
	<i>Pimephales promelas</i>	CrK(SO ₄) ₂	CL ₅₀ après 96 h	5,1 - 67,4	Pickering et Henderson, (1966)
	<i>Lepomis macrochirus</i>	CrK(SO ₄) ₂	CL ₅₀ après 96 h	7,5 - 71,9	Pickering et Henderson, (1966)
	<i>Lepomis gibbosus</i>	-	CL ₅₀ après 96 h	17	Rehwoldt et al., 1972

Suite du tableau 2

Modèle	Espèces	Substance testée	Critère d'effet	[Cr] mg/L	Référence
Poissons	<i>Fundulus diaphanous</i>	-	CL ₅₀ après 96 h	16,9	Rehwoldt et al., 1972
	<i>Roccus saxatilis</i>	-	CL ₅₀ après 96 h	17,7	Rehwoldt et al., 1972
	<i>Roccus americanus</i>	-	CL ₅₀ après 96 h	14,4	Rehwoldt et al., 1972
	<i>Aristichthys nobilis</i>	-	CL ₅₀ après 96 h	151	Wong et al., 1982
	<i>Poecilia reticulata</i>	CrK(SO ₄) ₂	CL ₅₀ après 96 h	3,3	Pickering et Henderson, (1966)
	<i>Anguilla rostrata</i>	-	CL ₅₀ après 96 h	13,9	Rehwoldt et al., 1972
Etudes non retenues par l'OMS pour la détermination de la PNEC					
Algues	<i>Selenastrum capricornutum</i>	-	CE ₅₀ après 24 h	>1	Turbak et al., 1986
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	CrCl ₃	CE ₅₀ après 96 h (biomasse)	0,3	Greene et al., 1988
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	-	CE ₅₀ après 14 à 21 j (biomasse)	0,6	Turbak et al., 1986
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	CrK(SO ₄) ₂	NOEC après 5 j	>2	Meisch et Schmitt-Beckmann, 1979
	<i>Scenedesmus subcapitatus</i>	Cr(OH)SO ₄	NOEC après 24 h	> 0,313	IUCLID, 1999
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Cr(NO ₃) ₃	CE ₅₀ après 72 h	0,031	Vignati et al., 2010
	<i>Chlorella kessleri</i>	Cr(NO ₃) ₃	CE ₅₀ après 72 h	0,1	Vignati et al., 2010
Invertébrés (bivalves)	<i>Perna viridis</i>	CrCl ₃	CL ₀ après 96 h	1	Vijayavel et al., 2007
	<i>Perna viridis</i>	CrCl ₃	CL ₅₀ après 96 h	2,5	Vijayavel et al., 2007
	<i>Perna viridis</i>	CrCl ₃	CL ₁₀₀ après 96 h	4,5	Vijayavel et al., 2007

**Caddis fly* : Phrygane

Damsel fly : Mouche dame

N.B : *Selenastrum capricornutum* est l'ancienne appellation de *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Références bibliographiques

- Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Keyhan, M., Blake, R., Matin, A., 2004a. Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environ. Microbiol.* 6, 851–860. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00639.x
- Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Park, C.H., Blake, R., Keyhan, M., Matin, A., 2004b. Chromate-Reducing Properties of Soluble Flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 873–882. doi:10.1128/AEM.70.2.873-882.2004
- Adriano, D.C., 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments. Springer New York, New York, NY.
- Ali, N.A., Dewez, D., Didur, O., Popovic, R., 2006. Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex. *Photosynth. Res.* 89, 81–87. doi:10.1007/s11120-006-9085-5
- Allen, H.E., Hansen, D.J., 1996. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environ. Res.* 68, 42–54. doi:10.2175/106143096X127307
- Alvarado, L., Ramírez, A., Rodríguez-Torres, I., 2009. Cr(VI) removal by continuous electrodeionization: Study of its basic technologies. *Desalination* 249, 423–428. doi:10.1016/j.desal.2009.06.051
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015
- Appenroth, K.-J., Keresztes, Á., Sárvári, É., Jaglarz, A., Fischer, W., 2003. Multiple Effects of Chromate on *Spirodela polyrhiza*: Electron Microscopy and Biochemical Investigations. *Plant Biol.* 5, 315–323. doi:10.1055/s-2003-40801
- Appenroth, K.J., Stöckel, J., Srivastava, A., Strasser, R.J., 2001. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 115, 49–64.
- Auchinvole, C.A.R., Richardson, P., McGuinness, C., Mallikarjun, V., Donaldson, K., McNab, H., Campbell, C.J., 2012. Monitoring Intracellular Redox Potential Changes Using SERS Nanosensors. *ACS Nano* 6, 888–896. doi:10.1021/nn204397q
- Banerjee, R., 2012. Redox outside the Box: Linking Extracellular Redox Remodeling with Intracellular Redox Metabolism. *J. Biol. Chem.* 287, 4397–4402. doi:10.1074/jbc.R111.287995
- Barnhart, J., 1997. Occurrences, Uses, and Properties of Chromium. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 26, S3–S7. doi:10.1006/rtp.1997.1132
- Belchik, S.M., Kennedy, D.W., Dohnalkova, A.C., Wang, Y., Sevinc, P.C., Wu, H., Lin, Y., Lu, H.P., Fredrickson, J.K., Shi, L., 2011. Extracellular Reduction of Hexavalent Chromium by Cytochromes MtrC and OmcA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4035–4041. doi:10.1128/AEM.02463-10
- Bengtson Nash, S.M., Quayle, P.A., Schreiber, U., Müller, J.F., 2005. The selection of a model microalgal species as biomaterial for a novel aquatic phytotoxicity assay. *Aquat. Toxicol.* 72, 315–326. doi:10.1016/j.aquatox.2005.02.004
- Bertin, G., Averbeck, D., 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie, Facets of Environmental Nuclear Toxicology* 88, 1549–1559. doi:10.1016/j.biochi.2006.10.001

- Beyersmann, D., Hartwig, A., 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch. Toxicol.* 82, 493. doi:10.1007/s00204-008-0313-y
- Bielicka, A., I, B., A, W., 2005. Two faces of chromium - pollutant and bioelement. *Pol. J. Environ. Stud.* 14.
- Bjerregaard, P., 2014. Ecotoxicology of Metals - Sources, Transport, and Effects on the Ecosystem. *Handb. Toxicol. Met.* Fourth Ed. 425–459.
- Bourotte, C., Bertolo, R., Almodovar, M., Hirata, R., 2009. Natural occurrence of hexavalent chromium in a sedimentary aquifer in Urânia, State of São Paulo, Brazil. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 81, 227–242. doi:10.1590/S0001-37652009000200009
- Branco, R., Chung, A.P., Johnston, T., Gurel, V., Morais, P., Zhitkovich, A., 2008. The Chromate-Inducible chrBACF Operon from the Transposable Element TnOtChr Confers Resistance to Chromium(VI) and Superoxide. *J. Bacteriol.* 190, 6996–7003. doi:10.1128/JB.00289-08
- Bridgewater, L.C., Manning, F.C.R., Patierno, S.R., 1994. Base-specific arrest of in vitro DNA replication by carcinogenic chromium: relationship to DNA interstrand crosslinking. *Carcinogenesis* 15, 2421–2427. doi:10.1093/carcin/15.11.2421
- Campbell, P.G.C., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms : A critique of the Free-ion Activity Model. *Met. Speciat. Bioavailab. Aquat. Syst.*
- Campbell, P.G.C., Erréalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneault, B., 2002. Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 133, 189–206. doi:10.1016/S1532-0456(02)00104-7
- Campbell, P.G.C., Fortin, C., 2013. Biotic Ligand Model, in: Féraud, J.-F., Blaise, C. (Eds.), *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer Netherlands, pp. 237–246.
- Campbell, P.G., Couillard, Y., 2004. Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques, in: *Ecotoxicologie moléculaire Principes fondamentaux et perspectives de développement*, Sciences Appliquées. Presses Universitaires du Québec, p. 502.
- Campbell, P.G.C., Pelletier, E., Denizeau, F., 2004. *Écotoxicologie Moléculaire: Principes Fondamentaux et Perspectives de Développement*. PUQ.
- Campy, M., Macaire, J.-J., 2003. *Géologie de la surface: érosion, transfert et stockage dans les environnements continentaux*. Dunod.
- Cardozo, K.H.M., Oliveira, M.A.L., Tavares, M.F.M., Colepicolo, P., Pinto, E., 2002. Daily Oscillation of Fatty Acids and Malondialdehyde in the Dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. *Biol. Rhythm Res.* 33, 371–382. doi:10.1076/brhm.33.4.371.8802
- Cattaneo, A., Asioli, A., Comoli, P., Manca, M., 1998. Organisms' response in a chronically polluted lake supports hypothesized link between stress and size. *Limnol. Oceanogr.* 43, 1938–1943. doi:10.4319/lo.1998.43.8.1938
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J.C., Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 335–347. doi:10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x
- Cheng, Y., XIE, Y., ZHENG, J., WU, Z., CHEN, Z., MA, X., LI, B., LIN, Z., 2009. Identification and characterization of the chromium(VI) responding protein from a newly isolated *Ochrobactrum anthropi* CTS-325. *J. Environ. Sci.* 21, 1673–1678. doi:10.1016/S1001-0742(08)62472-9

- Chovanec, P., Sparacino-Watkins, C.E., Zhang, N., Basu, P., Stolz, J., 2012. Microbial reduction of chromate in the presence of nitrate by three nitrate respiring organisms. *Microbiol. Chem. Geomicrobiol.* 3, 416. doi:10.3389/fmicb.2012.00416
- Christl, I., Imseng, M., Tatti, E., Frommer, J., Viti, C., Giovannetti, L., Kretzschmar, R., 2012. Aerobic Reduction of Chromium(VI) by *Pseudomonas corrugata* 28: Influence of Metabolism and Fate of Reduced Chromium. *Geomicrobiol. J.* 29, 173–185. doi:10.1080/01490451.2010.539662
- Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159–182. doi:10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154
- Codd, R., Dillon, C.T., Levina, A., Lay, P.A., 2001. Studies on the genotoxicity of chromium: from the test tube to the cell. *Coord. Chem. Rev.* 216–217, 537–582. doi:10.1016/S0010-8545(00)00408-2
- Cranston, R.E., Murray, J.W., 1978. The determination of chromium species in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 99, 275–282. doi:10.1016/S0003-2670(01)83568-6
- Crémazy, A., 2014. Étude des mécanismes de prise en charge des métaux traces trivalents chez les algues unicellulaires. (phd). Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Québec.
- Crémazy, A., Campbell, P.G.C., Fortin, C., 2013a. The Biotic Ligand Model Can Successfully Predict the Uptake of a Trivalent Ion by a Unicellular Alga Below pH 6.50 but not Above: Possible Role of Hydroxo-Species. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2408–2415. doi:10.1021/es3038388
- Crémazy, A., Levy, J.L., Campbell, P.G.C., Fortin, C., 2013b. Uptake and subcellular partitioning of trivalent metals in a green alga: comparison between Al and Sc. *BioMetals* 26, 989–1001. doi:10.1007/s10534-013-9675-6
- Czakó-Vér, K., Batiè, M., Raspor, P., Sipiczki, M., Pesti, M., 1999. Hexavalent chromium uptake by sensitive and tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.* 178, 109–115. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13765.x
- da Costa, C.H. da, Perreault, F., Oukarroum, A., Melegari, S.P., Popovic, R., Matias, W.G., 2016. Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Total Environ.* 565, 951–960. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.028
- Di Bona, K.R., Love, S., Rhodes, N.R., McAdory, D., Sinha, S.H., Kern, N., Kent, J., Strickland, J., Wilson, A., Beaird, J., Ramage, J., Rasco, J.F., Vincent, J.B., 2010. Chromium is not an essential trace element for mammals: effects of a “low-chromium” diet. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 16, 381–390. doi:10.1007/s00775-010-0734-y
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., Santore, R.C., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical Basis. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2383–2396. doi:10.1002/etc.5620201034
- Dominik, J., Vignati, D. a. L., Koukal, B., Pereira de Abreu, M.-H., Kottelat, R., Szalinska, E., Baś, B., Bobrowski, A., 2007. Speciation and Environmental Fate of Chromium in Rivers Contaminated with Tannery Effluents. *Eng. Life Sci.* 7, 155–169. doi:10.1002/elsc.200620182
- Duffus, J.H., 2002. “Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 74, 793–807. doi:10.1351/pac200274050793
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal-induced Oxidative Damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 529–539. doi:10.2174/1568026013394831

- Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., Wood, W., 2007. Framework for Metals Risk Assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68, 145–227. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.03.015
- Fantoni, D., Brozzo, G., Canepa, M., Cipolli, F., Marini, L., Ottonello, G., Zuccolini, M., 2002. Natural hexavalent chromium in groundwaters interacting with ophiolitic rocks. *Environ. Geol.* 42, 871–882. doi:10.1007/s00254-002-0605-0
- Florence, T.M., Morrison, G.M., Stauber, J.L., 1992. Determination of trace element speciation and the role of speciation in aquatic toxicity. *Sci. Total Environ., Trace Metals in the Aquatic Environment* 125, 1–13. doi:10.1016/0048-9697(92)90377-5
- Francisco, R., Alpoim, M. c., Morais, P. v., 2002. Diversity of chromium-resistant and -reducing bacteria in a chromium-contaminated activated sludge. *J. Appl. Microbiol.* 92, 837–843. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01591.x
- Gaillardet, J., Viers, J., Dupré, B., 2003. Trace Elements in River Waters. *Treatise Geochem.* 5, 605. doi:10.1016/B0-08-043751-6/05165-3
- Gnanamani, A., Kavitha, V., Radhakrishnan, N., Suseela Rajakumar, G., Sekaran, G., Mandal, A.B., 2010. Microbial products (biosurfactant and extracellular chromate reductase) of marine microorganism are the potential agents reduce the oxidative stress induced by toxic heavy metals. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 79, 334–339. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.04.007
- González, A.G., Shirokova, L.S., Pokrovsky, O.S., Emnova, E.E., Martínez, R.E., Santana-Casiano, J.M., González-Dávila, M., Pokrovski, G.S., 2010. Adsorption of copper on *Pseudomonas aureofaciens*: Protective role of surface exopolysaccharides. *J. Colloid Interface Sci.* 350, 305–314. doi:10.1016/j.jcis.2010.06.020
- Gunkel-Grillon, P., Laporte-Magoni, C., Lemestre, M., Bazire, N., 2014. Toxic chromium release from nickel mining sediments in surface waters, New Caledonia. *Environ. Chem. Lett.* 12, 511–516. doi:10.1007/s10311-014-0475-1
- Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53, 1–11. doi:10.1093/jexbot/53.366.1
- Han, J., Burgess, K., 2010. Fluorescent Indicators for Intracellular pH. *Chem. Rev.* 110, 2709–2728. doi:10.1021/cr900249z
- Höresik, Z.T., Kovács, L., Láposi, R., Mészáros, I., Lakatos, G., Garab, G., 2007. Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*. *Photosynthetica* 45, 65–69. doi:10.1007/s11099-007-0010-8
- Hu, P., Brodie, E.L., Suzuki, Y., McAdams, H.H., Andersen, G.L., 2005. Whole-Genome Transcriptional Analysis of Heavy Metal Stresses in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 187, 8437–8449. doi:10.1128/JB.187.24.8437-8449.2005
- Kabata-Pendias, A., 2010. *Trace Elements in Soils and Plants*, Fourth Edition. CRC Press.
- Kanmani, P., Aravind, J., Preston, D., 2011. Remediation of chromium contaminants using bacteria. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 9, 183–193. doi:10.1007/s13762-011-0013-7
- Khalida, Z., Youcef, A., Boutiba Zitouni, Mohammed, Z., Radovan, P., 2012. Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the effect of chromium on activity of photosystem II at the alga *Scenedesmus obliquus*. *Int. J. Res. Rev. Appl. Sci.* 12.
- Khati, W., Ouali, K., Mouneyrac, C., Banaoui, A., 2012. Metallothioneins in Aquatic Invertebrates: Their Role in Metal Detoxification and their Use in Biomonitoring. *Energy Procedia, Terragreen 2012: Clean Energy Solutions for Sustainable Environment (CESSE)* 18, 784–794. doi:10.1016/j.egypro.2012.05.094
- Komine, Y., Eggink, L.L., Park, H., Hooper, J.K., 2000. Vacuolar granules in *Chlamydomonas reinhardtii*: polyphosphate and a 70-kDa polypeptide as major components. *Planta* 210, 897–905. doi:10.1007/s004250050695

- Kotaš, J., Stasicka, Z., 2000. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ. Pollut.* 107, 263–283. doi:10.1016/S0269-7491(99)00168-2
- Krishna, B.M.V., Chandrasekaran, K., Rao, S.V., Karunasagar, D., Arunachalam, J., 2005. Speciation of Cr(III) and Cr(VI) in waters using immobilized moss and determination by ICP-MS and FAAS. *Talanta* 65, 135–143. doi:10.1016/j.talanta.2004.05.051
- Küpper, H., Šetlík, I., Spiller, M., Küpper, F.C., Prášil, O., 2002. Heavy Metal-Induced Inhibition of Photosynthesis: Targets of in Vivo Heavy Metal Chlorophyll Formation1. *J. Phycol.* 38, 429–441. doi:10.1046/j.1529-8817.2002.01148.x
- Lavoie, M., Le Faucheur, S., Fortin, C., Campbell, P.G.C., 2009. Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquat. Toxicol.* 92, 65–75. doi:10.1016/j.aquatox.2008.12.007
- Leonard, S.S., Bower, J.J., Shi, X., n.d. Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Mol. Cell. Biochem.* 255, 3–10. doi:10.1023/B:MCBI.0000007255.72746.a6
- Levina, A., Codd, R., Dillon, C.T., Lay, P.A., 2003. Chromium in Biology: Toxicology and Nutritional Aspects, in: Karlin, K.D. (Ed.), *Progress in Inorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 145–250.
- Levina, A., Lay, P.A., 2008. Chemical Properties and Toxicity of Chromium(III) Nutritional Supplements. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 563–571. doi:10.1021/tx700385t
- Lira-Silva, E., Ramírez-Lima, I.S., Olín-Sandoval, V., García-García, J.D., García-Contreras, R., Moreno-Sánchez, R., Jasso-Chávez, R., 2011. Removal, accumulation and resistance to chromium in heterotrophic *Euglena gracilis*. *J. Hazard. Mater.* 193, 216–224. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.07.056
- Llagostera, M., Garrido, S., Guerrero, R., Barbé, J., 1986. Induction of SOS genes of *Escherichia coli* by chromium compounds. *Environ. Mutagen.* 8, 571–577. doi:10.1002/em.2860080408
- Magalhães, D. de P., Marques, M.R. da C., Baptista, D.F., Buss, D.F., 2015. Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. *Environ. Chem. Lett.* 13, 69–87. doi:10.1007/s10311-015-0491-9
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56, 358–392. doi:10.1002/jemt.10040
- Mason, R.P., 2013. *Trace Metals in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons.
- Menon, S.G., Goswami, P.C., 2006. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* 26, 1101–1109. doi:10.1038/sj.onc.1209895
- Miquel, J.C., 2001. Environment and biology of the Kara Sea: a general view for contamination studies. *Mar. Pollut. Bull.* 43, 19–27.
- Miranda, A.T., González, M.V., González, G., Vargas, E., Campos-García, J., Cervantes, C., 2005. Involvement of DNA helicases in chromate resistance by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 578, 202–209. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.05.018
- Morel, F.M., 1983. *Principles of aquatic chemistry*. John Wiley Sons N. Y. NY 1983 446.
- Ndung'u, K., Friedrich, S., Gonzalez, A.R., Flegal, A.R., 2010. Chromium oxidation by manganese (hydr)oxides in a California aquifer. *Appl. Geochem.* 25, 377–381. doi:10.1016/j.apgeochem.2009.12.004
- Nies, D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 313–339. doi:10.1016/S0168-6445(03)00048-2

- Nies, D.H., Rehbein, G., Hoffmann, T., Baumann, C., Grosse, C., 2006. Paralogs of Genes Encoding Metal Resistance Proteins in *Cupriavidus metallidurans* Strain CH34. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 11, 82–93. doi:10.1159/000092820
- Ortega, R., Fayard, B., Salomé, M., Devès, G., Susini, J., 2005. Chromium Oxidation State Imaging in Mammalian Cells Exposed in Vitro to Soluble or Particulate Chromate Compounds. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1512–1519. doi:10.1021/tx049735y
- 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., 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 133, 3–35. doi:10.1016/S1532-0456(02)00112-6
- Perales-Vela, H.V., Peña-Castro, J.M., Cañizares-Villanueva, R.O., 2006. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 64, 1–10. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.11.024
- Pereira de Abreu, M.-H., Université de Genève, Section des sciences de la terre, Université de Genève, Faculté des sciences, Université de Genève, Département de géologie et de paléontologie, Université de Genève, Département de minéralogie, Institut Forel (Genève), Université de Pau et des pays de l'Adour, Laboratoire de chimie analytique et bioinorganique, 2006. Spéciation et mobilité du chrome dans les environnements aquatiques pollués par les effluents de tanneries: étude par couplage HPLC-ICP-MS. Atelier de reproduction de la section de physique, Genève.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T.C.S., Leitão, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., Colepicolo, P., 2003. Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Algae. *J. Phycol.* 39, 1008–1018. doi:10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x
- Poljsak, B., Pócsi, I., Raspor, P., Pesti, M., 2010. Interference of chromium with biological systems in yeasts and fungi: a review. *J. Basic Microbiol.* 50, 21–36. doi:10.1002/jobm.200900170
- Poulopoulou, V.G., Vrachnou, E., Koinis, S., Katakis, D., 1997. The $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, CrO_4^{2-} , HCrO_4^- system revisited. *Polyhedron* 16, 521–524. doi:10.1016/0277-5387(96)00247-1
- Priester, J.H., Olson, S.G., Webb, S.M., Neu, M.P., Hersman, L.E., Holden, P.A., 2006. Enhanced Exopolymer Production and Chromium Stabilization in *Pseudomonas putida* Unsaturated Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1988–1996. doi:10.1128/AEM.72.3.1988-1996.2006
- Puckett, C.A., Ernst, R.J., Barton, J.K., 2010. Exploring the cellular accumulation of metal complexes. *Dalton Trans.* 39, 1159–1170. doi:10.1039/B922209J
- Rai, D., Eary, L.E., Zachara, J.M., 1989. Environmental chemistry of chromium. *Sci. Total Environ., The Chromium Paradox in Modern Life* 86, 15–23. doi:10.1016/0048-9697(89)90189-7
- Rai, D., Sass, B.M., Moore, D.A., 1987. Chromium(III) hydrolysis constants and solubility of chromium(III) hydroxide. *Inorg. Chem.* 26, 345–349. doi:10.1021/ic00250a002
- Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., Cervantes, C., 2008. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 21, 321–332. doi:10.1007/s10534-007-9121-8
- Rand, G.M., 1995. *Fundamentals Of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate And Risk Assessment*. CRC Press.

- Richard, F.C., Bourg, A.C.M., 1991. Aqueous geochemistry of chromium: A review. *Water Res.* 25, 807–816. doi:10.1016/0043-1354(91)90160-R
- Roh, J.-Y., Lee, J., Choi, J., 2006. Assessment of stress-related gene expression in the heavy metal-exposed nematode *Caenorhabditis elegans*: A potential biomarker for metal-induced toxicity monitoring and environmental risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2946–2956. doi:10.1897/05-676R.1
- Rosabal-Rodriguez, M., 2015. Subcellular metal-handling strategies in two groups of aquatic animals (insect, fish): Contributions to the understanding of metal toxicity. (phd). Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Québec.
- Saputro, S., Yoshimura, K., Matsuoka, S., Takehara, K., Narsito, Aizawa, J., Tennichi, Y., 2014. Speciation of dissolved chromium and the mechanisms controlling its concentration in natural water. *Chem. Geol.* 364, 33–41. doi:10.1016/j.chemgeo.2013.11.024
- Ščančar, J., Milačič, R., 2014. A critical overview of Cr speciation analysis based on high performance liquid chromatography and spectrometric techniques. *J. Anal. At. Spectrom.* 29, 427–443. doi:10.1039/C3JA50198A
- Sen, I.S., Peucker-Ehrenbrink, B., 2012. Anthropogenic Disturbance of Element Cycles at the Earth's Surface. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8601–8609. doi:10.1021/es301261x
- Shi, X., Dalal, N.S., 1990. On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium(V) species. *Arch. Biochem. Biophys.* 277, 342–350. doi:10.1016/0003-9861(90)90589-Q
- Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O., 2009. *Metallothioneins and Related Chelators*. Royal Society of Chemistry.
- Silver, S., Phung, L.T., 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 587–605. doi:10.1007/s10295-005-0019-6
- Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2002. Physicochemical Aspects of Lead Bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environ. Sci. Technol.* 36, 969–975. doi:10.1021/es0101577
- Sobol, Z., Schiestl, R.H., 2012. Intracellular and extracellular factors influencing Cr(VI) and Cr(III) genotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 53, 94–100. doi:10.1002/em.20679
- Sokolova, I.M., Ringwood, A.H., Johnson, C., 2005. Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquat. Toxicol.* 74, 218–228. doi:10.1016/j.aquatox.2005.05.012
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321–336. doi:10.1016/0891-5849(94)00159-H
- Sumner, E.R., Shanmuganathan, A., Sideri, T.C., Willetts, S.A., Houghton, J.E., Avery, S.V., 2005. Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast. *Microbiology* 151, 1939–1948. doi:10.1099/mic.0.27945-0
- Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Lee, J.-S., Kim, H.C., Lee, W.C., Shin, K.-H., 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 51–71. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.01.042
- Susplugas, S., Srivastava, A., Strasser, R.J., 2000. Changes in the photosynthetic activities during several stages of vegetative growth of *Spirodela polyrhiza*: Effect of chromate. *J. Plant Physiol.* 157, 503–512. doi:10.1016/S0176-1617(00)80105-4
- Suzuki, T., Miyata, N., Horitsu, H., Kawai, K., Takamizawa, K., Tai, Y., Okazaki, M., 1992. NAD(P)H-dependent chromium (VI) reductase of *Pseudomonas ambigua* G-1: a Cr(V) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III). *J. Bacteriol.* 174, 5340–5345. doi:10.1128/jb.174.16.5340-5345.1992

- Teitzel, G.M., Parsek, M.R., 2003. Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2313–2320. doi:10.1128/AEM.69.4.2313-2320.2003
- Thompson, S.L., Manning, F.C.R., McColl, S.M., 2002. Comparison of the Toxicity of Chromium III and Chromium VI to Cyanobacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 286–293. doi:10.1007/s00128-002-0059-9
- Tsou, T.-C., Chen, C.-L., Liu, T.-Y., Yang, J.-L., 1996. Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by chromium(III) plus hydrogen peroxide and its prevention by scavengers. *Carcinogenesis* 17, 103–108. doi:10.1093/carcin/17.1.103
- Twiss, M.R., Errécalde, O., Fortin, C., Campbell, P.G.C., Jumarie, C., Denizeau, F., Berkelaar, E., Hale, B., van Rees, K., 2001. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. *Chem. Speciat. Bioavailab.* 13, 9–24. doi:10.3184/095422901782775462
- Ueshima, M., Ginn, B.R., Haack, E.A., Szymanowski, J.E.S., Fein, J.B., 2008. Cd adsorption onto *Pseudomonas putida* in the presence and absence of extracellular polymeric substances. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72, 5885–5895. doi:10.1016/j.gca.2008.09.014
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161–1208. doi:10.2174/0929867053764635
- Vasconcelos, M.T.S.D., Leal, M.F.C., 2001. Adsorption and Uptake of Cu by *Emiliania huxleyi* in Natural Seawater. *Environ. Sci. Technol.* 35, 508–515. doi:10.1021/es000954p
- Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 104, 355–372. doi:10.1016/0742-8413(93)90001-2
- Vignati, D.A.L., Dominik, J., Beye, M.L., Pettine, M., Ferrari, B.J.D., 2010. Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: a paradigm to revise? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 743–749. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.01.011
- Viti, C., Decorosi, F., Mini, A., Tatti, E., Giovannetti, L., 2009. Involvement of the *oscaA* gene in the sulphur starvation response and in Cr(VI) resistance in *Pseudomonas corrugata* 28. *Microbiology* 155, 95–105. doi:10.1099/mic.0.021873-0
- Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., Giovannetti, L., 2013. Molecular mechanisms of Cr (VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.*
- Wallace, W.G., Lee, B., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249, 183–197. doi:10.3354/meps249183
- Weltens, R., Goossens, R., Puymbroeck, S.V., 2000. Ecotoxicity of Contaminated Suspended Solids for Filter Feeders (*Daphnia magna*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 315–323. doi:10.1007/s002440010110
- Wood, J.M., Wang, H.-K., 1983. Microbial resistance to heavy metals. *Environ. Sci. Technol.* 17, 582A–590A. doi:10.1021/es00118a717
- World Health Organization. (2009). Inorganic chromium (III) compounds.
- World Health Organization. (2013). Inorganic chromium (VI) Compounds.
- Worms, I., Simon, D.F., Hassler, C.S., Wilkinson, K.J., 2006. Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie, Facets of Environmental Nuclear Toxicology* 88, 1721–1731. doi:10.1016/j.biochi.2006.09.008

Zayed, A.M., Terry, N., 2003. Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant Soil* 249, 139–156. doi:10.1023/A:1022504826342

Chapitre II.

Matériels et Méthodes

I. Choix des modèles biologiques

I.1 Algues (*Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlamydomonas reinhardtii*)

Les algues désignent un ensemble d'organismes que l'on retrouve essentiellement dans les milieux aquatiques (eaux douces et marines). Elles rassemblent à la fois les macroalgues benthiques souvent fixées sur un support ainsi que des algues microscopiques (microalgues) pélagiques en suspension dans l'eau. Dans les eaux douces, les algues sont typiquement présentes comme microorganismes (Bellinger and Sigeo, 2010). Les algues constituent un groupe extrêmement hétérogène et diversifié avec une caractéristique physiologique commune : la photosynthèse oxygénique (Sahoo and Baweja, 2015). A la différence des plantes, les algues sont des organismes simples ne se différenciant pas en racines, tiges et feuilles. Les microalgues, appelées également phytoplancton, sont définies comme étant des organismes unicellulaires ou pluricellulaires indifférenciés qui peuvent être eucaryotes ou procaryotes. Le nombre total des espèces algales est estimé entre 1 à 10 millions, avec une majorité d'espèces microscopiques (Andersen, 1992). Elles sont variables en termes de taille, allant d'un diamètre inférieur à 1 μm jusqu'à des colonies globulaires pouvant atteindre 2000 μm de diamètre (Bellinger and Sigeo, 2010). La forme de leurs cellules varie de simples sphères non mobiles aux grandes structures multicellulaires (Figure 14).

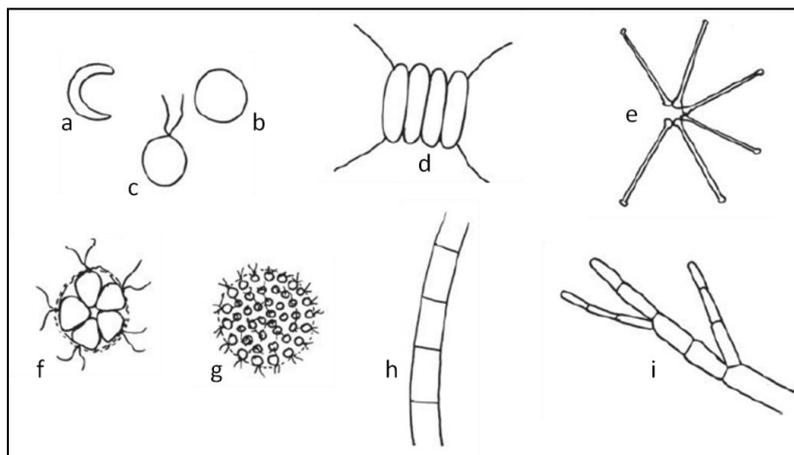


Figure 14 : Formes générales des cellules algales. Unicellulaires non motiles : (a) *Pseudokirchneriella* (anciennement *Selenastrum*) ; (b) *Chlorella*. Unicellulaires motiles : (c) *Chlamydomonas*. Colonie non motile : (d) *Scenedesmus* ; (e) *Asterionella*. Colonie motile : (f) *Pandorina* ; (g) *Volvox*. Filament non ramifié : (h) *Spirogyra*. Filament ramifié : (i) *Cladophora*. Modifié d'après Bellinger and Sigeo (2010).

Les avantages de l'utilisation des algues dans les tests écotoxicologiques sont bien documentés. Les algues sont de petite taille et ont un taux de croissance rapide permettant d'atteindre rapidement de grandes populations ainsi que la réalisation d'études sur plusieurs générations. Elles sont également faciles à cultiver en laboratoire, ne nécessitant pas de gros volumes de milieux de cultures et d'expositions. De plus, elles sont sensibles à une grande variété de contaminants, notamment à des faibles concentrations d'éléments traces métalliques (ETM) (Knauer et al., 1997; Peters et al., 2013; Wang et al., 2016), et sont relativement tolérantes à des variations des paramètres physico-chimiques (pH, température, force ionique) dans leur milieu de croissance et de culture, permettant ainsi de travailler dans différentes conditions d'exposition. Différentes études ont montré que les algues sont plus sensibles à différents polluants que les poissons. Par exemple Hutchinson et al. (2003) ont reporté que, pour 91 produits pharmaceutiques testés dans différents laboratoires, environ 80% avaient une CE_{50} chez les algues plus faibles que les CL_{50} correspondantes chez les poissons. Kahru and Dubourguier (2010) ont également montré que les algues étaient plus sensibles à différents types de nanoparticules par rapport aux poissons, aux bactéries ou aux crustacés. Toutes ces caractéristiques font des algues des modèles biologiques appropriés pour étudier l'écotoxicité de différents polluants ainsi que leurs mécanismes d'interaction avec les organismes vivants.

L'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* a été utilisée pour les expériences visant à étudier les liens entre la spéciation du Cr et ses effets sur la croissance (chapitre III, partie 1) ainsi que d'autres effets du chrome sur le fonctionnement des cellules algales (chapitre III, partie 2). *Pseudokirchneriella subcapitata* (anciennement dénommée *Selenastrum capricornutum*) est une algue verte unicellulaire non motile d'eau douce, appartenant à la classe Chlorophyceae et à l'ordre Sphaeropleales. C'est une espèce planctonique vivant dans les étangs d'eau douce, les lacs et les rivières. Les cellules ont une forme de croissants (Figures 14a et 15), de longueur variant entre 8 et 14 μm et largeur entre 2 et 5 μm . Sa reproduction se fait par division de la cellule mère en 2, 4 ou 8 autospores. Elle détient une paroi cellulaire rigide en cellulose (Wehr et al., 2015). Cette algue est couramment rencontrée dans la plupart des eaux douces et est très utilisée dans les études écotoxicologiques (Vannini et al., 2009 ; Aruoja et al., 2009; Yang et al., 2008), notamment dans le cadre de bioessais. *Pseudokirchneriella subcapitata* est validée et recommandée comme organisme modèle dans le test d'écotoxicité standardisé (test d'inhibition de croissance – OCDE, 2011). De plus, cette

espèce est dotée d'une grande sensibilité aux polluants. Par exemple, dans une étude comparant la toxicité de plusieurs contaminants incluant le dichromate de potassium ainsi que trois pesticides chez sept espèces d'algues, *P. subcapitata* a été classée comme la plus sensible pour tous les contaminants testés (Rojíčková and Maršálek, 1999).

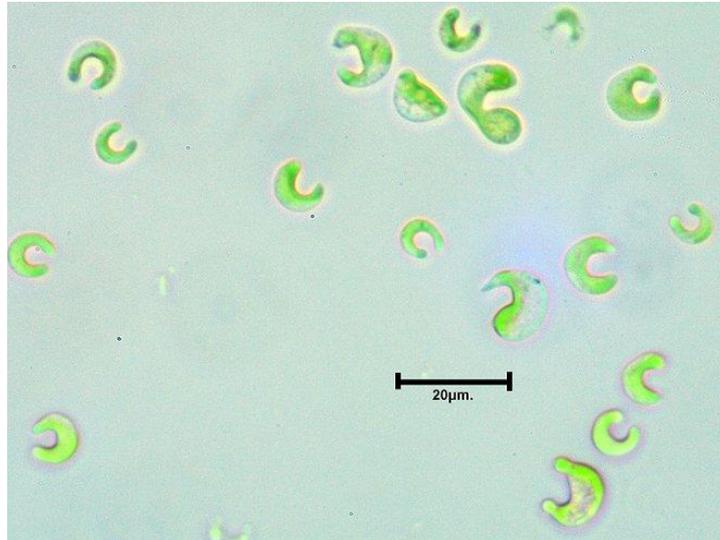


Figure 15 : Cellules de l'algue d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* (chaque croissant correspond à un individu) (Source : algalweb.net, site web visité le 11/08/2016).

Les expériences menées pour l'étude des flux d'internalisation du Cr(III) et Cr(VI) et de leur répartition subcellulaire ont été réalisées sur l'espèce algale *Chlamydomonas reinhardtii* (Figure 16). En effet, il a été observé que la lyse de la paroi des cellules de *P. subcapitata* est difficile et plusieurs méthodes d'homogénéisation se sont avérées inefficaces pour cette espèce (Crémazy et al., 2013b; Lavoie et al., 2009) d'où l'utilisation de *C. reinhardtii*. Cette dernière espèce est une algue verte unicellulaire d'eau douce, faisant partie de la classe des Chlorophyceae et de l'ordre des Volvocales. Elle est de forme ellipsoïdale avec un diamètre d'environ 5 μm . Elle possède deux flagelles lui permettant de se déplacer dans l'eau. Sa paroi cellulaire est principalement composée de glycoprotéines (Macfie and Welbourn, 2014). L'intérêt de son utilisation pour des études écotoxicologiques se base sur le fait qu'elle est un des organismes unicellulaires photosynthétiques les plus caractérisés au niveau biochimique et génétique (Pröschold et al., 2005). De plus, elle est facilement cultivable dans un milieu de culture relativement simple (sans cofacteurs ni vitamines). Cette algue est aussi tolérante à une large gamme de pH (Crémazy et al., 2013a) d'où son utilité pour les études d'internalisation et d'applicabilité des différents modèles de prédiction de biodisponibilité et toxicité des ETMs comme le modèle du ligand biotique. Lustigman et al. (1995) ont trouvé

que cette algue était capable de croître entre pH 4 et 12 avec une diminution de croissance aux extrémités de cette gamme. Outre son utilisation répandue dans les études écotoxicologiques (Lustigman et al., 1995), *C. reinhardtii* est utilisée comme organisme modèle dans le laboratoire INRS-ETE (Québec, Canada) où les expériences d'internalisation et répartition subcellulaire du Cr ont été réalisées (Fortin and Campbell, 2000).

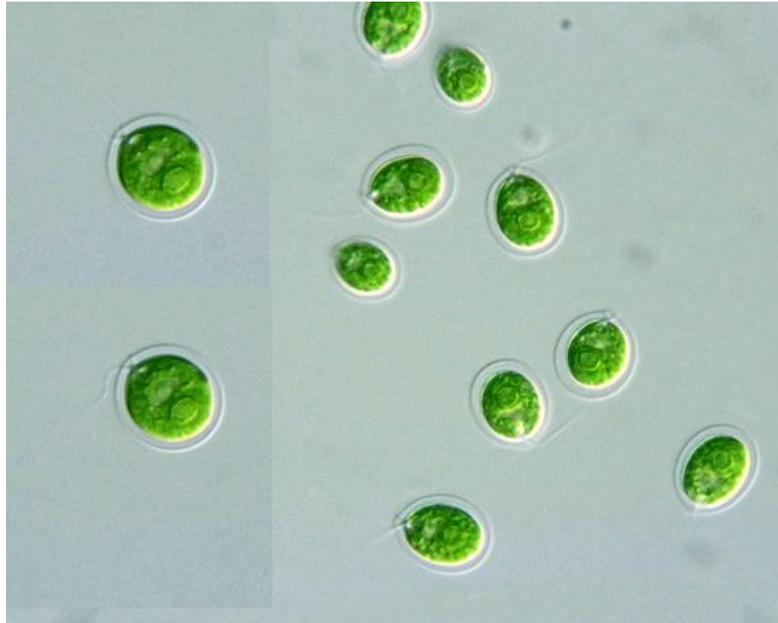


Figure 16 : Cellules de l'algue verte d'eau douce *Chlamydomonas reinhardtii* (Source : http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/chlorophyta/chlamydomonas/Euchlamydomonas/reinhardtii/sp_06.jpg, site web visité le 11/11/2016).

I.2 Bivalves (*Corbicula fluminea*)

Les bivalves sont des organismes largement utilisés comme bioindicateurs de la pollution aquatique grâce à leur capacité d'accumulation des polluants, notamment les ETM, dans leurs différents tissus (Amiard and Amiard-Triquet, 2008; Andrès et al., 1999; Walsh and O'Halloran, 1998). Ils présentent aussi un large choix de biomarqueurs capables de répondre à une exposition aux ETM, y compris le Cr (Vijayavel et al., 2007; Ciacci et al., 2012). Ils sont des organismes filtreurs vivant, selon l'espèce, sur des substrats rigides, à l'interface eau-sédiment ou enfouis dans les sédiments. L'internalisation des contaminants métalliques chez les bivalves peut se faire par voie directe (internalisation des formes dissoutes des ETM) ou par voie trophique (assimilation des contaminants adsorbés sur des particules potentiellement nutritives ingérées par les organismes) (Fournier et al., 2005). Ils sont ainsi très utilisés dans

les programmes de biosurveillance (Sarkar et al., 2008; Tomazelli et al., 2003; Wagner and Boman, 2004; Zuykov et al., 2013). Parmi les autres facteurs qui expliquent le succès des bivalves en tant qu'espèces sentinelles, on mentionnera notamment :

Leur abondance, afin que les prélèvements n'aient pas d'impact sur la structure et la densité des populations naturelles ;

Leur facilité d'échantillonnage ;

Leur sédentarité, qui permet une corrélation entre l'état des individus et le niveau de pollution du site ;

Leur large distribution géographique, qui permet les comparaisons entre différents sites et régions.

Pour cette étude, l'espèce choisie est *Corbicula fluminea* (Figure 17) ; un bivalve lamellibranche (lamelles branchiales reliées par des ponts tissulaires et vasculaires) appartenant à la sous-classe des hétérodontes (charnière de la coquille constituée de différentes dents). Il appartient à l'ordre *Veneroida*, comprenant la famille *Corbiculoidea* à laquelle appartient le genre *Corbicula*.



Figure 17 : Individus de *Corbicula fluminea* maintenus en laboratoire après prélèvement. Le pied de quelques individus est visible en blanc.

En plus d'avoir les caractéristiques (citées ci-dessus) des espèces sentinelles, *C. fluminea* présente une croissance rapide et une maturité sexuelle précoce, une courte durée de vie et une fécondité élevée (Tableau 3). C'est une des espèces non indigènes les plus invasives capable de coloniser facilement différentes niches écologiques. Elle a ainsi été retrouvée dans des cours d'eau, des lacs et des canaux, et occupe principalement les habitats composés de gravier fin, de sable et de vase (Sousa et al., 2008). Cette espèce, originaire des écosystèmes asiatiques, des régions tropicales et sub-tropicales d'Afrique et d'Australie est devenue très répandue dans les systèmes aquatiques dulcicoles d'Europe et d'Amérique (Sousa et al., 2008). *C. fluminea* a été recensée pour la première fois en France en 1980, dans le bassin de la Dordogne et elle a été signalée dans la Moselle en 1994 (Bachmann et al., 1995). Cette espèce a depuis colonisé la majorité des cours d'eaux, certains lacs, ainsi que de nombreux canaux de navigation.

Tableau 3 : Résumé des principales caractéristiques du cycle de vie de *Corbicula fluminea* (adapté d'après McMahon, 2002 et Sousa et al., 2008).

Caractéristiques du cycle de vie	
Durée de vie	1 à 5 ans
Age de maturité	3 à 9 mois
Mode de reproduction	Hermaphrodite (auto-fertilisation)
Taux de croissance	Rapide
Fécondité (nombre moyen de jeunes par saison de reproduction)	35000 juvéniles libérés par adulte
Evénements de reproduction par an	2
Taille moyenne des larves à la libération	250 µm
Couvaison	Synchrone
Taux relatif de survie des juvéniles	Faible
Taux relatif de survie des adultes	Faible, 2 à 41% par an
Degré d'itéroparité	Modérément itéropare (1 à 7 périodes de reproduction)

Le corps de *C. fluminea* est composé de deux parties bien distinctes : la coquille et les tissus mous (corps mou) (Figure 18). Le corps mou se trouve à l'intérieur de la coquille et comprend quatre principaux ensembles tissulaires : les muscles (et le manteau), les branchies, la masse

viscérale (comprenant les glandes digestives) et le pied (Figure 18). *Corbicula fluminea* possède deux muscles adducteurs (antérieurs et postérieurs) fixés sur chacune des valves. Leur rôle est de contrôler l'ouverture et la fermeture des valves. Le manteau est un épithélium mince qui recouvre entièrement la face interne de la coquille et englobe donc le corps mou. Les deux lobes du manteau fusionnent pour former les siphons inhalant et exhalant. Ces derniers contrôlent les flux d'eau qui entrent et sortent dans la cavité palléale grâce à de nombreux cils photorécepteurs et sensoriels (Britton and Morton, 1982). Après avoir été enrobés de mucus, les excréments sont expulsés dans le milieu aquatique sous formes de pseudofèces par le siphon exhalant.

Les branchies sont formées de deux hémibranchies ornées de cils permettant la ventilation nécessaire aux échanges respiratoires et nutritifs (Payne et al., 1995). Cette activité de ventilation change en fonction de plusieurs facteurs tels que la température, la charge particulaire du milieu ainsi que les facteurs internes de régulation (Grizel, 2003). Les branchies permettent l'oxygénation du milieu circulant (sang ou hémolymphe) et la capture de particules nutritives. Elles jouent aussi un rôle prépondérant dans la reproduction car l'incubation des larves chez *C. fluminea* se fait au niveau des hémibranchies internes (Sousa et al., 2008).

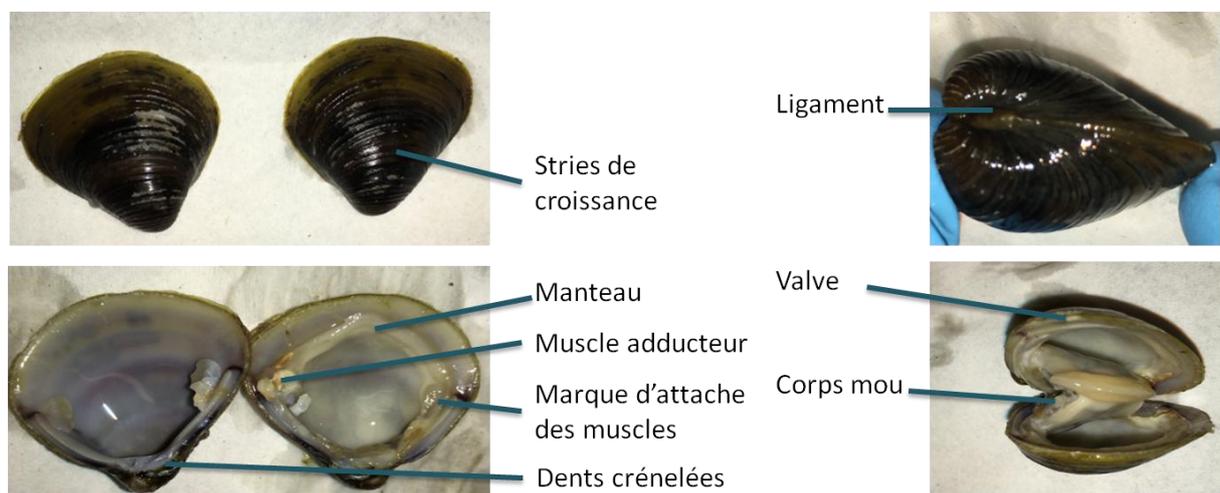


Figure 18 : Vue externe et interne d'une coquille de *Corbicula fluminea* (photo : I. Aharchaou).

La masse viscérale englobe l'appareil digestif, l'appareil excrétoire, le cœur et les gonades. Elle est recouverte de cils permettant le transport des particules vers l'estomac via l'œsophage. L'estomac possède un stylet cristallin (le cristallin) et est entouré par les glandes

digestives. La masse viscérale contient aussi le système reproducteur mâle et femelle, d'où l'hermaphrodisme de l'espèce (McMahon, 2002; Sousa et al., 2008).

Le pied de *C. fluminea* est très musculeux et participe aux mouvements d'enfouissement dans le sédiment. En effet, lorsque le milieu de vie est très pauvre en particules nutritives en suspension, l'organisme peut utiliser la surface ciliée de son pied pour faire remonter vers les palpes labiaux des particules nutritives présentes dans le sédiment (détritus organiques, algues, bactéries) (Way et al., 1990). Ce phénomène est appelé le « pedal feeding » (Reid et al., 1992). Cette variabilité et plasticité des modes alimentaires de *C. fluminea* contribuent à en faire une espèce colonisatrice efficace.

Corbicula fluminea exige une oxygénation élevée des milieux aquatiques et des températures entre 2 et 36 °C ; des températures hors de cette gamme pouvant être létales (McMahon, 2002; Sousa et al., 2008). Bien que la corbicule puisse tolérer cette large gamme de température, l'eau doit être à une température supérieure à 16°C pour la reproduction et une réduction du métabolisme survient quand la température dépasse les 30 °C.

D'un point de vue écotoxicologique, l'intérêt de *C. fluminea* réside tout d'abord dans son mode de vie à l'interface eau-sédiment et dans sa capacité de filtration (pouvant atteindre 10 L/individu/jour) à des fins respiratoires et nutritionnelles (Way et al., 1990). Ce bivalve est de ce fait capable d'accumuler d'importantes quantités de contaminants, dont les ETM (Andrès et al., 1999; Baudrimont et al., 1997a; Graney et al., 1983; Marie et al., 2006) et de nombreuses études ont démontré que *C. fluminea* est un bioindicateur fiable des contaminations métalliques (Abaychi and Mustafa, 1988; Achard et al., 2004; Andrès et al., 1999; Baudrimont et al., 1997b ; 2003 ; Bilos et al., 1998; Graney et al., 1983; Inza et al., 1997; Labrot et al., 1999). La forte capacité d'adaptation de la corbicule aux variations des conditions et facteurs écologiques (par exemple température et pH) permet de la maintenir en conditions de laboratoire pendant plusieurs mois (Inza et al., 1997). De plus, la longueur des coquilles (allant de 1 à 5 cm chez les individus adultes) permet de réaliser facilement la dissection des organes (notamment les branchies et la glande digestive) nécessaires aux différentes expériences menées dans nos études. En effet, dans le cadre de ce travail, ce modèle biologique a été utilisé pour étudier l'accumulation du Cr(III) et du Cr(VI) dans les

branchies et les glandes digestives d'individus de *C. fluminea* ainsi que l'induction de plusieurs biomarqueurs dans les mêmes tissus.

I.3 Culture cellulaire CHO

Les cellules CHO sont issues d'une lignée cellulaire obtenue à partir d'ovaires de hamster chinois (*Cricetulus griseus*). Elles sont couramment utilisées en toxicologie pour l'étude des effets de différents polluants (y compris les ETM) sur les cellules de mammifères (Blankenship et al., 1994; Coryell and Stearns, 2006; Ercal et al., 1996; Howard et al., 1991; Huang et al., 1980). Elles sont également utilisées en recherche dans plusieurs domaines tels que la biotechnologie et la production de protéines thérapeutiques. Plusieurs sous-lignées de CHO présentant des altérations génétiques variables et parfois peu caractérisées sont aussi exploitées notamment pour la production de protéines recombinantes.

Le choix des cellules CHO comme modèle dans le cadre de ce travail repose de façon générale sur l'intérêt des cellules mammifères comme modèle biologique et en particulier sur l'intérêt de leur utilisation dans l'étude des mécanismes d'internalisation du Cr(III) dans les cellules. En effet, à ce jour, ces mécanismes d'internalisation du Cr(III) dans les cellules restent peu compris (Viti et al., 2014). Dans cette étude, nous voulons voir si l'assimilation du chrome pourrait être dépendante de la nature de la surface exoplasmique des cellules en utilisant des cellules dérivant de CHO comme modèle. En effet, comme beaucoup de cellules mammifères, la surface de ces cellules est recouverte de glycoprotéines appelées « protéoglycane de surface ». La présence de ces glycoprotéines pourrait jouer un rôle dans l'assimilation de par leurs propriétés de rétention de macromolécules ou d'ions (Gandhi and Mancera, 2008; Schwartz, 2001). Ils sont constitués d'une partie protéique transmembranaire à laquelle sont liées covalamment une ou plusieurs chaînes de glucosaminoglycane (GAG). Ces macro-complexes sont très diversifiés et assurent le bon fonctionnement cellulaire (Schwartz, 2001). En plus de leur charge négative pouvant favoriser l'adsorption des ions métalliques, les protéoglycane de surface se sont avérés impliqués dans des phénomènes de phagocytose/pinocytose (Fukasawa et al., 1997). Par ailleurs, l'existence d'une sous-lignée CHO présentant une déficience génétique de l'expression de ces protéoglycane de surface présente un intérêt tout particulier, d'où l'utilisation des cellules CHO comme modèle pour une partie de notre étude sur l'internalisation du Cr.

Trois lignées cellulaires ont ainsi été utilisées dans ce travail : la lignée CHO-K1 sauvage (nommée CHO wt dans ce document), une lignée mutante n'exprimant pas de protéoglycanes de surface (nommée CHO pgs-) et enfin une lignée mutante B618 transfectée exprimant la β -galactosyltransférase T7 (nommée CHO pgs B618 β -gal T7, ou encore CHO pgs⁺ - cette dernière appellation sera utilisée tout au long de ce manuscrit) ce qui permet dans ce dernier cas l'expression des protéoglycanes de surface à partir de la lignée CHO pgs-. Ces différentes lignées nous ont été gracieusement fournies par les Dr Sylvie Fournel-Gigleux et Mineem Saliba (Biopôle, faculté de médecine de Vandœuvre-lès-Nancy). D'avantage de détails sur ces modèles (cultures cellulaires) sont fournis dans la partie V de ce chapitre.²

II. Conditions de culture et du maintien au sein du laboratoire

II.1 Algues

Afin d'éviter toute contamination bactérienne dans nos cultures algales, des précautions d'asepsie ont été prises. De ce fait, les milieux Lefevre-Czarda (LC), utilisé pour *P. subcapitata*, et MHSM-1, utilisé pour *C. reinhardtii*, ainsi que l'ensemble de la verrerie ont été stérilisés avant utilisation par autoclave. Les cultures d'algues ont ensuite été manipulées sous une hotte à flux laminaire.

II.1.1 *Pseudokirchneriella subcapitata*

Des cellules de *P. subcapitata* (souche 278/4 obtenue initialement du centre de culture et de collection des algues et des protozoaires – CCAP-Argyll, Royaume-Uni) ont été cultivées dans un milieu LC (Tableau 1, annexe 1 ; Ionescu et al., 2006). Ce milieu a un pH de 7,8 et est caractérisé par sa richesse et disponibilité des nutriments (azote et phosphore) nécessaires à la croissance des algues. Les cultures ont été maintenues dans une chambre thermostatée à 21 ± 2 °C et sous illumination constante (90–110 mol/m²/s). Les flacons de culture (Erlenmeyers de 100 mL) ont été placés sur une table d'agitation à 100 rotations par minute

² Cette partie a été réalisée en collaboration avec Mme Bérengère Yon et M Raphaël Heymes (stagiaires en Master 1) que j'ai co-encadré.

(rpm). L'entretien s'est effectué de façon hebdomadaire en inoculant dans 90 mL de milieu LC frais et stérile un volume (10 mL) d'une culture d'algues de la semaine précédente.

II.1.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

Les cellules de *C. reinhardtii* ont été cultivées dans un milieu de culture MHSM-1 (Tableau 2, annexe 1). Ce milieu a un pH de 7, une force ionique de 10.3 meq/L et contient l'ensemble des éléments nécessaire à la croissance des algues, comme les métaux essentiels (p. ex. Fe, Cu et le Zn), l'azote (sous forme d'ammonium) ou le phosphore (sous forme de phosphates). Les cultures ont été maintenues dans un incubateur (Convion, CMP3023) sous agitation (100 rpm) et à température ($20,0 \pm 0,1$ °C) et illumination (100 ± 10 mol/m²/s) constantes. Afin de conserver les cellules dans des conditions physiologiques satisfaisantes, une aliquote de 2 mL de culture a été transférée dans une nouvelle solution MHSM-1 (100 mL) tous les quatre jours.

II.2 *Corbicula fluminea*

Les individus de *C. fluminea* utilisés pour les différentes expériences ont été prélevés sur un site de référence couramment utilisé dans les études réalisées au LIEC (UMR 7360, CNRS et Université de Lorraine). Le site de prélèvement se situe au niveau de la rivière Moselle, sur le plan d'eau de l'île du Saulcy à Metz (Moselle, France; Figure 19). Le pH, la conductivité électrique et l'oxygène dissous ont été mesurés dans l'eau du site avec de sondes multiparamètres (WTW, Multi 3430) calibrées à partir de solutions-étalon. Au moment du prélèvement des organismes, l'eau du site avait un pH de 8.00, une conductivité de 1823 µs/cm et une saturation en oxygène de 103%.

Selon l'expérience, entre 160 et 170 organismes de taille entre 2 et 4 cm ont été prélevés et transportés jusqu'au laboratoire dans des glacières remplies avec de l'eau du site. Ces organismes ont été maintenus au laboratoire dans une salle climatisée à 15°C et acclimatés pendant 4 jours. L'acclimatation s'est effectuée dans des cristallisoirs de 3 L contenant 1,5 L du milieu d'acclimatation oxygéné en continu grâce à des bulleurs, selon le protocole présenté dans la Figure 20. Le milieu d'acclimatation a été renouvelé chaque 24 h. A la fin de la période d'acclimatation, les organismes ont été maintenus dans de l'eau minérale Cristalline (source Aurèle-composition détaillée dans le tableau 3 de l'annexe 1). La viabilité des

organismes a été vérifiée manuellement à chaque renouvellement du milieu en appuyant sur le ligament ; les bivalves morts sont ainsi ouverts alors que les vivants restent collés et fermés.

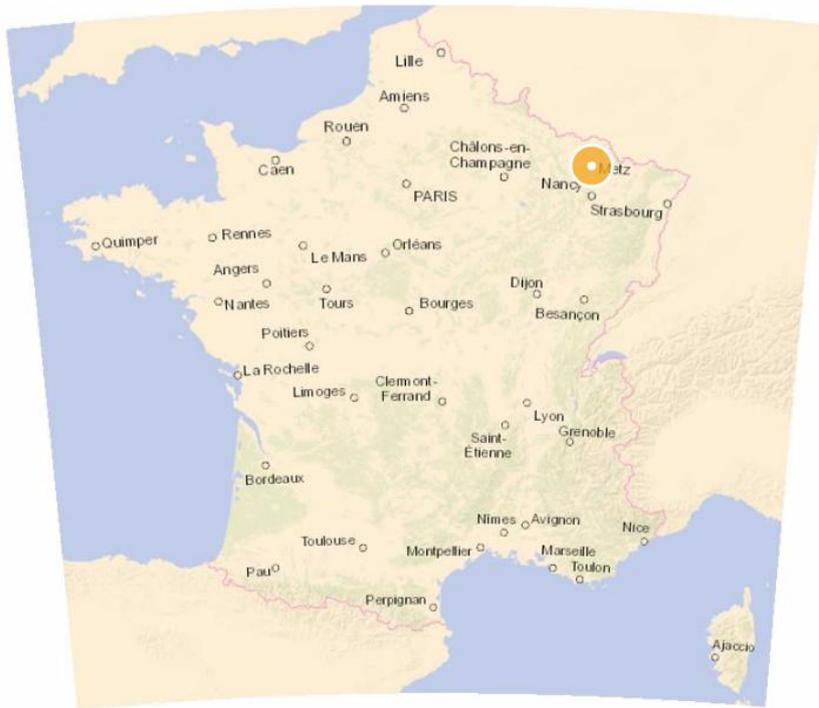


Figure 19 : Localisation du site de prélèvement des individus de *Corbicula fluminea* utilisés pour les expériences de bioaccumulation du Cr et l'étude de biomarqueurs. Le site se trouve dans la ville de Metz (Moselle, France), coordonnées GPS : 49°07'06.5''N 6°09'39.0''E; source de la carte : www.géoportail.fr.

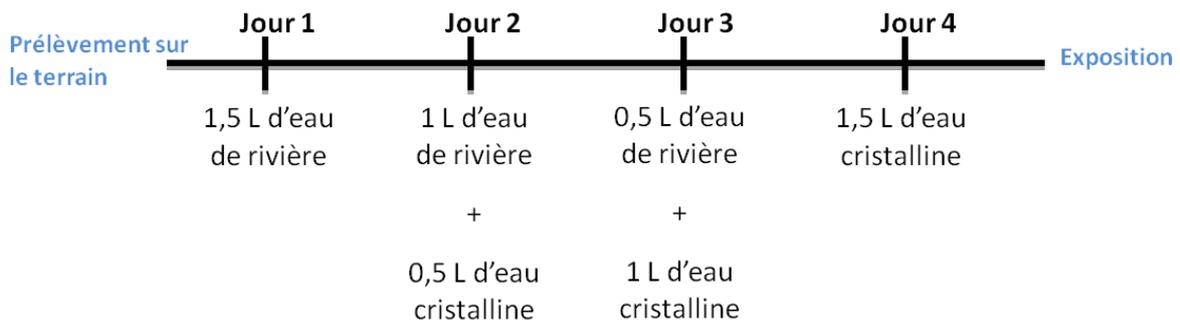


Figure 20 : Protocole de l'acclimatation des corbicules après leur échantillonnage dans la rivière Moselle (France).

La température a été suivie pendant toute la durée d'acclimatation et d'exposition dans un des cristallisoirs utilisés à l'aide d'une sonde (Onset, pendant temp, HOB0®) et aucune variation de température n'a été observée ($15 \pm 0,1$ °C).

II.3 Culture cellulaire CHO

Les cellules CHO ont été cultivées dans un milieu complet composé d'un mélange de milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Eurobio) et de milieu Ham F-12 (50/50, v/v, Eurobio) complémenté avec du sérum de veau fœtal (10% v/v, Eurobio), un mélange pénicilline/streptomycine à 5000 U/mL (Gibco) ainsi qu'avec une solution de L-glutamine (Gibco) à 200 mM (milieu complet). Les récipients typiquement utilisés pour nos cultures sont des flasques F75 ou des boîtes de Pétri (diamètre de 100 mm). Les cellules ont été ensuite cultivées dans un incubateur à 37°C et à 5% de CO₂. La conservation des cellules avant leur utilisation s'est effectuée dans des cryotubes à -180 °C. Ce travail a été réalisé dans une salle blanche permettant la prévention des contaminations des cultures ainsi que de travailler dans des conditions contrôlées de température, d'humidité et de pression relative.

III. Etudes menées chez les algues

III.1 Conditions d'exposition des algues

Deux types de milieux d'exposition algale ont été utilisés dans notre étude : le milieu ISO8692 (composition détaillée dans le tableau 4 de l'annexe 1) selon la ligne directrice OCDE 201 (OCDE, 2011) dans le cas des expériences menées chez l'algue verte *P. subcapitata* et le milieu MHSM-1 (Tableau 1 de l'annexe 1) dans le cas des expériences réalisées avec l'algue verte *C. reinhardtii*.

Le Cr utilisé dans les différentes expériences était principalement sous forme non radioactive. Toutefois, le ⁵¹Cr radioactif a été utilisé dans l'étude des flux d'internalisation (section III.5) et de la répartition subcellulaire (section III.6) du Cr(III) et Cr(VI) chez *C. reinhardtii*. L'utilisation du Cr radioactif permet une détection du Cr satisfaisante dans les milieux d'exposition et chez les algues à des concentrations suffisamment faibles pour minimiser les phénomènes de précipitation du Cr(III) (voir section III.2 et Chapitre I).

III.2 Spéciation du Cr dans les milieux d'exposition

La spéciation du Cr dans les différents milieux d'exposition a été calculée avec le logiciel Mineql+ (version 4.6). Les constantes de formation des complexes du Cr n'ont pas été

modifiées par rapport à la base de données thermodynamiques utilisées par défaut dans ce logiciel. Pour ce qui est de la spéciation du Cr(III), les résultats de calculs autorisant la précipitation des phases solides et de calculs n'autorisant pas cette précipitation ont été comparés.

Les valeurs de pH utilisées pour la modélisation ont été mesurées directement dans les solutions correspondantes à l'aide d'une électrode de pH avant et après le début de l'exposition (ajout des algues). Les mesures de la concentration en Cr total ont été réalisées par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) pour les expériences effectuées chez *P. subcapitata* ou par mesure de radioactivité (compteur gamma) pour les expériences réalisées chez *C. reinhardtii*. Ces valeurs expérimentales, ainsi que les concentrations nominales des autres éléments en solution (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , etc.), ont été utilisées pour modéliser la spéciation chimique du Cr dans les différentes solutions d'exposition.

III.3 Tests d'écotoxicité du Cr chez *P. subcapitata*

L'écotoxicité du Cr(VI) a été évaluée en utilisant son sel de dichromate ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, VWR) alors que trois sels de Cr(III) ont été utilisés : le chlorure de chrome ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Alfa Aesar, 99.5% min), le sulfate de potassium de chrome ($\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; Merck Millipore, 99%) et le nitrate de chrome ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; Alfa Aesar, 98.5%). Ces trois sels de chrome trivalent sont les plus rencontrés dans la littérature et ils ont été utilisés afin de comparer leurs écotoxicités. Les tests ont été réalisés selon les normes et les lignes directrices du test d'inhibition de croissance algale OCDE 201 (OCDE, 2011) dans le milieu ISO8692.

Une solution correspondant au milieu ISO à une concentration 10 fois plus élevée que celle nécessaire pour assurer la croissance des algues a été préparée en utilisant des solutions nutritives concentrées et stérilisées. Des cellules en phase de croissance exponentielle ont été ajoutées à une densité d'environ 200.000 cellules/mL au milieu ISO concentré 10 fois. Le nombre exact des cellules a été dénombré par observation microscopique et comptage en utilisant la cellule de Malassez. Les cellules ont été transférées du milieu de culture (milieu LC) au milieu du test sans lavage.

Immédiatement avant les tests, des solutions mères de Cr(III) et Cr(VI) (5 g/L) ont été préparées et diluées à 2,5 mg/L. Huit dilutions successives ont ensuite été préparées dans de

l'eau ultrapure suivant une progression géométrique avec un facteur de séparation de 2 ; soit un total de neuf concentrations nominales du Cr : 2,5 ; 1,25 ; 0,63 ; 0,31 ; 0,16 ; 0,08 ; 0,039 ; 0,02 ; 0,009 mg/L). Des aliquotes (270 μ L) de chaque dilution (eau ultrapure pour les contrôles) ont été transférées en microplaques de 96 puits (Greiner bio-one, Cellstar ; 12 colonnes par 8 lignes) (Figure 21). Les microplaques ont été utilisées au lieu des Erlenmeyers car elles permettaient de travailler avec un faible volume d'échantillon et d'algues et nécessitaient moins d'espace pour l'incubation que les essais en Erlenmeyers. De plus, l'utilisation des microplaques dans les tests d'écotoxicité chez les algues est également standardisé et reconnue comme équivalente à l'utilisation des Erlenmeyers (Blaise and Vasseur, 2005; Staveley and Smrcek, 2005).

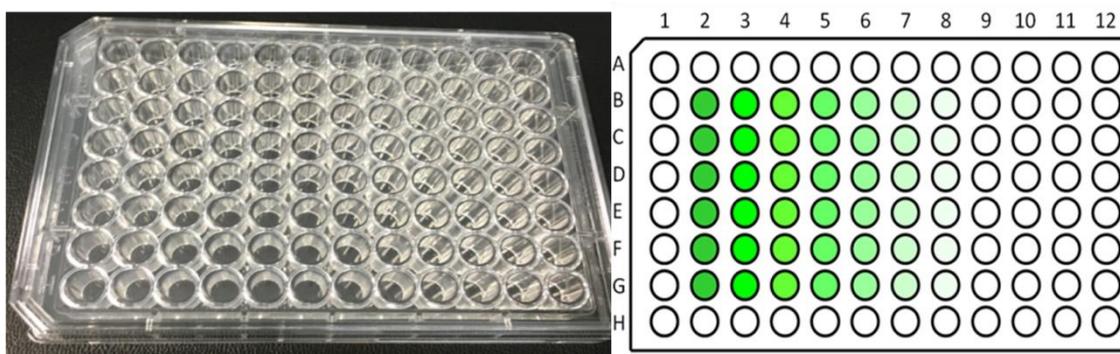


Figure 21 : Photographie des microplaques utilisées pour l'étude d'écotoxicité du Cr(III) et Cr(VI) chez les algues et schéma du résultat attendu (autofluorescence) avec les concentrations croissantes en contaminant. Les puits extérieurs sont remplis avec de l'eau ultrapure pour minimiser l'évaporation des solutions pendant les tests.

Les puits externes ont été remplis avec 300 μ L d'eau ultrapure afin de minimiser l'évaporation. Trente microlitres d'inoculum algal en milieu ISO concentré 10 fois ont été ensuite ajoutées dans les différents puits (exposés et contrôles). Les dilutions réalisées (270 μ L d'eau ultrapure ou de solution de Cr et 30 μ L d'inoculum algal) ont donné lieu à un inoculum de 20.000 cellules/mL et à des concentrations nominales de 2,25 ; 1,13 ; 0,56 ; 0,28 ; 0,14 ; 0,07 ; 0,035 ; 0,018 ; 0,009 mg Cr/L. Toutes les microplaques ont été recouvertes d'un couvercle en plastique et incubées pendant 72 h sous une lumière continue (90–110 μ M/m²/s) et une température constante de 21 \pm 2 °C. A l'exception des microplaques et des cônes de micropipettes, tout le matériel utilisé a été lavé avec de l'acide nitrique à 10 % pendant au moins 24 h et rincé abondamment à l'eau ultrapure.

Les effets du Cr(III) et du Cr(VI) sur la biomasse algale ont été quantifiés par mesure de la fluorescence algale après 72 h d'exposition à l'aide d'un spectrofluorimètre (Fluostar, BMG

labtechnology, Allemagne). Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission ont été fixées à 488/685 nm pour toutes les expériences. Pour chaque puits, le pourcentage d'inhibition après 72 h a été calculé selon l'équation suivante :

$$I(\%)_{72} = ((F_{\text{contrôle}} - F_{\text{échantillon}}) / F_{\text{contrôle}}) \times 100$$

'I' correspond au pourcentage d'inhibition de la fluorescence après 72 h, $F_{\text{contrôle}}$ et $F_{\text{échantillon}}$ sont les valeurs de fluorescence mesurées pour le contrôle et les différents échantillons après 72 h d'exposition. Pour chaque essai, l'écotoxicité du Cr a été exprimée sous forme de concentrations efficaces d'expositions qui ont produit une réduction de 50% de la fluorescence (concentration d'effet 50 : CE_{50}). Ces valeurs ont été calculées en effectuant une régression non linéaire sur le modèle de Hill avec la macro REGTOX (Version EV7.0.4, accessible sur le lien http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html ; Vindimian, 2010).

Dans le cas du Cr(III), les CE_{50} ont été estimées sur la base des concentrations totales nominales et aussi sur la base des concentrations moyennes pondérées dans le temps (Time-Weighted Mean – TWM) à partir de valeurs mesurées expérimentalement par AAS. L'utilisation de la TWM permet d'estimer la concentration moyenne à laquelle les organismes sont exposés au cours d'un essai d'écotoxicité lorsque les concentrations (dissoutes ou totales) d'un élément ou d'une substance diminuent au fil du temps. Les calculs des TWM ont été effectués selon la méthode décrite dans la ligne directrice 211 de l'OCDE (OCDE, 2008). La TWM est calculée selon l'équation suivante :

$$surface = ((Conc\ 1 - Conc\ 2) / (Ln(Conc\ 1) - Ln(Conc\ 2))) \times nbre\ de\ J$$

nbre de J est le nombre de jours durant la période d'exposition sans renouvellement du milieu d'exposition;

Conc 1 est la concentration mesurée au début de chaque période d'exposition;

Conc 2 est la concentration mesurée à la fin de chaque période d'exposition;

Surface est l'aire sous la courbe obtenue sur un graphique de concentration en fonction du temps (en jours) en joignant les points correspondants à chaque concentration mesurée. La surface ou l'aire sous cette courbe est égale à la concentration correspondant à la TWM.

III.4 Etude de la spéciation du Cr dans le milieu de test ISO 8692

III.4.1 Variabilité temporelle des concentrations du Cr

Selon la norme OCDE 211 (ISO, 2011), le pH du milieu de test algal ISO 8692 devrait se situer autour de 8 unités. Pour des valeurs de pH dans cette gamme, la spéciation du Cr(III) est dominée par la présence d'hydroxydes insolubles $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$ (Rai et al., 1989 ; Figure 6 du chapitre I). Ceci pourrait déterminer une diminution des concentrations d'exposition lors de test d'écotoxicité (Vignati et al., 2008, 2010 ; Ponti et al, 2014). Des expériences visant à étudier la variation de la concentration totale et filtrable (0,22 μm) du Cr(III) et, pour comparaison, du Cr(VI) dans le milieu ISO entre 0 et 72 heures, temps correspondant à la durée du test de toxicité, ont donc été réalisées.

Dans une première expérience, des solutions ayant des concentrations initiales en Cr de 140 $\mu\text{g/L}$ et 560 $\mu\text{g/L}$ ont été préparées dans du milieu ISO 8692. Ces deux concentrations ont été choisies car elles couvraient la gamme des CE_{50} rapportées dans la littérature pour les algues (Munn et al., 2005; OMS 2009; OMS 2013). Les sels de chlorures, nitrates ou sulfates ont été utilisés pour le Cr(III) et le dichromate de potassium pour le Cr(VI). Des aliquotes de chaque solutions ont été récupérées après 0, 24, 48, et 72 h, filtrées à 0,22 μm et acidifiées à 1% (v/v) avec de l'acide nitrique concentré (70%) et gardées à 4°C jusqu'à analyse. Les concentrations en chrome ont été déterminées par spectrométrie d'absorption atomique (SAA). L'incubation des solutions a été faite dans les mêmes conditions qu'un test d'écotoxicité sous lumière continue (90–110 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$) et température de 21 ± 2 °C.

Dans une deuxième expérience, huit concentrations initiales de Cr(III) (sous forme de chlorures) entre 0 et 2250 $\mu\text{g/L}$ (0, 18, 35, 70, 140, 280, 560, 1250 et 2250 $\mu\text{g/L}$) ont été préparées de la même façon. Les concentrations en Cr ont été mesurées avant et après filtration à 0,22 μm après 0, 24, 48 et 72 h d'incubation comme décrit précédemment.

Dans une troisième expérience, des aliquotes de milieu ISO 8692 ont été dopées avec des concentrations correspondant aux CE_{50} du Cr(III) ou du Cr(VI) en présence ou en absence de cellules algales (*P. subcapitata*) à une densité initiale de 20.000 cellules/mL. Les concentrations totales (sans filtration) et totales dissoutes (filtration à 0,22 μm) du Cr ont été déterminées après 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 24 ; 48 et 72 h d'incubation sous une lumière continue

(90–110 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$) à 21 ± 2 °C. Ce suivi sur des temps initialement courts a été adopté afin de mieux comprendre le comportement du Cr dans le milieu de test pendant les premières 24 heures.

Pour toutes les expériences, le milieu de test (ISO 8692) était fraîchement préparé selon les lignes directrices OCDE (OCDE, 2011) et dopé avec soit du Cr(VI) ou du Cr(III) (voir section III.3 pour les sels utilisés). Toutes les filtrations ont été faites avec des filtres seringues à 0,22 μm (Millex 33 mm de diamètre, PVDF, Millipore) prélevés une fois avec 10 mL d'acide chlorhydrique dilué (10% v/v ; HCL supra-pur 30%, VWR) et trois fois avec 10 mL d'eau ultrapure (MILLIPORE, Q-POD®). Tous les échantillons ont été acidifiés à 1% v/v avec l'acide nitrique concentré (HNO_3 67%, Prolabo, VWR) avant analyse.

Les concentrations de Cr ont été déterminées par spectrométrie d'absorption atomique en flamme (FAAS, Perkin-Elmer AAnalyst 100) ou par spectrométrie d'absorption atomique avec four de graphite pour des concentrations inférieures à 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ (GFAAS, Varian spectra 300). Les limites de quantification étaient de 0,2 $\mu\text{g}/\text{L}$ pour la GFAAS et 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ pour la FAAS. Les matériaux de référence certifiés SPS-SW1 (concentration en Cr total de $2,00 \pm 0,02$ $\mu\text{g}/\text{L}$) et WW1 (200 ± 1 $\mu\text{g}/\text{L}$) (Spectrapure standards, Manglerud, Norvège) ont été utilisés comme contrôles de qualité d'analyses.

III.4.2 Suivi de la spéciation redox du Cr

Afin de mieux comprendre le comportement écotoxicologique du Cr(III) et du Cr(VI), nous avons utilisé la technique de l'IC-ICP-MS (Spectrométrie de masse par torche à plasma couplée à une chromatographie ionique) pour vérifier si des interconversions entre Cr(VI) et Cr(III) peuvent avoir lieu dans le milieu standard du test algal (ISO 8692) en absence (milieu abiotique) ou en présence (milieu biotique) de l'algue verte *P. subcapitata*.³ Des informations détaillées sur la spéciation du Cr dans le milieu ISO 8692 permettent de s'assurer que la toxicité observée provient de la forme du chrome ajoutée dans chaque cas et non d'un mélange de deux formes redox suite à une éventuelle interconversion entre elles.

Des aliquotes (50 mL) du milieu ISO 8692 ont été dopées avec 60 $\mu\text{g}/\text{L}$ de Cr(III) (ajouté sous forme de chlorure) ou 115 $\mu\text{g}/\text{L}$ de Cr(VI) (ajouté sous forme de dichromate de potassium),

³ Cette partie a été réalisée en collaboration avec M. Py et M. Rosin (LHN, Anses Nancy).

c'est-à-dire les concentrations correspondant aux CE_{50} à 72 h déterminées pour les deux formes (Chapitre III, partie 1). Dans le cas des milieux biotiques, un inoculum algal de 20.000 cellules/mL a été ajouté immédiatement avant le dopage au Cr. Les échantillons ont été analysés immédiatement après l'ajout du Cr ($t=0$) ou après incubation pendant 24, 48 et 72 h à 23 ± 1 °C sous agitation à 100 rpm (seulement pour les échantillons contenant des algues) et une lumière continue ($90-110 \mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$). A la fin de chaque période d'incubation, des aliquotes de ces échantillons ont été filtrées ($0,22 \mu\text{m}$) et les concentrations en Cr(III) et Cr(VI) quantifiées. Les premiers 5 mL du filtrat ont été écartés afin d'éliminer toutes les traces des solutions de lavage des filtres et minimiser les phénomènes d'adsorption du Cr sur les filtres. Dix mL de solution ont donc été collectés dans des tubes en polystyrène et analysés immédiatement. Durant l'analyse, les échantillons ont été maintenus entre 4 et 6°C.

Dans d'autres expériences, nous avons examiné la spéciation du Cr(III) à des intervalles d'incubation plus courts. Un volume de milieu ISO8692 (2 L) a été préparé en conditions abiotiques dans une bouteille en polyéthylène prélavée à l'acide nitrique dilué (10% v/v). Une quantité équivalente à $60 \mu\text{g}/\text{L}$ de Cr(III) a été ajoutée à ce milieu afin de suivre de plus près les cinétiques de changement de la spéciation du Cr(III). Des aliquotes ont été récupérées, selon les modalités décrites ci-dessus, toutes les 20 minutes pendant les premières 6 heures après ajout du Cr et ensuite après 24, 48 et 72 h d'incubation.

Les deux formes du chrome (trivalente et hexavalente) ont été séparées par chromatographie ionique en utilisant une pompe (Thermo ICS 5000+) couplée avec une colonne d'échange anionique (Thermo AG7 2x50 mm) connectée au nébuliseur d'une ICP-MS (Thermo, Series XII) permettant la quantification du Cr. Les analyses ont été réalisées selon la méthode développée par l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) basée sur les recommandations du fournisseur (Kutscher et al., ANSES/LHN/MT-CrVI).

III.4.3 Formation des particules contenant du Cr

Des analyses permettant le suivi de la formation de particules (concentration et distribution des tailles) dans les milieux ISO 8692 ont été réalisées avec les techniques « nanoparticle

tracking analysis » (NTA) et « Single Particle Counting » (SPC)⁴. Ces expériences ont été réalisées seulement dans des solutions dopées en Cr(III) car la formation d'espèces insolubles de Cr, pouvant ensuite précipiter sous forme des colloïdes ou particules, ne concerne que cette forme redox de l'élément.

L'étude de la formation des particules par NTA a été effectuée en utilisant un appareil Nanosight NS500 (Malvern instruments Ltd, Royaume uni ; Figure 22). Cette technique exploite les propriétés de la lumière diffusée et les phénomènes liés au mouvement Brownien pour calculer la distribution de taille et la concentration des particules en suspension dans un liquide. Un faisceau laser traverse la chambre d'échantillon (volume de 0,3 mL) et les particules en suspension présentes sur la trajectoire de ce faisceau diffusent la lumière de telle sorte qu'elles peuvent être visualisées avec un microscope ayant un grossissement de 20x et équipé d'une caméra. La caméra enregistre un fichier vidéo des particules soumises au mouvement Brownien. Le logiciel fourni avec l'instrument (NTA 2.3 build 0033) repère les trajectoires des particules et calcule leurs diamètres hydrodynamiques (Figure 23). Pour des mesures fiables, la concentration en particules dans les échantillons doit être comprise entre 10^7 et 10^{10} particules/mL (Carr et Wright, 2013). Après chaque mesure, la chambre d'échantillon est rincée avec de l'eau ultrapure et l'échantillon suivant y est introduit. Toutes les mesures ont été faites en triplicata et les moyennes ± 1 écart-type de la distribution de taille et de la concentration en particules ont été calculées à chaque fois.

⁴ Les analyses NTA ont été réalisées en collaboration avec M. Cambier du LIST (Luxembourg Institute of Science and Technology) ; les analyses SPC ont été réalisées en collaboration avec M. Loizeau du Département F.-A. Forel de Sciences de l'Environnement et de l'eau (anciennement Institut F.-A. Forel) de l'Université de Genève.



Figure 22 : Appareil Nanosight NS500 utilisé pour la détection des nanoparticules dans le milieu ISO 8692 (photo S. Cambier).

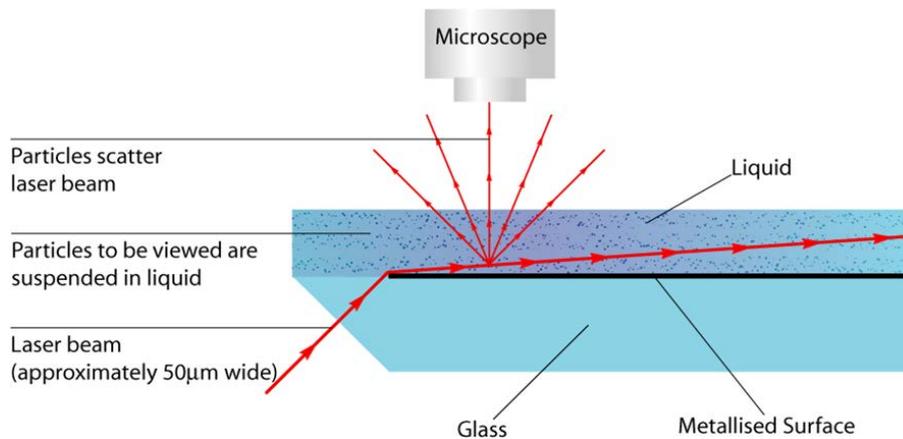


Figure 23 : Schéma de la configuration optique utilisée dans le suivi des nanoparticules par Nanoparticle Tracking Analysis. D'après Carr et Wright (2013).

Dans une première expérience, un suivi de l'évolution de la présence de particules dans des aliquotes du milieu de test a été fait entre 0 et 72 heures après l'ajout du Cr(III). Les concentrations utilisées (0, 17, 35, 70, 140 et 280 μg/L) couvraient une partie de la gamme utilisée dans les tests d'écotoxicité. Dans les solutions dopées à 17 μg/L, les mesures par NTA n'ont pas mis en évidence la présence de particules alors qu'un nombre trop élevé de particules a été observé dans les solutions contenant 140 et 280 μg/L de Cr. Des concentrations de particules inférieures à 10^7 particules/mL peuvent altérer la reproductibilité statistique des résultats. En revanche, pour des concentrations supérieures à 10^{10} particules/mL, les trajectoires de mouvement brownien des différentes particules peuvent se croiser durant la mesure et réduire la fiabilité des résultats (Carr et Wright, 2013). Compte-tenu de ces observations et de contraintes méthodologiques décrites ci-dessus, des analyses

plus approfondies ont été réalisées seulement dans des solutions contenant 70 µg/L de Cr(III). En effet, des concentrations de particules dans la gamme $1-3 \cdot 10^9$ particules/mL ont été observées dans les solutions contenant 35 et 70 µg de Cr(III)/L. Cette dernière concentration, proche de la valeur de CE_{50} du Cr(III) pour *P. subcapitata*, a été choisie pour une analyse détaillée du nombre et de la distribution par taille des particules après 1, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min ainsi qu'après 24, 48 et 72 heures d'incubation.

Dans cette série de mesures, les concentrations des particules ont montré une diminution systématique du nombre de particules entre le premier et le troisième répliqua, ce qui s'est traduit par des écart-types supérieurs à 40%. Un temps d'attente de 60 s a alors été ajouté entre les mesures des répliquas du même échantillon ce qui a permis la réduction des écart-types relatifs à 1–11%. Dans une deuxième expérience, la distribution de taille des particules et leur concentration ont été donc suivies par NTA dans du milieu ISO 8692 dopé avec 60 µg/L de Cr(III) avant et après filtration à 0,22 µm et pour différentes durée d'incubation (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 24 ; 48 et 72 h).

Puisque la technique NTA permet une détection des particules de taille entre 10 et 1000 nm seulement (Carr et Wright, 2013), la distribution des tailles des particules dans du milieu ISO 8692 dopé avec 60 µg/L de Cr(III) a aussi été étudiée par la technique SPC. Cette technique se base sur le principe de la dispersion de la lumière par les particules. Les particules sont comptées individuellement et classées sur un nombre de classes de tailles définies par trois détecteurs (Rossé and Loizeau, 2003) : un moniteur *in-situ* à sensibilité élevée (HSLIS, modèle M50) pour la gamme entre 50 et 200 nm et deux spectromètres volumétriques (LiQuilaz-S02 et LiQuilaz-S05 ; Particles measuring systems, Boulder) pour les gammes 200–2000 nm et 500 nm–20 µm, respectivement (Figure 24).

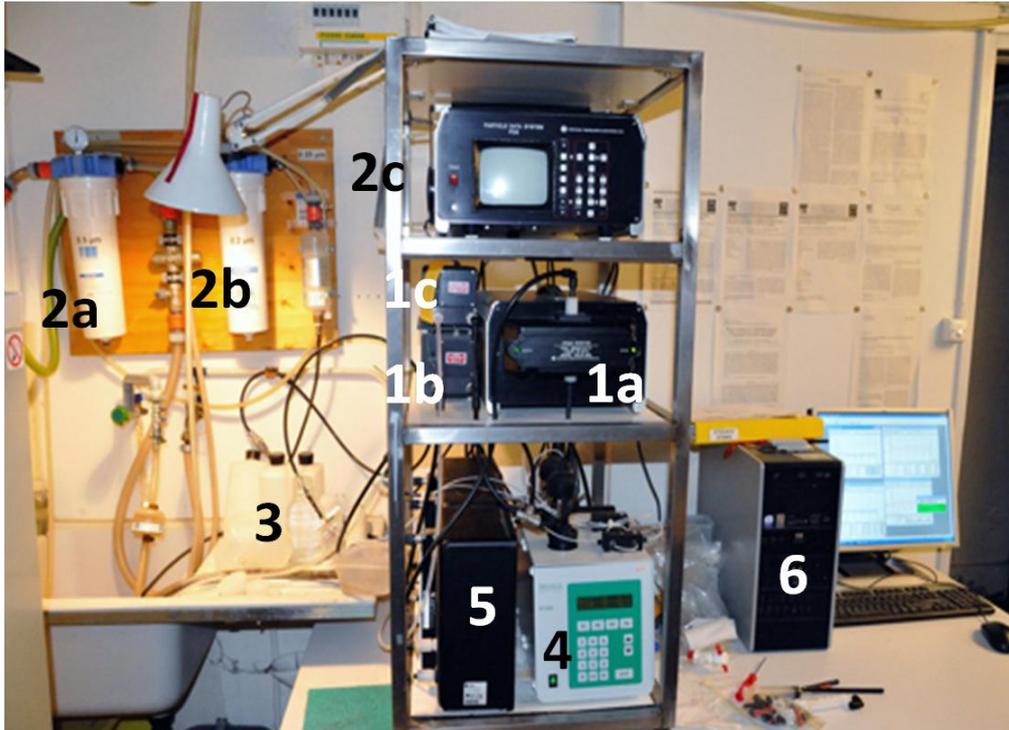


Figure 24 : Système SPC utilisé pour le suivi de la formation des particules dans le milieu ISO 8692 dopé avec 60 µg/L de Cr(III). (1) Compteurs des particules: (1a) HLIS-M50, (1b) LiQuilaz S02 et (1c) LiQuilaz-S05. (2) Cartouches filtrantes (Millipore): (2a) Polygard-CR 0,5 mm, 2b) Durapore 0,2 mm, (2c) Optimiseur DI 0,05 mm. (3) Echantillon. (4) Pompe volumétrique de précision KP2000 (Desaga GmbH), débit 1–1000 mL/h, contrôlée par ordinateur. (5) Contrôleurs du débit d'eau FC-100. (6) Ordinateur permettant le traitement des données avec le logiciel 'Facility Net'.

Pour les analyses par SPC, quatre bouteilles (250 mL chacune) contenant du milieu ISO 8692 dopé avec 60 µg/L de Cr(III) et quatre autres bouteilles contenant seulement du milieu ISO fraîchement conçu (blancs) ont été préparées. Les analyses ont été effectuées immédiatement après la préparation des milieux ($t = 0$) ou après 24, 48 et 72 h d'incubation. Les résultats obtenus pour les solutions du milieu de test contenant le Cr(III) ont été corrigés par rapport aux blancs correspondants.

En parallèle avec les mesures de concentration de particules par NTA et SPC, des aliquotes du milieu ISO ont été prélevées pour la détermination de la concentration totale du Cr par SAA avant et après filtration (0,22 µm) avec les mêmes procédures décrites à la section III.4.1.

III.5 Détermination des flux d'internalisation du Cr(III) et du Cr(VI) chez *C. reinhardtii*

Afin d'évaluer les mécanismes d'interaction du Cr avec les algues, un séjour d'environ 4 mois a été effectué à l'Institut National de la Recherche Scientifique à Québec (Canada) en collaboration avec le professeur Claude Fortin et avec le soutien financier du projet LabexR21 (<http://ressources21.univ-lorraine.fr/>, action 67). Le but principal du stage était de tester si la différence de toxicité entre Cr(III) et Cr(VI) pouvait être régie par une différence dans leurs flux d'internalisation (prise en charge par les algues) ou dans leurs répartitions intracellulaires (section III.6).

La détermination des taux d'internalisation du Cr(III) et Cr(VI) par les algues a été faite en exposant des cultures de l'algue unicellulaire *C. reinhardtii* à l'isotope radioactif ^{51}Cr sous ces deux formes redox. Le formalisme du modèle de ligand biotique, qui est un modèle conceptuel utilisé pour prédire l'accumulation et la toxicité des éléments traces pour les organismes aquatiques, a été appliqué pour comprendre la contribution des espèces ioniques du Cr(III) à l'internalisation et aux effets écotoxicologiques potentiels (Campbell et al., 2002; Crémazy et al., 2013a). Ce modèle tient compte de la spéciation chimique d'un métal dissout, comprenant la complexation avec des ligands organiques et inorganiques et de sa réactivité avec le ligand biotique. Le ligand biotique représente un site récepteur de l'action sur un organisme où l'absorption des métaux se produit et conduit à un effet toxique (Crémazy et al., 2013 ; Campbell et al., 2002).

Tout le matériel utilisé dans ces expériences a été lavé avec de l'acide nitrique 10 % v/v pendant au moins 24 h, rincé abondamment (5 fois) à l'eau déminéralisée et trois fois à l'eau ultrapure et enfin séché sous une hotte à flux laminaire avant son utilisation. Des cellules algales ont été exposées (pendant de temps allant de 5 à 60 minutes) au Cr(III) ou au Cr(VI) radioactifs (activité initiale de 20.000 désintégration par minute/mL–DPM/mL), respectivement sous forme de $^{51}\text{CrCl}_3$ (PerkinElmer, pureté radio-nucléidique > 99,9%, activité spécifique initiale de 649,5 mCi/mg (24,03 GBq/mg); et de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (PerkinElmer, pureté radio-nucléidique > 99,9%, activité spécifique initiale de 244,3 mCi/mg (9,04 GBq/mg). Le milieu d'exposition (Chapitre III, Partie 3, Publication 2) a été préparé et filtré (0,22 μm) 24 h avant l'ajout des cellules algales, et le pH a été vérifié et ajusté (NaOH) selon

besoin. Toutes les solutions stocks utilisées pour la préparation du milieu d'exposition ont été pré-filtrées (0,22 μm) afin d'enlever les particules abiotiques qui pourraient causer un biais dans le comptage des algues ou adsorber les métaux en solution, mais aussi afin d'éliminer des bactéries qui peuvent altérer la composition de ces solutions stocks. Aucun tampon de pH n'a été utilisé dans les milieux d'exposition afin de réduire toute formation de complexes de Cr.

Les expositions ont été réalisées avec des cultures d'algues en phase de croissance exponentielle (~ 72 h après le début d'une nouvelle culture). Ces algues étaient récoltées par filtration sur une membrane de 2 μm en polycarbonate (PC) puis rincées avec 10 mL d'une solution de rinçage (Chapitre III, Partie 3, Publication 2). Ces cellules ont été remises en suspension dans environ 10 mL du milieu de rinçage au pH d'exposition désiré (5, 6 ou 7). La distribution de taille (gamme utilisée entre 2 et 10 μm), la surface moyenne et la densité cellulaire ont été immédiatement déterminées en utilisant un compteur de particule automatisé (Coulter Z2, Beckman Coulter, multisizer 3) après une dilution au 1/100 de la suspension algale avec une solution isotonique (Isoton II) (100 μL de suspension algale + 9,9 mL de la solution isotonique). La densité algale initiale dans les milieux d'exposition était toujours de 100.000 cellules/mL. Toutefois, selon l'expérience, le temps d'exposition et la concentration du Cr variaient dans les milieux selon ce plan :

Pour l'étude cinétique de l'évolution de la prise en charge du Cr par les algues, les cellules ont été exposées à 10 nM de Cr(III) ou du Cr(VI) pendant environ 5, 15, 30 et 60 minutes ;

Pour l'étude de l'évolution de la prise en charge du Cr par les algues à différentes concentrations d'exposition, les cellules ont été exposées à différentes concentrations en Cr(III) ou Cr(VI) (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM ou 10 μM) durant une heure. Les expositions ont eu lieu à différents pH (5, 6 et 7), le but étant de déterminer l'effet du pH et de la concentration en chrome sur les flux d'internalisation de deux formes de Cr par l'algue modèle.

A la fin de chaque durée d'exposition, les cellules ont été récupérées sur deux filtres superposés (membranes de polycarbonates de 2 μm ; filtre supérieur et inférieur) et une aliquote de 2 mL de la solution d'exposition a été récupérée à la fin de l'expérience pour déterminer la concentration d'exposition totale en chrome. L'activité (radioactivité) du filtre inférieur a été soustraite de celle du filtre supérieur pour une correction pour l'adsorption du Cr sur le filtre. Après un rinçage avec 10 mL de la solution de rinçage (Chapitre III, Partie 3,

Publication 2), les cellules ont été incubées pendant 10 minutes dans 10 mL d'une solution d'extraction (solution de rinçage supplémentée avec de l'EDTA à 0,1 mM ; (Chapitre III, Partie 3, Publication 2), puis ont été rincées à nouveau trois fois avec 10 mL de la solution de rinçage. Dans le cas du Cr(VI), la solution d'extraction a été ajustée à pH 8 et l'EDTA n'a pas été ajoutée. La fraction de Cr restant associée aux cellules d'algues a été définie comme la fraction du chrome intracellulaire. Les cellules ont été remises en suspension en agitant le filtre supérieur avec une paire de pinces dans 2 ml d'eau ultrapure. La suspension obtenue en présence du filtre a été analysée avec un compteur gamma (Wizard2 compteur gamma automatique, PerkinElmer) pour déterminer la quantité de Cr accumulée par les algues. Le filtre inférieur a également été remis en suspension par agitation avec des pinces dans 2 ml d'eau ultrapure, et a également été analysé au compteur gamma. Toutes les expériences d'internalisation et de prise en charge du Cr par les algues ont été effectuées en triple et les valeurs de concentrations ont été normalisées par rapport à la surface des algues.

III.6 Détermination de la répartition subcellulaire du Cr(III) et du Cr(VI) chez *C. reinhardtii*

L'isotope radioactif ^{51}Cr a également été utilisé pour comparer l'accumulation intracellulaire dans les algues ainsi que la distribution subcellulaire du Cr après une exposition des algues au Cr (III) et Cr (VI). Les expériences de fractionnement subcellulaires ont été réalisées pour les deux formes du chrome en utilisant un temps d'exposition de 1 h (équivalent au temps maximal utilisé dans l'étude des flux d'internalisation) et de 72 h. Des cellules de *C. reinhardtii* en phase semi-exponentielle ont été récoltées et resuspendues à une densité initiale de 100.000 cellules/mL dans les milieux d'exposition contenant 100 nM de chrome (trivalent ou hexavalent). Les concentrations en chrome, le pH et la densité cellulaire ont été mesurés toutes les 24 h, du début à la fin de l'exposition (pour l'expérience de 72 h). Après les durées d'exposition préconisées, les algues ont été récupérées par centrifugation, mises en présence de 10 mL d'une solution de 1 mM d'EDTA pendant 10 min, puis récoltées à nouveau par centrifugation. Cette étape a été effectuée pour enlever le métal extracellulaire adsorbé sur la surface des cellules et la solution MHSM-E a été analysée pour sa teneur en Cr extracellulaire (compteur gamma). Le reste des algues a été lysé par sonication (Branson 250 sonication probe; 4 min, fréquence des pulses = 0.2 s/s, 4 °C) et les différentes fractions subcellulaires ont été ensuite séparées par centrifugation différentielle avec des traitements chimiques et

thermiques pour isoler certaines fractions selon la méthode décrite par Lavoie et al., 2009, avec un erratum publié en 2011 (Lavoie et al., 2011) (Figure 25). Les différentes fractions correspondent aux débris cellulaires (noyaux, membranes et parois cellulaires), aux organelles (mitochondries, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, chloroplastes, etc.), aux granules (phases minérales résistantes à un traitement en présence de NaOH), aux protéines stables à la chaleur ou « HSP – heat stable proteins » (glutathion, phytochélatines et autres peptides non identifiés) et aux protéines instables à la chaleur ou « HDP – heat denaturable proteins » telles que les enzymes. Les concentrations en Cr ont été mesurées dans chacune de ces fractions. Ces fractions subcellulaires ont été directement analysées au compteur gamma.

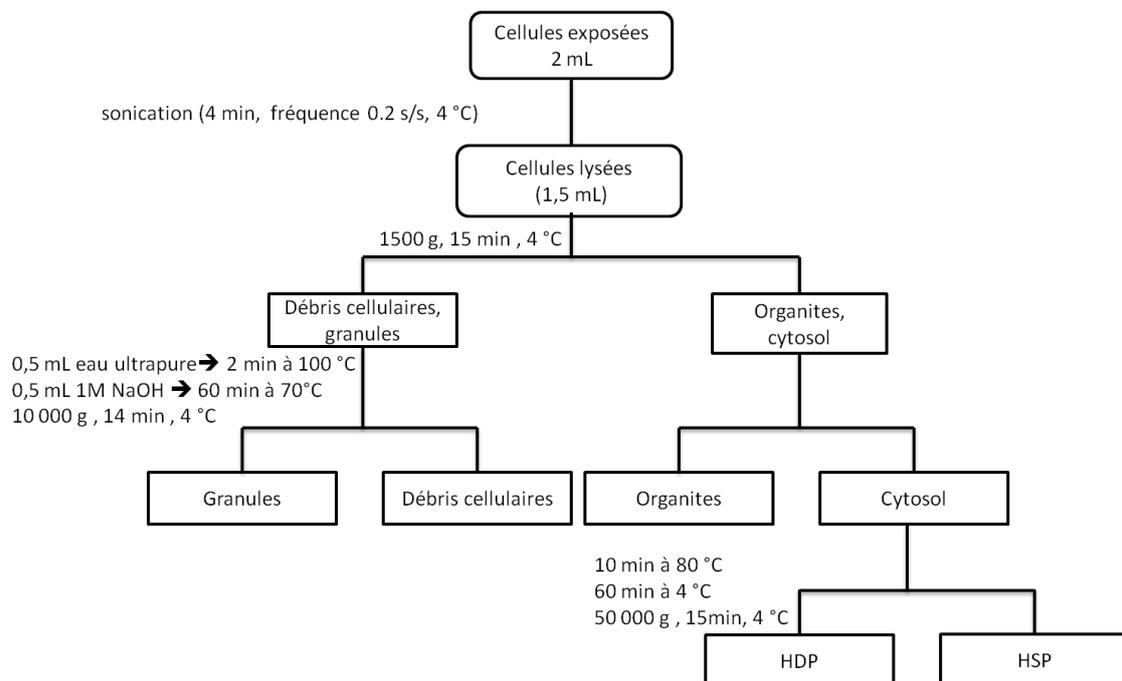


Figure 25 : Protocole de séparation des fractions subcellulaires par centrifugation différentielle couplée au traitement thermique et chimique. Adapté d'après Lavoie et al. (2011).

III.7 Investigation des effets écotoxiques chez *P. subcapitata*

III.7.1 Effet du chrome sur l'activité photosynthétique (photosystème II – PSII)

L'activité photosynthétique est couramment étudiée dans les tests d'évaluation d'écotoxicité de plusieurs polluants, y compris les ETM (Mallakin et al., 2002; Plekhanov and Chemeris, 2003; Ruley et al., 2006). La photosynthèse est le processus qui permet aux organismes photosynthétiques de convertir l'énergie lumineuse du soleil en énergie chimique et en

biomasse. Les réactions de la photosynthèse se divisent en deux phases : une phase lumineuse qui implique les réactions photochimiques responsables de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique, et une phase obscure ou biochimique (indépendante de la lumière) qui consiste en l'ensemble des réactions biochimiques liés au cycle de Calvin pour la transformation du CO₂ en glucides.

Chez les algues vertes et les plantes supérieures, l'absorption de la lumière se fait au niveau des antennes collectrices de lumière du PSII par différents pigments, notamment la chlorophylle a (Chl a) et ses pigments accessoires (Chl b et caroténoïdes). Lorsqu'un pigment photosynthétique absorbe un photon, il passe rapidement d'un état fondamental à un état excité, possédant un plus haut niveau d'énergie. Le retour à l'état stable est possible par le transfert de l'énergie d'excitation à une molécule voisine (avant que l'excitation soit transférée au centre réactionnel du PSII), par la dissipation de l'énergie d'excitation sous forme de chaleur ou de fluorescence ou encore par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

En absence de lumière, la fluorescence mesurée suite à l'application d'un flash saturant, et avant que l'énergie d'excitation ne soit transférée au centre réactionnel du PSII, est la fluorescence (F₀), aussi connue comme la fluorescence de base ou morte. Par contre, l'arrivée de l'énergie d'excitation au centre réactionnel du PSII contribue à la réduction des transporteurs d'électrons du PSII ; ce qui permet de mesurer la fluorescence maximale (F_m). La différence entre F_m et F₀ constitue la fluorescence variable (F_v = F_m - F₀) qui représente un indicateur de la capacité de transport d'électrons du PSII. Le rapport F_v/F_m (Fluorescence variable / Fluorescence maximale) est le rendement photochimique du PSII, qui renseigne sur l'état de santé des cellules photosynthétiques (Schreiber et al., 1997).

Une étude comparative de la toxicité du Cr(III) et du Cr(VI) sur l'activité du PSII a été effectuée chez l'algue verte *P. subcapitata*. La toxicité a été évaluée à courte durée (2, 4, 6 et 24 heures). Puisque les concentrations dissoutes du Cr(III) ajoutées au milieu de culture algale diminuent rapidement (< 24 h) au fil du temps (Chapitre III, partie 1; Vignati et al., 2008), il

nous est apparu intéressant d'étudier les réponses biologiques pour des temps d'exposition plus courts que les 72 heures du test d'inhibition de croissance.⁵

L'activité du PSII a été évaluée en absence (contrôle) ou en présence de concentrations croissantes (entre 0,0097 et 100 mg Cr/L) en Cr (III) ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Alfa Aesar, 99,5% min) et Cr(VI) ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, VWR, 99,8% min). Des inocula de 200.000 cellules/mL de l'algue verte *P. subcapitata* en phase exponentielle de croissance ont été préparés dans le milieu ISO 8692. Cette densité cellulaire a été choisie pour permettre une détection correcte de la fluorescence par le fluorimètre Handy PEA (Hansatech) utilisé dans ces expériences. Les suspensions d'algues ont été adaptées à l'obscurité pendant 15 min avant la mesure de l'efficacité photosynthétique du PSII et la détermination des ratios Fv/Fm, ce dernier paramètre étant calculé automatiquement par le fluorimètre.

III.7.2 Etude de l'effet du Cr(III) sur l'intégrité et la fonctionnalité cellulaire

Cette expérience a été réalisée afin d'étudier les effets algicides ou algistatiques que peut avoir le Cr(III) sur la viabilité des cellules algales en utilisant la cytométrie en flux qui permet de différencier les cellules vivantes des cellules mortes à l'aide de marqueurs cellulaires.⁶ Ces études ont été effectuées à l'aide d'un cytomètre en flux BD accuri C6. Le Cr(III) a été ajouté sous forme de son sel de chlorures ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Alfa Aesar, 99,5% min).

Pour permettre la différenciation des cellules mortes de celles vivantes, il a été nécessaire de préparer un contrôle positif (cellules mortes). Pour cela, des cellules algales ont subi un traitement thermique (72°C pendant 15 min) ou un traitement au peroxyde d'hydrogène (30 %) pendant 2h.

Deux marqueurs cellulaires ont ensuite été testés : le Sytox Green et le diacétate de fluorescéine. Le Sytox Green (utilisé à une concentration de 0.5 μM) pénètre seulement à l'intérieur des cellules mortes (dont la membrane plasmique est devenue perméable) et se lie à leur ADN. Après une incubation de 15 minutes à l'obscurité, les cellules mortes présentent

⁵ Une partie de ces expériences a été réalisée en collaboration avec M. Arab Mohammed, stagiaire de M1, que j'ai co-encadré durant les mois de janvier et février 2014.

⁶ Ces expériences ont été effectuées dans le cadre du stage de Master 1 de M. Ait Benamara Nassim Djamel que j'ai co-encadré durant Janvier et Février 2014.

une fluorescence verte après excitation à une longueur d'onde entre 450 et 490 nm. Le FDA, en revanche, permet de marquer les cellules vivantes car cette molécule, une fois dans une cellule vivante, subit une hydrolyse enzymatique produisant son métabolite fluorescent (la fluorescéine) qui a une longueur d'onde d'émission de 525 nm. Les cellules algales ont été incubées en présence de FDA (100 μ M) pendant 15 minutes à l'obscurité avant la mesure de la fluorescence associée à l'hydrolyse du FDA.

Pour le marquage au Sytox Green, un inoculum de 20.000 cellules/mL de *P. subcapitata* dans du milieu ISO 8692 a été exposé à 0,06 mg/L de Cr(III) (valeur d' CE_{50} du Cr(III) trouvée dans l'expérience de l'inhibition de la croissance algale après 72 h ; voir chapitre III, partie 1) pendant 72h, sous lumière continue (90–110 μ M/m²/s), sous agitation (100 rpm) et à une température de 21 ± 2 °C. Deux aliquotes des cellules issues de cet inoculum ont été prélevées et marquées au Sytox Green avant lecture au cytomètre en flux.

Dans le cas de la FDA, des inocula de 20.000 cellules/mL de *P. subcapitata* ont été exposés à des concentrations de Cr(III) entre 10 μ g/L et 1,25 mg/L dans des microplaques à 96 puits et dans les mêmes conditions décrites pour le Sytox Green (hors agitation). Après 72 heures, les cellules contenues dans chaque puits ont été marquées avec le FDA et incubées comme décrit ci-dessus avant détermination de leur fluorescence en cytométrie en flux.

III.7.3 Essais de développement d'un protocole pour l'étude de la génotoxicité du Cr(III) et du Cr(VI)

Une étude d'applicabilité du test de comètes (Singh et al., 1988) pour la mesure de la génotoxicité du Cr(III) et Cr(VI)⁷ a été réalisée chez des cellules de *P. subcapitata*. Le test des comètes repose sur la microélectrophorèse des noyaux de cellules isolées en conditions alcalines dans du gel d'agarose sur lames de microscope.

L'idée originale de ce test revient à Rydberg et Johanson (1978) qui ont été les premiers à quantifier les dommages à l'ADN dans des cellules isolées incluses dans de l'agarose sur lame de microscope. La lyse des cellules en conditions alcalines permet le déroulement partiel

⁷ Cette partie a été réalisée dans le cadre de stages de Mme Ada-Fouda Rufine et Mme Simonin Cécile et avec la collaboration de Mme Sylvie Cotelle, MCF au LIEC.

de la chromatine et son marquage à l'acridine orange. La mesure du rapport fluorescence verte / fluorescence rouge, traduisant le rapport entre les molécules d'ADN double-brin et simple-brin, permet une évaluation de l'intégrité du matériel génétique et la mesure du degré des dommages à l'ADN. Ostling and Johanson (1984) ont apporté quelques modifications et ont donné à l'essai son nom de test des comètes. Ils ont ajouté au protocole une brève étape d'électrophorèse en conditions neutres et ont opté pour une coloration au bromure d'éthidium (BeT). Toutefois cette procédure ne permet que la détection des cassures double-brins. Avec l'ajout d'une électrophorèse en conditions alcaline par Singh et al. (1988) il est devenu possible de détecter les cassures simple-brins ainsi que les sites alcali-libres. Les différentes étapes du protocole expérimental sont illustrées dans la figure 26.

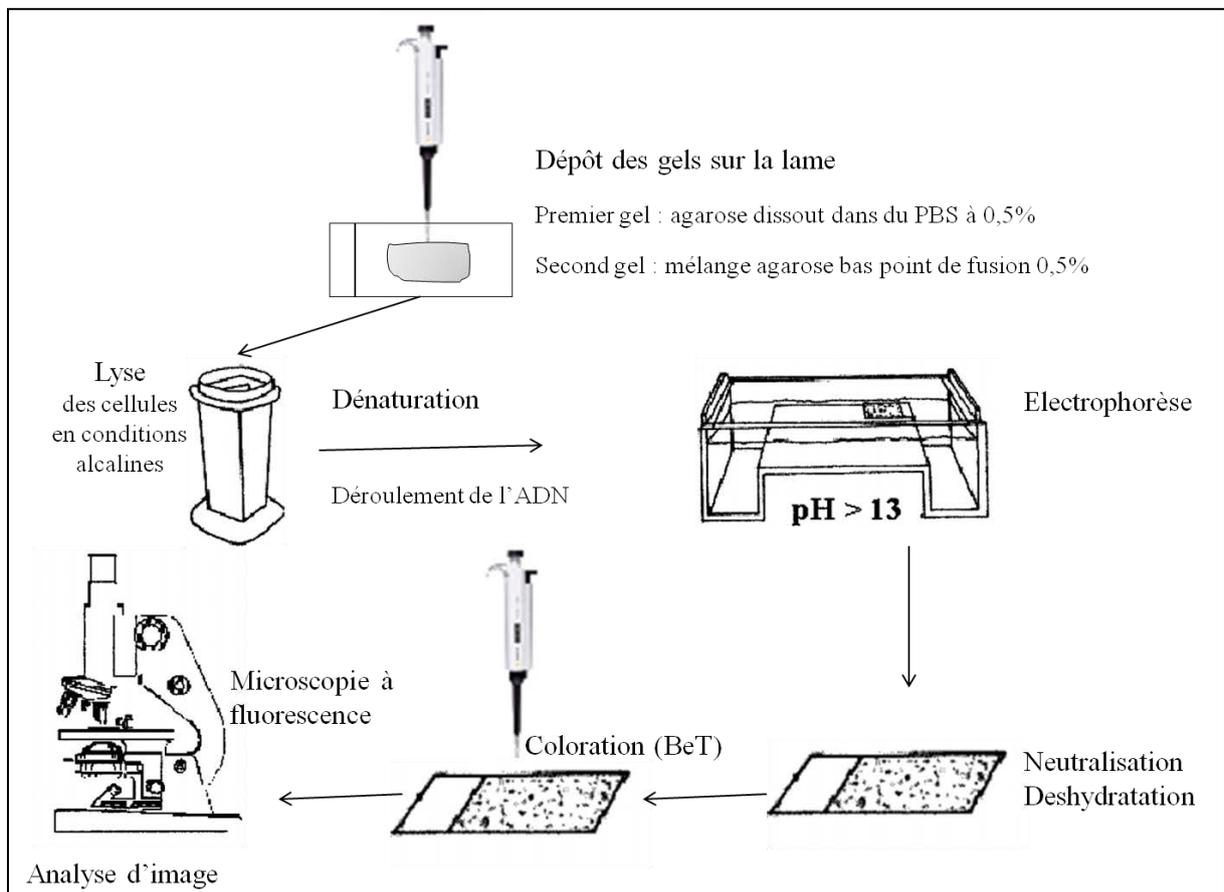


Figure 26 : Principales étapes du test des comètes (modifié d'après Rojas et al., 1999) ; PBS : phosphate-buffered saline, BeT : bromure d'éthidium.

Des cellules de *P. subcapitata* en phase exponentielle de croissance (environ 72 h) ont été récupérées à partir du milieu de culture (LC) par centrifugation à 4.000 rpm pendant 15 min et resuspendues dans l'eau ultrapure avant de préparer un inoculum de 200.000 cellules/mL dans

le milieu ISO 8692. Ces algues ont ensuite été exposées pendant 3 heures à 0,06 mg/L de Cr(III) ou à 0,15 mg/L de Cr(VI). Des contrôles non exposés au Cr ont aussi été préparés.

Après exposition, les cellules ont été incluses dans un gel d'agarose sur des lames et lysées dans une solution contenant 300 mM de NaOH, 30 mM d'EDTA et 0,01% de SDS auquel sont ajoutés du DMSO 10% et du triton X-100 à 1% v/v. Après la lyse, les lames ont été rincées et placées dans une solution de dénaturation (300 mM de NaOH et 1mM d'EDTA) afin d'éliminer toutes traces de détergents ou de sels. Le pH de cette solution est supérieur à 13 et permet la dénaturation des molécules d'ADN. Une courte électrophorèse (20 min, 25 V, 300 mA) permet ensuite aux fragments d'ADN cassés (chargés négativement) de migrer vers l'anode. Si la molécule d'ADN est intacte, elle se déplacera peu, car elle est trop encombrante pour migrer dans l'agarose. Par contre, si elle a subi des dommages qui se traduisent par des coupures des brins, les fragments d'ADN issus de ces coupures pourront se déplacer dans le gel, d'autant plus loin qu'ils sont petits (Cotelle and Férard, 1999).

Après cette étape de migration, les lames ont été trempées dans une solution tris-HCl (0,4 M et pH de 7,5) pour deux fois pendant 5 minutes, ce qui permet un ré-appariement des deux brins d'ADN complémentaires. Ensuite, les lames ont été colorées au BeT, un agent intercalant qui rend l'ADN fluorescent. Après marquage au BeT, l'ADN intact apparaît comme une sphère alors que l'ADN lésé s'étire progressivement vers l'anode proportionnellement au nombre de cassures. Un microscope à fluorescence équipé d'une lampe à vapeur de mercure et couplé à une caméra vidéo (monochrome CCD IEEE1394 Fire Wire) a été utilisé pour l'observation des lames et visualisation de l'image sur ordinateur grâce au logiciel Comet Assay IV. En cliquant sur un point blanc (qui représente le noyau de la cellule coloré avec du BeT) visible sur l'écran d'ordinateur et ainsi désigne la comète, celle-ci est positionnée dans le cadre de lecture (de couleur jaune), et le logiciel définit alors trois repères délimitant les différentes parties de la comète (en bleu, violet et vert) (Figure 27) et mesure les différents paramètres : « tail length » (la distance de migration de l'ADN du corps du noyau), « tail moment » (le produit de la longueur de la queue de la comète et la fraction de l'ADN totale dans la queue), « tail intensity » (intensité de la queue).

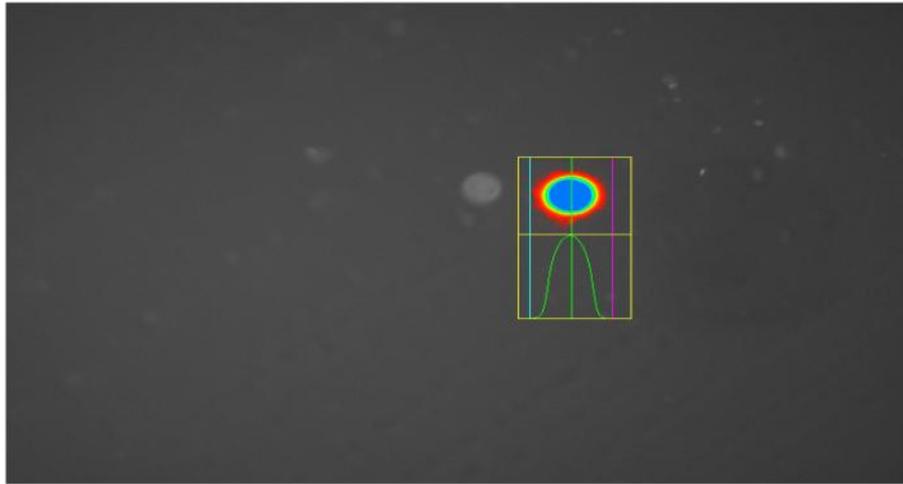


Figure 27 : Analyse d'une comète par le logiciel Comet Assay IV couplé à une caméra digitale. Dans cet exemple c'est une cellule algale *P. subcapitata* après un traitement au Cr(III) (0,06 mg/L) pendant 3 h.

III.8 Tests statistiques

Dans les expériences sur la répartition subcellulaire du Cr(III) et Cr(VI) chez *C. reinhardtii*, toutes les valeurs ont été exprimées sous forme de moyenne arithmétique ± 1 écart-type ($n = 3$). Les différences des concentrations du Cr entre les différents compartiments cellulaires (total accumulé, intracellulaire et extracellulaire) et entre les différentes fractions subcellulaires ont été évaluées en utilisant le test non paramétrique Kruskal-Wallis sur les rangs suivi d'un test de Tukey-Kramer HSD (Honest Standard Deviation). Pour les valeurs en pourcentage, les données ont été transformées en arcsine avant d'appliquer une Anova suivi d'un test de Tukey-Kramer HSD. Ces analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel JMP Pro 11 (SAS Institute Inc., USA) et les graphes ont été préparés avec Sigmaplot 10.0 (Systat Software, Inc., USA).

IV. Etudes menées chez le bivalve *Corbicula fluminea*

IV.1 Toxicité létale du Cr(III) et du Cr(VI)

Un test pour la détermination des concentrations létales du Cr(III) et du Cr(VI) a été réalisé chez *C. fluminea* pour permettre de définir des conditions d'exposition adéquates (absence de mortalité) pour les études de bioaccumulation (section IV.2) et d'expression de biomarqueurs (section IV.3). Ce type de test n'étant pas normalisé chez les bivalves, les essais ont été adaptés à nos conditions expérimentales. Ainsi, après acclimatation de 4 jours (Figure 20), 10

corbicules ont été mises dans des cristallisoirs de 3 L. Chaque cristallisoir contenait 1,5 litre du milieu d'exposition (eau Cristalline, source Aurèle) auquel des concentrations de Cr(III) ou Cr(VI) ont été ajoutées. En plus des témoins (blancs – pas de chrome ajouté), 6 concentrations d'exposition (5, 50, 500 µg/L, 1, 2 et 5 mg/L) de Cr(III) (ajouté sous forme de chlorure de chrome) ou de Cr(VI) (utilisé sous forme de dichromate de potassium) ont été préparées à partir de solutions mères de 5 g/L et testées. Les milieux d'exposition ont été oxygénés par bullage pendant toute la durée du test (96 h) et renouvelés quotidiennement. La température des milieux était de 15 °C et la photopériode de 12 h/12 h (12 h de lumière suivies de 12 h d'obscurité). Les tests ont été réalisés sans ajout de nourriture.

A la fin de ce test, aucune mortalité n'a été observée chez les corbicules, ce qui n'a pas permis de déterminer les concentrations létales ou sub-létales des deux formes de Cr dans les conditions choisies. Les trois concentrations plus basses (5, 50 et 500 µg/L), qui sont les plus réalistes d'un point de vue environnemental, ont été donc choisies et utilisées dans les expériences suivantes.

IV.2 Détermination de la bioaccumulation du Cr

Deux expériences ont été réalisées pour l'étude de la bioaccumulation du Cr(III) et Cr(VI) dans les branchies et les glandes digestives des corbicules. Dans chaque expérience, des échantillons ont aussi été récupérés pour l'étude de la perturbation de l'expression de plusieurs biomarqueurs précoces de la toxicité (voir section IV.3). Les expositions ont été faites dans les mêmes conditions de température et photopériode décrites pour le test de létalité. Dans cette partie, toutes les analyses de concentrations du Cr dans les échantillons biologiques sont exprimées en fonction du poids sec, ce qui permet de s'affranchir des problèmes de la variabilité de la teneur en eau d'un individu à l'autre ou d'un échantillon à l'autre.

Dans la première expérience, douze individus de *C. fluminea*, repartis entre les contrôles et les 3 concentrations d'exposition, ont été exposés au Cr dans des cristallisoirs de 3 L remplis avec 1,5 L de milieu d'exposition (Figure 28). Le milieu d'exposition a été renouvelé quotidiennement. A 24 h et 96 h d'exposition, quatre individus ont été disséqués et les branchies et les glandes digestives de chacun récupérés et congelés à -20 °C. Ces organes congelés à l'issue de chaque dissection ont été lyophilisés pendant 24 h (Lyophilisateur

CRIOS–80, Cryotec) avant la détermination des poids secs. Par la suite, les échantillons lyophilisés ont été placés dans des tubes en polystyrène auxquels un mélange de 0,5 mL d'acide nitrique (HNO₃, Suprapur, 65%, VWR) et 0,1 mL de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, Suprapur, 30%, VWR) ont été ajoutés. Afin de procéder à la minéralisation des échantillons, les tubes ont ensuite été placés pendant ~ 12 heures dans une étuve à 65 °C.

Un suivi détaillé (0, 2, 4, 6 et 24 h) de la variabilité de la concentration totale du Cr a été réalisé dans les différents cristallisoirs. Ce suivi a été fait en triplicata, avec des prélèvements du milieu d'exposition avec ou sans filtration à 0,45 µm réalisés au cours de chaque 24 h pendant trois jours. Les échantillons ont été acidifiés à 1 % v/v avec de l'acide nitrique (HNO₃, Suprapur, 65%, VWR) et les teneurs en Cr quantifiées par absorption atomique en flamme.

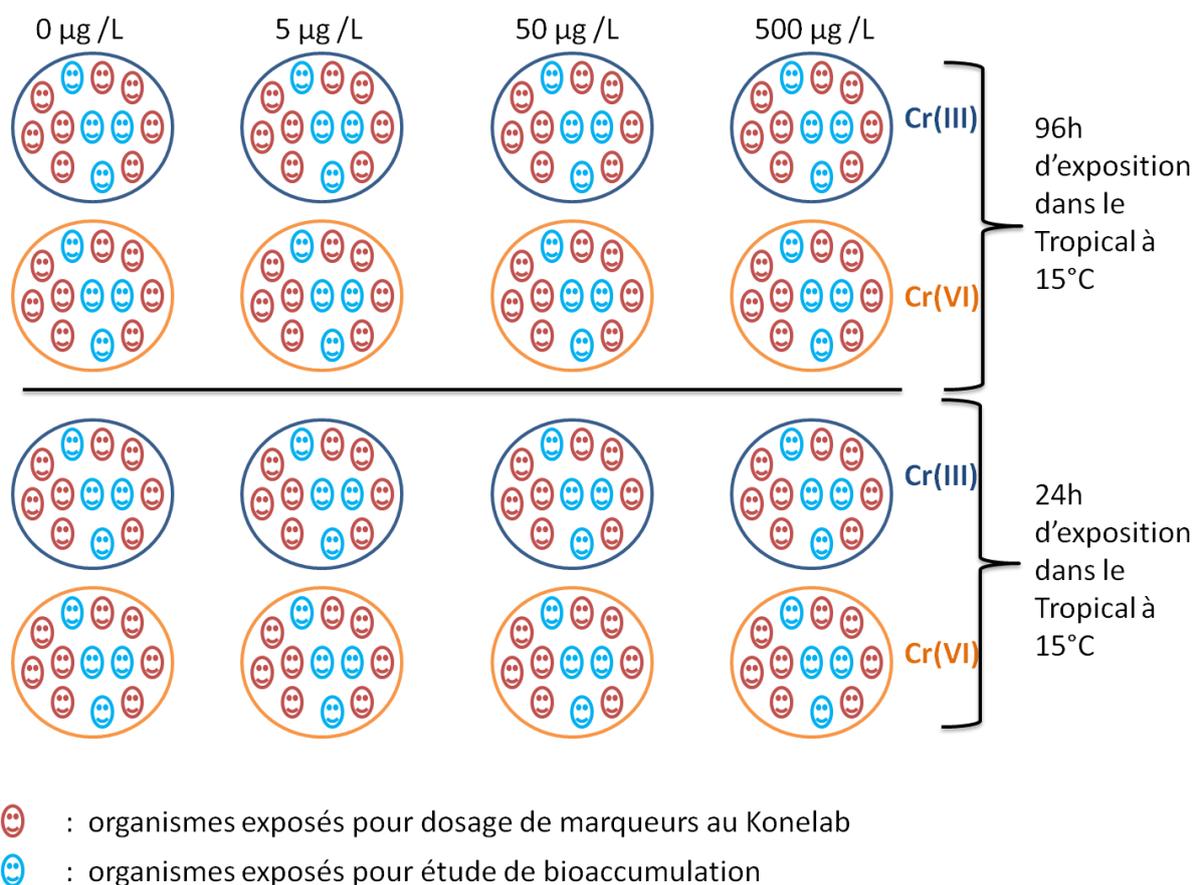


Figure 28 : Protocole d'exposition pour l'expérience 1 de l'étude de la bioaccumulation du Cr chez *C. fluminea*.

Dans la deuxième expérience, en plus des témoins, trois conditions d'exposition ont été testées pour un temps d'incubation de 96 h : 50 µg/L de Cr(III) ajouté sous forme de chlorure,

50 µg/L de Cr(VI) ajouté sous forme de dichromate de potassium) et un mélange de Cr(III) et de Cr(VI) ajoutés sous forme de solutions isotopiquement enrichies. Le mélange de Cr(III) et Cr(VI) a été préparé avec 100 µg/L de ⁵⁰Cr(III) (Applied Isotope Technologies, USA, batch # 030129-04-A, Lot # Cr04272010A ; PN-2 ; 97,30%) et 50 µg/L de ⁵³Cr(VI) (Applied Isotope Technologies, USA, batch # SH1332, Lot # CR12222014JC ; PN-20529, 97,70%). En effet, dans des conditions naturelles, les organismes aquatiques sont simultanément exposés au Cr(VI) et Cr(III). Cependant, à l'intérieur des cellules vivantes, le Cr(VI) est rapidement réduit en Cr(III) (Viti et al., 2013). Les techniques conventionnelles ne permettent donc pas de déterminer si le Cr accumulé dans les tissus était présent sous forme de Cr(VI) ou de Cr(III) dans la matrice d'exposition. L'utilisation de solutions isotopiquement enrichies offre la possibilité de suivre spécifiquement le devenir biologique du Cr(VI) et du Cr(III) dans les organismes aquatiques utilisés comme bioindicateurs. Le choix d'une concentration du Cr(III) deux fois supérieure à celle du Cr(VI) prend en compte le comportement du Cr(III) dans le milieu d'exposition. En effet, la concentration du Cr(III) diminuant au cours du temps, une concentration initiale de 100 µg/L de Cr(III) correspond à une concentration moyenne (moyenne géométrique) de 50 µg/L sur 24 heures (Chapitre III, partie 4, section I.3).

Douze palourdes ont été mises dans chaque cristalliseur (4 ont été utilisées pour l'étude de bioaccumulation et 8 pour l'étude de biomarqueurs selon le schéma de la figure 28). Le milieu a été renouvelé quotidiennement et des aliquotes ont été prélevées chaque 24 h pour suivre la stabilité de la concentration en Cr(III) et Cr(VI) dans les milieux d'exposition avant et après filtration à 0,45 µm par ICP-MS. A la fin des durées d'exposition, une dissection a été réalisée. Ensuite les tissus congelées à -20°C ont été lyophilisés et minéralisés comme décrit précédemment.

Les mesures de la bioaccumulation du Cr(III) ou Cr(VI) ont été effectuées par ICP-MS (ICAP Q, Thermo-Scientific)⁸ pour les deux expériences. Après la minéralisation, les échantillons issus des corbicules exposées à 500 µg/L (expérience 1 seulement) ont été dilués 101 fois avec de l'eau ultrapure avant analyse, alors que les autres échantillons issus des corbicules exposées à 0, 5 et 50 µg/L ont été dilués 26 fois. Le matériel de référence TORT-2 (lobster

⁸ Les analyses des échantillons de bioaccumulation du Cr dans les tissus des corbicules ont été faites en collaboration avec Marie-Noëlle Pons et Hélène Poirot (LRGP, Nancy).

hepatopancreas ; Conseil national de recherche du Canada ; teneur certifiée en Cr : $0,77 \pm 0,15$ mg/kg) a été utilisé pour évaluer la justesse de la procédure de minéralisation.

IV.3 Etude de l'induction des biomarqueurs précoces chez *C. fluminea*

IV.3.1 Préparation d'homogénats des branchies et des glandes digestives

Après exposition au Cr(III) ou Cr(VI) pendant 24 ou 96 heures (expérience 1) ou pendant uniquement 96 h (expérience 2), les glandes digestives et les branchies ont été collectées et rassemblées 2 à 2 (afin d'obtenir suffisamment de matériel biologique) dans des microtubes (2 mL) et congelées à -80 °C jusqu'au jour des analyses. Le jour des analyses, les échantillons ont été lentement décongelés dans de la glace et leur masse fraîche a été déterminée. Les tissus ont été broyés selon le protocole décrit dans Garaud et al. (2015) et Sroda et Cossu-Leguille (2011). En bref, le broyage a été effectué dans un tampon d'homogénéisation composé de 98% de tampon phosphate 50 mM à pH 7,6 supplémenté par 1% de phénylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) et d'1% d'un mélange L-Sérine borate à 1mM pour permettre d'inhiber les protéases (Garaud et al., 2015). Pour chaque échantillon, les volumes du tampon d'homogénéisation ont été adaptés aux masses fraîches des pools des branchies ou de glandes digestives mesurées, soit 4 mL de tampon ajouté pour 500 mg de tissu. Les tissus et le tampon ont été mis dans un microtube (2 mL) puis, à l'aide d'un potter en plastique adapté, broyés par pression entre le potter et les parois internes du microtube. Enfin, les broyats ont été centrifugés à 250 g pendant 5 min à 4 °C.

Une partie du broyat (homogénat) a été gardé pour la mesure de quelques biomarqueurs dans l'homogénat entier (voir ci-dessous), alors que le reste a été centrifugé à 1.000 g pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant a été récupéré et centrifugé à 20.000 g pendant 50 min à 4 °C. Le surnageant final, correspondant à la fraction cytosolique, a été récupéré pour les mesures des activités enzymatiques (Garaud et al., 2015).

IV.3.2 Mesure de biomarqueurs de défenses antioxydantes et antitoxiques

L'évaluation de la Capacité Totale Antioxydante (TAC) et les mesures de l'activité Glutathion Peroxydase Totale (GPx-Tot), Glutathion-S-Transférase (GST) et Catalase (CAT) ont été mesurée sur la fraction cytosolique, alors que l'activité Phosphatase Acide (ACP) a été

mesurée sur les broyats des tissus (glandes digestives ou branchies). Les analyses des différents biomarqueurs ont été effectuées à l'aide d'un analyseur Konelab 20-XTi (ThermoScientific). L'ensemble des protocoles utilisés, établi par Garaud et al. (2015), est reporté en annexe 2.

IV.3.3 Biomarqueurs des dommages cellulaires

Les mesures de la concentration des hydroperoxydes lipidiques (LOOH) ont été effectuées sur le broyat des glandes digestives ou des branchies d'après la méthode de Garaud et al. (2015) adaptée de celle de Arab and Steghens (2004) et détaillée dans l'annexe 2. L'activité de l'enzyme caspase 3 (CSP-3) a été mesurée quant à elle sur la fraction cytosolique (Garaud et al., 2015).

IV.3.4 Biomarqueurs de réserves énergétiques

Les concentrations en protéines (PROT), en triglycérides (TG) et en cholestérol (CHOL) ont été mesurées sur les broyats des tissus grâce à des réactifs spécifiquement élaborés par Thermo Scientific pour des analyses au Konelab (Garaud et al., 2015). L'activité mitochondriale du système de transport d'électrons (ETS) a été également mesurée sur les broyats selon le protocole de Garaud et al. (2015) adapté à partir de celui de (Coen and Janssen, 1997). L'activité lactate déshydrogénase (LDH) a quant à elle été mesurée sur la fraction cytosolique à partir de réactifs fournis également par Thermo Scientific. La concentration en protéines a été en plus mesurée dans la fraction cytosolique.

IV.4 Tests statistiques

Dans le cas de l'expérience 1, les effets de la forme redox du Cr, de la durée d'exposition et de la concentration en Cr ont été comparés, pour tous les biomarqueurs étudiés, en utilisant une ANOVA à plan factoriel (2 x 2 x 4) suivie d'un test de Tukey-Kramer HSD. Pour l'expérience 2, les mêmes techniques ont été utilisées pour étudier les effets de la forme redox du Cr (y inclus le mélange Cr(III)-Cr(VI)) et du tissu sur l'expression de biomarqueurs. Ces tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel Statistica (version 7.0).

V. Etudes menées chez des cultures cellulaires de CHO

V.1 Entretien et amplification des cellules en culture

La procédure commence par la récupération du cryotube conservé à -180 °C dans de l'azote liquide. Ce dernier a été décongelé dans un bain-marie (30 °C). Le volume a été ensuite prélevé et placé dans un tube de 15 mL contenant 5 mL de milieu de culture complet (section II.3). Après centrifugation de ce tube pendant 5 min à 123 g à température ambiante, le milieu a été aspiré, éliminant ainsi le diméthylsulfoxyde (DMSO) utilisé comme cryoprotecteur. Le culot a été ensuite resuspendu dans 5 mL de milieu de culture complet. La totalité du volume a été finalement transféré vers une flasque F75 complétée à 10 mL avec du milieu complet et placée à l'incubateur à 37 °C (5% CO₂).

Ces cellules en culture ont été ensuite utilisées pour les différents tests réalisés. Le milieu de culture a été aspiré avant lavage du tapis cellulaire avec 20 mL de tampon PBS. Le détachement des cellules a été obtenu par trypsination (2 mL de trypsine 0,25%, après dilution dans du tampon PBS d'une solution de trypsine 2,5%, GibcoBRL), et incubation pendant 5 minutes à 37°C. L'ajout de 8 mL de milieu complet entraîne l'arrêt de l'activité protéolytique. Le comptage des cellules a été effectué sur cellule de Malassez avec le bleu trypan comme colorant d'exclusion permettant de déterminer la viabilité cellulaire. Pour cela, 50 µL du milieu de culture contenant les cellules en suspension ont été prélevés et mélangés à 50 µL de bleu trypan à 0,04%. Le mélange a été ensuite placé sur cellule de Malassez après 2 min d'incubation. La densité cellulaire (D) a été obtenue à l'aide de la formule suivante :

$$D = \frac{n \times F}{(25 \times 10 E - 5)}$$

D (cellules/mL) : densité cellulaire

F : facteur de dilution

n : nombre de cellules comptées (en moyenne)

25 : nombre de rectangles de comptage sur la cellule de comptage

10 E⁻⁵ : volume (mL) de la zone de comptage.

Grâce à l'utilisation du bleu trypan, il a été également possible de déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire :

$$\% \text{ de viabilité cellulaire} = \frac{\text{nombre total de cellules vivantes (non bleues)}}{\text{nombre total de cellules (vivantes et mortes)}} \times 100$$

Après comptage des cellules, une nouvelle flasque F75 a étéensemencée à raison d'un million de cellules (10 mL de milieu complet) pour obtenir une confluence après trois jours d'incubation à 37°C.

V.2 Test d'ensemencement des cellules

L'objectif était dans un premier temps de définir les conditions d'ensemencement des plaques 96 puits (Greiner bio-one, Cellstar) à utiliser pour l'étude de la toxicité du chrome chez les cellules CHO. Les cellules en culture ont été récupérées à sub-confluence (détermination visuelle) afin d'en conserver la tendance de croissance exponentielle. Le milieu a été pour cela aspiré, puis les cellules ont été lavées avec 20 mL du tampon PBS, une étape de trypsination a été réalisée et enfin le milieu de culture a été ajouté aux cellules afin de stopper la dissociation cellulaire. Après homogénéisation, la totalité de la suspension a été transférée dans un tube de 15 mL. La viabilité de trois densités cellulaires (2.000, 5.000 et 10.000 cellules/puits) des cellules CHO a été testée sur trois temps d'étude (24, 48 et 72 h) en plaques à 96 puits. Après trypsination des cellules (flasque F75), un comptage de cellules a été réalisé en présence du bleu trypan (voir section V.1) afin de pouvoir préparer les trois densités cellulaires ciblées.

Pour chaque puits, 100 µL de suspension cellulaire ont été ajoutés. Après 24 heures d'incubation à 37°C, 50 µL de milieu de culture ont été ajoutés (selon le protocole du paragraphe V.3 visant à déterminer la cytotoxicité du Cr). Ensuite, après 24, 48 et 72 h d'incubation, un test MTT est réalisé (paragraphe V.3).

V.3 Test colorimétrique de cytotoxicité et prolifération cellulaire employant le MTT

Le test MTT est un test colorimétrique permettant de quantifier de manière relative le nombre de cellules vivantes (Mosmann, 1983). Il est basé sur l'utilisation du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium), un sel de tétrazolium. Ce réactif est susceptible d'être réduit au sein des cellules vivantes par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Cette réduction forme un composé insoluble dans le milieu de culture, le formazan. Après resuspension des cristaux de formazan dans du DMSO (Kupcsik, 2011), la lecture de l'absorbance pourra se faire et ces valeurs seront proportionnelles au nombre des cellules vivantes présentes dans l'échantillon. La réalisation de ce test nécessite des étapes d'optimisation afin d'éviter une saturation du signal lors de la lecture des absorbances.

Dans chaque puits de la microplaque, après 24 h ou 48h d'incubation des cellules, 20 μ L de solution de MTT (Sigma) à 5 mg/mL (préparée par dilution dans du PBS, filtrée sur filtre de seringue à 0,22 μ m et maintenue à l'obscurité) ont été ajoutés aux 150 μ L de milieu déjà présents. Après 2 heures d'incubation à l'étuve à 37°C, le surnageant a été aspiré et 200 μ L de DMSO ont été ajoutés dans chaque puits afin de dissoudre les cristaux de formazan formés. Après agitation pendant 5 minutes, les résultats d'absorbance sont obtenus par spectrophotométrie à 570 nm (lecteur de microplaques SAFAS Xenius).

V.4 Cytotoxicité du Cr à l'aide du test MTT

L'étude a été réalisée dans un premier temps sur une gamme de concentration étendue pour les deux formes de chrome (Cr(III) et Cr(VI)). En plus du témoin négatif (cellules incubées sans chrome mais avec un volume de milieu complet), huit concentrations (préparées dans du milieu complet), formant une gamme étendue (0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 ; 150 ; 200 ; 250 mg de Cr/L) ont été testées pendant 24 et 48 h. Une fois la CE_{50} estimée, une gamme restreinte a été réalisée pour chaque solution de chrome. Pour cela, une gamme de huit concentrations de Cr(III) (75 ; 100 ; 125 ; 150 ; 175 ; 200 ; 225 ; 250 mg/L) et une autre gamme de huit concentrations de Cr(VI) (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1,6 ; 3,2 ; 6,4 mg/L) ont été préparées.

L'ensemencement des microplaques a été effectué comme décrit précédemment avec une densité cellulaire de 2.000 cellules/puits et 100 µL de milieu complet par puits. Après 24 h d'incubation (37°C, 5% CO₂), 50 µL de Cr(III) ou de Cr(VI) solubilisé dans le milieu de culture complet ont été ajoutés pour atteindre les concentrations finales mentionnées ci-dessus. Le contrôle en absence de chrome a été réalisé avec l'ajout de 50 µL de milieu complet au 100 µL de cellules CHO.

V.5 Stabilité des concentrations d'exposition

Des solutions mères du Cr(III) et du Cr(VI) (respectivement CrCl₃.6H₂O et K₂Cr₂O₇), chacune à 5g de Cr/L (préparées dans de l'eau ultrapure) ont été utilisées pour suivre l'évolution de deux concentrations en chrome soluble (10 et 150 mg de Cr/L) dans le milieu de culture des cellules en fonction du temps. Le chrome a été introduit dans 50 mL de milieu complet de culture cellulaire pour atteindre les concentrations souhaitées avant d'être incubé à 37°C dans une étuve. Aux quatre temps d'étude (0, 24, 48 et 72 h), environ 6 mL de solution de chrome ont été filtrés sur filtre stérile (0.22 µm) puis minéralisé en présence de 10% v/v d'acide nitrique et 10% v/v de peroxyde d'hydrogène à 30%, avant passage à l'étuve à 65°C pendant une nuit. Après centrifugation (3000 g, 5 minutes), le surnageant contenant le chrome a été récupéré puis dilué afin d'obtenir une concentration avoisinant 1 mg/L. Cette dilution était nécessaire à la quantification du chrome en spectrométrie d'absorption atomique de flamme (PerkinElmer, AAnalyse 100 (lampe à cathode creuse, flamme air-acétylène).

V.6 Modélisation des courbes de cytotoxicité

Afin de déterminer les concentrations d'effet des deux formes redox du chrome sur les lignées des cellules CHO, la macro Regtox (Vindimian, 2010) accessible sur le site internet suivant : http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html, a été utilisée à partir des valeurs d'absorbance obtenues pour les tests MTT.

Références bibliographiques

- Abaychi, J.K., Mustafa, Y.Z., 1988. The asiatic clam, *Corbicula fluminea*: An indicator of trace metal pollution in the Shatt al-Arab River, Iraq. *Environ. Pollut.* 54, 109–122. doi:10.1016/0269-7491(88)90141-8
- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* 67, 347–357. doi:10.1016/j.aquatox.2004.01.014
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., 2008. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier.
- Andersen, R.A., 1992. Diversity of eukaryotic algae. *Biodivers. Conserv.* 1, 267–292. doi:10.1007/BF00693765
- Andrès, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2462–2471. doi:10.1002/etc.5620181112
- Arab, K., Steghens, J.-P., 2004. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. *Anal. Biochem.* 325, 158–163.
- Aruoja, V., Dubourguier, H.-C., Kasemets, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci. Total Environ.* 407, 1461–1468. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.10.053
- Bachmann, V., Cegiëlka, E., Wagner, P., Usseglio-Polatera, P., Moreteau, J.-C., 1995. Installation de l'Amphipode *Corophium curvispinum* et de la palourde asiatique *Corbicula* sp. dans la partie française de la Moselle. *Hydroécologie Appliquée* 7, 185–190. doi:10.1051/hydro:1995010
- Baudrimont, M., Andres, S., Durrieu, G., Boudou, A., 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquat. Toxicol.* 63, 89–102. doi:10.1016/S0166-445X(02)00134-0
- Baudrimont, M., Lemaire-Gony, S., Ribeyre, F., Métivaud, J., Boudou, A., 1997b. Seasonal Variations of Metallothionein Concentrations in the Asiatic Clam (*Corbicula fluminea*). *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 118, 361–367. doi:10.1016/S0742-8413(97)00157-6
- Baudrimont, M., Metivaud, J., Maury-Brachet, R., Ribeyre, F., Boudou, A., 1997a. Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2096–2105. doi:10.1002/etc.5620161016
- Bellinger, E.G., Sigee, D.C., 2010. Introduction to Freshwater Algae, in: *Freshwater Algae*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–40.
- Bilos, C., Colombo, J.C., Presa, M.J., 1998. Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environ. Pollut.* 99, 1–11. doi:10.1016/S0269-7491(97)00177-2
- Blaise, C., Vasseur, P., 2005. Algal Microplate Toxicity Test, in: Blaise, C., Féraud, J.-F. (Eds.), *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations*. Springer Netherlands, pp. 137–179.

- Blankenship, L.J., Manning, F.C.R., Orenstein, J.M., Patierno, S.R., 1994. Apoptosis Is the Mode of Cell Death Caused by Carcinogenic Chromium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126, 75–83. doi:10.1006/taap.1994.1092
- Britton, J.C., Morton, B., 1982. A dissection guide, field and laboratory manual for the introduced bivalve *Corbicula fluminea*. *Malacological Review*.
- Campbell, P.G.C., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneault, B., 2002. Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 133, 189–206. doi:10.1016/S1532-0456(02)00104-7
- Carr, b, Wright, M, 2013. Nanoparticle Tracking Analysis [WWW Document]. URL http://particularsciences.ie/psl/brochures/supplier_brochures_pdf/nta_brochure.pdf (accessed 3.21.16).
- Ciacci, C., Barmo, C., Gallo, G., Maisano, M., Cappello, T., D'Agata, A., Leonzio, C., Mauceri, A., Fasulo, S., Canesi, L., 2012. Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 120–121, 109–118. doi:10.1016/j.aquatox.2012.04.015
- Coen, W.M.D., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery* 6, 43–55. doi:10.1023/A:1008228517955
- Coryell, V.H., Stearns, D.M., 2006. Molecular analysis of hprt mutations induced by chromium picolinate in CHO AA8 cells. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 1st Workshop on Chromium and Human Health 610, 114–123. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.06.020
- Cotelle, S., Férard, J.F., 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ. Mol. Mutagen.* 34, 246–255.
- Crémazy, A., Campbell, P.G.C., Fortin, C., 2013a. The Biotic Ligand Model Can Successfully Predict the Uptake of a Trivalent Ion by a Unicellular Alga Below pH 6.50 but not Above: Possible Role of Hydroxo-Species. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2408–2415. doi:10.1021/es3038388
- Crémazy, A., Levy, J.L., Campbell, P.G.C., Fortin, C., 2013b. Uptake and subcellular partitioning of trivalent metals in a green alga: comparison between Al and Sc. *BioMetals* 26, 989–1001. doi:10.1007/s10534-013-9675-6
- Ercal, N., Treeratphan, P., Lutz, P., Hammond, T.C., Matthews, R.H., 1996. N-acetylcysteine protects Chinese hamster ovary (CHO) cells from lead-induced oxidative stress. *Toxicology* 108, 57–64. doi:10.1016/S0300-483X(95)03273-I
- Eric, Vindimian, 2010. REGTOX: macro Excel™ for dose-response modelling.
- Fortin, C., Campbell, P.G.C., 2000. Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2769–2778. doi:10.1002/etc.5620191123
- Fournier, E., Adam, C., Massabuau, J.-C., Garnier-Laplace, J., 2005. Bioaccumulation of waterborne selenium in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: influence of feeding-induced ventilatory activity and selenium species. *Aquat. Toxicol.* 72, 251–260. doi:10.1016/j.aquatox.2005.01.002
- Fukasawa, M., Sekine, F., Miura, M., Nishijima, M., Hanada, K., 1997. Involvement of Heparan Sulfate Proteoglycans in the Binding Step for Phagocytosis of Latex Beads by Chinese Hamster Ovary Cells. *Exp. Cell Res.* 230, 154–162. doi:10.1006/excr.1996.3403

- Gandhi, N.S., Mancera, R.L., 2008. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chem. Biol. Drug Des.* 72, 455–482. doi:10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x
- Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V., Giamberini, L., 2015. Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO₂) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeseli*. *Aquat. Toxicol.* 158, 63–74. doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.004
- Gómez Morales, J., García Carmona, J., Rodríguez Clemente, R., Muraviev, D., 2003. Preparation of Chromium Hydroxide Sub-micro- and Nanoparticles by Microwave Dielectric Heating. *Langmuir* 19, 9110–9113. doi:10.1021/la0343167
- Graney Jr, R. L., Cherry, D. S., & Cairns Jr, J. (1983). Heavy metal indicator potential of the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in artificial stream systems. *Hydrobiologia*, 102(2), 81-88.
- Grizel, H., 2003. An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. 200 pp.
- Howard, W., Leonard, B., Moody, W., Kochhar, T.S., 1991. Induction of chromosome changes by metal compounds in cultured CHO cells. *Toxicol. Lett.* 56, 179–186. doi:10.1016/0378-4274(91)90105-F
- Huang, P.C., Smith, B., Bohdan, P., Corrigan, A., 1980. Effect of zinc on cadmium influx and toxicity in cultured CHO cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 2, 211–220. doi:10.1007/BF02785356
- Hutchinson, T.H., Barrett, S., Buzby, M., Constable, D., Hartmann, A., Hayes, E., Huggett, D., Laenge, R., Lillicrap, A.D., Straub, J.O., Thompson, R.S., 2003. A strategy to reduce the numbers of fish used in acute ecotoxicity testing of pharmaceuticals. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 3031–3036. doi:10.1897/02-558
- Inza, B., Ribeyre, F., Maury-Brachet, R., Boudou, A., 1997. Tissue distribution of inorganic mercury, methylmercury and cadmium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to the contamination levels of the water column and sediment. *Chemosphere* 35, 2817–2836. doi:10.1016/S0045-6535(97)00342-1
- Ionescu, R.E., Abu-Rabeah, K., Cosnier, S., Durrieu, C., Chovelon, J.-M., Marks, R.S., 2006. Amperometric Algal *Chlorella vulgaris* Cell Biosensors Based on Alginate and Polypyrrole-Alginate Gels. *Electroanalysis* 18, 1041–1046. doi:10.1002/elan.200603506
- Kahru, A., Dubourguier, H.-C., 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology, Potential Hazard of Nanoparticles: From Properties to Biological & Environmental Effects* 269, 105–119. doi:10.1016/j.tox.2009.08.016
- Knauer, K., Behra, R., Sigg, L., 1997. Effects of free Cu²⁺ and Zn²⁺ ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 220–229. doi:10.1002/etc.5620160218
- Kupcsik, L., 2011. Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 740, 13–19. doi:10.1007/978-1-61779-108-6_3
- Kutscher, D., McSheehy, S., Wills, J., n.d. Speciation analysis of Cr (III) and Cr (VI) in drinking waters using anion exchange chromatography coupled to the Thermo Scientific iCAP Q ICP-MS. *Thermo Fish. Sci.*
- Labrot, F., Narbonne, J.F., Ville, P., Denis, M.S., Ribera, D., 1999. Acute Toxicity, Toxicokinetics, and Tissue Target of Lead and Uranium in the Clam *Corbicula fluminea* and the Worm *Eisenia fetida*: Comparison with the Fish *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 167–178. doi:10.1007/s002449900457
- Lavoie, M., Bernier, J., Fortin, C., Campbell, P.G.C., 2009. Cell homogenization and subcellular fractionation in two phytoplanktonic algae: implications for the

- assessment of metal subcellular distributions. *Limnol. Oceanogr. Methods* 7, 277–286. doi:10.4319/lom.2009.7.277
- Lavoie, M., Le Faucheur, S., Fortin, C., Campbell, P.G.C., 2011. Erratum to “Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules” [*Aquat. Toxicol.* 92 (2009) 65–75]. *Aquat. Toxicol.* 101, 298. doi:10.1016/j.aquatox.2010.09.015
- Lustigman, B., Lee, L.H., Weiss-Magasic, C., 1995. Effects of cobalt and pH on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 65–72. doi:10.1007/BF00212390
- Macfie, S.M., Welbourn, P.M., 2014. The Cell Wall as a Barrier to Uptake of Metal Ions in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 413–419. doi:10.1007/s002440010122
- Mallakin, A., Babu, T.S., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., 2002. Sites of toxicity of specific photooxidation products of anthracene to higher plants: Inhibition of photosynthetic activity and electron transport in *Lemna gibba* L. G-3 (Duckweed). *Environ. Toxicol.* 17, 462–471. doi:10.1002/tox.10080
- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65, 609–617. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.01.074
- Matijević, E., 1976. Preparation and characterization of monodispersed metal hydrous oxide sols, in: Müller, F.H., Weiss, A., Wolfram, E. (Eds.), *Colloids and Surfaces, Progress in Colloid & Polymer Science*. Steinkopff, pp. 24–35.
- McMahon, R.F., 2002. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: r selection versus resistance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 1235–1244. doi:10.1139/f02-105
- Méthode d’analyse du chrome hexavalent dans les eaux ; <https://www.anses.fr/fr/system/files/MethodeChromeHexavalentEaux-Consultation.pdf> (visité le 24 novembre 2016).
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Munn, S.J., Allanou, R., Aschberger, K., Berthault, F., Cosgrove, O., Luotamo, M., Pakalin, S., Paya-Perez, A., Pellegrini, G., Schwarz-Schulz, B. and Vegro, S., 2005. Chromium trioxide, sodium chromate, sodium dichromate, ammonium dichromate, potassium dichromate, EUR 21508 EN. *European Union Risk Assessment Report*, 53.
- OECD 2011. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD test guideline 211.
- Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291–298. doi:10.1016/0006-291X(84)90411-X
- Payne, B.S., Miller, A.C., Hubertz, E.D., Lei, J., 1995. Adaptive variation in palp and gill size of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and Asian clam (*Corbicula fluminea*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 1130–1134. doi:10.1139/f95-109
- Peters, K., Bundschuh, M., Schäfer, R.B., 2013. Review on the effects of toxicants on freshwater ecosystem functions. *Environ. Pollut.* 180, 324–329. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.025
- Plekhanov, S.E., Chemeris, Y.K., 2003. Early Toxic Effects of Zinc, Cobalt, and Cadmium on Photosynthetic Activity of the Green Alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 30, 506–511. doi:10.1023/A:1025806921291

- Ponti, B., Bettinetti, R., Dossi, C., & Vignati, D. A. L. (2014). How reliable are data for the ecotoxicity of trivalent chromium to *Daphnia magna*?. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(10), 2280-2287.
- Pröschold, T., Harris, E.H., Coleman, A.W., 2005. Portrait of a Species. *Genetics* 170, 1601–1610. doi:10.1534/genetics.105.044503
- Rai, D., Eary, L.E., Zachara, J.M., 1989. Environmental chemistry of chromium. *Sci. Total Environ.*, The Chromium Paradox in Modern Life 86, 15–23. doi:10.1016/0048-9697(89)90189-7
- Reid, R.G.B., McMahon, R.F., Foighil, D.O., Finnigan, R., 1992. Anterior inhalant currents and pedal feeding in bivalves. *The Veliger* 35, 93–104.
- Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M., 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 722, 225–254. doi:10.1016/S0378-4347(98)00313-2
- Rojícková, R., Maršálek, B., 1999. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. *Chemosphere* 38, 3329–3338. doi:10.1016/S0045-6535(98)00566-9
- Rossé, P., Loizeau, J.-L., 2003. Use of single particle counters for the determination of the number and size distribution of colloids in natural surface waters. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, Symposium C of the E-MRS 2002 Spring Meeting in Strasbourg, France 217, 109–120. doi:10.1016/S0927-7757(02)00565-4
- Ruley, A.T., Sharma, N.C., Sahi, S.V., Singh, S.R., Sajwan, K.S., 2006. Effects of lead and chelators on growth, photosynthetic activity and Pb uptake in *Sesbania drummondii* grown in soil. *Environ. Pollut., Soil and Sediment Remediation (SSR)* Soil and Sediment Remediation (SSR) 144, 11–18. doi:10.1016/j.envpol.2006.01.016
- Rydberg, B., & Johanson, K. J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. *DNA repair mechanisms*, (03), 465-468.
- Sahoo, D., Baweja, P., 2015. General Characteristics of Algae, in: Sahoo, D., Seckbach, J. (Eds.), *The Algae World, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Springer Netherlands, pp. 3–29.
- Sarkar, S.K., Cabral, H., Chatterjee, M., Cardoso, I., Bhattacharya, A.K., Satpathy, K.K., Alam, M.A., 2008. Biomonitoring of Heavy Metals Using the Bivalve Molluscs in Sunderban Mangrove Wetland, Northeast Coast of Bay of Bengal (India): Possible Risks to Human Health. *Clean – Soil Air Water* 36, 187–194. doi:10.1002/clen.200700027
- Schreiber, U., Gademann, R., Ralph, P.J., Larkum, A.W.D., 1997. Assessment of Photosynthetic Performance of *Prochloron* in *Lissoclinum patella* in hospite by Chlorophyll Fluorescence Measurements. *Plant Cell Physiol.* 38, 945–951.
- Schwartz, N.B., 2001. Proteoglycans, in: eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0
- Sousa, R., Antunes, C., Guilhermino, L., 2008. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *Ann. Limnol. - Int. J. Limnol.* 44, 85–94. doi:10.1051/limn:2008017
- Sroda, S., Cossu-Leguille, C., 2011. Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere* 83, 538–544. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.023
- Staveley, J.P., Smrček, J.C., 2005. Algal Toxicity Test, in: Blaise, C., Féraud, J.-F. (Eds.), *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations*. Springer Netherlands, pp. 181–202.

- Tomazelli, A.C., Martinelli, L.A., Avelar, W.E.P., Camargo, P.B. de, Fostier, A.-H., Ferraz, E.S.B., Krug, F.J., Santos Júnior, D., 2003. Biomonitoring of Pb and Cd in two impacted watersheds in Southeast Brazil, using the freshwater mussel *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) (*Bivalvia* : *Mycetopodidae*) as a biological monitor. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46, 673–684. doi:10.1590/S1516-89132003000400022
- Vannini, C., Marsoni, M., Domingo, G., Antognoni, F., Biondi, S., Bracale, M., 2009. Proteomic analysis of chromate-induced modifications in *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere* 76, 1372–1379. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.06.022
- Vignati, D.A.L., Beye, M.L., Dominik, J., Klingemann, A.O., Filella, M., Bobrowski, A., Ferrari, B.J., 2008. Temporal Decrease of Trivalent Chromium Concentration in a Standardized Algal Culture Medium: Experimental Results and Implications for Toxicity Evaluation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 305–310. doi:10.1007/s00128-008-9379-8
- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., Balasubramanian, M.P., 2007. Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. *Chemosphere* 69, 979–986. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.05.011
- Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., Giovannetti, L., 2014. Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 633–659. doi:10.1111/1574-6976.12051
- Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., Giovannetti, L., 2013. Molecular mechanisms of Cr (VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.*
- Wagner, A., Boman, J., 2004. Biomonitoring of trace elements in Vietnamese freshwater mussels. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, 10th Symposium on Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis and 39th Discussion Meeting on Chemical Analysis 59, 1125–1132. doi:10.1016/j.sab.2003.11.009
- Walsh, A.R., O'Halloran, J., 1998. Accumulation of chromium by a population of mussels (*Mytilus edulis* (L.)) exposed to leather tannery effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1429–1438. doi:10.1002/etc.5620170729
- Wang, Z., Meador, J.P., Leung, K.M.Y., 2016. Metal toxicity to freshwater organisms as a function of pH: A meta-analysis. *Chemosphere* 144, 1544–1552. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.10.032
- Way, C.M., Hornbach, D.J., Miller-Way, C.A., Payne, B.S., Miller, A.C., 1990. Dynamics of filter feeding in *Corbicula fluminea* (*Bivalvia*: *Corbiculidae*). *Can. J. Zool.* 68, 115–120. doi:10.1139/z90-016
- Wehr, J.D., Sheath, R.G., Kociolek, J.P., 2015. *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Elsevier.
- Yang, L.-H., Ying, G.-G., Su, H.-C., Stauber, J.L., Adams, M.S., Binet, M.T., 2008. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1201–1208. doi:10.1897/07-471.1
- Zuykov, M., Pelletier, E., Harper, D.A.T., 2013. Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93, 201–208. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.05.001

Chapitre III.

Résultats et Discussion

Partie 1

Ecotoxicité et spéciation du chrome

L'étude présentée dans cette partie a été en grande partie réalisée dans le cadre du projet INSOKINTOX (Insoluble elemental species in algal culture medium : a kinetic approach to their formation and ecotoxicological relevance) financé par l'initiative structurante EC2CO « Ecosphère Continentale et Côtière » sous la thématique ECODYN (Ecotoxicologie et Ecodynamique des contaminants). Le projet a été réalisé sous la responsabilité de M VIGNATI Davide, dans l'objectif d'étudier en détail la chimie du Cr(III) dans le milieu de test algal ISO 8692 et ses implications sur l'évaluation de l'écotoxicité et le risque chez les algues.

Les résultats de cette partie sont présentés sous forme d'une publication scientifique en cours de soumission dans le journal Environmental Science & Technology.

L'écotoxicité du Cr(III) et Cr(VI) chez *P. subcapitata* en lien avec leur spéciation dans le milieu du test

Contexte

Dans les milieux aquatiques, le chrome existe principalement sous les deux formes redox Cr(VI) et Cr(III). A un pH proche de 7, le Cr(VI) se retrouve sous des formes anioniques telles que les chromates (CrO_4^{2-} , HCrO_4^-) et les dichromates ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). En revanche, sous les mêmes conditions, les espèces dissoutes du Cr(III) portent une charge positive et la spéciation de cette forme redox est dominée par la formation des hydroxydes insolubles $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$ (Rai et al., 1989). La présence du fer peut réduire davantage la solubilité du Cr(III) par une formation des hydroxydes mixtes Fe-Cr (Sass and Rai, 1987). La faible solubilité de $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$ et Fe-Cr(OH)₃ contrôle la concentration soluble et biodisponible du Cr(III).

En général, le Cr(VI), formant des espèces chargées négativement, interagit peu avec la matière colloïdale et particulaire (portant aussi une charge nette négative) et est hautement mobile dans l'environnement. Cependant, le Cr(III) est très réactif, et a une spéciation dominée par des formes colloïdales ou particulaires ou encore par des espèces insolubles (Domink et al., 2007 ; Vignati et al., 2010). Des interconversions entre les deux formes sont possibles. Notamment, en présence de matière organique, le Cr(VI) est réduit en Cr(III) alors que, en présence d'hydroxydes de Mn, le Cr(III) peut être oxydé en Cr(VI) (Rai et al., 1989).

La majorité des études considèrent le chrome (VI) comme la forme la plus importante à étudier en raison de sa toxicité et cancérogénicité pour les mammifères. En revanche, le Cr(III) est considéré comme relativement non toxique chez les mammifères, en partie du fait qu'il y a peu ou pas d'absorption cellulaire de cette forme de chrome (Thompson et al., 2002). Toutefois, alors que la toxicité du Cr(VI) n'est pas contestée, des études remettent en question la non ou faible toxicité de la forme trivalente du chrome (Lira-Silva et al., 2011 ; Vignati et al., 2010 ; Thompson et al., 2002). De plus, il est reconnu qu'il existe un grand manque de données pour le Cr(III) (INERIS, 2005). Des études qui permettront de comprendre les mécanismes de toxicité du Cr(III) en relation avec sa spéciation chimique dans le milieu utilisé dans les tests en laboratoire sont donc indispensables pour bien appréhender la toxicité relative des deux formes de Cr.

Dans cette étude, suite à la présence dans la littérature de données contradictoires en termes d'écotoxicité du Cr(III) et Cr(VI), l'objectif était de comparer l'écotoxicité de ces deux formes du Cr chez *P. subcapitata* tout en caractérisant en détail l'évolution de la spéciation de ces deux formes de Cr dans le milieu de test. Trois aspects très importants pour une évaluation correcte de l'écotoxicité du Cr en lien avec sa spéciation ont été étudiés :

La stabilité des concentrations de Cr ajouté au début dans le milieu de test (ISO 8692) au fil de la durée du test,

L'absence d'interconversion entre les formes redox testées du Cr,

L'absence de formation de particules colloïdales (non biodisponibles) du Cr dans le milieu de test.

Méthodes

L'écotoxicité du Cr(III) et Cr(VI) chez l'algue verte d'eau douce *P. subcapitata* a été étudiée via la réalisation des tests d'inhibition de croissance algale selon le protocole recommandé par la ligne directrice OCDE 201. De plus, l'évolution de la spéciation du Cr(III) et Cr(VI) dans le milieu de test a été suivie sur 72 h par SAA et IC-ICP-MS. Nous avons également vérifié la formation des particules de Cr dans le milieu de test dopé avec du Cr(III) à différents temps entre 0 et 72 h par Nanosight et SPC.

Principaux résultats

Tout d'abord, dans nos conditions expérimentales, le Cr(III) s'est avéré plus toxique que le Cr(VI) par rapport à la croissance algale, plus particulièrement quand l'on tient compte de la concentration effective plutôt que la concentration nominale en chrome. Ensuite, alors que la concentration du Cr(VI) ($K_2Cr_2O_7$) reste relativement stable après 72 h, la concentration des trois sels de Cr(III) diminue fortement avec le temps. Dans le cas du Cr(III), la concentration totale de Cr diminue de plus de 80% par rapport aux valeurs initiales après 72 h, avec une diminution très marquée pendant les premières 24 heures. Les résultats ont été similaires pour toutes les concentrations initiales testées. En effet, même une faible concentration initiale de Cr(III) de 20 $\mu\text{g/L}$, montre une réduction de la concentration en fonction du temps (jusqu'à environ 80% de la concentration nominale après 72 h).

Les résultats IC-ICP-MS ont montré qu'aucune interconversion entre le Cr(III) et Cr(VI) ne se produit dans le milieu de test durant 72 h, avec ou sans algues. Ceci confirme que les effets observés chez les algues provenaient de la forme du Cr testée à chaque fois. Dans le milieu biotique (présence d'algues), alors que le Cr(VI) reste stable dans la solution pendant 72 h, les pics correspondants au Cr(III) disparaissaient déjà après 24 h de la préparation des milieux. De plus, deux autres pics ont été observés dans le cas du Cr(III) à $t = 0$ h. Le suivi de la spéciation du Cr(III) à des intervalles courts (toutes les 20 minutes pendant 6 heures) a montré une évolution très rapide. En effet, A $t = 0$, les concentrations de Cr mesurées par IC-ICP-MS correspondaient à celles attendues et 84 % du Cr(III) étaient présents sous forme de Cr libre. Cependant, deux heures après le dopage, le Cr(III) libre ne représentait que 10% de la concentration totale du Cr et d'autres espèces du Cr(III), possiblement des hydroxydes de Cr ou des carbonates, ont apparu dans les chromatogrammes. Enfin, Les analyses effectuées avec les techniques Nanosight et SPC confirment une formation rapide de particules colloïdales contenant du Cr dans le milieu ISO dopé avec du Cr(III).

Publication 1

1 Chromium speciation in a standardized
2 ecotoxicological medium for algae: implications
3 for hazard and risk assessment

4 *Imad Aharchaou^a, Jean-Sébastien Py^b, Sébastien Cambier^c, Jean-Luc Loizeau^d, Eric*
5 *Battaglia^a, Philippe Rousselle^a, Davide A.L. Vignati^{a*}*

6 ^aLaboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux LIEC-UMR 7360,
7 Université de Lorraine and CNRS, 8 rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

8 ^bAgence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
9 ANSES-Laboratoire de Nancy, 40 rue Lionnois, 54000 Nancy, France

10 ^cLuxembourg Institute of Science and Technology LIST, 4 avenue des hauts fourneaux-L-
11 4362 Esch sur Alzette, Luxembourg

12 ^dInstitut F.-A. Forel and Institute for Environmental Sciences, University of Geneva, 66 Bd
13 Carl-Vogt, CH-1211 Genève, Switzerland

14 ABSTRACT

15 Despite the consensus about the importance of chemical speciation in controlling
16 bioavailability and ecotoxicity of trace elements, detailed speciation studies in standardized
17 media used for laboratory ecotoxicity testing remain scarce contributing to uncertainty during
18 the extrapolation of laboratory findings to real field situations in risk assessment. We
19 characterize the speciation and the ecotoxicological effects of Cr^{III} and Cr^{VI} (the two
20 predominant redox forms of Cr in surface aquatic environment) in the OECD medium for
21 algal ecotoxicity testing. Total and dissolved (< 0.22 μm) Cr concentration show little
22 variability in media spiked with hexavalent Cr, while dissolved Cr concentration decrease by
23 as much as 80% over 72 hours (i.e., whole test duration) in medium amended with trivalent
24 Cr. In terms of time weighed dissolved Cr concentration, Cr^{III} is 4 times more toxic than Cr^{VI}.
25 Analysis of solutions amended with Cr^{III} or Cr^{VI} by ion chromatography ICP-MS highlight the
26 absence of redox interconversion between the two forms both in the presence and absence of
27 algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*). Furthermore, the concentration of ionic Cr^{III} drops
28 below detection limits in less than 2 hours with the corresponding formation of carbonate
29 complexes and Cr hydroxides. Precipitation of Cr^{III} in the form of colloidal particles of
30 variable diameters is confirmed by nanoparticle-tracking analysis and single particle counting.
31 Cr^{III} ecotoxicity may thus arise from interactions between free ionic Cr^{III} and algae at the
32 beginning of the test, from the presence of Cr-bearing nanoparticles or combination of the
33 two. Future ecotoxicological studies must pay more attention to Cr speciation to reliably
34 compare the ecotoxicity of Cr^{III} and Cr^{VI}.

35

36

37 **1 Introduction**

38 The bioavailability and ecotoxicity of trace elements in natural environments are determined
39 by the complex interplay among the ecological traits of living organisms, the toxicodynamics
40 and toxicokinetics of trace elements, and the elemental speciation in environmental matrices.¹⁻
41 ³ Elemental speciation refers to various physico-chemical forms in which trace elements occur
42 in a given environment and, in some cases, includes the presence of different oxidation states
43 with contrasting environmental biogeochemistry. In the specific case of chromium, the
44 importance of speciation is well appreciated with regard to its biogeochemical cycle⁴⁻⁶ and
45 biological effects.^{7,8} In surface waters, chromium mainly occurs in two oxidation states,
46 namely Cr^{VI} and Cr^{III}, with contrasting environmental and biological behavior. Hexavalent
47 chromium, a recognized human carcinogen, forms negatively charged chemical species,
48 interacts little with colloidal and particulate material, has a high environmental mobility, and
49 easily crosses biological membranes.⁸ In contrast, Cr^{III} preferentially forms positively charged
50 chemical species, tends to associate with colloids or suspended particulate matter and is
51 considered of lower ecotoxicological concern.^{7,8} In most environmental settings, both redox
52 forms occur simultaneously, albeit in variable proportions^{6,9} and interconversions between
53 them have been documented along with the corresponding controlling factors.¹⁰⁻¹² However,
54 experimental research on Cr speciation in standardized ecotoxicological test media has
55 received limited attention. Thermodynamic speciation calculations are increasingly used as a
56 tool to predict the Cr forms likely to exist in ecotoxicological exposure media, thus aiding
57 experimental planning and data interpretation.¹³⁻¹⁵ These calculations also suggest that
58 insoluble species of Cr^{III} (mostly Cr oxy-hydroxides) can form in ecotoxicological test media
59 for algae, daphnids and aquatic plants.^{13,16,17} The presence of such chemical species can
60 modify the fraction of Cr^{III} that is potentially bioavailable for the test organism during the

61 exposure period. Large differences between total and total filterable ($< 0.45\mu\text{m}$) Cr
62 concentrations in test media spiked with Cr^{III} have also been reported, with their extent
63 varying depending on medium composition.¹⁷⁻¹⁹ Furthermore, certain studies present results
64 supporting the conclusion that Cr^{III} is more ecotoxic than Cr^{VI} ,^{16,20-23} in contrast with the
65 current consensus considering Cr^{VI} as the most ecotoxic redox form.⁸ A more detailed
66 knowledge of Cr speciation in (standardized) laboratory test media used for ecotoxicity
67 testing will help to both reconcile contrasting ecotoxicological results in controlled settings
68 and improve our ability to extrapolate laboratory results to real-field risk assessment
69 situations.

70 On the basis of the above considerations, three aspects related to Cr speciation, and its
71 changes during a given (standardized) test, appear of particular importance for an improved
72 understanding of the relative ecotoxicity of Cr^{III} and Cr^{VI} : a) the stability of (filterable) Cr
73 concentrations added to the test medium, b) the possibility of redox interconversions between
74 Cr^{III} and Cr^{VI} , and c) the formation of Cr oxyhydroxides (i.e., Cr-bearing nanoparticles). In the
75 present study, the ecotoxicity of three Cr^{III} salts and one Cr^{VI} salt towards the green alga
76 *Pseudokirchneriella subcapitata* was investigated using the standard algal medium ISO 8692,
77 hereinafter test medium, as exposure matrix. The behavior and speciation of both Cr^{III} and
78 Cr^{VI} forms, including their possible interconversions, were investigated in detail over 72 h;
79 corresponding to the typical duration of a standard algal test.²⁴ Our results showed rapid
80 changes (i.e., within hours) in Cr^{III} speciation which call for a thorough reconsideration of the
81 current knowledge about the relative ecotoxicity of Cr^{III} and Cr^{VI} in terms of both hazard and
82 risk assessment.

83

84

85

86 **2 Experimental**

87 **2.1 Chemicals**

88 All chemicals used were of highest purity. For the various experiments, the test medium
89 ISO8692 was prepared according to the OECD guideline 201²⁴ and spiked with either Cr^{VI} as
90 potassium dichromate (K₂Cr₂O₇, VWR, purity 99,8% min, CAS number 7778-50-9) or with
91 one of the following Cr^{III} salts: chromium chloride (CrCl₃·6H₂O; Alfa Aesar, 99.5% min,
92 Crystalline, CAS number 10060-12-5), chromium potassium sulfate (KCr(SO₄)₂·12H₂O;
93 VWR, 99%, CAS number 7788-99-0) or chromium nitrate (Cr(NO₃)₃·9H₂O; Alfa Aesar,
94 98.5%, Crystalline, CAS number 7789-02-8). All filtrations were performed using 0.22 µm
95 syringe filters (Millex 33 mm diameter, PVDF, Millipore, reference number SLGV033NB)
96 prewashed one time with 10 mL of diluted (10% v/v) hydrochloric acid (HCl Suprapur 30%,
97 Merck Millipore, lot number Z0309518344) and three times with 10 mL of ultrapure water
98 (Millipore, Q-POD®). All samples for the analysis of total Cr concentration were acidified at
99 1% v/v with concentrated nitric acid (HNO₃ 67%, Prolabo, VWR, batch number 1108110). A
100 solution of 0.4 M nitric acid (Chemlab, suprapur 70%, batch: 221831609) spiked with 1 µg/L
101 of rhodium was used as internal standard during the analyses of Cr speciation.

102 **2.2 Chromium ecotoxicity**

103 The ecotoxicity of Cr^{VI} and Cr^{III} salts to the green alga *P. subcapitata* (strain 278/4 originally
104 obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa – CCAP – Argyll, Scotland,
105 United Kingdom) was evaluated according to OECD guideline 201.²⁴ Tests were performed as
106 previously described¹⁶ using inoculums of 20,000 cells/mL and nominal total exposure
107 concentrations of 2250, 1130, 560, 280, 140, 70, 35, 18, 9 µg/L. The effects of Cr salts on
108 algal growth were expressed as the effective exposure concentrations (ECs₅₀) that produced a

109 50% decrease in algal fluorescence (BMG LabTechnologies, Fluostar), considered as a proxy
110 for algal biomass. The ECs50 were calculated by performing a nonlinear regression on Hill's
111 model with the macro REGTOX (VersionEV7.0.4., E. Vindimian).²⁵ . In the case of Cr^{III},
112 ECs50 were estimated based on both total dissolved nominal concentrations and Time-
113 Weighted Mean (TWM) concentrations.²⁶

114 **2.3 Temporal evolution of Cr concentrations in the test medium**

115 Aliquots (50 mL) of freshly prepared test medium were transferred to acid-washed
116 Erlenmeyer flasks (150 mL) and spiked with a Cr concentration corresponding to the EC50 of
117 either Cr^{III} (added as chloride) or Cr^{VI} in the presence or absence of an initial inoculum
118 of 20,000 cells/mL. Aliquots were analyzed for total and total dissolved Cr after 0.5, 1, 2, 4, 8,
119 24, 48 and 72 h of incubation on an oscillating plate at 100 rpm and continuous light (90 –
120 110 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$) at 21 ± 2 °C. The increased temporal resolution of this experiment was adopted
121 to better understand the Cr behavior during the first 24 hours.

122 Total and total dissolved Cr concentrations were determined by flame atomic absorption
123 spectrometry (FAAS, Perkin-Elmer AAnalyst 100) or, for concentrations < 20 $\mu\text{g}/\text{L}$, graphite
124 furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS, Varian spectra 300, using 0.1% $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$
125 as matrix modifier). Quantification limits were 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ for FAAS and 0.2 $\mu\text{g}/\text{L}$ for GFAAS.
126 Certified reference materials SPS-SW1 (2.00 ± 0.02 $\mu\text{g}/\text{L}$) and WW1 (200 ± 1 $\mu\text{g}/\text{L}$), both for
127 spectrapure standards (Manglerud, Norway), were used as quality controls.

128 **2.4 Chromium redox speciation**

129 To investigate Cr redox speciation and the possible interconversion between Cr^{III} and Cr^{VI},
130 aliquots (50 mL) of the test medium were spiked with either Cr^{VI} or Cr^{III} (added as chloride)
131 both in absence (abiotic medium) and presence (biotic medium) of algal inoculums (20,000
132 cells/mL). Nominal Cr concentrations in the spiked solutions were 60 $\mu\text{g}/\text{L}$ for Cr^{III} and 115

133 $\mu\text{g/L}$ for Cr^{VI} , corresponding to the calculated 72h EC50 (see section 3.1). Samples were
134 analyzed immediately after spiking ($t=0$) or incubated at 23 ± 1 °C, under and continuous
135 light ($90 - 110 \mu\text{M/m}^2/\text{s}$) and, biotic samples only, rotary agitation (100 rpm) for 24, 48 and
136 72 h prior to analysis (Figure S1). At the end of each incubation period, sample aliquots for Cr
137 speciation were filtered as described above. After discarding the first 5 mL, 10 mL of filtrate
138 were collected in polystyrene sample vials and immediately analyzed by ion chromatography-
139 inductively coupled plasma mass spectrometry (IC-ICP-MS). Samples were kept between 4
140 and 6 °C in a refrigerated sample tray during analysis.

141 An additional abiotic sample of test medium (2 L) was prepared in an acid-washed low-
142 density polyethylene bottle and spiked with $60 \mu\text{g/L}$ of Cr^{III} to follow more closely the
143 kinetics of the changes in Cr^{III} speciation.^{27,28} Aliquots for analysis were recovered every 20
144 min over the first 6 hours after spiking and again after 24, 48 and 72 hours of incubation in
145 the same conditions described above.

146 Trivalent and hexavalent chromium species were separated and quantified by IC-ICP-MS
147 using a Thermo ICS 5000+ pump coupled with an anion exchange column (Thermo AG7
148 2x50 mm) and connected to the nebulizer of an ICP-MS (Thermo, Series XII) (Table S1). The
149 analyses were carried out according to the method developed by the French Agency for Food,
150 Environmental & Occupational Health & Safety (ANSES) on the basis of the application note
151 from the supplier.^{27,29} Chromium detection was performed at m/z 52 and 53.

152 **2.5 Formation of Cr nanoparticles in test media**

153 Aliquots of test medium were spiked with $60 \mu\text{g/L}$ of Cr^{III} (added as chloride) to investigate
154 the possible formation of Cr-containing particles over 72 h; i.e. the typical duration of an algal
155 ecotoxicological test. Samples were analyzed with and without filtration for particle
156 concentration, particle size distribution (PSD) and Cr concentration at 0, 30, 60, and 120

157 minutes and 24, 48, and 72 hours after spiking. Particle concentration and PSD were
158 determined by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) using a Nanosight NS500 instrument
159 (Malvern instruments Ltd, UK). The NS500 provides detailed analysis of the concentration
160 and size distribution of all types of nanoparticles from 10 nm to 1000 nm in diameter³⁰ using
161 the properties of both light scattering and Brownian motion in liquid suspensions. Particles in
162 suspension in the sample chamber (volume = 0.3 mL) were visualized via a 20x magnification
163 microscope equipped with a camera operated at 25 frames per second for 60 s. The resulting
164 video files were elaborated using the built-in software (NTA 2.3 build 0033) to calculate the
165 hydrodynamic diameter of the individually tracked particles. After each measurement, the
166 sample chamber was flushed with milliQ water and reloaded with the next sample aliquot. All
167 measurements were done in triplicate and the mean (\pm one standard deviation) of particle
168 concentration and average size calculated. Preliminary experiments and protocol optimization
169 steps are summarized in the supplementary information.

170 To detect the presence of particles outside the NTA measuring range, four batches (250 mL
171 each) of test medium spiked with 60 $\mu\text{g/L}$ of Cr^{III} and four corresponding blanks (i.e.,
172 unspiked, freshly prepared test medium) were prepared and analyzed after 0, 24, 48 and 72
173 hours of incubation using three Single Particle Counters (SPCs): a high sensitivity in-situ
174 monitor (HSLIS) Model M50 for the range 50–200 nm and two Volumetric Spectrometers
175 (LiQuilaz-S02 and LiQuilaz-S05, Particle Measuring Systems, Boulder, CO, U.S.A) for the
176 ranges 200–2000 nm and 500 nm–20 μm , respectively. The SPCs use light scattering to count
177 individual particles across 31 size classes with some overlapping between the LiQuilaz-S02
178 and S05.³¹ Results for spiked medium were corrected for blank values. Filtered and unfiltered
179 aliquots were collected from each batch for analysis of total and total dissolved Cr by FAAS
180 at each incubation time.

181

182

183 **3 Results and Discussion**

184 **3.1 Chromium ecotoxicity and temporal stability of chromium concentrations**

185 Results of ecotoxicity tests with *P. subcapitata* were highly reproducible with ECs50 at 72 h
186 (mean values \pm 1 standard deviation) of 113 ± 3 $\mu\text{g/L}$ ($n = 3$) for $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 59 ± 3 $\mu\text{g/L}$ for
187 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($n = 6$), 61 ± 8 $\mu\text{g/L}$ for $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ($n = 3$) and 62 ± 3 $\mu\text{g/L}$ for
188 $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ($n=3$). The EC50 values reported in the literature for freshwater algae range
189 from 130 to 470 $\mu\text{g/L}$ for Cr^{VI} and from 30 $\mu\text{g/L}$ to over 1000 $\mu\text{g/L}$ for Cr^{III} .^{7,8,16,24} In the case
190 of Cr^{VI} , a ring test involving 16 laboratories determined a range of 72h-EC50 between 70 and
191 260 $\mu\text{g Cr/L}$ for *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum* based on algal
192 biomass endpoint,^{8,32} which agrees with our results. In the case of Cr^{III} , our results are in the
193 low range of the values reported in the literature and indicate a higher toxicity of Cr^{III}
194 compared with Cr^{VI} ; an occurrence also reported in previous research.^{16,20-23} Further insights in
195 the relative ecotoxicity of the two redox forms of Cr can be gained by examining their
196 behavior in the test medium. In particular, the detailed examination of Cr^{VI} and Cr^{III} behavior
197 added to the test medium at concentrations corresponding to their respective ECs50 allows to
198 exactly determine the actual concentrations responsible for the observed effects.

199 At $t=0$ h, the measured total and total dissolved Cr concentrations (added as Cr^{III}) were similar
200 and corresponded to the expected nominal values in both abiotic and biotic media. In the
201 absence of algae, total Cr concentrations remained within 20 % of the initial value over the
202 first 24 hours and had decreased by about 40 % after 72 h. In the same experiment, total
203 dissolved Cr concentrations remained within 20% of the initial values only over the first two
204 hours, but had dropped by 40 % eight hours after spiking and by 83 % after 72 h (Figure 1).

205 The decrease in total Cr concentrations indicates that some of the added Cr may be lost to the
206 walls of the test vessel over time. However, comparison of total and total dissolved
207 concentrations indicates that about 50% of the added Cr likely occurs in the form of colloidal
208 or particulate form (most likely Cr oxyhydroxides) starting from 24 hours after spiking (i.e.,
209 for over 2/3 of the test duration). The difference between total and total dissolved Cr
210 concentrations becomes statistically significant starting from 8 h after spiking (one-way anova
211 with Tukey post-hoc comparison, $p < 0.01$). Considering the temporal decrease of the total
212 dissolved Cr concentration, assumed as a better proxy of the Cr potentially available to the
213 algae, the time-weighted mean (TMW),²⁶ exposure concentration of the algae to Cr (added as
214 Cr^{III}) was about 25 µg/L. Similar behavior of total and total dissolved Cr concentration was
215 observed over the concentration range 20 – 7,000 µg/L for CrCl₃ and for selected
216 concentrations of Cr(NO₃)₃ and CrKSO₄ (Figures S2–S4); confirming that the decrease in the
217 total dissolved exposure concentrations must be considered and quantified when testing Cr^{III}
218 toxicity in standardized laboratory media. These observations corroborate previous findings
219 obtained by measuring the decrease in Cr concentrations in ISO 8692 medium directly in 96-
220 well microplates in the absence of algae and without actually providing information on the
221 total vs. dissolved Cr concentrations.^{16,18}

222 In the presence of algae, both total and total dissolved Cr concentrations decreased with time
223 (Figure 1) and the decrease was more marked for the total dissolved concentrations (over 95
224 % after 72 hours). The incomplete recovery of total Cr most likely reflects attachment of algal
225 cells to the vessel's walls despite the constant agitation. Most importantly, the differences
226 between total dissolved Cr concentrations in the absence and presence of algae became
227 statistically significant starting from 24 h after spiking (one-way anova with Tukey post-hoc
228 comparison, $p < 0.01$), indicating adsorption onto or absorption into the algal cells of most of

229 the available total dissolved Cr. Based on the total dissolved Cr concentrations in the presence
230 of algae, the 72 h TMW EC50 for algal biomass was 11.5 µg/L. Analogous experiments
231 performed with aliquots of test medium amended with Cr^{VI} at the corresponding EC50
232 concentration (115 µg/L) did not show significant changes in total or total dissolved Cr
233 concentration neither in the absence nor in the presence of algae (Figure S5).

234 The above observations lead to conclude that Cr^{III} is 4 to 10 times more toxic than Cr^{VI} when
235 the 72 h EC50 for Cr^{III} is expressed as the TWM total dissolved concentration in the absence
236 or presence of algae. However, the presence of algae had no measurable effect on total
237 filterable Cr^{VI} concentrations (Figure S6). One possibility is that the entrance of minimal
238 quantities of Cr^{VI} into the cells may suffice to reduce algal biomass, which would support the
239 current consensus that Cr^{VI} is more toxic than Cr^{III}. On the other hand, exposure to Cr^{VI} has
240 been shown to cause lysis of *P. subcapitata* cells at concentrations of 1.75 mg/L or higher
241 added to an algal inoculum of $2 \cdot 10^5$ cells/mL,³³ i.e. an initial quantity of 8.75 ng of Cr^{VI} per
242 algal cell at the beginning of the experiment (our calculation). This figure compares favorably
243 with the value of 5.75 ng of Cr^{VI} per algal cell in our experimental conditions for an initial
244 spike of 115 µg/L. Upon cell lysis, the initially internalized Cr^{VI} would be released back to the
245 culture medium resulting in an apparent stable total (dissolved) Cr concentration over the
246 duration of the experiment. Finally, Cr^{VI} can undergo intracellular reduction to Cr^{III} ^{21,34,35}
247 which could also be released back to the culture medium upon cell lysis; possibly in
248 association with intracellular constituents preventing its precipitation in the medium. It is
249 therefore important to verify if changes in the redox state of Cr occur during the exposure
250 period.

251

252

253 3.3 Chromium redox speciation

254 Aliquots of test medium spiked with Cr^{VI} exhibited a single peak, corresponding to the one
255 observed in a standard solution of Cr^{VI}, with a retention time of about 50 s regardless of the
256 presence of algae and of the incubation time (Figures 2A and S6). The total Cr^{VI}
257 concentration, determined from total peak area, was 118 µg/L at t=0 and 120 µg/L after 72h of
258 incubation in the abiotic test medium and 137 µg/L at t=0 and 120 µg/L after 72h in the biotic
259 medium. No peaks corresponding to Cr^{III} were observed in either abiotic or biotic test medium
260 (Figures 2A and S6). While this result does not provide information on possible Cr^{VI} to Cr^{III}
261 interconversion in the intracellular environment,^{21,36,37} it shows that algal cells are exposed to
262 a practically constant concentration of Cr^{VI} throughout the test duration. The corresponding
263 EC50 values for Cr^{VI} can therefore be confidently ascribed to this specific redox form and
264 calculated from the concentrations initially added to the test medium.

265 On the other hand, marked and rapid changes in Cr speciation occurred in medium aliquots
266 amended with Cr^{III}. At t=0 and in the absence of algae, a single peak at a retention time of
267 about 100 s, corresponding to the hydrated Cr^{III} ion, was observed (Figure 2B). The
268 corresponding total filterable Cr^{III} concentration determined by IC-ICP-MS was 57 µg/L, in
269 agreement with the expected value of 60 µg/L. However, after 24 h of incubation, the peak
270 area at 100 s had dropped by 99 % and the corresponding total filterable Cr^{III} concentration at
271 72 h was only 0.39 µg/L (Figure 2B). Starting from 24 h after spiking, two additional peaks
272 were observed at retention times around 45 s and 75 s (Figure 2B). Considering the measured
273 pH range of the test medium (7.4–8.1 units), trivalent chromium is expected to rapidly
274 undergo hydrolysis^{10,11,38} and the peaks at 45 and 75 s likely correspond to the hydrolytic Cr^{III}
275 complexes Cr(OH)²⁺ and Cr(OH)₃⁰.²⁸ Additional measurements confirmed that the peak at 45
276 s was not the results of an oxidation of Cr^{III} to Cr^{VI} during the experiment (Figures 2C and

277 S6). Samples spiked with Cr^{III} in the presence of algae showed the three distinct peaks at
278 retention times of about 100 s, 75 s and 45 s already at t = 0 (Figure S6). The area of all the
279 peaks rapidly decreased and became practically negligible after 24 hours of incubation
280 (Figure S6). In the presence of algae, the concentration of hydrated Cr^{III} (peak at 100 s)
281 decreased from 30 µg/L at t = 0 to 0.143 µg/L at t = 72 h (Figure S6). The discrepancy
282 between the measured (30 µg/L) and expected concentration (60 µg/L) at t = 0 can be
283 explained by a more rapid formation of hydrolysis products. Indeed, the presence of particular
284 microenvironments with increased pH around algal cells and colonies was reported to
285 enhance Fe hydrolysis³⁹ and an analogous phenomenon may occur in the case of Cr^{III}. Again,
286 no peak indicative of the formation of Cr^{VI} was identified throughout the experiment duration
287 so that the reported ecotoxicological effects can be ascribed to Cr^{III}.

288 The disappearance of the chromatographic peak of hydrated Cr^{III} (t = 100 s) between 0 and 24
289 h of incubation prompted us to examine the changes in Cr^{III} speciation at shorter time
290 intervals. Note that, given the absence of calibration standards for the peaks at 45 and 75 s,
291 the changes in the relative importance of the chromatographic peaks can be discussed solely
292 on the basis of their signal intensities. Immediately after spiking, 84% of total filterable Cr
293 was present as hydrated Cr^{III} (retention time 100 s) with the peaks at 75 s (Cr(OH)²⁺) and 45 s
294 (Cr(OH)₃) representing about 8% of the total signal each (Figures 2C and 3). The peak of
295 hydrated ionic Cr^{III} decreased very rapidly and was only 2 % of the initial total filterable Cr
296 concentration after 6 hours of incubation (Figure 3). At the same time, the peak at 75s
297 increased up to 56 % of the total signal 1 hour after spiking and then slowly decreased to 40
298 % after 6 h. The peak at 45 s accounted for 7 and 10% of the total signal regardless of the
299 incubation time (Figure 3). Both the sum of the signals of the three peaks and the
300 corresponding total filterable Cr signal (assayed by ICP-MS) decreased by 50 % and 40%

301 compared with their respective initial values (Figure 3). Samples collected after 24, 48 and 72
302 h of incubation confirmed the initial decreasing trend and, in the case of total dissolved Cr,
303 were comparable with the results obtained by FAAS (Figure 1). The difference between total
304 dissolved Cr (ICP-MS) and the sum of various Cr peaks (IC-ICP-MS) suggests some losses
305 occurred in the chromatographic column. On the other hand, the signal of total Cr (in terms of
306 relative intensity measured by ICP-MS) remained within 20% of the initial value (Figure 3).
307 The ecotoxicological implications of the rapid disappearance (< 2 h) of ionic Cr^{III} from the
308 test solution are discussed in section 3.5 after the presentation of the results confirming the
309 formation of Cr-bearing particles in the test medium.

310 **3.4 Formation of chromium (nano)particles in test media**

311 NTA analysis showed that colloidal particles formed within minutes after adding soluble Cr^{III}
312 (as chloride) into the test medium. Particle concentration and size ranged between 9.64×10^8
313 and 29.7×10^8 particles/mL and 80 and 140 nm, respectively (Figure 4). The particle
314 concentration was $0.17 \pm 0.10 \times 10^8$ particles/mL in ISO medium without added Cr^{III} (Figure
315 4). Filtration of Cr^{III}-amended aliquots of test medium lowered particle concentration to
316 around 0.6×10^8 particles/mL, but did not decrease their size by more than 25 % (Figure 4).
317 Total Cr concentration remained within ± 20 % of initial value over the entire experiment
318 duration. Total dissolved Cr concentrations also did not change and agreed with the total ones
319 during the first 2 h of incubation, but then decreased to 53, 32, and 26% of the initial value
320 after 24, 48 and 72h, respectively (Figure 4). The concomitant removal of particles and
321 decrease in total dissolved Cr concentration for incubation times > 24 h (Figure 4) confirms
322 the formation of Cr containing (nano)particles starting from initially soluble Cr^{III} salts.

323 Because no particles were observed in unspiked ISO medium (Figure 4), the addition of Cr^{III}
324 to the test medium appears necessary for particles formation. However particles formed for

325 incubation times \leq 2 h did not contain any Cr (Figure 4) and were unable to form again after
326 filtration despite the presence of Cr in the test medium. The concentration of total and total
327 dissolved iron, which may form ferrihydrite particles in the test medium, was examined and
328 observed to vary by less than 25% over 72 hours. Total dissolved Fe concentrations constantly
329 were within 20% of total ones. These measurements excluded the massive formation of Fe-
330 bearing particles (including mixed Cr-Fe(oxy)hydroxides);⁴⁰ which is important to dismiss
331 the possibility of indirect ecotoxic effect of Cr^{III} via sequestration of the essential nutrient Fe.
332 However, the exact nature of particles at short incubation times requires further
333 investigations. Finally, removal of particles with sizes between 80 and 140 nm by filters with
334 a 0.22 μm nominal cut-off can be explained by an actual smaller cut-off of the filters' pores
335 (She et al., 2008) or by the formation of larger particles undetectable via NTA.

336 Measurements by SPC confirmed the presence of particles in the same range identified by
337 NTA, but also of particles larger than 300 nm in unfiltered test medium spiked with Cr^{III} and
338 incubated for 24, 48, and 72 hours (Figure 5 and S8). At t=0, only particles between 50 and
339 150 nm were observed at a concentration of 3.2×10^5 particles/mL. After 24 hours, the
340 concentration of particles between 50 and 200 nm increased to 6.1×10^6 particles/mL and
341 particles larger than 300 nm (8.5×10^3 particles/mL) had also appeared. Particles in the range
342 50–200 nm were still present after 48 (6.5×10^6 particles/mL) and 72 h (9.8×10^6
343 particles/mL) of incubation, while particles larger than 300 nm eventually disappeared after
344 72 h (Figure 5). The latter observation suggests the formation of particles too large to be
345 measured by the instruments or, more likely, settling too quickly to be effectively sampled by
346 the instrument.

347 Based on the analysis of total and total dissolved Cr in the samples subject to SPC
348 measurements (figure S7), 45 μg of Cr had been incorporated in the observed particles after

349 72 hours. Assuming a density of 5.22 g/cm^3 for Cr_2O_3 solids (although amorphous Cr
350 oxyhydroxides likely occur in the medium), the total volume of the particles would be approx.
351 $8.6\text{E-}15 \text{ m}^3/\text{mL}$. Given an approximate volume of $5.24\text{E-}22 \text{ m}^3$ for an individual (spherical)
352 particle with a diameter of 100 nm, a mass of Cr of $45 \text{ }\mu\text{g}$ would be enough to form $1.65\text{E+}07$
353 particles/mL; in reasonable agreement with SPC experimental determinations at 72 hours. The
354 presence of larger particles, unaccounted for in the previous calculation, can be invoked to
355 explain the difference between calculations and measurements.

356 **3.5 Implications for Cr hazard and risk assessment**

357 Our results show that Cr^{III} speciation into a standardized ecotoxicological test medium for
358 algae changes within a few hours after spiking; even when the total Cr^{III} concentration remain
359 comparatively stable. Similar, although less detailed, investigations on daphnids¹⁷ and
360 bacteria⁴¹ suggest that such behavior may be common in ecotoxicological media whose
361 composition favors the formation of Cr^{III} hydroxides. Thus, new ecotoxicological data for the
362 hazard assessment of Cr^{III} must be obtained by considering the recommendations originally
363 developed for sparingly soluble substances (ISO 14442). In particular, in the case of marked
364 differences ($> 20 \%$) between nominal and actual concentration, the corresponding EC50 for
365 Cr^{III} must be calculated as the Time Weighted Mean (TWM) of the total dissolved
366 concentration.²⁶

367 Furthermore, following our IC-ICPMS results, the question of the actual Cr^{III} species
368 responsible for the observed ecotoxicological effects in living organisms deserves additional
369 study. An application of the BLM to the study of root elongation in barley⁴² suggested Cr^{3+}
370 and $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$ as the two biologically active chemical species in controlling the effects of
371 trivalent Cr. However, the rapid disappearance ($< 2 \text{ h}$) of ionic Cr from the algal test medium
372 questions the role of such species in determining the observed algal response. One possibility

373 is that a pulse exposure to 50 µg/L of Cr^{III} at the beginning of the test can cause a 50 %
374 reduction in algal biomass after incubation over 72 h. Alternatively, the residual concentration
375 of ionic Cr^{III} after 2 h (less than 1 µg/L) determines the effect observed at the end of the test or
376 the other Cr^{III} species also contribute to the observed toxicity. The formation of some Cr-
377 bearing (nano)particles over the course of the test also points to a possible nano-
378 ecotoxicological dimension in the toxicity of Cr^{III} to algae. In particular, freshly formed
379 Cr(OH)₃ particles can lead to the formation of “transiently available Cr^{III} species” which may
380 be highly toxic.⁴¹ The existence of monomeric and polymeric Cr^{III} being documented in
381 environmental samples,⁴³ both Cr hydroxides and Cr-bearing (nano)particles may have an
382 ecotoxicological role outside laboratory settings and deserve consideration in risk assessment
383 for Cr^{III}.

384 The present study does not question the high ecotoxicity of Cr^{VI}, but it adds to the growing
385 evidence that the biological effects of Cr^{III} strongly depend on the composition of the medium
386 used for testing and are likely underestimated.^{17,22} In this context, the paradigm ‘Cr^{VI} is more
387 toxic than Cr^{III}’ increasingly appears as an oversimplified representation of environmental
388 reality. In this context, more detailed studies on the speciation Cr^{III} in standardized
389 ecotoxicological laboratory settings are highly desirable for at least three reasons. First,
390 reduction of Cr^{VI} to Cr^{III} is a typical strategy for remediation of Cr-contaminated matrices and
391 environments; second Cr contamination remains a serious environmental problem in several
392 low-middle income countries whose economic activity is linked with the material demands of
393 the current lifestyle in developed countries;⁴⁴ third the safe perspective use of Cr₂O₃
394 nanoparticles is linked to their intrinsic properties, but also to the possible release of soluble
395 Cr in either redox forms.⁴⁵⁻⁴⁷ In all cases, the appropriate knowledge of the actual ecotoxicity
396 of Cr^{VI} and Cr^{III} necessary to assess the environmental risks of Cr appears incomplete.

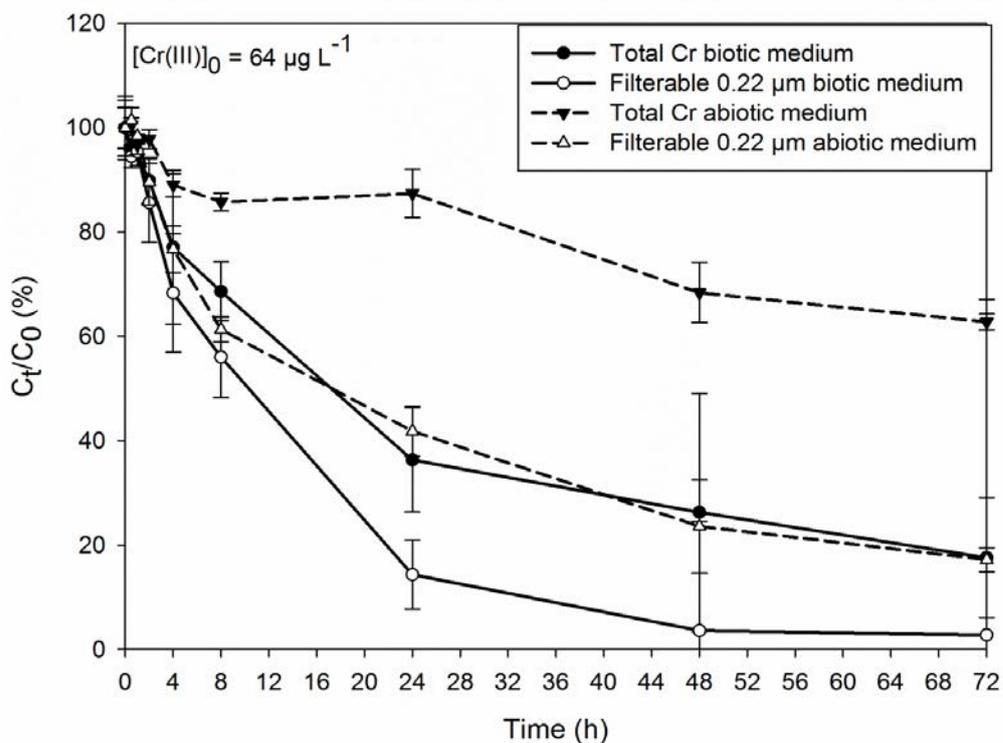
397 Identifying the exact chemical species responsible for ecotoxicological effects, especially in
398 the case of Cr^{III} , will facilitate extrapolation of laboratory findings to complex environmental
399 realities and the associated remediation/management decision.

400

401

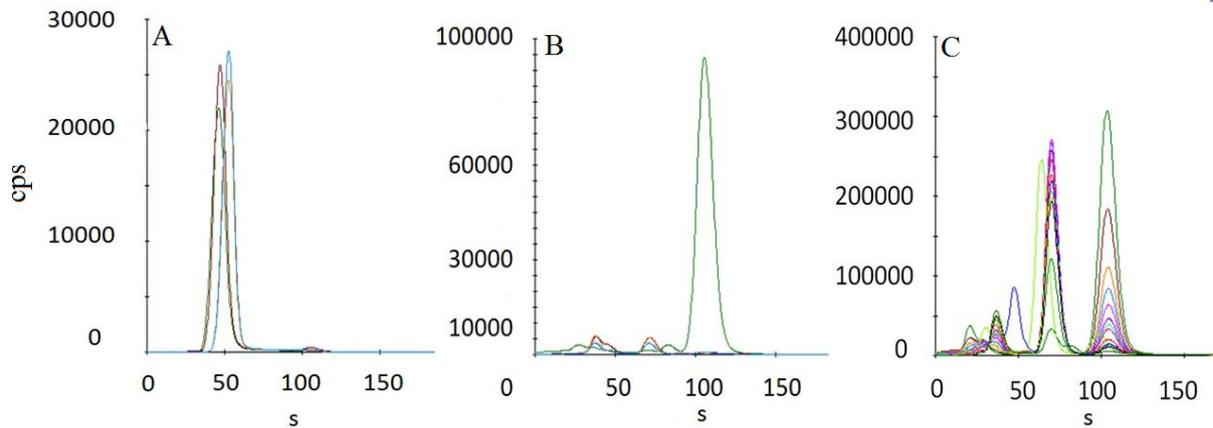
402 FIGURES

403



404 **Figure 1.** Temporal evolution (expressed as a percentage of the values measured at $t = 0$) of
405 total and total dissolved ($< 0.22 \mu\text{m}$) Cr concentrations in ISO medium amended with
406 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ at an initial concentration of $64 \mu\text{g/L}$ (measured value). High standard deviations
407 after 72 h of incubation were caused by Cr concentration decreasing to values close to the
408 instrumental detection limit.

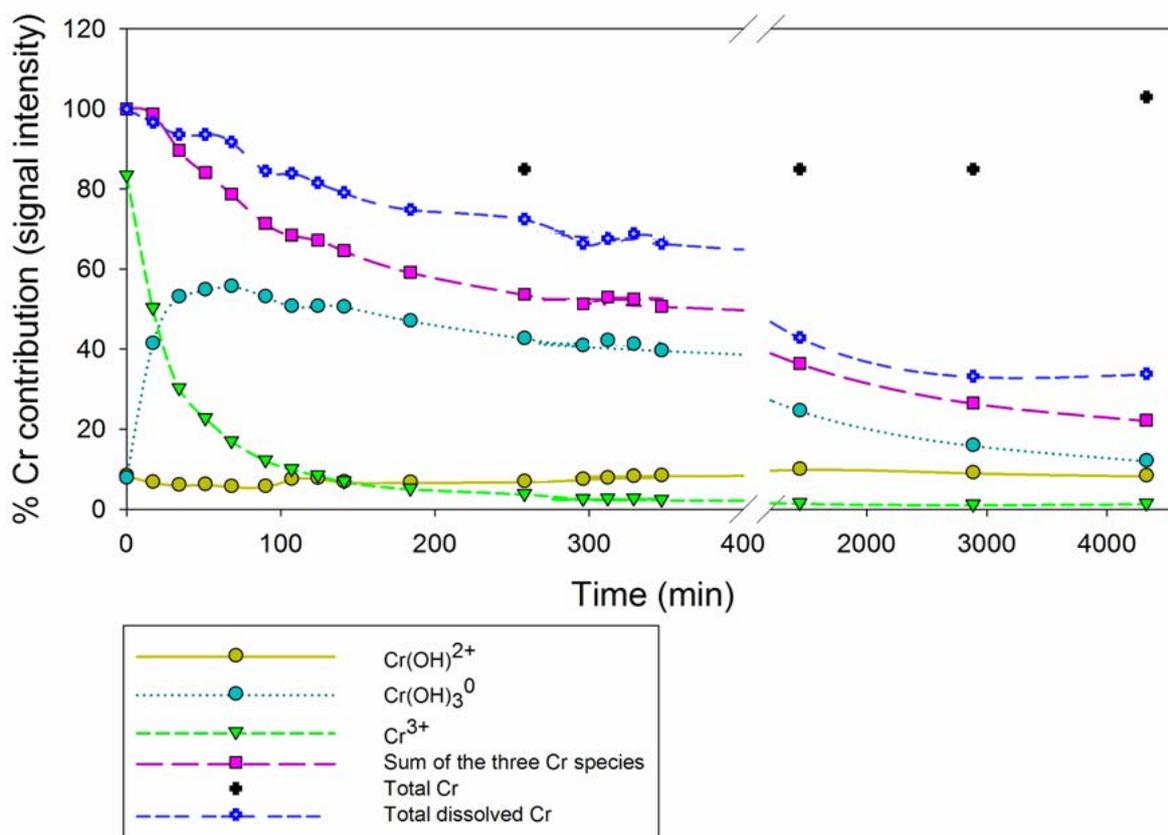
409



410

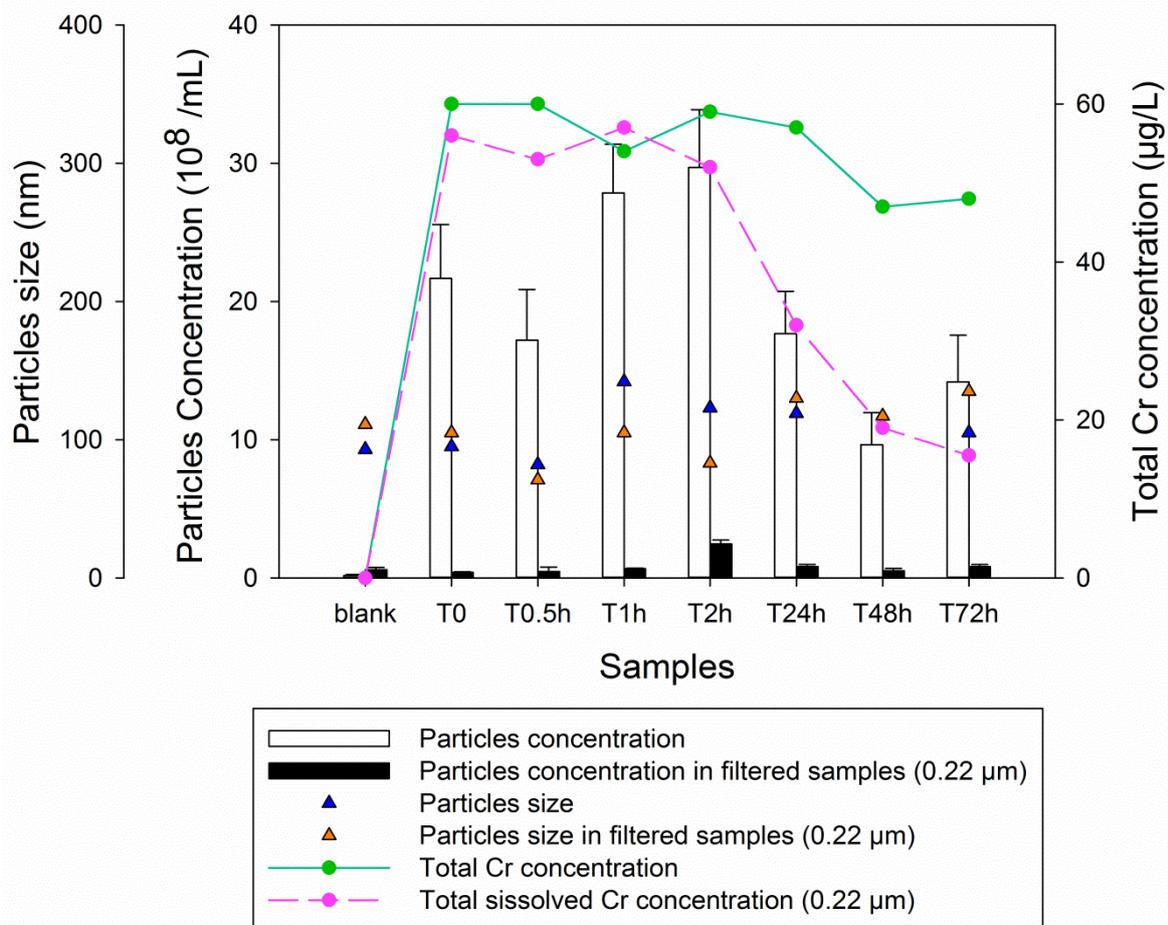
411 **Figure 2.** Chromatograms of standard ISO 8692 medium (without added algae) amended with
412 115 $\mu\text{g/L}$ of Cr^{VI} ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (A) or 60 $\mu\text{g/L}$ of Cr^{III} ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (B) at 0 h (green), 24 h
413 (brown), 48 h (orange) or 72 h (blue) after spiking. Temporal evolution of chromatograms of
414 standard ISO 8692 medium containing 60 $\mu\text{g/L}$ of Cr^{III} with measurements performed every
415 20 min during 6 h (C). In panel C, note the peak of added $\text{Cr}(\text{VI})$ (5 $\mu\text{g/L}$) at 50 s. All
416 solutions were filtered (0.22 μm) immediately before analysis; cps (counts per second).

417



418

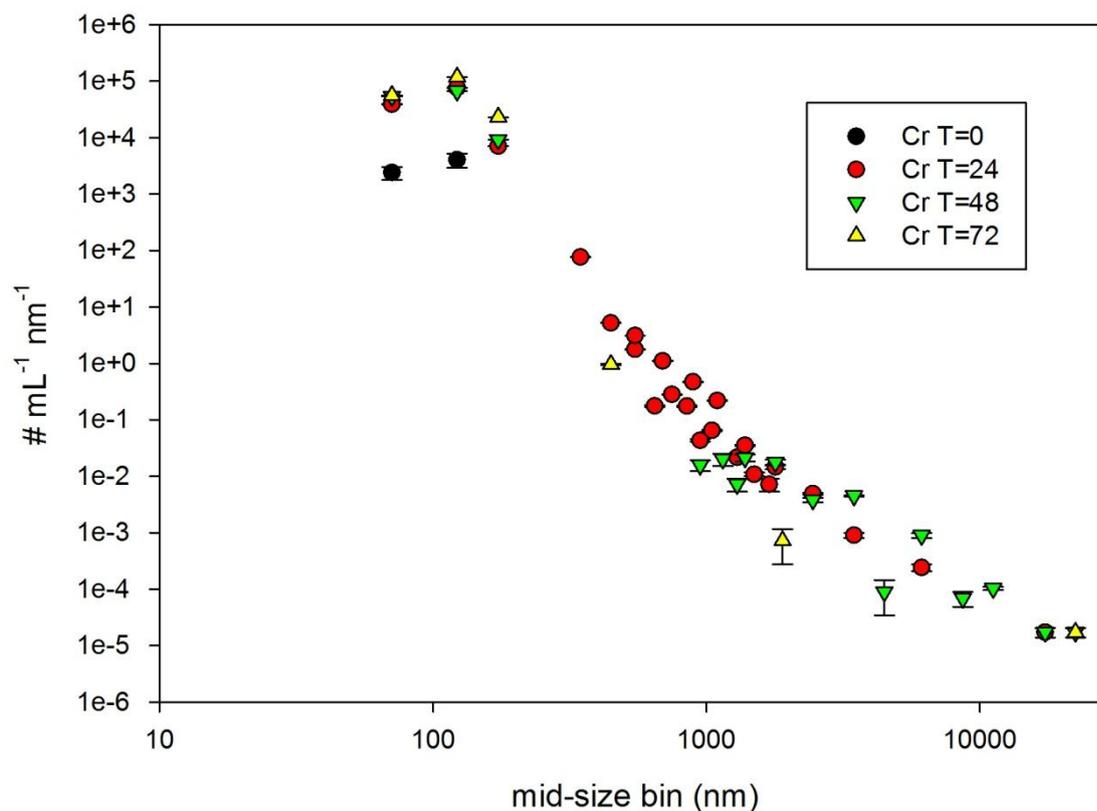
419 **Figure 3.** Temporal evolution of the relative abundances of three Cr^{III} species (Cr(OH)²⁺,
 420 Cr(OH)₃⁰, blue circles; Cr³⁺, green triangles) in ISO medium spiked with 60
 421 µg/L of Cr^{III} (CrCl₃·6H₂O) determined by IC-ICP-MS. The sum of the three Cr species (pink
 422 squares) and the signals of total chromium (black crosses) and total dissolved chromium
 423 (filtered at 0.22 µm; blue crosses) are also indicated.



424

425 **Figure 4.** Particles concentrations (bars), particles size (triangles) and chromium
 426 concentration (lines) in unfiltered and filtered (0.22 µm) aliquots of ISO medium spiked
 427 (except for the sample 'Blank') with 60 µg/L of Cr^{III} (CrCl₃· 6H₂O) at different incubation
 428 times. Particle concentration and size measured by nanoparticles tracking analysis, Cr
 429 concentration measured by atomic absorption spectrometry.

Cr(III)



430

431 **Figure 5.** Particle size distribution and number of particles (in mL⁻¹ nm⁻¹) in ISO algal test
432 medium spiked with Cr^{III} (CrCl₃· 6H₂O) after 0 (black circles), 24 (red circles), 48 (green
433 triangles) and 72 h (yellow triangles) of incubation. All measurements were performed by
434 Single Particle Counter (SPC) at a sample flow rate of 64 mL/min. Results for each size class
435 have been corrected for particle concentration in ISO medium without added Cr^{III} (see figure
436 S7 for the corresponding comparisons). To obtain the number of particles per mL in a given
437 size range, the values on the y-axis must be multiplied for the corresponding average size
438 value (in nm) on the x-axis.

439 ASSOCIATED CONTENT

440 Supporting Information Available: additional informations on experimental and analytical
441 conditions for IC-ICP-MS analyses, and more detailed results of our different experiments.
442 This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

443

444 AUTHOR INFORMATION

445 **Corresponding Author**

446 * david-anselmo.vignati@univ-lorraine.fr

447

448 ACKNOWLEDGMENT

449 This work is part of the PhD thesis of Imad Aharchaou who is supported by the French
450 Ministry of Education. The financial support of the CNRS (project EC2CO Insokintox) is
451 greatly acknowledged. We thank Alexandra Garnier (LHN, ANSES, Nancy) for help with IC-
452 ICP-MS analysis. The contributions of Sebastien Cambier were in part made possible within
453 NANION (FNR/12/SR/4009651-Fonds National de la Recherche Luxembourg). We are
454 grateful to Ewa Szalinska (AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland) for
455 her help in some experiments.

456 REFERENCES

- 457 (1) Fairbrother, A.; Wenstel, R.; Sappington, K.; Wood, W. Framework for Metals Risk
458 Assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2007**, *68* (2), 145–227.
- 459 (2) Mason, R. P. *Trace Metals in Aquatic Systems*; John Wiley & Sons, 2013.
- 460 (3) Harris, C. A.; Scott, A. P.; Johnson, A. C.; Panter, G. H.; Sheahan, D.; Roberts, M.;
461 Sumpter, J. P. Principles of Sound Ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (6), 3100–
462 3111.
- 463 (4) Masscheleyn, P. H.; Pardue, J. H.; DeLaune, R. D.; Patrick, J. W.H. Chromium Redox
464 Chemistry in a Lower Mississippi Valley Bottomland Hardwood Wetland. *Environ. Sci.*
465 *Technol.* **1992**, *26* (6), 1217–1226.
- 466 (5) Dominik, J.; Vignati, D. a. L.; Koukal, B.; Pereira de Abreu, M.-H.; Kottelat, R.;
467 Szalinska, E.; Baś, B.; Bobrowski, A. Speciation and Environmental Fate of Chromium in
468 Rivers Contaminated with Tannery Effluents. *Eng. Life Sci.* **2007**, *7* (2), 155–169.
- 469 (6) Saputro, S.; Yoshimura, K.; Matsuoka, S.; Takehara, K.; Narsito; Aizawa, J.;
470 Tennichi, Y. Speciation of dissolved chromium and the mechanisms controlling its
471 concentration in natural water. *Chem. Geol.* **2014**, *364*, 33–41.
- 472 (7) World Health Organization. (2009). Inorganic chromium (III) compounds.
- 473 (8) World Health Organization. (2013). Inorganic chromium (VI) Compounds.
- 474 (9) Bobrowski, A.; Baś, B.; Dominik, J.; Niewiara, E.; Szalińska, E.; Vignati, D.; Zarbski,
475 J. Chromium speciation study in polluted waters using catalytic adsorptive stripping
476 voltammetry and tangential flow filtration. *Talanta* **2004**, *63* (4), 1003–1012.
- 477 (10) Richard, F. C.; Bourg, A. C. M. Aqueous geochemistry of chromium: A review. *Water*
478 *Res.* **1991**, *25* (7), 807–816.
- 479 (11) Rai, D.; Eary, L. E.; Zachara, J. M. Environmental chemistry of chromium. *Sci. Total*
480 *Environ.* **1989**, *86* (1–2), 15–23.

- 481 (12) Lin, C.-J. The Chemical Transformations of Chromium in Natural Waters – A Model
482 Study. *Water. Air. Soil Pollut.* **2002**, *139* (1-4), 137–158.
- 483 (13) Dazy, M.; Béraud, E.; Cotelle, S.; Meux, E.; Masfaraud, J.-F.; Férard, J.-F.
484 Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent and hexavalent chromium species in
485 *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* **2008**, *73* (3), 281–290.
- 486 (14) Didur, O.; Dewez, D.; Popovic, R. Alteration of chromium effect on photosystem II
487 activity in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures under different synchronized state of the cell
488 cycle. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *20* (3), 1870–1875.
- 489 (15) Liu, J.; Fu, J.; Ning, X.; Sun, S.; Wang, Y.; Xie, W.; Huang, S.; Zhong, S. An
490 experimental and thermodynamic equilibrium investigation of the Pb, Zn, Cr, Cu, Mn and Ni
491 partitioning during sewage sludge incineration. *J. Environ. Sci.* **2015**, *35*, 43–54.
- 492 (16) Vignati, D. A. L.; Dominik, J.; Beye, M. L.; Pettine, M.; Ferrari, B. J. D.
493 Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: A paradigm to revise?
494 *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2010**, *73* (5), 743–749.
- 495 (17) Ponti, B.; Bettinetti, R.; Dossi, C.; Vignati, D. A. L. How reliable are data for the
496 ecotoxicity of trivalent chromium to *Daphnia magna*? *Environ. Toxicol. Chem.* **2014**, *33* (10),
497 2280–2287.
- 498 (18) Vignati, D. A. L.; Beye, M. L.; Dominik, J.; Klingemann, A. O.; Filella, M.;
499 Bobrowski, A.; Ferrari, B. J. Temporal Decrease of Trivalent Chromium Concentration in a
500 Standardized Algal Culture Medium: Experimental Results and Implications for Toxicity
501 Evaluation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2008**, *80* (4), 305–310.
- 502 (19) Chapman, G. A.; Ota, S.; Recht, F.; Corvallis Environmental Research Laboratory.
503 *Effects of water hardness on the toxicity of metals to Daphnia magna: status report - January*
504 *1980*; U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis Environmental Research Laboratory:
505 Corvallis, Ore., 1980.
- 506 (20) Thompson, S. L.; Manning, F. C. R.; McColl, S. M. Comparison of the Toxicity of
507 Chromium III and Chromium VI to Cyanobacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2002**, *69*
508 (2), 286–293.

- 509 (21) Kováčik, J.; Babula, P.; Hedbavny, J.; Kryštofová, O.; Provazník, I. Physiology and
510 methodology of chromium toxicity using alga *Scenedesmus quadricauda* as model object.
511 *Chemosphere* **2015**, *120*, 23–30.
- 512 (22) Lira-Silva, E.; Ramírez-Lima, I. S.; Olín-Sandoval, V.; García-García, J. D.; García-
513 Contreras, R.; Moreno-Sánchez, R.; Jasso-Chávez, R. Removal, accumulation and resistance
514 to chromium in heterotrophic *Euglena gracilis*. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *193*, 216–224.
- 515 (23) Holdway, D. . *The toxicity of chromium to fish*; John Wiley & Sons, 1988.
- 516 (24) OECD. *Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*;
517 Organisation for Economic Co-operation and Development: Paris, 2011.
- 518 (25) Eric, Vindimian. REGTOX: macro Excel™ for dose-response modelling. 2010.
- 519 (26) OECD. *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*; Organisation for Economic
520 Co-operation and Development: Paris, 2012.
- 521 (27) Sacher, F.; Raue, B.; Klinger, J.; Brauch, H.-J. Simultaneous Determination of Cr(III)
522 and Cr(VI) in Ground and Drinking Waters by IC-ICP-MS. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1999**,
523 *74* (1-4), 191–201.
- 524 (28) Séby, F.; Charles, S.; Gagean, M.; Garraud, H.; Donard, O. F. X. Chromium
525 speciation by hyphenation of high-performance liquid chromatography to inductively coupled
526 plasma-mass spectrometry—study of the influence of interfering ions. *J. Anal. At. Spectrom.*
527 **2003**, *18* (11), 1386–1390.
- 528 (29) Méthode d'analyse du chrome hexavalent dans les eaux
529 <https://www.anses.fr/fr/system/files/MethodeChromeHexavalentEaux-Consultation.pdf>
530 (accessed Apr 11, 2016).
- 531 (30) Carr, b; Wright, M. Nanoparticle Tracking Analysis
532 http://particularsciences.ie/psl/brochures/supplier_brochures_pdf/nta_brochure.pdf (accessed
533 Mar 21, 2016).

- 534 (31) Rossé, P.; Loizeau, J.-L. Use of single particle counters for the determination of the
535 number and size distribution of colloids in natural surface waters. *Colloids Surf. Physicochem.*
536 *Eng. Asp.* **2003**, *217* (1–3), 109–120.
- 537 (32) INERIS, Chrome et ses dérivés. INERIS–DRC-01-05590-00DF253, INERIS, 2005.
- 538 (33) Labra, M.; Bernasconi, M.; Grassi, F.; De Mattia, F.; Sgorbati, S.; Airoidi, R.; Citterio,
539 S. Toxic and genotoxic effects of potassium dichromate in *Pseudokirchneriella subcapitata*
540 detected by microscopy and AFLP marker analysis. *Aquat. Bot.* **2007**, *86* (3), 229–235.
- 541 (34) Volland, S.; Lütz, C.; Michalke, B.; Lütz-Meindl, U. Intracellular chromium
542 localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*. *Aquat.*
543 *Toxicol. Amst. Neth.* **2012**, *109*, 59–69.
- 544 (35) Cheung, K. H.; Gu, J.-D. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by
545 microorganisms and bioremediation application potential: A review. *Int. Biodeterior.*
546 *Biodegrad.* **2007**, *59* (1), 8–15.
- 547 (36) Shanker, A. K.; Cervantes, C.; Loza-Tavera, H.; Avudainayagam, S. Chromium
548 toxicity in plants. *Environ. Int.* **2005**, *31* (5), 739–753.
- 549 (37) Viti, C.; Marchi, E.; Decorosi, F.; Giovannetti, L. Molecular mechanisms of Cr(VI)
550 resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **2014**, *38* (4), 633–659.
- 551 (38) Kotaś, J.; Stasicka, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its
552 speciation. *Environ. Pollut.* **2000**, *107* (3), 263–283.
- 553 (39) Sunda, W.; Huntsman, S. Effect of pH, light, and temperature on Fe–EDTA chelation
554 and Fe hydrolysis in seawater. *Mar. Chem.* **2003**, *84* (1–2), 35–47.
- 555 (40) Sass, B. M.; Rai, D. Solubility of amorphous chromium(III)-iron(III) hydroxide solid
556 solutions. *Inorg. Chem.* **1987**, *26* (14), 2228–2232.
- 557 (41) Bencheikh-Latmani, R.; Obratsova, A.; Mackey, M. R.; Ellisman, M. H.; Tebo, B. M.
558 Toxicity of Cr(III) to *Shewanella* sp. Strain MR-4 during Cr(VI) Reduction. *Environ. Sci.*
559 *Technol.* **2007**, *41* (1), 214–220.

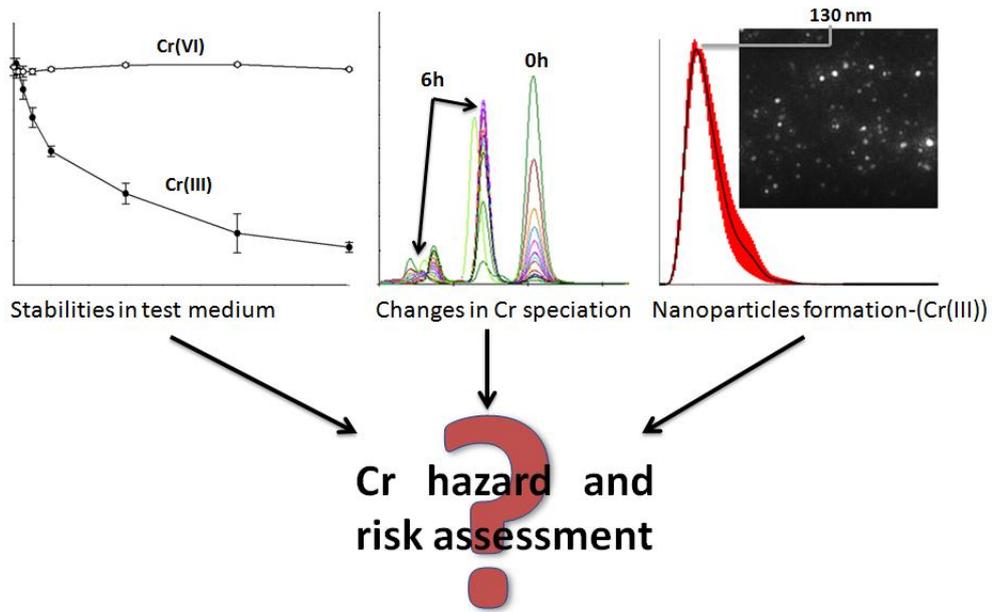
- 560 (42) Song, N.; Zhong, X.; Li, B.; Li, J.; Wei, D.; Ma, Y. Development of a Multi-Species
561 Biotic Ligand Model Predicting the Toxicity of Trivalent Chromium to Barley Root
562 Elongation in Solution Culture. *PLoS ONE* **2014**, *9* (8), e105174.
- 563 (43) Hu, L.; Cai, Y.; Jiang, G. Occurrence and speciation of polymeric chromium(III),
564 monomeric chromium(III) and chromium(VI) in environmental samples. *Chemosphere* **2016**,
565 *156*, 14–20.
- 566 (44) Pure Earth; Green Cross. The World's Worst Pollution Problems 2016: The Toxics
567 Beneath Our Feet. October 25, 2016.
- 568 (45) da Costa, C. H.; Perreault, F.; Oukarroum, A.; Melegari, S. P.; Popovic, R.; Matias, W.
569 G. Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species
570 and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Total Environ.*
571 **2016**, *565*, 951–960.
- 572 (46) Puerari, R. C.; da Costa, C. H.; Vicentini, D. S.; Fuzinato, C. F.; Melegari, S. P.;
573 Schmidt, É. C.; Bouzon, Z. L.; Matias, W. G. Synthesis, characterization and toxicological
574 evaluation of Cr₂O₃ nanoparticles using *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. *Ecotoxicol.*
575 *Environ. Saf.* **2016**, *128*, 36–43.
- 576 (47) Horie, M.; Nishio, K.; Endoh, S.; Kato, H.; Fujita, K.; Miyauchi, A.; Nakamura, A.;
577 Kinugasa, S.; Yamamoto, K.; Niki, E.; et al. Chromium(III) oxide nanoparticles induced
578 remarkable oxidative stress and apoptosis on culture cells. *Environ. Toxicol.* **2013**, *28* (2), 61–
579 75.
- 580
- 581
- 582
- 583
- 584
- 585

586

587

588

589 **Table of Contents Graphic and Synopsis**



590

591

592

Supporting information

Chromium speciation in a standardized ecotoxicological medium: implications for hazard and risk assessment

Imad Aharchaou^{a*}, Jean-Sébastien Py^b, Sébastien Cambier^c, Jean-Luc Loizeau^d, Eric Battaglia^a, Philippe Rousselle^a, Davide A.L. Vignati^a

^a Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux LIEC-UMR 7360, Université de Lorraine and CNRS, 8 rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

^b Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ANSES-Laboratoire d'hydrologie de Nancy, 40 rue Lionnois, 54000 Nancy, France

^c Luxembourg Institute of Science and Technology LIST, 4 avenue des hauts fourneaux-L-4362 Esch sur Alzette, Luxembourg

^d Institute François-Alphonse Forel and Institute for Environmental Sciences, University of Geneva, 66 Bd Carl-Vogt, CH-1211 Genève, Switzerland

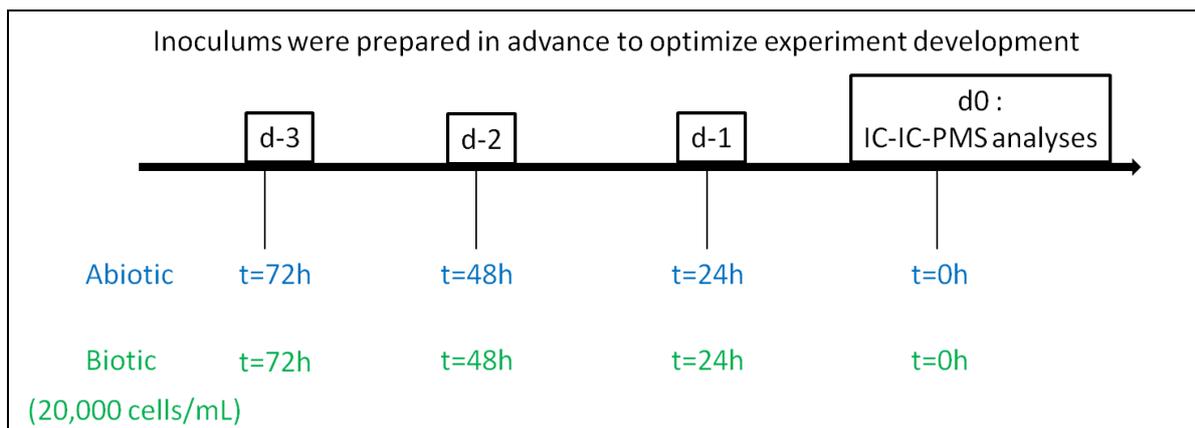


Figure S1. Experimental plan for IC-ICP-MS experiment. Abiotic (absence of algae) and biotic (presence of algae) samples were prepared 3, 2 or 1 day (d-3, d-2, d-1) in advance or immediately prior to analysis (d0). To optimize the analyses course, all samples were analyzed on day 0.

Table S1: IC conditions and ICP-MS parameters for the determination of chromium species

IC conditions	
pump	Thermo ICS 5000+
separation column	Dionex Thermo AG7 2x50 mm
column temperature	20 °C
eluent	0.4 mol/L HNO ₃ spiked with 1µg/L of Rh, isocratic system
flow rate	500 µL/min
sample volume	200 µL
flushing volume	1,500 µL
duration	10 min
ICP-MS parameters	
ICP-MS	Thermo XII series
nebulizer	PFA-LC
gas flow	0.87 L/min
plasma power	1,500 W
plasma gas flow	13.5 L/min
auxiliary gas flow	0.77 L/min
detector mode	pulse counting
KED	He/H ₂
CCT – KED flow rate	3.5 mL/min – 3 V
Data acquisition	
ions (m/z)	⁵² Cr, ⁵³ Cr, ¹⁰³ Rh
measurement unit	counts
sweps/reading	1
replicates	1
dwel time	100 ms
intergration time	600,000 ms

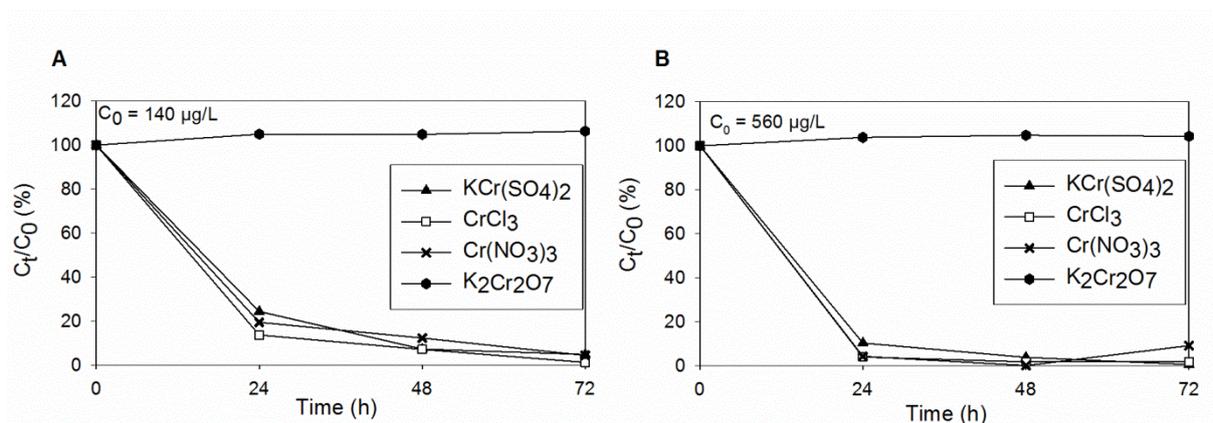


Figure S2. Temporal evolution (expressed as a percentage of the value measured at $t=0$) of total dissolved chromium concentrations (filtered at $0.22 \mu\text{m}$) in standard (ISO8692) medium amended with Cr^{III} ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (square) or $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (cross) or $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (triangle)) or Cr^{VI} ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (circle)) during 72 hours. Initial concentration of each salt was $140 \mu\text{g/L}$ (A) or $560 \mu\text{g/L}$ (B).

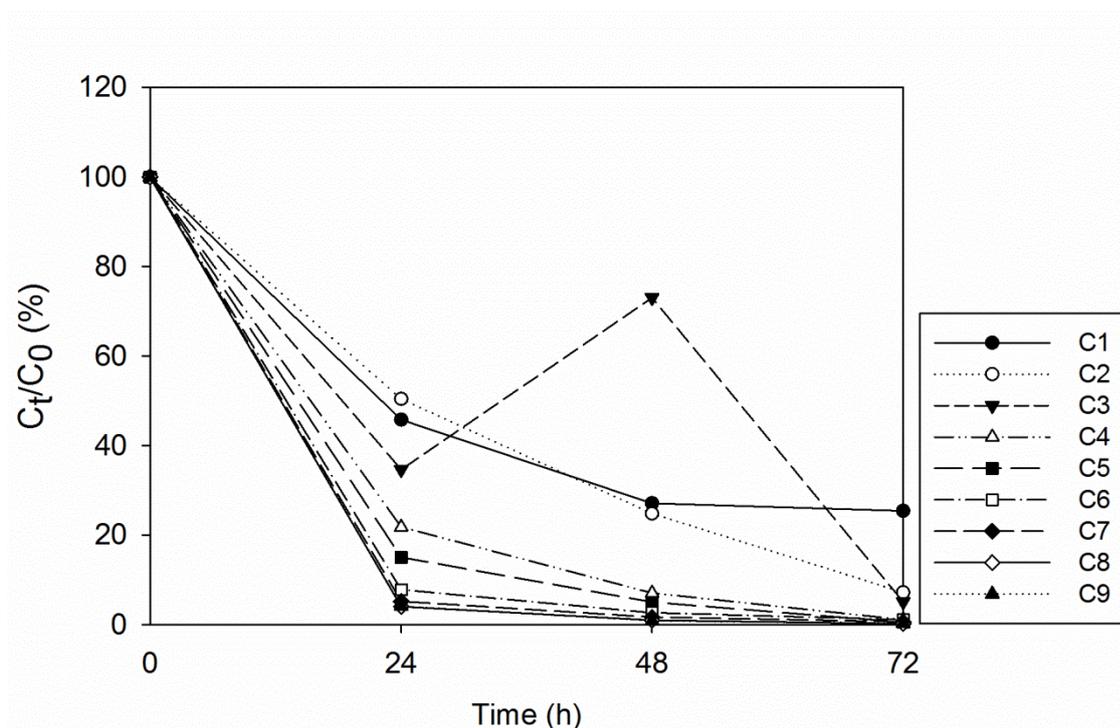


Figure S3. Temporal evolution (expressed as a percentage of the value measured at $t=0$) of total dissolved chromium concentrations (filtered at $0.22 \mu\text{m}$) in standard (ISO 8692) medium amended with initial total concentrations of $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ between 20 (C1) and 7000 (C9) $\mu\text{g/L}$ (see Table S2 for the full compilation of the measured values at $t = 0$). Measurements were

done in triplicate for C1, C2, C4 and C9 after 0 and 48 h of incubation. The relative standard deviations (RSD) for these measurements were usually below 10 % except for C1 at 48 h (RSD = 70%) and C2 at 48 h (RSD = 40%) and C3 at 48 h (RSD = 20%). The high RSD were obtained for analytical concentrations close to the instrumental quantification limit for FAAS. Also note that, with increasing concentrations, total dissolved Cr levels were lower than the corresponding total ones already at $t = 0$ (see Table S2).

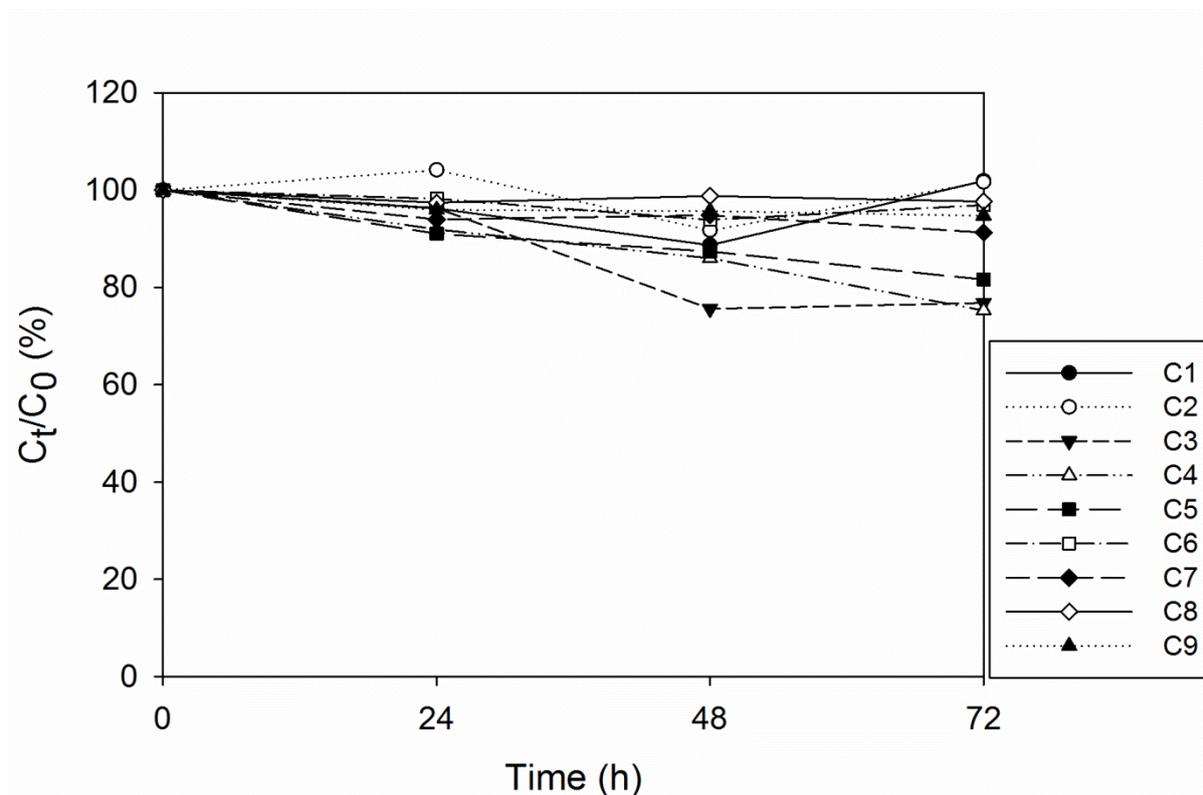


Figure S4. Temporal evolution (expressed as a percentage of the value measured at $t = 0$) of total chromium concentrations in standard (ISO 8692) medium amended with initial concentrations of $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ between 20 (C1) and 7000 (C9) $\mu\text{g/L}$ (see Table S2 for the full compilation of the measured values at $t = 0$). Measurements were done in triplicate for C1, C2, C4 and C9 after 0 and 48 h of incubation. The relative standard deviations (RSD) for these measurements were usually below 10 % except for C1 at 48 h (RSD = 20%) and C2 at 48 h (RSD = 15%).

Table S2. Measured Cr concentration at $t = 0$ in standard (ISO 8692) medium amended with different initial concentrations (C1–C9) of $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ with and without filtration at $0.22 \mu\text{m}$. All values are in $\mu\text{g/L}$ of Cr.

	measured concentration at $t = 0$	total measured filterable ($0.22 \mu\text{m}$) concentration at $t = 0$
C1	18	20
C2	40	42
C3	82	78
C4	186	179
C5	436	379
C6	789	717
C7	1745	1477
C8	3596	2700
C9	6877	5489

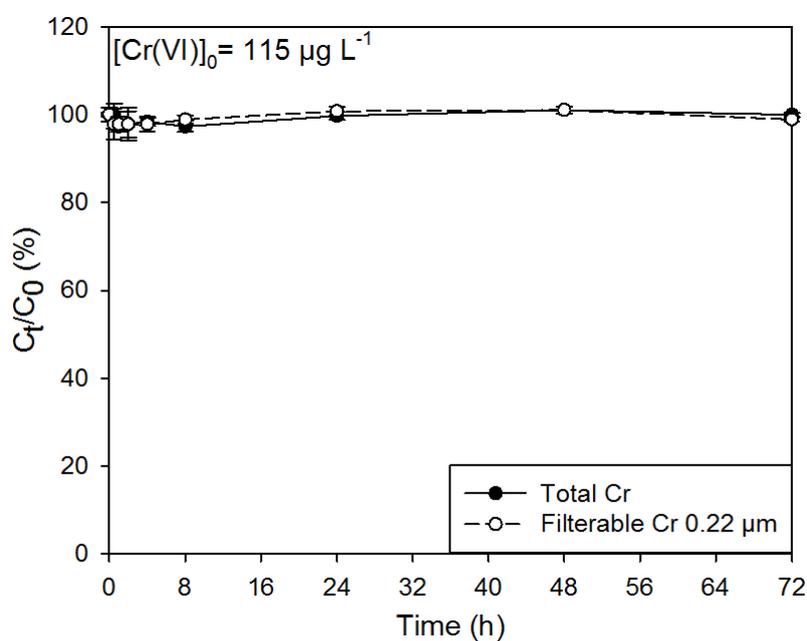


Figure S5. Temporal evolution (expressed as a percentage of the values measured at $t = 0$) of chromium concentrations (total Cr concentrations (black circles) and total dissolved Cr concentrations (filtered at $0.22 \mu\text{m}$) (white circles) in biotic (presence of algae) ISO medium amended with hexavalent chromium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) during 72 hours. Initial chromium concentration is $115 \mu\text{g/L}$.

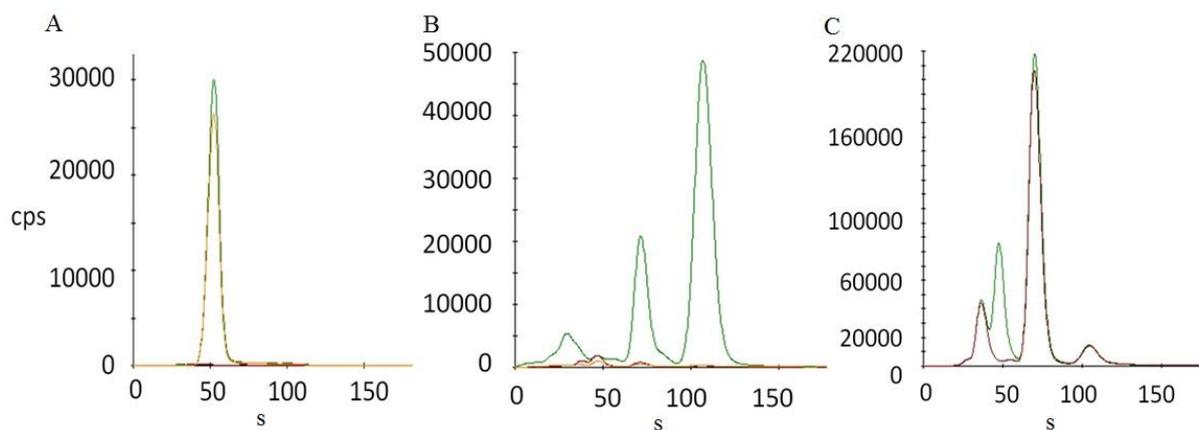


Figure S6. Chromatograms of standard ISO 8692 biotic (presence of algae) medium amended with 115 $\mu\text{g/L}$ of Cr^{VI} ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (A) or with 60 $\mu\text{g/L}$ of Cr^{III} ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (B) at 0 h (green), 24 h (brown), 48 h (orange) or 72 h (blue) after spiking. Chromatograms of standard ISO 8692 medium containing 60 $\mu\text{g/L}$ of Cr^{III} ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) during 24 h (brown), and then amended with Cr^{VI} ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (green) (C). All solutions were filtered ($0.22\mu\text{m}$) immediately before analysis; cps (counts per second).

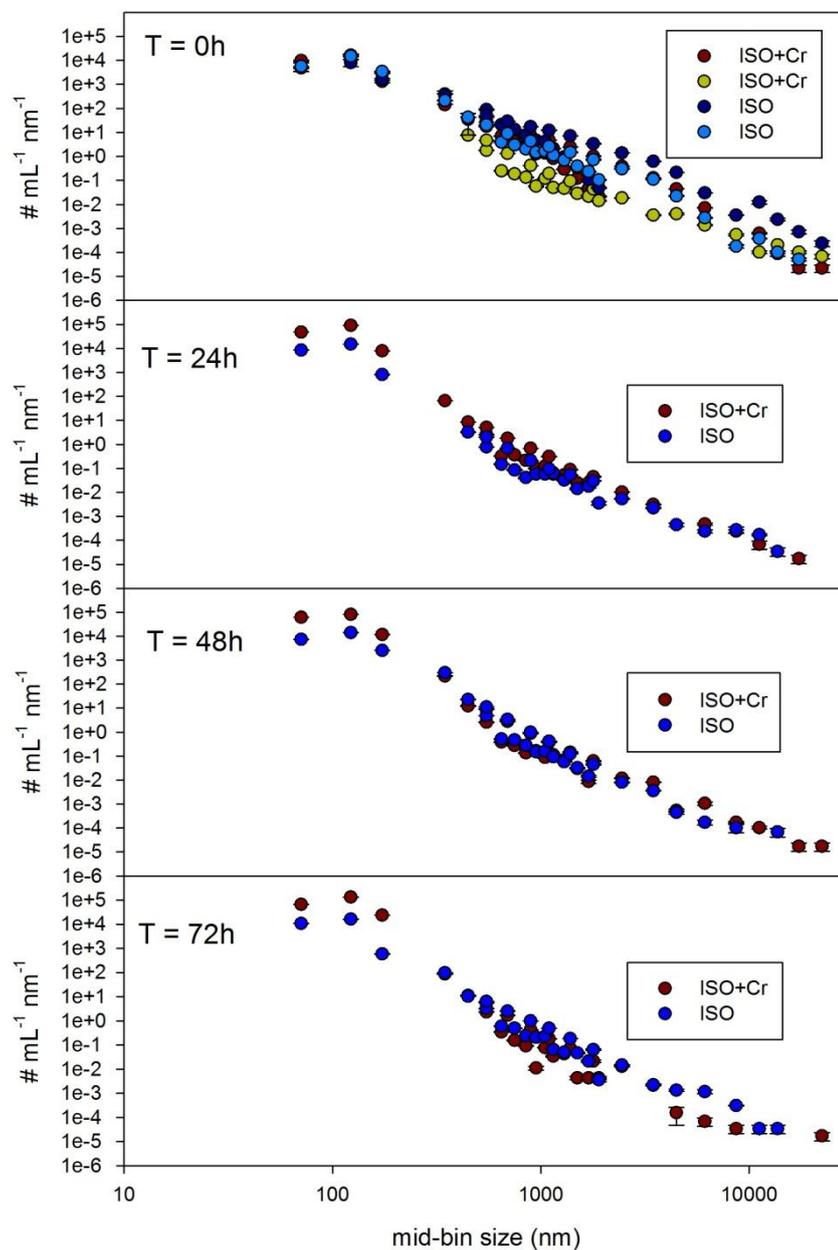


Figure S7. Particle size distribution and number of particles (in $\text{mL}^{-1} \text{nm}^{-1}$) determined with Single Particles Counter (SPC) measurements in ISO algal test medium with and without addition of $70 \mu\text{g/L}$ of Cr^{III} (added as $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) at different incubation times. To obtain the number of particles per mL in a given size range, the values on the y-axis must be multiplied for the corresponding average size value (in nm) on the x-axis.

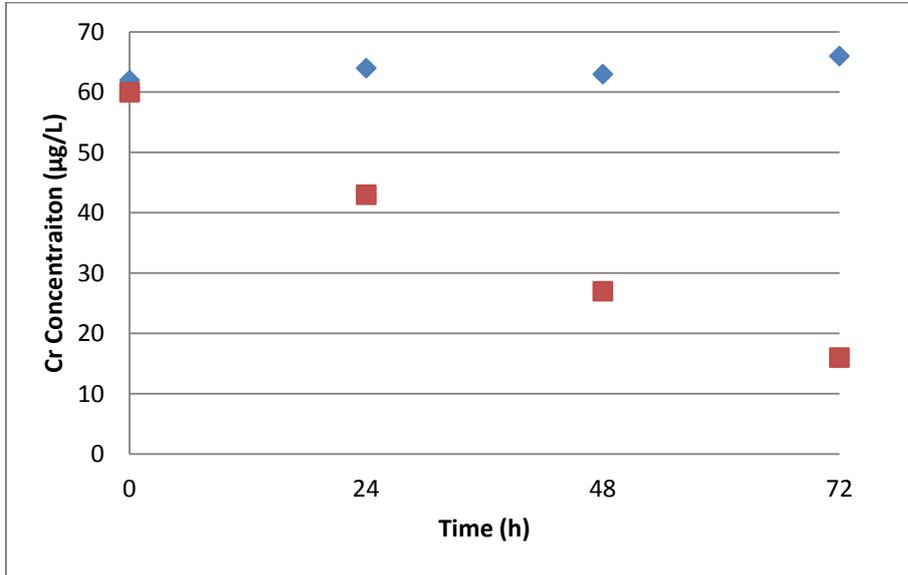


Figure S8. Temporal evolution of chromium concentrations in µg/L (total Cr concentrations (blue squares), and filterable Cr concentrations (0.22 µm) (red squares) in ISO medium amended with Cr^{III} (CrCl₃.6H₂O) during 72 hours. Initial nominal chromium concentration is 70 µg/L.

Optimization of operating conditions for Nanoparticle Tracking Analysis with Nanosight NS500 instrument (Malvern instruments Ltd, UK)

In a preliminary experiment, aliquots of test medium spiked with 0, 17, 35, 70, 140 and 280 $\mu\text{g/L}$, partly covering the concentration range used in toxicity test, were analyzed by NTA. No particles were observed in aliquots spiked with 17 $\mu\text{g/L}$ Cr^{III} and too many particles were detected in aliquots spiked with 140 $\mu\text{g/L}$ and 280 $\mu\text{g/L}$ Cr^{III} . Particle concentrations in the range $1\text{--}3 \times 10^9$ particles/mL were observed in solutions containing 35 and 70 $\mu\text{g/L}$ Cr^{III} . The latter concentration, closed to the observed 72h EC50 for Cr^{III} , was chosen for detailed analysis after 1, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min, and 24, 48 and 72 h of incubation.

No particles were detected in the ultrapure water (MQW) used to prepare the test medium. Particle concentration in the blank sample (freshly prepared ISO medium) was low ($0.14 \pm 0.07 \times 10^8$ particles/mL) and particle size distribution (PSD) covered a large spectrum between 0 and 900 nm (Figure S10). In ISO medium spiked with Cr^{III} and regardless of the incubation time, particle concentrations ranged between 7.85×10^8 and 27.5×10^8 particles/mL with relative standard deviations (RSD) between 6 and 59 % (Figure S10). Particles detected by NTA had a mean size between 100 and 135 nm with RSD between 1% and 12% (Figure S10). The high RSD of some particle concentration measurements were caused by the systematic decrease in particle number between the first and the third replicate measurement (Figure S11 A, B and C). The total (unfiltered) Cr concentration was stable over 72 h and ranged between 62 $\mu\text{g/L}$ at $t=0$ and 66 $\mu\text{g/L}$ 72 h after spiking. However, the total filterable Cr concentration decreased over time from 60 $\mu\text{g/L}$ at $t=0$ to 16 $\mu\text{g/L}$ after 72 h (Figure S12).

Examination of the videos recorded during NTA showed that the number of particles visible in the field of the camera was stable during data acquisition for the first replicate, but increased with time for replicates two and three.

Measurement parameters were modified by adding a waiting step of 60 s before data acquisition for replicates two and three and RSD on particle concentrations was reduced to 1–11% (Figure S11 D, E and F).

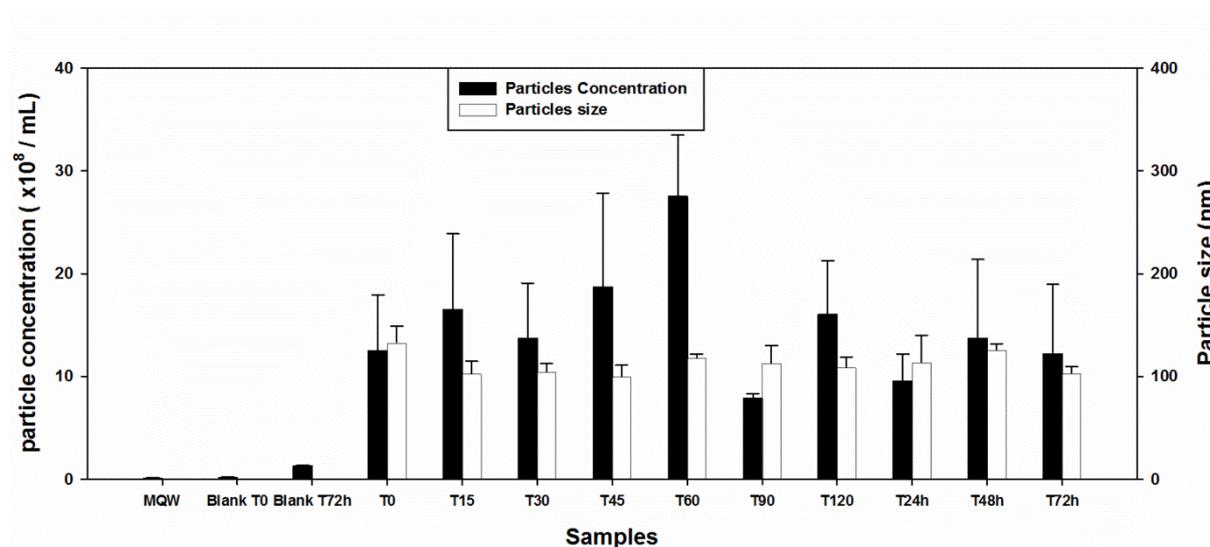


Figure S9. Particles concentration (black bars) and size (white bars) measured by nanoparticles tracking analysis (NTA) in standard (ISO 8692) medium spiked or not with 70 $\mu\text{g/L}$ of $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ for different incubation time between 0 and 120 min and after 24, 48 and 72 h.

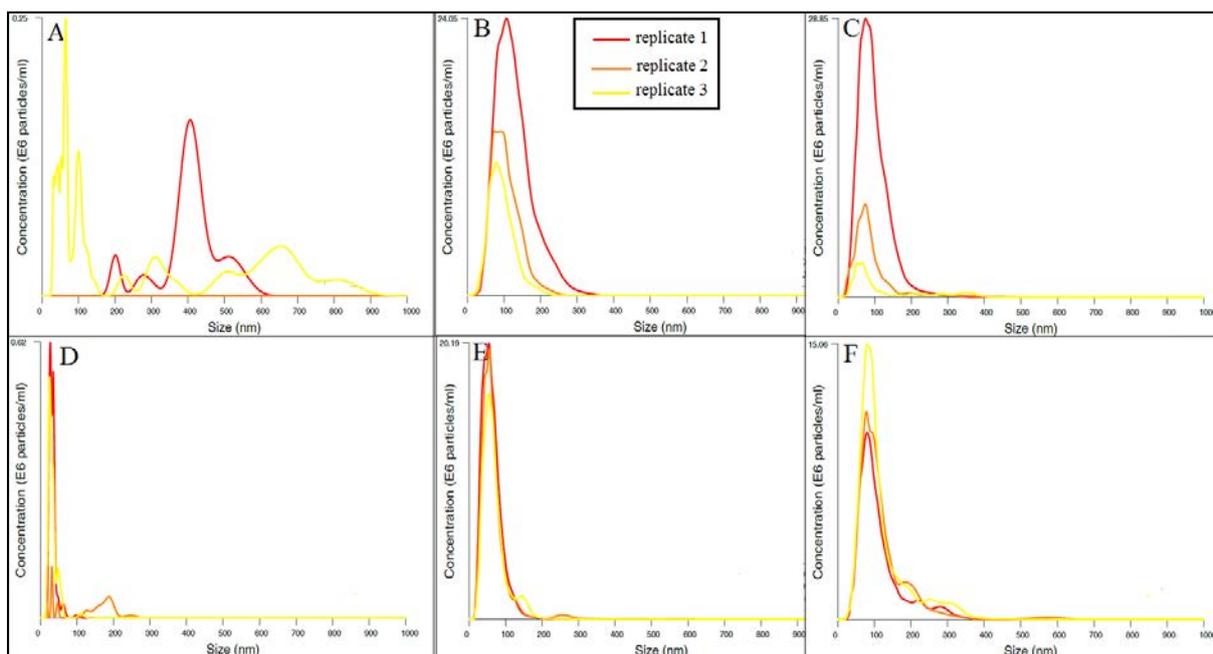


Figure S10. Comparison of reproducibility of results profiles before (A, B and C) and after (D, E and F) measurement parameters modification by adding a waiting step of 60 s before data acquisition for replicates 2 and 3. This edit to the experimental procedure aimed to harmonize the waiting time before each replicate measurement; i.e. to increase the waiting time for replicates two and three from 5 seconds to 60 s. This experiment was realized in ISO test medium spiked with 60 $\mu\text{g/L}$ of Cr^{III} , corresponding to the previously determined EC_{50} at 72 h.

Partie 2

Mécanismes de l'écotoxicité du chrome chez *Pseudokirchneriella subcapitata*

Contexte

Pour mieux appréhender les mécanismes de toxicité du Cr sur l'algue *P. subcapitata*, nous nous sommes intéressés à ses effets sur l'activité photosynthétique (section I.1), la viabilité et l'intégrité cellulaire (section I.2), et enfin sur le matériel génétique (section I.3). Les résultats portant sur le comportement du Cr(III) dans le milieu ISO 8692 (chapitre III, partie 1) ayant montré une forte diminution des concentrations d'exposition avec le temps, nous avons aussi exploré les effets du Cr(III) sur des temps d'exposition inférieurs à 24 heures. Les effets du Cr(VI) ont été également étudiés afin de pouvoir comparer les effets de ces deux formes redox du chrome.

Méthodes

Les effets du Cr(III) et du Cr(VI) sur l'activité photosynthétique du photosystème II (PSII) de l'algue *P. subcapitata* ont été étudiés en déterminant le rendement photochimique du PSII (Chapitre II, section III.7.1) après 2, 4, 6 et 24 h d'exposition. La viabilité, l'autofluorescence et l'activité des estérases des cellules algales exposées au Cr(III) ont été évaluées en utilisant la cytométrie de flux (Chapitre II, section III.7.2) pour une durée d'exposition de 72 heures. L'utilisation du test des comètes (Chapitre II, section III.7.3) pour l'étude des effets génotoxiques du Cr(III) et Cr(VI) a aussi été examinée.

Principaux résultats

Pour des concentrations de Cr(III) et Cr(VI) entre 0 et 2,5 mg/L, une réduction de l'activité du PSII (jusqu'à 50% par rapport aux contrôles) a été observée dans les cellules après 24 heures d'exposition, tandis que les effets étaient plus faibles et variables entre 2 et 6 h. Pour des teneurs en Cr plus élevées (entre 0 et 100 mg/L pour chaque forme redox), des effets sur le PSII apparaissaient dès 2–4 heures avec des taux d'inhibition allant jusqu'à 80% à partir de 12,5 mg/L de Cr(VI) et 25 mg/L de Cr(III). En considérant la diminution progressive de la concentration en Cr dans le milieu ISO dopé avec du Cr(III), celui-ci s'avère aussi toxique, voir plus toxique, que le Cr(VI) pour une même concentration moyenne après 24 h d'exposition. Les concentrations initiales en Cr(III) supérieures à 12,5 mg/L provoquent une baisse de pH de 3–4 unités qui contribue à la diminution de l'activité du PSII et est donc susceptible de constituer un facteur confondant pour les concentrations élevées en Cr(III). La différence de sensibilité entre inhibition du PSII à 24h et croissance à 72h est de seulement un facteur 2 dès lors que les concentrations d'exposition sont exprimées en ng de Cr par cellule et non en termes de concentration massique dans le milieu de test.

L'utilisation de la cytométrie de flux nous a permis de déterminer que le Cr(III) exerce un effet algicide et non pas algistatique sur les cellules de *P. subcapitata*. De plus, les investigations sur l'activité enzymatique (estérase) montrent que les cellules restant intègres à de fortes concentrations en Cr(III) ne fonctionnent plus de manière optimale. En revanche, la génotoxicité du Cr(III) et du Cr(VI) n'a pu être évaluée sur les cellules algales par le test des comètes suite à des difficultés rencontrées pour la lyse des parois cellulaires. Des développements méthodologiques ultérieurs doivent être préconisés pour l'application de ce test à l'algue verte *P. subcapitata* qui se caractérise par une paroi cellulaire particulièrement résistante.

I. Effets du Cr sur le photosystème II

I.1 Effets du Cr(III)

Pour la gamme de concentrations entre 0 et 2,5 mg/L de Cr(III), aucun effet sur l'activité photosynthétique n'a été observé après 2, 4 et 6 heures d'exposition par rapport aux contrôles correspondants. Après 24 h d'incubation, l'activité du PSII diminue progressivement avec un maximum d'effet (42 %) à 1,25 mg/L (Figure 29-A) mais l'inhibition de l'activité photosynthétique est de seulement 25 % pour les cellules exposées à 2,5 mg/L (Figure 29-A). Une diminution de l'activité photosynthétique (inférieure à 10%) a été aussi observée dans le contrôle par rapport au signal mesuré à $t = 0$, mais ceci ne masque pas les effets provoqués par l'exposition au Cr(III) (Figure 29-A).

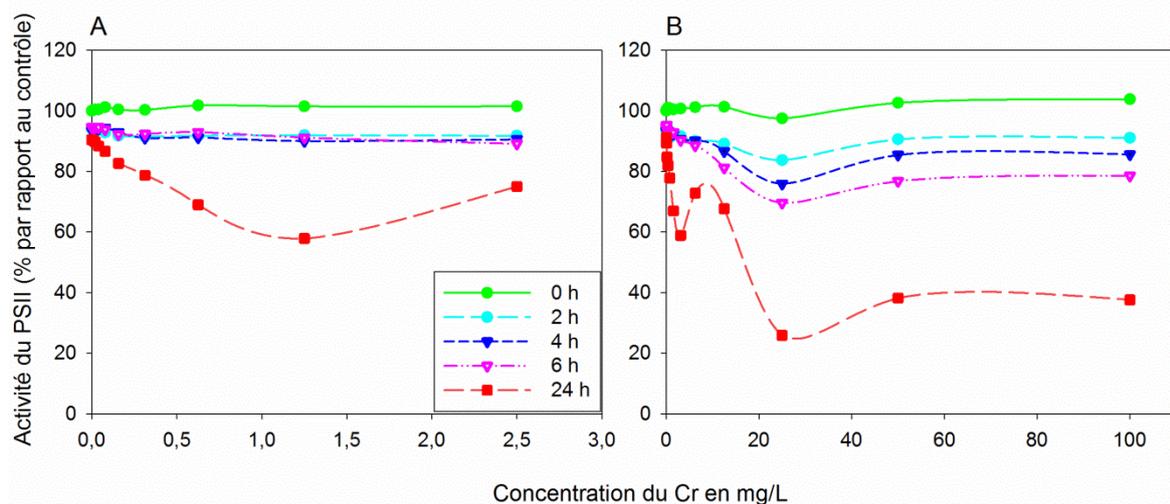


Figure 29 : Activité du PSII des cellules de *P. subcapitata* exposées au Cr(III) pendant 0, 2, 4, 6 et 24 heures. Les activités sont exprimées par rapport au contrôle à $t = 0$. L'activité de PSII a été mesurée en déterminant le rapport F_v/F_m (fluorescence variable/fluorescence maximale, voir chapitre II, section III.7.1). A : gamme de concentrations en Cr(III) de 0 à 2,5 mg/L. B : gamme de concentrations en Cr(III) de 0 à 100 mg/L. Les suspensions algales ont été adaptées à l'obscurité pendant 15 min avant les mesures.

Pour la gamme de concentrations entre 0 et 100 mg/L, des effets sur l'efficacité photosynthétique sont observables à 4 h et 6 h d'exposition avec un maximum (24 et 30% d'inhibition du PSII respectivement) à 25 mg/L et des effets plus faibles à 50 et 100 mg/L (Figure 29-B). Après 24 heures d'exposition, les effets du Cr(III) deviennent plus marqués avec une diminution de l'activité du PSII allant jusqu'à 75% à 25 mg/L. Toutefois, la diminution de l'activité photosynthétique n'est pas monotone avec un effet plus marqué à

3,12 mg/L qu'à 6,25 et 12, 5 mg/L. Comme pour les temps d'exposition plus courts, les concentrations de 50 et 100 mg/L provoquent un effet inférieur par rapport aux milieux contenant 25 mg/L. Une petite diminution (inférieure à 10%) de l'activité photosynthétique dans les contrôles non exposées au Cr est observable entre 2 et 24 heures (Figure 29-B).

I.2 Effets du Cr(VI)

Pour la gamme de concentrations entre 0 et 2,5 mg/L de Cr(VI), aucun effet sur l'activité photosynthétique n'a été observé après 2 heures d'exposition (Figure 30-A). Une diminution de l'activité d'environ 15 et 20% pour une exposition à 2,5 mg/L est observable après 4 et 6 h d'exposition, respectivement. Après 24 h d'incubation, l'activité du PSII baisse proportionnellement avec la concentration en Cr(VI), avec un maximum d'effet (52%) à 2,5 mg/L (Figure 30-A).

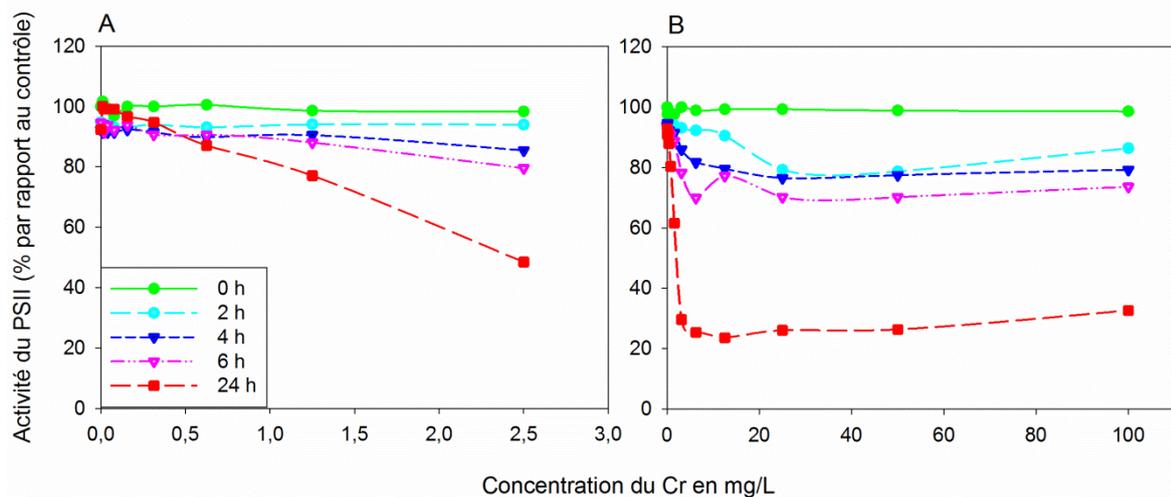


Figure 30 : Activité du PSII des cellules de *P. subcapitata* exposées au Cr(VI) pendant 0, 2, 4, 6 et 24 heures. Les activités sont exprimées par rapport au contrôle à t = 0. L'activité du PSII a été mesurée en déterminant le rapport Fv/Fm (fluorescence variable/f maximale, voir chapitre II, section III.7.1). A : gamme de concentrations en Cr(VI) de 0 à 2,5 mg/L. B : gamme de concentration en Cr(VI) de 0 à 100 mg/L. Les suspensions algales ont été adaptées à l'obscurité pendant 15 min avant les mesures.

Pour la gamme de concentrations entre 0 et 100 mg/L, une diminution de l'efficacité photosynthétique des algues est observable dès 2 h d'exposition avec un maximum d'effet à 25 mg/L (Figure 30-B). Les effets deviennent progressivement plus marqués et atteignent 76% d'inhibition du PSII après 24 h d'exposition à 12,5 mg/L. La diminution de l'activité photosynthétique n'est pas complètement proportionnelle à la concentration d'exposition. En effet, après 4, 6 et 24 h, les effets maximaux sont observés entre 12,5 et 25 mg/L et restent

stables même si la concentration d'exposition augmente (Figure 30-B), ce qui indiquerait un seuil d'effet maximale dans la réponse du PSII au Cr(VI). Une petite diminution (inférieure à 10%) de l'activité photosynthétique a été observée pour le contrôle entre 2 et 24 heures (Figure 30).

I.3 Comparaison des effets du Cr(III) et du Cr(VI)

De façon générale, nos résultats montrent qu'après une exposition des cellules de *P. subcapitata* au chrome, le rapport Fv/Fm, qui est proportionnel au rendement du centre réactionnel du photosystème II (Genty et al., 1990; Hörcsik et al., 2007), se réduit considérablement. Cette inhibition augmente avec la concentration (du moins sur une partie des gammes choisies) et avec la durée d'exposition. L'effet inhibiteur du Cr(VI) sur l'activité du PSII a été observé dans plusieurs études chez les algues et les plantes (Tableau 4). Les données de Machado et al, (2015) indiquent une inhibition de 80% pour l'activité photosynthétique des cellules de *P. subcapitata* exposées à 40 mg/L de Cr(VI) pendant 72 h, en bon accord avec nos résultats à 24 heures. En revanche, nous n'avons pas pu trouver en littérature une étude comparative sur les effets du Cr(III) et du Cr(VI) vis-à-vis de l'activité photosynthétique des algues.

Pour les cellules exposées à des concentrations entre 0 et 2,5 mg/L, l'inhibition maximale du PSII à 24 heures est de 42% à 1,25 mg/L dans le cas du Cr(III) et de 52% à 2,5 mg/L dans le cas du Cr(VI). Pour la deuxième gamme de concentrations (0 à 100 mg/L), l'inhibition maximale de l'activité du PSII après 24 heures est de 70% pour les cellules exposées à 25 mg/L de Cr(III) et à 6,25 mg/L du Cr(VI), ce qui indiquerait un effet plus marqué de cette dernière forme sur le fonctionnement du PSII. De plus, les effets du Cr(VI) semblent pouvoir se déclencher de façon plus précoce par rapport à ceux du Cr(III) (Figures 29 et 30). Toutefois, comme le montre l'étude de la spéciation du Cr(III) et Cr(VI) dans le milieu algal ISO8692 (Chapitre III, partie 1), la concentration réelle du Cr(III) à laquelle les algues sont exposées diminue avec le temps. Il est donc indispensable de prendre en considération cette diminution des concentrations pour interpréter correctement les effets du Cr(III) et les comparer de façon appropriée à ceux du Cr(VI).

Tableau 4 : Résumé de travaux ayant étudié l'effet du Cr(VI) et du Cr(III) sur l'activité photosynthétique chez des microalgues ; - : donnée non reportée. HSM : High Salt Medium ; WC medium : Woods Hole modified CHU 10 medium.

Référence	Modèle biologique	Forme du Cr	Durée d'exposition	Concentration d'exposition (mg/L)	% d'inhibition d'activité photosynthétique	Milieu d'exposition
Didur et al., 2013	<i>C. reinhardtii</i>	Cr(VI) (K ₂ Cr ₂ O ₇)	24 h	0,65	10	HSM
				1,3	15	
				2,6	30	
Takami et al., 2012	<i>Monoraphidium convolutum</i>	Cr(VI) (K ₂ Cr ₂ O ₇)	24 h	0,1	1	WC medium
				1	30	
				5	40	
				10	30	
Hörscsik et al., 2007	<i>Chlorella Pyrenoidosa</i>	Cr(VI) (K ₂ Cr ₂ O ₇)	24 h	10	5	C-30 medium
				20	10	
			8 h	40	25	
				0-40	0	
Machado et al., 2015	<i>P. subcapitata</i>	Cr(VI) (K ₂ Cr ₂ O ₇)	72 h	0-11	0-2	ISO 8692
				41	80	
Perrault et al., 2009	<i>C. reinhardtii</i>	Cr(VI) (K ₂ Cr ₂ O ₇)	24 h	6	0	HSM
				12,5	20	
				0,25	0	
Khalida et al., 2012	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Cr(VI) (K ₂ Cr ₂ O ₇)	24 h	0,5	2	Kessler
				1	10	
				5	14	
			48 h	10	11	
				0,5	2	
				1	25	
Appenroth et al., 2001	<i>Spirodela polyrhiza</i>	Cr(VI) (K ₂ Cr ₂ O ₇)	10 j	5	42	-
				10	50	
Da Costa et al., 2016	<i>C. reinhardtii</i>	Cr(III) (Cr ₂ O ₃)	72 h	17 ^{\$}	33	HSM

\$, cette valeur correspond à la concentration de Cr(III) soluble libérée à partir d'un ajout de 10 g/L de nanoparticules de Cr₂O₃ dans le milieu test.

Pour les concentrations entre 0 et 2,5 mg/L de Cr(III), les analyses nécessaires ont déjà été présentées et discutées au Chapitre III, partie 1. Pour des teneurs en Cr(III) dans la gamme 0 – 100 mg/L, les concentrations filtrées (0,22 µm) dans le milieu du test diminuaient au fil du temps pour des ajouts de Cr(III) entre 0 et 6,25 mg/L (Figure 31-A). Par rapport aux concentrations initiales, la diminution était de 80% après seulement 6 h et dépassait 95% après 24 h. Toutefois, dans des solutions dopées avec 12,5 mg/L de Cr(III), la concentration filtrée montrait une diminution de 38% seulement après 6 h et une tendance à l'augmentation entre 6h et 24 h. De plus, la concentration filtrée du Cr(III) au bout de 24h restait stable dans le milieu dopé avec 25, 50 et 100 mg/L (Figure 31-A). Cette différence de comportement du Cr(III) parmi les concentrations jusqu'à 6,25 mg/L et celles égales ou supérieures à 12,5 mg/L suggère un changement de spéciation du Cr(III) dans le milieu. Puisque le pH peut fortement influencer la solubilité du Cr(III) dans un milieu (Rai et al., 1989), nous avons vérifié les valeurs du pH dans des aliquotes du milieu ISO8692 dopées avec différentes concentrations de Cr(III) à t = 0 et t = 24 heures. Il s'avère que l'ajout du Cr(III) au milieu utilisé pour les tests provoque une diminution du pH pouvant aller, pour une concentration de 100 mg/L de Cr(III), jusqu'à 4 unités par rapport au milieu de contrôle (Tableau 5). Cette diminution de pH explique la stabilité des concentrations filtrées dans des solutions ayant été dopées avec plus de 6,25 mg/L de Cr(III). En effet, les espèces insolubles (hydroxydes et carbonates) du Cr(III) sont dominantes à des pH proches de 7 (Rai et al., 1989). L'acidification du milieu réduit leur importance et les formes dissoutes du Cr(III) (Cr^{3+} et $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$) deviennent dominantes.

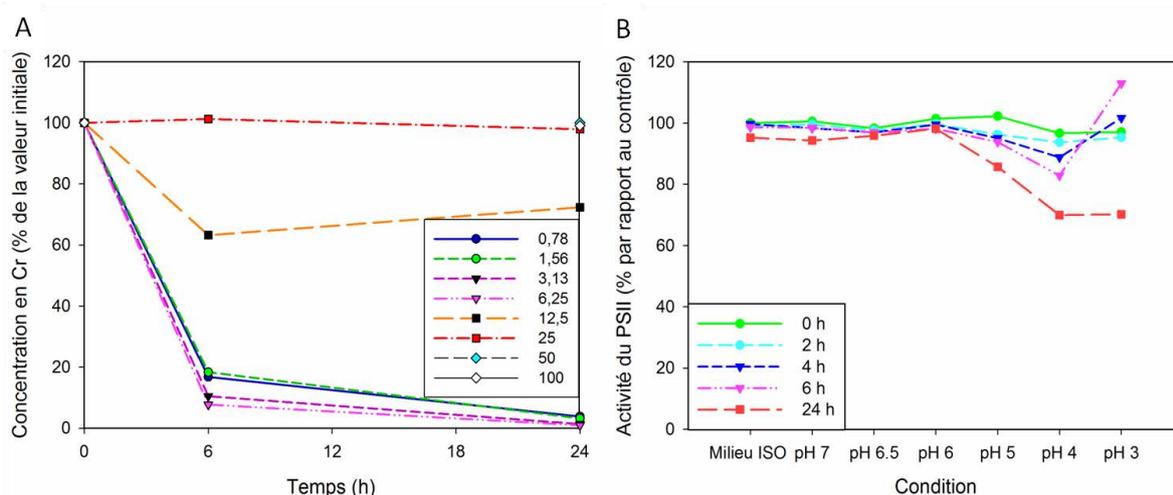


Figure 31 : (A) évolution temporelle de la concentration totale filtrée (0,22 µm) du Cr (quantifiée par SAA) dans le milieu ISO 8692 dopé avec du Cr(III) sur 24 h. (B) Effet du pH sur l'activité photosynthétique de l'algue *P. subcapitata* ; Les valeurs de pH ont été obtenues en ajoutant de l'acide chlorhydrique (30%) au milieu ISO 8692 (valeur initiale du pH = 7,9)

La vérification analytique des concentrations d'exposition (après filtration à 0,22 µm) dans le milieu du test a donc montré que les concentrations du Cr(III) inférieures à 12,5 mg/L diminuent de plus de 90% après 24 h (Figure 31-A et Chapitre III, partie 1), alors que celles du Cr(VI) restent stables. En considérant ces observations, la concentration nominale de 1,25 mg/L de Cr(III) ayant provoqué 42% d'inhibition de l'activité du PSII après 24 h (Figure 29-A) correspond à une concentration réelle (moyenne pondérée) de 0,48 mg/L Cr(III). A cette concentration, l'inhibition engendrée par le Cr(VI) après 24 h ne dépassait pas 10% (Figure 30-A), ce qui indique une plus forte toxicité du Cr(III). De même, la concentration nominale de 2,5 mg/L de Cr(III) correspond aussi à une concentration moyenne d'environ 0,5 mg/L. En revanche, la diminution de la toxicité du Cr(III) entre 1,25 et 2,5 mg/L (concentrations nominales) pourrait être due à des cinétiques différentes de formation d'espèces insolubles (voir Chapitre III, partie 1) et nécessite d'autres études complémentaires.

Tableau 5 : Valeurs du pH dans le milieu ISO 8692 dopé avec différentes concentrations de Cr(III) après 0 et 24 heures.

Concentration en Cr(III) en mg/L	pH à t = 0 h	pH à t = 24 h
0 – 2	7,23 – 7,92	7,51 – 7,87
3,12	7,08	7,15
5	6,69	7,35
6,25	6,5	6,55
10	6,22	6,03
12,5	5,67	4,96
25	5,27	4,96
50	4,24	4,17
100	3,81	3,77

Pour ce qui est de la gamme de concentrations entre 0 et 100 mg/L, une distinction doit être faite entre les concentrations jusqu'à 6,25 mg/L et celles de 12,5 à 100 mg/L. Pour l'intervalle 0–6,25 mg/L, les mêmes considérations illustrées pour la gamme 0–2,5 mg/L s'appliquent. Ainsi, la concentration nominale de 3,12 mg/L de Cr(III) provoquant une inhibition de 40% de l'activité du PSII à 24 heures correspond à une concentration réelle d'environ 0,26 mg/L. A cette concentration, les effets du Cr(VI) sur le PSII ne dépassaient pas 15% d'inhibition. Pour l'intervalle 12,5–100 mg/L, les concentrations filtrées de Cr(III) restaient (relativement pour 12,5 mg/L) stables (Figure 31-A) mais le pH du milieu d'exposition baissait à cause de l'hydrolyse du Cr(III) (Rai et al., 1989; Vignati et al., 2010 et références citées). L'effet du pH sur l'activité du PSII a donc été étudié en incubant les cellules algales dans un milieu ISO

modifié (absence d'éléments traces et de Fe-EDTA ; cette modification n'entraînant aucun effet sur la croissance algale et la performance du PSII à court terme). Afin d'obtenir des solutions avec un pH entre 3 et 7, nous avons ajouté de l'acide chlorhydrique au milieu et ce en absence de Cr. Il s'est avéré que l'activité photosynthétique était affectée à des valeurs de pH inférieures ou égales à 5, plus particulièrement après 24 h d'incubation (Figure 31-B).

Dans le milieu ISO8692, l'ajout du Cr(III) à des concentrations égales ou supérieures à 12,5 mg/L diminue le pH à des valeurs inférieures à 5 unités soit immédiatement, soit après 24 d'incubation (Tableau 5). Il est donc possible que les effets sur le PSII observés sur des algues exposées à des fortes concentrations ($\geq 12,5$ mg/L) soient en partie liés à cette baisse du pH. Cependant, le pourcentage d'inhibition de l'activité du PSII après 24 heures est d'environ 10% pour des cellules incubées à pH 5 et de l'ordre de 25% à pH 4 ou 3 (Figure 31-B), tandis que l'inhibition observée en présence de concentrations de Cr(III) entre 12,5 et 100 mg/L apparaît clairement plus prononcée (Figure 29-B). Ces observations pourraient donc indiquer un effet combiné du Cr(III) et de la baisse de pH. En acceptant cette hypothèse, les effets du Cr(III) aux fortes concentrations ($\geq 12,5$ mg/L) seraient donc inférieurs à ceux du Cr(VI), particulièrement à 12,5 mg/L (concentration réelle — moyenne géométrique — pour le Cr(III) égale à 7,8 mg/L). Pour ce niveau d'exposition, le Cr(III) provoque une inhibition du PSII de seulement 30% alors que l'inhibition provoquée par le Cr(VI) atteint déjà 80% à 6,25 mg/L. Les différences entre les deux formes redox s'estompent à des concentrations supérieures à 25 mg/L.

Dans la deuxième gamme de concentrations, la présence de réponses à des temps relativement plus courts (2 heures pour le Cr(VI) ; 4–6 heures pour le Cr(III)) indique aussi l'induction d'effets précoces par rapport aux réponses observées dans les tests sur l'inhibition de la croissance algale à 72h. Le comportement chimique du Cr et les modifications du pH du milieu demandent encore une fois à être considérés pour interpréter correctement les résultats obtenus. En effet, pour des concentrations initiales égales ou inférieures à 6,25 mg/L, les teneurs en Cr(III) filtré après 6 heures d'incubation chutent de 85% à 99% par rapport aux valeurs initiales (Figure 31). Ceci se traduit par l'absence d'effets à court terme par rapport au Cr(VI) qui induit des effets visibles à partir de 4 heures dans la même gamme de concentrations nominales. De même, pour des concentrations égales ou supérieures à 12,5 mg/L, les réponses des algues exposées au Cr(III) pendant 2 à 6 heures ne sont pas différentes

de celles observées dans le cas des incubations à des faibles valeurs de pH (Figures 29-B et 31), alors que des effets du Cr(VI) sont observables (Figure 30). Au final, les observations à court terme corroborent l'hypothèse que le Cr(VI) est plus toxique que le Cr(III), alors que les résultats après 24 h d'exposition mettent en évidence (pour des concentrations inférieures à 6,25 mg/L) une toxicité plus élevée du Cr(III). Les résultats pour la gamme de concentrations entre 0 et 2,5 mg/L mènent à des conclusions analogues. Les teneurs du Cr dans l'environnement dépassant rarement le mg/L, d'avantage d'études comparatives sur les effets du Cr(III) et Cr(VI) vis-à-vis des mécanismes cellulaires sont nécessaires.

Dans la littérature, seul l'effet du Cr(VI) sur l'activité photosynthétique a été souvent étudié et discuté (Tableau 4). Cette forme est généralement considérée comme la plus toxique puisque elle se retrouve dans l'environnement sous forme de chromates (CrO_4^{2-}) ou dichromates ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). Ces molécules peuvent facilement passer à travers les membranes cellulaires comme un substrat alternatif pour le système de transport de sulfates ou de phosphates (Cervantes et al., 2001; Shanker et al., 2005; Viti et al., 2014). Une fois internalisé dans la cellule, le Cr(VI) est réduit en Cr(III) et exerce une action toxique à travers la formation d'intermédiaires réactifs durant cette réduction. Comme observé dans le cas de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Rodríguez et al., 2007), le Cr(VI) a tendance à générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui peuvent modifier les lipides des thylakoïdes (principalement des acides gras insaturés) ou provoquer la destruction des membranes et des complexes protéiques au niveau des membranes de chloroplastes (Suresh Kumar et al., 2014). De plus, l'inhibition de l'activité photochimique du PSII par le Cr a été principalement associée à une altération de la protéine D1 (Ali et al., 2006; Perreault et al., 2009). Appenroth et al. (2001) ont aussi montré qu'une exposition de la lentille d'eau douce *Spirodela polyrhiza* au Cr(VI) provoquait une réduction du contenu en pigments photosynthétiques (chlorophylle a et caroténoïdes) qui augmentait avec la concentration d'exposition. Da Costa et al. (2016) ont étudié l'effet de nanoparticules de Cr(III) sur l'activité photosynthétique et ont montré une inhibition de 33% de cette activité chez l'algue verte *C. reinhardtii* après 72 h d'exposition à l'équivalent d'une concentration de 17 mg/L de Cr. Ce travail a été la seule étude que nous avons rencontrée dans la littérature, évaluant l'effet du Cr(III) sur l'activité du PSII chez une microalgue.

Les valeurs absolues de la fluorescence maximale F_m et de la fluorescence de base F_0 peuvent nous renseigner d'avantage sur la nature des effets du Cr(III) et Cr(VI) sur l'activité photosynthétique. En effet, Khalida et al, (2012) ont reporté que la variation de la fluorescence de F_0 survient suite à une altération de complexes de pigments et de protéines associées au PSII. Le même travail a souligné que la diminution de la fluorescence maximale F_m peut indiquer une altération du système de transport d'électrons dans le PSII. Dans notre travail, dans le cas du Cr(VI), alors que F_0 reste stable, F_m diminue de façon régulière avec la concentration (Figure 32). Dans le cas du Cr(III), F_0 augmente entre 0 et 3,12 mg/L pour ensuite diminuer entre 3,12 et 25 mg/L, alors que F_m diminue entre 0 et 1,56 mg/L, montre un plateau entre 1,56 et 6,25 mg/L et diminue à nouveau entre 6,25 et 25 mg/L suite aux changements dans la spéciation du Cr. Cette diminution de F_m dans le cas du Cr(VI) et du Cr(III) suggère que le système de transport d'électrons serait la principale cible des deux formes de Cr dans le système photosynthétique de l'algue *P. subcapitata* (Khalida et al., 2012).

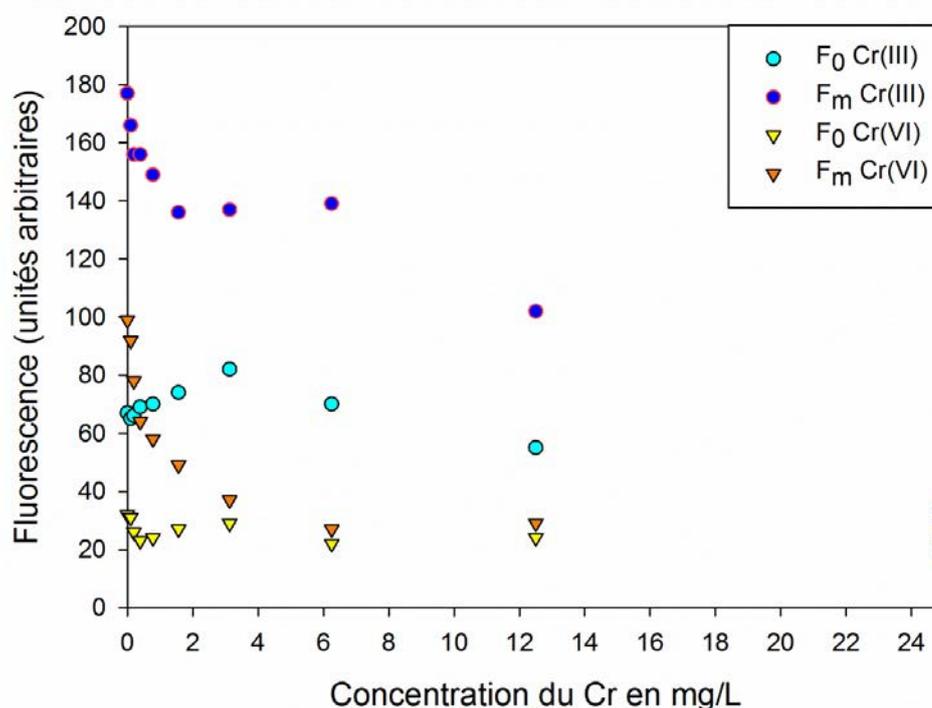


Figure 32 : Effet du Cr(III) et du Cr(VI) sur la fluorescence maximale et minimale chez l'algue verte *P. subcapitata* après 24 heures d'exposition à des concentrations entre 0 et 25 mg/L.

Nos résultats, du moins pour le Cr(VI) pour lequel des données sont disponibles dans la littérature (Tableau 4), confirment l'effet toxique du Cr sur l'activité photosynthétique des algues. En revanche, la comparaison de nos données avec les études résumées dans le tableau 4 montre un effet plus marqué dans le cas de notre étude. En effet, nos résultats montrent un pourcentage d'inhibition dépassant 70% après 24 h à partir d'environ 3 mg/L alors que dans les autres études, pour la même durée d'exposition, l'effet maximal était d'environ 40% chez *Monoraphidium convolutum* à 5 mg/L (Tableau 4). A cette même concentration, seulement 14% d'inhibition de l'activité photosynthétique a été observée chez *Scenedesmus obliquus* après 24 h d'exposition au Cr(VI) (Tableau 4). Ces différences du pourcentage de l'effet pourraient s'expliquer par la différence des conditions expérimentales (espèces algales et milieux d'expositions).

A l'exception de l'étude de Hörsik et al, (2007), les temps d'exposition utilisés pour l'observation des effets du Cr(VI) sur le PSII sont de un ou plusieurs jours, ce qui questionne l'utilisation de l'activité du PSII comme marqueur précoce de l'écotoxicité du Cr(III). Ceci est d'autant plus regrettable dans le cas du Cr(III) pour lequel la spéciation et les concentrations filtrables dans le milieu ISO 8692 évoluent dans des temps de l'ordre de dizaines de minutes pour la première et de quelques heures pour les deuxièmes (Chapitre III, partie 1 et Figure 31). Il est toutefois instructif de comparer les CE_{50} déterminées à 72 heures pour l'inhibition de la croissance algale avec les effets sur PSII à 24 heures. En termes de concentrations nominales, la réponse du PSII à 24 heures est environ 20 fois moins sensible que la croissance algale à 72 h pour les deux formes redox du Cr (Tableau 6). La différence est maintenue même en raisonnant en termes de TWM (applicable seulement au Cr(III)). Cependant, l'appréciation de la sensibilité relative de ces deux réponses biologiques change si l'on considère la différence entre la quantité d'algues introduite dans le milieu de culture à $t = 0$ pour le test chronique de croissance (environ 20,000 cellules/mL) et celle introduite dans le cas des tests de l'activité du PSII (environ 200,000 cellules/mL). Dans ce cas, la quantité de Cr (exprimée en ng de Cr ajoutés par cellule à $t = 0$) responsable des effets observés diffère seulement d'un facteur 2 entre les deux réponses (Tableau 6). En d'autres termes, l'inhibition de l'activité du PSII à 24 h prévoit avec une bonne approximation les effets du Cr(III) et du Cr(VI) sur la croissance de la même algue dès lors que les CE sont exprimées en ng de Cr disponible par cellule au début du test. Une fois de plus, le Cr(III) apparaît donc plus toxique

que le Cr(VI) indépendamment de la réponse biologique choisie, ce qui confirme l'importance de considérer la chimie du Cr(III) dans le milieu d'exposition.

Tableau 6 : Comparaison des résultats des tests d'écotoxicité réalisés sur la croissance et l'activité du PSII de *P. subcapitata*. TWM, time weighted mean concentration selon la norme OCDE 211 (OCDE, 2008). Le nombre de cellules dans la colonne CE₅₀ (ng Cr/cellule) indique la densité initiale au début du test.

	CE ₅₀ (mg/L) (nominale)		CE ₅₀ (mg/L) (TWM)		CE ₅₀ (ng Cr/cellule)	
	Croissance 72h	PSII 24 h *	Croissance 72h	PSII 24 h *	Croissance 72h (20,000 cell/mL)	PSII 24 h (200,000 cell/mL)
Cr(III)	0,060	1,25	0,025	0,48	1,25	2,40
Cr(VI)	0,115	2,50	0,115	2,50	5,75	12,5

* : l'inhibition maximale observée était de 42%.

II. Effets du Cr(III) sur la viabilité, l'intégrité et la fonctionnalité des cellules algales

Les paramètres de base qui sont souvent étudiés par cytométrie de flux chez les algues sont la morphologie (taille cellulaire et granularité) ainsi que l'autofluorescence des pigments intracellulaires. La taille et la granularité sont en corrélation avec deux signaux de diffusion de la lumière laser mesurés par le cytomètre de flux, respectivement FSC (Forward Scatter Signal) et SSC (Side Scatter Signal) (Hyka et al., 2013).

II.1 Dénombrement des cellules et mesure de leur autofluorescence par cytométrie de flux

Les comptages des cellules ont été effectués après 24, 48 et 72 h d'exposition à des concentrations de Cr(III) entre 0 et 2,5 mg/L. Sur la base de la variation du nombre de cellules (Figure 33), une CE₅₀ à 72 h de 0,08 mg/L a été calculée, ce qui corrobore les résultats du test d'écotoxicité basé sur la fluorescence algale déjà décrits au Chapitre III, partie 1. Il sera donc possible de comparer les résultats acquis dans les chapitres précédents avec ceux obtenus par cytométrie de flux.

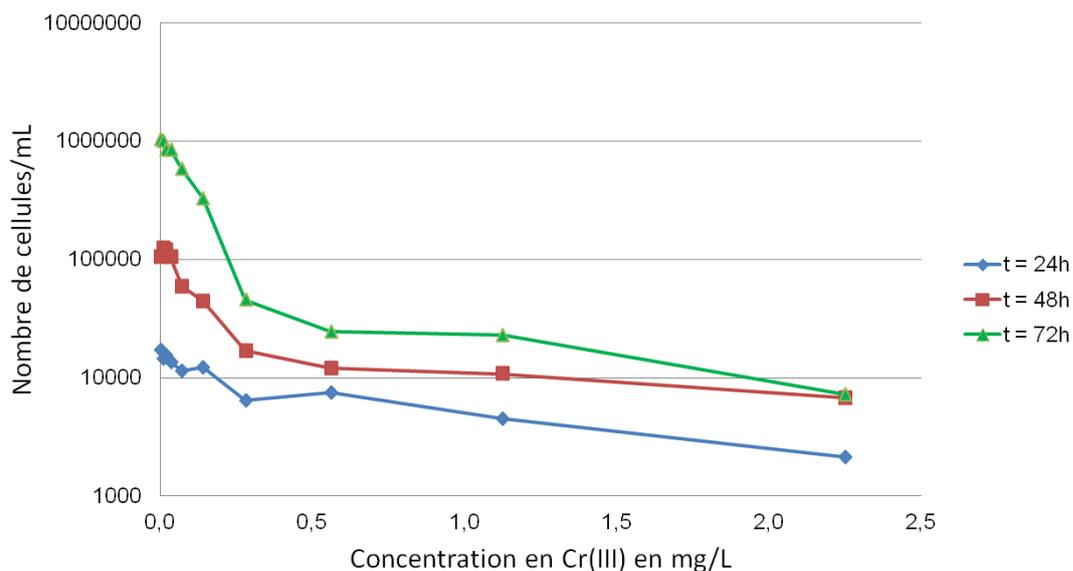


Figure 33 : Densité cellulaire déterminée par cytométrie de flux après exposition pendant 24, 48 et 72 h à différentes concentrations de Cr(III) (représentation semi-logarithmique). La densité initiale des algues était de 20000 cellules/mL.

Dans un autre test, l'autofluorescence des cellules algales a été mesurée après 72 h d'exposition à des concentrations de Cr(III) entre 0 et 1,25 mg/L. La mesure de l'autofluorescence est liée à la présence de chlorophylle et, dans le cas de notre instrumentation (chapitre II, section III.7.2), est détectée par le signal du canal d'acquisition FL3-A ($\lambda \geq 670$ nm). La mesure des cellules non exposées au Cr définit les valeurs d'autofluorescence typique de cellules intactes et vivantes (région P2 de la figure 34-A). Pour les cellules exposées au Cr, les résultats sont ensuite exprimés en pourcentage du signal mesuré dans la région P2 de la figure 34-A. Une diminution de 20% du signal (nombre de cellules dans la région P2 en figure 34) est observée chez les cellules exposées au Cr(III) à partir de 0,156 mg/L de Cr. Cette baisse devient plus importante avec l'augmentation de la concentration d'exposition et atteint 45% à la concentration nominale de 1,25 mg/L de Cr(III) (figure 34). Aux faibles concentrations en Cr(III) (inférieures à 0,039 mg/L en concentration nominale), le nombre de cellules en région P2 est supérieur à celui présent dans le contrôle (absence de Cr). Cela peut être dû soit à une faible croissance de cellules dans le contrôle, soit à un effet d'hormèse du Cr(III) sur les algues. Cet effet a déjà été reporté dans d'autres études écotoxicologiques pour différents contaminants (Calabrese and Baldwin, 2003) et pourra faire l'objet d'approfondissements dans d'autres études. La discussion de résultats de cette expérience n'est pas remise en question par cette situation.

Puisque le nombre total de particules comptées par le cytomètre diminue en même temps que le nombre de cellules intactes (Figure 34-B), il est possible de conclure que le Cr(III) bloque progressivement la prolifération algale en déterminant ainsi des effets au niveau populationnel. La diminution de particules dans la région P2 est aussi accompagnée d'une faible augmentation du nombre de particules hors de la région P2 (Figure 34-A). Celles-ci peuvent correspondre à des cellules dont le fonctionnement pourrait être affecté puisqu'elles ont la même taille que les cellules dans la région P2 (Figure 34-A, signal FSC). Des mesures du nombre de particules donnant un signal sur le canal FL3-A dans le milieu d'exposition dopé avec du Cr(III) en absence d'algues n'ont pas montré d'apparition ou d'augmentation du nombre de particules, et cela même aux plus fortes concentrations testées (0,62 et 1,25 mg/L de Cr(III)). Cette observation corrobore l'hypothèse que les particules observées hors de la région P2 (Figure 34-A) seraient des cellules dont le bon fonctionnement pourrait être affecté et non les particules de Cr(III) observables dans le milieu ISO8692 par d'autres techniques (Chapitre III, section 1). Il est donc possible de conclure que le Cr(III) exercerait un effet algicide sur *P. subcapitata*.

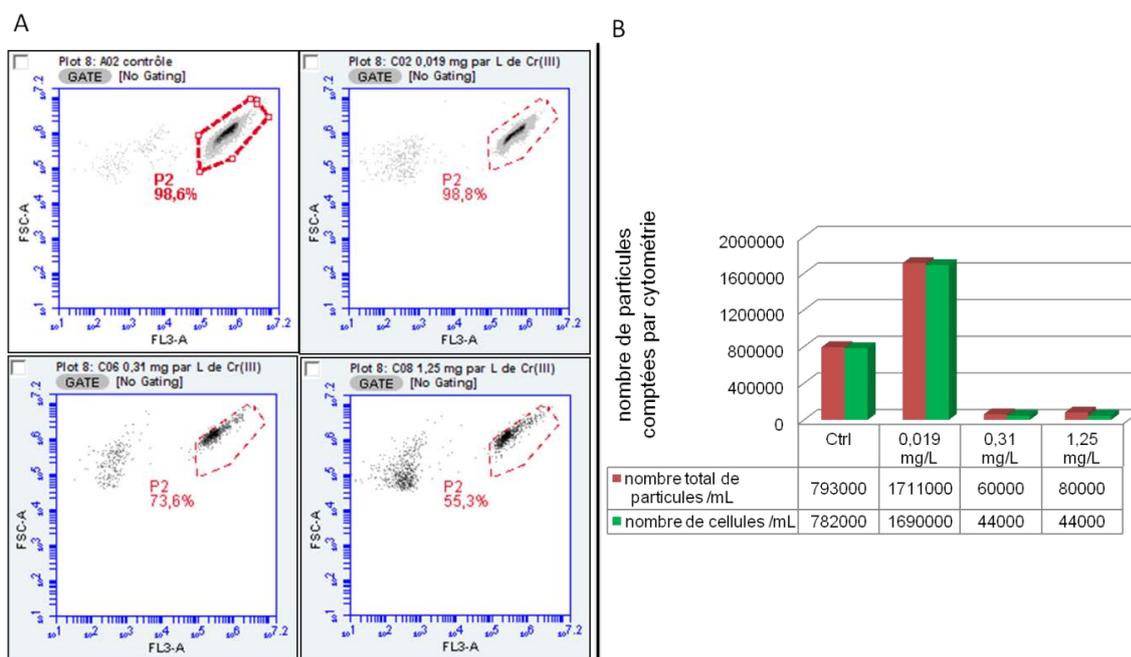


Figure 34 : (A) mise en évidence de l'effet algicide du Cr(III) sur *P. Subcapitata*. Les résultats obtenus au cytomètre de flux représentant l'autofluorescence des cultures algales exposées pendant 72 h à différentes concentrations entre 0 et 1,25 mg/L de Cr(III). Les cellules fluorescentes donnent un signal sur l'axe des abscisses (FL-3). (B) représentation graphique du nombre total de particules (rouge) et du nombre de particules considérées comme des cellules intactes (vert) comptées à des concentrations variables en Cr(III).

II.2 Test de viabilité cellulaire

Le comptage cellulaire par cytométrie en flux a permis de mettre en évidence un effet du Cr(III) sur la densité cellulaire. De plus, les mesures d'autofluorescence ont permis de différencier les cellules d'algues (vivantes et mortes) des autres particules sur la base de la fluorescence de la chlorophylle a (Franklin et al., 2001). Différents marqueurs de viabilité cellulaire peuvent être utilisés en cytométrie de flux pour évaluer de façon plus approfondie l'écotoxicité de contaminants (Franqueira et al., 2000). Ainsi, un marquage au Sytox Green permet de distinguer les cellules contenant des pigments chlorophylliens mais mortes (perméables au marqueur) des cellules vivantes (imperméables au marqueur) (Machado et al., 2012). Nous avons donc d'abord optimisé le test de détermination de la viabilité cellulaire algale par cytométrie en flux en exploitant à la fois la fluorescence de la chlorophylle a et celle du Sytox Green. Ainsi, après marquage d'un échantillon de la culture algale au Sytox Green et observation au microscope à fluorescence, la majorité des cellules fluoresce en rouge, du fait de la présence de chlorophylle a dans la population de cellules. De plus, l'analyse de ces mêmes cellules vivantes par cytométrie de flux en utilisant le canal FL1-A (longueur d'onde 500–560 nm), permettant de détecter la fluorescence du Sytox Green (i.e. des cellules mortes seulement), a permis d'identifier et définir la région correspondant aux cellules vivantes. Ensuite, pour obtenir un échantillon de type témoin positif (i.e. cellules mortes) vis-à-vis du marquage en présence de Sytox Green, un traitement au peroxyde d'hydrogène a été réalisé et la région correspondant au signal des cellules mortes a été définie. Une fois les deux régions Q1-LR (cellules vivantes) et Q1-UR (cellules mortes) identifiées, il a été possible d'étudier les effets du Cr(III) sur la viabilité cellulaire.

Après exposition des algues à 0,06 mg/L de Cr(III) (correspondant à la CE_{50} dans le test de croissance ; Chapitre III, partie 1) pendant 72 h, la moitié des cellules (53,4% et 54,9% de la population totale) étaient identifiables comme mortes (Figure 35). Cette expérience montre donc que le Cr(III) a un effet algicide et corrobore les résultats d'inhibition de la fluorescence et les résultats de l'autofluorescence (Chapitre III, partie 1 ; partie 3, section I.2.1).

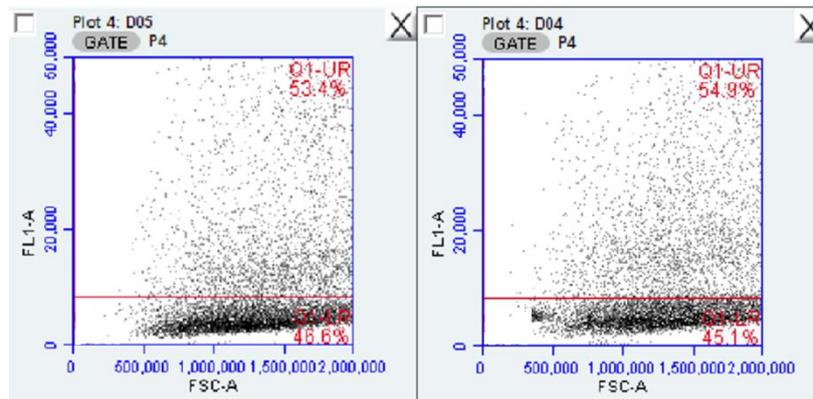


Figure 35 : Détermination de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux avec marquage au Sytox Green après exposition au Cr(III) (0,06 mg/L pendant 72 h). Les cellules mortes donnent un signal plus fort (fluorescence du Sytox Green) sur l'axe vertical et se trouvent dans la région Q1-UR, alors que les cellules vivantes se trouvent dans la région Q1-LR.

II.3 Effets du Cr sur l'activité estérase chez *P. subcapitata*

De manière complémentaire aux essais précédents, nous avons évalué l'effet du Cr(III) sur l'activité estérase, renseignant sur l'activité enzymatique cellulaire (Hyka et al., 2013). Pour cela, nous avons utilisé le Diacétate de Fluorescéine (FDA) comme marqueur biologique de cette activité chez l'algue *P. subcapitata* exposée pendant 72 h à des concentrations de Cr(III) entre 0 et 1,25 mg/L. Après avoir pénétré dans les cellules, le FDA est hydrolysé par des estérases en fluorescéine (détection de la fluorescence à 500–560 nm) et, étant hydrophile, est retenu seulement par les cellules viables (Hyka et al., 2013; Stauber et al., 2002). Après marquage avec le FDA, les cellules fonctionnelles, ayant une activité enzymatique normale et ne présentant pas d'altération de leur intégrité membranaire, donneront un signal sur le canal FL1-A (500–560 nm) dans la région V1-R (Figure 36). Pour des concentrations de Cr(III) ajoutées entre 0 (contrôle) et 0,039 mg/L, la proportion de cellules fonctionnelles vis-à-vis de leur activité estérasique et dont la membrane conserve son intégrité (cellules vivantes) dépasse 95% du totale des cellules dans la suspension (Figure 36). En revanche, la proportion de cellules fonctionnelles diminue rapidement à partir de 0,078 mg/L de Cr(III) (Figure 36, région V1-R). De plus, le nombre total de cellules diminue fortement par rapport au contrôle à partir de 0,078 mg/L de Cr(III) avec l'augmentation de la concentration en Cr(III) (Figure 37), en bon accord avec les résultats de détermination de la CE_{50} (Chapitre 3, partie 1). La plupart de particules (cellules) observables à des concentrations égales ou supérieures à 0,156 mg/L de Cr(III) pouvait être classée comme cellules dont l'intégrité et/ou la fonctionnalité sont/est perturbée(s) (Figure 37). Un effet d'hormèse a été également observé dans le cas de ce

marquage, avec un nombre de cellules plus élevé après exposition à 0,01 et 0,019 mg/L de Cr(III) par rapport au contrôle. Cela ne remet pas en cause les effets observés sur la fonctionnalité cellulaire.

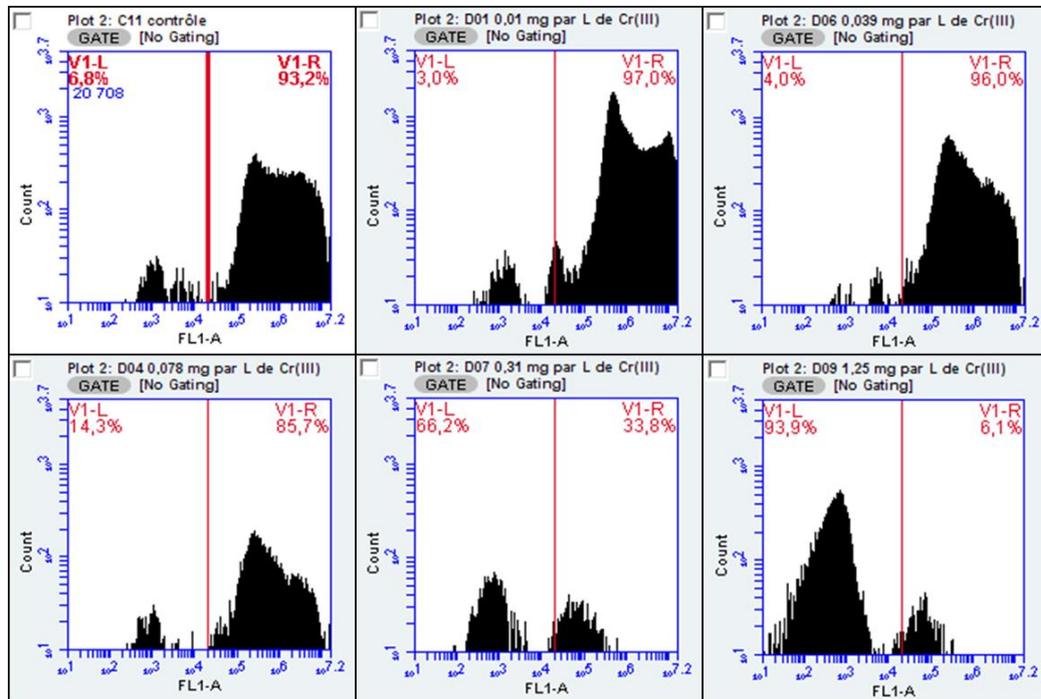


Figure 36 : Visualisation de l'activité estérase des cellules de *P. subcapitata* par cytométrie en flux en présence de Cr(III). La fluorescence de la fluorescéine (Fluorescence FL1) issue de l'activité des estérases intracellulaires vis-à-vis de la FDA a été mesurée chez *P. subcapitata* après exposition pendant 72 h à différentes concentrations entre 0 et 1,25 mg/L. Dans les graphiques, les valeurs de fluorescence se situent dans la région V1-R en absence d'effets écotoxiques et dans la région V1-L en présence d'effets écotoxiques.

Nous n'avons trouvé aucune étude évaluant l'effet du Cr(III) sur l'activité estérase et une seule étude examinant l'effet du Cr(VI) sur l'activité estérase chez *P. subcapitata* (Labra et al., 2007). Cette étude a montré une diminution de l'activité estérase par rapport aux contrôles d'environ 70 et 80% après exposition pendant 72 h à 1,75 et 2,62 mg/L de Cr(VI), respectivement. Toutefois, Labra et al, (2007) ont aussi observé une diminution d'environ 40% de la fluorescence du FDA dans le contrôle après 72 h d'exposition, ce qui a été expliqué par un éventuel efflux du FDA par les cellules. Une étude montrant un effet du Cr sur l'activité estérase a par ailleurs été réalisée chez des rotifères (Pérez-Legaspi et al., 2002), mais sans spécification de la forme redox du Cr utilisée. Dans cette étude, une inhibition de 50% de l'activité estérase a été produite après 15 minutes d'exposition à 1,18 mg/L de Cr chez *Lecane luna* et après 15 minutes d'exposition à 1,65 mg/L de Cr chez *Lecane quadridentata* (Pérez-Legaspi et al., 2002).

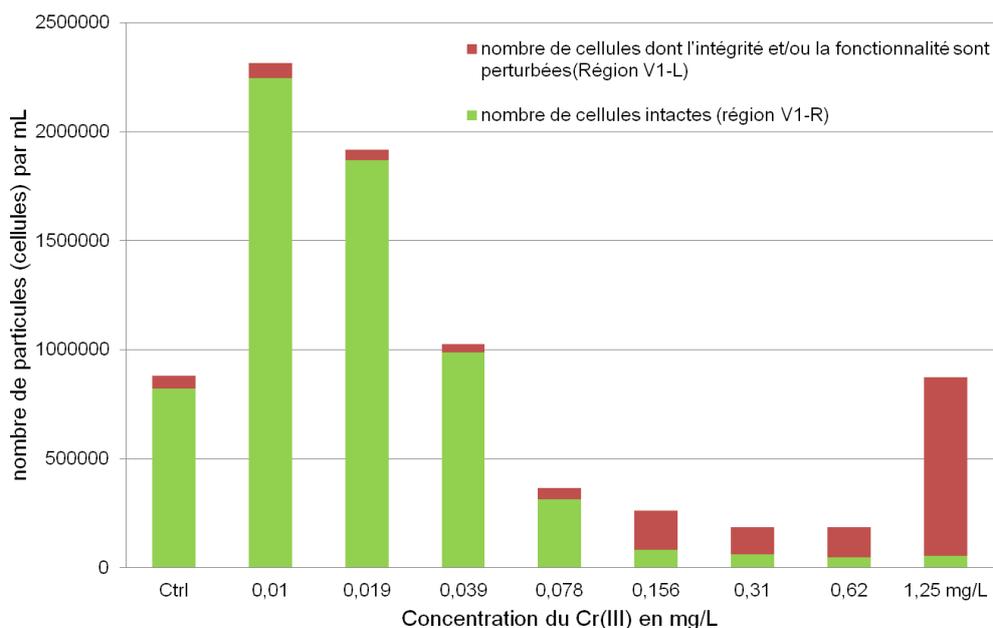


Figure 37 : Variation du nombre total de cellules intactes (barres vertes, correspondant à la région V1-R de la figure 36) et de cellules dont l'intégrité et/ou la fonctionnalité sont/est perturbée(s) (barres rouges, correspondant à la région V1-L de la figure 36) déterminée au cytomètre de flux pour des concentrations d'exposition entre 0 et 1,25 mg/L de Cr(III).

III. Génotoxicité du Cr(III) et Cr(VI)

III.1 Optimisation du test des comètes

Compte-tenu du protocole retenu (Chapitre 2, section III.7.3), trois étapes ont nécessité des études d'optimisation pour l'application du test des comètes à l'algue verte *P. subcapitata* : le choix de la densité cellulaire optimale pour l'observation de noyaux, la préparation des lames et le protocole de lyse cellulaire.

La densité cellulaire optimale est de 2×10^5 cellules/mL ce qui permet l'obtention d'un nombre suffisant de noyaux sans pour autant générer des interférences pendant la phase de migration sur gel. L'utilisation de deux gels différents pour la préparation de lames (MPA – Melting Point Agarose et LMPA – Low Melting Point Agarose) a permis de choisir un gel LMPA à 2% (Tableau 7 et Figure 38). L'utilisation d'une couche d'agarose LMPA à 0,5% (telle que spécifié dans les travaux de Singh et al., 1988) rend extrêmement difficile la solidification du gel si bien que la majorité des cellules se détache du gel même si la lyse (pendant une nuit) est effective avec le peu de cellules qui reste sur la lame.

Tableau 7 : Observations effectuées après migration des noyaux dans le gel MPA et LMPA à différentes concentrations (0 – 2%)

Concentration en tampon (%)	Observations	
	MPA	LMPA
0,5	Explosion des noyaux	Détachement des cellules
1	Faible diffusion de l'ADN	Les noyaux ont diffusé et migré
1,5	Gel trop épais et opaque	Meilleure diffusion des noyaux
2	Gel trop épais et opaque	Très bonne migration des noyaux

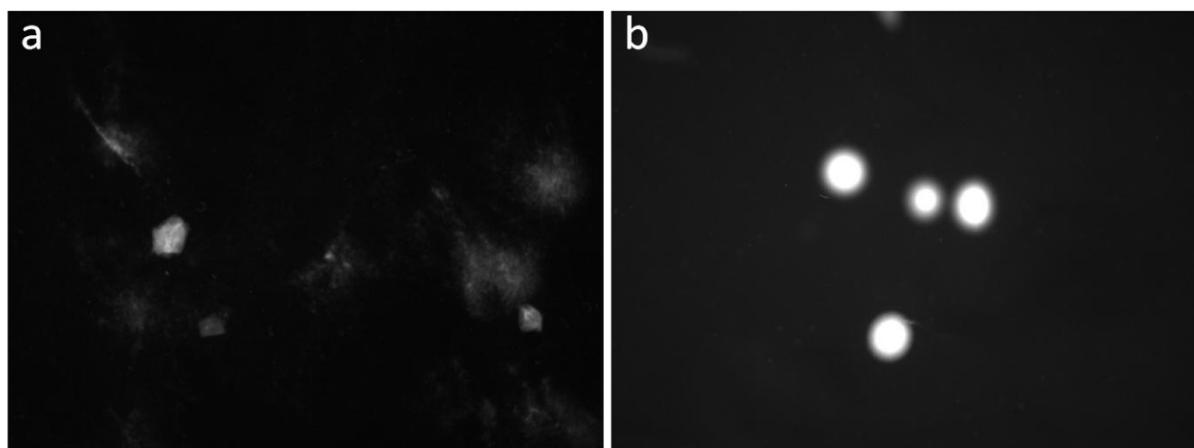


Figure 38 : Photographies prises au microscope à fluorescence (x 40) après migration des noyaux dans un gel MPA à 2% (a) et dans un gel LMPA à 2% (b).

Pour l'étape de lyse des parois des algues, qui s'est avérée particulièrement difficile à réaliser, trois méthodes ont été testées : l'utilisation d'un tampon de lyse SDS (sodium dodecyl sulfate), la sonication, et l'exposition des cellules à des pressions élevées (de l'ordre du kilobar) à l'aide d'une presse de French. L'efficacité de la lyse de cellules algales au moyen d'une solution contenant du SDS a été étudiée à trois temps : 30 minutes, une heure et une nuit. La majorité des cellules algales maintenait leur forme en croissant pour des temps de lyse de 30 minutes et 1 heure, ce dernier temps étant recommandé par Singh et al, (1988). L'augmentation de la durée de lyse jusqu'à une nuit s'est avérée inefficace car la majorité des cellules possédait toujours leur paroi lors de l'observation microscopique. La rupture de la paroi algale n'ayant pas pu être réalisée, il a donc été impossible d'obtenir des noyaux qui puissent migrer par électrophorèse. Les deux autres méthodes de lyse (sonication pendant 10 ou 20 minutes, passage d'une suspension algale à la presse de French) n'ont permis de lyser qu'un nombre très limité de cellules.

Cette difficulté de lyse de la paroi cellulaire de *P. subcapitata* a été rencontrée dans d'autres études (Crémazy et al., 2013; Lavoie et al., 2009). A titre d'exemple, Lavoie et al. (2009) ont testé plusieurs méthodes pour leur efficacité de lyse des cellules algales de *P. subcapitata* et *C. reinhardtii*. Leurs résultats ont montré que l'utilisation d'un agitateur vortex pendant 6 minutes pour la lyse des algues en présence de billes en zircone (0,5 mm de diamètre) permettait une lyse de toutes les cellules de *C. reinhardtii* mais seulement d'environ 18% des cellules de *P. subcapitata*. Cette étude a montré également que l'utilisation d'un homogénéisateur (Rotor-stator) pendant 30 min à 24.000 rpm était inefficace et lysait moins d'1% des cellules algales. Lavoie et al. (2009) ont aussi trouvé que la sonication était relativement inefficace vis-à-vis de *P. subcapitata* avec seulement environ 25% de cellules lysées après 4 min de sonication à 22 W et 0,2 s/s comme fréquence de pulsations. Dans les mêmes conditions, 98% des cellules algales de *C. reinhardtii* étaient lysées. Les difficultés de la lyse résident dans les caractéristiques morphologiques et biochimiques de la paroi de *P. subcapitata* qui consiste en plusieurs types de glycoprotéines spécifiquement structurées (Roberts, 1974; Roberts et al., 1985).

Suite à l'inefficacité des méthodes de lyse cellulaire utilisées et sachant que la lyse de la majorité des cellules est l'un des critères de validité du test des comètes (Cotelle and Férard, 1999; Fairbairn et al., 1995), il n'a pas été possible d'étudier et de comparer les effets génotoxiques du Cr(III) et du Cr(VI) chez *P. subcapitata* à l'aide de ce test. Toutefois, en utilisant une technique appelée polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP), Labra et al. (2007) ont montré que le Cr(VI) provoque des mutations génétiques chez *P. subcapitata* à partir d'une concentration testée de 0,35 µg de Cr(VI) par g de milieu de culture Bristol (milieu utilisé dans l'étude).

Plusieurs chercheurs ont aussi montré que le Cr(VI) et le Cr(III) peuvent être génotoxiques pour plusieurs modèles et organismes biologiques, principalement des cultures cellulaires, des plantes ou des bactéries. Blasiak and Kowalik, (2000) ont comparé les effets du Cr(III) et du Cr(VI) sur l'ADN de lymphocytes humains en utilisant le test des comètes. Leurs résultats ont montré que le Cr(VI) et le Cr(III) induisent des dommages à l'ADN en fonction de la concentration d'exposition, avec des effets plus importants dans le cas du Cr(III) à des concentrations supérieures à 500 µM. Dans une autre étude réalisée par Plaper et al, (2002), une fragmentation d'ADN a été observée chez des cellules bactériennes d'*Escherichia coli* exposées à 15–20 µM de Cr(III). Chez les plantes, le Cr(VI) est décrit comme un agent

génétoxique pouvant induire différents dommages à l'ADN (Bal and Kasprzak, 2002; Knasmüller et al., 1998). De Flora et al, (1990) ont compilé environ 700 travaux réalisés avec 32 composés de Cr sur différents modèles biologiques et via différents tests. La majorité des résultats ont montré une génotoxicité dans le cas du Cr(VI), alors que le Cr(III) n'induisait pas d'effets génotoxiques dans la plupart des études réalisées sur des cellules intactes. Ce même constat a été effectué dans une autre étude (Bianchi and Levis, 1988). En revanche nous n'avons rencontré aucune étude ayant réalisé un test des comètes chez l'algue verte *P. subcapitata* ni d'étude comparatif sur la génotoxicité du Cr(III) et du Cr(VI) pour ce modèle biologique. Les résultats méthodologiques détaillés dans cette section montrent que l'applicabilité de ce test pour *P. subcapitata* repose sur le développement d'un protocole de lyse efficace qui reste à établir.

Références bibliographiques

- Ali, N.A., Dewez, D., Didur, O., Popovic, R., 2006. Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex. *Photosynth. Res.* 89, 81–87. doi:10.1007/s11120-006-9085-5
- Appenroth, K.J., Stöckel, J., Srivastava, A., Strasser, R.J., 2001. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 115, 49–64.
- Bal, W., Kasprzak, K.S., 2002. Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. *Toxicol. Lett.* 127, 55–62. doi:10.1016/S0378-4274(01)00483-0
- Bianchi, V., Levis, A.G., 1988. Review of genetic effects and mechanisms of action of chromium compounds. *Sci. Total Environ.* 71, 351–355.
- Blasiak, J., Kowalik, J., 2000. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutat. Res.* 469, 135–145.
- Calabrese, E.J., Baldwin, and L.A., 2003. Hormesis: The Dose-Response Revolution. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 175–197. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140223
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J.C., Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 335–347. doi:10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x
- Cotelle, S., Féraud, J.F., 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ. Mol. Mutagen.* 34, 246–255.
- Crémazy, A., Levy, J.L., Campbell, P.G.C., Fortin, C., 2013. Uptake and subcellular partitioning of trivalent metals in a green alga: comparison between Al and Sc. *BioMetals* 26, 989–1001. doi:10.1007/s10534-013-9675-6
- Da Costa, C.H. da, Perreault, F., Oukarroum, A., Melegari, S.P., Popovic, R., Matias, W.G., 2016. Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Total Environ.* 565, 951–960. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.028
- De Flora, S., Bagnasco, M., Serra, D., Zanacchi, P., 1990. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* 238, 99–172. doi:10.1016/0165-1110(90)90007-X
- Didur, O., Dewez, D., Popovic, R., 2013. Alteration of chromium effect on photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures under different synchronized state of the cell cycle. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 1870–1875. doi:10.1007/s11356-012-1389-8
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* 339, 37–59. doi:10.1016/0165-1110(94)00013-3
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P., 2001. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 160–170. doi:10.1002/etc.5620200118
- Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C., Cid, A., 2000. Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Sci. Total Environ.* 247, 119–126. doi:10.1016/S0048-9697(99)00483-0

- Genty, B., Harbinson, J., Briantais, J.-M., Baker, N.R., 1990. The relationship between non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem 2 photochemistry in leaves. *Photosynth. Res.* 25, 249–257. doi:10.1007/BF00033166
- Hörcešik, Z.T., Kovács, L., Láposi, R., Mészáros, I., Lakatos, G., Garab, G., 2007. Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*. *Photosynthetica* 45, 65–69. doi:10.1007/s11099-007-0010-8
- Hyka, P., Lickova, S., Přibyl, P., Melzoch, K., Kovar, K., 2013. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnol. Adv.*, Prague Symposium 2011 31, 2–16. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.04.007
- Khalida, Z., Youcef, A., Boutiba Zitouni, Mohammed, Z., Radovan, P., 2012. Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the effect of chromium on activity photosystem II at the alga *Scenedesmus obliquus*. *Int. J. Res. Rev. Appl. Sci.* 12.
- Knasmüller, S., Gottmann, E., Steinkellner, H., Fomin, A., Pickl, C., Paschke, A., Göd, R., Kundi, M., 1998. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat. Res.* 420, 37–48.
- Labra, M., Bernasconi, M., Grassi, F., De Mattia, F., Sgorbati, S., Airoidi, R., Citterio, S., 2007. Toxic and genotoxic effects of potassium dichromate in *Pseudokirchneriella subcapitata* detected by microscopy and AFLP marker analysis. *Aquat. Bot.* 86, 229–235. doi:10.1016/j.aquabot.2006.10.006
- Lavoie, M., Bernier, J., Fortin, C., Campbell, P.G.C., 2009. Cell homogenization and subcellular fractionation in two phytoplanktonic algae: implications for the assessment of metal subcellular distributions. *Limnol. Oceanogr. Methods* 7, 277–286. doi:10.4319/lom.2009.7.277
- Machado, M.D., Lopes, A.R., Soares, E.V., 2015. Responses of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* to long-term exposure to metal stress. *J. Hazard. Mater.* 296, 82–92. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.04.022
- Pérez-Legaspi, I.A., Rico-Martínez, R., Pineda-Rosas, A., 2002. Toxicity testing using esterase inhibition as a biomarker in three species of the genus *Lecane* (Rotifera). *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 776–782. doi:10.1002/etc.5620210413
- Perreault, F., Ait Ali, N., Saison, C., Popovic, R., Juneau, P., 2009. Dichromate effect on energy dissipation of photosystem II and photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Photochem. Photobiol. B* 96, 24–29. doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.03.011
- Plaper, A., Jenko-Brinovec, S., Premzl, A., Kos, J., Raspor, P., 2002. Genotoxicity of trivalent chromium in bacterial cells. Possible effects on DNA topology. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 943–949.
- Rai, D., Eary, L.E., Zachara, J.M., 1989. Environmental chemistry of chromium. *Sci. Total Environ.*, The Chromium Paradox in Modern Life 86, 15–23. doi:10.1016/0048-9697(89)90189-7
- Roberts, K., 1974. Crystalline Glycoprotein Cell Walls of Algae: Their Structure, Composition and Assembly. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 268, 129–146. doi:10.1098/rstb.1974.0021
- Roberts, K., Grief, C., Hills, G.J., Shaw, P.J., 1985. Cell Wall Glycoproteins: Structure and Function. *J Cell Sci* 1985, 105–127. doi:10.1242/jcs.1985.Supplement_2.6
- Rodríguez, M.C., Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Conforti, V., Gualtieri, P., 2007. Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Res.* 105, 234–239. doi:10.1016/j.envres.2007.01.011

- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S., 2005. Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31, 739–753. doi:10.1016/j.envint.2005.02.003
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0
- Stauber, J.L., Franklin, N.M., Adams, M.S., 2002. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends Biotechnol.* 20, 141–143. doi:10.1016/S0167-7799(01)01924-2
- Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Lee, J.-S., Kim, H.C., Lee, W.C., Shin, K.-H., 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 51–71. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.01.042
- Takami, R., Almeida, J.V., Vardaris, C.V., Colepicolo, P., Barros, M.P., 2012. The interplay between thiol-compounds against chromium (VI) in the freshwater green alga *Monoraphidium convolutum*: Toxicology, photosynthesis, and oxidative stress at a glance. *Aquat. Toxicol.* 118–119, 80–87. doi:10.1016/j.aquatox.2012.03.018
- Vignati, D.A.L., Dominik, J., Beye, M.L., Pettine, M., Ferrari, B.J.D., 2010. Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: A paradigm to revise? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 743–749. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.01.011
- Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., Giovannetti, L., 2014. Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 633–659. doi:10.1111/1574-6976.12051

Partie 3

Internalisation et répartition subcellulaire du chrome

L'étude présentée dans cette partie a été réalisée dans le cadre d'un séjour d'environ 4 mois à l'INRS (Quebec, Canada) en collaboration avec M Claude FORTIN et avec le soutien financier du programme 'Investissement d'avenir' de l'ANR (*ANR-10-LABX-21-01 / LABEX RESSOURCES21; action 67, porteur M. VIGNATI Davide*). Le projet avait pour objectif de vérifier si les différences entre l'écotoxicité du Cr(III) et du Cr(VI) vis-à-vis des algues peuvent être expliquées par des différences de flux l'internalisation et/ou de distribution intracellulaire.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet de la rédaction de deux publications scientifiques. La première publication, qui est en cours de préparation, compare l'internalisation du Cr(III) et Cr(VI) chez l'algue verte *C. reinhardtii*. La deuxième publication aborde l'accumulation et la répartition subcellulaire du Cr(III) et Cr(VI) chez *C. reinhardtii*, et est parue dans le journal *Aquatic toxicology* (volume 182, pages 49–57).

Internalisation et répartition subcellulaire du Cr(III) et Cr(VI) chez *C. reinhardtii*

Contexte

L'écotoxicité des éléments traces métalliques vis-à-vis des organismes vivant dépend de plusieurs paramètres tels que la biodisponibilité, la toxicocinétique ou la toxicodynamique. Ces paramètres contrôlent les interactions parmi les éléments traces et les organismes et ils dépendent principalement de la forme chimique sous laquelle l'ETM est présent dans l'environnement plutôt que de sa concentration totale. Le chrome est un bon exemple permettant de voir comment la spéciation affecte le comportement et la toxicité d'un ETM. En effet, dans les eaux de surface, le chrome se trouve principalement sous deux états d'oxydation, le Cr(III) et le Cr(VI). Ces deux formes diffèrent en termes de mobilité et biodisponibilité. Le Cr(III) est relativement immobile, peu soluble et généralement considéré peu toxique comparé au Cr(VI) qui est très mobile, très soluble et plus biodisponible. Ces propriétés différentes contrôlent la réactivité biochimique de ces deux espèces de Cr (Dhal et al., 2013; Markiewicz et al., 2015). Alors que le Cr(VI) traverse les membranes cellulaires via les voies d'internalisation des sulfates et des phosphates (Viti et al., 2014a), les mécanismes d'internalisation du Cr(III) sont peu connus. Dans le but d'améliorer la compréhension des interactions du Cr avec les organismes vivants nous avons voulu :

Vérifier si la différence d'écotoxicité du Cr(III) et Cr(VI) pourrait s'expliquer par une différence de leurs flux d'internalisation,

Etudier l'effet du pH et de la concentration sur l'internalisation du Cr(III) et Cr(VI) par les algues,

Comparer l'accumulation intracellulaire du Cr(III) et Cr(VI) chez les algues,

Comparer la distribution intracellulaire des deux formes de Cr.

Méthodes

Les taux d'internalisation du Cr(III) et Cr(VI) ont été déterminés en utilisant des cultures de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* exposées pendant une heure à l'isotope radioactif du chrome (^{51}Cr) sous les deux formes redox. Ces expériences ont été réalisées à des pH entre 5 et 7. A chaque pH, le taux d'internalisation a été mesuré à cinq concentrations

d'exposition comprise entre 1 nM et 10 μ M de Cr. La spéciation du Cr dans les milieux d'exposition a été calculée en utilisant le logiciel MINEQL+ (version 4.6). La distribution intracellulaire du Cr(III) et du Cr(VI) a été aussi déterminée chez des cellules algales exposées pendant 1 ou 72 h à l'une des deux formes de Cr en utilisant un protocole d'homogénéisation couplée à une approche de centrifugation différentielle.

Principaux résultats

L'internalisation du Cr(III) et du Cr(VI) était linéaire entre 0 et 60 minutes indiquant un flux d'internalisation constant et l'absence d'efflux du Cr à partir des cellules. De plus, l'adsorption du Cr(III) et du Cr(VI) sur les cellules était très rapide (< 5 minutes) et, de façon générale, leurs flux d'internalisation augmentaient avec la concentration d'exposition. Un effet du pH était observé principalement sur l'internalisation du Cr(III). Le Cr(III) et le Cr(VI) étaient accumulés de façon similaire après 1 h et 72 h d'exposition à 100 nM du Cr(III) ou de Cr(VI) chez *C. reinhardtii*. Toutefois, la fraction extracellulaire constituait la majeure partie du Cr accumulé après 1 h d'exposition tandis que la plupart du Cr se trouvait dans la fraction intracellulaire après une exposition de 72 h. De plus, ces deux formes redox du Cr avaient une même distribution à l'intérieur des cellules et s'associaient principalement aux organites et à des protéines et peptides cytosoliques thermiquement stables (fraction HSP).

Publication 2

1

Uptake of Cr^{III} and Cr^{VI} by the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Imad Aharchaou^a, Fengjie Liu^b, Eric Battaglia^a, Davide A.L Vignati^a and Claude Fortin^{b,*}

^aLaboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, UMR 7360,

Université de Lorraine and CNRS, 8 rue du Général Delestraint, 57070 Metz,
France

^bInstitut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement
(INRS-ETE), 490 rue de la Couronne, Québec (Québec), Canada G1K 9A9

Tel/Fax: + 1 418 654 3770 / + 1 418 654 2600

*Corresponding author: claud.fortin@ete.inrs.ca

1

2 **Introduction**

3 Biological effects of trace elements depend on their bioaccessibility (the likelihood to
4 get in contact with biota), bioavailability (the actual adsorption/absorption by biota)
5 and biological availability, comprising toxicodynamics and toxicokinetics (Semple et
6 al, 2004; Rainbow, 2002). In the specific case of Cr, bioaccessibility and
7 bioavailability in aquatic environments are largely controlled by the existence of two
8 redox forms (namely Cr^{VI} and Cr^{III}) which are used in different industrial activities
9 (e.g., Cr^{VI} in electroplating and Cr^{III} in leather tanning) and have contrasting
10 biogeochemical behavior. In particular, Cr^{VI} usually occurs as anionic species (mainly
11 chromate ions) which therefore interact little with negatively charged environmental
12 particles, resulting in high mobility, and are strongly bioavailable because of their
13 structural similarities with sulfate ions and uptake (Viti et al., 2014). Conversely, Cr^{III}
14 has a strong tendency to associate with environmental particles (e.g., Dominik et al.,
15 2007), which reduces its environmental mobility, and tend to form different inorganic
16 and organic species that can influence its bioavailability in different ways. In terms of
17 its biological mechanism of action, Cr^{III} is believed to act by altering membrane
18 fluidity (Raja et al., 2011; Viti et al., 2014) and, in prokaryotes only, to interact with
19 Fe^{III} uptake and metabolism (Viti et al., 2014). However, Cr^{VI} uptake by the marine
20 diatom phytoplankton *Thalassiosira weissflogii* was low compared with Cr^{III}
21 internalization (Semeniuk et al., 2016), suggesting that Cr uptake may vary depending
22 on both exposure conditions and be species.

23 The other few studies with marine plankton species reviewed by Semeniuk et al.
24 (2016) do not provide a comparison between the relative uptake of the two redox
25 forms and we have been unable to find analogous studies for freshwater plankton. In

26 terms of bioaccumulation, Cr^{VI} and Cr^{III} showed similar accumulation and
27 intracellular distribution in the alga *Chlamydomonas reinhardtii* after a 72 h exposure
28 (Aharchaou et al., 2017), questioning the consensus about the higher bioavailability of
29 the hexavalent Cr form. The applicability of the critical body residue approach
30 (McCarty and McKay, 1993) being limited in the case of trace elements (Adams et al.,
31 2011), the importance of uptake rates has also been proposed as a criterion to predict
32 the ecotoxicity of trace elements irrespective of their conditional speciation in the
33 external exposure medium (Casado-Martinez et al., 2010). The use of equilibrium
34 models such as the Free Ion Activity Model (FIAM) or the Biotic Ligand Model
35 (BLM) to determine the bioavailability of trivalent elements to freshwater algae is
36 increasing (e.g., Cremazy et al., 2013; El-Akl et al., 2015; Tan et al., 2017), but we
37 found only one application of the BLM to predict Cr^{III} uptake in the terrestrial plant
38 *Hordeum vulgare* – barley (Song et al., 2014). While information on the relative
39 responses of different organisms to Cr^{VI} and Cr^{III} is abundant (WHO, 2009; 2013),
40 experimental data about Cr internalization are required to refine the current
41 understanding of the relative bioavailability of the two redox forms.

42 In the present study, we quantify the uptake of Cr^{VI} and Cr^{III} by *C. reinhardtii* across
43 the concentration range 1 nM – 10 µM, which includes the typical Cr levels of both
44 pristine and moderately contaminated ecosystems. The effects of changing pH
45 conditions on the uptake of the two redox forms are also examined and the results
46 interpreted in relation to the modeled Cr speciation in the exposure medium.

47

48

49 **Materials and methods**

50 *Test organism and media preparation*

51 The freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (CPCC11 wild strain),
52 originally obtained from the Canadian Phycological Culture Center (University of
53 Waterloo, Canada) was cultivated and grown in a sterile modified high salt medium
54 MHSM-1 (Table SI.1) with an ionic strength of 10.3 meq / L. These cultures were
55 kept in an environmental growth chamber (Convion, CMP3023, Controlled
56 Environments Ltd., Canada) under constant illumination ($100 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and
57 temperature ($20.0 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$) and rotary agitation (100 rpm). Algae were grown at pH 7
58 and subsequently exposed to three pH levels (5, 6 and 7). For regular maintenance of
59 the algal culture, aliquots of 2 mL of algal suspension in the exponential growth phase
60 were transferred twice a week to 100 mL of fresh and sterile MHSM-1 solution (Table
61 S1) with pH adjusted to 7. All culture manipulations were performed under a sterile
62 laminar flow hood and culture media were sterilized at $121 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 min in an
63 autoclave prior to use.

64 *Experimental procedures*

65 All culture plasticware and glassware was soaked for at least 24 h in 10% (v/v) HNO_3 ,
66 thoroughly rinsed five times with deionized water and three times with ultrapure
67 water and dried under laminar flow hood before use. Chromium uptake experiments
68 were carried out by exposing algae to radiolabeled Cr^{III} or Cr^{VI} , namely $^{51}\text{CrCl}_3$ (lot
69 number 14M16j4, radionuclidic purity >99.9% initial specific activity of 649.54
70 $\text{mCi}\cdot\text{mg}^{-1}$ ($24.03 \text{ GBq}\cdot\text{mg}^{-1}$), PerkinElmer, USA) or $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (lot number
71 CR120314, radionuclidic purity >99.9% initial specific activity of $244.33 \text{ mCi}\cdot\text{mg}^{-1}$
72 ($9.04 \text{ GBq}\cdot\text{mg}^{-1}$), PerkinElmer, USA). In both cases, cold (non-radioactive) Cr was

73 added to the radiolabeled Cr solution to reach each desired total exposure
74 concentration. For all experiments, the exposure medium (Table S1) was prepared and
75 filtered (0.2 μm , polycarbonate, Millipore) 24 h before adding the algal cells, and the
76 pH checked again and adjusted if needed. No phosphate or pH buffers were used to
77 avoid possible chromium complexation or, in the case of Cr^{VI} , changes in
78 bioavailability due to competition for uptake (Qian et al., 2013).

79 Two milliliters of cells culture solution were initially inoculated, allowed to grow in
80 the MHSM-1 (pH 7) to reach mid-exponential growth, and then gently harvested cells
81 on a 2 μm filter membrane (2 μm , polycarbonate, Millipore) using a vacuum pressure
82 of 10 cm Hg or less. Harvested cells were rinsed three times with 10 mL of sterile
83 simplified culture medium (MHSM-R or Rinse solution; Table S1) containing neither
84 phosphate nor trace metals and then resuspended in about 10 mL of rinse solution at
85 the same pH used for exposure to Cr. This rinsing step was performed to remove any
86 algal exudates present in the original algal culture. Size distribution (size range used,
87 e.g., 2–10 μm), average surface area, and cellular density were immediately
88 determined using an electronic particle counter (MultisizerTM 3 Coulter Counter[®]
89 with a 70 μm aperture; Beckman, USA) after appropriate dilution in Isoton III
90 electrolyte isotonic solution (Beckman, USA) (100 μL of algae solution + 9,9 mL
91 isoton solution). Cells were then resuspended into the desired exposure solutions
92 previously spiked with either Cr^{III} or Cr^{VI} to give an initial cell density of 100,000
93 cells / mL. The same initial cell density was used for all experiments.

94 Temporal evolution of Cr uptake by algae was studied by exposing cells to 10 nM of
95 Cr^{III} or Cr^{VI} at pH 6 for about 5, 15, 30 and 60 minutes. To determine Cr uptake at
96 different Cr concentrations, cells were exposed 1nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM and 10

97 μM of Cr^{III} or Cr^{VI} under the conditions outlined below (pH 5, 6 or 7) during one
98 hour. These short exposure durations were used to minimize effects of cells exudates
99 that could affect the chromium speciation in solution and to minimize changes in cell
100 abundance or volume that would modify exposure parameters.

101 After exposure, the cells were recovered on two superposed $2\ \mu\text{m}$ polycarbonate
102 membrane filters (upper and lower filters) and a 2 mL aliquot of the exposure solution
103 was retrieved after the experiment to determine the total Cr exposure concentration.
104 The activity of the lower membrane was subtracted from that of the upper one to
105 correct for Cr adsorption on the filter. After one rinse with 10 mL of rinsing solution
106 (Table S1), cells were washed for 10 min by soaking in 10 mL of rinsing solution
107 supplemented with 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma, Sigma
108 Grade 98.5–101.5%, Germany) and then rinsed again three times with 10 mL of the
109 rinsing solution. In the case of Cr^{VI} , the rinsing solution pH was adjusted to 8 and no
110 EDTA was added. The fraction of Cr remaining associated with algal cells was
111 operationally defined as the intracellular chromium fraction. The cells were
112 resuspended by agitating the upper filter with a pair of tweezers in 2 mL of ultrapure
113 water. The resulting suspension in presence of the filter was analyzed with a gamma
114 counter (peak at 320 keV; counting window 250–380 keV; counting time of 300 sec;
115 counting efficiency of 7%; Wallac Wizard2, PerkinElmer, USA) to determine the
116 amount of Cr accumulated by the algae. The lower filter was also resuspended by
117 agitating with tweezers in 2 mL of ultrapure water, and was also analyzed with the
118 gamma counter. All the experiments were done in triplicate, and uptake values were
119 normalized for the total algal surface area.

120

121 *Chromium speciation calculation in the exposure media*

122 The measurements of pH were made directly in the exposure solutions with a pH
123 electrode before the start of exposure (before the addition of algae). The
124 measurements of total Cr concentration were performed with the gamma counter in
125 aliquots of solutions taken before the addition of algae. These data, as well as nominal
126 concentrations of other species in solution (Table S1) were used as input to the
127 software of thermodynamic speciation calculations MINEQL+ (version 4.6) to model
128 the chemical speciation of Cr in the different exposure solutions.

129

130 **Results and discussion**

131 *Cr speciation in exposure solution*

132 In the case of Cr^{VI}, the concentrations in the test medium in the absence of algae were
133 around 70 % of the expected ones for all tested exposure and pH values. The
134 corresponding values for Cr^{III} were slightly lower (55–60 %) and more variable
135 (Table S2). For the exposure solution at a nominal concentration of 10 μM Cr^{III} and
136 pH 7, the measured value was only 14.4 % of the theoretical one (Table S2),
137 suggesting the formation of insoluble Cr^{III} species under such exposure conditions.
138 Measured concentrations were therefore always used in all calculations for Cr
139 speciation and uptake fluxes, although the nominal values will be indicated in the text
140 for ease of reading.

141 Speciation calculation for Cr^{III} in the pH range 4–8 at the different concentrations
142 added into the exposure medium highlighted the progressive appearance of conditions
143 favorable to the formation of amorphous Cr oxyhydroxides Cr(OH)_{3am} (Figure 1).
144 The expected abundance of Cr(OH)_{3am} increased from negligible at a total Cr

145 concentration of 1 nM to 100 % for a total Cr concentration of 10 μ M at pH values
146 above 6. The predicted speciation of Cr^{III} in such conditions agrees well with the
147 marked difference between expected and measured Cr levels (Table S2).

148 Considering the whole array of experiments performed in the present work, algae
149 should have been exposed almost exclusively to dissolved Cr forms for added Cr^{III}
150 total concentrations of 1 and 10 nM (Figure 1), although a shift from Cr(OH)²⁺ and
151 Cr(OH)₂⁺ was predicted over the experimental pH range. For added Cr^{III} total
152 concentration between 100 nM and 10 μ M, dissolved Cr species were predicted to
153 predominate only at pH 5, while the formation of Cr oxyhydroxides was expected at
154 pH 7 (at a total Cr^{III} concentration of 100 nM) and at both pH 6 and 7 for total Cr^{III}
155 concentrations of 1 and 10 μ M (Figure 1). However, the speciation calculations
156 presented in figure 1 assume equilibrium conditions which were probably not reached
157 over the 1 hour exposure time of our experiments. Indeed, Aharchaou et al.
158 (unpublished) showed that, in the standardized OECD algal medium (OECD, 2011),
159 total Cr concentration, added as Cr^{III}, were relatively stable over at least 2 hours
160 despite the concomitant decrease of ionic Cr^{III} levels as quantified by IC-ICP-MS.
161 These findings suggest that Cr-bearing particles did not form over such time scales.
162 Considering the measured concentrations in exposure media amended with Cr^{III}
163 (Table S1), the formation of large amounts of insoluble Cr species likely occurred
164 only for the exposure scenario at pH 7 and 10 μ M added Cr^{III}.

165 Model results for the speciation of Cr^{VI} were similar for all exposure concentrations
166 with the hydrogen chromate ion HCrO₄⁻ being the sole species at pH 4 and becoming
167 almost completely replaced by chromate CrO₄²⁻ at pH 8 (Figure S1).

168

169 *Temporal evolution of Cr uptake by algae*

170 The concentration of internalized Cr increased linearly with time over 1 h (Figure 2).

171 The intercept (Y_0 , corresponding to the adsorbed Cr) values were about $1.82E^{-22}$ mol

172 μm^{-2} ($R^2 = 0.78$; $p < 0.001$) in the case of Cr^{III} and about $2.71E^{-22}$ mol μm^{-2} ($R^2 = 0.84$;

173 $p < 0.001$) in the case of Cr^{VI} . Actual exposure concentrations were 4.80 nM of Cr^{III} or

174 7.35 nM of Cr^{VI} at pH 6 for a nominal concentration of 10 nM. Both Cr^{III} and Cr^{VI}

175 had linear kinetics of internalization at pH 6 during around 1 h. Moreover,

176 extracellular chromium concentrations did not differ between 5 and 60 min of

177 exposure, indicating that the equilibrium between the chromium in the solution and

178 the adsorption sites in the cells surface was quickly reached in our experimental

179 conditions. The presence of a linear relationship between time and internalized Cr and

180 the fact that the values of the intercept Y_0 in the case of both Cr^{III} and Cr^{VI} were close

181 to zero showed that the rinse procedures effectively removed the adsorbed chromium.

182 The results also showed that no plateau had been seen in uptake kinetics over around

183 60 min, suggesting no significant efflux of chromium from algae during the

184 experiment. The slopes of the linear regressions correspond to uptake rate of about

185 $1.67E^{-23}$ mol $\cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ for Cr^{III} and $4.16E^{-23}$ mol $\cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ for Cr^{VI} . The faster

186 internalization rate of Cr^{VI} agrees with the uptake of Cr^{VI} via a process involving a

187 facilitated transport via sulfate/phosphate transporters due to the structural similarities

188 between these anions and chromate. Considering the relative concentration of sulfates

189 (10^{-5} M; Table S1) and Cr^{VI} (10^{-8} in this experiment), the uptake via sulfate

190 transporters may have been of secondary importance in our experimental conditions

191 (Riedel, 1984; 1985) and other internalization mechanisms may have been active.

192 After 1 hour, the ratio of adsorbed vs. absorbed concentrations was about two for Cr^{VI}
193 and around one for Cr^{III}. The presence of measurable amounts of Cr^{VI}, expected to
194 occur as anionic species in the test medium (Figure S1), adsorbed on the cellular wall
195 (also bearing a net negative charge) was quite unexpected. Using a reductive washing
196 procedure (Ti-citrate-EDTA) to convert adsorbed Cr^{VI} to Cr^{III}, Semeniuk et al. (2016)
197 did not observe an increase in the removal of adsorbed Cr from the marine diatom
198 *Thalassiosira weissflogii* and concluded that Cr^{VI} was unlikely to adsorb to the cell. It
199 may therefore be possible that the Cr adsorbed onto the cell wall of our *C. reinhardtii*
200 cells is constituted by a pool of Cr^{III} having undergone extracellular reduction
201 followed by adsorption (Viti et al., 2014). While Aharchaou et al. (unpublished)
202 demonstrated the absence of redox interconversion in the OECD culture medium for
203 algae (OECD, 2011), the possibility of an extracellular interconversion at the cell's
204 membrane followed by adsorption onto the membrane itself would have gone
205 undetected by their method. Further insights into the relative uptake of Cr^{III} and Cr^{VI}
206 by *C. reinhardtii* were obtained by examining different the internalization fluxes at 60
207 minutes at different pH value and Cr concentrations.

208

209 *Effect of pH and concentration on Cr uptake*

210 Uptake of Cr^{III} increased with concentration at all pH values and without reaching a
211 plateau which indicates there was no apparent saturation of Cr uptake sites on the
212 cells' membrane. At pH 5 and 6, the uptake fluxes showed rather abrupt increases
213 (about 120-fold) when the added Cr^{III} concentration reached a value approximately
214 equal to the corresponding proton concentration (10^{-5} for pH 5 and 10^{-6} at pH 6)
215 (Figure 3); suggesting a possible inhibition of Cr^{III} absorption by protons or a
216 dependence of the activity of the currently unknown mechanism of Cr(III)

217 internalization on pH. At pH 7, Cr^{III} uptake increased regularly between 1 and 100
218 nM, slowed down between 100 nM and 1 μM and increased by over 400-fold between
219 1 and 10 μM. However, at pH 7, actual Cr concentration for a nominal addition of 10
220 μM Cr^{III} was only 1.4 μM; i.e. only twice as much the actual Cr concentration (0.75
221 M) for the 1μM nominal concentration spike. In this case, the abrupt change in Cr
222 uptake likely follows from a shift from dissolved Cr to Cr oxyhydroxides in Cr^{III}
223 speciation (Figure 1) and it may indicate that part of the Cr oxyhydroxides are
224 available for uptake by algal cells. Cremazy et al. (2013) studied the uptake of Sc by
225 *C. reinhardtii* and actually had to postulate that Sc hydroxy species were available to
226 explain the observed influx rates at pH values above 6.5. However, Cremazy et al.
227 (2013) also reported a reduced influx of Sc with raising pH (due to the formation Sc
228 hydroxy species); in contrast with our results. The most likely cause for this
229 discrepancy is that Cremazy et al. (2013) used a maximum Sc concentration of 1 μM.
230 At this concentration, the increase in Cr(III) uptake by *C. reinhardtii* at pH 7 also
231 tended to level off (Figure 3), indicating that the actual uptake rate is a function of
232 both pH and concentration. Cr(III) adsorption onto the algal wall being very rapid, the
233 increase of its internalization fluxes at 10 μM can be the consequence of a transient
234 and rapidly changing chemical speciation at the beginning of the exposure; a
235 phenomenon that cannot be predicted using thermodynamic model calculations.

236 Uptake of Cr^{VI} also increased linearly with concentration without reaching a plateau
237 indicating that there was not a saturation of Cr uptake sites on the cells membranes.
238 Furthermore, no abrupt changes in uptake rates at high concentrations were observed
239 in this case for our experimental conditions. However, uptake was somewhat higher at
240 pH 5 and 6 for Cr^{VI} concentrations between 1 and 10 nM, while it appeared to be
241 almost exclusively controlled by concentrations for Cr^{VI} spikes equal to or higher than

242 100 nM. It could be assumed that low pH reduced the repulsion between the
243 negatively charged Cr^{VI} and cellular membranes which, at low added Cr^{VI}
244 concentrations, resulted in an increase of Cr(VI) uptake.

245 Comparison between the uptake of Cr^{III} and Cr^{VI} (Figure 3) also highlighted a larger
246 effect of increasing Cr added concentration with respect to pH. The uptake of Cr^{VI}
247 was higher than that of Cr^{III} at all pH values between 1 nM, while the opposite was
248 true at 10 μM added Cr (Figure 3). The situation was slightly less clear-cut for
249 concentrations between 10 nM and 1 μM, where the influence of pH on the relative
250 uptake of the two species could determine changes of over one order of magnitude in
251 the observed Cr influx. In particular, for an added concentration of 10 to 100 nM, Cr^{III}
252 and Cr^{VI} had a similar uptake rate at pH 7; while Cr^{VI} was internalized faster than Cr^{III}
253 at pH 5 and 6 (Figure 3). The opposite situation was observed for Cr addition of 1
254 μM.

255 To make sense of such contrasting observations, it is important to remember that the
256 theoretical solubility limit of Cr^{III} in pure water is situated between 100 nM and 1 μM
257 (Rai et al., 1989) and that, in our experimental pH range, formation of Cr
258 oxyhydroxides is predicted to be of interest starting from 100 nM added Cr. Thus, at
259 1 and 10 nM, the increase in pH simply makes the net surface charge of *C. reinhardtii*
260 cells progressively more negative, thus slowing down Cr^{VI} diffusion towards the
261 membrane and increasing that of Cr^{III} with opposite consequences on their uptake.
262 Alternatively, the mechanisms of Cr internalization themselves could be pH-
263 dependent, but we are unable to confirm either of the hypothesis at the moment.
264 Furthermore, at such low concentration soluble Cr^{III} species are expected to be still
265 predominant even at pH 7 (Figure 1). As a consequence, the increase in pH leads to a

266 decrease competition between Cr^{III} and H^+ which also increases the uptake rate of
267 Cr^{III} . Starting from added Cr concentrations of 100 nM, the pH effect on Cr^{VI} uptake
268 becomes less important (likely because the quantity of Cr in solution is high enough
269 to compensate the increased effects of electrostatic repulsion at low pH) and Cr^{VI}
270 uptake is similar for all the studied pH values. In the case of Cr^{III} , oxyhydroxides are
271 predicted to dominate at pH 7. However, the evolution of Cr^{III} uptake with pH is
272 similar to that observed at the lower concentrations and uptake is likely controlled by
273 the same species. A reverse situation is observed at 1 μM where uptake is one order of
274 magnitude higher for Cr^{III} than for Cr^{VI} at pH 5 and 6 and similar between the two
275 forms of Cr at pH 7. This probably indicate a real, pH-dependent change in speciation
276 for Cr^{III} , with appearance of Cr oxyhydroxides at pH 7 (Figure 1), over the time
277 course of the experiments. At 10 μM , Cr^{III} uptake is faster than that of Cr^{VI} at all the
278 examined pH values. Furthermore, no pH dependence of uptake fluxes is observed for
279 either one of the redox forms. It is noteworthy that the uptake fluxes of Cr^{III} are
280 comparable at the three pH values even if the concentration at pH 7 is about 5-fold
281 lower than at pH 5 and 6. While thermodynamic speciation calculation do not account
282 for the kinetics aspects, formation of Cr oxyhydroxides at 10 μM added Cr^{III} is likely
283 faster and quantitatively more important than at the other concentrations (Table S2).
284 The similar uptake rates at the three pH values can be explained by assuming that
285 such Cr oxo-complexes are bioavailable (as observed for Sc by Cremazy et al., 2013)
286 or by surmising the existence of a two-step uptake process consisting in a fast
287 adsorption phase followed by a slower internalization phase. In the second scenario,
288 the fast adsorption of Cr^{III} onto the cell surface would serve as a source of Cr^{III} for
289 internalization for the remaining duration of the experiment; regardless of the
290 speciation changes in the exposure medium.

291 The comparison between Cr^{III} and Cr^{VI} uptake rates shows that internalization of the
292 two redox forms of Cr depends on a quite complex interplay of at least three factors:
293 Cr speciation in the exposure medium (which is pH dependent and of particular
294 relevance for trivalent Cr), net surface charge of the biological surface (which has a
295 contrasting effect on the anionic Cr^{VI} and the cationic Cr^{III} species) and actual
296 exposure concentration. Most interestingly, concentrations in the range 10 nM – 1 μM
297 and neutral pH conditions result in a similar uptake of the two redox forms (Figure 3).
298 This concentration range includes the typical Cr levels for world rivers (0.2 – 2 μg /
299 L; i.e. approx 4–40 nM according to Gaillardet et al., 2003), although levels in the
300 range of tens of μM or higher of both redox forms can be observed in industrial
301 effluents (Krishna et al., 2005) or in mining areas (Gunkel-Grillon et al., 2014). High
302 concentrations seem to favor the uptake of Cr^{III} over Cr^{VI}. However, besides pH, the
303 actual composition of the natural waters includes many components that can modulate
304 the uptake of Cr^{III} (i.e., Fe and phosphates) and Cr^{VI} (i.e., ammonium and sulfates).

305 Finally, it is interesting to examine how short-term uptake fluxes can predict actual Cr
306 accumulation in algae. Considering the uptake rate measured in this study for
307 concentrations of 100 nM at pH 7 and assuming an average surface of 70 μm² / cell
308 for *C. reinhardtii* (Aharchaou et al., unpublished), the predicted accumulation levels
309 after 1 hour would be 1.84 amol / cell for Cr^{III} and 4.2 amol / cell for Cr^{VI}. These
310 figures represent slight overestimations compared with the experimental
311 measurements of 0.97 ± 0.26 amol / cell for Cr^{III} and 1.76 ± 0.54 amol/cell for Cr^{VI}
312 obtained by Aharchaou et al. (2017) under the same exposure conditions. Most
313 importantly, during 72 h exposures, Cr^{III} and Cr^{VI} accumulation were 5.06 ± 0.97
314 amol / cell and 5.60 ± 0.85 amol /cell, respectively. The similar level of accumulation
315 for the two redox forms after 72 hours agrees with the similar internalization rates, but

316 also points to differences in the time required by the two redox form to achieve a
317 steady state concentration within cells. Semeniuk et al. (2016) report a higher short-
318 term accumulation of Cr^{III} vs. Cr^{VI} in *Thalassiosira weissflogii* exposed to 100 nM of
319 either form of Cr for periods up to 2.5 h in synthetic ocean water (SOW). SOW is
320 characterized by very high levels of sulfate which can reduce Cr^{VI} uptake (Riedel at
321 al. 1984; 1985).

322 Apart from speciation in the exposure medium, the relative surface charge of
323 biological membrane appears to have an important role in the relative uptake rates of
324 the different redox forms of Cr. Low pH values decrease the net negative membrane
325 charge (average point of zero charge for algal biomass are assumed to be around pH 3
326 – Crist et al., 1981) so that electrostatic repulsion between the cell membrane and Cr^{VI}
327 increases with increasing pH thus lowering uptake fluxes (Figure 3). An opposite pH
328 effects is observed for Cr^{III} whose electrostatic attraction towards the membrane
329 reduces at low pH values. However, electrostatic effects linked to pH seem to be
330 important at concentrations below 100 nM and less important in contaminated
331 environments; at least for the pH range 5 to 7 examined in the present study. The
332 possibility of changes in the activity level of Cr internalization following changes in
333 pH cannot be ruled out either.

334 Overall, it seems incorrect to assume a priori that Cr^{VI} will be more bioavailable than
335 Cr^{III} because of its structural affinity with sulfates or phosphates anions and the
336 subsequent inadvertent uptake via transporters for other ions. The variability of uptake
337 fluxes with pH and added Cr concentration shows that actual exposure conditions can
338 result in contrasting uptake behavior and that more comparative studies on the uptake
339 of the two Cr forms are needed to make sense of bioaccumulation, bioavailability and
340 ecotoxicity of the two redox forms in laboratory and environmental conditions.

341

342 **Acknowledgements**

343 We gratefully acknowledge the technical assistance provided by L. Rancourt and S.
344 Prémont. Financial support was provided by the Labex R21, the Ministry of National
345 Education, Higher Education and Research (France) and the Natural Sciences and
346 Engineering Research Council of Canada. C. Fortin is supported by the Canada
347 Research Chair Program.

348 **References**

- 349 Adams, W. J.; Blust, R.; Borgmann, U.; Brix, K. V.; DeForest, D. K.; Green, A. S.;
350 Meyer, J. S.; McGeer, J. C.; Paquin, P. R.; Rainbow, P. S.; Wood, C. M., Utility of
351 tissue residues for predicting effects of metals on aquatic organisms. *Integrated*
352 *Environmental Assessment and Management* 2011, 7, (1), 75-98.
- 353 Aharchaou, I.; Rosabal, M.; Liu, F.; Battaglia, E.; Vignati, D. A. L.; Fortin, C.,
354 Bioaccumulation and subcellular partitioning of Cr(III) and Cr(VI) in the freshwater
355 green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology* 2017, 182, 49-57.
- 356 Aharchaou, I.; Py, J.-S.; Cambier, S.; Loizeau, J.-L.; Battaglia, E.; Rousselle, P.;
357 Vignati, D.A.L., Chromium speciation in a standardized ecotoxicological medium for
358 algae: implications for hazard and risk assessment. Submitted to : *Environ. Sci.*
359 *Technol.*
- 360 Carmen Casado-Martinez, M.; Smith, B. D.; Luoma, S. N.; Rainbow, P. S., Metal
361 toxicity in a sediment-dwelling polychaete: Threshold body concentrations or
362 overwhelming accumulation rates? *Environmental Pollution* 2010, 158, (10), 3071-
363 3076.
- 364 Crémazy, A.; Campbell, P. G. C.; Fortin, C., The Biotic Ligand Model Can
365 Successfully Predict the Uptake of a Trivalent Ion by a Unicellular Alga Below pH
366 6.50 but not Above: Possible Role of Hydroxo-Species. *Environ. Sci. Technol.* 2013,
367 47, (5), 2408-2415.
- 368 Crist, R. H.; Oberholser, K.; Shank, N.; Ming, N., Nature of bonding between metallic
369 ions and algal cell walls. *Environ. Sci. Technol.* 1981, 15, (10), 1212-1217.
- 370 Dominik, J.; Vignati, D. A. L.; Koukal, B.; Pereira de Abreu, M.-H.; Kottelat, R.;
371 Szalinska, E.; Bas, B.; Bobrowski, A., Speciation and environmental fate of
372 chromium in rivers contaminated with tannery effluents. *Engineering Life Science*
373 2007, 7, 155-169.
- 374 El-Akl, P.; Smith, S.; Wilkinson, K. J., Linking the chemical speciation of cerium to
375 its bioavailability in water for a freshwater alga. *Environmental Toxicology and*
376 *Chemistry* 2015, 34, (8), 1711-1719.
- 377 Gaillardet, J., Viers, J., Dupré, B., 2003. Trace Elements in River Waters. Treatise
378 *Geochem.* 5, 605. doi:10.1016/B0-08-043751-6/05165-3

379 Gunkel-Grillon, P., Laporte-Magoni, C., Lemestre, M., Bazire, N., 2014. Toxic
380 chromium release from nickel mining sediments in surface waters, New Caledonia.
381 *Environ. Chem. Lett.* 12, 511–516.

382 Krishna, B.M.V., Chandrasekaran, K., Rao, S.V., Karunasagar, D., Arunachalam, J.,
383 2005. Speciation of Cr(III) and Cr(VI) in waters using immobilized moss and
384 determination by ICP-MS and FAAS. *Talanta* 65, 135–143.
385 doi:10.1016/j.talanta.2004.05.051

386 McCarty, L. S.; MacKay, D., Enhancing ecotoxicological modeling and assessment.
387 *Environ. Sci. Technol.* 1993, 27, (9), 1719-1728.

388 OECD. *Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*;
389 Organisation for Economic Co-operation and Development: Paris, 2011.

390 Qian, H.; Sun, Z.; Sun, L.; Jiang, Y.; Wei, Y.; Xie, J.; Fu, Z., Phosphorus availability
391 changes chromium toxicity in the freshwater alga *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere*
392 2013, 93, (6), 885-891.

393 Rai, D.; Eary, L. E.; Zachara, J. M., Environmental chemistry of chromium. *Sci. Total*
394 *Environ.* 1989, 86, 15-23.

395 Rainbow, P. S., Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?
396 *Environ. Poll.* 2002, 120, 497-507.

397 Raja, N. S.; Sankaranarayanan, K.; Dhathathreyan, A.; Nair, B. U., Interaction of
398 chromium(III) complexes with model lipid bilayers: Implications on cellular uptake.
399 *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2011, 1808, (1), 332-340.

400 Riedel, G. F., Influence of salinity and sulfate on the toxicity of chromium (VI) to the
401 estuarine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology* 1984, 20, (4), 496-
402 500.

403 Riedel, G. F., The relationship between chromium(VI) uptake, sulfate uptake, and
404 chromium(VI) toxicity in the estuarine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Aquatic*
405 *Toxicology* 1985, 7, (3), 191-204.

406 Semeniuk, D. M.; Maldonado, M. T.; Jaccard, S. L., Chromium uptake and adsorption
407 in marine phytoplankton – Implications for the marine chromium cycle. *Geochimica*
408 *et Cosmochimica Acta* 2016, 184, 41-54.

409

410 Semple, K. T.; Doick, K. J.; Jones, K. C.; Bureau, P.; Craven, A.; Harms, H.,
411 Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediments is
412 complicated. *Environ. Sci. Technol.* 2004, 38, 228A-231A.

413 Song N, Zhong X, Li B, Li J, Wei D, et al. (2014) Development of a Multi-Species
414 Biotic Ligand Model Predicting the Toxicity of Trivalent Chromium to Barley Root
415 Elongation in Solution Culture. PLoS ONE 9(8): e105174.
416 doi:10.1371/journal.pone.0105174
417 Tan, Q.-G.; Yang, G.; Wilkinson, K. J., Biotic ligand model explains the effects of
418 competition but not complexation for Sm biouptake by *Chlamydomonas reinhardtii*.
419 *Chemosphere* 2017, 168, 426-434.
420 Viti, C.; Marchi, E.; Decorosi, F.; Giovannetti, L., Molecular mechanisms of Cr(VI)
421 resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 2014, 38, (4), 633-659.
422 WHO. *Inorganic Chromium(III) Compounds*; World Health Organization, 2009.
423 WHO. *Inorganic Chromium(VI) Compounds*; World Health Organization, 2013.

424 **Figure Captions**

425 **Fig. 1.** Thermodynamic speciation calculation for Cr(III) in the exposure medium (M,
426 table S1) from pH 4 to 8 calculated with MINEQL+ (version 4.6) for different added
427 concentrations (nominal values). Solid precipitation was allowed except that of Cr(III)
428 oxides Cr₂O₃.

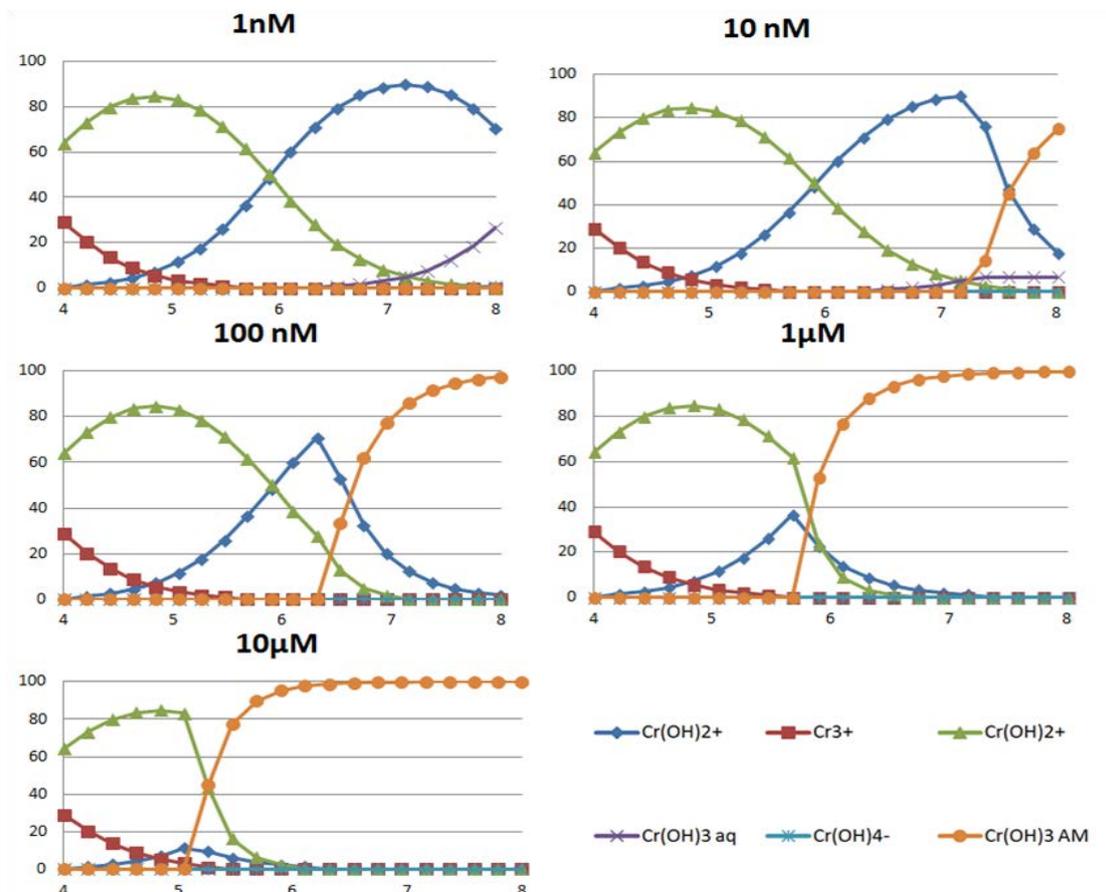
429

430 **Fig. 2.** Typical intracellular (circles) and extracellular (triangles) chromium (Cr(III)
431 and Cr(VI)) uptake profiles as a function of time (pH = 6; measured [Cr(III)] = 4.80
432 nM; measured [Cr(VI)] = 7.35 nM).

433

434 **Fig. 3.** Effect of pH on Cr(III) and Cr(VI) uptake by the algae *C. reinhardtii* and
435 comparison of Cr(III) and Cr(VI) uptakes at different concentrations. Results were
436 obtained from different algal batches and measured Cr concentrations were used for
437 all calculations.

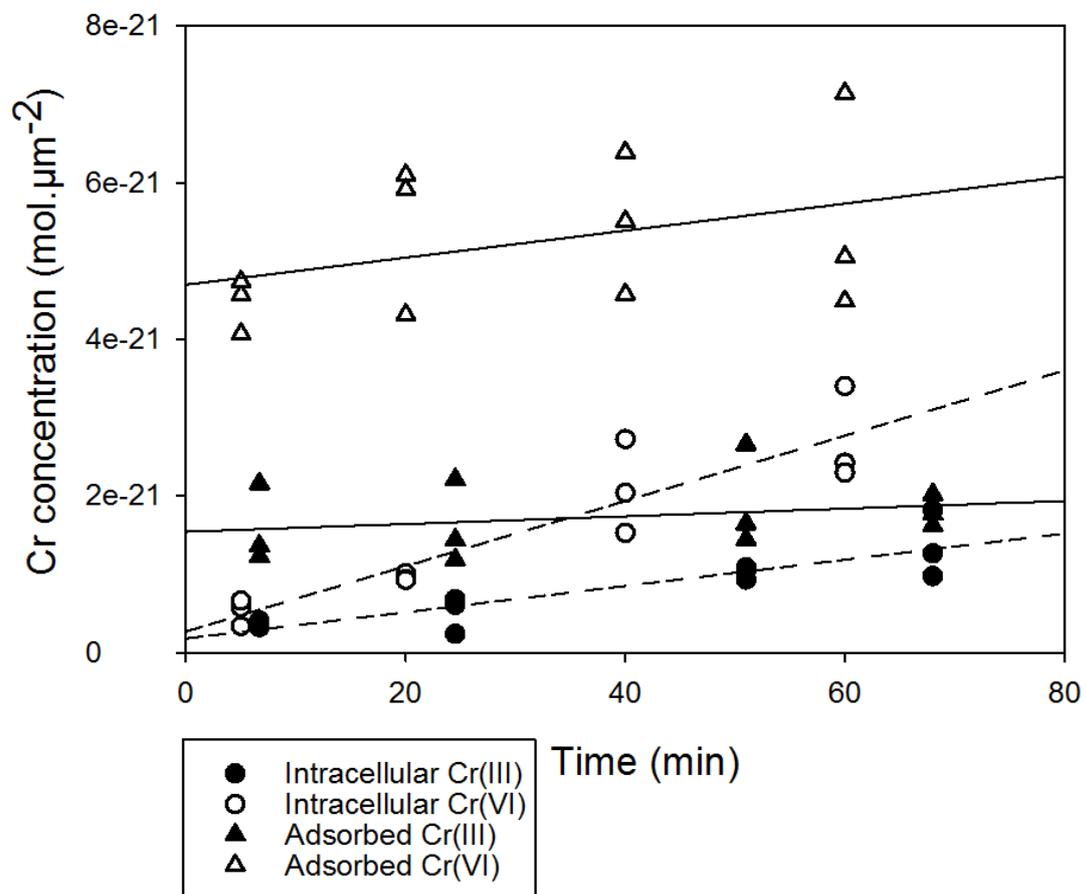
438 **Figure 1**



439

440

441 **Figure 2**

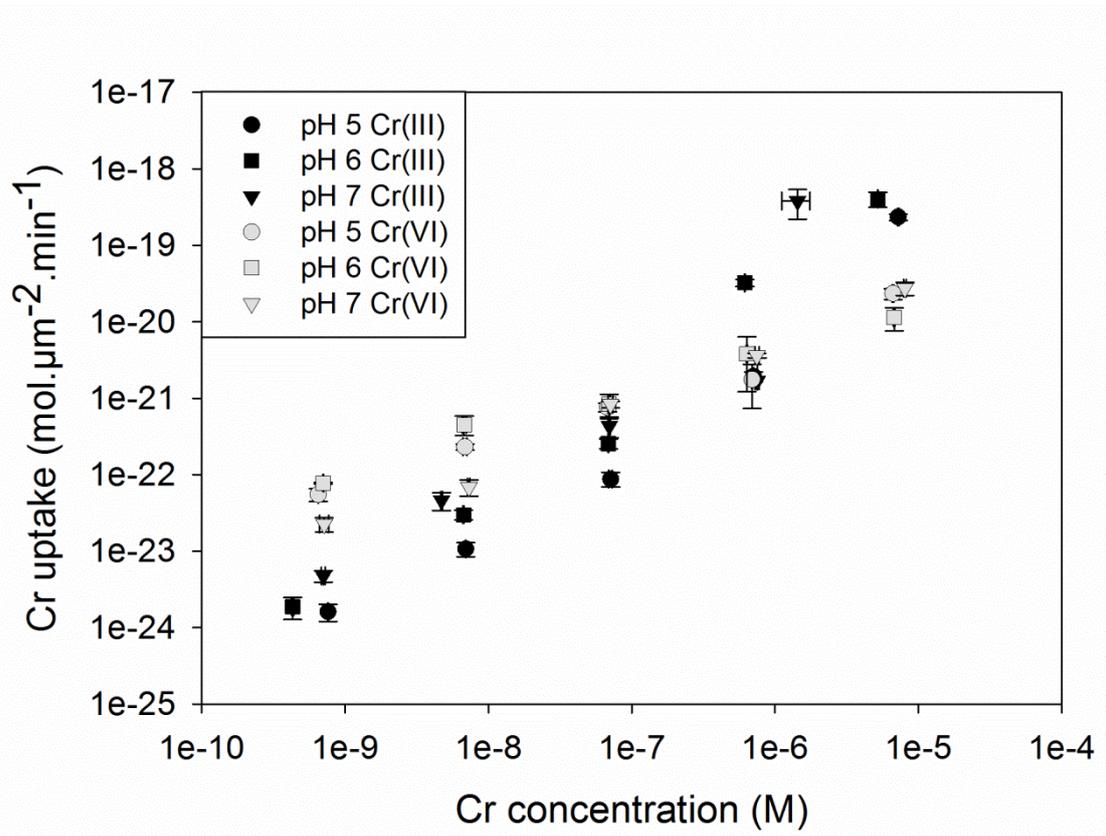


442

443

444 **Figure 3**

445



446

447

Supplementary Information for

Uptake of Cr(III) and Cr(VI) in the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Imad Aharchaou^a, Fengjie Liu^b, Eric Battaglia^a, Davide A.L Vignati^a and Claude Fortin^{b,*}

^a Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, UMR 7360, Université de Lorraine and CNRS, 8 rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

^b Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement (INRS-ETE), 490 rue de la Couronne, Québec (Québec), Canada G1K 9A9

Table S1: Molar concentrations of the used cations and anions in the preparation of culture media MHSM-1, Rinse solution, EDTA solution and exposure medium.

Ions	Culture MHSM-1(M)	Rinse solution or MHSM-R (M)	EDTA solution or MHSM-E (M)	Exposure Medium (M)
NH ₄ ⁺	9.37 x 10 ⁻⁴	9.37 x 10 ⁻⁴	9.37 x 10 ⁻⁴	9.37 x 10 ⁻⁴
Cl ⁻	5.98 x 10 ⁻⁶	-	-	-
K ⁺	4.22 x 10 ⁻³	4.22 x 10 ⁻³	4.22 x 10 ⁻³	4.22 x 10 ⁻³
PO ₄ ³⁻	1.37 x 10 ⁻⁴	-	-	-
NO ₃ ⁻	5.07 x 10 ⁻³	5.07 x 10 ⁻³	5.07 x 10 ⁻³	5.07 x 10 ⁻³
SO ₄ ²⁻	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵
Mg ²⁺	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵
Ca ²⁺	6.80 x 10 ⁻⁵	6.80 x 10 ⁻⁵	6.80 x 10 ⁻⁵	6.80 x 10 ⁻⁵
Na ⁺	1.02 x 10 ⁻⁴	1.02 x 10 ⁻⁴	1.02 x 10 ⁻⁴	Variable
BO ₃ ³⁻	3.01 x 10 ⁻⁶	-	-	-
Mn	2.10 x 10 ⁻⁶	-	-	-
Fe	5.92 x 10 ⁻⁷	-	-	-
MoO ₄	3.00 x 10 ⁻⁸	-	-	-
Zn	2.43 x 10 ⁻⁸	-	-	-
Co	1.09 x 10 ⁻⁸	-	-	-
Cu	7.04 x 10 ⁻¹¹	-	-	-
EDTA	8.06 x 10 ⁻⁷	-	1.01 x 10 ⁻⁴ *	-
MOPS	10 ⁻²	-	-	-
CO ₃	atm ^a	atm ^a	atm ^a	atm ^a
Cr ^{III}	-	-	-	variable
Cr ^{VI}	-	-	-	variable

^a: Open to the atmosphere

-: not used in the medium preparation

*: In the case of Cr(VI) experiments, no EDTA was added, but the pH was adjusted to 8 with NaOH 0.1 M.

Table S2. Actual concentration (as a percentage of the expected nominal values) of Cr^{VI} and Cr^{III} added to the exposure medium (M, Table S1) for different pH values.

Nominal concentration	Cr ^{VI}			Cr ^{III}		
	pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7
1 nM	68.6	70.3	68.6	43	43	70.5
10 nM	68.9	67.8	68.9	66.9	66.9	47
100 nM	70.1	69.5	70.1	68.6	68.6	69.7
1 μM	70.3	63.6	70.3	61.5	61.5	75.1
10 μM	66.4	67.8	66.4	52.1	52.1	14.4

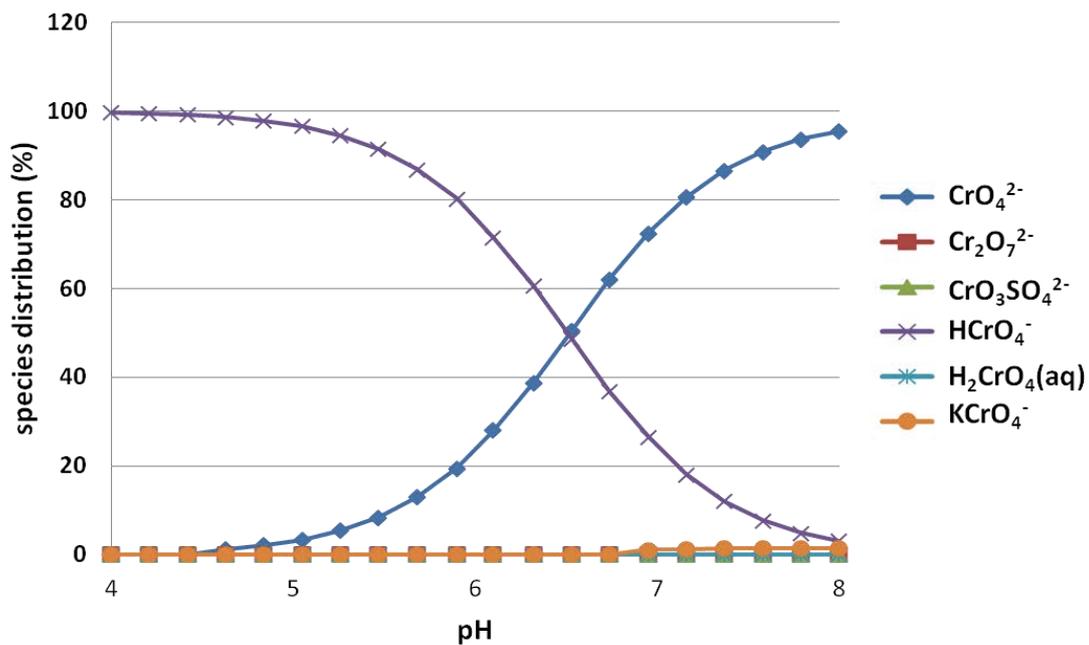


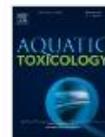
Figure S1: Modeling of the speciation of Cr(VI) in the exposure medium (M, Table S1) from pH 4 to 8 calculated using the software MINEQL+ (version 4.6). No changes were made in the default database of the model.

Publication 3



Aquatic Toxicology

Volume 182, January 2017, Pages 49–57



Bioaccumulation and subcellular partitioning of Cr(III) and Cr(VI) in the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Imad Aharchaou^a, Maikel Rosabal^{b, 1}, Fengjie Liu^b, Eric Battaglia^a, Davide A.L. Vignati^a, Claude Fortin^b



^a Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, UMR 7360, Université de Lorraine and CNRS, 8 rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

^b Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement (INRS-ETE), 490 rue de la Couronne, Québec (Québec) G1K 9A9, Canada

Received 20 June 2016, Revised 31 October 2016, Accepted 4 November 2016, Available online 6 November 2016



1 Bioaccumulation and subcellular partitioning of Cr(III) and Cr(VI) in the freshwater
2 green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

3

4 Imad Aharchaou^a, Maikel Rosabal^{b1}, Fengjie Liu^b, Eric Battaglia^a, Davide A.L
5 Vignati^a and Claude Fortin^{b,*}

6

7

8 ^a Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, UMR 7360,
9 Université de Lorraine and CNRS, 8 rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

10 ^b Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement
11 (INRS-ETE), 490 rue de la Couronne, Québec (Québec), Canada G1K 9A9

12 Tel/Fax: + 1 418 654 3770 / + 1 418 654 2600

13 *Corresponding author: claude.fortin@ete.inrs.ca

14

15 ¹ Present address: Université du Québec à Montréal, Département des sciences
16 biologiques, Case postale 8888, Succursale Centre-ville, Montréal (Québec), Canada
17 H3C 3P8

Abstract

Chromium occurs in aquatic environments under two main redox forms, namely Cr(III) and Cr(VI), with different geochemical and biochemical properties. Cr(VI) readily crosses biological membranes of living organisms and once inside the cells it undergoes a rapid reduction to Cr(III). The route of entry for this latter form is however poorly known. Using the radioactive tracer ^{51}Cr we compared the accumulation (absorption and adsorption) of the two Cr forms by the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* after 1 h and 72 h of exposure to 100 nM of either Cr(III) or Cr(VI) at pH 7. Both Cr forms had similar accumulation, with a major part in the extracellular (adsorbed) fraction after 1 h and a major part of total accumulated Cr the intracellular (absorbed) fraction after 72 h. We also investigated the intracellular partitioning of Cr using an operational fractionation scheme and found that both Cr forms had similar distributions among fractions, where Cr was mostly associated with organelles ($23 \pm 12\%$ after 1 h and $37 \pm 7\%$ after 72 h) and cytosolic heat-stable proteins and peptides ($39 \pm 18\%$ after 1 h and $35 \pm 3\%$ after 72 h) fractions. Further investigations using a metallomic approach (SEC-ICP-MS) were performed with the heat-stable proteins and peptides fraction to compare the distribution of the two Cr forms among various biomolecules of this fraction. One Cr-binding biomolecule (~ 28 kDa) appeared after 1 h of exposure for both Cr species. After 72 h another biomolecule of lower molecular weight (~ 0.7 kDa) was involved in binding Cr and higher signal intensities were observed for Cr(VI) compared to Cr(III). This original work shows, for the first time, that both Cr(III) and Cr(VI) have similar fate within algal cells, supporting the tenet that a unique redox form occurs within cells.

Keywords: Subcellular partitioning, unicellular alga, trivalent chromium, hexavalent chromium, SEC-ICP-MS.

Introduction

Chromium is widely used in various industrial processes such as production of refractory materials, metallurgy and chemical manufacturing. Large quantities of chromium compounds are released into the terrestrial and aquatic (fresh and marine) environments where they can have significant adverse ecological effects (Cervantes et al., 2001). In surface waters, this transition element occurs mainly in two redox forms, Cr(VI) and Cr(III), with different mobility, bioavailability and toxicity. Trivalent Cr is relatively immobile in the environment, poorly soluble and considered of limited ecotoxicological concern compared to the highly mobile, soluble and bioavailable Cr(VI) (Dhal et al., 2013; Kotaś and Stasicka, 2000; Markiewicz et al., 2015).

Hexavalent chromium is highly toxic because of its elevated oxidation potential and ability to quickly penetrate biological membranes (Ramírez-Díaz et al., 2008). This latter ability originates from the structural similarity between chromate and sulfate or phosphate anions, which are transported into cells via oxyanion transporters in various microorganisms (as reviewed in Viti et al., 2014). In contrast, the routes of entry of Cr(III) into the cells are much less well-established. Uptake via Fe(III) transporter has been hypothesized in prokaryotes, while Cr(III) ions could alter the fluidity and permeability of the outer region of the cell membrane in eukaryotes (Parker et al., 2011; Viti et al., 2014; Volland et al., 2012). Inside living cells, Cr(VI) is rapidly reduced to Cr(III) which is the major redox form found in the intracellular environment (Cervantes et al., 2001; Viti et al., 2014). Reduction of Cr(VI) to Cr(III) inside the cell occurs via different nonspecific reductants such as glutathione (GSH), glutathione reductase (GR), cysteine, carbohydrates, reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH), nucleotides and ascorbic acid (Asatiani et al., 2004). Inside the cell, toxicity and tolerance mechanisms towards trace elements are linked to their subcellular partitioning (Campbell and Hare, 2009; Crémazy et al., 2013); i.e., the distribution among the different intracellular fractions (organelles, granule-like, heat-stable proteins and peptides (HSP), heat-denaturatable proteins (HDP) and cellular debris). The metal accumulation in the HDP and organelles fractions are generally considered as biologically active pools (metal-sensitive compartments), while those measured in the HSP and granules-like fractions are associated with metal detoxification processes (Crémazy et al., 2013; Lavoie et al., 2009b; Wallace et al., 2003). In fact, microalgae are able to control the biologically available intracellular

concentration of metals by controlling their rates of uptake and loss, or by making them unavailable by complexation with metal-binding proteins and accumulation into metal-rich granules (Lavoie et al., 2009b). These mechanisms preclude the binding of metals to physiologically important, metal-sensitive sites (Rosabal et al., 2012; Wallace et al., 2003).

With this in mind, we first compared the intracellular (absorbed) vs. extracellular (adsorbed) accumulation of Cr by the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to radiolabeled Cr(III) and Cr(VI) over short (1 h) and long (72 h) time periods and determined the subcellular partitioning of Cr among operationally defined intracellular fractions. These experiments were designed to determine if exposure to the two different redox forms of Cr eventually leads to similar subcellular distribution inside the cells. Furthermore, we applied a metallomic approach to characterize the molecular weight of the biomolecules involved in the binding of Cr in the HSP fraction of *C. reinhardtii* cells exposed to either trivalent or hexavalent chromium.

Materials and methods

Maintenance of algal culture

Cultures of the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (CPCC11 wild strain), originally obtained from the Canadian Phycological Culture Center (University of Waterloo, Canada), were inoculated and grown in a sterile modified high salt medium (MHSM-1, table S1) at pH 7 (Crémazy et al., 2013; Lavoie et al., 2009a). Algae were kept in an environmental growth chamber (Convion, CMP3023, Controlled Environments Ltd., Canada) at a constant temperature (20.0 ± 0.2 °C) and under continuous light ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and rotary agitation (100 rpm). Twice a week, aliquots of 2 mL of algal suspension in the exponential growth phase were transferred to 100 mL of freshly prepared and sterile MHSM-1 medium for culture maintenance. All culture glassware was soaked for at least 24 h in 10% (v/v) HNO₃, thoroughly rinsed five times with deionized water and three times with ultrapure water and dried under a laminar flow hood before use. Media were autoclaved at 121 °C for 15 min before use.

Exposure of algae to Cr(III) and Cr(VI)

Exposure experiments to Cr(III) or Cr(VI) for comparing Cr accumulation and intracellular distribution were performed at pH 7 in sterile algal culture medium MHSM-1. The pH did not significantly vary and remained around 7.00 ± 0.15 pH values over both 1 h and 72 h-exposures. Trivalent and hexavalent chromium were spiked as radiolabeled $^{51}\text{CrCl}_3$ (lot number 14M16j4, radionuclidic purity >99.9%, initial specific activity of $649.54 \text{ mCi}\cdot\text{mg}^{-1}$ ($24.03 \text{ GBq}\cdot\text{mg}^{-1}$), PerkinElmer, USA) or $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (lot number CR120314, radionuclidic purity >99.9%, initial specific activity of $244.33 \text{ mCi}\cdot\text{mg}^{-1}$ ($9.04 \text{ GBq}\cdot\text{mg}^{-1}$), PerkinElmer, USA), respectively. In both cases, cold (non-radioactive) Cr was added to the radiolabeled Cr (initial activity of $20,000 \text{ disintegrations per minute}\cdot\text{mL}^{-1} - \text{DPM}\cdot\text{mL}^{-1}$) solution to reach a total exposure concentration of 100 nM. This relatively low concentration was used to limit the possible formation of Cr(III)-precipitated species (i.e., Cr hydroxides). The losses in Cr concentrations in the test medium were less than 5% over 48 h, and 12% over 72 h with or without filtration ($0.2 \mu\text{m}$, polycarbonate, Millipore). After spiking, the pH was re-adjusted to 7.00 ± 0.05 using a 1 M solution of NaOH (99.9%, SigmaAldrich, Canada). All exposure solutions were prepared one day before their use.

Chlamydomonas reinhardtii cells in mid-exponential growth phase were collected on a $2 \mu\text{m}$ filter membrane using a vacuum pressure of 10 cm Hg or less, and rinsed three times with MHSM-R (Table S1). The rinsing step was employed to remove any algal exudates present in the original algal culture. Cells were then resuspended into the desired exposure solution previously spiked with either Cr(III) or Cr(VI) to give an initial cell density of $100,000 \text{ cells mL}^{-1}$. Algal suspensions were incubated in the environmental growth chamber for 1 or 72 h under the same growth conditions described above.

Cellular densities, volumes and surface area were determined with an electronic particle counter (MultisizerTM 3 Coulter Counter[®] with a $70 \mu\text{m}$ aperture; Beckman, USA) after appropriate dilution in Isoton III electrolyte (Beckman, USA). At the end of the exposure duration, the cells were collected by centrifugation and soaked for 10 minutes in 10 mL of MHSM-E (Extracting solution; Table S1), corresponding to MHSM-R (rinse solution) supplemented with 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma, Sigma Grade 98.5 – 101.5%, Germany). This step was performed to remove the extracellular metal adsorbed on the cell surface (Crémazy et al., 2013). The algal cells were then centrifuged and resuspended

twice in 10 mL of fresh MHSM-R solution with pH adjusted to 8 to remove any residual MHSM-E solution. The intracellular fraction corresponds to the metal inside the cells after washing with MHSM-E and MHSM-R. The extracellular fraction corresponds to the quantity of metal in the extracting and rinse solutions. Hence, the sum of the two fractions corresponds to the total accumulated metal.

After the third centrifugation, algae were transferred to 2 mL of MHSM-R solution. Aliquots of this suspension were sub-sampled for the measurements of cell density and total intracellular chromium content. Three replicates and one negative control (no Cr added) were used for each exposure. All ^{51}Cr measurements were performed on a gamma counter (peak at 320 keV; counting window 250-380 keV; counting time of 300 sec; counting efficiency of 7%; Wallac Wizard2, PerkinElmer, USA).

Chromium subcellular partitioning procedure

The study of subcellular partitioning of Cr in algae after exposure to Cr(III) or Cr(VI) for 1 and 72 h was performed using a protocol involving an initial cell homogenization step, followed by a differential centrifugation approach designed to separate different fractions (Fig. SI.1). The protocol previously optimized for *C. reinhardtii* by Lavoie et al. (2009a) was used and homogenization efficiencies were determined with a particle counter. The following five subcellular fractions were isolated: organelles (ORG: mitochondria, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum), granules-like (GR: NaOH-resistant materials), debris (DE: membranes, cell walls), heat-stable proteins and peptides (HSP: glutathione, phytochelatin and other unidentified thermostable peptides) and heat-denatured proteins (HDP: enzymes) (see Fig SI.1).

The algal cells (1.5 mL) were first disrupted by ultrasonication (Branson 250 sonication probe, USA) for 4 min at a pulse frequency = 0.2 s/s and a temperature of 4 °C. Aliquots of 500 μL were collected from the algal homogenate for mass-balance quality-control measurements, while the remaining algal homogenate was kept on ice to prevent protein denaturation. The broken cells were centrifuged at $1500 \times g$ for 15 min at 4 °C to separate the organelles + cytosol fraction (S1 : supernatant 1) and the debris + granules like fraction (P1 :

pellet 1) (Fig SI.1). After collecting supernatant 1, pellet 1 was resuspended in 500 μL of ultrapure water and heated for 2 min at 100 $^{\circ}\text{C}$ in an oil bath (Cole-Parmer, Canada). Sodium hydroxide solution (500 μL , 1 M NaOH; 99.9%, SigmaAldrich, Canada) was then added and the mixture heated again at 65 $^{\circ}\text{C}$ for 60 min. The suspension was centrifuged at $10,000 \times g$ for 14 min at 20 $^{\circ}\text{C}$ to separate the NaOH-resistant fraction (also referred to as granule-like (GR); P2) from the supernatant comprising the debris fraction (S2). The organelles + cytosol fraction, corresponding to supernatant 1 (S1) obtained from the first centrifugation, was split into the organelles (P3) and cytosol fraction (S3) by ultracentrifugation at $100,000 \times g$ for 60 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. The cytosol fraction was further separated into HSP (S4) and HDP (P4) fractions by heating for 10 min at 80 $^{\circ}\text{C}$ in an oil bath, cooling on ice for 60 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ and then centrifuging at $50,000 \times g$ for 15 min at 4 $^{\circ}\text{C}$.

The $50,000 \times g$ and $100,000 \times g$ centrifugations were carried out using a WX ULTRA 100 centrifuge (Sorval, Ultra Thermo Scientific, Canada) equipped with a F50L-24 \times 1.5 rotor (FisherScientific, Canada), while an IEC Micromac centrifuge (Thermo IEC, USA) was used in all the other cases. All ^{51}Cr measurements were performed by gamma counting as previously mentioned and in order to minimize sample geometry effects, the subcellular fractions have been put into the same water volume (1.5 mL).

SEC-ICP-MS analysis

Chromatographic separation of the HSP fractions collected from algae exposed to either Cr(III) or Cr(VI) during 1 and 72 h was conducted with a thermo spectra HPLC system equipped with an autosampler containing a 100 μL injection loop and a multiple wavelength detector. The sample flow-path of the chromatographic equipment contained metal-free components (mainly PEEK; polyether ether ketone) to preserve the integrity of Cr-biomolecule complexes and minimize unwanted surface interactions. A Thermo Elemental X series (Winsford, England) ICP-MS fitted with a nebulizer and platinum cones was used for ^{52}Cr detection. To minimize isobaric interferences from $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, a collision cell (with He as collision gas) was used which decreased background signal to about 600 counts per second (cps).

Separation of the 100- μ L HSP fractions were performed using a Superdex peptide (SEC_{pep}) 10/30 size exclusion column ensuring a linear mass separation range between 0.1 – 7 kDa (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The Superdex peptide column was calibrated with carbonic anhydrase (10 kDa), Cd-metallothionein2 (Cd-MT2) (6.8 kDa), vitamin B12 (1.3 kDa) and cysteine (0.12 kDa). Fractionation was carried out using 100 mM ammonium acetate (pH = 7.4) as the mobile phase at a flow rate of 0.7 mL \cdot min⁻¹. Before each analysis, the column was flushed with 100 μ L of the mobile phase spiked with 10 mM EDTA. The chromatographic effluent was directly introduced via PEEK tubing into the HPLC UV-visible detector for evaluation of protein absorbance at 570 nm, corresponding to Cr(III) d–d transitions (Döker et al., 2010; Peterson et al., 2008), and subsequently delivered to the ICP-MS for ⁵²Cr analysis. Molecular masses of Cr-binding biomolecules from the HSP fractions were estimated using the molecular weight calibration curve (0.1 – 10 kDa), even for the metal-ligand complexes that eluted outside the linear mass separation range reported for the SEC_{pep} column.

Calculation and statistical analysis

Mass balances for the intracellular fractionation procedure were calculated based on the ratio between the sum of the Cr burdens in the five fractions (DE, GR, ORG, HSP and HDP) divided by the total intracellular Cr burden. For each exposure, and for all measurements, chromium burden was normalized on a per cell basis (in amol/cell).

In the 72 h Cr exposure experiment, the recovery mean for all the subcellular measurements accounted for 105 \pm 3% of the total internalized Cr(III) and 111 \pm 15% in the case of Cr(VI). For the 1 h Cr exposure experiment, the percentage recoveries were 172 \pm 99% for Cr(III) and 159 \pm 91% for Cr(VI). These high mean values and standard deviations are likely due to the low metal accumulation over 1 h. The Cr activities measured by gamma counter in the different subcellular components after a 1 h exposure ranged between 1 and 50 counts per minute (cpm) (compared with values of about 2,000 cpm for the 72 h experiment). In the case of Cr measurements, the background noise of the instrument was around 1 cpm which could translate in large standard deviations associated with some measurements. All numerical data are expressed as arithmetic means \pm standard deviations (SD); n = 3.

Differences in Cr concentrations among the cellular compartments (total accumulated, intracellular and extracellular) and among the various subcellular fractions were assessed by one-way ANOVA using the non-parametric Kruskal-Wallis test on the ranks. For percentages values (peak area %), the data were arcsine transformed before applying parametric statistical tests, one-way ANOVA followed by the Tukey Kramer HSD test. *P*-levels of 0.05 were used as the threshold for statistical significance. Statistical analyses were performed using JMP Pro 11 (SAS Institute Inc., USA) and graphs were prepared with SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc., USA)

Results

Cr(III) and Cr(VI) accumulation in C. reinhardtii

Chlamydomonas reinhardtii accumulated detectable quantities of Cr after 1 and 72 h of exposure to 100 nM of each Cr form and no growth inhibition was observed over 72 h. After 1 h of exposure, chromium content in the extracellular (adsorbed) compartment was significantly higher than in the intracellular (absorbed) one for both Cr(III) (4.59 ± 0.59 vs. 0.97 ± 0.26 amol·cell⁻¹) and Cr (VI) (7.28 ± 2.45 vs. 1.76 ± 0.54 amol·cell⁻¹; Fig. 1A, B). In the case of Cr(III), the opposite situation was observed after 72 h of exposure with extracellular vs. intracellular contents being 2.17 ± 0.29 vs. 5.06 ± 0.97 amol·cell⁻¹ (Fig. 1A). However, no significant differences were observed between the extracellular and the intracellular concentration in the case of Cr(VI) (3.76 ± 1.72 vs. 5.60 ± 0.85 amol·cell⁻¹; Fig.1B).

The total Cr(III) accumulation significantly increased over time, with values of 5.56 ± 0.49 amol·cell⁻¹ after 1 h and 7.23 ± 1.10 amol·cell⁻¹ after 72 h (Fig.1A). However, no differences in total accumulated Cr between the two different exposure periods were observed in the case of Cr(VI) (9.04 ± 2.29 vs. 9.36 ± 2.56 amol·cell⁻¹, Fig.1B). Finally, accumulation of total Cr(VI) was significantly higher than for Cr(III) after 1 h exposure, but did not show significant differences between the two Cr forms after 72 h of exposure (Fig SI.2).

Subcellular partitioning of Cr(III) and Cr(VI)

In the case of Cr(III), no statistically significant differences were observed among the subcellular fractions after a 1 h exposure (Fig. 2). However, the Cr concentration in the HSP ($0.54 \pm 0.34 \text{ amol}\cdot\text{cell}^{-1}$) and ORG ($0.35 \pm 0.16 \text{ amol}\cdot\text{cell}^{-1}$) fractions together represented 59% of the total bioaccumulated Cr. Similarly, the fractions HSP ($2.10 \pm 0.49 \text{ amol}\cdot\text{cell}^{-1}$) and ORG ($2.21 \pm 0.89 \text{ amol}\cdot\text{cell}^{-1}$) represented 64% the total bioaccumulated Cr after 72 hours. Also, at 72 h, Cr accumulation in the GR fraction was significantly higher ($p < 0.05$) than in DE and HDP (Fig. 2). Overall Cr concentrations increased significantly in ORG, GR and HSP fractions between 1 and 72 h of exposure (Fig.2).

In cells exposed to Cr(VI), chromium accumulation in the DE and HDP fractions was significantly lower than in the remaining fractions. No significant differences were observed between these two fractions (DE and HDP) after both 1 h and 72 h of exposure. As in the case of Cr(III) experiments, Cr content in the ORG, GR and HSP fractions increased significantly between 1 h (85% of the total bioaccumulated Cr) and 72 h (94% of the total bioaccumulated Cr) of exposure (Fig. 2).

For Cr accumulation in cells exposed to different redox forms of the element, significant differences were observed only for the HSP fraction after 1 h (0.54 ± 0.35 for Cr(III) vs. $1.47 \pm 0.78 \text{ amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ for Cr(VI)) and for the GR fraction after 72 h with $0.89 \pm 0.26 \text{ amol}\cdot\text{cell}^{-1}$ vs. 1.83 ± 0.51 for Cr(III) and Cr(VI), respectively (Fig SI.3). The Cr content in the other fractions was similar after 72 h or did not show statistically significant differences after 1 h, albeit mean values were higher in cells exposed to Cr(VI) than to Cr(III) (Fig. SI.3).

For the algal cells exposed to Cr(VI) during either 1 h or 72 h, Cr distribution and content did not show statistically significant differences between metal-sensitive compartments (ORG and HDP) and metal-detoxified compartments (GR and HSP) (Fig. SI.4). The Cr content in the metal-sensitive compartments of the cells exposed to Cr(VI) after 1 h ($1.09 \pm 0.87 \text{ amol}\cdot\text{cell}^{-1}$) and 72 h ($2.11 \pm 0.24 \text{ amol}\cdot\text{cell}^{-1}$) were not significantly different. Similarly, Cr content in the metal-detoxified compartments after an exposure to Cr(VI) for 1 h ($2.39 \pm 1.07 \text{ amol}\cdot\text{cell}^{-1}$) or 72 h ($3.71 \pm 0.93 \text{ amol}\cdot\text{cell}^{-1}$) were not significantly different (Fig SI.4). However, in the Cr(III) exposures, a significant increase of Cr content was observed between 1 h and 72 h of exposure in both metal-sensitive and metal-detoxified compartments.

Moreover, both subcellular compartments (metal-sensitive and metal-detoxified) of the cells exposed to Cr(VI) for 1 h contained relatively similar chromium content as those exposed to Cr(III) for the same duration (Fig. SI.5). After a 72 h-exposure, the cells exposed to Cr(III) contained similar Cr content in both metal-sensitive and metal-detoxified compartments as the same compartments of the cells exposed to Cr(VI). However, metal-detoxified compartments of the cells exposed to Cr(VI) contained significantly more Cr than the metal-sensitive compartments of the same cells (Fig. SI.5). Furthermore, for both Cr(III) and Cr(VI) and for both exposure durations, the Cr content in the metal-sensitive compartments was mainly (> 80%) present in the ORG fraction and Cr content was very low and sometimes not statistically different from zero in the HDP fraction (Fig. 2).

SEC-ICP-MS analysis

The HSP fractions of *C. reinhardtii* algae exposed for 1 or 72 h were analyzed by SEC_{pep}-ICP-MS to perform a screening of the Cr-binding biomolecules (Fig. 3). The HPLC-UV detection data at 570 nm for Cr(III) showed two peaks (Fig. 3A), which overlap with the metal elution peaks (Fig. 3B, C). After 72 h of exposure, two Cr peaks were observed at 10.2 min and 23.9 min, while for the cells exposed for 1 h, only one peak was observed at a retention time of 10.2 min (Fig. 3). The area of the Cr_{10.2min} peak ranged around 40% of the total Cr signal for both Cr(III) and Cr(VI) exposed cells (data not shown). However, for both Cr(III) and Cr(VI) cells, the Cr_{23.9 min}-peak area percentages ranged around 60% of total Cr but no significant difference was observed between the two chromium forms in terms of percentage area of the total signal. Following exposures to both Cr forms for 72 h, SEC_{pep}-ICP-MS analysis indicated association of Cr with a high MW biomolecule (~ 28 kDa), corresponding to the peaks denoted as Cr_{10.2} (retention time: 10.2 min), but also with a lower MW bioligand (0.7 kDa) denoted as Cr_{23.9} (Fig. 3C). For both Cr forms and especially for Cr(VI), the higher molecular weight biomolecule (Cr_{10.2}, peak mean area: 5.9×10^4 cps², n = 3) contained more chromium than the molecular component eluted at 23.9 min (peak mean area: 5.2×10^4 cps², n = 3; Fig. 3C).

Discussion

Cr(III) and Cr(VI) accumulation by C. reinhardtii

Typically, metal adsorption reactions occur over short time scales (e.g. minutes (Fortin et al., 2004; Hassler et al., 2004; Schenck et al., 1988)) and our extracellular data indeed show little changes in extracellular Cr concentrations between 1 h and 72 h exposures for both redox Cr forms. On the other hand, accumulation inside the cell increases over time until a steady-state between accumulation, excretion and biodilution through cell division is achieved (e.g. for Cd this occurred after about 24 h; Paquet et al., 2015).

Studies comparing Cr(III) and Cr(VI) uptake are very scarce, especially in algae perhaps due to a general consensus considering Cr(VI) as the most toxic Cr form in the environment, making it the most studied form. However, this consensus was recently questioned by several studies considering Cr(III) speciation during ecotoxicity tests (Bencheikh-Latmani et al., 2007; Kováčik et al., 2015; Thompson et al., 2002; Vignati et al., 2010). Our results contribute to revisiting this tenet as the internalized Cr contents for both Cr forms after exposure to an environmentally relevant concentration of 100 nM were not significantly different when the same incubation time was considered (Fig. SI.2). It is however important to note that our exposure medium, while major cations (Ca and Mg) are representative of soft freshwaters, contains relatively high levels of NH_4^+ (about 1 mM) and PO_4^{3-} (about 0.1 mM) which are required for cell growth. Both compounds have been reported to exert a protective effect against Cr(VI) toxicity to *Chlorella vulgaris* at levels of 3–10 mM for NH_4^+ and 0.1–1 mM for PO_4^{3-} (Liu et al., 2015; Qian et al., 2013). While we have been unable to find similar studies for Cr(III), we acknowledge that extrapolation of our results to other exposure media should be done with care and consider differences and similarities in their composition.

The similar accumulation of Cr(III) and Cr(VI) by *C. reinhardtii* also bears relevance for a correct interpretation of the ecotoxicity of Cr_2O_3 nanoparticles which are increasingly used in leather tanning, pigments manufacture and cosmetics. Release of both Cr(III) and Cr(VI) from these nanoparticles has been reported in studies with *C. reinhardtii* (Costa et al., 2016), *D. magna* and *A. fischeri* (Puerari et al., 2016) and human cell cultures (Horie et al., 2013). Considering our results, studies on the Cr nanoparticles should systematically examine the

bioavailability and toxicity of both forms of released Cr. In the next section we examine the fate of Cr once inside the cells, whether they were exposed to Cr(III) or Cr(VI).

Cr(III) and Cr(VI) subcellular partitioning

Metal distribution in algal subcellular fractions can provide insights in terms of toxic action or detoxification mechanism, as reported in previous studies (Crémazy et al., 2013; Lavoie et al., 2009b). Fractions are operationally defined and need to be interpreted with caution (Giguère et al., 2006). This being said, Lavoie et al. (2009a) showed that over 80% of the citrate synthase activity and over 90% of the cytochrome c oxidase activity, both mitochondrial enzymes, were found in the organelles fraction, indicating a good integrity of organelles.

After 1 h exposure, no significant differences were observed in Cr(III) subcellular partitioning although, based on arithmetic mean values, Cr(III) content decreased in the order: HSP > ORG > GR > DE > HDP. On the other hand, Cr(VI) partitioning after 1 h exposure showed a significantly higher Cr burden in the HSP, GR and ORG fractions compared to DE and HDP fractions. Based on arithmetic means values, Cr(VI) burden decreased in the order: HSP > ORG > GR > DE > HDP. However, after 72 h exposure more pronounced differences were noted, with Cr(III) partitioning into subcellular fractions decreasing in the order: ORG ~ HSP > GR > DE ~ HDP and Cr(VI) partitioning decreasing in the order: ORG ~ HSP ~ GR > DE > HDP. These results showed that the majority of Cr accumulated in *C. reinhardtii* was associated with organelles, HSP and granules fractions without significant differences between Cr(III) and Cr(VI) after 72 h exposure (Fig. 2).

Crémazy et al. (2013) have studied the subcellular distribution of two trivalent metals (Al and Sc) in *C. reinhardtii* after 72 h exposures. Both Al and Sc were mostly found in the organelles fraction followed by debris and granules. However, in contrast with our findings for Cr(III) and Cr(VI), very small proportions of these metals were found in the HSP fraction, suggesting different intracellular pathways for these trivalent elements compared to Cr.

Many reviews have reported that Cr(VI) is rapidly reduced to Cr(III) once inside cells (Cervantes et al., 2001; Viti et al., 2014 and the references therein) and that Cr(VI) can be

reduced to Cr(III) at the surface of *Chlorella miniata* (Han et al., 2007). This could explain the relative similarity between Cr(III) and Cr(VI) subcellular distribution. In biological systems, Cr(III) and Cr(VI) are expected to bind to several chemical groups. Han et al. (2007) showed that Cr(VI) interact with the positively charged groups (i.e., amine group) at the algal surface, and suggested that Cr(III) interacts with the oxygen containing groups, such as carboxylate group. Cr(III) is known for its ability to bind to carboxyl groups (Cervantes et al., 2001; Gardea-Torresdey et al., 2002; Nieboer and Richardson, 1980; Sobol and Schiestl, 2012) and it behaves as many trivalent elements readily forming complexes with a variety of ligands having hydroxyl functional groups (Richard and Bourg, 1991). Moreover, Cr interaction with phosphate groups was also previously observed (e.g. the phosphate groups of di- and triphosphate nucleotides (Arakawa et al., 2000; Wolf et al., 1989)). Metal subcellular distributions may be greatly influenced by ligand preferences, but also by competition for cellular ligands with other cations present in the subcellular fractions (Crémazy et al., 2013).

The chromium content in the ORG fraction increased between 1 and 72 h, while it did not vary or decreased over time in the HDP fraction, which may be linked to the dynamic character of this latter fraction. An important proportion of Cr(III) (around 24% after 1 h and around 40% after 72 h) and Cr(VI) (around 22% after 1 h and around 34% after 72 h) was found in the organelles fraction. This might be the result of the strong binding of chromium (considering that only Cr(III) is expected to be stable in the intracellular environment) with nucleotides and nucleic acids, e.g. adenosine di- and tri-phosphates (ADP, ATP). ADP and ATP are mainly present in mitochondria which produce energy as ATP and are contained in the organelles fractions. Wolf et al. (1989) have examined the interaction of Cr(III) and Cr(VI) with the phosphate groups of di- and triphosphate nucleotides. They found that the formation of Cr-nucleotide complexes, could only be detected with Cr(III) and that Cr(III), generated from Cr(VI) intracellular reduction, interacted also with the phosphate groups of nucleotides. Janson and Cleland (1974) have reported that trivalent chromium ions compete with Mg ions for binding to ADP and ATP, making it unavailable for metabolism. The chromium nucleotide CrATP was found to bind to the glycerokinase tighter than the magnesium nucleotide by factors up to 30 (Janson and Cleland, 1974). Similar results were observed in the case of yeast phosphoglycerate kinase, the acetate kinase of *Escherichia coli*, and yeast hexokinase (Janson and Cleland, 1974). Similarly, Viola et al. (1980) observed a strong inhibition of the yeast enzyme hexokinase in the presence of other trivalent metals such

as Al. This inhibition of enzymes was mainly due to metal binding to ATP or ADP which are substrates for those enzymes and could explain the important presence of Cr in the organelles fraction in our study. Other previously reported aspects of chromium interaction with organelles are the reduction in chloroplast integrity in Cr(VI) treated *Euglena* (between 1.5 and 9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), accompanied by an abnormal increase of the number of plastids, enlarged mitochondria and nuclei (Fasulo et al., 1983).

Important proportions of Cr(III) (around 36% of the total internalized Cr after 1 h and around 39% after 72 h) and Cr(VI) (around 42% after 1 h and around 30% after 72 h) were also found in the cytosolic HSP fraction which includes phytochelatins, GSH and other unidentified peptides. These cysteine-rich thiolated molecules play an important role in metal sequestration and detoxification, especially for “soft” and borderline metals such as Cd and Pb (Lavoie et al., 2009b; Scheidegger et al., 2011). As expected from its hard character, the literature suggests that PC synthesis is not induced by chromium in algae and higher plants (Gorbi et al., 2006; Toppi et al., 2003 and references cited therein). Previous study in *Euglena gracilis* have shown that Cr(VI) induced an increased cysteine and glutathione content, but not in phytochelatins (García-García et al., 2009). Schiavon et al. (2008) have found that, once internalized, Cr(VI) induces transcription of genes associated with sulfur assimilation, cysteine and glutathione synthesis, suggesting that these thiol compounds play a role in Cr tolerance in *Brassica juncea*. In fact, cysteine and GSH are molecules able to reduce Cr(VI) and chelate Cr(III) (Valko et al., 2005).

The partitioning of Cr(III) and Cr(VI) in the granules-like fraction could be associated with sequestration into polyphosphate bodies. In fact, this mode of metal detoxification has been observed and reported in different organisms, including algae. Nishikawa et al. (2003) have observed that cadmium treatment in *Chlamydomonas acidophila* caused ultrastructural changes, polyphosphate degradation and increased vacuolar short-chain and orthophosphates accompanied by the presence of starch grains and vacuoles. Moreover, previous studies have reported the existence of X-ray dense granules containing linear chains of polyphosphates in the cytoplasm and in vacuoles of several algal species exposed to various metals like Cd, Hg and Zn (Jensen et al., 1982; Komine et al., 2000; Visviki and Rachlin, 1992). The relatively important chromium content in the granules-like fraction of the cells in our exposure conditions (16% of the total internalized Cr(III) in the cells after 1 h, around 18% after 72 h;

around 20% of the total internalized Cr(VI) after 1 h and about 30% after 72 h) could be due to its affinity to phosphate contained in these granules and such structures seem to play an important role in chromium detoxification in *C. reinhardtii*.

The small proportions of Cr(III) and Cr(VI) observed in the debris fraction (around 16 % of the total internalized Cr(III) after 1 h and only about 2% after 72 h; around 9% of the total internalized Cr(VI) after 1 h and around 5% after 72 h) could be the result of a strongly effective EDTA wash and rinse procedure and suggest a low accumulation in the nucleus.

Finally, only very small Cr(III) and Cr(VI) proportions (not exceeding 9% after 1 h for both Cr forms, and not exceeding 1 %, after 72 h for both Cr(III) and Cr(VI)) were found in the HDP fraction, considered as metal-sensitive fraction. This fraction probably has a very dynamic nature and could act as a conveyor belt of Cr to the other fractions via the various enzymes that could be involved in the mechanisms of the other fractions such as organelles.

The relative similarity of Cr(III) and Cr(VI) distribution in the different subcellular fractions after both exposure durations (1 and 72 h) agrees with the expected rapid reduction of Cr(VI) to Cr(III) inside the cells (Viti et al., 2014), leading to a similar intracellular behavior despite some significant differences between the proportions of the two Cr forms in some fractions. Moreover, even if the 1 h-experiment resulted in poor metal recoveries due to the low activities after only 1 h, it is nevertheless noteworthy that the distribution remain relatively similar between Cr(III) and Cr(VI). Note also that in some fractions, especially DE and HDP fractions, Cr content was not significantly different from zero.

Grouping the five different fractions into the previously defined subcellular compartments (metal-sensitive and metal-detoxified compartments) reveals no significant differences in Cr partitioning between the two subcellular compartments in *C. reinhardtii* exposed to 100 nM Cr(III) for 1 h . However, Cr concentration increased significantly over time in the two subcellular compartments of the cells exposed to Cr(III) while those exposed to Cr(VI) did not (Fig. SI.4), suggesting higher initial uptake fluxes for Cr(VI) compared to Cr(III).

The similar accumulation and subcellular partitioning observed for the two Cr redox forms does not always agree with the corresponding physiological effects that may be observed in algae exposed to Cr. Szivak et al. (2009) showed that a moderate increase in intracellular ROS

in *C. reinhardtii* was induced by Cr(VI), but not by Cr(III). In the case of Cr(VI), effects on the photosynthetic activity (Didur et al., 2013), chloroplast morphology, pigment composition and photoaccumulation (Rodriguez et al., 2007) were also reported in *C. reinhardtii*, but no comparisons with Cr(III) were performed. Studies with other species reached different conclusions depending on the actual physiological endpoints taken into consideration (Kováčik et al., 2015; Jasso-Chávez et al., 2010; Lira-Silva et al., 2011; Volland et al., 2012). Comparisons between the effects of Cr(VI) and Cr(III) should become more systematic to get a better understanding of their relative effects on algal physiology.

SEC-ICP-MS analysis

SEC-ICP-MS analyses allowed for the determination of the distribution of Cr bound to biomolecules differing in molecular weight in the HSP fraction of *C. reinhardtii*. Such screening provides insight on the nature and identity of the observed chromium-biomolecule complexes. Amino acids, low molecular weight peptides such as glutathione, phytochelatin (PC; e.g., PC₂-PC₄) and other unidentified peptides (Lavoie et al., 2009b) are cytosolic ligands expected to be found in the HSP fraction. Such thermostable ligands are involved in the detoxification of soft metals in microalgae (Crémazy et al., 2013; Lavoie et al., 2009b) but the ligands involved in the detoxification of hard metals such as chromium are not as well known. Chromium showed two peaks denoted as Cr_{10.2min} and Cr_{23.9min} in the HSP fraction of algae exposed for 72 h to either Cr(III) or Cr(VI) and only one peak denoted as Cr_{10.2min} in the HSP fraction of the algae exposed for 1 h to either Cr(III) or Cr(VI). The fact that the peaks observed in the case of Cr(III) and Cr(VI) are similar in terms of the retention times in the chromatograms lead us to suggest that only Cr(III) is detectable in the cells following rapid reduction of Cr(VI) to Cr(III) (Cervantes et al., 2001; Viti et al., 2014; and references cited therein).

As anticipated, chromium did not elute with cysteine as well as with the other compounds used as calibration standards, and neither with glutathione (0.3 kDa) or phytochelatin PC₂₋₄ (0.5 kDa, 0.8 kDa, 1.0 kDa). Since Cr is classified as a hard metal (da Silva and Williams, 2001), it is more likely to interact with oxygen containing ligands than with thiolated ligands.

The Cr_{23.9min} peak observed at 0.7 kDa could correspond to Cr(III)-Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Cr(III)-NAD⁺). Such complex have already been reported as end-product of Cr(VI) reduction in *Escherichia coli* (Puzon et al., 2002) and have the same molecular weight. Similar peaks with retention times around 23 min and molecular weight ranging between 0.12 kDa and 1.3 kDa were observed in the case of Hg-GSH and Zn-GSH in metal-exposed microalgae (Gómez-Jacinto et al., 2015), but Cr-GSH complex molecular weight (0.3 kDa) does not correspond to the observed peak even if GSH is a molecule able to reduce Cr(VI) and chelate Cr(III) (Valko et al., 2005). The Cr_{10.2min} peak could correspond to Cr-carbonic anhydrase 3 (Cr-Cah3; 28 kDa) which was previously observed in cells of *C. reinhardtii* (Mitra et al., 2005) and matches in molecular weight to the observed peak. The appearance of the second peak Cr_{23.9min} after 72 h, could be linked to the observed significant increase of Cr content in the HSP fractions of the cells exposed to either Cr(III) or Cr(VI) for 72 h compared to those exposed for 1 h. Even if no significant difference was observed in terms of Cr content in the HSP fractions between the cells exposed for 72 h to either Cr(III) or Cr(VI) (Fig. SI 3), the peak Cr_{10.2min} is higher for Cr(VI) than Cr(III) treated cells. These unidentified ligands may play an important role in the internal handling and/or reduction of Cr(VI) and their identification requires further investigations.

Conclusion

Our result showed rapid adsorption (1 hour exposure) onto cells followed by steady-state intracellular Cr content in algal cells exposed to an environmentally relevant concentration of Cr(III) and Cr(VI) over 72 h. Furthermore, Cr(III) and Cr(VI) had similar subcellular partitioning, suggesting that they have similar intracellular fate. To the best of our knowledge, this is the first time that the partitioning of Cr(III) and Cr(VI) to subcellular components in an algal cells has been assessed and a metallomic approach applied to algal HSP fractions. The metallomic analyses showed that Cr eluted at identical times regardless of cells exposure to Cr(III) or Cr(VI), indicating intracellular binding of Cr by the same ligands. For a 72 h exposure, the peak eluting after 10.2 min was greater for the cells incubated in the presence of Cr(VI) than for Cr(III). These ligands are tentatively identified as Cr-carbonic anhydrase (Cr_{10.2min} peak) and Cr-NAD⁺ (Cr_{23.9min} peak), but their exact identification needs further investigation. All the observed similarities can be explained by the rapid reduction that Cr(VI)

undergoes once internalized into cells and may indicate a common toxicity and resistance mechanisms for Cr(III) and Cr(VI) in *C. reinhardtii* algal cells.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the technical assistance provided by K. Racine, L. Rancourt and S. Prémont. Financial support was provided by *the French National Research Agency through the national program “Investissements d’avenir” (ANR-10-LABX-21-01 / LABEX RESSOURCES21)*, the Ministry of National Education, Higher Education and Research (France) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. C. Fortin is supported by the Canada Research Chair Program.

References

- Arakawa, H., Ahmad, R., Naoui, M., Tajmir-Riahi, H.A., 2000. A comparative study of calf thymus DNA binding to Cr(III) and Cr(VI) ions. Evidence for the guanine N-7-chromium-phosphate chelate formation. *J. Biol. Chem.* 275, 10150–10153. doi:10.1074/jbc.275.14.10150
- Asatiani, N.V., Abuladze, M.K., Kartvelishvili, T.M., Bakradze, N.G., Sapojnikova, N.A., Tsibakhashvili, N.Y., Tabatadze, L.V., Lejava, L.V., Asanishvili, L.L., Holman, H.-Y., 2004. Effect of chromium(VI) action on *Arthrobacter oxydans*. *Curr. Microbiol.* 49, 321–326. doi:10.1007/s00284-004-4351-2
- Bencheikh-Latmani, R., Obraztsova, A., Mackey, M.R., Ellisman, M.H., Tebo, B.M., 2007. Toxicity of Cr(III) to *Shewanella sp.* strain MR-4 during Cr(VI) reduction. *Environ. Sci. Technol.* 41, 214–220. doi:10.1021/es0622655
- Campbell P.G.C., Hare, L., 2009. Metal detoxification in freshwater animals. Roles of metallothioneins, in: *Metallothioneins and Related Chelators: Metal Ions in Life Sciences*. Vol 5. The Royal Society of Chemistry, pp 239–277.
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J.C., Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 335–347. doi:10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x
- Crémazy, A., Levy, J.L., Campbell, P.G.C., Fortin, C., 2013. Uptake and subcellular partitioning of trivalent metals in a green alga: comparison between Al and Sc. *Biometals* 26, 989–1001. doi:10.1007/s10534-013-9675-6
- da Costa, C.H., Perreault, F., Oukarroum, A., Melegari, S.P., Popovic, R., Matias, W.G., 2016. Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Total Environ.* 565, 951–960. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.028
- da Silva, J.J.R.F., Williams, R.J.P., 2001. *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*, second ed. Oxford University Press, New York.
- Dhal, B., Thatoi, H.N., Das, N.N., Pandey, B.D., 2013. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review. *J. Hazard Mater.* 250–251, 272–291. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.01.048
- Didur, O., Dewez, D., Popovic, R., 2013. Alteration of chromium effect on photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures under different synchronized state of the cell cycle. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 1870–1875. doi:10.1007/s11356-012-1389-8
- Döker, S., Mounicou, S., Doğan, M., Lobinski, R., 2010. Probing the metal-homeostasis effects of the administration of chromium(VI) to mice by ICP MS and size-exclusion chromatography-ICP MS. *Metallomics* 2, 549–555. doi:10.1039/C004508J
- Fasulo, M.P., Bassi, M., Donini, A., 1983. Cytotoxic effects of hexavalent chromium in *Euglena gracilis*. II. Physiological and ultrastructural studies. *Protoplasma* 114, 35–43. doi:10.1007/BF01279866
- Fortin, C., Dutel, L., Garnier-Laplace, J., 2004. Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 974–981. doi:10.1897/03-90
- García-García, J.D., Rodríguez-Zavala, J.S., Jasso-Chávez, R., Mendoza-Cozatl, D., Moreno-Sánchez, R., 2009. Chromium uptake, retention and reduction in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 191, 431–440. doi:10.1007/s00203-009-0469-8

- Gardea-Torresdey, J.L., Dokken, K., Tiemann, K.J., Parsons, J.G., Ramos, J., Pingitore, N.E., Gamez, G., 2002. Infrared and X-ray absorption spectroscopic studies on the mechanism of chromium(III) binding to alfalfa biomass. *Microchem. J.* 71, 157–166. doi:10.1016/S0026-265X(02)00007-3
- Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Couture, P., 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol.* 77, 178–189. doi:10.1016/j.aquatox.2005.12.001
- Gómez-Jacinto, V., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., Garbayo-Nores, I., Vilchez-Lobato, C., 2015. Elucidation of the defence mechanism in microalgae *Chlorella sorokiniana* under mercury exposure. Identification of Hg–phytochelatins. *Chem. Biol. Interact.* 238, 82–90. doi:10.1016/j.cbi.2015.06.013
- Gorbi, G., Torricelli, E., Pawlik-Skowrońska, B., di Toppi, L.S., Zanni, C., Corradi, M.G., 2006. Differential responses to Cr(VI)-induced oxidative stress between Cr-tolerant and wild-type strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Aquat. Toxicol.* 79, 132–139. doi:10.1016/j.aquatox.2006.06.002
- Han, X., Wong, Y.S., Wong, M.H., Tam, N.F.Y., 2007. Biosorption and bioreduction of Cr(VI) by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*. *J. Hazard. Mater.* 146, 65–72. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.11.053
- Hassler, C.S., Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2004. Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol. Oceanogr. Methods* 2, 237–247. doi:10.4319/lom.2004.2.237
- Horie, M., Nishio, K., Endoh, S., Kato, H., Fujita, K., Miyauchi, A., Nakamura, A., Kinugasa, S., Yamamoto, K., Niki, E., Yoshida, Y., Iwahashi, H., 2013. Chromium(III) oxide nanoparticles induced remarkable oxidative stress and apoptosis on culture cells. *Environ. Toxicol.* 28, 61–75. doi:10.1002/tox.20695
- Janson, C.A., Cleland, W.W., 1974. The specificity of chromium nucleotides as inhibitors of selected kinases. *J. Biol. Chem.* 249, 2572–2574.
- Jasso-Chávez, R., Pacheco-Rosales, A., Lira-Silva, E., Gallardo-Perez, J.C., Garcia, N., Moreno-Sanchez, R., 2010. Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*. *Aquat. Toxicol.* 100:329–338. doi:10.1016/j.aquatox.2010.08.006
- Jensen, T.E., Baxter, M., Rachlin, J.W., Jani, V., 1982. Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (cyanophyceae) into cellular components, especially polyphosphate bodies: An X-ray energy dispersive study. *Environ. Pollut. Ser.A.* 27, 119–127. doi:10.1016/0143-1471(82)90104-0
- Kotaś, J., Stasicka, Z., 2000. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ. Pollut.* 107, 263–283. doi:10.1016/S0269-7491(99)00168-2
- Komine, Y., Eggink, L.L., Park, H., Hooper, J.K., 2000. Vacuolar granules in *Chlamydomonas reinhardtii*: polyphosphate and a 70-kDa polypeptide as major components. *Planta* 210, 897–905. doi:10.1007/s004250050695
- Kováčik, J., Babula, P., Hedbavny, J., Kryštofová, O., Provazník, I., 2015. Physiology and methodology of chromium toxicity using alga *Scenedesmus quadricauda* as model object. *Chemosphere* 120, 23–30. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.05.074
- Lavoie, M., Bernier, J., Fortin, C., Campbell, P.G.C., 2009a. Cell homogenization and subcellular fractionation in two phytoplanktonic algae: Implications for the assessment of metal subcellular distributions. *Limnol. Oceanogr. Methods.* 7, 277–286. doi:10.4319/lom.2009.7.277

- Lavoie, M., Le Faucheur, S., Fortin, C., Campbell, P.G.C., 2009b. Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquat. Toxicol.* 92, 65–75. doi:10.1016/j.aquatox.2008.12.007
- Lira-Silva, E., Ramirez-Lima, I.S., Olin-Sandoval, V., Garcia-Garcia, J.D., Garcia-Contreras, R., Moreno-Sanchez, R., Jasso-Chavez, R., 2011. Removal, accumulation and resistance to chromium in heterotrophic *Euglena gracilis*. *J. Hazard Mater.* 193:216–224. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.07.056
- Liu, J., Sun, Z., Lavoie, M., Fan, X., Bai, X., Qian, H., 2015. Ammonium reduces chromium toxicity in the freshwater alga *Chlorella vulgaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 3249–3258. doi: 10.1007/s00253-014-6218-1
- Markiewicz, B., Komorowicz, I., Sajnog, A., Belter, M., Baralkiewicz, D., 2015. Chromium and its speciation in water samples by HPLC/ICP-MS – technique establishing metrological traceability: A review since 2000. *Talanta* 132, 814–828. doi:10.1016/j.talanta.2014.10.002
- Mitra, M., Mason, C.B., Xiao, Y., Ynalvez, R.A., Lato, S.M., Moroney, J.V., 2005. The carbonic anhydrase gene families of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Can. J. Bot.* 83, 780–795. doi:10.1139/b05-065
- Nieboer, E., Richardson, D.H.S., 1980. The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. Ser.B.* 1, 3–26. doi:10.1016/0143-148X(80)90017-8
- Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., Tominaga, N., 2003. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 253–259. doi:10.1016/S0168-6496(03)00049-7
- Paquet, N., Lavoie, M., Maloney, F., Duval, J.F.L., Campbell, P.G.C., Fortin, C., 2015. Cadmium accumulation and toxicity in the unicellular alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Influence of metal-binding exudates and exposure time. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1524–1532. doi:10.1002/etc.2927
- Parker, D.L., Borer, P., Bernier-Latmani, R., 2011. The response of *Shewanella oneidensis* MR-1 to Cr(III) toxicity differs from that to Cr(VI). *Front. Microbiol.* 2. doi:10.3389/fmicb.2011.00223
- Peterson, R.L., Banker, K.J., Garcia, T.Y., Works, C.F., 2008. Isolation of a novel chromium(III) binding protein from bovine liver tissue after chromium(VI) exposure. *J. Inorg. Biochem.* 102, 833–841. doi:10.1016/j.jinorgbio.2007.12.003
- Puerari, R.C., da Costa, C.H., Vicentini, D.S., Fuzinato, C.F., Melegari, S.P., Schmidt, E.C., Bouzon, Z.L., Matias, W.G., 2016. Synthesis, characterization and toxicological evaluation of Cr₂O₃ nanoparticles using *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 128, 36–43. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.02.011
- Puzon, G.J., Petersen, J.N., Roberts, A.G., Kramer, D.M., Xun, L., 2002. A bacterial flavin reductase system reduces chromate to a soluble chromium(III)–NAD⁺ complex. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 294, 76–81. doi:10.1016/S0006-291X(02)00438-2
- Qian, H.F., Sun, Z.Q., Sun, L.W., Jiang, Y.F., Wei, Y., Xie, J., Fu, Z.W., 2013. Phosphorus availability changes chromium toxicity in the freshwater alga *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere* 93, 885–891. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.05.035
- Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., Cervantes, C., 2008. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21, 321–332. doi:10.1007/s10534-007-9121-8
- Richard, F.C., Bourg, A.C.M., 1991. Aqueous geochemistry of chromium: A review. *Water Res.* 25, 807–816. doi:10.1016/0043-1354(91)90160-R

- Rodríguez, M.C., Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Conforti, V., Gualtieri, P., Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Res.* 105, 234–239. doi:10.1016/j.envres.2007.01.011
- Rosabal, M., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2012. Subcellular metal partitioning in larvae of the insect *Chaoborus* collected along an environmental metal exposure gradient (Cd, Cu, Ni and Zn). *Aquat. Toxicol.* 120–121, 67–78. doi:10.1016/j.aquatox.2012.05.001
- Scheidegger, C., Behra, R., Sigg, L., 2011. Phytochelatin formation kinetics and toxic effects in the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii* upon short- and long-term exposure to lead(II). *Aquat. Toxicol.* 101, 423–429. doi:10.1016/j.aquatox.2010.11.016
- Schenck, R.C., Tessier, A., Campbell, P.G.C., 1988. The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. *Limnol. Oceanogr.* 33, 538–550. doi:10.4319/lo.1988.33.4.0538
- Schiavon, M., Pilon-Smits, E.A.H., Wirtz, M., Hell, R., Malagoli, M., 2008. Interactions between chromium and sulfur metabolism in *Brassica juncea*. *J. Environ. Qual.* 37, 1536–1545. doi:10.2134/jeq2007.0032
- Sobol, Z., Schiestl, R.H., 2012. Intracellular and extracellular factors influencing Cr(VI) and Cr(III) genotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 53, 94–100. doi:10.1002/em.20679
- Szivak, I., Behra, R., Sigg, L., 2009. Metal-induced reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 45, 427–435. doi:10.1111/j.1529-8817.2009.00663.x
- Thompson, S.L., Manning, F.C.R., McColl, S.M., 2002. Comparison of the toxicity of chromium III and chromium VI to cyanobacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 286–293. doi:10.1007/s00128-002-0059-9
- Toppi, L.S.D., Gremigni, P., Pawlik-Skowrońska, B., Prasad, M.N.V., Cobbett, C.S., 2003. Response to heavy metals in plants: a molecular approach, in: di Toppi, L.S., Pawlik-Skowrońska, B. (Eds.), *Abiotic Stresses in Plants*. Springer Netherlands, pp. 133–156.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161–1208. doi:10.2174/0929867053764635
- Vignati, D.A.L., Dominik, J., Beye, M.L., Pettine, M., Ferrari, B.J.D., 2010. Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: A paradigm to revise? *Ecotox. and Environ. Safe.* 73, 743–749. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.01.011
- Viola, R.E., Morrison, J.F., Cleland, W.W., 1980. Interaction of metal(III)-adenosine 5'-triphosphate complexes with yeast hexokinase. *Biochemistry-US* 19, 3131–3137. doi:10.1021/bi00555a003
- Visviki, I., Rachlin, J.W., 1992. Ultrastructural changes in *Dunaliella minuta* following acute and chronic exposure to copper and cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 420–425. doi:10.1007/BF00203803
- Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., Giovannetti, L., 2014. Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 633–659. doi:10.1111/1574-6976.12051
- Volland, S., Lütz, C., Michalke, B., Lütz-Meindl, U., 2012. Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*. *Aquat. Toxicol.* 109, 59–69. doi:10.1016/j.aquatox.2011.11.013
- Wallace, W.G., Lee, B., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249, 183–197. doi:10.3354/meps249183
- Wolf, T., Kasemann, R., Ottenwälder, H., 1989. Molecular interaction of different chromium species with nucleotides and nucleic acids. *Carcinogenesis* 10, 655–659. doi:10.1093/carcin/10.4.655

Figure Captions

Fig. 1. Mean Cr concentrations (in $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$; \pm SD, $n = 3$) of *C. reinhardtii* following 1-h and 72-h exposures to Cr(III) (A) or Cr(VI) (B) as total accumulated, extracellular and intracellular compartments. Different letters indicate statistical significant differences (ANOVA followed by Tukey Kramer HSD test; $P < 0.05$).

Fig. 2. Mean Cr concentrations (in $\text{amol}\cdot\text{cell}^{-1}$; \pm SD, $n = 3$) in each subcellular fractions (ORG: organelles; GR: granules; DE: cellular debris, HDP: heat-denatured proteins; HSP: heat-stable proteins) of *C. reinhardtii* following 1-h (white bars) and 72-h (black bars) exposures to Cr(III) or Cr(VI). Different letters indicate statistical significant differences (ANOVA followed by the Tukey Kruskal wallis test, $P < 0.05$).

Fig. 3. SEC_{peptide} chromatograms of the HSP fractions of *C. reinhardtii* A) with UV detection at 570 nm after a 1-h or 72-h exposure to Cr (VI), or with ICP-MS detection for algae exposed to 1 h (B) or 72 h (C). Data for Cr(III) is represented by black lines whereas Cr(VI) by gray lines in panels B and C. Vertical dotted lines represent retention times of the MW standards. Cr_{10.2} and Cr_{23.9} represent the Cr peaks observed by SEC_{peptide}-ICP-MS.

Figure 1

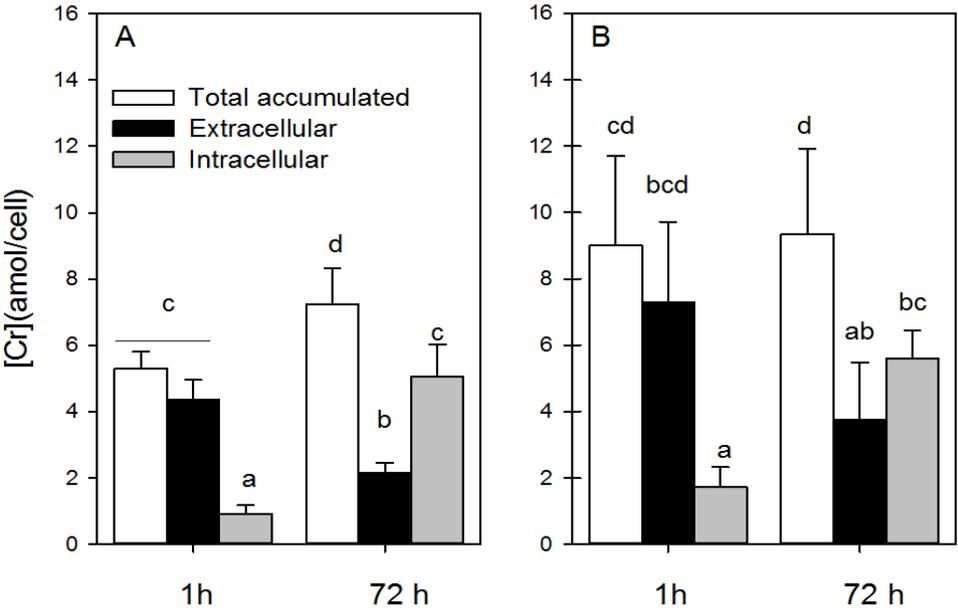


Figure 2

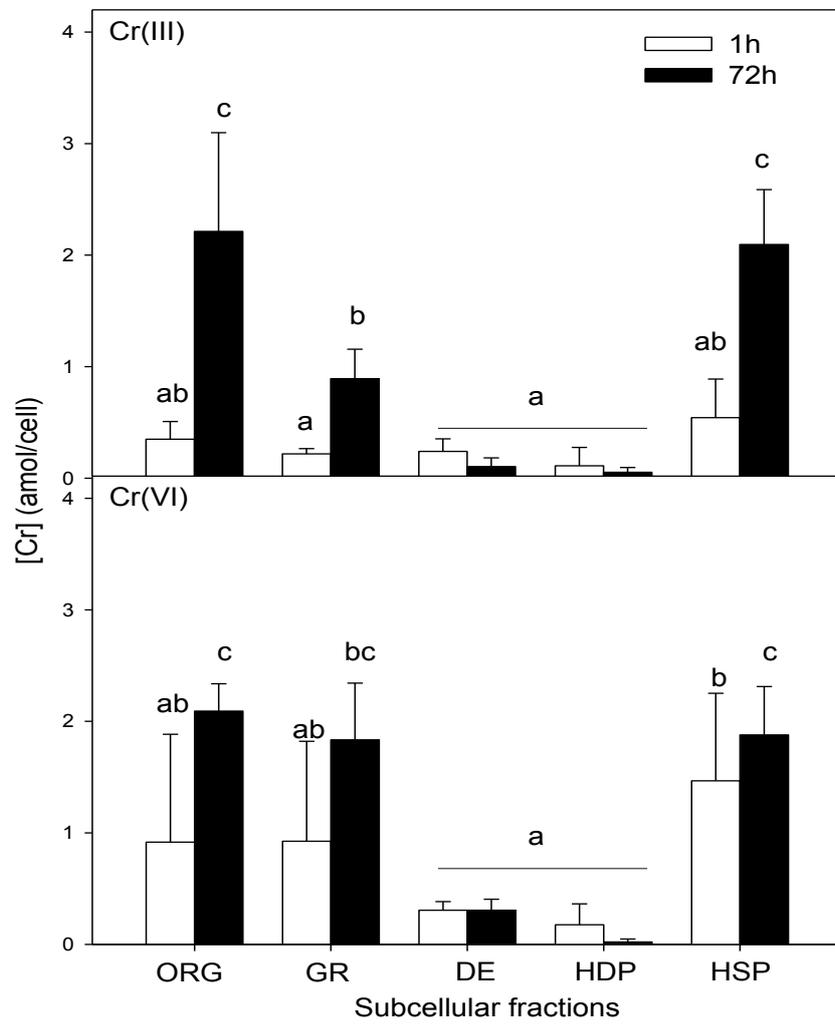
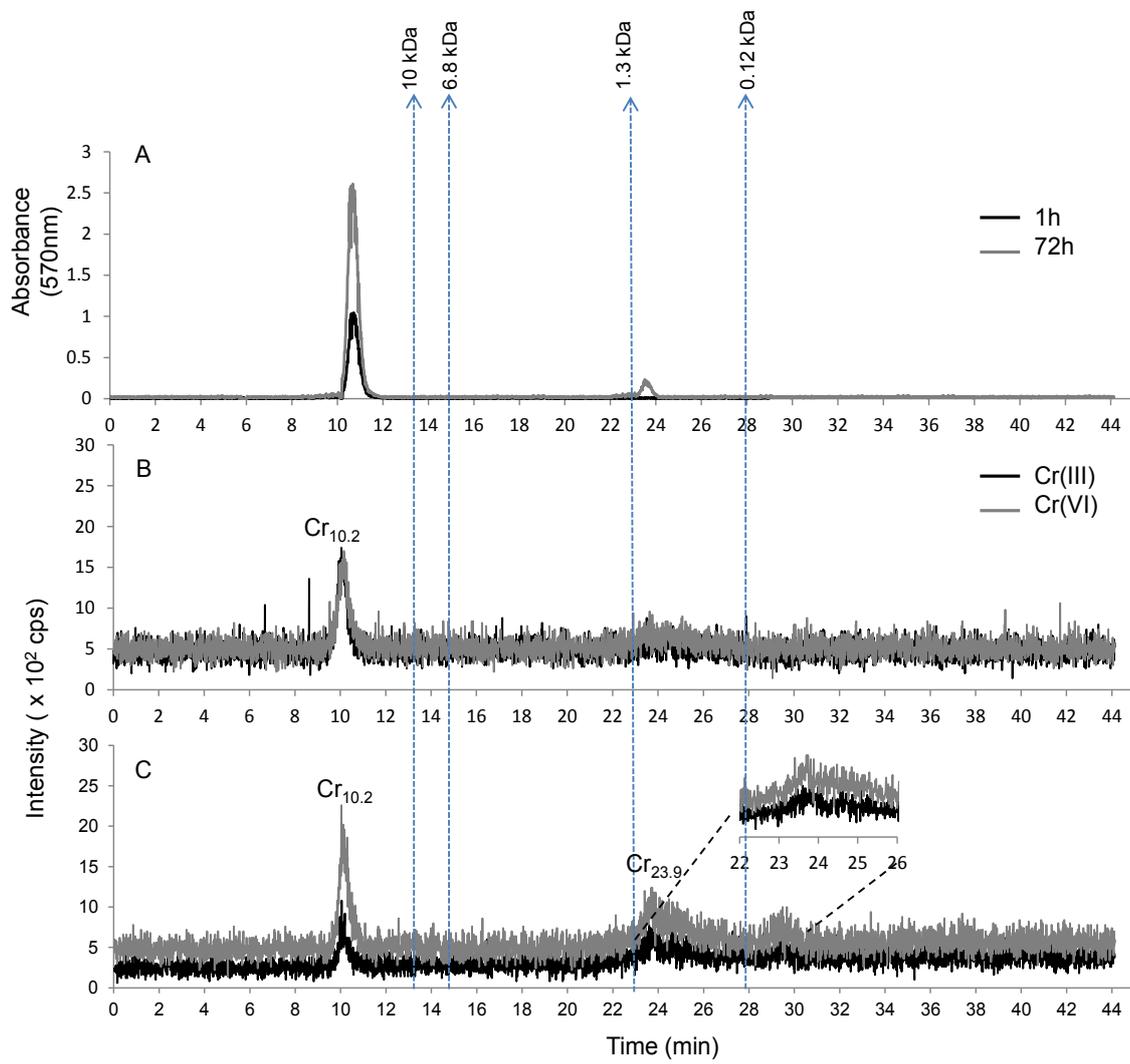


Figure 3



Bioaccumulation and subcellular partitioning of Cr(III) and Cr(VI) in the freshwater green
alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Imad Aharchaou^a, Maikel Rosabal^b, Fengjie Liu^b, Eric Battaglia^a, Davide A.L Vignati^a and
Claude Fortin^{b,*}

^a Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, UMR 7360, Université de
Lorraine and CNRS, 8 rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

^b Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement (INRS-
ETE), 490 rue de la Couronne, Québec (Québec), Canada G1K 9A9

Supporting Information

Table SI-1: Molar concentrations of the used cations and anions in the preparation of culture media MHSM-1, Rinse solution, EDTA solution and exposure medium.

Ions	Culture MHSM-1(M)	Rinse solution or MHSM-R (M)	EDTA solution or MHSM-E (M)	Exposure Medium (M)
NH ₄ ⁺	9.37 x 10 ⁻⁴	9.37 x 10 ⁻⁴	9.37 x 10 ⁻⁴	9.37 x 10 ⁻⁴
Cl ⁻	5.98 x 10 ⁻⁶	-	-	5.98 x 10 ⁻⁶
K ⁺	4.22 x 10 ⁻³	4.22 x 10 ⁻³	4.22 x 10 ⁻³	4.22 x 10 ⁻³
PO ₄ ³⁻	1.37 x 10 ⁻⁴	1.37 x 10 ⁻⁴	1.37 x 10 ⁻⁴	1.37 x 10 ⁻⁴
NO ₃ ⁻	5.07 x 10 ⁻³	5.07 x 10 ⁻³	5.07 x 10 ⁻³	5.07 x 10 ⁻³
SO ₄ ²⁻	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵
Mg ²⁺	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵	8.12 x 10 ⁻⁵
Ca ²⁺	6.80 x 10 ⁻⁵	6.80 x 10 ⁻⁵	6.80 x 10 ⁻⁵	6.80 x 10 ⁻⁵
Na ⁺	1.02 x 10 ⁻⁴	Variable	Variable	Variable
BO ₃ ³⁻	3.01 x 10 ⁻⁶	-	-	3.01 x 10 ⁻⁶
Mn	2.10 x 10 ⁻⁶	-	-	2.10 x 10 ⁻⁶
Fe	5.92 x 10 ⁻⁷	-	-	5.92 x 10 ⁻⁷
MoO ₄	3.00 x 10 ⁻⁸	-	-	3.00 x 10 ⁻⁸
Zn	2.43 x 10 ⁻⁸	-	-	2.43 x 10 ⁻⁸
Co	1.09 x 10 ⁻⁸	-	-	1.09 x 10 ⁻⁸
Cu	7.04 x 10 ⁻¹¹	-	-	7.04 x 10 ⁻¹¹
EDTA	8.06 x 10 ⁻⁷	-	1.01 x 10 ⁻⁴	8.06 x 10 ⁻⁷
MOPS	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²
CO ₃ ²⁻	atm ^a	atm ^a	atm ^a	atm ^a
Cr ³⁺	-	-	-	variable
CrO ₄ ⁻	-	-	-	variable

^a: Open to the atmosphere

-: not used in the medium preparation

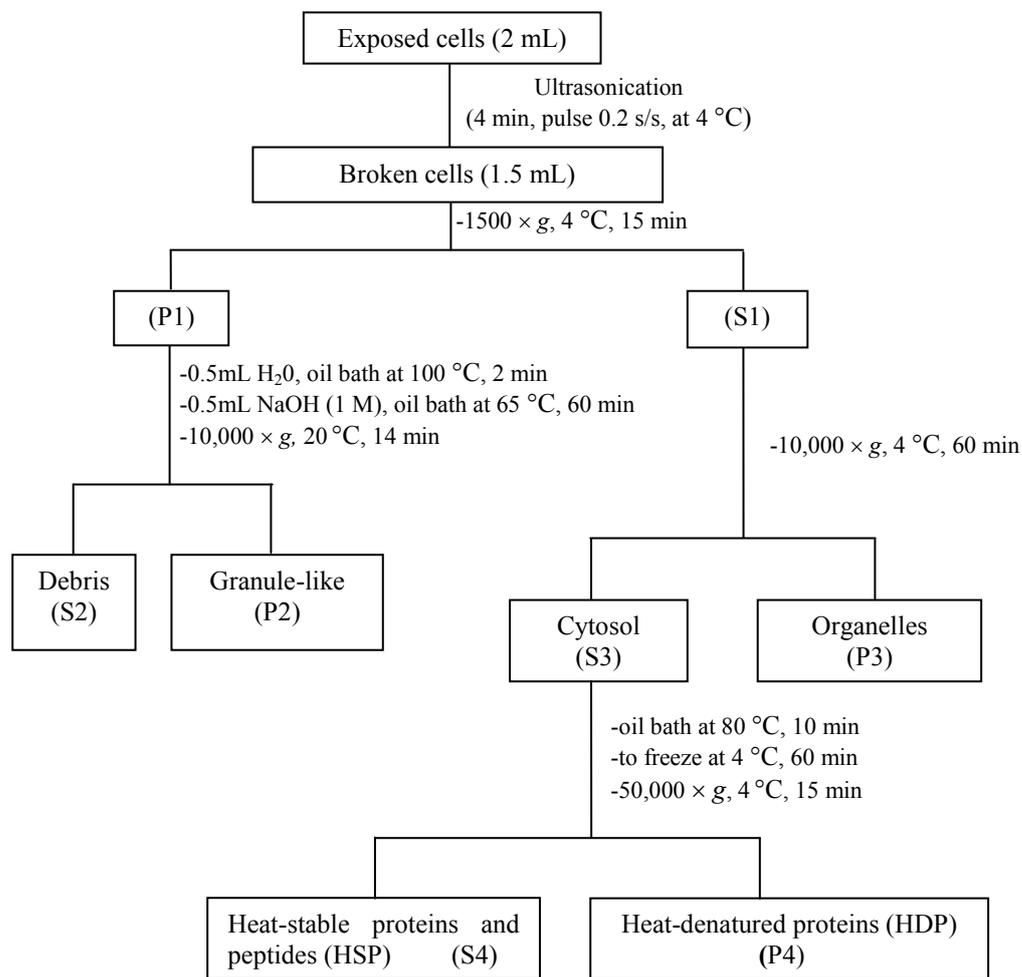


Fig SI-1 Subcellular partitioning protocol used to separate algae into different subcellular fractions (redrawn from Lavoie et al. 2009 and Wallace et al. 2003). S: supernatant, P: pellet.

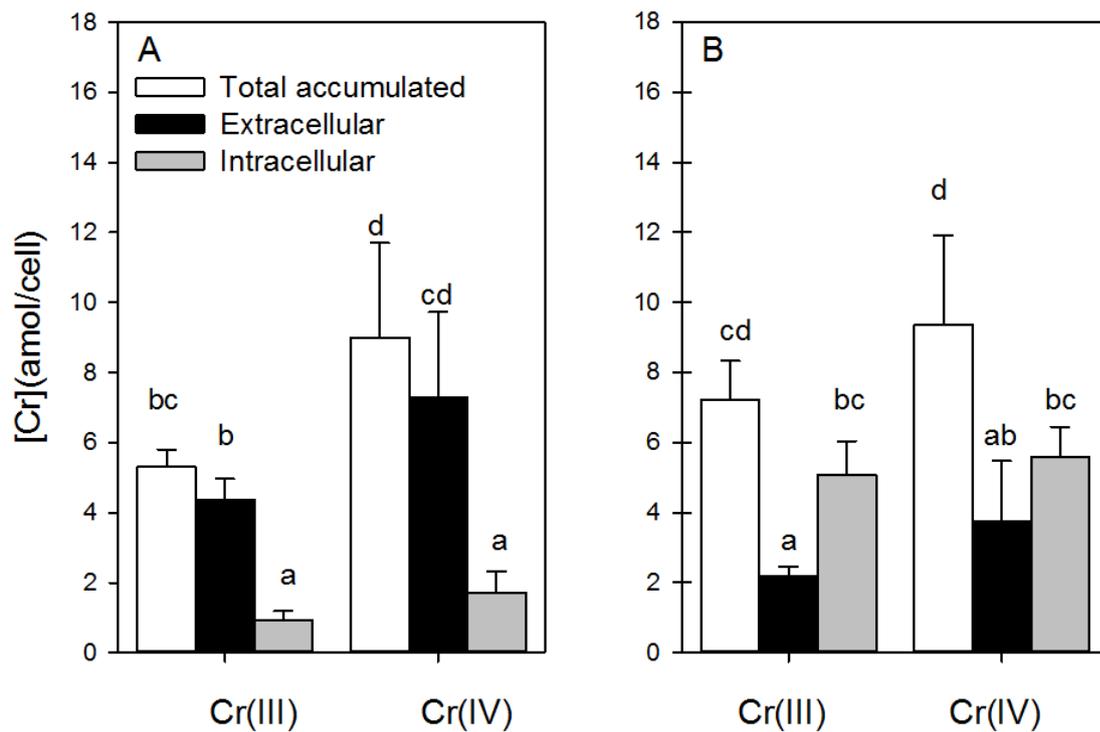


Fig SI-2 Mean (\pm SD, $n = 3$) [Cr] (amol/cell) of *C. reinhardtii* following a 1-h (panel A) and 72-h (panel B) exposure to Cr(III) (left bars) or Cr(VI) (right bars) as total accumulated, extracellular and intracellular compartments. Bars with different letters indicate significant statistical differences (ANOVA followed by Kruskal Wallis test; $P < 0.05$).

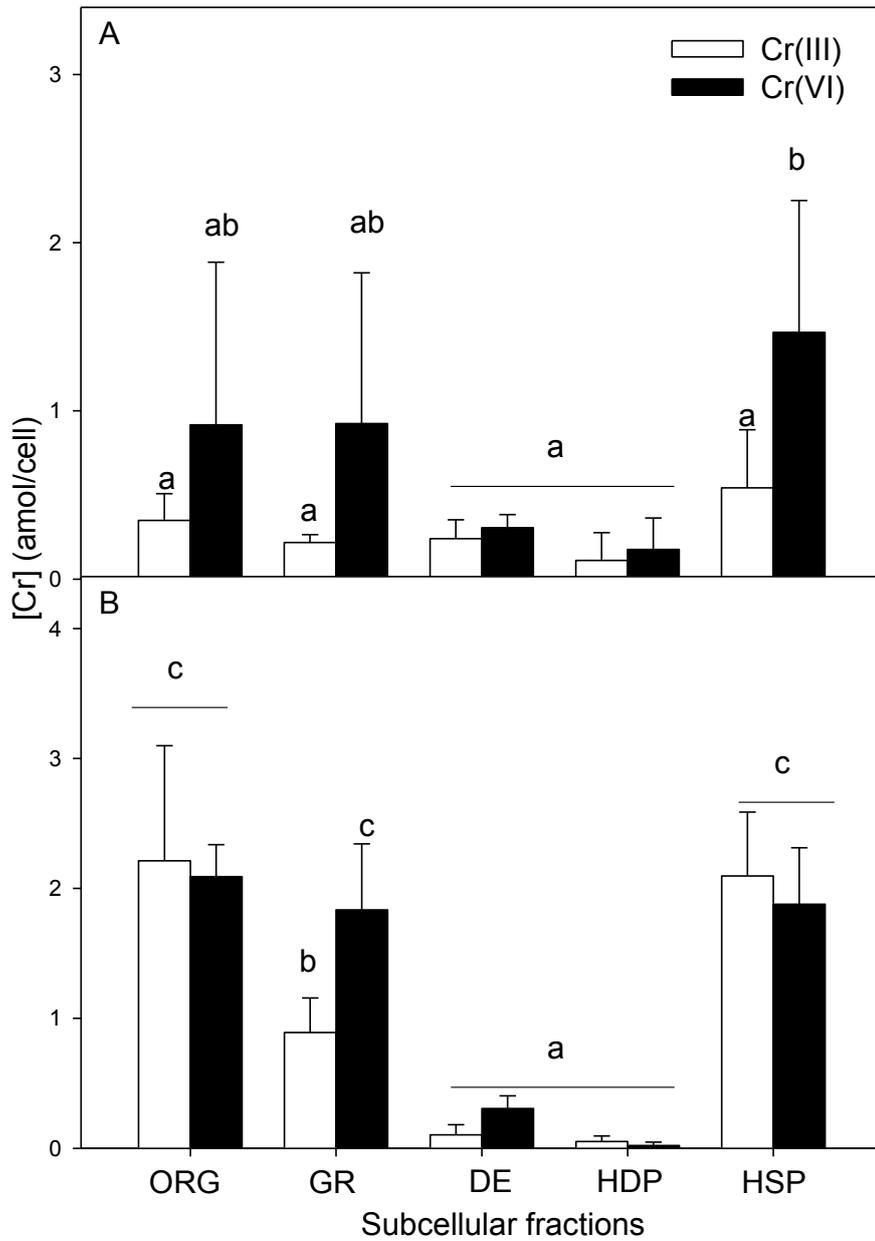


Fig SI-3: Mean Cr concentrations (amol/cell; \pm SD, n = 2-3) in each subcellular fractions (ORG: organelles; GR: granules; DE: cellular debris, HDP: heat-denatured proteins; HSP: heat-stable proteins) of *C. reinhardtii* exposed to Cr(III) (white bars) or Cr(VI) (black bars) after 1h (panel A) and 72 h (panel B). Bars with the same letters indicate non-significant differences, whereas different letters indicate that the differences are significant (ANOVA followed by the Kruskal Wallis test, $P < 0.05$).

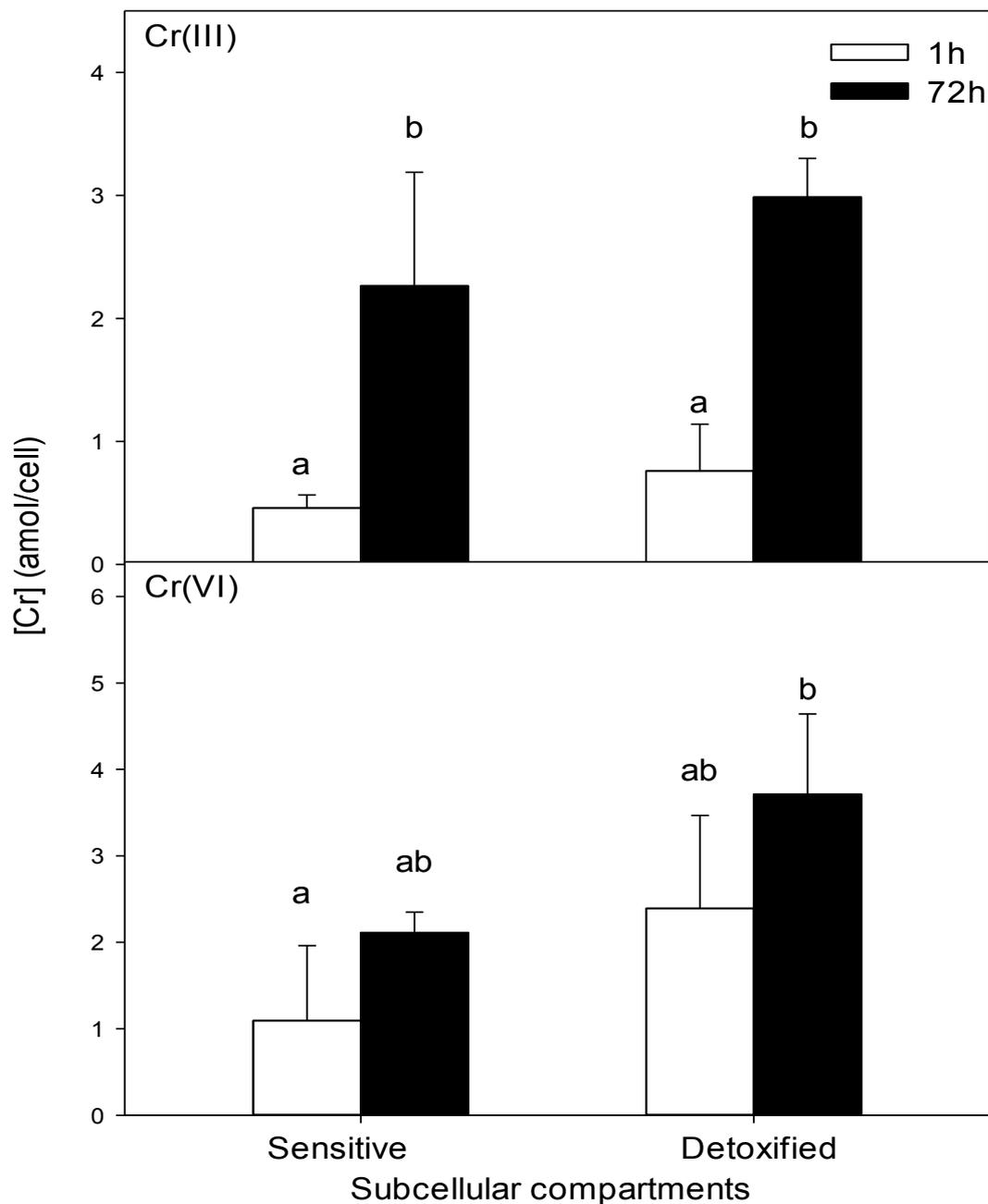


Fig SI-4 Mean Cr concentrations (amol/cell; \pm SD, $n = 2-3$) in metal-sensitive compartment and metal-detoxified compartment of *C. reinhardtii* following a 1-h (white bars) or 72-h (black bars) exposure to Cr(III) or Cr(VI). Bars with the same letters indicate non-significant differences, whereas different letters indicate that the differences are significant (ANOVA followed by Kruskal Wallis test, $P < 0.05$).

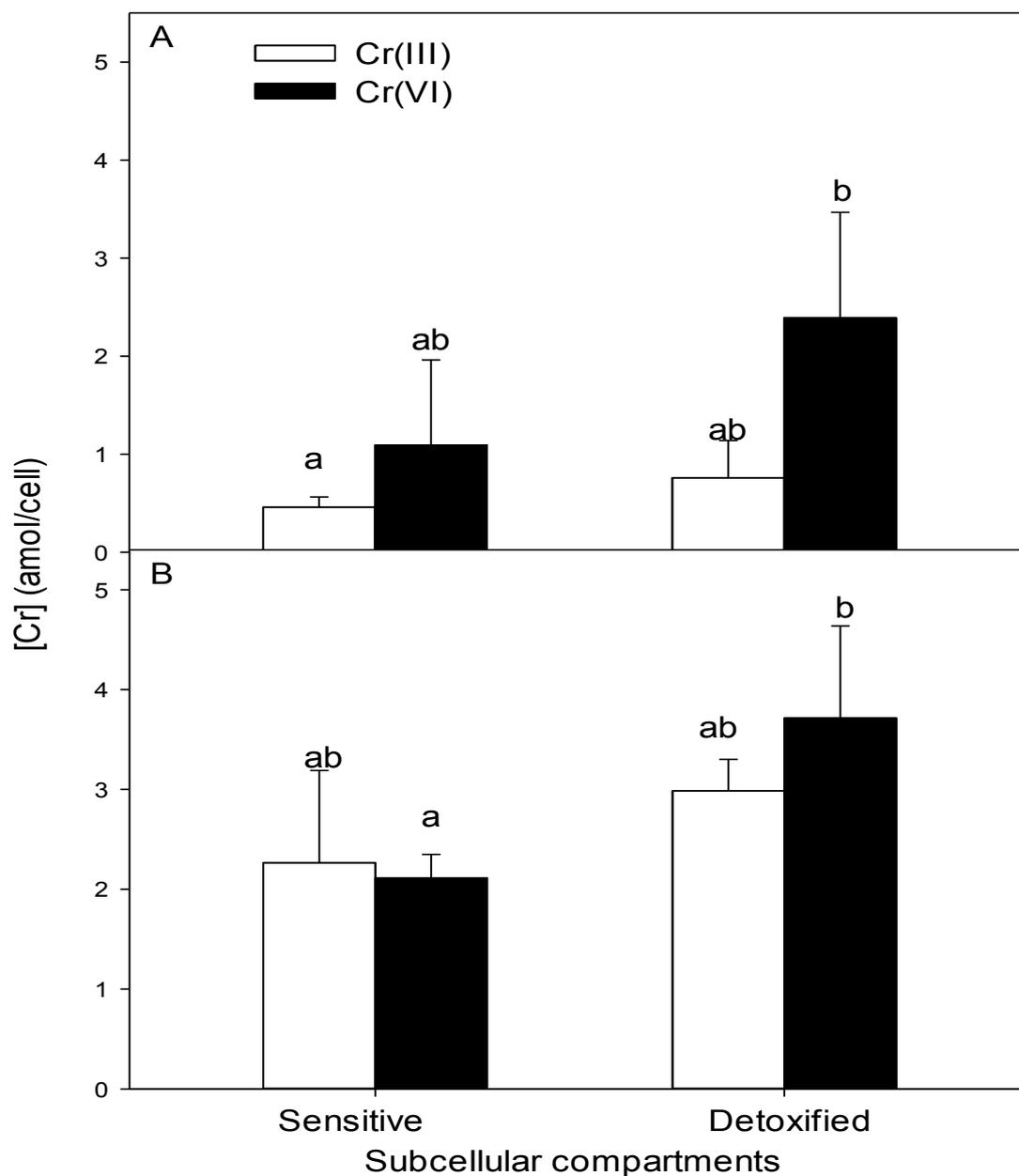


Fig SI-5 Mean Cr concentrations (amol/cell; \pm SD, $n = 2-3$) in metal-sensitive compartment and metal-detoxified compartment of *C. reinhardtii* exposed to Cr(III) (white bars) or Cr(VI) (black bars) after 1h (panel A) and 72 h (panel B). Bars with the same letters indicate non-significant differences, whereas different letters indicate that the differences are significant (ANOVA followed by the Kruskal Wallis test, $P < 0.05$).

References

- Lavoie, M., Bernier, J., Fortin, C., Campbell, P.G.C., 2009a. Cell homogenization and subcellular fractionation in two phytoplanktonic algae: implications for the assessment of metal subcellular distributions. *Limnol. Oceanogr. Methods* 7, 277–286. doi:10.4319/lom.2009.7.277
- Wallace, W.G., Lee, B., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249, 183–197. doi:10.3354/meps249183

Partie 4

Bioaccumulation du chrome et mesures de biomarqueurs chez *Corbicula fluminea*

Contexte

L'écotoxicité des éléments traces métalliques (ETM) dépend fortement de leur spéciation chimique dans les milieux d'exposition, de leur activité biologique intracellulaire et, pour les organismes pluricellulaires, de leur distribution dans les tissus (Fairbrother et al., 2007). Le Cr existe dans les eaux de surface sous deux formes redox principales, le Cr(VI) et le Cr(III), au comportement contrasté. Le Cr(VI) forme préférentiellement des espèces chimiques anioniques et reste principalement soluble alors que le Cr(III) réagit rapidement avec les particules en suspension et les colloïdes avec une fraction dissoute moins importante (Bobrowski et al., 2004). De ce fait, le Cr(VI) et le Cr(III) s'accumulent principalement par la voie aqueuse et la voie trophique respectivement (Wang et al., 1997). De plus, certaines études ont démontré une accumulation préférentielle du Cr dans les branchies et les glandes digestives des bivalves (*C. fluminea* et *Mytilus edulis*) (Oliveira and Martinez, 2014; Walsh and O'Halloran, 1998), mais sans établir un lien avec la spéciation du Cr dans le milieu d'exposition. Les bivalves présentent aussi un large choix de biomarqueurs capables de répondre à une exposition aux ETM, y compris le Cr (Ciacci et al., 2012; Vijayavel et al., 2007). De façon générale, l'identification de marqueurs précoces d'écotoxicité en fonction de la spéciation et des voies d'exposition aux ETM permettrait d'identifier et minimiser les risques liés à la présence de ces ETM dans l'environnement. De plus, dans le cas du chrome, ses deux formes redox (Cr(III) et le Cr(VI)) se retrouvent ensemble dans l'environnement et des effets combinés ne peuvent pas être exclus à priori. Des expériences ont donc été menées

pour établir la bioaccumulation de deux formes redox du Cr dans deux organes cibles (branchies et glande digestive) ainsi que les relations entre bioaccumulation et expression de biomarqueurs chez *C. fluminea*.

Méthodes

Des bivalves (*Corbicula fluminea*) prélevés dans des sites de référence habituellement utilisés au sein du laboratoire LIEC et acclimatés aux conditions de laboratoire ont été exposés au Cr(III), au Cr(VI) ou à un mélange des deux formes redox en utilisant des solutions isotopiquement enrichies en $^{50}\text{Cr(III)}$ et $^{53}\text{Cr(VI)}$. Les concentrations en Cr ont été quantifiées par ICP-MS dans les branchies et les glandes digestives des différents individus après leur lyophilisation et minéralisation. L'évolution des concentrations totales et filtrées du Cr dans le milieu d'exposition a été suivie dans les différentes expériences par absorption atomique ou par ICP-MS. Les activités des biomarqueurs des dommages cellulaires, des défenses antioxydantes et antitoxiques et les paramètres énergétiques ont été également évalués en utilisant l'analyseur Konelab 20 Xti après 24 et 96 h d'exposition.

Principaux résultats

La bioaccumulation des deux formes redox du Cr après 24 heures d'exposition reste faible (ne dépassant pas les 5 μg de Cr/g de tissu) pour toutes les concentrations testées (5, 50 et 500 $\mu\text{g/L}$), sauf dans le cas de l'exposition à 500 $\mu\text{g/L}$ de Cr(VI), où le niveau de bioaccumulation a dépassé les 40 μg de Cr/g de branchies. Toutefois, après exposition pendant 96 h, le Cr(VI) a montré une bioaccumulation préférentielle dans les branchies. En revanche, le Cr(III) s'accumule préférentiellement dans les glandes digestives quand il est testé seul ou dans les branchies quand il est testé en mélange avec le Cr(VI). Alors que le Cr(VI) s'est avéré relativement stable dans les milieux d'exposition, la concentration totale et filtrée (0,45 μm) du Cr(III) diminue d'environ 60% par rapport à la concentration initiale après 4 heures seulement. Enfin, la réponse des différents biomarqueurs cellulaires varie selon les conditions d'exposition. En effet, les traitements statistiques ont mis en évidence l'importance du tissu considéré, de la forme redox du Cr, de la concentration et du temps d'exposition sur différents biomarqueurs.

I. Vue d'ensemble des expériences

Après avoir vérifié que les deux formes redox du Cr ne provoquaient pas de mortalité chez *C. fluminea* pour des concentrations jusqu'à 5 mg/L et des temps d'exposition de 96 h (voir Chapitre 2, section IV), nous avons exposé des individus de *C. fluminea* à 5, 50 et 500 µg/L de Cr(III) ou Cr(VI) pendant 24 ou 96 h pour étudier la bioaccumulation du Cr et la perturbation de l'activité de différents biomarqueurs dans les branchies et les glandes digestives de ces palourdes. Nous avons ensuite étudié la bioaccumulation du Cr dans les branchies et les glandes digestives ainsi que l'induction des mêmes biomarqueurs chez *C. fluminea* exposée pendant 96 h à un mélange de solutions isotopiquement enrichies de Cr (100 µg/L de ⁵⁰Cr(III) + 50 µg/L de ⁵³Cr(VI)). L'utilisation de ces solutions a permis d'étudier la bioaccumulation simultanée des deux formes redox de Cr ainsi que la possibilité de leurs effets combinés. En parallèle, des expositions à 50 µg/L de Cr(III) ajouté sous forme de chlorures ou à 50 µg/L de Cr(VI) ajouté sous forme de dichromate de potassium ont été conduites afin de disposer de contrôles expérimentaux.

II. Bioaccumulation et effets du Cr(III) et Cr(VI) chez *Corbicula fluminea* après 24 h et 96 h d'exposition

II.1. Bioaccumulation du Cr(III) et Cr(VI) dans les branchies et glandes digestives

Les concentrations de Cr dans les tissus des moules non exposées et dans les contrôles analytiques étaient faibles et proches de zéro, ce qui montre une absence de contamination du matériel et des réactifs utilisés ainsi qu'une faible teneur en Cr dans les tissus des organismes utilisés. Après une exposition de 24 h au Cr(III) ou Cr(VI) à une concentration de 5 ou 50 µg/L, les valeurs de Cr bioaccumulé (corrigées par rapport aux témoins) dans les tissus des corbicules ne dépassent pas les 5 µg de Cr/g (Figure 39). Pour les moules exposées à 500 µg/L de Cr(III) pendant 24 h, la bioaccumulation reste relativement faible avec $2,76 \pm 0,62$ µg de Cr/g de branchies et $4,90 \pm 1,44$ µg de Cr/g de glandes digestives. Dans le cas des moules exposées à 500 µg/L de Cr(VI), les valeurs de Cr bioaccumulé sont plus élevées d'environ 10 fois par rapport aux branchies des moules exposées à la même concentration de Cr(III) avec un coefficient de variation d'environ 15%. Cependant, dans les glandes digestives des moules

exposés à 500 $\mu\text{g/L}$ de Cr(VI), les valeurs de Cr bioaccumulé sont toujours faibles, ne dépassant pas 2 μg de Cr/g de tissus (Figure 39). Ces résultats suggèrent une bioaccumulation similaire des deux formes de Cr dans les deux tissus sauf pour des fortes concentrations de Cr(VI) (Figure 39).

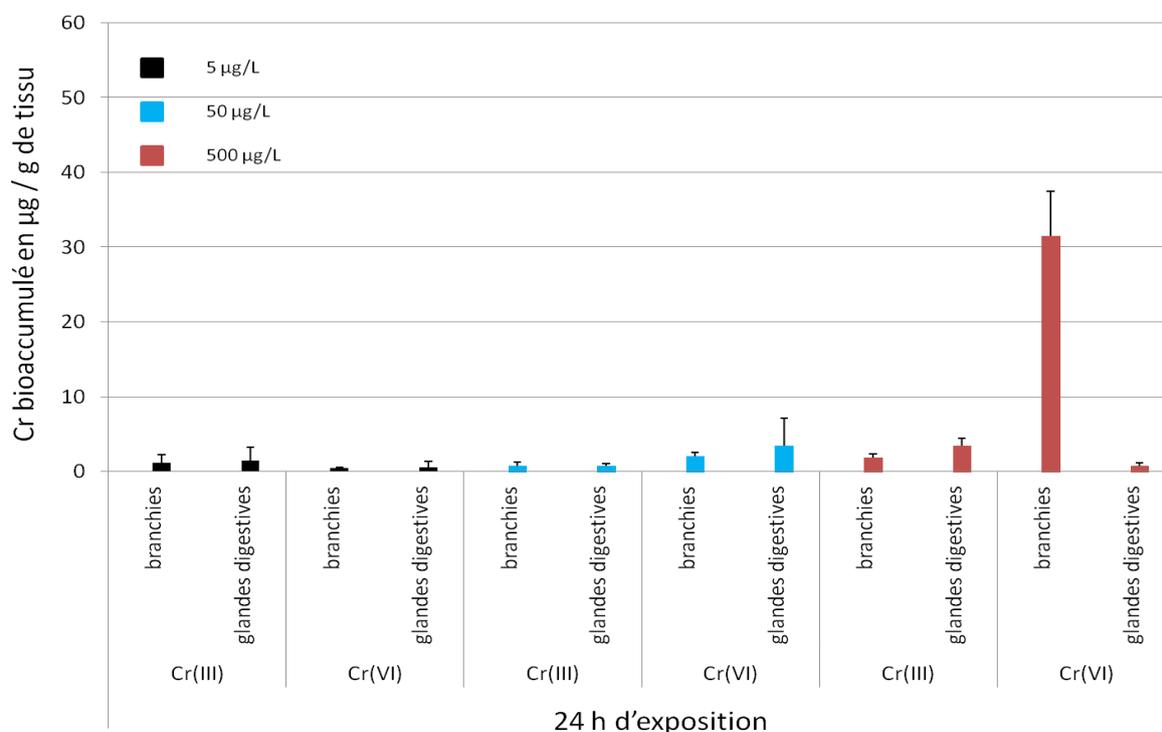


Figure 39 : Bioaccumulation du Cr(III) et Cr(VI) dans les branchies et glandes digestives des corbicules exposées à 5, 50 ou 500 $\mu\text{g/L}$ de Cr(III) ou de Cr(VI) pendant 24 h. Toutes les valeurs sont exprimées en μg de Cr/g de tissu après soustraction des concentrations mesurées dans des moules non exposées au Cr. Les barres correspondent à ± 1 écart type sur la moyenne ($n=3-4$).

Pour les corbicules exposées aux deux formes de Cr pendant 96 h, des problèmes techniques liés au système automatique d'introduction des échantillons dans l'ICP-MS (notamment la présence de bulles d'air qui faussaient systématiquement les résultats) ont été détectés après l'utilisation de tout le volume d'échantillon disponible. Les concentrations bioaccumulées après 96 heures d'exposition n'ont donc pas pu être déterminées.

II.2. Comportement du Cr(III) et Cr(VI) dans les milieux d'exposition

Les concentrations en Cr total dans le milieu d'exposition avec et sans filtration (0,45 μm) au début de l'expérience ($t = 0$) montrent des différences dépassant 20% entre les concentrations mesurées et celles attendues, surtout à 50 et 500 $\mu\text{g/L}$ et cela dans le cas des deux formes

redox du Cr (Cr(III) et Cr(VI)) (Tableau 8). La mesure des concentrations en Cr totale avec et sans filtration (0,45 µm) à différents temps entre 0 et 24 h montre que la teneur en Cr reste relativement stable ($\pm 20\%$ de la valeur attendue) dans le milieu d'exposition dans le cas du Cr(VI) mais diminue au fil du temps dans le cas du Cr(III). En effet, les concentrations totales et filtrées (0,45 µm) du Cr(III) diminuent d'environ 60% par rapport à la concentration initiale après 4 heures seulement et ce quelle que soit la concentration initiale entre 5 et 500 µg/L (Figure 40). Après 24 h, la diminution des concentrations du Cr(III) atteint environ 80% de la concentration initiale pour les trois concentrations étudiées, sauf pour le Cr total dans le milieu initialement dopé à 500 µg/L. Dans ce cas, la diminution de la concentration totale après 24 h (environ 40% par rapport à la valeur initiale) est inférieure à celle observée après 4 h (Figure 40-C). Puisque, la concentration filtrée correspondante montre une décroissance régulière entre 0 et 24 h, nous soupçonnons un problème d'adsorption/désorption du Cr à partir des parois ou du fond du cristalliseur. En général, la diminution très similaire de concentrations totales du Cr(III) avec et sans filtration suggère des phénomènes d'adsorption plutôt que la formation de particules contenant du Cr comme observé dans le milieu ISO pour algues (Chapitre 3, partie 1). Quoiqu'il en soit, les niveaux moyens d'exposition au Cr(III) sont donc inférieurs à ceux du Cr(VI) pour une même concentration nominale, ce qui doit être pris en considération pour éviter de sous-estimer la bioaccumulation et les effets du Cr(III) dans nos conditions expérimentales.

Tableau 8 : Concentrations nominales et mesurées de Cr avant et après filtration (0,45 µm) dans les différentes conditions d'exposition des corbicules à t = 0.

	Concentrations nominales attendues à t=0 (µg/L)	Concentrations réelles mesurées à t=0 (µg/L)
Cr(III) total	5	4,59 ± 0,27
Cr(III) filtré à 0,45 µm	5	4,44 ± 0,41
Cr(VI) total	5	4,32 ± 0,36
Cr(VI) filtré à 0,45 µm	5	4,93 ± 0,35
Cr(III) total	50	31,3 ± 4,04
Cr(III) filtré à 0,45 µm	50	30,7 ± 1,53
Cr(VI) total	50	36,0 ± 5,00
Cr(VI) filtré à 0,45 µm	50	34,3 ± 2,52
Cr(III) total	500	434 ± 86,0
Cr(III) filtré à 0,45 µm	500	362 ± 25,4
Cr(VI) total	500	363 ± 26,8
Cr(VI) filtré à 0,45 µm	500	378 ± 20,8

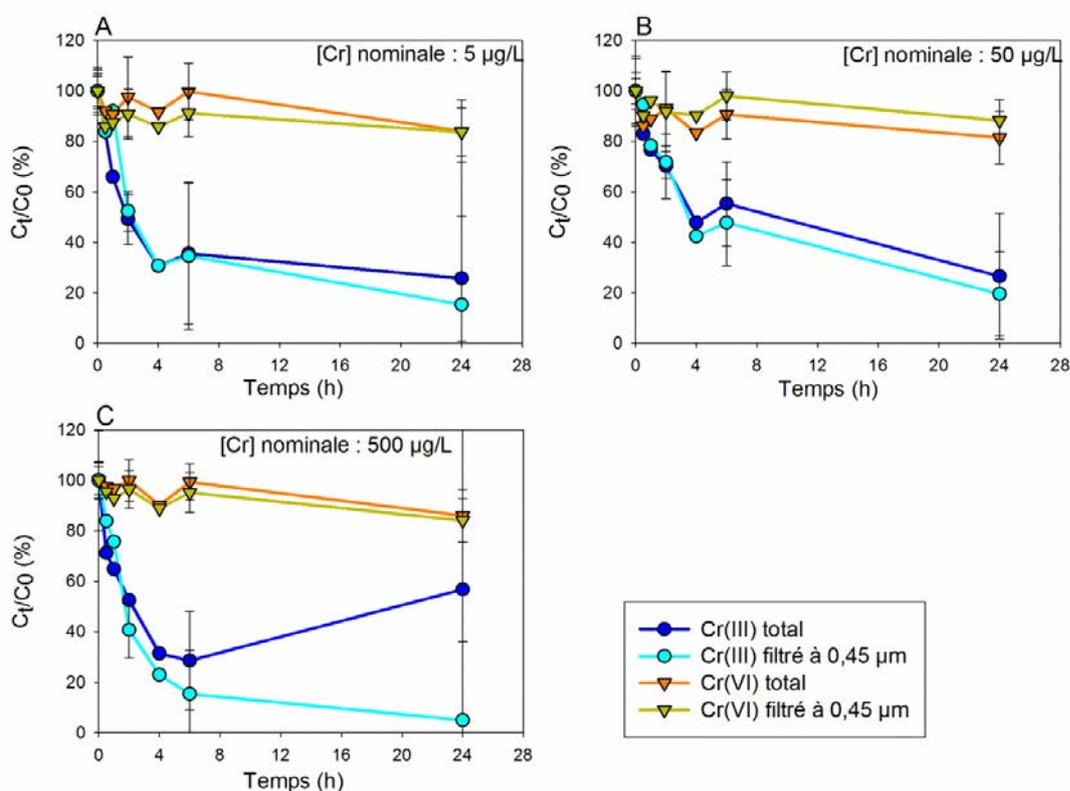


Figure 40 : Cinétique de variation des concentrations totales et filtrées (0,45 µm) du Cr exprimé en pourcentage de la concentration initiale ajoutée dans les milieux d'exposition dopés avec 5 µg/L (A), 50 µg/L (B) ou 500 µg/L (C) de Cr(III) ou de Cr(VI).

II.3. Effets du Cr(III) et Cr(VI) sur différents biomarqueurs

La possible perturbation de différents biomarqueurs chez *Corbicula fluminea* a été déterminée après exposition à 5, 50 ou 500 µg/L de Cr(III) ou de Cr(VI) pendant 24 ou 96 h. Les valeurs de l'activité des 13 biomarqueurs cellulaires sont présentées dans le tableau 1 de l'annexe 2 tandis que les résultats des tests statistiques d'analyses de variance (Anova à plan factoriel) sont résumés dans les tableaux 9 (Branchies) et 10 (Glandes digestives) avec une discussion des observations les plus significatives. Pour rappel, les biomarqueurs mesurés (voir Chapitre II, partie V.3) comprennent : les concentrations en protéines contenues dans le broyat et dans la fraction cytosolique, les concentrations dans la fraction cytosolique en cholestérol et en triglycérides, l'activité du système de transport d'électrons (ETS), les concentrations des hydroperoxydes lipidiques (LOOH), l'activité de la phosphatase alcaline (ACP), la capacité totale antioxydante (ACP), l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), l'activité glutathion peroxydase totale (Gpx), glutathion-s-transférase (GST), caspase-3 (CSP3) et catalase.

Le temps d'exposition (24 h ou 96 h) n'affecte l'expression d'aucun biomarqueur dans les glandes digestives (Tableau 10), alors que trois biomarqueurs (GST, [triglycérides] et CSP3) sont affectés par la durée d'exposition dans les branchies (Tableau 9). Toutefois, l'examen détaillé des résultats (Annexe 2, Tableau 1) ne montre pas une réponse commune au temps d'exposition pour ces trois biomarqueurs. En effet, l'activité GST dans les branchies des corbicules exposées au Cr(VI) pendant 96 h est significativement supérieure par rapport à celle mesurée après 24 h. Pour la CSP3 des différences existent pour le Cr(III) avec une activité plus élevée après 24 h qu'à 96 h. En revanche, les effets sur la concentration en triglycérides dans les branchies ne sont pas réguliers.

Pour ce qui est des concentrations d'exposition, des effets significatifs ont été observés sur trois biomarqueurs (ACP, LDH, CSP3) dans les branchies et sur seulement l'ETS dans les glandes digestives (Tableaux 9 et 10). Cependant, seulement la LDH a montré une claire augmentation d'activité dans les branchies avec la concentration de Cr (pour les deux formes redox), alors que les réponses de l'ACP et de la CPS3 étaient plus variables (Annexe 2, Tableau 1). Dans les glandes digestives, une tendance vers l'augmentation de l'activité de l'ETS avec la concentration du Cr(III) a été observée (Annexe 2, Tableau 1).

La forme redox du Cr induit des effets significatifs dans les branchies sur des marqueurs de paramètres énergétiques (ETS, LDH, protéines dans le broyat), sur l'ACP et sur la CSP3 (Tableau 9). L'effet de la forme redox du Cr dans les glandes digestives est visible sur différents biomarqueurs de défense antioxydante (GST, Gpx, TAC et Catalase), sur l'ETS, la LDH et la CSP3 (Tableau 10). L'examen détaillé des résultats (Annexe 2, Tableau 1) ne montre toutefois pas de tendances régulières de la réponse de ces biomarqueurs dans les deux tissus selon la forme du Cr utilisée. Enfin, des différences significatives ont été observées entre les deux tissus (branchies et glandes digestives) sur tous les biomarqueurs, sauf la Caspase-3, la catalase et l'activité phosphatase alcaline. A l'exception de la concentration des hydroperoxydes lipidiques (LOOH), qui était supérieure dans les branchies, l'activité de tout les autres biomarqueurs était plus élevée dans les glandes digestives par rapport aux branchies. Une discussion des résultats obtenus par rapport aux connaissances déjà disponibles dans la littérature est présentée à la section I.3.3.

Tableau 9: Résultats statistiques de l'analyse de variance (Anova à plan factoriel) pour les activités des différents biomarqueurs mesurés dans les branchies des corbicules exposées pendant 24 ou 96 h à 5, 50 et 500 µg/L de Cr(III) ou de Cr(VI). « ddl » : degré de liberté. Les valeurs en gras sont statistiquement significatives (p < 0,05). Les deux marqueurs Gpx et TAC n'ont pas été inclus dans le traitement statistique à cause des faibles valeurs de leur activité.

	ddl	[Protéines] broyat	[Protéines] F cytosolique	[Triglycérides]	[Cholestérol]	ETS	LOOH	ACP	LDH	GST	CSP 3	Catalase
		p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value
Forme Cr (A)	1	0,057	0,012	0,092	0,103	0,000	0,095	0,000	0,018	0,500	0,000	0,672
Temps (B)	1	0,356	0,371	0,042	0,421	0,755	0,707	0,710	0,759	0,018	0,041	0,552
Concentration (C)	3	0,497	0,156	0,383	0,112	0,128	0,229	0,012	0,002	0,354	0,000	0,353
A · B	1	0,481	0,001	0,645	0,640	0,791	0,996	0,061	0,297	0,001	0,010	0,013
A · C	3	0,419	0,001	0,815	0,802	0,502	0,001	0,844	0,001	0,027	0,009	0,191
B · C	3	0,108	0,038	0,835	0,043	0,000	0,038	0,424	0,000	0,118	0,600	0,257
A · B · C	3	0,500	0,000	0,529	0,312	0,005	0,093	0,029	0,063	0,152	0,008	0,845

Tableau 10: Résultats statistiques de l'analyse de variance (Anova à plan factoriel) pour les activités des différents biomarqueurs mesurés dans les glandes digestives des corbicules exposées pendant 24 ou 96 h à 5, 50 et 500 µg/L de Cr(III) ou de Cr(VI). « ddl » : degré de liberté. Les valeurs en gras sont statistiquement significatives (p < 0,05).

	ddl	[Protéines] broyat	[Protéines] F cytosolique	[Triglycérides]	[Cholestérol]	ETS	LOOH	ACP	LDH	TAC	GPx	GST	CSP 3	Catalase
		p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value
Forme Cr (A)	1	0,539	0,160	0,957	0,441	0,000	0,217	0,099	0,048	0,004	0,012	0,013	0,000	0,000
Temps (B)	1	0,794	0,535	0,750	0,384	0,924	0,267	0,354	0,392	0,453	0,767	0,649	0,540	0,991
Concentration (C)	3	0,497	0,440	0,140	0,760	0,020	0,629	0,196	0,415	0,241	0,797	0,223	0,238	0,186
A · B	1	0,668	0,565	0,030	0,878	0,000	0,006	0,016	0,952	0,062	0,042	0,396	0,006	0,313
A · C	3	0,585	0,783	0,075	0,907	0,041	0,372	0,935	0,855	0,750	0,394	0,934	0,009	0,499
B · C	3	0,493	0,330	0,065	0,775	0,016	0,112	0,911	0,288	0,004	0,590	0,118	0,045	0,719
A · B · C	3	0,019	0,070	0,313	0,647	0,003	0,000	0,241	0,278	0,077	0,007	0,045	0,505	0,673

III. Bioaccumulation et effets d'un mélange de Cr(III) et Cr(VI) après 96 h d'exposition

III.1 Bioaccumulation du Cr(III) et Cr(VI) dans les branchies et glandes digestives

Dans cette expérience, en plus des organismes témoins non exposés au Cr, des corbicules ont été exposées pendant 96 h à 50 µg/L de Cr(III) ou de Cr(VI) ou encore à un mélange de solutions isotopiquement enrichies contenant 100 µg/L de ⁵⁰Cr(III) + 50 µg/L de ⁵³Cr(VI). Tous les milieux d'exposition ont été renouvelés chaque 24 h. Après 96 h d'exposition à 50 µg/L de Cr(III), les valeurs de Cr bioaccumulé (corrigées par rapport aux témoins) restent plus faibles dans les branchies (2,49 ± 0,88 µg de Cr/g) par rapport aux glandes digestives (8,53 ± 4,57 µg de Cr/g). En revanche, pour les moules exposées au Cr(VI), la bioaccumulation du Cr est plus élevée dans les branchies (10,83 ± 0,16 µg de Cr/g) que dans les glandes digestives (2,64 ± 0,78 µg de Cr/g) (Figure 41). Pour les corbicules exposées au mélange des deux formes de Cr, les valeurs de Cr(III) bioaccumulé restent faibles dans les deux tissus avec 2,04 ± 0,35 µg de Cr(III)/g de branchies et 0,62 ± 0,53 µg de Cr(III) /g de glandes digestives. De façon similaire, les teneurs en Cr(VI) dans les tissus des organismes exposés au mélange des deux formes redox de Cr sont réduites par rapport à ceux exposés au Cr(VI) seul. Dans ce cas, les valeurs de bioaccumulation de Cr(VI) sont de 5,92 ± 1,92 µg de Cr(VI)/g de branchies et de 1,17 ± 0,62 µg de Cr(VI)/g de glandes digestives (Figure 41). Le niveau de bioaccumulation du Cr(III) dans les glandes digestives était significativement supérieur chez les corbicules exposées au Cr(III) seul que dans celles exposées au mélange Cr(III)/Cr(VI) ($p = 0,04$; *test de Student*). Dans le cas du Cr(VI), une accumulation préférentielle dans les branchies est observée pour toutes les expositions. Toutefois le niveau de bioaccumulation est supérieur dans les branchies des corbicules exposés au Cr(VI) seul que dans les branchies des corbicules exposées au mélange ($p = 0,03$; *test de Student*).

Les légères augmentations des niveaux de bioaccumulation du Cr(III) dans les glandes digestives et du Cr(VI) dans les branchies par rapport aux résultats de la première expérience pourraient être expliquées par la différence de la durée d'exposition (24 h dans la première expérience et 96 h dans la deuxième expérience). Toutefois, ces valeurs de Cr bioaccumulé restent généralement en accord avec les données disponibles dans la littérature (Tableau 11).

En effet, des études réalisées chez différentes espèces de bivalves ont montré, selon la concentration d'exposition, le temps d'exposition et le tissu étudié, des valeurs de bioaccumulation entre 0 et 50 $\mu\text{g/g}$ (Barrera-Escorcía and Wong-Chang, 2010; Franzellitti et al., 2012a; Oliveira and Martínez, 2014; Potet et al., 2016; Tsangaris et al., 2008a; Zaroogian and Johnson, 1983). En revanche, des valeurs de bioaccumulation de l'ordre du mg de Cr/g de tissu ont été observées dans une étude réalisée chez *Caelatura companyoi* utilisant une concentration d'exposition de Cr (forme redox non reportée) de 20 mg/L pendant des durées variant entre 1 et 20 jours (Moloukhia and Sleem, 2011).

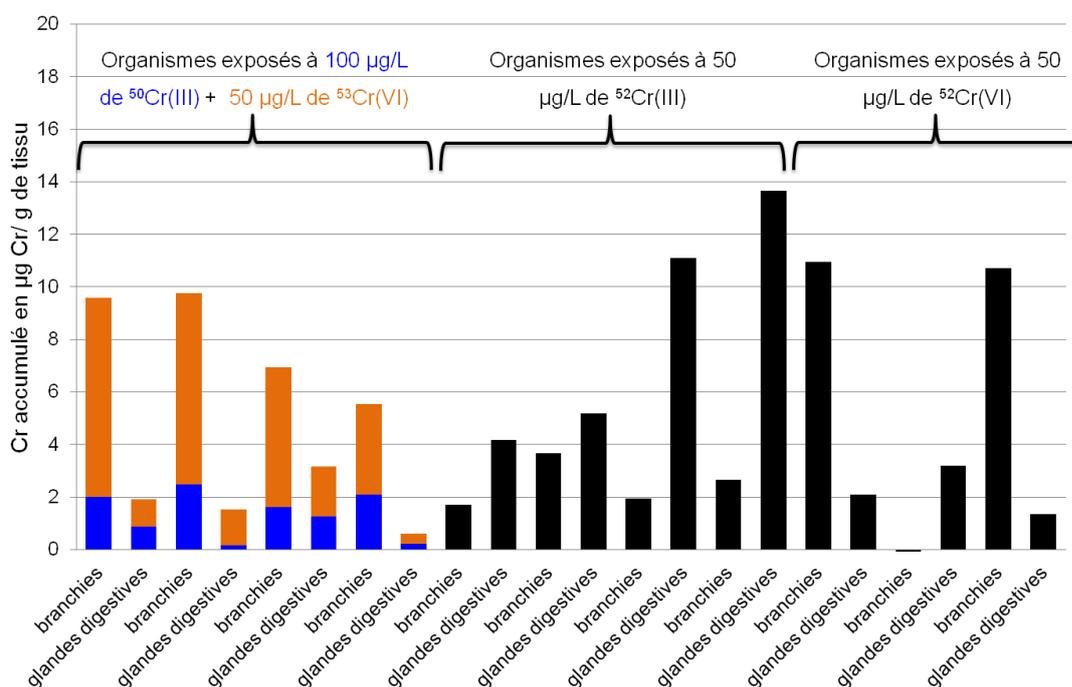


Figure 41 : Bioaccumulation du Cr(III) et Cr(VI) dans les branchies et glandes digestives des corbicules exposées à 50 $\mu\text{g/L}$ de Cr(III) ou de Cr(VI) séparément ou à un mélange de solutions isotopiquement enrichies (100 $\mu\text{g/L}$ de $^{50}\text{Cr(III)}$ + 50 $\mu\text{g/L}$ de $^{53}\text{Cr(VI)}$) pendant 96 h. Les solutions d'exposition ont été renouvelées toutes les 24 heures. La concentration initiale du $^{50}\text{Cr(III)}$ a été fixée à 100 $\mu\text{g/L}$ afin d'avoir des concentrations moyennes d'environ 50 $\mu\text{g/L}$ sur 24 h (voir le texte pour plus de détails). Toutes les valeurs sont exprimées en μg de Cr/g de tissu après soustraction des concentrations mesurées dans des moules non exposées au Cr.

Tableau 11 : Niveaux de bioaccumulation du Cr rencontrés dans différents travaux en µg de Cr/g de tissu (poids sec sauf référence 4 (poids humide)) réalisés chez les bivalves.

Référence	Organisme modèle	Durée d'acclimatation (jours)	Contaminant	Concentrations d'exposition (µg/L)	Durée d'exposition en jours	Milieu d'exposition	Laboratoire/ terrain	Tissu étudié	Cr bioaccumulé (µg de Cr/ g de tissu)		
[1]	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	3	Cr(VI)	0,001	7	eau de mer	laboratoire	glandes digestives	1,5		
				0,01					2,5		
				0,05					2,7		
				0,001					1		
				0,01					1,2		
				0,05					2,2		
[2]	<i>Dreissena polymorpha</i>	4	Cr(VI)	5	4 à 12°C	eau minérale (Cristalline)	laboratoire	organisme entier (sauf coquille)	0,5 ± 0,2		
				15					1,9 ± 0,7		
				5	4 à 17°C				0,7 ± 0,1		
				15					1,3 ± 0,7		
	<i>Dreissena r. bugensis</i>			4	Cr(VI)				5	4 à 12°C	1 ± 0,2
									15		0,9 ± 0,4
									5	4 à 17°C	1,2 ± 0,3
									15		1,2 ± 0,3
[3]	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	7	Cr(VI)	0,5	28	eau de mer artificielle	laboratoire	organisme entier (sauf coquille)	1,4 ± 0,2		
				5					2,5 ± 0,4		
				50					15,4 ± 6,1		
[4]	<i>Caelatura companyoi</i>	15	Cr (forme non reportée)	20000	1	non reporté	laboratoire	organisme entier (sans coquille)	3400		
					2				8400		
					5				16800		
					10				28200		
					15				42400		
20	65000										

Suite du tableau 11: Niveaux de bioaccumulation de Cr rencontrés dans différents travaux en µg de Cr/g de tissu (poids sec sauf référence 4 (poids humide)) réalisés chez les bivalves

Référence	Organisme modèle	Durée d'acclimatation (jours)	Contaminant	Concentrations d'exposition (µg/L)	Durée d'exposition en jours	Milieu d'exposition	Laboratoire/ terrain	Tissu étudié	Cr bioaccumulé (µg de Cr/ g de tissu)
[5]	<i>Crassostrea virginica</i>	23 jours	(forme non reportée)	88	4	eau de mer artificielle	laboratoire	branchies	27,47 ± 18,65
								glandes digestives	13,89 ± 5,69
				144				branchies	19,41 ± 2,87
								glandes digestives	28,19 ± 12,85
[6]	<i>Crassostrea virginica</i>	1 mois	Cr(VI)	5	12 semaines	eau de mer artificielle	laboratoire	organisme entier	3,12 ± 0,45
				10				(sans coquille)	5,63 ± 1,15
	5							4,83 ± 1,32	
	10							9,41 ± 3,37	
[7]	<i>Corbicula Fluminea</i>	0	Cr total		1	in situ	in situ (cours d'eau)		8,24 - 22,59
				in situ (0,70 - 3,58)	5			branchies	17,51 - 31,44
					15				29,83 - 34,32
					30				22,75
				in situ (0,70 - 3,58)	1				4,05 - 9,05
					5			glandes digestives	3,28 - 14,81
	15		4,80 - 17,31						
	30		3,51 - 18,22						

[1] (Franzellitti et al., 2012), [2] (Potet et al., 2016), [3] (Tsangaris et al., 2008), [4] (Moloukhia and Sleem, 2011), [5] (Barrera-Escorcia et Wong-Chang, 2010), [6] (Zarogian et Johnson, 1983), [7] (Oliveira et Martinez, 2014).

III.2 Comportement du Cr(III) et Cr(VI) dans les milieux d'exposition

Le comportement du Cr(III) et du Cr(VI) a été également étudié en mesurant les concentrations totales et filtrées (0,45 μm) du $^{50}\text{Cr(III)}$ et $^{53}\text{Cr(VI)}$ dans le milieu d'exposition à $t = 0$ et après 24 h d'incubation avec les moules. Nous avons trouvé que la concentration du Cr(VI) était stable dans le milieu d'exposition sur 24 h. Toutefois, les concentrations totale et filtrée du $^{50}\text{Cr(III)}$ ont diminué de 100 $\mu\text{g/L}$ à $t = 0$ à environ 25 $\mu\text{g/L}$ et 10 $\mu\text{g/L}$ après 24 h (Figure 42). Cette chute des concentrations filtrées du Cr(III) dans les milieux d'exposition suggère une formation d'espèces insolubles qui sont probablement retenues dans les filtres.

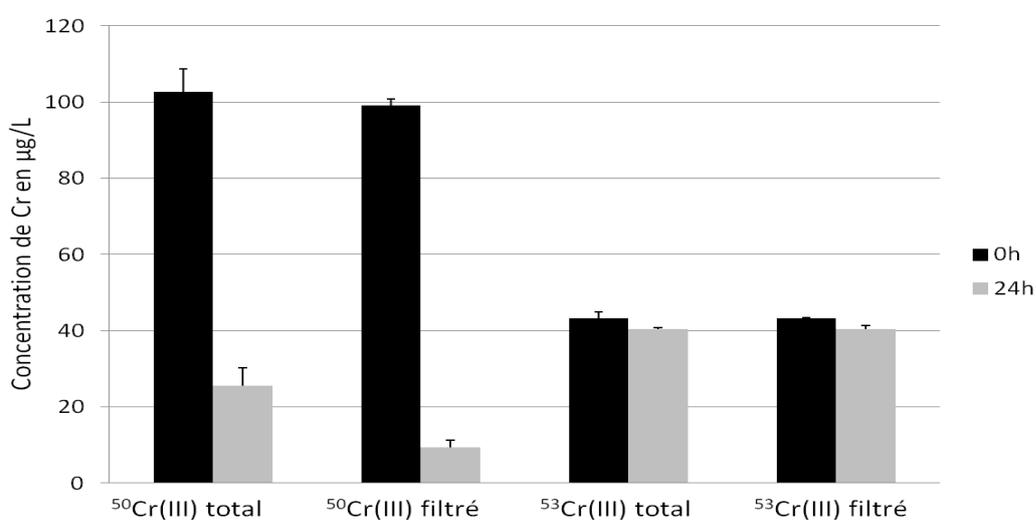


Figure 42 : Variation temporelle des concentrations totales et filtrées (0,45 μm) du Cr entre 0 (barres noires) et 24 h (barres grises). Toutes les valeurs sont en $\mu\text{g/L}$.

III.3 Effets du Cr(III) et Cr(VI) sur différents biomarqueurs

Nous avons comparé le changement dans l'activité des mêmes biomarqueurs examinés dans la section I.2.3 après exposition pendant 96 h à 50 $\mu\text{g/L}$ de Cr(III) ajouté sous forme de chlorures de Cr, à 50 $\mu\text{g/L}$ de Cr(VI) ajouté sous forme de dichromate de potassium ou à un mélange de solutions isotopiquement enrichis contenant 100 $\mu\text{g/L}$ de $^{50}\text{Cr(III)}$ + 50 $\mu\text{g/L}$ de $^{53}\text{Cr(VI)}$. Une concentration initiale plus élevée de Cr(III) a été choisie pour essayer d'obtenir une concentration moyenne d'exposition des palourdes au Cr(III) plus proche de celle du Cr(VI). En effet, sur la base des résultats dans la figure 42, les moyennes géométriques des concentrations du Cr(III) auront été d'environ 50 $\mu\text{g/L}$ pour la concentration totale et 30 $\mu\text{g/L}$ pour la concentration filtrée, raisonnablement proche de 40 $\mu\text{g/L}$ pour le Cr(VI).

Des différences statistiquement significatives entre branchies et glandes digestives sont observées pour différents biomarqueurs. En effet, les concentrations des différents biomarqueurs énergétiques ([protéines] (dans le broyat et dans la fraction cytosolique), [triglycérides] et [cholestérol]) sont de 2 à 3 fois plus élevées dans les glandes digestives que dans les branchies (Tableaux 12 et 13). De façon similaire, l'activité GST est plus importante dans les glandes digestives que dans les branchies (Tableaux 12 et 13). En revanche, l'expression de la CSP-3 et le niveau de LOOH (peroxydation lipidique) sont généralement plus importants dans le cas des branchies (Tableaux 12 et 13).

Dans cette expérience, seule la caspase-3 dans les branchies a été influencée par la forme redox du Cr avec une différence entre l'exposition au Cr(VI) et ou Cr(III) (Figure 43).

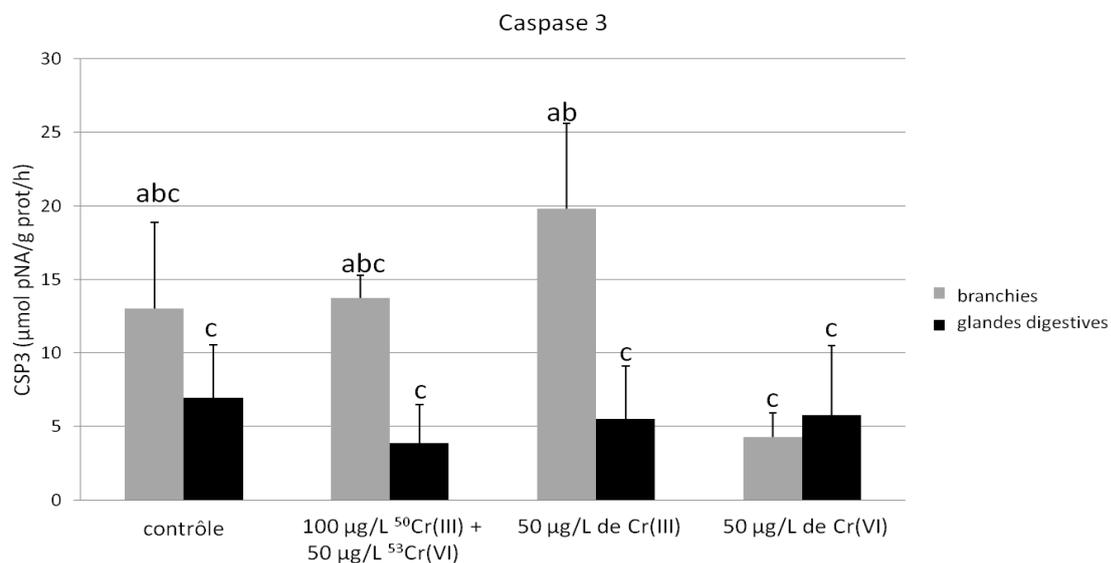


Figure 43 : Variation de l'activité de la caspase-3 (CSP3) dans les branchies et les glandes digestives des corbicules après exposition pendant 96 h aux différentes conditions. Les barres correspondent à ± 1 écart type sur la moyenne (n=3-4). L'activité de la CSP3 est significativement différente (p < 0,05 ; Anova à plan factoriel suivie d'un test de Tukey) pour les barres ayant des lettres différentes.

L'utilisation de biomarqueurs examinés dans nos expériences est bien documentée dans la littérature comme outil de biosurveillance des contaminations à différents polluants métalliques chez différents bivalves, y compris *C. fluminea*, (Black and Belin, 1998; Borković-Mitić et al., 2013; Cossu et al., 1997; Franzellitti et al., 2012b; Guidi et al., 2010; Mazorra et al., 2002; Tsangaris et al., 2008 ; Vranković, 2015),

Différentes études évaluant l'effet du chrome (principalement sous forme hexavalente) sur certains biomarqueurs chez des bivalves existent (Barmo et al., 2011; Canesi et al., 2010; Ciacci et al., 2012, 2011; Regoli and Principato, 1995), mais nous n'en avons rencontré

qu'une seule évaluant les effets du Cr(VI) chez *C. fluminea* en laboratoire (Wang et al., 2012). Ces auteurs ont montré une augmentation de la peroxydation des lipides et une diminution de l'activité de la catalase dans les tissus de *C. fluminea*. En revanche, aucune étude portant sur l'effet du Cr(III) chez *C. fluminea* n'a été rencontrée dans la littérature. Nos résultats montrent l'intérêt de l'utilisation de ces différents biomarqueurs dans l'évaluation des effets de deux formes redox du Cr. Dans la plupart des études rencontrées dans la littérature, les biomarqueurs sont généralement étudiés dans les organismes entiers ou dans leurs glandes digestives. La différence des réponses des biomarqueurs étudiés dans notre travail entre les branchies et les glandes digestives montre l'intérêt de leur utilisation combinée pour une meilleure évaluation des effets. Pour conclure, l'utilisation des solutions isotopiquement enrichies a permis de mieux simuler une situation plus proche de la réalité environnementale où les deux formes redox du Cr se retrouvent ensemble, bien que en proportions variables (Chapitre I, Partie 2, section II.3).

Tableau 12 : Moyennes \pm écart-types des valeurs des biomarqueurs cellulaires mesurés sur les tissus (branchies et glandes digestives) de *C. fluminea* exposées à différentes conditions (50 $\mu\text{g/L}$ de Cr(III) ou de Cr(VI) ou à un mélange des deux formes (100 $\mu\text{g/L}$ de $^{50}\text{Cr(III)}$ + 50 $\mu\text{g/L}$ de $^{53}\text{Cr(VI)}$) pendant 96 h.

Biomarqueur	Condition	Branchies	Glandes digestives	Biomarqueur	Condition	Branchies	Glandes digestives
protéines broyat (mg/gMF)	Témoin	11,6 \pm 3,8	25,6 \pm 4	ACP ($\mu\text{mol/g prot/h}$)	témoin	89 \pm 178	85 \pm 15
	$^{50}\text{Cr(III)}$ + $^{53}\text{Cr(VI)}$	14,9 \pm 2,3	28,9 \pm 4,2		$^{50}\text{Cr(III)}$ + $^{53}\text{Cr(VI)}$	89 \pm 17	76 \pm 20
	Cr(III)	15,6 \pm 2,2	29,6 \pm 1,8		Cr(III)	78 \pm 14	80 \pm 13
	Cr(VI)	11,5 \pm 2,5	32,5 \pm 6		Cr(VI)	77 \pm 18	83 \pm 22
protéines fraction cytosolique (mg/gMF)	Témoin	8,6 \pm 0,8	19,7 \pm 2,7	LDH ($\mu\text{mol NADPH/gprot/h}$)	témoin	135 \pm 35	182 \pm 88
	$^{50}\text{Cr(III)}$ + $^{53}\text{Cr(VI)}$	10 \pm 1,8	20,7 \pm 2,4		$^{50}\text{Cr(III)}$ + $^{53}\text{Cr(VI)}$	107 \pm 35	121 \pm 35
	Cr(III)	9,9 \pm 1,7	21,7 \pm 0,7		Cr(III)	95 \pm 29	137 \pm 65
	Cr(VI)	9,6 \pm 0,3	22 \pm 3,8		Cr(VI)	110 \pm 59	170 \pm 121
Cholestérol (mg/g MF)	Témoin	0,48 \pm 0,16	1,03 \pm 0,25	TAC ($\mu\text{mol Teq/gprot/min}$)	témoin	-	31,3 \pm 6,5
	$^{50}\text{Cr(III)}$ + $^{53}\text{Cr(VI)}$	0,61 \pm 0,1	1,23 \pm 0,24		$^{50}\text{Cr(III)}$ + $^{53}\text{Cr(VI)}$	-	25,5 \pm 3,9
	Cr(III)	0,61 \pm 0,1	1,20 \pm 0,17		Cr(III)	-	28,9 \pm 5,2
	Cr(VI)	0,48 \pm 0,12	1,29 \pm 0,34		Cr(VI)	-	53,9 \pm 40,7
Triglycérides (mg/g MF)	témoin	0,45 \pm 0,24	3,59 \pm 1,38	Gpx ($\mu\text{mol NADPH/gprot/min}$)	témoin	-	-
	$^{50}\text{Cr(III)}$ + $^{53}\text{Cr(VI)}$	0,45 \pm 0,1	4,22 \pm 1,53		$^{50}\text{Cr(III)}$ + $^{53}\text{Cr(VI)}$	-	-
	Cr(III)	0,58 \pm 0,1	3,78 \pm 0,83		Cr(III)	-	-
	Cr(VI)	0,43 \pm 0,2	4,08 \pm 1,28		Cr(VI)	-	-
ETS ($\mu\text{mol O}_2/\text{g MF/h}$)	témoin	33 \pm 11,1	45,1 \pm 3,3	GST($\mu\text{mol CDNB/gprot/min}$)	témoin	343 \pm 126	982 \pm 345
	$^{50}\text{Cr(III)}$ + $^{53}\text{Cr(VI)}$	46 \pm 7,6	51,7 \pm 5,8		$^{50}\text{Cr(III)}$ + $^{53}\text{Cr(VI)}$	428 \pm 178	1001 \pm 333
	Cr(III)	42,7 \pm 4,5	48,6 \pm 4,1		Cr(III)	415 \pm 77	972 \pm 184
	Cr(VI)	32,9 \pm 5,1	53 \pm 11,8		Cr(VI)	461 \pm 126	949 \pm 173
LOOH ($\mu\text{mol/g prot}$)	témoin	64,3 \pm 9,7	22,4 \pm 0,9	CSP3 ($\mu\text{mol pNA/gprot/h}$)	témoin	13 \pm 5,9	7 \pm 3,6
	$^{50}\text{Cr(III)}$ + $^{53}\text{Cr(VI)}$	55,9 \pm 5,8	23,2 \pm 1,3		$^{50}\text{Cr(III)}$ + $^{53}\text{Cr(VI)}$	13,7 \pm 1,6	3,8 \pm 2,6
	Cr(III)	61,9 \pm 3	22,6 \pm 1,4		Cr(III)	19,8 \pm 5,8	5,5 \pm 3,6
	Cr(VI)	57,4 \pm 1,8	24,6 \pm 3,1		Cr(VI)	4,3 \pm 1,7	5,8 \pm 4,7

Tableau 13 : Résultats statistiques de l'analyse de variance (Anova à 2 facteurs) pour les activités des différents biomarqueurs mesurés dans les branchies et les glandes digestives des corbicules exposées pendant 96 h à 50 µg/L de Cr(III) ou de Cr(VI) ou à un mélange des deux (100 µg/L de ⁵⁰Cr(III) + 50 µg/L de ⁵³Cr(VI)). « ddl » : degré de liberté. Les valeurs en gras sont statistiquement significatives. Les deux marqueurs Gpx et TAC n'ont pas été inclus dans le traitement statistique à cause des faibles valeurs de leur activité. L'activité de la catalase n'a pas été déterminée.

		[Protéines] broyat	[Protéines] F cytosolique	[Triglycérides]	[Cholestérol]	ETS	LOOH	ACP	LDH	GST	CSP 3
	ddl	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value
Tissue (A)	1	0,000000	0,000000	0,000000	0,000001	0,002075	0,000000	0,755250	0,147404	0,000008	0,000470
Forme Cr (B)	3	0,254569	0,503608	0,941669	0,486318	0,165318	0,491657	0,858724	0,604267	0,976466	0,032795
A · B	3	0,273127	0,908952	0,911550	0,670216	0,309913	0,212931	0,805616	0,942236	0,941889	0,023132

Références bibliographiques

- Barmo, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Olivieri, S., Bianchi, N., Gallo, G., Canesi, L., 2011. Pleiotropic effects of hexavalent chromium (CrVI) in *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Chemosphere* 83, 1087–1095. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.037
- Barrera-Escorcía, G., Wong-Chang, I., 2010. Lipid peroxidation and metallothionein induction by chromium and cadmium in Oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) from Mandinga Lagoon, Veracruz. *Hidrobiológica* 20, 31–40.
- Black, M.C., Belin, J.I., 1998. Evaluating Sublethal Indicators of Stress in Asiatic Clams (*Corbicula fluminea*) Caged in an Urban Stream. doi:10.1520/STP12156S
- Bobrowski, A., Baś, B., Dominik, J., Niewiara, E., Szalińska, E., Vignati, D., Zarbski, J., 2004. Chromium speciation study in polluted waters using catalytic adsorptive stripping voltammetry and tangential flow filtration. *Talanta* 63, 1003–1012. doi:10.1016/j.talanta.2004.01.004
- Borković-Mitić, S., Pavlović, S., Perendija, B., Despotović, S., Gavrić, J., Gačić, Z., Saičić, Z., 2013. Influence of some metal concentrations on the activity of antioxidant enzymes and concentrations of vitamin E and SH-groups in the digestive gland and gills of the freshwater bivalve *Unio tumidus* from the Serbian part of Sava River. *Ecol. Indic.* 32, 212–221. doi:10.1016/j.ecolind.2013.03.024
- Canesi, L., Barmo, C., Fabbri, R., Olivieri, S., Gallo, G., Boatti, L., Dondero, F., Viarengo, A., 2010. Effects of hexavalent chromium in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Supplement* 1, S36. doi:10.1016/j.cbpa.2010.06.103
- Ciacci, C., Barmo, C., Fabbri, R., Canonico, B., Gallo, G., Canesi, L., 2011. Immunomodulation in *Mytilus galloprovincialis* by non-toxic doses of hexavalent Chromium. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 1026–1033. doi:10.1016/j.fsi.2011.09.002
- Ciacci, C., Barmo, C., Gallo, G., Maisano, M., Cappello, T., D'Agata, A., Leonzio, C., Mauceri, A., Fasulo, S., Canesi, L., 2012. Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 120–121, 109–118. doi:10.1016/j.aquatox.2012.04.015
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997. Glutathione Reductase, Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase, Glutathione Levels, and Lipid Peroxidation in Freshwater Bivalves, *Unio tumidus*, as Biomarkers of Aquatic Contamination in Field Studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38, 122–131. doi:10.1006/eesa.1997.1582
- Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., Wood, W., 2007. Framework for Metals Risk Assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68, 145–227. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.03.015
- Franzellitti, S., Viarengo, A., Dinelli, E., Fabbri, E., 2012a. Molecular and cellular effects induced by hexavalent chromium in Mediterranean mussels. *Aquat. Toxicol.* 124–125, 125–132. doi:10.1016/j.aquatox.2012.07.011
- Franzellitti, S., Viarengo, A., Dinelli, E., Fabbri, E., 2012b. Molecular and cellular effects induced by hexavalent chromium in Mediterranean mussels. *Aquat. Toxicol.* 124–125, 125–132. doi:10.1016/j.aquatox.2012.07.011
- Guidi, P., Frenzilli, G., Benedetti, M., Bernardeschi, M., Falleni, A., Fattorini, D., Regoli, F., Scarcelli, V., Nigro, M., 2010. Antioxidant, genotoxic and lysosomal biomarkers in the freshwater bivalve (*Unio pictorum*) transplanted in a metal polluted river basin. *Aquat. Toxicol.* 100, 75–83. doi:10.1016/j.aquatox.2010.07.009

- Mazorra, M.T., Rubio, J.A., Blasco, J., 2002. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 131, 241–249. doi:10.1016/S1096-4959(01)00502-4
- Moloukhia, H., Sleem, S., 2011. Bioaccumulation, Fate and Toxicity of Two Heavy Metals Common in Industrial Wastes in Two Aquatic Molluscs. *J. Am. Sci.* 7, 459–464. doi:10.7537/marsjas070811.51
- Oliveira, L.F. de, Martinez, C.B. dos R., 2014. Chromium Accumulation in the Asian Clam, *Corbicula fluminea* (Müller, 1774), as an Indicative of Landfill Leachate Contamination. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 93, 149–153. doi:10.1007/s00128-014-1313-7
- Potet, M., Devin, S., Pain-Devin, S., Rousselle, P., Giambérini, L., 2016. Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. *Environ. Pollut.* 218, 39–49. doi:10.1016/j.envpol.2016.08.025
- Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31, 143–164. doi:10.1016/0166-445X(94)00064-W
- Tsangaris, C., Papathanassiou, E., Nicolaidou, A., 2008a. Biochemical biomarkers and overall health status of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to nickel and chromium. *Chem. Ecol.* 24, 315–327. doi:10.1080/02757540802368650
- Tsangaris, C., Papathanassiou, E., Nicolaidou, A., 2008b. Biochemical biomarkers and overall health status of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to nickel and chromium. *Chem. Ecol.* 24, 315–327. doi:10.1080/02757540802368650
- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., Balasubramanian, M.P., 2007. Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. *Chemosphere* 69, 979–986. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.05.011
- Vranković, J., 2015. Environmental impact on the antioxidant responses in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Veneroida: Corbiculidae) from the Danube River. *Ital. J. Zool.* 82, 378–386. doi:10.1080/11250003.2015.1043963
- Walsh, A.R., O'Halloran, J., 1998. Accumulation of chromium by a population of mussels (*Mytilus edulis* (L.)) exposed to leather tannery effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1429–1438. doi:10.1002/etc.5620170729
- Wang, P.F., Zhang, S.H., Wang, C., Han, N.N., 2012. Cr Bioaccumulation and its Effects on Nutrient Elements Uptake and Oxidative Response in *Corbicula Fluminea* Exposed to Hexavalent Chromium. *Adv. Mater. Res.* 343-344, 975–980. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.343-344.975
- Wang, W.-X., Griscom, S.B., Fisher, N.S., 1997. Bioavailability of Cr(III) and Cr(VI) to Marine Mussels from Solute and Particulate Pathways. *Environ. Sci. Technol.* 31, 603–611. doi:10.1021/es960574x
- Zarogian, G.E., Johnson, M., 1983. Chromium uptake and loss in the bivalves *Crassostrea virginica* and *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*

Partie 5

Cytotoxicité du Cr(III) et du Cr(VI) chez les cellules CHO

Contexte

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'internalisation du Cr(III), qui restent très peu connus comparés à ceux du Cr(VI), nous avons utilisé différentes lignées cellulaires de cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) exprimant ou pas des protéoglycanes de surface. Les cytotoxicités du Cr(III) et du Cr(VI) ont été comparées sur ces différentes lignées cellulaires. Une implication de ces protéoglycanes dans des phénomènes d'internalisation de métaux a déjà été reportée dans la littérature (Gandhi and Mancera, 2008). Nous avons donc voulu évaluer si ces molécules de surface cellulaire peuvent jouer un rôle dans l'adsorption et l'internalisation du Cr et ainsi contribuer à sa cytotoxicité.

Méthodes

La cytotoxicité du Cr(III) ainsi que celle du Cr(VI) ont été évaluées en réalisant des tests MTT sur trois lignées des cellules CHO (la lignée CHO-K1 sauvage : **wt**, la lignée mutante n'exprimant pas de protéoglycanes : **pgs-** et la lignée mutante transfectée avec un vecteur d'expression de la β -galactosyltransférase T7 : **pgs+**). De plus, la solubilité du Cr(III) a été évaluée dans le milieu de culture en incubant le Cr(III) et le Cr(VI) en absence des cellules. Ensuite, la fraction soluble (filtration 0,22 μ m), a été mesurée par SAA après minéralisation.

Principaux résultats

Le Cr(VI) s'est montré plus cytotoxique que le Cr(III) vis-à-vis des 3 lignées de cellules CHO. Cette cytotoxicité du Cr(VI) devenait plus importante avec la durée de l'incubation mais restait à des niveaux relativement comparables entre les trois lignées. En revanche, même si le Cr(III) était moins cytotoxique que le Cr(VI), le niveau de cytotoxicité après deux jours d'incubation était plus faible dans les cellules **pgs-** ne présentant pas de protéoglycanes de surface, ce qui ferait soupçonner un rôle de ces molécules de surface cellulaire dans les mécanismes d'interactions entre cellules et Cr(III). Enfin, Le Cr(III) et le Cr(VI) restaient relativement solubles (pertes inférieures à 20%) dans le milieu de culture utilisé.

I. Cinétique de croissance des cellules CHO

Pour connaître la cinétique de croissance des cellules CHO wt (indispensable à la mise en place du test de cytotoxicité en présence du MTT) 2000, 5000 et 10000 cellules ont été ensemencées dans des microplaques à 96 puits et incubées pendant 24, 48 et 72 h à 37 °C (5% CO₂). Les cellules ont été examinées au microscope pour un suivi de confluence et l'activité MTT a été mesurée (figure 44).

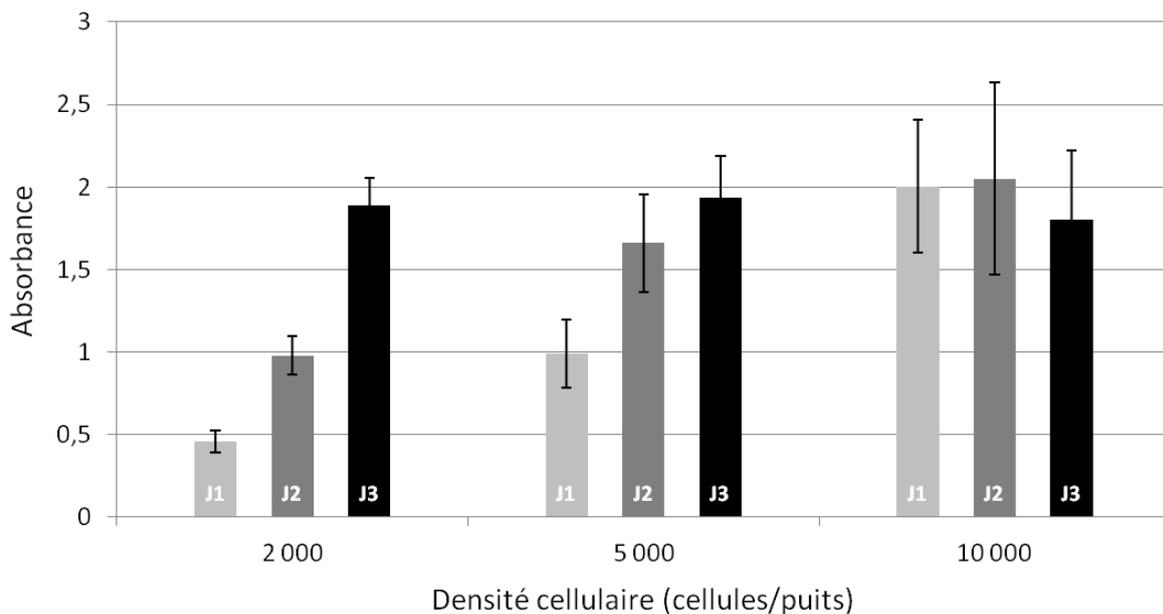


Figure 44 : Détermination de la densité cellulaire optimale pour l'évaluation de la cytotoxicité du Cr chez les cellules CHO wt (wild type). J1, J2, J3 indiquent de temps d'incubation allant de 1 à 3 jours. Les barres d'erreur indiquent ± 1 écart type (n = 3).

L'augmentation de l'absorbance (formation de formazan) en fonction de la cinétique de croissance des cellules après l'ensemencement de 2000 et 5000 cellules/puits traduit la prolifération des cellules CHO. En revanche, la densité d'ensemencement de 10000 cellules/puits apparaît trop importante pour observer une cinétique de prolifération. Ces résultats ont pu être confirmés par l'observation microscopique des cellules en culture. La confluence après 24 h était faible pour les puits contenant 2000 cellules alors que les puits avec 5000 cellules montraient une confluence plus soutenue. Pour les puits à 10000 cellules, la confluence était déjà proche de 80% après un jour d'incubation. 100% de confluence étaient atteints après 72 h pour les densités cellulaires d'ensemencement de 2000 et 5000 cellules/puits contre 48 h pour la densité de 10000 cellules/puits. Puisqu'il est recommandé

de réaliser les tests de cytotoxicité et de prolifération cellulaire sur des cellules en phase de croissance, la densité d'ensemencement des cellules CHO choisie a été de 2000 cellules/puits, densité pour laquelle par ailleurs la dispersion des résultats était faible (Figure 44). De plus, le suivi des effets du Cr a été réalisé durant 24 et 48 h d'incubation afin d'éviter de se rapprocher d'une situation de confluence des cellules pour des temps plus longs. La même optimisation a été effectuée avec les deux autres lignées (pgs - ; pgs +) ce qui a permis de retenir la densité d'ensemencement de 2000 cellules/puits pour toutes les lignées.

L'effet du Cr(III) et du Cr(VI) a été évalué sur les cellules CHO à l'aide des tests MTT réalisés dans un premier temps sur une gamme étendue de concentrations en Cr puis sur une gamme restreinte, afin de déterminer les valeurs de CE_x (résultats non montrés). De plus, nous avons observé une diminution des absorbances en fonction des concentrations du Cr(III) et du Cr(VI), ce qui montre l'absence d'interférence entre l'absorbance du Cr susceptible d'être présent dans le milieu et l'absorbance des cristaux de formazan.

II. Comparaison de la cytotoxicité du Cr(III) et du Cr(VI) chez les différentes lignées cellulaires

Nous avons voulu déterminer si les protéoglycanes de surface pouvaient jouer un rôle dans l'adsorption et l'internalisation du Cr et ainsi contribuer à sa cytotoxicité. Pour cela, en se basant sur les résultats des expériences précédentes, des tests MTT ont été réalisés sur trois lignées des cellules CHO (la souche CHO-K1 sauvage : **wt**, la souche mutante n'exprimant pas de protéoglycanes : **pgs-** et la souche mutante transfectée avec un vecteur d'expression de la β -galactosyltransférase T7 : **pgs+**). Les résultats, obtenus sous forme de valeurs d'absorbance, ont été convertis en pourcentage d'inhibition par rapport au témoin :

$\left(1 - \frac{uDO}{uDO_0}\right) * 100$ Où uDO_0 représente la moyenne des absorbances obtenues pour le témoin et uDO la moyenne des absorbances pour les cellules exposées au Cr).

Une forte toxicité a été observée dans le cas du Cr(VI). En effet, à J1 (24 h d'incubation), le maximum d'inhibition (environ 90%) était atteint à partir d'une concentration de 3,2 mg de Cr(VI)/L (Figure 45-A). Alors que à J2 (48 h d'incubation), le maximum était atteint dès la

concentration de 0,7 mg de Cr(VI)/L (Figure 45-B) et cela pour les trois lignée cellulaires étudiées.

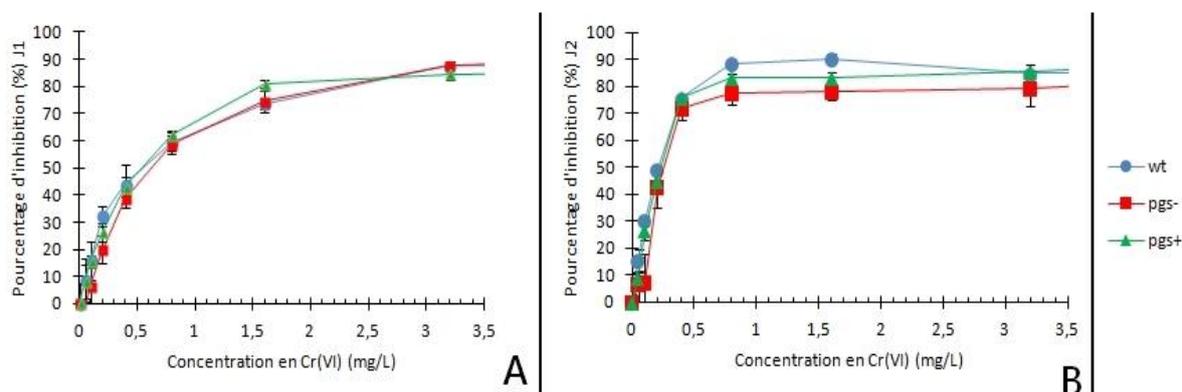


Figure 45 : Effets du Cr(VI) sur la viabilité cellulaire. Les trois lignées cellulaires sont comparées pour chaque graphique. A : 24h d'incubation (J1) ; B : 48h d'incubation (J2). Les tests ont été réalisés sur microplaques 96 puits, 6 réplicas par modalité.

Les valeurs de CE_{50} et de CE_{25} du Cr(VI) ont été déterminées chez les différentes lignées cellulaires et sont résumées dans le tableau 14. La toxicité du Cr(VI) devient plus importante avec l'augmentation de la durée d'incubation, mais les valeurs de CE_{50} et de CE_{25} restent relativement proches chez les trois lignées cellulaires pour un même temps d'incubation malgré des valeurs légèrement plus élevées dans le cas de la lignée pgs-.

Tableau 14 : Valeurs de CE_{50} et CE_{25} du Cr(VI) (en mg/L Cr) chez les trois lignées cellulaires CHO d'intérêt : wt, wild type ; Pgs-, lignée mutante n'exprimant pas de protéoglycanes; Pgs+, lignée mutante transfectée avec un vecteur d'expression de la β -galactosyltransférase T7. Ces résultats ont été obtenus en utilisant la macro Regtox.

	wt	Pgs-	Pgs+
	CE_{50} (mg/L)		
J1 (24 h)	0,46	0,54	0,42
J2 (48 h)	0,16	0,20	0,17
	CE_{25} (mg/L)		
J1 (24 h)	0,15	0,24	0,17
J2 (48 h)	0,08	0,14	0,09

Dans le cas du Cr(III), nos résultats indiquent, dans l'ensemble, une cytotoxicité relativement faible. En effet, les concentrations utilisées sont presque 50 fois supérieures à celles utilisées pour le Cr(VI), tandis qu'un maximum de 45% d'inhibition est observé à J1 (Figure 46). Cependant, une hausse de la cytotoxicité a été observée à J2, avec jusqu'à 70% d'inhibition

(250 mg de Cr(III)/L) pour les lignées wt et pgs+. Les courbes J2 sont particulièrement intéressantes dans la mesure où elles montrent cette fois clairement une différence entre les lignées cellulaires. Il semblerait que les cellules pgs- soient en partie préservées de l'action toxique du Cr(III) avec une inhibition de la viabilité cellulaire (à 250 mg de Cr(III)/L) de 40% par rapport aux 70% observés pour wt et pgs+ (Figure 46). Ces résultats suggèrent donc un lien possible entre la toxicité du Cr(III) chez les cellules CHO et la présence de protéoglycanes de surface. Ces glycoprotéines pourraient ainsi jouer un rôle dans l'internalisation du Cr(III), soit par le biais de liaisons ioniques avec les cations Cr^{3+} et/ou rétention d'ion de Cr(III) qui sont au voisinage direct des cellules. Gandhi et Mancera, (2008) soulignent la présence de liaisons ioniques entre ces glycoprotéines et des métaux de transition, notamment le zinc. En outre, les travaux de Fukasawa et al, (1997) ont montré également l'importance de ces protéoglycanes dans le phénomène de phagocytose chez la lignée CHO-K1 (modèle utilisé dans notre étude). En effet, ces cellules sont capables de phagocyter des billes de latex de 0,8 μm de diamètre, tout ceci facilité par les protéoglycanes de surface. On pourrait donc imaginer un mécanisme d'endocytose aspécifique d'agrégats Cr(III)-protéines chez nos cellules. Néanmoins, ces expériences restent préliminaires et devront être répétées afin de confirmer et préciser le rôle de ces molécules de surface cellulaire exoplasmique dans l'internalisation et donc la cytotoxicité du Cr(III).

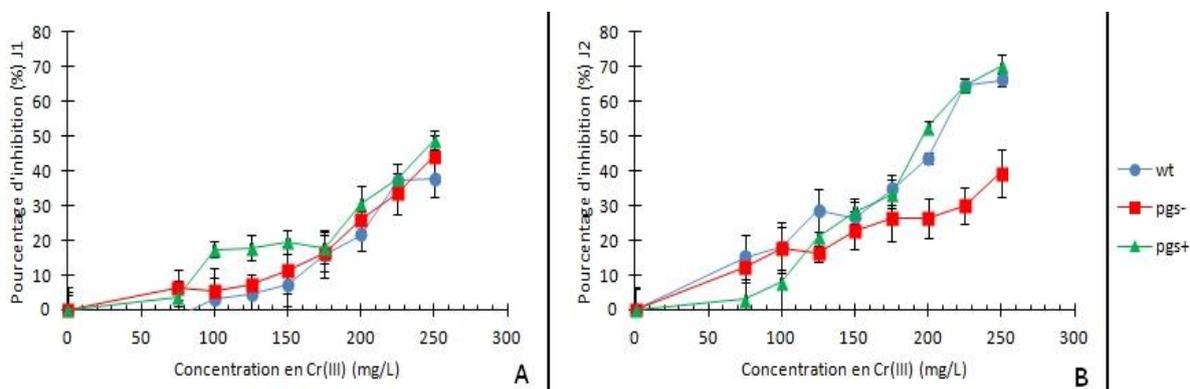


Figure 46 : Effets du Cr(III) sur la viabilité cellulaire. Les trois lignées cellulaires sont comparées pour chaque graphique. A : 24h d'incubation (J1) ; B : 48h d'incubation (J2). Les tests ont été réalisés sur microplaques 96 puits, 6 réplicas par modalités.

Dans le cas du Cr(VI), nos résultats suggèrent que son internalisation et sa toxicité augmentent avec le temps d'exposition. La spéciation du Cr(VI) est dominée par des chromates ou dichromates qui sont des espèces chimiques chargées négativement. La charge également négative des protéoglycanes de surface (Gandhi et Mancera, 2008) pourrait

expliquer l'absence de différence de toxicité du Cr(VI) chez les trois lignées cellulaires exprimant ou non ces molécules par l'absence de liaisons chimiques stables entre le Cr(VI) et ces glycoprotéines de surface. De plus, le Cr(VI) est généralement considéré comme un agent très toxique dans la mesure où son internalisation dans les cellules est aisée suite à son analogie avec les ions phosphates et sulfates, et peut donc potentiellement entrer en compétition avec ces derniers au niveau de leurs transporteurs spécifiques (Cervantes et al., 2001; Viti et al., 2014). Il est également établi que sa réduction intracellulaire en Cr(III) est une source importante de stress oxydant, responsable en partie de sa toxicité (Travacio et al., 2000).

Dans le cas du Cr(III), la faible toxicité observée pourrait être liée au comportement chimique de cette forme redox du Cr dans le milieu d'exposition. En effet, cette forme est relativement peu soluble dans les milieux aqueux, et sa spéciation est dominée par la formation d'hydroxydes de Cr dans les milieux ayant un pH entre 6 et 11 (Barceloux, 1999; Rai et al., 1989). De plus, il a déjà été reporté que le Cr(III) est capable de former des liaisons covalentes avec des protéines (Reynolds et al., 2004). Notre milieu de culture étant complété avec du sérum de veau fœtal (SVF), il est particulièrement riche en biomolécules de grande taille-protéines notamment-soit autant de liaisons que le Cr(III) pourrait former. Il est d'ailleurs intéressant de préciser que, pour les plus hautes concentrations étudiées (225 et 250 mg/L), des particules macroscopiques sont visibles dans le milieu de culture, suggérant ainsi que le Cr(III) pourrait former de grands agrégats protéiques. Tous ces paramètres suggèrent une possible baisse de la concentration de Cr(III) biodisponible pour les cellules.

Des tests de viabilité cellulaire à l'aide du bleu trypan ont été réalisés (résultats non montrés) dans le but de vérifier les résultats des tests MTT, mais aussi afin de déterminer si le Cr avait un effet cytotoxique ou cytostatique sur les cellules. Nous avons remarqué que la densité cellulaire diminue de façon corrélée avec l'augmentation de la concentration du Cr(III) comme celle du Cr(VI). Cependant, aucun effet majeur du Cr(III) n'a été constaté sur la viabilité puisque moins de 5% des cellules comptés apparaissaient marquées en présence de bleu trypan (cellules mortes) ce qui est similaire à la viabilité de cellules non-traitées (résultats non montrés). Toutefois, il est important de noter que l'observation au microscope des cultures cellulaires incubées ou non en présence de chrome (III) a permis de montrer que

le nombre de cellules restées fixées au support de culture est d'autant plus important que la concentration en chrome augmente. Ces résultats ont donc montré que le Cr(III) pouvait avoir un effet inhibiteur sur la trypsine. Cette protéase est utilisée en culture cellulaire en tant qu'agent de dissociation matrice-cellule, elle permet de détacher les cellules en culture. Puisque les comptages au bleu de trypan nécessitent la récupération des cellules adhérentes (en culture avec du chrome) et alors que nos cellules restaient en grande partie fixées à leur support en dépit d'un traitement en présence de trypsine pour les cellules incubées en présence de Cr(III), les résultats de viabilité cellulaire sont inexploitable à ce stade et ne sont pas présentés dans cette thèse.

III. Vérification des concentrations d'exposition dans le milieu de culture cellulaire

Des solutions contenant 10 ou 150 mg/L de Cr(III) ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ou Cr(VI) ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$) ont été incubées pendant 24 h dans du milieu de culture complet, sans cellules. Puisque l'ajout d'acide nitrique (1% v/v) nécessaire pour l'analyse du Cr en absorption atomique provoquait la formation d'un précipité, les solutions ont été minéralisées avec un mélange de HNO_3 et H_2O_2 (chapitre II, section V.5) avant analyse. Cette procédure permet d'obtenir la quasi-disparition du précipité et, en moyenne, les différences entre concentrations mesurées et nominales sont de seulement 11% (Figure 47). Ces pourcentages montrent que les concentrations mesurées en chrome trivalent et hexavalent varient en fonction du temps d'incubation dans le milieu. Les pourcentages de pertes de Cr(III) après filtration restent cependant relativement faibles comparés à ceux observés dans le cas du milieu ISO (milieu de test algal, chapitre III, partie 1). Il convient toutefois de souligner que ces expériences ont été réalisées une seule fois et devront donc être répétées.

De plus, la mesure des concentrations et tailles de particules de Cr dans le milieu de culture complet dopé ou pas avec différentes concentrations du Cr(III), à l'aide du Nanosight (analyses NTA-voir chapitre II, partie III.4.3), n'a pas été possible suite à une saturation du signal liée à la composition complexe de ce milieu de culture des cellules CHO (résultats non montrés).

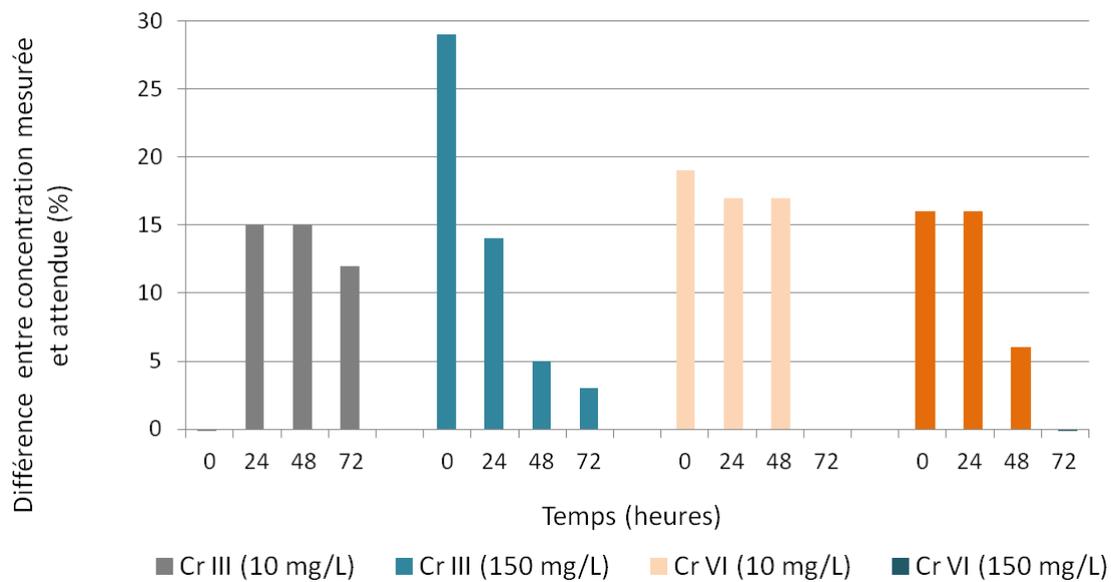


Figure 47 : Evolution des concentrations filtrées de Cr à t = 0 et 24, 48 et 72 h après ajout du Cr(III) ou du Cr(VI) dans le milieu de culture complet à deux concentrations différentes. Les échantillons ont été minéralisés avec de l'acide nitrique (10% v/v) et du peroxyde d'hydrogène (10% v/v).

Références bibliographiques

- Barceloux, D.G., 1999. Chromium. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37, 173–194. doi:10.1081/CLT-100102418
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J.C., Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 335–347. doi:10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x
- Fukasawa, M., Sekine, F., Miura, M., Nishijima, M., Hanada, K., 1997. Involvement of Heparan Sulfate Proteoglycans in the Binding Step for Phagocytosis of Latex Beads by Chinese Hamster Ovary Cells. *Exp. Cell Res.* 230, 154–162. doi:10.1006/excr.1996.3403
- Gandhi, N.S., Mancera, R.L., 2008. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chem. Biol. Drug Des.* 72, 455–482. doi:10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x
- Rai, D., Eary, L.E., Zachara, J.M., 1989. Environmental chemistry of chromium. *Sci. Total Environ., The Chromium Paradox in Modern Life* 86, 15–23. doi:10.1016/0048-9697(89)90189-7
- Reynolds, M., Peterson, E., Quiévryn, G., Zhitkovich, A., 2004. Human Nucleotide Excision Repair Efficiently Removes Chromium-DNA Phosphate Adducts and Protects Cells against Chromate Toxicity. *J. Biol. Chem.* 279, 30419–30424. doi:10.1074/jbc.M402486200
- Travacio, M., Mar a Polo, J., Llesuy, S., 2000. Chromium(VI) induces oxidative stress in the mouse brain. *Toxicology* 150, 137–146. doi:10.1016/S0300-483X(00)00254-7
- Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., Giovannetti, L., 2014. Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 633–659. doi:10.1111/1574-6976.12051

Chapitre IV.

Conclusions et perspectives

I. Contexte général et nécessité du travail de thèse

Si l'écotoxicité du Cr(III) a longtemps été considérée comme négligeable, des travaux récents tendent à suggérer que celle-ci serait largement sous-estimée, alors même que l'écotoxicité du Cr(VI) n'est pas contestée. Nous avons notamment postulé que la spéciation du Cr(III) doit être considérée avec plus d'attention dans toute étude d'écotoxicité du Cr(III). Ainsi un des objectifs de cette thèse était d'améliorer la compréhension de l'écotoxicité du Cr(III) par une étude détaillée de sa spéciation en conditions de laboratoire. Nous avons de même réalisé des études comparant les effets biologiques du Cr(III) et du Cr(VI) afin d'infirmer ou confirmer le consensus 'le Cr(VI) est plus toxique que le Cr(III)'. De plus, durant cette thèse, certains aspects des interactions du Cr(III) et du Cr(VI) avec le vivant ont été comparés pour la première fois en utilisant des concentrations d'exposition réalistes d'un point de vue environnemental. Pour finir, l'utilisation de solutions isotopiquement enrichies en $^{50}\text{Cr(III)}$ et $^{53}\text{Cr(VI)}$ aura permis d'en suivre la bioaccumulation dans les tissus des organismes exposés, la présence simultanée des deux formes redox étant la situation la plus courante dans l'environnement. Tous ces travaux de laboratoire liant l'écotoxicité, la biodisponibilité et la bioaccumulation du Cr(III) et du Cr(VI) avec leurs spéciations permettront une meilleure évaluation et gestion de leur risque environnemental.

II. Spéciation et effets biologiques du chrome

Nos résultats montrent que les concentrations du Cr(VI) restent stables dans les différents milieux et pour les durées d'exposition utilisées dans nos travaux. En revanche, les concentrations du Cr(III) diminuent rapidement au fil du temps dans les milieux d'exposition ISO8692 (milieu standardisé pour les tests de croissance algale) et l'eau minérale Cristalline – source Aurèle (utilisée dans les expériences avec les bivalves *Corbicula fluminea*). Ces résultats ont été observés pour toutes les concentrations testées. Par ailleurs, le Cr(III) s'est avéré plus toxique que le Cr(VI) vis-à-vis de la croissance algale, plus particulièrement si l'on tient compte de la concentration effective d'exposition plutôt que de la concentration nominale en chrome.

Les résultats d'IC-ICP-MS ont également permis une caractérisation détaillée de la spéciation du Cr(III) et montrent qu'elle change très rapidement dans le milieu ISO8692. En particulier,

l'espèce ionique du Cr(III) disparaît du milieu d'exposition environ 2 heures après l'ajout initial de $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. D'autres espèces de Cr(III), probablement des hydroxydes ou de carbonates, se forment en même temps, mais au final la concentration du Cr(III) diminue au fil de 72 heures correspondant à la durée d'un test écotoxicologique de croissance algale. Les analyses par ICP-MS ont aussi permis d'exclure la présence d'interconversions Cr(III)/Cr(VI), en confirmant que le Cr(III) est plus écotoxique que le Cr(VI) dans nos conditions expérimentales. Compte tenu de changements très rapides dans les concentrations et dans la spéciation du Cr(III), les relations dose-réponse établies pour le Cr(III) dans différentes études fournissent des informations incomplètes et parfois inadéquates sur les concentrations réelles d'exposition ainsi que sur l'espèce chimique du Cr(III) qui provoque les effets observés. Compte-tenu de l'évolution très rapide de la spéciation du Cr(III) dans les milieux de test, une évaluation correcte de l'écotoxicité du Cr(III) nécessite une procédure méthodologique *ad hoc*, particulièrement dans des conditions de pH (proches de) neutres. A ces valeurs de pH, des espèces insolubles de Cr(III), potentiellement responsables de la diminution des concentrations observées dans les différents milieux, peuvent être prédominantes. Par conséquent, la façon appropriée d'établir une relation concentration-réponse correcte pour le Cr(III) doit utiliser des protocoles initialement développés pour les substances peu solubles. Les étapes détaillées de cette procédure comprennent des mesures répétées de la concentration totale et filtrable du Cr(III) sur toute la durée du test, le suivi du pH du milieu durant la période des tests, le calcul de la concentration d'exposition en tant que moyenne pondérée ou géométrique en fonction du temps, l'expression de la toxicité du Cr(III) en termes des espèces ioniques plutôt que de concentrations totales. Un article détaillant cette procédure est en cours de préparation.

La diminution des concentrations filtrées ($0,22 \mu\text{m}$) dans le milieu de test algal ISO8692 dopé avec du Cr(III) suggère la formation de particules (colloïdales) qui sont retenues par les filtres. Des analyses effectuées avec les techniques du Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) et Single Particle Counting (SPC) confirment la formation rapide de particules colloïdales contenant du Cr dans le milieu ISO dopé avec du Cr(III). Toutefois, la technique SPC n'a pas mis en évidence une formation de particules de ce type dans les milieux d'exposition des bivalves. Dans ce cas, la diminution des concentrations au fil du temps serait plutôt liée à des phénomènes d'adsorption sur les parois des cristallisoirs ou sur les coquilles des palourdes.

Afin d'évaluer l'éventuelle contribution de ces espèces insolubles du Cr(III) dans les mécanismes de toxicité, il serait pertinent d'étudier directement leur écotoxicité vis-à-vis des algues et d'autres modèles biologiques. En effet, des essais de synthèse de nanoparticules de Cr(III) (hydroxydes) par hydrolyse forcée ont été déjà réalisés (Annexe 3), mais sans pouvoir caractériser les particules obtenues en termes de distribution de taille par diffraction laser à cause de leur structure amorphe. Plusieurs techniques permettant une meilleure caractérisation de ces particules devraient être explorées. La DLS (Dynamic Light Scattering), SAXS (Small Angle X-ray Scattering), MET (Microscopie électronique à transmission), NTA (Nanoparticles Tracking Analysis) ou encore le SPC (Single Particle Counting) pourraient être utilisés pour la mesure de taille. De plus, l'étude de la composition élémentaire de ces particules pourrait se faire par des techniques comme la SPICP-MS (Single Particle Inductive Coupled Plasma-Mass Spectrometry) ou par un couplage d'EDS (Energy Dispersive X ray Spectroscopy) et d'ICP-OES (Inductive Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy).

Même si le comportement du Cr peut varier parmi les milieux d'exposition, les résultats détaillés de la spéciation du Cr aident à une meilleure compréhension de l'écotoxicité relative du Cr(III) et du Cr(VI). Ainsi, la comparaison des effets du Cr(III) et du Cr(VI) vis-à-vis de l'activité du photosystème II de l'algue *P. subcapitata* montre que l'inhibition de l'activité du PSII à 24 h prédit avec une bonne approximation les effets du Cr(III) et du Cr(VI) sur la croissance de la même algue à 72 heures dès lors que les CE₅₀ sont exprimées en ng de Cr disponible par cellule au début du test. En complément de ces résultats, il serait intéressant d'identifier les cibles du Cr(III) et du Cr(VI) au niveau du photosystème par des mesures des cinétiques de fluorescence modulée. Ces mesures permettent une meilleure compréhension des mécanismes de dissipation d'énergie dans les photosystèmes (Khalida et al., 2012) et donc de vérifier si les deux formes affectent les mêmes cibles au niveau du photosystème (p.ex., systèmes de collection de lumière, centres réactionnels ou systèmes de transport d'électrons). Par ailleurs, l'utilisation de la cytométrie de flux et des marqueurs cellulaires a permis de déterminer que le Cr(III) exerce un effet algicide sur les cellules de *P. subcapitata* et que, à de fortes concentrations en Cr(III), les cellules restant intègres ne fonctionnaient plus de façon optimale. Toutefois, ces tests ont été réalisés une seule fois sans réplicas et doivent être considérés comme des pistes possibles pour améliorer la compréhension des mécanismes d'écotoxicité du Cr chez les algues.

Dans le cadre de l'étude de l'écotoxicité du Cr(III) et du Cr(VI) chez les bivalves, l'étude des effets du Cr(III) et du Cr(VI) (seuls ou en mélange de solutions isotopiquement enrichies) sur différents biomarqueurs constitue une des approches de ce travail. Le traitement statistique des résultats (*Anova*) met en évidence des effets de la forme redox du Cr principalement en ce qui concerne les défenses antioxydantes et dommages cellulaires. Toutefois, l'examen détaillé des résultats ne montre pas de tendances régulières de la réponse de ces biomarqueurs dans les tissus étudiés. L'utilisation du mélange isotopique n'induit pas d'effets systématiquement différents par rapport aux expositions à l'une des deux formes redox. L'intégration des variations de ces biomarqueurs dans un traitement statistique plus puissant tel que l'analyse discriminante permettrait de séparer le poids des différents groupes et conditions sur les réponses des différents biomarqueurs et donc une meilleure compréhension des variations de ces biomarqueurs. En outre, il serait judicieux même en absence de perturbation nette de l'activité des biomarqueurs d'opérer à un autre niveau moléculaire en réalisant des études transcriptomiques ciblant les gènes codant ces différents biomarqueurs. Des tissus d'organismes exposés au Cr(III) et au Cr(VI) ont été congelés et l'étude transcriptomique constitue une piste à explorer dans le futur comme suite de ces expériences.

Les résultats obtenus dans les expériences avec les cellules CHO indiquent une plus forte toxicité du Cr(VI) par rapport au Cr(III). Ce dernier apparaît moins cytotoxique vis-à-vis des cellules pgs- par rapport aux deux autres lignées, tandis que les différences entre les lignées sont minimales pour le Cr(VI). Ceci suggère une possible importance des protéoglycanes de surface dans l'internalisation du Cr(III) chez les cellules CHO, contrairement au Cr(VI). En plus de répéter ces expériences (réalisées une seule fois), il serait pertinent d'utiliser du Cr(III) et du Cr(VI) radioactifs pour mesurer et comparer les taux d'adsorption et d'internalisation de ces deux formes redox du Cr chez les différentes lignées des cellules CHO. Cela permettra également de vérifier l'implication des protéoglycanes dans l'adsorption et l'internalisation du Cr chez ces cellules.

III. Internalisation et bioaccumulation du chrome

L'utilisation de ^{51}Cr radioactif a permis d'examiner en détail si les deux formes redox du Cr ont une vitesse d'internalisation et une distribution intracellulaire différentes dans les cellules algales. Indépendamment de la forme redox, l'équilibre entre le chrome en solution et les sites

d'adsorption sur la surface des cellules est atteint rapidement dans nos conditions expérimentales et l'adsorption atteint sa valeur maximale dans les premières minutes d'exposition. En revanche, les flux d'internalisation du Cr(III) et du Cr(VI) augmentent avec la concentration d'exposition et les changements du pH ont un effet parfois marqué sur l'internalisation du Cr(III), ce qui suggère un effet des protons sur l'internalisation du Cr(III). Globalement, les taux d'internalisation du Cr(III) et du Cr(VI) varient avec le pH et avec les concentrations d'exposition. L'internalisation Cr(VI) est plus rapide par rapport à celle du Cr(III) pour des concentrations de 1-10 nM, alors que la situation inverse est observée pour des concentrations de 1-10 μ M. De plus, pour des conditions de pH et de concentrations environnementalement réalistes (5 μ g/L de Cr et pH 7), les flux d'internalisation des deux formes de Cr sont comparables. Globalement, les différences d'internalisation entre les deux formes de Cr n'expliquent pas, à elles seules, les différences de leur écotoxicité. Pour compléter ces travaux, il serait intéressant d'élargir la gamme de pH étudiée et de tester l'applicabilité du formalisme du modèle du ligand biotique dans la prédiction de la biodisponibilité du Cr(III). Cela permettra d'émettre des hypothèses sur l'espèce(s) chimique(s) qui contrôle(nt) l'internalisation et par conséquent les effets biologiques du Cr(III) chez les cellules algales.

En termes de bioaccumulation, nos résultats ont montré que le Cr(III) et le Cr(VI) sont accumulés de façon similaire après 1 h et 72 h d'exposition à 100 nM du Cr(III) ou de Cr(VI) chez *C. reinhardtii*. Toutefois, la fraction extracellulaire constitue la majeure partie du Cr accumulé après 1h d'exposition tandis que la plupart du Cr se trouve dans la fraction intracellulaire après une exposition de 72h. De plus, ces deux formes redox du Cr ont une même distribution à l'intérieur des cellules et s'associent principalement aux organites et à des protéines et peptides cytosoliques thermiquement stables (fraction HSP). En utilisant une approche métallomique (SEC-ICP-MS) avec la fraction HSP, une biomolécule de liaison au Cr (~ 28 kDa) a été détectée après 1 h d'exposition pour les deux espèces de Cr. Après 72 h, une autre biomolécule de poids moléculaire inférieur (~ 0,7 kDa) impliquée dans la liaison au Cr et des intensités de signal plus élevées ont été observées pour le Cr(VI) ainsi que pour le Cr(III). La réalisation d'un test d'écotoxicité chez *C. reinhardtii* et d'un suivi de l'évolution de ces biomolécules dans la fraction HSP au cours du temps et des investigations permettant leur identification serait intéressante d'un point de vue cinétique. Cela permettra de coupler les aspects mécanistiques (répartition et induction de biomolécules) avec l'écotoxicité afin

d'améliorer la compréhension des interactions du Cr avec ces algues. Enfin, la similitude de la répartition intracellulaire et l'induction des mêmes biomolécules dans la fraction HSP suggèrent une réduction intracellulaire rapide du Cr(VI) en Cr(III).

Dans le cas des expériences réalisées avec les bivalves *C. fluminea*, la bioaccumulation du Cr(III) et du Cr(VI) est généralement faible après exposition aux différentes concentrations pendant 24 h ou 96 h. De plus, nous avons remarqué que les deux formes de Cr s'accumulent dans les deux tissus (branchies et glandes digestives). Les teneurs en Cr dans ces tissus est comparables après exposition des organismes aux deux formes séparément ou en mélange, même si des interactions entre les deux formes semblent exister pour les expositions à un mélange Cr(III)/Cr(VI). Sachant qu'à l'intérieur des cellules le Cr(VI) est rapidement réduit en Cr(III) qui y est majoritaire, il serait pertinent de coupler l'utilisation des solutions isotopiquement enrichies et des techniques de séparation et de quantification des formes redox du Cr (p.ex., IC-ICP-MS) pour vérifier si le Cr(III) accumulé dans les tissus était absorbé sous forme de Cr(III) ou plutôt de Cr(VI) qui a été ensuite réduit (p. ex., déterminer si le Cr(III) mesuré dans les tissus est présent sous la forme ajoutée ($^{50}\text{Cr(III)}$) ou plutôt sous forme réduite du $^{53}\text{Cr(VI)}$ ajoutée).

IV. Implications pour la gestion du risque

Nos résultats montrent que la spéciation du Cr(III) peut changer rapidement dans un milieu de test écotoxicologique standardisé (ISO 8692). La faible solubilité observée dans le cas du Cr(III) dans différentes expériences décrites dans cette thèse montre qu'il est nécessaire d'utiliser des protocoles développés pour les substances peu solubles afin d'appréhender correctement l'écotoxicité du Cr(III). La possibilité de changements très rapides (moins de 2 heures) dans la spéciation du Cr(III) ouvre de nouvelles pistes de recherche pour déterminer quelle serait l'espèce du Cr(III) provoquant les effets écotoxicologiques observables chez les différents organismes. En effet, une meilleure compréhension de la spéciation du Cr en conditions de laboratoire est une condition nécessaire pour l'application de ces résultats aux situations naturelles. L'apparition et la formation des (nano) particules de Cr au cours des essais mettent également en évidence une possible nano-écotoxicité du Cr(III) qui demande à être mieux étudiée.

Dans le cadre de l'optimisation des méthodes de l'évaluation du risque et du danger environnemental lié au Cr, il serait aussi nécessaire de vérifier si ce comportement s'applique à d'autres milieux (standardisés ou pas), à d'autres modèles ou même à d'autres paramètres servant à tester la toxicité (endpoints). De même, il serait judicieux de vérifier ce comportement et ces niveaux de toxicité du Cr(III) et du Cr(VI) dans des milieux plus représentatifs de l'environnement en termes de composition (p.ex., présence de matière organique, d'autres éléments traces à différentes concentrations). Enfin, les expériences de bioaccumulation montrent une biodisponibilité du Cr(III) et du Cr(VI) souvent comparable ce qui indique que le paradigme 'le Cr(VI) est plus biodisponible et écotoxique que le Cr(III)' serait une vision simpliste d'une réalité environnementale beaucoup plus complexe. Les approches utilisées dans cette thèse, ainsi que les interrogations que ce travail ouvre, sont autant de directions de recherche pour s'approcher de cette complexité.

Annexes

Annexe 1

Composition des différents milieux de culture ou d'exposition utilisés dans les différentes expériences.

Tableau 1 : Composition du milieu de culture algal Lefevre-Czarda (LC).

Composés	Concentration (mg/L)
Ca(NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O	40
KNO ₃	100
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	30
K ₂ HPO ₄	40
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,015
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4 H ₂ O	0,03
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,03
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,03
Mn(NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O	0,03
C ₆ H ₈ O ₂ , H ₂ O	0,03
H ₃ BO ₃	0,03
C ₆ H ₅ FeO ₇ , 5 H ₂ O	0,81
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0,31
FeCl ₃ , 6 H ₂ O	0,31

Tableau 2 : Composition du milieu de culture MHSM-1 utilisé dans les expériences avec l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.

Ions	Concentration (M)
NH ₄ ⁺	9.37 x 10 ⁻⁴
Cl ⁻	5.98 x 10 ⁻⁶
K ⁺	4.22 x 10 ⁻³
PO ₄ ³⁻	1.37 x 10 ⁻⁴
NO ₃ ⁻	5.07 x 10 ⁻³
SO ₄ ²⁻	8.12 x 10 ⁻⁵
Mg ²⁺	8.12 x 10 ⁻⁵
Ca ²⁺	6.80 x 10 ⁻⁵
Na ⁺	1.02 x 10 ⁻⁴
BO ₃ ³⁻	3.01 x 10 ⁻⁶
Mn	2.10 x 10 ⁻⁶
Fe	5.92 x 10 ⁻⁷
MoO ₄	3.00 x 10 ⁻⁸
Zn	2.43 x 10 ⁻⁸
Co	1.09 x 10 ⁻⁸
Cu	7.04 x 10 ⁻¹¹
EDTA	8.06 x 10 ⁻⁷
MOPS	10 ⁻²
CO ₂	Atm ^a

a : ouvert à l'atmosphère.

Tableau 3 : Composition de l'eau minérale Cristalline (Source Aurèle).

Composés	Concentration (mg/L)
Calcium	106
Magnésium	4,2
Sodium	3,5
Potassium	1,5
Hydrogénocarbonates	272
Chlorures	3,8
Sulfates	50
Nitrates	< 1
Silice	8,3
Fluor	0,9

Tableau 4 : Composition du milieu ISO 8692 utilisé dans les tests avec l'algue *P. subcapitata*.

Composés	Concentration (mg/L)
NaHCO ₃	50
NH ₄ Cl	15
MgCl ₂ ·6(H ₂ O)	12
CaCl ₂ ·2(H ₂ O)	18
MgSO ₄ ·7(H ₂ O)	15
K ₂ HPO ₄	1,6
FeCl ₃ ·6(H ₂ O)	0,08
Na ₂ EDTA·2(H ₂ O)	0,1
H ₃ BO ₃	0,185
MnCl ₂ ·4(H ₂ O)	0,415
ZnCl ₂	0,003
CoCl ₂ ·6(H ₂ O)	0,0015
Na ₂ MoO ₄ ·2(H ₂ O)	0,007
CuCl ₂ ·2(H ₂ O)	0,00001

Annexe 2

Protocoles utilisés pour les dosages des différents biomarqueurs sur Konelab. Ces protocoles ont été établis sur la dreissène par Garaud et al. (2015, 2016).

Antioxidant and antitoxic defences

Total Antioxidant Capacity (TAC), Total Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione-S-Transferase (GST) and catalase (CAT) activities were measured on the cytosolic fraction, while the Acid Phosphatase activity (ACP) was measured on the whole homogenate of the digestive gland using automated colorimetric methods adapted and developed on the Konelab 20-XTi (Thermo Scientific).

Total Antioxidant Capacity TAC was measured following the method developed by Erel (2004). 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{*+}) bleaching upon reduction by antioxidants in the cytosolic fraction was measured at 660nm after a 342 s incubation time. A Trolox standard calibration curve (0.01-1.5 mmol/L) was constructed and TAC was expressed in $\mu\text{mol Trolox equivalent/g protein/min}$ ($\mu\text{molTeq/gprot/min}$).

GPx activity was measured following the method from Paglia and Valentine (1967) adapted for its automation on the Konelab. Cytosolic fraction was diluted to 1/10 (v/v) in a total reactional volume of 160 μL 50 mM phosphate buffer (pH = 7.6) containing reduced glutathione (GSH, 2 mM), NADPH (0.36 mM), glutathione reductase (1 U/mL) and cumene hydroperoxyde (1,125 mM) as substrate. NADPH consumption was followed at 340 nm for 126 s and GPx activities were expressed in $\mu\text{mol NADPH/g protein/min}$ ($\mu\text{mol NADPH/g prot/min}$; $\epsilon \text{ NADPH} = 6220 \text{ M}^{-1}/\text{cm}$).

GST activity was measured on the Konelab automat by monitoring at 340 nm during 4 min the GST-catalyzed conjugation of 1-chloro 2,4-dinitrobenzene (CDNB; 1 mM) with GSH (1 mM) in phosphate buffer (0.1 M; pH 6.5) with 1/40 (v/v) of cytosolic fraction introduced in the reactive mixture. GST activity was expressed in $\mu\text{mol CDNB/g proteins/min}$ ($\mu\text{mol CDNB/g prot/min}$).

Catalase activity was measured on a classic spectrophotometer according to Beers and Sizer (1952). Cytosolic fraction was diluted to 1/4 in 50 mM phosphate buffer (pH=7.6). The decomposition of hydrogen peroxide (30 mM) catalysed by catalase was followed at 240 nm during 30 seconds with 1/10 (v/v) of diluted cytosolic fraction introduced into the reactive mixture. Enzyme activity was expressed in mmol H₂O₂/g proteins/min (mmol H₂O₂/g prot/min; ϵ H₂O₂ = 40 M⁻¹/cm).

Whole homogenate ACP activity was measured on the Konelab automat by monitoring 4-nitrophenyl phosphate (1.67 g/L) hydrolysis by acid phosphatase of diluted (1/18 v/v) whole homogenate in a total reactional volume of 90 μ L 41.7 mM citrate buffer (pH=4.8) supplemented with 0.16% Triton X- 100. The reaction was stopped and the p-nitrophenol released was revealed after 15 min by the addition of 125 μ L NaOH 138.7 mM. A p nitrophenol standard calibration curve was constructed and ACP activity was expressed in μ mol p-nitrophenol/g proteins/h (μ molp-nit/gprot/h).

Protein concentration was determined by the Pyrogallol red colorimetric method using ready to-use U/CSF protein reagents and Scal bovine-based serum as reference (Thermo-Scientific).

Cellular damage assessment

Lipid hydroperoxide concentration ([LOOH]) in the whole homogenate was measured on the Konelab following the automated method developed by Arab and Steghens (2004) with minor modifications on the final Xylenol Orange (XO) concentration (240 mM) and on the working wavelength (620nm). Fe²⁺ oxidation into Fe³⁺ by LOOH contained in the whole homogenate was revealed by Fe³⁺ complexation with XO. XO-Fe³⁺ complex absorbance was measured at 620 nm after a 20 min incubation time. A Tert-butyl hydroperoxide (TBH) standard calibration curve (6.25-200 μ mol/L) was constructed and LOOH contents were expressed in μ mol TBH/g proteins (μ mol TBH/g prot).

Caspase-3 (CSP-3) activity was measured in the cytosolic fraction following an automated method developed on the Konelab. The absorbance of pNA released by the cleavage of z-DEVD-pNA (25 μ M) by CSP-3 in Tris buffer (10 mM, pH=7.4) supplemented with DTT (5 mM) and EDTA (2 mM) was followed for 1h at 405 nm with 1/7 (v/v) of diluted cytosolic

fraction introduced into the reactive mixture. CSP-3 activity was expressed in $\mu\text{mol pNA/g proteins/h}$ ($\mu\text{mol pNa/g prot/h}$, $\epsilon \text{ pNA}=10500 \text{ M}^{-1}/\text{cm}$ at 405 nm).

Energetic parameters

Protein, triglyceride and cholesterol concentrations ([prot], [trigly.] and [chol.]) were measured using Thermo-Scientific Konelab ready-to-use reagents and methods adapted to mussel digestive gland whole homogenate. Scal bovine-based serum (Thermo-Scientific) was used to create calibration curves and energetic reserve contents were expressed in mg/g fresh weight (mg/g fw).

Electron Transport System (ETS) mitochondrial activity was measured on the whole homogenate following the original method from Owens and King (1975) modified by De Coen and Janssen (1997) and automated on the Konelab. ETS activity was measured by monitoring at 480 nm for 12 min the formazan produced by p-iodonitrotetrazolium (0.133 g/L) reduction as final electron acceptor of the mitochondrial respiratory chain in 80 mM phosphate buffer (pH=8.5) containing MgSO_4 (15 μM), Triton X-100 (0.16%), PVP (0.3 g/L), NADH (1 mM) and NADPH (0.15 mM) with 1/35 (v/v) of diluted whole homogenate. ETS activity was calculated according to De Coen and Janssen (1997) and expressed in $\mu\text{mol O}_2/\text{g fresh weight/h}$ ($\mu\text{mol O}_2/\text{g fw/h}$).

Lactate Dehydrogenase (LDH) activity was measured using Thermo-Scientific Konelab ready-to-use reagents and methods (LDH IFCC) adapted to mussel digestive gland cytosolic fraction. LDH activity was expressed $\mu\text{mol NADH/g proteins/h}$ ($\mu\text{mol NADH/g prot/h}$).

Tableau 1 : Moyennes \pm écart-types des valeurs des biomarqueurs cellulaires mesurées sur les tissus (branchies et glandes digestives) de *C. fluminea* exposées à différentes conditions (0, 5, 50 et 500 $\mu\text{g/L}$ de Cr(III) ou Cr(VI)) pendant 24 ou 96 h.

Biomarqueur	Condition	durée d'exposition	Branchies				Glandes digestives			
			0 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	0 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$
protéines broyat (mg/g MF)	témoin	24 h	19,1 \pm 3,5				38,7 \pm 1,5			
	Cr(III)		18,7 \pm 3,5	17,3 \pm 4,9	18 \pm 4,6		36 \pm 6,4	37,1 \pm 6,3	41,4 \pm 4,8	
	Cr(VI)		18,9 \pm 2,8	18,7 \pm 1,3	18,1 \pm 1		44,1 \pm 7	37,9 \pm 4,8	31,0 \pm 5,3	
	témoin	96 h	20,4 \pm 1,3				39,8 \pm 2,5			
	Cr(III)		18,1 \pm 1,2	16,9 \pm 4,5	13,4 \pm 2,4		37,2 \pm 5,2	34,8 \pm 7,6	33,3 \pm 10	
	Cr(VI)		15,7 \pm 1,1	16,6 \pm 1,2	16,2 \pm 2,6		34,8 \pm 4,2	34,7 \pm 5,8	39,8 \pm 3,5	
protéines fraction cytosolique (mg/g MF)	témoin	24 h	12,6 \pm 1,8				27,8 \pm 2,5			
	Cr(III)		11,9 \pm 0,8	12,3 \pm 1,4	11,8 \pm 0,3		25,5 \pm 3,5	26,9 \pm 4,7	30,4 \pm 1,9	
	Cr(VI)		12,9 \pm 1,4	12,9 \pm 1,2	12,6 \pm 1,1		31,5 \pm 5,9	25,7 \pm 2,6	23,6 \pm 5,1	
	témoin	96 h	10 \pm 0,7				25,6 \pm 2,2			
	Cr(III)		12,4 \pm 1	10,7 \pm 2,3	8,7 \pm 1,4		26,3 \pm 2,8	25,4 \pm 6,4	24,9 \pm 6,8	
	Cr(VI)		10,9 \pm 0,8	11,1 \pm 0,8	11,3 \pm 1,6		24,7 \pm 2,4	24,3 \pm 4	25,8 \pm 2,3	
Cholestérol (mg/g MF)	témoin	24 h	1 \pm 0,3				1,5 \pm 0,2			
	Cr(III)		0,7 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1		1,4 \pm 0,3	1,4 \pm 0,4	1,6 \pm 0,3	
	Cr(VI)		0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1		1,7 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1	1,5 \pm 0,2	
	témoin	96 h	0,7 \pm 0,1				1,6 \pm 0,3			
	Cr(III)		0,7 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1		1,5 \pm 0,3	1,5 \pm 0,4	1,5 \pm 0,3	
	Cr(VI)		0,6 \pm 0,01	0,6 \pm 0,01	0,6 \pm 0,1		1,6 \pm 0,2	1,5 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	

Suite du tableau 1 : Moyennes \pm écart-types des valeurs des biomarqueurs cellulaires mesurées sur les tissus (branchies et glandes digestives) de *C. fluminea* exposées à différentes conditions (0, 5, 50 et 500 $\mu\text{g/L}$ de Cr(III) ou Cr(VI)) pendant 24 ou 96 h.

Biomarqueur	Condition	durée d'exposition	Branchies				Glandes digestives			
			0 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	0 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$
Triglycérides (mg/g MF)	témoin		1 \pm 0,5				4,5 \pm 0,6			
	Cr(III)	24 h		1,2 \pm 0,2	1,1 \pm 0,4	1,2 \pm 0,5		5,2 \pm 1,8	4,1 \pm 0,9	4,7 \pm 0,6
	Cr(VI)			1,2 \pm 0,2	1 \pm 0,1	0,9 \pm 0,2		6,1 \pm 0,8	6,1 \pm 1	4,5 \pm 1,1
	témoin		1,2 \pm 0,1				5,5 \pm 0,2			
	Cr(III)	96 h		1,2 \pm 0,1	1 \pm 0,3	0,8 \pm 0,2		5,2 \pm 1,2	4,8 \pm 0,9	4,9 \pm 1,5
	Cr(VI)			0,9 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,2		4,8 \pm 0,7	4,7 \pm 0,7	4,0 \pm 0,4
ETS ($\mu\text{mol O}_2/\text{g MF/h}$)	témoin		43,4 \pm 7,4				61 \pm 2,9			
	Cr(III)	24 h		44,6 \pm 9,5	38,6 \pm 9,1	40,9 \pm 6,8		39 \pm 5,8	49,1 \pm 12,7	59,1 \pm 5,5
	Cr(VI)			41,2 \pm 5,2	42,5 \pm 2,3	40,4 \pm 2,2		64,5 \pm 1,6	65 \pm 7,5	54,3 \pm 6,9
	témoin		43,4 \pm 1,9				66,4 \pm 11,6			
	Cr(III)	96 h		34,6 \pm 0,8	31,8 \pm 12,5	19,2 \pm 4,8		66,8 \pm 6	118,9 \pm 39,2	72,2 \pm 19
	Cr(VI)			36,1 \pm 1,5	36,5 \pm 2,7	35,8 \pm 1,5		60,1 \pm 2,7	64,6 \pm 2,7	76,5 \pm 14,9
LOOH (nmol/g prot)	témoin		138 \pm 13				200 \pm 24			
	Cr(III)	24 h		151 \pm 13	134 \pm 18	121 \pm 20		241 \pm 16	199 \pm 35	183 \pm 9
	Cr(VI)			142 \pm 10	148 \pm 17	145 \pm 12		167 \pm 12	191 \pm 17	194 \pm 39
	témoin		132 \pm 8				168 \pm 15			
	Cr(III)	96 h		155 \pm 8	168 \pm 42	148 \pm 12		171 \pm 13	192 \pm 18	217 \pm 46
	Cr(VI)			163 \pm 14	152 \pm 11	157 \pm 9		198 \pm 29	214 \pm 16	168 \pm 8

Suite du tableau 1 : Moyennes \pm écart-types des valeurs des biomarqueurs cellulaires mesurées sur les tissus (branchies et glandes digestives) de *C. fluminea* exposées à différentes conditions (0, 5, 50 et 500 $\mu\text{g/L}$ de Cr(III) ou Cr(VI)) pendant 24 ou 96 h; - : valeur non déterminée.

Biomarqueur	Condition	durée d'exposition	Branchies				Glandes digestives			
			0 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	0 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$
ACP ($\mu\text{mol/g prot/h}$)	témoin		107 \pm 17				81 \pm 38			
	Cr(III)	24 h		116 \pm 9	107 \pm 16	108 \pm 10		89 \pm 28	120 \pm 41	99 \pm 27
	Cr(VI)			113 \pm 8	113 \pm 8	104 \pm 6		124 \pm 15	132 \pm 4	125 \pm 23
	témoin		95 \pm 7				84 \pm 24			
	Cr(III)	96 h		106 \pm 7	106 \pm 7	92 \pm 9		111 \pm 33	104 \pm 38	113 \pm 29
	Cr(VI)			102 \pm 8	105 \pm 1	95 \pm 6		87 \pm 16	122 \pm 37	88 \pm 17
LDH ($\mu\text{molNADPH/g prot/h}$)	témoin		113,7 \pm 13				129 \pm 27			
	Cr(III)	24 h		100 \pm 12	106 \pm 32	108 \pm 33		116 \pm 30	157 \pm 78	121 \pm 50
	Cr(VI)			108 \pm 17	98 \pm 18	103 \pm 18		133 \pm 32	107 \pm 48	175 \pm 40
	témoin		96 \pm 10	111			129 \pm 71			
	Cr(III)	96 h		90 \pm 12	111 \pm 58	183 \pm 32		94 \pm 73	130 \pm 77	93 \pm 34
	Cr(VI)			85 \pm 3	75 \pm 16	120 \pm 16		138 \pm 50	156 \pm 79	112 \pm 35
TAC ($\mu\text{molTeq/g prot/min}$)	témoin		-				22,7 \pm 6,7			
	Cr(III)	24 h		-	-	-		25 \pm 4	29 \pm 9	18 \pm 3
	Cr(VI)			-	-	-		27 \pm 4	27 \pm 4	37 \pm 5
	témoin		-				26,8 \pm 9,6			
	Cr(III)	96 h		-	-	-		24 \pm 10	22 \pm 9	18,8 \pm 5
	Cr(VI)			-	-	-		22 \pm 5	27 \pm 10	20 \pm 3

Suite du tableau 1 : Moyennes \pm écart-types des valeurs des biomarqueurs cellulaires mesurées sur les tissus (branchies et glandes digestives) de *C. fluminea* exposées à différentes conditions (0, 5, 50 et 500 $\mu\text{g/L}$ de Cr(III) ou Cr(VI)) pendant 24 ou 96 h; - : valeur non déterminée.

Biomarqueur	Condition	durée d'exposition	Branchies				Glandes digestives			
			0 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	0 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$
Gpx ($\mu\text{mol NADPH/g prot/min}$)	témoin	24 h	15,5 \pm 10,6				37 \pm 29			
	Cr(III)		2,9 \pm 8,4	8,6 \pm 9,6	13,4 \pm 3,3		38 \pm 23	52 \pm 29	20 \pm 5,7	
	Cr(VI)		14,5 \pm 6,3	14,8 \pm 7,7	16,4 \pm 8,4		31 \pm 6	35 \pm 36	76 \pm 51	
	témoin	96 h	9,7 \pm 2,3				33 \pm 23			
	Cr(III)		4,8 \pm 2,3	3,4 \pm 11,4	2,4 \pm 34,6		26 \pm 18	37 \pm 36	52 \pm 50	
	Cr(VI)		-	-	0,2 \pm 11,4		23 \pm 6	11 \pm 7	10 \pm 6,7	
GST($\mu\text{mol CDNB/g prot/min}$)	témoin	24 h	391 \pm 46				708 \pm 190			
	Cr(III)		397 \pm 67	384 \pm 170	367 \pm 114		887 \pm 208	955 \pm 611	583 \pm 146	
	Cr(VI)		366 \pm 25	301 \pm 47	303 \pm 35		632 \pm 144	746,7 \pm 43	1068 \pm 205	
	témoin	96 h	348 \pm 84				607 \pm 173			
	Cr(III)		277 \pm 75	387 \pm 106	329 \pm 65		643 \pm 205	612 \pm 260	605 \pm 80	
	Cr(VI)		597 \pm 87	443 \pm 57	441 \pm 165		701 \pm 173	841 \pm 337	695 \pm 174	
CSP3 ($\mu\text{mol pNA/g prot/h}$)	témoin	24 h	6,1 \pm 2				4,9 \pm 3,3			
	Cr(III)		10,2 \pm 5	8 \pm 5,5	18,7 \pm 6,5		6,3 \pm 4,2	7,6 \pm 7,5	7,1 \pm 5,7	
	Cr(VI)		6,3 \pm 0,5	5,9 \pm 1,4	10,5 \pm 5,2		10 \pm 5,2	8,5 \pm 6,2	19 \pm 8,4	
	témoin	96 h	7,2 \pm 1,7				1,2 \pm 2,7			
	Cr(III)		6,3 \pm 2,7	4,1 \pm 0,8	3 \pm 1,2		6,8 \pm 7,7	4,8 \pm 7,1	1,7 \pm 1,3	
	Cr(VI)		4,7 \pm 1,1	5,3 \pm 1,8	9,5 \pm 3,5		2,6 \pm 2,6	5,8 \pm 6,4	1,2 \pm 1	

Suite du tableau 1 : Moyennes \pm écart-types des valeurs des biomarqueurs cellulaires mesurées sur les tissus (branchies et glandes digestives) de *C. fluminea* exposées à différentes conditions (0, 5, 50 et 500 $\mu\text{g/L}$ de Cr(III) ou Cr(VI)) pendant 24 ou 96 h; - : valeur non déterminée.

Biomarqueur	Condition	durée d'exposition	Branchies				Glandes digestives			
			0 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	0 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$
Catalase (mmole H_2O_2 consommé/g prot/min)	témoin	24 h	41 \pm 1,3				72 \pm 15			
	Cr(III)		47 \pm 2,8	42 \pm 7,7	43 \pm 5,5		89 \pm 25	-	105 \pm 63	
	Cr(VI)		40 \pm 6,9	37 \pm 4,2	39 \pm 3,5		82 \pm 16	78 \pm 43	99 \pm 39	
	témoin	96 h	41 \pm 4,2				63 \pm 22			
	Cr(III)		43 \pm 2,7	42 \pm 17	34 \pm 11		52 \pm 22	34 \pm 37	62 \pm 36	
	Cr(VI)		49 \pm 8,9	45 \pm 4,3	46 \pm 9,3		67 \pm 37	67 \pm 21	73 \pm 28	

Annexe 3

Tests de synthèse de nanoparticules de Cr

Dans cette partie, des essais de synthèse de particules de Cr(III) (hydroxydes de Cr(III)) ayant des caractéristiques définies en termes de taille ont été menés en collaboration avec le Dr. Eric Meux (Institut Jean Lamour, Université de Lorraine, Metz). Les expériences par NTA et SPC ayant mis en évidence une formation de (nano)particules contenant du Cr dans le milieu de test ISO 8692 dopé avec du Cr(III) (Chapitre 3, partie 1), cette synthèse a été faite dans le but de pouvoir tester la toxicité de nanoparticules de Cr en absence de Cr(III) dissous (du moins au début du test écotoxicologique).

Parmi les méthodes utilisées pour la préparation de particules d'hydroxydes de chrome à partir de solutions de Cr(III), la plus étudiée est celle de l'hydrolyse forcée (Matijević, 1976). Cette technique consiste à faire vieillir des solutions aqueuses de Cr(III) à des températures relativement élevées (60–90°C) pendant de longues périodes (de 18 h à plusieurs jours). Dans certaines conditions, elle permet d'obtenir des particules sphériques, mono-dispersées et amorphes de nature polymérique. Son principal inconvénient est la durée des périodes de synthèse. Dans nos expériences, nous avons suivi le protocole optimisé par Gómez Morales et al. (2003) pour réduire le temps de synthèse et produire des particules avec une distribution de taille étroite. Il s'agit d'utiliser le chauffage par micro-ondes au lieu d'un chauffage classique pour la précipitation d'hydroxydes de Cr à partir de solutions aqueuses homogènes de Cr(III).

Des solutions de sulfate de potassium et de Cr(III) ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; ACS reagent, $\geq 98\%$, Prolabo) ont été préparées à des concentrations de Cr entre $5 \cdot 10^{-3}$ et 10^{-1} M et utilisées pour la synthèse des nanoparticules de Cr. Un micro-ondes diélectrique CEM DISCOVER (Figure A), permettant de travailler dans différentes conditions contrôlées (système fermé ; jusqu'à 80 mL de volume ou système ouvert jusqu'à 125 mL de volume), a été utilisé pour réaliser plusieurs expériences dans des conditions variables de température, puissance, temps de réaction et concentration initiale de chrome. La température utilisée lors de nos tests variait entre 90 et 175 °C, la puissance utilisée entre 30 et 90 W et le temps de réaction entre 2 et 35 minutes. A la fin de chaque synthèse, une caractérisation des particules dans l'échantillon a été faite par granulométrie Laser (Malvern, Model 127).

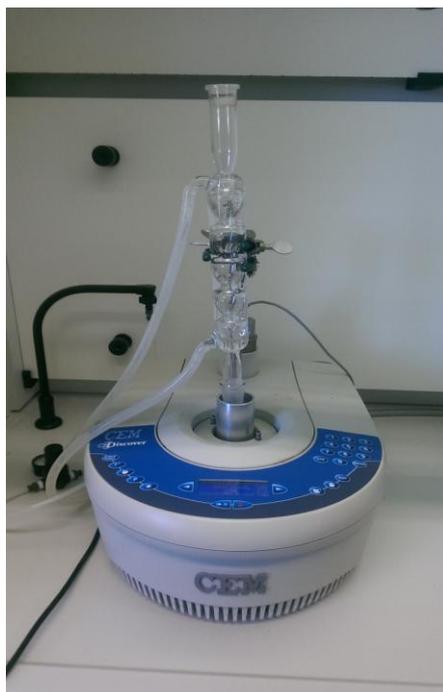


Figure A : Instrument à micro-ondes diélectrique utilisé pour la synthèse de nanoparticules de chrome (photo I. Aharchaou).

Nous n'avons pas pu mettre en évidence la formation de ces particules. En effet, comme évoqué dans les conclusions, nous n'avons pas pu réaliser une caractérisation physique des particules par diffraction laser.

Références bibliographiques

- Gómez Morales, J., García Carmona, J., Rodríguez Clemente, R., Muraviev, D., 2003. Preparation of Chromium Hydroxide Sub-micro- and Nanoparticles by Microwave Dielectric Heating. *Langmuir* 19, 9110–9113. doi:10.1021/la0343167
- Matijević, E., 1976. Preparation and characterization of monodispersed metal hydrous oxide sols, in: MÜller, F.H., Weiss, A., Wolfram, E. (Eds.), *Colloids and Surfaces, Progress in Colloid & Polymer Science*. Steinkopff, pp. 24–35.

Communications scientifiques issues du travail de thèse

- **Communications orales dans des congrès internationaux**

- Aharchaou I., Battaglia E., Vignati D.A.L. Trivalent chromium chemistry, when considered, makes it more toxic than the hexavalent chromium in algal toxicity test. *SETAC Europe 24th annual meeting*, 11–15th May 2014, Bâle, Suisse.
- Vignati D.A.L., Aharchaou I., Battaglia E., Meux E., Ponti B., Ferrari B.J.D., Bettinetti R. Is current knowledge of Cr(III) ecotoxicity to aquatic organisms based on data in inadequate quality? *SETAC North America 35th annual meeting*, 9–13th November 2014, Vancouver, Canada.
- Aharchaou I., Vignati D.A.L., Battaglia E., Liu F., Fortin C. Uptake and intracellular distribution of trivalent and hexavalent chromium in a freshwater alga. *SETAC Europe 25th annual meeting*, 3–7th May 2015, Barcelona, Spain.

- **Communications orales dans des congrès nationaux**

- Aharchaou I., Masfaraud J.-F., Arab M., Vignati D.A.L. Effets du chrome sur l'efficacité du photosystème II d'une algue verte. *Colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée*, 1st–2nd July 2014, Besançon, France.

- **Communications affichées dans des congrès internationaux**

- Vignati D.A.L., Gonzalez V., Aharchaou I., Fortin C. Wrong conclusions from correct results in metal toxicity. *SETAC Europe 24th annual meeting*, 11–15th May 2014, Bâle, Suisse.
- Aharchaou I., Battaglia E., Masfaraud J.-F., Meux E., Rousselle P., Arab M., Vignati D.A.L. Effects of chromium (III) and chromium (VI) on the photosynthetic activity in a freshwater green alga. *SETAC North America 35th annual meeting*, 9–13th November 2014, Vancouver, Canada.
- Aharchaou I., Py J.-S., Battaglia E., Cambier S., Vignati D.A.L. Chromium speciation in standard ecotoxicological test medium: implication for hazard and risk assessment. *Young environmental scientist meeting*, 14–19th March 2015, Petnica, Serbia.
- Aharchaou I., Py J.-S., Battaglia E., Cambier S., Loizeau J.-L., Vignati D.A.L. The importance of speciation in chromium hazard and risk assessment. *SETAC Europe 26th annual meeting*, 22–26th May 2016, Nantes, France.
- Aharchaou I., Battaglia E., Poirot H., Pons M.-N., Vignati D.A.L. Understanding Cr biological fate in freshwater bivalves and identification of biomarkers. *SETAC Europe 26th annual meeting*, 22–26th May 2016, Nantes, France.

- **Communications orales dans des séminaires**

- Aharchaou I., Py J.-S., Cambier S., Battaglia E., Vignati D.A.L. Spéciation du chrome pendant les tests de toxicité: implications dans l'évaluation du danger et du risque. *Journée des doctorants-DocDay*, 5 Avril 2015, Nancy, France.

- Aharchaou I., Vignati D.A.L., Battaglia E., Liu F., Fortin C. Internalisation et distribution intracellulaire du Cr(III) et Cr(VI) dans une algue d'eau douce. *Séminaire Scientifique du Labex R21*, 16 Octobre 2015, Nancy, France.
- **Communications affichées dans des séminaires**
- Vignati D.A.L., Aharchaou I., Battaglia E., Fortin C. Uptake and intracellular distribution of Cr(III) in freshwater algae. *Séminaire du Labex R21*, 20 Janvier 2015, Nancy, France.

Écotoxicité et bioaccumulation du Cr(III) et du Cr(VI) : spéciation, biodisponibilité et effets biologiques

L'écotoxicité des éléments traces vis-à-vis du vivant est contrôlée par leur bioaccessibilité, leur biodisponibilité et leurs interactions avec le(s) site(s) d'action à l'intérieur des organismes. Dans le cas des certains éléments, l'existence dans le milieu naturel de plusieurs formes redox ayant des propriétés différentes doit aussi être prise en considération. Dans le cas spécifique du Cr, le consensus général considère le Cr(III) comme moins écotoxique que le Cr(VI). Toutefois, plusieurs études récentes soulignent que ce consensus devrait être réexaminé. Plus particulièrement, une connaissance insuffisante de la spéciation du Cr(III) pendant les tests en laboratoire pourrait avoir conduit à une sous-estimation de sa biodisponibilité et écotoxicité. Ce travail de thèse s'intéresse donc aux relations entre spéciation, biodisponibilité et bioaccumulation du Cr(III) et Cr(VI) dans différents modèles biologiques pour mieux appréhender leur potentiel écotoxique ainsi que leurs mécanismes d'interaction avec le vivant.

Des études ont été menées chez les algues *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlamydomonas reinhardtii*, le bivalve *Corbicula fluminea* et des cultures de cellules d'ovaire d'hamster chinois (CHO). L'ensemble des résultats de ce travail suggère que la validité du paradigme 'le Cr(VI) est plus écotoxique que le Cr(III)' serait dépendante des conditions d'exposition et du modèle biologique utilisé. Ce paradigme, accepté tant par la communauté scientifique que par les gestionnaires environnementaux, nécessite donc un réexamen afin d'assurer une meilleure gestion des risques liés au Cr.

Mots clés : chrome, spéciation, bioaccumulation, écotoxicité

Ecotoxicity and bioaccumulation of Cr(III) and Cr(VI): speciation, bioavailability and biological effects

The ecotoxicity of the trace elements to the living organisms is controlled by their bioaccessibility, their bioavailability and their interactions with the site(s) of action inside the organisms. In the case of certain elements, the existence in the natural environment of several redox forms having different properties must also be taken into consideration. In the specific case of Cr, general consensus considers Cr(III) to be less ecotoxic than Cr(VI). However, several recent studies highlight that this consensus should be re-examined. In particular, insufficient knowledge of Cr(III) speciation during laboratory tests may have led to an underestimation of its bioavailability and ecotoxicity. This work focuses on the relationship between speciation, bioavailability and bioaccumulation of Cr(III) and Cr(VI) in different biological models in order to better understand their ecotoxic potential as well as their mechanisms of interaction with living organisms.

Studies have been conducted on the algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii*, the bivalve *Corbicula fluminea* and cultures of Chinese hamster ovary cells (CHO). The results of this work suggest that the validity of the paradigm 'Cr(VI) is more ecotoxic than Cr(III)' would be dependent on the exposure conditions and the used biological model. This paradigm, accepted by both the scientific community and the environmental managers, requires a reassessment to ensure a better management of Cr risks.

Keywords: chromium, speciation, bioaccumulation, ecotoxicity